

سورة

A highly stylized, black calligraphic flourish. It begins with a small, elegant script character at the top, which then flows into a series of thick, sweeping curves and loops. The design is symmetrical and ends in two solid black diamond shapes at the bottom.



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

مطالعه‌ی هم‌بیانی و تکاملی برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین

در گیاه تک‌لیپه و دولپه

نگارنده: فاطمه جعفرزاده قمی

استاد راهنما

دکتر شاهرخ قرنجیک

شهریور ۱۳۹۸

تقدیم اثر

به پدر و مادر عزیز و بزرگوارم به پاس قدردانی از تمام زحمات و حمایت های بی دریغشان

و

خواهر های عزیزتر از جان و برادر مهربانم

تشکر و قدردانی

راسی رابسی ارم از روی برم پرومکدی را ار یتیم سا تاهسا ست پر بار وجود ان بیایم پشاور

ابرا و یرم وازسا وجود ان خدا نمودا تن یم وایرنی بو نشان ت اری است

بر سرم و نشان دینی است بر بودم را این دو وجود پس از پروردار ما ستی ام بود اندوتم را تندورا

رمن را دین وادی زندگی پر از شیازو موتند جا بر این ت نری است ا دو تقدیم نان

از استاد رانقدر جنا ی هر تر ل یه در ما ر با حسن و بر مونی ویت را نمای

این نملین را بر ر تنما تشکر دارم

از اساتید رنا ی دتر امین ابرایمی و ی دتر پرویز حیدرتی ا ار اردوی ان ردا تم اسنارم

از دوستان عزیزم و بو جنا ی ندس برید سیمانی نهاد ا ام این و یاری بردند اسنارم

مرج رزاد می هر پور

تهدنامه

اینجانب فاطمه جعفرزاده قمی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه مطالعه هم‌بپانی و تکاملی برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در گیاه تک لپه و دو لپه تحت راهنمایی دکتر شاهرخ قرنجیک متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

لیگنین یکی از بیشترین پلی‌مرهای زیستی آروماتیک است و قسمت اعظمی از دیواره‌ی سلولی را تشکیل می‌دهد. لیگنین نقش‌های متعددی در دفاع گیاهان دارد، لیگنین و یا ترکیب‌های فنولی شبه لیگنین اغلب به سرعت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پاسخ می‌دهند. شوری خاک یکی از مهم‌ترین عوامل نامساعد و تنش‌زای غیر زنده است که اثر نامطلوبی بر تولید و کیفیت محصولات کشاورزی دارد و یکی از عوامل محدود کننده‌ی کشت برنج و سویا در سراسر دنیا معرفی شده است. در این پژوهش برای مطالعه ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین از ابزار بیوانفورماتیک و داده‌های ریزآرایه استفاده شد. برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در مقاومت گیاه به تنش شوری نقش دارند. بنابراین این ژن‌ها (PAL، 4CL، CCR) در دو گیاه مدل سویا (دو لپه) و برنج (تک لپه) انتخاب شدند. بررسی‌های هم‌بیانی این ژن‌ها به منظور یافتن ژن‌های هم‌بیان با ژن‌های اصلی و ژن‌هایی که عملکرد ناشناخته‌ای دارند اما احتمالاً در بیوسنتز لیگنین و مسیرهای دیگر نقش دارند، انجام شد. بررسی بیان ژن 4CL و ژن هم‌بیانش، چالکون سنتتاز و نیز ژن STR به عنوان ژن هم‌بیان با PAL و CCR تحت تیمار شوری در دو رقم حساس (L17) و مقاوم (ویلیامز) سویا و در دو سطح ۰ و ۲۰۰ میلی مولار و ۴ بازه زمانی ۰، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت، توسط دستگاه PCR زمان واقعی انجام شد. نتایج بیان ژن نشان داد که ژن 4CL در رقم حساس سویا در ۶ ساعت اول اعمال تنش شوری بیان بیشتری نسبت به رقم مقاوم داشته و در زمان ۲۴ ساعت هر دو رقم افزایش بیان معنی داری داشتند. بیان ژن CHS در زمان ۲۴ ساعت مشابه با ژن 4CL بود و ژن STR در همه زمان‌ها افزایش بیان داشت. بررسی‌های آزمایشگاهی بررسی‌های بیوانفورماتیک را تایید کرد و نشان داد که ژن‌های هم‌بیان، پروفایل بیانی مشابهی دارند. آنالیز پروموتور نشان داد که در بالادست این ژن‌ها جایگاه اتصال برای تعدادی از فاکتورهای رونویسی که در مسیر بیوسنتز لیگنین و فنیل پروپانویدها دخالت دارند، وجود دارد.

کلمات کلیدی: لیگنین، تنش شوری، ژن هم‌بیان، بیان ژن

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

1- Jafarzadeh qomi, f., Gharanjik, .sh. (2019) Expression of 4-Coumarate-CoA ligase gene in sensitive and tolerant soybean cultivar under salt stress, Intentional student Biotechnology Congress, 25-27 February 2019, University of Tehran.

۲- جعفرزاده قمی، ف.، قرنجیک. ش.، (۱۳۹۸) " شناسایی ژن‌های هم‌بیان با آنزیم

فنیل‌آلانین‌آمونیا لایاز (PAL) و 4-کومارات کوآنزیم‌آلیگاز (4CL) در مسیر بیوسنتز لیگنین در سویا و

برنج"، سومین همایش بین‌المللی و یازدهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ۱۰ تا

۱۲ شهریورماه ۱۳۹۸. مرکز همایش‌های بین‌المللی رازی

۳- جعفرزاده قمی، ف.، قرنجیک. ش.، (۱۳۹۸) بررسی نحوه پاسخ ژن چالکون سنتتاز تحت تنش

شوری در ارقام حساس و متحمل سویا، سومین همایش بین‌المللی و یازدهمین همایش ملی

بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ۱۰ تا ۱۲ شهریورماه ۱۳۹۸. مرکز همایش‌های بین‌المللی رازی

مرمت الب

د	فهرست جدول‌ها
ه	فهرست شکل‌ها
۱	فصل ۱ مقدمه
۲	۱-۱ مقدمه.....
۵	۲-۱ اهداف تحقیق.....
۷	فصل ۲ کمیت و کیفیت پوشش
۸	۱-۲ گیاه‌شناسی.....
۹	۲-۲ بیان مسئله.....
۱۰	۳-۲ تنش شوری.....
۱۲	۴-۲ دیواره سلولی.....
۱۴	۱-۴-۲ سلولز.....
۱۵	۲-۴-۲ همی سلولز.....
۱۵	۳-۴-۲ پکتین.....
۱۵	۴-۴-۲ لیگنین.....
۱۷	۵-۲ لیگنین و ساختار آن.....
۲۰	۶-۲ بیوسنتز لیگنین.....
۲۳	۷-۲ بیان ژن.....
۲۴	۸-۲ ژن‌های هم‌بیان.....
۲۷	۹-۲ مروری بر پژوهش‌های انجام شده.....

- ۳-۱-۱ بخش بیوانفورماتیک ۳۸
- ۳-۱-۱-۱ شناسایی ژن های کد کننده آنزیم های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین ۳۸
- ۳-۱-۲ موقعیت کروموزومی ۳۸
- ۳-۱-۳ بررسی الگوی اینترون و اگزون ۳۹
- ۳-۱-۴ بررسی روابط تکاملی و فیلوژنتیکی توالی های پروتئینی ۴۰
- ۳-۱-۵ بررسی وقوع دو برابر شدگی ژن ها ۴۱
- ۳-۱-۶ مکان فعالیت آنزیم ها ۴۲
- ۳-۱-۷ بررسی برهم کنش پروتئین های هدف با سایر پروتئین ها و ترکیبات ۴۳
- ۳-۱-۸ بررسی های هم بیانی ۴۳
- ۳-۱-۹ رسم شبکه هم بیانی ۴۶
- ۳-۱-۱۰ آنالیز TFBS های ژن های هم بیان ۴۶
- ۳-۲-۱ بخش آزمایشگاهی ۴۷
- ۳-۲-۱-۱ محل و زمان اجرای طرح ۴۷
- ۳-۲-۲ مواد گیاهی ۴۷
- ۳-۲-۳ کشت ارقام گیاهی و القای تنش ۴۷
- ۳-۲-۴ نمونه برداری از گیاهچه ها ۴۸
- ۳-۲-۵ اندازه گیری بیان ژن ها تحت تنش ۴۸
- ۳-۲-۶ بررسی بیان با استفاده از qRT-PCR ۴۹
- ۳-۲-۷ تهیه استوک آغازگرها ۵۲
- ۳-۲-۸ تحلیل داده های واکنش qRT-PCR با روش لیواک ۵۳

- ۱-۴ شناسایی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین ۵۶
- ۲-۴ مکان قرار گیری ژن‌ها بر روی کروموزوم ۵۶
- ۱-۲-۴ آنالیز تکاملی PAL ۵۹
- ۲-۲-۴ آنالیز تکاملی 4CL؛ : ۶۱
- ۳-۲-۴ آنالیز تکاملی CCR ۶۳
- ۴-۲-۴ بررسی مکان فعالیت پروتئین‌ها: ۶۵
- ۵-۲-۴ بررسی برهم‌کنش آنزیم‌های PAL، CCR و 4CL با سایر پروتئین‌ها ۶۶
- ۳-۴ بررسی شبکه هم‌بیانی PAL ۷۵
- ۱-۳-۴ بررسی شبکه هم‌بیانی 4CL ۸۴
- ۲-۳-۴ بررسی شبکه هم‌بیانی CCR ۹۰
- ۴-۴ آنالیز توالی بالادست ۹۶
- ۵-۴ نتایج آزمایشگاهی ۱۰۲
- ۱-۵-۴ بررسی کیفیت و کمیت RNA ۱۰۲
- ۲-۵-۴ اندازه‌گیری بیان ژن‌ها تحت تنش با استفاده از qRT-PCR ۱۰۳
- ۳-۵-۴ بررسی بیان ژن ۴-کومارات کوآنزیم آلیگاز (4CL) ۱۰۵
- ۴-۵-۴ بررسی بیان ژن چالکون سنتتاز (CHs) ۱۰۶
- ۵-۵-۴ بررسی بیان ژن Strictosidine Synthase (STR) ۱۰۷
- ۶-۴ بحث ۱۰۸
- ۷-۴ نتیجه‌گیری ۱۱۰
- ۸-۴ پیشنهادها ۱۱۳

فهرست جدول‌ها

جدول ۳-۱. دمای استفاده شده برای سنتز cDNA.....	۴۹
جدول ۳-۲. مواد مورد استفاده در واکنش سنتز cDNA.....	۵۰
جدول ۳-۳. توالی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد ارزیابی.....	۵۱
جدول ۳-۴. میزان مواد مورد استفاده در واکنش PCR.....	۵۱
جدول ۳-۵. مواد مورد استفاده در واکنش qRT-PCR.....	۵۲
جدول ۴-۱. ژن‌های PAL، CCR و 4CL دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در دو گیاه سویا و برنج.....	۵۸
جدول ۴-۲. برهمکنش پروتئین‌های PAL با سایر پروتئین‌ها در دو گیاه سویا و برنج.....	۶۷
جدول ۴-۳. برهمکنش پروتئین‌های 4CL با سایر پروتئین‌ها در دو گیاه سویا و برنج.....	۶۸
جدول ۴-۴. برهمکنش پروتئین‌های CCR با سایر پروتئین‌ها در دو گیاه سویا و برنج.....	۷۴
جدول ۴-۵. ژن‌های هم‌بیان با PAL در سویا و برنج.....	۷۶
جدول ۴-۶. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان PAL در سویا.....	۸۱
جدول ۴-۷. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان PAL در برنج.....	۸۲
جدول ۴-۸. ژن‌های هم‌بیان با 4CL در سویا و برنج.....	۸۴
جدول ۴-۹. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان 4CL در سویا.....	۸۷
جدول ۴-۱۰. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان 4CL در برنج.....	۸۸
جدول ۴-۱۱. ژن‌های هم‌بیان با CCR در سویا و برنج.....	۹۰
جدول ۴-۱۲. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان CCR در سویا.....	۹۱
جدول ۴-۱۳. TFBS‌های موجود در توالی بالادست ژن PAL در گیاه سویا.....	۹۹
جدول ۴-۱۴. TFBS‌های موجود در توالی بالادست ژن PAL در گیاه برنج.....	۹۹
جدول ۴-۱۵. TFBS‌های موجود در توالی بالادست ژن 4CL در گیاه سویا.....	۱۰۰
جدول ۴-۱۶. TFBS‌های موجود در توالی بالادست ژن 4CL در گیاه برنج.....	۱۰۰
جدول ۴-۱۷. TFBS‌های موجود در توالی بالادست ژن CCR در گیاه سویا.....	۱۰۱
جدول ۴-۱۸. TFBS‌های موجود در توالی بالادست ژن CCR در گیاه برنج.....	۱۰۱
جدول ۴-۱۹. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در ارقام مقاوم و حساس.....	۱۰۴

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۲. ساختار دیواره سلولی اولیه..... ۱۷
- شکل ۲-۲. بیوسنتز مونولیگنول‌های لیگنین..... ۱۹
- شکل ۳-۲. بیوسنتز لیگنین ۲۳
- شکل ۱-۳. کشت گیاه در گلدان ۴۸
- شکل ۱-۴. موقعیت قرارگیری ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین بر روی کروموزوم سویا..... ۵۷
- شکل ۲-۴. موقعیت قرارگیری ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین بر روی کروموزوم برنج ۵۷
- شکل ۳-۴. بررسی الگوی اینترون اگزون ژن‌های PAL ۶۰
- شکل ۴-۴. درخت فیلوژنتیکی، توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های PAL..... ۶۱
- شکل ۵-۴. بررسی الگوی اینترون اگزون ژن‌های 4CL ۶۲
- شکل ۶-۴. درخت فیلوژنتیکی، توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های 4CL..... ۶۳
- شکل ۷-۴. بررسی الگوی اینترون اگزون ژن‌های CCR ۶۳
- شکل ۸-۴. درخت فیلوژنتیکی، توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های CCR..... ۶۴
- شکل ۹-۴. تصویر شماتیک مکان فعالیت آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین..... ۶۶
- شکل ۱۰-۴. برهم کنش ژن‌های PAL با سایر پروتئین‌ها ۷۳
- شکل ۱۱-۴. شبکه‌ی هم‌بیانی PAL : الف) سویا، ب) برنج ۷۸
- شکل ۱۲-۴. بررسی هم‌بستگی ژن‌های هم‌بیان PAL با یگ‌دیگر در گیاه سویا ۸۳
- شکل ۱۳-۴. بررسی هم‌بستگی ژن‌های هم‌بیان 4CL با یگ‌دیگر در گیاه سویا ۸۹
- شکل ۱۴-۴. بررسی هم‌بستگی ژن‌های هم‌بیان CCR با یگ‌دیگر در گیاه سویا ۹۳
- شکل ۱۵-۴. میزان بیان ژن CCR در بافت‌های مختلف سویا..... ۹۴
- شکل ۱۶-۴. میزان بیان ژن CCR در مراحل رشدی مختلف سویا..... ۹۵
- شکل ۱۷-۴. نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد..... ۱۰۳
- شکل ۱۸-۴. نتایج حاصل از واکنش PCR با گرادیانت دمایی..... ۱۰۳
- شکل ۱۹-۴. نمودار منحنی ذوب در واکنش qRT-PCR..... ۱۰۴
- شکل ۲۰-۴. میزان بیان نسبی ژن ۴-کومارات کوآنزیم آلیگاز (4CL)..... ۱۰۶
- شکل ۲۱-۴. میزان بیان نسبی ژن چالکون سنتتاز (CHs)..... ۱۰۷
- شکل ۲۲-۴. میزان بیان نسبی ژن Strictosidine Synthase (STR)..... ۱۰۸

فصل ۱ : مقدمه

۱-۱ مقدمه

دیواره سلولی گیاه عامل مهمی برای تعیین شکل سلول و پاسخ سلول به محیط می‌باشد. دیواره سلولی ثانویه از ترکیباتی چون سلولز، همی سلولز و لیگنین تشکیل شده است. لیگنین بعد از سلولز دومین پلی مر زیستی مهم بوده که تقریباً ۳۰٪ از کربن آلی در بیوسفر را شامل می‌شود (Boerjan, Ralph et al. 2003).

لیگنین در شکل ساختاری دیواره سلولی، چوبی شدن و استحکام ساقه نقش دارد. علاوه بر این لیگنین عایق آب دیواره سلولی بوده و توانایی انتقال آب و مواد محلول از طریق سیستم آوندی را دارا است و نقش مهم حفاظت گیاهان در برابر پاتوژن‌ها و دیگر تنش‌های محیطی را بر عهده دارد. مسیر فنیل پروپانویید مسیر بیوسنتزی بزرگی در گیاهان و به ویژه درختان است که لیگنین در این مسیر ساخته می‌شود (Eudes, Liang et al. 2014). مسیر فنیل پروپانویید سطح وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کند که در توسعه گیاهان و پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی شرکت می‌کند (Eudes, Liang et al. 2014).

کاهش بیوسنتز لیگنین می‌تواند جریان کربن را در مسیر فنیل پروپانویید تغییر دهد و به طور غیر مستقیم روی سنتز متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارد. بسیاری از متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در تعاملات گیاهی و محیطی ایفا می‌کنند. افزون بر این، تغییرات لیگنین نشان داده است که بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین به تنش‌های مختلف، پاسخ می‌دهند. بررسی و درک این اثرات غیر مستقیم در فرآیندهای مرتبط با تنش برای دستکاری لیگنین ضروری است (Baxter and Stewart Jr 2013).

اطلاعات زیادی در زمینه ی مهندسی لیگنین از طریق مطالعات مربوط به مدل گونه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) و توتون (*Nicotiana tabacum*) به دست آمده است (Baxter and Stewart Jr 2013). علاوه بر این تغییر متابولیسم فنیل پروپانویید و تغییرات در بیوسنتز لیگنین هم

چنین می تواند با تغییر در نحوه پاسخ گیاهان به تنش های زیستی و غیر زیستی در ارتباط باشد (Baxter and Stewart Jr 2013).

تغییر در مسیر بیوسنتزی لیگنین نشان داده است که سطوح ترکیبات ثانویه می توانند مقاومت گیاه را در برابر تنش های غیرزیستی افزایش دهند. گیاهان آنتوسیانین ها و یا فلاونوئیدها را به عنوان یک مکانیسم حفاظتی علیه تنش شوری، آسیب *UV-B*، دمای سرد و تنش خشکی تجمع می دهند (Baxter and Stewart Jr 2013).

در یک مطالعه روی کلون های حساس و متحمل به تنش شوری در نیشکر مشخص شد که تجمع فنول های محلول و آنتوسیانین ها و فلاون ها به میزان ۳ برابر در کلون های متحمل بیشتر است و این ترکیبات برای تقویت تحمل شوری و به دلیل حفاظت ساختار سیتوپلاسمی و کلروپلاست از آسیب تنش های شوری پیشنهاد شده است (Baxter and Stewart Jr 2013).

در این پایان نامه بررسی های بیوانفورماتیکی بر روی دو گیاه برنج و سویا انجام گرفت. برنج گیاهی یک ساله، علفی و تک لپه است. این گیاه از تیره گندمیان (*graminae*) از جنس *oryza* در آسیا و *glabrima* در آفریقا می باشد. برنج یک گیاه مدل گیاهان علفی است (مادانا و همکاران، ۲۰۱۱). سویا نیز یک گیاه مدل دو لپه ای است که دارای مقادیر زیادی پروتئین و روغن است. این ویژگی سویا را به یک محصول کشاورزی مهم در صنایع تولید مواد غذایی و تولید لوازم آرایشی و بهداشتی تبدیل کرده است. اخیرا سویا به منظور تولید سوخت های زیستی نیز مورد توجه قرار گرفته است (Baldoni, Von Pinho et al. 2013).

تفسیر توالی های جدید به طور معمول از طریق مقایسه با توالی های آرئولوگ شناخته شده انجام می شود. با این حال برخلاف روابط آرئولوگ در ژنوم های جانوری، این نوع ارتباط ها در گیاهان به دلیل رویکردهای تکثیر ژن ها پیچیده تر است (Obayashi, Okamura et al. 2014). مطالعات نشان داده است که پروفایل بیان ژنی می تواند به حل این مشکل کمک کند. در واقع بین ژن های پارالوگ با ارائه شواهدی در مورد نقش های زیستی خود، آن ها را تشخیص می دهند. ژن هایی که در مسیر بیولوژیکی

مرتبطی هستند به طور کلی با هم بیان می‌شوند. بنابراین اطلاعات در مورد هم‌بیانی ژن‌ها می‌تواند کلید اصلی در شناخت سیستم‌های بیولوژیکی در سطح مولکولی باشد (Obayashi, Okamura et al. 2014).

اگرچه آنالیزهای بیان برای ژن‌های درگیر در سنتز سلولز و همی‌سلولز در برخی از گونه‌ها انجام شده است اما رابطه هم‌بیانی حفاظت شده در میان ژن‌های مرتبط با لیگنین کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (Ruprecht and Persson 2012) در مطالعاتی که به منظور پیدا کردن هم‌بیانی انجام گرفته است، مشاهده شد که در گیاه آرابیدوپسیس آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (*PAL*) با بسیاری از ژن‌های درگیر در شکل‌گیری لیگنین رابطه هم‌بیانی دارد (Ehltling, Hamberger et al. 2006).

در مطالعات هم‌بیانی پلانک و همکاران، روابط هم‌بیانی نسبی بین گونه‌ها با استفاده از ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین نشان داده شد. در این تحقیق روش‌های هم‌بیانی برای نقش ژن‌های دخیل در شکل دیواره سلولی، ایزوپروپونوئید و گلوکوزینولات و مسیرهای مختلف متابولیسم در آرابیدوپسیس مورد استفاده قرار گرفته اند (Proost and Mutwil 2017).

تغییر در مسیر بیوسنتز لیگنین می‌تواند پاسخ گیاه در مقابل تنش‌های غیر زیستی را تحت تاثیر قرار دهد. در یک بررسی که بر روی آنزیم *4CL* (*4-coumarate-CoA ligase*) در گیاه برنج انجام گرفت، مشخص شد که این آنزیم در مسیر بیوسنتز لیگنین و ایجاد مقامت در برابر بیماری بلاست برنج نقش مهمی دارد. *4CL* هیدروکسی سینامات را به استرهای CoA برای بیوسنتز فلاونوئیدها و لیگنین تبدیل می‌کند (Sun, Di et al. 2017).

در این تحقیق ابتدا بررسی‌های بیوانفورماتیک، به منظور یافتن روابط هم‌بیانی برخی از ژن‌های سنتز کننده مسیر بیوسنتز لیگنین (نظیر *PAL*، *4CL*، *CCR* و ..) مطالعه ی عناصر سیس این ژن‌های هم‌بیان و بررسی تفاوت توالی‌ها در دو سطح ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در این مسیر در گیاه برنج و سویا با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی و ابزاری مانند NCBI، KEGG، Phytozome، Genevestigator، ATTED II و... انجام شد.

سپس بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در گیاه سویا تحت تیمار تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. عملیات آزمایشگاهی شامل کشت گیاهان در دو شرایط شوری و نرمال، استخراج RNA از بافت‌های مختلف، سنتز CDNA و ... انجام شد. بررسی میزان بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه RCR زمان واقعی اندازه‌گیری شد.

۲-۱ اهداف تحقیق

۱. بررسی‌های بیوانفورماتیکی به منظور یافتن روابط هم‌بیانی برخی از ژن‌های سنتز کننده مسیر بیوسنتز لیگنین
۲. بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز لیگنین در تنش شوری در دو رقم حساس و مقاوم سویا از طریق آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با استفاده از تکنیک RCR زمان واقعی
۳. مقایسه میزان بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری در دو رقم حساس و مقاوم در گیاه سویا.

فصل ۲ کلیات و پیشینه پژوهش

۱-۲ گیاه‌شناسی

سویا (*Glycine max(L.) Merr*) یکی از گیاهان مهم خانواده لگومینوز است که نقش مهمی در تأمین غذا و علوفه جهان پس از گیاهان خانواده‌ی غلات مانند گندم، برنج و ذرت دارد. تقریباً یک سوم پروتئین تغذیه‌ای و روغن گیاهی فرآوری شده برای مصارف انسانی از طریق کشت سویا و سایر گیاهان خانواده لگومینوز تامین می‌شود. از آنجایی که سویا متعلق به خانواده لگومینوز است این گیاه هم مانند سایر گیاهان این خانواده قادر به برقراری هم‌زیستی نوعی باکتری خاکری بنام *Bradyrhizobium* است که سبب تثبیت بیولوژیکی ازت می‌شود. تثبیت بیولوژیک ازت از نظر اکولوژیکی و اقتصادی، اهمیت چشم‌گیری دارد زیرا تثبیت بیولوژیک ازت توسط گیاه موجب تقویت خاک‌های زراعی و هم چنین کاهش مصرف کودهای ازته و در نهایت سبب کاهش آلودگی‌های زیست محیطی می‌شود (میرزایی و همکاران، ۱۳۹۳).

دانه‌ی سویا با داشتن ۳۵-۴۵ درصد پروتئین و ۱۶-۲۴ درصد روغن از نظر تأمین کالری و انرژی مورد نیاز انسان و دام در میان محصولات زراعی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و از با ارزش‌ترین محصولات بخش کشاورزی در کشورهای پیشرفته جهان به شمار می‌رود (Shereen and Ansari, 2001). فرآورده‌های دانه سویا مانند روغن خوراکی و کنجاله به عنوان (منبع پروتئینی) در تغذیه انسان، دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد. و از طرفی وارد کردن این گیاه در تناوب زراعی با سایر محصولات کشاورزی و قابلیت تثبیت نیتروژن توسط آن و سهولت به کارگیری انواع ادوات و ماشین‌های کشاورزی در تولید آن باعث تقویت خاک و استفاده بهینه آب و خاک می‌شود. ولی متأسفانه در سال‌های اخیر توجه چندانی به تولید دانه‌ی سویا در کشور نشده است و بیش از ۹۰ درصد تولید و کشت آن مربوط به استان‌های گلستان و مازندران است (طایفه نوری و همکاران، ۱۳۹۳).

روغن سویا به دلیل فراوانی، ارزانی، کیفیت خوب روغن، محصول پروتئینی با ارزش به جا مانده از روغن کشتی و بازده بالای روغن، از مهم‌ترین منابع روغن‌های گیاهی است (Trichopoulou, Costacou et al. 2003).

برنج متعلق به خانواده گرامینه و جنس *Oryzae* است. از ۲۳ گونه جنس *Oryzae* امروزه دو گونه *O. sativa* که منشأ آن را مناطق حاره‌ای و مرطوب آسیا می‌دانند و *O. Gluberrima* که متعلق به غرب آفریقا است مورد کشت و کار قرار می‌گیرد (FAO, 2004). برنج منبع غذایی بیش از نیمی از مردم جهان است به طوری که در آسیا ۲۰۰ میلیون نفر ۶۰ تا ۷۰ درصد کالری مورد نیاز خود را از برنج و فرآورده‌های آن به دست می‌آورند. برنج گیاهی تک لپه و دیپلوئید با ۲۴ عدد کروموزوم است ($2n = 24$) که در مقایسه با سایر غلات ژنوم کوچکتر (۴۳۰ Mb) و تعداد ژن‌های کم تری (۳۰۰۰۰ ژن) دارد (Ambavaram, Krishnan et al. 2011).

۲-۲ بیان مسئله

شوری خاک یکی از مهم‌ترین عوامل نامساعد و تنش زای غیر زنده است که اثر نامطلوبی بر تولید و کیفیت محصولات کشاورزی دارد و یکی از عوامل محدود کننده کشت برنج و سویا در سراسر دنیا معرفی شده است. صفت تحمل به شوری در گیاهان پدیده‌ی پیچیده‌ای است که از جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و مولکولی قابل بحث و بررسی است. حدود ۶/۸ میلیون هکتار از اراضی کشور دارای درجات مختلف شوری هستند که ۴/۳ میلیون هکتار آن محدودیت شوری دارند و ۵۷۰ هزار هکتار از اراضی شور در کشور دارای آب زیرزمینی در محدوده‌ی رشد ریشه هستند.

هدف از انجام این تحقیق مطالعه‌ی هم‌بیانی برخی از ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین نظیر *CCR*، *ACL*، *PAL* در دو گیاه سویا و برنج تحت تأثیر تنش شوری می‌باشد. هم‌چنین بررسی بیان برخی از این ژن‌ها و نیز ژن‌های هم‌بیان حاصل از داده‌های بیوانفورماتیک نیز در این مطالعه انجام گرفت. استفاده از این اطلاعات نرم‌افزاری و بیوانفورماتیک در کنار داده‌های حاصل از سایر

تکنیک‌های مولکولی می‌تواند بستر مناسبی جهت بهبود تحمل به تنش شوری در گیاه برنج و سویا و سایر گیاهان مشابه باشد. به منظور دستیابی به این اهداف باید اطلاعات لازم را در مورد مسیر بیوسنتزی و ساختار تشکیل دهنده‌ی لیگنین در اختیار داشت.

۲-۳ تنش شوری

شوری یکی از تنش‌های غیرزیستی در مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشد که می‌تواند رشد و عملکرد گیاه را محدود سازد. از کل اراضی زیر کشت دنیا حدود ۲۳ درصد مشکل شوری دارند. در ایران مساحت خاک‌هایی که به نوعی مشکل شوری دارند بالغ بر ۳۲ میلیون هکتار می‌باشد که حدود ۵۵ درصد اراضی قابل کشت کشور را شامل می‌شود. سویا یکی از مهم‌ترین محصولات از لحاظ اقتصادی در سراسر جهان است. با این حال رشد و توسعه‌ی آن به شدت تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار می‌گیرد. مهم‌ترین واکنش گیاه به شوری خاک و یا آب، کاهش رشد است. اگر غلظت نمک به بیش از آستانه‌ی تحمل گیاه برسد به موازات افزایش غلظت نمک‌های محلول (شوری) رشد گیاه کاهش پیدا می‌کند که البته آهنگ کاهش رشد در گیاهان متفاوت است. مشکلات شوری در اثر تجمع کلرید سدیم به صورت سمیت و تنش اسمزی ایجاد می‌شود (احمدی و همکاران، ۱۳۹۲).

عدم جوانه‌زنی گیاهان در خاک‌های شور، اغلب به خاطر پتانسیل اسمزی پایین و ممانعت از جذب آب و سمیت یون‌های Na^+ و Cl^- و یا عدم تعادل عناصر غذایی می‌باشد. ولی هنوز به درستی مشخص نیست که کدام یک از عوامل یاد شده نقش مهم‌تری را در بازدارندگی جوانه‌زنی بذر تحت شرایط شوری دارا می‌باشد. تحقیقات نسبتاً زیادی بر روی جوانه‌زنی گیاهان زراعی مختلف انجام شده که بیانگر این واقعیت است که با افزایش غلظت شوری و سرعت و درصد جوانه‌زنی و همچنین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش می‌یابد. با توجه در نظر گرفتن موارد فوق و اهمیت دانه سویا در تغذیه انسان و دام، شناخت ارقام متحمل به شوری در مرحله جوانه‌زنی ضروری به نظر می‌رسد (قربانی پور و همکاران، ۱۳۸۹).

اگر تنش شوری بیش از آستانه ی تحمل گیاه باشد رشد و عملکرد کاهش می‌یابد. تنش شوری منجر به بسته شدن روزنه‌ها، کاهش CO₂ در برگ و مانع از تثبیت کربن می‌شود که به نوبه خود می‌تواند باعث افزایش گونه‌های اکسیژن فعال و القاء اکسیداتیو شود (George, Venkataraman et al. 2010).

شوری خاک و آب، از مهم‌ترین عوامل محدود کننده در افزایش تولیدات کشاورزی است و مناطق وسیعی از سطح زمین به دلیل تحمل کم گیاهان زراعی نسبت به تنش شوری و نبود اطلاعات کافی در مورد مکانیسم‌های تحمل به این تنش عملاً غیرقابل استفاده برای کشاورزان می‌باشد (علی پور و همکاران، ۱۳۸۹).

در اکثر مناطق ایران آب آبیاری از کیفیت مطلوبی برخوردار نبوده و به درجات مختلف با شوری همراه است. اغلب این‌گونه آب‌ها برای کشت گیاهان متحمل و نیمه متحمل به شوری استفاده و در بسیاری از موارد از عملکرد نسبتاً مطلوبی نیز برخوردار نیستند. مصرف آب آبیاری شور ضمن کاهش عملکرد، ارتفاع، طول ریشه و وزن ماده خشک گیاه موجب افزایش میزان یون‌های K⁺ و Na⁺ در اندام‌های گیاهی می‌گردد. هم‌چنین تنش شوری موجب کاهش درصد پروتئین و افزایش درصد روغن دانه می‌گردد. ولی برخی از محققین افزایش درصد پروتئین را در اثر تنش شوری گزارش نمودند. در گونه‌های متحمل به شوری مقدار سدیم و کلر کمتر و میزان پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم تجمع یافته در برگ بیشتر از ارقام حساس می‌باشد (بهمنیار و همکاران، ۱۳۸۴).

گیاه به دلیل دارا بودن دیواره‌ی سلولی دارای مکانیزم دفاعی در مقابل تنش‌های زیستی نظیر انواع بیماری‌ها و تنش‌های غیرزیستی نظیر خشکی، کم آبی و شوری و ... می‌باشد. دیواره‌ی سلولی دارای اجزای مختلفی می‌باشد و لیگنین که در دیواره‌ی سلولی ثانویه وجود دارد یکی از عوامل مهم مقاومت گیاه در برابر انواع تنش‌ها می‌باشد (Eudes, Liang et al. 2014).

۲-۴ دیواره سلولی

دیواره‌ی سلول‌های گیاهی نه‌تنها ساختار اصلی گیاه را فراهم می‌کند، بلکه موانعی را علیه تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایجاد می‌کند. دیواره‌ی سلولی، که گاهی با کوتیکول پوشانده شده است، معمولاً اولین مانعی است که پاتوژن‌ها با آن مواجه می‌شوند، و برای نفوذ به این مانع، میکروب‌ها آنزیم‌های تخریب دیواره‌ی سلولی را تحت الشعاع قرار می‌دهند که عامل اصلی ویرولانسی^۱ هستند (Nuhse 2012). بیشتر دیواره‌های سلول‌های بنیادی بر پایه‌ی یک شبکه‌ی گسترده‌ی سلولز با میکرو فیبریل‌های مرتبط با هم سلولز بنا شده‌اند (Pauly, Gille et al. 2013). دیواره‌ی سلولی شامل دیواره‌ی سلولی اولیه و دیواره‌ی سلولی ثانویه می‌باشد. در دیواره‌های اولیه بخش‌های در حال رشد گیاهان، این شبکه در یک ماتریس پلی‌ساکاریدهای پکتین تعبیه شده است (شکل ۱-۱). در دیواره‌ی سلولی ثانویه، بافت‌های بالغ پراکندگی پکتینی کمتری دارند، اما دیواره‌ها با لیگنین تقویت می‌شوند (Endler and Persson 2011). اگر چه بیشتر دیواره‌های سلولی بر اساس این اجزاء اصلی هستند، اما آن‌ها در ساختارهای معماری سه بعدی بسیار متفاوت هستند. این ناهمگونی به دلیل تنوع استراتژی‌هایی هم‌چون ترشح گلیکوزیل هیدرولازهای متعدد است که آن‌ها در مقابل پاتوژن‌ها به کار برده‌اند (Annis and Goodwin 1997). گیاهان در پاسخ به حمله‌ی پاتوژن ممکن است برخی از پلیمرهای تقویت کننده، مثلاً ترکیبات فنولی و پلی‌توکسیک را تولید کنند (Hückelhoven 2007). با این حال، این واکنش‌های فیزیکی و شیمیایی فقط یک بخش از نقش دیواره سلولی در دفاع است و توانایی گسترده پاتوژن‌ها برای تخریب مولکول‌های دیواره سلولی هزینه‌ای دارد. اختلال یکپارچگی دیواره‌ی سلولی (که هم‌چنین ممکن است موجب تغییر شکل بخش مجاور غشاء پلازما شود) و انتشار قطعات تخریب شده، توسط گیاهان تحت نظارت قرار می‌گیرد و وضعیت دیواره‌ی سلولی تغییر یافته، یک عامل مهمی برای سازوکارهای دفاعی است (Hématy, Cherk et al. 2009).

^۱ -virulence

علیرغم اهمیت بسیار زیاد دیواره‌های سلولی در سیستم دفاعی گیاه، جنبه‌های بسیاری وجود دارد که درک نمی‌شوند. به عنوان مثال، اکثر کارها بر روی یک مجموعه محدود از پلیمرهای دیواره‌ی سلولی (به ویژه کالوس، اکستنسین و لیگنین) تمرکز کرده و نقش بالقوه بسیاری از دیگر اجزای دیواره‌ی سلولی، مبهم هستند. یکی دیگر از جنبه‌های بسیار ناشناخته دیواره‌های سلولی و دفاع، تکامل و توسعه‌ی استراتژی‌های دفاع است (Sorensen, Domozych et al. 2010).

رسوب لیگنین یکی از مراحل پایانی تمایز سلول‌های آوند چوبی است و عمدتاً در زمان ضخیم شدن دیواره‌ی سلولی ثانویه رخ می‌دهد. به طور کلی، دیواره سلولی ثانویه شامل سه لایه است: ۱- لایه بیرونی (S1)، ۲- لایه میانی (S2) و ۳- لایه داخلی (S3). رسوب لیگنین در مراحل مختلف و هر بار قبل از رسوب کربوهیدرات‌ها پیش می‌رود و وقتی که تشکیل لایه بیرونی آغاز می‌شود، در گوشه‌ی سلول در ناحیه لاملا میانی و دیواره‌ی اولیه تشکیل می‌شود. هنگامی که تشکیل ماتریس پلی ساکارید از لایه میانی تکمیل می‌شود، لایه زایی از طریق دو سوم دیواره انجام می‌شود. لیگنین بعد از سلولز و کمپلکس‌های همی سلولز در لایه داخلی قرار می‌گیرد. به طور کلی، غلظت لیگنین در لاملا میانی و گوشه‌های سلولی بالاتر از دیواره ثانویه لایه میانی است (Donaldson 2001).

درواقع به دلیل این که لیگنین بخش زیادی از دیواره‌ی سلولی را تصرف می‌کند، دیواره‌ی سلولی ثانویه بیش‌ترین مقدار لیگنین را دارا می‌باشد. دیواره‌ی ثانویه آوندها معمولاً مقدار بیش‌تری لیگنین نسبت به فیبرها دارند.

دیواره‌ی سلولی ثانویه آنژیوسپرم^۲ توسط لایه‌ی ژلاتینی غیر چوبی که از سلولز کریستالی زیادی تشکیل شده است تشخیص داده می‌شود. در مقابل، بافت چوبی فشرده‌ی جیمنوسپرم^۳ لایه میانی توسط حلقه‌های برجسته‌ی چوبی تشخیص داده می‌شوند (Donaldson 2001).

^۲ گیاه نهان‌دانه

^۳ گیاه بازدانه

دستگاه‌های میکروواترادیوگرافی و UV - میکرواسپکترومتر، سه مونولیگنول در مراحل مختلف شکل گیری دیواره‌ی سلولی را نشان داده‌اند. عموماً واحدهای H در ابتدا و به دنبال آن واحدهای G و S در آنژیوسپرم تشکیل می‌شوند (Donaldson 2001, Terashima, Fukushima et al. 1993).

لیگنین در آوندها در واحدهای G تجمع بیشتری دارد و در عوض لیگنین موجود در فیبرها بیشتر در واحدهای S ذخیره شده است.

تفاوت زمان رسوب مونولیگنول‌ها با تغییرات تراکم لیگنین در لایه‌های دیواره‌ی سلولی گیاه مرتبط است، به طوری که توسط ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی‌هایی که علیه H خالص، G خالص و یا مخلوط مصنوعی GS لیگنین به کار گرفته شده‌اند، نشان داده شده است (Joseleau and Ruel 1997).

(Chabannes, Ruel et al. 2001).

۲-۴-۱ سلولز

میکروفیبریل‌های سلولزی نقش یک ساختار اولیه در دیواره‌ی سلولی دارند. میکروفیبریل‌های سلولز از کمپلکس‌های بزرگ چندتایی تشکیل شده است که شامل زیر واحدهای کاتالیزوری سلولز سنتاز است (Endler and Persson 2011). کمپلکس سلولز سنتاز (CESA) از پروتئین CESA1، 3 و 6 مرتبط در دیواره‌ی اولیه تشکیل شده و همچنین CESA4، 7 و 8 در دیواره‌ی ثانویه تشکیل شده‌اند (Ruprecht and Persson 2012). فیبرها از زنجیره‌های -D-Glcp (1 → 4) β با پیوند هیدروژنی تشکیل شده است (Hemsworth, Henrissat et Vaaje-Kolstad, Westereng et al. 2010).

(al. 2014). در بسیاری از موارد که سلول دیواره سلولی تحت آسیب قرار می‌گیرد، جبران کننده‌های مکانیسم می‌توانند تأثیرات ناشی از اختلال در ساختار یا رسوب سلولز را تحت الشعاع قرار دهند. موتاسیون‌های ضعیف سلولز به طور معمول فرآیند لیگنینی شدن (چوبی شدن) را افزایش می‌دهند (Caño-Delgado, Penfield et al. 2003, Hamann 2012).

۲-۴-۲ همی سلولز

همی سلولزها یک گروه متنوع از پلی ساکاریدها هستند که معمولاً دارای یک کمپلکس (backbone) از مانوز، گلوکز یا زایلوز هستند که با پیوندهای β -(1→4) به هم مرتبط می‌شوند. نقش مرکزی همی سلولز تقویت دیواره‌ی سلول در تعامل با سلولز و گاهی اوقات لیگنین می‌باشد (Scheller Endler and Persson 2011, and Ulvskov 2010).

۲-۴-۳ پکتین

پکتین هتروپلی ساکارید پیچیده‌ی اصلی دیواره‌ی سلولی است که در دیواره‌ی سلولی اولیه فراوان است. پکتین شامل یک مجموعه از دمین‌های^۴ متمایز ساختاری است که به عنوان ستون اصلی یا زنجیرهای جانبی با پلی ساکاریدهای پکتینی عمل می‌کنند (Wolf, Mouille et al. 2009).

۲-۴-۴ لیگنین

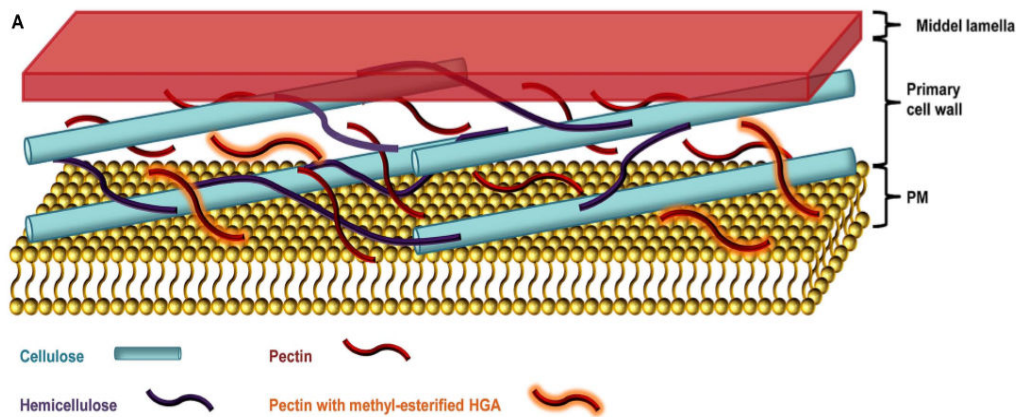
لیگنین یک پلیمر فنلی است که عمدتاً در دیواره‌ی سلولی ثانویه در آخرین مراحل تمایز سلولی ذخیره می‌شود. لیگنین فاز آبی دیواره‌ی سلولی را تغییر می‌دهد، پلی ساکاریدهای سلولز و ماتریکس را پوشش می‌دهد و باعث افزایش قدرت مکانیکی و مانع نفوذ آب می‌شود (Albersheim, Darvill et al. 2010). لیگنین هم‌چنین برای تقویت سلول‌های آوندی مورد نیاز است که آب را تحت فشار منفی در آوندها انتقال می‌دهد. اهمیت لیگنین در این بافت‌ها توسط ضعف آوندی در لیگنین گیاهان نشان داده شده است (Jones, Ennos et al. 2001, Piquemal, Lapierre et al. 1998). لیگنین نقش‌های متعددی در دفاع گیاه دارد، لیگنین و یا ترکیب‌های فنولی شبه لیگنین اغلب به سرعت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پاسخ می‌دهند (Sattler and Funnell-Harris 2013). لیگنین می‌باشد

^۴ - domain

نیز برای اهداف دفاعی فعالیت می‌کند. به عنوان مثال، این مسیر مبتنی بر سنتز سایر ترکیبات فنولی از جمله فیتوالکسین‌ها، استیلبنز، کومارین‌ها و فلوونوئیدها است که بعضی از آن‌ها در دفاع گیاه دخیل بوده‌اند (Lozovaya, Lygin et al. 2007). در واقع، شواهدی وجود دارد که در برخی از گیاهان، اسید سالیسیلیک که به عنوان جزء کلیدی برخی از مکانیزم‌های دفاعی شناخته شده است، همچنین می‌تواند توسط مسیر فنیل پروپانوئید تولید شود (Pan, Zhan et al. 2006).

نقش لیگنین در سیستم دفاعی گیاه، سبب توجه چشم‌گیری در زمینه‌ی گیاهان مهندسی شده، به منظور استفاده از لیگنین به عنوان ماده اولیه‌ی زیست محیطی شده است. لیگنین به طور قابل ملاحظه‌ای به تخریب دیواره‌ی سلول‌ها برای انحلال به قندهای قابل اشتعال کمک می‌کند و به همین علت محتوی لیگنین به اهداف مهم تحقیقات بیوتکنولوژی مواد اولیه تبدیل شده است. با این حال، از آنجا که لیگنین نیز برای دفاع از گیاه مورد نیاز است، احتمالاً کاهش بیش از حد لیگنین در گیاه سبب آسیب پذیری گیاه به بیماری‌ها و پاتوژن‌ها می‌شود (Sattler and Funnell-Harris 2013). لیگنین بعد از سلولز دومین پلی مر زیستی مهم بوده که تقریباً ۳۰ درصد از کربن آلی در بیوسفر را شامل می‌شود (Boerjan, Ralph et al. 2003). لیگنین در شکل ساختاری دیواره‌ی سلولی، چوبی شدن و استحکام ساقه نقش دارد. علاوه بر این لیگنین عایق آب دیواره‌ی سلولی بوده و توانایی انتقال آب و مواد محلول از طریق سیستم آوندی را دارا می‌باشد و نقش مهمی در حفاظت گیاهان در برابر پاتوژن‌ها و دیگر تنش‌های محیطی ایفا می‌کند (Eudes, Liang et al. 2014). مسیر بیوسنتزی لیگنین بیش از یک قرن است که مورد مطالعه قرار گرفته است، اما طی دهه گذشته در مورد این مسیر تجدید نظر شده است. پیشرفت‌های قابل توجهی در کلونینگ ژن‌های جدید توسط روش‌های ژنتیک و ترکیب بیوانفورماتیک و بیوشیمی انجام شده است. تست‌های آنزیمی در آزمایشگاه و تجزیه و تحلیل دقیق جهش‌ها و گیاهان تراریخته‌ی حاصل از بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین، سبب توجه بیشتری به مسیر بیوسنتز لیگنین و مونولیگنول‌ها شده اند. در بسیاری از موارد گیاهان تراریخته با تغییر ساختار لیگنین حاصل شده‌اند (Boerjan, Ralph et al. 2003). به این منظور باید

درک بهتری از مسیر بیوسنتزی لیگنین در اختیار داشت تا بتوان براساس این مسیر بیوسنتزی و ژن‌های دخیل در آن برای دستیابی به گیاهانی مقاوم به تنش و حتی تراریخته گام بزرگی در راستای این اهداف برداشت.



شکل ۱-۲. ساختار دیواره سلولی اولیه

۵-۲ لیگنین و ساختار آن

لیگنین یک ترکیب شیمیایی پیچیده است که در چوب، گیاهان و جلبک، که یکی از پرطرفدارترین مواد زیستی طبیعی موجود در زمین است وجود دارد. لیگنین یکی از ترکیبات مسیر سنتز فنیل پروپانویید است. اگر چه ساختار دقیق لیگنین در طبیعت هنوز هم ناشناخته است، اما اعتقاد بر این است که بیوسنتز لیگنین شامل پلیمریزاسیون واحدهای فنلی می‌باشد. ترکیب، وزن مولکولی و مقدار لیگنین در هر گیاهی متفاوت است؛ با این حال برآورد شده است که لیگنین حاوی ۳۰ درصد از کربن آلی موجود در بیوماس گیاهی در دسترس است (Lee and Deng 2015). لیگنین یکی از بیشترین بیوپلی‌مرهای آروماتیک است و بخش زیادی از دیواره‌ی سلولی را تشکیل می‌دهد. لیگنین یک ماده‌ی اولیه برای تولید زیست توده گیاهی است که استفاده‌ی صنعتی ندارد و

نمی‌توان بدون آن که اثر جدی روی رشد گیاه بگذارد آن را به سادگی از گیاه در حال رشد حذف کرد (Eudes, Liang et al. 2014).

مسیر بیوسنتزی لیگنین برای بیش از یک قرن مورد مطالعه قرار گرفته است، اما طی دهه گذشته تجدید نظر شده است. پیشرفت‌های قابل توجهی در کلونینگ ژن‌های جدید بوسیله ژنتیک و ترکیب بیوانفورماتیک و روش‌های بیوشیمی انجام شده است. تست‌های آنزیمی انجام شده در آزمایشگاه و تجزیه و تحلیل دقیق جهش‌ها و گیاهان تراریخته که در بیان ژن‌های بیوسنتز لیگنین تغییر کرده‌اند، پایه‌ای اساسی برای بازسازی مسیر بیوسنتزی مونولیگنول فراهم کرده‌اند و تجزیه و تحلیل ساختاری نشان داده است که دیواره‌ی سلول‌های گیاهی می‌تواند تغییرات بزرگی در محتوا و ساختار لیگنین داشته باشد (Boerjan, Ralph et al. 2003).

مونولیگنول‌ها به ترتیب p-هیدروکسی فنیل^۵ (H)، گویاسیل^۶ (G)، و سرینگیل^۷ (S) فنیل پروپانوئید، زمانی که در پلیمر لیگنین وارد شده است تولید شده‌اند. مقدار و ترکیب لیگنین‌ها در بین تاکسون‌ها، انواع سلول‌ها و لایه‌های دیواره مخصوص سلول‌ها متفاوت است و از طریق نشانه‌های توسعه و محیط زیستی قابل تشخیص است (Boerjan, Ralph et al. 2003).

گرچه استثنائات وجود دارد، لیگنوزهای دولپه‌ای (جنگلی) به طور عمده شامل واحدهای G و S و H هستند، در حالی که لیگنین گیاهان بازدانه (چوب نرم) بیشتر از واحدهای G با سطح پایین واحد H تشکیل می‌شوند. لیگنین در گیاهان علفی (تک لپه) شامل واحدهای G و S در سطوح قابل مقایسه و بیشتری از واحد H در گیاهان دو لپه می‌باشد (Boerjan, Ralph et al. 2003).

واحدهای H مشتق شده از ترکیب مولیگنول p-کوماریل الکل MIH در لیگنین‌ها نباید با p-کومارات Y3، که به عنوان گروه‌های استیله گیاهان علفی لیگنین‌ها ظاهر می‌شود اشتباه گرفته شود.

^۵ -p-hydroxyl phenol

^۶ - Guaiacyl

^۷ - Syringyl

این سردرگمی (و مشتق شدن از محصولات یکسان با استفاده از روش های تجزیه مانند اکسیداسیون نیتروبنزن) منجر به برآورد کردن سطح H در گذشته شده است (Boerjan, Ralph et al. 2003).

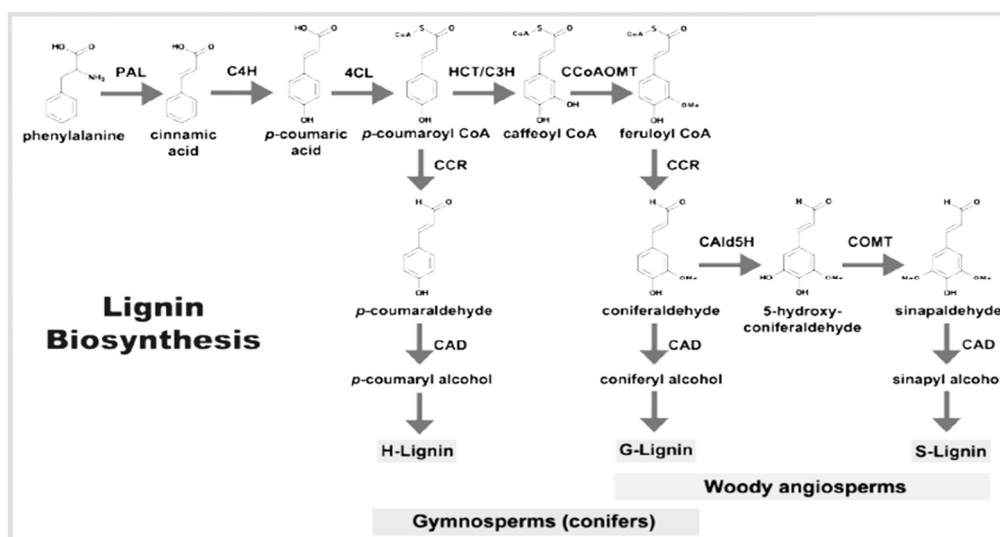
بیوسنتز مونولیگنول ها با فنیل آلانین آغاز می شود و شامل واکنش های هیدروکسی لیتیک متوالی از حلقه معطر، به دنبال آن O-متیله شدن فنولیک و تبدیل کربوکسیل جانبی زنجیره ای به گروه الکل است (Boerjan, Ralph et al. 2003).

محققان زمان زیادی را به این موضوع پرداخته اند که واکنش های هیدروکسیل شدن و متیلاسیون در سطح اسیدهای پتاسیم و فرولیک و کوماریک و سیناپیک اسید رخ می دهد که نهایتاً به مونولیگنول های متناظر توسط فعالیت های متناوب آنزیم های CCR، CAD، و ۴-کومارات کوآنزیم آ لیگاز تبدیل می شود (Boerjan, Ralph et al. 2003).

مونولیگنول های H، G، S تنها در درجه متوکسیلاسیون با یکدیگر تفاوت دارند. مونولیگنول H، هیچ گروه متوکسی در ساختار خود ندارد.

مونولیگنول G تنها در کربن ۳، و مونولیگنول S در هر دو موقعیت کربن ۳ و ۵ متیله هستند (شکل

۲-۲).



شکل ۲-۲. بیوسنتز مونولیگنول های لیگنین. در مسیر بیوسنتز لیگنین، کوماریل الکل به عنوان پیش ساز تولید هیدروکسی فنیل (H) ساخته می شود. این مونولیگنول فاقد گروه متوکسی در ساختار خود است. پیش ساز گوباسیل (G) در مسیر بیوسنتز لیگنین، کونفریل الکل است که در موقعیت کربن ۳ خود دارای یک گروه متوکسی

است. سیناپیل الکل پیش ساز تولید سرینگیل (S) می‌باشد که در طول مسیر بیوسنتز لیگنین ساخته می‌شود و در موقعیت کربن ۳ و ۵ خود دو گروه متوکسی دارد. وجود گروه‌های متیل بر روی حلقه‌ی آروماتیک فرصت ایجاد کراس لینک بین مونومرهای تشکیل دهنده‌ی لیگنین را کاهش داده و موجب کاهش تراکم لیگنین در دیواره‌ی سلولی می‌شوند.

۶-۲ بیوسنتز لیگنین

فنیل آلانین آمونیالیز ($^A PAL$)، (EC ۴,۳,۱,۲۵) اولین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد. ترانس سینامیک اسید می‌تواند در مراحل بعدی برای تولید مونولگینول‌ها استفاده شود. در این مرحله مقداری آمونیاک نیز تولید می‌شود که ممکن است در مراحل بعد برای سنتز مونولگینول‌ها به کار برده شود. ممکن است آمونیاک در گیاه مجدد بازیابی شود. یک راه برای بازیابی آمونیاک، فعالیت گلوتامین سنتتازی است که قادر است نیتروژن را مجدد به چرخه‌ی تولید آمینواسیدها وارد کند. دومین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید، سینامیک اسید ۴ هیدروکسیلاز ($C4H$) است. پس از آن که سینامات طی این مرحله توسط آنزیم PAL سنتز شد به وسیله‌ی، ($C4H$) به p-کومارات هیدروکسیله می‌شود. $C4H$ اولین آنزیم از خانواده‌ی سیتوکروم P450 در مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد (Lu, Zhou et al. 2006). در این مرحله سیتوکروم P450 یک اتم از مولکول اکسیژن را به ترنس سینامات اضافه می‌کند و اتم دیگر به وسیله NADPH به آب احیا می‌شود. طی مسیر بیوسنتز لیگنین تحت تاثیر آنزیم ۴ کومارات کوآنزیم آلیگاز ($4CL$) (EC ۶,۲,۱,۱۲) با مصرف ATP به p-کوماریل آ تبدیل می‌شود. در مرحله‌ی اول p-کومارات و AMP, کوماریل آدنیلات را تشکیل می‌دهند. هم زمان یک پیروفسفات آزاد می‌شود. در مرحله‌ی بعد گروه کوماریل به گروه سولفیدریل کوآ منتقل می‌شود و به دنبال آن یک AMP هم آزاد می‌شود (Yuan, Yu et al. 2014).

^A phenylalanine ammonia-lyase

آنزیم کوماریل کوآنزیم آ می تواند توسط دو آنزیم هیدروکسی سینامیل کوآنزیم آ (CCR)^۹ (۱,۲,۱,۴۴) و سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD)^{۱۰} به سمت مسیر سنتز مونولیگنول H پیش رود. علاوه بر این به وسیله آنزیم هیدروکسی سینامیل ترنسفراز (HCT)^{۱۱} ترکیب کونیفرآلدئید را سنتز کند که آن خود نیز می تواند در دو زیر شاخه متفاوت از مسیر بیوسنتز لیگنین منجر به سنتز بیولیگنول های S و G شود.

CCR اولین نقطه ی ورود به مسیر اختصاصی سنتز لیگنین در مسیر فنیل پروپانوئید است. به همین علت این آنزیم در کنترل کیفیت و کمیت لیگنین نقش مهمی دارد (Kawasaki, Koita et al. 2006). CCR معمولاً می تواند از سینامیل کوآ به عنوان سوپسترا استفاده کرده و آن را به سینامیل آلدئیدهای مختلف تبدیل کند. این آنزیم در این مرحله موجب تبدیل P-کوماریل کوآ به P-کوماریل آلدئید را می شود.

مرحله ی بعدی توسط آنزیم سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) کاتالیز می شود. این آنزیم با استفاده از NADPH ، P- هیدروکسی سینامیل آلدئید را به الکل های مربوطه تبدیل می کند. طی این مرحله CAD, NADPH را به عنوان کوفاکتور می پذیرد. NADPH طی یک واکنش اکسیداسیون H⁺ خود را از دست می دهد و به NADP⁺ اکسید می شود. CAD این H⁺ را به P- کومارآلدئید انتقال می دهد و گروه آلدئیدی آن را به گروه الکی تبدیل می کند. به این ترتیب P- کوماریل الکل, پیش ساز مونولیگنول H را کاتالیز می کند.

برای تولید کونیفر آلدئید P-کوماریل کوآ تحت اثر واکنش هیدروکسیلاسیون که توسط آنزیم های HCT و کومارات ۳-هیدروکسیلاز (C3H) کاتالیز می شود به کافئول کوآ تبدیل می شود (Salvador, Lima et al. 2013). HCT در این مرحله طی واکنش آسیل ترنسفرازی، از P-کوماریل کوآ به عنوان

^۹ Cinnamoyl -coa reductase

^{۱۰} cinnamyl alcohol dehydrogenase

^{۱۱} Hydroxycinnamoyl COA: shiki- mate hydroxycinnamoyl transferase

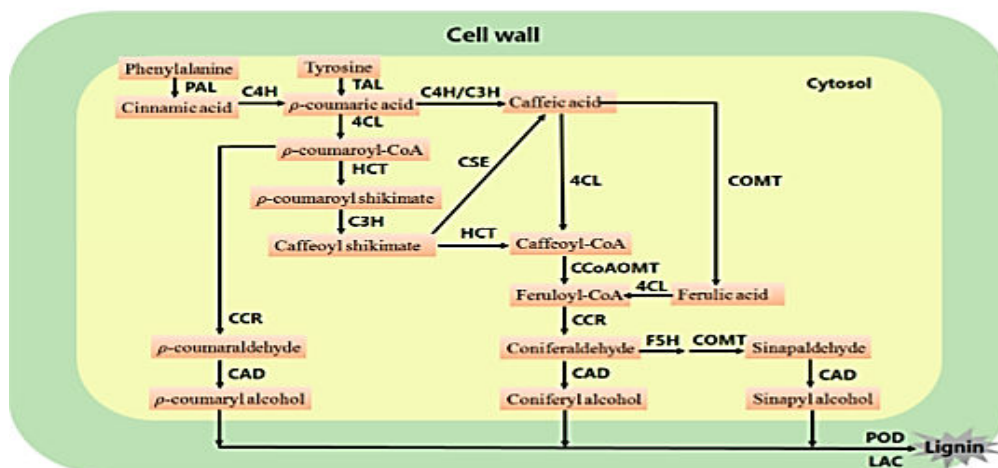
دهنده‌ی گروه آسپیل و از شیکیمات اسید به عنوان گیرنده‌ی گروه آسپیل استفاده می‌کند و P-کومارول شیکیمات را سنتز می‌کند (Hoffmann, Besseau et al. 2004).

در نهایت آنزیم کافئول کوآ 3-O-متیل ترنسفرز (CCoAOMT)، (EC ۲,۱,۱,۱,۱۰۴) به صورت اختصاصی متیلاسیون ۳، ۴-دی هیدروکسی را به عنوان سوبسترای تیواستر متصل به کوآ انجام می‌دهد و اولین واکنش O-متیل ترنسفرزی را کاتالیز می‌کند. به این ترتیب فرولویل کوآ سنتز می‌شود. به این منظور یک گروه متیل را از S-آدنوزین و L-متیونین (SAM) به موقعیت کربن ۳ حلقه‌ی آروماتیک کافئول کوآ انتقال می‌دهد (Hoffmann, Maury et al. 2001).

سپس آنزیم C3H دومین آنزیم سیتوکروم P450 ای که در مسیر بیوسنتز لیگنین فعالیت دارد، یک اتم مولکول اکسیژن را به P-کومارول شیکیمات منتقل و اتم دیگر مولکول اکسیژن را توسط NADPH به آب احیا می‌کند و به این ترتیب 5-O-کافئول شیکیمیک اسید را سنتز می‌کند (Boerjan, Ralph et al. 2003).

سپس بار دیگر آنزیم HCT واکنش آسپیل ترانسفرزی را کاتالیز می‌کند و این مرتبه طی انتقال گروه آسپیل به 5-O-کافئول شیکیمیک اسید، کافئول کوآ را تولید می‌شود. پس از این مرحله CCR مجدداً فعالیت خود را آغاز کرده و موجب تبدیل فرولویل کوآ به کونفریل آلدهید را کاتالیز می‌شود. کونفریل آلدهید که یک گروه متیل دارد می‌تواند تحت تأثیر CAD به کونفریل الکل پیش‌ساز مونولیگنول G تبدیل شود. هم‌چنین CAD می‌تواند توسط دو آنزیم فیرولات ۵-هیدروکسیلاز (F5H) و کافئیک اسید ۵-هیدروکسی فیرولات O-متیل ترنسفرز (COMT)، (EC ۲,۱,۱,۶۸) به ترتیب موقعیت کربن پنج در حلقه‌ی آروماتیک هیدروکسیله و متیله شده و به سیناپیل آلدهید تبدیل شود. گروه آلدهید سیناپیل آلدهید، تحت اثر فعالیت آنزیم CAD به گروه الکی تبدیل شود و سیناپیل الکل، پیش‌ساز مونولیگنول S سنتز می‌شود (شکل ۱-۲).

و نهایتاً پیش‌سازهای مونولیگنول‌ها در دیواره‌ی سلولی به هم اتصال می‌یابند و ساختار پلیمری ناهمگون و غیریکنواختی را به وجود می‌آورند (Boerjan, Ralph et al. 2003).



شکل ۲-۳. بیوسنتز لیگنین (Liu, Luo et al. 2018)

۲-۷ بیان ژن

آنالیزهای بیان ژن با استفاده از PCR زمان واقعی اخیراً مورد توجه قرار گرفته‌اند، زیرا این آنالیزها درک بهتری از فرآیندهای بیولوژیک ارائه می‌دهد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان حقیقی (Real-Time PCR) به عنوان یکی از حساس‌ترین روش‌ها برای سنجش الگوی بیان ژن به کار می‌رود. آنالیزهای بیان ژن در مقایسه با روش‌های سنتی برای آنالیزهای رونویسی، نظیر Northern blot، ¹³qRT-PCR و ¹²semi-RT-PCR مبتنی بر فلورسانس اخیراً به عنوان قابل اطمینان‌ترین روش برای تشخیص mRNA محسوب می‌شود. هم‌چنین به علت حساسیت بالای آن، پس از پردازش نمونه‌ها توسط PCR می‌توان RNAهایی که فراوانی آن‌ها بسیار متفاوت است را مقایسه کرد (Jian, Liu et al. 2008).

واکنش Real-Time PCR که به آن qRT-PCR نیز اطلاق می‌شود، یک روش کمی حساس برای تعیین تعداد کپی‌های اولیه‌ی PCR، از قبیل DNA یا cDNA می‌باشد. کاربردهای متنوعی از قبیل اندازه‌گیری مقدار ژن، آنالیز بیان ژن، تعیین میزان آلودگی‌های ویروسی و بررسی چند شکلی تک

¹² Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction

¹³Quantitative Reverse Transcription PCR

نوکلئوتیدی^{۱۴} دارد. بررسی و اندازه‌گیری تولیدات PCR در مراحل ابتدایی واکنش^{۱۵} سرعت، دقت و حساسیت بالا، از امتیازهای این تکنیک نسبت به PCR معمولی می‌باشد (Espy, Uhl et al. 2006). علاوه بر این، استفاده آسان از PCR زمان واقعی، نیاز به ایزوتوپ‌های رادیواکتیو را از بین می‌برد. همچنین، استفاده از دستگاه، زمانی که تعداد کمی از سلول در دسترس می‌باشد نیز توصیه می‌شود. برخی از ممکن مشکلات در هنگام کار با دستگاه ممکن است پیش آید که شامل تغییر در کیفیت نمونه و یا آلودگی در طی انجام مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA می‌باشد؛ به همین دلیل برای برطرف کردن این مشکلات در PCR در زمان واقعی از یک ژن مرجع استفاده می‌شود.

ساده‌ترین راه شناسایی برای تولیدات PCR سنتز شده جدید در PCR زمان واقعی با کمک رنگ فلورسنت SYBR Green I که به طور ویژه به شیار کوچک DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود انجام می‌گردد (Espy, Uhl et al. 2006).

علت انجام این پژوهش، بررسی مطالعات تکاملی بیوانفورماتیکی گیاه سویا به عنوان نماینده گیاهان دولپه و گیاه برنج به عنوان نماینده گیاهان تک لپه است. در این پژوهش هم‌چنین میزان تغییر بیان برخی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش شوری در مسیر بیوسنتز لیگنین در دو رقم حساس و مقاوم گیاه سویا به منظور شناسایی بعضی از ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش شوری در این مسیر و هم‌چنین بررسی ژن‌های هم بیان با برخی ژن‌های اصلی درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین نظیر PAL، 4CL،CCR انجام گرفت.

۸-۲ ژن‌های هم بیان

به طور کلی، ژن‌های هم بیان، پروفایل بیانی مشابهی دارند و داده‌های ریزآرایه آن‌ها در دسترس است. در واقع، بسیاری از این ژن‌ها در ساختار سلولز، همی سلولز، و لیگنین در گیاه آراییدوپسیس با هم در

^{۱۴}Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping

^{۱۵}Exponential phases

ارتباط هستند. برای سهولت در آنالیز داده‌های حاصل از میکرواری، ابزارهای اطلاعاتی و نرم افزارهای مختلفی وجود دارند که به محققین اجازه می‌دهند تا این اطلاعات را بررسی کنند. علاوه بر این، با روش‌های دیگر می‌توان آنالیز داده‌های میکرواری را بین گونه‌های مختلف، با هدف درک فرآیندهای سلول و پیش بینی روابط ژن‌هایی که در یک مسیر فعالیت می‌کنند، انجام داد (Ruprecht and Persson 2012).

در دهه‌ی گذشته افزایش استفاده از آنالیزهای بیانی ریزآرایه، آنالیزهای گسترده‌ای از نسخه‌ی رونویسی شده را ممکن ساخته است. مطالعات بر اساس داده‌های ریزآرایه که در غالب پایگاه‌های اطلاعاتی در دسترس هستند، نشان دادند که ژن‌هایی که عملکرد مشابهی دارند به هنگام رونویسی تمایل دارند که هماهنگ با یکدیگر رونویسی شوند. این نتایج براساس مشاهدات حاصل از بررسی ژن‌های هم بیان در مسیرهای مختلف نظیر ژن‌های درگیر در ساختار دیواره‌ی سلولی، بیوسنتز گلوکوزینولات و مسیرهای مختلف متابولیسم در آرآبیدوپسیس می‌باشد (Ruprecht and Persson 2012). نکته جالب توجه آن است که برخی از روابط هم بیانی در بین گونه‌های مختلف در یک مرحله‌ی خاص از زندگی حفاظت شده هستند (Bergmann, Ihmels et al. 2003). به عنوان مثال، ژن‌های ارتولوگ درگیر در سنتز پروتئین، چرخه سلولی و تجزیه پروتئین، کلاسترهای هم بیان قابل مقایسه‌ای را در گونه‌های مختلف را تشکیل می‌دهند.

ابزارهای هم‌بیانی مختلفی نظیر ACT، ASIDB، ATTED II، Cress Express، PlaNet، Genevestigator در دسترس هستند که امکان مقایسه بین ژن‌ها را نیز فراهم می‌کنند.

بیشتر ابزارهای هم‌بیانی بر روی گیاه آرآبیدوپسیس به عنوان گیاه مدل متمرکز شده و بخش عمده‌ای از مجموعه داده‌های ریزآرایه قابل دسترس را در بر می‌گیرند و به همین ترتیب، نشان دهنده ارتباطات هم بیانی است. با این حال برخی از روابط رونویسی مربوط به بیولوژی ممکن است فقط تحت شرایط آزمایش خاص یا در برخی از بافت‌ها نشان داده شود. برای پیدا کردن چنین روابطی، ابزارهایی مانند

CORNET، به کاربر این اجازه را می‌دهد تا براساس داده‌های میکروآرای به محاسبه‌ی روابط هم‌بیانی بپردازد (Obayashi, Nishida et al. 2011).

روپرت و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که سلولز تشکیل دهنده‌ی دیواره‌ی سلولی از کمپلکس‌های سلولز سنتتاز (CESA) تشکیل شده است. بخشی از اجزای این کمپلکس در دیواره‌ی اولیه و بخشی دیگر در دیواره‌ی ثانویه سنتز می‌شوند. جالب توجه است، این CESA موجود در دیواره‌ی اولیه و ثانویه به ترتیب الگوهای بیانی مشابهی را نشان می‌دهند. علاوه بر این، مطالعات آن‌ها نشان داد که بسیاری از ژن‌های درگیر در سنتز زایلان و لیگنین همراه با CESA در دیواره ثانویه بیان شده است. بنابراین تجزیه و تحلیل این هم‌بیانی‌ها ممکن است برای شناسایی ژن‌های جدید درگیر در سنتز مربوط به دیواره سلولی ثانویه، موثر واقع شود (Ruprecht and Persson 2012).

علاوه بر سنتز سلولز، از شبکه‌های هم‌بیانی برای شناسایی ژن‌های درگیر در سنتز همی سلولز، نیز استفاده شده است. به عنوان مثال، کوورون و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که ژن CSLC4 در گیاه آرابیدوپسیس که احتمالاً در سنتز ستون اصلی زایلوگلیکان دخیل است، همراه با ژن AtXT1 زایلوزیل ترانسفراز هم‌بیانی دارد که قبلاً نشان داده شده است که باقی مانده‌های زایلوز را به ستون اصلی گلوکان متصل می‌کند (Ruprecht and Persson. 2012).

یکی از مسائل در تجزیه و تحلیل ژن‌های هم‌بیان، میزان همبستگی "مثبت کاذب"^{۱۶} است، یعنی ژن‌های هم‌بیانی که ممکن است به صورت اتفاقی همزمان با هم، بیان شوند، بدون اینکه از نظر عملکرد مرتبط باشند. یک رویکرد مفید برای به حداقل رساندن میزان این همبستگی «مثبت کاذب» ممکن است بررسی بیان ژن‌های ارتولوگ در گونه‌های مرتبط با هم باشد. اینکه بدانیم ژن‌های ارتولوگ در گونه‌های مربوط به یکدیگر آیا در ارتباط با هم بیان می‌شوند یا خیر؟ همانطور که پیش‌تر ذکر شد، روابط هم‌بیانی اغلب در میان گونه‌ها حفاظت شده است (Ruprecht and Persson. 2012).

^{۱۶} false positives

۲-۹ مروری بر پژوهش های انجام شده

لیگنین پلیمری فنلی دارای نقش مرکزی در تناسب گیاهان و استفاده کاربردی برای انسان است. در طول توسعه، لیگنین همراه با سلولز و همی سلولز در سلول های ثانویه فیبرهای ساختاری^{۱۷} و سلول های آبرسانی^{۱۸} ذخیره می شود، این ترکیبات همگی برای استحکام و مقاومت سلول ضروری هستند. علاوه بر این رسوب لیگنین در محل ایجاد زخم در بافت گیاه یا محل حمله پاتوژن القاء می شود که مانع فعالیت آنزیم های سلولولیتیک قارچی و باکتریایی در محل آسیب شده و در نتیجه موجب مهار توسعه ی آسیب به بافت های اطراف می گردد (Baxter and Stewart Jr. 2013).

حضور لیگنین در سلول های گیاهی به عنوان یک عامل مهم در مقاومت در برابر تبدیل دیواره ی سلولی به پیش ماده های سوختی شناخته شده است (Baxter and Stewart Jr 2013).

لیگنین مقادیر محصولات زیست توده را که برای تولید علوفه یا سوخت زیستی لیگنوسلولوزیک استفاده می شود، با دخالت در تجزیه سلولز و سایر پلی ساکاریدهای دیواره ی سلولی به قندهای ساده محدود می سازد (Bonawitz, Im Kim et al. 2014).

تلاش برای کاهش تلفات زیست توده از طریق دستکاری ژنتیکی رسوب لیگنین با برخی از موفقیت ها همراه بوده است، اما دوره ی رشدی کوتاه مدت در بسیاری از گیاهان پرورشی و متعاقباً بازده کم محصول در این گیاهان، استفاده از تغییرات ژنتیکی مشابه در محصولات زیست توده را در سطح تجاری دشوار می کند (Bonawitz, Im Kim et al. 2014).

توضیحات مختلفی برای افزایش ضخامت دیواره سلولی در بافت اسکلرانسیم^{۱۹} وجود دارد. یک احتمال این است که کاهش محتوای لیگنین باعث شده است که دیواره ی سلول ها نسبت به آب نفوذپذیرتر

¹⁷ Structural fibres

¹⁸ water-conducting cells

¹⁹ sclerenchyma

باشند. دیواره‌ی سلولی کربوهیدرات‌ها، که در طبیعت آب دوست^{۲۰} هستند، ممکن است به علت جذب آب متورم^{۲۱} شده باشد. عدم پیوستگی دیواره سلولی نیز ممکن است ناشی از تورم باشد. این اثر ممکن است با افزایش ظاهری محتوای پلی ساکارید همی سلولزی افزایش یابد. در عوض، کاهش سطوح اسید فروئلیک^{۲۲} در دیواره‌های جهش یافته می‌تواند میزان پیوند بین لیگنین و گلوکورونوآرابینوکسی‌زایلان^{۲۳} را کاهش دهد و موجب ایجاد یک ساختار دیواره با فشردگی کم‌تر شود که به دیواره‌ی اولیه اتصال نداشته باشد (Vermerris, Sherman et al. 2010).

افزایش محتوای پلی ساکاریدهای همی سلولزی احتمالاً سبب ایجاد یک مکانیسم جبران کننده‌ای^{۲۴} در گیاه در پاسخ به کاهش مقدار لیگنین یا تغییرات خاص در ترکیبات لیگنین می‌شود. هو و همکاران (۱۹۹۹)، وجود مکانیسم‌های جبرانی را مطرح کرده‌اند. براساس مشاهدات آن‌ها در گیاه صنوبر مقدار لیگنین به علت کاهش تنظیم ژن ۴-کومارات CoA لیگاز(4CL) کاهش یافته است. در این گیاهان کاهش محتوای لیگنین منجر به افزایش همزمان محتوای سلولز شد (Vermerris, Sherman et al. 2010).

یو هو و همکاران (۲۰۰۹) بیان دو آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز لیگنین، توسط روش Real-Time PCR در یک رقم مقاوم و حساس در برابر خشکسالی در ذرت و هم‌چنین شرایط کنترلی به خوبی سیراب^{۲۵} اندازه‌گیری کردند. آن‌ها اختلاف معنی‌داری در محتوای لیگنین برگ پاسخ به تنش خشکی مشاهده کردند. این نتایج نشان می‌دهد که محتوای لیگنین برگ یک شاخص مفید برای ارزیابی تحمل به خشکی در گیاه ذرت است (Hu, Li et al. 2009).

^{۲۰} hydrophilic

^{۲۱} swollen

^{۲۲} ferulic acid

^{۲۳} glucuronoarabinoxylans

^{۲۴} compensatory mechanisms

^{۲۵} watered

تغییر در مقدار، ترکیب و ساختار لیگنین می‌تواند در تولید گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار گیرد و اثرات حاصل از بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین در صفات فنوتیپی گیاهان تراریخته به وضوح قابل شناسایی و تشخیص است. در دو دهه‌ی گذشته، محققان با استفاده از مهندسی لیگنین، مقدار لیگنین و ترکیب آن را در گیاهان تغییر داده‌اند (Hu, Li et al. 2009).

لینا گالگوگورالدو و همکاران (۲۰۱۱) مطرح کردند که تنظیم ناحیه‌ی پایین دست آنزیم‌های hydroxycinnamoyl CoA آنزیم (HCT) در گیاهان تراریخته سبب کاهش شدید در میزان لیگنین می‌شود، که نهایتاً موجب نقص‌های شدید در رشد می‌گردد (Gallego-Giraldo, Escamilla, Trevino et al. 2011).

بسهو و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که خاموش شدن آنزیم HCT در آرابیدوپسیس منجر به تجمع فلاونوئیدها و مهار انتقال اکسین می‌شود. آن‌ها گزارش کردند که بازگشت انتقال اکسین به وسیله کاهش محتوای فلاونوئینوئید درحالی که میزان لیگنین کاهش می‌یابد سبب غلبه بر فنوتیپ کوتولگی می‌گردد (Gallego-Giraldo, Jikumaru et al. 2011).

در گیاه آرابیدوپسیس، مقدار لیگنین در ۴ گونه‌ی جهش یافته‌ی ژن PAL (PAL1, PAL2, PAL3, PAL4) حدود ۲۵-۲۰ درصد کاهش پیدا کرد. درحالی که در ۴ گونه‌ی وحشی گیاه آرابیدوپسیس، کاهش سطوح سالیسیلیک اسید و به دنبال آن کاهش حساسیت به پاتوژن‌ها مشاهده شد.

گوی و همکاران دریافتند که مهار کردن میزان بیان ژن $Os4CL3$ در گیاه برنج، به طور قابل توجهی سبب کاهش میزان لیگنین و هم چنین کاهش ارتفاع گیاه برنج می‌شود.

سرکوب میزان mRNA در ژن 4CL در کاج مونتری (*Pinus radiata*) میزان لیگنین را در گیاهان تراریخته بین ۳۶-۵۰ درصد کاهش داد که این ناشی از تخلیه‌ی مونولیگنول گویاسیل سازنده‌ی لیگنین است که سبب ایجاد پدیده‌ی کوتولگی^{۲۶} در گیاه برنج می‌شود (Liu, Luo et al. 2018).

^{۲۶} Dwarf

وایتو و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که تداخل بیان ژن‌های CCR1 و COMT1 به طور قابل توجهی محتوا و ترکیب لیگنین را در گیاه علفی چچم^{۲۷} تغییر داده و هضم پذیری لیگنین بدون اینکه اثرات منفی بر روی گیاه یا تولید زیست توده داشته باشد افزایش می‌یابد (Tu, Rochfort et al. 2010).

شادل و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که در گیاه علفی جو^{۲۸} تراریخته، یک ساختار آنتی سنس با ژن HCT، منجر به کاهش قابل توجهی در محتوای لیگنین و تغییرات آشکاری در ترکیب لیگنین می‌شود که در ویژگی‌های ظاهری گیاه سبب کوتاه قدی آشکار، کاهش زیست توده و تأخیر در گل‌دهی یونجه علفی شده است (Shadle, Chen et al. 2007).

مطالعات نشان داده‌اند که متابولیسم فنیل پروپانویید و سنتز خاص لیگنین توسط عوامل رونویسی تنظیم می‌شود. فاکتور رونویسی گسترده برای بیوسنتز لیگنین، به خانواده‌ی MYB تعلق دارد یافت شده است که بیان بالای عوامل رونویسی MYB58 و MYB63 در آرابیدوپسیس، بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز لیگنین را تقویت می‌کند و موجب افزایش فرآیند لیگنینی شدن سلول‌ها می‌شود. در حالی که دیگر عوامل رونویسی، مانند EgMYB1 در گیاه اکالیپتوس، MYB31 در موز^{۲۹}، بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز لیگنین را مهار و انباشت لیگنین را کاهش می‌دهند (Liu, Luo et al. 2018).

فاکتورهای رونویسی MYB نقش مهمی در بیوسنتز دیواره‌ی سلولی ثانویه و تحمل به تنش‌های غیر زیستی دارند. بیان بالای BplMYB46 در گونه‌ای درخت توس^{۳۰} سبب افزایش تحمل به تنش شوری و فشار اسمزی می‌گردد (Guo, Wang et al. 2017).

وی و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که در مجموع ۱۷ ژن در ناحیه تنظیمی بالادست و ۱۶ تنظیم کننده ژن‌های فاکتورهای رونویسی در پایین دست ژن حاوی لیگنین بالا، از جمله MYB85 و MYB103 یافت شده است. MYB85 با فعال شدن در مسیر بیوسنتز لیگنین در آرابیدوپسیس و

^{۲۷} Ryegrass

^{۲۸} Medicago sativa

^{۲۹} Musa

^{۳۰} Betula platyphylla

بیان بالای MYB85 منجر به تخریب لیگنین در سلول‌های اپیدرمی و قشرغشاء ساقه می‌گردد. سرکوب بیان MYB103 موجب کاهش ضخامت دیواره ثانویه در فیبرهای ساقه گل آذین می‌شود (Wei, Jian et al. 2017).

اومان و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که MYB103 برای بیان F5H و بیوسنتز مونولیگنول سرینگیل در آرابیدوپسیس مورد نیاز است. هم‌چنین این یافته‌ها نشان داد که فاکتورهای رونویسی MYB85 و MYB103 می‌تواند به عنوان تنظیم کننده بیوسنتز لیگنین در گیاه شلغم (*Brassica napus*) باشند (Öhman, Demedts et al. 2013).

یکی از دیگر بزرگترین خانواده های فاکتورهای رونویسی (TF) در گیاهان، فاکتورهای رونویسی NAC هستند که نقش مهمی در تنظیم روند رشدی گیاهان و هم‌چنین پاسخ به تنش‌های غیر زیستی دارند. خانواده NAC در فرآیندهای مختلفی از جمله مریستم راس ساقه، رشد گل‌ها، تقسیم سلولی، پیری برگ، تشکیل دیواره‌های ثانویه و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارند. شاو و همکاران (۲۰۱۵) طی مطالعاتی نشان دادند که بسیاری از TFهای NAC پاسخ دهنده به تنش‌های زیستی و غیر زیستی برای بهبود تحمل تنش در گیاهان زراعی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، به کار گرفته شده‌اند (Shao, Wang et al. 2015).

با این حال، تنها تعداد کمی از این ژن‌های NAC، تا به امروز مشخص شده‌اند و اکثر اعضای خانواده NAC هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، هر چند که این ژن‌ها احتمالاً نقش مهمی در گیاهان ایفا می‌کنند و برای تعیین میزان مشخصه عملکرد بیولوژیکی هر ژن NAC دانستن اطلاعات کامل این خانواده‌ی فاکتور رونویسی امری ضروری است (Shao, Wang et al. 2015).

سیمپسون و همکاران (۲۰۰۳) مطرح کردند که فاکتورهای رونویسی NAC با استفاده از نواحی تنظیمی پروموتورهایشان، رونویسی ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. توالی تشخیصی NAC (NACRS)^۱

^۱ NAC recognition sequence

شامل توالی CACG موتیف DNA متصل شونده، در پروموتور ژن پاسخ دهنده به خشکسالی زودهنگام (ERD1)¹ در گیاه آرابیدوپسیس شناسایی شده است (Simpson, Nakashima et al. 2003).

فنگ و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که فاکتورهای رونویسی ONAC ناشی از خشکی برنج نیز می‌توانند به یک NACRS مشابه متصل شوند، این موضوع نشان می‌دهد که NACRS میان گیاهان کمی برای فاکتورهای رونویسی NAC، حفاظت شده باشد (Fang, You et al. 2008).

فاکتورهای رونویسی NAC نقش مهمی در شبکه های سیگنالینگ پیچیده به منظور پاسخ به تنش های گیاهی دارند. با توجه به گسترده بودن فاکتورهای رونویسی NAC در گیاهان مختلف و نقش های نامعلوم آنها، نقش این فاکتورهای رونویسی برای مقابله با تنش های غیر زیستی همچنان یک چالش بزرگ محسوب می‌شود. اخیراً، مطالعات با استفاده از پروفایل بیانی ژنوم وترنسکریپتوم انجام شده که محققان را قادر ساخته است، تعدادی از فاکتورهای رونویسی NAC را که احتمالاً در پاسخ به تنش های غیرزیستی دخیل هستند، شناسایی کنند. به عنوان مثال، ۳۳ ژن NAC تحت تیمار با نمک به طور معنی داری در آرابیدوپسیس تغییر کردند و ۳۸ ژن NAC در پاسخ به خشکسالی در سویا، ۴۰ ژن NAC در تنش شوری و خشکسالی در برنج دخیل بودند (Shao, Wang et al. 2015).

علاوه بر فاکتور رونویسی MYB، تعدادی از اعضای خانواده فاکتور رونویسی NAC در آرابیدوپسیس توانایی کنترل بیوسنتز لیگنین با تنظیم تمام ژن های مربوط به سنتز دیواره ی سلولی را دارند (Liu, Luo et al. 2018).

علاوه بر این فاکتورهای رونویسی فاکتورهای رونویسی WRKY نیز می‌توانند به عنوان تنظیم کننده های ژن های بیوسنتز لیگنین عمل کنند. فاکتور رونویسی WRKY سبب افزایش سطح لیگنین و افزایش عملکرد بیوماس در یونجه (*Medicago sativa L*) شده است. (Liu, Luo et al. 2018)

¹ EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION1

چین و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که تغییر الگوهای بیانی ژن‌های WRKY و یا تغییر در فعالیت‌ها آن‌ها سبب ایجاد مشارکت در مسیرهای سیگنالینگ مختلف و شبکه‌های تنظیمی می‌شود (Chen, Song et al. 2012).

تعداد زیادی از ژن‌های خانواده‌ی WRKY در گیاهان مختلف شناسایی شده‌اند. در آرابیدوپسیس ۷۴ ژن WRKY، در برنج بیش از ۱۰۰ ژن، سویا ۱۹۷ و صنوبر ۱۰۴، انبه هندی ۶۶، ذرت خوشه‌ای ۶۸ و در جو بیش از ۴۵ ژن WRKY شناخته شده‌اند (Chen, Song et al. 2012).

در چند سال گذشته، بیشتر ژن‌های مرتبط با متابولیسم لیگنین با آزمایش‌های *In vivo* شناسایی شده‌اند، از جمله ژن CCoAOMT1 در ذرت، ژن BpMADS12 از فاکتورهای رونویسی MADS-box در درخت جنگلی توس نقره‌ای^۱ و عوامل شوک حرارتی EjHSF3 در ازگیل ژاپنی^۲ از این قبیل ژن‌های شناسایی شده هستند (Li, Yang et al. 2016).

علاوه بر این مطالعات استفاده از تکنولوژی مهندسی ژنتیک برای تغییر محتوا و ترکیب لیگنین، رشد، توسعه و سازگاری محیطی گیاهان تراریخته باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد (Liu, Luo et al. 2018).

لیلجگرن و همکاران (۲۰۰۰) مطرح کردند که به عنوان یکی از اجزای اصلی دیواره سلول گیاهی، لیگنین به عملکرد سلول‌های چندگانه در بافت‌ها و اندام‌های گیاهی وابسته است. متابولیسم لیگنین سبب رشد و تکامل گیاه می‌شود. دخالت بیوسنتز لیگنین، به ویژه واحدهای مونولیگنول H، اغلب منجر به مهار رشد و توسعه‌ی گیاه می‌شود. در برخی از گیاهان، تجمع لیگنین برای انتشار بذر اهمیت دارد. قرار دادن لیگنین در پوشش بذر می‌تواند دانه‌ها را از عوامل نامطلوب خارجی محافظت کند (Liljegren, Ditta et al. 2000). با وجود مطالعات انجام شده تاکنون ولی همچنان مکانیسم‌های لیگنین که بر رشد و رشد گیاه تأثیر می‌گذارد، شناخته نشده است. بوناویتز و همکاران (۲۰۱۴) پیشنهاد کرده‌اند که فرآیند رونویسی و مسیرهای سیگنالینگ پاسخ به نقص دیواره سلولی ممکن است

¹ *Betula platyphylla*

² *Eriobotrya japonica*

نقش مهمی در کمبود لیگنین و متعاقبا بازماندن از رشد داشته باشد (Bonawitz, Im Kim et al. 2014).

تریپتای و همکاران (۲۰۰۳) یکی از مهم‌ترین صفات است که بر رشد و عملکرد دانه تأثیر می‌گذارد مقاومت در برابر خوردگی است که می‌تواند گیاهان را از خم شدن یا شکستن حفاظت کند. مطالعات متعدد نشان داده است که مقاومت گیاهان با ارتفاع گیاه، بیوماس، قطر ساقه و ترکیب و ویژگی‌های دیواره‌ی سلولی ساقه مرتبط است. تجمع لیگنین در دیواره سلولی به طور قابل توجهی باعث افزایش قدرت مکانیکی ساقه گیاه می‌شود که این امر اهمیت زیادی در مقاومت گیاهان دارد (Tripathi, Sayre et al. 2003).

هو و همکاران (۲۰۱۷) گزارش دادند که ترکیب و فعالیت آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین نظیر (PAL, 4CL, CAD و POD) نقش مهمی در مقاومت مطابق با شاخص‌های متابولیسم لیگنین در گونه‌های مختلف فاگوپیروم^۱ دارند (Hu, Liu et al. 2017).

دیواره سلول گیاهی اولین مانع در مقابل خطرات خارجی است، یکی از واکنش‌های کلی گیاهان تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی، انباشت گونه‌های اکسیژن آزاد، همراه با افزایش تجمع لیگنین است بنابراین متابولیسم لیگنین ارتباط خاصی با مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی نظیر ، مقاومت به حشرات، تحمل خشکسالی، شوری، گرما، سرما، فلزات سنگین و سایر تنش‌ها دارد (Derikvand, Sierra et al. 2008).

ژن‌های PAL, C4H در برنج و ژن‌های مرتبط با پاتوژنز (PR9) که در ارتباط با بیوسنتز لیگنین بودند، به طور قابل توجهی سبب مقاومت گیاه برنج به حشرات جهنده‌ی قهوه‌ای برنج شد. این امر نشان می‌دهد که همبستگی متقابل با متابولیسم لیگنین سبب بروز مقاومت در برابر حشرات برنج می‌گردد (Jannoey, Channei et al. 2017).

^۱ *Fagopyrum esculentum* Moench

خشکسالی شدید و تنش زیاد نمکی به طور هم‌زمان رخ می‌دهد و باعث تنش اسمزی می‌شود که سبب از دست رفتن آب و حتی مرگ سلول می‌شود، که به طور قابل ملاحظه‌ای روی رشد و رشد گیاه تأثیر می‌گذارد و باعث خسارت جدی محصول می‌شود. لیگنین می‌تواند نفوذ آب از دیواره آب دیواره‌ی سلولی گیاه را کاهش دهد، که این امر به حفظ تعادل اسمزی سلولی و یکپارچگی غشای محافظ کمک می‌کند (Liu, Luo et al. 2018). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که بیوسنتز لیگنین تحت تنش خشکی افزایش می‌یابد. هنگامی که گیاه از تنش خشکسالی رنج می‌برد، محتوای لیگنین به طور قابل ملاحظه‌ای در ساقه‌ی گیاه اوکالیپتوس یورگندیس^۱ و منطقه اپیکالی ساقه اکالیپتوس گلوبوس^۲، افزایش می‌یابد (Moura-Sobczak, Souza et al. 2011).

تحت تنش خشکی بیان سطوح ژن‌های CAD و COMT که در مسیر بیوسنتز لیگنین درگیر هستند در برگ‌های ذرت، به طور معناداری با هم مرتبط بود. CCR یک ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز لیگنین است که در شرایط تنش خشکی به طور قابل توجهی در ریشه ذرت به شدت تنظیم می‌شود (Fan, Linker et al. 2006). در حال حاضر بیشتر تحقیقات در مورد لیگنین در گیاهان، بر روی تنظیم مقادیر لیگنین، از طریق زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک مولکولی انجام شده است. به طور کلی می‌توان گفت که کاهش تجمع لیگنین در گیاهان انرژی می‌تواند تولید سوخت‌های زیستی^۳ را بهبود بخشد. با این حال، همان‌طور که در بالا شرح داده شد، کاهش میزان بیوسنتز لیگنین می‌تواند به طور جدی بر رشد و تکامل گیاه تأثیر بگذارد، سبب افزایش خطر ابتلا به بیماری‌ها، کاهش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زیستی و بیولوژیکی خارجی و در نتیجه باعث تهدید جدی برای تولید محصول می‌شود. در آینده باید نکاتی در مورد نتیجه‌ی احتمالی کاهش مقدار لیگنین در گیاه خاص از طریق تغییرات ژنتیکی ژن‌های بیوسنتز لیگنین، حفظ متابولیسم فیزیولوژیکی طبیعی گیاه و افزایش کارآمد

^۱ Eucalyptusurograndis

^۲ Eucalyptusglobulus

^۳ biofuels

انرژی زیستی، به طور هم‌زمان مورد بررسی قرار گیرد. برای برخی از محصولات مهم، می‌توان ذخیره‌ی لیگنین را در گیاه با مهندسی ژنتیک افزایش داد، بنابراین این امر مقاومت در برابر عوامل خارجی محیطی و بهبود عملکرد محصولات را افزایش می‌دهد. علاوه بر این موارد اصلاح ترکیب و نسبت مونومرهای تشکیل دهنده‌ی لیگنین توسط ژن‌های ویژه‌ای از ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین می‌تواند یک مسیر موثری را برای بهبود کاربردهای لیگنین فراهم کند (Liu, Luo et al. 2018).

استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک امکان شناخت بهتر ژن‌های درگیر در مسیر سنتز لیگنین را فراهم می‌کند.

فصل ۳ مواد و روش ها

۳-۱ بخش بیوانفورماتیک

۳-۱-۱ شناسایی ژن های کد کننده آنزیم های درگیر در مسیر

بیوسنتز لیگنین

ژن های کد کننده آنزیم های PAL^۱، 4CL^۲ و CCR^۳ درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین از پایگاه های اطلاعاتی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) فیتوزوم

(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) به دست آمد. در پایگاه اطلاعاتی NCBI در بخش Gene پس از انتخاب نام گیاه، نام کامل آنزیم نیز بررسی شد. در پایگاه اطلاعاتی فیتوزوم بررسی آنزیم براساس EC Number مربوط به هر آنزیم انجام گرفت.

فعالیت ژن های حاصل از این دو پایگاه اطلاعاتی در پایگاه اطلاعاتی kegg (<http://www.genome.jp/kegg/genome.html>) تایید شد. برای این منظور در قسمت Kegg genome و در قسمت Organism نام هر گیاه جستجو شد و با توجه به EC Number^۴ آنزیم بررسی انجام گرفت.

۳-۱-۲ موقعیت کروموزومی

موقعیت کروموزومی ژن ها را از سایت ها و پایگاه های اطلاعاتی مختلفی می توان به دست آورد. به عنوان مثال پایگاه اطلاعاتی NCBI، شماره ی کروموزومی هر ژن را مشخص کرده است. با توجه به Gene Id هر ژن هم می توان متوجه شد که این ژن روی چه کروموزومی قرار گرفته است. به عنوان

^۱ Phenylalanine ammonia lyase

^۲ 4-coumarate-coa ligase

^۳ Cinnamoyl -coa reductase

^۴ Enzyme Commission Number

مثال در ژن 03G181600 که مربوط به ژن PAL در گیاه سویا است عدد 03 نشان دهنده موقعیت کروموزومی ژن و G181600 موقعیت قرارگیری آن روی کروموزوم را نشان می‌دهد. در این پژوهش موقعیت کروموزومی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین در گیاه تک لپه برنج و گیاه دو لپه‌ی سویا با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Ensemble plants (http://plants.ensembl.org/index.html) رسم شد. در قسمت All genome گونه‌ی گیاهی مورد نظر انتخاب شد. برای گیاه سویا *Glycine max* و برای برنج نام *Oryza sativa japonica* انتخاب و روی گزینه‌ی جستجو کلیک شد. سپس گزینه‌ی view karyotype انتخاب شد و با وارد شدن به صفحه‌ی جدید، گزینه‌ی Add Features انتخاب شد و ID متناظر هر ژن در جدول مربوطه وارد شد. در پایین جدول گزینه‌ی مربوط به انتخاب رنگ برای ژن‌های مختلف دارد که می‌توان با در نظر گرفتن یک رنگ خاص برای یک ژن، جایگاه‌های کروموزومی ژن‌ها را به تفکیک رنگ روی گراف نشان داد.

۳-۱-۳ بررسی الگوی اینترون و اگزون

برای این منظور از نرم‌افزارهای مختلفی می‌توان استفاده کرد، به عنوان مثال پایگاه اطلاعاتی NCBI با وارد کردن شماره‌ی ژن، اطلاعات مربوط به ژن شامل اسم ژن، تعداد اگزون ژن و حتی شکل آن را به دست می‌دهد. یکی از نرم‌افزارهایی که می‌توان در این زمینه از آن استفاده کرد ORF finder NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) است که براساس شماره‌ی ژن و یا توالی نوکلئوتیدی آن همه‌ی آمینواسیدهایی که ممکن است از توالی مدنظر ما ایجاد شوند را در دو رشته‌ی الگو و غیر الگو نشان می‌دهد. در واقع قطعاتی که به شکل اگزون ایجاد می‌شوند را نشان می‌دهد. در این نرم‌افزار توالی نوکلئوتیدی هر ژن وارد شد و پس از کلیک کردن روی گزینه‌ی submit به اطلاعات مربوط

به ORF^o های مربوط به هر ژن را نشان داده شد. ORF های رشته الگو و غیر الگو با علامت های مثبت و منفی در جدولی نشان داده شد. هر ORF انتخاب شد و روی گزینه ی smartblast کلیک شد. در این مرحله گرافی نشان داده می شود که بیان می کند چه نوع پروتئینی با این توالی ژنی و در چه موجودی تولید می شود. نرم افزار دیگر که شکل شماتیک توالی و اینترون و اگزون و ناحیه UTR را نشان می دهد و از این جهت کاربردی تر است GSDs2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) می باشد که با در اختیار داشتن توالی های CDS و توالی ژنومی هر ژن ، قابلیت نشان دادن توالی های اینترون و اگزون هر ژن را دارا می باشد. در نرم افزار GSDs2.0 در قسمت Gene Features، فرمت Fasta انتخاب شد. در کادر بالا توالی بالا توالی CDS و در کادر پایین توالی ژنومی ژن وارد شد. با انتخاب گزینه submit توالی اینترون و اگزون ژن ها نشان داده شد.

۳-۱-۴ بررسی روابط تکاملی و فیلوژنتیکی توالی های پروتئینی

برای بررسی تکاملی ژن های مورد مطالعه از درصد مشابهت توالی پروتئینی ژن ها با استفاده از پایگاه NCBI و ابزار هم ردیفی پروتئینی چندتایی Blast protein استفاده شد. هم چنین با استفاده از نرم افزار Mega7.0 درخت فیلوژنتیک مربوط به محصول های پروتئینی، با استفاده از هم ردیفی Muscle و روش Maximum Likelihood (ML) با دقت و Boot strap ۱۰۰۰ رسم شد. این نرم افزار که برای آنالیز داده های حاصل از توالی های DNA و پروتئین ها می باشد دارای محیط کاربری ساده و دسته بندی شده ای است که کار با این نرم افزار را بسیار آسان می نماید. اصول اصلی کار با این نرم افزار وارد کردن داده ها، مرتب کردن داده (Align) و آنالیز داده ها می باشد.

برای بررسی تکاملی ژن ها ، توالی های آمینواسیدی ژن ها در نرم افزار Mega7.0 وارد شد. برای این منظور پس از وارد شدن به نرم افزار Mega7.0 روی گزینه ی Align کلیک کرده و سپس Edith/

^o Open Reading Fram

build Alignment را انتخاب کردیم. سپس گزینه‌ی Creat new alignment را انتخاب کرده و پس از انتخاب نام Protein ، به صفحه‌ی Alignment explore وارد شده و تمامی داده‌ها را برای مرتب سازی در این قسمت وارد شد.

برای وارد کردن توالی‌ها روی گزینه‌ی Edit کلیک کرده و Insert sequence from file را انتخاب شد. نکته‌ای که در مرتب کردن داده‌ها اهمیت دارد آن است که برخی از توالی‌ها با حرف N نمایش داده می‌شوند که این قسمت‌ها ممکن است آنالیز را دچار مشکل کند. برای جلوگیری از ایجاد این مشکل این قسمت‌ها با گزینه‌ی Delete کیبورد حذف شد.

در مرحله‌ی بعد داده‌ها Align شدند. در این قسمت باید برای نرم‌افزار مشخص کرد که کدام قسمت از توالی‌ها را Align کند به این منظور پس از انتخاب همه‌ی نمونه‌ها، گزینه‌ی Align Protein را انتخاب کردیم و در نهایت گزینه‌ی compute را انتخاب شد تا Align نمونه‌ها آغاز شود. پس از Align کردن می‌توان دید که در هر ستون تقریباً نوکلئوتیدهای یکسانی قرار گرفته است و اختلاف نوکلئوتیدی که در هرستون دیده می‌شود به دلیل پلی مورفیسم بین نمونه‌ها می‌باشد.

آنالیز داده‌ها شامل رسم درخت فیلوژنتیک، محاسبه ضرایب تشابه و ... می‌باشد. برای این کار پس از Align از گزینه‌ی Data، قسمت Phylogenetic analysis را انتخاب شد. برای رسم درخت فیلوژنتیکی روی گزینه‌ی Phylogeny کلیک کرده و روی گزینه Maximum likelihood tree کلیک شد. رسم درخت را با Bootstrap ۱۰۰۰ تنظیم کرده و گزینه‌ی compute انتخاب شد. پس از پایان یافتن زمان آنالیز داده‌ها درخت فیلوژنتیکی مشاهده شد.

۳-۱-۵ بررسی وقوع دو برابر شدگی ژن‌ها

با استفاده از نرم‌افزار Mega7.0 وقوع دوبرابر شدگی ژن‌ها در ژن‌های همولوگ مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های همولوگ به دو دسته‌ی ژن‌های پارالوگ و ارتولوگ تقسیم‌بندی می‌شوند. ژن‌های پارالوگ آن دسته از ژن‌ها هستند که در یک موجود مشترک با هم تشابه زیادی داشته باشند و در اثر

فرآیند دو برابر شدن ایجاد شده باشند. این در حالی است که ژن‌های آرئولوگ شامل ژن‌هایی می‌شوند که با هم تشابه زیادی دارند اما در اثر فرآیند گونه‌زایی تفکیک شده‌اند. به عبارت دیگر یعنی ژن‌های آرئولوگ ژن‌هایی با تشابه زیاد اما در دو موجود مختلف هستند. به منظور بررسی دو برابر شدگی ژن‌ها، درخت فیلوژنتیکی بر اساس هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن‌ها با الگوریتم Muscle و روش ML با آزمون Boot strap ۱۰۰۰، رسم شد. پس از رسم درخت فیلوژنتیک، روی گزینه user tree کلیک کرده و گزینه Find gene duplication را انتخاب کردیم. در این مرحله صفحه جدید Gene duplication wizard ظاهر شده و با انتخاب گزینه Load gene tree و در نهایت Launch analysis دو برابرشدگی وقوع ژن‌ها به دست آمد.

۳-۱-۶ مکان فعالیت آنزیم‌ها

بررسی مکان فعالیت آنزیم‌ها به منظور اینکه بدانیم هر آنزیم مورد مطالعه در کدام قسمت گیاه مثل شبکه آندوپلاسمی، جسم گلژی، سیتوپلاسم و ... فعالیت می‌کند با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Plant-mPLoc (www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi) انجام شد. در این نرم‌افزار آنلاین توالی آمینواسیدی هر ژن به صورت مجزا وارد شد و روی گزینه submit کلیک شد. در این مرحله نرم‌افزار ما را به صفحه‌ی جدیدی هدایت می‌کند و مکانی که ژن‌های آنزیم مورد مطالعه در آن فعالیت می‌کنند را نشان می‌دهد.

نرم‌افزار TargetP 1.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>)، نیز برای یافتن مکان فعالیت آنزیم‌ها استفاده می‌شود اما از آنجایی که برای آنزیم‌های مورد مطالعه‌ی ما مکانی را تعریف نکرد به نظر می‌رسد که این ابزار برای بررسی آنزیم‌های گیاهی کارآمد نمی‌باشد از این رو از نرم‌افزار Plant-mPLoc استفاده شد.

۷-۱-۳ بررسی برهم کنش پروتئین های هدف با سایر پروتئین ها و

ترکیبات

به منظور بررسی ارتباط ژن های مورد مطالعه با سایر ژن ها و پروتئین ها از پایگاه اطلاعاتی STRING با version 11.0 ۲۰۱۹ استفاده شد. در این نرم افزار آنلاین پس از وارد شدن به صفحه اصلی روی گزینهی Search کلیک شد. سپس اسم ژن مورد نظر را در کادر بالای صفحه وارد و نام گیاه مورد نظر انتخاب شد. با کلیک روی گزینهی Search جدول پروتئین ها و ژن هایی که با ژن ما برهم کنش دارند به همراه تصویر شماتیک آن نشان داده شد. برای به دست آوردن شبکه برهم کنش ژن ها از توالی پروتئینی ژن ها نیز می توان استفاده کرد.

۸-۱-۳ بررسی های هم بیانی

در این پروژه شبکه ی هم بیانی ژن های PAL، 4CL و CCR در گیاه سویا و برنج مورد بررسی قرار گرفت. به منظور به دست آوردن ژن های هم بیان با ژن های اصلی درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین از پایگاه اطلاعاتی ATTED II (<http://atted.jp>) و Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) استفاده شد.

ATED II ۱-۸-۱-۳

این پایگاه اطلاعاتی، یک پایگاه داده هم بیانی برای گونه های گیاهی است که به کشف روابط ژن های ناشناخته در یک گونه کمک می کند. که به عنوان یک روش تجزیه تحلیل پیشرفته ی داده های هم بیانی با بررسی تغییرات روابط ژنی گونه های مختلف می توان آن ها را از منظر تکاملی مقایسه کرد. با این حال، تعیین اعتبار مقایسه ی مطالعات هم بیانی، بدون ارزیابی کمی از کیفیت داده های هم بیانی

مشکل است. شاخص مورد استفاده برای تعیین هم بستگی در پایگاه ATTED II ضریب MR^۶ (شاخص رتبه متقابل) است. پیش تر از ضریب همبستگی پیرسون^۷ برای میزان همبستگی ژن ها استفاده می شد. علت جایگزین کردن شاخص MR به جای ضریب پیرسون آن است قدرت پیش بینی MR برای عملکرد ژن نسبت به ضریب همبستگی پیرسون (PCC) بالاتر است. به عبارتی ژن های زیادی وجود دارند که تعداد ژن های هم بیان کمی براساس ضریب پیرسون به دست می دهند در حالی که از لحاظ عملکردی مناسب هستند. در واقع برای حفظ انعطاف پذیری ژن های ضعیف که هم بیان های ژنی قابل توجهی دارند استفاده از شاخص MR مناسب تر است (Obayashi, Aoki et al. 2017). در پایگاه اطلاعاتی ATTED II پس از انتخاب [CoExSearch](#)، id ژن ها در کادر مورد نظر وارد شد. شاخص هم بستگی MR انتخاب شد و با انتخاب گزینه Submit جدول نشان دهنده ژن های هم بیان با ژن مورد نظر به دست آمد.

Genevestigator ۲-۸-۱-۳

نرم افزار Genevestigator ابزاری قدرتمند برای زیست شناسان برای کشف بیان ژن در زمینه های متنوع زیست محیطی است (Hruz, Laule et al. 2008). آنالیز بیان ژن به ابزار تحقیق قدرتمندی در زیست شناسی نیاز دارد. در حال حاضر چندین نرم افزار کاربردی برای زیست شناسان با استفاده از داده های میکروآرای^۸ امکان تحقیق را فراهم کرده اند. نرم افزار Genevestigator داده ها را براساس Affymetrix Genechip ارائه می دهد. کاربران می توانند با استفاده از این نرم افزار الگوهای بیان ژن مورد نظر را در شرایط محیطی مختلف، مراحل رشدی و اندامک های گوناگون جست و جو کنند. این نرم افزار این امکان را به کاربر می دهد تا ژن هایی که به طور خاص در تنش انتخاب شده، در مراحل رشدی مختلف و یا در اندام های مختلف شناسایی کند. با استفاده از نرم افزار

^۶ Mutual Rank

^۷ Pearson's correlation coefficient (PCC)

^۸ Microarrays

Genevestigator می‌توان پروفایل بیانی بیش از ۲۲۰۰۰ ژن آرابیدوپسیس را که حدود ۱۰۶۰۰ ژن آن شناسایی نشده‌اند را به دست آورد. هدف از استفاده از این نرم افزار کاربردی کشف عملکرد ژن‌های هدف و طرح آزمایشات جدید مبتنی بر اطلاعات بیان ژن توسط زیست‌شناسان گیاهی است. پس از نصب نرم‌افزار Genevestigator، گزینه‌ی new را انتخاب کرده، اسم گیاه و متد اندازه‌گیری Affymetrix Soybean Genome Arrey را انتخاب می‌کنیم. id ژن‌ها را وارد کرده و سپس گزینه‌ی Coexpression را انتخاب می‌کنیم. لیست هم‌بیان ژن‌ها به صورت جدول و شکل به دست می‌آید که می‌توان ضریب پیرسون آن را با توجه به اهمیت میزان آن برای کار ما تغییر داد. این نرم افزار ۲۵ ژن هم‌بیان برای هر ژن وارد شده مشخص می‌کند و به آن‌ها براساس ضریب پیرسون و همبستگی بیشتر، به صورت پیش فرض، رتبه‌ی ۱-۲۵ را می‌دهد.

این مراحل برای پیدا کردن ژن‌های هم بیان در گیاه برنج هم انجام شد.

برای بررسی میزان Pathway Enrichment و براساس مرور منابع انجام گرفته مشخص شد می‌توان از هر دو پایگاه اطلاعاتی Kegg و Phytozome بهره جست. در این پژوهش شبکه‌های هم‌بیانی با استفاده از ابزار Phytomine (<https://phytozome.jgi.doe.gov/phytomine/begin.do>)، مورد بررسی‌های Pathway Enrichment قرار گرفتند. به این منظور لیست ژن‌های هم‌بیان با ژن‌های اصلی در کادر Genes وارد شد و روی گزینه Analysis کلیک شد. در نتیجه هدایت به صفحه جدید روی کادر سبز رنگ Save a list of Genes کلیک شد و نهایتاً جدول اطلاعات مربوط به ژن‌ها و هم‌چنین جدول Pathway Enrichment مشاهده شد. میزان محاسبه Pathway Enrichment براساس ضریب P-value محاسبه می‌گردد که هر چقدر میزان این ضریب کم‌تر باشد نشان دهنده دقت بالاتر محاسبه می‌باشد.

۳-۱-۹ رسم شبکه هم‌بیانی

شبکه هم‌بیانی توسط نرم‌افزار Cytoscape ورژن 3.7.0 رسم شد. به این منظور داده‌های هم‌بیانی در یک فایل اکسل وارد شدند. در ستون A اکسل اسم Source و در ستون B اکسل اسم Target انتخاب شد. در ستون‌های زیر Source لیست خانواده‌های ژنی درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین در ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش وارد شد و در ستون‌های زیر Target، لیست ژن‌های هم‌بیان با هر ژن وارد شد. برای ذخیره کردن فایل اکسل از گزینه save as استفاده کرده و پس از گذاشتن یک نام برای فایل گزینه‌ی Text(tab delimited) را برای بارگذاری در نرم‌افزار Cytoscape، انتخاب کردیم. در نرم‌افزار Cytoscape گزینه‌ی File را کلیک کرده و با انتخاب گزینه‌ی Import Network from File، فایل اکسل ذخیره شده در مرحله‌ی قبل وارد شد و در نهایت با انتخاب گزینه‌ی OK، نرم‌افزار شکل مربوط به شبکه‌های هم‌بیانی را ترسیم کرد.

۳-۱-۱۰ آنالیز TFBS های ژن های هم بیان

به منظور آنالیز توالی‌های بالا دست ژن‌های هم‌بیان از نرم‌افزار planpan3.0 (http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/gene_group.php) استفاده شد. سپس گزینه‌ی Gene Group Analysis انتخاب شد. یک بار روی تصویر گیاه سویا و بار دیگر روی تصویر گیاه برنج کلیک کرده و id ژن اصلی و ژن‌های هم بیان با آن ژن را وارد کردیم. به این ترتیب جدولی شامل TFBS^۹ هایی که در ناحیه‌ی بالادست حداقل ۹۰ درصد ژن‌ها قرار داشتند، به دست آمدند. پیش‌تر از نرم‌افزار plantpan2.0 استفاده می‌شد که فقط اطلاعات پروموتوری سه گیاه آرابیدوپسیس، ذرت و سویا را دارا بود. در حال حاضر از ورژن planpan3.0 استفاده می‌شود که اطلاعات گیاهان دیگری نظیر گوجه فرنگی، برنج، پنبه و گونه‌ی دیگری از آرابیدوپسیس را علاوه بر گیاهان قبلی دارد.

^۹ Transcription Factor Binding Site

۲-۳ بخش آزمایشگاهی

۱-۲-۳ محل و زمان اجرای طرح

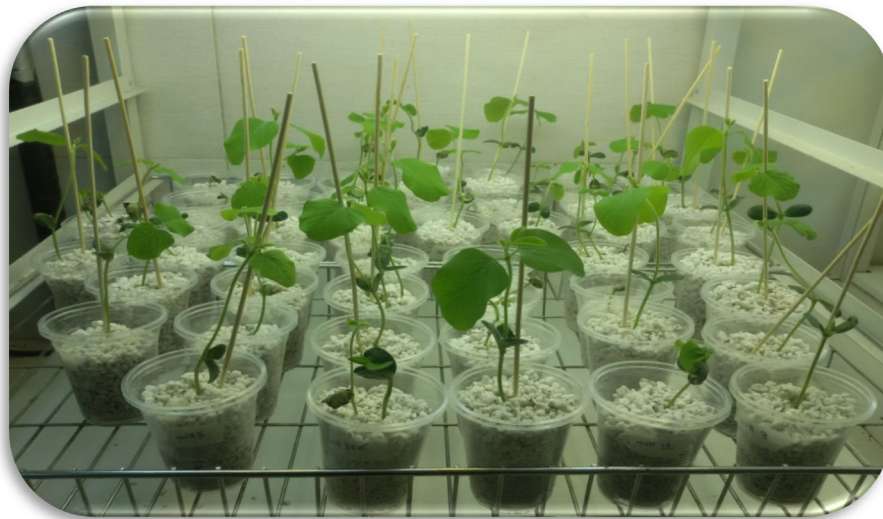
این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود در فاصله زمانی ۹۶-۹۷ انجام شد.

۲-۲-۳ مواد گیاهی

بذرهای دو رقم سویای حساس L17 و مقاوم Williams به تنش شوری استفاده شده در این پژوهش از مرکز تحقیقات و اصلاح بذر کرج تهیه شد و تنش شوری به گیاهان کشت شده در آزمایشگاه اعمال گردید.

۳-۲-۳ کشت ارقام گیاهی و القای تنش

بذر ارقام حساس و مقاوم سویا پس از شست و شو به مدت یک هفته در کاغذ صافی آغشته به آب و پتری دیش قرار گرفتند. پس از بزرگ شدن جوانه‌ها به اندازه‌ی تقریبی ۲cm، جوانه‌ها به گلدان‌های حاوی پرلیت خالص اتوکلاو شده انتقال پیدا کردند. برای آبیاری گیاهان از محلول هوگلند استفاده شد. القاء تنش شوری ۲۰۰Mm در مرحله‌ی ۴ برگی گیاه (حدوداً یک ماه پس از کشت جوانه‌ها) انجام گرفت. برای هر سطح ۳ تکرار در نظر گرفته شد (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱. کشت گیاه در گلدان

۳-۲-۴ نمونه برداری از گیاهچه ها

پس از اعمال تنش، از گیاهچه‌های تحت تنش شوری نمونه‌برداری از برگ در بازه‌های زمانی صفر، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد، نمونه‌ها جهت آزمایش‌های بررسی بیان ژن‌های مسیر متابولیسم لیگنین و تا زمان استخراج RNA در دمای 80°C - نگهداری شد.

۳-۲-۵ اندازه‌گیری بیان ژن‌ها تحت تنش

۳-۲-۵-۱ استخراج RNA کل

استخراج RNA توسط کیت RNAX-Plus بر اساس دستورالعمل شرکت سیناکلون انجام شد.

۳-۲-۵-۲ تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده

برای تعیین کمیت و خلوص RNA استخراج شده می‌توان از نسبت جذب نوری عصاره‌ی حاصل در طول موج‌های ۲۶۰ nm به ۲۸۰ nm استفاده کرد. از این روش برای بررسی آلودگی عصاره به

پروتئین‌ها و نمک‌ها و فنول‌ها و هم‌چنین سایر مواد مانند قندها و مواد مصرفی در فرآیند استخراج استفاده می‌شود. برای این منظور از دستگاه NANODROP استفاده شد. نسبت جذب نوری ۲۶۰ nm به ۲۸۰ nm نشان‌دهنده آلودگی‌های پروتئینی و نسبت ۲۶۰ nm به ۲۳۰ nm جهت بررسی میزان آلودگی‌های مواد معلق و قندها در محلول RNA استخراج شده است. برای محاسبه میزان خلوص عصاره استخراج، از آب دوبار تقطیر برای صفر کردن دستگاه استفاده شد و ۱ μL از نمونه‌های RNA استخراج شده برای اندازه‌گیری روی حسگر دستگاه قرار داده شد. هم‌چنین برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز آگاروز ۱ درصد نیز استفاده شد.

۶-۲-۳ بررسی بیان با استفاده از qRT-PCR

۱-۶-۲-۳ سنتز cDNA

سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل کیت شرکت سبیز زیست ژن انجام شد. برای رقیق کردن، cDNA به غلظت ۵۰ ng/μL رسید. واکنش سنتز در دستگاه ترموسایکر Bio-Rad انجام شد. مواد و دستورالعمل دمایی این واکنش در جدول‌های (۱-۳ و ۲-۳) آورده شده‌اند.

جدول ۱-۳. دمای استفاده شده برای سنتز cDNA

تعداد چرخه	زمان اجرا (دقیقه)	دما (°C)
۱	۱۰	۶۵
۱	۱۰	۲۵
۱	۵۰	۵۰
۱	۱۰	۷۲

جدول ۳-۲. مواد مورد استفاده در واکنش سنتز cDNA

غلظت	مقدار بر حسب μL	مواد واکنش
$250 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$	۵	عصاره RNA
$10 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$	۰/۵	آغازگر اولیگو dT
0.1	۱	مخلوط dNTP
10X	۱	بافر RT
$200 \text{ U}/\mu\text{l}$	۰/۵	RevertAid M-MuLV RT
-	۲	آب عاری از RNase
	۱۰	حجم نهایی

۳-۲-۶ طراحی آغازگرها برای واکنش qRT-PCR

برای بررسی تغییر میزان رونوشت ژن‌های 4CL به عنوان ژن اصلی، ژن CHs به عنوان ژن هم‌بیان با 4CL و PAL و ژن STR به عنوان ژن هم‌بیان با CCR و PAL توسط روش qRT-PCR، آغازگرهای مناسبی برای ژن‌های مورد نظر از ابزار PrimerQuest در وب سایت IDT به نشانی (<http://eu.idtdna.com/primerquest/home/index>) و نرم افزار Primer 3 طراحی شده و جهت سنتز به شرکت پیشگام ارسال شد.

شرایط مناسب برای طراحی یک آغازگر مانند طول محصول و درصد GC (۴۰-۶۰ درصد)، مقدار دلتا G (کمتر از ۱۰-)، مکمل بودن آغازگرها با یکدیگر و احتمال تشکیل حلقه^{۱۰} و دایمر در آن‌ها، با استفاده از نرم افزار Oligo AnalyzerTool (<https://eu.idtdna.com>) مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پایه آغازگرها بعد از سنتز $100 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ بود که توسط آب استریل به غلظت $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ رسید. ژن اکتین مربوط به گیاه سویا (*Glycin max*)، نیز به عنوان ژن خانه دار مرجع استفاده شد (جدول ۳-۳).

^{۱۰} Hairpin

جدول ۳-۳. توالی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد ارزیابی

ژن	آغازگر	توالی آغازگر (۵'-۳')	دمای اتصال (°C)	طول محصول (bp)
ACT	F	TCCGATTGAGCATGGTATTG	۵۷	۱۱۳
	R	CCGTCAACAGAACTGGATG		
4CL	F	GTGGCATTGTTTCTGTGGAG	۵۸	۱۱۸
	R	GGGAGAGGCTTCTGTGTATC		
CHs	F	TTACATGGCACCTTCGTTG	۵۷	۱۱۸
	R	AATCTTGGACTTGGGTTGAC		
STR	F	GTTGATGTTGATACGGAAGGG	۵۷	۱۴۰
	R	GTGGTTTCCTTAGTGGCAAG		

۳-۲-۳-۶-۳ تأیید ساخت cDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR:

برای اطمینان از ساخت cDNA، واکنش PCR با استفاده از cDNAهای ساخته شده و آغازگرهای ژن مرجع اکتین^{۱۱}، انجام گرفت. هم‌چنین به منظور اطمینان از تکثیر اختصاصی آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد مطالعه (قبل از انجام Real Time PCR) واکنش PCR با استفاده از cDNA گیاهان شاهد و آغازگر تعدادی از ژن‌ها انجام شد. مخلوط واکنش PCR به شرح جدول ۳-۴ تهیه گردید.

جدول ۳-۴. میزان مواد مورد استفاده در واکنش PCR

غلظت	مقدار مواد (μl)	مواد و وسایل
	۷/۵	مسترمیکس PCR
10pmolμl ⁻¹	۱	آغازگر بالادستی
10pmolμl ⁻¹	۱	آغازگر پائین دستی
-	۳/۵	آب مقطر
50 ngμl ⁻¹	۲	cDNA الگو
	۱۵	حجم نهایی

^{۱۱}Actin

۴-۶-۲-۳ واکنش qRT-PCR

واکنش qRT-PCR با کمک دستگاه StepOnePlus و با استفاده از کیت Amplicon SYBR Mix ساخت شرکت پیشگام انجام شد. همچنین میکروتیوب‌های مخصوص واکنش Real time PCR نیز از شرکت سیناکلون تهیه شدند. مواد لازم برای انجام واکنش qRT-PCR در جدول (۳-۵) نشان داده شده است.

جدول ۳-۵. مواد مورد استفاده در واکنش qRT-PCR

غلظت	مقدار بر حسب μL	مواد واکنش
$50 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$	۲	الگوی cDNA
$10 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$	۰/۲	آغازگر رفت
$10 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$	۲	آغازگر برگشت
2X	۵	SYBR Mix Plus
-	۳	آب دوبار تقطیر
	۱۰	حجم نهایی

۷-۲-۳ تهیه استوک آغازگرها

در ابتدا طبق دستورالعمل شرکت سازنده پرایمرها به آن آب تزریق اضافه کرده و سپس برای اطمینان از حل شدن کامل پرایمرها در آب، چند بار پیپتاژ نموده و پس از گذشت زمان ۱۰ ثانیه در دور زیر ۵۰۰۰ در دمای اتاق سانتریفوژ کرده و در نهایت مراحل مخلوط کردن و سانتریفوژ نمودن را سه بار تکرار کرده تا از مخلوط شدن پرایمرها در آب تزریق و توزیع مناسب آن‌ها اطمینان حاصل شود. سرانجام رقت‌های به دست آمده تا زمان کار در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

۳-۲-۱-۷-۱ تهیه محلول کار

برای تهیه محلول کاری، ابتدا یک حجم از محلول استوک آغازگر حل شده در آب را با نه حجم آب تزریق مخلوط کرده و سپس آن را پیپتاژ و سانتریفوژ نموده تا به خوبی مخلوط شوند، در نهایت رقت های حاصل را دمای ۲۰- درجه تا هنگام کار نگهداری شد.

۳-۲-۸ تحلیل داده های واکنش qRT-PCR با روش لیواک

برای آنالیز داده های به دست آمده از روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه ($\Delta\Delta CT$)^{۱۲} استفاده شد که ابتدا چرخه آستانه برای نمونه های مختلف با استفاده از ژن مرجع، نرمال سازی^{۱۳} شد و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن های هدف با استفاده از فرمول های زیر و نرم افزار^{۱۴} REST[®] تهیه شده توسط فافل^{۱۵} و همکاران (Pfaffl, Horgan et al. 2002) محاسبه گردید. فرمول های زیر برای محاسبه میزان $\Delta\Delta CT$ به کار گرفته شدند.

فرمول (۱-۳):

ΔCT (نمونه مقاوم تحت تنش دیده) = CT (ژن هدف در تنش) - CT (ژن مرجع در تنش)

فرمول (۲-۳):

ΔCT (نمونه شاهد حساس تحت تنش) = CT (ژن هدف در شاهد) - CT (ژن مرجع در شاهد)

سپس نرمال سازی ΔCT نمونه تنش دیده با ΔCT شاهد طبق فرمول ۳-۳ انجام می گیرد:

فرمول (۳-۳): $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ (نمونه تنش دیده) - ΔCT (نمونه شاهد)

در نهایت نسبت بیان نرمال شده با فرمول ۴-۳ محاسبه می شود.

فرمول (۴-۳): نسبت بیان نرمال شده = $2^{-\Delta\Delta CT}$

^۱Delta Delta Cycle Threshold

^{۱۲} Normalization

^{۱۴} Relative Expression Software Tool (REST)

^{۱۵} Pfaffl

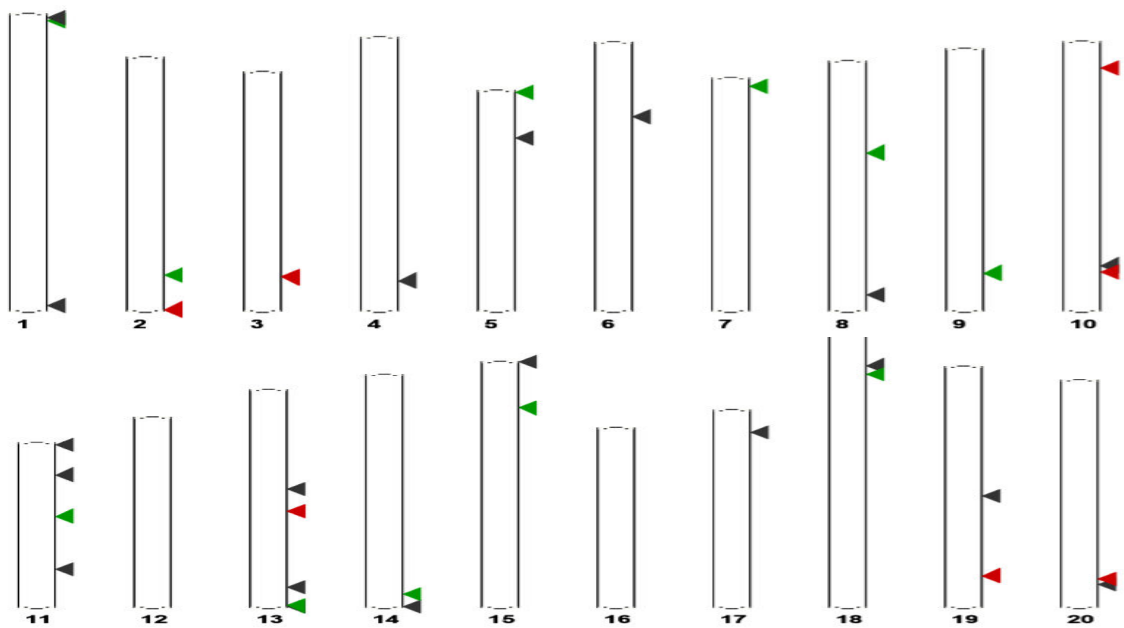
فصل ۴ نتایج و بحث

۴-۱ شناسایی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین

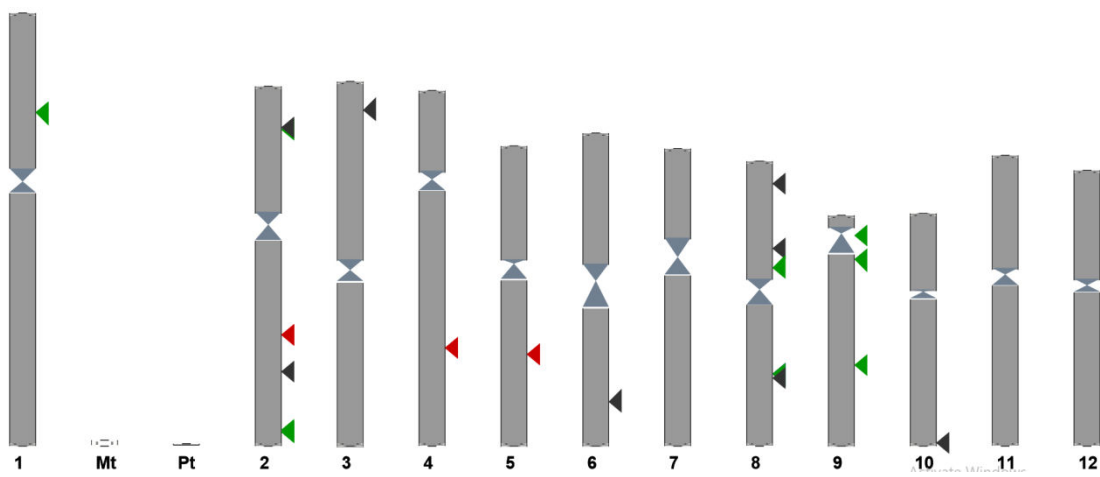
بررسی تعداد برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین نظیر PAL، 4CL و CCR در دو گیاه سویا به عنوان نماینده‌ی گیاهان دو لپه و برنج به عنوان نماینده‌ی گیاهان تک لپه انجام گرفت. بررسی‌ها حضور ۸ ژن PAL در سویا و ۳ ژن PAL در برنج را نشان دادند. ژن 4CL در سویا ۱۶ ژن و در برنج ۸ ژن و نهایتاً ژن CCR در سویا ۱۱ ژن و در برنج ۸ ژن را شامل شدند. این ژن‌ها از پایگاه‌های داده‌ی NCBI و KEGG و فیتوزوم به دست آمد. چو و همکاران (۲۰۱۴) برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز ایزوفلاونوئیدها را بررسی کردند. آن‌ها برای PAL در سویا ۸ ژن و برنج ۹ ژن را در نظر گرفتند. هم‌چنین برای آنزیم 4CL در سویا ۹ ژن و برنج ۷ ژن را در نظر گرفتند (Chu, Wang et al. 2014). آنچه که اهمیت دارد آن است که چو و همکاران (۲۰۱۴) میانگینی برای وجود آنزیم‌های PAL، 4CL در گیاهان مختلف بیان کردند. این میانگین برای آنزیم PAL، ۷ ژن و برای آنزیم 4CL، ۶ ژن بود. اما تعداد این ژن‌ها بیشتر است و در پژوهش آن‌ها به صورت میانگین این تعداد مطرح شده است که با نتایج ما هم‌خوانی دارد (جدول ۱-۴).

۴-۲ مکان قرار گیری ژن‌ها بر روی کروموزوم

ژن‌های PAL، CCR و 4CL بر روی ۱۸ کروموزوم از ۲۰ کروموزوم سویا توزیع شده‌اند. ژن‌های این آنزیم‌ها در برنج بر روی ۹ کروموزوم از ۱۲ کروموزوم برنج قرار گرفته‌اند. برخی از ژن‌ها در این آنزیم‌ها در روی کروموزوم‌ها روی هم قرار گرفته‌اند و یا در فاصله‌ی نزدیکی نسبت به هم واقع شده‌اند. برخی از ژن‌ها روی بیش از یک کروموزوم جای گرفته‌اند. روی کروموزوم ۱۲ و ۱۶ سویا هیچ ژن از این سه ژن وجود ندارد و هم‌چنین در برنج نیز کروموزوم ۱۲، ۱۱ و ۷ خالی از حضور ژن در مسیر بیوسنتز لیگنین است.



شکل ۴-۱. موقعیت قرارگیری ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین بر روی کروموزوم سویا: رنگ قرمز معرف ژن‌های PAL، رنگ سبز معرف CCR و رنگ سیاه معرف ۴CL است.



شکل ۴-۲. موقعیت قرارگیری ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین بر روی کروموزوم برنج: رنگ قرمز معرف ژن‌های PAL، رنگ سبز معرف CCR و رنگ سیاه معرف ۴CL است.

جدول ۴-۱. ژن‌های CCR, PAL و 4CL دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در دو گیاه سویا و برنج

<i>Glycine max</i>		
Genes	Name/Gene ID	Location
phenylalanine ammonia lyase (PAL)		
Gmpal1	GLYMA_03G181600	Chromosome 3, NC_016090.2 (39351580..39354938)
Gmpal2	GLYMA_19G182300	Chromosome 19, NC_016106.2 (44117792..44121737)
Gmpal3	GLYMA_13G145000	Chromosome 13, NC_016100.2 (25758490..25763587)
Gmpal4	GLYMA_03G181700	Chromosome 3, NC_016090.2 (39362363..39366236)
Gmpal5	GLYMA_02G309300	Chromosome 2, NC_016089.2 (48286839..48289735)
Gmpal6	GLYMA_10G209800	Chromosome 10, NC_016097.2 (44173304..44179425)
Gmpal7	GLYMA_10G058200	Chromosome 10, NC_016097.2 (5329214..5333437)
Gmpal8	GLYMA_20G180800	Chromosome 20, NC_016107.2 (41888008..41894225)
4-coumarate coAligase(4CL)		
Gm4CL1	GLYMA_17G064600	Chromosome 17, NC_016104.2 (4988085..4993712)
Gm4CL2	GLYMA_13G372000	Chromosome 13, NC_016100.2 (45701240..45704269)
Gm4CL3	GLYMA_14G223200	Chromosome 14, NC_016101.2 (48847895..48851353)
Gm4CL4	GLYMA_13G095600	Chromosome 13, NC_016100.2 (21058855..21065859)
Gm4CL5	GLYMA_06G171900	Chromosome 6, NC_016093.2 (14392084..14396710)
Gm4CL6	GLYMA_04G194200	Chromosome 4, NC_016091.2 (46583921..46597401)
Gm4CL7	GLYMA_05G075100	Chromosome 5, NC_016092.2 (9240376..9258393)
Gm4CL8	GLYMA_13G323000	Chromosome 13, NC_016100.2 (41740800..41746265)
Gm4CL9	GLYMA_11G194500	Chromosome 11, NC_016098.2 (26790498..26796532)
Gm4CL10	GLYMA_01G232400	Chromosome 1, NC_016088.2 (55890692..55894659)
Gm4CL11	GLYMA_08G329700	Chromosome 8, NC_016095.2 (44747016..44751074)
Gm4CL12	GLYMA_10G197900	Chromosome 10, NC_016097.2 (42920492..42922922)
Gm4CL13	GLYMA_15G001700	Chromosome 15, NC_016102.2 (191035..194440)
Gm4CL14	GLYMA_18G076900	Chromosome 18, NC_016105.2 (7297064..7301125)
Gm4CL15	GLYMA_19G076100	Chromosome 19, NC_016106.2 (27419654..27421979)
Gm4CL16	GLYMA_20G192100	Chromosome 20, NC_016107.2 (43068804..43075215)
cinnamyl coA reductase(CCR)		
GmCCR1	GLYMA_14G197600	Chromosome 14, NC_016101.2 (46288259..46290935)
GmCCR2	GLYMA_09G205700	Chromosome 9, NC_016096.2 (42977402..42980557)
GmCCR3	GLYMA_01G017100	Chromosome 1, NC_016088.2 (1634021..1637483)
GmCCR4	GLYMA_11G164700	Chromosome 11, NC_016098.2 (15648161..15653438)
GmCCR5	GLYMA_02G230500	Chromosome 2, NC_016089.2 (41810233..41812878)
GmCCR6	GLYMA_15G125100	Chromosome 15, NC_016102.2 (9930677..9933683)
GmCCR7	GLYMA_07G026300	Chromosome 7, NC_016094.2 (2055184..205805)
GmCCR8	GLYMA_13G369800	Chromosome 13, NC_016100.2 (45526198..45528796)
GmCCR9	GLYMA_05G006600	Chromosome 5, NC_016092.2 (589990..593557)
GmCCR10	GLYMA_08G218100	Chromosome 8, NC_016095.2 (17722149..17725324)
GmCCR11	GLYMA_18G091300	Chromosome 18, NC_016105.2 (9117685..9125568)
Oryza sativa		
OsPAL1	LOC4330040	NC_029257.1 (25006493..25009135)
OsPAL2	LOC4336415	NC_029259.1 (25927051..25929746)
OsPAL3	LOC4338861	NC_029260.1 (20953409..20955934)
4-coumarate coAligase(4CL)		
Os4CL1	LOC4345054	Chromosome 8, NC_029263.1 (8874074..8878899)

Os4CL2	LOC4328485	Chromosome 2, NC_029257.1 (4280488..4285919)
Os4CL3	LOC4345717	Chromosome 8, NC_029263.1 (21873068..21875508)
Os4CL4	Os03t0152400	Chromosome 3
Os4CL5	Os08t0143300	Chromosome 8
Os4CL6	Os10t0578950	Chromosome 10
Os4CL7	Os06t0656500	Chromosome 6
Os4CL8	Os02t0697400	Chromosome 2
cinnamyl coA reductase(CCR)		
OsCCR1	LOC4347074	Chromosome 9,NC_029264.1 (15076244..15079461)
OsCCR2	LOC4346438	Chromosome 9,NC_029264.1 (2083417..2086585)
OsCCR3	LOC4331085	Chromosome 2,NC_029257.1 (34564285..34566280)
OsCCR4	Os01t0283600	Chromosome 1
OsCCR5	Os02t0180700	Chromosome 2
OsCCR6	Os08t0277200	Chromosome 8
OsCCR7	Os08t0441500	Chromosome 8
OsCCR8	Os09t0262000	Chromosome 9

۴-۲-۱ آنالیز تکاملی PAL

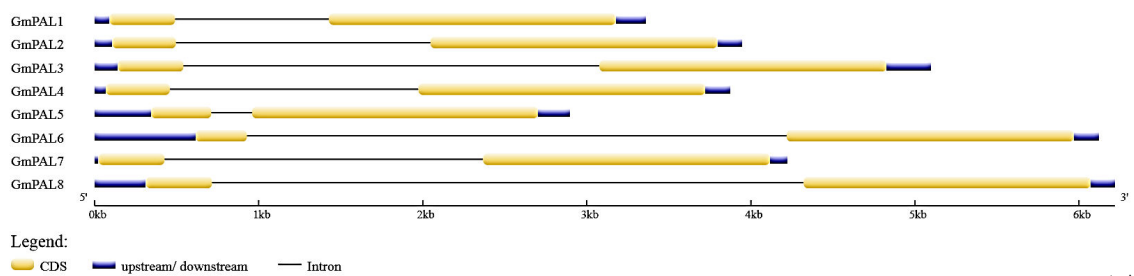
با استفاده از اطلاعات به دست آمده از نرم‌افزار ORF Finder^{۱۶} مشخص شد که در سویا ژن PAL1، ۲۵ ORF دارد که در گیرنده پروتئین‌های هیپوکوتیل و همیتیدین آمونیالیاز و فنیل آلانین آمونیالیاز در موجودات مختلف به جز سویا می‌باشد که البته بیشترین شباهت با گیاه آرابیدوپسیس مشاهده شد در این میان پروتئین‌هایی با عملکرد ناشناخته نیز مشاهده شد. ژن PAL2، ۳۰ PAL3، ۳۱ PAL4، ۲۹ PAL5، ۱۷ PAL6، ۳۶ PAL7 و ۲۵ PAL8 و ORF۳۴ PAL8 دارند. در گیاه برنج PAL1، ۱۳ PAL2، ۱۴ PAL3 و ORF۱۰ PAL3 را نشان دادند. در برنج نیز این پروتئین‌های ساخته شده توسط ژن PAL مانند پروتئین‌های سویا بودند.

در بررسی الگوی اینترون و اگزون در سویا مشاهده شد که همه‌ی ۸ ژن PAL در سویا دارای دو اگزون و یک اینترون هستند و ژن‌های PAL در برنج دارای یک اگزون و فاقد اینترون می‌باشند، این موضوع

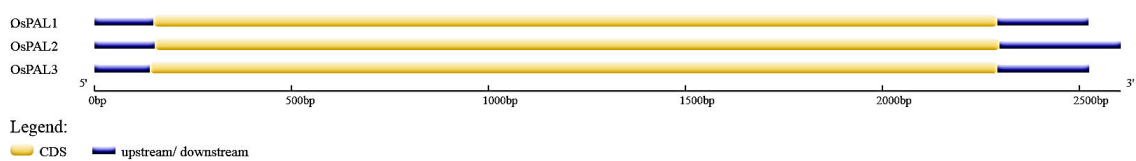
^{۱۶} Open reading frame

می‌تواند نشان دهنده این باشد که احتمالاً تنوع این خانواده ژنی در برنج کم است و تنوع ژن‌ها در سویا به طور کلی به دلیل دارا بودن اینترون بیشتر است. با توجه به این نتیجه و نتایج حاصل از بررسی‌های درخت فیلوژنتیک، مشخص شد که ژن‌های دارای الگوی اینترون و اگزون مشابه در یک خوشه از درخت فیلوژنتیک قرار می‌گیرند.

الف



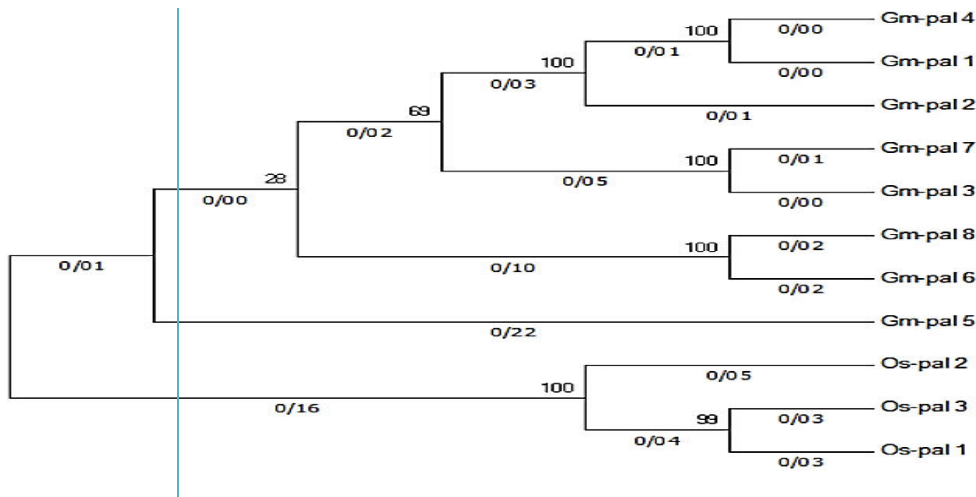
ب



شکل ۴-۳. بررسی الگوی اینترون اگزون ژن‌های PAL با استفاده از پایگاه GSDs (الف) سویا (ب) برنج

بررسی درصد مشابهت توالی پروتئینی ژن‌های PAL نشان داد که درصد مشابهت بین ژن‌های هر دو گیاه پیرامون ۷۵-۷۷ درصد است. با مشاهده درخت فیلوژنتیک مشخص شد که دو خوشه مجزا تشکیل شده است. اولین خوشه مربوط به ژن‌های PAL سویا و دومین خوشه مربوط به ژن‌های PAL برنج است. در سویا ژن GmPAL5 با هیچ ژنی ارتباط نزدیکی نشان داد و احتمالاً این ژن می‌تواند جد خویشاوندی باشد. بررسی وقوع دو برابرشدگی با استفاده از نرم افزار Mega7.0 در هر دو گیاه نشان داد که ژن‌های PAL در سویا در ۷ درائر دو برابرشدگی و ژن‌های PAL در برنج در ۲ درائر دو برابرشدگی ایجاد شده‌اند. نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی مشخص کرد که ژن‌های همولوگ در سویا و برنج جدا از یکدیگر قرار گرفته‌اند که این خود می‌تواند دلیلی بر دو برابر شدگی ژن‌ها باشد با توجه به

درخت فیلوژنتیک ژن‌های PAL در سویا با یکدیگر هم منشأ هستند و در یک خوشه از درخت فیلوژنتیک قرار می‌گیرند و ژن‌های PAL در برنج احتمالاً حاصل دو برابر شدگی‌هایی هستند که بعد از اشتقاق گونه‌های تک لپه و دو لپه به وقوع پیوسته است.



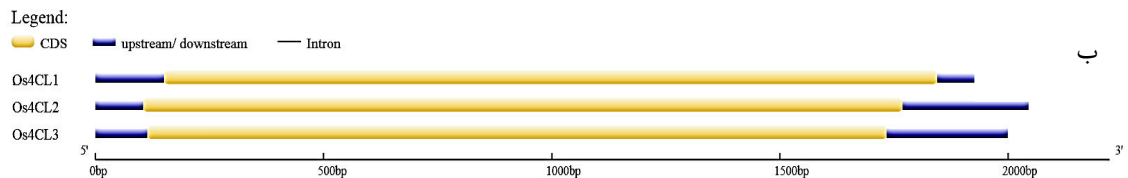
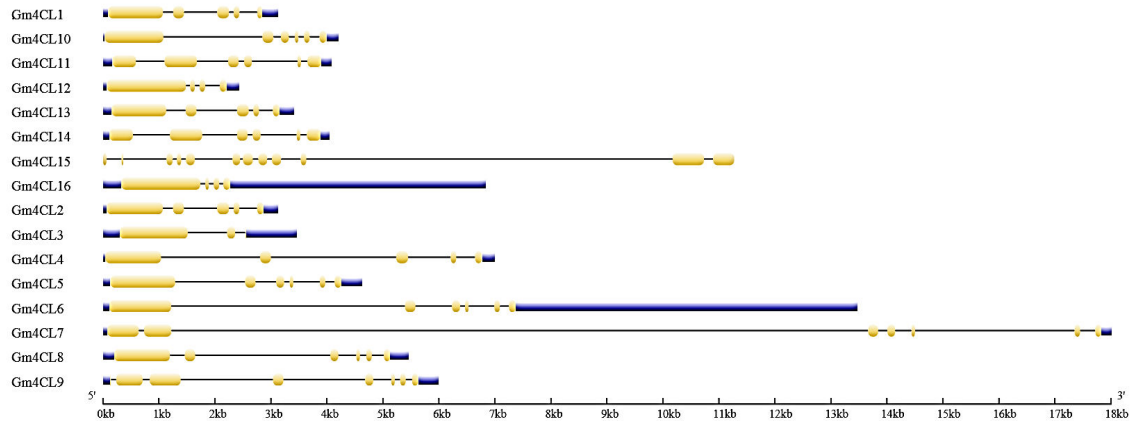
شکل ۴-۴. درخت فیلوژنتیکی، توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های PAL با استفاده از الگوریتم Maximum likelihood و آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار (Mega7.0)

۲-۲-۴ آنالیز تکاملی 4CL :

در بررسی الگوی اینترون و اگزون در سویا مشاهده شد که هر سه ژن 4CL در برنج دارای یک اگزون بوده و فاقد هرگونه اینترون در ساختار خود هستند. این در حالی است که در بررسی‌های به عمل آمده مشخص شد که ژن‌های 4CL در سویا به مراتب دارای اینترون و اگزون‌های پراکنده زیادی در ساختار خود می‌باشند.

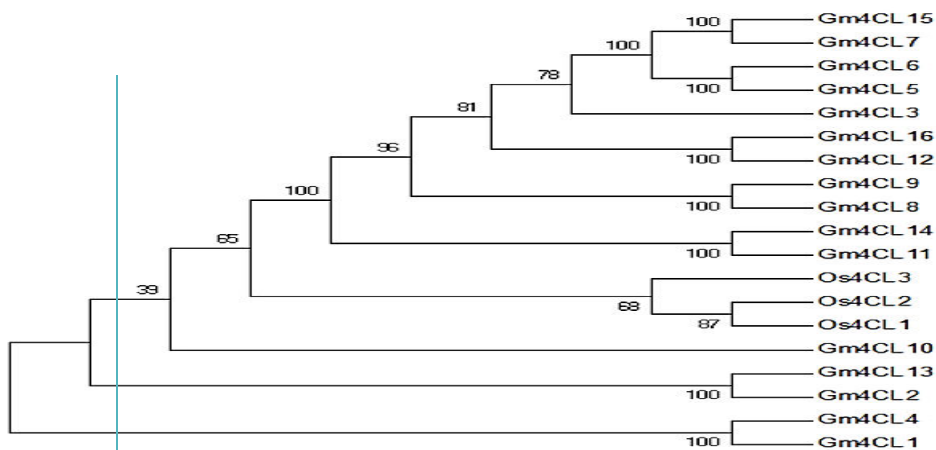
نتایج حاصل از پایگاه اطلاعاتی GSDs 2.0 نشان داد که ژن‌های 4CL1 و 4CL4 دارای ۵ ناحیه اگزون و ۴ ناحیه اینترون هستند و ژن‌های 4CL2 و 4CL8 هر کدام دارای ۶ ناحیه اگزون و ژن 4CL2 دارای ۷ اینترون و ژن 4CL8 دارای ۵ ناحیه اگزون در ساختار خود می‌باشند. این نواحی اینترونی و اگزونی هر چه به سمت انتهای ژن پیش می‌رود به هم نزدیک‌تر و کوچک‌تر می‌شوند. این

موضوع می‌تواند نشان دهنده این موضوع باشد که ژن‌های 4CL در سویا و احتمالاً گیاهان دولپه
 الف



شکل ۴-۵. بررسی الگوی اینترون اگزون ژن‌های 4CL با استفاده از پایگاه GSDs (الف) سویا (ب) برنج

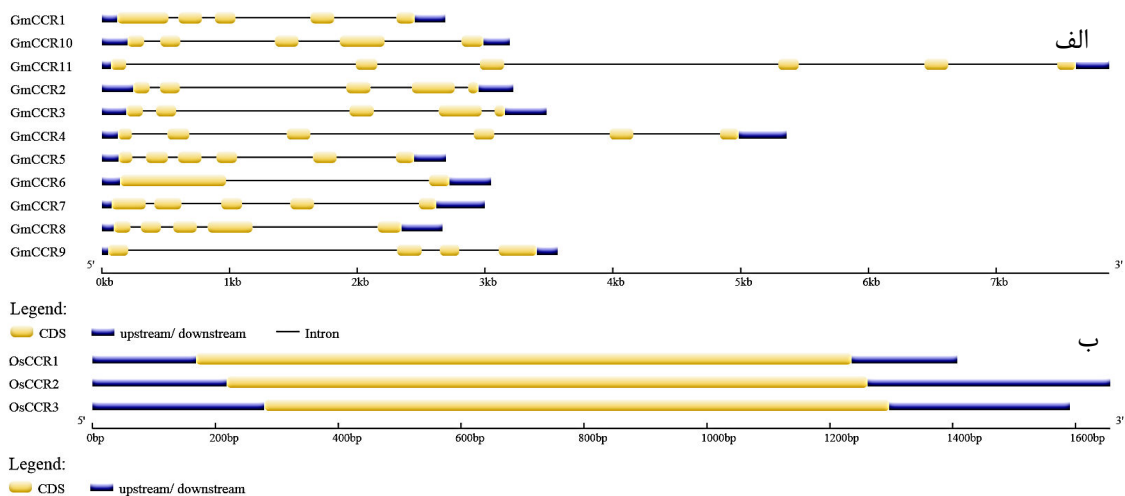
بررسی‌های درخت فیلوژنتیک ژن 4CL در گیاه سویا و برنج، سه خوشه بندی متفاوت نشان داد. ژن‌های Gm4CL1، Gm4CL4، در یک خوشه، ژن‌های Os4CL2، Os4CL13 در یک خوشه از درخت فیلوژنتیک و سایر ژن‌های 4CL سویا و برنج در خوشه سوم درخت فیلوژنتیک قرار گرفتند. قرار گرفتن ژن‌های برنج در خوشه ژن‌های سویا می‌تواند احتمالاً نشان دهنده ارتباط نزدیک این ژن در این دو گیاه و رابطه خویشاوندی نزدیک میان آنها باشد. همچنین با توجه به درخت فیلوژنتیک مشخص شد که ژن Gm4CL10 در هیچ خوشه‌ای قرار نگرفته است و به صورت تک خوشه مشاهده می‌شود که این امر می‌تواند نشان دهنده این موضوع باشد که احتمالاً این ژن جد خویشاوندی سایر ژن‌ها بوده و می‌تواند منشأ پیدایش سایر ژن‌های این خانواده باشد.



شکل ۴-۶. درخت فیلوژنتیکی، توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های 4CL با استفاده از الگوریتم Maximum likelihood و آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار (Mega7.0)

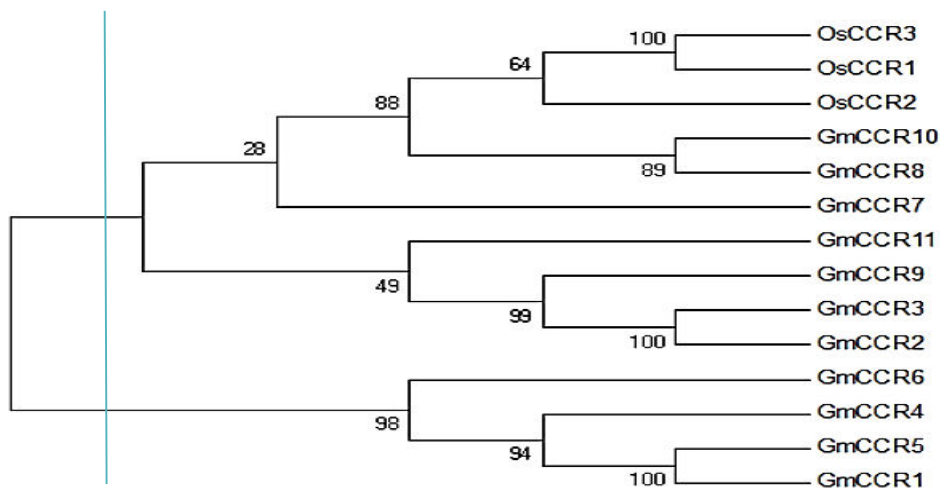
۳-۲-۴ آنالیز تکاملی CCR

در بررسی الگوی اینترون و اگزون در سویا مشاهده شد که هر سه ژن CCR در برنج دارای یک اگزون بوده و فاقد هرگونه اینترون در ساختار خود هستند. این در حالی است که در بررسی‌های به عمل آمده مشخص شد که ژن‌های CCR در سویا به مراتب دارای اینترون و اگزون‌های پراکنده زیادی در ساختار خود می‌باشند. ژن‌های CCR4,5 در گیاه سویا دارای ۶ اگزون و ۵ اینترون در ساختار خود هستند. در میان ژن‌های CCR سویا، تنها ژن CCR6 دارای ۲ اگزون و یک اینترون بود. سایر ژن‌های CCR دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون بودند.



شکل ۴-۷. بررسی الگوی اینترون اگزون ژن‌های CCR با استفاده از پایگاه GSDs الف) سویا ب) برنج

باتوجه به درخت فیلوژنتیک ژن CCR در دو گیاه سویا و برنج، سه خوشه‌بندی متفاوت مشاهده شد. ژن‌های GmCCR1، GmCCR5، GmCCR4 و GmCCR6 در یک خوشه از درخت، ژن‌های GmCCR2، GmCCR3، GmCCR9 و GmCCR11 در یک خوشه از درخت فیلوژنتیک و سایر ژن‌های سویا و همه ژن‌های برنج در خوشه سوم از درخت فیلوژنتیک جای گرفتند. این موضوع می‌تواند نشان دهنده ارتباط نزدیک میان ژن‌های CCR در دو گیاه سویا و برنج و احتمالاً هم منشأ بودن آن‌ها باشد. در این میان ژن GmCCR7 به صورت یک تک خوشه مجزا از سایر ژن‌ها قرار گرفت. این ژن احتمالاً جد خویشاوندی سایر ژن‌ها است. بررسی وقوع دوبرابردگی با استفاده از نرم افزار Mega7.0 در هر دو گیاه نشان داد ژن‌های CCR در سویا در اثر ۷ دو برابر شدگی و ژن‌های CCR در برنج در اثر ۲ دو برابر شدگی ایجاد شده‌اند. نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی مشخص کرد که ژن‌های همولوگ در سویا و برنج جدا از یکدیگر قرار گرفته‌اند که این خود می‌تواند دلیلی بر دو برابرشدگی ژن‌ها باشد.



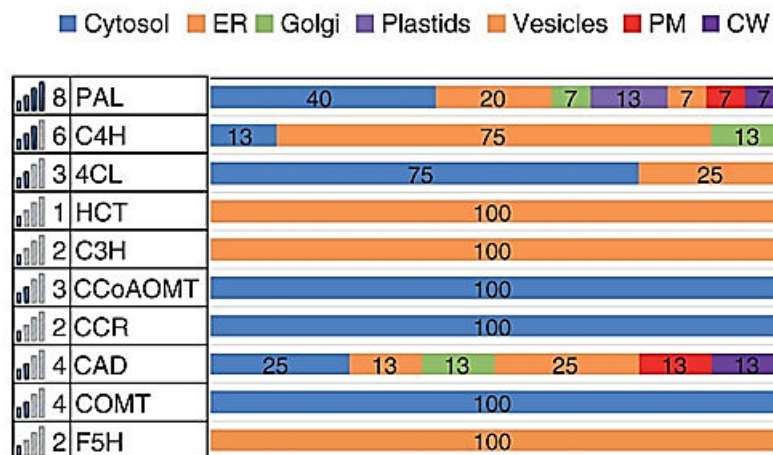
شکل ۴-۸. درخت فیلوژنتیکی، توالی‌های آمینواسیدی ژن‌های CCR با استفاده از الگوریتم Maximum likelihood و آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار (Mega7.0)

۴-۲-۴ بررسی مکان فعالیت پروتئین‌ها:

همه آنزیم‌هایی که در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفت، توسط چند ژن همولوگ کد می‌شوند. هدف از بررسی مکان فعالیت محصول پروتئینی ژن‌ها مقایسه‌ی این مکان‌ها با نتایج حاصل از مطالعات آزمایشگاهی قبلی است و نهایتاً رسیدن به این مسئله است که آیا ممکن است تعدادی از ژن‌های همولوگ کد کننده‌ی آنزیم‌ها به صورت اختصاصی و ویژه در مسیر بیوسنتز لیگنین فعالیت کنند یا خیر؟ به این منظور با در اختیار داشتن توالی آمینواسیدی ژن‌ها و استفاده از پایگاه Plant-mPLoc (www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi) مکان فعالیت هر پروتئین مشخص شد. براساس این پایگاه آنزیم PAL در سویا و برنج تنها در سیتوپلاسم وجود دارد. در آنزیم CCR، ژن CCR1,8 در کلروپلاست و گلژی، ژن CCR2,3 در سیتوپلاسم و CCR4,5,6,7 در گلژی حضور دارند. ژن 4CL در سویا و برنج در پروکسی‌زوم حضور دارد. پیش‌تر باروس و همکاران (۲۰۱۵) حضور ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین را در گیاهان مختلف بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که ژن PAL در سیتوپلاسم بیش‌تر از مکان‌های دیگر حضور دارد که این امر با نتایج حاصل از پایگاه Plant-mPLoc مطابقت دارد (شکل ۴-۹). آن‌ها همچنین مطرح کردند که ژن 4CL ۷۵ درصد در سیتوپلاسم و ۲۵ درصد در وزیکول‌ها یافت می‌شود (Barros, Serk et al. 2015).

در مورد ژن CCR بیان داشتند که این ژن فقط در سیتوپلاسم حضور دارد این درحالی است که نتایج ما حضور برخی از ژن‌های CCR در کلروپلاست و گلژی را تایید می‌کند. نتایج به دست آمده از پایگاه اطلاعاتی در مورد ژن PAL با منابع پیشین مطابقت دارد اما در مورد آنزیم‌های 4CL و CCR این مطابقت دیده نشد. از مقایسه نتایج کارهای آزمایشگاهی و نتایج ما می‌توان این‌گونه استنباط کرد که تقریباً این نتایج با یکدیگر ارتباط مستقیم دارند و اختلاف در برخی از نتایج ممکن است با اختصاصی‌تر شدن الگوریتم‌های محاسبه‌ی مکان فعالیت آنزیم در پایگاه‌های اطلاعاتی مورد استفاده براساس

مسیر بیوسنتزی مورد مطالعه‌ی ما (مسیر بیوسنتز لیگنین) رفع شود. پایگاه اطلاعاتی پایگاه Plant-mPLOC نسبت به پایگاه target p کارآمدتر بوده اما با این وجود نیاز به دقت بیشتری دارد.



شکل ۴-۹. تصویر شماتیک مکان فعالیت آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین: سیتوزول، شبکه‌ی آندوپلاسمی (ER)، گلژی، پلاستیدها، ریزیکول‌ها، شامپلاسمایی (PM)، یواره‌ی سلولی (CW) شبکه‌ی

۴-۲-۵ بررسی برهم‌کنش آنزیم‌های PAL، CCR و 4CL با سایر

پروتئین‌ها

به منظور یافتن رابطه‌ی آنزیم‌های اصلی مسیر بیوسنتز لیگنین با سایر پروتئین‌ها از پایگاه داده STRING (<https://string-db.org>) استفاده شد. ژن‌های هر آنزیم به صورت جداگانه در این پایگاه داده وارد شد و لیستی از پروتئین‌هایی که با این ژن‌ها ارتباط و یا عدم ارتباط دارند به دست آمد. در گیاه سویا ژن‌های 4CL و C4H ارتباط زیادی با ژن‌های PAL دارند (جدول ۴-۲). در این میان در گیاه برنج نقش و ارتباط ژن 4CL با ژن PAL همانند گیاه سویا است. پروتئین دیگری به نام NAAT1 (nutrient amino acid transporter 1) که با ژن‌های Os-PAL2 و Os-PAL3 ارتباط دارد. این پروتئین در انتقال سدیم، انتقال فعال غشاء D-اسیدآمینو، انتقال فعال غشاء L-اسیدآمینو

نقش داشته و در مسیرهای حمل و نقل اسید آمینه خنثی، حمل و نقل نئوروترانسمیتر^{۱۷} حمل و نقل

غشاء اسید آمینه فعالیت می‌کند. NAAT5 نیز با همه ی ژن‌های PAL برنج ارتباط دارد.

جدول ۴-۲. برهمکنش پروتئین‌های PAL با سایر پروتئین‌ها در دو گیاه سویا و برنج (STRING)

	Gm-PAL1	Gm-PAL2	Gm-PAL3	Gm-PAL4	Gm-PAL5	Gm-PAL6	Gm-PAL7	Gm-PAL8
GLYMA17G07180.1(4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYMA17G07170.1(4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYMA14G38580.1(C4H1)	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYMA02G40290.1(C4H)	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYMA20G24810.1(C4H)	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYMA11G09710.2(4CL)	+	+	+	+	-	+	+	+
GLYMA01G44270.1(4CL4)	+	+	+	+	-	+	+	+
GLYMA18G08550.1(4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYMA17G07190.2(4CL1)	+	+	+	-	+	+	+	+
GLYMA15G00390.1(4CL)	+	-	+	-	+	+	-	+
GLYMA13G39770.1(4CL)	-	+	-	+	+	-	+	-
LOC547944(4CL)	-	-	-	+	+	-	-	-
				Os-PAL1	Os-PAL2	Os-PAL3		
LOC_Os02g08100(4CL)				+	+	+		
LOC_Os05g25640				+	+	+		
LOC_Os01g60450				+	+	+		
LOC_Os06g44620(4CL)				+	+	+		
LOC_Os04g33390				+	-	-		
LOC_Os03g05780(4CL)				+	+	+		
LOC_Os02g46970(4CL)				+	+	+		
LOC_Os08g04770(4CL)				+	+	+		
LOC_Os04g24530				+	+	+		
LOC_Os11g35040(NAAT5)				+	+	+		
LOC_Os02g20360(NAAT1)				-	+	+		

^{۱۷} neurotransmitter transport

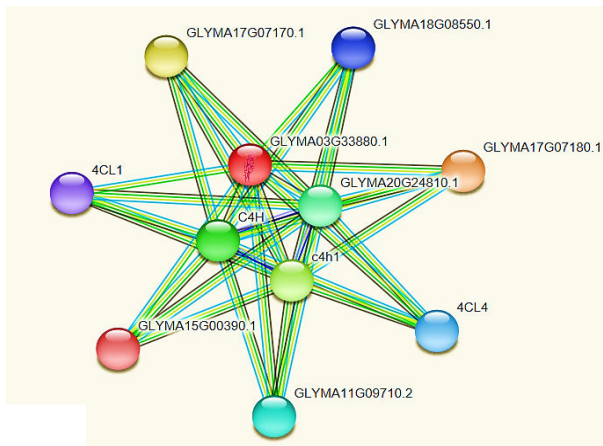
بررسی روابط بین ژن‌های اصلی ژن 4CL با سایر پروتئین‌هایی که در مسیر بیوسنتزی لیگنین دخالت دارند نیز انجام شد (جدول ۴-۳). با توجه به اطلاعات به دست آمده مشخص شد که ژن‌های 4CL1، 4CL4، 4CL8 و 4CL14 در گیاه سویا در ارتباط با سایر پروتئین‌ها رابطه بسیار نزدیکی با یکدیگر دارند. این ژن‌ها با ژن‌های PAL1 و PAL2 که از ژن‌های آغازین مسیر بیوسنتز لیگنین است ارتباط دارند. ژن 4CL1 فقط با C4H در ارتباط بود و بین سه ژن دیگر ارتباطی با این ژن مشاهده نشد. ژن‌های 4CL12 و 4CL16 نیز دارای پروتئین‌های مشترکی بودند. این دو ژن با پروتئین ACX1;1 (GLYMA11G03800) در ارتباط بودند. این پروتئین به نام آسیل کوآ اکسیداز است که در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و فلاونوئیدها، بیوسنتز اسیدهای چرب، مسیر سنتزی هورمون جاسمونیک اسید دخالت دارد. ژن‌های شناسایی شده در ارتباط با ژن 4CL اغلب ژن‌های PAL را شامل شدند و سایر ژن‌ها دارای عملکرد ناشناخته بودند. این پایگاه اطلاعاتی برای ژن‌های 4CL2، 4CL6، 4CL10 و 4CL15 نتوانست شبکه برهمکنشی با سایر پروتئین‌ها و ترکیبات را نشان دهد. در گیاه برنج با نگاه اجمالی به اطلاعات بدست آمده متوجه می‌شویم که میان ژن‌های 4CL برنج و ژن‌های CCR و C4H و PAL ارتباط نزدیکی وجود دارد. و Os4CL2 با Os4CL3 در ژن‌های که پیرامون خود دارند با هم اشتراکات بیشتری دارند.

جدول ۴-۳. برهمکنش پروتئین‌های 4CL با سایر پروتئین‌ها در دو گیاه سویا و برنج (STRING)

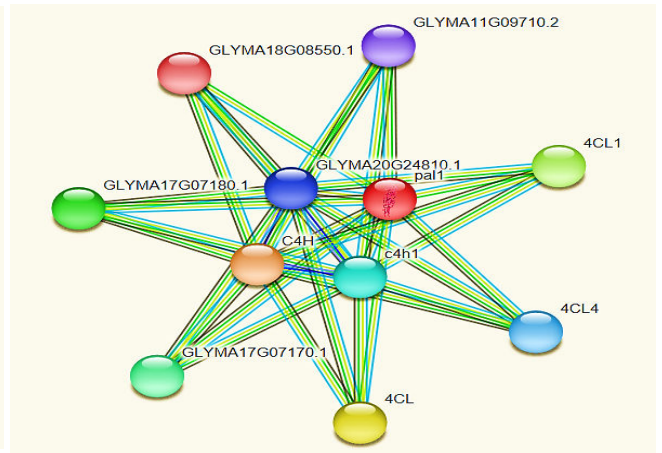
	Gm-4CL1	Gm-4CL3	Gm-4CL4	Gm-4CL5	Gm-4CL7	Gm-4CL8	Gm-4CL9	Gm-4CL11	Gm-4CL12	Gm-4CL13	Gm-4CL14	Gm-4CL16
GLYMA10G06600 PAL2	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
GLYMA19G36620 PAL1	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
GLYMA13G20800	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-

GLYMA03G33880	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
GLYMA02G47940	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
GLYMA02G40290 C4H	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA20G32135	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
GLYMA15G00600	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
GLYMA13G44700	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
GLYMA08G23310	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
GLYMA07G02690	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
GLYMA12G18960	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GLYMA06G14220	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
GLYMA06G14200	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
GLYMA04G40580	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
GLYMA20G24810	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
GLYMA05G31390	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA17G05780	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA17G05770	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA13G16950	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA13G16940	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA12G14060	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA06G43840	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA11G03800 ACX1;1	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA05G04940 ACX1;2	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA01G41600	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA18G43240	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA03G07540	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA19G09320	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA14G14990	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
GLYMA20G02420	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA18G52590	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA02G15070	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA0839S50	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA16G00520	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA12G28870	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA17G18500	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA14G04520	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA02G44250	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA20G18980	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA20G33380	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA13G44960	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA15G00400	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA13G39790	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA18G08561	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Os4CL1			Os4CL2			Os4CL3					

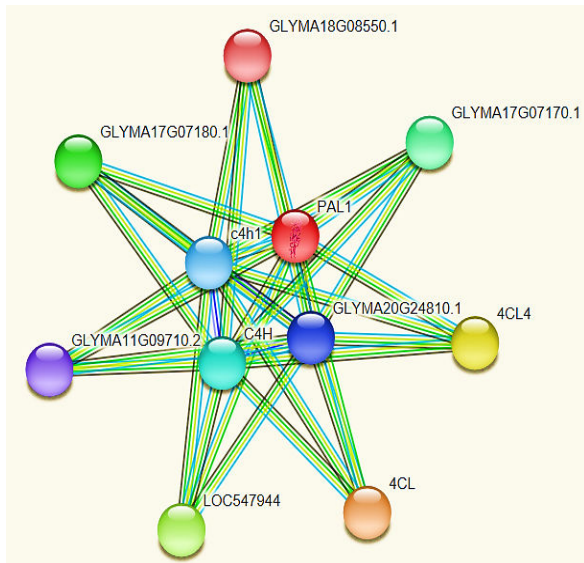
OS02T0626100 PAL	+		+		+
OS09T0127300	+		+		-
OS05T0427400 OsJ_18619	+		-		-
OS04T0518400 OsJ_19054	+		-		-
OS02T0627100 ZB8	+		-		+
OS02T0626400 OsJ_07593	+		+		-
OS02T0808800 CCR1	+		-		-
OS05T0320700 OsC4HL	+		-		-
OS02T0207900	+		+		+
OS06T0165800 COA1	+		-		
OS08T0441500 CCR	-		+		+
OS09T0419200 CCR	-		+		
OS08T0277200 CCR	-		+		+
OS02T0180700 CCR	-		+		+
OS01T0820000	-		+		-
OS02T0626400 PAL	-		+		-
OS05T0494000 cytochrome P450	-		+		+
OS09T0127300 CCR	-		-		+
OS09T0419200-01, OsJ_29385 CCR	-		-		+
OS02T0467600 C4H	-		-		+



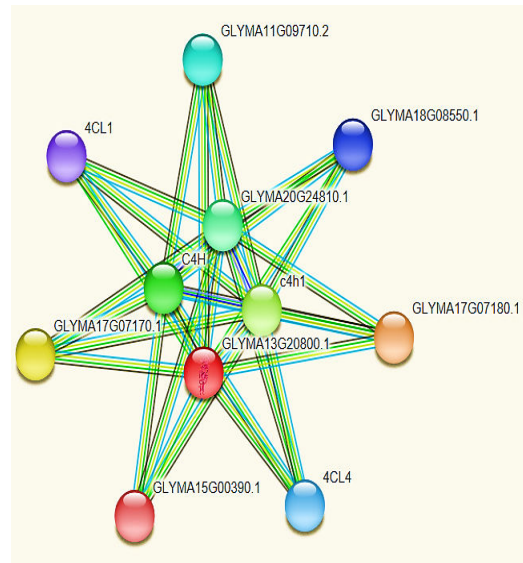
1-GmPAL1



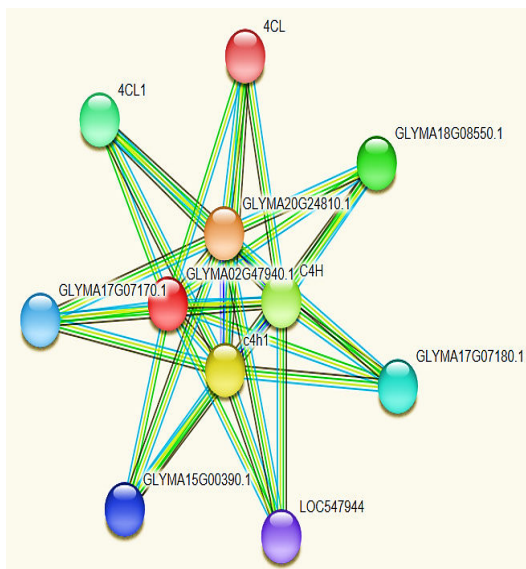
2-GmPAL2



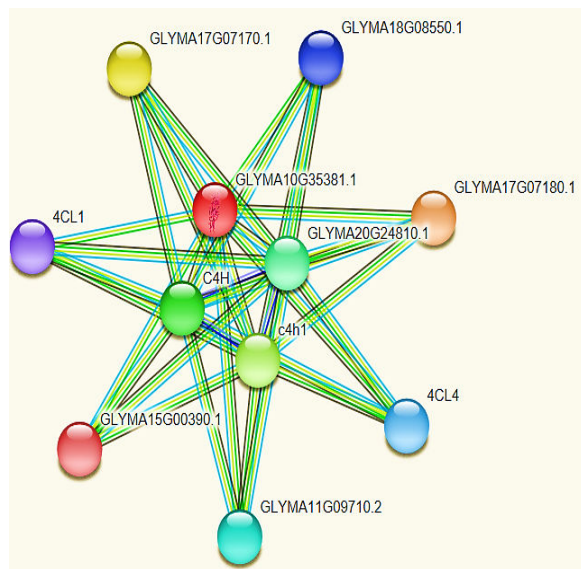
3-GmPAL3



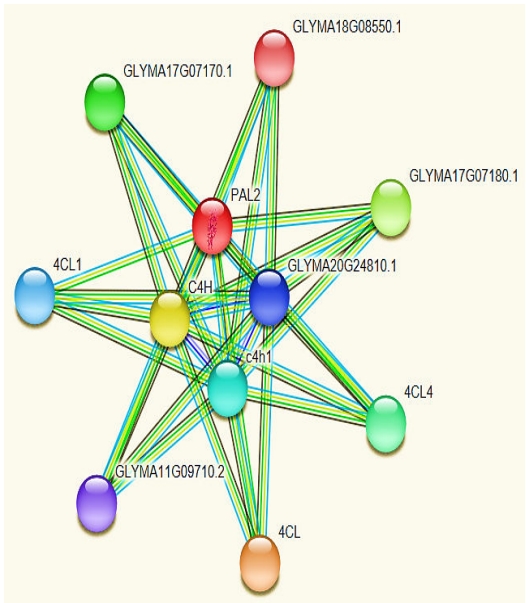
4-GmPAL4



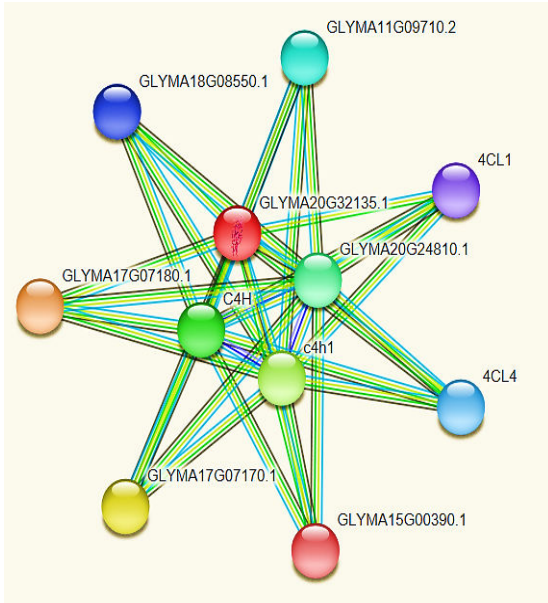
5-GmPAL5



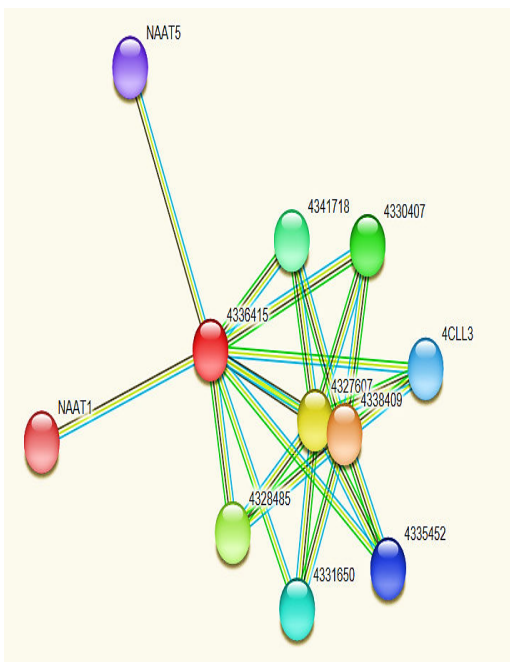
6-GmPAL6



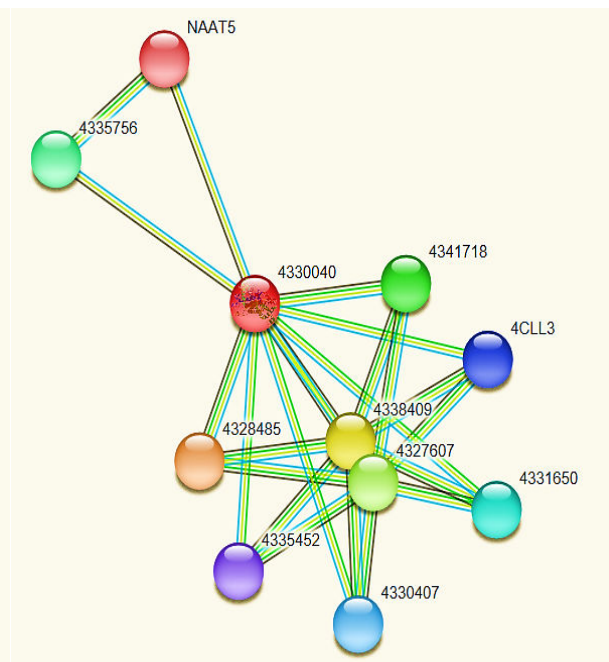
7-GmPAL7



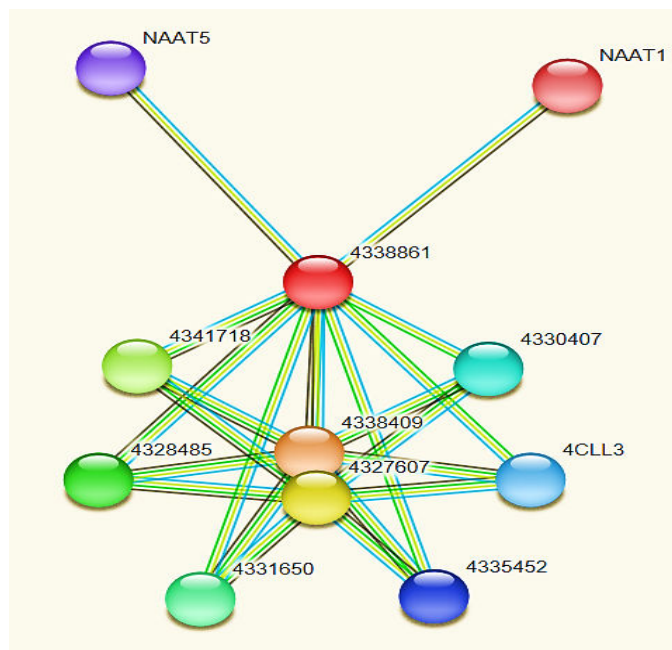
8-GmPAL8



9-OsPAL1



10-OsPAL2



11-OsPAL3

شکل ۴-۱۰. برهم کنش ژن‌های PAL با سایر پروتئین‌ها (STRING). شماره ۸-۱ مربوط به ژن‌های PAL در سویا و شماره ۹-۱۱ مربوط به ژن‌های PAL در برنج است.

بررسی روابط بین ژن‌های اصلی ژن CCR با سایر پروتئین‌هایی که در مسیر بیوسنتزی لیگنین دخالت دارند نیز انجام شد (جدول ۴-۴). با توجه به اطلاعات به دست آمده مشخص شد که ژن‌های Gm-CCR9 و Gm-CCR7، Gm-CCR6، Gm-CCR5، Gm-CCR4، Gm-CCR1 پروتئین‌های مشترکی در ارتباط هستند. در گیاه برنج ژن‌های OsCCR2 و OsCCR1 با پروتئین‌های مشترک ارتباط نشان دادند. آنزیم CCR در برنج با آنزیم‌های 4CL و HCT ارتباط نزدیکی دارد و این ارتباط در گیاه سویا با آنزیم‌های C4H و 4CL بیشتر است. نکته جالب توجه آن است که این پروتئین‌ها مانند CYP98A2 GLYMA19G30600 نیز به نحوی در مسیر متابولیت‌های ثانویه و مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویدها نقش دارند. ژن (GLYMA11G07850) نیز در سنتز مونولیگنول‌ها که پیش ساز سنتز لیگنین در دیواره سلولی ثانویه هستند نقش دارد.

جدول ۴-۴. برهمکنش پروتئین‌های CCR با سایر پروتئین‌ها در دو گیاه سویا و برنج (STRING)

	Gm-CCR1	Gm-CCR2	Gm-CCR3	Gm-CCR4	Gm-CCR5	Gm-CCR6	Gm-CCR7	Gm-CCR8	Gm-CCR9	Gm-CCR10	Gm-CCR11	
GLYMA09G34431	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
GLYMA01G01350	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
GLYMA19G02150	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
cytochrome P450												
GLYMA11G07850	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
CYP84A16												
GLYMA16G24341	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
cytochrome P450												
GLYMA01G37430	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
cytochrome P450												
GLYMA17G18800	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
GLYMA11G05800	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
GLYMA07G33780	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
GLYMA02G11530	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
GLYMA13G44830	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GLYMA08G23560	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GLYMA07G02460	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GLYMA15G00490	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
GLYMA02G09460	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
GLYMA19G30600	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CYP98A2												
GLYMA03G27740	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
cytochrome P450												
GLYMA14G39840	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA19G33940	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA03G31100	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA18G08550	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA08G44190	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA13G39770	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4CL												
GLYMA12G30125	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA12G08460	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA11G20020	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA17G07341	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYMA18G08550	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GLYMA08G44190	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GLYMA11G20020	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GLYMA17G07180	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GLYMA17G07170	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GLYMA15G00390	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GLYMA13G01080	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GLYMA01G01350	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GLYMA02G40290	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
C4H												
GLYMA11G09710	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GLYMA03G14960	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GLYMA01G26990	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GLYMA15G06460	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GLYMA13G32830	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GLYMA07G04840	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GLYMA12G18960	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
cytochrome P450												
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GLYMA14G33244	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GLYMA14G33227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GLYMA13G02740	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
FLS1												
								OsCCR1	OsCCR2	OsCCR3		
OS09T0481400								+	-	+		
OS04T0310800 (4CLL9)								+	+	-		
OS02T0697400 (4CL2)								+	+	-		

OS02T0177600 (4CL3)	+	+	-
OS08T0448000 (4CL5)	+	+	-
OS06T0656500 (4CL4)	+	+	-
OS02T0611800 (HCT2)	+	+	+
OS04T0500700 (HCT1)	+	+	+
OS10T0578950 (4CLL2)	+	+	-
OS08T0143300 (4CLL3)	+	+	-
OS08T0245200 (4CL1)	-	+	+
OS03T0112900(OsF5HL2)	-	-	+
OS06T0165800 (COA1)	-	-	+
OS05T0320700 (OsC4HL)	-	-	+
OS01T0591000 (ALDH1a)	-	-	+
OS10T0512400	-	-	+
OS01T0591300	-	-	+

۳-۴ بررسی شبکه هم‌بیانی PAL

مطالعه‌ی شبکه هم‌بیانی PAL با استفاده از دو نرم افزار ATTED II و Genevestigator انجام گرفت.

نرم افزار ATTED II برای ۴ ژن از ۸ ژن PAL سویا ژن‌های هم بیان در نظر گرفت (جدول ۴-۵).

هم‌بیان‌های ژن PAL2 (Glyma-10G058200)، PAL4 (Glyma-03G181700)، PAL8 (Glyma-

20G180800) PAL5 (Glyma-02G309300) از نرم افزار ATTED II به دست آمد. نرم

افزار Genevestigator برای ۶ ژن از ۸ ژن PAL ژن‌های هم بیان مشخص کرد که از میان این ژن‌ها،

ژن PAL5 با ATTED II مشترک بود. به طور کلی ژن PAL در نرم افزار ATTED II ۱۴ ژن هم‌بیان

را نشان داد و در نرم افزار Genevestigator براساس ضریب پیرسون بالای ۷۰ درصد، ۱۹ ژن هم بیان

در ۶ زیرشبکه هم‌بیانی انتخاب شد. از آنجایی که معیار اندازه‌گیری دو نرم افزار با هم متفاوت است

ما اطلاعات به دست آمده از هر دو نرم‌افزار را کنار هم قرار دادیم تا به اطلاعات جامع‌تری از آنالیزهای

هم‌بیانی دست پیدا کنیم. مجموع ژن‌های هم بیان PAL در سویا ۳۳ ژن بود. در گیاه برنج ۲ ژن از ۳

ژن PAL در هر دو نرم افزار، هم بیان نشان دادند. تعداد ژن‌های هم‌بیان بدست آمده PAL در گیاه

برنج با استفاده از اطلاعات هر دو نرم افزار، ۱۵ ژن بود. در گیاه سویا ژن C4H1 با PAL2 و PAL8 هم

بیان شد. همچنین ژن 4CL نیز با ژن‌های PAL هم بیانی نشان داد. این موضوع می‌تواند نشان

دهنده‌ی ارتباط نزدیک این دو ژن در مسیر بیوسنتز لیگنین باشد. ژن 4-trans-cinnamate

monooxygenase (Glyma-14G205200) به عنوان ژن هم‌بیان با PAL2 و PAL8 مطرح شده است

که به اختصار C4H1 نامیده می‌شود. این ژن و PAL2 و PAL8 در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه، بیوسنتز فلاونوئیدها، بیوسنتز کپسی‌سایین^{۱۸}، بیوسنتز مونولیگنول‌ها و تبدیل آلانین به تیروزین، مسیرهای بیوسنتزی یوبیکوئیتینه شدن و سایر مسیرهای ترپنوئید-کوئینون و هم‌چنین در مسیر بیوسنتزی فنیل آلانین نقش دارد. هم‌چنین ژن C4H2 (Glyma-02G236500) بین ژن‌های PAL2 و PAL7 مشترک است.

سه ژن (Glyma-07G271200 ، Glyma-03G156800، Glyma-17G094700) بین ژن‌های PAL6 و PAL8 مشترک است. ژن Glyma-17G094700 یک پروتئین سرین-ترئونین کیناز AtPK2/AtPK19 است.

ژن هم بیان GND 6-phosphogluconate dehydrogenase که با PAL4 هم‌بیانی نشان داد در متابولیسم کربن و گلوکاتایون، مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه و مسیر پنتوزفسفات دخالت دارد. گلوکاتایون در سال ۱۹۸۸ میلادی توسط J. de Rey-Pailhade کشف شد. ترکیب گلوکاتایون بعدها، در سال ۱۹۲۹، توسط تلاش‌های گولند هاپکینز و هم‌چنین هانتر و ایگلز که نشان داد، گلوکاتایون یک ترکیب تری پتید از گلوکاتامات، سیستئین و گلیسین است. ساختار نهایی گلوکاتایون به عنوان C-گلوکاتامیل سیستئیل گلایسین توسط پیر و پینهی و با استفاده از سنتز شیمیایی Harington و Mead در سال ۱۹۳۵ تعیین شد.

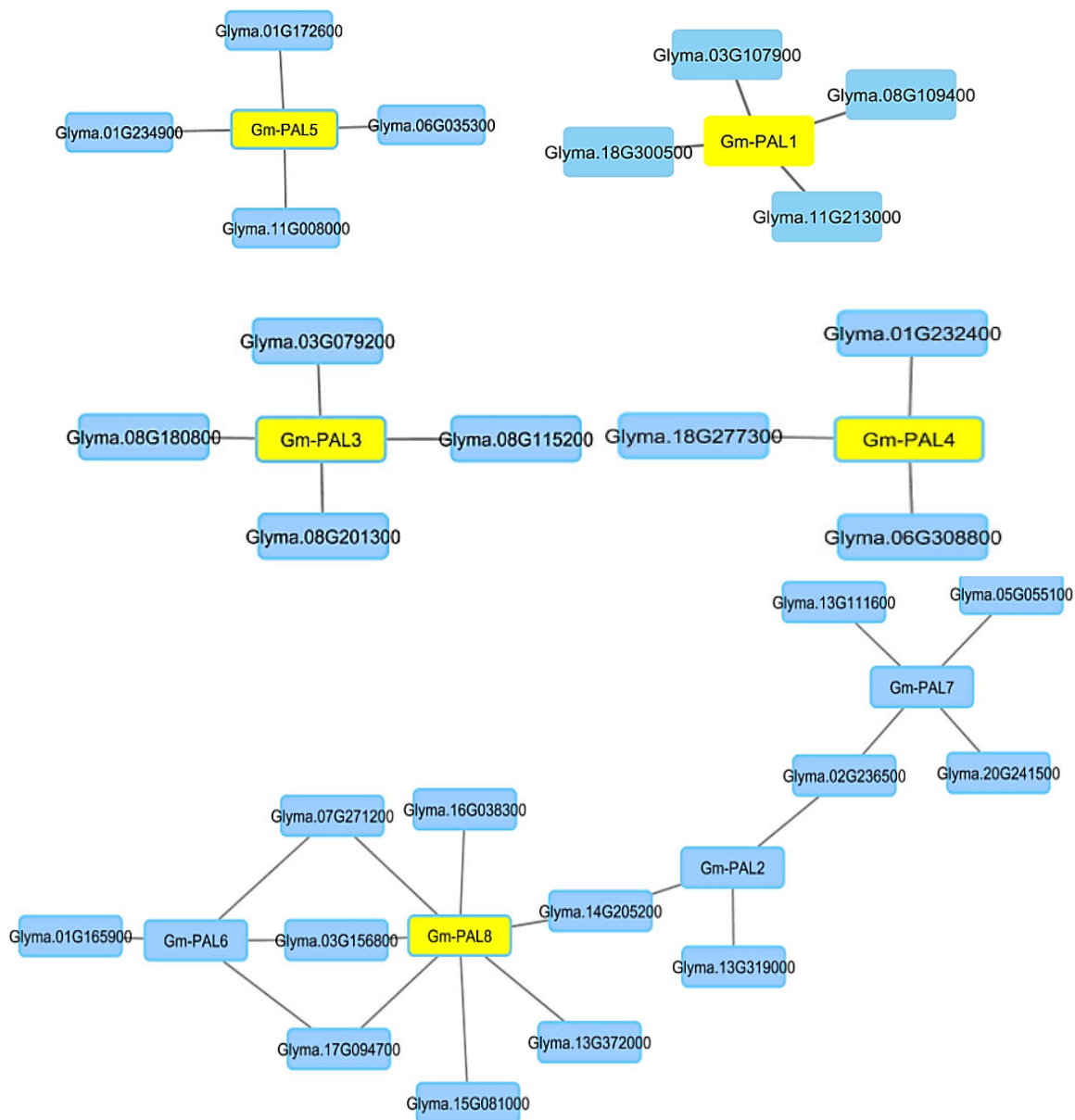
جدول ۴-۵. ژن‌های هم‌بیان با PAL در سویا و برنج (Genevestigator و ATTED II)

Genes	Coexpression genes
	<i>Glycine max</i>
Gm-PAL1	Glyma.08G109400, Glyma.03G107900, Glyma.18G300500, Glyma.11G213000
Gm-PAL2	Glyma.02G236500, Glyma.14G205200, Glyma.13G319000,
Gm-PAL3	Glyma.08G201300, Glyma.08G180800, Glyma.03G079200, Glyma.08G115200
Gm-PAL4	Glyma.18G277300, Glyma.06G308800, Glyma.01G232400
Gm-PAL5	Glyma.11G008000, Glyma.01G234900, Glyma.01G172600, Glyma.06G035300
Gm-PAL6	Glyma.17G094700, Glyma.03G156800, Glyma.07G271200, Glyma.01G165900
Gm-PAL7	Glyma.02G236500, Glyma.05G055100, Glyma.13G111600, Glyma.20G241500

^{۱۸} Capsaicin biosynthesis

Gm-PAL8	Glyma.13G372000,Glyma.16G038300,Glyma.14G205200,Glyma.15G081000 Glyma.17G094700,Glyma.03G156800,Glyma.07G271200
<i>Oryza sativa</i>	
Os-PAL1	Os02g0626600,Os08g0448000,Os02g0611800,Os02g0626400,Os07g0622200,Os09g0438000 LOC_Os06g10160,LOC_Os02g08100,LOC_Os02g39850
Os-PAL2	Os11g0116300,Os10g0320100,Os11g0530600 LOC_Os03g16390,LOC_Os01g14590,LOC_Os03g03700

(الف)



(ب)



شکل ۴-۱۱. شبکه‌ی هم‌بیانی PAL: الف) سویا، ب) برنج (Cytoscape)

ابزار غنی سازی (Enrichment) شامل هر روش تحلیلی می‌گردد که براساس مسیر مولکولی و یا اطلاعات شبکه بینش مناسبی از یک سیستم بیولوژیک به دست می‌دهد (Marco-Ramell, Palau- Rodriguez et al. 2018). از مهم‌ترین کاربردهای استفاده از آنالیزهای Pathway Enrichment شناسایی مسیرهایی است که سلول‌های سرطانی در آن فعالیت می‌کنند و به نحوی در شناسایی و تشخیص و درمان سرطان‌ها می‌توانند موثر واقع شوند (Yang, Wang et al. 2019). بررسی Pathway Enrichment در واقع نمایانگر مسیرهایی است که ژن‌های مورد نظر در آن مسیر فعالیت می‌کنند و با محاسبه ضریب P-Value، میزان احتمال این مشارکت را مشخص می‌کند. ضریب P-Value در فیتوزوم ۰/۱، ۰/۰۵ و ۱ محاسبه شده است. که هر چه میزان این P-Value کمتر باشد نتیجه آنالیز از دقت بالاتری برخوردار است و با این احتساب ضریب ۰/۰۵ دقیق‌تر است. هم‌چنین فیتوزوم، آزمون تصحیح نیز برای نتایج آنالیز در نظر می‌گیرد که این آزمون‌ها شامل Benjamini, Holm-Bonferroni و Hochberg و Bonferroni می‌باشند.

آزمون تصحیح Bonferroni یک آزمون چند متغیری است که زمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد که چندین آزمایش وابسته و یا مستقل، به صورت هم‌زمان با هم انجام می‌شود (از آنجا این آزمون یک مقدار آلفا در نظر می‌گیرد ممکن است برای هر متغیر به صورت انفرادی مناسب است و شاید برای مجموعه متغیرها و مقایسه آن‌ها مناسب نباشد، برای جلوگیری از بسیاری از پیامدهای نادرست، مقدار آلفا باید برای تعدیل مقایسه‌هایی که انجام می‌شود کاهش یابد.

بنابراین از طریق بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان می‌توان عملکرد ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی که فعالیت می‌کنند را شناسایی کرد و به منظور تکمیل اطلاعات به دست آمده از ژن‌هایی که عملکرد آن‌ها براساس Pathway Enrichment ، مشخص نشده است را با استفاده از پایگاه اطلاعاتی KEGG بدست آورد.

با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیزهای Pathway Enrichment مشخص شد که ژن Glyma.13G372000 در گیاه سویا در ۴ مسیر سنتزی فعالیت می‌کند. که این مسیرها شامل مسیر بیوسنتز مونومرهای سوبرین، بیوسنتز هیدروکسی بنزووات، بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها و در نهایت مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها می‌باشد (جدول ۴-۶).

سوبرین (*Suberin*) یک پلیمر زیستی است که از مشتقات اسید چرب C16-C26 طویل تشکیل شده است که از طریق پیوندهای کووالانسی استری به گلیسرول و هیدروکسی سینامات، یعنی اسید فورولیک و اسید p-کوماریک، به یکدیگر متصل می‌شوند، و آسیل گلیسیرین را تولید می‌کند و در دیواره‌ی سلولی گیاه انباشت می‌شود. موانع چربی دوست نظیر لایه سوبرین، کوتیکول و لایه مومی سطح گیاه از خروج جریان آب از طریق انتقال و حرکت آب، به صورت محلول‌ها و گازها در سراسر گیاه جلوگیری می‌کنند. علاوه بر این نتایج بدست آمده در چند نمونه گیاهی نظیر سیب زمینی، بلوط و سیب نشان داد که این موانع چربی دوست و سایر ژن‌های بیوسنتز سوبرین، در ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن‌ها نیز دخالت دارند (Figueiredo, Araújo et al. 2019).

مسیر پر اهمیت دیگر بیوسنتز اسکوپلین و اسکولین است. اسکوپولیتین در زمان کمبود آهن در ریزوسفر دفع می‌شود و میکروبیوم ریشه را در *Arabidopsis* شکل می‌دهد، اما ارتباط سازگاری اکولوژیکی و سازوکارهای زیست شناختی پایه آن هنوز کشف نشده است.

داده‌های اخیر مسیر بیوسنتزی اسکوپولیتین را که منجر به فلاکسین و سیدرتین می‌شود، نشان داده و رابطه آن‌ها با فعالیت زیستی و نقش این ترکیبات در تغذیه گیاهان را ارائه می‌دهد.

فرضیه‌ای وجود دارد که این ترکیبات هم‌چنین می‌توانند بر ترکیب میکروبیوم تاثیر بگذارند. جهش‌های بیوسنتتیک در مطالعات آینده در مورد نقش آن‌ها در تعاملات گیاه-میکروب و گیاه-میکروبیوم بسیار مهم خواهد بود (Stringlis, de Jonge et al. 2019). در واقع اسکوپلین یک ترکیب ضد میکروبی است. دو ژن Glyma.13G372000 و Glyma.14G205200 هم در مسیر بیوسنتز لیگنین و نیز در مسیر سنتز اسکوپلین حضور دارند و می‌توان مطرح کرد که این ژن‌ها به نوعی در مکانیسم دفاعی گیاه نقش دارند.

ژن (Glyma.18G277300) با نام 6-phosphogluconate dehydrogenase (GND)، در مسیر بیوسنتز پنتوز فسفات دخالت دارد. مسیر پنتوز فسفات اکسیداتیو (OPPP) مسیر اصلی تولید NADPH است که برای بیوسنتز و تعادل بازدارندگی در سلول‌های گیاهی استفاده می‌شود. گام اصلی تنظیم OPPP توسط گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز (G6PDH یا G6PD) کاتالیز می‌شود. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که G6PD در گیاهان نقش مهمی در مقابله با تنش‌ها، از جمله شور و خشکی دارد. قطعاً شوری یک محدودیت محیطی بزرگ برای رشد محصولات کشاورزی است و منجر به کاهش کارایی گیاه می‌شود (Yang, Wang et al. 2019).

گیاهان می‌توانند اثرات تنش شوری را با حذف ^{19}ROS از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به حداقل برسانند. اخیراً گزارش شده است G6PD، که با ارائه NADPH بیشتر برای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در پاسخ به تنش دارد (Yang, Wang et al. 2019).

ژن (Glyma.16G038300) با نام methionine synthase در مسیر بیوسنتزی سلنوامینواسید فعالیت می‌کند. نقش مسیر بیوسنتزی سلنوامینواسید در پاسخ‌های دفاع گیاهی و پیامدهای مربوط به اکولوژیکی مورد بحث قرار گرفته است (Lima, Pilon-Smits et al. 2018). در گیاه برنج نیز از میان شبکه هم‌بیان ژن‌ها، تنها نقش دو ژن در Pathway Enrichment مشخص شد. این دو ژن

¹⁹ reactive oxygen species

(LOC_OS02g39850) و (LOC_OS02g08100) در کنار یکدیگر در مسیرها بیوسنتزی مختلفی فعالیت می‌کنند. این مسیرهای بیوسنتزی شامل مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها، سوبرین، فنیل پروپانوئید، هیدروکسی بنزوات و ... می‌شود (جدول ۴-۷). این مسیرها در گیاه سویا نیز مشترک بود و معرفی این مسیرهای بیوسنتزی در گیاه سویا به صورت مفصل ارائه شد.

جدول ۴-۶. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان PAL در سویا: ستون اول ID مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌های موجود در مسیر، ستون چهارم ضریب P-Value است که میزان اتفاقی بودن مسیر را مشخص می‌کند و ستون پنجم ژن‌های درگیر در مسیر هستند.

Pathways	Pathways Name	No	p-Value	Genes
PWY-1121	suberin monomers biosynthesis	4	0.001002	Glyma.13G372000 Glyma.02G236500 Glyma.14G205200 Glyma.01G232400
PWY1F-467	phenylpropanoid biosynthesis, initial reactions_	2	0.134083	Glyma.02G236500 Glyma.14G205200
PWY-6435	4- hydroxybenzoate biosynthesis V	2	0.399885	Glyma.13G372000 Glyma.01G232400
PWY-7186	superpathway of scopolin and esculin biosynthesis_	2	0.692658	Glyma.02G236500 Glyma.14G205200
OXIDATIVEPENT-PWY	pentose phosphate pathway (oxidative branch)_	1	1.000000	Glyma.18G277300
PENTOSE-P-PWY	pentose phosphate pathway_	1	1.000000	Glyma.18G277300
PWY-3462	L-phenylalanine biosynthesis II	1	1.000000	Glyma.13G319000
PWY-3481	superpathway of L-phenylalanine and L-tyrosine biosynthesis_	1	1.000000	Glyma.13G319000
PWY-361	phenylpropanoid biosynthesis_	2	1.000000	Glyma.13G372000 Glyma.01G232400
PWY-5041	<i>S</i>-adenosyl-L-methionine cycle II_	1	1.000000	Glyma.16G038300
PWY-6936	seleno-amino acid biosynthesis_	1	1.000000	Glyma.16G038300
PWY-702	L-methionine biosynthesis II_	1	1.000000	Glyma.16G038300
PWY-724	superpathway of L-lysine, L-threonine and L-methionine biosynthesis II_	1	1.000000	Glyma.16G038300
PWY1F-FLAVSYN	flavonoid biosynthesis_	2	1.000000	Glyma.13G372000 Glyma.01G232400

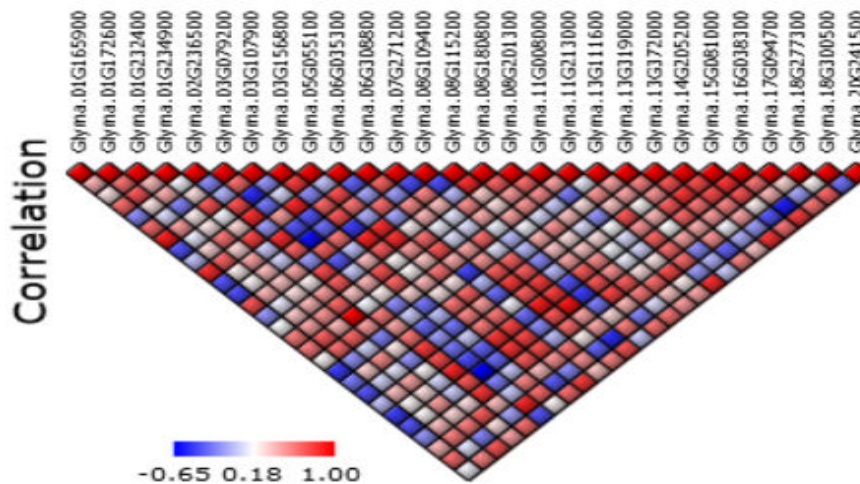
جدول ۴-۷. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان PAL در برنج: ستون اول ID مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌های موجود در مسیر، ستون چهارم ضریب P-Value است که میزان اتفاقی بودن مسیر را مشخص می‌کند و ستون پنجم ژن‌های درگیر در مسیر هستند.

Pathways	Pathways Name	No	p-Value	Genes
PWY-1121	suberin monomers biosynthesis	1	1.000000	LOC_OS02g08100
PWY1F-FLAVSYN	flavonoid biosynthesis	1	1.000000	LOC_OS02g08100
PWY-361	phenylpropanoid biosynthesis	2	0.246975	LOC_OS02g08100 LOC_OS02g39850
PWY-6435	4- hydroxybenzoate biosynthesis V	1	1.000000	LOC_OS02g08100
PWY-6673	caffeoylglucarate biosynthesis	1	1.000000	LOC_OS02g08100
PWY-6040	chlorogenic acid biosynthesis II	1	1.000000	LOC_OS02g39850

از آن‌جا که هدف اصلی پروژه ما بررسی‌های هم‌بیانی در ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین است از این رو پی بردن به میزان هم‌بستگی میان ژن‌های هم‌بیان اهمیت خاصی پیدا می‌کند. دانستن این موضوع که کدام ژن‌ها با یک دیگر رابطه نزدیکی دارند خود می‌تواند به امر پیش‌بینی فرآیندهای نظیر فعالیت‌های این ژن‌ها در سلول، بویژه ژن‌هایی که هنوز دارای عملکرد ناشناخته‌ای از دیدگاه ما هستند و بشر هنوز نتوانسته است به نقش دقیق این ژن‌ها پی ببرد، کمک کند. هم‌چنین بیان ژن‌ها را نیز می‌توان براساس میزان هم‌بستگی تفسیر کرد. در مورد ژن PAL، نرم‌افزار فیتوزوم ضریب هم‌بستگی بین ۰/۶- و ۱+ در نظر گرفت. با حرکت دادن موس بر روی هر یک از خانه‌ی شطرنجی شکل رابطه بین دو ژن نشان داده می‌شود. خانه‌های قرمز نمایانگر رابطه هم‌بستگی نزدیک و خانه‌های آبی نشان دهنده هم‌بستگی ضعیف و یا عدم هم‌بستگی هستند. در شکل برای ۲۸ ژن PAL در گیاه سویا هم‌بستگی در نظر گرفته شده است و روابط میان این ژن‌ها به خوبی مشخص شده است. با نگاه اجمالی به شکل ترسیم شده می‌توان به طور کلی به این نتیجه رسید که هم‌بستگی کامل میان ژن‌های PAL خیلی کم به چشم می‌خورد و تقریباً با هم‌بستگی ضعیف و منفی (اثر مخالف ژن‌ها و فعالیت معکوس آن‌ها) برابری می‌کند.

دانستن این اطلاعات همبستگی ما را در شناخت بهتر ژن‌های اصلی درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین، ژن‌های هم‌بیان متعلق به هر زیرشبکه هم‌بیانی و همچنین ارتباط میان ژن‌های هم‌بیان هر زیرشبکه هم‌بیانی با یکدیگر یاری خواهد کرد و موجب به دست آوردن بینش مناسبی از درک روند تکاملی دیواره سلولی و انجام هرچه بهتر و دقیق‌تر مطالعات آزمایشگاهی می‌شوند.

نرم افزار فیتوزوم برای ۶ ژن از ۱۵ ژن مطرح شده گیاه برنج، اطلاعات ژن‌ها را در اختیار داشت اما شکل همبستگی میان ژن‌های هم‌بیان مشاهده نشد (شکل ۴-۱۲).



	Glyma.08G201300	Glyma.11G008000	Glyma.11G213000	Glyma.13G111600	Glyma.13G319000
Glyma.08G109400	0.553	0.447	0.137	-0.026	-0.016
Glyma.08G115200	0.344	0.286	0.479	0.166	0.447
Glyma.08G180800	0.660	0.506	0.512	0.083	0.512
Glyma.08G201300	1	0.645	0.549	0.045	0.389
Glyma.11G008000	0.645	1	0.466	-0.209	0.285
Glyma.11G213000	0.549	0.466	1	0.129	0.531
Glyma.13G111600	0.045	-0.209	0.129	1	0.458
Glyma.13G319000	0.389	0.285	0.531	0.458	1
Glyma.13G372000	0.096	-0.148	0.363	0.465	0.571
Glyma.14G205200	0.292	0.196	0.734	0.206	0.516
Glyma.15G081000	0.172	0.084	0.525	0.424	0.692
Glyma.16G038300	0.133	0.068	0.667	0.177	0.661
Glyma.17G094700	0.292	0.277	0.636	0.476	0.447
Glyma.18G277300	0.649	0.735	0.653	-0.155	0.517
Glyma.18G300500	0.374	0.234	-0.112	-0.041	-0.295
Glyma.20G241500	0.498	0.468	0.852	0.044	0.577

شکل ۴-۱۲. بررسی همبستگی ژن‌های هم‌بیان PAL با یکدیگر در گیاه سویا (Phytozome)

۴-۳-۱ بررسی شبکه هم بیانی 4CL

مطالعه‌ی شبکه هم‌بیانی PAL با استفاده از دو نرم افزار ATTED II و Genevestigator انجام گرفت (جدول ۴-۸). نرم افزار ATTED II برای هر ۱۲ ژن 4CL از ۱۶ ژن سویا ژن‌های هم بیان در نظر گرفت. و برای گیاه برنج از ۸ ژن 4CL، اطلاعات هم‌بیانی مربوط به ۳ ژن (LOC4328485)، (LOC4345717) و (LOC4345054) را در اختیار ما قرار داد. در نرم‌افزار ATTED II، ژن 4CL1 براساس داده‌های ریزآرایه با ۷ ژن به صورت مستقیم نظیر ژن‌های PAL8 و C4H سویا هم بیانی نشان داد. نرم‌افزار Genevestigator، برای ۱۲ ژن هم بیان در نظر گرفت و درمقابل برای ۳ ژن 4CL گیاه برنج شبکه هم‌بیانی ارائه کرد. به این دلیل اطلاعات این دو نرم‌افزار با یکدیگر هم‌پوشانی دارد و مجموع اطلاعات این دو نرم‌افزار برای بررسی هم‌بیانی ژن‌ها موثرتر است.

بررسی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape مشخص کرد که ژن‌های هم‌بیان با ژن‌های اصلی فقط با ژن اصلی خود دارای وجه اشتراک و ارتباط هستند و ارتباطی با سایر هم‌بیان‌ها در هر دو گیاه سویا و برنج ندارند.

جدول ۴-۸. ژن‌های هم‌بیان با 4CL در سویا و برنج (ATTED II و Genevestigator)

Genes	Coexpression genes
	<i>Glycine max</i>
Gm4CL1	Glyma.15G003600, Glyma.13G101400, Glyma.11G020700, Glyma.08G220200
Gm4CL2	Glyma.02G134500, Glyma.11G228100, Glyma.08G115200
Gm4CL3	Glyma.17G246500, Glyma.01G177200, Glyma.16G054200
Gm4CL4	Glyma.15G246800, Glyma.16G218900, Glyma.03G138700
Gm4CL5	Glyma.13G261700, Glyma.12G193500, Glyma.14G152100
Gm4CL6	Glyma.06G277600, Glyma.20G081000, Glyma.13G167300
Gm4CL7	Glyma.18G258000, Glyma.01G195200, Glyma.10G104700
Gm4CL8	Glyma.20G126500, Glyma.08G002700, Glyma.03G121100, Glyma.10G269700
Gm4CL9	Glyma.U009200, Glyma.06G141600, Glyma.10G261000
Gm4CL10	Glyma.06G143000, Glyma.14G205200, Glyma.08G109400
Gm4CL11	Glyma.05G088100, Glyma.10G145000, Glyma.09G275500
Gm4CL12	Glyma_05G088100, Glyma_10G145000, Glyma_09G275500

<i>Oryza sativa</i>	
Os4CL1	LOC-Os06g48860, LOC-Os01g18660, LOC-Os01g72834,
Os4CL2	LOC-Os11g25860, LOC-Os08g06100, LOC-Os02g50490
Os4CL3	LOC-Os08g34800, LOC-Os03g17700, LOC-Os02g41670 Os02g0626600, Os10g580900, Os09g057200

با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیزهای Pathway Enrichment، از ۳۸ ژن هم‌بیان با ۱۲ زیرشبکه هم‌بیانی ژن 4CL در سویا، برای ۱۵ ژن مسیرهایی که با درصد احتمال مشخص در آن مشارکت می‌کنند نشان داده شد. ۳۱ مسیر بیوسنتزی با توجه به جدول ۴-۹ مشخص شد. در مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئید که مسیر اصلی مورد نظر این پژوهش است دو ژن هم‌بیان (Glyma.15G003600) و (Glyma.08G220200) حضور دارند که هم‌بیان با ژن اصلی Gm4CL1 هستند. در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها سه ژن، در مسیر تجزیه اتانول و فیتول ۲ ژن و در سایر مسیرهای بیوسنتزی تنها یک ژن از ژن‌های هم‌بیان حضور دارند (جدول ۴-۹).

با توجه به این نتایج می‌توان به اهمیت ژن 4CL و پراکندگی گسترده این ژن در مسیرهای سنتزی مختلف پی برد. نتایج حاکی از آن است که 4CL در گیاه سویا نقش‌های متعددی دارد و علاوه بر مسیرهای سنتزی فنیل پروپانوئیدها و متابولیت‌های ثانویه در گیاه در مسیرهای دیگری نیز فعالیت دارد.

ژن Glyma.03G121100 در مسیر تجزیه نشاسته و قند حضور دارد. نشاسته مهم‌ترین ذخیره کربوهیدرات در گیاهان است. نشاسته یک مولکول ساده تشکیل شده از واحدهای مونومری گلوکز با پیوند های α -1، α -4 و α -6 است. نشاسته اغلب در اندام‌های ذخیره سازی ترکیبات گیاه مانند ریشه، ریزوم، غده، ساقه و دانه حضور دارد که نه تنها منبع اصلی کربوهیدرات در رژیم غذایی انسان است، بلکه به عنوان ماده خامی برای اهداف صنعتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Thalman and Santelia, 2017).

متابولیسم نشاسته در برگ‌ها بهتر انجام می‌شود، نشاسته در طول روز سنتز می‌شود و در طول شب که امکان فتوسنتز گیاه وجود ندارد به کار می‌رود تا تعادل عرضه کربن و انرژی را تضمین کند. تنظیمات میزان تخریب نشاسته تحت تغییر دوره نور در اوایل غروب خورشید رخ می‌دهد. در گیاه آرابیدوپسیس نشاسته از طریق فعالیت شبکه‌ای از آنزیم‌های متعدد تخریب می‌شود. نشاسته نیز به عنوان یک مولکول کلیدی در پاسخ گیاهان به تنش‌های غیر زنده مانند کمبود آب، شوری بالا یا دمای شدید است. در این شرایط محیطی چالش انگیز، گیاهان به طور کلی نشاسته را مجدداً برای تولید انرژی و کربن در زمانی که فتوسنتز محدود است، فراهم می‌کنند (Thalman and Santelia, 2017).

مسیر تجزیه قند نیز ارتباط مستقیمی با تجزیه نشاسته دارد و هر دو این مسیرها در برابر تنش‌های غیر زیستی نقش موثری دارند و در کاهش و افزایش بیان ژن در نمونه‌های مختلف موثر است (Sui, Yang et al. 2015).

ژن‌های Glyma.14G152100 و Glyma.08G002700 در مسیر تجزیه فیتول نقش دارند. فیتول از اجزا دیترپن الکل‌های نیتروژن دار است که اساس آن در صنعت داروسازی و بیوتکنولوژی اهمیت فراوانی دارد (Islam, Ali et al. 2018).

ژن Glyma.05G088100 در متابولیسم روتین دخالت دارد. روتین در سال ۱۸۴۲ کشف شد و در پزشکی برای درمان اختلالات عروقی مربوط به نفوذپذیری و شکنندگی مویرگ استفاده شده است. این ترکیب یکی از رایج‌ترین گلوکوزیدهای موجود در تعدادی از منابع گیاهی است. غلظت روتین در انگور و گندم سیاه بیشتر از سایر گونه‌های گیاهی است. این ترکیب به طور عمده در قسمت‌های مختلف گیاهان مانند پوست میوه، برگ، گل و ریشه‌ها یافت می‌شود.

در میان فلاونوئیدها، روتین به فلاونول‌ها تعلق دارد. همانند دیگر فلاونوئیدها، به علت ساختار شیمیایی آن‌ها، روتین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، شیمیایی و ضد میکروبی است و بنابراین در سلامت بسیار

اهمیت دارد. همچنین سنتز روتین در مقاومت به تنش‌های غیرزیستی در گیاه نظیر تنش خشکی و سرما نقش دارد (Zhang, Li et al. 2017).

ژن‌های Glyma.14G152100 و Glyma.08G002700 در مسیر دی متیل سولفونیپروپانوات (^۲DMSP) نقش دارند.

DMSP یکی از مولکول‌های مهم سیگنال دهنده و فراوان در کره زمین است و همچنین یک ماده غذایی مهم برای میکروارگانیسم‌های دریایی محسوب می‌شود. کورسون و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی این ترکیبات تحت تنش‌های مختلف در شرایط رشد باکتری مشاهده کردند که با افزایش سطح شوری در محیط میزان انباشت این ترکیبات افزایش پیدا می‌کند (Curson, Liu et al. 2017).

جدول ۴-۹. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیمان 4CL در سویا: ستون اول ID مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌های موجود در مسیر، ستون چهارم ضریب P-Value است که میزان اتفاقی بودن مسیر را مشخص می‌کند و ستون پنجم ژن‌های درگیر در مسیر هستند.

Pathways	Pathways Name	No	p-Value	Genes
PWY-5203	soybean saponin I biosynthesis	1	1.000000	Glyma.10G104700
PWY-735	jasmonic acid biosynthesis	1	1.000000	Glyma.17G246500
PWY-361	phenylpropanoid biosynthesis	2	1.000000	Glyma.15G003600 Glyma.08G220200
PWY-7066	glycyrrhetinate biosynthesis	1	1.000000	Glyma.13G261700
PWY-7420	monoacylglycerol metabolism (yeast)	1	1.000000	Glyma.13G101400
PWY-6724	starch degradation II	1	1.000000	Glyma.03G121100
PWY-7238	sucrose biosynthesis II	1	1.000000	Glyma.03G121100
PWY-3101	flavonol biosynthesis	1	1.000000	Glyma.05G088100
PWY-5390	rutin biosynthesis	1	1.000000	Glyma.05G088100
PWY-5391	syringetin biosynthesis	1	1.000000	Glyma.05G088100
PWY-6787	flavonoid biosynthesis (in equisetum)	1	1.000000	Glyma.05G088100
PWY-6054	dimethylsulfoniopropanoate biosynthesis I (Wollastonia)	2	0.447856	Glyma.14G152100 Glyma.08G002700
PWY66-21	ethanol degradation II	2	1.000000	Glyma.14G152100 Glyma.08G002700
PWY66-389	phytol degradation	2	1.000000	Glyma.14G152100 Glyma.08G002700
PWY-1121	suberin monomers biosynthesis	1	1.000000	Glyma.14G205200

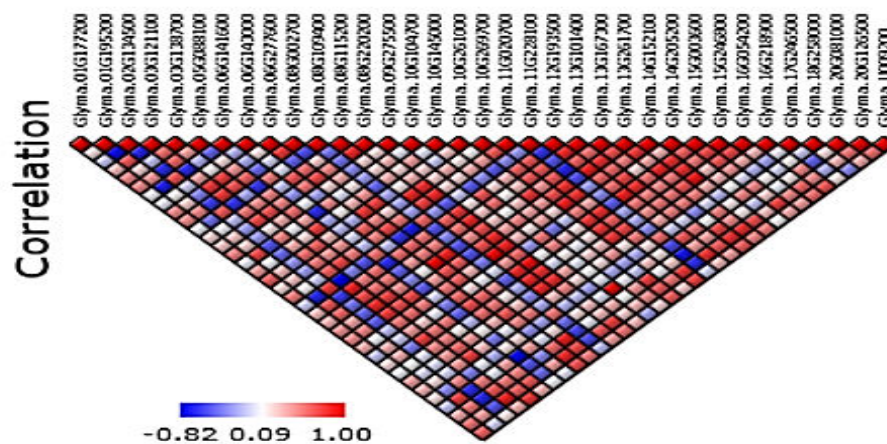
^۲ D- methyl sulfonyl propanoate

PWY1F-467	phenylpropanoid biosynthesis, initial reactions	1	1.000000	Glyma.14G205200
PWY-7186	superpathway of scopolin and esculin biosynthesis	1	1.000000	Glyma.14G205200
PWY1F-FLAVSYN	flavonoid biosynthesis	2	1.000000	Glyma.08G109400 Glyma.06G143000
PWY-6787	flavonoid biosynthesis (in equisetum)	3	0.578040	Glyma.08G109400 Glyma.06G143000 Glyma.05G088100
PWY-6040	chlorogenic acid biosynthesis II	1	1.000000	Glyma.08G220200
PWY-2002	isoflavonoid biosynthesis I	1	1.000000	Glyma.06G143000
PWY-5059	pinobanksin biosynthesis	1	1.000000	Glyma.06G143000
PWY-6325	echinatin biosynthesis	1	1.000000	Glyma.06G143000
PWY-2343	daidzein conjugates interconversion	1	1.000000	Glyma.18G258000
PWY-2345	genistein conjugates interconversion	1	1.000000	Glyma.18G258000
	medicarpin conjugates interconversion	1	1.000000	Glyma.18G258000
PWY-2701	maackiain conjugates interconversion	1	1.000000	Glyma.18G258000
PWY-2861	biochanin A conjugates interconversion	1	1.000000	Glyma.18G258000
PWY-2904	formononetin conjugates interconversion	1	1.000000	Glyma.18G258000
PWY-5717	superpathway of formononetin derivative biosynthesis	1	1.000000	Glyma.18G258000
PWY-6010	apigenin glycosides biosynthesis	1	1.000000	Glyma.18G258000

بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان 4CL در برنج نیز انجام گرفت. و مسیرهایی که ژن‌های هم‌بیان در آن‌ها فعالیت می‌کردند در ۴ مسیر سنتزی سوبرین، فنیل پروپانویید، اسکولین و اسکوپلین و نهایتاً بیوسنتز کریزوریول خلاصه شد. از میان ۹ ژن تنها ۲ ژن در مسیرهای مطرح شده فعالیت داشتند. ژن LOC_Os08G06100 در مسیر سنتز کریزوریول و ژن LOC_Os02G41670 در سه مسیر دیگر مشارکت دارد (جدول ۴-۱۰).

جدول ۴-۱۰. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان 4CL در برنج: ستون اول ID مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌های موجود در مسیر، ستون چهارم ضریب P-Value است که میزان اتفافی بودن مسیر را مشخص می‌کند و ستون پنجم ژن‌های درگیر در مسیر هستند.

Pathways	Pathways Name	No	p-Value	Genes
PWY-6232	chrysoeriol biosynthesis	1	0.336913	LOC_Os08G06100
PWY-1121	suberin monomers biosynthesis	1	1.000000	LOC_Os02G41670
PWY1F-467	phenylpropanoid biosynthesis, initial reactions	1	1.000000	LOC_Os02G41670
PWY-7186	superpathway of scopolin and esculin biosynthesis	1	1.000000	LOC_Os02G41670



	Glyma.02G134500	Glyma.03G121100	Glyma.03G138700	Glyma.05G088100
Glyma.01G177200	-0.056	0.335	0.497	0.491
Glyma.01G195200	-0.731	0.681	0.239	0.465
Glyma.02G134500	1	-0.664	-0.084	-0.620
Glyma.03G121100	-0.664	1	0.601	0.638
Glyma.03G138700	-0.084	0.601	1	0.448
Glyma.05G088100	-0.620	0.638	0.448	1
Glyma.06G141600	0.708	-0.616	-0.142	-0.416
Glyma.06G143000	-0.062	0.417	0.138	0.225
Glyma.06G277600	-0.308	0.810	0.771	0.455
Glyma.08G002700	-0.560	0.803	0.707	0.655
Glyma.08G109400	0.698	-0.584	-0.205	-0.591
Glyma.08G115200	-0.131	0.584	0.506	0.513
Glyma.08G220200	-0.223	0.756	0.707	0.515
Glyma.09G275500	-0.222	0.177	0.394	0.616
Glyma.10G104700	-0.495	0.511	0.068	0.417
Glyma.10G145000	-0.412	0.395	0.252	0.768
Glyma.10G261000	-0.256	0.599	0.661	0.326
Glyma.10G269700	-0.222	0.569	0.469	0.457
Glyma.11G020700	-0.055	0.651	0.761	0.558
Glyma.11G228100	0.795	-0.821	-0.306	-0.485

شکل ۴-۱۳. بررسی همبستگی ژن‌های هم‌بیان 4CL با یکدیگر در گیاه سویا (Phytozome)

برای نشان دادن همبستگی نتایج بدست آمده از مطالعات هم‌بیانی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی فیتوزوم شکل مربوط به همبستگی و ژن‌ها و جدول نتایج آن‌ها بدست آمد. برای ژن 4CL در سویا دامنه همبستگی بین بازه $0/82 -$ و $1+$ در نظر گرفته شد. رنگ آبی نمایانگر همبستگی کمتر و رنگ قرمز نشان دهنده همبستگی مثبت و کامل است. با توجه به شکل مشخص شده بین بیشتر ژن‌های هم‌بیان، همبستگی کامل وجود دارد. لازم به ذکر است که میزان همبستگی میان ژن 4CL و ژن هم

بیانش چالکون سنتتاز با استفاده از نرم افزار اکسل بررسی شد و رقم مقاوم سویا هم بستگی ۰/۶+ و رقم حساس سویا هم بستگی ۰/۶- نشان داد. که با بازه بدست آمده در شکل ۴-۱۴ تطابق دارد. نرم افزار فیتوزوم برای ۹ ژن از ۱۲ ژن مطرح شده 4CL در برنج اطلاعات در اختیار داشت ولی مانند PAL شکل مربوط به همبستگی میان ژنهای 4CL را بدست نداد (شکل ۴-۱۳).

۴-۳-۲ بررسی شبکه هم بیانی CCR

مطالعه‌ی شبکه هم‌بیانی CCR با استفاده از دو نرم افزار ATTED II و Genevestigator انجام گرفت. نرم‌افزار Genevestigator برای ۸ ژن از ۱۱ ژن CCR اطلاعات هم‌بیانی مشخص کرد و نرم‌افزار ATTED II برای ۴ ژن، ژن‌های هم‌بیان مشخص کرد. در برنج نیز هر دو نرم‌افزار، تنها اطلاعات هم‌بیانی ۳ ژن مشترک را در اختیار داشتند. در مجموع و مکمل قرار دادن اطلاعات هم‌بیانی این نرم‌افزارها ۳۴ ژن هم‌بیان CCR برای سویا و ۲۰ ژن هم‌بیان برای برنج با هم‌بستگی بیشتر از ۷۵ درصد مشخص شد.

شکل شماتیک نحوه ارتباط ژن‌های اصلی مسیر بیوسنتزی با ژن‌های هم‌بیان خود توسط نرم‌افزار Cytoscape بدست آمد. همه ژن‌ها به صورت مجزا با ژن‌های هم‌بیان خود در ارتباط بودند. تنها ژن هم‌بیان (Glyma.20G195000) با دو ژن GmCCR7 و GmCCR5 مشترک بود.

ژن (Glyma.20G195000) با نام 7-methylguanosine phosphate-specific 5'-nucleotidase A شناخته می‌شود و روی کروموزوم ۲۰ سویا قرار دارد و در مسیر سنتز متابولیت‌های ثانویه نقش دارد.

جدول ۴-۱۱. ژن‌های هم‌بیان با CCR در سویا و برنج (Genevestigator و ATTED II)

Coexpression genes	
Genes	<i>Glycine max</i>
GmCCR1	Glyma.06g213600, Glyma.14G098000, Glyma.08G162800
GmCCR2	Glyma.11G152400, Glyma.08G109500, Glyma.09G022400, Glyma.07G258200, Glyma.04G147000, Glyma.04G059000, Glyma.06G035300

GmCCR3	Glyma.06G308800,Glyma.20G180800,Glyma.06G186200
GmCCR4	Glyma.18G057900, Glyma.13G267900,Glyma.12G217400
GmCCR5	Glyma.20G195000,Glyma.17G157700,Glyma.01G197800,Glyma.07G002100, Glyma.20G250000, Glyma.09G135200
GmCCR6	Glyma.08G088500,Glyma.13G111400,Glyma.03G007300, Glyma.19G241400,Glyma.11G133200,Glyma.02G014100
GmCCR7	Glyma.20G195000, Glyma.11G219200 Glyma.12G228700
GmCCR8	Glyma.06G137300 Glyma.08G220200, Glyma.03G122000
<i>Oryza sativa</i>	
OsCCR1	LOC-Os02g13060,LOC-Os05g01280,LOC-Os01g45470, Os06g0294000,Os04g0121100,Os02g0175000
OsCCR2	Os02g0177600,Os08g0498100,Os01g0752200,Os01g860400,LOC-Os07g48060,LOC- Os03g57970,LOC-Os06g35410
OsCCR3	Os02g0811400,Os05g0469600,Os09g0471000,Os09g04833000,LOC-Os11g47550,LOC- Os09g31040,LOC-Os09g31000

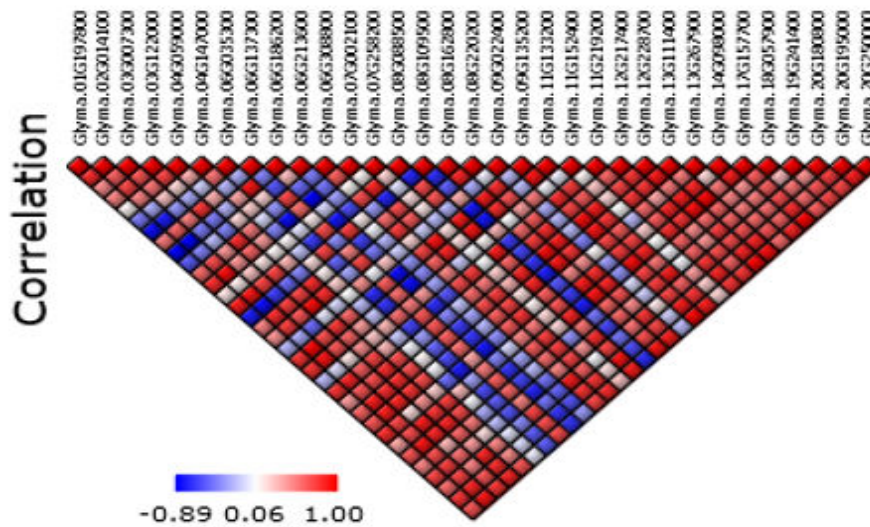
بررسی Pathway Enrichment ژن CCR نیز با استفاده از نرم افزار فیتوزوم انجام گرفت و برای ۸ ژن از ژن‌های هم‌بیان ژن CCR مسیرهای بیوسنتزی که احتمالاً در آنها شرکت می‌کنند را نشان داد. به عنوان مثال ژن Glyma.20G180800 همانند آنزیم PAL در مسیر بیوسنتز سوپرین فعالیت می‌کند. به طور کلی ژن‌های هم‌بیان با CCR در مسیرهای سنتزی مختلفی نظیر سنتز اسکوپلین و اسکولین، گلوتامات، آراشیدونات و ... نقش دارند (جدول ۴-۱۲).

جدول ۴-۱۲. بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم‌بیان CCR در سویا: ستون اول ID مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌های موجود در مسیر، ستون چهارم ضریب P-Value است که میزان اتفاقی بودن مسیر را مشخص می‌کند و ستون پنجم ژن‌های درگیر در مسیر هستند.

Pathways	Pathways Name	No	p-Value	Genes
PWY-5466	matairesinol biosynthesis	۱	1.000000	Glyma.09G022400
PWY-6824	justicidin B biosynthesis	۱	1.000000	Glyma.09G022400
PWY-7214	baicalein degradation (hydrogenperoxide detoxification)	۱	1.000000	Glyma.09G022400
PWY-7445	luteolin triglucuronide degradation	۱	1.000000	Glyma.09G022400
PWY-5080	very long chain fatty acid	۱	1.000000	Glyma.09G135200

	biosynthesis I			
PWY-6433	hydroxylated fattyacid biosynthesis (plants)	↘	1.000000	Glyma.09G135200
PWY-6598	sciadonate biosynthesis	↘	1.000000	Glyma.09G135200
PWY-7036	very long chain fatty acid biosynthesis II	↘	1.000000	Glyma.09G135200
PWY-7601	arachidonate biosynthesis IV (8-detaturase, lower eukaryotes)	↘	1.000000	Glyma.09G135200
PWY-7606	docosahexaenoate biosynthesis III (6-desaturase, mammals)	↘	1.000000	Glyma.09G135200
PWY-7619	juniperonate biosynthesis	↘	1.000000	Glyma.09G135200
PWY-2161B	glutamate removal from folates	↘	1.000000	Glyma.09G135200
PWY-6842	glutathione-mediated detoxification II	↘	1.000000	Glyma.09G135200
PWY-1121	suberin monomers biosynthesis	↘	1.000000	Glyma.20G180800 Glyma.06G137300
PWY1F-467	phenylpropanoid biosynthesis, initial reactions	↘	1.000000	Glyma.20G180800
PWY-7186	superpathway of scopolin and esculin biosynthesis	↘	1.000000	Glyma.20G180800 Glyma.06G137300
PWY-5381	pyridine nucleotide cycling (plants)	↘	1.000000	Glyma.20G195000
PWY-5695	urate biosynthesis/inosine 5'-phosphate degradation	↘	1.000000	Glyma.20G195000
PWY-6596	adenosine nucleotides degradation I	↘	1.000000	Glyma.20G195000
PWY-6606	guanosine nucleotides degradation II	↘	1.000000	Glyma.20G195000
PWY-6608	guanosine nucleotides degradation III	↘	1.000000	Glyma.20G195000
PWY-7185	UTP and CTP dephosphorylation I	↘	1.000000	Glyma.20G195000
SALVADEHYPOX-PWY	adenosine nucleotides degradation II	↘	1.000000	Glyma.20G195000
URSIN-PWY	ureide biosynthesis	↘	1.000000	Glyma.20G195000
PWY-3781	aerobic respiration I (cytochrome c)	↘	1.000000	Glyma.11G152400
PWY-4302	aerobic respiration III (alternative oxidase pathway)	↘	1.000000	Glyma.11G152400
PWY-5083	NAD/NADH phosphorylation and dephosphorylation	↘	1.000000	Glyma.11G152400
PWY1F-FLAVSYN	flavonoid biosynthesis	↘	1.000000	Glyma.08G109500
PWY-6787	flavonoid biosynthesis (in equisetum)	↘	1.000000	Glyma.08G109500
PWY-361	phenylpropanoid biosynthesis	↘	0.497520	Glyma.08G220200 Glyma.06G137300 Glyma.18G057900
PWY-6040	chlorogenic acid biosynthesis II	↘	1.000000	Glyma.08G220200
PWY-2181	free phenylpropanoid acid biosynthesis	↘	1.000000	Glyma.06G137300

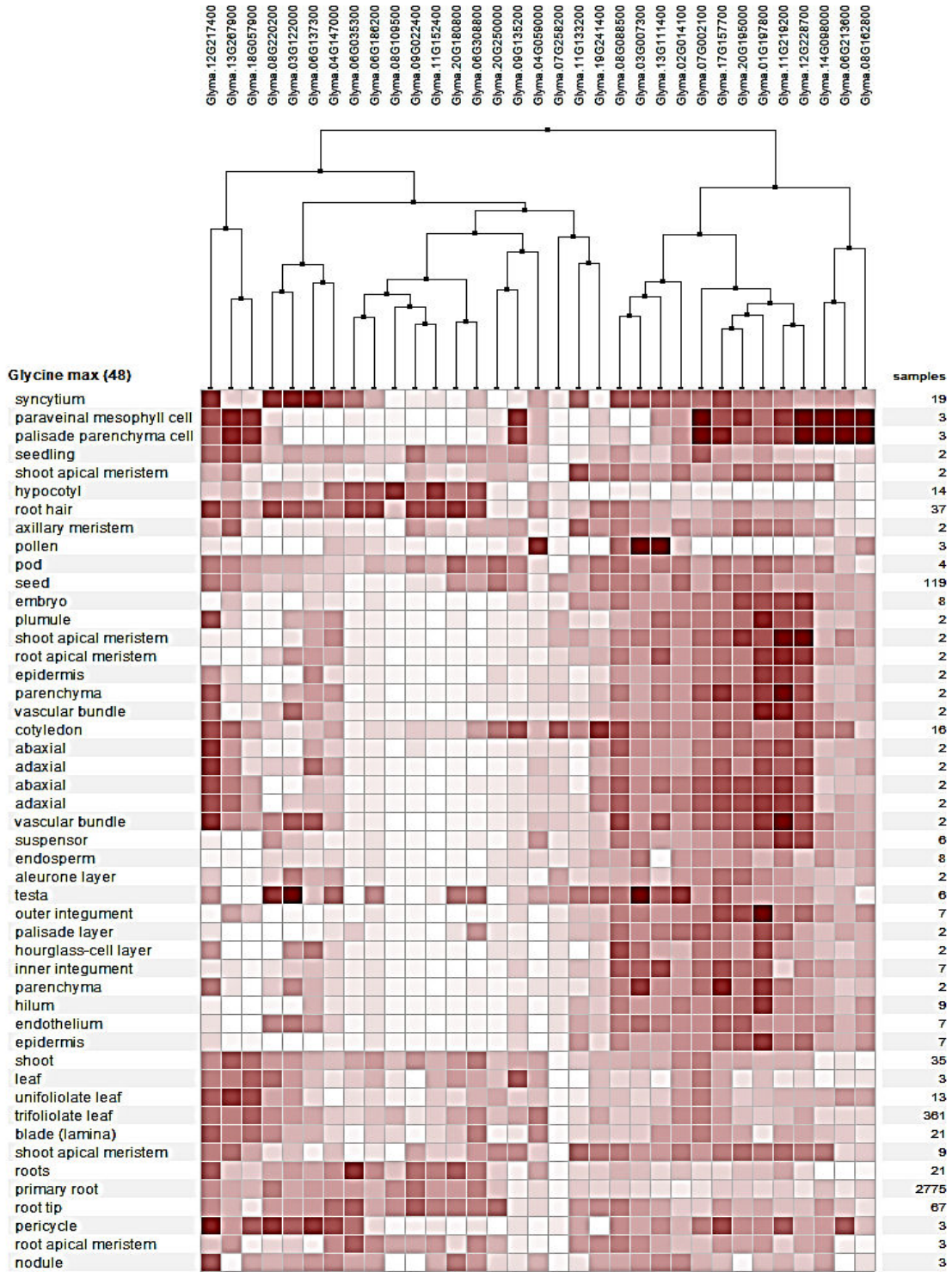
برای نشان دادن همبستگی نتایج بدست آمده از مطالعات هم‌بیانی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی فیتوزوم شکل مربوط به همبستگی و ژن‌ها و جدول نتایج آن‌ها بدست آمد. برای ژن CCR در سویا دامنه همبستگی بین بازه ۰/۸۹- و ۱+ در نظر گرفته شد. رنگ آبی نمایانگر همبستگی کمتر و رنگ قرمز نشان دهنده همبستگی مثبت و کامل است. با توجه به شکل مشخص شده بین بیشتر ژن‌های هم‌بیان، همبستگی کامل وجود دارد (۴-۱۴).



	Glyma.01G197800	Glyma.02G014100	Glyma.03G007300	Glyma.03G122000	Glyma.04G059000
Glyma.01G197800	1	0.831	0.474	0.510	0.106
Glyma.02G014100	0.831	1	0.666	0.744	0.517
Glyma.03G007300	0.474	0.666	1	0.694	0.564
Glyma.03G122000	0.510	0.744	0.694	1	0.751
Glyma.04G059000	0.106	0.517	0.564	0.751	1
Glyma.04G147000	-0.385	-0.207	0.265	0.216	0.350
Glyma.06G035300	-0.810	-0.756	-0.293	-0.223	-0.105
Glyma.06G137300	0.546	0.621	0.535	0.784	0.369
Glyma.06G186200	-0.887	-0.852	-0.402	-0.384	-0.180
Glyma.06G213600	-0.519	-0.378	-0.160	-0.359	0.224
Glyma.06G308800	0.581	0.696	0.434	0.815	0.522
Glyma.07G002100	0.836	0.934	0.450	0.619	0.413
Glyma.07G258200	0.157	0.125	0.281	0.156	0.097
Glyma.08G088500	0.879	0.916	0.744	0.730	0.340

شکل ۴-۱۴. بررسی همبستگی ژن‌های هم‌بیان CCR با یک‌دیگر در گیاه سویا (Phytozome)

Dataset: 48 anatomical parts from data selection: GM_AFFY_SOYBEAN-0
 Showing 33 measure(s) of 33 gene(s) on selection: GM-0

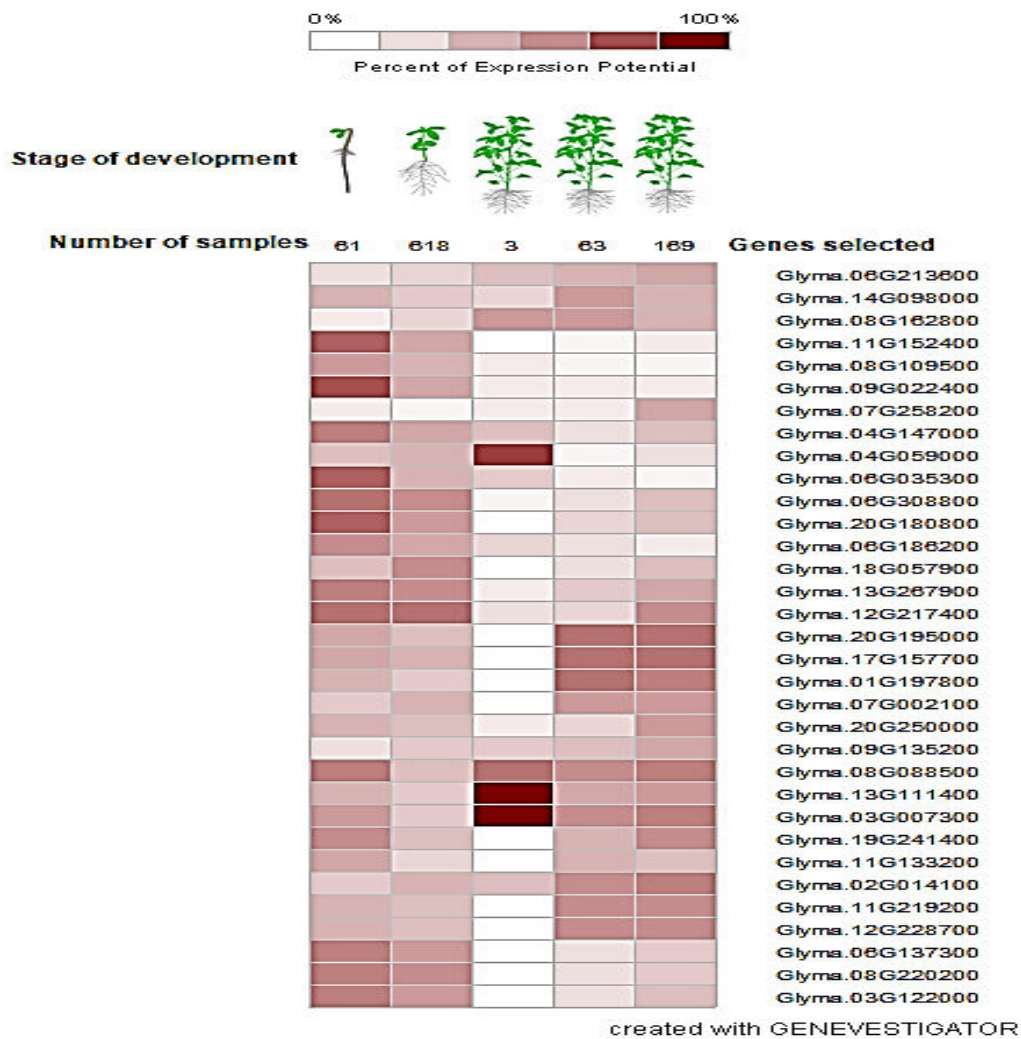


created with GENEVESTIGATOR

شکل ۴-۱۵. میزان بیان ژن CCR در بافت های مختلف سویا (Genevestigator)

با استفاده از نرم‌افزار Genevestigator می‌توان به این نتیجه رسید که براساس مطالعات انجام شده ژن مورد نظر در کدام مرحله رشدی بیان بیش‌تری دارد و در کدام بافت گیاهی این میزان بیش‌تر است. در مورد ژن‌های مورد مطالعه میزان بیان این ژن‌ها در بافت برگ گیاه به نسبت کم بود و در قسمت‌هایی نظیر هیپوکوتیل و ریشه موین این میزان بیش‌تر نشان داده شد (شکل ۴-۱۵). از طرفی سویا گیاهی است دو لپه که دارای ۵ مرحله رشدی است. میزان بیان ژن‌ها در مرحله اول رشدی و به هنگام خروج لپه‌ها و در مرحله سوم رشدی و رشد گیاهچه از سایر مراحل بیش‌تر است (شکل ۴-۱۶).

Dataset: 5 developmental stages from data selection: GM_AFFY_SOYBEAN-1
Showing 33 measure(s) of 33 gene(s) on selection: GM-0



شکل ۴-۱۶. میزان بیان ژن CCR در مراحل رشدی مختلف سویا (Genevestigator)

۴-۴ آنالیز توالی بالادست

توالی بالادست ژن‌ها به منظور یافتن TFBS با فراوانی بیش از ۹۰ درصد مورد بررسی قرار گرفت. هر شبکه هم بیانی شامل TFBS های مختلفی بود که می‌تواند نشان دهنده هم تنظیمی ژن‌های موجود مربوط به یک آنزیم و در نتیجه هم‌بیانی این ژن‌ها باشد.

هر ژن اصلی به همراه زیرشبکه هم‌بیانی خود مورد بررسی نواحی تنظیمی سیس و TFBS قرار گرفت. هر TF نقش متفاوتی در مسیرها و تنش‌های مختلفی می‌تواند داشته باشد که در ادامه به آن‌ها اشاره می‌شود.

در ۸ زیرشبکه هم‌بیانی ژن PAL در سویا تعداد ۱۶ TFBS بدست آمد که مسئول تنظیم فرایندهای سلولی این ژن هستند. از این تعداد TFBS های مربوط به خانواده TF، bHLH، TBP، SBP، TCP، E1N3، WRKY، Bzip و AT-Hook بین دو گیاه سویا و برنج به صورت حفاظت شده وجود داشت. به طور کلی فراوانی حضور این فاکتورهای رونویسی در تنظیم فعالیت ژن‌ها متفاوت است. فاکتور رونویسی AT-Hook، WRKY، bHLH، TBP و Homeodomain به میزان بیشتری در سویا وجود داشت که در این میان AT-Hook بالاترین مقدار را داشت. در گیاه برنج بالاترین میزان فاکتور رونویسی به WRKY اختصاص یافت. TFBS های B3 و CG-1 و AP2; ERF و Homeodomain; TALE در گیاه برنج مشاهده شد که در سویا دیده نشده بود.

این فاکتورهای رونویسی عملکردهای متفاوتی دارند و تفاوت نوع و تعداد این فاکتورها در گونه‌های مختلف می‌تواند دلیلی بر اهمیت این فاکتورها و تفاوت نقش آن‌ها در شرایط مختلف و گیاهان متفاوت باشد.

فاکتور رونویسی MYB یکی از بزرگترین خانواده های فاکتور رونویسی گیاه را تشکیل می‌دهند. این پروتئین‌ها در تنظیم سنتز ترکیبات مشتق از فنیل پروپانویید در گیاهان دارای عملکردهای اساسی هستند. این عوامل MYB در متابولیسم اولیه و ثانویه، تعیین سرنوشت سلولی و تشخیص، انتقال

سیگنال هورمونی ، تنظیم توسعه و پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده دخیل هستند. لی و همکاران (۲۰۱۵)، ساختار پروتئینی و نقش فاکتورهای رونویسی MYB و ارتباط آن‌ها با سایر ترکیبات مشتق شده از مسیر سنتز فنیل پروپانویدها مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که تعدادی از اعضای رونویسی این خانواده دارای نقش تنظیمی مثبت در مسیر بیوسنتز لیگنین هستند و تعدادی بالعکس نقش سرکوب کنندگی دارند. به عنوان مثال در گیاه تنباکو بیان ژن‌های AmMYB308 و AmMYB330 منجر به سرکوب ژن‌های سنتز لیگنین می‌شود و در نتیجه سطح تجمع لیگنین کاهش می‌یابد. به طور کلی نقش اصلی عوامل رونویسی MYB در کنترل سنتز ترکیبات مشتق از فنیل پروپانویید است که موجب تمرکز تلاش‌های تحقیقاتی در مهندسی این عوامل رونویسی برای ارتقاء مقاومت و ارزش اقتصادی گونه‌های زراعی شده است.

خانواده فاکتور رونویسی مارپیچ حلقوی مارپیچ (bHLH)^{۲۱} یک فاکتور رونویسی مهم برای رشد گیاه و پاسخ به استرس بسیار مهم محسوب می‌شود. وانگ و همکاران (۲۰۱۹) فاکتورهای رونویسی خانواده bhlh و نحوه پاسخ دهی آن‌ها به تنش‌های زنده و غیرزنده مختلف در بافت برگ گیاه گندم مورد بررسی قرار دادند.

خانواده فاکتور رونویسی bHLH دومین گروه بزرگ از فاکتورهای رونویسی در گیاهان را شامل می‌شوند. نتایج حاصل از مطالعات ژن‌های کد کننده bHLH گیاهان نشان می‌دهد که این فاکتور رونویسی علاوه بر دخالت در مسیر سنتز لیگنین در تنظیم مجموعه متنوعی از فرآیندهای بیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند مسیرهای سیگنالینگ، سیگنالینگ هورمون‌ها، انشعابات ساقه، روزنه‌ها و رشد ریشه و پاسخ به تنش غیر زنده نقش دارند. ماو و همکاران (۲۰۱۷) مطرح کردند که در شرایط استرس، برخی TF های خانواده bHLH فعال شده و به پروموتور ژن‌های اصلی درگیر در مسیرهای مختلف سیگنالینگ متصل می‌شوند و تحمل به تنش گیاهان را با تنظیم سطح رونویسی این ژن‌های هدف

^{۲۱} basic helix-loop-helix

تنظیم می کنند. به عنوان مثال آن‌ها بیان کردند که این فاکتور رونویسی در شرایط کاهش دما موجب افزایش مقاومت آرابیدوپسیس به تنش سرما شده است. و همچنین با استفاده از ژن‌های همولوگ و بررسی برهمکنش میان پروتئین‌های مختلف نقش احتمالی این فاکتورهای رونویسی در تنش خشکی و شوری در گیاه آرابیدوپسیس را پیش بینی کردند.

شاو و همکاران (۲۰۱۸)، نقش فاکتور رونویسی AT-Hook در پاسخ به تنش شوری در گونه‌ای گیاه توس (*Betula halophila*) مطرح کردند. آن‌ها در پژوهش خود علاوه بر فاکتور رونویسی AT-Hook فاکتورهایی که در سازگاری با تنش شوری دخالت دارند را شناسایی کردند. در مطالعه شاو و همکاران (۲۰۱۸)، ۱۶۸ فاکتور تنظیم کننده در بالادست ژن و ۳۵۱ فاکتور تنظیمی در پایین دست ژن *B. halophila* تحت تنش شوری شناسایی شدند. این فاکتورها شامل پروتئین‌های دهیدرین، انتقال دهنده سدیم / هیدروژن، انتقال دهنده پتاسیم، پروتئین شوک حرارتی، فاکتورهای رونویسی WRKY، ERF / AP2 و B3، که در گزارش‌های دیگر در سایر گیاهان مطرح شده است که با تنش شوری سازگار است.

لی و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی الگوهای بیان فاکتور رونویسی خانواده TCP در گیاه کاساوا، به عنوان نماینده گیاهان گرمسیری، به این نتیجه رسیدند که بیان *MeTCP* تحت سه تیمار شوری، خشکی و سرما افزایش می‌یابد و احتمالاً این ژن در بروز مقاومت در برابر تنش‌های غیر زیستی موثر است.

ژن‌های اساسی زیپ لوسین (bZIP)^{۲۲} فاکتورهای رونویسی را کدگذاری می‌کنند که در کنترل فرآیندهای مهم بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی موجود در گیاهان و سایر موجودات یوکاریوتی را نقش دارند. همچنین فاکتور رونویسی bZIP به عنوان یک تنظیم کننده مهم برای اسید آبسزیک (ABA) در ارتباط با مسیرهای سیگنالینگ تنش‌های غیر زنده در گیاهان عمل می‌کند. لیانگ و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از کلون کردن نوعی فاکتور رونویسی در پنبه معمولی به نام *GhABF2*

^{۲۲} Basic [leucine zipper](#)

مشاهده کردند که بیان بیش از حد *GhABF2* به طور قابل توجهی تحمل تنش خشکی و شوری را در آرابیدوپسیس و پنبه بهبود بخشید. در مقابل، خاموش کردن فعالیت *GhABF2* پنبه تراریخته را به تنش شوری و اسمزی حساس می کند. بیان *GhABF2* در اثر تیمارهای خشکسالی و ABA ایجاد شد اما با شوری زیاد سرکوب شد.

جدول ۴-۱۳. TFBS های موجود در توالی بالادست ژن PAL در گیاه سویا

	Homeo domain; HD-ZIP	AT-Hook	Myb/S ANT	Homeo domain	NA C; NA M	TB P	T C P	bZI P	C 2 H 2	bH LH	TC R	EI N3	WR KY	SBP	GA TA	MA DS box
Gm-pal1	۱	۵	۹	۱۴	۴	۹	۵	۱۳	۴	۱۷	۴	۶	-	-	-	-
Gm-pal2	-	۹	-	-	-	۵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gm-pal3	-	۲۲	-	۱۱	-	۹	-	۵	۴	-	۴	۶	-	-	-	-
Gm-pal4	-	-	-	۸	۴	۸	-	-	-	۶	-	-	۲۷	-	-	-
Gm-pal5	-	-	۵	۸	۲	۹	-	-	-	۶	-	۶	۲۶	۱۴	۹	--
Gm-pal6	-	۲۰	-	۳	-	۹	-	-	-	۸	-	-	-	-	-	۱۳
Gm-pal7	۱	۱۵	۱۱	-	۱	۹	-	-	۳	-	۲	۶	-	-	-	-
Gm-pal8	-	۲۰	-	۶	-	۹	-	-	۳	۱۱	۲	-	-	-	-	۱۳

جدول ۴-۱۴. TFBS های موجود در توالی بالادست ژن PAL در گیاه برنج

	bZI P	AP 2; ER F	bHL H	TB P	SB P	TC P	Homeodomain; TALE	N F-Y B	Myb/S ANT; MYB	AT-Hook	B3; bZI P	B3	WR KY	Myb /SA NT	CG-1	E I N 3
Os-PAL1	۲۰	-	۲	۲	۱۶	۶	۱	۴	۱	۳	۱	۲	-	-	-	-
Os-PAL2	۲۰	۵	۱۸	۲	۱۹	۶	۳	۴	۱	۶	-	۲	۶۵	۵	۳	۴

در زیرشبکه‌های هم‌بیانی 4CL در گیاه سویا و برنج نیز تعدادی از فاکتورهای رونویسی به صورت مشترک حفاظت شده بودند. فاکتور رونویسی AT-Hook تعداد زیادی در این ژن وجود داشت علاوه بر این فاکتورهای دیگر رونویسی نیز در تنظیم فعالیت‌های ژن دخالت دارند. فاکتوری نظیر MA

DF تنها در گیاه سویا یافت شد و در مقابل فاکتور رونویسی B3 و NF-YB فقط در گیاه برنج یافت شدند (جدول ۴-۱۵). احتمالاً این فاکتورهای رونویسی در تنش‌های ویژه در این گیاهان به صورت اختصاصی عمل می‌کنند.

جدول ۴-۱۵. TFBSهای موجود در توالی بالادست ژن 4CL در گیاه سویا

	WR KY	Myb /SANT	Homeo domain; HD-ZIP	Homeo domain	NAC; NAM	TCR	TBP	AP2; B3	SBP	GA TA	Bh LH	AT- Hook	MADS box	MA DF	bZIP	C2 H2	EIN 3
Gm-4CL1	-	۳	۱	۶	۱	-	۹	-	-	-	-	۱۵	۱۳	۹	۵	-	-
Gm-4CL2	-	۵	۱	۳	-	۴	۹	۵	-	۹	-	۲۰	۱۳	۹	۲	۲	۶
Gm-4CL3	-	۵	۱	۳	۱	۲	-	-	-	۹	-	۱۵	-	-	۵	۲	۶
Gm-4CL4	۱۹	۳	۱	۹	۵	-	۹	۵	-	-	۶	-	۱۳	-	۸	۳	۶
Gm-4CL5	-	۱	۱	۸	۴	۲	۹	-	-	-	-	۱۵	-	۹	-	۴	-
Gm-4CL6	-	۴	۱	۱۱	-	۲	۹	-	-	-	-	۲۰	۱۱	-	۲	۳	-
Gm-4CL7	-	۳	۱	۸	-	۲	۹	-	-	-	-	۲۰	-	-	۴	۳	-
Gm-4CL8	-	۴	-	۱۴	-	-	۹	-	-	-	-	۲۰	۱۳	-	-	-	-
Gm-4CL9	۱۷	۲	-	-	-	۲	۹	-	-	-	-	۵	-	-	۲	۳	-
Gm-4CL10	-	۱	-	۳	۲	۲	۹	-	۱۶	-	۴	۲۰	-	۹	۲	۳	۶
Gm-4CL11	۱۶	-	-	۴	۲	۲	۹	-	-	۱۰	۶	۲۰	-	۹	۲	۳	-
Gm-4CL12	-	۱	-	-	-	۲	۹	-	-	-	-	۱۵	۱۳	-	۵	۳	۶
Gm-4CL13	۲۰	-	۱	۱۲	۳	۴	۹	-	-	-	۱۷	۲۰	-	-	۶	۳	-

جدول ۴-۱۶. TFBSهای موجود در توالی بالادست ژن 4CL در گیاه برنج

	WRKY	Myb /SANT; MYB	Homeo domain; HD-ZIP	Homeo domain; TALE	NAC; NAM	TCP	TBP	SBP	bHLH	AT- Hook	NF- YB	B3	bZIP	C2H2	EIN3
Os-4CL1	۹۲	۱	۷	۱	۹	۳	۲	۱۷	۱۸	۵	۴	۲	۱۸	۳	۴
Os-4CL2	-	۱	۱۳	۱	-	۶	۲	۱۶	۳۲	۵	۴	۲	۴	۳	-
Os-4CL3	۸۷	-	۶	۵	۹	۱	۲	۱۹	۱۸	۲	۴	-	۴	-	۴

در زیرشبکه‌های هم‌بیانی CCR در گیاه سویا و برنج نیز تعدادی از فاکتورهای رونویسی به صورت مشترک حفاظت شده بودند. و بیش‌ترین تعداد فاکتور رونویسی مربوط به Homeodomain و AT-

Hook است. برخی از ژن‌ها نظیر bHLH در برنج تعداد بیش‌تری نسبت به سویا دارد. این تفاوت می‌تواند اهمیت نقش این فاکتورهای رونویسی در شرایط تنش مختلف در گیاهان متفاوت تک لپه و دولپه را بیان کند. (جدول ۴-۱۶)

جدول ۴-۱۷. TFBS های موجود در توالی بالادست ژن CCR در گیاه سویا

	SBP	C2 H2	E1 N3	TCR	Homeo domai n; HD- ZIP	bZIP	AT- Hook	MAD S box	AP 2; B3	TBP	Myb/S ANT	Homeo domai n	bH LH	NAC ; NA M	WRK Y
Gm- CCR 1	-	-	۵	۲	۱	۵	۱۹	-	-	۹	۳	۱۱	-	-	-
Gm- CCR 2	۱۴	۳	۶	-	۱	۵	۲۰	۱۳	-	۹	-	۳	۵	۲	۲۸
Gm- CCR 3	-	۳	-	-	۱	۵	۲۰	-	-	۸	-	۱۱	۵	-	-
Gm- CCR 4	۱۴	۳	۶	-	۱	-	۲۰	-	-	۹	۲	۱۱	۵	-	-
Gm- CCR 5	-	-	-	۲	۱	۵	۲۰	۱۲	-	۹	۲	-	-	-	-
Gm- CCR 6	-	-	-	۲	-	۵	۲۰	-	۵	۹	-	۳	-	۱	-
Gm- CCR 7	-	-	۶	۲	۱	۵	۲۰	-	-	۹	۲	۶	-	-	-
Gm- CCR 8	-	-	۶	۲	۱	۵	۲۰	-	-	۹	۳	۶	-	-	-

جدول ۴-۱۸. TFBS های موجود در توالی بالادست ژن CCR در گیاه برنج

	SBP	C2H2	EIN3	TCP	Homeo domain; HD-ZIP	bZIP	AT- Hook	NF- YB	B3	Myb/SA NT; MYB	Homeo domain; TALE	bHLH	NAC ; NA M
Os- CCR1	۱۹	۳	۴	۶	۷	۴	۶	۳	۲	۱	۱	-	-
Os- CCR2	۱۶	۲	-	۶	۷	۴	۷	۴	۲	-	۱	۱۷	-
Os- CCR3	۱۸	۹	-	۶	۱۳	۵	۵	۴	۲	-	۱	۱۸	۹

۴-۵ نتایج آزمایشگاهی

مطالعات آزمایشگاهی این پژوهش، جهت بررسی الگوهای بیان پاسخ دهنده به تنش شوری در دو رقم مقاوم و حساس سویا، اقدام به بررسی ژن آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز و متابولیسم لیگنین و همچنین برخی از ژن‌های هم‌بیان این ژن‌ها نموده است. لیگنین موجود در دیواره سلولی ثانویه به عنوان یک حفاظت کننده اسمزی مهم در گیاهان شناخته شده و انباشت آن در بسیاری از تنش‌ها از جمله شوری، خشکی و حرارتی مشاهده شده است. در این پژوهش برای بررسی تغییرات بیان از روش qRT-PCR بهره برده شد.

ژن‌های انتخاب شده شامل ^{34}CL به عنوان ژن اصلی درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین و ژن‌های ^{24}CHs ، ^{25}STR به عنوان ژن‌های هم‌بیان می‌باشند.

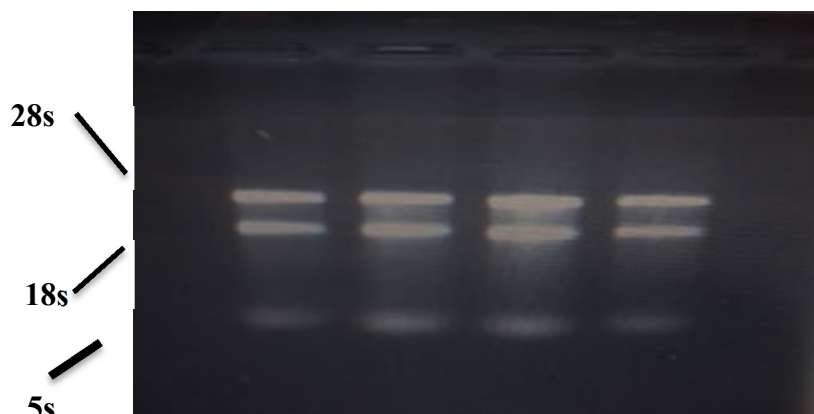
۴-۵-۱ بررسی کیفیت و کمیت RNA

به منظور بررسی کیفی RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز ۱ درصد استفاده شد. وضوح دو باند مربوط به $28S$ rRNA و $18S$ rRNA روی ژل الکتروفورز ۱ درصد و عدم وجود باند نزدیک چاهک‌ها که حاکی از وجود DNA در نمونه است نشان دهنده کیفیت خوب RNA استخراج شده بود. غلظت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ در حدود ۱۰۰ الی ۳۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. همچنین مقایسه نسبت جذب نوری طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر و همچنین ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر نشان دهنده عدم آلودگی نمونه RNA استخراجی بود.

²³ 4-coumarate-coa ligase

²⁴ Chalcone synthase

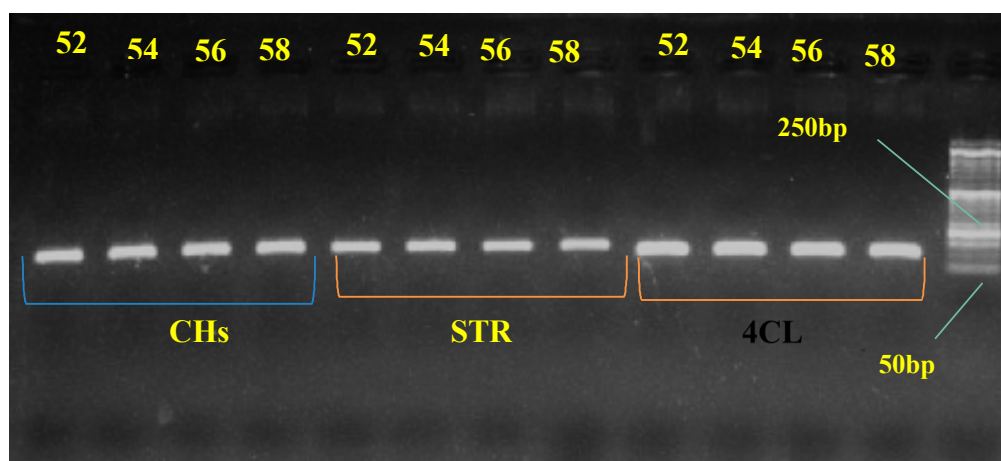
²⁵ Strictosidine synthase



شکل ۴-۱۷. نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد

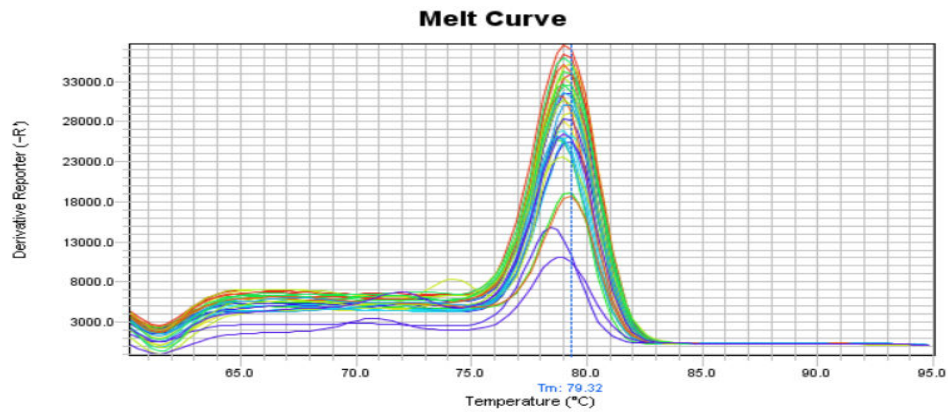
۴-۵-۲ اندازه‌گیری بیان ژن‌ها تحت تنش با استفاده از qRT-PCR

به منظور اطمینان حاصل کردن از عملکرد اختصاصی آغازگرهای طراحی شده و انتخاب دمای اتصال بهینه برای اتصال این آغازگرها به رشته الگو، از PCR با شیب دمایی استفاده شد و مناسب‌ترین دما برای حداکثر کارایی آغازگرهای طراحی شده (۵۸ درجه سانتی‌گراد) تعیین شد (شکل ۴-۱۸).



شکل ۴-۱۸. نتایج حاصل از واکنش PCR با گرادپانت دمایی

همچنین نمودار مربوط به منحنی ذوب^{۲۶} در واکنش qRT-PCR به دلیل اینکه فقط یک پیک نشان داد، نشان از عدم آلودگی (عملکرد اختصاصی پرایمرهای طراحی شده) در این واکنش بود (شکل ۴-۱۹).



شکل ۴-۱۹. نمودار منحنی ذوب در واکنش qRT-PCR

هر ژن دارای ۳ تکرار بیولوژیکی از دو گیاه متفاوت حساس و مقاوم و در سه وضعیت مختلف تیمار ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعته بود. پس از استخراج نتایج خام از دستگاه Step One Plus، تکرارهایی که دارای تکثیر غیر اختصاصی (بیش از یک پیک در منحنی ذوب) بودند از داده‌های آزمایش حذف شدند. سپس میزان بیان نسبی داده‌های خام با استفاده از نرم افزار REST® محاسبه گردید. نتایج بدست آمده در جدول ... آورده شده‌اند.

جدول ۴-۱۹. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در ارقام مقاوم و حساس

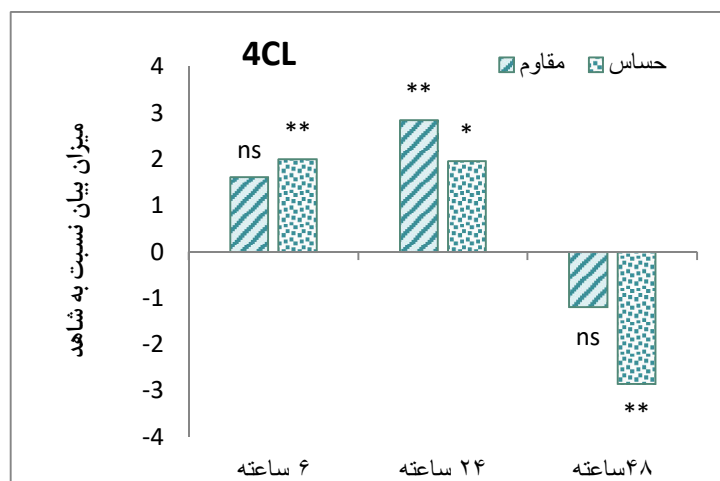
ژن	رقم گیاه	تیمار ۶ ساعته	تیمار ۲۴ ساعته	تیمار ۴۸ ساعته
4CL	حساس	۲	۱/۹۶	-۲/۸۵
	مقاوم	۱/۶۲	۲/۸۴	-۱/۲
CHs	حساس	-۷	-۱۲	-۶
	مقاوم	-۸	۹/۸	-۵

۱. melt curve

STR	حساس	۲۷۰	۷۷	۱۷
	مقاوم	۸	۱۶	۹/۷

۳-۵-۴ بررسی بیان ژن 4-کومارات کوآنزیم آلیگاز (4CL)

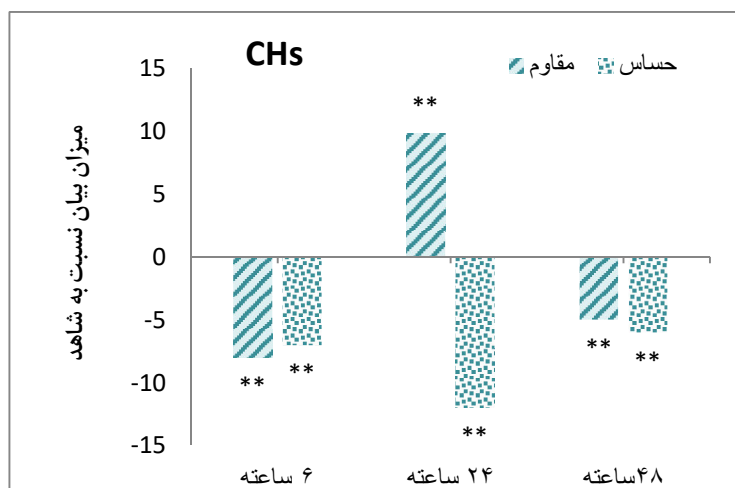
پس از اعمال تنش شوری بر گیاهان ارقام مقاوم و حساس تغییراتی در الگوی بیان ژن‌های آن‌ها به ویژه انواع دخیل در بیوسنتز و متابولیسم لیگنین ایجاد می‌شود. بررسی‌های مولکولی نشان داد که سطح رونوشت ژن 4CL در ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمارشوری در سطح ۲۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد، در رقم مقاوم به ترتیب ۱/۶۲، ۲/۸۴ و ۱/۲- و در رقم حساس در ساعت‌های مختلف اعمال تیمار به ترتیب ۲، ۱/۹۶ و ۲/۸۵- بوده است. که نسبت به گیاهان شاهد تفاوت چشم‌گیری نداشته‌اند. میزان رونوشت ژن 4CL در ۶ ساعت اولیه‌ی اعمال تنش شوری در دو رقم حساس و مقاوم افزایش داشته است و در این بازه، رقم حساس نسبت به رقم مقاوم، بیان بیشتری از خود نشان داد. در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار سطح رونوشت این ژن در هر دو رقم افزایش یافت و رقم مقاوم به حداکثر میزان بیان خود رسید. در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار رقم حساس کاهش بیان معنی داری درپیش گرفت اما رقم مقاوم بیان معنی داری از خود نشان نداد. تغییرات بیان این ژن طی ساعات پس از تیمار در نمودار ۴-۲۱ نشان داده شده است.



شکل ۴-۲۰. میزان بیان نسبی ژن ۴-کومارات کوآنزیم آلیگاز (4CL) در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمارهای شوری در سطح ۲۰۰ میلی مولار و ۳ بازه‌ی زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعته. علائم **، * و ns بترتیب، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.

۴-۵-۴ بررسی بیان ژن چالکون سنتتاز (CHs)

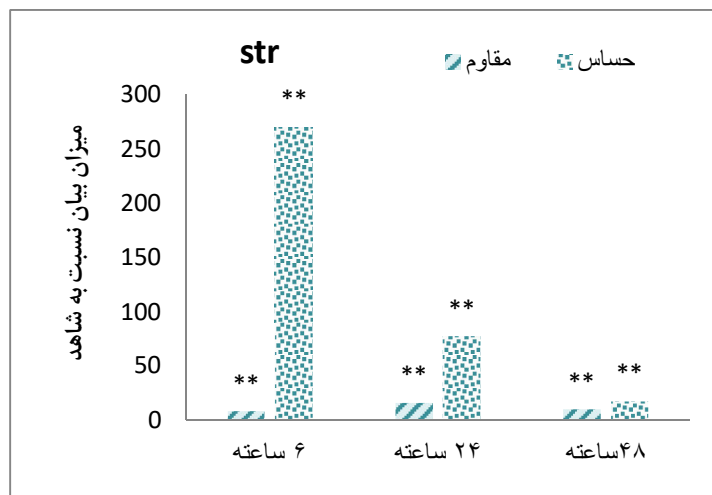
ژن چالکون سنتتاز به عنوان ژن هم‌بیان با دو ژن اصلی درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین 4CL و PAL انتخاب شد. ضریب همبستگی پیرسون این ژن با ژن 4CL بیش از ۷۰٪ بود. بررسی‌های مولکولی نشان داد که سطح رونوشت ژن CHs در ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار شوری در سطح ۲۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد، تفاوت‌هایی مشاهده شد. سطح رونوشت این ژن در ۶ ساعت اولیه اعمال تنش در رقم مقاوم ۸، برابر گیاهان تیمار نشده و در رقم حساس ۷ برابر گیاهان تیمار نشده، در سطح معنی داری ۱ درصد کاهش پیدا کرد. هم‌چنین رونوشت ژن در بازه‌ی زمانی ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار را در سطح معنی داری ۱ درصد افزایش یافت. (حدود ۱۰ برابر گیاهان شاهد). در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش رقم مقاوم و حساس نسبت به شاهد به ترتیب کاهش بیان ۵ و ۶ برابری از خود نشان دادند.



شکل ۴-۲۱. میزان بیان نسبی ژن چالکون سنتتاز (CHs) در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمارهای شوری در سطح ۲۰۰ میلی مولار و ۳ بازه‌ی زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعته. علائم **, * و ns به ترتیب، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.

۴-۵-۵ بررسی بیان ژن Strictosidine Synthase (STR)

ژن STR به عنوان ژن هم‌بیان با PAL و CCR در نظر گرفته شد. ضریب همبستگی پیرسون ژن STR، ۸۷ درصد بود. بررسی‌های مولکولی نشان داد که سطح رونوشت ژن STR در ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمارشوری در سطح ۲۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد، در رقم مقاوم به ترتیب ۸، ۱۶ و ۹/۷ و در رقم حساس در ساعت‌های مختلف اعمال تیمار به ترتیب ۲۷۰، ۷۷ و ۱۷ بوده است. این ژن در سطح معنی‌داری ۱ درصد در دو رقم مقاوم و حساس گیاه سویا به تنش شوری افزایش معنی‌دار سطح رونوشت ژن را نشان داد. در ساعات اولیه اعمال تیمار شوری به گیاه این ژن در رقم حساس به حداکثر میزان رونوشت خود رسید در حالی که در رقم مقاوم در همین سطح بیان چشم‌گیری مشاهده نشد.



شکل ۴-۲۲. میزان بیان نسبی ژن Strictosidine Synthase (STR) در زمان‌های مختلف بعد از اعمال تیمارهای شوری در سطح ۲۰۰ میلی مولار و ۳ بازه‌ی زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعته. علائم **, * و ns بترتیب، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.

۴-۶ بحث

آنزیم ۴- کومارات CoA لیگاز (4CL) (EC 6.2.1.12) نقش مهمی در متابولیسم فنیل پروپانوئیدی با کاتالیزوری تشکیل استری CoA دارد. 4CL در یک مسیر ویژه‌ای فعالیت می‌کند که به سنتز فلاونوئید و لیگنین کمک می‌کند. هر دو این محصولات، عملکردهای فیزیولوژیکی مختلفی را در گیاهان کنترل می‌کنند و سازگاری گیاه با تنش‌های محیطی را بهبود می‌بخشند (Zhang, Ma et al. 2015). شواهدی وجود دارد که تنش شوری موجب افزایش لیگنینی شدن دیواره سلولی در گیاهان می‌شود. بنابراین، فرض شده است که عملکرد ژن‌های 4CL به شدت با تنش‌های محیطی که گیاهان با آن مواجه می‌شوند، وابسته است (Neves, Marchiosi et al. 2010).

یانگ و همکاران (۲۰۱۵) بیان ژن‌های 4CL در سه گونه سپیدار را بررسی کردند و مشاهده کردند که در ساعات اولیه تنش، به منظور سازگاری با شرایط شوری بیان کمی کاهش می‌یابد. در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش به سطح مطلوبی از بیان ژن رسید و در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تنش بیان معنی‌داری مشاهده نشد (Zhang, Ma et al. 2015). این نتایج، با نتایج بدست آمده از آزمایشات ما روی گیاه

سویا مطابق بود و در گیاه سویا نیز در ساعات اولیه تنش رقم حساس بیان بیش‌تری نسبت به مقاوم نشان داد و در تیمار ۲۴ ساعت هر دو رقم به بالاترین سطح بیان رسیدند و در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار بیان کاهش یافت.

چالکون سنتتاز (CHS) (EC 2.3.1.74) آنزیم محوری است که در مرحله اول بیوسنتز فنیل پروپانویدها منجر به کاتالیز فلاونوئیدها می‌شود که نقش مهمی در مقاومت به گیاه در برابر ناسازگاری ایفا می‌کند. (Wang, Zhi et al. 20171)

ماو و همکاران (۲۰۱۴)، گزارش کردند که ترکیبات فنولی و آنتوسیانین در برگ‌ها گندم تحت تنش خشکی افزایش می‌یابد. در میان ژن‌های مورد بررسی در پژوهش آن‌ها ژن چالکون سنتتاز بیش‌ترین سطح بیان را در مواجهه با تنش خشکی داشته است. مشابه با این نتیجه مطالعات پیشین در گیاه بایکالین (*Scutellaria*) *baicalensis* که گیاهی از دارویی و از تیره نعناعیان است، نشان داد بیان ژن چالکون سنتتاز در بافت ریشه و برگ این گیاه در شرایط کمبود آب، بیان قابل ملاحظه‌ای داشته است. (Ma, Sun et al. 201) از آن جایی که کمبود آب در خاک‌های زمین کشاورزی می‌تواند عاملی برای شوری خاک و در معرض قرار دادن گیاه در شرایط شوری باشد، بنابراین این دو عامل تنش غیرزنده خشکی و شوری ارتباط تنگاتنگی با یک‌دیگر داشته و نتایج حاصل از این پژوهش‌ها با پژوهش‌ها ما منطبق است.

هم‌چنین در پژوهشی دیگر شانتا بر و همکاران (۲۰۱۶) مطرح کردند که تنش شوری سبب تغییرات عمده در الگوریتم بیان ژن‌های درگیر در فرآیند‌های فیزیولوژیک متنوع در مسیرهای سنتزی و تنظیمی در برخی ژنوتیپ‌های برنج در مراحل مختلف رشد می‌شود. الگوهای بیان ژن‌های CHS در مسیر سنتز آنتوسیانین به طور کلی با تغییرات محتوای آنتوسیانین کل در رقم‌های برنج تحت تنش شوری ارتباط داشت. این مشاهدات نشان داد که نمک در مسیر سنتز آنتوسیانین نقش مهمی ایفا می‌کند. آن‌ها گزارش دادند که افزایش بیان CHS مربوط به تجمع آنتوسیانین در برگ و دانه‌های برنج است (Chunthaburee, Sakuanrungrasirikul et al. 2016).

استریکتوزیدین سنتاز (STR) نقش مهمی در بیوسنتز آلکالوئیدها ایفا می کند و در طیف وسیعی از بافت‌های فعال گیاهان عالی بیان شده است. پروتئینهای STR در مسیرهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نقش دارند. با این حال، عملکرد پروتئینهای STR در توسعه برنج به خوبی شناخته نشده است.

۴-۷ نتیجه‌گیری

در این پروژه مطالعات تکاملی و هم‌بیانی روی سه ژن اصلی درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین (PAL، 4CL و CCR) انجام گرفت. مطالعات تکاملی این ژن‌ها می‌تواند نگرش بهتری نسبت به دیواره سلولی و فرآیندهایی که درون سلول رخ می‌دهد را ایجاد کند. و ما را در درک متابولیسم‌های دیواره سلولی، سنتز لیگنین و اتفاقاتی که در مسیر بیوسنتز لیگنین که مورد بحث پژوهش ما است، یاری کند.

مطالعه تکاملی این ژن‌ها نشان داد که درصد مشابهت توالی پروتئینی ژن‌های PAL در هر دو گیاه پیرامون ۷۵-۷۷ درصد است. نتایج حاصل از آنالیزهای درخت فیلوژنتیک مشخص کرد که ژن‌های همولوگ در سویا و برنج جدا از یکدیگر قرار گرفته‌اند که این خود می‌تواند دلیلی بر دوبرابری ژن‌ها باشد.

ژن 4CL طی آنالیزهای تکاملی سه خوشه بندی متفاوت از خود نشان داد که طی آن برخی از ژن‌های برنج در یک خوشه با ژن‌های سویا قرار گرفتند. قرار گرفتن ژن‌های برنج در خوشه ژن‌های سویا می‌تواند احتمالاً نشان دهنده رابطه خویشاوندی نزدیک میان آن‌ها باشد. همچنین مشخص شد که ژن Gm4CL10 در هیچ خوشه ای قرار نگرفته است که این امر می‌تواند نشان دهنده این موضوع باشد که احتمالاً این ژن جد خویشاوندی سایر ژن‌ها بوده و می‌تواند منشأ پیدایش ژن‌ها باشد.

آنالیز تکاملی ژن CCR نشان داد که همه سه ژن CCR در برنج با سه ژن CCR7,8,10 در یک خوشه از درخت فیلوژنتیک قرار گرفته‌اند. با توجه به این که ژن‌های برنج به همراه تعدادی از ژن‌های سویا در یک خوشه از درخت فیلوژنتیک قرار گرفته‌اند می‌توان اینطور استنباط کرد که احتمال هم منشأ بودن آن‌ها وجود دارد.

در بررسی‌های هم‌بیانی و Pathway Enrichment مشخص شد که ژن PAL و شبکه‌های هم‌بیانی آن علاوه بر حضور در مسیر بیوسنتز لیگنین در مسیر سنتز سوبرین و اسکوپلین و مسیر پنتوزفسفات که بویژه در مقاومت گیاه به تنش شوری نقش ایفا می‌کند، حضور دارد. می‌توان مطرح کرد که این ژن به نوعی در مکانیسم دفاعی گیاه نقش دارد. بررسی ژن‌های هم‌بیان با ژن PAL توانست مسیرهایی که این ژن‌ها احتمالاً در آن شرکت می‌کنند و همچنین هم‌بیان‌هایی که در مسیر بیوسنتز لیگنین و پروپانویدها درگیر هستند را معرفی کند. همچنین می‌توان برای ژن‌هایی که عملکرد ناشناخته‌ای دارند با توجه به نقش مشخص ژن‌هایی که در ارتباط نزدیکی با آن‌ها فعالیت می‌کنند، به یک نقش احتمالی برای این ژن‌ها دست یافت.

شبکه هم‌بیانی ژن 4CL، ژن‌هایی که در مسیر تجزیه اتانول و قند و نشاسته دخالت دارند را مشخص کرد. مسیر تجزیه قند ارتباط مستقیمی با تجزیه نشاسته دارد. هر دو این مسیرها در برابر تنش‌های غیر زیستی نقش موثری دارند. همچنین مشخص شد که برخی از ژن‌های زیرشبکه هم‌بیانی 4CL در بیوسنتز روتین نقش دارند. روتین نیز گلیکوزیدی است که به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی در سلامت انسان اهمیت زیادی پیدا کرده است و همچنین در گیاه نیز موجب مقاومت به تنش‌های غیر زیستی می‌شود. این امر نشان دهنده این مسئله است که این ژن‌ها می‌توانند در مسیر بیوسنتز لیگنین فعالیت داشته باشند و علاوه بر آن در مسیرهایی دیگر فواید بیش‌تری به سلول برسانند.

ژن CCR نیز علاوه بر مسیر سنتز لیگنین در مسیر متابولیت‌های ثانویه دخالت دارد و در نهایت این ژن و ژن‌های هم‌بیان با آن می‌توانند در مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش داشته باشند.

بررسی نواحی تنظیمی بالادست شبکه‌های هم‌بیانی مشخص کرد که برخی از فاکتورهای رونویسی TFBS، نظیر TCP، bZIP، در هر دو گیاه مشترک است. برخی از فاکتورهای رونویسی به صورت ویژه تنها در یک گیاه حضور دارند. حضور فاکتورهای رونویسی Alpha-amylase·B3 در گیاه برنج تایید شد. B3 در تنش غیرزیستی نظیر شوری و Alpha-amylase در شکستن خواب بذر دانه‌های برنج نقش موثری دارد. هم‌چنین وجود ۲ فاکتور رونویسی Storekeeper در ژن Os-CCR2 بدون اینکه عملکرد مشخص و شناخته شده‌ای داشته باشند مشخص شد. از این فاکتور رونویسی ۱۳ مورد بدون عملکردناشناخته در گیاهان مختلف گزارش شده است. مارگالها و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند SnRK1 که یک پروتئین کیناز و از خانواده فاکتور رونویسی Storekeeper است فرآیندهموستاز انرژی را در گیاهان تنظیم می‌کند. با انجام این کار، تحمل به شرایط نامساعد محیطی را ارتقا داده و بر تعداد زیادی از فرآیندهای رشد و توسعه تأثیر می‌گذارد. بنابراین می‌توان گفت که این فاکتور رونویسی احتمالاً در مسیر بیوسنتز لیگنین و در مقاومت به تنش‌های محیطی می‌تواند نقش موثری داشته باشد.

طبق یافته‌های حاصل از مطالعات نرم‌افزاری این انتظار وجود داشت که ژن‌هایی که در یک مسیر بیوسنتزی با هم بیان می‌شوند در آزمایشگاه نیز این روند بیان ژن نزدیک به هم باشد. طبق انجام پژوهش آزمایشگاه و انجام بیان ژن 4CL و ژن چالکون سنتتاز به عنوان ژن هم‌بیان با 4CL و Pal، مشخص شد که روند بیان ژن در ساعات مختلف تیمار شوری نزدیک به هم بوده و می‌توان گفت که تقریباً الگوی بیان نزدیک به هم داشته‌اند.

۴-۸ پیشنهادها

- ۱) تکرار مطالعات بر روی گیاهان دیگر و ترجیحاً گیاهانی که از نظر اقتصادی برای کشور حائز اهمیت هستند.
- ۲) در صورت امکان انجام پژوهش‌های نرم‌افزاری بر اساس داده‌های RNA-seq
- ۳) با توجه به روز شدن پایگاه‌های اطلاعاتی، استفاده از پایگاه‌های با نسخه‌های جدیدتر امکانات بهتری را برای درک فرآیندهای درون سلولی فراهم می‌کند.
- ۴) انجام پژوهش‌های آزمایشگاهی در گیاهان مختلف و بررسی روند مقایسه‌ای بیان بین گیاهان
- ۵) بررسی‌های نرم‌افزاری روی ژن‌هایی که از نظر ما عملکرد ناشناخته‌ای داشتند و اطلاعاتی از آن‌ها در دسترس نیست اما می‌توانند نقش مهمی در سلول ایفا کنند.
- ۶) بررسی مطالعات آزمایشگاهی روی ژن‌هایی که بر محتوای لیگنین تاثیر می‌گذارند و برای مهندسی لیگنین حائز اهمیت هستند.
- ۷) شناسایی ژن‌های مقاومت به تنش و انجام آزمایش‌های انتقال ژن برای دستیابی به گیاهان مقاوم و مطلوب

منبع

احمدی، ویدالیننی جعفر و محمد رضا نقوی، ۱۳۹۲، بررسی بیان ژن CAT تحت تنش شوری در سویا با استفاده از Real time PCR، هشتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران و چهارمین همایش ملی امنیت زیستی، تهران، انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، دانشگاه تهران،

بهمنیار، محمدعلی؛ مهدی قاجار سپانلو و فیض ا... عزیز زاد فیروزی، ۱۳۸۴، تأثیر تنش شوری بر رشد، میزان پروتئین و روغن دانه و ترکیب عناصر غذایی در سه رقم سویا، نهمین کنگره علوم خاک ایران، تهران، مرکز تحقیقات حفاظت خاک و آبخیزداری کشور

قربانی پور، علی و مسعود صفررضوی زاده، ۱۳۸۹، ارزیابی ارقام مختلف سویا (*Glycine max L.*) نسبت به تنش شوری در مرحله جوانه زنی، یازدهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات، تهران، دانشگاه شهید بهشتی

محمدعلی پور، زینب و علیرضا باقری، ۱۳۸۹، اثر سالیسیلیک اسید (SA) بر تحمل تنش شوری در گیاه سویا *Glycin Max*، اولین همایش ملی کشاورزی پایدار و تولید محصول سالم، اصفهان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان

میرزایی، سعید و پیتر گرشف، ۱۳۹۳، مطالعه ترانسکریپتوم نوک ریشه موتانت GmCLVATA1A سویا، سیزدهمین همایش علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران و سومین همایش علوم و تکنولوژی بذر ایران، انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران،

میرنظامی ضیابری، ح. ۱۳۸۸. فناوری روغن و پالایش آن. انتشارات علم کشاورزی ایران. ۳۶۲ ص

طایفه نوری، مینو و سجاد سید رحمانی، ۱۳۹۳، بررسی تاثیر تنش شوری بر میزان تجمع پرولین در سه رقم سویا، سیزدهمین همایش علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران و سومین همایش علوم و تکنولوژی بذر ایران، انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران،

Albersheim, P., et al. (2010). Plant cell walls, Garland Science.

Ambavaram, M. M., et al. (2011). "Coordinated activation of cellulose and repression of lignin biosynthesis pathways in rice." Plant Physiology **155**(2): 916-931.

Annis, S. L. and P. H. Goodwin (1997). "Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi." European Journal of Plant Pathology **103**(1): 1-14.

Barros, J., et al. (2015). "The cell biology of lignification in higher plants." Annals of

botany **115**(7): 1053-1074.

Baxter, H. L. and C. N. Stewart Jr (2013). "Effects of altered lignin biosynthesis on phenylpropanoid metabolism and plant stress." Biofuels **4**(6): 635-650.

Bergmann, S., et al. (2003). "Similarities and differences in genome-wide expression data of six organisms." PLoS biology **2**(1): e9.

Boerjan, W., et al. (2003). "Lignin biosynthesis." Annual review of plant biology **54**(1): 519-546.

Bonawitz, N. D., et al. (2014). "Disruption of Mediator rescues the stunted growth of a lignin-deficient Arabidopsis mutant." Nature **509**(7500): 376.

Caño-Delgado, A., et al. (2003). "Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in Arabidopsis thaliana." The Plant Journal **34**(3): 351-362.

Chabannes, M., et al. (2001). "In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels." The Plant Journal **28**(3): 271-282.

Chen, L., et al. (2012). "The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms **1819**(2): 120-128.

Chen, P., et al. (2013). "Physiological mechanisms for high salt tolerance in wild soybean (*Glycine soja*) from yellow river delta, China: photosynthesis, osmotic regulation, ion flux and antioxidant capacity." PloS one **8**(12): e83227.

Chu, S., et al. (2014). "Evolutionary study of the isoflavonoid pathway based on multiple copies analysis in soybean." BMC genetics **15**(1): 76.

Chunthaburee, S., et al. (2016). "Changes in anthocyanin content and expression of anthocyanin synthesis genes in seedlings of black glutinous rice in response to salt stress." Asian J Plant Sci **15**: 56-65.

Curson, A. R., et al. (2017). "Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in marine bacteria and identification of the key gene in this process." Nature microbiology **2**(5): 17009.

Derikvand, M. M., et al. (2008). "Redirection of the phenylpropanoid pathway to feruloyl malate in Arabidopsis mutants deficient for cinnamoyl-CoA reductase 1." Planta **227**(5): 943-956.

Donaldson, L. A. (2001). "Lignification and lignin topochemistry—an ultrastructural view." Phytochemistry **57**(6): 859-873.

Endler, A. and S. Persson (2011). "Cellulose synthases and synthesis in Arabidopsis." Molecular Plant **4**(2): 199-211.

- Espy, M., et al. (2006). "Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing." Clinical microbiology reviews **19**(1): 165-256.
- Eudes, A., et al. (2014). "Lignin bioengineering." Current opinion in biotechnology **26**: 189-198.
- Fan, L., et al. (2006). "Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics." Plant Physiology **140**(2): 603-612.
- Fang, Y., et al. (2008). "Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice." Molecular Genetics and Genomics **280**(6): 547-563.
- Figueiredo, R., et al. (2019). "Suberin and hemicellulose in sugarcane cell wall architecture and crop digestibility: A biotechnological perspective." Food and Energy Security: e00163.
- Fraser, C. M. and C. Chapple (2011). "The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis." The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists **9**.
- Gallego-Giraldo, L., et al. (2011). "Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(51): 20814-20819.
- Gallego-Giraldo, L., et al. (2011). "Selective lignin downregulation leads to constitutive defense response expression in alfalfa (*Medicago sativa* L.)." New Phytologist **190**(3): 627-639.
- George, S., et al. (2010). "A chloroplast-localized and auxin-induced glutathione S-transferase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confer drought tolerance on tobacco." Journal of plant physiology **167**(4): 311-318.
- Guo, H., et al. (2017). "Expression of the MYB transcription factor gene Bpl MYB 46 affects abiotic stress tolerance and secondary cell wall deposition in *Betula platyphylla*." Plant biotechnology journal **15**(1): 107-121.
- Hamann, T. (2012). "Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms." Frontiers in plant science **3**: 77.
- Hématy, K., et al. (2009). "Host-pathogen warfare at the plant cell wall." Current opinion in plant biology **12**(4): 406-413.
- Hemsworth, G. R., et al. (2014). "Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases." Nature chemical biology **10**(2): 122.
- Hoffmann, L., et al. (2004). "Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A

shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis." The Plant Cell **16**(6): 1446-1465.

Hoffmann, L., et al. (2001). "Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase by site-directed mutagenesis." Journal of Biological Chemistry **276**(39): 36831-36838.

Hruz, T., et al. (2008). "Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes." Advances in bioinformatics **2008**.

Hu, D., et al. (2017). "The lignin synthesis related genes and lodging resistance of *Fagopyrum esculentum*." Biologia Plantarum **61**(1): 138-146.

Hu, Y., et al. (2009). "Differential expression of candidate genes for lignin biosynthesis under drought stress in maize leaves." Journal of applied genetics **50**(3): 213-223.

Hückelhoven, R. (2007). "Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility." Annu. Rev. Phytopathol. **45**: 101-127.

Islam, M. T., et al. (2018). "Phytol: A review of biomedical activities." Food and chemical toxicology **121**: 82-94.

Jannoey, P., et al. (2017). "Expression analysis of genes related to rice resistance against brown planthopper, *Nilaparvata lugens*." Rice Science **24**(3): 163-172.

Jian, B., et al. (2008). "Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR." BMC molecular biology **9**(1): 59.

Jones, L., et al. (2001). "Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*." The Plant Journal **26**(2): 205-216.

Joseleau, J.-P. and K. Ruel (1997). "Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes (An investigation by Fourier transform infrared cross-polarization-magic angle spinning ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and immunocytochemical transmission electron microscopy)." Plant Physiology **114**(3): 1123-1133.

Kawasaki, T., et al. (2006). "Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(1): 230-235.

Lee, A. and Y. Deng (2015). "Green polyurethane from lignin and soybean oil through non-isocyanate reactions." European Polymer Journal **63**: 67-73.

Li, H., et al. (2016). "BpMADS12 gene role in lignin biosynthesis of *Betula platyphylla* Suk by transcriptome analysis." Journal of forestry research **27**(5): 1111-1120.

Liljegren, S. J., et al. (2000). "SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*." Nature **404**(6779): 766.

- Lima, L. W., et al. (2018). "Mechanisms of selenium hyperaccumulation in plants: A survey of molecular, biochemical and ecological cues." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1862**(11): 2343-2353.
- Liu, Q., et al. (2018). "Lignins: Biosynthesis and biological functions in plants." International journal of molecular sciences **19**(2): 335.
- Lozovaya, V. V., et al. (2007). "Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase." Planta **225**(3): 665-679.
- Lu, S., et al. (2006). "Distinct roles of cinnamate 4-hydroxylase genes in Populus." Plant and Cell Physiology **47**(7): 905-914.
- Ma, D., et al. (2014). "Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress." Plant Physiology and Biochemistry **80**: 60-66.
- Marco-Ramell, A., et al. (2018). "Evaluation and comparison of bioinformatic tools for the enrichment analysis of metabolomics data." BMC bioinformatics **19**(1): 1.
- Moura-Sobczak, J., et al. (2011). Drought stress and changes in the lignin content and composition in Eucalyptus. BMC proceedings, BioMed Central.
- Neves, G., et al. (2010). "Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean." Journal of Agronomy and Crop Science **196**(6): 467-473.
- Nuhse, T. S. (2012). "Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants." Frontiers in plant science **3**: 280.
- Obayashi, T., et al. (2017). "ATTED-II in 2018: a plant coexpression database based on investigation of the statistical property of the mutual rank index." Plant and Cell Physiology **59**(1): e3-e3.
- Obayashi, T., et al. (2011). "ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants." Plant and Cell Physiology **52**(2): 213-219.
- Obayashi, T., et al. (2014). "ATTED-II in 2014: evaluation of gene coexpression in agriculturally important plants." Plant and Cell Physiology **55**(1): e6-e6.
- Öhman, D., et al. (2013). "MYB 103 is required for FERULATE-5-HYDROXYLASE expression and syringyl lignin biosynthesis in Arabidopsis stems." The Plant Journal **73**(1): 63-76.
- Pan, Q., et al. (2006). "Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants." Plant Science **171**(2): 226-233.

- Pauly, M., et al. (2013). "Hemicellulose biosynthesis." Planta **238**(4): 627-642.
- Pfaffl, M. W., et al. (2002). "Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic acids research **30**(9): e36-e36.
- Piquemal, J., et al. (1998). "Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants." The Plant Journal **13**(1): 71-83.
- Ruprecht, C. and S. Persson (2012). "Co-expression of cell-wall related genes: new tools and insights." Frontiers in plant science **3**: 83.
- Salvador, V. H., et al. (2013). "Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth." PloS one **8**(7): e69105.
- Sattler, S. and D. Funnell-Harris (2013). "Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens?" Frontiers in plant science **4**: 70.
- Scheller, H. V. and P. Ulvskov (2010). "Hemicelluloses." Annual review of plant biology **61**.
- Shadle, G., et al. (2007). "Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality." Phytochemistry **68**(11): 1521-1529.
- Shao, H., et al. (2015). "NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects." Frontiers in plant science **6**: 902.
- Shereen, A. and R. Ansari (2001). "Salt tolerance in soybean (*Glycine max* L.): Effect on growth and water relations." Pak J Biol Sci **4**: 1212-1214.
- Simpson, S. D., et al. (2003). "Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence." The Plant Journal **33**(2): 259-270.
- Sorensen, I., et al. (2010). "How have plant cell walls evolved?" Plant Physiology: pp. 110.154427.
- Stringlis, I. A., et al. (2019). "The Age of Coumarins in Plant–Microbe Interactions." Plant and Cell Physiology.
- Sui, N., et al. (2015). "Identification and transcriptomic profiling of genes involved in increasing sugar content during salt stress in sweet sorghum leaves." BMC genomics **16**(1): 534.
- Terashima, N., et al. (1993). "Comprehensive model of the lignified plant cell wall."

Forage cell wall structure and digestibility(foragecellwalls): 247-270.

Thalman, M. and D. Santelia (2017). "Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress." New Phytologist **214**(3): 943-951.

Trichopoulou, A., et al. (2003). "Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population." New England Journal of Medicine **348**(26): 2599-2608.

Tripathi, S. C., et al. (2003). "Growth and morphology of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) culms and their association with lodging: effects of genotypes, N levels and ethephon." Field crops research **84**(3): 271-290.

Tu, Y., et al. (2010). "Functional analyses of caffeic acid O-methyltransferase and cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*)." The Plant Cell **22**(10): 3357-3373.

Vaaje-Kolstad, G., et al. (2010). "An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides." Science **330**(6001): 219-222.

Vermerris, W., et al. (2010). "Phenotypic plasticity in cell walls of maize brown midrib mutants is limited by lignin composition." Journal of Experimental Botany **61**(9): 2479-2490.

Wang, C., et al. (2017). "Isolation and characterization of a novel chalcone synthase gene family from mulberry." Plant Physiology and Biochemistry **115**: 107-118.

Wei, L., et al. (2017). "Genetic and transcriptomic analyses of lignin-and lodging-related traits in *Brassica napus*." Theoretical and applied genetics **130**(9): 1961-1973.

Wolf, S., et al. (2009). "Homogalacturonan methyl-esterification and plant development." Molecular Plant **2**(5): 851-860.

Yang, L., et al. (2019). "Cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase is involved in seed germination and root growth under salinity in *Arabidopsis*." Frontiers in plant science **10**.

Yang, Q., et al. (2019). "Pathway enrichment analysis approach based on topological structure and updated annotation of pathway." Brief Bioinform **20**(1): 168-177.

Yuan, Y., et al. (2014). "Predicting the function of 4-coumarate: CoA ligase (LJ4CL1) in *Lonicera japonica*." International journal of molecular sciences **15**(2): 2386-2399.

Zhang, C.-H., et al. (2015). "Identification of 4CL genes in desert poplars and their changes in expression in response to salt stress." Genes **6**(3): 901-917.

Zhang, L., et al. (2017). "The tartary buckwheat genome provides insights into rutin biosynthesis and abiotic stress tolerance." Molecular Plant **10**(9): 1224-1237.

Abstract

Lignin is one of the most aromatic biopolymers and forms a major part of the cell wall. Lignin has many roles in plant defense, lignin or lignin-like phenolic compounds often respond quickly to biotic and abiotic stresses. Soil salinity is one of the most important abiotic stress that has adverse effect on crop production and quality and is one of the limiting factors of rice and soybean cultivation worldwide. In this study, bioinformatics tools and microarray data were used to study lignin biosynthesis pathway genes. Some genes involved in lignin biosynthesis pathway are involved in plant resistance to salinity stress. Some lignin biosynthetic pathway genes such as PAL, 4CL, CCR were obtained in soybean (Dicotyledon) and rice (monocotyledon) plants. Coexpression studies of these genes have been conducted to find coexpression genes to the main genes and genes that have unknown function but are likely to be involved in lignin biosynthesis and other pathways. Evaluation of 4CL gene expression and its associate gene, Chalcone synthetase and STR gene as a coexpression with PAL and CCR gene in saline treated two sensitive (L17) and resistant (Williams) cultivars at two levels of 0, 200 mM and 4 time intervals 6, 24, and 48 hours, were performed by q-RT PCR. Gene expression results showed that the 4CL gene in Soybean sensitive cultivar had more expression than the resistant cultivar in the first 6 h and both cultivars had significant expression in 24 h. The expression of the CHs gene was similar to that of 4CL at 24 h and the STR gene increased at all times. Laboratory studies confirmed bioinformatics studies and showed that the Coexpression genes had similar expression profiles. Promoter analysis showed that upstream of these genes there is a binding site for a number of transcription factors involved in the biosynthesis of lignin and phenylpropanoids.

Keywords: Lignin, Salinity, Coexpression Gene, Gene expression



**Shahrood University of
Technology**

Faculty of Agricultural Sciences
M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

Co-expression and evolutionary study of some genes involved in the lignin
biosynthesis pathway
In monocotyledonous and dicotyledonous plants

By: Fatemeh Jafarzadeh Qomi

Supervisor:
Dr. Shahrokh Gharanjik

September 2019

