

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ



دانشکده کشاورزی

رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

**مطالعه بیوانفورماتیکی مسیر بیوسنتز لیگنین در سویا و براکی پودیوم**

نگارنده: سمیرا سادات موسوی فرد

اساتید راهنما

دکتر شاهرخ قرنجیک

دکتر ناصر فرخی

استاد مشاور

دکتر مهدیه پارسائیان

شهریور، ۱۳۹۷

شماره: ۴۰۴

تاریخ: ۱۳۹۷/۷/۱۸

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم سمیرا سادات موسوی فرد با شماره دانشجویی ۹۳۱۶۷۱۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی در کشاورزی تحت عنوان مطالعه بیوانفورماتیکی مسیر بیوستز لیگنین در سویا و براکیپودیوم که در تاریخ ۹۷/۶/۱۸ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

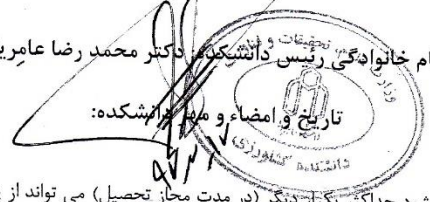
قبول (با امتیاز ..... درجه .....):  مردود

نوع تحقیق: نظری  عملی

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر شاهرخ قرنچیک	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر ناصر فرخی	دانشیار	
۳- استاد مشاور	دکتر مهدیه پارسائیان	استادیار	
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد رضا عامریان	دانشیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر امین ابراهیمی	استادیار	
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر پرویز حیدری	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمد رضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:



تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیرم بہ

مفسر مولا امام زماخ عجل اللہ

## تقدیر و تشکر

خدا را برادر تمام نعمت‌هایم که در زندگی به من ارزانند داشت، شکر میکنم، به ویژه برادر نعمت خانواده، خانواده‌ام پر عاطفه که بستر رنج برادر شد مع بود. قدر رنج مادر و پدر مهربانم هستم که همواره منشا شور و حرکت مع هستند. همچنین شاد و سیاهگزارم به خاطر داشتن برادر و خواهران همراه و حامی که بدون آنها قطعاً شخص جزایع بودم.

همچنین خدا را برادر فراهم کردن زمینه آشنایی با معلمان و اساتید درسوز و مشتاق شکر میکنم، که از کودکی بذر علاقه به علم آموزر را در دل مع کاشتنده و رشد دادند. همواره قدر رنج و سیاهگزار معلمان خود خواهم بود.

لطف خداوند بار دیگر شامل جام شد، تا بتوانم در همکاری با اساتید دانشمند آقاییان دکتر فرض و دکتر قرنچیک و خانم دکتر پارسائیانی پژوهش‌پیشرو را به انجام برسانم. بر خود لازم میدانم، از ایشان که در تمام مراحل کار راهنما مع بودند قدر دانم نمایم. به ویژه آقا دکتر فرض که انجام ایع پایانی نام بدون راهنمایی ایشان امکان پذیر نبود.

## تعهد نامه

اینجانب سمیرا سادات موسوی فرد دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه مطالعه بیوانفورماتیکی مسیر بیوسنتز لیگنین در سویا و براکی پودیوم تحت راهنمایی دکتر شاهرخ قرنچیک و دکتر ناصر فرخی متعهد می شوم .

- 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 می باشد 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 می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آن ها ) 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 می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .

\* متن این صفحه نیز باید در ابتدای نسخه های تکثیر شده پایان نامه وجود داشته باشد .

چکیده:

لیگنین پلیمری فنلی در دیواره‌ی ثانویه گیاهان است که از منظر بیولوژیک و اقتصادی اهمیت فراوانی دارد. از این رو مهندسی لیگنین برای منظور تولید گیاهان متحمل همچنین گیاهان مناسب برای صنایع همواره از اهداف دانشمندان بوده است. با این حال اکثر تلاش‌ها برای مهندسی ژن‌های اصلی دخیل در بیوسنتز لیگنین منجر به بروز فنوتیپ‌های نامطلوبی مثل حساسیت به تنش‌ها و کاهش بیومس شده است. از این جهت یافتن ژن‌های کاندیدای مناسب برای مهندسی لیگنین که بتوانند مقدار و محتوای لیگنین را بدون تاثیرگذاری بر رشد و مقاومت به تنش‌ها کنترل کنند، اهمیت دارد. در این پایان‌نامه با استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی به جستجوی چنین ژن‌هایی در شبکه‌ی هم بیانی ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL)، سینامات ۴- هیدروکسیلاز (C4H) و P- کومارات ۳- هیدروکسیلاز (C3H) دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در براکی پودیوم و سویا پرداخته شده است. برای این منظور ژن‌های هم بیان ژن‌های مورد مطالعه از پایگاه‌های داده‌ی Phytozome و PlaNet بازیابی شد. مطالعات Pathway Enrichment در Phytozome، مطالعه‌ی عملکرد در KEGG، Uniprot و مطالعه‌ی هم تنظیمی در PlantPAN 2.0 انجام شد. در کنار سایر ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین تعداد زیادی ژن با عملکرد ناشناخته در شبکه‌های هم بیانی حضور داشتند. پیش‌بینی می‌شود این ژن‌ها لیگنیفیکاسیون را تحت تاثیر قرار دهند. مطالعات نشان داد که ژن‌های مورد مطالعه در مسیرهای مقابله با تنش‌ها دخالت دارند یا با ژن‌های دخیل در این مسیرها هم بیان هستند. ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی پتانسیل سنتز پلیمرهای دیواره ثانویه (سلولز و زایلان)، شرکت در تنظیم مسیر فنیل پروپانوئید (فاکتورهای نسخه برداری، پروتئین‌های متصل شونده به RNA، پروتئین‌های دخیل در سنتز پیش سازهای مسیر بیوسنتز لیگنین (آمینو اسیدهای آروماتیک)، پروتئین‌های درگیر در انتقال نترات)، تنظیم پلیمریزاسیون لیگنین (همچون فاکتورهای نسخه برداری، اندوگلوکاناز و آسکوربات اکسیدازها و ...) و شرکت در مسیر انتقال سیگنال را دارند. آنالیز توالی بالادست ژن‌های هر شبکه‌ی هم بیانی نشان داد که در بالادست این ژن‌ها جایگاه اتصال برای تعدادی از فاکتورهای نسخه

برداری دخیل در تنظیم مسیر فنیل پروپانوئید و مسیر بیوسنتز لیگنین حضور دارد. آنالیز تکاملی ژن‌های *C3H* و *C4H PAL* بین دو گیاه مورد مطالعه انجام شد و در تمام موارد به غیر از *C3H* در براکی پودیوم بیش از یک ژن آنزیم‌های مورد مطالعه را کد می‌کنند. بررسی نشان داد که احتمالاً خانواده‌ی ژنی *PAL* و *C3H* بعد از اشتقاق گونه‌های دولپه از تک لپه گسترش یافته‌اند. علاوه بر این گسترش خانواده‌ی ژنی *C4H* گیاهان تک لپه، احتمالاً قبل از اشتقاق گونه‌ها صورت گرفته است.

**کلمات کلیدی:** بیوسنتز لیگنین، مسیر فنیل پروپانوئید، فنیل آلانین آمونیاک‌لیاز، سینامات ۴-  
هیدروکسیلاز، P- کومارات ۳-هیدروکسیلاز، ژن‌های هم بیان، ژن‌های هم تنظیم



مقالات:

**The 6 th Conference on Bioinformatics, 13-15 Dec 2016**

- Phylogeny and structural analysis of *Brachypodium distachyon* phenylalanine ammonia-lyase genes
- *Brachypodium distachyon* phenylalanine ammonia lyase gene network prediction towards improving plant tolerance to biotic stress

**The 7 th Conference on Bioinformatics, 3-5 January 2018**

- Comparative coexpressed network study of phenylalanine ammonia-lyase in *brachypodium distachyon* and *glycine max*
- Functional and promoter analysis of conserved gene coexpression network of 4-Coumarate 3-hydroxylase in *Brachypodium distachyon* and *Glycine max*

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۲	۱- مقدمه
۲	۱-۱ دیواره‌ی سلولی
۳	۱-۱-۱ دیواره‌ی اولیه
۴	۱-۱-۲ دیواره‌ی ثانویه
۵	۱-۱-۳ دیواره‌ی سلولی از منظر تکاملی
۶	۲-۱ لیگنین و ساختار آن
۸	۲-۲-۱ بیوسنتز لیگنین
۱۲	۱-۲-۲-۱ سایر آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز لیگنین
۱۳	۱-۱-۲-۲-۱ پروتئین‌های دخیل در پلیمریزاسیون
۱۴	۲-۱-۲-۲-۱ گلیکولیزاسیون و دگلیکولیزاسیون
۱۵	۳-۲-۱ محل سنتز لیگنین
۱۷	۳-۱ حوزه‌های مصرف دیواره‌ی سلولی و نقش لیگنین در اقتصاد
۱۹	۱-۳-۱ دارو و سلامت
۲۰	۲-۳-۱ استفاده از لیگنین در مهندسی نانو
۲۱	۳-۳-۱ خوراک دام
۲۱	۴-۳-۱ استفاده از لیگنین در چاپ سه بعدی
۲۲	۴-۱ لیگنین و سوخت‌های زیستی
۲۴	۵-۱ تاریخچه‌ی مهندسی لیگنین
۲۵	۶-۱ اهداف و ضرورت مطالعه
۲۶	۱-۶-۱ ضرورت مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی

۲۷	۱-۱-۶-۱ آنالیز تکاملی
۲۸	۲-۱-۶-۱ ژن‌های هم بیان
۳۲	۳-۱-۶-۱ آنالیز نواحی بالادست

### فصل دوم مرور منابع

۳۶	۲- مروری بر منابع
۳۸	۱-۲ مروری بر مطالعات تکاملی
۳۹	۲-۲ مروری بر مطالعات هم بیانی و آنالیز پروموتر

### فصل سوم مواد و روش‌ها

۴۶	۳- مواد و روش‌ها
۴۶	۱-۳ شناسایی ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین
۴۸	۲-۳ موقعیت کروموزومی
۴۸	۳-۳ بررسی الگوی اینترون و اگزون
۴۹	۴-۳ بررسی تکاملی و فیلوژنتیکی توالی‌های پروتئینی
۴۹	۵-۳ بررسی وقوع دوبرابردگی ژن‌ها
۴۹	۶-۳ بررسی مکان فعالیت آنزیم‌ها
۵۰	۷-۳ بررسی برهمکنش پروتئین‌های هدف با سایر ترکیبات و پروتئین‌ها
۵۰	۸-۳ بررسی‌های هم بیانی
۵۰	۱-۸-۳ یافتن شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده
۵۱	۲-۸-۳ رسم شبکه‌ی هم بیانی
۵۲	۹-۳ آنالیز توالی بالادست ژن‌های هم بیان

### فصل چهارم نتایج و بحث

۵۴	۴- نتایج و بحث
----	----------------

۵۴	۱-۴ شناسایی ژن‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین
۵۴	۲-۴ مکان قرارگیری ژن‌ها بر روی کروموزوم
۵۵	۴-۳ آنالیزهای تکاملی
۵۵	۱-۳-۴ آنالیز تکاملی PAL
۵۷	۲-۳-۴ آنالیز تکاملی C4H
۵۹	۳-۳-۴ آنالیز تکاملی C3H
۶۰	۴-۴ بررسی مکان فعالیت پروتئین‌ها
۶۱	۵-۴ بررسی برهمکنش‌های آنزیم‌های PAL، C4H و C3H
۶۳	۶-۴ بررسی هم‌بیانی
۶۶	۱-۶-۴ مطالعه‌ی Pathway Enrichment و عملکرد ژن‌های هم‌بیان
۶۶	۱-۱-۶-۴ ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش‌ها
۷۳	۲-۱-۶-۴ ژن‌های دخیل در بیوسنتز سایر پلیمرهای دیواره
۷۴	۳-۱-۶-۴ ژن‌های درگیر در تنظیم مسیر فنیل پروپانوئید
۷۶	۴-۱-۶-۴ ژن‌های با پتانسیل دخالت در پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون لیگنین
۷۸	۵-۱-۶-۴ ژن‌های دخیل در سنتز لیگنان‌ها
۷۹	۶-۱-۶-۴ ژن‌های درگیر در مسیر انتقال سیگنال
۸۱	۷-۱-۶-۴ لیپید ترنسفرازها
۸۱	۲-۶-۴ بررسی اشتراکات بین سه شبکه‌ی هم‌بیانی
۸۳	۷-۴ آنالیز توالی‌های بالادست
۸۷	۸-۴ نتیجه‌گیری کلی
۸۹	۹-۴ پیشنهادات
۹۰	منابع
۱۰۵	پیوست

## فهرست شکل‌ها و جدول‌ها

صفحه	عنوان
۴	شکل (۱-۱) مدل ساده‌ی دیواره‌ی سلولی
۸	شکل (۲-۱) بلوک‌های اصلی سازنده‌ی لیگنین
۹	شکل (۳-۱) مسیر بیوسنتز لیگنین
۱۶	شکل (۴-۱) مکان سنتز مونولیگنول‌ها
۲۱	شکل (۵-۱) : اشیاء سه بعدی ساخته شده از مواد لیگنوسلولزی
۴۷	شکل (۱-۳) نمایی کلی از مراحل انجام پژوهش
۵۶	شکل (۱-۴) درختچه فیلوژنتیکی، توالی‌های آمینو اسیدی PAL
۵۸	شکل (۲-۴) درختچه فیلوژنتیکی C4H
۶۰	شکل (۳-۴) درختچه فیلوژنتیکی برای توالی آمینو اسیدی C3H
۶۴	شکل (۴-۴) شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده PAL بین براکی پودیوم و سویا و اشتراکات بین زیرشبکه‌ها
۶۵	شکل (۵-۴) شبکه‌ی هم بیانی PAL
۶۷	شکل (۶-۴) شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده C4H بین براکی پودیوم و سویا و اشتراکات بین زیرشبکه‌ها
۶۸	شکل (۷-۴) شبکه‌ی هم بیانی C4H
۶۸	شکل (۸-۴) شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده C3H بین براکی پودیوم و سویا و اشتراکات بین زیرشبکه‌ها
۶۹	شکل (۹-۴) شبکه‌ی هم بیانی C3H
۸۲	شکل (۱۰-۴) اشتراکات شبکه‌های هم بیانی PAL، C4H و C3H
۸۵	شکل (۱۱-۴) فراوانی TFBS برای هر TF در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی PAL
۸۶	شکل (۱۲-۴) فراوانی TFBS برای هر TF در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی C4H
۸۷	شکل (۱۳-۴) فراوانی TFBS برای هر TF در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی C3H
۳۱	جدول (۱-۱) مروری بر منابع در دسترس برای آنالیز هم بیانی
۸۲	جدول (۱-۴) اشتراکات سه شبکه‌ی هم بیانی PAL، C4H و C3H در براکی پودیوم و سویا

## جدول اختصارات

---

Phenylalanine ammonia lyase	PAL
Cinnamate 4-hydroxylase or NADPH ;cytochrome P450 oxidoreductase	C4H
Tyrosine ammonia lyase	TAL
4-coumarate-COA ligase	4CL
Hydroxycinnamoyl COA: shiki- mate hydroxycinnamoyl transferase	HCT
<i>P</i> -coumarate 3-hydroxylase	C3H
Caffeoyl COA-3- <i>O</i> -methyltransferase	CCOAMT
Cinnamoyl-COA reductase	CCR
Ferulate 5-hydroxylase	F5H
Caffeic acid/5-hydroxyferulic acid <i>O</i> -methyltransferase	COMT
Peroxidase	PRX
Laccase	LAC

---

فصل اول

مقدمه

## ۱- مقدمه

بیوماس<sup>۱</sup> منبع بزرگی برای صنایع کاغذسازی، تولید سوخت‌های زیستی محسوب می‌گردد (سامریل و همکاران، ۲۰۱۰؛ یانگ و همکاران، ۲۰۱۳)، یکی از اجزا اصلی بیوماس لیگنین می‌باشد. این پلیمر به عنوان عامل محدودکننده‌ی استفاده‌ی موثر از بیوماس مطرح می‌باشد، به همین دلیل همواره تولید گیاهانی با لیگنین قابل هضم تر و محتوای کمتر مورد توجه دانشمندان بوده است (لی و همکاران، ۲۰۱۷). علاوه بر این لیگنین فاکتوری مهم برای مقابله با تنش‌های زنده و غیر زنده محسوب می‌شود و مهندسی آن می‌تواند منجر به تولید گیاهانی مقاوم به تنش‌ها گردد (بهائیان و همکاران، ۲۰۰۹؛ بهاتاکاریا و همکاران، ۲۰۱۰؛ محمودی و همکاران، ۲۰۱۰؛ نوس و همکاران، ۲۰۱۰؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۲). با این حال شناخت محدود بشر از ساختار، بیوسنتز و تنظیم بیوسنتز لیگنین، تولید گیاهان با محتوا و ساختار مورد نظر دانشمندان را با مشکل مواجه کرده است (پن و همکاران، ۲۰۰۶؛ ویناردل و میتاجانز، ۲۰۱۷). شناخت بهتر مسیر بیوسنتز لیگنین نوید بخش استفاده‌ی کارآمد از این پلیمر ارزشمند خواهد بود. امروزه با وجود داده‌های فراوان حاصل از تکنولوژی‌های با سرعت بالا و توالی‌یابی، همچنین با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی به منظور آنالیز این داده‌ها، امکان بررسی و شناخت بهتر مسیرهای متابولیکی مثل مسیر بیوسنتز لیگنین فراهم شده است. در این فصل به مطالعه‌ی دیواره‌ی سلولی، ساختار و مسیر بیوسنتز لیگنین، کاربردها و چالش‌های اقتصادی لیگنین، اهمیت مطالعات بیوانفورماتیکی به ویژه مطالعات هم بیانی در این زمینه پرداخته شده است.

### ۱-۱ دیواره‌ی سلولی

دیواره‌ی سلولی خارجی‌ترین قسمت سلول گیاهی است و بر روی سطح خارجی غشای پلاسمایی قرار دارد. بدون دیواره‌ی سلولی، گیاهان توده‌ای بدون شکل از پروتوپلاسم هستند و بیشتر شبیه لجن خواهند بودند (کاسگرو و همکاران، ۲۰۰۵). دیواره‌های سلولی، پیچیده و متنوع هستند و طی فرآیندهای

---

<sup>۱</sup> معمولاً به قسمت‌های غیر خوراکی گیاهان بیوماس گفته می‌شود.

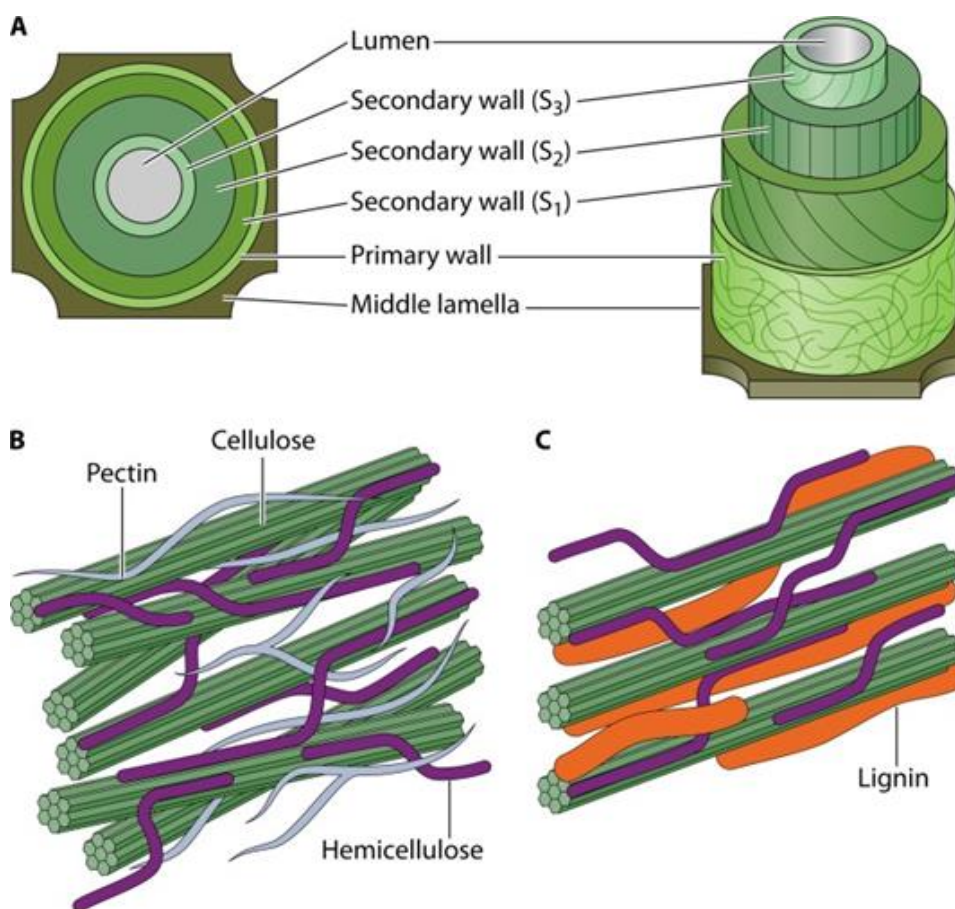


تقسیم سلولی، رشد و تمایز تغییر می‌کنند و اغلب از پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها ساخته شده‌اند. انواع پلی ساکاریدهای به کار رفته در دیواره‌ی سلولی بسته به گیاه، نوع و مکان سلول، مرحله‌ی رشدی و انواع تنش‌هایی که سلول با آن‌ها مواجه می‌شود، می‌تواند متفاوت باشد (دوبلین و همکاران، ۲۰۱۰). دیواره‌ی سلولی نقش‌های متنوعی را در گیاه بر عهده دارد. این دیواره اندازه، شکل و در نهایت مورفولوژی سلول را تعیین می‌کند که نتیجه‌ی آن تشکیل بافت‌ها و اندام‌های مختلف در گیاه است. همچنین دیواره استحکام را برای سلول‌های گیاهی به ارمغان می‌آورد. از آنجایی که دیواره در خارجی‌ترین سطح سلول‌ها قرار دارد، نقش مهمی در برهمکنش سلول و پاتوژن‌ها، مثل پاسخ دفاعی در برابر آن‌ها ایفا می‌کند. تمایل به درک مکانیسم عملکرد دیواره باعث شده که ساختار و بیوسنتز دیواره همواره مورد توجه باشد (گیگسترا و همکاران، ۲۰۱۰).

دیواره‌ی سلولی از سه قسمت دیواره‌ی اولیه، تیغه‌ی میانی و دیواره‌ی ثانویه تشکیل شده است (شکل ۱-۱). دیواره‌ی سلولی اولیه، سلول‌های در حال توسعه‌ی بافت‌های جوان را احاطه می‌کند و با انعطاف-پذیری مناسب خود می‌تواند از نیروی هیدروستاتیک که توسط پروتوپلاست اعمال می‌شود، تاثیر بپذیرد و باعث رشد سلول شود (دوبلین و همکاران، ۲۰۱۰). دیواره‌ی ثانویه برخلاف دیواره‌ی اولیه که در همه‌ی سلول‌ها وجود دارد، بعد از توقف رشد سلول بر اساس نوع و عملکرد سلول ساخته می‌شود (مانوچ و همکاران، ۲۰۱۶). هر گیاه خشکی زی به ساقه مقاوم و بافت آبرسان نیاز دارد. سلول‌ها بعد از تشکیل دیواره‌ی ضخیم ثانویه استحکام کافی را بدست می‌آورند و در عمل آبرسانی یا حمایت ساختاری گیاه نقش ایفا می‌کنند (اسپک و بورگر، ۲۰۱۱؛ کاسگرو، ۲۰۱۲؛ مانوچ و همکاران، ۲۰۱۶).

### ۱-۱-۱ دیواره‌ی اولیه

دیواره‌ی اولیه حاوی شبکه‌ی سلولزی است که در ماتریکس پیچیده‌ای حاوی پلی ساکاریدها قرار گرفته است. حدود ۹۰ درصد از وزن خشک دیواره‌ی اولیه را پلی ساکاریدها تشکیل می‌دهند. این دیواره از



شکل (۱-۱) مدل ساده‌ی دیواره‌ی سلولی. (A) ساختار اصلی شامل لایه‌ی میانی و دیواره‌ی اولیه و ثانویه (B) پلی ساکاریدهای اصلی در دیواره‌ی اولیه (C) پلی ساکاریدهای اصلی و لیگنین موجود در دیواره‌ی ثانویه. لیگنین بین اجزای دیواره‌ی ثانویه اتصالات عرضی ایجاد می‌کند و باعث استحکام بیشتر آن می‌شود (رتیوجا و همکاران، ۲۰۱۴).

سلولز، همی سلولز، مواد پکتیکی و گلیکوپروتئینی تشکیل شده است (و بورتون و همکاران، ۲۰۰۵؛ فرخی و همکاران، ۲۰۰۶؛ رتیوجا و همکاران، ۲۰۱۴).

### ۲-۱-۱ دیواره‌ی ثانویه

ترکیب اصلی دیواره‌ی ثانویه شامل سلولز، پلی ساکاریدهای شبکه (همی سلولزها، زایلان و گلوکومانان) و لیگنین می‌باشد که در برخی از سلول‌های اختصاصی مثل عناصر آوندی، فیبرها و سایر سلول‌های اسکلرانشیمی رسوب می‌کند. حدود ۶۰ درصد از وزن خشک دیواره‌ی سلولی ثانویه از پلی ساکاریدها تشکیل شده است. دیواره‌ی ثانویه به سلول استحکام می‌بخشد و می‌تواند به حمایت مکانیکی و حفاظت

از گیاه منجر شود. وجود دیواره‌ی ثانویه در عناصر آوندی قابلیت انتقال آب را ایجاد می‌کند (ملریویژ و ساندبرگ، ۲۰۰۸؛ دوبلین و همکاران، ۲۰۱۰؛ پتولینو و همکاران، ۲۰۱۲؛ ژونگ و یه، ۲۰۱۴).

ترکیب دیواره‌ی ثانویه در گیاهان مختلف و حتی در سلول‌های مختلف یک گیاه می‌تواند متفاوت باشد. این ترکیب می‌تواند در پاسخ به محرک‌های رشد و محرک‌های محیطی نیز تغییر کند. از آنجایی که دیواره‌ی ثانویه قسمت زیادی از چوب و فیبرها را می‌سازد و استفاده‌های اقتصادی فراوانی دارد، تاکنون مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌ی مکانیزم مولکولی، کنترل ترکیب و بیوسنتز آن انجام شده است (ژونگ و یه، ۲۰۱۴).

### ۱-۱-۳ دیواره‌ی سلولی از منظر تکاملی

دیواره‌ی سلولی گیاهی تنوع قابل توجهی در ساختار مولکولی و ترکیب دارند. در بعضی موارد اهمیت کارکرد یک نوع دیواره‌ی سلولی خاص قابل تشخیص به نظر می‌رسد. به عنوان مثال دیواره‌ی ثانویه اغلب به وسیله‌ی لیگنین مستحکم می‌شود و نقش آن استحکام بخشیدن به ساختار گیاه است. دیواره‌ی لوله‌ی گرده ترکیب خاصی دارد که قابلیت رشد در نوک لوله گرده را ایجاد می‌کند. دیواره سلولی دانه لوبین به طور خاص با گالاکتان به عنوان یک پلی ساکارید ذخیره‌ای ضخیم شده است. با این حال اغلب مکانیزم‌های تکاملی و فشارهای انتخابی که باعث تنوع دیواره‌ی سلولی شده‌اند، مشخص نیستند و روند تکاملی دیواره‌ی سلولی واضح نیست. مجموعه اطلاعات ترانسکریپتومی و ژنومی برای گیاهان سبز متنوعی (کلروفیت‌ها و استرپتوفیت‌ها) در دسترس هستند. به لطف این مجموعه اطلاعات می‌توان با صرف کمترین زمان و هزینه به آنالیز تکاملی پرداخت. چنین مطالعاتی منجر به بهبود درک ما از چگونگی ورود گیاهان به سطح زمین می‌شوند (فانجل و همکاران، ۲۰۱۲).

جلبک‌های *Charophycean* یا (CGA)<sup>۱</sup> گروهی گسترده از جلبک‌های سبز هستند که رابطه‌ی نزدیک-تری با گیاهان خشکی زی دارند. طی دهه‌ی گذشته، مطالعات بر روی دیواره‌ی CGA بینش مهمی در

---

<sup>۱</sup> Charophycean Green Algae

مورد ساختار و تکامل دیواره‌ی سلولی ایجاد کرده است. طبق مطالعات احتمالا CGA ها منشاء اولین گونه‌های گیاهی بوده‌اند که توانستند در سطح خشکی زندگی کنند (پوپر و فرای، ۲۰۰۳؛ دوموزیچ و همکاران، ۲۰۰۷؛ دوموزیچ و همکاران، ۲۰۰۹؛ پوپر و توهی، ۲۰۱۰؛ پوپر و همکاران، ۲۰۱۱؛ سرسن و همکاران ۲۰۱۱). در دیواره‌ی سلولی تاکسون‌هایی که اخیراً از CGA جدا شده‌اند، پلی ساکاریدهایی مثل سلولز، پکتین‌ها، گلوکان‌ها و پلیمرهای همی سلولزی مثل زایلوگلوکان‌ها، مانان‌ها و زایلان‌ها وجود دارد و از این جهت شباهت زیادی به گیاهان خشکی زی دارند. به طور کلی می‌توان گفت که بسیاری از پلی ساکاریدهای مهم دیواره از جلبک‌های CGA منشاء گرفته‌اند (دیوید و همکاران، ۲۰۱۰). طبق مشاهدات ترکیباتی شبیه به لیگنین در دیواره‌ی سلولی جلبک‌های جنس *Coleochaete* وجود دارد (دوموزیچ و همکاران، ۲۰۱۲؛ میکلسن و همکاران، ۲۰۱۴).

## ۱-۲ لیگنین و ساختار آن

لیگنین نیز همانند سلولز و همی سلولز، از ترکیبات اصلی دیواره‌ی ثانویه است (وانگ و همکاران، ۲۰۱۳). سنتز لیگنین تنها در زمان رشد طبیعی و به صورت برنامه‌ریزی شده انجام نمی‌شود، بلکه تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی و اختلال در ساختار دیواره، نیز می‌توانند سنتز لیگنین را القا کنند (سریواستاوا و همکاران، ۲۰۰۷؛ کیم و همکاران، ۲۰۰۸؛ وانهوم و همکاران، ۲۰۱۰).

در اواخر قرن نوزدهم و اوایل قرن بیستم این فرضیه که لیگنین از پلیمریزاسیون کونیفریل الکل مشتق شده مطرح شد. بعد از آن در دهه ۱۹۶۰ میلادی طرح کلی مسیر سنتز کونیفریل الکل و سایر مونولیگنول‌ها پیشنهاد شد (وتن و صدروف، ۱۹۹۵). امروزه می‌دانیم بلوک‌های اصلی سازنده‌ی پلیمر لیگنین گواایاسیل<sup>۱</sup>(G)، سرینگیل<sup>۲</sup>(S) و *p*-هیدروکسی فنیل<sup>۳</sup>(H) به ترتیب از کونیفریل الکل<sup>۴</sup>،

---

<sup>۱</sup> Guaiacyl

<sup>۲</sup> Syringyl

<sup>۳</sup> *p*-Hydroxyl Phenol

<sup>۴</sup> Coniferyl Alcohol

سیناپیل الکل<sup>۱</sup> و *p*-کوماریل الکل<sup>۲</sup> مشتق می‌شوند (بروجان و همکاران، ۲۰۰۳). لیگنین در گیاهان علفی حدود ۲۰ درصد (یون و همکاران، ۲۰۱۵) و در گیاهان چوبی بین ۱۵ تا ۴۰ درصد از دیواره‌ی سلولی ثانویه را تشکیل می‌دهد و منافذ بین پلی‌ساکاریدها را پر می‌کند. پس از پایان فرآیند تمایز سلولی لیگنین شروع به رسوب در دیواره‌ی سلولی می‌کند و دیواره‌ی سلولی را ضخیم‌تر می‌سازد (سارکانن و لودویگ، ۱۹۷۱؛ یون و همکاران، ۲۰۱۵). علاوه بر مقدار لیگنین معمولاً ترکیب لیگنین نیز در خانواده‌های مختلف گیاهی متفاوت می‌باشد. لیگنین در گیاهان چوبی دو لپه و گیاهان علفی تک لپه عمدتاً از واحدهای *G*، *S* و مقدار کمتری از واحدهای *H* تشکیل شده است. در گیاهان علفی نسبت به گیاهان چوبی معمولاً مقدار بیشتری واحد *H* وجود دارد. لیگنین در بازدانگان چوبی بیشتر از واحدهای *G* و مقدار کمتری واحدهای *H* تشکیل می‌شود (پاتیل و همکاران، ۲۰۰۳؛ لو و رالف، ۲۰۰۸؛ هتفیلد و همکاران، ۲۰۰۹). علاوه بر واحدهای معمول سازنده لیگنین در برخی از گیاهان سایر ترکیبات فنولی هم می‌توانند به عنوان مونومرهای لیگنین به کار گرفته شوند به عنوان مثال در گندم واحدهای فلاونوئید تریسین نیز در ساختار لیگنین دیده می‌شود (دل ریو و همکاران، ۲۰۱۲). استحکام دیواره به نسبت سه مونولیگنول اصلی بستگی دارد (وانهوم و همکاران، ۲۰۱۰). مونولیگنول‌های *S*، *G* و *H* تنها در درجه متوکسیلاسیون با یکدیگر تفاوت دارند. مونولیگنول *H* هیچ گروه متوکسی در ساختار خود ندارد. مونولیگنول *G* تنها در کربن ۳، مونولیگنول *S* در هر دو موقعیت کربن ۳ و ۵ متیله می‌باشند (شکل ۲-۱). بعد از قرارگیری مونولیگنول‌ها در ساختار پلیمر لیگنین، تنها کربن‌های ۳ و ۵ قادر به شرکت در اتصالات عرضی با سایر مونومرها در ساختار پلیمر می‌باشند. متوکسیلاسیون در کربن ۳ مونومر *G* لیگنین و کربن ۳ و ۵ مونومر *S* موقعیت ایجاد کراس لینک را بلوکه می‌نماید و به این ترتیب پتانسیل ایجاد کراس لینک توسط مونومرهای موجود در ساختمان لیگنین را کاهش می‌دهد. به همین دلیل نسبت مونومرهای *S* به مونومرهای *G* درجه‌ی تراکم و سختی لیگنین را تعیین کند (وتن و صدروف،

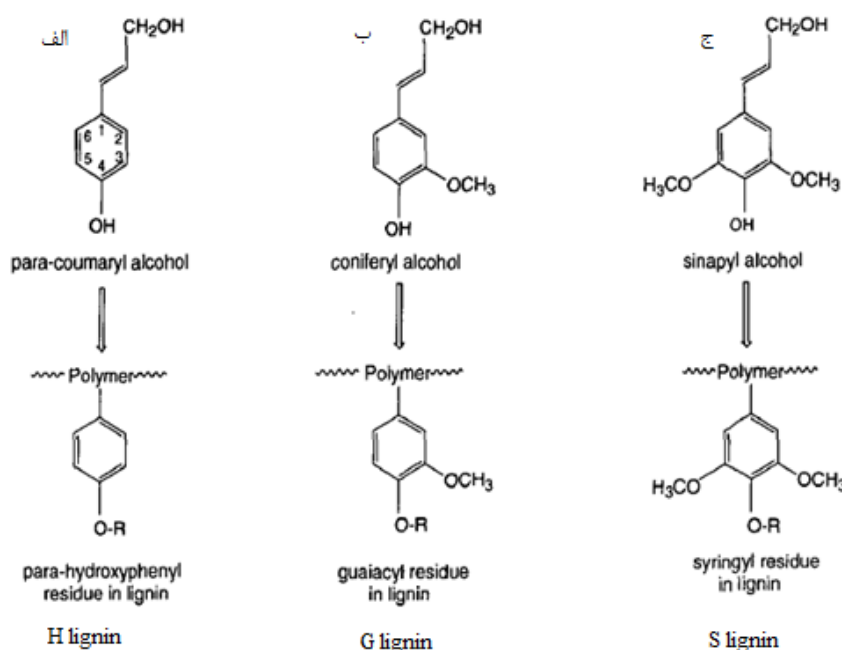
<sup>۱</sup> Sinapyl Alcohol

<sup>۲</sup> *P*-Coumaryl Alcohol

۱۹۵۵ و بیهیا و لویی، ۲۰۱۰ و سینگ، ۲۰۱۳).

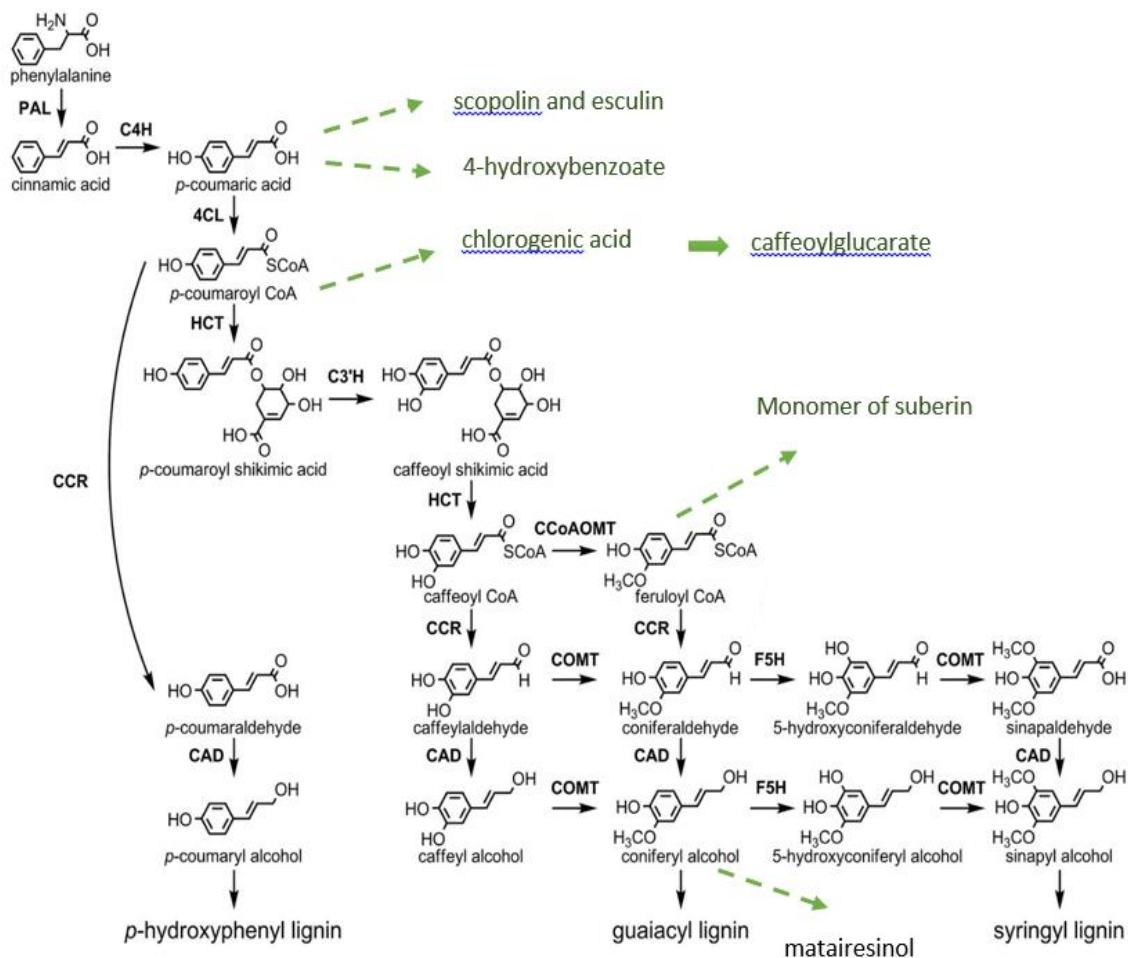
## ۱-۲-۲ بیوسنتز لیگنین

بلوک‌های سازنده‌ی لیگنین از آمینو اسید فنیل آلانین و طی مسیر عمومی فنیل پروپانوئید و مسیرهای اختصاصی مونولیگنول‌ها سنتز می‌شوند (وانهوم و همکاران، ۲۰۱۰، شکل ۱-۳). مسیر فنیل پروپانوئید شامل مسیری منشعب از واکنش‌های شیمیایی پیچیده است که ترکیبات فنلی مهمی شامل بسیاری از متابولیت‌های ثانویه مثل لیگنین، لیگنان<sup>۱</sup>، سالیسیلات، پیگمان‌ها و کومارین‌ها را برای گیاه فراهم می‌کند



شکل (۲-۱) الف) کوماریل الکل طی مسیر بیوسنتز لیگنین، به عنوان پیشساز *p*-هیدروکسی فنیل (H) سنتز می‌شود. این مونولیگنول در ساختار خود گروه متوکسی ندارد. ب) کونفریل الکل سنتز شده در مسیر بیوسنتز لیگنین پیشساز گویاسیل (G)، می‌باشد که دارای یک گروه متوکسی در موقعیت کربن ۳ خود می‌باشد. ج) سیناپیل الکل پیشساز سیرینگیل (S) است که طی مسیر بیوسنتز لیگنین سنتز می‌شود و دارای دو گروه متوکسی در موقعیت کربن ۳ و ۵ می‌باشد. گروه‌های متیل بر روی حلقه‌ی آروماتیک فرصت ایجاد کراس لینک بین مونومرهای سازنده‌ی لیگنین را کم کرده و باعث کم شدن تراکم لیگنین در دیواره‌ی سلولی خواهند شد. گروه R در موقعیت ۴-O می‌تواند یک گروه هیدروکسیل آزاد باشد و یا اینکه با پیوند اتری و یا استری به سایر پلیمرهای دیواره نظیر سلولز متصل شود (وتن و صدروف، ۱۹۵۵).

<sup>۱</sup> لیگنان‌ها از مونولیگنول‌ها یا پیشسازهای آن‌ها ساخته می‌شوند و می‌توانند فرآیندهای دفاعی در برابر پاتوژن‌ها شرکت کنند (هانو و همکاران، ۲۰۰۶)



شکل (۱-۳) مسیر بیوسنتز لیگنین به وسیله‌ی آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، سینامیک اسید ۴-هیدروکسیلاز یا NAPH: اکسیژن اکسیدو ردوکتاز (C4H)، ۴-کومارات: کوآ لیگاز (4CL)، هیدروکسی سینامول کوآ: شیکیمات/کوینات هیدروکسی سینامول ترانسفراز (HCT)، *p*-کومارات ۳-هیدروکسیلاز (C3H)، کافئول کوآ ۳-*O*-متیل ترانسفراز (CCoAOMT)، سینامیل کوآ ردوکتاز (CCR)، فرولات ۵-هیدروکسیلاز (F5H) و کافئیک اسید/۵-هیدروکسی فرولات *O*-متیل ترانسفراز (COMT) کاتالیز می‌شود. در مرحله‌ی آخر مسیر پرکسیدازهای (PRX) متصل به دیواره‌ی سلولی و لاکازها (LAC)، پلیمریزاسیون اکسیداتیو این سه مونومر را به *p*-هیدروکسی فنیل (H)، گویاسیل (G) و سرینگیل (S) را انجام می‌دهند (بروجان و همکاران، ۲۰۰۳؛ ونگ و همکاران، ۲۰۰۸؛ الموگرو و همکاران، ۲۰۰۹). فلش‌های خط چین نشانگر برخی از مشتقات مسیر فنیل پروپانوئید هستند که می‌توانند طی چندین واکنش، ایجاد شوند.

(دیکسون و پایوا، ۱۹۹۵، فراسر و چاپل، ۲۰۱۱). انشعابات مسیر فنیل پروپانوئید به معنای واقعی به هزاران ترکیب متفاوت منجر می‌شوند (وسشار و جنکیس، ۱۹۹۸). متابولیت‌های حاصل از این مسیر در رشد طبیعی و پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده نقش دارند (لی و همکاران، ۱۹۹۵). فنیل آلانین آمونیاک (PAL)، (EC ۴.۳.۱.۲۴) اولین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید است که کاتالیز L- فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید و آمونیاک را بر عهده دارد (شکل پیوست ۱، الف). ترانس سینامیک اسید می‌تواند در مراحل بعدی برای تولید مونولیگنول‌ها استفاده شود. اما از سرنوشت آمونیاک تولیدی در این مرحله اطلاعی در دست نیست. با این حال مقدار نیتروژن از دست رفته طی این واکنش نشان می‌دهد، که احتمالاً آمونیاک در گیاه بازیابی می‌شود (وتن و صدروف، ۱۹۹۵). اثبات شده که در برخی گیاهان PAL می‌تواند از آمینو اسید تیروزین نیز به عنوان سوبسترا استفاده کند (مکدونالد و همکاران، ۲۰۰۷). سینامات که طی این مرحله توسط آنزیم PAL سنتز شد. به وسیله‌ی دومین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید، سینامیک اسید ۴-هیدروکسیلاز یا NAPH: اکسیژن اکسید و ردوکتاز (C4H)، (EC ۱.۱۴.۱۳.۱۱)، به P-کومارات هیدروکسیله می‌شود. C4H اولین آنزیم از سوپر خانواده‌ی سیتوکروم P450 وابسته به اکسیژن‌از در مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد (کاوایی و همکاران، ۱۹۹۶؛ گراوت و همکاران، ۲۰۰۴؛ لو و همکاران، ۲۰۰۶؛ تائو و همکاران، ۲۰۱۵). طی این مرحله P450 یک اتم از مولکول اکسیژن را به ترانس سینامات اضافه می‌کند. اتم دیگر اکسیژن به وسیله NADPH به آب احیاء می‌شود. برای بیشتر P450 های یوکاریوتی NADPH/ سیتوکروم P450 ردوکتاز که یک فلاوپروتئین غشایی است، دو الکترون لازم را از NADPH به P450 انتقال می‌دهد (بولول و همکاران، ۱۹۹۴؛ شکل پیوست ۱، ب). P-کومارات می‌تواند مستقیماً توسط فعالیت تیروزین آمونیاک‌یازی (TAL) نیز سنتز شود (شکل پیوست ۱، ج). در گیاهان علفی آنزیم PAL به دلایل نامشخص می‌تواند فعالیت TAL نیز داشته باشد. به عنوان مثال در گیاه براکی‌پودیوم هشت ژن همولوگ، آنزیم فنیل آلانین آمونیاک‌یاز را کد می‌کنند که از بین آن‌ها محصول یکی از ژن‌ها هر دو فعالیت PAL و TAL را دارد. فعالیت TAL، مسیر فنیل پروپانوئید را بیشتر به سمت سنتز مونولیگنول S پیش می‌برد. احتمالاً علت



وجود مقدار بیشتری مونولیگنول S در دیواره‌ی گیاهان علفی همین فعالیت TAL می‌باشد (باروز و همکاران، ۲۰۱۶). P-کومارات چه در نتیجه فعالیت دو آنزیم PAL و C4H یا از فعالیت مستقیم TAL بدست بیاید، طی مسیر بیوسنتز لیگنین تحت تاثیر آنزیم ۴-کومارات: کوآ لیگاز (4CL)، (۶.۲.۱.۱۲) EC) و با مصرف ATP، به P-کوماریل کوآ تبدیل می‌شود (شکل پیوست ۱، چ)، این واکنش طی دو مرحله انجام می‌گیرد. در مرحله‌ی اول P-کومارات و AMP، کوماریل آدنیلات را تشکیل می‌دهند. هم زمان با آن یک پیروفسفات آزاد می‌شود. در مرحله‌ی بعد گروه کوماریل به گروه سولفیدریل کوآ منتقل می‌شود و به دنبال آن یک AMP نیز آزاد می‌شود (یوان و همکاران، ۲۰۱۴). آنزیم 4CL علاوه بر P-کومارات برخی دیگر از ترکیبات مرتبط مثل کافئیک اسید، فرولیک اسید و سیناپیک اسید را به استرهای کوآ مربوطه تبدیل می‌کنند (لیندرمایل و همکاران، ۲۰۰۲؛ هامبرگر و هالبروک، ۲۰۰۳).

P-کوماریل کوآ در مهم‌ترین نقطه از منشعب شدن مسیر بیوسنتز لیگنین قرار دارد. این ترکیب می‌تواند تحت تاثیر آنزیم‌های مختلف مسیر را در دو زیرشاخه مختلف از مسیر بیوسنتز لیگنین پیش ببرد. این ترکیب یا تحت تاثیر آنزیم‌های سینامیل کوآ ردوکتاز (CCR)، (EC ۱.۲.۱.۴۴) و سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD)، (EC ۱.۱.۱.۱۹۵) قرار گیرد و به این ترتیب مسیر به سمت تولید مونولیگنول H پیش می‌برد (وایمبیک و همکاران ۱۹۷۹؛ لاپر و همکاران، ۱۹۹۹؛ لاورگت و همکاران، ۲۰۰۱؛ بلانکو پورتالز و همکاران، ۲۰۰۲؛ شکل پیوست ۲، الف و ب). یا اینکه طی چند واکنش مسیر را به سمت بیوسنتز کونفرآلدهید را پیش می‌برد، بعد از آن نیز مسیر می‌تواند در دو انشعاب تولید مونولیگنول S یا G ادامه پیدا کند (وت، ۲۰۱۰). بیوسنتز کونفرآلدهید توسط آنزیم‌های هیدروکسی سینامول کوآ: شیکیمات/کوپنات هیدروکسی سینامول ترانسفراز (HCT)، (EC ۲.۳.۱.۱۳۳)، کافئول کوآ ۳-O-متیل ترانسفراز (CCoAOMT)، (EC ۲.۱.۱.۱۰۴) و کومارات ۳-هیدورکسیلاز (C3H)، (EC ۱.۱۴.۱۳.۳۶)، کاتالیز می‌شود. طی این واکنش‌ها HCT، P-کوماریل کوآ را به کافئول کوآ تبدیل می‌کند (هافمن و همکاران، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴؛ سالوادور و همکاران، ۲۰۱۳؛ شکل پیوست ۲، ج). در ادامه آنزیم کافئول کوآ ۳-O-متیل ترانسفراز (CCoAOMT)، (EC ۲.۱.۱.۱۰۴) که به صورت اختصاصی می‌تواند متیلاسیون

۴،۳- دی هیدروکسی را به عنوان سوبسترای تیواستر متصل به کوآ انجام دهد و اولین واکنش *O*-متیل ترانسفرازی را کاتالیز کند، به این ترتیب فرولویل کوآ سنتز می‌شود (هافمن و همکاران، ۲۰۰۱؛ شکل پیوست ۲، ج). سپس آنزیم C3H دومین سیتوکروم P450 دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین، یک اتم از مولکول اکسیژن را به *P*-کومارول شیکیمات منتقل می‌کند و اتم دیگر اکسیژن را به وسیله NADPH به آب احیاء می‌کند (بولول و همکاران، ۱۹۹۴) و به این ترتیب *O*-۵-کافئول شیکیمیک اسید را سنتز می‌کند (شکل پیوست ۲، ح). سپس بار دیگر آنزیم HCT واکنش آسیل ترانسفرازی را کاتالیز می‌کند و این مرتبه طی انتقال گروه آسیل به *O*-۵-کافئول شیکیمیک اسید، کافئول کوآ را تولید می‌کند (شکل پیوست ۳، الف). در مرحله‌ی بعد CCR مجدداً وارد عمل شده و تبدیل فرولویل کوآ به کونفریل آلدئید را کاتالیز می‌کند (شکل پیوست ۳، ب). کونفریل آلدئید می‌تواند محل دوشاخه شدن مجدد مسیر باشد. این ترکیب که یک گروه متیل دارد، می‌تواند تحت اثر آنزیم CAD به کونفریل الکل پیشسازمونولیگنول تبدیل شود (شکل پیوست ۳، ج) و یا اینکه قبل از CAD می‌تواند تحت اثر دو آنزیم فرولات ۵-هیدروکسیلاز (F5H)، (EC ۱.۱۴.-.-) و کافئیک اسید/۵-هیدروکسی فرولات *O*-متیل ترانسفراز (COMT)، (EC ۲.۱.۱.۶۸) به ترتیب موقعیت کربن ۵ در حلقه‌ی آروماتیک هیدروکسیله و متیله شده و به سیناپیل آلدئید تبدیل شود (شکل پیوست ۳، چ و ح). گروه آلدئید سیناپیل آلدئید، تحت اثر آنزیم CAD به گروه الکی تبدیل شود و سیناپیل الکل، پیشسازمونولیگنول S سنتز می‌شود (هاراکاوا، ۲۰۰۵؛ تو و همکاران، ۲۰۱۰؛ شکل پیوست ۳، خ). این پیش سازها در دیواره‌ی سلولی به هم متصل می‌شوند و ساختار پلیمری ناهمگونی را ایجاد می‌کنند (بروجان و همکاران، ۲۰۰۳).

### ۱-۲-۲-۱ سایر آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز لیگنین

علاوه بر آنزیم‌هایی که به صورت مستقیم در سنتز مونولیگنول‌ها شرکت می‌کنند، برخی دیگر از آنزیم‌ها مانند استیل ترانسفرازا<sup>۱</sup> (رالف و همکاران، ۱۹۹۸؛ لو و همکاران، ۲۰۰۵؛ میشل و همکاران، ۲۰۰۷؛ لو

<sup>۱</sup> Acyltransferase

و همکاران، ۲۰۰۸؛ ویدرز و همکاران، ۲۰۱۲؛ دبرا ال و همکاران، ۲۰۱۴؛ پتريک و همکاران، ۲۰۱۴)، اسکوربات اکسیداز<sup>۱</sup> (فلتون و همکاران، ۱۹۹۳)، S-آدنوزیل متیونین سنتتاز<sup>۲</sup> و سایر آنزیم‌های درگیر در متابولیسم متیونین (شن و همکاران، ۲۰۰۲) و گلووتاتیون سنتتاز<sup>۳</sup> (وتن و صدروف، ۱۹۹۵) می‌توانند در سنتز لیگنین نقش موثر داشته باشند و سنتز لیگنین را تنظیم کنند. علاوه بر این آنزیم‌ها، آنزیم‌های دخیل در پلیمریزاسیون، گلیکولیزاسیون و دگلیکولیزاسیون نقش پررنگی در سنتز لیگنین دارند (کاپوتی و همکاران، ۲۰۱۲؛ ژلدنر و همکاران، ۲۰۱۳).

### ۱-۲-۲-۱ پروتئین‌های دخیل در پلیمریزاسیون

لاکازها و پراکسیدازها به ترتیب همراه با اکسیداسیون  $O_2$  و  $H_2O_2$  پلیمریزاسیون لیگنین را در دیواره‌ی سلولی کاتالیز می‌کنند (شکل پیوست ۴). با اینکه هنوز شواهد ژنتیکی در دست نیست، اما احتمالاً  $H_2O_2$  مورد نیاز در این واکنش‌ها از عمل NADPH اکسیداز و یا Germine like protein ها بدست می‌آید (دیویتسون و همکاران، ۲۰۰۶). ژلدنر و همکاران (۲۰۱۳)، مدل جالبی برای لیگنیفیکاسیون نوار کاسپارین در آرابیدوپسیس مطرح کردند. در این مدل پراکسیدازها به عنوان آخرین قطعه‌ی پازل لیگنیفیکاسیون معرفی شده‌اند. آن‌ها نشان دادند، آنزیم پراکسیداز با یک پروتئین CASP<sup>۴</sup> خاصی هم مکان است، که فعالیت آن به صورت غیر مستقیم تحت کنترل عمل NADPH اکسیدازی به نام RBOHF<sup>۵</sup> بود که  $H_2O_2$  را برای پراکسیدازها و به وسیله‌ی عمل یک سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)<sup>۶</sup> ناشناخته فراهم می‌کرد. به این ترتیب پروتئین غشایی CASP قادر است، فعالیت پراکسیدازی را کنترل کند. در نتیجه می‌تواند به عنوان مکانیزمی برای کنترل لیگنیفیکاسیون مطرح باشد (وانگ و همکاران، ۲۰۱۳).

<sup>۱</sup> Ascorbate Oxidase

<sup>۲</sup> S-Adenosylmethionine Synthetase (SAM)

<sup>۳</sup> Glutathione Synthetase

<sup>۴</sup> Casparian Strip Domain Protein

<sup>۵</sup> Respiratory Burst Oxidase Homolog F Protein

<sup>۶</sup> Super Oxide Dismutase Proteins

## ۱-۲-۲-۱-۲ گلیکولیزاسیون و دگلیکولیزاسیون

دسترسی به مونولیگنولها طی فرآیند پلیمریزاسیون لیگنین، از طریق گلیکولیزاسیون و دگلیکولیزاسیون آنها تعیین می‌شود. به همین دلیل ژن‌های دخیل در این واکنش‌ها می‌توانند هدف-های مناسبی برای مهندسی و بهبود بیوماس باشند. به علاوه مکانیزم‌های مشابه‌ای مثل تاثیر در دسترسی به فرولیک و *P*-کوماریلیک اسید برای لیگنین، همی سلولز و پکتین وجود دارد. همینطور اثرگذاری این فرآیندها در اتصالات عرضی، پلی ساکارید- پلی ساکارید در دیواره سلولی بر ضرورت تحقیقات روی گلیکوزیلاسیون و دگلیکوزیلاسیون مونولیگنولها و مولکول‌های فنلی تایید می‌کند. UDP-گلیکوزیل ترانسفرازها (UGTs)<sup>۱</sup> از خانواده‌ی GT1 معمولا در گلیکوزیلاسیون مونولیگنولها شرکت می‌کنند (کاپوتی و همکاران، ۲۰۱۲). بتا گلیکوزیدازها نیز از خانواده‌ی گلیکوزید هیدرولازها در فرآیندهای مهمی مثل لیگنیفیکاسیون نقش دارند (اسکامیلا تراوینو و همکاران، ۲۰۰۶). نقش بتا گلیکوزیدازها در تولید طیف وسیعی از مولکول‌های فعال در تنش‌های زنده در مطالعات زیادی اثبات شده است (موران و همکاران ۲۰۰۸).

اهمیت مطالعه بر روی گلیکولیزاسیون و دگلیکولیزاسیون مونولیگنولها زمانی درک شد که مطالعات فیلوژنیکی افزایش قابل توجهی در تعداد اعضا خانواده‌ی UGT1 از یک خانواده، در جلبک سبز *Chlamydomonas* به ۲۴۳ خانواده در گیاه چوبی صنوبر را نشان داد (کاپوتی و همکاران، ۲۰۱۲). تاکنون نقش کمتر از ۲۰ درصد اعضا خانواده‌ی UGT1 مشخص شده است (یونکورا ساکاکیارا و همکاران، ۲۰۱۲). وانگ و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که گلیکولیزاسیون مونولیگنولها در اندام‌های مختلف مکانیزیم منحصر به خود را دارد. برای یافتن UGT های دخیل در گلیکولیزاسیون مونولیگنولها به مطالعات بیشتری نیاز است (وانگ همکاران، ۲۰۱۳).

---

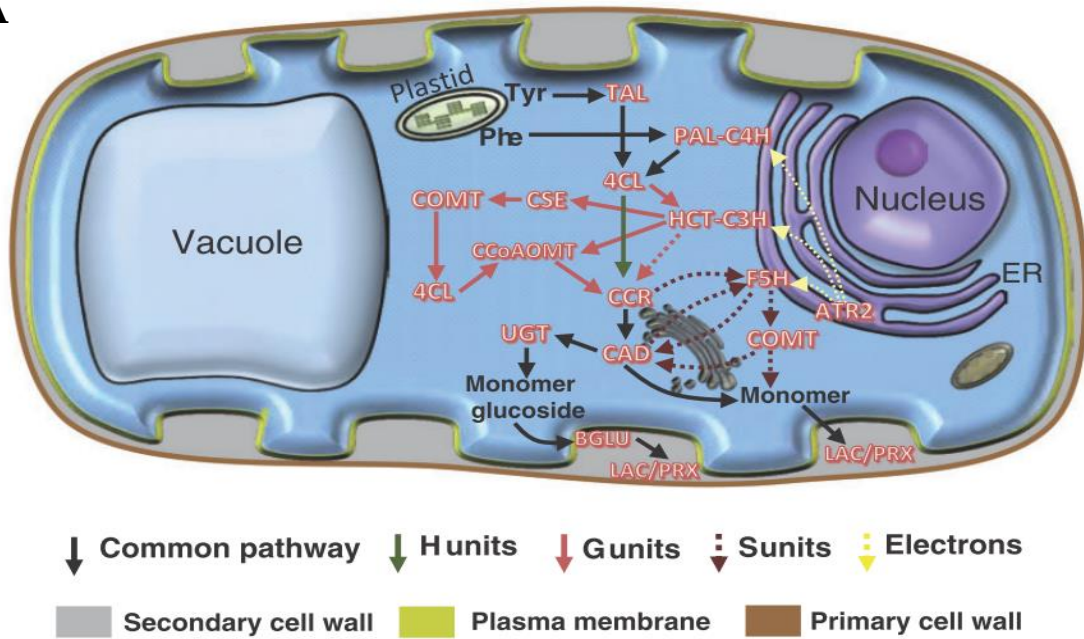
<sup>۱</sup> UDP-Glucuronosyltransferases

## ۱-۲-۳ محل سنتز لیگنین

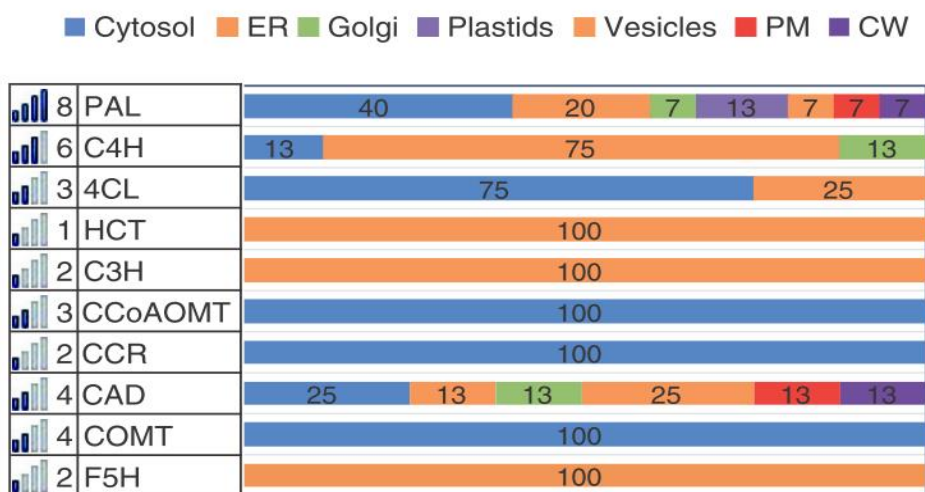
مطالعات نشان داده‌اند، آنزیم‌های شرکت کننده در مسیر بیوسنتز لیگنین در سیتوپلاسم و یا سطح بیرونی غشای شبکه آندوپلاسمایی (ER) فعالیت می‌کنند. سیتوکروم‌های P450، (C4H، C3H و F5H) که مسئول هیدروکسیلاسیون حلقه‌ی آروماتیکی هستند، بر روی سطح خارجی ER قرار گرفته‌اند. در حالی که سایر آنزیم‌های بیوسنتز کننده‌ی مونومرهای لیگنین (PAL، 4CL، CCoAMT، CCR، CAD و COMT) در سیتوپلاسم قرار دارند (شکل ۱-۴). با این حال بین آنزیم‌های سیتوپلاسمی و غشای ER ارتباط وجود دارد. آکونین و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند، آنزیم‌های PAL (سیتوپلاسمی) و C4H (ER) می‌توانند کمپلکس پروتئینی تشکیل دهند. همچنین چن و همکاران (۲۰۱۱) وجود کمپلکس پروتئینی بین تمام سیتوکروم P450 اکسید و ردوکتازهای موجود در غشا ER شامل C4H، C3H و F5H را اثبات کردند. علاوه بر این باسارد و همکاران (۲۰۱۲) وجود ارتباط بین HCT، 4CL و C3H را نشان دادند. پیشساز مونولیگنول‌ها در سیتوپلاسم تولید شده در پلاستیدها قرار می‌گیرند و توسط انتقال دهنده‌های وابسته به ATP مثل ترانسپورترهای ABC<sup>۱</sup> به دیواره منتقل شده و در آنجا پلیمریزه می‌شوند (الهاندرو و همکاران ۲۰۱۲؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۳؛ یون و همکاران ۲۰۱۵). سال‌های متمادی مکانیزم انتقال مونولیگنول‌ها ناشناخته باقی مانده بود و فرضیات متفاوتی در این مورد وجود داشته است (انتشار غیر فعال، اگزوسیتوز، انتقال فعال و ...). مطالعات دقیق بیوشیمیایی اخیر نشان داده است که گلیکولیزاسیون یا عدم گلیکولیزاسیون مونولیگنول‌ها می‌تواند تعیین کند که آن‌ها در وزیکول‌ها ذخیره شوند و در سنتز ترکیباتی چون سوبرین و لیگنان‌ها مورد استفاده قرار گیرند (تیونو و همکاران، ۲۰۱۶)، و یا اینکه به دیواره انتقال پیدا کنند و در بیوسنتز لیگنین شرکت کنند. مطالعات در آراییدوپسیس و صنوبر نشان داده است که انتقال کونیفریل‌الکل‌ها در حالت غیر گلیکوزیده انجام می‌گیرد و این کار بر عهده‌ی وزیکول‌های مشتق از غشا پلاسمایی است. در این حالت کونیفریل‌الکل‌ها ذخیره می‌شوند. اما

<sup>1</sup> ABC-Transporter

A



B



شکل (۱-۴) A) طرح مسیر بیوسنتز مونومرهای لیگنین و انتقال آن‌ها و مکان فعالیت پروتئین‌های درگیر در این مسیر (B) اعداد در ستون اول تعداد مطالعات در مورد هر آنزیم را مشخص می‌کند. در ستون بعدی نام اختصاری آنزیم‌ها آورده شده است. آخرین ستون درصد مطالعاتی که موقعیت آنزیم‌ها در درون سلول شامل: سیتوزول (cytosol)، شبکه‌ی آندوپلاسمی (ER)، ویکول، غشا پلاسمایی (Plasma membrane (PM)) و دیواره‌ی سلولی (Cell wall (CW)) را تایید می‌کند، مشخص شده است (بوروس و همکاران، ۲۰۱۵). در شکل PAL آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا، TAL آنزیم تیروزین آمونیا لیا، C4H آنزیم سینامیک اسید ۴-هیدروکسیلاز یا NAPH: اکسیژن اکسیدو ردوکتاز، 4CL آنزیم ۴-کومارات: کوآ لیگاز، HCT هیدروکسی سینامول کوآ: شیکیمات/کوینات هیدروکسی سینامول ترنس فراز، C3H آنزیم *p*-کومارات ۳-هیدروکسیلاز، CCoAOMT کافئول کوآ ۳-*O*-متیل ترانسفراز، CCR سینامیل کوآ ردوکتاز، F5H فرولات ۵-هیدروکسیلاز و COMT کافئیک اسید/۵-هیدروکسی فرولات *O*-متیل ترانسفراز، PRX پرکسیداز و LAC لاکاز، ATR آنزیم سیتوکروم P450 ردوکتاز<sup>۱</sup>، UGT آنزیم UDP-گلیکوزیل ترانسفراز و BGLU آنزیم بتا گلیکوزیداز را نشان می‌دهد

<sup>1</sup> Cytochrome P450 Reductase

نقل و انتقال کونیفریل الکل در حالت گلیکوزیده شده توسط وزیکول‌های مشتق از تونوپلاست انجام می‌شود. در این حالت کونیفریل الکل‌ها با مصرف ATP و به وسیله‌ی ترانسپورترهای ABC به دیواره سلولی منتقل می‌شوند و در آنجا به لیگنین پلیمریزه می‌شوند. تا امروز ترانسپورترهای ABC اختصاصی برای *P*-کوماریل الکل‌ها در گیاه آرابیدوپسیس کشف شده است (وانهوم و همکاران، ۲۰۱۲). اما ترانسپورتر اختصاصی برای کونیفریل الکل و یا سیناپیل الکل شناسایی نشده است. احتمالاً اختصاصی بودن ترکیب لیگنین در بافت‌های مختلف ناشی از اختصاصیت ترانسپورترهای غشایی ABC باشد (وانگ و همکاران، ۲۰۱۳). در نهایت پس از انتقال پیشسازمونولیگنول‌ها به دیواره، لاکازها و پراکسیدازها به ترتیب همراه با اکسیداسیون  $O_2$ ،  $H_2O_2$  پلیمریزاسیون لیگنین را در دیواره‌ی سلولی انجام می‌دهند (دیویتسون و همکاران، ۲۰۰۶؛ شکل پیوست ۳).

### ۱-۳ حوزه‌های مصرف دیواره‌ی سلولی و نقش لیگنین در اقتصاد

بیوماس لیگنوسلولوزی به عنوان خوراک دام، منبع تامین سلولز برای صنعت کاغذ و خمیر کاغذ و منبعی بزرگ از قندها برای تولید سوخت‌های زیستی است (سامریل و همکاران، ۲۰۱۰؛ یانگ و همکاران، ۲۰۱۳). امروزه زیست پالایشگاه‌ها<sup>۱</sup> در حال ساخت تجهیزات برای تبدیل مواد زیستی از جمله پسماند-های کشاورزی و بیوماس لیگنوسلولوزی به محصولات مختلف مانند مواد غذایی، علوفه، سوخت، مواد شیمیایی و انرژی هستند. بخش بزرگی از بیوماس لیگنوسلولوزی از دیواره‌ی سلولی ثانویه، همراه با پلیمرهای پلی‌ساکاریدی متصل به لیگنین تشکیل شده است (یانگ و همکاران، ۲۰۱۳؛ بالن و همکاران، ۲۰۱۴؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۶). در زیست پالایشگاه‌ها قندها می‌توانند به ترکیبات شیمیایی ارزشمندی تبدیل شوند اما فرآوری لیگنین هنوز چالشی در زیست پالایی محسوب می‌شود (ویناردل و میتاجانز، ۲۰۱۷). امروزه بیشتر لیگنین مورد استفاده در تجارت، بعد از اعمال پیش تیمارهای مختلف

---

<sup>۱</sup> زیست پالایشگاه‌ها مراکزی با هدف بهینه سازی مصرف منابع و به حداقل رساندن ضایعات و در نتیجه سودآوری حداکثری هستند که فرآیندهای تبدیل بیوماس به منظور تولید سوخت، ترکیبات شیمیایی، علوفه، مواد اولیه و انرژی را با تجهیزات لازم برای این کار ادغام می‌کند (گزارش Weforum، ۲۰۱۰).

بر بیوماس لیگنوسلولزی، طی فرآیند پالپ و کاغذسازی، به عنوان محصولی جانبی و ضایعات (کرافت) بدست می‌آید (آیاچی و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین میزان فراوانی لیگنین با قیمت ارزان در دسترس وجود دارد (وانهوم و همکاران، ۲۰۱۲). اما لیگنین پلیمری ناهمگون است و به همین جهت خالص سازی آن دشوار می‌باشد. در بسیاری از موارد لیگنین استخراجی ترکیبی از محصولات با وزن و ویژگی‌های متنوع است. ساختار دقیق لیگنین به علت ماهیت پلیمری پیچیده و اتصالات تصادفی درگیر در سازماندهی ماکرومولکول لیگنین هنوز شناخته شده نیست (ویناردل و میتاجانز، ۲۰۱۷). علاوه بر پیچیدگی‌های حاصل از ماهیت ساختاری لیگنین، پیش تیمارهای متفاوتی که طی فرآیند تبدیل بیوماس بر بیوماس لیگنوسلولزی وارد می‌شود، باعث شده که شناسایی مواد شیمیایی استخراجی از لیگنین، به درک طیف وسیعی از ویژگی‌ها، خواص پلیمریک، اتصالات لیگنین و ویژگی گروه‌های عملکردی آلیفاتیک متصل به حلقه آروماتیک موجود در پلیمر وابسته باشد (پن و همکاران، ۲۰۰۶). وجود چنین پیچیدگی‌هایی در استفاده از لیگنین به عنوان منبع ترکیبات شیمیایی باعث شده که بیشتر لیگنین بدست آمده طی فرآیند پالپ و کاغذسازی به عنوان سوخت و برای تولید انرژی سوزانده شود و درصد کمی از آن در سایر مقاصد تجاری استفاده شود. با این حال تلاش‌های قابل توجهی برای یافتن کاربردهای لیگنین به منظور ساخت محصولات با ارزش افزوده‌ی بالا در حال انجام است (چاکار و همکاران، ۲۰۰۴). به این دلیل، تا به امروز استراتژی‌های متفاوتی همچون دسته بندی لیگنین استخراجی در وزن‌های مولکولی متفاوت اتخاذ شده است (تولدونا و همکاران، ۲۰۱۳). با وجود تمام این پیچیدگی‌ها امروزه از لیگنین در زمینه‌های مختلفی مانند حوزه‌ی دارو و سلامت (بنارت و هتون، ۱۹۷۳؛ برونینگ و هورتن، ۲۰۰۴؛ کسپیل ولالوبوس و همکاران، ۲۰۱۳؛ هاساگوا و همکاران، ۲۰۱۵؛ باپارت و همکاران، ۲۰۱۶)، مهندسی نانو (ریچتر و همکاران، ۲۰۱۶)، چاپ سه بعدی (لی و همکاران، ۲۰۱۶) و خوراک دام (بارهو و همکاران، ۲۰۰۸) سود برده می‌شود.



### ۱-۳-۱ دارو و سلامت

فرآیندهای آنابولیکی و کاتابولیکی ضروری در سلول‌ها به صورت پیوسته رادیکال آزاد تولید می‌کنند. معمولاً این عوامل سمی تحت سیستم‌های کنترل شده از سلول و بافت حذف می‌شوند (دمیتریوس، ۲۰۰۶). با این حال تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد، قرار گرفتن در معرض اکسیدان‌های خارجی و یا شکست مکانیزم‌های دفاعی آنتی اکسیدان‌ها، می‌توانند تنش‌های اکسیداتیو را ایجاد کنند و در نهایت منجر به آسیب DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها شوند (دمیتریوس، ۲۰۰۶؛ آستلی، ۲۰۰۳). در حال حاضر تنظیم وضعیت اکسید و احیاء به کمک رژیم‌ها و ترکیبات غذایی به صورت گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. آنتی اکسیدان‌های موجود در رژیم غذایی، مقاومت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو را افزایش می‌دهند و تاثیر قابل توجهی بر سلامت انسان دارند (باراپات و همکاران، ۲۰۱۵). بررسی‌ها نشان داده‌اند که لیگنین قابلیت بالایی در جهت حذف رادیکال‌های آزاد دارد و در جلوگیری از بیماری‌هایی حاصل از حضور بیش از حد رادیکال‌ها موثر می‌باشد. در نتیجه لیگنین می‌تواند کاندیدای خوبی به عنوان عامل آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان باشد (باراپات و همکاران، ۲۰۱۶). در برخی از انواع لیگنین، رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجود در پلیمر می‌توانند نقش آنتی اکسیدانی ایفا کنند (کوچوا و همکاران، ۲۰۰۵). ترکیب ماکرومولکول لیگنین و ویژگی‌های آن می‌توانند غلظت مونومرهای آنتی اکسیدان موجود در پلیمر لیگنین را مشخص کنند (پن و همکاران، ۲۰۰۳). مطالعات اخیر نشان داده است که منشاء خاصیت آنتی اکسیدانی، مونومرهایی با وزن مولکولی پایین هستند که از واحدهای هیدروکسی سینامیک اسید و گویاسیل مشتق شده‌اند (آزادفر و همکاران، ۲۰۱۵). تا کنون نقش مشتقات لیگنین در کاهش کلسترول سرم خون (بنارت و هتون، ۱۹۷۳)، درمان دیابت (تندیس و همکاران، ۲۰۱۰؛ کسپیل ولالوبوس، همکاران، ۲۰۱۳؛ هاساگوا و همکاران، ۲۰۱۵؛ بین و همکاران، ۲۰۱۴؛ باراپات و همکاران، ۲۰۱۶)، کنترل بروز چاقی، کاهش ریسک ابتلا به برخی از بیماری‌های مزمن مثل مقاومت به انسولین، دیابت نوع دو و بیماری‌های قلبی-عروقی (برونینگ و هورتن، ۲۰۰۴؛ ساتو و همکاران، ۲۰۱۲)

اثبات شده است. همچنین تاثیر ضد ویروسی (HIV، سرخک و هرپس) کمپلکس کربوهیدرات- لیگنین<sup>۱</sup> استخراج شده از گیاهان مختلف و برخی دیگر از مشتقات لیگنین مثل لیگنوسولفونیک اسید گزارش شده است (فارگوس و همکاران، ۱۹۹۶؛ زانگ و همکاران، ۲۰۰۷؛ کریم و همکاران، ۲۰۱۰؛ لی و همکاران، ۲۰۱۱؛ ساکاگامی و همکاران، ۲۰۱۴). به علاوه این ترکیبات همچنین فعالیت ضد UV خوبی از خود نشان داده‌اند. بنابراین می‌توان در لوازم آرایشی بهداشتی مراقبت پوست در برابر آفتاب از آن‌ها استفاده کرد (ساکاگامی و همکاران، ۲۰۱۶).

### ۱-۳-۲ استفاده از لیگنین در مهندسی نانو

مهندسی ترکیبات نانو امکان حل مشکلات در بسیاری از زمینه‌ها مثل از بین بردن آلودگی‌ها از محیط زیست (خین و همکاران، ۲۰۱۲)، بالا بردن کیفیت کشاورزی (دوهان و همکاران، ۲۰۱۷)، سلامت و انتقال دارو در بدن (فرهان و همکاران، ۲۰۱۶؛ جهانگیریان و همکاران، ۲۰۱۷) را فراهم می‌کند. با این حال خطر احتمالی استفاده از نانو ذرات مصنوعی و تاثیرات فعالیت ترکیبات نانو پس از استفاده‌ی آنها<sup>۲</sup>، کاربرد نانو ذرات در مقیاس بالا را محدود کرده است (پیتروسکا و همکاران، ۲۰۰۹). علاوه بر این پتانسیل فعالیت پس از استفاده برخی از نانو ذرات با پایداری احتمالی آن‌ها ترکیب شده و می‌تواند منجر به تاثیرات بلند مدت بر روی محیط زیست شود (ریچتر و همکاران، ۲۰۱۶). نانو ذرات زیست تخریب پذیر، بدست آمده از منابع تجدید پذیر می‌توانند برای انتقال ایمن تر عناصر فعال به شکل مولکولی یا یونی استفاده شوند (اوادا و همکاران، ۲۰۱۵؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۶). لیگنین ترکیبی زیست تخریب پذیر و سازگار با محیط زیست است (توملا و همکاران، ۲۰۰۰)، همچنین اثر سمی برای سلول‌های انسانی ندارد (یوگارتوندو و همکاران، ۲۰۰۸؛ کیان و همکاران، ۲۰۱۵). لیگنین باقی مانده در محیط زیست، پس از استفاده در ترکیبات نانو، تحت تجزیه‌ی میکروبی تبدیل به خاک هموس یا کمپوست طبیعی می‌شود (توملا و همکاران، ۲۰۰۰، باگ و همکاران، ۲۰۱۱). زیست تخریب پذیر بودن، لیگنین را به

<sup>۱</sup> اغلب از هضم بیوماس توسط پلی ساکاریدازها بدست می‌آید (جفریز، ۱۹۹۰).

<sup>۲</sup> Postutilization

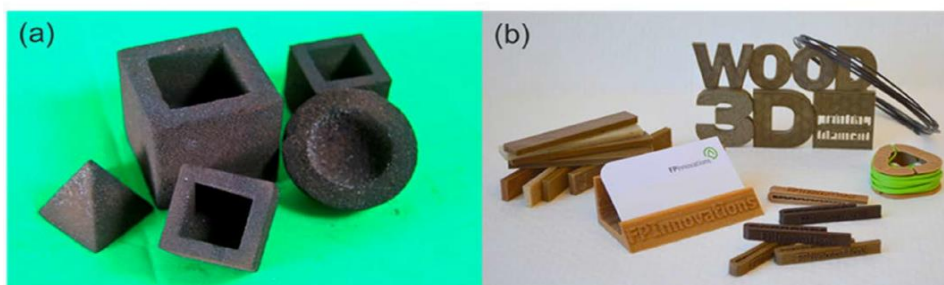
پیش سازی ایده آل برای توسعه ترکیبات در مقیاس نانو و سازگار با محیط زیست تبدیل کرده است (ریچتر و همکاران، ۲۰۱۶).

### ۱-۳-۳ خوراک دام

لیگنین طبیعی موجود در بیوماس با اتصال به سایر پلی ساکاریدهای دیواره قابلیت هضم بیوماس توسط حیوانات نشخوارکننده را کاهش می‌دهد. با این حال لیگنین موجود در کرافت نه تنها قابلیت هضم در احشام را دارد، بلکه با دارا بودن خواص ضد میکروبی می‌تواند به بهبود سلامت دام کمک کند و می‌تواند به عنوان افزودنی به خوراک دام‌ها در نظر گرفته شود (بارهو و همکاران، ۲۰۰۸).

### ۱-۳-۴ استفاده از لیگنین در چاپ سه بعدی

در چاپ سه بعدی، شیئی سه بعدی به کمک روی هم قرار گرفتن لایه لایه مواد تولید می‌شود. می‌توان از این صنعت برای تولید سریع نمونه‌ی اولیه‌ی ایده‌ها استفاده کرد. برای این کار طرح را به کامپیوتر متصل به دستگاه چاپ سه بعدی می‌دهند و دستگاه با توجه به طرح، مدل را به صورت شیئی سه بعدی تحویل می‌دهد. این تکنولوژی برای کاربران بسیار هیجان انگیز است و انقلابی برای تولید مدل‌های سه بعدی ایجاد کرده است. با استفاده از این تکنولوژی برای تولید مدل‌های سه بعدی می‌توان با حذف فرآیند طراحی، چاپ و اتصال جداگانه‌ی قطعات مدل به یکدیگر، در زمان و هزینه صرفه جویی کرد (میشرا، ۲۰۱۴). امروزه در صنایع هوا فضا، خودروسازی و صنایع نظامی سرمایه گذاری‌های کلانی در



شکل (۵-۱): اشیاء سه بعدی ساخته شده از مواد لیگنوسلولوزی در FPIInnovations به وسیله‌ی چاپ سه بعدی با دو تکنولوژی (A) اتصال ذرات<sup>۱</sup> (B) FDM (لی و همکاران، ۲۰۱۶).

<sup>۱</sup> Powder-Binding Technology

زمینه چاپ سه بعدی به منظور ساختن اشیاء با کیفیت بالا و حجم‌های کم و متوسط انجام شده است (لی و همکاران، ۲۰۱۶). از آنجایی که در این تکنولوژی می‌توان از ترکیبات و مواد متنوعی برای ساخت شیء سه بعدی استفاده کرد، تکنولوژی چاپ سه بعدی جای خود را در علوم زیستی مثل مهندسی بافت (سئول و همکاران، ۲۰۱۲؛ مورفی و آتالا، ۲۰۱۴) و پزشکی نیز پیدا کرده است (میشلسکی و روز، ۲۰۱۴). در مهندسی بافت با کمک این تکنولوژی می‌توان داربست و چارچوب سه بعدی را با توجه به فرم بدن بیمار طراحی کرد و برای ساخت بافت‌های زنده مثل استخوان (هینتون و همکاران، ۲۰۱۵)، غضروف گوش (لی و همکاران، ۲۰۱۴)، کبد (لی و همکاران، ۲۰۱۶) و غیره استفاده کرد. تکنولوژی‌های متنوعی در دستگاه‌های چاپ سه بعدی استفاده می‌شود، تکنولوژی که در مهندسی بافت و پزشکی استفاده می‌شود تکنولوژی بایو چاپ نام دارد. مواد مورد استفاده‌ی دستگاه در این موارد بیشتر بیولوژیک مثل سلولز هستند (لی و همکاران، ۲۰۱۶؛ مارتین و همکاران، ۲۰۱۴). در سال‌های اخیر استفاده از مواد لیگنوسلولزی در برخی از تکنولوژی‌های چاپ سه بعدی به صورت قابل توجهی افزایش یافته است و در حال حاضر تقاضا برای جایگزینی ترکیبات دوستدار محیط زیست به جای ترکیبات ترموپلاستیک نفتی وجود دارد از بین مواد زیستی موجود در دسترس بشر، فیبرهای چوبی، ترکیبات زیستی سلولزی و لیگنینی، بیشترین هماهنگی را با تکنیک‌های سه بعدی دارند. سازمان FPInnovations کانادا و دانشگاه Emily Carr انگلیس با همکاری هم بر روی استفاده از پیشساز لیگنین به عنوان ماده مورد استفاده در چاپ سه بعدی پژوهش‌هایی را انجام داده‌اند (لی، همکاران، ۲۰۱۶؛ شکل ۱-۵).

#### ۱-۴ لیگنین و سوخت‌های زیستی

ذخایر فسیلی در دنیا به صورت نامتعادل پراکنده شده‌اند. ۹۸ درصد از نفت جهان توسط ۴۲ کشور، ۲ درصد نیز توسط هفتاد کشور دیگر تولید می‌شود. هفتاد کشور هم از لحاظ ذخایر نفتی فقیر هستند. به همین علت برخی از این کشورها مثل انگولا، اتیوپی و میانمار ۷۰ تا ۹۰ درصد از انرژی مورد نیاز خود را از بیوماس بدست می‌آورند (بیرت و همکاران، ۲۰۱۳؛ حسینی و همکاران، ۲۰۱۳). کشورهای دنیا،

چه کشورهای توسعه یافته و چه کشورهای در حال توسعه صرف نظر از میزان ذخایر فسیلی خود در حال تکاپو به سمت سوخت‌های تجدید پذیر هستند (نصیری، ۱۳۸۷). ایران از نظر حجم ذخایر گاز طبیعی و نفت به ترتیب در جهان رتبه‌ی اول و چهارم را دارد (به ترتیب ۱۸/۲ و ۹/۱ درصد کل ذخایر جهان) (ساتبا). حدود ۹۸ درصد از کل انرژی مصرفی کشور از سوخت‌های فسیلی تامین می‌شود. امروزه مصرف بدون کنترل انرژی‌های فسیلی و آلودگی‌های ناشی از آن و همینطور کاهش ذخایر نفت و گاز به یکی از چالش‌های برنامه‌ریزی کشور تبدیل شده است (قائمی، ۱۳۹۲). علاوه بر این توسعه‌ی مبتنی بر صادرات نفت خام (به صورت مطلق و به تنهایی) مهم‌ترین عامل توسعه‌ی ناپایدار می‌باشد (قائمی، ۱۳۹۲) و اقتصاد ایران نیز به شدت وابسته به نفت خام است و نوسانات قیمت نفت توسعه‌ی ایران را تحت تاثیر قرار می‌دهد (حشمت زاده، ۲۰۰۰). با توجه به این نکات اخیراً دولتمردان استفاده از منابع انرژی پایدار و تجدید پذیر را به عنوان فاکتوری مهم در ترکیب انرژی پذیرفته‌اند (حسینی و همکاران، ۲۰۱۳). بیوماس یکی از اشکال مناسب انرژی‌های تجدید پذیر است. مزیت و وجه تمایز بیوماس نسبت به سایر انرژی‌های تجدید پذیر، تامین انرژی در هر سه شکل الکتریسته، گازی و مایع است (احمدپور، ۱۳۹۳). سلولز موجود در بیومس می‌تواند توسط سلولازها یا اسیدها شکسته شود و مورد تخمیر قرار گیرد (وایمن، ۱۹۹۹؛ پرز و همکاران، ۲۰۰۲). با این حال اتصالات میان سلولز و لیگنین در دیواره (پرز و همکاران، ۲۰۰۲) باعث افزایش قیمت تولید سوخت از سلولز می‌شود. زیرا قبل از تولید سوخت از سلولز، لیگنین باید از بیوماس حذف شود (بانرجی و همکاران، ۲۰۱۲). در واقع لیگنین به عنوان عاملی محدود کننده در تولید سوخت‌های زیستی از بیومس مطرح می‌باشد (ایکیوتن و همکاران، ۲۰۱۰؛ وانهوم و همکاران، ۲۰۱۰؛ والکر و همکاران، ۲۰۱۵؛ شکل ۱-۱). حذف لیگنین از دیواره سلولی فرایندی پر هزینه است (وانهوم و همکاران، ۲۰۱۰). از طرفی مهندسی لیگنین به منظور بهبود محتوای لیگنین در گیاهان چوبی و محصولات کشاورزی همیشه هدف و چالش بوده است، زیرا با کاهش شدید لیگنین بافت آوندی نیز دچار نقص می‌شود، در نتیجه عمل آبرسانی و تغذیه‌ی گیاه مختل می‌شود و بیوماس لیگنوسلولزی کاهش می‌یابد (وانگ و همکاران، ۲۰۱۳).

## ۱-۵ تاریخچه‌ی مهندسی لیگنین

با استفاده از مهندسی ژنتیک می‌توان مقدار، ترکیب و ساختار لیگنین را تغییر داد. در دو دهه‌ی اخیر تلاش‌های زیادی برای تغییر مقدار و ترکیب لیگنین صورت گرفته است (لیو و همکاران، ۲۰۱۸). به عنوان مثال هانگ و همکاران (۲۰۱۰) در چهار ژن کد کننده‌ی *PAL* آراییدوپسیس به صورت همزمان جهش ایجاد کردند. این جهش‌ها مقدار لیگنین را ۲۰ تا ۲۵ برابر نسبت به فنوتیپ وحشی کاهش داد و منجر به افزایش حساسیت به پاتوژن‌ها شد. گوی و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده کردند که با مهار ژن *4CL3* محتوای لیگنین کاهش می‌یابد، با این حال همزمان ارتفاع برنج نیز به طور قابل توجهی کاهش یافت. واگر و همکاران (۲۰۰۲) نیز فنوتیپ اخیر را هنگام کاهش سطح mRNA ژن *4CL* در کاج مونتری<sup>۱</sup> مشاهده کردند. چا و همکاران (۲۰۱۴؛ ۲۰۱۵) مشاهده کردند که افزایش بیان *C3H* موجب افزایش رسوب لیگنین و کاهش بیان آن موجب کاهش رسوب آن در بافت آوندی می‌شود و بر روی ضخامت ساقه تاثیر می‌گذارد. همزمان با این فنوتیپ‌ها رشد گیاه نیز تحت تاثیر قرار می‌گرفت. علاوه بر این، مطالعات شیلیمیلر و همکاران (۲۰۰۹) کاهش مقدار لیگنین و همزمان کاهش رشد گیاه را در موتانت‌های *C4H* نشان می‌دهد. اگرچه تغییر محتوای لیگنین اغلب به صورت افزایش محتوا می‌تواند موجب افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌های زنده و غیر زنده شود (بهائیان و همکاران، ۲۰۰۹؛ بهاتاکاریا و همکاران، ۲۰۱۰؛ محمودی و همکاران، ۲۰۱۰؛ نوس و همکاران، ۲۰۱۰؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۲). با این حال از لحاظ تاریخچه، در اکثر موارد هدف از مهندسی لیگنین کاهش محتوا یا تغییر ساختار و ترکیب آن به منظور به حداقل رساندن اثر منفی لیگنین بر روی هیدرولیز پلی‌ساکاریدهای دیواره (لی و همکاران، ۲۰۱۷) و به این ترتیب افزایش تولید پالپ، افزایش بازده تولید سوخت‌های زیستی و قابلیت هضم بیوماس برای چهارپایان متمرکز بوده است. تاکنون تلاش‌های بسیاری برای کاهش میزان محتوای لیگنین باعث کاهش شدید بازده بیوماس به ویژه در گیاهان دولپه شده است و تعداد کمی از تلاش‌ها

---

<sup>1</sup> *Pinus Radiata*

منجر به کاهش قابل توجه در میزان لیگنین گیاه شده‌اند (فرانک و همکاران، ۲۰۰۲؛ شادل و همکاران، ۲۰۰۷؛ والکر و همکاران، ۲۰۱۰؛ یانگ و همکاران، ۲۰۱۳).

## ۱-۶ اهداف و ضرورت مطالعه

همانطور که پیش‌تر اشاره شد، بسیاری از تلاش‌ها به منظور مهندسی لیگنین ناکام مانده‌اند و دستکاری ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین منجر به گیاهانی با رشد غیر طبیعی، نقص در بافت آوندی و کاهش بیوماس شده‌اند. از طرفی همانطور که پیش‌تر اشاره شد، مسیر بیوسنتز لیگنین انشعابی از مسیر فنیل پروپانوئید است. مسیر فنیل پروپانوئید منبع بسیاری از متابولیت‌ها می‌باشد، که در رشد طبیعی و در بسیاری از اعمال ضروری گیاه دخالت دارند. تغییر بیان هر یک از ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین می‌تواند در سنتز سایر متابولیت‌های مسیر فنیل پروپانوئید نیز تاثیر گذار باشد و باعث اختلال در رشد طبیعی گیاه شود. تمام این موارد نشان می‌دهند که شناخت ما از مسیر بیوسنتز لیگنین کامل نیست. به همین جهت نیاز به درک و شناخت بیشتر از ژن‌های موثر در مسیر بیوسنتز لیگنین و ارتباط آن با سایر مسیرهای متابولیکی ضروری است. با توجه به اینکه گیاهان مکانیزم آنزیمی لازم برای به چرخه در آوردن لیگنین را ندارند. لیگنین تولیدی همیشه به دیواره‌ی سلولی متصل می‌ماند. غیر برگشت پذیر بودن لیگنیفیکاسیون نیاز به تنظیم شدید آن را تایید می‌کند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۳). برای درک بهتر از مسیر بیوسنتز لیگنین نیاز به شناخت مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن‌های درگیر در آن نیز وجود دارد (والکر و همکاران، ۲۰۱۵). با این حال دانش ما در حوزه‌ی تنظیم رونویسی و پس از رونویسی مسیر بیوسنتز لیگنین کامل نیست (یانگ و همکاران ۲۰۱۳). از همین جهت در این پروژه به کمک ابزارهای بیوانفورماتیک به جستجوی ژن‌های جدید فعال در مسیر بیوسنتز لیگنین و ارتباط آن‌ها با سایر مسیرهای متابولیکی و ژن‌های عملکردی پرداخته می‌شود و در نهایت عناصر تنظیمی سیس در توالی بالادست این ژنها پرداخته شد.

تاکنون اکثر مطالعات مهندسی لیگنین در گیاهان دولپه‌ای مدلی چون آراییدوپسیس و صنوبر انجام شده است و اطلاعات کمی از مهندسی لیگنین در گیاهان علفی تک لپه در دسترس می‌باشد (تاکیدا و همکاران، ۲۰۱۷). این در حالی است که خانواده‌ی گیاهان علفی تک لپه شامل محصولات غذایی مهمی مانند برنج، ذرت، گندم، سورگوم و نیشکر می‌باشد. شناخت بهتر مسیر بیوسنتز لیگنین در این گیاهان می‌تواند به تولید گیاهان مقاوم در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده منجر شود. علاوه بر این سالانه مقدار زیادی بیوماس به عنوان پسماند کشاورزی از این گیاهان تولید می‌شود. این خانواده همچنین شامل طیف وسیعی از محصولات با محتوا بالای بیوماس مانند سویچ گراس، ارینتوس، بامبو و میسکانتوس می‌باشد، که می‌توان آن‌ها را به عنوان منابع جدید بیوماس مطرح کرد (یامامورا و همکاران، ۲۰۱۳؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۵). به همین علت در این پژوهش علاوه بر مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی مسیر بیوسنتز لیگنین در گیاه سویا (*Glycine max*) که گیاهی مدل و دولپه است، به مطالعه‌ی گیاه براکی پودیوم (*Brachypodium distachyon*) نیز پرداخته شد. براکی پودیوم گیاهی مدل و تک لپه است که خویشاوندی نزدیکی با گیاهان مهمی همچون برنج، گندم، جو و چاودار دارد (وین و همکاران، ۲۰۱۱).

### ۱-۶-۱ ضرورت مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی

محققان به وسیله‌ی تکنولوژی‌های با سرعت بالا<sup>۱</sup> و توالی یابی نسل جدید<sup>۲</sup> داده‌های فراوانی را تولید کرده‌اند. این داده‌های ژنومی امیدهای جدیدی را برای یافتن ارتباط عملکردی ماکرومولکول‌های زیستی ایجاد کرده‌اند، که به منظور مدیریت و استفاده از این داده‌ها متدهای جدیدی در قالب علم بیوانفورماتیک ایجاد شده است. پژوهشگران می‌توانند با استفاده از بیوانفورماتیک به برنامه ریزی دقیق‌تری برای انجام

---

<sup>۱</sup> High Throughput

<sup>۲</sup> Next Generation



پروژه‌های خود پردازند و به این نحو در زمان و هزینه‌ها صرفه جویی کنند. (کنت و همکاران، ۲۰۰۲؛ اسبونر و همکاران، ۲۰۱۱).

### ۱-۶-۱ آنالیز تکاملی

همانطور که پیش‌تر اشاره شد، اغلب مکانیزم‌های تکاملی و فشارهای انتخابی که باعث تنوع دیواره‌ی سلولی شده‌اند ناشناخته باقی مانده‌اند و روند تکاملی دیواره‌ی سلولی واضح نیست. بیوانفورماتیک با داده‌های فراوان ژنومی، روشی آسان و کم هزینه برای مقایسه تکاملی فراهم کرده است (فانجل و همکاران، ۲۰۱۲). در این پایان نامه آنالیز تکاملی و توالی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در دو گیاه سویا و براکی‌پودیوم انجام شد. علاوه بر این نقش دوبرابر شدگی<sup>۱</sup> در تولید ژن‌های همولوگ مورد بررسی قرار گرفت.

رسم درخت فیلوژنتیکی روشی برای بررسی رابطه‌ی تکاملی بین ژن‌ها و پروتئین‌ها است. با توجه به نمونه‌ی ژنی و هدف محقق، الگوریتم‌های متفاوتی برای رسم درخت فیلوژنتیکی وجود دارد. در این پروژه، پروتئین‌های دو گیاه دارای فاصله‌ی تکاملی بررسی می‌شود. با این حال در برخی موارد محصول پروتئینی این ژن‌ها مشابهت زیادی با هم دارند. در چنین مواردی الگوریتم Maximum Likelihood (ML) می‌تواند الگوریتم مناسبی برای رسم درخت باشد. اما سایر الگوریتم‌ها هر کدام معایبی دارند که باعث می‌شود در چنین مواردی از آن‌ها چشم‌پوشی کنیم، به عنوان مثال در رسم درخت به وسیله‌ی الگوریتم NJ Neighbor Joining در قدم اول اگر بیش از دو توالی با رابطه‌ی تکاملی یکسان یا نزدیک وجود داشته باشد، نرم افزار دو توالی را به تصادف انتخاب می‌کند و در گام‌های بعد سایر توالی‌ها را بررسی می‌کند. درخت بدست آمده در این شرایط بهینه نیست و دقت کافی ندارد. در الگوریتم Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean (UPGMA) درخت بر اساس این فرض رسم می‌شود که نرخ تکاملی در تمام تاکسون‌ها یکسان است، این فرضیه در غالب موارد درست نیست

---

<sup>1</sup> Duplication

و در نتیجه درخت قابل اعتماد نمی‌باشد. برخلاف دو مورد قبل الگوریتم Maximum Evolution (ME) از دقت خوبی برخوردار است، با این حال در گره‌های داخلی درخت نمی‌توان توالی اجدادی را مشخص کرد. این ضعف در الگوریتم‌های ML و Maximum Parsimony (MP) برطرف شده است. با این حال زمانی که فاصله‌ی تکاملی داده‌ها زیاد باشد، الگوریتم MP درست عمل نمی‌کند. در واقع این الگوریتم نسبت به Long-Branch Attraction<sup>۱</sup> حساس می‌باشد. به همین علت درخت بدست آمده در این شرایط قابل اطمینان نیست. این الگوریتم نقطه ضعف دیگری نیز دارد، الگوریتم MP از تمام طول توالی برای رسم درخت استفاده نمی‌کند. این مشکل‌ها در الگوریتم ML حل شده‌اند، یعنی این الگوریتم نسبت به Long-Branch Attraction حساس نیست و از همه‌ی طول توالی برای رسم درخت استفاده می‌کند. از طرفی در این الگوریتم از روش‌های آماری موجه استفاده می‌شود، که باعث شده از لحاظ ریاضی دقیق‌تر از سایر روش‌ها باشد. به هر حال این الگوریتم نیز بدون اشکال نیست به عنوان مثال زمانی که تعداد تاکسون‌ها زیاد باشد این الگوریتم قابل استفاده نمی‌باشد (شونگ، ۲۰۰۶).

#### ۱-۶-۱-۲ ژن‌های هم بیان

تکنیک میکروآرای به عنوان یکی از تکنیک‌های با سرعت بالا، اطلاعات بیانی فراوانی را فراهم می‌آورد و به این ترتیب امکان مطالعه‌ی شبکه‌های هم بیانی ژن‌ها را ایجاد می‌کند. ژن‌های هم بیان، ژن‌هایی هستند که پروفایل بیانی مشابه دارند. شبکه‌های هم بیانی منعکس کننده‌ی برهمکنش‌ها و ارتباطات عملکردی ژن‌ها هستند و ابزاری قوی برای درک جامع از وقایع بیولوژیکی به شمار می‌روند. به کمک این ابزار می‌توان به کشف ژن‌های جدید دخیل در وقایع بیولوژیکی پرداخت (آیه و همکاران، ۲۰۱۱). به عبارتی مطالعه ژن‌های هم بیان ابزار مهمی به منظور یافتن توضیحی برای مکانیزم‌های مولکولی و عملکردی درون سلول می‌باشند (چن و همکاران، ۲۰۰۱؛ امام جمعه و همکاران، ۲۰۱۵) و با کمک این ابزار می‌توان به برهمکنش بین پروتئین‌های مختلف طی مسیرهای متابولیکی پی برد (برین لوت و

---

<sup>۱</sup> خطایی سیستماتیک که باعث می‌شود دودمان‌های دور نزدیک تلقی شوند.

همکاران، ۲۰۱۰). در یک مسیر بیولوژیک مجموعه‌ای از مولفه‌های مولکولی (مثل ژن‌ها) فعالیت می‌کنند، که اغلب با یکدیگر برهمکنش دارند. درک ما از مسیرهای بیولوژیک با ابهام و نقص‌هایی همراه است. به عنوان مثال برخی از ژن‌ها و یا چگونگی برهمکنش این ژن‌ها و محصولات آن‌ها در پیشبرد مسیرهای متابولیک ناشناخته می‌باشند. اگرچه بشر در مورد برخی از مسیرهای بیولوژیکی بینش مناسبی دارد، اما همه‌ی ژن‌هایی که در این مسیرها فعالیت می‌کنند شناخته شده نیستند. امروزه حتی در گیاهان مدلی چون آرابیدوپسیس و برنج نیز عملکرد بسیاری از ژن‌ها هنوز اثبات نشده است (ری و موتول، ۲۰۱۴). با پیشرفت در رویکردهای محاسباتی و روش‌های آماری قوی همراه با دسترسی روز افزون به مجموعه داده‌های ترانسکریپتومیکس زمینه‌ای عالی برای کشف ژن در مسیرهای متابولیکی ناشناخته یا کم‌تر شناخته شده فراهم شده است. با توجه به این فرض که ژن‌هایی که در یک فرآیند بیولوژیکی مشابه فعالیت می‌کنند، الگوی بیانی مشابهی دارند، بررسی ژن‌های هم بیان یکی از گسترده‌ترین روش‌های مورد استفاده برای کشف ژن‌های عملکردی و تنظیمی برای رسیدن به اشراف نزدیک به واقعیت مسیرهای متابولیکی است. علاوه بر این آنالیز ژن‌های هم بیان قابل تعمیم به اطلاعات یافت شده از گیاهان مدل به گیاهان غیر مدل را می‌دهد (استوار و همکاران، ۲۰۰۳؛ یوسادل و همکاران، ۲۰۰۹؛ هیندریک و واندپول، ۲۰۱۲؛ تیزفادیا و همکاران، ۲۰۱۲؛ موحدی و همکاران، ۲۰۱۲؛ اتکین و همکاران، ۲۰۱۳؛ امار و همکاران، ۲۰۱۴؛ ری و موتول، ۲۰۱۴).

امروزه پایگاه‌های داده‌ی فراوانی برای استخراج داده‌های هم بیانی جانداران مدل وجود دارد (سو و همکاران، ۲۰۰۲؛ اوبایاشی و همکاران، ۲۰۰۹؛ جدول ۱-۱). در این پایگاه‌های داده، ژن‌های هم بیان با استفاده از سیستم Affymetrix GeneChip محاسبه می‌شوند. بیشتر سیستم‌های Affymetrix در پایگاه‌های داده‌ی اولیه مثل GEO (بارت و همکاران، ۲۰۰۷)، TAIR (سواربرک و همکاران، ۲۰۰۸) و NASCArray (کریجون و همکاران، ۲۰۰۴) ذخیره شده‌اند (اوبایاشی و کیوشیتا، ۲۰۰۹). برای محاسبه‌ی هم بیانی ژن‌ها بعد از انتخاب نمونه‌های مورد نظر از میکروارگانیزم و نرمال سازی داده‌ها، آخرین مرحله محاسبه‌ی هم بیانی بین ژن‌ها است. دو روش معمول در اندازه‌گیری تشابه

داده‌های بیان ژن، Euclidean Distance و ضریب همبستگی پیرسون<sup>۱</sup> می‌باشد (موحدی و همکاران، ۲۰۱۲).

روش‌های متفاوتی برای آنالیز داده‌های بیانی بدست آمده از میکروآرای و ژن‌های هم بیان وجود دارد (رداتز و همکاران، ۲۰۱۷). یکی از این روش‌ها یافتن شبکه‌های هم بیانی حفاظت شده است. ژن‌های اورتولوگ موجود در شبکه‌های هم بیانی دو یا چند گیاه را شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده گویند (نتوتیا و همکاران، ۲۰۱۴؛ تیزفادیا و همکاران، ۲۰۱۶). پیش بینی می‌شود که ژن‌های اورتولوگ موجود در شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده در دو گونه عملکرد مشابهی داشته باشند. وجود ژن‌های اورتولوگ بین دو گونه و در شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده می‌تواند تاییدی بر عملکرد مرتبط، ژن‌های هم بیان در مسیر متابولیکی باشد و این پیش بینی که تنظیم بیانی مشابهی<sup>۲</sup> برای ژن‌های هم بیان وجود دارد، می‌تواند زمینه‌ی درک بهتر تنظیم بیان ژن‌های دخیل در یک مسیر متابولیکی را میسر کند (نتوتیا و همکاران، ۲۰۱۴؛ تیزفادیا و همکاران، ۲۰۱۶). تاکنون گزارش‌های بسیاری از کشف ژن‌های عملکردی یا تنظیمی با استفاده از تجزیه و تحلیل هم بیانی در یک گونه گیاه منفرد ارائه شده است. اما پیدا کردن الگوهای هم بیانی حفاظت شده بین ژن‌های اورتولوگ در گونه‌های نزدیک گیاهی می‌تواند لیست ژن‌های کاندیدا (با عملکرد مشابه و فعال در مسیرهای متابولیکی مشابه) با ارتباط قوی را در اختیار بگذارد (هیرای و همکاران، ۲۰۰۵؛ اوبایاشی و همکاران، ۲۰۰۷؛ اوسادل و همکاران، ۲۰۰۹؛ موتول و همکاران، ۲۰۱۰؛ موتول و همکاران، ۲۰۱۱؛ موحدی و همکاران، ۲۰۱۲؛ هانسن و همکاران، ۲۰۱۴؛ توج و همکاران، ۲۰۱۴؛ روی و همکاران، ۲۰۱۶). از این رو در این پژوهش شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده بین دو گیاه سویا و براکی‌پودیوم مورد جستجو قرار گرفت. سپس ژن‌های بدست آمده تحت آنالیز Pathway Enrichment و آنالیز عملکرد قرار گرفتند. برای آنالیز Pathway Enrichment نیز ابزارهای متفاوتی در دسترس است. برای این آنالیز در این پژوهش Phytozome مورد استفاده قرار گرفت (جدول

<sup>۱</sup> Pearson Correlation

<sup>۲</sup> ژن‌های هم تنظیم یا Co-Regulated Genes

جدول (۱-۱) مروری بر منابع در دسترس برای آنالیز هم بیانی (سرین و همکاران، ۲۰۱۶).

Database	Description	Target species	Link
<b>Data availability and data selection for co-expression network analysis</b>			
BAR—eFP browser	Interactive Visualization Of Gene Expression	Arabidopsis	<a href="http://bar.utoronto.ca/">http://bar.utoronto.ca/</a>
Cressexpress	Co-Expression Analysis For Arabidopsis	Arabidopsis	<a href="http://cressexpress.org/">http://cressexpress.org/</a>
AraNet	Probabilistic Functional Gene Network Of Arabidopsis	Arabidopsis	<a href="http://www.functionalnet.org/aranet/search.html">http://www.functionalnet.org/aranet/search.html</a>
CORNET	Co-Expression Analysis On Predefined Or User Defined Experiments	Arabidopsis	<a href="https://bioinformatics.psb.ugent.be/cornet/">https://bioinformatics.psb.ugent.be/cornet/</a>
Oryza Express	Gene Expression Database For Rice	Rice	<a href="http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/OryzaExpress/">http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/OryzaExpress/</a>
RiceFriend	Gene Expression Database For Rice	Rice	<a href="http://ricefriend.dna.affrc.go.jp/">http://ricefriend.dna.affrc.go.jp/</a>
PlaNet	Database For Comparative Co-Expression Network Analyses For Plants	Several species	<a href="http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/">http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/</a>
Geneinvestigator	Database For Curated Gene Expression Data	Several species	<a href="http://www.plexdb.org/plex.php?database=Arabidopsis">http://www.plexdb.org/plex.php?database=Arabidopsis</a>
GEO	Public Functional Genomics Data Repository	Several species	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>
Phytozome	Comparative Platform For Plant Genomics	Several species	<a href="http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html">http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html</a>
ArrayExpress	Database For Large Functional Genomics	Several species	<a href="http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/">http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/</a>
ATTED-II	Gene Co-Expression Database	Several species	<a href="http://atted.jp/">http://atted.jp/</a>
PLANEX	Plant Gene Co-Expression Database	Several species	<a href="http://planex.plantbioinformatics.org/">http://planex.plantbioinformatics.org/</a>
<b>Database for promoter analysis)</b>			
PLACE	Database Of Motifs Found In Cis-Acting Regulatory Elements	Arabidopsis	<a href="https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&amp;pi">https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&amp;pi</a>
PlantPAN 2.0	Provides An Informative Resource For Detecting Transcription Factor Binding Sites, Corresponding Tfs, And Other Important Regulatory Elements	Several species	<a href="http://PlantPAN 2.0 .itps.ncku.edu.tw/">http://PlantPAN 2.0 .itps.ncku.edu.tw/</a>
plantTFDB	Plant Transcription Factor Database	Several species	<a href="http://meme-suite.org/">http://meme-suite.org/</a>
AGRIS and AtregNet	Information Resource Of Arabidopsis Promoter Sequences, Transcription Factor And Targets	Arabidopsis	<a href="http://arabidopsis.med.ohio-state">http://arabidopsis.med.ohio-state</a>
<b>Gene Ontology and Enrichment Analysis</b>			
KEGG (pathways)	Collection of manually drawn path-ways	Several species	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
BioCyc	Pathway and genome database	Several species	<a href="http://biocyc.org/">http://biocyc.org/</a>
Phytozome (Phytomine)	Gene Ontology And Pathway Enrichment Analysis	Several species	<a href="https://phytozome.jgi.doe.gov/phytomine/begin.do">https://phytozome.jgi.doe.gov/phytomine/begin.do</a>
Mapman	Display large data sets on diagram of metabolic maps	Several species	<a href="http://mapman.gabipd.org/">http://mapman.gabipd.org/</a>

۱-۱). این پایگاه داده آنالیز را بر اساس میزان p-Value که احتمال اتفاقی بودن نتایج را نشان می‌دهد، در اختیار قرار می‌دهد. Phytozome برای محاسبه‌ی p-Value از معادله‌ی زیر استفاده می‌کند:

$$P = \frac{(M \text{ choose } k) (N-M \text{ choose } n-k)}{N \text{ choose } n}$$

که در این معادله n تعداد ژن‌های هم بیان، N تعدادی از ژن‌های هم بیان که در مجموعه‌ی ژن‌های مرجع (تمام ژن‌هایی که در گیاه مورد نظر حاشیه نویسی شده‌اند) مورد استفاده وجود دارند، k تعداد ژن‌های هم بیانی که در Pathway Enrichment حاشیه نویسی شده‌اند و M تعداد ژن‌هایی از مجموعه‌ی ژن‌های مرجع که در Pathway Enrichment حاشیه نویسی شده‌اند، را نشان می‌دهد.

زمانی که استنتیج آماری چند آزمون به صورت موازی انجام می‌شود احتمال خطای False Positive زیاد می‌شود. در Pathway Enrichment به صورت هم زمان ژن‌ها در چند مسیر متابولیکی دسته بندی می‌شوند و همزمان برای آن‌ها p-Value محاسبه می‌شود. اگرچه پیش‌تر Phytozome تعداد آزمون‌ها را بر مبنای تعداد مسیرهای متابولیکی که ژن‌های مورد نظر در آن‌ها قرار دارند محاسبه می‌کرد، اما در نسخه‌های جدید تعداد آزمون‌های انجام شده تعداد مسیرهای متابولیکی موجود در ژن‌های مرجع می‌باشد. به منظور مرتفع کردن مشکل False Positive در آزمون‌های چندگانه، بسیاری از اصلاح‌کننده‌های آزمون‌های چندگانه توسعه داده شده‌اند تا با در نظر گرفتن تعداد آزمون‌هایی که انجام گرفته است، p-Value به درستی محاسبه شود. در این پروژه از آزمون تصحیح Bonferroni استفاده شد که یکی از ساده‌ترین روش‌های تصحیح آزمون می‌باشد. در این آزمون تصحیح، تعداد آزمون در p-Value تصحیح نشده ضرب می‌شود و به این ترتیب p-Value تصحیح شده به دست می‌آید (فیتوزوم).

### ۱-۶-۱ آنالیز نواحی بالادست

برای درک بهتر مسیر بیوسنتز لیگنین شناخت مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن‌های این مسیر ضروری

است (والکر و همکاران، ۲۰۱۵). با توجه به این نکات و با در نظر داشتن فرضیه‌ی هم تنظیمی<sup>۱</sup> ژن‌های هم بیان (نتوتیا و همکاران، ۲۰۱۴؛ تیزفادیا و همکاران، ۲۰۱۶)، در این پژوهش توالی بالادست ژن‌های هم بیان به منظور یافتن عناصر سیس مشترک مورد آنالیز قرار گرفتند. ابزارهای متعددی برای بررسی و آنالیز توالی بالادست ژن‌ها وجود دارد (جدول ۱-۱). در این پژوهش از ابزار Gene Group Analysis در سایت PlantPAN 2.0 (<http://PlantPAN 2.0.itps.ncku.edu.tw>) استفاده شد. این ابزار می‌تواند همکاری احتمالی بین فاکتورهای نسخه برداری برای تنظیم بیان ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی را نشان دهد. برای این کار جایگاه‌های اتصال فاکتورهای نسخه برداری که در فاصله‌ی ۲۰ تا ۲۰۰ جفت باز از هم قرار دارند، به عنوان فاکتورهای نسخه برداری با احتمال داشتن برهمکنش در نظر گرفته می‌شوند. در مراحل بعد مجموعه‌ای از فاکتورها که به صورت پیش فرض در بیش از ۹۰ درصد از توالی‌ها همکاری نشان می‌دهند به عنوان جایگاه‌های اتصال Co-occurrence معرفی می‌شوند (چانگ و همکاران، ۲۰۰۸).

---

<sup>۱</sup>ژن‌هایی که الگوی تنظیم بیان، مشابهی داشته باشند.





فصل دوم

مرور منابع

## ۲- مروری بر منابع

لیگنین پلیمری ناهمگون است که معمولاً در دیواره‌ی ثانویه رسوب می‌کند و به آن استحکام می‌بخشد. لیگنین با خاصیت هیدروفوب خود امکان ایجاد بافت آوندی به منظور انتقال آب از ریشه‌ها به برگ‌ها در مرتفع‌ترین شاخه‌ها را فراهم کرده است. مطالعات اثبات کرده است که لیگنین در اغلب تنش‌های زنده و غیر زنده نقش موثر دارد و به گیاه قابلیت تحمل تنش‌ها را می‌دهد. به عنوان مثال مشاهده شده است که تحت تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های دخیل در لیگنیفیکاسیون در گیاهان ذرت، شبدر و چچم افزایش می‌یابد (لی و همکاران، ۲۰۰۷؛ هو و همکاران، ۲۰۰۹؛ لی و همکاران، ۲۰۱۲). هو و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی توتون تحت شرایط خشکی بیان کردند، با افزایش سطح لیگنین گیاه تحمل بیشتری در برابر خشکی نشان می‌دهند. ورمیز و همکاران (۲۰۱۰) نقش لیگنین در تحمل شرایط خشکی را در گیاه ذرت بررسی کردند. آن‌ها مشاهده کردند، موتانت‌ها با سطح پایین لیگنین حتی در شرایط مطلوب باز هم علائم کم آبی را نشان می‌دهند. با این حال برخی مطالعات نشان داده‌اند که ممکن است، گیاهان با سطح لیگنین کم‌تر تحمل بیشتری در برابر خشکی داشته باشند. به عنوان مثال گالگو-گیرالدو و همکاران (۲۰۱۱) کاهش سطح لیگنین در گیاه تراریخته یونجه مقاوم به خشکی را گزارش کردند. همینطور وینسنت و همکاران (۲۰۰۵) در گیاه ذرت مقاوم در برابر خشکی کاهش سطح آنزیم‌های فعال در مسیر بیوسنتز لیگنین و به دنبال آن کاهش سطح لیگنین را گزارش کرده‌اند. با توجه به این مطالعات محتوای لیگنین با افزایش تحمل تنش خشکی رابطه‌ی مشخصی ندارد به این معنا که گاهی افزایش سطح لیگنین موجب افزایش تحمل گیاه و گاهی موجب کاهش تحمل گیاه در تنش خشکی می‌شود. برخلاف تنش خشکی، غالب تنش‌های غیر زنده‌ی دیگر باعث افزایش محتوای لیگنین می‌شوند (محمودی و همکاران، ۲۰۱۰؛ نوس و همکاران، ۲۰۱۰؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۲). علاوه بر تنش‌های غیر زنده لیگنین در پاسخ به تنش‌های زنده نیز نقش مهمی بر عهده دارد. دیواره اولین سد در برابر تنش‌های زنده همچون باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و یا حشرات گیاهخوار محسوب می‌شود (دیویدسون و فیلیپس،

۱۹۳۰؛ ما، ۲۰۱۰). لیگنین با سخت تر کردن دیواره، مانعی تجزیه ناپذیر در برابر پاتوژن‌ها فراهم می‌آورد (ماتیل، ۱۹۹۴؛ مگالاها سیلوا مورا و همکاران، ۲۰۱۰). تحریک مسیر فنیل پروپانویید و القا پلیمریزاسیون لیگنین باعث افزایش سطح لیگنین در تنش‌های زنده می‌شود (بهائیان و همکاران، ۲۰۰۹؛ بهاتاکاریا و همکاران، ۲۰۱۰). این واکنش‌های دفاعی به وسیله‌ی القا واکنش‌های انتقال سیگنال آبشاری ROS انجام می‌گیرد (بکر و اورلندی، ۱۹۹۵؛ آنجلینی و همکاران، ۲۰۰۸؛ اوبرینو همکاران، ۲۰۱۲). علاوه بر تعداد زیادی آزمایش که بر روی نقش لیگنین در حفاظت از طیف گسترده‌ای از گیاهان در برابر پاتوژن‌های قارچی صورت گرفته، مطالعات روی سایر پاتوژن‌ها و آفات مثل حشرات، نماتدها و باکتری‌ها، این اصل که لیگنین به عنوان فاکتوری مهم برای تحمل تنش زیستی است، را اثبات کرده است (فری، ۲۰۱۳). به این ترتیب با کمک مهندسی و دستورزی ژن‌های دخیل در بیوسنتز لیگنین می‌توان به گیاهان مقاوم به انواع تنش‌ها دست یافت. به علاوه همانطور که قبلا اشاره شد لیگنین پتانسیل استفاده در صنایع مختلف را دارد. با این حال دانش محدود ما از ساختار و بیوسنتز لیگنین، ناشناخته بودن بسیاری از ژن‌های موثر و دخیل در سنتز آن و تنظیم بیان این ژن‌ها باعث شده که نتوانیم به طور کارآمد از این پلیمر بهره مند شویم. بیوانفورماتیک، امکان آنالیز داده‌های ژنومی و بیانی فراوان تولید شده در تکنولوژی‌های با سرعت بالا را فراهم کرده است. این داده‌ها به ویژه داده‌های حاصل از آزمایشات میکرواری و هم بیانی اجازه‌ی مطالعه‌ی آسان مسیرهای متابولیکی را به پژوهشگران می‌دهد. با استفاده از این ابزار علاوه بر مطالعات تکاملی می‌توان به کشف ژن‌های جدید فعال در مسیرهای متابولیکی و مطالعه‌ی ارتباط بین مسیرهای متابولیکی پرداخت. همچنین بیوانفورماتیک ابزار مورد نیاز به منظور بررسی مسیر تنظیم بیان ژن‌ها را نیز در دسترس قرار داده است. در این فصل علاوه بر مرور منابع مطالعات تکاملی لیگنین به مرور منابع در خصوص بررسی‌های انجام شده در زمینه‌ی شبکه‌های ژنی می‌پردازیم.

## ۱-۲ مروری بر مطالعات تکاملی

گوجن و همکاران (۲۰۰۳)، به بررسی تکاملی ژن‌های دخیل در بیوسنتز لیگنین در آرابیدوپسیس پرداختند. بررسی‌های ایشان نشان داد اکثر آنزیم‌های این مسیر توسط چند ژن در خانواده‌های ژنی بیان می‌شوند و برخی از ژن‌های کد کننده‌ی PAL، 4CL، CAD حاصل پدیده‌ی دوبرابر شدگی می‌باشند. آن‌ها مشاهده کردند، در گیاه آرابیدوپسیس آنزیم‌های سیتوکروم P450 (F5H، C3H، C4H) به غیر از F5H که توسط دو ژن همولوگ کد می‌شود، به وسیله‌ی تک ژن کد می‌شوند.

زو و همکاران (۲۰۰۹)، به مطالعه‌ی تکاملی ژن‌های دخیل در بیوسنتز لیگنین، در ۱۴ گیاه و یک گونه‌ی قارچی پرداختند. آن‌ها بیان کردند، جلبک‌های سبز فاقد مسیر بیوسنتز لیگنین می‌باشند و مسیر کامل بیوسنتز لیگنین ابتدا در خزها ایجاد شده است. آن‌ها نتیجه گرفتند که پیچیدگی مسیر بیوسنتز لیگنین از وجود چندین آنزیم با عملکردهای چندگانه در این مسیر ناشی می‌شود. به عنوان مثال آنزیم‌های COMT و F5H هر دو می‌توانند چندین سوبسترا را بپذیرند. نتایج آن‌ها نشان داد که گسترش خانواده‌های ژنی بیوسنتز کننده‌ی لیگنین با تنوع سوبسترا رابطه دارد و گسترش اکثر خانواده‌های ژنی بعد از جدا شدن تک لپه‌ها و دو لپه‌ها ایجاد شده است.

باخ و همکاران (۲۰۱۲)، به بررسی ژن‌های CAD در گیاه براکی پودیوم پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که ۷ ژن کد کننده‌ی CAD در براکی پودیوم الگوی اینترون و اگزون متفاوتی دارند. همه‌ی آنزیم‌های CAD دارای پپتید نشانه‌های سیتوزول بودند، به جز CAD4 که دارای پپتید نشانه‌ی کلروپلاست بود. باخ و همکاران پیشنهاد دادند که علت حضور CAD در نواحی مختلف سلولی، تنوع فعالیت CAD در سلول است.

چو و همکاران (۲۰۱۴)، در بررسی آنزیم‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها (شاخه‌ای دیگر از مسیر فنیل پروپانوئید) در سویا و ۶ گیاه دیگر به این نتیجه رسیدند که PAL که در بالادست ترین نقطه‌ی مسیر فنیل پروپانوئید قرار دارند، در تمام نسخه‌های اجدادی و نسخه‌هایی اخیر حاصل از وقوع دوبرابر شدگی

به شدت حفاظت شده باقی مانده است. آن‌ها همچنین به این نتیجه رسیدند که تعداد کپی ژن‌های *C4H* و *PAL* در این گیاهان به طور متوسط به ترتیب ۷ و ۳ ژن می‌باشد. آن‌ها بیان کردند که ساختار و عملکرد یک مسیر متابولیکی منجر به ایجاد دوبرابردگی‌ها و محدودیت‌های تکاملی آنزیم‌ها می‌شود. مدل‌های انتقال سیگنال بر اساس آبشارهای پروتئینی MAPK<sup>۱</sup> به صورت حفاظت شده در تمام یوکاریوت‌ها فعالیت می‌کنند. این مسیر انتقال سیگنال نقش مهمی در رشد و تکامل گیاهان و پاسخ به تنش‌های چندگانه ایفا می‌کنند. فنج و همکاران (۲۰۱۶) ۸۶ پروتئین MAPKK<sup>۲</sup> که توسط ۷۳ ژن کد می‌شدند را در براکی‌پودیوم بررسی کردند. بررسی‌های فیلوژنتیک ژن‌های کد کننده‌ی این پروتئین‌ها در براکی‌پودیوم، برنج و آرابیدوپسیس حفاظت شدگی دومین‌های پروتئینی MAPKKK را نشان داد. آن‌ها مشاهده کردند که ژن‌های کد کننده‌ی این پروتئین‌ها الگوی اینترون-اگزون مشابهی دارند، همچنین بررسی‌های دوبرابر شدگی در مورد این ژن‌ها نشان داد که دوبرابر شدگی در قطعه‌ی کروموزوم قبل از جدا شدن برنج و براکی‌پودیوم رخ داده است.

## ۲-۲ مروری بر مطالعات هم بیانی و آنالیز پروموتور

پرسون و همکاران (۲۰۰۵) به بررسی ژن‌های دخیل در سنتز سلولز پرداختند. آن‌ها به کمک آنالیز هم بیانی به روش رگرسیون به لیستی از ژن‌های هم بیان با ژن‌های سلولز سنتاز (*CESA*) دست یافتند که می‌توانستند در ساخت سلولز دخیل باشند. سپس موتانت ۴ ژن کاندیدا را بررسی کردند. از این بین موتانت‌های دو ژن از چهار ژن، فنوتیپ‌های نامنظم در بافت آوندی را نشان دادند. این فنوتیپ پیش تر هنگام نقص در سلولز سنتتازهای دیواره ثانویه نیز مشاهده شده است.

میشل و همکاران (۲۰۰۷) به دنبال یافتن حلقه‌ی مفقوده‌ی مسیر بیوسنتز آرابینوزایلان‌ها (*AX*) یکی از اولین مطالعات مقایسه‌ای رونوشت‌ها مربوطه به سنتز دیواره را انجام دادند. *AX* از ترکیبات اصلی

<sup>۱</sup> Mitogen-Activated Protein Kinase (Mapk)

<sup>۲</sup> Mapk Kinase Kinases (Mapkkk)

دیواره‌ی سلولی گیاهان خانواده‌ی علفی تک لپه می‌باشد. با این حال علی رقم اهمیت اقتصادی که دارند اما تا آن زمان ژن‌هایی که آنزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز<sup>۱</sup> (GT) مراحل نهایی سنتز AX را کد می‌کنند، مشخص نشده بودند. با توجه به حضور پر رنگ این ترکیبات در دیواره‌ی گیاهان علفی تک لپه، این انتظار وجود داشت که این ژن‌ها در این خانواده گسترش یافته باشند. به همین علت میشل و همکاران (۲۰۰۷) به آنالیز افتراقی بیان ژن بین برنج و آرابیدوپسیس پرداختند. آن‌ها در این مطالعات به این نتیجه رسیدند که خانواده‌های ژنی *GT43*، *GT47* و *GT61* در برنج نسبت به آرابیدوپسیس گسترش یافته‌اند. آن‌ها پیشنهاد دادند که خانواده‌های ژنی در مراحل نهایی سنتز AX نقش دارند. همین گروه توانستند در سال ۲۰۱۲ نشان دهند که چندین *GT61* برای سنتز AX ضروری هستند (اندرس و همکاران، ۲۰۱۲).

ایکاو و همکاران (۲۰۱۰) به مقایسه‌ی اطلاعات هم‌بیانی ژن‌های *IRX9*<sup>۲</sup>، *IRX10* و *IRX14* دخیل در سنتز زایلان آرابیدوپسیس و همولوگ‌های آن‌ها در برنج پرداختند. آن‌ها شبکه‌ی هم‌بیانی ژن‌های مذکور را از پایگاه داده‌ی ATED II بدست آوردند و با استفاده از این اطلاعات توانستند مدلی برای سنتز زایلان در آرابیدوپسیس و برنج در دستگاه گلزی پیشنهاد دهند. همچنین مدلی برای انتقال سیگنال از غشای پلاسمایی به هسته برای تمایز دیواره‌ی ثانویه ارائه کردند.

روپرچ و همکاران (۲۰۱۱) به مقایسه‌ی شبکه‌ی هم‌بیانی ژن‌های *CESA* بین هفت گونه‌ی گیاهی پرداختند. آن‌ها شبکه‌ی هم‌بیانی حفاظت شده‌ی بین تمام گونه‌ها بدست آوردند. هرچند عملکرد بسیاری از ژن‌ها در شبکه‌ی هم‌بیانی حفاظت شده مشخص نبود، با این حال پیشنهاد کردند که این ژن‌ها در سنتز سلولز نقش دارند.

مطالعات هم‌بیانی در آرابیدوپسیس مشخص کرد که ژن‌های ترانسپورتر *ATABC29* (ATABC29) با ژن‌های مسیر فنیل پروپانویید هم تنظیم می‌باشند. این مطالعات نشان داد که این ژن‌ها در بافت‌ها و

---

<sup>1</sup> Glycosyl Transferases

<sup>2</sup> Irregular Xylem

اندام‌های لیگنینه بیان می‌شوند (الهاندرو و همکاران، ۲۰۱۲). بررسی‌ها در مخمر مشخص کرد که این پروتئین‌ها در انتقال *P*-کوماریل‌الکل‌ها نقش ایفا می‌کنند. اگرچه این پروتئین‌ها فعالیت کمی هم در انتقال سیناپیل‌الکل نشان داده‌اند، اما ترانسپورترهای ABCG در انتقال کونیفریل‌الکل‌ها نقشی ندارند (وانهوم و همکاران، ۲۰۱۲). با این حال آنالیز لیگنین در دو رده‌ی جهش یافته نشان داد که مقدار هر سه مونولیگنول کاهش یافت و مقدار سایر متابولیت‌های فنولی نیز تغییر پیدا کرد. این نتایج غیرمنتظره بود زیرا انتظار می‌رفت که تنها واحدهای H کاهش یابند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۳).

اتکین و همکاران (۲۰۱۳) با مقایسه شبکه‌ی هم‌بیانی در دو گیاه سیب زمینی و گوجه فرنگی توانستند، ژن‌های مرتبط با مسیر گلیکوالکالوئیدهای استروئیدی (SGA) را کشف کنند. SGA مانند سولانین موجود در گیاهان خانواده سولانسه<sup>۱</sup> نظیر سیب زمینی، عاملی ضد استرس برای انسان است. آن‌ها توانستند با مقایسه هم‌بیانی بین گوجه فرنگی و سیب زمینی ۱۰ ژن را در مسیر بیوسنتز SGA پیشنهاد کنند. مطالعات فیلوژنتیک این ژن‌ها نشان داد که از این بین ۶ ژن در نزدیکی هم و بر روی یک کروموزوم قرار دارند. آن‌ها در نهایت توانستند تصور قبلی از این مسیر را اصلاح کنند.

لیال و همکاران (۲۰۱۴) پس از آنالیز اطلاعات بیانی حاصل از چندین آزمایش میکروآرای موجود در پایگاه‌های داده و مقایسه‌ی اطلاعات هم‌بیانی حاصل از آن بین گونه‌های گیاهی مختلف (آرابیدوپسیس، برنج، سویا، گوجه فرنگی و کاسیو) توانستند مسیرهای انتقال سیگنال حفاظت شده‌ای را در پاسخ به پاتوژن بیابند.

فاکتورهای متصل شونده به عناصر پاسخ به دهیدراسیون<sup>۲</sup> (DREBs) یکی از فاکتورهای نسخه برداری مهم در گیاهان هستند که بیان بسیاری از ژن‌ها را تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی تنظیم می‌کنند و می‌توانند نقش قابل توجهی در تحمل تنش‌ها در گیاهان داشته باشند. سازگاری و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که بررسی شبکه‌های تنظیم بیان ژن‌های *DREBs* در آرابیدوپسیس می‌تواند به یافتن سایر

<sup>۱</sup> Solanaceous

<sup>۲</sup> Dehydration Response Element Binding Factors

ژن‌های *DREBs* و ژن‌های دخیل در پاسخ به تنش‌ها در این گیاه کمک کند. به همین علت آن‌ها به بررسی توالی بالادست ژن‌ها *DREBs* با استفاده از ابزارهای آنلاین موجود شامل Plant CARE و GeneMANIA پرداختند. آن‌ها همچنین با بررسی شبکه‌ی هم‌بیانی آن ژن‌ها نتوانستند برخی ژن‌ها با عملکرد مرتبط با پاسخ به تنش‌ها را شناسایی کنند.

شارما و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی هم‌بیانی ژن‌ها تحت تنش شوری و خشکی در سیب زمینی پرداختند. آن‌ها اطلاعات هم‌بیانی را از پایگاه داده‌ی GEO بازیابی کردند و به آنالیز آن‌ها پرداختند. تعداد زیادی (۲۵ درصد) از پروتئین‌های موجود در شبکه‌ی هم‌بیانی لپوکسیژنازها<sup>۱</sup> را کد می‌کردند. شارما و همکاران پیشنهاد دادند که علت آن می‌تواند نقش این پروتئین‌ها در مسیر متیل جاسمونیک اسید در پاسخ به تنش‌های غیر زنده باشد. آن‌ها توالی بالادست ژن‌های هم‌بیان را آنالیز کردند. بررسی‌ها نشان داد که همه‌ی این ژن‌ها دارای تکرار مشابهی از جایگاه اتصال برای EREBP/AP2 بودند و به این نتیجه رسیدند که ژن‌های هم‌بیان در این مسیر هم تنظیم نیز هستند. آن‌ها همچنین اظهار داشتند که ژن‌های هم‌بیان به صورت تصادفی در ژنوم پخش نشده‌اند، بلکه تمایل دارند که با هم کلاستر تشکیل دهند.

روی و همکاران (۲۰۱۶) با مقایسه‌ی الگوی بیانی ژن‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین و ژن‌های *UGT* رابطه‌ی هم‌بیانی این ژن‌ها را مشخص کردند. این رابطه می‌تواند تاییدی در ارتباط لیگنیفیکاسیون و گلیکولیزاسیون مونولیگنول‌ها باشد. آن‌ها همچنین مشاهده کردند، بین برخی از *UGT* های مرتبط با لیگنیفیکاسیون و پراکسیدازی موسم به *PRX49* ارتباط هم‌بیانی وجود دارد. علاوه بر این *UGT* های مذکور و *PRX49* همگی با پراکسیدازی دیگر به نام *PRX72* رابطه‌ی هم‌بیانی داشتند. پیش‌تر این دو پراکسیداز به عنوان دو آنزیم مهم در پلیمریزاسیون لیگنین‌ها معرفی شده بودند (هررو و همکاران،

---

<sup>۱</sup> Lipoxigenase



۲۰۱۳؛ فرناندز پرز و همکاران، ۲۰۱۵). از آنجایی که پراکسیدازها و UGT از سوپسترای یکسانی استفاده می‌کنند، این نتایج می‌توانند ارتباط بین عملکرد این آنزیم‌ها را تایید کند.

فنج و همکاران (۲۰۱۶) به منظور تایید برهمکنش بین MPK، MPKK<sup>۱</sup> و MAPKKK ها در مسیر انتقال سیگنال MAPK، به آنالیز هم بیانی ژن‌های کد کننده‌ی این پروتئین‌ها پرداختند. مسیر انتقال سیگنال MAPK در آرابیدوپسیس به صورت گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است، به همین دلیل آن‌ها برای سنجش اطلاعات حاصل از آنالیز هم بیانی ابتدا به مطالعه‌ی هم بیانی در گیاه آرابیدوپسیس پرداختند. برای این منظور اطلاعات ژن‌های هم بیان MAPKK را برای هر دو گیاه براکی‌پودیوم و آرابیدوپسیس بدست آوردند و MAPKKK و MAPK هم بیان با MAPKK را مورد بررسی قرار دادند. در میان مسیرهای انتقال سیگنال MAPK پیشنهادی در آرابیدوپسیس چهار مسیر انتقال سیگنال شناخته شده وجود داشت که می‌توانست نتایج حاصل از مطالعه‌ی هم بیانی را تایید کند. با توجه به این مسیرهای شناخته شده آن‌ها نشان دادند، مسیرهای انتقال سیگنال MAPK که پیشنهاد داده‌اند مورد اعتماد است. سپس آن‌ها به مطالعات هم بیانی در براکی‌پودیوم نیز پرداختند و توانستند برخی مسیرهای انتقال سیگنال MAPK را در گیاه براکی‌پودیوم پیش بینی کنند.

ژو و همکاران (۲۰۱۷)، به مطالعه‌ی بیوسنتز رنگ گلبرگ‌ها در گیاه کاملیا طلایی پرداختند. در این مطالعه ۵۸۳،۱۹۴ رونوشت مورد بررسی‌های هم بیانی قرار گرفتند، علاوه بر این ژو و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی ژن‌ها با بیان متفاوت نیز پرداختند. آن‌ها می‌دانستند، رنگ طلایی در نتیجه تجمع فلاونول‌ها و کاروتنوئیدها در حالت گلیکوزیله درون گلبرگ‌ها ایجاد می‌شود. بررسی‌های هم بیانی و بررسی ژن‌ها با بیان متفاوت در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها نشان داد، که بیان بالای فیتون سنتاز و بتا کاروتن ۳ - هیدروکسیلاز منجر به افزایش سطح کاروتنوئیدها و بیان بالای شالکون سنتاز و فلاونول سنتاز باعث افزایش سطح فلاونول‌ها می‌شود. آن‌ها پیشنهاد کردند که این نتایج می‌تواند یک استراتژی برای اصلاح

---

<sup>۱</sup> Mapk Kinases (Mpk Or Mkk)

گیاه کاملیا باشد و در آزمایشات بعدی پژوهشگران باید بر روی افزایش کاروتنوئیدها و فلاونوئید گلیکوزیده و کاهش سنتز آنتوسیانین متمرکز شوند.

اگرچه تاکنون مطالعات آنالیز پروموتور در ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین با کمک ابزار بیوانفورماتیک به صورت گسترده انجام نشده است، اما تنظیم بیوسنتز لیگنین همواره مورد توجه بوده است. مطالعات نشان داده‌اند که مسیر فنیل پروپانوئید به ویژه مسیر بیوسنتز لیگنین به وسیله‌ی فاکتورهای نسخه‌برداری تنظیم می‌شوند. در این رابطه مطالعات زیادی بر روی خانواده‌ی فاکتور نسخه برداری MYB<sup>1</sup> در تنظیم بیوسنتز لیگنین انجام شده است. این مطالعات نقش MYB ها را در مسیرهای یاد شده مورد تایید قرار داد (زانک و همکاران، ۲۰۱۶؛ لی و همکاران، ۲۰۱۷؛ لیو و همکاران، ۲۰۱۸). مطالعات نشان داده است که علاوه بر MYB ها برخی از اعضا فاکتورهای نسخه برداری خانواده‌های NAC<sup>2</sup>، MADS<sup>3</sup>، bZIP<sup>4</sup>، BHLH<sup>5</sup>، TCP<sup>6</sup> و C2H2<sup>7</sup>، WRKY<sup>8</sup> نیز می‌توانند در تنظیم بیوسنتز دیواره و لیگنین نقش داشته باشند (هارتمن و همکاران، ۲۰۰۵؛ یان و همکاران، ۲۰۱۳؛ کاسما و همکاران، ۲۰۱۴؛ گالگو-گیرالدو و همکاران، ۲۰۱۶؛ لی و همکاران، ۲۰۱۶؛ وانگ و همکاران، ۲۰۱۶).

---

<sup>1</sup> Myeloblastosis

<sup>2</sup> Nitrogen Assimilation Control (NAC) Protein

<sup>3</sup> Minichromosome Maintenance1, Agamous, Deficiens And Serum Response Factor

<sup>4</sup> Basic Leucine Zipper Domain

<sup>5</sup> Basic Helix-Loop-Helix

<sup>6</sup> Teosinte Branched1/Cycloidea/Pcf

<sup>7</sup> Proteins Contain Cys<sub>2</sub> His<sub>2</sub> Zinc Finger Motifs.

<sup>8</sup> Wrky: Stands For The First Amino Acids From The WRKY Proteins Family Hall Mark WRKYGQK...W-Tryptophan, R-Arginine, K-Lysine, Y-Tyrosine.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

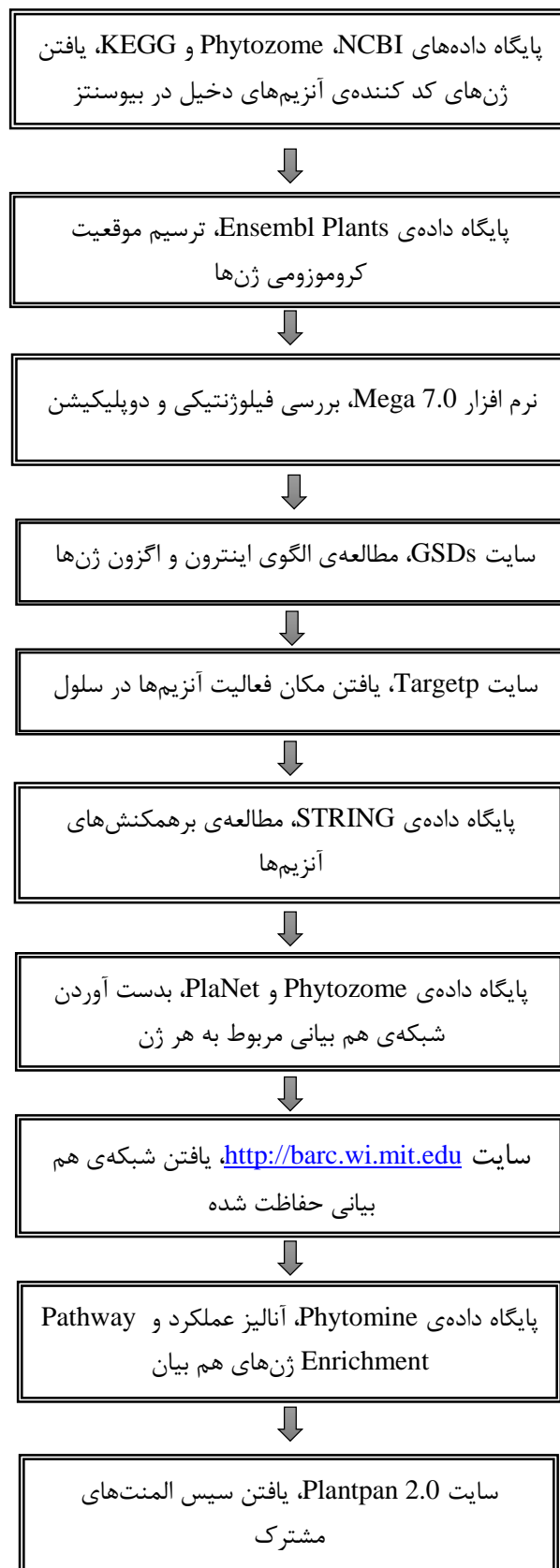
### ۳- مواد و روش‌ها

در پژوهش سه آنزیم PAL، C4H و C3H مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. آنزیم PAL اولین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید و بیوسنتز لیگنین است. این آنزیم همچنین اولین آنزیم محدود کننده در مسیرهای یاد شده می‌باشد و نقش مهمی در تنظیم مقدار لیگنین در دیواره‌ی سلولی دارد (وتن و صدروف، ۱۹۹۵؛ فریر و همکاران، ۲۰۰۸). علاوه بر این سه آنزیم سیتوکروم P450 (C3H، C4H، F5H) در مسیر بیوسنتز لیگنین فعالیت می‌کنند. این آنزیم‌ها برای سنتز مونولیگنول‌ها به همراه PAL کمپلکس پروتئینی ایجاد می‌کنند (چن و همکاران، ۲۰۱۱). این همکاری می‌تواند نشانگر اهمیت آنزیم‌های سیتوکروم P450 در بیوسنتز لیگنین باشد. به علاوه C4H و C3H از آنزیم‌های محدود کننده‌ی مهم مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشند (آنترولا و لويس، ۲۰۰۲). مطالعه‌ی هم بیانی ژن‌های کد کننده‌ی این آنزیم‌ها می‌تواند یک استراتژی مناسب برای دستیابی به سایر ژن‌های دخیل در بیوسنتز لیگنین باشد. در این پایان نامه علاوه بر مطالعات هم بیانی بررسی تکاملی نیز بر روی ژن‌های کد کننده‌ی این سه آنزیم انجام شد (شکل ۳-۱).

### ۳-۱ شناسایی ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین

ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های PAL، C4H و C3H درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین از پایگاه‌های NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) و Phytozome (گودستین و همکاران، ۲۰۱۲)، (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)، بدست آمد. در NCBI در بخش Gene پس از انتخاب نام گیاه، نام کامل آنزیم جستجو شد و در پایگاه Phytozome نیز EC Number مربوط به هر آنزیم مورد جستجو قرار گرفت. فعالیت ژن‌های به دست آمده در مسیر بیوسنتز لیگنین در صفحه‌ی مربوط به هر گیاه در پایگاه داده‌ی KEGG<sup>۱</sup> (کانه‌یسا و گوتو، ۲۰۰۰)، (<http://www.genome.jp/kegg/genome.html>) و در قسمت KEGG Genome تایید شد. برای این

<sup>۱</sup> Kyoto Encyclopedia Of Genes And Genomes



شکل (۱-۳) نمایی کلی از مراحل انجام پژوهش

منظور در صفحه KEGG Genome و در قسمت Organism مخفف نام هر گیاه (bdi برای براکی پودیوم و gmx برای سویا)، که در همین سایت معرفی شده است مورد جستجو قرار گرفت. پس از آن EC Number هر آنزیم مورد جستجو قرار گرفت.

### ۲-۳ موقعیت کروموزومی

موقعیت کروموزومی ژن‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین در براکی پودیوم، در Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>)، رسم شد. در قسمت All Genome گونه‌ی مورد نظر انتخاب شد. سپس بر روی View Karyotype کلیک گردید با کلیک بر روی Add Features می‌توان با وارد کردن Id ژن‌ها موقعیت آن‌ها بر روی کروموزوم مشاهده کرد. برای رسم موقعیت کروموزومی ژن‌های سویا نیز از سایت یاد شده استفاده شد. با این تفاوت که در این پروژه ما از اطلاعات *Glycine Max* v2.0 استفاده می‌کنیم. اما این پایگاه داده هنوز از اطلاعات *Glycine Max* v1.0 استفاده می‌کند به همین دلیل توالی ژن‌های *PAL*، *C3H* و *C4H* در Ensembl Plants، BLAST شدند و Id متناظر آن‌ها در *Glycine Max* v1.0 یافت شد (جدول پیوست ۱) و برای ترسیم نقشه‌ی ژن‌ها بر روی کروموزوم از آن‌ها استفاده شد.

### ۳-۳ بررسی الگوی اینترون و اگزون

ژن‌های کد کننده‌ی هر آنزیم از لحاظ الگوی اینترون و اگزون، CDS در GSDs 2.0<sup>۱</sup> (هو و همکاران، ۲۰۱۴)، (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور در سایت GSDs 2.0 و قسمت Gene Features فرمت توالی (FASTA)، انتخاب شد. در کادر اول توالی‌های CDS و در کادر دوم توالی ژنومی وارد شد.

---

<sup>۱</sup> Gene Structure Display Server

### ۳-۴ بررسی تکاملی و فیلوژنتیکی توالی‌های پروتئینی

درصد مشابهت محصول پروتئینی ژن‌ها در NCBI و ابزار هم‌ردیفی چندتایی در Protein BLAST بدست آمد. پس از هم‌ردیفی این ابزار درصد مشابهت پروتئین‌ها را در اختیار ما قرار داد. درخت فیلوژنتیکی با کمک نرم افزار<sup>۱</sup> Mega 7.0، بر اساس هم‌ردیفی با الگوریتم Muscle و روش ML و Boot Strap، ۱۰۰۰ تکرار رسم شد. برای این منظور ابتدا توالی‌های آمینو اسیدی وارد نرم افزار شدند، سپس هم‌ردیفی توالی‌ها با الگوریتم Muscle انجام شد. در مرحله‌ی بعد با انتخاب گزینه‌ی Phylogenetic Analysis امکان انتخاب الگوریتم رسم درخت فراهم شد و بعد از انتخاب الگوریتم مورد استفاده و آزمون Boot Strap، درخت مورد نظر بدست آمد.

### ۳-۵ بررسی وقوع دوبرابری ژن‌ها

به وسیله‌ی نرم افزار Mega 7.0 وقوع دوبرابری ژن‌ها در ژن‌های همولوگ مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور درخت فیلوژنتیکی بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌ها با الگوریتم Muscle و روش ML و Boot Strap با ۱۰۰۰ تکرار رسم شد. بعد از لود کردن درخت فیلوژنتیکی در پنجره‌ی Gene Duplication Wizard و نام گذاری گونه‌ها گزینه‌ی Launch Analysis انتخاب شد.

### ۳-۶ بررسی مکان فعالیت آنزیم‌ها

بررسی مکان فعالیت آنزیم‌ها بر اساس پپتید نشانه‌ی موجود در توالی پپتیدی در Targetp (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Targetp/>) صورت گرفت. بعد از انتخاب Plant در قسمت Organism Group، توالی پروتئین‌ها در فرمت FASTA به صورت همزمان به Targetp وارد شد. در مرحله‌ی بعد با مرور منابع، درستی پیش بینی مورد بررسی قرار گرفت.

<sup>1</sup> Molecular Evolutionary Genetics Analysis

### ۳-۷ بررسی برهمکنش پروتئین‌های هدف با سایر ترکیبات و پروتئین‌ها

برای جستجو برهمکنش‌ها پایگاه STRING (<https://string-db.org>)، برای براکی‌پودیوم با Id ژن‌ها مورد جستجو قرار گرفت. برای گیاه سویا از آنجایی که STRING از اطلاعات *Glycine Max* v1.0 استفاده می‌کند. جستجو ژن‌های سویا در این پایگاه با استفاده از Id های بدست آمده از بخش ۳-۲ انجام شد.

### ۳-۸ بررسی‌های هم‌بیانی

در این پروژه بررسی شبکه‌ی هم‌بیانی حفاظت شده در دو گیاه سویا و براکی‌پودیوم و در ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های PAL، C4H و C3H انجام شد. برای یافتن شبکه‌ی ژن‌های هم‌بیان ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های مورد نظر در سویا به پایگاه داده‌ی Phytozome و برای براکی‌پودیوم به پایگاه‌های داده‌ی Phytozome و PlaNet<sup>۱</sup> (<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de>)، (پروست و موتیل، ۲۰۱۷) مراجعه شد. برای بدست آوردن ژن‌های هم‌بیان، هر دو پایگاه با Id ژن‌ها جستجو گردیدند. بعد از جستجو Id ژن‌ها در پایگاه داده‌ی PlaNet جدولی از ژن‌های هم‌بیان با ضریب هم‌بستگی پیرسون بیشتر از ۷۵ درصد بدست آمد (موتیل و همکاران، ۲۰۱۱). در پایگاه داده‌ی Phytozome بعد از وارد کردن Id ژن و انتخاب سربرگ Expression و کلیک بر روی گزینه‌ی Coexpression جدولی از ژن‌های هم‌بیان با ضریب هم‌بستگی پیرسون بیشتر از ۸۵ درصد دسترس قرار گرفت.

### ۳-۸-۱ یافتن شبکه‌ی هم‌بیانی حفاظت شده

برای بدست آوردن شبکه‌ی هم‌بیانی حفاظت شده در گیاه هدف، شبکه‌ی هم‌بیانی ژن‌های همولوگ کدکننده‌ی آنزیم مورد نظر با اورتولوگ هم‌بیان‌های ژن‌های مورد مطالعه در گیاه دوم مقایسه شد. برای این منظور از ابزار Phytomine در قسمت Tools سایت Phytozome استفاده شد. در قسمت Analyze و در کادر Gene، Id ژن‌های هم‌بیان با ژن‌های مورد مطالعه در گیاه دوم مورد جستجو قرار

---

<sup>۱</sup> Plant Network



گرفت. در صفحه‌ی جدید در قسمت Orthologs بر روی نام گیاه هدف کلیک شد. ژن‌های اورتولوگ بازیابی شدند.

برای یافتن ژن‌های مشابه در لیست شبکه‌ی هم بیانی گیاه هدف و ژن‌های اورتولوگ، به سایت <http://barc.wi.mit.edu> مراجعه شد. گزینه‌ی BaRC Tools و سپس Compare Two Lists انتخاب گردید. در یکی از این کادرها ژن‌های هم بیان با ژن‌های مورد مطالعه در گیاه هدف و در کادر بعدی اورتولوگ ژن‌های بدست آمده در گیاه دوم وارد شدند. از آنجایی که در Id ژن‌ها قسمت‌های (Glyma یا Bradi) به طور مشترک تکرار شده بود و نرم افزار در تحلیل لیست‌ها دچار مشکل می‌شد، با انتخاب گزینه‌ی Case Insensitive حساسیت نرم افزار به این تکرارها کم شد و بر روی Compare Lists کلیک شد. به این ترتیب ژن‌های مشابه در دو لیست (شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده) بدست آمد. این کار برای تمام آنزیم‌ها و در دو گیاه تکرار شد.

این شبکه‌های هم بیانی در ابزار Phytomine مورد آنالیز Pathway Enrichment قرار گرفتند. برای این کار بعد از جستجوی Id ژن‌ها در کادر Gene در صفحه‌ی Phytomine، در کادر Pathway Enrichment، Max p-Value برابر با ۱/۰۰، آزمون تصحیح Bonferroni و Biological-Process انتخاب شدند و سپس گزینه‌ی view انتخاب شد. مطالعات تکمیلی برای درک عملکرد ژن‌های هم بیان در پایگاه‌های داده‌ی KEGG و Uniprot (<http://www.uniprot.org>) صورت گرفت. برای این منظور Id ژن‌ها در کادر جستجو پایگاه‌های داده‌ی KEGG و Uniprot وارد شد و سپس بر روی گزینه‌ی جستجو کلیک شد.

### ۳-۸-۲ رسم شبکه‌ی هم بیانی

شبکه‌ی هم بیانی به وسیله‌ی نرم افزار Cytoscape رسم شد. برای این کار پس از بارگذاری لیست هم بیانی در نرم افزار تصویر بدست آمده ذخیره شد.

### ۳-۹ آنالیز توالی بالادست ژن‌های هم بیان

با توجه به فرضیه‌ی هم تنظیمی ژن‌های هم بیان، بعد از بازیابی توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده، عناصر سیس مشترک بین این ژن‌ها مورد جستجو قرار گرفتند. برای این منظور توالی بالادست ژن‌ها از پایگاه داده‌ی Phytozome به دست آمد. با انتخاب گیاه و وارد کردن Id ژن‌ها، سپس انتخاب سربرگ Sequence و Genome Sequence تعداد ۱۰۰۰ باز در کادر Upstream وارد گردید. در گام بعدی آنالیز توالی بالادست انجام شد. برای این منظور به قسمت Gene Group Analysis در سایت PlantPAN 2.0 (<http://PlantPAN 2.0 .itps.ncku.edu.tw>)، مراجعه شد. با انتخاب گزینه‌ی Multiple Promoter Analysis پروموتورها آنالیز شدند. به این نحو TFBS<sup>۱</sup>هایی که در ناحیه‌ی بالادست حداقل ۹۰ درصد از ژن‌ها در فاصله‌ی ۲۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتیدی از هم قرار داشتند، بدست آمدند.

---

<sup>۱</sup> Transcription Factor Binding Site

فصل چہارم

نتایج و بحث

#### ۴- نتایج و بحث

##### ۴-۱ شناسایی ژن‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین

شناسایی و بررسی تعداد ژن‌ها در براکی‌پودیوم به عنوان یک گیاه تک لپه و سویا به عنوان یک گیاه دولپه برای ژن‌های کد کننده‌ی PAL، C4H و C3H دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین انجام شد. حاصل جستجو در پایگاه‌های داده‌ی Phytozome، NCBI، KEGG، ۸ ژن PAL و ۳ ژن C4H در سویا و براکی‌پودیوم بود (جدول پیوست ۲). در سویا ۲ ژن و در براکی‌پودیوم ۱ ژن آنزیم C3H را کد می‌کردند. چو و همکاران (۲۰۱۴) نیز پس از بررسی تکاملی برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویید از جمله PAL و C4H در سویا و ۶ گیاه دیگر، به این نتیجه رسیدند که تعداد نسخه ژن‌های PAL و C4H به طور متوسط در ژنوم گیاهان به ترتیب ۷ و ۳ کپی است. همچنین نتیجه‌ی بررسی تکاملی زو و همکاران (۲۰۰۹) بر روی مسیر بیوسنتز لیگنین نشان داد که گیاهان مورد بررسی ایشان به طور میانگین نزدیک به ۷ ژن PAL، ۲ ژن C4H و ۲ ژن C3H داشتند. تطابق نتایج این پژوهش با نتایج چو و همکاران (۲۰۱۴) و زو و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که تعداد نسخه ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های مورد مطالعه در بین گیاهان تقریباً یکسان است. برای درک دقیق روند تکامل ژن‌ها در گیاهان و درک اینکه این ژن‌ها قبل یا بعد از جدا شدن گیاهان دولپه و تک لپه ایجاد شده‌اند، در مراحل بعد مطالعات تکمیلی انجام شد.

##### ۴-۲ مکان قرار گیری ژن‌ها بر روی کروموزوم

ژن‌های PAL، C4H و C3H در سویا بر روی ۷ کروموزوم از ۲۰ کروموزوم متمرکز شده‌اند. در براکی‌پودیوم ژن‌های مورد نظر بر روی ۳ کروموزوم از ۵ کروموزوم براکی‌پودیوم قرار دارند. برخی از ژن‌های PAL و C4H در براکی‌پودیوم تمایل به تشکیل کلاستر نشان می‌دهند. بررسی‌ها مشخص کرد، ۷ ژن از ۸ ژن PAL روی کروموزوم ۳ قرار گرفته‌اند، این ۷ ژن در نزدیکی هم و در همسایگی ژن *Bd-C4H3* قرار دارند. با این حال ژن‌های PAL، C4H و C3H در سویا نسبت به براکی‌پودیوم تمایل کمتری

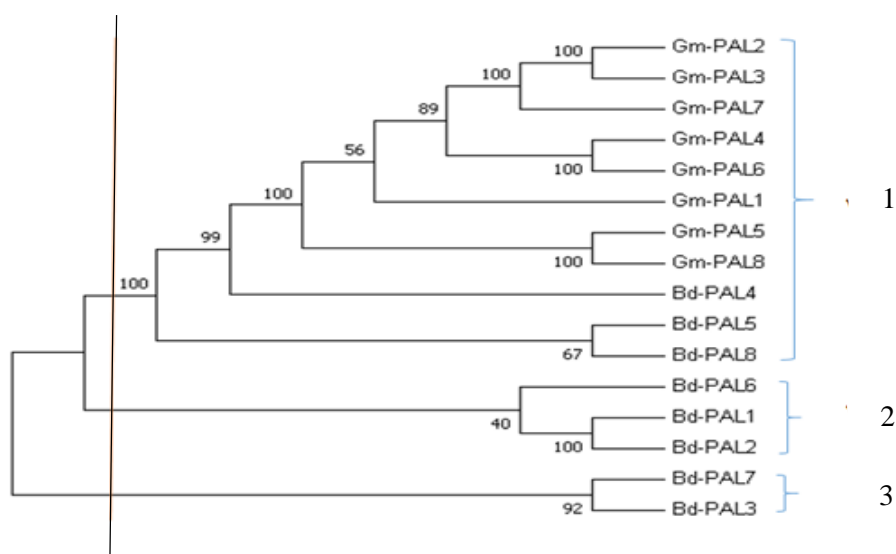
به تشکیل کلاستر دارند. بررسی‌ها در سویا نشان داد، ژن‌های *Gm-PAL2* و *Gm-PAL3* در نزدیکی هم و بر روی کروموزوم ۳ قرار دارند، ژن *Gm-C3H1* نیز در همسایگی آن‌ها قرار گرفته است (شکل پیوست ۵).

### ۳-۴ آنالیزهای تکاملی

#### ۳-۴-۱ آنالیز تکاملی PAL

بررسی درصد مشابهت توالی‌های پروتئینی در PAL نشان داد که توالی آنزیم‌های کد شده توسط ۸ ژن درون گونه و بین دوگونه حفاظت شده می‌باشد (درصد مشابهت بین ۶۴ تا ۷۸ بین پروتئین‌های دو گیاه)، (جدول پیوست ۳). بررسی‌های دوبرابر شدگی به وسیله‌ی نرم افزار Mega 7.0 در هر دو گیاه نشان داد که ژن‌های PAL در گیاهان مورد مطالعه در اثر ۷ دوبرابر شدگی ایجاد شده‌اند. پیش‌تر نیز هم‌متی و همکاران (۲۰۱۵) ژن‌های PAL را بین گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها از منظر تکاملی بررسی کردند. آن‌ها بیان کردند که احتمالاً گیاهان یک ژن PAL را از طریق انتقال افقی در همزیستی باکتری‌ها و قارچ‌ها به دست آورده‌اند. همچنین به این نتیجه رسید که مکانیسم توسعه‌ی ژن‌های PAL در گیاهان بیشتر از راه دوبرابرشدگی‌ها می‌باشد. به عنوان مثال در نهاندانگان، بعد از اشتقاق گیاهان دولپه از تک لپه، ژن‌های PAL به دفعات دستخوش دوبرابر شدگی قرار گرفته‌اند. درخت فیلوژنتیکی (شکل ۴-۱) نیز نشان می‌دهد همولوگ‌های سویا و براکی‌پودیوم جدای از هم آرایش یافته‌اند که خود نشانگر دوبرابر شدگی ژن‌ها می‌باشد.

در بررسی الگوی اینترون و اگزون بین ژن‌های PAL درون گونه‌ی براکی‌پودیوم دو الگوی متفاوت مشاهده شد. سه ژن با الگوی دو اگزون و یک اینترون (*Bd-PAL4*, *Bd-PAL5* و *Bd-PAL8*) و ۵ ژن دیگر بدون اینترون بودند. بررسی ژن‌های PAL سویا نیز نشان داد که تمام این ژن‌ها در سویا دارای الگوی یک اینترون و دو اگزون هستند (شکل پیوست ۶). بررسی فیلوژنتیک مشخص کرد که توالی پروتئینی ژن‌ها با الگوی اینترون و اگزون مشابه (یک اینترون و دو اگزون) در یک خوشه قرار می‌گیرند



شکل (۴-۱) درخت فیلوژنتیکی، توالی‌های آمینو اسیدی PAL با استفاده از الگوریتم ML و آزمون بوت استرپ با 1000 تکرار (Mega 7.0).

(تمام PAL های سویا و سه پروتئین Bd-PAL4, Bd-PAL5 و Bd-PAL8 در براکی‌پودیوم)، (شکل پیوست ۶). به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً ژن‌های PAL در سویا و ژن‌های *Bd-PAL4*، *Bd-PAL5* و *Bd-PAL8* هم منشأ هستند و سایر ژن‌های PAL در براکی‌پودیوم نیز حاصل دوبرابردگی‌هایی هستند که بعد از اشتقاق گونه‌های تک لپه و دولپه در گیاهان دولپه به وقوع پیوسته است. این نتایج با مقایسه درصد مشابهت این پروتئین‌ها با سایر پروتئین‌های PAL در براکی‌پودیوم و سویا نیز تایید می‌شود به این نحو که مقایسه درصد مشابهت نشان می‌دهد *Bd-PAL4* با تمام ژن‌ها چه در سویا و چه براکی‌پودیوم تفاوت تقریباً یکسانی دارد. احتمالاً این ژن پس از اشتقاق دو لپه‌ها از تک لپه‌ها، در براکی‌پودیوم دچار تغییرات و جهش‌ها شده است. *Bd-PAL5* و *Bd-PAL8* درصد مشابهت بالاتری با سایر PAL های براکی‌پودیوم نسبت به سویا دارند (جدول پیوست ۳). احتمالاً پس از انتقال این ژن‌ها به گیاهان دو لپه و اشتقاق بیشتر آن‌ها نسبت به ژن‌های اجدادی دوبرابر شدگی‌ها در سویا اتفاق افتاده است. به عبارتی دوبرابر شدگی‌ها در سویا بعد از اشتقاق گونه‌ها اتفاق افتاده است.

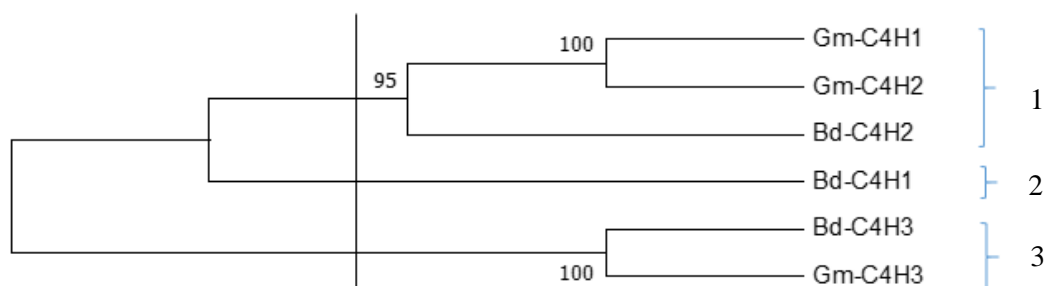
با توجه به تمام این شواهد می‌توان حدس زد که تمام PAL ها در براکی‌پودیوم حاصل دوبرابر شدگی‌هایی هستند که بعد از اشتقاق گونه‌ها اتفاق افتاده است. سپس طی روند تکامل ژن‌های *Bd-PAL4*

*Bd-PAL5* و *Bd-PAL8* اینترون به دست آورده‌اند. طبق نتایج کاس و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ی میزان واگرایی این ژن‌ها در گیاه براکی پودیوم، پروتئین‌های *Bd-PAL4*، *Bd-PAL5* از سایر PAL‌ها در این گیاه متفاوت‌تر می‌باشند. احتمالاً *Bd-PAL4* طی اشتقاق از دیگر PAL‌ها امکان دامیناسیون تیروزین را نیز پیدا کرده است.

به طور کلی اینترون‌ها نسبت به اگزون‌ها تراکم بیشتری در ژنوتیپ دارند و هنوز در برخی از رده‌های یوکاریوتی، اینترون‌های جدیدی تولید می‌شوند. با توجه به این نکته که اینترون‌ها هزینه‌ی زیادی را برای رونویسی و سپس حذف از رونوشت به سلول تحمیل می‌کنند هنوز علت ازدیاد آن‌ها طی تکامل کاملاً واضح و مشخص نیست. تاکنون برخی عملکردها از جمله دخالت در فرآیند پیرایش RNA، انتقال mRNA و تنظیم بیان ژن‌ها برای اینترون‌ها ذکر شده است. همچنین با توجه به اینکه اینترون‌ها حدود ۴۰ درصد از طول کلی ژن‌ها را تشکیل می‌دهند، می‌توان گفت ۴۰ درصد از جهش‌های تصادفی در اینترون‌ها رخ می‌دهد و به این ترتیب جهش‌ها خنثی می‌شوند (جو و چوی، ۲۰۱۵).

#### ۴-۳-۲ آنالیز تکاملی C4H

در بررسی‌های درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های C4H مشاهده شد که پروتئین‌های *Bd-C4H2*، *Gm-C4H1*، *Gm-C4H2* در یک خوشه قرار دارند (شکل ۴-۲). بررسی الگوی اینترون-اگزون ژن‌های کدکننده‌ی پروتئین‌های موجود در این خوشه نشان داد همه‌ی این ژن‌ها به جز *Bd-C4H2* (که دارای دو اینترون بود)، سه اینترون دارند (شکل پیوست ۷). با توجه به درصد مشابهت بالا و برابر با ۸۴ پروتئین-های *Gm-C4H1*، *Gm-C4H2* و *Bd-C4H2* فرضیه‌ی هم‌منشاء بودن آن‌ها مطرح می‌شود (جدول پیوست ۴). اما با توجه مشاهده‌ی درصد مشابهت بالا *Gm-C4H1*، *Gm-C4H2* (۹۸ درصد) می‌توان به این نتیجه رسید که احتمالاً یک ژن *C4H* هم‌منشاء با *Bd-C4H2* به گیاهان دولپه انتقال پیدا کرده است و سپس در گونه‌های دولپه دستخوش دوبرابردگی شده است. ژن *C4H* پس از انتقال به گیاه دولپه‌ی سویا طی تکامل اینترون بیشتری در خود جای داده‌اند.



شکل (۴-۲) درخت فیلوژنتیکی C4H برای توالی آمینو اسیدی با استفاده از الگوریتم ML و آزمون بوت استرپ با 1000 تکرار (Mega 7.0).

هرچند خوشه‌ی ۲ تنها Bd-C4H1 را در خود جای داده بود، اما بررسی دوبرابر شدگی نشان داد ژن‌ها درون براکی‌پودیوم حاصل ۲ دوبرابر شدگی هستند. با توجه به این نکته و با توجه به درصد مشابهت برابر با ۷۵ این ژن و ژن *Bd-C4H2* می‌توان به این نتیجه رسید که این سه ژن در براکی‌پودیوم احتمالاً طی ۲، دوبرابر شدگی ایجاد شده‌اند و سپس طی روند تکامل نسبت به هم تغییراتی همچون به دست آوردن اینترون را متحمل شده‌اند. در بررسی فیلوژنتیکی، خوشه‌ی ۳ که حاوی پروتئین‌های Bd-C4H3 و Gm-C4H3 بود، مشخص شد که ژن‌های مربوطه به این پروتئین‌ها الگوی اینترون و اگزون مشابهی دارند (یک اینترون و دو اگزون)، (شکل پیوست ۷). از کنار هم قرار دادن این مشاهدات و با توجه به درصد مشابهت این دو پروتئین که برابر ۷۰ (این مشابهت بیشتر از مشابهت ژن‌های مذکور با سایر ژن‌های درون گونه‌ی مربوط به خود می‌باشد) بود (جدول پیوست ۴)، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً ژن‌های *Gm-C4H3* نیز *Bd-C4H3* هم منشاء می‌باشند. با توجه به این نکته و این فرضیه که سه ژن *C4H* در براکی‌پودیوم حاصل دو برابر شدگی‌ها هستند، می‌توان به این نتیجه رسید که احتمالاً جد مشترک این ژن‌ها بعد از دو برابر شدگی‌ها در گیاهان تک لپه به گیاهان دو لپه منتقل شده است. به طور کلی می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که بعد از دو برابر شدگی ژن‌های *C4H* در گیاهان تک لپه، ژن‌ها به گیاهان دولپه منتقل شده‌اند و سپس این خانواده‌ی ژنی در گیاهان دولپه نیز طی دو برابر شدگی‌ها گسترش پیدا کرده‌اند. با این حال با توجه به درصد مشابهت بیش از ۶۳ درصد بین تمام

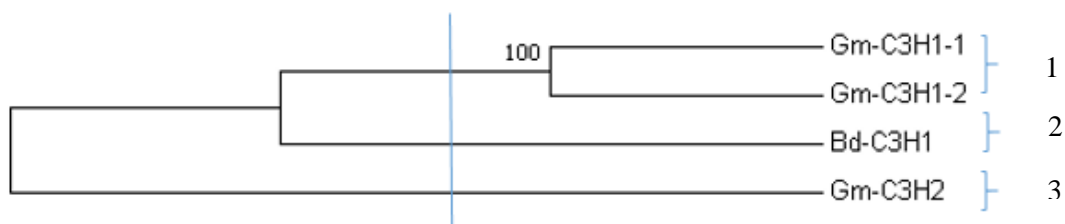


پروتئین‌ها می‌توان مشاهده کرد که توالی این پروتئین‌ها طی تکامل حفاظت شده است. در بررسی‌های ال‌تینگ و همکاران (۲۰۰۶)، نیز مشاهده شد که cDNA تعداد زیادی از *C4H* در گونه‌های مورد بررسی آن‌ها شباهت زیادی به هم داشتند.

#### ۳-۳-۴ آنالیز تکاملی *C3H*

بررسی فیلوژنتیکی توالی آمینو اسیدی *C3H*، نشان داد که پروتئین‌ها در سه خوشه‌ی مجزا، خوشه‌ی ۱ شامل *Gm-C3H1-1* و *Gm-C3H1-2*، خوشه‌ی ۲ شامل *Bd-C3H* و خوشه‌ی ۳، *Gm-C3H2* قرار گرفتند (شکل ۳-۴). هر چند ژن‌های *C3H* براکی‌پودیوم و سویا در درخت فیلوژنتیکی در دو خوشه‌ی مجزا قرار گرفتند، اما درصد مشابهت بیش از ۶۸ درصد (جدول پیوست ۵) بین توالی تنها پروتئین *C3H* در براکی‌پودیوم و *C3H* سویا می‌تواند هم منشاء بودن آن‌ها را نشان دهد. این فرضیه زمانی که به الگوی اینترون و اگزون این ژن‌ها توجه می‌کنیم، قوت می‌گیرد. همه‌ی ژن‌های *C3H* براکی‌پودیوم و سویا به جز حالتی که *Gm-C3H2* پروتئین *Gm-C3H2-2* را کد می‌کند، دارای دو ناحیه‌ی اینترون می‌باشند (شکل پیوست ۸ و جدول پیوست ۵). در بررسی ال‌تینگ و همکاران (۲۰۰۶) نیز *C3H* های گیاهان تک لپه و دو لپه در درخت فیلوژنتیکی در خوشه‌های جدا از هم قرار گرفتند. با این حال هیچ یک از ژن‌های *C3H* مورد بررسی آن‌ها نسبت به سایرین فاصله‌ی تکاملی زیادی نداشتند. با توجه به مشاهدات، ژن *Gm-C3H1* دو رونوشت دارد و دو واریانت پروتئین *Gm-C3H1* را تولید می‌کند (شکل ۳-۴). ایزوفرم‌های متفاوت احتمالاً در نتیجه‌ی پیرایش آلترناتیو<sup>۱</sup> تولید شده‌اند. برای تولید واریانت‌های پروتئینی جدید سلول‌ها دو مسیر پیش رو دارند، یکی دوبرابرشدگی ژن و تغییرات بعد از آن، و دیگری اضافه شدن یک اگزون به درون اینترون است. بازده تولید واریانت‌های جدید در پیرایش آلترناتیو بسیار بیشتر از دوبرابر شدگی است. با هر دوبرابر شدگی بعد از جدا شدن مسیر تکاملی ژن جدید و تغییر آن ژن تنها یک واریانت جدید به سلول اضافه می‌شود. اما با اضافه شدن یک اگزون درون یک اینترون و با

<sup>۱</sup> Alternative Splicing



شکل (۳-۴) درخت فیلوژنتیکی برای توالی آمینو اسیدی C3H با استفاده از الگوریتم ML و آزمون بوت استرپ با 1000 تکرار (Mega 7.0).

استفاده از ابزار پیرایش آلترناتیو امکان تولید تعداد زیادی پروتئین جدید در سلول فراهم می‌شود (پارک و گراولی، ۲۰۰۷). محصول پیرایش آلترناتیو می‌تواند نقش‌های مختلفی در سلول برعهده داشته باشند، یا در شرایط یا بافت‌های متفاوتی فعالیت کنند (پارک و گراولی، ۲۰۰۷؛ ترس و همکاران، ۲۰۱۷).

#### ۴-۴ بررسی مکان فعالیت پروتئین‌ها

همه‌ی آنزیم‌های مورد مطالعه در این پژوهش توسط چندین ژن همولوگ کد می‌شوند. با بررسی محل فعالیت محصول هر ژن و مقایسه‌ی آن با منابع قبلی به دنبال پاسخ این سوال بودیم که آیا ممکن است یک یا چند ژن از ژن‌های همولوگ کد کننده‌ی یک پروتئین برای مسیر بیوسنتز لیگنین اختصاصی شده باشند؟ برای پاسخ به این سوال مکان فعالیت پروتئین‌های کد شونده توسط هر ژن همولوگ در سلول بررسی شد و این مکان‌ها با اطلاعات قبلی در دسترس، در مورد مکان فعالیت آنزیم‌های درگیر در سنتز لیگنین مقایسه گردید. در مورد PAL، اگرچه مطالعات قبلی جایگاه فعالیت آنزیم را در سیتوپلاسم و غشا شبکه‌ی آندوپلاسمی نشان می‌دهد (بوروس و همکاران، ۲۰۱۵) (برای اطلاعات بیشتر به فصل ۱ مراجعه شود)، اما پایگاه داده‌ی Targetp نتوانست پتید نشانه‌ای در آنزیم‌های PAL شناسایی کند و پیشنهادی برای مکان فعالیت آنزیم‌های PAL ارائه دهد. همچنین برخلاف یافته‌های قبلی که مکان فعالیت C4H را در وزیکول‌ها، سیتوزول و دستگاه گلژی تایید کرده بود (بوروس و همکاران، ۲۰۱۵)، Targetp پتید نشانه‌ی ترشحی را برای این پروتئین شناسایی کرد. طی مرور منابع توسط بوروس و همکاران (۲۰۱۵) مشخص شد که تاکنون آنزیم C3H در مکانی غیر از غشا شبکه‌ی

آندوپلاسمی یافت نشده است. با این حال Targetp برای ژن‌های C3H در براکی‌پودیوم و سویا به ترتیب پپتید نشانه‌ی ترشحی و حضور در میتوکندری را پیشنهاد داد (جدول پیوست ۶). با توجه به وجود تناقض در مطالعات آزمایشگاهی و نتایج حاصل از Targetp باید در تحلیل و استنتاج نتایج حاصل از Targetp دقت نمود و ضرورتاً به نتایج به دست آمده از آن اکتفا ننمود. ضمن اینکه این یافته‌ها حکایت از این موضوع دارد که شاید این نرم افزار در حوزه‌ی گیاهی کاربرد ایده‌آلی ندارد یا اینکه باید الگوریتم‌های تدوین شده با توجه به یافته‌های مربوط به توالی‌های پروتئینی مرتبط با بیوسنتز لیگنین به روز رسانی گردد.

#### ۴-۵ بررسی برهمکنش‌های آنزیم‌های PAL، C4H و C3H

در ادامه به منظور مطالعات تکمیلی، برهمکنش‌های هر آنزیم با سایر آنزیم‌های سلول مورد بررسی قرار گرفت. بررسی برهمکنش‌های آنزیم‌های PAL در سویا و براکی‌پودیوم (جدول پیوست ۷ و شکل پیوست ۹) نشان داد که تمام ژن‌ها با سایر آنزیم‌های درگیر در مسیر فنیل پروپانوئید شامل آنزیم‌های 4CL، C4H دخیل در مسیر سنتز لیگنین برهمکنش دارند. به این ترتیب و با توجه به برهمکنش‌های آنزیم‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که شواهد قطعی برای پررنگتر بودن نقش یک PAL در مسیر بیوسنتز لیگنین وجود ندارد و به نظر می‌رسد که همه‌ی ژن‌های کد کننده‌ی این آنزیم به یک اندازه در این مسیر موثر می‌باشند.

در براکی‌پودیوم آنزیم‌های C4H با سایر آنزیم‌های انشعاب بیوسنتز لیگنین از مسیر فنیل پروپانوئید شامل 4CL، PAL، CCR برهمکنش دارند. به علاوه آنزیم‌های Bd-C4H1 و Bd-C4H2 با CHS<sup>۱</sup> نیز برهمکنش دارند. این آنزیم در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها، انشعابی دیگر از مسیر فنیل پروپانوئید شرکت دارد (فراسر و چاپل، ۲۰۱۱؛ زو و همکاران، ۲۰۱۷)، (شکل پیوست ۱۰). اما آنزیم Bd-C4H3 تنها با آن دسته از آنزیم‌های عمومی مسیر فنیل پروپانوئید برهمکنش دارد که در مسیر بیوسنتز لیگنین نیز

---

<sup>۱</sup> Chalcone Synthetase

شرکت دارند. نتایج در سویا نیز نشان داد که اگرچه هر سه ژن با سایر آنزیم‌های مسیر بیوسنتز لیگنین برهمکنش برقرار می‌کنند ولی آنزیم Gm-C4H3 تنها با آنزیم‌های موجود در مسیر عمومی فنیل پروپانویید که در بیوسنتز لیگنین نیز دخیل هستند، برهمکنش دارد. اما آنزیم‌های Gm-C4H1 و Gm-C4H2 با آنزیم‌های CHS و دی هیدروکسی فلاونویید ردوکتاز (DFR)<sup>۱</sup> نیز برهمکنش دارند. آنزیم DFR یکی دیگر از آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانویید است که در سنتز آنتوسیانین‌ها نقش دارد (پیکرت و همکاران، ۲۰۱۳). به این ترتیب می‌توان پیشنهاد داد آنزیم‌های Bd-C4H3 و Gm-C4H3 به ترتیب در براکی‌پودیوم و سویا نقش پررنگتری در بیوسنتز لیگنین دارند. اما دو آنزیم دیگر می‌توانند در سنتز فلاونوییدها نیز شرکت داشته باشند (جدول پیوست ۸ و شکل پیوست ۱۱).

نتیجه‌ی بررسی برهمکنش‌های آنزیم‌های C3H در سویا برهمکنش آنزیم‌های Gm-C3H1 با HCT و CCR که در بیوسنتز لیگنین نیز دخیل هستند را نشان داد. علاوه بر این، Gm-C3H1 با آنزیم کافئویل شیکیمات استراز<sup>۲</sup> (CSE) نیز برهمکنش دارد. مطالعات پیشین ارتباط لیگنیفیکاسیون و عملکرد این آنزیم را نشان داده است. وانهوم و همکاران (۲۰۱۶) کاهش محتوای لیگنین در موتانت‌های ژن‌های کد کننده‌ی این آنزیم را مشاهده کردند و پیشنهاد دادند که این آنزیم در سنتز لیگنین نقش دارد (شکل پیوست ۱۲). در براکی‌پودیوم علاوه بر برهمکنش آنزیم C3H با آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین شامل 4CL و CCR، برهمکنش با آنزیم فردوکسین<sup>۳</sup> (petF) نیز مشاهده شد (جدول پیوست ۹ و شکل پیوست ۱۳).

بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه داده‌ی<sup>۴</sup> uniprot، petF ها در کلروپلاست و فرآیند فتوسنتز (Bradi2g55680، Bradi5g09320، Bradi3g13170، Bradi2g23930) همچنین در میتوکندری (Bradi4g31120) حضور دارند. پروتئین petF می‌تواند در انتقال الکترون به سیتوکروم‌های P450 نیز

<sup>۱</sup> Dihydroflavonol 4-Reductase/Flavanone

<sup>۲</sup> Caffeoylshikimate Esterase

<sup>۳</sup> Ferredoxin

<sup>۴</sup> [Http://Www.Uniprot.Org/](http://www.uniprot.org/)

نقش ایفا کند. با توجه به حضور petF ها در اندامک‌های مختلف و برهمکنش آن با آنزیم C3H می‌توان پیش‌بینی کرد که C3H های مورد مطالعه در براکی‌پودیوم علاوه بر شرکت در بیوسنتز لیگنین وظایف متعدد و متفاوت دیگری نیز در سلول بر عهده دارند.

این بررسی‌ها نشان داد که در بسیاری از موارد آنزیم‌های مورد مطالعه‌ی ما با سایر آنزیم‌های مسیر بیوسنتز لیگنین که شاخه‌ای از مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد، برهمکنش برقرار می‌کنند. اگرچه این آنزیم‌ها می‌توانند در تعیین مقدار و محتوای لیگنین نقش داشته باشند. اما در تولید سایر محصولات مسیر فنیل پروپانوئید نیز دخیل هستند. به عنوان مثال 4CL که با همه‌ی آنزیم‌های مورد مطالعه در هر دو گیاه برهمکنش دارد، در سنتز مونومرهای سوپرین نقش دارد، که نقش‌های مهم و مختلفی در سلول برعهده دارند (برای اطلاعات بیشتر به بخش بررسی‌های هم‌بیانی مراجعه شود). پیش‌تر بروجان و همکاران (۲۰۰۳) نیز بیان کرده‌اند که تغییر در فعالیت یک آنزیم از مسیر بیوسنتز لیگنین ممکن است سطح ترکیبات حد واسط مسیر را تغییر دهد. آن‌ها پیش‌بینی کردند که به همین علت فنوتیپ پلیوتروپیک<sup>۱</sup> در برخی از رده‌های موتانت‌های این مسیر مشاهده می‌شود.

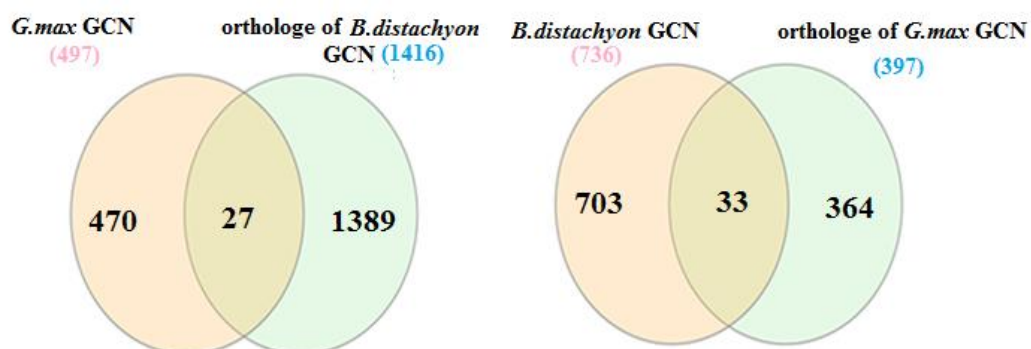
#### ۴-۶ بررسی هم‌بیانی

در این مرحله بررسی شبکه‌ی هم‌بیانی حفاظت شده (از این به بعد در متن، شبکه‌ی هم‌بیانی دلالت بر هم‌بیانی حفاظت شده دارد) برای ژن‌های کدکننده‌ی هر آنزیم انجام شد. این بررسی‌ها نشان داد که شبکه‌ی هم‌بیانی PAL در براکی‌پودیوم و سویا (جدول پیوست ۱۰ و ۱۱) به ترتیب حاوی ۳۳ و ۲۷ ژن می‌باشند (شکل ۴-۴)، که این ژن‌های هم‌بیان در هر دو گیاه در ۶ زیر شبکه هم‌بیانی حضور دارند، به این معنا که از ۸ ژن PAL در هر دو گیاه تنها ژن‌های هم‌بیان با ۶ ژن PAL در شبکه‌ی هم‌بیانی وجود داشت (شکل ۴-۵، جدول پیوست ۱۲). برخی از ژن‌های شبکه‌ی هم‌بیانی در بیش از یک زیر شبکه در یک گیاه وجود داشتند (شکل ۴-۴، جدول پیوست ۱۳).

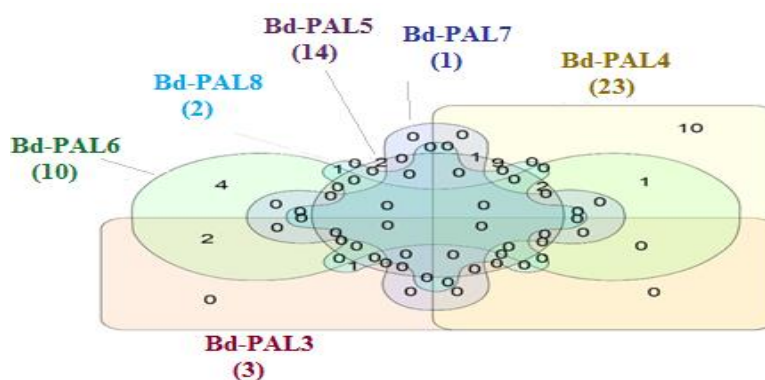
---

<sup>۱</sup> پلیوتروپیک یا Pleiotropic به حالتی گفته می‌شود که در آن یک ژن چندین صفت مختلف و غیر مرتبط را کنترل می‌کند.

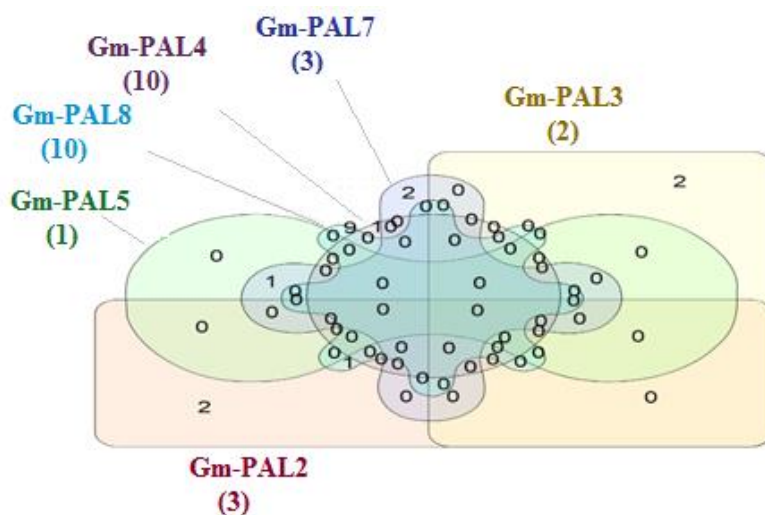
A



B



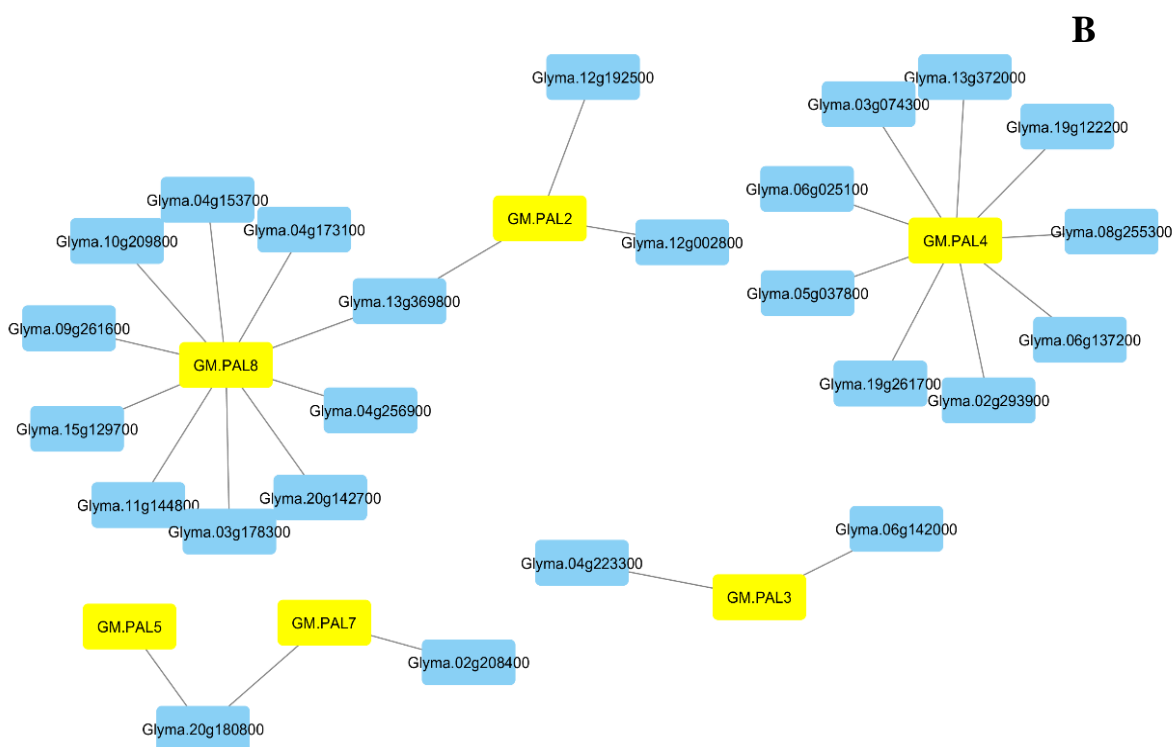
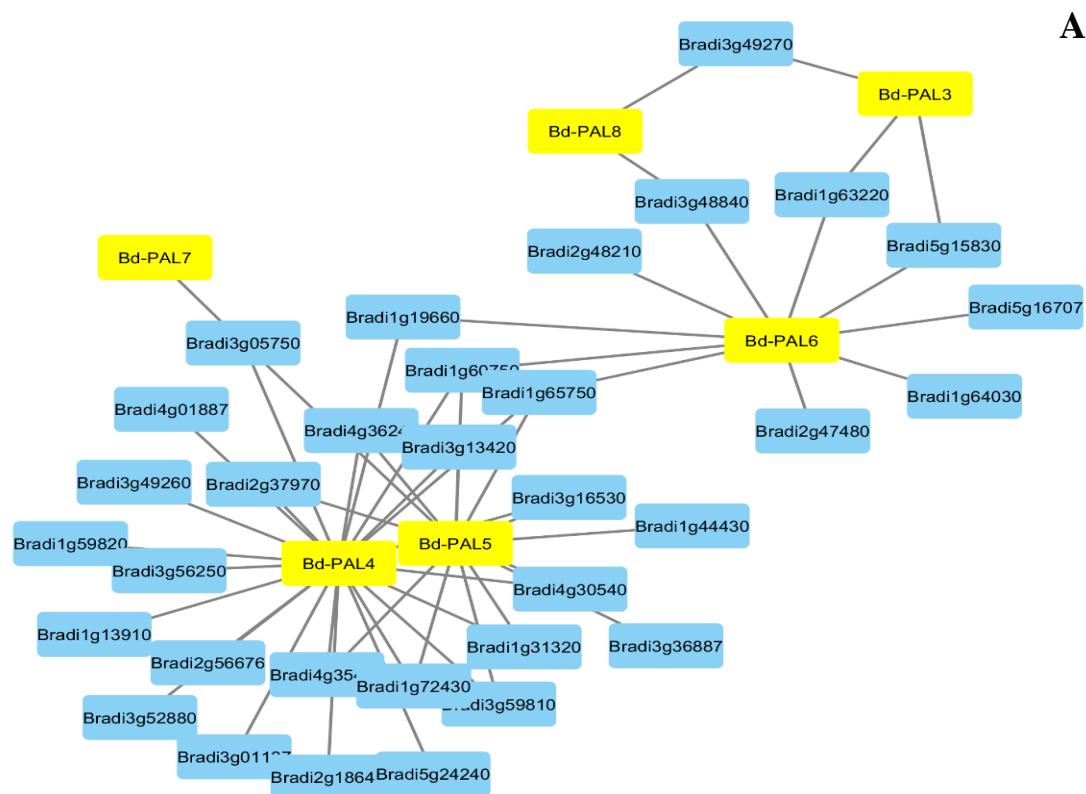
C



شکل (۴-۴) A: شبکه‌ی هم بیانی (GCN<sup>۱</sup>) حفاظت شده بین برای پودیموم و سویا به ترتیب شامل ۳۳ و ۲۷ ژن می‌باشد. نمودار ون اشتراک بین زیر شبکه‌های هم بیانی *B. PAL*: در گیاه برای پودیموم C: در سویا (جدول پیوست ۹) (interactivenn<sup>۲</sup>).

<sup>۱</sup> Gene Coexpression Network

<sup>۲</sup> [Http://www.interactivenn.net/](http://www.interactivenn.net/)



شکل (۴-۵) شبکه‌ی هم بیانی *PAL*: *A*: برای پودیم *B*: سویا (Cytoscape).

بررسی‌ها نشان داد که شبکه‌ی هم بیانی  $C4H$  در براکی‌پودیوم و سویا (جدول پیوست ۱۴ و ۱۵) به ترتیب حاوی ۱۹ و ۲۶ ژن می‌باشد (شکل ۴-۶ و ۷-۴). در هر دو گیاه ژن‌ها در دو زیرشبکه‌ی هم بیانی (جدول پیوست ۱۶) حضور داشتند. هیچ ژنی بین زیرشبکه‌های هم بیانی  $C4H$  مشترک نبود (شکل ۴-۶) عدم وجود ژن مشترک بین زیر شبکه‌ها در هر گیاه می‌تواند نشانگر سیر تکاملی مختلف ژن‌های همولوگ باشد. در بررسی شبکه‌ی هم بیانی  $C3H$  نیز مشاهده شد که براکی‌پودیوم و سویا به ترتیب ۱۵ و ۱۹ ژن در این شبکه دارند (جدول پیوست ۱۷ و ۱۸، شکل ۴-۸ و ۴-۹)، که این ژن‌ها در دو گیاه در یک زیرشبکه‌ی هم بیانی فعالیت می‌کنند (جدول پیوست ۱۹).

#### ۴-۶-۱ مطالعه‌ی Pathway Enrichment و عملکرد ژن‌های هم بیان

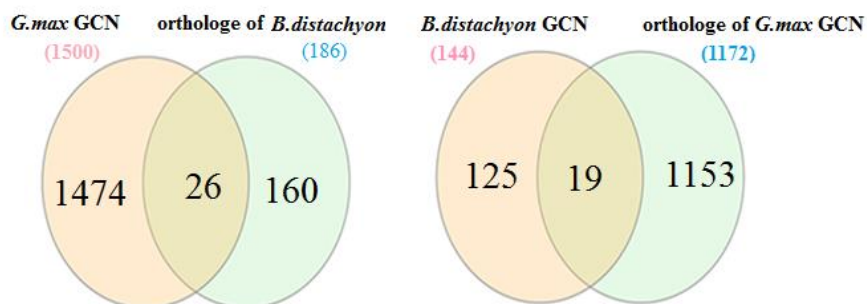
با توجه به این فرضیه که ژن‌های هم بیان در مسیرهای متابولیکی یکسانی فعالیت می‌کنند، شناخت سایر مسیرهای متابولیکی که با ژن‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین ارتباط دارند، می‌تواند توضیحی برای علت بروز برخی فنوتیپ‌های غیر منتظره پیدا کند، که بعد از مهندسی و تغییر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین در گیاه ایجاد می‌شود. به همین دلیل در این پایان نامه بررسی Pathway Enrichment در شبکه‌های هم بیانی  $PAL$  (جدول پیوست ۲۰، ۲۱ و شکل پیوست ۱۴)،  $C4H$  (جدول پیوست ۲۲، ۲۳ و شکل پیوست ۱۵) و  $C3H$  (جدول پیوست ۲۴، ۲۵ و شکل پیوست ۱۶) انجام شد. با توجه به اینکه تنها تعداد کمی از ژن‌ها در Pathway Enrichment در مسیرهای متابولیکی حضور داشتند، برای مطالعه‌ی دقیق‌تر شبکه‌های هم بیانی، عملکرد اثبات شده یا احتمالی ژن‌های هم بیان نیز مورد بررسی قرار گرفت (جدول پیوست ۲۶ و شکل پیوست ۱۷، ۱۸ و ۱۹).

#### ۴-۶-۱-۱ ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش‌ها

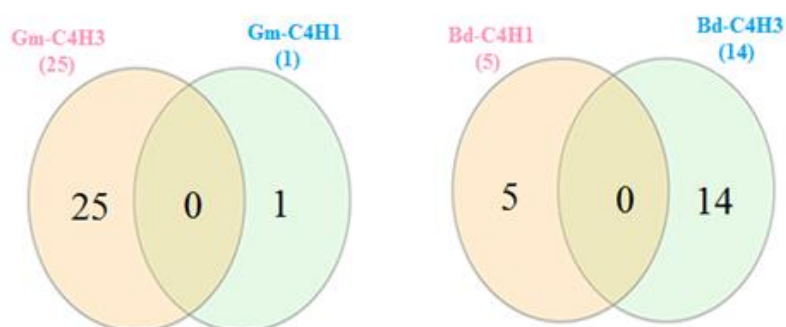
از ژن‌های هم بیان  $PAL$ ، ژن‌های  $Gm-PAL8$  (*Glyma.20g180800*)،  $Gm-PAL5$  (*Glyma.10g209800*)،  $COMT$  (*Glyma.06G137200*) و ژن  $4CL$  (*Glyma.13G372000*) در سویا و ژن‌های کد کننده‌ی  $Bd-PAL3$  (*Bradi3g48840*)،  $Bd-PAL5$  (*Bradi3g49260*)،  $Bd-PAL6$



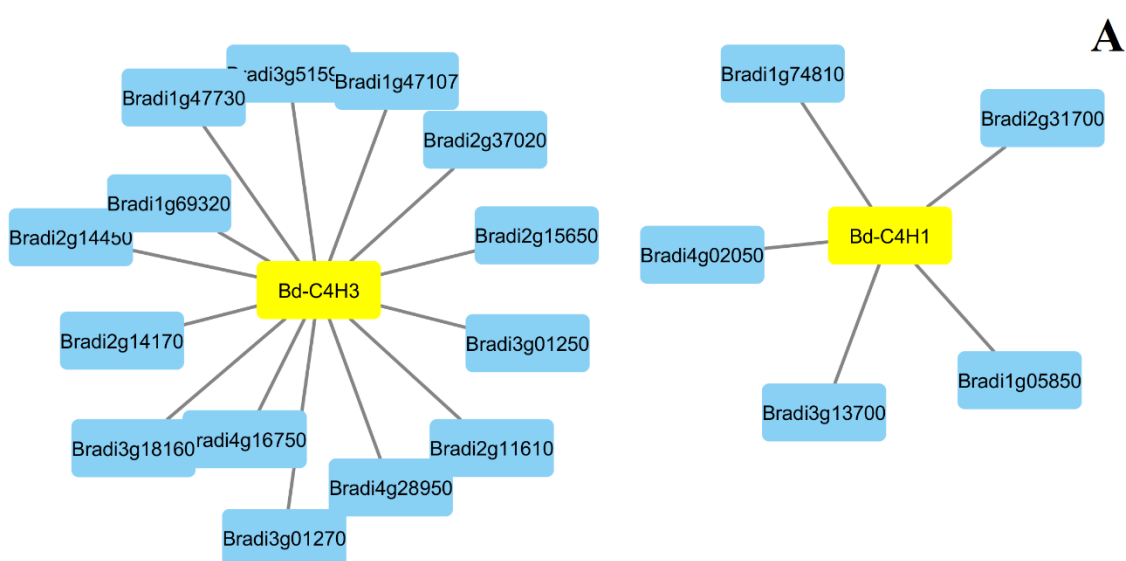
A

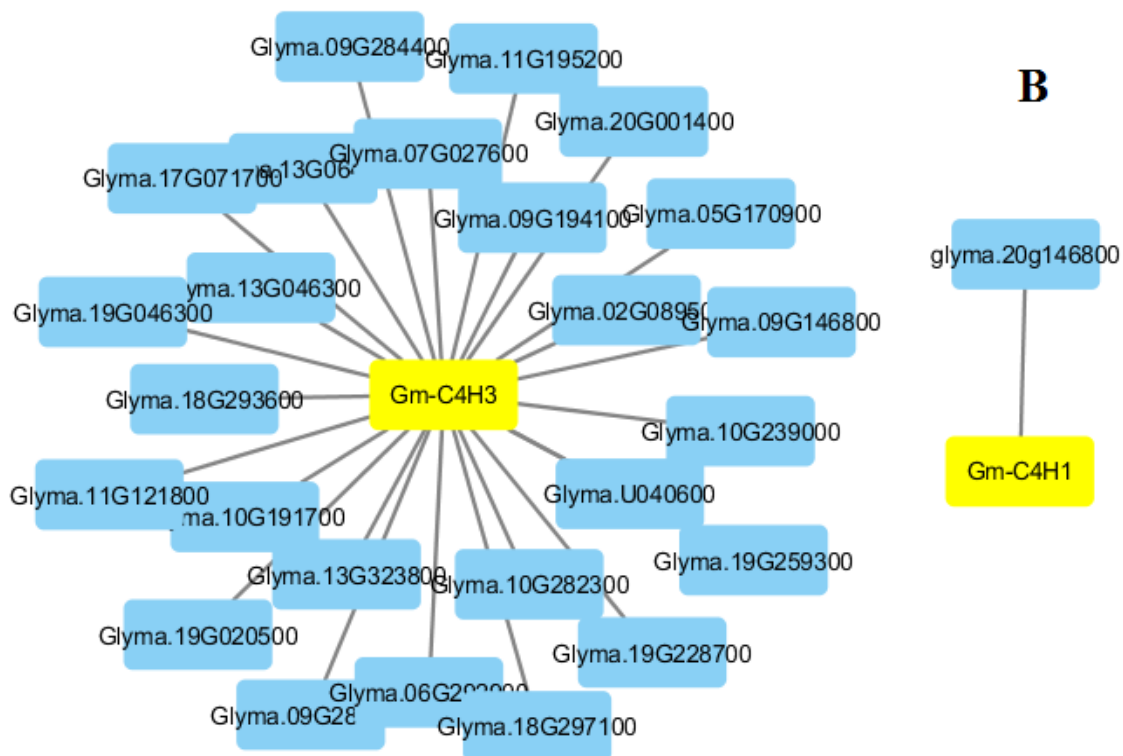


B

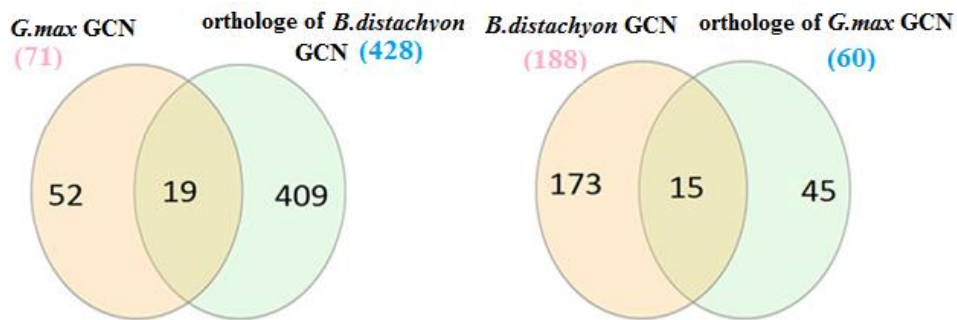


شکل (۴-۶) A: شبکه‌ی هم بیانی (GCN) حفاظت شده C4H بین دو گیاه برآکی پودیوم و سویا: به ترتیب حاوی ۱۹ و ۲۶ ژن در بود. B: بین زیر شبکه‌های هم بیانی C4H در دو گیاه هیچ ژن مشترکی وجود نداشت (interactivenn).

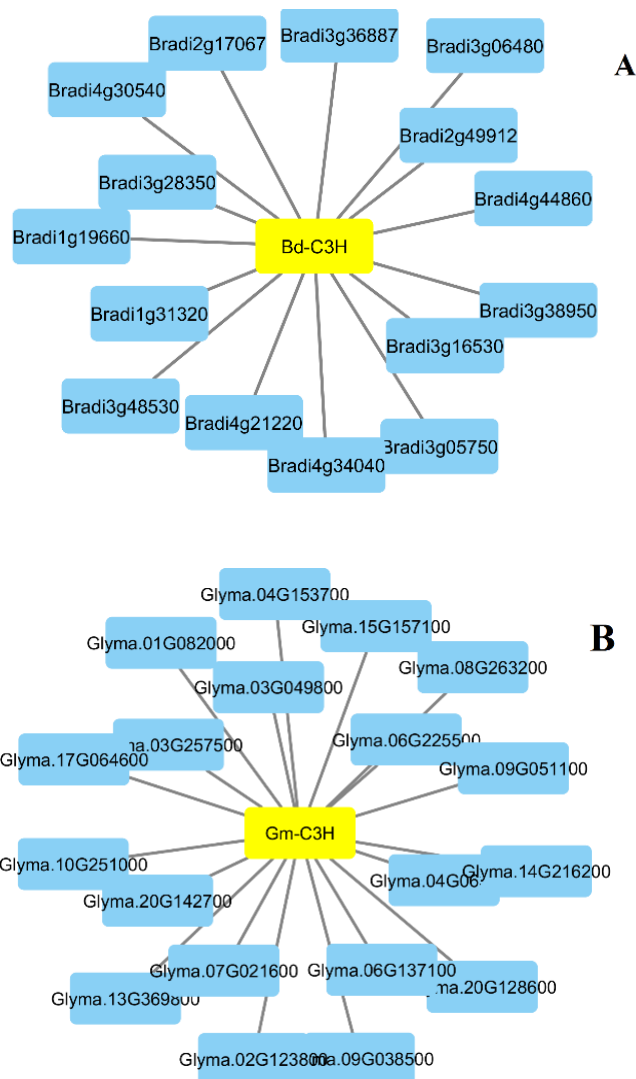




شکل (۴-۷) شبکه‌ی هم بیانی C4H، A: در براکی پودیوم B: سویا (Cytoscape).



شکل (۴-۸) شبکه‌ی هم بیانی (GCN) حفاظت شده *C3H* بین براکی پودیوم و سویا به ترتیب حاوی ۱۵ و ۱۹ ژن می‌باشد (interactivenn).



شکل (۴-۹) شبکه‌ی هم بیانی *C3H*: A: براکی‌پودیوم، B: سویا (Cytoscape).

و (*Bradi3g05750* و *Bradi1g31320*) 4CL، (*Bradi5g15830*) Bd-PAL8، (*Bradi3g49270*) COMT (*Bradi3g16530*) (همگی از ژن‌های دخیل در بیوسنتز لیگنین می‌باشند) در براکی‌پودیوم می‌توانند در مسیر بیوسنتز سوبرین (شکل ۱-۳) نقش ایفا کنند. به غیر از ژن‌های کد کننده‌ی 4CL در بالا، سایر ژن‌ها می‌توانند در مسیر بیوسنتز اسکوپلین و اسکولین<sup>۱</sup> نیز شرکت کنند. علاوه بر این، برخی ژن‌های 4CL دخیل در مسیر بیوسنتز کافئول گلوکارات (*Bradi1g31320*، *Bradi3g05750*) نیز در شبکه‌ی هم بیانی *PAL* براکی‌پودیوم حضور دارند.

<sup>1</sup> Superpathway Of Scopolin And Esculin Biosynthesis

شبکه‌ی هم بیانی *C3H* براکی‌پودیوم نیز حاوی ژن‌های *4CL* (*Bradi3g05750* و *Bradi1g31320*) دخیل در مسیر بیوسنتز ۴-هیدروکسی بنزوآت و کافئول گلوکارات می‌باشد. دو ژن اخیر به همراه ژن‌های کد کننده‌ی *COMT* (*Bradi3g16530*) در براکی‌پودیوم و ژن *COMT* (*Glyma.06G137100*) در شبکه‌ی هم بیانی *C3H* سویا، در مسیر بیوسنتز مونومرهای سوبرین درگیر هستند. ژن *4CL* (*Glyma.17G064600*) موجود در شبکه‌ی هم بیانی *PAL* در سویا نیز در مسیر بیوسنتز ۴-هیدروکسی بنزوآت نقش ایفا می‌کند.

محصول نهایی مسیرهای بیولوژیکی ذکر شده در بالا، شامل مسیر بیوسنتز اسکوپلین و اسکولین، مسیر بیوسنتز مونومرهای سوبرین، مسیر بیوسنتز ۴-هیدروکسی بنزوآت و کافئول گلوکارات که مشتقاتی از مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشند، در مقابله با تنش‌های گوناگون نقش دارند.

اسکوپلین و اسکولین از جمله کومارین‌های مشتق از مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشند (یوریتانی و همکاران، ۱۹۹۹؛ واسکور و همکاران، ۲۰۰۴؛ شکل ۱-۳؛ شکل پیوست ۲۰). اسکوپلین در بسیاری از تنش‌ها از جمله مواجهه با قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها و برخی از تنش‌های غیر زنده مثل زخم، فشار اسمزی و کاهش دما نقش دارد (یوریتانی و همکاران، ۱۹۹۹؛ چونگ و همکاران، ۲۰۰۲؛ گاچون و همکاران، ۲۰۰۴؛ شیمیزو و همکاران، ۲۰۰۵؛ بایومی و همکاران، ۲۰۰۸؛ ناومکینا و همکاران، ۲۰۱۰؛ دول و همکاران، ۲۰۱۸). *PAL* به عنوان اولین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید می‌تواند به طور مستقیم در بیوسنتز اسکوپلین و اسکولین شرکت کند (شکل پیوست ۲۰). اگرچه مطالعه‌ی شاران و همکاران (۱۹۹۸) نشان داده است که تنظیم سنتز اسکوپلین تا حدودی مستقل از تنظیم *PAL* می‌باشد و همیشه افزایش بیان *PAL* با افزایش سطح اسکوپلین همراه نیست. اما بررسی‌های زیادی نقش آنزیم *PAL* را در پاسخ به تنش‌ها به ویژه تنش‌های زنده اثبات کرده‌اند (کاسما و همکاران، ۲۰۱۵؛ زانگ و همکاران، ۲۰۱۷).

سوبرین ماکرومولکولی لیپوفنولیک است که در دیواره‌ی سلول‌های اختصاصی شده مانند سلول‌های

پریدرم یافت می‌شود. این پلیمر در محل زخم‌ها و محل ریزش برگ‌ها نیز رسوب می‌کند. N-فیرولولویل تیامین یکی از مونومرهای سازنده‌ی سوبرین و از مشتقات مسیر فنیل پروپانوئید است (شکل ۱-۳ و پیوست ۲۱). سوبرین نیز در مقاومت به قارچ‌ها نقش دارد (نووو و همکاران، ۲۰۱۷). پیش‌تر مشاهده شده بود که ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین و سوبرین توسط فاکتور نسخه برداری (TF) مشترکی از خانواده‌ی MYB تنظیم می‌شوند. کاسما و همکاران (۲۰۱۴) در موتانت‌های با بیان بالای این TF، سطح بالای سوبرین و لیگنین را مشاهده کرده بودند. MYB به دو طریق می‌تواند مسیر بیوسنتز لیگنین را کنترل کند. در مواردی مشاهده شده است که برخی از TF های این خانواده به طور مستقیم تنظیم بیان ژن‌های درگیر در این مسیر را القا می‌کنند، اما مواردی هم به عنوان Repressor از بیان ژن‌های این مسیر ممانعت می‌کنند (زانک و همکاران، ۲۰۱۶). در این مورد افزایش بیان MYB باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در مونولیگنول‌ها و انباشت سوبرین شده بود.

کافئول گلوکارات نیز از کلروژنیک اسید، یکی از مشتقات مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می‌شود (شکل ۱-۳ و پیوست ۲۲). این ترکیب پتانسیل شرکت در مکانیسم دفاعی در برابر گیاهخواران، باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را دارد (تویتچ باین و همکاران، ۲۰۱۰).

علاوه بر این ۴-هیدروکسی بنزوآت نیز از *P*-کومارات تولیدی در مسیر فنیل پروپانوئید مشتق می‌شود. این ترکیب یکی از اسیدهای فنولیک متصل به دیواره است که نقش مهمی در دفاع در برابر پاتوژن‌ها ایفا می‌کند (لوچر و هید، ۱۹۹۴؛ سیکار و همکاران، ۲۰۰۸؛ جانگ و همکاران، ۲۰۱۶؛ شکل ۱-۳).

مطالعات حاضر هم بیانی *PAL* و ژن‌های دخیل در بیوسنتز سایر ترکیبات با پتانسیل دفاع در برابر تنش‌های زنده را نشان داد. می‌توان پیشنهاد داد علت اینکه موتانت‌های *PAL* مقاومت خود را در برابر پاتوژن‌ها از دست می‌دهند (کاس و همکاران، ۲۰۱۵)، وجود رابطه‌ی هم بیانی بین *PAL* و مسیرهای یاد شده باشد. آزمودن این فرضیه نیاز به تحقیقات بیشتر در آزمایشگاه دارد به عنوان مثال باید ارتباط

سطح این ترکیبات در شرایط مختلف قبل و بعد از اعمال تنش‌ها بررسی شود و با تغییرات میزان بیان *PAL* و سایر ژن‌های هم بیان آن در سویا و براکی پودیوم مقایسه شود.

اگرچه تاکنون نقش *C3H* در تنش‌های زنده گزارش نشده است، اما سانگ و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که بیان *C3H* نیز در تنش‌های غیر زنده مانند زخم، سرما،  $H_2O_2$ ،  $NaCl$  و متیل جاسمونات افزایش می‌یابد. با توجه به این مطالعات می‌توان پیش بینی کرد که ژن‌های *C3H* در مکانیسم دفاعی در برابر پاتوژن‌ها دخیل باشد. پیشنهاد می‌شود که نقش ژن‌های *C3H* در مواجهه با پاتوژن‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

مشاهده شد شبکه‌ی هم بیانی *C3H* حاوی برخی از متیل آدنین گلیکوزیلازهای (*Glyma.02G123800*، *Glyma.08G263200*، *Glyma.01G082000* و *Bradi3g38950*) دخیل در ترمیم DNA هنگام مواجهه با UV می‌باشد. پیش تر نقش برخی از سیتوکروم‌های P450 در پاسخ به UV گزارش شده بود (سانگ و همکاران، ۲۰۱۲). به این ترتیب می‌توان پیش بینی کرد که ژن‌های کد کننده‌ی *C3H* دخیل در بیوسنتز لیگنین در گیاهان مورد مطالعه می‌توانند در پاسخ به UV شرکت کنند.

در شبکه‌ی هم بیانی *C4H* سویا و براکی پودیوم نیز به ترتیب ۵ و ۲ ژن درگیر در پاسخ به تنش‌ها حضور دارند. از این بین محصول ژن *Bradi2g37020* در براکی پودیوم و ژن‌های *Glyma.20G001400*، *Glyma.09G284700*، *Glyma.09G284400* و *Glyma.10G191700* در سویا پراکسیدازهایی بودند که علاوه بر پلیمریزاسیون لیگنین در مکانیسم دفاعی در برابر تنش‌های اکسیداتیو نیز نقش ایفا می‌کنند. ژن‌های *Glyma.19G228700* و *Bradi2g11610* کد کننده‌ی Universal Stress Protein A ها هستند. اگرچه تاکنون نقش دو ژن اخیر در سویا و براکی پودیوم بررسی نشده است، با این حال پروتئین‌های این خانواده در شرایط تنش‌هایی چون گرما، فقدان مواد مغذی، حضور اکسیدان‌ها، عوامل آسیب به DNA و یا سایر تنش‌هایی که ممکن است رشد سلول را متوقف کنند، نقش دارند (تیکچاک و همکاران، ۲۰۱۳). بررسی بیان و نقش ژن‌های کد کننده‌ی Universal Stress Protein A در تنش‌های

اخیر و تنش‌هایی که  $C4H$  در پاسخ به آن‌ها شرکت می‌کند، از جمله تنش‌های نور، زخم، سرما، خشکی، شوری و آلودگی قارچی (لئونگ و همکاران، ۱۹۹۷؛ مزوتانی و همکاران، ۱۹۹۷؛ نیر و همکاران، ۲۰۰۲؛ ریز و همکاران، ۲۰۰۳؛ کومار و همکاران، ۲۰۱۶) می‌تواند گزینه‌های جدیدی برای مهندسی لیگنین ایجاد کند.

#### ۴-۶-۱-۲ ژن‌های دخیل در بیوسنتز سایر پلیمرهای دیواره

مطالعه‌ی Pathway Enrichment نشان داد، برخی از ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی  $C3H$  در بیوسنتز سلولز نقش دارند (*Bradi2g49912*، *Bradi3g28350* و *Bradi4g30540* در براکی‌پودیوم و *Glyma.04G063800*، *Glyma.04G153700*، *Glyma.09G051100*، *Glyma.15G157100* و *Glyma.06G225500* در سویا). ژن‌های *Glyma.04G153700* و *Bradi4g30540* علاوه بر شبکه‌ی هم بیانی  $C3H$  در شبکه‌ی هم بیانی  $PAL$  نیز حضور دارند. هانداکومبورا و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که سه ژن *Bradi2g49912*، *Bradi3g28350* و *Bradi4g30540* در بیوسنتز سلولز دیواره‌ی ثانویه نقش ایفا می‌کنند. با این حال نقش ژن‌های یاد شده در سویا تاکنون مطالعه و تایید نشده است. پیش بینی می‌شود که این ژن‌ها نیز در سنتز سلولز دیواره‌ی ثانویه دخیل باشند. پیشنهاد می‌شود با ایجاد موتانت‌های ژن‌های مذکور در سویا عملکرد آن‌ها در سنتز سلولز دیواره‌ی ثانویه مطالعه شود.

علاوه بر ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم سلولز سنتاز، ژن‌های *UGT* (*Glyma.03G178300*)، *Bradi1g65750* و *Bradi2g37970* دخیل در سنتز همی‌سلولز زایلان نیز در شبکه‌ی هم بیانی  $PAL$  حضور دارند. مانند سلولز، همی‌سلولزها نیز در بهبود بیوماس به منظور تولید خوراک دام و همچنین زیست‌پالایی اهمیت دارند. به علاوه این فرضیه وجود دارد که لیگنین به واسطه‌ی زایلان به سلولز متصل می‌شود وجود دارد. لیزاکوسکی و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از بیومس موتانت‌های ژن‌های مسیر بیوسنتز زایلان‌ها در آرابیدوپسیس نشان دادند که تغییر ساختار زایلان بازده ساکاریفیکاسیون<sup>۱</sup> را در

<sup>۱</sup> هیدرولیز پلی ساکاریدها به قندهای محلول

تولید قندهای گلوکز تا ۳۰ درصد و در تولید قندهای زایلان تا ۷۰۰ درصد افزایش داد. به علاوه ژن‌های *UGT* می‌توانند در گلیکوزاسیون مونولیگنول و پلیمریزاسیون آن‌ها نیز نقش ایفا کنند. اگرچه نقش ژن‌های مذکور در سنتز زایلان تایید شده است اما نقش آن‌ها در اتصال لیگنین و سلولز (نقش در بازده ساکاریفیکاسیون) و همچنین پلیمریزاسیون لیگنین بررسی نشده است.

#### ۴-۶-۱-۳ ژن‌های درگیر در تنظیم مسیر فنیل پروپانویید

به ترتیب ۴ و ۵، TF در شبکه‌ی هم بیانی *PAL* در براکی‌پودیوم (*Bradi1g63220*, *Bradi1g13910*)، *Glyma.05G037800*، *Glyma.04G223300* و *Bradi3g52880* و *Bradi5g16707* (بین *Glyma.06G142000*، *Glyma.15G129700* و *Glyma.09G261600*) یافت شد. از این بین *Bradi1g63220* از فاکتورهای نسخه برداری در براکی‌پودیوم در تنظیم بیان دو زیرشبکه‌ی هم بیانی (*Bd-PAL6* و *Bd-PAL4*) حضور دارد. این TF از خانواده‌ی، *WRKY70* می‌باشد. TF های *Glyma.06G142000* و *Glyma.04G223300* در سویا نیز از خانواده‌ی *WRKY70* هستند. این خانواده-ی TF نه تنها بیان برخی از ژن‌های مورد نیاز برای پاسخ به بیماری را هنگام مواجهه گیاه با پاتوزن تنظیم می‌کند، بلکه در زمان عدم حضور پاتوزن بیان برخی دیگر از ژن‌های مورد نیاز برای پاسخ به بیماری را سرکوب می‌کند (ژو و همکاران، ۲۰۱۸). احتمالاً هم بیانی این *WRKY70* ها با *PAL* منجر به پاسخ‌های دفاعی از جمله تنظیم بیان ژن‌های سایر مسیرهای موثر در پاسخ به تنش‌ها می‌شود. در شبکه‌ی هم بیانی *PAL* ژن‌های *Bradi1g13910*، *Glyma.15G129700*، TF هایی از خانواده‌ی Homeobox-leucine zipper protein مشاهده شد. پیش‌تر مشخص شده بود که برخی TF های این خانواده در آرابیدوپسیس، هنگام تشکیل بافت آوندی بیان بالایی دارند (شینیا و همکاران، ۲۰۱۶). احتمالاً *PAL* ها در سویا و براکی‌پودیوم نیز از طریق هم بیانی با فاکتورهای نسخه برداری *Bradi1g13910*، *Glyma.15G129700* تشکیل بافت آوندی و لیگنیفیکاسیون دیواره‌ی ثانویه را تنظیم و کنترل می‌کنند. *Glyma.05G037800*، *Bradi3g52880* نیز دو ژن کد کننده‌ی TF های خانواده‌ی



Dof zinc finger protein می‌باشند. تاکنون گزارشاتی مبنی بر نقش این TF ها در تنظیم پاسخ گلدھی به دورهی نوری وجود داشته است (فورنارا و همکاران، ۲۰۰۹؛ سونگ و همکاران، ۲۰۱۲). فاکتورهای نسخه برداری خانوادهی MYB نیز در شبکهی هم بیانی PAL حضور داشتند (*Glyma.09G261600*, *Bradi5g16707*). طیف وسیعی از اعضا این خانواده در تنظیم مسیر بیوسنتز لیگنین دخیل هستند (لی و همکاران، ۲۰۱۷؛ لیو و همکاران، ۲۰۱۸). تاکنون عملکرد این دو ژن در سویا و برآکی پودیوم و در تنظیم مسیر بیوسنتز لیگنین بررسی نشده است. همانطور که اشاره شد عملکرد این ژن‌ها هنوز در گیاهان مورد مطالعهی ما به اثبات نرسیده است. با بررسی بیشتر این ژن‌ها در آزمایشگاه احتمالاً می‌توان به ژن‌های هدفی در جهت تنظیم لیگنیفیکاسیون و یا مکانیزم‌های دفاعی دست یافت.

در شبکهی هم بیانی PAL دو ژن *Glyma.12G002800*, *Bradi2g56676* پروتئین‌های متصل شونده به <sup>۱</sup> RNA (RBP) را کد می‌کنند. عملکرد محصول این دو ژن در سلول مشخص نیست، اما RBP در تنظیم بیان در سطح بعد از ترجمه (لی و کانگ، ۲۰۱۶)، رشد و توسعهی گیاهان و پاسخ به تنش‌ها (لورکوویچ و همکاران، ۲۰۰۹؛ منگون و همکاران، ۲۰۱۰) نقش دارند. پیشنهاد می‌شود، نقش این دو ژن به ویژه در تنش‌های زنده در آزمایشگاه بررسی شود. در صورتی که این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های زنده نقش داشته باشند، تولید گیاهانی با تغییر بیان RBP همزمان با کاهش بیان PAL احتمالاً منجر به تولید گیاهان با لیگنین کمتر می‌شود، که در برابر تنش‌ها به ویژه تنش‌های زنده حساسیت نشان نمی‌دهد. تولید بیوماس با چنین مشخصاتی در صنایعی چون کاغذسازی و تولید سوخت‌های زیستی به صرفه جویی در هزینه‌ها و افزایش بازده می‌انجامد.

در شبکهی هم بیانی PAL ژن‌های دخیل در مسیر سنتز کوريسمات (*Glyma.02G208400*, *Bradi1g60750*) نیز حضور دارند. کوريسمات یکی از ترکیبات حدواسط برای چند متابولیت ضروری

---

<sup>1</sup> RNA Binding Proteines

است و می‌تواند منجر به سنتز آمینواسیدهای آروماتیک L-فنیل آلانین و L-تیروزین شود (تین و گاليله، ۲۰۱۰). هم بیان بودن ژن‌های این مسیر و PAL می‌تواند در جهت تنظیم سنتز این آمینو اسیدها و مسیر فنیل پروپانوئید موثر باشد.

علاوه بر این پروتئین‌های غشایی دخیل در انتقال نیترات (*Glyma.11G195200*, *Bradi3g01250* و *Bradi3g01270*) در شبکه‌ی هم بیانی *C4H* حضور دارند. پیش‌تر فریتز و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند که در شرایط کمبود نیتروژن افزایش چشمگیری در سطح بسیاری از متابولیت‌های ثانویه‌ی حاصل از مسیر فنیل پروپانوئید در توتون دیده می‌شود. همچنین کمبود نیتروژن منجر به افزایش لیگنیفیکاسیون در ساقه‌های توتون شده بود. علاوه بر این آن‌ها افزایش بیان در ژن‌های *C4H*، *PAL* و *4CL* را مشاهده کردند. آن‌ها همچنین گزارش کردند که بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز آمینو اسیدهای آروماتیک افزایش پیدا نکرد و میزان آمینو اسیدهای آروماتیک در سلول کاهش یافت. آن‌ها بیان کرده‌اند که دلیل ارتباط کمبود نیترات و افزایش فنیل پروپانوئیدها به علت بالا رفتن سطح کربوهیدراتها در شرایط کمبود نیترات و در نتیجه تحریک تولید متابولیت‌های فنیل پروپانوئید بوده است. فریتز و همکاران (۲۰۰۶) اذعان کرده‌اند وجود چنین رابطه‌ای بین سطح کربوهیدراتها و متابولیت‌های فنیل پروپانوئید بعید است. طبق مشاهدات ما این افزایش سطح می‌تواند در نتیجه‌ی هم بیانی *C4H* و نیترات ترانسپورترها باشد. به این ترتیب می‌توان علت افزایش متابولیت‌های فنیل پروپانوئید طی کمبود نیتروژن را توضیح داد. به علاوه این سوال ایجاد می‌شود که آیا ممکن است در زمان کمبود نیتروژن در سلول آمینو اسیدهای فنیل آلانین و تیروزین در مسیر فنیل پروپانوئید قرار گیرند تا به این نحو آمونیاک بیشتری تولید شود (شکل پیوست ۱، الف) و سلول نیتروژن مورد نیاز خود را فراهم کند؟ درک این مساله به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

#### ۴-۶-۱-۴ ژن‌های با پتانسیل دخالت در پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون لیگنین

بررسی عملکرد ژن‌های هم بیان نشان داد به ترتیب ۲ و ۴ اندوگلوکاناز در شبکه‌ی هم بیانی *PAL* سویا

(*Bradi3g59810*, *Bradi1g44430*) و براکی‌پودیوم (*Glyma.06G025100* و *Glyma.02G293900*)  
*Bradi4g01887* و *Bradi4g36240*) وجود دارند. اندوگلوکانازها در عمل دگلیکولیزاسیون مونولیگنولها  
نقش دارند. به طور کلی آنزیم‌های دخیل در گلیکولیزاسیون و دگلیکولیزاسیون نقش پررنگی در  
پلیمریزاسیون و سنتز لیگنین دارند (کاپوتی و همکاران، ۲۰۱۲؛ ژلدنر و همکاران، ۲۰۱۳). عملکرد این  
اندوگلوکاناز تاکنون در سلول بررسی نشده است. این ژن‌ها می‌توانند ژن‌های کاندیدا در تنظیم  
پلیمریزاسیون و محتوای لیگنین در دیواره باشند. اگرچه موتانت‌های *PAL* همزمان با کاهش لیگنین  
فوتوپهایی چون حساسیت به تنش‌ها را از خود بروز می‌دهند. اما به نظر می‌رسد *PAL* کنترل میزان  
و محتوای لیگنین و ایجاد مقاومت به تنش‌ها را با هم بیانی با برخی ژن‌های خاص مثل گیرنده‌ها، TF  
ها و اندوگلوکاناز انجام می‌دهد. با بررسی این ژن‌ها (جدول پیوست ۲۶) در آزمایشگاه احتمالا می‌توان  
به ژنی دست یافت که تنها بر میزان لیگنین تاثیر گذار باشد.

بررسی‌ها نشان داد که ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین‌های *CASP* (*Glyma.06G292900*،  
*Glyma.05G170900*، *Bradi2g31700* و *Bradi4g02050*) در شبکه‌ی هم بیانی *C4H* حضور دارند.  
در مطالعات قبلی مدلی برای لیگنیفیکاسیون مطرح شده بود که در آن یک پروتئین *CASP* به طور  
غیر مستقیم و در همکاری با یک <sup>۱</sup>SOD ناشناخته در کنترل پراکسیدازهای دخیل در پلیمریزاسیون  
لیگنین نقش ایفا می‌کنند (ژلدنر و همکاران، ۲۰۱۳). زمانی که به حضور همزمان این ژن‌ها و ژن‌های  
کد کننده‌ی پراکسیداز در شبکه‌ی هم بیانی *C4H* توجه می‌کنیم، اهمیت هم بیانی ژن‌های کد کننده‌ی  
پروتئین‌های *CASP* با *C4H* بیشتر مشخص می‌شود و نقش این ژن‌ها در لیگنیفیکاسیون محتمل تر  
خواهد بود. پیشنهاد می‌شود تاثیر کاهش بیان ژن‌های مذکور بر پلیمریزاسیون لیگنین مشخص شود.  
این احتمال وجود دارد که با کاهش بیان ژن‌های مذکور پلیمریزاسیون لیگنین نیز کاهش یابد.

---

<sup>1</sup> Superoxide dismutase

بررسی‌ها نشان داد برخی از پراکسیدازهای موجود در شبکه‌ی هم بیانی  $C4H$  سویا و براکی پودיום علاوه بر پلیمریزاسیون لیگنین در تجزیه‌ی فلاونوئیدهایی نظیر بایکالئین (شکل پیوست ۲۳)، لوتولین تری گلوکورونید (شکل پیوست ۲۴) نیز شرکت دارند. پراکسیداز با شکستن هیدروژن پراکسید تجزیه‌ی این ترکیبات را کاتالیز می‌کند. هرچند این واکنش‌ها منجر به سم زدایی سلول می‌شوند (گالاتی و همکاران، ۲۰۰۱؛ چوی و همکاران، ۲۰۱۶)، با این حال می‌توانند با از دسترس خارج کردن هیدروژن پراکسید مورد نیاز پلیمریزاسیون لیگنین بر روی ساختار و محتوای آن تاثیر گذار باشد. احتمالاً این رابطه‌ی هم بیانی است که باعث پلیمریزاسیون نشدن مونولیگنول‌ها در موتانت‌های  $C4H$  آرابیدوپسیس می‌شود و به این ترتیب کاهش سطح لیگنین در موتانت‌های  $C4H$  با انباشت محصولات پایانی مسیر فنیل پروپانویید در سلول همراه می‌شود (شیلمیلر و همکاران، ۲۰۰۹).

وجود اسکوربات اکسیدازهای *Bradi4g28950* و *Glyma.U040600* در شبکه‌ی هم بیانی  $C4H$  می‌تواند پلیمریزاسیون لیگنین را افزایش دهد. در واقع اسکوربات می‌تواند فعالیت آنزیم‌های شکل دهنده‌ی لیگنین مثل پراکسیدازهای اختصاصی تولید لیگنین را مهار کند. این عمل به وسیله‌ی محدود کردن هیدروژن پراکسید یا کاهش محصولات آنزیمی پروکسیداز انجام می‌شود. در واقع در هنگام تهاجم پاتوژن‌ها عمل اسکوربات اکسیداز می‌تواند، عمل آنزیم‌های بیوسنتز کننده‌ی لیگنین را تسهیل کند (فلتون و همکاران، ۱۹۹۳). تا به امروز نقش ژن‌های مذکور در لیگنیفیکاسیون مورد بررسی قرار نگرفته است.

#### ۴-۶-۱-۵ ژن‌های دخیل در سنتز لیگنان‌ها

ژن‌های *Bradi2g37020*، *Bradi4g28950* و *Glyma.09g284400*، *Glyma.09g284700*، *Glyma.10g191700*، *Glyma.20g001400* و *Glyma.u040600* موجود در شبکه‌ی هم بیانی  $C4H$  در مسیر بیوسنتز لیگنان ماتریسینول مشتق از کونفریل الکل شرکت دارند (تپونو و همکاران، ۲۰۱۶؛ شکل ۱-۳؛ شکل پیوست ۲۵). اگرچه تاکنون عملکرد ماتریسینول در گیاهان بررسی نشده است، اما

مطالعات فراوانی بر روی نقش این لیگنان در سلامت بشر صورت گرفته است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند، ماترسینول فعالیت ضد آنژیوژن<sup>۱</sup>، ضد سرطان، ضد قارچ و ضد پوکی استخوان دارد (چو و همکاران، ۲۰۱۴). شبکه‌ی هم‌بیانی *C4H* در سویا حاوی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز جاستیسایدن B نیز می‌باشد. این لیگنان طی چند واکنش از واحدهای کونفریل الکل سنتز می‌شود (شکل پیوست ۲۶، همتی و سراجی، ۲۰۱۶). نقش جاستیسایدن B همچون ماترسینول و بسیاری از لیگنان‌ها درون گیاه مورد بررسی قرار نگرفته است، اما نقش آن در درمان بیماری‌های بشر تایید شده است (همتی و سراجی، ۲۰۱۶). با توجه به این اطلاعات می‌توان پیش بینی کرد که تغییر در بیان *C4H* می‌تواند سنتز برخی از لیگنان‌ها را با مشکل رو به رو کند، و این احتمال وجود دارد که نقش *C4H* در پاسخ نسبت به نور، زخم، سرما، خشکی، شوری و آلودگی قارچی (لئونگ و همکاران، ۱۹۹۷؛ مزوتانی و همکاران، ۱۹۹۷؛ نیر و همکاران، ۲۰۰۲؛ ریز و همکاران، ۲۰۰۳؛ کومار و همکاران، ۲۰۱۶) به علت هم‌بیانی با مسیرهای سنتز لیگنان‌ها باشد از همین رو پیشنهاد می‌شود که نقش این لیگنان‌ها در تنش‌های یاد شده مورد بررسی قرار گیرد.

#### ۴-۶-۱-۶ ژن‌های درگیر در مسیر انتقال سیگنال

بررسی عملکرد شبکه‌ی هم‌بیانی *PAL* مشخص کرد که تعداد ۴ و ۵ ژن با فعالیت کینازی و عملکرد نامشخص به ترتیب در براکی‌پودیوم و سویا حضور دارند (*Glyma.08G255300*، *Glyma.12G192500*، *Bradi2g47480*، *Glyma.19G261700*، *Glyma.11G144800*، *Glyma.03G074300*، *Bradi3g56250* و *Bradi1g72430* و *Bradi3g01137*). محصول این ژن‌ها می‌توانند در مسیر انتقال سیگنال شرکت کنند. از این بین ژن‌های *Glyma.12G192500* و *Bradi2g47480* پروتئین‌های MAPKKK را کد می‌کنند که می‌توانند عضوی از مدل‌های انتقال سیگنال بر اساس آبشارهای پروتئینی MAPK باشند. نقش مهمی در رشد و تکامل گیاهان همچنین در پاسخ به تنش‌های

<sup>۱</sup> آنژیوژنز فرآیندی فیزیولوژیک است که از طریق آن عروقی خونی جدید از عروق خونی پیشین تشکیل می‌شود.

چندگانه دارد (فنج و همکاران، ۲۰۱۶؛ شکل پیوست ۲۷). هم بیانی این پروتئین‌ها و PAL می‌تواند مسیر انتقال سیگنال بر اساس آبخارهای پروتئینی MAPK را فعال کند و به این ترتیب منجر به پاسخ‌های رشدی، متابولیکی و مقاومت در برابر تنش‌ها شود. سایر کینازها هم بیان که همگی گیرنده‌هایی در سطح غشا هستند، می‌توانند سیگنال‌ها (زنده و غیر زنده) را از محیط دریافت کنند و آن‌ها را در اختیار سایر اعضا مسیر انتقال سیگنال MAPK و یا دیگر مسیرهای انتقال سیگنال قرار دهند و در نهایت منجر به پاسخ‌های سلولی (نظیر لیگنیفیکاسیون) شوند. هرچند عملکرد این گیرنده‌ها قبلاً در گیاهان مورد مطالعه بررسی نشده است، اما در برخی از موارد ارتباط گیرنده‌های هم خانواده‌ی آن‌ها با مسیر فنیل پروپانوئید در سایر گیاهان به اثبات رسیده است (جیائو و همکاران، ۲۰۱۷). ژن *Bradi1g72430* در براکی‌پودیوم و ژن *Glyma.19G261700* در سویا گیرنده‌هایی مربوط به خانواده‌ی استروئلیگ<sup>۱</sup> را کد می‌کنند. پیش‌تر ارتباط این خانواده با لیگنیفیکاسیون و تولید لیگنان‌ها در آرابیدوپسیس و سویا تایید شده است (آیبوگلو و همکاران، ۲۰۰۷؛ اشنایدر و همکاران، ۲۰۱۶). این کینازها می‌توانند به عنوان گیرنده‌های موثر در لیگنیفیکاسیون مطرح باشند. دو گیرنده دیگر (*Bradi3g01137* و *Glyma.03G074300*) که داری دمین لکتین می‌باشند نیز می‌توانند در فرایند لیگنیفیکاسیون درگیر باشند. پیش‌تر ارتباط این نوع گیرنده‌ها با مسیر لیگنیفیکاسیون در گیاه آرابیدوپسیس به اثبات رسیده است. موتانت‌های آرابیدوپسیس با بیان بالای همولوگ‌های این ژن گل-های متراکم‌تر، برگ‌های کوچک‌تر و ارتفاع کمتر داشتند. به علاوه در این گیاهان تجمع آنتوسیانین و لیگنین نیز مشاهده شده است. همچنین این گیاهان به پاتوژن‌ها و زخم‌های فیزیکی مقاوم‌تر بودند (بومستر و همکاران، ۲۰۱۱؛ چوی و همکاران، ۲۰۱۴). پیشنهاد می‌شود که عملکرد هر یک از این گیرنده‌ها همزمان با پروتئین‌های کینازی MAPK موجود در شبکه‌ی هم بیانی و آنزیم PAL در آزمایشگاه و در تحت تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی مورد بررسی قرار بگیرد. همچنین با اندازه‌گیری مقدار لیگنین تحت این تنش‌ها می‌توان به نقش این گیرنده‌ها و کینازها در عمل لیگنیفیکاسیون

---

<sup>1</sup> Struelig-Receptor Family

پی برد و به این نحو احتمالا بتوان به ژن‌های هدف مناسبی برای مهندسی لیگنین و یا تولید گیاهان مقاوم به تنش‌ها دست یافت.

#### ۴-۶-۱-۷ لیپید ترانسفرازها

ژن‌های *Bradi1g05850* و *Glyma.20G146800* در شبکه‌ی هم بیانی *C4H*، لیپید ترانسفرازهای غیراختصاصی را کد می‌کنند. پیش‌تر شی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کرده بودند که برخی از ژن‌های هم خانواده‌ی محصول پروتئینی این ژن‌ها در سنتز لیگنین دخالت دارند. آن‌ها بیان کردند که بیان پایین این ژن‌ها در آراییدوپسیس منجر به کاهش محتوای لیگنین می‌شود. پیشنهاد می‌شود نقش این ژن‌ها در لیگنیفیکاسیون مورد بررسی قرار گیرد. به نظر می‌رسد که این ژن‌های می‌توانند، کاندیدای مناسبی جهت مهندسی لیگنین باشند.

#### ۴-۶-۲ بررسی اشتراکات بین سه شبکه‌ی هم بیانی

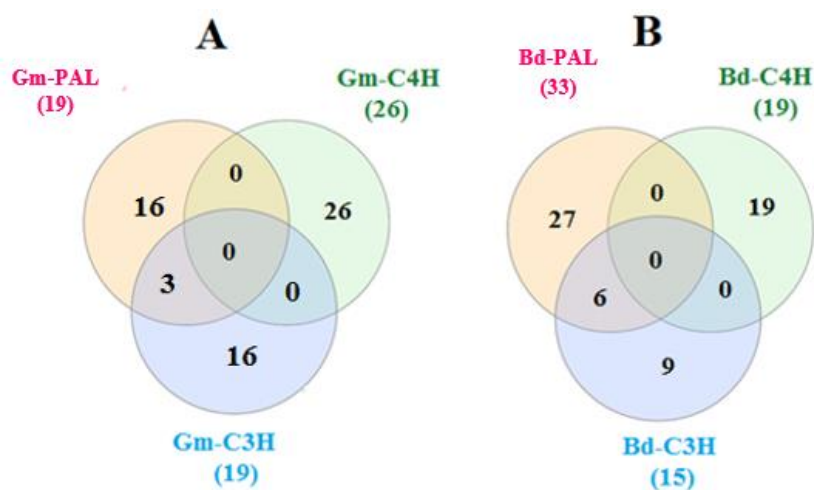
بررسی‌ها نشان داد به ترتیب ۶ و ۳ ژن بین شبکه‌ی هم بیانی *PAL* و *C3H* در براکی‌پودیوم و سویا مشترک می‌باشند (جدول ۴-۱ و شکل ۴-۱۰). در براکی‌پودیوم ۵ ژن درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین و سنتز پلیمرهای دیواره بودند. اما یکی از آن‌ها عملکرد ناشناخته داشت. نکته قابل توجه این است که این ژن در بیش از یک زیر شبکه در *PAL* (*Bd-PAL4* و *Bd-PAL6*) شرکت داشت. در سویا نیز علاوه بر ژن‌هایی دخیل در سنتز سلولز و مسیر بیوسنتز مونولیگنول‌ها، ژنی با عملکرد ناشناخته حضور دارد. هر دو پروتئین با عملکرد ناشناخته در براکی‌پودیوم و سویا دارای دومین <sup>۱</sup>CAP هستند. با توجه به این نکته که سایر ژن‌های مشترک بین شبکه‌های هم بیانی *PAL* و *C3H* به طور مستقیم در مسیر بیوسنتز لیگنین و دیواره‌ی ثانویه نقش دارند، این احتمال وجود دارد که این ژن‌ها نیز در این مسیرها نقش ایفا نمایند. با این حال هم بیان بودن این ژن‌ها با چندین ژن از مسیر فنیل پروپانوئید می‌تواند یادآور سایر

---

<sup>۱</sup> پروتئین‌های مربوط به بیماریزایی در یکی از سه دسته‌ی Cysteine-Rich Secretory Proteins، Antigen 5 و Athogenesis-Related 1 Proteins قرار می‌گیرند و به طور کلی به آن‌ها خانواده‌ی CAP می‌گویند.

جدول (۱-۴) اشتراکات سه شبکه‌ی هم بیانی *C3H* و *C4H*, *PAL* در براکی پودیوم و سویا

<i>B. ditachyon</i>	
Gene Id	Function
<b>Bradi1g19660</b>	Uncharacterized GPI-anchored protein At3g06035-like
<b>Bradi1g31320</b>	4-Coumarate:CoA ligase (4CL)
<b>Bradi3g05750</b>	4-Coumarate:CoA ligase (4CL)
<b>Bradi3g16530</b>	Caffeic acid O-methyltransferase (COMT)
<b>Bradi3g36887</b>	Cinnamoyl-coa reductase (CCR)
<b>Bradi4g30540</b>	Cellulose synthase
<i>G.max</i>	
<b>Glyma.04G153700</b>	Cellulose synthase A catalytic subunit 7
<b>Glyma.13G369800</b>	Cinnamoyl-coa reductase (CCR)
<b>Glyma.20G142700</b>	Uncharacterized LOC100499681



شکل (۱۰-۴) اشتراکات شبکه‌های هم بیانی *C3H* و *C4H*, *PAL* در سویا (A) و براکی پودیوم (B) (interactivenn).



موتانت‌هایی از این مسیر باشد، که علاوه بر بروز فنوتیپ مورد نظر محقق فنوتیپ‌های نامطلوبی چون حساسیت به پاتوژن‌ها را بروز می‌دادند (بروان و همکاران، ۲۰۰۵؛ والکر و همکاران، ۲۰۱۰؛ کاس و همکاران، ۲۰۱۵). با این حال مطالعه‌ی بیشتر بر روی نقش این ژن‌ها در مسیر فنیل پروپانوئید و بیوسنتز لیگنین می‌تواند درک ما را از مسیرهای یاد شده بیشتر کند و در نتیجه گامی موثری در جهت مهندسی لیگنین باشد.

#### ۴-۷ آنالیز توالی‌های بالادست

توالی بالادست ژن‌ها در زیر شبکه‌های هم بیانی (هر ژن به همراه ژن‌های هم بیان خود)، به منظور یافتن Co-occurrence TFBS (با فراوانی بیش از ۹۰ درصد در هر زیر شبکه) به صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت. هر زیر شبکه‌ی هم بیانی حاوی چندین Co-occurrence TFBS (از این پس با TFBS نشان داده می‌شود) احتمالی بود (جدول پیوست ۲۷ الی ۳۰)، که می‌تواند نشانگر هم تنظیمی این ژن‌ها و تاییدی بر هم بیانی آن‌ها باشد.

مجموع ۱۲ زیر شبکه‌ی هم بیانی *PAL* (۶ زیر شبکه در سویا و ۶ زیر شبکه در براکی پودیوم) از جهت TFBS مشترکشان مورد بررسی قرار گرفتند (جدول پیوست ۳۱ و شکل ۴-۱۱). بررسی‌ها نشان داد، TFBS های مربوط به TF های خانواده‌های *bZIP*، *BHLH*، *AT-Hook* و *MYB/SANT* در توالی بالادست تعدادی از شبکه‌های هم بیانی ژن‌های *PAL* به صورت حفاظت شده در دو گیاه مورد مطالعه حضور دارند. TF های مذکور می‌توانند نقش‌های متنوعی در سلول ایفا کنند (جدول پیوست ۳۲). پیش تر نقش برخی از این فاکتورها در ارتباط با هم یا به صورت مجزا در تنظیم سنتز لیگنین و مسیر فنیل پروپانوئید به اثبات رسیده است. به عنوان مثال یان و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که فاکتورهای نسخه برداری *BHLH* در تنظیم سنتز لیگنین نقش مهمی دارند. آن‌ها بیان کردند که احتمالاً این TF ها از طریق مکانیسم بازخورد<sup>۱</sup> بر روی تنظیم رونوشت‌های فاکتورهای نسخه برداری *Myb* تاثیر می‌گذارد.

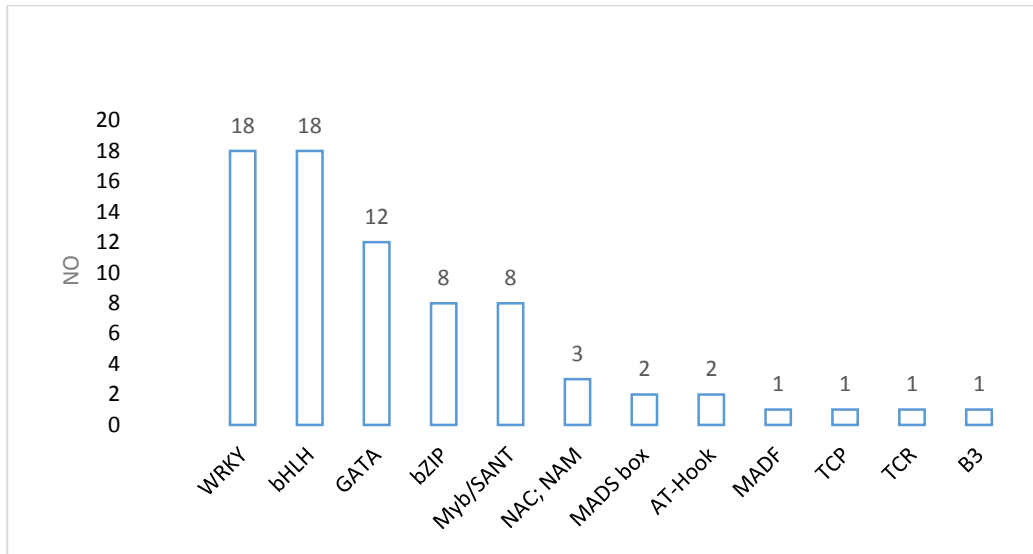
---

<sup>1</sup> Feedback Mechanism

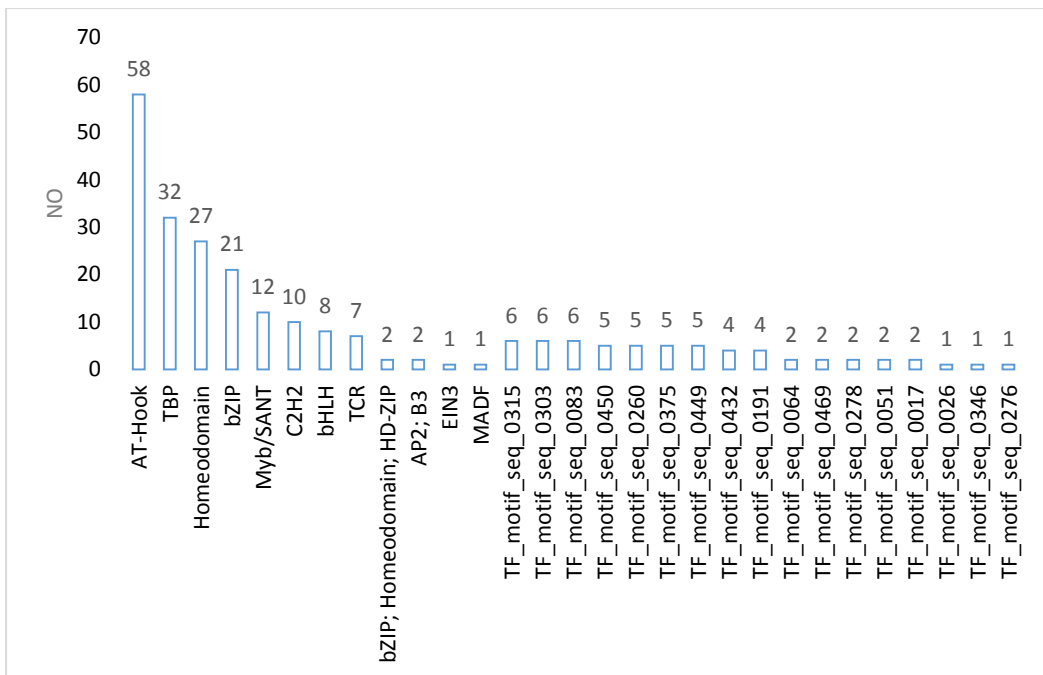
مشاهده شده است که اعضا خانواده‌ی Myb نیز می‌توانند به هر دو روش Activator و Repressor مسیر بیوسنتز لیگنین را تنظیم کنند (زانک و همکاران، ۲۰۱۶). علاوه بر این هارتمن و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده کردند که TF های خانواده‌ی bZIP و Bhlh در تنظیم بیان ژن‌های *CHS* و *F3H* نقش دارند. *F3H* علاوه بر نقشی که در مسیر بیوسنتز لیگنین بر عهده دارد (شکل ۱-۳) به همراه *CHS* در سنتز فلاونول‌ها نیز شرکت می‌کند (شکل پیوست ۷). نتایج ما برهمکنش آنزیم‌های PAL، C4H و CHS را در براکی‌پودیوم نشان داده است. به این ترتیب به نظر می‌رسد TF های خانواده‌ی bZIP و BHLH تنها به تنظیم بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین نمی‌پردازند و در تنظیم سایر انشعابات مسیر فنیل پروپانویید نیز شرکت دارند و احتمالاً گزینه‌های مناسبی برای مهندسی لیگنین نیستند. می‌توان پیش‌بینی کرد که تغییر در بیان ژن‌های کد کننده‌ی این TF ها بر طیف وسیعی از خصوصیات گیاه مثل واکنش به تنش‌های زنده و غیر زنده، مسیرهای انتقال سیگنال، رشد، توسعه‌ی بافت آوندی، سنتز هورمون‌ها تاثیر گذار باشد.

همچنین اگرچه نقش TF های خانواده‌ی AT-Hook در سنتز هورمون‌ها و پاسخ به نور تایید شده است (جدول پیوست ۳۲)، با این حال تا کنون ارتباطی بین TF های خانواده‌ی AT-Hook و مسیر فنیل پروپانویید گزارش نشده، این TF ها (به ویژه در سویا (شکل ۴-۱۰)) احتمالاً در تنظیم این مسیر فعالیت می‌کنند. ژن‌های موجود در زیر شبکه هم بیانی *C4H* نیز حاوی چندین TFBS مشترک بودند (جدول پیوست ۳۳). TFBS های مربوطه به TF های خانواده‌ی AT-Hook و bZIP در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *C4H* نیز حضور دارند. این مشاهدات احتمال فعالیت خانواده‌ی AT-Hook در تنظیم مسیر فنیل پروپانویید به ویژه در سویا (جدول پیوست ۳۳ و شکل ۴-۱۲) را بیشتر می‌کند. علاوه بر این در توالی بالادست ژن‌های شبکه‌ی هم بیانی در سویا TFBS مربوط به خانواده‌ی TBP نیز حضور دارند، پیش‌تر نقش این TF در پاسخ به نور، مسیر انتقال سیگنال گزارش شده بود، همچنین این TF در تنظیم بیان *PAL* در برنج نیز نقش دارد (جدول پیوست ۳۲).

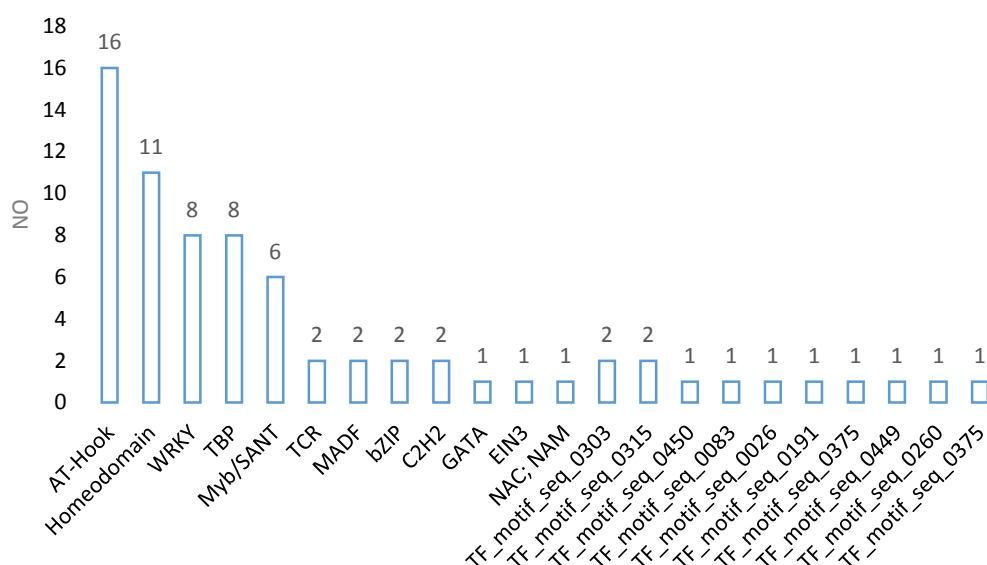
الف



ج



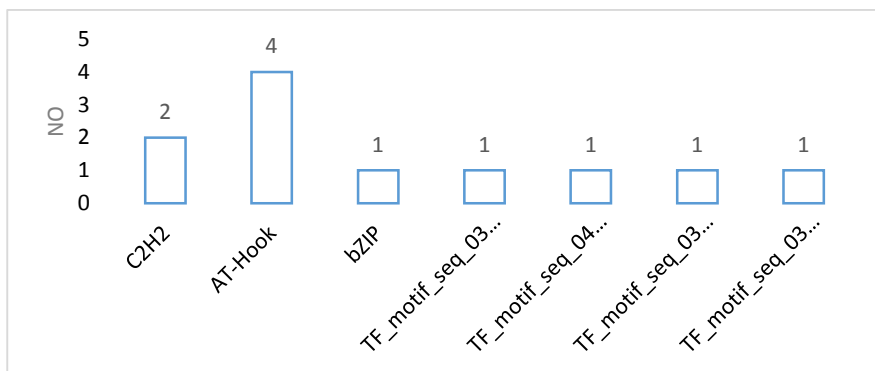
شکل (۴-۱۱) فراوانی TFBS برای هر TF در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *PAL* در الف) براکی‌پودیوم و ب) سویا. در این نمودارهای محور yها تعداد تکرار هر TFBS یا موتیف در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *PAL* و در محور xها نام TF متصل شونده به TFBS ذکر شده است. در صورتی که برای یک TFBS تاکنون TF در PlantPAN ثبت نشده باشد، TFBS با Id مربوط به خود نشان داده شده است.



شکل (۴-۱۲) فراوانی TFBS برای هر TF در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *C4H* در سویا: در این نمودارهای محور yها تعداد تکرار هر TFBS یا موتیف در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *C4H* و در محور xها نام TF متصل شونده به TFBS ذکر شده است. در صورتی که برای یک TFBS تاکنون TF در PlantPAN ثبت نشده باشد، TFBS با Id مربوط به خود نشان داده شده است.

اگرچه ژن‌های موجود در زیر شبکه‌ی هم بیانی *C3H* حاوی TFBS های مشترک کمتری هستند (جدول پیوست ۳۴ و شکل ۴-۱۳)، اما TF های خانواده‌ی bZIP در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *C3H* نیز حضور دارند، همچنین TFBS های مربوط به TF های خانواده‌ی AT-Hook در بالادست اکثر ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *C3H* در سویا حضور دارند. با توجه به این مشاهدات پیشنهاد می‌شود نقش TF های خانواده‌ی AT-Hook در مسیر فنیل پروپانوئید در سویا بررسی شود.

علاوه بر این TF های خانواده‌ی C2H2 دارای محل اتصال در بالادست توالی ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *C3H* می‌باشند. این TF ها در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده و در سنتز و پاسخ به هورمون‌ها نقش دارند (جدول پیوست ۳۴).



شکل (۴-۱۳) فراوانی TFBS برای هر TF در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *C3H* در سویا: در این نمودارهای محور  $\gamma$ ها تعداد تکرار هر TFBS یا موتیف در توالی بالادست ژن‌های موجود در شبکه‌ی هم بیانی *C3H* و در محور  $x$ ها نام TF متصل شونده به TFBS ذکر شده است. در صورتی که برای یک TFBS تاکنون TF در PlantPAN ثبت نشده باشد، TFBS با Id مربوط به خود نشان داده شده است.

#### ۴-۸ نتیجه‌گیری کلی

در این پروژه ژن‌های کد کننده‌ی آنزیم‌های PAL، C4H و C3H دخیل در بیوسنتز لیگنین از جهت تکاملی و هم بیانی مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعه‌ی تکاملی این ژن‌ها می‌تواند بینش بهتری از روند تکامل دیواره‌ی سلولی ایجاد کند. مطالعه‌ی تکاملی این ژن‌ها نشان داد که توالی پروتئینی PAL و تعداد ژن‌های همولوگ کد کننده‌ی این آنزیم، طی تکامل بین براکی‌پودیوم (گیاه مدل نماینده‌ی تک لپه‌ای ها) و سویا (گیاه مدل نماینده‌ی دو لپه‌ای ها) حفاظت شده باقی مانده است. مطالعه‌ی تکاملی ژن‌های *C4H* و *C3H* مشخص کرد که احتمالاً این ژن‌ها نیز بین دو گونه‌ی تک لپه و دو لپه هم منشاء هستند. بررسی درصد مشابهت، درخت تکاملی و بررسی الگوی اینترون‌ها نشان داد که خانواده‌ی ژنی کد کننده‌ی PAL و *C3H* بعد از اشتقاق گونه‌ها درون هر گیاه توسعه پیدا کرده‌اند. احتمالاً گسترش خانواده‌ی ژنی *C4H* گیاهان تک لپه، قبل از اشتقاق گونه‌ها صورت گرفته است.

بررسی‌های هم بیانی ارتباط بین ژن *PAL* و ژن‌های درگیر در مسیرهای بیوسنتز اسکوپلین و اسکولین، سوپرین در هر دو گیاه و کافئول گلوکارات در براکی‌پودیوم را نشان داد. محصول این مسیرهای بیولوژیکی در مقاومت به تنش‌ها به ویژه تنش‌های زنده شرکت دارند. این رابطه‌ی هم بیانی می‌تواند دلیلی برای

حساسیت موتانت‌های *PAL* در برابر تنش‌ها باشد. مطالعه‌ی عملکرد ژن‌های هم بیان با *PAL* توانست برخی از ژن‌های کاندیدا با پتانسیل تاثیر گذاری و یا شرکت در مسیر بیوسنتز لیگنین و فنیل پروپانوئید را معرفی کند، از جمله برخی از گیرنده‌ها و پروتئین کینازها که تاکنون عملکرد آن‌ها در سلول بررسی نشده بود. علاوه بر این برخی از فاکتورهای نسخه برداری در شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده وجود داشت که می‌توانند به عنوان فاکتور رونویسی دخیل در لیگنیفیکاسیون و مسیر فنیل پروپانوئید مطرح باشند. همچنین در این شبکه‌ی هم بیانی برخی از اندوگلوکانازها با عملکرد نامشخص حضور داشتند. این اندوگلوکانازها می‌توانند با دگلیکولیزاسیون مونولیگنول‌ها در پلیمریزاسیون لیگنین نقش ایفا کنند. در شبکه‌ی هم بیانی *C4H* ژن‌های کد کننده‌ی پراکسیدازها، *CASP* و اسکوربات اکسیداز حضور داشتند که هر کدام می‌توانستند به نوعی در پلیمریزاسیون لیگنین نقش داشته باشند. همچنین حضور برخی از پروتئین‌های دخیل در انتقال نیترات این فرضیه را ایجاد کرد که هنگام کمبود نیتروژن سلول با افزایش بیان *C4H*، فنیل آلانین و تیروزین را در مسیر فنیل پروپانوئید قرار می‌دهد و به این ترتیب آمونیاک بیشتری تولید می‌کند و از این طریق به تنظیم نیتروژن می‌پردازد.

در این پژوهش با بررسی هم بیانی *C3H*، برخی از ژن‌های کاندیدای درگیر در سنتز سلولز دیواره‌ی ثانویه معرفی شدند. علاوه بر این رابطه‌ی هم بیانی این ژن‌ها با ژن‌های درگیر در مسیرهای سنتز مونومرهای سوبرین، مسیر بیوسنتز ۴- هیدروکسی بنزوات و کافئول گلوکارات مشاهده شد. محصول نهایی این مسیرها می‌توانند در مقاومت به تنش‌ها نقش ایفا کنند.

بررسی توالی بالادست شبکه‌های هم بیانی نشان داد شبکه‌ی هم بیانی مربوط به ژن‌های کد کننده‌ی هر سه آنزیم دارای TFBS مربوطه به فاکتور نسخه برداری bZIP می‌باشند. این TF یکی از فاکتورهای نسخه برداری دخیل در تنظیم مسیر فنیل پروپانوئید است. علاوه بر این هر کدام از زیر شبکه‌ها، دارای TFBS های مربوط به برخی دیگر از TF های درگیر در تنظیم این مسیر هستند.

#### ۹-۴ پیشنهادات:

- ۱- آزمون تئوری خنثی و Coalescent برای درک بهتر مفاهیم تکامل مولکولی و بررسی نقش انتخاب در توالی‌های مربوط به ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین و استفاده از الگوی حاصله، در فهم بهتر گونه‌زایی در گیاهان علاوه بر دو گیاه مدل سویا و براکی‌پودیوم.
- ۲- تکرار مطالعات با گیاهان بیشتر و با استفاده از داده‌ها هم بیانی ناشی از مطالعات RNA-Seq.
- ۳- بررسی نقش *C3H* در مواجهه با پاتوزن‌ها و UV
- ۴- انجام مطالعات آزمایشگاهی به شیوه‌ی ایجاد موتانت‌های ژن‌های ناشناخته (جدول پیوست ۳۵) و بررسی عمل آن‌ها و تاثیر بر مسیرهای شناخته شده در این پایان نامه با تاکید بر محتوای لیگنین.
- ۵- هرچند اطلاعات هم بیانی گیاهان بازدانه تا به امروز در پایگاه‌های داده قرار نگرفته‌اند، اما مطالعه‌ی شبکه‌ی هم بیانی به صورت افتراقی بین بازدانگان و نهاندانگان می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد از آنجایی که مقدار و ترکیب لیگنین بین این دو گروه گیاه متفاوت است (معمولا دیواره‌ی سلولی نهاندانگان قابل هضم تر از بازدانگان می‌باشد) با مقایسه‌ی افتراقی شبکه‌ی هم بیانی مسیر بیوسنتز لیگنین احتمالا می‌توان به ژن‌هایی برای مهندسی لیگنین در گیاهان بازدانه (مهم در صنایع) دست یافت که لیگنین را قابل هضم تر کنند.

## منابع :

- احمدپور، امین، ۱۳۹۳، معرفی انواع انرژی های تجدید پذیر و بررسی مزایای استفاده از آن، ششمین همایش علمی تخصصی انرژی های تجدید پذیر، پاک و کارآمد، تهران، شرکت هم اندیشان انرژی کیمیا،  
فیتوزوم (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)
- قائمى، فرزانه و حسین صادقى، ۱۳۹۲، پتانسیل تولید بیوگاز از فضولات دامی در ایران، چهارمین همایش بیوانرژی ایران (بیوماس و بیوگاز)، تهران، هم اندیشان انرژی کیمیا،
- نصیری، جواد، ۱۳۸۷، امکان سنجی نیروگاه بیوگازی ساوه، چهارمین همایش ملی مدیریت پسماند، مشهد، سازمان شهرداریها و دهرداریهای کشور، سازمان حفاظت محیط زیست،
- وزارت نیرو سازمان انرژی های تجدیدپذیر و بهره‌وری انرژی برق (ساتبا) ، ترازنامه‌ی انرژی سال ۱۳۹۲ (<http://www.saba.org.ir/fa/energyinfo/tashilat/taraz>)
- Abdelaziz, O. Y., D. P. Brink, J. Prothmann, K. Ravi, M. Sun, J. García-Hidalgo, M. Sandahl, C. P. Hultberg, C. Turner and G. Lidén (2016). "Biological valorization of low molecular weight lignin." **Biotechnology Advances** 8,34: 1318-1346.
- Achnine, L., E. B. Blancaflor, S. Rasmussen and R. A. Dixon (2004). "Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis." **The Plant Cell** 11,16: 3098-3109.
- Achyuthan, K. E., A. M. Achyuthan, P. D. Adams, S. M. Dirk, J. C. Harper, B. A. Simmons and A. K. Singh (2010). "Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels." **Molecules** 12,15: 8641-8688.
- Ahmad, M., J. N. Roberts, E. M. Hardiman, R. Singh, L. D. Eltis and T. D. Bugg (2011). "Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase." **Biochemistry** 23,50: 5096-5107.
- Alejandro, S., Y. Lee, T. Tohge, D. Sudre, S. Osorio, J. Park, L. Bovet, Y. Lee, N. Geldner and A. R. Fernie (2012). "AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis." **Current Biology** 13,22: 1207-1212.
- Alendé, N., J. E. Nielsen, D. C. Shields and N. Khaldi (2011). "Evolution of the isoelectric point of mammalian proteins as a consequence of indels and adaptive evolution." **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics** 5,79: 1635-1648.
- Almagro, L., L. Gómez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barceló and M. Pedreno (2008). "Class III peroxidases in plant defence reactions." **Journal Of Experimental Botany** 2,60: 377-390.
- Amar, D., I. Frades, A. Danek, T. Goldberg, S. K. Sharma, P. E. Hedley, E. Proux-Wera, E. Andreasson, R. Shamir and O. Tzfadia (2014). "Evaluation and integration of functional annotation pipelines for newly sequenced organisms: the potato genome as a test case." **BMC Plant Biology** 1,14: 329.
- Anders, N., M. D. Wilkinson, A. Lovegrove, J. Freeman, T. Tryfona, T. K. Pellny, T. Weimar, J. C. Mortimer, K. Stott and J. M. Baker (2012). "Glycosyl transferases in family 61 mediate arabinofuranosyl transfer onto xylan in grasses." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 3,109: 989-993.
- Anterola, A. M. and N. G. Lewis (2002). "Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity." **Phytochemistry** 3,61: 221-294.
- Aouada, F. A. and M. R. de Moura (2015). "Nanotechnology applied in agriculture: controlled release of agrochemicals." **Nanotechnologies in Food and Agriculture**, 103-118.
- Artimo, P., M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. De Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier and E. Gasteiger (2012). "ExPASy: SIB bioinformatics resource portal." **Nucleic Acids Research** W1,40: W597-W603.
- Aya, K., G. Suzuki, K. Suwabe, T. Hobo, H. Takahashi, K. Shiono, K. Yano, N. Tsutsumi, M. Nakazono and Y. Nagamura (2011). "Comprehensive network analysis of anther-expressed genes in rice by the combination of 33 laser microdissection and 143 spatiotemporal microarrays." **PLoS One** 10,6: e26162.
- Ayyachamy, M., F. E. Cliffe, J. M. Coyne, J. Collier and M. G. Tuohy (2013). "Lignin: untapped biopolymers in biomass conversion technologies." **Biomass Conversion and Biorefinery** 3,3: 255-269.
- Azadfar, M., A. H. Gao, M. V. Bule and S. Chen (2015). "Structural characterization of lignin: A potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol." **Int. J. Biol. Macromol.**,75: 58-66.
- Barapatre, A., K. R. Aadil, B. N. Tiwary and H. Jha (2015). "In vitro antioxidant and antidiabetic activities of biomodified lignin from *Acacia nilotica* wood." **Int. J. Biol. Macromol.**,75: 81-89.



- Barapatre, A., A. S. Meena, S. Mekala, A. Das and H. Jha (2016). "In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*." **Int. J. Biol. Macromol.**,**86**: 443-453.
- Barnard, D. and K. Heaton (1973). "Bile acids and vitamin A absorption in man: the effects of two bile acid-binding agents, cholestyramine and lignin." **Gut** **4**,**14**: 316-318.
- Barrett, T., D. B. Troup, S. E. Wilhite, P. Ledoux, D. Rudnev, C. Evangelista, I. F. Kim, A. Soboleva, M. Tomashevsky and R. Edgar (2006). "NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update." **Nucleic Acids Research suppl** **1**,**35**: D760-D765.
- Barros, J., H. Serk, I. Granlund and E. Pesquet (2015). "The cell biology of lignification in higher plants." **Annals Of Botany** **7**,**115**: 1053-1074.
- Barros, J., J. C. Serrani-Yarce, F. Chen, D. Baxter, B. J. Venables and R. A. Dixon (2016). "Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis." **Nature Plants**,**2**: 16050.
- Bassard, J.-E., L. Richert, J. Geerinck, H. Renault, F. Duval, P. Ullmann, M. Schmitt, E. Meyer, J. Mutterer and W. Boerjan (2012). "Protein–protein and protein–membrane associations in the lignin pathway." **The Plant Cell** **11**,**24**: 4465-4482.
- Baurhoo, B., C. Ruiz-Feria and X. Zhao (2008). "Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review." **Animal Feed Science And Technology** **3**,**144**: 175-184.
- Bayoumi, S. A., M. G. Rowan, I. S. Blagbrough and J. R. Beeching (2008). "Biosynthesis of scopoletin and scopolin in cassava roots during post-harvest physiological deterioration: the EZ-isomerisation stage." **Phytochemistry** **17**,**69**: 2928-2936.
- Bell-Lelong, D. A., J. C. Cusumano, K. Meyer and C. Chapple (1997). "*Cinnamate-4-hydroxylase* expression in Arabidopsis (regulation in response to development and the environment)." **Plant Physiol.** **3**,**113**: 729-738.
- Bhattacharya, A., P. Sood and V. Citovsky (2010). "The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection." **Molecular Plant Pathology** **5**,**11**: 705-719.
- Bhuiya, M.-W. and C.-J. Liu (2010). "Engineering monolignol 4-O-methyltransferases to modulate lignin biosynthesis." **Journal Of Biological Chemistry** **1**,**285**: 277-285.
- Bhuiyan, N. H., G. Selvaraj, Y. Wei and J. King (2009). "Role of lignification in plant defense." **Plant Signaling & Behavior** **2**,**4**: 158-159.
- Blanco-Portales, R., N. Medina-Escobar, J. López-Ráez, J. González-Reyes, J. Villalba, E. Moyano, J. Caballero and J. Muñoz-Blanco (2002). "Cloning, expression and immunolocalization pattern of a *cinnamyl alcohol dehydrogenase* gene from strawberry (*Fragaria× ananassa* cv. Chandler)." **Journal Of Experimental Botany** **375**,**53**: 1723-1734.
- Boerjan, W., J. Ralph and M. Baucher (2003). "Lignin biosynthesis." **Annu Rev Plant Biol** **1**,**54**: 519-546.
- Bolwell, G. P., K. Bozak and A. Zimmerlin (1994). "Plant cytochrome P450." **Phytochemistry** **6**,**37**: 1491-1506.
- Bouwmeester, K., M. De Sain, R. Weide, A. Gouget, S. Klamer, H. Canut and F. Govers (2011). "The lectin receptor kinase LecRK-I. 9 is a novel Phytophthora resistance component and a potential host target for a RXLR effector." **PLoS pathogens** **3**,**7**: e1001327.
- Brown, D. M., L. A. Zeef, J. Ellis, R. Goodacre and S. R. Turner (2005). "Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics." **The Plant Cell** **8**,**17**: 2281-2295.
- Browning, J. D. and J. D. Horton (2004). "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury." **Journal Of Clinical Investigation** **2**,**114**: 147.
- Bugg, T. D., M. Ahmad, E. M. Hardiman and R. Rahmanpour (2011). "Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi." **Natural Product Reports** **12**,**28**: 1883-1896.
- Bujnicki, J. M. and J. Tiuryn (2013). "Bioinformatics and computational biology in Poland." **Plos Computational Biology** **5**,**9**: e1003048.
- Bukh, C., P. H. Nord-Larsen and S. K. Rasmussen (2012). "Phylogeny and structure of the *cinnamyl alcohol dehydrogenase* gene family in *Brachypodium distachyon*." **Journal Of Experimental Botany** **17**,**63**: 6223-6236.
- Burton, R. A., N. Farrokhi, A. Bacic and G. B. Fincher (2005). "Plant cell wall polysaccharide biosynthesis: real progress in the identification of participating genes." **Planta** **3**,**221**: 309-312.
- Byrt, C. S., N. S. Betts, N. Farrokhi, R. A. Burton and B. Singh (2013). "Deconstructing plant biomass: cell wall structure and novel manipulation strategies." **Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics**: 135.
- Bystrzejewska-Piotrowska, G., J. Golimowski and P. L. Urban (2009). "Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management." **Waste Management** **9**,**29**: 2587-2595.
- Camarero, S., M. J. Martínez and A. T. Martínez (2014). "Understanding lignin biodegradation for the improved utilization of plant biomass in modern biorefineries." **Biofuels, Bioproducts And Biorefining** **5**,**8**: 615-625.

- Caputi, L., M. Malnoy, V. Goremykin, S. Nikiforova and S. Martens (2012). "A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land." **The Plant Journal** **6,69**: 1030-1042.
- Caputi, L., M. Malnoy, V. Goremykin, S. Nikiforova and S. Martens (2012). "A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land." **The Plant Journal** **6,69**: 1030-1042.
- Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut (1993). "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth." **The Plant Journal** **1,3**: 1-30.
- Carroll, A. and C. Somerville (2009). "Cellulosic biofuels." **Annu Rev Plant Biol**,**60**: 165-182.
- Cass, C. L., A. Peraldi, P. F. Dowd, Y. Mottiar, N. Santoro, S. D. Karlen, Y. V. Bukhman, C. E. Foster, N. Thrower and L. C. Bruno (2015). "Effects of PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*." **Journal Of Experimental Botany** **14,66**: 4317-4335.
- Cesarino, I., P. Araújo, A. P. Domingues Júnior and P. Mazzafera (2012). "An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance." **Brazilian Journal Of Botany** **4,35**: 303-311.
- Chakar, F. S. and A. J. Ragauskas (2004). "Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry." **Industrial Crops And Products** **2,20**: 131-141.
- Chang, W.-C., T.-Y. Lee, H.-D. Huang, H.-Y. Huang and R.-L. Pan (2008). "PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups." **BMC Genomics** **1,9**: 561.
- Chai, G., Z. Wang, X. Tang, L. Yu, G. Qi, D. Wang, X. Yan, Y. Kong and G. Zhou (2014). "R2R3-MYB gene pairs in *Populus*: evolution and contribution to secondary wall formation and flowering time." **Journal of experimental botany** **15,65**: 4255-4269.
- Chen, H.-C., Q. Li, C. M. Shuford, J. Liu, D. C. Muddiman, R. R. Sederoff and V. L. Chiang (2011). "Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol biosynthesis." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** **52,108**: 21253-21258.
- Chen, T., V. Filkov and S. S. Skiena (2001). "Identifying gene regulatory networks from experimental data." **Parallel Computing** **1,27**: 141-162.
- Choi, E.-O., J.-W. Jeong, C. Park, S. H. Hong, G.-Y. Kim, H.-J. Hwang, E.-J. Cho and Y. H. Choi (2016). "Baicalein protects C6 glial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through regulation of the Nrf2 signaling pathway." **International Journal Of Molecular Medicine** **3,37**: 798-806.
- Choi, J., K. Tanaka, Y. Cao, Y. Qi, J. Qiu, Y. Liang, S. Y. Lee and G. Stacey (2014). "Identification of a plant receptor for extracellular ATP." **Science** **6168,343**: 290-294.
- Choi, S.-W., K.-I. Park, J.-T. Yeon, B. J. Ryu, K.-J. Kim and S. H. Kim (2014). "Anti-osteoclastogenic activity of matairesinol via suppression of p38/ERK-NFATc1 signaling axis." **BMC Complementary And Alternative Medicine** **1,14**: 35.
- Chu, S., J. Wang, H. Cheng, Q. Yang and D. Yu (2014). "Evolutionary study of the isoflavonoid pathway based on multiple copies analysis in soybean." **BMC Genetics** **1,15**: 76.
- Cosgrove, D. J. (2005). "Growth of the plant cell wall." **Nature Reviews. Molecular Cell Biology** **11,6**: 850.
- Cosgrove, D. J. and M. C. Jarvis (2012). "Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls." **Frontiers In Plant Science**,**3**.
- Counsell, D. (2003). "A review of bioinformatics education in the UK." **Briefings In Bioinformatics** **1,4**: 7-21.
- Craigon, D. J., N. James, J. Okyere, J. Higgins, J. Jotham and S. May (2004). "NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service." **Nucleic Acids Research Suppl** **1,32**: D575-D577.
- Crick, F. (1970). "Central dogma of molecular biology." **Nature** **5258,227**: 561-563.
- D'Auria, J. C. (2006). "Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD." **Current Opinion In Plant Biology** **3,9**: 331-340.
- Dahan, O., H. Gingold and Y. Pilpel (2011). "Regulatory mechanisms and networks couple the different phases of gene expression." **Trends In Genetics** **8,27**: 316-322.
- Davidson, J. and M. Phillips (1930). "Lignin as a possible factor in lodging of cereals." **Science** **1868,72**: 401-402.
- Davidson, R. M., P. A. Reeves, P. M. Manosalva and J. E. Leach (2009). "Germins: A diverse protein family important for crop improvement." **Plant Science** **6,177**: 499-510.
- Del Río, J. C., G. Marques, J. Rencoret, Á. T. Martínez and A. Gutiérrez (2007). "Occurrence of naturally acetylated lignin units." **J Agric Food Chem** **14,55**: 5461-5468.

- Del Río, J. C., J. Rencoret, P. Prinsen, A. n. T. Martínez, J. Ralph and A. Gutiérrez (2012). "Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods." **J Agric Food Chem** **23,60**: 5922-5935.
- Dimitrios, B. (2006). "Sources of natural phenolic antioxidants." **Trends in Food Science & Technology** **9,17**: 505-512.
- Dixon, R. A. and N. L. Paiva (1995). "Stress-induced phenylpropanoid metabolism." **The Plant Cell** **7,7**: 1085.
- Doblin, M. S., F. Pettolino and A. Bacic (2010). "Plant cell walls: the skeleton of the plant world." **Functional Plant Biology** **5,37**: 357-381.
- Döll, S., M. Kuhlmann, T. Rutten, M. F. Mette, S. Scharfenberg, A. Petridis, D. C. Berreth and H. P. Mock (2018). "Accumulation of the coumarin scopolin under abiotic stress conditions is mediated by the *Arabidopsis thaliana* THO/TREX complex." **The Plant Journal** **3,93**: 431-444.
- Domozych, D., M. Ciancia, J. Fangel, M. Mikkelsen, P. Ulvskov and W. Willats (2012). "The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity." **Frontiers In Plant Science** **82,3**.
- Domozych, D., A. Serfis, S. Kiemle and M. Gretz (2007). "The structure and biochemistry of charophycean cell walls: I. Pectins of *Penium margaritaceum*." **Protoplasma** **1,230**: 99-115.
- Domozych, D. S., L. Lambiasse, S. N. Kiemle and M. R. Gretz (2009). "CELL-WALL DEVELOPMENT AND BIPOLAR GROWTH IN THE DESMID *PENIUM MARGARITACEUM* (ZYGNEMATOPHYCEAE, STREPTOPHYTA). ASYMMETRY IN A SYMMETRIC WORLD." **Journal Of Phycology** **4,45**: 879-893.
- DOMOZYCH, D. S., B. WELLS and P. J. SHAW (1991). "Basket scales of the green alga, *Mesostigma viride*: chemistry and ultrastructure." **Journal Of Cell Science** **2,100**: 397-407.
- Duhan, J. S., R. Kumar, N. Kumar, P. Kaur, K. Nehra and S. Duhan (2017). "Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture." **Biotechnology Reports**,**15**: 11-23.
- Dutta, S. (2015). "**Lignin deconstruction: chemical and biological approaches. Sustainable Catalytic Processes**", Elsevier Amsterdam: 125-155.
- Ehltling, J., B. Hamberger, R. Million-Rousseau and D. Werck-Reichhart (2006). "Cytochromes P450 in phenolic metabolism." **Phytochemistry Reviews** **2-3,5**: 239-270.
- Emamjomeh, A., B. Goliaei, J. Zahiri and R. Ebrahimpour (2015). "Prediction of Gene Co-Expression by Quantifying Heterogeneous Features." **Curr Bioinform** **4,10**: 414-424.
- Escamilla-Trevino, L. L., W. Chen, M. L. Card, M.-C. Shih, C.-L. Cheng and J. E. Poulton (2006). "*Arabidopsis thaliana*  $\beta$ -glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides." **Phytochemistry** **15,67**: 1651-1660.
- Eyüboğlu, B., K. Pfister, G. Haberer, D. Chevalier, A. Fuchs, K. F. Mayer and K. Schneitz (2007). "Molecular characterisation of the STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY of genes encoding putative leucine-rich repeat receptor-like kinases in *Arabidopsis thaliana*." **BMC Plant Biology** **1,7**: 16.
- Fangel, J. U., P. Ulvskov, J. P. Knox, M. D. Mikkelsen, J. Harholt, Z. A. Popper and W. G. Willats (2012). "Cell wall evolution and diversity." **Frontiers In Plant Science**,**3**.
- Fargues, C., Á. Mathias and A. Rodrigues (1996). "Kinetics of vanillin production from kraft lignin oxidation." **Industrial & Engineering Chemistry Research** **1,35**: 28-36.
- Farrokhi, N., R. A. Burton, L. Brownfield, M. Hrmova, S. M. Wilson, A. Bacic and G. B. Fincher (2006). "Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes." **Plant Biotechnology Journal** **2,4**: 145-167.
- Felton, G. and C. Summers (1993). "Potential role of ascorbate oxidase as a plant defense protein against insect herbivory." **Journal Of Chemical Ecology** **7,19**: 1553-1568.
- Feng, K., F. Liu, J. Zou, G. Xing, P. Deng, W. Song, W. Tong and X. Nie (2016). "Genome-Wide Identification, Evolution, and Co-expression Network Analysis of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinases in *Brachypodium distachyon*." **Frontiers In Plant Science**,**7**.
- Ferhan, M. (2016). "Coordination Complexes with Lignin-Based Nanoparticles in Targeted Drug Controlled Release and Their Molecular Expression in Cell Lines." **Novel Approaches In Drug Designing And Development** **1.3.8**.
- Fernández-Pérez, F., F. Pomar, M. A. Pedreño and E. Novo-Uzal (2015). "Suppression of *Arabidopsis* peroxidase 72 alters cell wall and phenylpropanoid metabolism." **Plant Science**,**239**: 192-199.
- Ferrer, J.-L., M. Austin, C. Stewart and J. Noel (2008). "Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids." **Plant Physiol Biochem** **3,46**: 356-370.
- Figueiredo, P., K. Lintinen, A. Kiriazis, V. Hynninen, Z. Liu, T. Bauleth-Ramos, A. Rahikkala, A. Correia, T. Kohout and B. Sarmiento (2017). "In vitro evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells." **Biomaterials**,**121**: 97-108.

- Flegr, J. (2009). "A possible role of intracellular isoelectric focusing in the evolution of eukaryotic cells and multicellular organisms." **Journal Of Molecular Evolution** 5,69: 444.
- Fornara, F., K. C. Panigrahi, L. Gissot, N. Sauerbrunn, M. Rühl, J. A. Jarillo and G. Coupland (2009). "Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response." **Developmental Cell** 1,17: 75-86.
- Franke, R., J. M. Humphreys, M. R. Hemm, J. W. Denault, M. O. Ruegger, J. C. Cusumano and C. Chapple (2002). "The Arabidopsis *REF8* gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism." **The Plant Journal** 1,30: 33-45.
- Fraser, C. M. and C. Chapple (2011). "The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis." **The Arabidopsis Book**: e0152.
- Fritz, C., N. Palacios-Rojas, R. Feil and M. Stitt (2006). "Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism." **The Plant Journal** 4,46: 533-548.
- Fuchs, M., A. J. E. van Bel and K. Ehlers (2011). "Do symplasmic networks in cambial zones correspond with secondary growth patterns?" **Protoplasma** 1,248: 141-151.
- Funaoka, M. and S. Fukatsu (1996). "Characteristics of lignin structural conversion in a phase-separative reaction system composed of cresol and sulfuric acid." **Holzforchung-International Journal Of The Biology, Chemistry, Physics And Technology Of Wood** 3,50: 245-252.
- Galati, G., M. Y. Moridani, T. S. Chan and P. J. O'Brien (2001). "Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation." **Free Radical Biology And Medicine** 4,30: 370-382.
- Gallego-Giraldo, L., L. Escamilla-Trevino, L. A. Jackson and R. A. Dixon (2011). "Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 51,108: 20814-20819.
- Gallego-Giraldo, L., Y. Jikumaru, Y. Kamiya, Y. Tang and R. A. Dixon (2011). "Selective lignin downregulation leads to constitutive defense response expression in alfalfa (*Medicago sativa* L.)." **New Phytologist** 3,190: 627-639.
- Gallego-Giraldo, L., G. Shadle, H. Shen, J. Barros-Rios, S. Fresquet Corrales, H. Wang and R. A. Dixon (2016). "Combining enhanced biomass density with reduced lignin level for improved forage quality." **Plant Biotechnology Journal** 3,14: 895-904.
- Garcia-Moreno, B. (2009). "Adaptations of proteins to cellular and subcellular pH." **Journal Of Biology** 11,8: 98.
- GÓMEZ-VÁSQUEZ, R., R. Day, H. Buschmann, S. Randles, J. R. Beeching and R. M. Cooper (2004). "Phenylpropanoids, Phenylalanine Ammonia Lyase and Peroxidases in Elicitor-challenged Cassava (*Manihot esculenta*) Suspension Cells and Leaves." **Annals Of Botany** 1,94: 87-97.
- Goodstein, D. M., S. Shu, R. Howson, R. Neupane, R. D. Hayes, J. Fazo, T. Mitros, W. Dirks, U. Hellsten and N. Putnam (2011). "Phytozome: a comparative platform for green plant genomics." **Nucleic Acids Research** D1,40: D1178-D1186.
- Goujon, T., R. Sibout, A. Eudes, J. MacKay and L. Jouanin (2003). "Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*." **Plant Physiol Biochem** 8,41: 677-687.
- Gravot, A., R. Larbat, A. Hehn, K. Lievre, E. Gontier, J.-L. Goergen and F. Bourgaud (2004). "Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant—*Ruta graveolens*—exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation." **Archives Of Biochemistry And Biophysics** 1,422: 71-80.
- Grelier, S. and G. K. Yoya (2014). "Process for depolymerization of lignin by laccases." **U.S. Patent Application** 15/039,796.
- Hamberger, B. and K. Hahlbrock (2004). "The *4-coumarate: CoA ligase* gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 7,101: 2209-2214.
- Handakumbura, p., (2014), PhD. Thesis, "Understanding the transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in the model grass *Brachypodium distachyon*", Diss. University of Massachusetts Amherst**
- Hano, C., M. Addi, L. Bensaddek, D. Crônier, S. Baltora-Rosset, J. Doussot, S. Maury, F. Mesnard, B. Chabbert and S. Hawkins (2006). "Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures." **Planta** 5,223: 975-989.
- Hansen, B. O., N. Vaid, M. Musialak-Lange, M. Janowski and M. Mutwil (2014). "Elucidating gene function and function evolution through comparison of co-expression networks of plants." **Frontiers In Plant Science**,5.
- Harakava, R. (2005). "Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in Eucalyptus." **Genetics And Molecular Biology** 3,28: 601-607.
- Hartmann, U., M. Sagasser, F. Mehrrens, R. Stracke and B. Weisshaar (2005). "Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes." **Plant Molecular Biology** 2,57: 155-171.

- Hasegawa, Y., Y. Kadota, C. Hasegawa and S. Kawaminami (2015). "Lignosulfonic acid-induced inhibition of intestinal glucose absorption." **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** **6,61:** 449-454.
- Hatfield, R. D., J. M. Marita, K. Frost, J. Grabber, J. Ralph, F. Lu and H. Kim (2009). "Grass lignin acylation: p-coumaroyl transferase activity and cell wall characteristics of C3 and C4 grasses." **Planta** **6,229:** 1253-1267.
- Hemmati, S. (2015). "Phenylalanine ammonia-lyase through evolution: A bioinformatic approach." **Trends In Pharmaceutical Sciences** **1,1:** 10-14.
- Hemmati, S. and H. Seradj (2016). "Justicidin B: a promising bioactive lignan." **Molecules** **7,21:** 820.
- Hernández-de-Diego, R., E. P. de Villiers, T. Klingström, H. Gourelé, A. Conesa and E. Bongcam-Rudloff (2017). "The eBioKit, a stand-alone educational platform for bioinformatics." **Plos Computational Biology** **9,13:** e1005616.
- Herrero, J., A. Esteban-Carrasco and J. M. Zapata (2013). "Looking for *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis." **Plant Physiol Biochem.** **67:** 77-86.
- Heyndrickx, K. S. and K. Vandepoele (2012). "Systematic identification of functional plant modules through the integration of complementary data sources." **Plant Physiol.** **3,159:** 884-901.
- Hinton, T. J., Q. Jallerat, R. N. Palchesko, J. H. Park, M. S. Grodzicki, H.-J. Shue, M. H. Ramadan, A. R. Hudson and A. W. Feinberg (2015). "Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels." **Science advances** **9,1:** e1500758.
- Hoffmann, L., S. Besseau, P. Geoffroy, C. Ritzenthaler, D. Meyer, C. Lapierre, B. Pollet and M. Legrand (2004). "Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis." **The Plant Cell** **6,16:** 1446-1465.
- Hoffmann, L., S. Maury, M. Bergdoll, L. Thion, M. Erard and M. Legrand (2001). "Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase by site-directed mutagenesis." **Journal Of Biological Chemistry** **39,276:** 36831-36838.
- Hoffmann, L., S. Maury, F. Martz, P. Geoffroy and M. Legrand (2003). "Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism." **Journal Of Biological Chemistry** **1,278:** 95-103.
- Hosmani, P. S., T. Kamiya, J. Danku, S. Naseer, N. Geldner, M. L. Guerinet and D. E. Salt (2013). "Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** **35,110:** 14498-14503.
- Hosseini, S. E., A. M. Andwari, M. A. Wahid and G. Bagheri (2013). "A review on green energy potentials in Iran." **Renewable And Sustainable Energy Reviews.** **27:** 533-545.
- Hu, B., J. Jin, A.-Y. Guo, H. Zhang, J. Luo and G. Gao (2014). "GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server." **Bioinformatics** **8,31:** 1296-1297.
- Hu, Y., W. C. Li, Y. Xu, G. Li, Y. Liao and F.-L. Fu (2009). "Differential expression of candidate genes for lignin biosynthesis under drought stress in maize leaves." **J Appl Genet.** **3,50:** 213-223.
- Huber, D., A. Ortner, A. Daxbacher, G. S. Nyanhongo, W. Bauer and G. M. Guebitz (2016). "Influence of Oxygen and Mediators on Laccase-Catalyzed Polymerization of Lignosulfonate." **ACS Sustainable Chemistry & Engineering** **10,4:** 5303-5310.
- Huang, J., M. Gu, Z. Lai, B. Fan, K. Shi, Y.-H. Zhou, J.-Q. Yu and Z. Chen (2010). "Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress." **Plant Physiol.** **4,153:** 1526-1538.
- Itkin, M., U. Heinig, O. Tzfadia, A. Bhide, B. Shinde, P. Cardenas, S. Bocobza, T. Unger, S. Malitsky and R. Finkers (2013). "Biosynthesis of antinutritional alkaloids in solanaceous crops is mediated by clustered genes." **Science** **6142,341:** 175-179.
- Iwaki, T., F. Osawa, M. Onishi, T. Koga, Y. Fujita, A. Hosomi, N. Tanaka, Y. Fukui and K. Takegawa (2003). "Characterization of *vps33+*, a gene required for vacuolar biogenesis and protein sorting in *Schizosaccharomyces pombe*." **Yeast** **10,20:** 845-855.
- Jahangirian, H., E. G. Lemraski, T. J. Webster, R. Rafiee-Moghaddam and Y. Abdollahi (2017). "A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine." **International Journal Of Nanomedicine.** **12:** 2957.
- Jeffries, T. W. (1991). "Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes." **Physiology Of Biodegradative Microorganisms**, 163-176.
- Jeon, J. R., P. Baldrian, K. Murugesan and Y. S. Chang (2012). "Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications." **Microbial Biotechnology** **3,5:** 318-332.
- Jiao, C., R. Yang, P. Wang, L. Tian and Z. Gu (2017). "Mitogen-activated protein kinase mediates nitric oxide-induced isoflavone accumulation in soybean sprouts under UVB radiation." **Canadian Journal Of Plant Science** **0,98:** 1-8.
- Jo, B.-S. and S. S. Choi (2015). "Introns: the functional benefits of introns in genomes." **Genomics & Informatics** **4,13:** 112-118.

- Jung, D. H., E. J. Kim, E. Jung, R. J. Kazlauskas, K. Y. Choi and B. G. Kim (2016). "Production of p-hydroxybenzoic acid from p-coumaric acid by *Burkholderia glumae* BGR1." **Biotechnology And Bioengineering** 7,113: 1493-1503.
- Karim, Q. A., S. S. A. Karim, J. A. Frohlich, A. C. Grobler, C. Baxter, L. E. Mansoor, A. B. Kharsany, S. Sibeko, K. P. Mlisana and Z. Omar (2010). "Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women." **Science** 599,329: 1168-1174.
- Kawai, S., A. Mori, T. Shiokawa, S. Kajita, Y. Katayama and N. Morohoshi (1996). "Isolation and analysis of cinnamic acid 4-hydroxylase homologous genes from a hybrid aspen, *Populus kitakamiensis*." **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry** 10,60: 1586-1597.
- Kawasaki, T., H. Koita, T. Nakatsubo, K. Hasegawa, K. Wakabayashi, H. Takahashi, K. Umemura, T. Umezawa and K. Shimamoto (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 Of The United States Of America** 1,103: 230-235.
- Keegstra, K. (2010). "Plant cell walls." **Plant Physiol.** 2,154: 483-486.
- Kent, W. J., C. W. Sugnet, T. S. Furey, K. M. Roskin, T. H. Pringle, A. M. Zahler and D. Haussler (2002). "The human genome browser at UCSC." **Genome Research** 6,12: 996-1006.
- Khin, M. M., A. S. Nair, V. J. Babu, R. Murugan and S. Ramakrishna (2012). "A review on nanomaterials for environmental remediation." **Energy & Environmental Science** 8,5: 8075-8109.
- Kim, Y.-H., C. Y. Kim, W.-K. Song, D.-S. Park, S.-Y. Kwon, H.-S. Lee, J.-W. Bang and S.-S. Kwak (2008). "Overexpression of *sweet potato swpa4 peroxidase* results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco." **Planta** 4,227: 867-881.
- Kocheva, L., M. Borisenkov, A. Karmanov, V. Mishurov, L. Spirikhin and Y. B. Monakov (2005). "Structure and antioxidant characteristics of wheat and oat lignins." **Russian Journal Of Applied Chemistry** 8,78: 1343-1350.
- Kosma, D. K., J. Murmu, F. M. Razeq, P. Santos, R. Bourgault, I. Molina and O. Rowland (2014). "AtMYB41 activates ectopic suberin synthesis and assembly in multiple plant species and cell types." **The Plant Journal** 2,80: 216-229.
- Kulkarni-Kale, U., S. Sawant and V. Chavan (2010). "Bioinformatics education in India." **Briefings In Bioinformatics** 6,11: 616-625.
- Kumar, M., L. Campbell and S. Turner (2015). "Secondary cell walls: biosynthesis and manipulation." **Journal Of Experimental Botany** 2,67: 515-531.
- Kumar, R., D. Vashisth, A. Misra, M. Q. Akhtar, S. U. Jalil, K. Shanker, M. M. Gupta, P. K. Rout, A. K. Gupta and A. K. Shasany (2016). "RNAi down-regulation of cinnamate-4-hydroxylase increases artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*." **Scientific Reports**,6: 26458.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016). "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets." **Molecular Biology And Evolution** 7,33: 1870-1874.
- Kundrotas, P. J. and E. Alexov (2006). "Electrostatic properties of protein-protein complexes." **Biophysical Journal** 5,91: 1724-1736.
- Lapierre, C., B. Pollet, M. Petit-Conil, G. Toval, J. Romero, G. Pilate, J.-C. Leplé, W. Boerjan, V. Ferret and V. De Nadai (1999). "Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping." **Plant Physiol.** 1,119: 153-164.
- Lauvergeat, V., C. Lacomme, E. Lacombe, E. Lasserre, D. Roby and J. Grima-Pettenati (2001). "Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria." **Phytochemistry** 7,57: 1187-1195.
- Le Roy, J., B. Huss, A. Creach, S. Hawkins and G. Neutelings (2016). "Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants." **Frontiers In Plant Science**,7.
- Leal, L. G., C. López and L. López-Kleine (2014). "Construction and comparison of gene co-expression networks shows complex plant immune responses." **PeerJ**,2: e610.
- Lee, B. R., S. Muneer, W. J. Jung, J. C. Avice, A. Ourry and T. H. Kim (2012). "Mycorrhizal colonization alleviates drought-induced oxidative damage and lignification in the leaves of drought-stressed perennial ryegrass (*Lolium perenne*)." **Physiol. Plant** 3,145: 440-449.
- Lee, B.-R., K.-Y. Kim, W.-J. Jung, J.-C. Avice, A. Ourry and T.-H. Kim (2007). "Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.)." **Journal Of Experimental Botany** 6,58: 1271-1279.
- Lee, H. K., A. K. Hsu, J. Sajdak, J. Qin and P. Pavlidis (2004). "Coexpression analysis of human genes across many microarray data sets." **Genome Research** 6,14: 1085-1094.
- Lee, J.-B., C. Yamagishi, K. Hayashi and T. Hayashi (2011). "Antiviral and immunostimulating effects of lignin-carbohydrate-protein complexes from *Pimpinella anisum*." **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry** 3,75: 459-465.

- Lee, J.-S., J. M. Hong, J. W. Jung, J.-H. Shim, J.-H. Oh and D.-W. Cho (2014). "3D printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration." **Biofabrication** 2,6: 024103.
- Lee, J. W., Y.-J. Choi, W.-J. Yong, F. Pati, J.-H. Shim, K. S. Kang, I.-H. Kang, J. Park and D.-W. Cho (2016). "Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering." **Biofabrication** 1,8: 015007.
- Lee, K. and H. Kang (2016). "Emerging roles of RNA-binding proteins in plant growth, development, and stress responses." **Molecules And Cells** 3,39: 179.
- Lee, S., H. Mo, J. Im Kim and C. Chapple (2017). "Genetic engineering of Arabidopsis to overproduce disinapoyl esters, potential lignin modification molecules." **Biotechnol Biofuels** 1,10: 40.
- Leple, J.-C., R. Dauwe, K. Morreel, V. Storme, C. Lapierre, B. Pollet, A. Naumann, K.-Y. Kang, H. Kim and K. Ruel (2007). "Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure." **The Plant Cell** 11,19: 3669-3691.
- Li, H., Y. Yang, Z. Wang, X. Guo, F. Liu, J. Jiang and G. Liu (2016). "*BpMADS12* gene role in lignin biosynthesis of *Betula platyphylla* Suk by transcriptome analysis." **Journal Of Forestry Research** 5,27: 1111-1120.
- Li, M., Y. Li, L. Guo, N. Gong, Y. Pang, W. Jiang, Y. Liu, X. Jiang, L. Zhao and Y. Wang (2017). "Functional Characterization of Tea (*Camellia sinensis*) MYB4a Transcription Factor Using an Integrative Approach." **Frontiers In Plant Science**,8: 943.
- Li, T., J. Aspler, A. Kingsland, L. M. Cormier and X. Zou (2016). "3d printing—a review of technologies, markets, and opportunities for the forest industry." **J. Sci. Technol. For. Prod. Process** 2,5: 30.
- Li, X. and C. Chapple (2010). "Understanding lignification: challenges beyond monolignol biosynthesis." **Plant Physiol.** 2,154: 449-452.
- Lievonen, M., J. J. Valle-Delgado, M.-L. Mattinen, E.-L. Hult, K. Lintinen, M. A. Kostianen, A. Paananen, G. R. Szilvay, H. Setälä and M. Österberg (2016). "A simple process for lignin nanoparticle preparation." **Green Chemistry** 5,18: 1416-1422.
- Lindermayr, C., B. Möllers, J. Fliegmann, A. Uhlmann, F. Lottspeich, H. Meimberg and J. Ebel (2002). "Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate: coenzyme A ligase gene family." **The FEBS Journal** 4,269: 1304-1315.
- Liu, Q., L. Luo and L. Zheng (2018). "Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants." **International Journal Of Molecular Sciences** 2,19: 335.
- Lorković, Z. J. (2009). "Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization." **Trends In Plant Science** 4,14: 229-236.
- Loscher, R. and L. Heide (1994). "Biosynthesis of p-hydroxybenzoate from p-coumarate and p-coumaroyl-coenzyme A in cell-free extracts of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures." **Plant Physiol.** 1,106: 271-279.
- Lu, F. and J. Ralph (2008). "Novel tetrahydrofuran structures derived from  $\beta$ - $\beta$ -coupling reactions involving sinapyl acetate in Kenaf lignins." **Organic & Biomolecular Chemistry** 20,6: 3681-3694.
- Lu, S., Y. Zhou, L. Li and V. L. Chiang (2006). "Distinct roles of cinnamate 4-hydroxylase genes in *Populus*." **Plant and Cell Physiology** 7,47: 905-914.
- Lunt, B., H. Szurmant, A. Procaccini, J. A. Hoch, T. Hwa and M. Weigt (2010). "Chapter Two-Inference of Direct Residue Contacts in Two-Component Signaling." **Methods In Enzymology**,471: 17-41.
- Lyczakowski, J. J., K. B. Wicher, O. M. Terrett, N. Faria-Blanc, X. Yu, D. Brown, K. B. Krogh, P. Dupree and M. Busse-Wicher (2017). "Removal of glucuronic acid from xylan is a strategy to improve the conversion of plant biomass to sugars for bioenergy." **Biotechnol Biofuels** 1,10: 224.
- Ma, Q.-H. (2010). "Functional analysis of a cinnamyl alcohol dehydrogenase involved in lignin biosynthesis in wheat." **Journal Of Experimental Botany** 10,61: 2735-2744.
- MacDonald, M. J. and G. B. D'Cunha (2007). "A modern view of phenylalanine ammonia lyase." **Biochemistry and Cell Biology** 3,85: 273-282.
- Maeda, H. and N. Dudareva (2012). "The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants." **Annu Rev Plant Biol**,63: 73-105.
- Mahmoudi, H., J. Huang, M. Y. Gruber, R. Kaddour, M. Lachaâl, Z. Ouerghi and A. Hannoufa (2010). "The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite accumulation, and antioxidative responses in lettuce." **J Agric Food Chem** 8,58: 5122-5130.
- Mangeon, A., R. M. Junqueira and G. Sachetto-Martins (2010). "Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily." **Plant Signaling & Behavior** 2,5: 99-104.
- Marcelo, G., M. López-González, I. Trabado, M. M. Rodrigo, M. Valiente and F. Mendicuti (2016). "Lignin inspired PEG hydrogels for drug delivery." **Materials Today Communications**,7: 73-80.

- Martin, I., P. J. Simmons and D. F. Williams (2014). "Manufacturing challenges in regenerative medicine." **Science Translational Medicine** 232,6: 232fs216-232fs216.
- Mateille, T. (1994). "Biology of the plant-nematode relationship: physiological changes and the defence mechanism of plants." **Nematologica (Netherlands)**.
- Mellerowicz, E. J. and B. Sundberg (2008). "Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties." **Current Opinion In Plant Biology** 3,11: 293-300.
- Michalski, M. H. and J. S. Ross (2014). "The shape of things to come: 3D printing in medicine." **Jama** 21,312: 2213-2214.
- Mikkelsen, M. D., J. Harholt, P. Ulvskov, I. E. Johansen, J. U. Fangel, M. S. Doblin, A. Bacic and W. G. Willats (2014). "Evidence for land plant cell wall biosynthetic mechanisms in charophyte green algae." **Annals Of Botany** 6,114: 1217-1236.
- Mishra, M. (2014). "3D Printing Technology." **Science Horizon**,43.
- Mitchell, R. A., P. Dupree and P. R. Shewry (2007). "A novel bioinformatics approach identifies candidate genes for the synthesis and feruloylation of arabinoxylan." **Plant Physiol.** 1,144: 43-53.
- Mizutani, M., D. Ohta and R. Sato (1997). "Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from Arabidopsis and its expression manner in planta." **Plant Physiol.** 3,113: 755-763.
- Morant, A. V., K. Jørgensen, C. Jørgensen, S. M. Paquette, R. Sánchez-Pérez, B. L. Møller and S. Bak (2008). "β-Glucosidases as detonators of plant chemical defense." **Phytochemistry** 9,69: 1795-1813.
- Motari, M., U. Quach, H. Thorsteinsdóttir, D. K. Martin, A. S. Daar and P. A. Singer (2004). "South Africa—blazing a trail for African biotechnology." **Nature Biotechnology**,22: DC37-DC41.
- Moura, J. C. M. S., C. A. V. Bonine, J. De Oliveira Fernandes Viana, M. C. Dornelas and P. Mazzafera (2010). "Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants." **Journal Of Integrative Plant Biology** 4,52: 360-376.
- Movahedi, S., M. Van Bel, K. S. Heyndrickx and K. Vandepoele (2012). "Comparative co-expression analysis in plant biology." **Plant Cell Environ.** 10,35: 1787-1798.
- Murphy, S. V. and A. Atala (2014). "3D bioprinting of tissues and organs." **Nature Biotechnology** 8,32: 773-785.
- Mutwil, M., S. Klie, T. Tohge, F. M. Giorgi, O. Wilkins, M. M. Campbell, A. R. Fernie, B. Usadel, Z. Nikoloski and S. Persson (2011). "PlaNet: combined sequence and expression comparisons across plant networks derived from seven species." **The Plant Cell** 3,23: 895-910.
- Mutwil, M., B. Usadel, M. Schütte, A. Loraine, O. Ebenhöf and S. Persson (2010). "Assembly of an interactive correlation network for the Arabidopsis genome using a novel heuristic clustering algorithm." **Plant Physiol.** 1,152: 29-43.
- Naoumkina, M. A., Q. Zhao, L. GALLEGU-GIRALDO, X. Dai, P. X. Zhao and R. A. Dixon (2010). "Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways." **Molecular Plant Pathology** 6,11: 829-846.
- Netotea, S., D. Sundell, N. R. Street and T. R. Hvidsten (2014). "ComPIEx: conservation and divergence of co-expression networks in *A. thaliana*, *Populus* and *O. sativa*." **BMC Genomics** 1,15: 106.
- Neves, G., R. Marchiosi, M. Ferrarese, R. Siqueira-Soares and O. Ferrarese-Filho (2010). "Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean." **Journal Of Agronomy And Crop Science** 6,196: 467-473.
- Novo, M., C. Silvar, F. Merino, T. Martínez-Cortés, F. Lu, J. Ralph and F. Pomar (2017). "Deciphering the role of the phenylpropanoid metabolism in the tolerance of *Capsicum annum* L. to *Verticillium dahliae* Kleb." **Plant Science**,258: 12-20.
- Obayashi, T., S. Hayashi, M. Saeki, H. Ohta and K. Kinoshita (2008). "ATTED-II provides coexpressed gene networks for Arabidopsis." **Nucleic Acids Research Suppl** 1,37: D987-D991.
- Obayashi, T. and K. Kinoshita (2009). "Rank of correlation coefficient as a comparable measure for biological significance of gene coexpression." **DNA Research** 5,16: 249-260.
- Obayashi, T., K. Kinoshita, K. Nakai, M. Shibaoka, S. Hayashi, M. Saeki, D. Shibata, K. Saito and H. Ohta (2006). "ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in Arabidopsis." **Nucleic Acids Research Suppl** 1,35: D863-D869.
- Oetzuerk-Winder, F. and J.-J. Ventura (2012). "The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation." **Biochemical Journal** 1,445: 1-10.
- Ogata, H., S. Goto, K. Sato, W. Fujibuchi, H. Bono and M. Kanehisa (1999). "KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes." **Nucleic Acids Research** 1,27: 29-34.
- Oikawa, A., H. J. Joshi, E. A. Rennie, B. Ebert, C. Manisseri, J. L. Heazlewood and H. V. Scheller (2010). "An integrative approach to the identification of Arabidopsis and rice genes involved in xylan and secondary wall development." **PLoS One** 11,5: e15481.



- Pan, H., R. Zhou, G. V. Louie, J. K. Mühlemann, E. K. Bomati, M. E. Bowman, N. Dudareva, R. A. Dixon, J. P. Noel and X. Wang (2014). "Structural studies of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase, key enzymes of monolignol biosynthesis." **The Plant Cell** **9,26**: 3709-3727.
- Pan, X., J. F. Kadla, K. Ehara, N. Gilkes and J. N. Saddler (2006). "Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity." **J Agric Food Chem** **16,54**: 5806-5813.
- Park, J. W. and B. R. Graveley (2007). "Complex alternative splicing." **Advances In Experimental Medicine And Biology**,**623**: 50.
- Payyavula, R. S., R. Shakya, V. G. Sengoda, J. E. Munyaneza, P. Swamy and D. A. Navarre (2015). "Synthesis and regulation of chlorogenic acid in potato: Rerouting phenylpropanoid flux in HQT-silenced lines." **Plant Biotechnology Journal** **4,13**: 551-564.
- Pearce, J. (1983). "Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue." **Proceedings Of The Nutrition Society** **2,42**: 263-271.
- Pérez, J., J. Munoz-Dorado, T. de la Rubia and J. Martinez (2002). "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview." **International Microbiology** **2,5**: 53-63.
- Perron, N. R. and J. L. Brumaghim (2009). "A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding." **Cell Biochemistry And Biophysics** **2,53**: 75-100.
- Persson, S., H. Wei, J. Milne, G. P. Page and C. R. Somerville (2005). "Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets." **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America** **24,102**: 8633-8638.
- Petrik, D. L., S. D. Karlen, C. L. Cass, D. Padmakshan, F. Lu, S. Liu, P. Bris, S. Antelme, N. Santoro and C. G. Wilkerson (2014). "p-Coumaroyl-CoA: monolignol transferase (PMT) acts specifically in the lignin biosynthetic pathway in *Brachypodium distachyon*." **The Plant Journal** **5,77**: 713-726.
- Pettolino, F. A., C. Walsh, G. B. Fincher and A. Bacic (2012). "Determining the polysaccharide composition of plant cell walls." **Nature Protocols** **9,7**: 1590.
- Peukert, M., S. Weise, M. S. Röder and I. E. Matthies (2013). "Development of SNP markers for genes of the phenylpropanoid pathway and their association to kernel and malting traits in barley." **BMC Genetics** **1,14**: 97.
- Popper, Z. A. and S. C. Fry (2003). "Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes." **Annals Of Botany** **1,91**: 1-12.
- Popper, Z. A., G. Michel, C. Hervé, D. S. Domozych, W. G. Willats, M. G. Tuohy, B. Kloareg and D. B. Stengel (2011). "Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants." **Annu Rev Plant Biol**,**62**: 567-590.
- Popper, Z. A. and M. G. Tuohy (2010). "Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls." **Plant Physiol.** **2,153**: 373-383.
- Proost, S. and M. Mutwil (2017). "PlaNet: Comparative Co-Expression Network Analyses for Plants." **Plant Genomics Databases: Methods And Protocols**: 213-227.
- Qian, Y., X. Qiu and S. Zhu (2015). "Lignin: a nature-inspired sun blocker for broad-spectrum sunscreens." **Green Chemistry** **1,17**: 320-324.
- Quesille-Villalobos, A. M., J. S. Torrico and L. G. Ranilla (2013). "Phenolic compounds, antioxidant capacity, and in vitro  $\alpha$ -amylase inhibitory potential of tea infusions (*Camellia sinensis*) commercialized in Chile." **CyTA-Journal Of Food** **1,11**: 60-67.
- Raes, J., A. Rohde, J. H. Christensen, Y. Van de Peer and W. Boerjan (2003). "Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*." **Plant Physiol.** **3,133**: 1051-1071.
- Ralph, J. (1996). "An unusual lignin from kenaf." **Journal Of Natural Products** **4,59**: 341-342.
- Ralph, J. and F. Lu (1998). "The DFRC method for lignin analysis. Part 6. A modified method to determine acetate regiochemistry on native and isolated lignins." **J. Agric. Food Chem.****46**: 4616-4619.
- Reddy, B. S., Y. Maeura and M. Wayman (1983). "Effect of Dietary Corn Bran and Autohydrolyzed Lignin on 3, 2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl-Induced Intestinal Carcinogenesis in Male F344 Rats 2 3." **Journal Of The National Cancer Institute** **2,71**: 419-423.
- Rhee, S. Y. and M. Mutwil (2014). "Towards revealing the functions of all genes in plants." **Trends In Plant Science** **4,19**: 212-221.
- Richter, A. P., B. Bharti, H. B. Armstrong, J. S. Brown, D. Plemmons, V. N. Paunov, S. D. Stoyanov and O. D. Velev (2016). "Synthesis and characterization of biodegradable lignin nanoparticles with tunable surface properties." **Langmuir** **25,32**: 6468-6477.
- Roberts, A. W., E. M. Roberts and C. H. Haigler (2012). "Moss cell walls: structure and biosynthesis." **Frontiers in plant science**,**3**.

- Ruprecht, C., M. Mutwil, F. Saxe, M. Eder, Z. Nikoloski and S. Persson (2011). "Large-scale co-expression approach to dissect secondary cell wall formation across plant species." **Frontiers In Plant Science**,2: 23.
- Russell, C., A. Rahman and A. R. Mohammed (2013). "Application of genomics, proteomics and metabolomics in drug discovery, development and clinic." **Therapeutic delivery** 4,3 (2013): 395-413.
- Rytioja, J., K. Hildén, J. Yuzon, A. Hatakka, R. P. de Vries and M. R. Mäkelä (2014). "Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes." **Microbiology And Molecular Biology Reviews** 4,78: 614-649.
- Sakagami, H. (2014). "Biological activities and possible dental application of three major groups of polyphenols." **Journal of pharmacological sciences** 2,126: 92-106.
- Sakagami, H., H. Sheng, N. Okudaira, T. Yasui, H. Wakabayashi, J. Jia, T. Natori, M. Suguro-Kitajima, H. Oizumi and T. Oizumi (2016). "Prominent Anti-UV Activity and Possible Cosmetic Potential of Lignin-carbohydrate Complex." **In Vivo** 4,30: 331-339.
- Salvachúa, D., A. Prieto, Á. T. Martínez and M. J. Martínez (2013). "Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw." **Applied And Environmental Microbiology** 14,79: 4316-4324.
- Salvador, V. H., R. B. Lima, W. D. dos Santos, A. R. Soares, P. A. F. Böhm, R. Marchiosi, M. d. L. L. Ferrarese and O. Ferrarese-Filho (2013). "Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth." **PLoS One** 7,8: e69105.
- Sánchez, C. (2009). "Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi." **Biotechnology Advances** 2,27: 185-194.
- Sang, W., W.-H. Ma, L. Qiu, Z.-H. Zhu and C.-L. Lei (2012). "The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle *Tribolium castaneum*." **Journal Of Insect Physiology** 6,58: 830-836.
- Sarkanen, K. V. and C. H. Ludwig (1971). "Lignins. Occurrence, formation, structure, and reactions." **New York.; Wiley-Interscience**.
- Sarkissian, C. N. and A. Gámez (2005). "Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now?" **Molecular Genetics And Metabolism**,86: 22-26.
- Sato, S., Y. Mukai, Y. Tokuoka, K. Mikame, M. Funaoka and S. Fujita (2012). "Effect of lignin-derived lignophenols on hepatic lipid metabolism in rats fed a high-fat diet." **Environmental Toxicology And Pharmacology** 2,34: 228-234.
- Sazegari, S., A. Niazi and F. S. Ahmadi (2015). "A study on the regulatory network with promoter analysis for *Arabidopsis* DREB-genes." **Bioinformatics** 2,11: 101.
- Sboner, A., X. J. Mu, D. Greenbaum, R. K. Auerbach and M. B. Gerstein (2011). "The real cost of sequencing: higher than you think!" **Genome Biology** 8,12: 125.
- Schillmiller, A. L., J. Stout, J. K. Weng, J. Humphreys, M. O. Ruegger and C. Chapple (2009). "Mutations in the *cinnamate 4-hydroxylase* gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*." **The Plant Journal** 5,60: 771-782.
- Schneider, R., W. Rolling, Q. Song, P. Cregan, A. E. Dorrance and L. K. McHale (2016). "Genome-wide association mapping of partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean plant introductions from the Republic of Korea." **BMC Genomics** 1,17: 607.
- Schwartz, R., C. S. Ting and J. King (2001). "Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life." **Genome Research** 5,11: 703-709.
- Seol, Y.-J., T.-Y. Kang and D.-W. Cho (2012). "Solid freeform fabrication technology applied to tissue engineering with various biomaterials." **Soft Matter** 6,8: 1730-1735.
- Serin, E. A., H. Nijveen, H. W. Hilhorst and W. Ligterink (2016). "Learning from co-expression networks: possibilities and challenges." **Frontiers In Plant Science**,7: 444.
- Shadle, G., F. Chen, M. S. Reddy, L. Jackson, J. Nakashima and R. A. Dixon (2007). "Down-regulation of *hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase* in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality." **Phytochemistry** 11,68: 1521-1529.
- Sharan, M., G. Taguchi, K. Gonda, T. Jouke, M. Shimosaka, N. Hayashida and M. Okazaki (1998). "Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures." **Plant Science** 1,132: 13-19.
- Sharma, A. (2015). "In silico identification of regulatory motifs in co-expressed genes under osmotic stress representing their co-regulation." **Plant Gene**,1: 29-34.
- Shen, B., C. Li and M. C. Tarczynski (2002). "High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene." **The Plant Journal** 3,29: 371-380.
- Shi, Y., X. Zhang, Z. Y. Xu, L. Li, C. Zhang, M. Schläppi and Z. Q. Xu (2011). "Influence of EARLI1-like genes on flowering time and lignin synthesis of *Arabidopsis thaliana*." **Plant Biology** 5,13: 731-739.

- Shimizu, B.-I. (2014). "2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in the biosynthesis of simple coumarins." **Frontiers In Plant Science**,5: 549.
- Shinya, T., E. Iwata, K. Nakahama, Y. Fukuda, K. Hayashi, K. Nanto, A. C. Rosa and A. Kawaoka (2016). "Transcriptional profiles of hybrid Eucalyptus genotypes with contrasting lignin content reveal that monolignol biosynthesis-related genes regulate wood composition." **Frontiers In Plant Science**,7: 443.
- Shukla, M. R., A. S. Singh, K. Piunno, P. K. Saxena and A. M. P. Jones (2017). "Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems." **Plant Methods** 1,13: 6.
- Sibout, R. and H. Höfte (2012). "Plant cell biology: the ABC of monolignol transport." **Current Biology** 13,22: R533-R535.
- Siminszky, B., F. T. Corbin, E. R. Ward, T. J. Fleischmann and R. E. Dewey (1999). "Expression of a soybean *cytochrome P450 monooxygenase* cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 4,96: 1750-1755.
- Singh, B. P. (2013). "**Biofuel Crops: Production, Physiology And Genetics.**" CABI.
- Sircar, D. and A. Mitra (2008). "Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*." **Journal Of Plant Physiology** 4,165: 407-414.
- Somerville, C., H. Youngs, C. Taylor, S. C. Davis and S. P. Long (2010). "Feedstocks for lignocellulosic biofuels." **Science** 599,329: 790-792.
- Song, Y. H., R. W. Smith, B. J. To, A. J. Millar and T. Imaizumi (2012). "FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering." **Science** 608,4,336: 1045-1049.
- Sørensen, I., F. A. Pettolino, A. Bacic, J. Ralph, F. Lu, M. A. O'Neill, Z. Fei, J. K. Rose, D. S. Domozych and W. G. Willats (2011). "The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls." **The Plant Journal** 2,68: 201-211.
- Speck, T. and I. Burgert (2011). "Plant stems: functional design and mechanics." **Annual Review of Materials Research**,41: 169-193.
- Srivastava, V., H. Schinkel, J. Witzell, M. Hertzberg, M. Torp, M. K. Srivastava, B. Karpinska, M. Melzer and G. Wingsle (2007). "Downregulation of high-isoelectric-point extracellular superoxide dismutase mediates alterations in the metabolism of reactive oxygen species and developmental disturbances in hybrid aspen." **The Plant Journal** 1,49: 135-148.
- Stekhoven, F. S., M. Gorissen and G. Flik (2008). "The isoelectric point, a key to understanding a variety of biochemical problems: a minireview." **Fish Physiology And Biochemistry** 1,34: 1-8.
- Strack, D., W. Gross, V. Wray and L. Grotjahn (1987). "Enzymic synthesis of caffeoylglucaric acid from chlorogenic acid and glucaric acid by a protein preparation from tomato cotyledons." **Plant Physiol.** 3,83: 475-478.
- Stuart, J. M., E. Segal, D. Koller and S. K. Kim (2003). "A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules." **Science** 564,3,302: 249-255.
- Su, A. I., M. P. Cooke, K. A. Ching, Y. Hakak, J. R. Walker, T. Wiltshire, A. P. Orth, R. G. Vega, L. M. Sapinoso and A. Moqrich (2002). "Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 7,99: 4465-4470.
- Sugano, Y., R. Muramatsu, A. Ichianagi, T. Sato and M. Shoda (2007). "DyP, a Unique Dye-decolorizing Peroxidase, Represents a Novel Heme Peroxidase Family ASP171 REPLACES THE DISTAL HISTIDINE OF CLASSICAL PEROXIDASES." **Journal Of Biological Chemistry** 50,282: 36652-36658.
- Sun, X., C. Wang, N. Xiang, X. Li, S. Yang, J. Du, Y. Yang and Y. Yang (2017). "Activation of secondary cell wall biosynthesis by miR319-targeted TCP4 transcription factor." **Plant Biotechnology Journal** 10,15: 1284-1294.
- Sung, C. B., K. Si-Yong, B. Hyeun-Jong, L. Hyoun-Sub, P. Eui-Ho and B. Hanhong (2012). "Transcriptional analysis of the *rho-coumarate 3-hydroxylase (C3H)* gene from *Hibiscus cannabinus* L. during developmental stages in various tissues and in response to abiotic stresses." **Research Journal Of Biotechnology** 3,7: 23-33.
- Swarbreck, D., C. Wilks, P. Lamesch, T. Z. Berardini, M. Garcia-Hernandez, H. Foerster, D. Li, T. Meyer, R. Muller and L. Ploetz (2007). "The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation." **Nucleic Acids Research Suppl** 1,36: D1009-D1014.
- Takeda, Y., T. Koshiba, Y. Tobimatsu, S. Suzuki, S. Murakami, M. Yamamura, M. M. Rahman, T. Takano, T. Hattori and M. Sakamoto (2017). "Regulation of *CONIFERALDEHYDE 5-HYDROXYLASE* expression to modulate cell wall lignin structure in rice." **Planta**: 1-13.
- Tao, S., D. Wang, C. Jin, W. Sun, X. Liu, S. Zhang, F. Gao and S. Khanizadeh (2015). "*Cinnamate-4-Hydroxylase* Gene Is Involved in the Step of Lignin Biosynthesis in Chinese White Pear." **Journal Of The American Society For Horticultural Science** 6,140: 573-579.
- Teponno, R. B., S. Kusari and M. Spiteller (2016). "Recent advances in research on lignans and neolignans." **Natural Product Reports** 9,33: 1044-1092.

Teutschbein, J., W. Gross, M. Nimtz, C. Milkowski, B. Hause and D. Strack (2010). "Identification and localization of a lipase-like acyltransferase in phenylpropanoid metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum*)."  
**Journal Of Biological Chemistry** **49,285: 38374-38381**.

Tkaczuk, K. L., I. A. Shumilin, M. Chruszcz, E. Evdokimova, A. Savchenko and W. Minor (2013). "Structural and functional insight into the universal stress protein family."  
**Evolutionary Applications** **3,6: 434-449**.

Tohge, T., S. Alseekh and A. R. Fernie (2014). "On the regulation and function of secondary metabolism during fruit development and ripening."  
**Journal Of Experimental Botany** **16,65: 4599-4611**.

Toledano, A., L. Serrano, A. M. Balu, R. Luque, A. Pineda and J. Labidi (2013). "Fractionation of organosolv lignin from olive tree clippings and its valorization to simple phenolic compounds."  
**ChemSusChem** **3,6: 529-536**.

Tress, M. L., F. Abascal and A. Valencia (2017). "Alternative splicing may not be the key to proteome complexity."  
**Trends In Biochemical Sciences** **2,42: 98-110**.

Tu, Y., S. Rochfort, Z. Liu, Y. Ran, M. Griffith, P. Badendorst, G. V. Louie, M. E. Bowman, K. F. Smith and J. P. Noel (2010). "Functional analyses of caffeic acid O-methyltransferase and cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*)."  
**The Plant Cell** **10,22: 3357-3373**.

Tundis, R., M. Loizzo and F. Menichini (2010). "Natural products as  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update."  
**Mini Reviews In Medicinal Chemistry** **4,10: 315-331**.

Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka and M. Itävaara (2000). "Biodegradation of lignin in a compost environment: a review."  
**Bioresource Technology** **2,72: 169-183**.

Tzfadia, O., D. Amar, L. M. Bradbury, E. T. Wurtzel and R. Shamir (2012). "The MORPH algorithm: ranking candidate genes for membership in Arabidopsis and tomato pathways."  
**The Plant Cell** **11,24: 4389-4406**.

Tzfadia, O., T. Diels, S. De Meyer, K. Vandepoele, A. Aharoni and Y. Van de Peer (2016). "CoExpNetViz: comparative co-expression networks construction and visualization tool."  
**Frontiers In Plant Science**, **6: 1194**.

Tzin, V. and G. Galili (2010). "The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*."  
**The Arabidopsis Book**: e0132.

Ugartondo, V., M. Mitjans and M. P. Vinardell (2008). "Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources."  
**Bioresource Technology** **14,99: 6683-6687**.

Uritani, I. (1999). "Biochemistry on postharvest metabolism and deterioration of some tropical tuberous crops."  
**Botanical Bulletin Of Academia Sinica**, **40**.

Usadel, B., T. Obayashi, M. Mutwil, F. M. Giorgi, G. W. Bassel, M. Tanimoto, A. Chow, D. Steinhäuser, S. Persson and N. J. Provart (2009). "Co-expression tools for plant biology: opportunities for hypothesis generation and caveats."  
**Plant Cell Environ.** **12,32: 1633-1651**.

Vain, P. (2011). "Brachypodium as a model system for grass research."  
**Journal Of Cereal Science** **1,54: 1-7**.

Vanholme, R., I. Cesarino, K. Rataj, Y. Xiao, L. Sundin, G. Goeminne, H. Kim, J. Cross, K. Morreel and P. Araujo (2013). "Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in Arabidopsis."  
**Science** **6150,341: 1103-1106**.

Vanholme, R., B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph and W. Boerjan (2010). "Lignin biosynthesis and structure."  
**Plant Physiol.** **3,153: 895-905**.

Vanholme, R., V. Storme, B. Vanholme, L. Sundin, J. H. Christensen, G. Goeminne, C. Halpin, A. Rohde, K. Morreel and W. Boerjan (2012). "A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in Arabidopsis."  
**The Plant Cell** **9,24: 3506-3529**.

Vermerris, W., D. M. Sherman and L. M. McIntyre (2010). "Phenotypic plasticity in cell walls of maize brown midrib mutants is limited by lignin composition."  
**Journal Of Experimental Botany** **9,61: 2479-2490**.

Vincent, D., C. Lapierre, B. Pollet, G. Cornic, L. Negroni and M. Zivy (2005). "Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation."  
**Plant Physiol.** **3,137: 949-960**.

Vishwanath, S. J., C. Delude, F. Domergue and O. Rowland (2015). "Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier."  
**Plant Cell Reports** **4,34: 573-586**.

Voelkel, S. L., B. Lachenbruch, F. C. Meinzer, M. Jourdes, C. Ki, A. M. Patten, L. B. Davin, N. G. Lewis, G. A. Tuskan and L. Gunter (2010). "Antisense down-regulation of *4CL* expression alters lignification, tree growth, and saccharification potential of field-grown poplar."  
**Plant Physiol.** **2,154: 874-886**.

Wadenbäck, J., S. von Arnold, U. Egertsdotter, M. H. Walter, J. Grima-Pettenati, D. Goffner, G. Gellerstedt, T. Gullion and D. Clapham (2008). "Lignin biosynthesis in transgenic Norway spruce plants harboring an antisense construct for cinnamoyl CoA reductase (CCR)."  
**Transgenic research** **3,17: 379-392**.

- Wang, H., J. H. Yang, F. Chen, I. Torres-Jerez, Y. Tang, M. Wang, Q. Du, X. Cheng, J. Wen and R. Dixon (2016). "Transcriptome analysis of secondary cell wall development in *Medicago truncatula*." **BMC Genomics** **17**: 23.
- Wang, H., L. Zhou, Y. Fu, M. Y. CHEUNG, F. L. WONG, T. H. PHANG, Z. Sun and H. M. LAM (2012). "Expression of an apoplast-localized BURP-domain protein from soybean (*GmRD22*) enhances tolerance towards abiotic stress." **Plant Cell Environ.** **11,35**: 1932-1947.
- Wang, J., Y. Deng, Y. Qian, X. Qiu, Y. Ren and D. Yang (2016). "Reduction of lignin color via one-step UV irradiation." **Green Chemistry** **3,18**: 695-699.
- Wang, Y., M. Chantreau, R. Sibout and S. Hawkins (2013). "Plant cell wall lignification and monolignol metabolism." **Frontiers In Plant Science**,4.
- Wang, Y., C. Fan, H. Hu, Y. Li, D. Sun, Y. Wang and L. Peng (2016). "Genetic modification of plant cell walls to enhance biomass yield and biofuel production in bioenergy crops." **Biotechnology Advances** **5,34**: 997-1017.
- Wanner, L. A., G. Li, D. Ware, I. E. Somssich and K. R. Davis (1995). "The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*." **Plant Molecular Biology** **2,27**: 327-338.
- Wagner, A., L. Donaldson, H. Kim, L. Phillips, H. Flint, D. Steward, K. Torr, G. Koch, U. Schmitt and J. Ralph (2009). "Suppression of 4-coumarate-CoA ligase in the coniferous gymnosperm *Pinus radiata*." **Plant Physiol.** **1,149**: 370-383.
- Weisshaar, B. and G. I. Jenkins (1998). "Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation." **Current Opinion In Plant Biology** **3,1**: 251-257.
- Welker, C. M., V. K. Balasubramanian, C. Petti, K. M. Rai, S. DeBolt and V. Mendu (2015). "Engineering plant biomass lignin content and composition for biofuels and bioproducts." **Energies** **8,8**: 7654-7676.
- Weng, J.-K., X. Li, J. Stout and C. Chapple (2008). "Independent origins of syringyl lignin in vascular plants." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** **22,105**: 7887-7892.
- Whetten, R. and R. Sederoff (1995). "Lignin biosynthesis." **The plant cell** **7,7**: 1001.
- Withers, S., F. Lu, H. Kim, Y. Zhu, J. Ralph and C. G. Wilkerson (2012). "Identification of grass-specific enzyme that acylates monolignols with p-coumarate." **Journal Of Biological Chemistry** **11,287**: 8347-8355.
- Wyman, C. E. (1999). "Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges." **Annual Review Of Energy And The Environment** **1,24**: 189-226.
- WYRAMBIK, D. and H. GRISEBACH (1979). "Enzymic synthesis of lignin precursors." **The FEBS Journal** **2,97**: 503-509.
- Xiong, J. (2006). "**Essential Bioinformatics**." Cambridge University Press.
- Xu, Z., D. Zhang, J. Hu, X. Zhou, X. Ye, K. L. Reichel, N. R. Stewart, R. D. Syrenne, X. Yang and P. Gao (2009). "Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom." **BMC bioinformatics** **11,10**: S3.
- Yan, L., C. Xu, Y. Kang, T. Gu, D. Wang, S. Zhao and G. Xia (2013). "The heterologous expression in *Arabidopsis thaliana* of sorghum transcription factor *SbBHLH1* downregulates lignin synthesis." **Journal Of Experimental Botany** **10,64**: 3021-3032.
- Yang, F., P. Mitra, L. Zhang, L. Prak, Y. Verhertbruggen, J. S. Kim, L. Sun, K. Zheng, K. Tang and M. Auer (2013). "Engineering secondary cell wall deposition in plants." **Plant Biotechnology Journal** **3,11**: 325-335.
- Yin, Z., W. Zhang, F. Feng, Y. Zhang and W. Kang (2014). " $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants." **Food Science And Human Wellness** **3,3**: 136-174.
- Yonekura-Sakakibara, K., A. Fukushima, R. Nakabayashi, K. Hanada, F. Matsuda, S. Sugawara, E. Inoue, T. Kuromori, T. Ito and K. Shinozaki (2012). "Two glycosyltransferases involved in anthocyanin modification delineated by transcriptome independent component analysis in *Arabidopsis thaliana*." **The Plant Journal** **1,69**: 154-167.
- Yoon, J., H. Choi and G. An (2015). "Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development." **Journal Of Integrative Plant Biology** **11,57**: 902-912.
- You, M. and D. W. Crabb (2004). "Recent advances in alcoholic liver disease II. Minireview: molecular mechanisms of alcoholic fatty liver." **American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology** **1,287**: G1-G6.
- Yuan, Y., S. Yu, J. Yu, Z. Zhan, M. Li, G. Liu, X. Wang and L. Huang (2014). "Predicting the function of 4-coumarate: CoA ligase (LJ4CL1) in *Lonicera japonica*." **International Journal Of Molecular Sciences** **2,15**: 2386-2399.
- Zhang, C., X. Wang, F. Zhang, L. Dong, J. Wu, Q. Cheng, D. Qi, X. Yan, L. Jiang and S. Fan (2017). "Phenylalanine ammonia-lyase2. 1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection." **Scientific Reports** **1,7**: 7242.
- Zhang, J., H. Ge, C. Zang, X. Li, D. Grierson, K.-s. Chen and X.-r. Yin (2016). "Ejodo1, a MYB transcription factor, regulating lignin biosynthesis in developing loquat (*Eriobotrya japonica*) fruit." **Frontiers In Plant Science**,7: 1360.
- Zhang, Y., P. P.-H. But, V. E.-C. Ooi, H.-X. Xu, G. D. Delaney, S. H. Lee and S. F. Lee (2007). "Chemical properties, mode of action, and In Vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*." **Antiviral Research** **3,75**: 242-249.

Zhong, R. and Z.-H. Ye (2014). "Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation." **Plant and Cell Physiology** 2,56: 195-214.

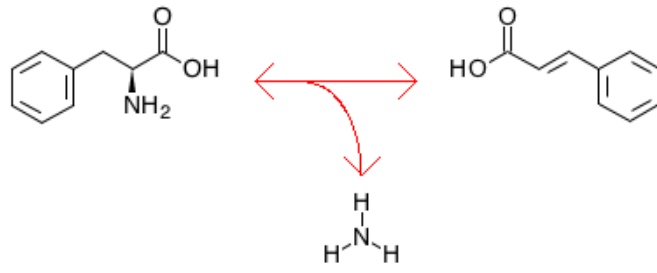
Zhou, M., Y. Lu, G. Bethke, B. T. Harrison, N. Hatsugai, F. Katagiri and J. Glazebrook (2018). "WRKY70 prevents axenic activation of plant immunity by direct repression of SARD1." **New Phytologist** 2,217: 700-712.

Zhou, R., L. Jackson, G. Shadle, J. Nakashima, S. Temple, F. Chen and R. A. Dixon (2010). "Distinct cinnamoyl CoA reductases involved in parallel routes to lignin in *Medicago truncatula*." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 41,107: 17803-17808.

Zhou, X., J. Li, Y. Zhu, S. Ni, J. Chen, X. Feng, Y. Zhang, S. Li, H. Zhu and Y. Wen (2017). "De novo Assembly of the *Camellia nitidissima* Transcriptome Reveals Key Genes of Flower Pigment Biosynthesis." **Frontiers In Plant Science**,8: 1545.

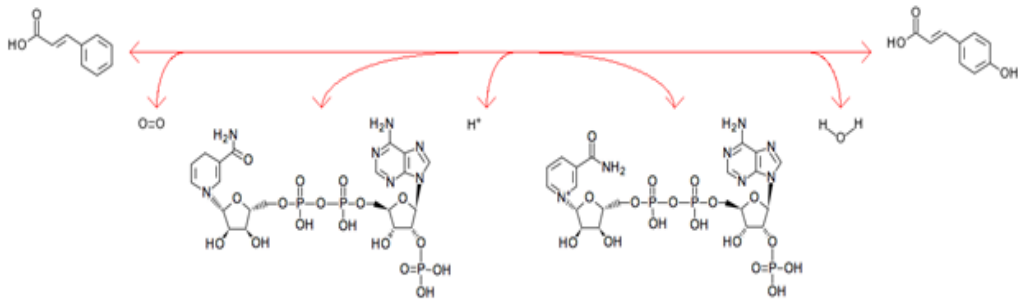
پیوست

(الف)



L- فنیل آلانین ⇌ آمونیاک + ترانس سینامات

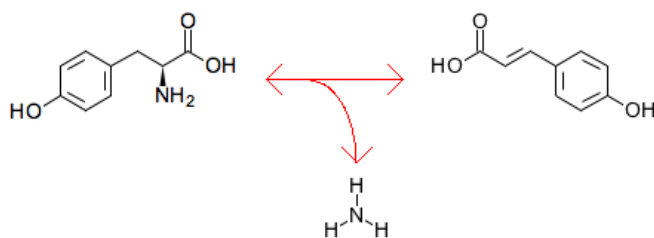
(ب)



ترانس سینامات + NADPH + H<sup>+</sup> + اکسیژن ⇌ P-کومارات + NADP<sup>+</sup> + آب

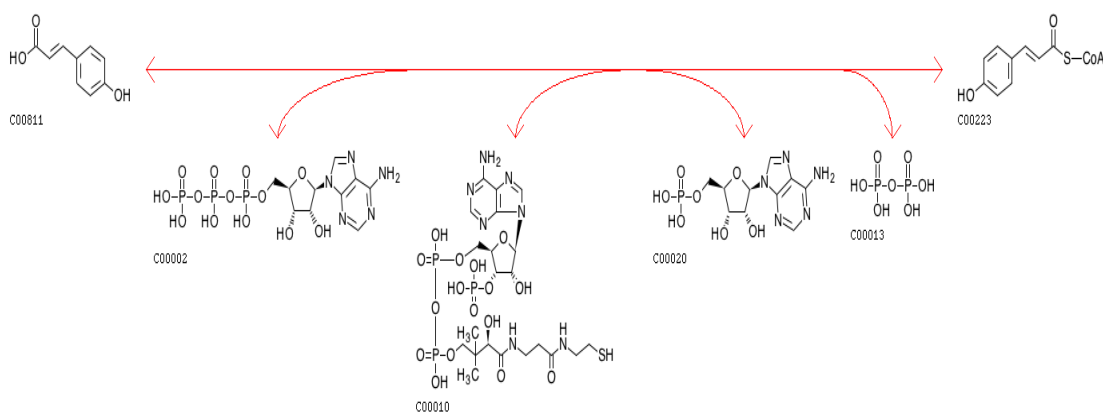


ج



L- تیروزین  $\Leftrightarrow$  -P- کومارات + آمونیاک

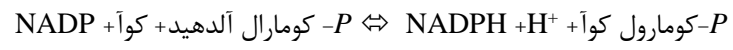
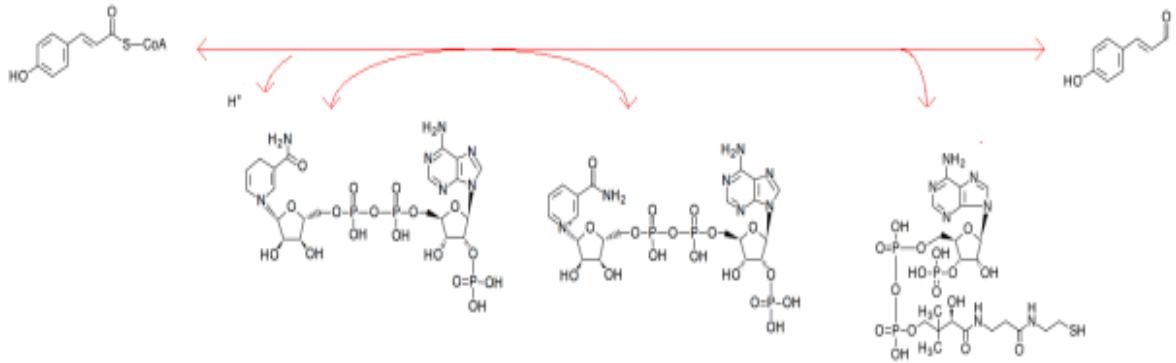
چ



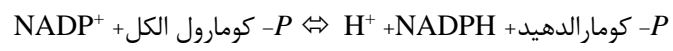
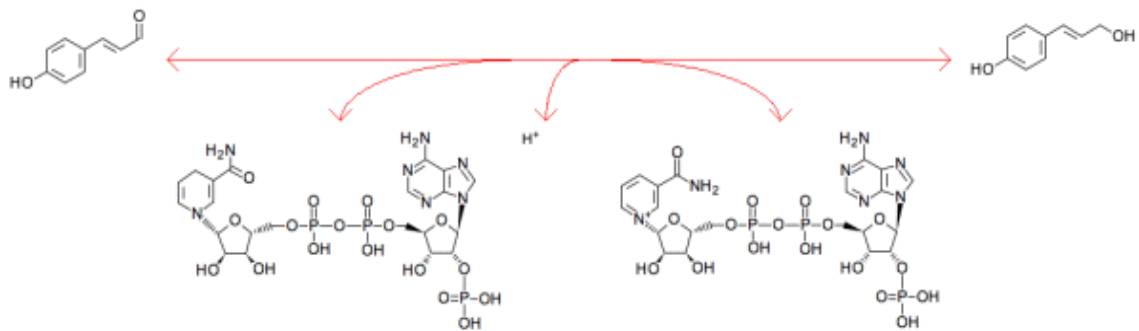
کوآ + -P- کومارات + ATP  $\Leftrightarrow$  -P- کوماریل کوآ + دی پیروفسفات + AMP

شکل پیوست (۱) : الف) اولین مرحله از بیوسنتز لیگنین که توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز کatalیز می‌شود. طی این واکنش ترانس سینامات سنتز می‌شود. ب) سپس در دومین مرحله آنزیم سینامیک اسید ۴- هیدروکسیلاز، طی یک واکنش اکسیداتیو با هیدروکسیلاسیون ترانس سینامیک اسید، -P- کوماریک اسید را کatalیز می‌کند (لو و همکاران، ۲۰۰۶). ج) علاوه بر PAL که -P- کومارات را سنتز می‌کند. -P- کومارات در گیاهان علفی می‌تواند در اثر فعالیت دامیناسیونی آنزیم تیروزین آمونیلیاز نیز سنتز شود. چ) طی این مرحله استریفیکاسیون کوآ توسط 4CL کatalیز می‌شود و با مصرف ATP، -P- کوماریل کوآ سنتز می‌شود (KEGG)

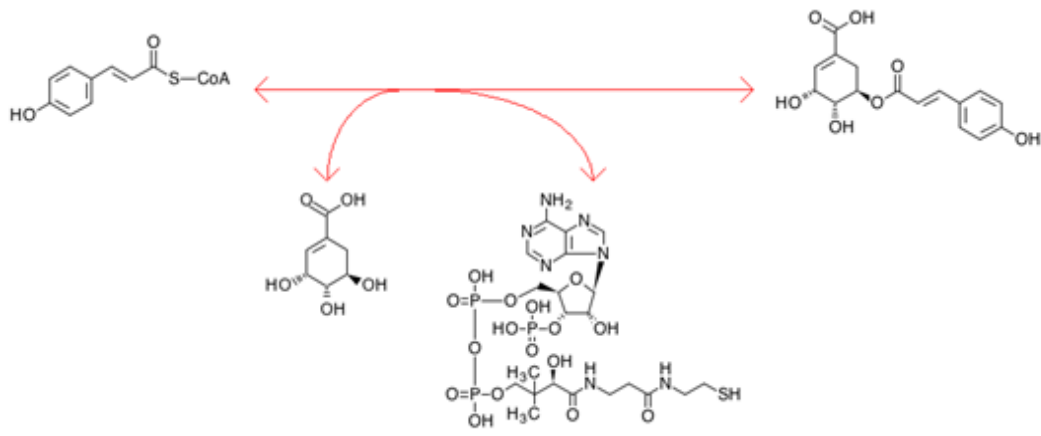
(الف)



(ب)

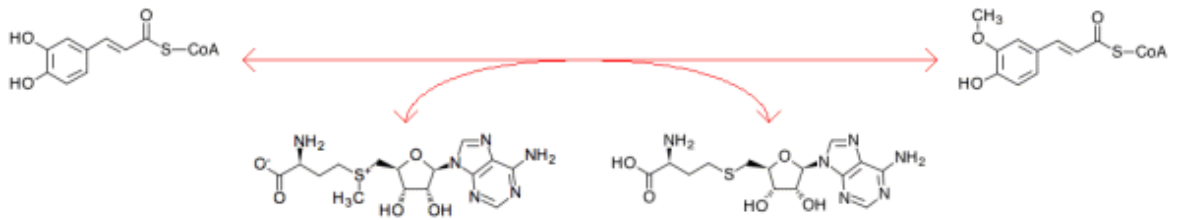


ج



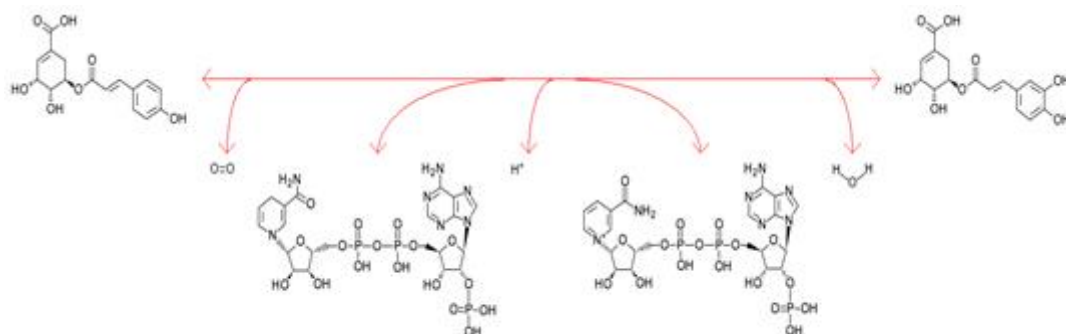
$P$ -کومارول - کوآ + شیکیمات  $\Leftrightarrow$   $P$ -کومارول شیکیمات + کوآ

ج



کافئول کوآ + S - آدنوزیل - L - میتوینین  $\Leftrightarrow$  S - آدنوزیل - L - هوموسیستین + فرلولیل کوآ

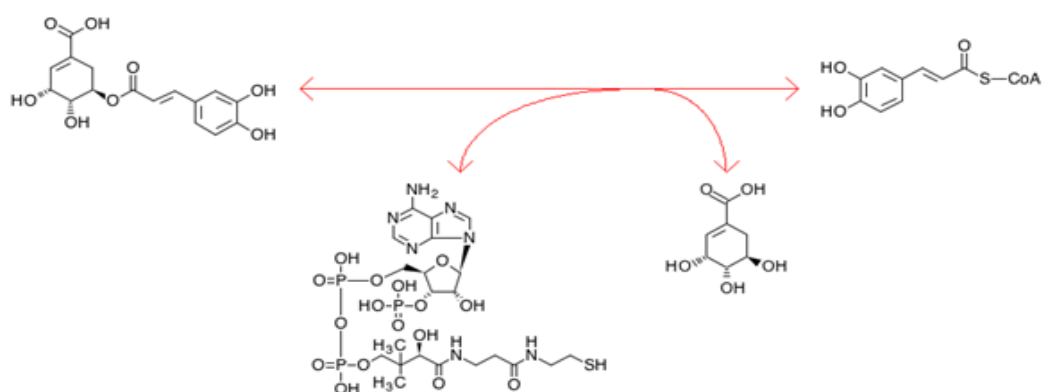
ح



P- کومارول شیکیمات +H+ +NADP+ +NADPH+ اکسیژن ⇌ ۵-O- کافئول شیکیمیک اسید + آب + NADP

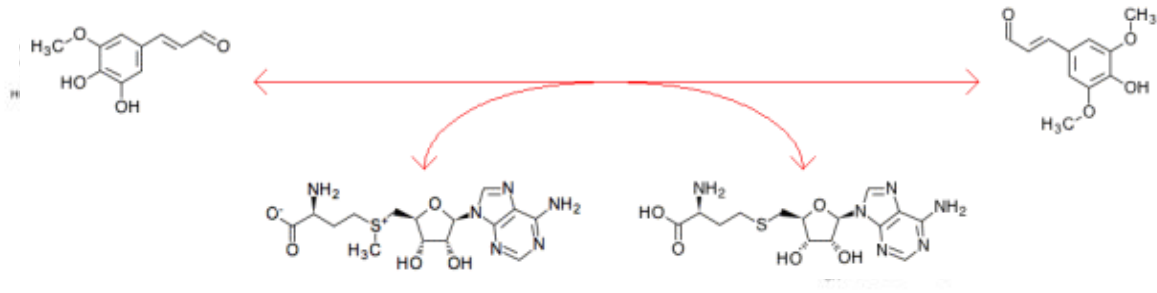
شکل پیوست (۲): الف) سینامیل کوآ ردوکتاز (CCR) واکنش تبدیل P- کومارول کوآ به P- کومارال آلدهید را کاتالیز می‌کند. علاوه بر P- کومارول کوآ CCR می‌تواند از ، کافئول کوآ، فرولویل کوآ، ۵- هیدروکسی فرولویل کوآ و سیناپویل کوآ نیز به عنوان سوبسترا استفاده کند (سزارینو و همکاران ۲۰۱۲، پن و همکاران ۲۰۱۴). ب) در این مرحله CAD آخرین مرحله در سنتز پیش ساز مونولیگنول H را کاتالیز می‌کند. برای این منظور از NADPH به عنوان کوفاکتور استفاده می‌کند و با انتقال یک گروه H+ به P- کومارالدهید، P- کومارول الکل را سنتز می‌کند. ج) آنزیم HCT با فعالیت آسیل ترانسفراز P- کومارول شیکیمات را سنتز می‌کند. چ) کافئول کوآ ۳-O- متیل ترانسفراز (CCoAOMT) با کاتالیز اولین واکنش متیل ترانسفراز، یک گروه متیل را از S- آدنوزیل-L- میتوینین به کافئول کوآ انتقال می‌دهد و فرولویل کوآ را سنتز می‌کند. ح) در این مرحله آنزیم C3H طی یک واکنش هیدروکسیلاسیون ۵-O- کافئول شیکیمیک اسید را تولید می‌کند (KEGG).

الف



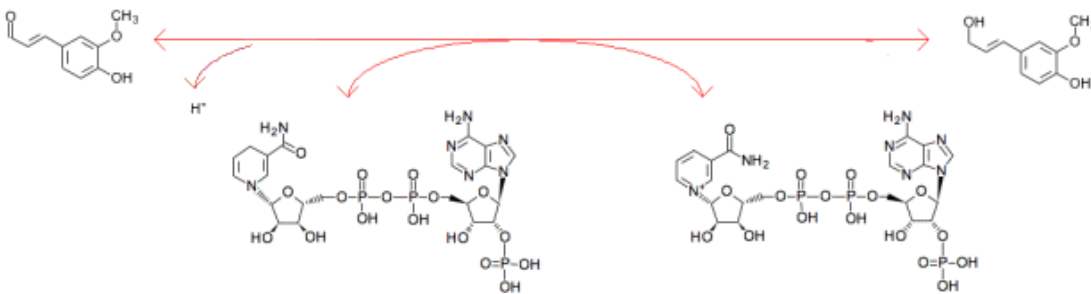
۵-O- کافئول شیکیمیک اسید+ کوآنزیم آ ⇌ شیکیمات+ کافئول کوآ

(ب)



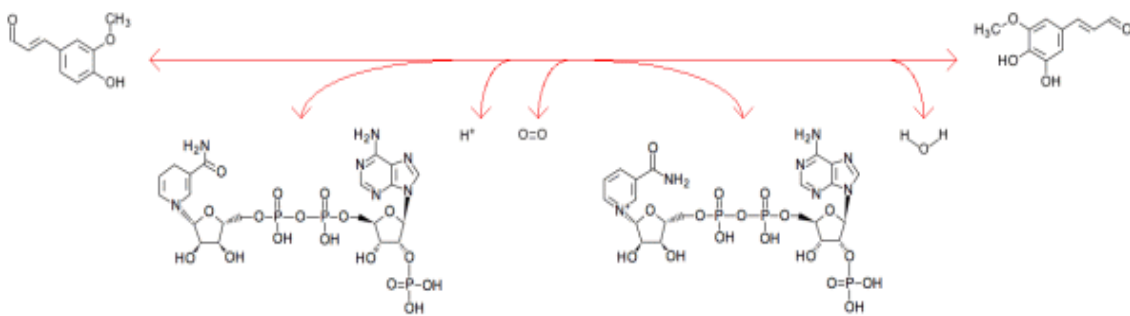
فرولویل کوآ + NADPH + H<sup>+</sup> ⇌ کونفریل آلدهید + کوآ + NADP<sup>+</sup>

(ج)



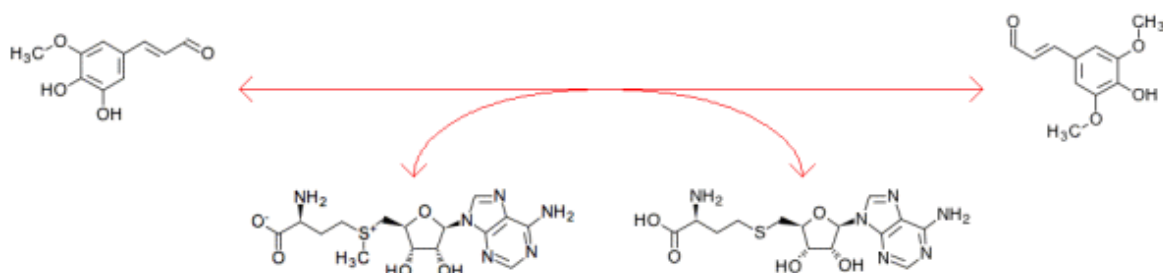
کونفریل آلدهید + NADPH + H<sup>+</sup> ⇌ کونفریل الکل + NADP<sup>+</sup>

(ج)



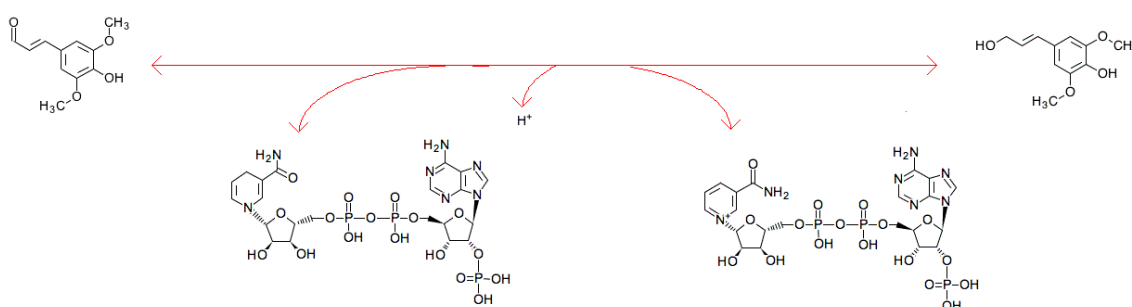
کونفریل آلدهید + NADPH + H<sup>+</sup> + اکسیژن ⇌ 5-هیدروکسی کونفریل آلدهید + NADP<sup>+</sup> + آب

(ح)



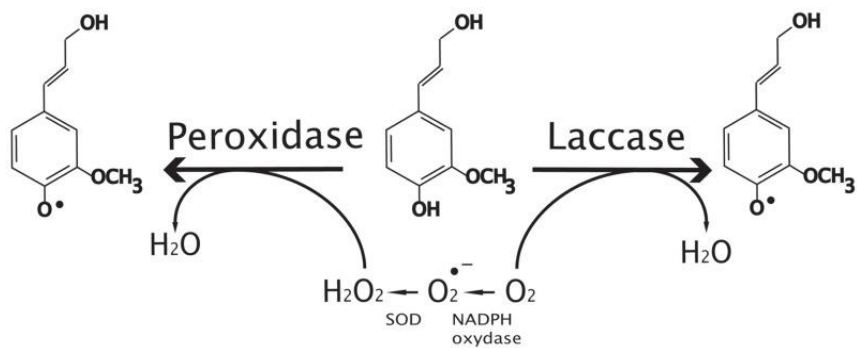
۵- هیدروکسی کونفریل آلدهید + S- آدنوزیل -L- میتیونین ⇌ سیناپیل آلدهید + S- آدنوزیل -L- هوموسیستئین

(خ)



سیناپیل آلدهید + NADPH + H<sup>+</sup> ⇌ سیناپیل الکل + NADP<sup>+</sup>

شکل پیوست (۳) الف) آنزیم HCT یک گروه آسیل به ۵-O- کافئول شیکیمیک اسید اضافه کرده و کافئول کوآ را سنتز می‌کند (هافمن و همکاران ۲۰۰۳؛ هافمن و همکاران ۲۰۰۴). ب) در این مرحله آنزیم CCR تبدیل فرولویل کوآ به کونفریل آلدهید را کاتالیز می‌کند. ج) اکنون که ترکیب کونفریل آلدهید با یک گروه متیل سنتز شده است. می‌تواند مستقیماً تحت اثر آنزیم CAD قرار گیرد و به پیش ساز مونولیگنول G را تبدیل شود. چ) آنزیم فیرولات ۵-هیدروکسیلاز، (F5H) ، سومین سیتوکروم P450 وابسته به مونوکسیژناز است که در مسیر سنتز لیگنین شرکت می‌کند. کونفریل آلدهید را به ۵- هیدروکسی فیرولیک اسید تبدیل می‌کند. ح) COMT یک گروه متیل از S- آدنوزیل -L- میتیونین را به موقعیت کربن ۵ حلقه‌ی آروماتیک ۵- هیدروکسی کونفریل آلدهید انتقال می‌دهد، در این زمان حلقه‌ی آروماتیک دارای دو گروه متیل می‌باشد. به این نحو پیش ساز سیناپیل الکل، سیناپیل آلدهید سنتز می‌شود. خ) آنزیم CAD تبدیل گروه آلدهیدی سیناپیل آلدهید به گروه الکلی را کاتالیز می‌کند و به این ترتیب سیناپیل الکل پیش ساز مونولیگنول S سنتز می‌شود (KEEG).

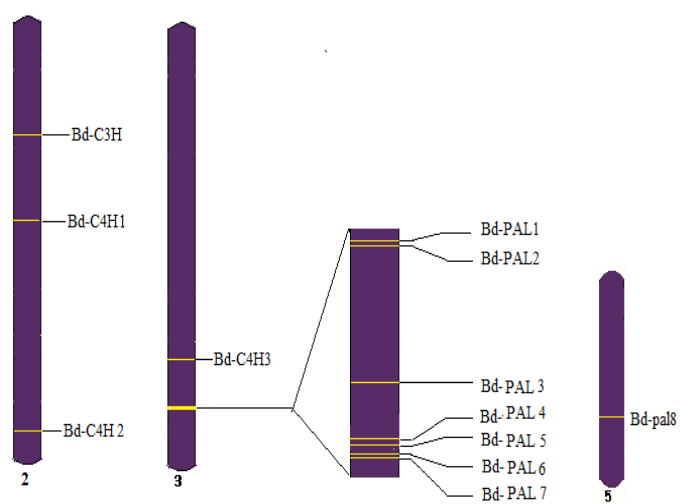


شکل پیوست (۴) بر اثر فعالیت لاکازها و پراکسیدازها پیش ساز مونولیگنولها اکسید می‌شوند. رادیکال‌های ایجاد شده به لیگنین پلیمریزه می‌شوند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۳).

(الف)



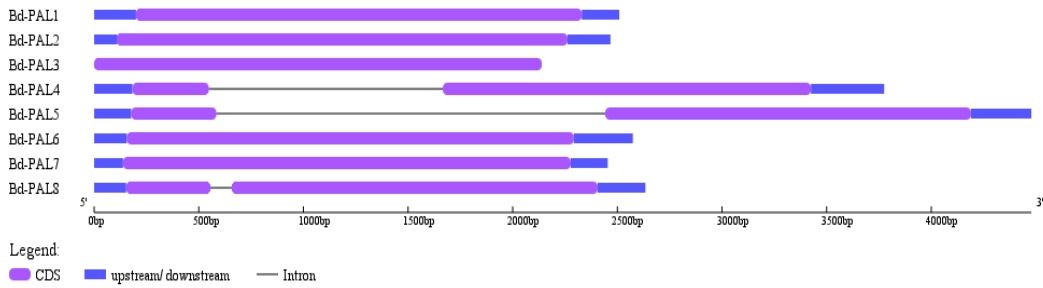
(ب)



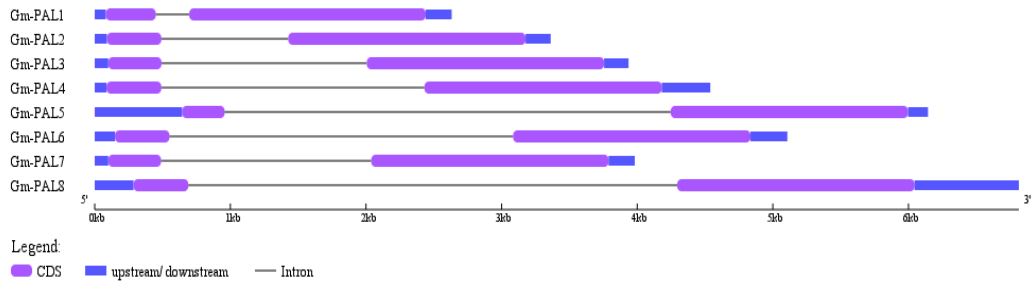
شکل پیوست (الف) موقعیت ژن‌ها بر روی کروموزوم‌های سویا . (ب) موقعیت ژن‌ها بر روی کروموزوم‌های برآکی پودیوم.



الف

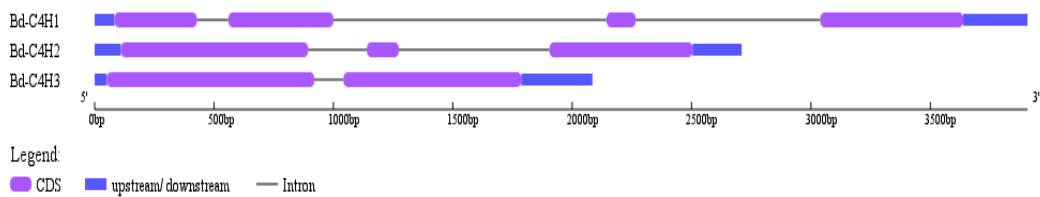


ب

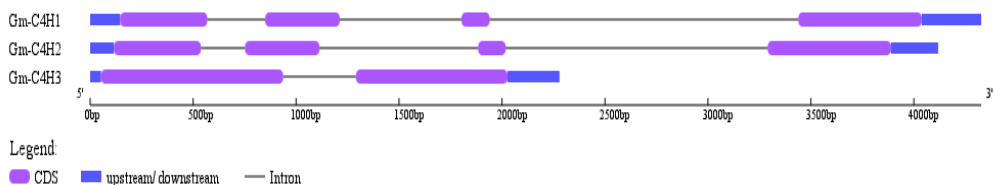


شکل پیوست (۶) بررسی الگوی اگزون-اینترن ژنهای *PAL* (الف) براکی پودیوم (ب) سویا (سایت GSDs).  
 (در شکل CDS: ناحیهی کد کنندهی ژن، upstream / downstream: نواحی UTR و Intron: ناحیهی اینترن، را نشان می دهند).

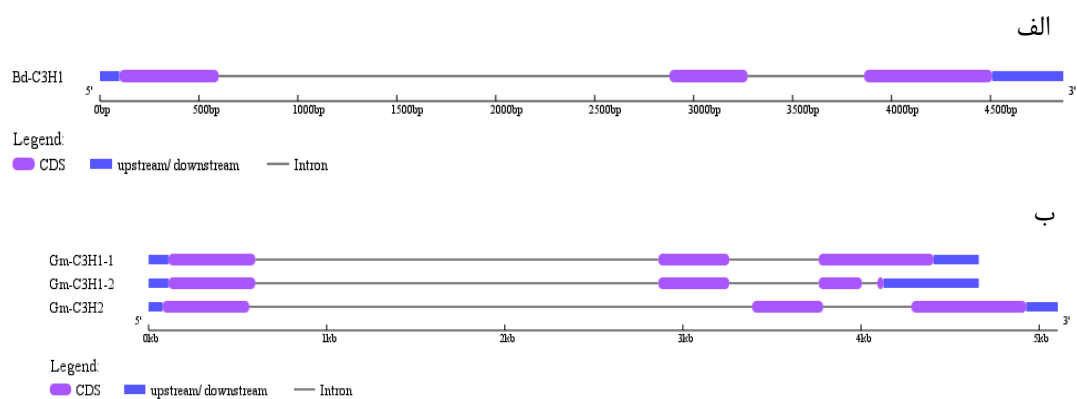
الف



ب

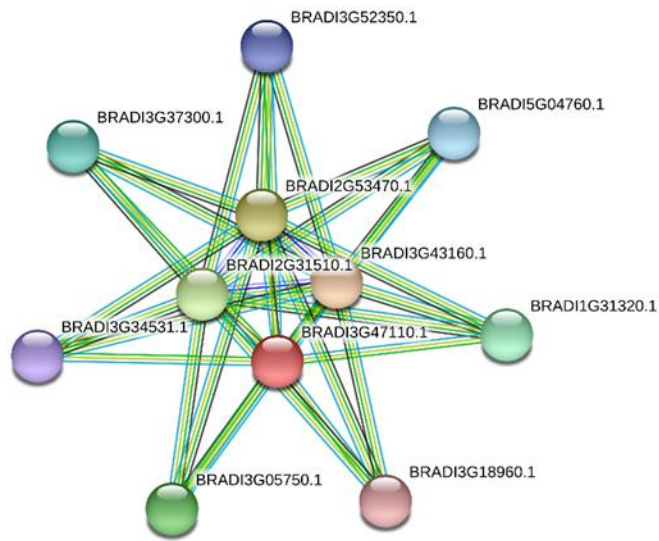


شکل پیوست (۷) بررسی الگوی اگزون-اینترن ژنهای *C4H* (الف) براکی پودیوم (ب) سویا (سایت GSDs).  
 (در شکل CDS: ناحیهی کد کنندهی ژن، downstream/upstream: نواحی UTR و Intron: ناحیهی اینترن، را نشان می دهند).

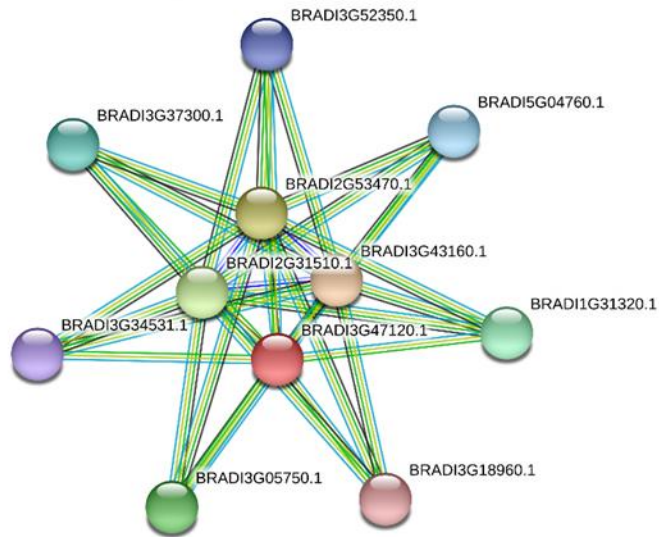


شکل پیوست (۸) بررسی الگوی اگزون- اینترون ژنهای C3H الف) براکی پودیوم ب) سویا (سایت GSDs).  
(در شکل CDS: ناحیهی کد کنندهی ژن، upstream / downstream: نواحی UTR و Intron: ناحیهی  
اینترون، را نشان می دهند)

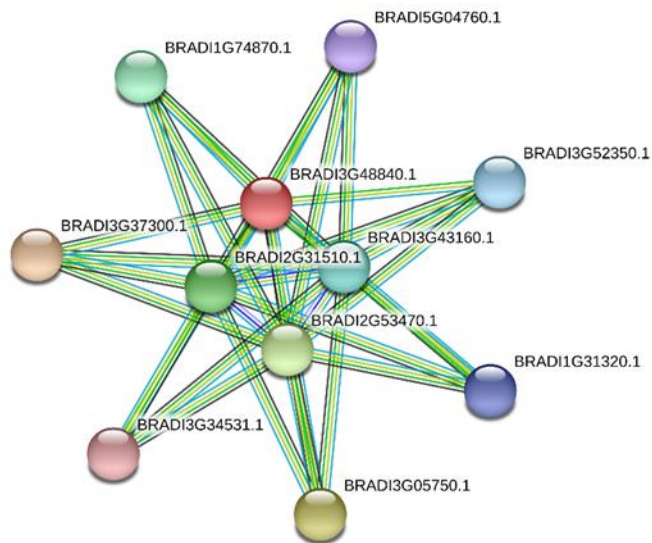
1



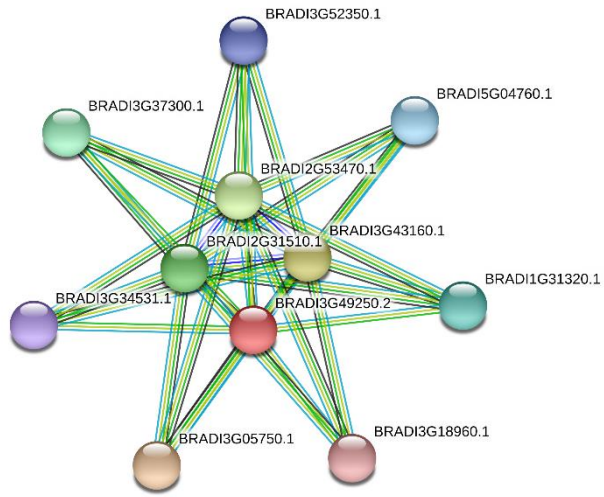
2



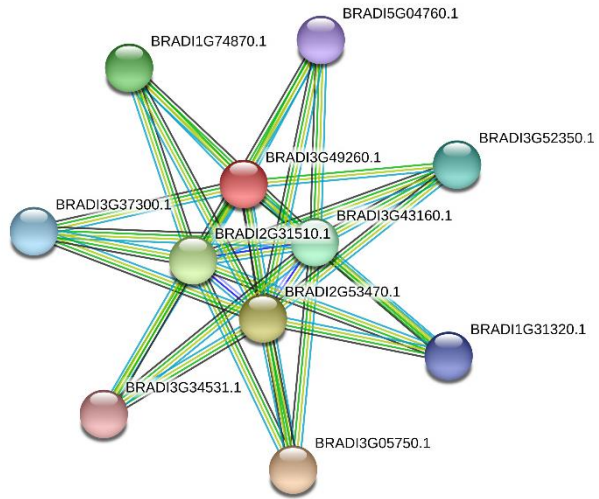
3



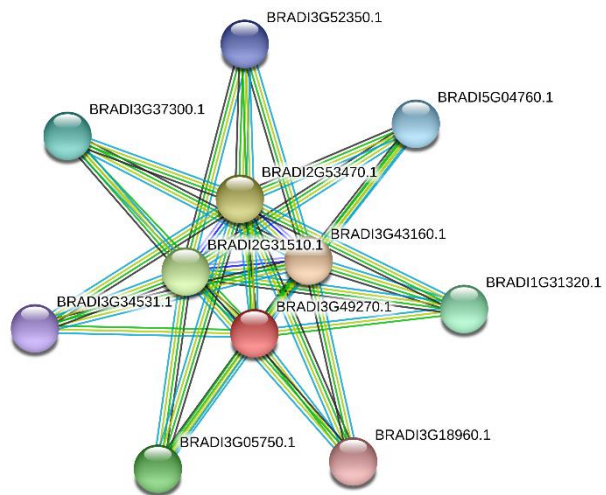
4

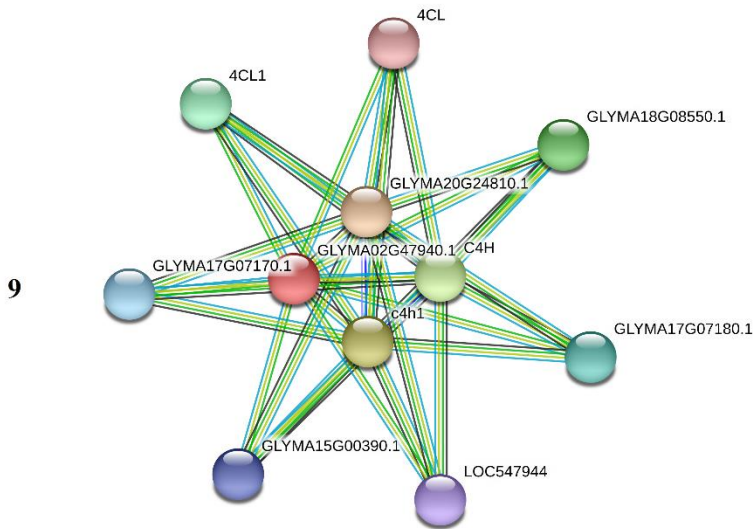
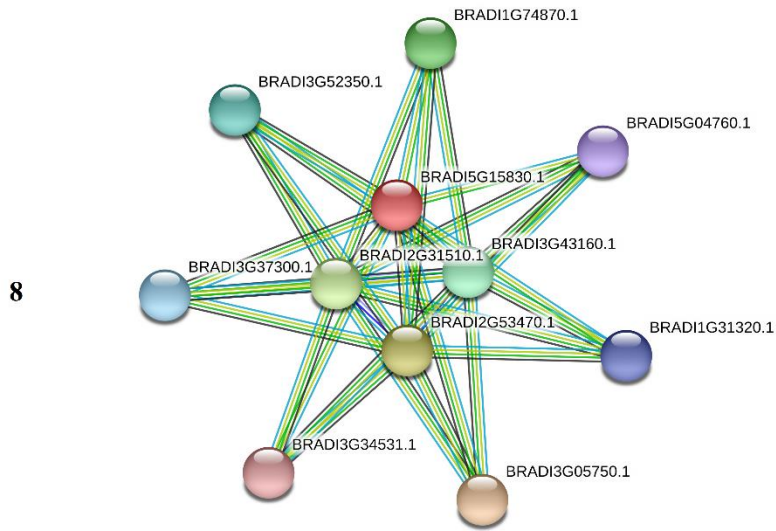
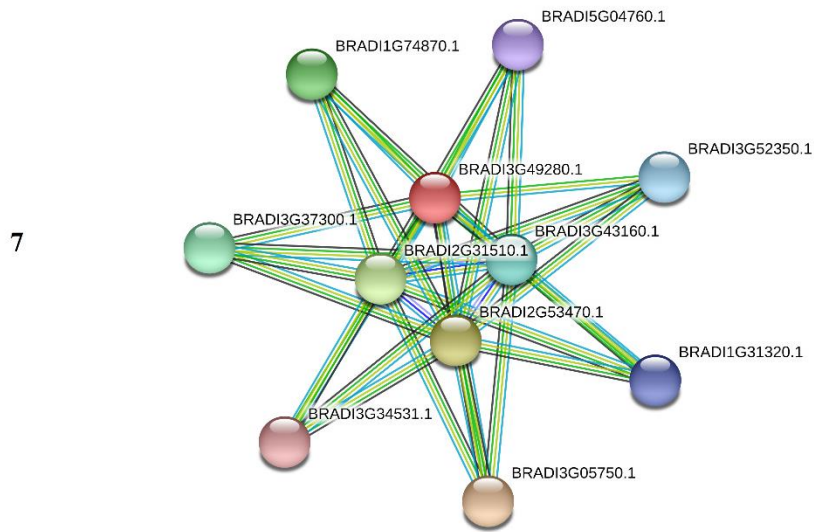


5

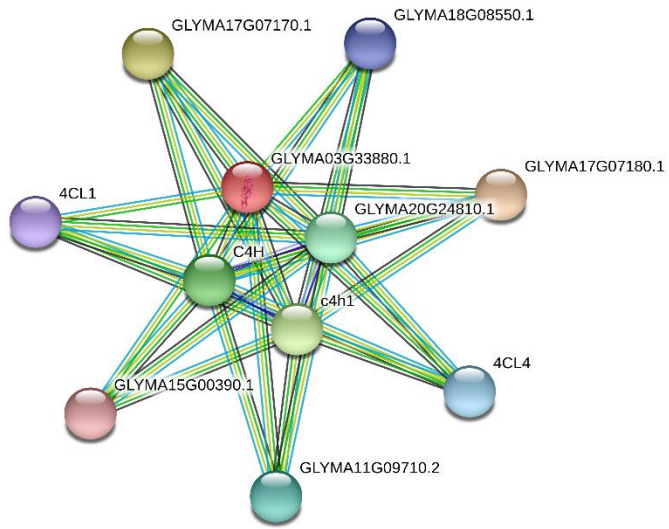


6

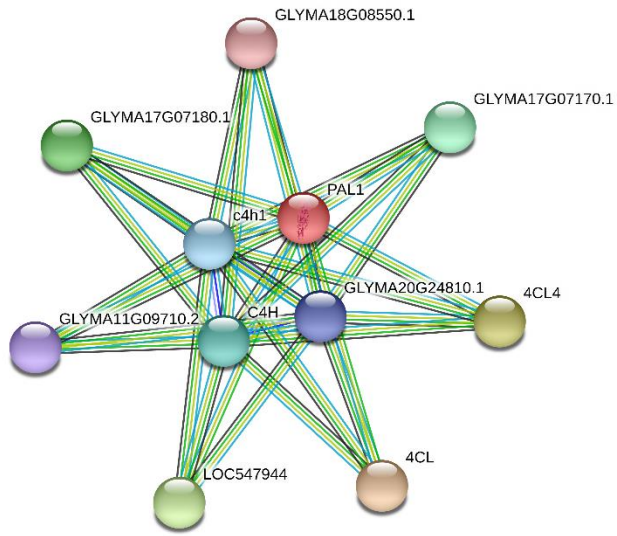




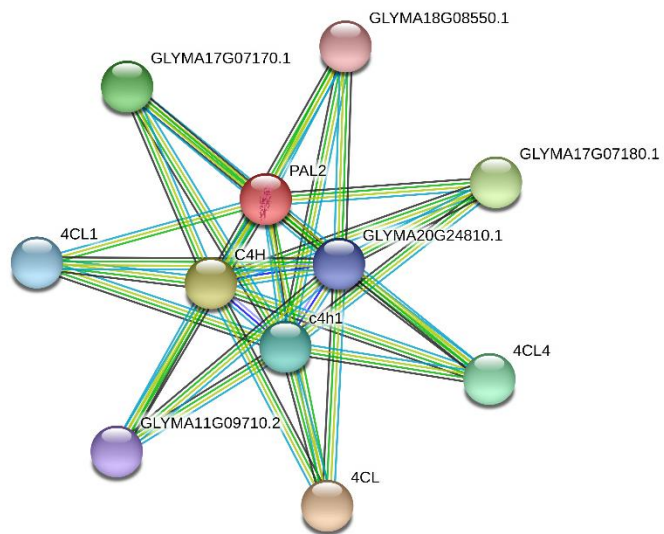
10



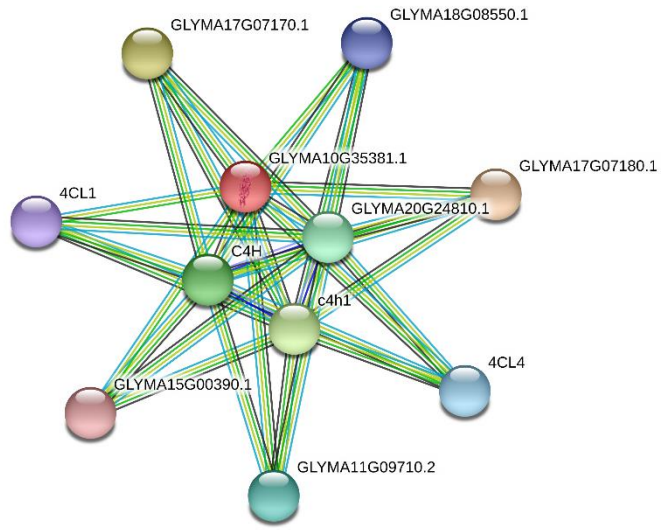
11



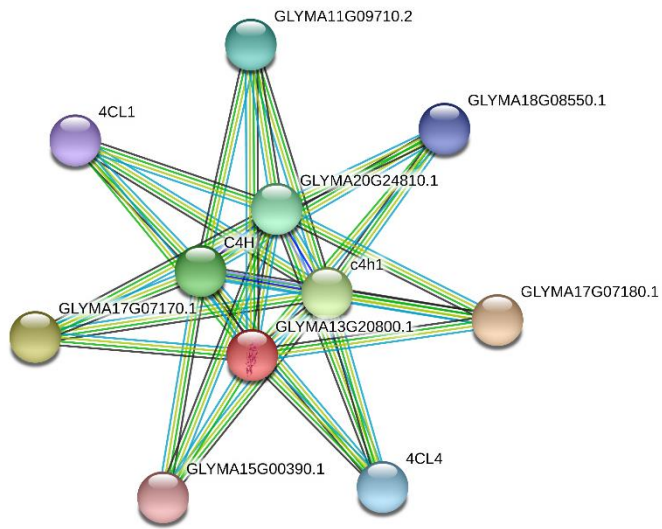
12



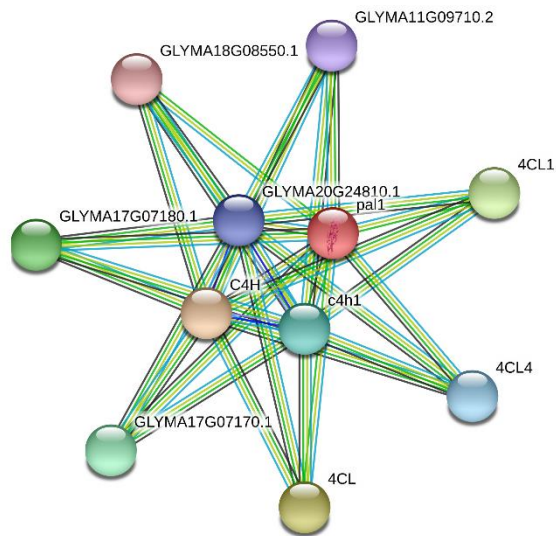
13

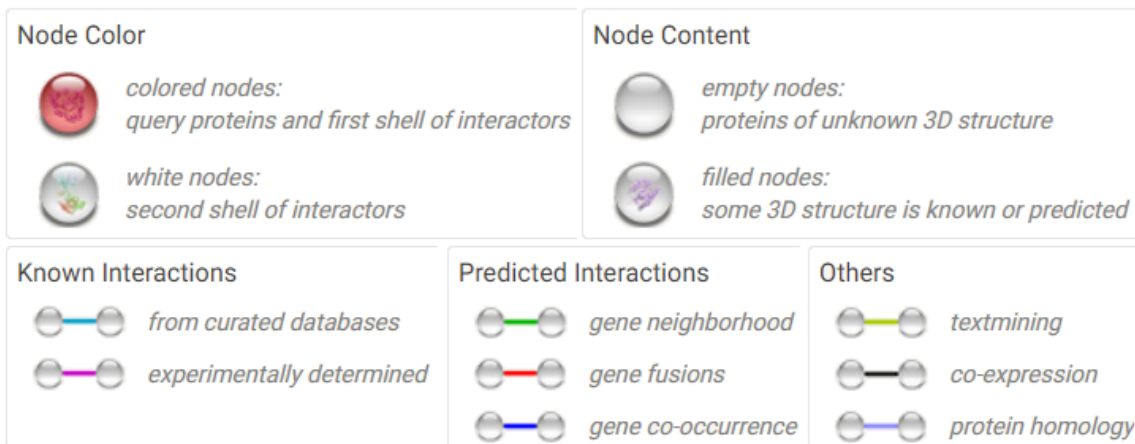
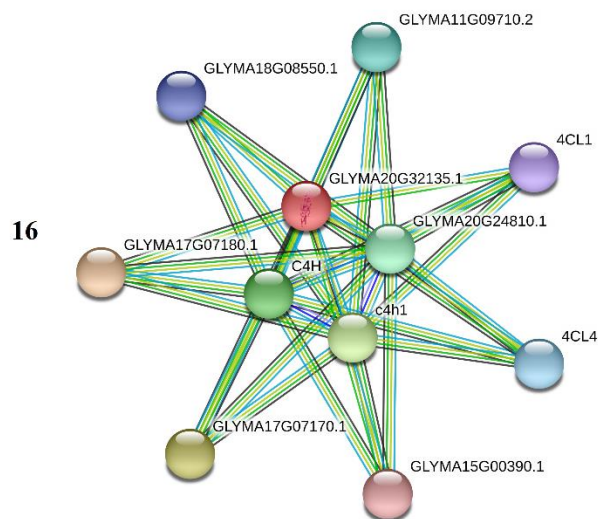


14



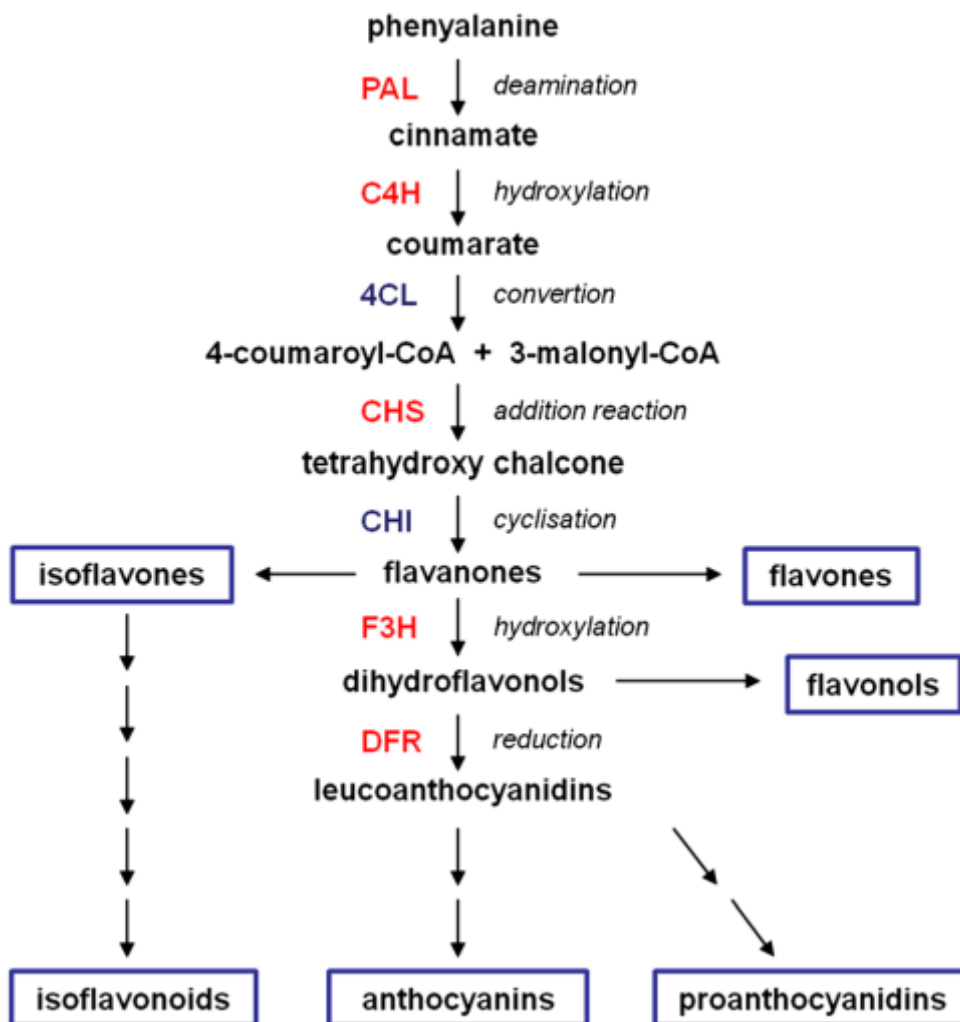
15





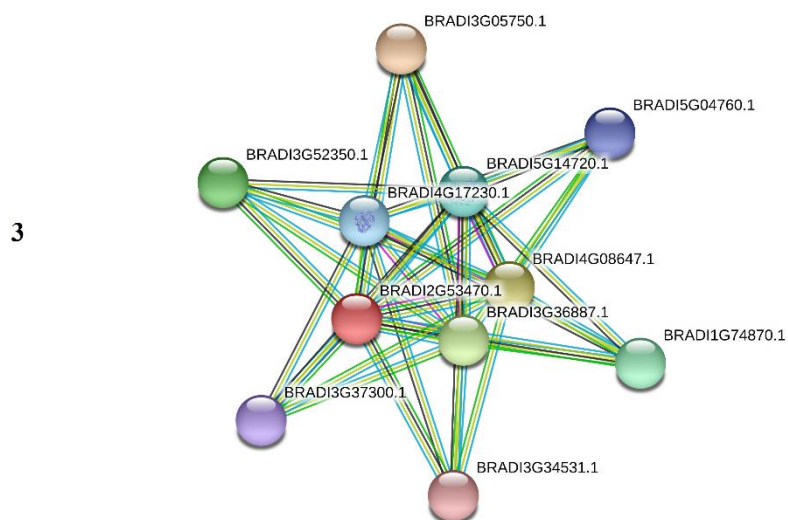
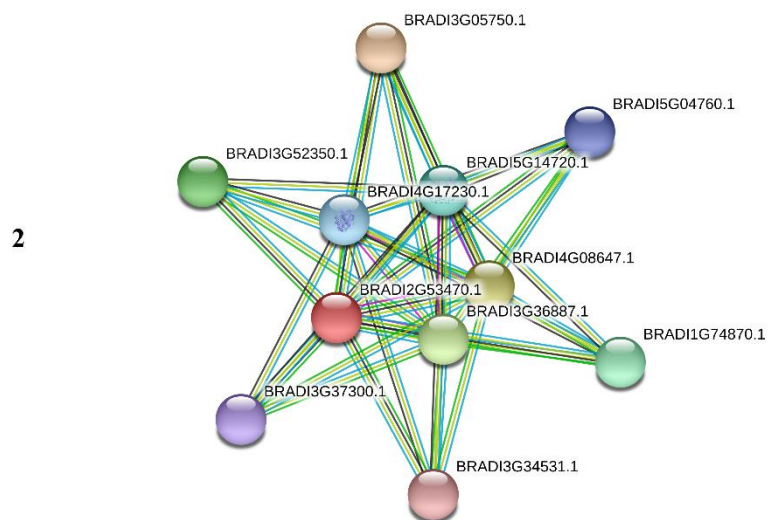
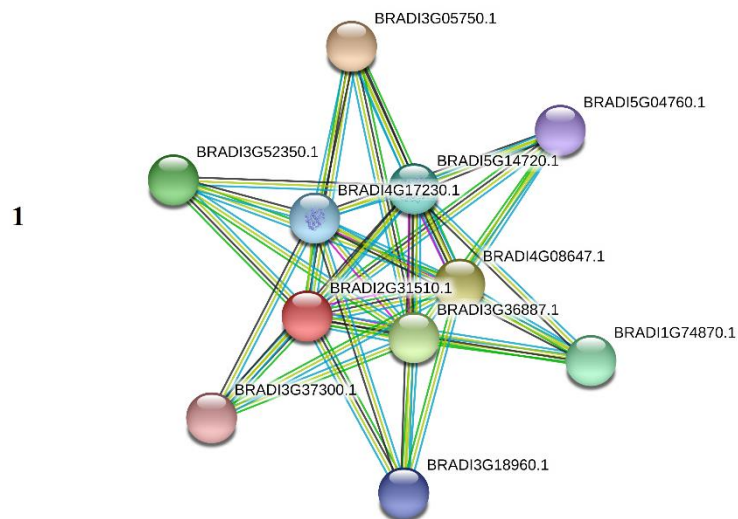
شکل پیوست (۹) شماره ۱ تا ۸ شبکه‌ی برهمکنش‌های آنزیم‌های PAL1 تا PAL8 در براکی‌پودیوم و ۹ تا ۱۶ شبکه‌ی برهمکنش‌های PAL1 تا PAL8 در سویا را نشان می‌دهند (STRING).



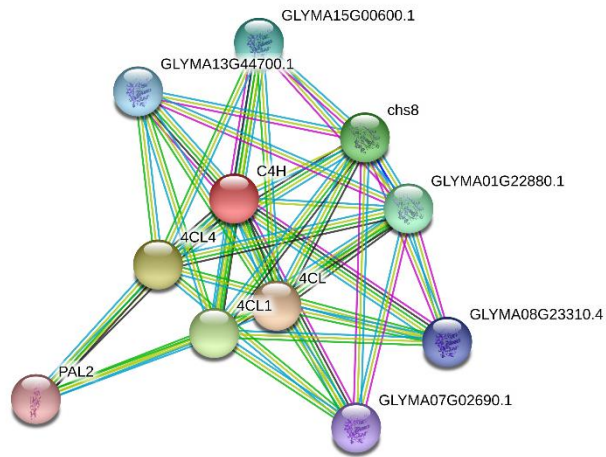


شکل پیوست (۱۰) آنزیم‌های شالکون سنتتاز (CHS) و دی هیدروکسی فلاونوئیدردوکتاز (DFR) به ترتیب در سنتز فلاونل‌ها و آنتوسیانین از فنیل آلانین نقش دارند. در این شکل PAL به فنیل آلانین آمونیالیا، C4H به سینامات هیدروکسیلاز، 4CL به ۴-کومارات کوآ لیگاز،<sup>۱</sup> CHI به شالکون ایزامراز، F3H فیرولات ۵-هیدروکسیلاز اشاره دارد (پیکرت و همکاران، ۲۰۱۳).

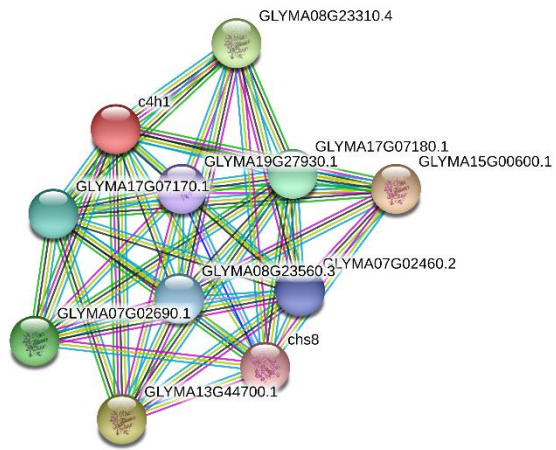
<sup>۱</sup> Chalcone Isomerase



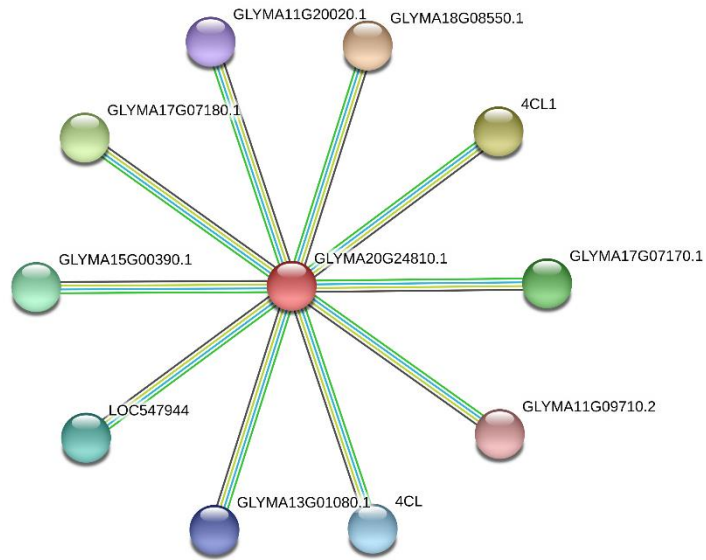
4

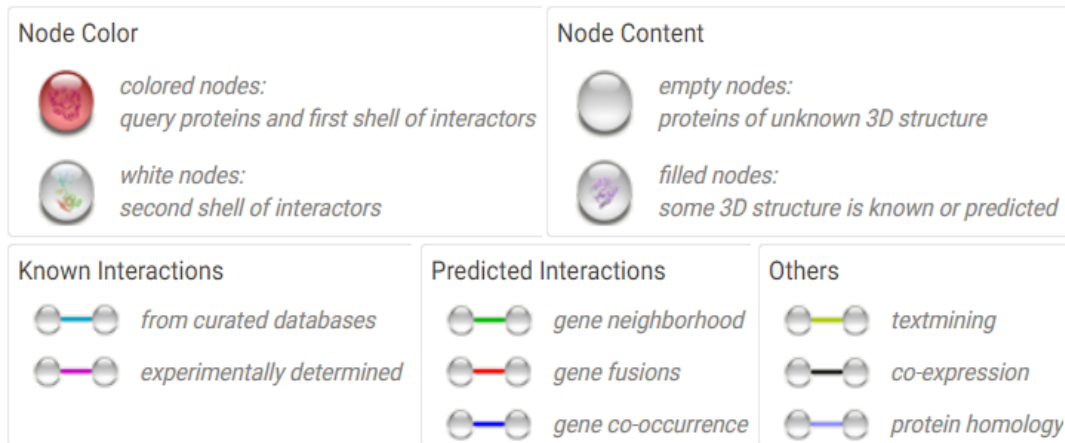


5

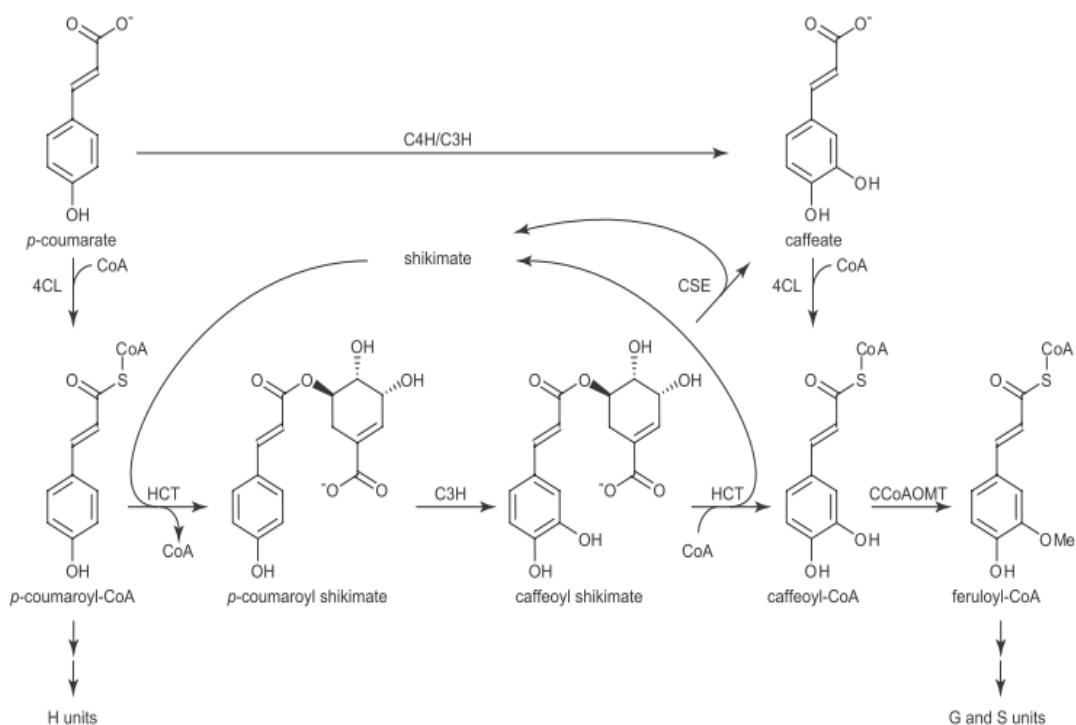


6



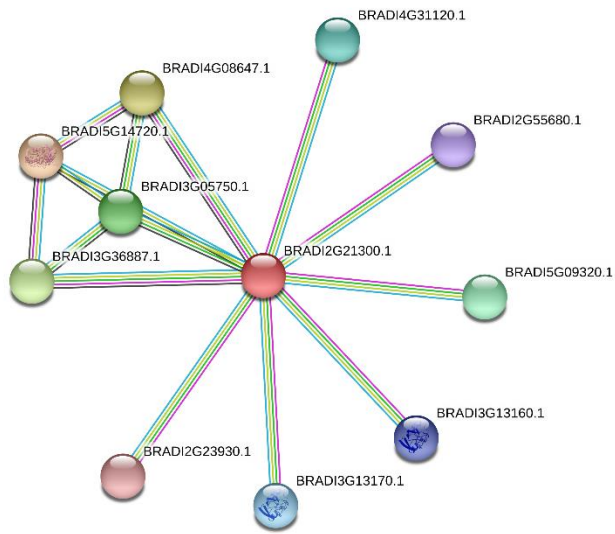


شکل پیوست (۱۱) شماره‌ی ۱ تا ۳ و ۴ تا ۶ به ترتیب شبکه‌ی برهمکنش آنزیم‌های C4H1 تا C4H3 در براکی‌پودیوم و سویا را نشان می‌دهند. (STRING)

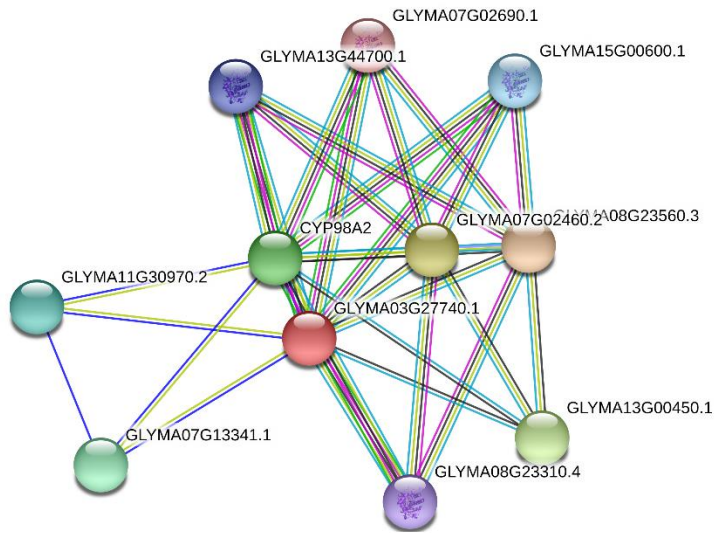


شکل پیوست (۱۲) مسیر بیوسنتز لیگنین می‌تواند با واکنش کاتالیز شده توسط آنزیم کافئول شیکیمات استراز (CES) همراه شود و مسیر را بیشتر به سمت سنتز مونومرهای S و G پیش ببرد (وانهولم و همکاران، ۲۰۱۳).

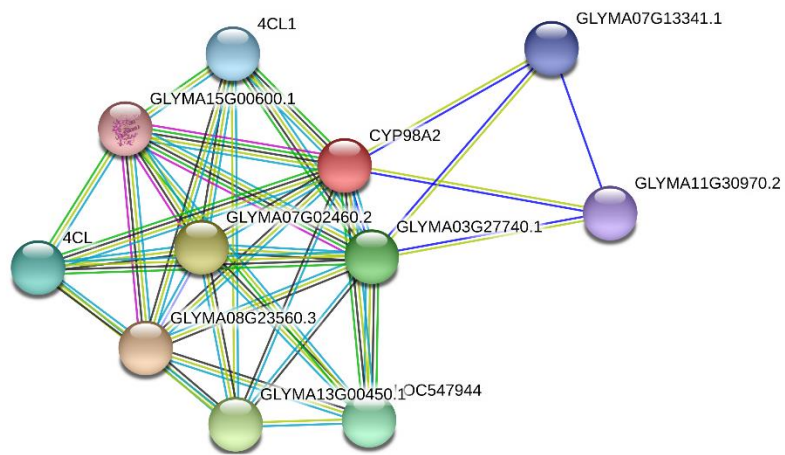
1

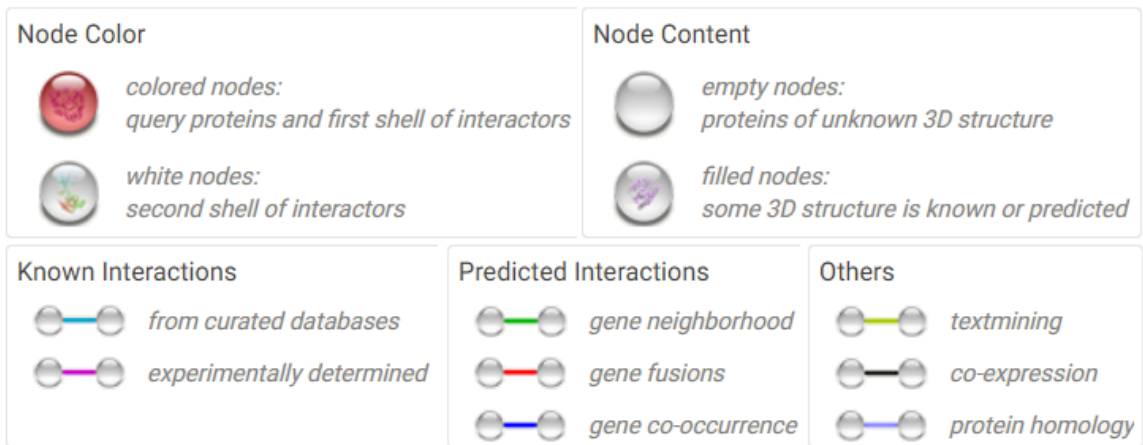


2



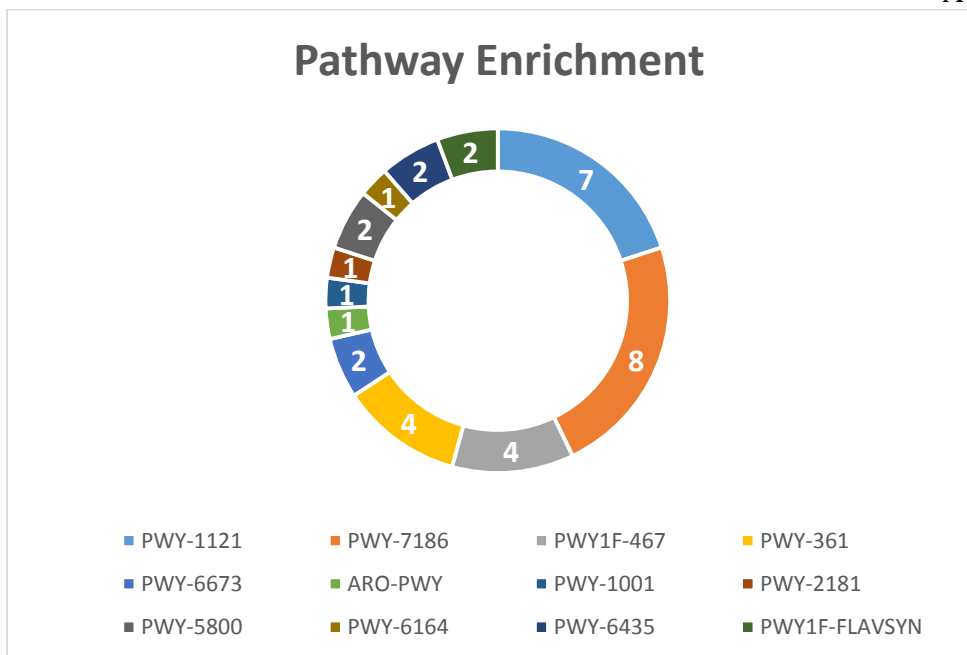
3



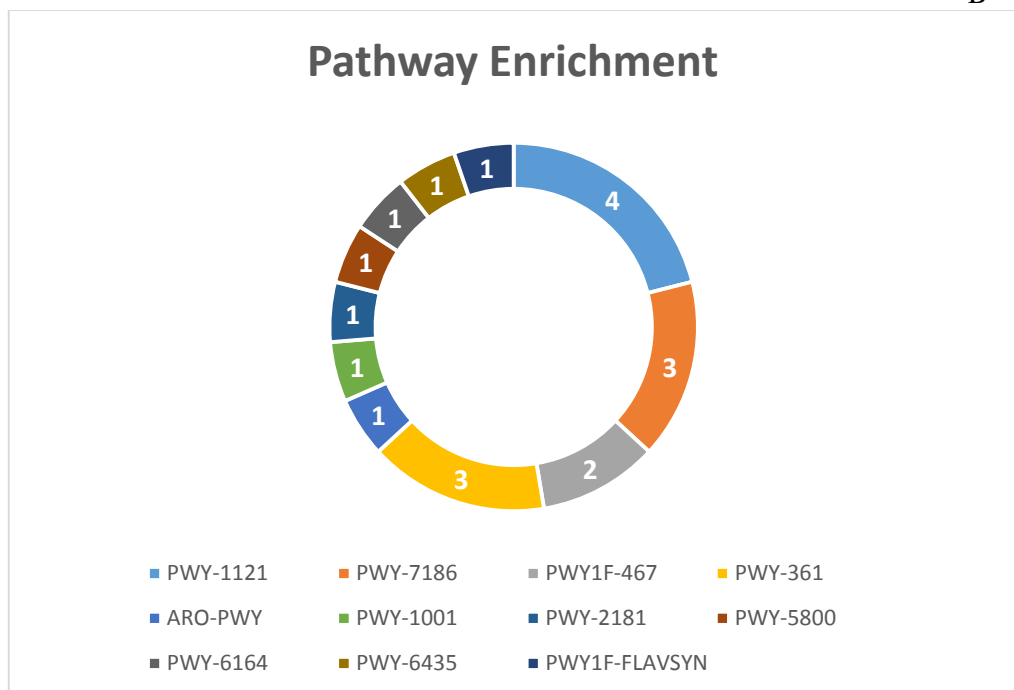


شکل پیوست (۱۳) شماره ۱ برهمکنش آنزیم C3H در براکی پوديوم، ۲ و ۳ به ترتیب شبکه‌ی برهمکنش آنزیم‌های C3H1 تا C3H2 در سویا را نشان می‌دهند. (STRING)

A

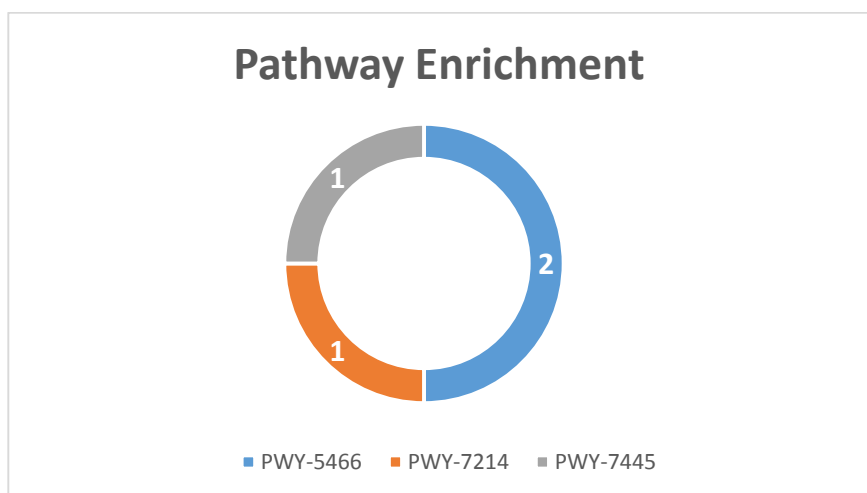


B

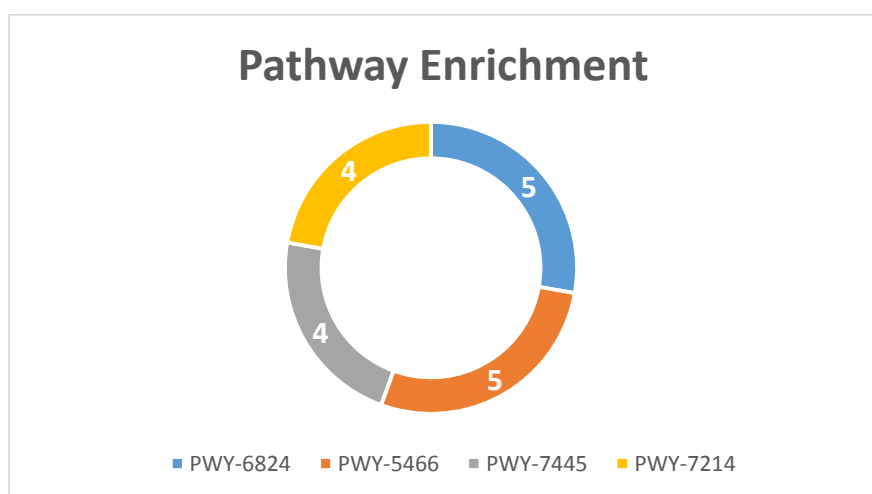


شکل پیوست (۱۴) بررسی Pathway Enrichment هم بیان‌های *PAL* الف) براکی‌پودیوم ب) سویا (فیتوزوم). در این نمودار هر رنگ معرف یک مسیر متابولیکی است که نام کد مربوط به هر مسیر در کنار رنگ آن نوشته شده است. تعداد ژن‌ها موجود در هر مسیر نیز درون نمودار مشخص شده است. -PWY- 1121 مسیر بیوسنتز مونومرهای سوبرین، PWY-7186 مسیر بیوسنتز اسکوپلین و اسکولین، -PWY1F- 467 واکنش‌های نخستین در مسیر فنیل پروپانوئید، PWY-361 مسیر فنیل پروپانوئید، PWY-6673 مسیر بیوسنتز کافئول گلوکارات، ARO-PWY مسیر بیوسنتز کورسمات ، PWY-1001 مسیر بیوسنتز سلولز، PWY-2181 مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدهای اسیدی و آزاد، PWY-5800 بیوسنتز زایلان، PWY-6164 مسیر بیوسنتز ۳ دهیدروکوینات، PWY-6435 مسیر بیوسنتز ۴-هیدروکسی بنزوات و PWY1F-FLAVSYN، مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها را نشان می‌دهد).

A



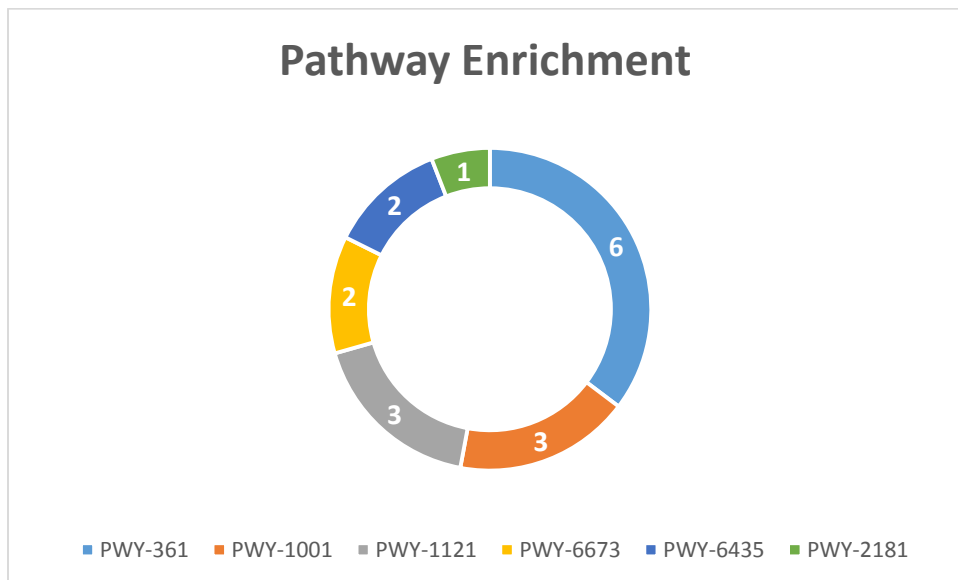
B



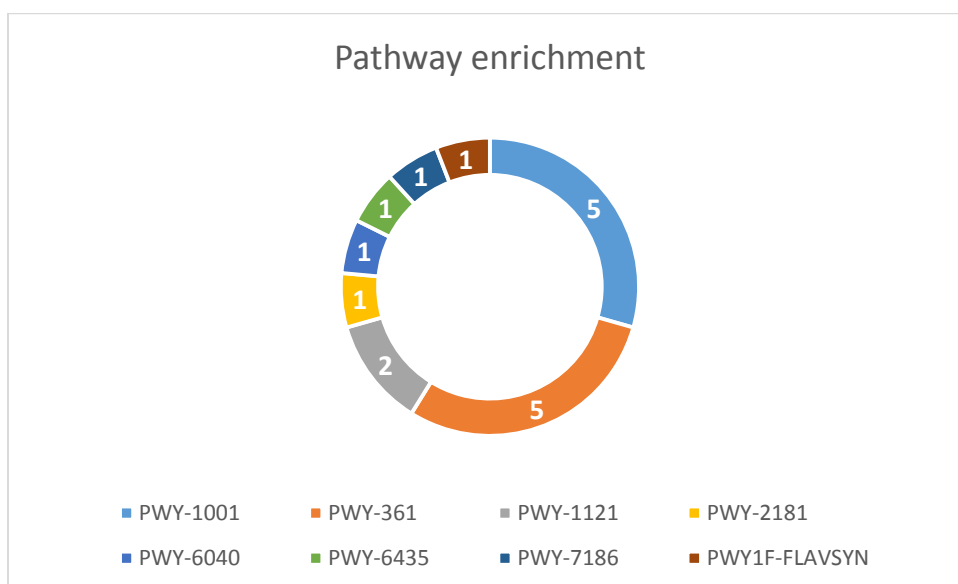
شکل پیوست (۱۵) بررسی Pathway Enrichment هم بیان‌های C4H (الف) سویا، ب) براکی پودیوم (فیتوزوم). در این نمودار هر رنگ معرف یک مسیر متابولیکی است که نام کد مربوط به هر مسیر در کنار رنگ آن نوشته شده است. در این نمودار PWY-6824 مسیر بیوسنتز جاستیسایدن B، PWY-5466 مسیر بیوسنتز ماتریسینول، PWY-7445 مسیر تجزیه‌ی لوتولین تری گلوکورونید و PWY-7214 مسیر تخریب باپکالئین نشان می‌دهد.



A



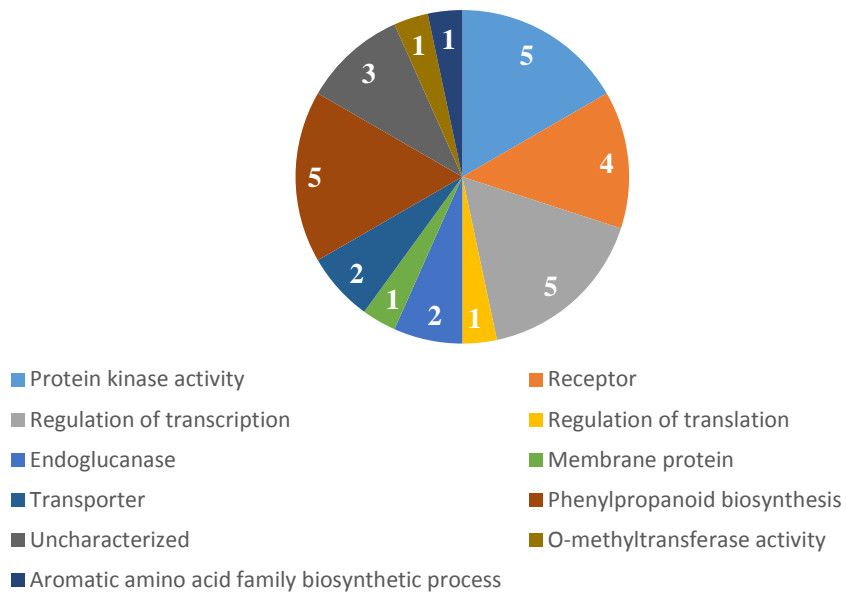
B



شکل پیوست (۱۶) بررسی Pathway Enrichment هم بیان‌های C3H الف) براکی پودیوم، ب) سویا (فیتوزوم). در این نمودار هر رنگ معرف یک مسیر متابولیکی است که نام کد مربوط به هر مسیر در کنار رنگ آن نوشته شده است. در این نمودار PWY-6673 مسیر بیوسنتز کافئویل گلوکارات، PWY-2181 مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید اسیدهای آزاد، PWY-1001 مسیر بیوسنتز سلولز، PWY-361 مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید، PWY-1121 مسیر بیوسنتز مونومرهای سوپرین، PWY-6040 مسیر بیوسنتز کلروژنیک اسید، PWY-6435 مسیر بیوسنتز ۴- هیدروکسی بنزوات، PWY-7186 مسیر بیوسنتز اسکوپلینو اسکولین، PWY1F-FLAVSYN مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها را نشان می‌دهد.

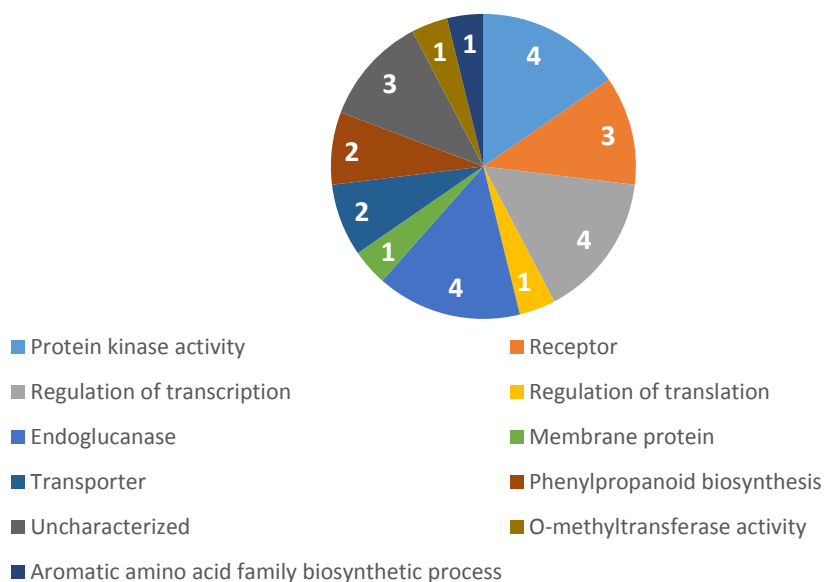
A

### Fuction Erichment



B

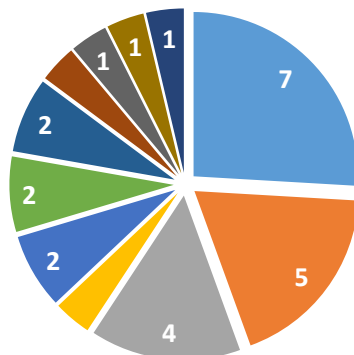
### Fuction Erichment



شکل پیوست (۱۷) بررسی عملکرد ژن‌های هم بیان *PAL* (الف) سویا، ب) برای پودینوم. در این نمودار هر رنگ معرف یک عملکرد می‌باشد که نام مربوط به هر مسیر در کنار رنگ آن نوشته شده است. تعداد ژن‌ها موجود در هر مسیر نیز درون نمودار مشخص شده است

A

### Function Enrichment



- Unknown function
- Response to stress
- Phenylpropanoid biosynthesis
- Nitrate transporter
- CASP-like protein
- Protein detoxification
- Plant cysteine oxidase
- Non-symbiotic hemoglobin- oxygen transport
- L-ascorbate oxidase
- Probable L-gulonolactone oxidase
- Lipid-transfer protein

B

### Function Enrichment

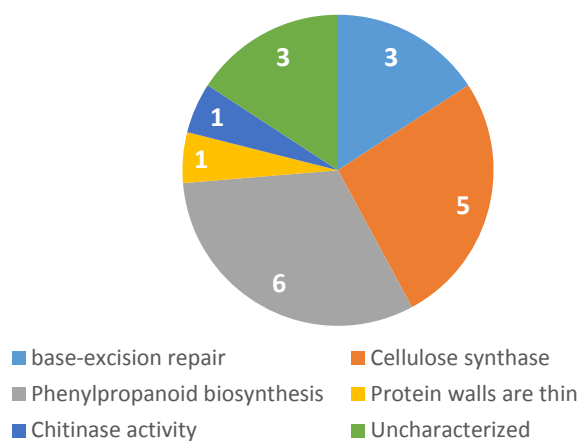


- Unknown function
- Response to stress
- Phenylpropanoid biosynthesis
- Nitrate transporter
- CASP-like protein
- Protein detoxification
- Plant cysteine oxidase
- Non-symbiotic hemoglobin- oxygen transport
- L-ascorbate oxidase
- Probable L-gulonolactone oxidase
- Lipid-transfer protein

شکل پیوست (۱۸) بررسی عملکرد ژن‌های هم بیان *C4H* : الف) سویا، ب) براکی پودیوم. در این نمودار هر رنگ معرف یک عملکرد می‌باشد که نام مربوط به هر مسیر در کنار رنگ آن نوشته شده است. تعداد ژن‌ها موجود در هر مسیر نیز درون نمودار مشخص شده است.

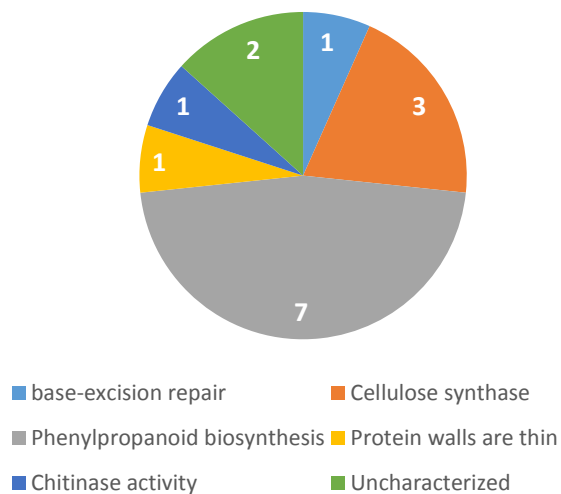
A

### Function Enrichment

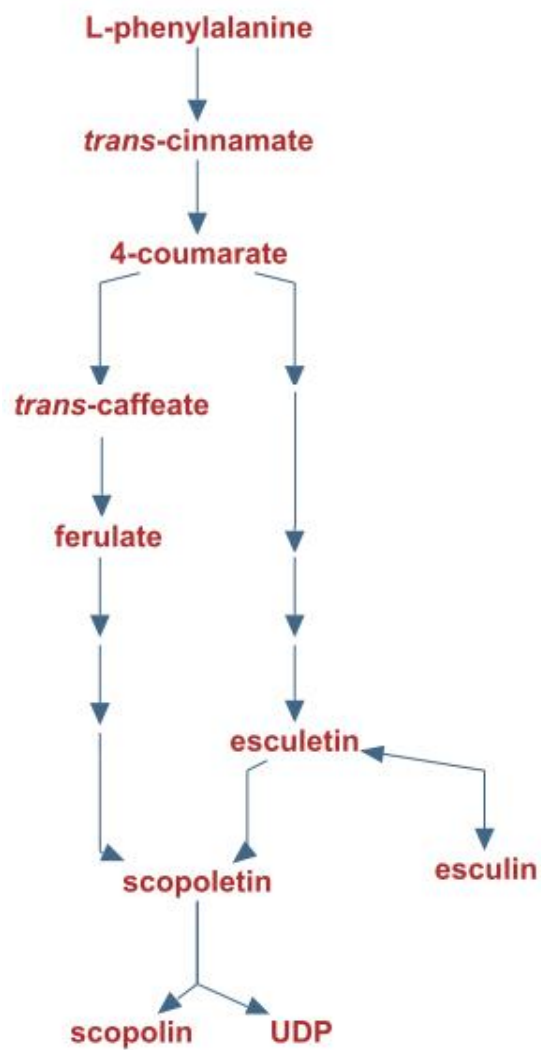


B

### Function Enrichment

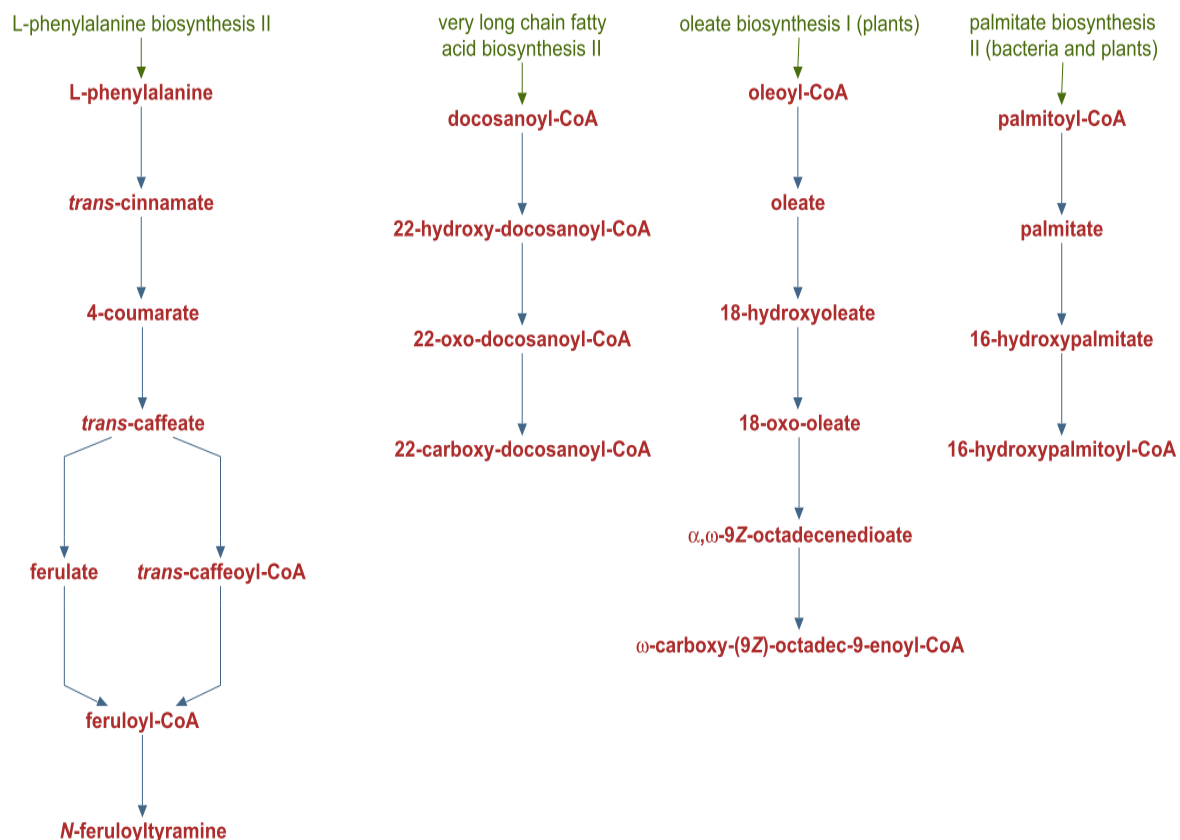


شکل پیوست (۱۹) بررسی عملکرد ژن‌های هم بیان *C3H* : الف) سویا، ب) براکی پودیوم. در این نمودار هر رنگ معرف یک عملکرد می‌باشد که نام مربوط به هر مسیر در کنار رنگ آن نوشته شده است. تعداد ژن‌ها موجود در هر مسیر نیز درون نمودار مشخص شده است.



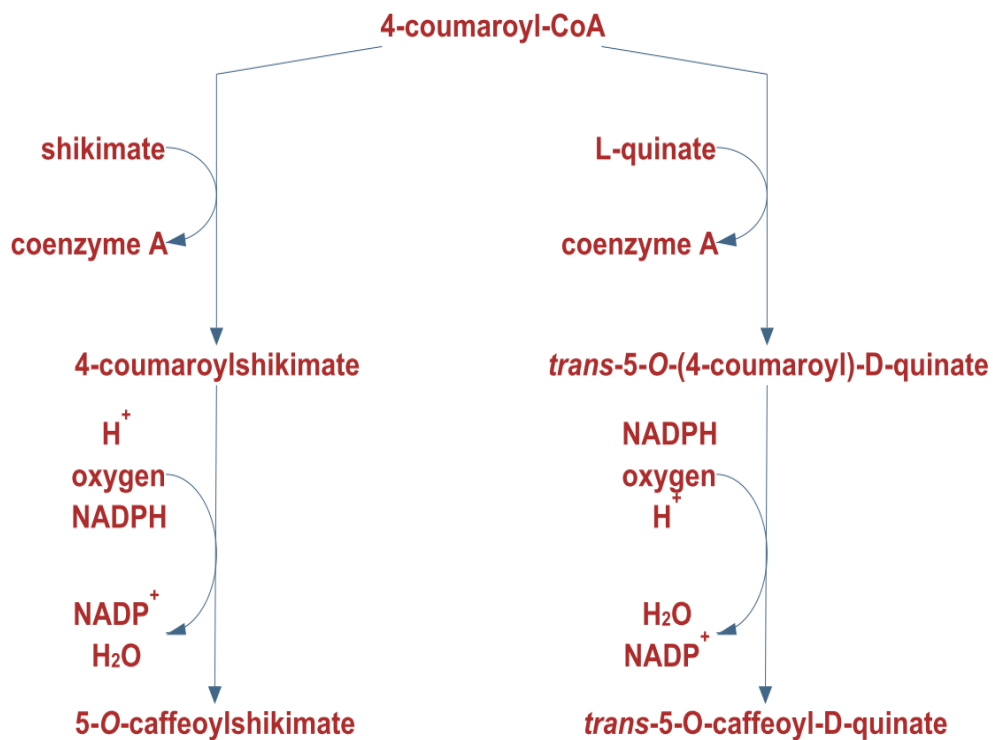
شکل پیوست (۲۰) مسیر بیوسنتز اسکوپلین و اسکولین که شاخه ای از مسیر فنیل پروپانوئید و مسیر بیوسنتز کومارینها می باشد (MetaCyc Pathway<sup>۱</sup>).

<sup>۱</sup> <https://Biocyc.Org/>

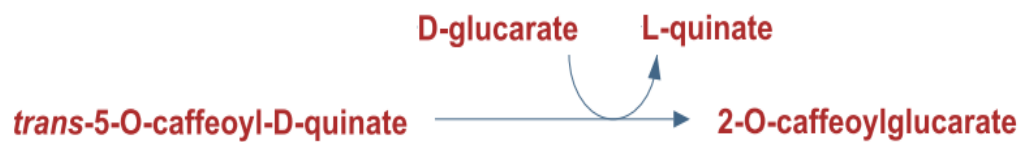


شکل پیوست (۲۱) مسیرهای بیوسنتز مونومرهای تشکیل دهنده‌ی سوبرین: مونومر *N*-فرولویل تیرامین از محصولات مسیر فنیل پروپانوئید مشتق می‌شود. سایر مونومرها شامل ۲۲-کربوکسی-دوکوسانوئیل کوآ،  $(\omega)$ -کربوکسی-(Z9)-اکتادک-۹-انویل-کوآ و ۱۶ هیدروکسی پامیتول + کوآ طی مسیرهای بیوسنتز اسیدهای چرب بسیار بلند زنجیر، سنتز اولات و مسیر سنتز پالمیتات سنتز می‌شوند (MetaCyc Pathway). به طور کلی سوبرین شامل پلی استر پلی آلیفاتیک متصل به ترکیبات فنلی و است که در بستری مومی جای گرفته است (ویشوانات و همکاران، ۲۰۱۵).

A



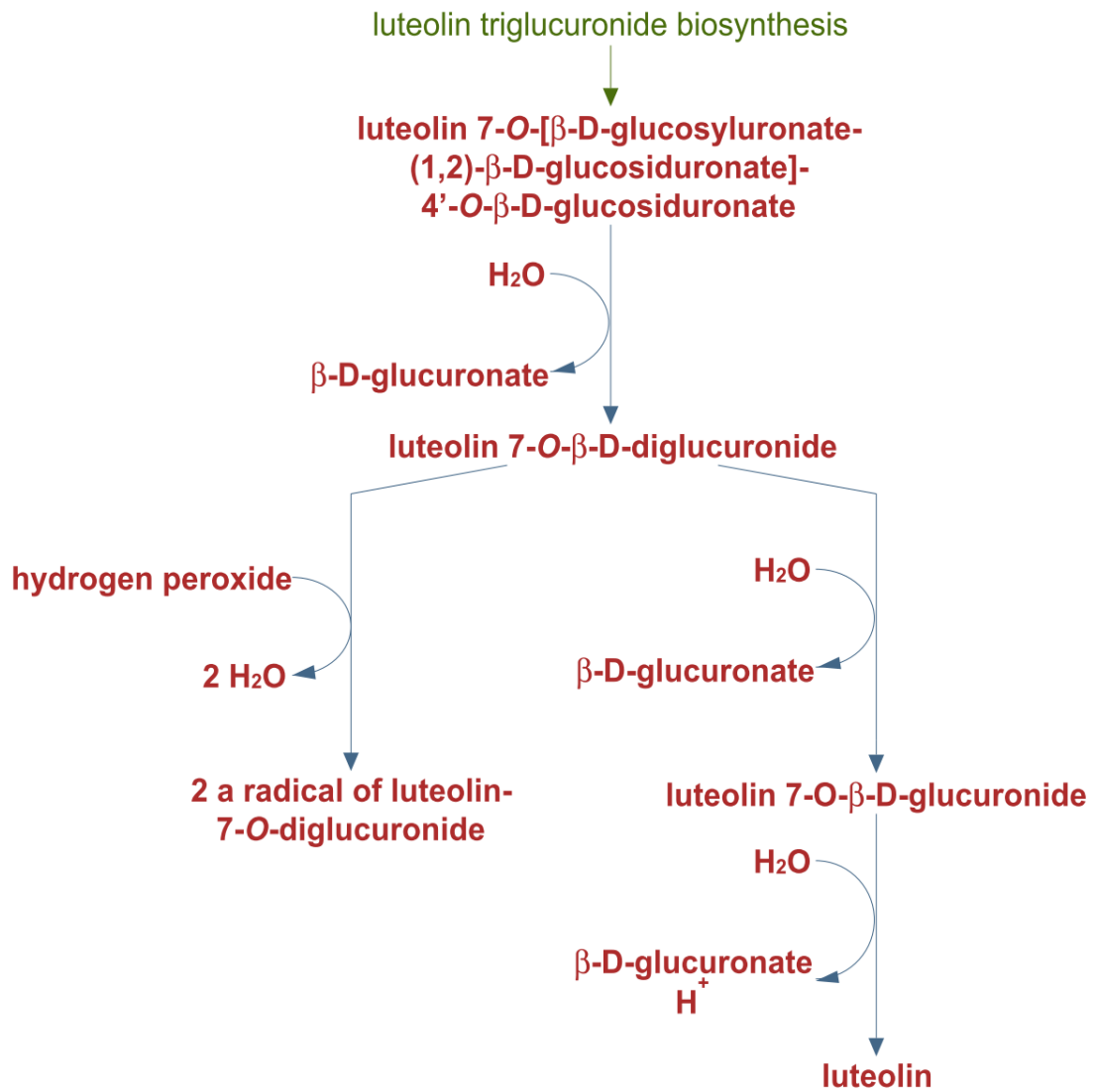
B



شکل پیوست (۲۲) A) سنتز کلوروژنیک اسید (trans-5-O-caffeoyl-d-quinic) طی مسیر فنیل پروپانوید از کوماریل کوآ صورت می‌گیرد. B) این ترکیب در مراحل بعد می‌تواند به ۲-کافئول گلوکارات تبدیل شود (MetaCyc Pathway).

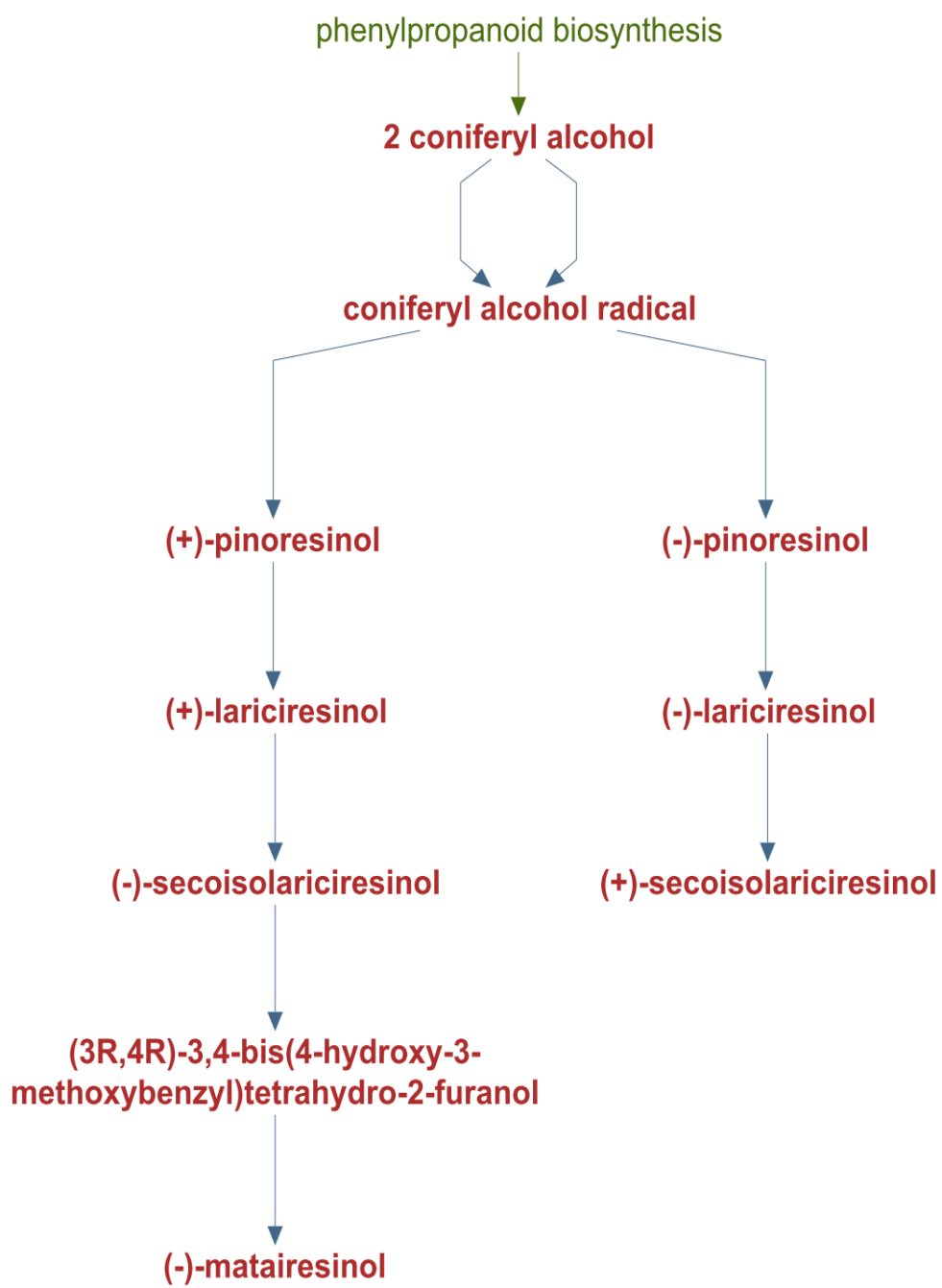


شکل پیوست (۲۳) مسیر تجزیه‌ی بایکالئین (MetaCyc Pathway).

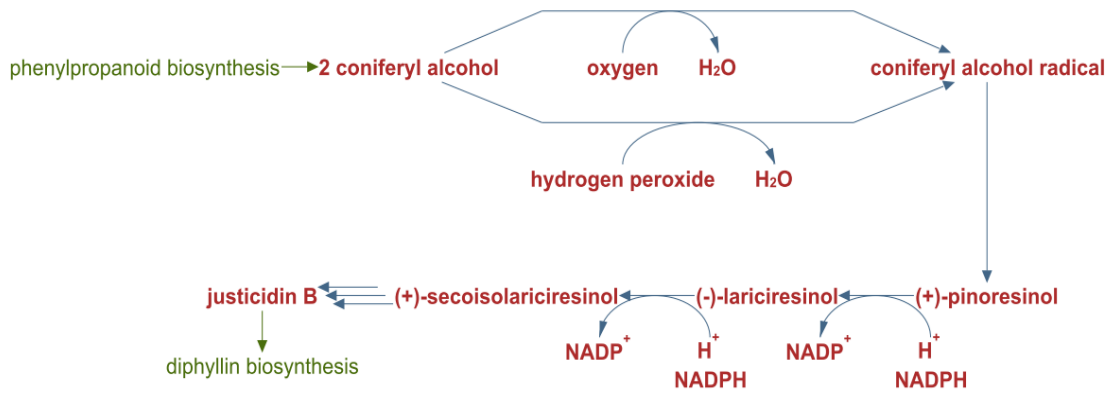


شکل پیوست (۲۴) تجزیه‌ی لوتولین تری گلوکورونید (luteolin 7-O-[β-D-glucosyluronate-(1,2)-β-D-(glucosiduronate)-4'-O-β-D-glucosiduronate]). (MetaCyc Pathway).

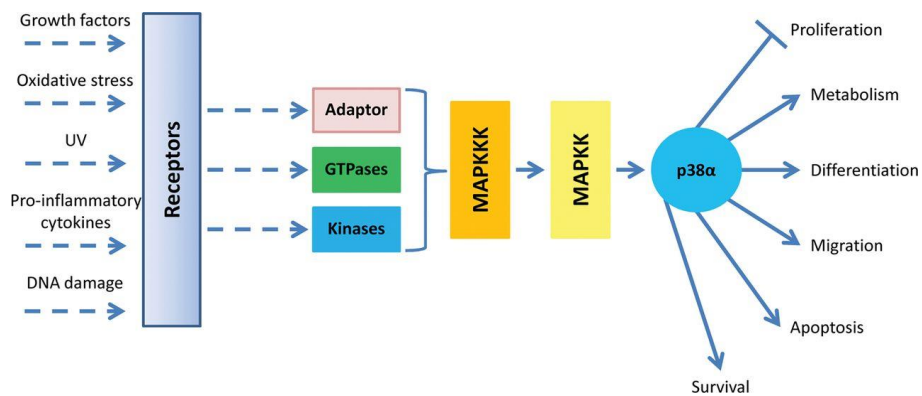




شکل پیوست (۲۵) مسیر بیوسنتز ماترسیینول از دو واحد کونفریل الکل (MetaCyc Pathway).



شکل پیوست (۲۶) مسیر بیوسنتز لیگنان جاستیسایدن B (MetaCyc Pathway).



شکل پیوست (۲۷) شکل کلی مدل انتقال سیگنال بر اساس آشارهای پروتئینی MAPK، مسیر کینازها با سیگنالهای خارجی شروع می‌شود. پروتئین‌های کیناز ابشاری از فسفریلاسیون را تشکیل می‌دهند منجر به فعال شدن پروتئین‌های پایین دست می‌شود و در نهایت منجر به پاسخ سلول می‌شوند. (p38 یک پروتئین MAPK می‌باشد) (ایزتورک و همکاران، ۲۰۱۲).

جدول پیوست (۱) جدول نتایج بلاست ژن‌های کد کننده آنزیم‌های PAL، C4H و C3H در Glycine max v2.0 بر علیه Glycine max v1.0.

	<b>Id in Glycine max V2.0</b>	<b>Location</b>	<b>Id in Glycine max V1.0</b>	<b>Location</b>	<b>Id%</b>
<b>Gm-PAL1</b>	Glyma.02g309300	Chr02:48287101..48289732	Glyma02g47940	Chr2:51367715...51368088	100
<b>Gm- PAL2</b>	Glyma.03g181600	Chr03:39351927..39355288	Glyma03g33880	Chr3:41365605...41367444	100
<b>Gm- PAL3</b>	Glyma.03g181700	Chr03:39362677..39366612	Glyma03g33890	Chr3:41374933...41378868	100
<b>Gm- PAL4</b>	Glyma.10g058200	Chr10:5328963..5333501	Glyma10g06600	Chr10:5306846...5311384	100
<b>Gm-PAL5</b>	Glyma.10g209800	Chr10:44173311..44179454	Glyma10g35381	Chr10:43593245...43599388	100
<b>Gm- PAL6</b>	Glyma.13g145000	Chr13:25758490..25763596	Glyma13g20800	Chr13:24273026...24278132	100
<b>Gm- PAL7</b>	Glyma.19g182300	Chr19:44118211..44122192	Glyma19g36620	Chr19:43914634...43918615	100
<b>Gm-PAL8</b>	Glyma.20g180800	Chr20:41891638..41898451	Glyma20g32135	Chr20:40774301...40781114	100
<b>Gm-C4H1</b>	Glyma.02G236500	Chr02:42416141..42420467	CYP73A11	Chr2:45490798...45495124	100
<b>Gm -C4H2</b>	Glyma.14G205200	Chr14:47041931..47046048	Glyma14g38580	Chr14:47721233...47725350	100
<b>Gm -C4H3</b>	Glyma.20G114200	Chr20:35592130..35594408	Glyma20g24810	Chr20:34452632...34454910	100
<b>Gm-C3H1</b>	Glyma.03G122000	Chr03:33466244..33470904	Glyma03g27740	Chr3:35505245...35509905	100
<b>Gm-C3H2</b>	Glyma.19G126000	Chr19:38430097..38435201	CYP98A2	Chr19:38217225...38222328	100

جدول پیوست (۲) ژن‌های *PAL*، *C4H* و *C3H* دخیل در بیوسنتز لیگنین در سویا و براکی‌پودیوم (Phytozome). (KEGG, NCBI)

<i>G. max</i>				
protein	Transcript name(phytozome)	Locuse tag	NCBI-GeneID	Location
<i>phenylalanine ammonia lyase (PAL)</i>				
<b>Gm-PAL1</b>	Glyma.02G309300.1	Glyma_02g309300	100787872	Chr02:48287101..48289732 forward
<b>Gm-PAL2</b>	Glyma.03G181600.1	Glyma_03g181600	100787902	Chr03:39351927..39355288 forward
<b>Gm-PAL3</b>	Glyma.03G181700.1	Glyma_03g181700	100788438	Chr03:39362677..39366612 forward
<b>Gm-PAL4</b>	Glyma.10G058200.1	Glyma_10g058200	100302735	reverse Chr10:5328963..5333501
<b>Gm-PAL5</b>	Glyma.10G209800.1	Glyma_10g209800	100801470	Chr10:44173311..44179454 reverse
<b>Gm-PAL6</b>	Glyma.13G145000.1	Glyma_13g145000	100803857	Chr13:25758490..25763596 reverse
<b>Gm-PAL7</b>	Glyma.19G182300.1	Glyma_19g182300	100811101	Chr19:44118211..44122192 forward
<b>Gm-PAL8</b>	Glyma.20G180800.1	Glyma_20g180800	100818777	Chr20:41891638..41898451 forward
<i>Cinnamate-4-hydroxylase (C4H)</i>				
<b>Gm-C4H1</b>	Glyma.02G236500.1	Glyma_02G236500	100499623	Chr02:42416141..42420467 reverse
<b>Gm-C4H2</b>	Glyma.14G205200.1	Glyma_14G205200	100818985	Chr14:47041931..47046048 forward
<b>Gm-C4H3</b>	Glyma.20G114200.1	Glyma_20G114200	100812188	Chr20:35592130..35594408 reverse
<i>p-coumarate 3-hydroxylase (C3H)</i>				
<b>Gm-C3H1.1</b>	Glyma.03G122000.1	Glyma_03G122000	100811080	Chr03:33466244..33470904 reverse
<b>Gm-C3H1.2</b>	Glyma.03G122000.2	Glyma_03G122000	100811080	Chr03:33466244..33470904 reverse
<b>Gm-C3H2</b>	Glyma.19G126000	Glyma_19G126000	606506	Chr19:38430097..38435201 reverse
<i>B. distachyon (PAL)</i>				
<b>Bd-PAL1</b>	Bradi3g47110.1	Bradi_3g47110	100843583	Bd3:48876022..48878530 forward
<b>Bd-PAL2</b>	Bradi3g47120.1	Bradi_3g47120	100844192	Bd3:48894428..48896888 forward
<b>Bd-PAL3</b>	Bradi3g48840.1	Bradi_3g48840	100829928	Bd3:50330480..50332787 forward
<b>Bd-PAL4</b>	Bradi3g49250.2	Bradi_3g49250	100839236	Bd3:50689769..50693543 reverse
<b>Bd-PAL5</b>	Bradi3g49260.1	Bradi_3g49260	100840340	Bd3:50701570..50706047 reverse
<b>Bd-PAL6</b>	Bradi3g49270.1	Bradi_3g49270	100841149	Bd3:50707931..50710472 reverse
<b>Bd-PAL7</b>	Bradi3g49280.1	Bradi_3g49280	100841454	Bd3:50714244..50716696 reverse
<b>Bd-PAL8</b>	Bradi5g15830.1	Bradi_5g15830	100845653	Bd5:19319891..19322517 reverse
<i>Cinnamate-4-hydroxylase (C4H)</i>				
<b>Bd-C4H1</b>	Bradi2g31510.1	Bradi_2g31510	100833073	Bd2:31278519..31282425 reverse
<b>Bd-C4H2</b>	Bradi2g53470.1	Bradi_2g53470	100839986	Bd2:52622797..52625506 reverse
<b>Bd-C4H3</b>	Bradi3g43160.1	Bradi_3g43160	100832881	Bd3:44559171..44561255 forward
<i>p-coumarate 3-hydroxylase (C3H)</i>				
<b>Bd-C3H</b>	Bradi2g21300.1	Bradi_2g21300	100835531	Bd2:18665394..18670261 reverse

جدول پیوست (۳) درصد مشابهت توالی آمینو اسیدی PAL در سویا و براکی پودיום

	Protein name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
		% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id
1	Bd-PAL1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Bd- PAL2	98	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Bd- PAL3	93	92	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Bd- PAL4	75	76	76	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Bd- PAL5	85	76	86	76	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Bd- PAL6	94	87	94	75	85	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Bd- PAL7	93	93	98	76	86	94	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Bd- PAL 8	86	86	88	75	87	87	88	100	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Gm-PAL1	67	67	69	64	68	68	78	77	100	-	-	-	-	-	-	-
10	Gm- PAL2	76	76	77	72	75	77	77	77	76	100	-	-	-	-	-	-
11	Gm- PAL3	75	76	78	72	75	77	77	79	76	99	100	-	-	-	-	-
12	Gm- PAL4	75	74	78	70	76	77	77	78	75	89	89	100	-	-	-	-
13	Gm-PAL5	75	75	76	71	76	76	78	78	72	85	85	85	100	-	-	-
14	Gm- PAL6	75	76	77	71	76	78	75	77	75	89	89	98	84	100	-	-
15	Gm- PAL7	75	76	78	73	76	78	76	77	76	97	98	90	85	90	100	-
16	Gm-PAL 8	74	74	75	72	75	76	69	68	73	84	84	84	97	84	84	100

جدول پیوست (۴) درصد مشابهت توالی آمینو اسیدی C4H بدست آمده از NCBI

	Protein name	1	2	3	4	5	6
		% Id	% Id	% Id	% Id	% Id	% Id
1	Bd-C4H1	100	-	-	-	-	-
2	Bd-C4H2	75	100	-	-	-	-
3	Bd-C4H3	63	66	100	-	-	-
4	Gm-C4H1	76	84	64	100	-	-
5	Gm -C4H2	76	84	64	98	100	-
6	Gm -C4H3	60	64	70	65	66	100

جدول پیوست (۵) درصد مشابهت توالی آمینو اسیدی C3H به دست آمده از NCBI

	Protein name	1	2	3	4
		id	id	id	id
1	Bd-C3H1	100	-	-	-
2	Gm-C3H1-1	70	100	-	-
3	Gm-C3H1-2	68	100	100	-
4	Gm-C3H2	69	96	96	100

جدول پیوست (۶) پیش بینی مکان فعالیت هر آنزیم بر اساس پپتید نشانه (TP)، موجود در آنزیم در سایت Targetp آنزیم‌هایی حاوی پپتید نشانه حضور در میتوکندری (Mitochondrion) با (M) و پروتئین‌هایی که دارای سیگنال پپتید حضور در مسیر ترشحی (Secretory pathway) را دارند با (S) نشان داده شده‌اند. خط تیره به این معنا است که آنزیم در هر مکان دیگری می‌تواند فعالیت کند

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
Bd-PAL1	710	0.170	0.053	0.128	0.760	_	3
Bd-PAL2	716	0.015	0.116	0.255	0.597	_	4
Bd-PAL3	712	0.158	0.067	0.073	0.846	_	2
Bd-PAL4	707	0.199	0.071	0.056	0.801	_	2
Bd-PAL5	717	0.051	0.176	0.096	0.755	_	3
Bd-PAL6	711	0.098	0.109	0.119	0.691	_	3
Bd-PAL7	712	0.147	0.079	0.061	0.857	_	2
Bd-PAL8	715	0.063	0.084	0.061	0.862	_	2
Gm-PAL1	703	0.157	0.051	0.069	0.875	_	2
Gm-PAL2	716	0.369	0.038	0.052	0.757	_	4
Gm-PAL3	713	0.329	0.077	0.061	0.780	_	3
Gm-PAL4	717	0.197	0.033	0.186	0.752	_	3
Gm-PAL5	687	0.071	0.194	0.086	0.893	_	2
Gm-PAL6	716	0.112	0.060	0.093	0.874	_	2
Gm-PAL7	712	0.398	0.100	0.050	0.709	_	4
Gm-PAL8	717	0.193	0.041	0.100	0.856	_	2
Bd-C4H1	501	0.013	0.121	0.847	0.040	S	2
Bd-C4H2	505	0.029	0.151	0.501	0.104	S	4
Bd-C4H3	537	0.018	0.104	0.727	0.042	S	2

Gm-C4H1	506	0.008	0.179	0.789	0.091	S	2
Gm-C4H2	505	0.008	0.179	0.789	0.091	S	2
Gm-C4H3	539	0.011	0.018	0.480	0.259	S	4
Bd-C3H	514	0.164	0.025	0.685	0.010	S	3
Gm-C3H1-1	509	0.024	0.431	0.231	0.034	M	5
Gm-C3H1-2	387	0.024	0.431	0.231	0.034	M	5
Gm-C3H2	509	0.023	0.409	0.225	0.043	M	5

جدول پیوست (۷) برهمکنش‌های پروتئین‌های PAL و سایر پروتئین‌ها در سویا و براکی بودیوم (STRING).

<i>G-max</i>								
	PAL1	PAL2	PAL3	PAL4	PAL5	PAL6	PAL7	PAL8
Glyma20G24810.1 (C4H)	+	+	+	+	+	+	+	+
Glyma11g09710.2 (4CL)	-	+	+	+	+	+	+	+
Glyma17G07170.1 (4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
Glyma17g07180.1 (4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
Glyma18g08550.1 (4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
Glyma15g00390.1 (4CL)	+	+	-	-	+	+	-	+
LOC547944 (4CL)	+	-	-	-	-	-	-	-
Glyma14g38580.1 (C4H)	+	+	+	+	+	+	+	+
Glyma02g40290.1 (C4H)	+	+	+	+	+	+	+	+
Glyma13g39770.1 (4CL)	+	-	+	+	-	-	+	-
Glyma01g44270.1 (4CL4)	-	+	+	+	+	+	+	+
Glyma17g07190.2 (4CL1)	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>B-distachyon</i>								
	PAL1	PAL2	PAL3	PAL4	PAL5	PAL6	PAL7	PAL8
Bradi3g37300.1 (4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
Bradi3g05750.1 (4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
Bradi2g53470.1 (C4H)	+	+	+	+	+	+	+	+
Bradi2g31510.1 (C4H)	+	+	+	+	+	+	+	+
Bradi1g74870.1 (4CL)	-	-	+	-	+	-	+	+
Bradi3g18960.1 (4CL)	+	+	-	+	-	+	-	-
Bradi5g04760.1 (4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
Bradi3g52350.1 (4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
Bradi1g31320.1 (4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+
Bradi3g43160.1 (C4H)	+	+	+	+	+	+	+	+
Bradi3g34531.1 (4CL)	+	+	+	+	+	+	+	+

جدول پیوست (۸) برهمکنش‌های پروتئین‌های C4H و سایر پروتئین‌ها در براکی‌پودیوم و سایر پروتئین‌ها (STRING).

<i>G-max</i>							
	C4H1	C4H2	C4H3		C4H1	C4H2	C4H3
Glyma13g39770.1 (4CL)	+	-	+	Glyma18g08550.1 (4CL)	-	-	+
Glyma17g07190.2 (4CL1)	+	-	+	Glyma15g00390.1 (4CL)	-	-	+
Glyma01g44270.1 (4CL4)	+	-	-	Glyma07g02460.2 (HCT)	-	+	-
Glyma.11g01350.1 (CHS8)	+	+	-	Glyma08g23560.3 (HCT)	-	+	-
Glyma10g06600.1 (PAL2)	+	-	-	Glyma08g23310.4 (CCR)	+	+	-
LOC547944 (4CL)	-	-	+	Glyma13g44700.1 (CCR)	+	+	-
Glyma11g09710.2 (4CL)	-	-	+	Glyma07g02690.1 (CCR)	+	+	-
Glyma17g07170.1 (4CL)	-	+	+	Glyma15g00600.1 (DFR)	+	+	-
Glyma13g01080.1 (4CL)	-	-	+	Glyma01g22880.1 (CHS)	+	-	-
Glyma17g07180.1 (4CL)	-	+	+	Glyma19g27930.1 (CHS)	-	+	-
Glyma11g20020.1 (4CL)	-	-	+				
<i>B-distachyon</i>							
	C4H1	C4H2	C4H3		C4H1	C4H2	C4H3
Bradi3g48840.1 (PAL)	-	+	-	Bradi1g31320.1 (4CL)	-	-	+
Bradi5g04760.1 (4CL)	+	+	+	Bradi5g14720.1 (4CL)	+	+	-
Bradi3g05750.1 (4CL)	+	+	+	Bradi3g34531.1 (4CL)	-	-	+
Bradi3g52350.1 (4CL)	+	+	+	Bradi3g36887.1 (CCR)	+	+	-
Bradi3g37300.1 (4CL)	+	+	+	Bradi4g08647.1 (CCR)	+	+	+
Bradi3g18960.1 (4CL)	+	-	+	Bradi3g54970 (CCR)	-	-	+
Bradi1g74870.1 (4CL)	+	+	+	Bradi4g17230.1 (CHS)	+	+	-

جدول پیوست (۹) برهمکنش‌های پروتئین‌های C3H و سایر پروتئین‌ها در سویا و براکی‌پودیوم (STRING).

<i>G-max</i>					
	C3H1	C3H2		C3H1	C3H2
Glyma08g23560.3 (HCT)	+	+	LOC547944 (4CL)	-	+
Glyma07g02460.2 (HCT)	+	+	Glyma13g39770.1 (4CL)	-	+
Glyma03g27740.1 (C3H)	-	+	Glyma17g07190.2(4CL1)	+	-
Glyma15g00600.1 (CCR)	+	+	Glyma13g00450.1 (CES)	+	+
Glyma13g44700.1 (CCR)	+	-	Glyma11g30970.2 (Uncharacterized cytochrome p450)	+	+
Glyma08g23310.4 (CCR)	+	-	Glyma07g13341.1 (Uncharacterized cytochrome p450)	+	+
Glyma07g02690.1 (CCR)	+	+			
<i>B-distachyon</i>					
	C3H			C3H	
Bradi5g14720.1 (4CL)	+		Bradi5g09320.1 (petF)	+	
Bradi4g08647.1 (4CL)	+		Bradi4g31120.1 (petF)	+	
Bradi3g36887.1 (CCR)	+		Bradi3g13170.1 (petF)	+	
Bradi3g05750.1 (4CL)	+		Bradi3g13160.1 (petF)	+	
Bradi2g55680.1 (petF)	+		Bradi2g23930.1 (petF)	+	



جدول پیوست (۱۰) شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده *PAL* در گیاه براکی پودبوم (فیتوزوم و PlaNet)

Gene Id	Function	Chromosome
<b>Bradi1g13910</b>	Homeobox-leucine zipper protein (Transcription factors)	1
<b>Bradi1g19660</b>	Uncharacterized GPI-anchored protein At3g06035-like	1
<b>Bradi1g31320</b>	4-Coumarate:coa ligase (4CL)	1
<b>Bradi1g44430</b>	Endoglucanase 16-like	1
<b>Bradi1g59820</b>	L-type lectin-domain containing receptor kinase I.9	1
<b>Bradi1g60750</b>	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	1
<b>Bradi1g63220</b>	Probable WRKY transcription factor 70	1
<b>Bradi1g64030</b>	Vegetative cell wall protein gp1-like	1
<b>Bradi1g65750</b>	Putative xylosyltransferase, cazy family GT43	1
<b>Bradi1g72430</b>	Protein struelig-receptor family 7-like	1
<b>Bradi2g18640</b>	Nucleoside-triphosphatase activity Protein iq-domain 31-like	2
<b>Bradi2g37970</b>	Probable glucuronosyltransferase	2
<b>Bradi2g47480</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase NPK1-like	2
<b>Bradi2g48210</b>	Nucleoside-triphosphatase activity (Blast2GO) Protein IQ-DOMAIN 31-like	2
<b>Bradi2g56676</b>	RNA-binding protein 24-B-like	2
<b>Bradi3g01137</b>	Receptor-like serine/threonine-protein kinase NCRK	3
<b>Bradi3g05750</b>	4-Coumarate:coa ligase (4CL)	3
<b>Bradi3g13420</b>	Putative methylesterase 14, chloroplastic	3
<b>Bradi3g16530</b>	Caffeic acid O-methyltransferase (COMT)	3
<b>Bradi3g36887</b>	Cinnamoyl-coa reductase (CCR)	3
<b>Bradi3g48840</b>	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)	3
<b>Bradi3g49260</b>	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)	3
<b>Bradi3g49270</b>	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)	3
<b>Bradi3g52880</b>	Dof zinc finger protein DOF5.6-like (Transcription factor activity)	3
<b>Bradi3g56250</b>	Leucine-rich repeat protein kinase, putative, expressed, subfamily LRR-II	3
<b>Bradi3g59810</b>	Endoglucanase 7-like	3
<b>Bradi4g01887</b>	Homeobox-leucine zipper protein (Transcription factors)	4
<b>Bradi4g30540</b>	Cellulose synthase A	4
<b>Bradi4g35477</b>	Sodium/metabolite cotransporter bass5, chloroplastic-related	4
<b>Bradi4g36240</b>	Endoglucanase 24	4
<b>Bradi5g15830</b>	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)	5
<b>Bradi5g16707</b>	Myb-related protein Myb4-like	5
<b>Bradi5g24240</b>	SEC1 family transport protein SLY1	5

جدول پیوست (۱۱) شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده *PAL* در سویا (فیتوزوم)

Gene Id	function	Chromosome
Glyma.02G208400	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	2
Glyma.02G293900	Endoglucanase 11-like	2
Glyma.03G074300	L-type lectin-domain containing receptor kinase VIII.2-like	3
Glyma.03G178300	Probable beta-1,4-xylosyltransferase	3
Glyma.04G153700	Cellulose synthase A catalytic subunit 7 [UDP-forming]-like	4
Glyma.04G173100	protein iq-domain 31-like	4
Glyma.04G223300	WRKY DNA -binding domain (WRKY)	4
Glyma.04G256900	Putative methylesterase 12, chloroplastic-like	4
Glyma.05G037800	Dof zinc finger protein DOF5.6-like	5
Glyma.05G122800	SEC1 family transport protein SLY1-like	5
Glyma.06G025100	Endoglucanase 2	6
Glyma.06G137200	Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like	6
Glyma.06G142000	Probable WRKY transcription factor 70	6
Glyma.08G255300	Protein nsp-interacting kinase 1-like	8
Glyma.09G261600	Transcription repressor MYB6-like	9
Glyma.10G209800	Phenylalanine ammonia-lyase	10
Glyma.11G028500	Probable sodium/metabolite cotransporter BASS5, chloroplastic	11
Glyma.11G144800	Receptor-like serine/threonine-protein kinase ncrk	11
Glyma.12G002800	RNA-binding protein 24-like	12
Glyma.12G192500	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase A-like	12
Glyma.13G369800	Cinnamoyl-coa reductase (CCR)	13
Glyma.13G372000	4-coumarate:coa ligase isoenzyme 2	13
Glyma.15G129700	Homeobox-leucine zipper protein ATHB-14- (Transcription factors)	15
Glyma.19G122200	Uncharacterized LOC100803801	19
Glyma.19G261700	Protein struBdelig-receptor family 6	19
Glyma.20G142700	Uncharacterized LOC100499681 (Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored)	20
Glyma.20G180800	Phenylalanine ammonia-lyase	20

جدول پیوست (۱۲) زیر شبکه‌های هم بیانی در شبکه‌ی هم بیانی *PAL* در براکی پودیوم. ستون اول نام زیر و ستون دوم نام ژن‌های هم بیان موجود در هر زیر شبکه را نشان می‌دهد (Phytozome و PLANET).

subnetworks	Genes in subnetworks
<i>Bd.distachyon</i>	
<b>Bd-PAL3</b>	Bradi1g63220,Bradi3g49270,Bradi5g15830
<b>Bd-PAL4</b>	Bradi1g13910,Bradi1g19660,Bradi1g31320,Bradi1g59820,Bradi1g60750,Bradi1g65750,Bradi1g72430,Bradi2g18640,Bradi2g37970,Bradi2g56676,Bradi3g01137,Bradi3g05750,Bradi3g13420,Bradi3g16530,Bradi3g49260,Bradi3g52880,Bradi3g56250,Bradi3g59810,Bradi4g01887,Bradi4g30540,Bradi4g35477,Bradi4g36240,Bradi5g24240
<b>Bd-PAL5</b>	Bradi1g31320,Bradi1g44430,Bradi1g60750,Bradi1g65750,Bradi1g72430,Bradi2g37970,Bradi3g05750,Bradi3g13420,Bradi3g16530,Bradi3g36887,Bradi3g59810,Bradi4g30540,Bradi4g35477,Bradi4g36240
<b>Bd-PAL6</b>	Bradi1g19660,Bradi1g60750,Bradi1g63220,Bradi1g64030,Bradi1g65750,Bradi2g47480,Bradi2g48210,Bradi3g48840,Bradi5g15830,Bradi5g16707
<b>Bd-PAL7</b>	Bradi3g05750
<b>Bd-PAL8</b>	Bradi3g48840,Bradi3g49270

<i>G. max</i>	
<b>GM.PAL2</b>	Glyma.12G002800,Glyma.12G192500,Glyma.13G369800
<b>GM.PAL3</b>	Glyma.04G223300,Glyma.06G142000
<b>GM.PAL4</b>	Glyma.02G293900,Glyma.03G074300,Glyma.05G037800,Glyma.06G025100, Glyma.06G137200,Glyma.08G255300,Glyma.11G028500,Glyma.13G372000, Glyma.19G122200,Glyma.19G261700
<b>GM.PAL5</b>	Glyma.20g180800
<b>GM.PAL7</b>	Glyma.20G180800,Glyma.02G208400
<b>GM.PAL8</b>	Glyma.03G178300,Glyma.04G153700,Glyma.04G173100,Glyma.04G256900, Glyma.09G261600,Glyma.10G209800,Glyma.11G144800,Glyma.13G369800, Glyma.15G129700,Glyma.20G142700

جدول پیوست (۱۳) ژن‌های مشترک بین زیر شبکه‌های هم بیانی مربوط به *PAL* در براکی پودیم و سویا

Subnetworks	Gene	Function
<b>Bd-pal4, Bd-pal5, Bd-pal7</b>	Bradi3g05750	4-Coumarate:CoA ligase (4CL)
<b>Bd-pal4, Bd-pal5, Bd-pal6</b>	Bradi1g60750	(1 of 4) 2.5.1.54 - 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase / Phospho-2-oxo-3-deoxyheptonate aldolase
	Bradi1g65750	Putative xylosyltransferase, CAZy family GT43
<b>Bd-pal3, Bd-pal6</b>	Bradi1g63220	WRKY transcription factor
	Bradi5g15830	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)
<b>Bd-pal4, Bd-pal5</b>	Bradi1g72430	leucine-rich repeat protein kinase, putative, expressed, subfamily LRR-V
	Bradi2g37970	Putative xylosyltransferase, CAZy family GT43
	Bradi1g31320	4-Coumarate:CoA ligase (4CL)
	Bradi3g16530	Caffeic acid O-methyltransferase (COMT)
	Bradi3g59810	Glycosyl hydrolase (GH), subfamily GH9
	Bradi4g30540	cellulose synthase
	Bradi4g35477	PTHR10361:SF30 - Sodium/metabolite cotransporter bass5, chloroplastic-related
	Bradi4g36240	Glycosyl hydrolase (GH), subfamily GH9
<b>Bd-pal4, Bd-pal6</b>	Bradi3g13420	3.1.1.82 - Pheophorbidase / PPD
	Bradi1g19660	Uncharacterized GPI-anchored protein At3g06035-like
<b>Bd-pal6, Bd-pal8</b>	Bradi3g48840	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)
<b>Bd-pal3, Bd-pal8</b>	Bradi3g49270	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)
<b>Gm.PAL5, Gm.PAL7</b>	Glyma.20g180800	Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)
<b>Gm.PAL2, Gm.PAL8</b>	Glyma.13G369800	Cinnamoyl-coa reductase (CCR)

جدول پیوست (۱۴) شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده *C4H*، براکی پودیم (فیتوزوم و PlaNet)

Gene Id	Function	Chromosome
<b>Bradi1g05850</b>	non-specific lipid-transfer protein-like protein At2g13820	1
<b>Bradi1g47107</b>	PF00069//PF00560//PF08263//PF13855 - Protein kinase domain (Pkinase) // Leucine Rich Repeat (LRR_1) // Leucine rich repeat N-terminal domain (LRRNT_2) // Leucine rich repeat (LRR_8)	1
<b>Bradi1g47730</b>	PF03140 - Plant protein of unknown function (DUF247) putative UPF0481 protein At3g02645	1
<b>Bradi1g69320</b>	non-symbiotic hemoglobin	1
<b>Bradi1g74810</b>	FAD-dependent urate hydroxylase-like	1
<b>Bradi2g11610</b>	universal stress protein A-like protein	2
<b>Bradi2g14170</b>	putative RING-H2 finger protein ATL12 E3 ubiquitin-protein ligase ATL6/9/15/31/42/55 [EC:2.3.2.27]	2
<b>Bradi2g14450</b>	plant cysteine oxidase 1-like cysteamine dioxygenase [EC:1.13.11.19] Cysteamine + Oxygen <=> Hypotaurine	2
<b>Bradi2g15650</b>	uncharacterized LOC100830726	2

<b>Bradi2g31700</b>	CASP-like protein 1C1	2
<b>Bradi2g37020</b>	Peroxidase 5-like Phenylpropanoid biosynthesis	2
<b>Bradi3g01250</b>	high-affinity nitrate transporter 2.1-like MFS transporter, NNP family, nitrate/nitrite transporter	3
<b>Bradi3g01270</b>	phosphate transmembrane transporter activity (Blast2GO) high-affinity nitrate transporter 2.1-like MFS transporter, NNP family, nitrate/nitrite transporter Pathways: Nitrogen metabolism	3
<b>Bradi3g13700</b>	probable L-gulonolactone oxidase 4	3
<b>Bradi3g18160</b>	L-gulonolactone oxidase 2-like	3
<b>Bradi3g51590</b>	protein detoxification 49-like multidrug resistance protein, MATE family	3
<b>Bradi4g02050</b>	CASP-like protein 1B1	4
<b>Bradi4g16750</b>	LOB domain-containing protein 42-like	4
<b>Bradi4g28950</b>	L-ascorbate oxidase	4

جدول پیوست (۱۵) شبکه‌ی هم‌بیانی حفاظت شده *C4H*، در سویا (فیتوزوم)

Gene Id	Function	Chromosome
<b>Glyma.02G089500</b>	Uncharacterized LOC100527161	2
<b>Glyma.05G170900</b>	CASP-like protein 9-like	5
<b>Glyma.06G292900</b>	CASP-like protein 1C2 Iron-sulfur cluster binding	6
<b>Glyma.07G027600</b>	Putative UPF0481 protein At3g02645 Uncharacterized protein	7
<b>Glyma.09G146800</b>	Protein detoxification 49-like	9
<b>Glyma.09G194100</b>	E3 ubiquitin-protein ligase ATL42-like Proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	9
<b>Glyma.09G284400</b>	Peroxidase 5-like Phenylpropanoid biosynthesis	9
<b>Glyma.09G284700</b>	Peroxidase 5-like Phenylpropanoid biosynthesis	9
<b>Glyma.10G191700</b>	Peroxidase 5-like Phenylpropanoid biosynthesis	10
<b>Glyma.10G239000</b>	Protein detoxification 49-like Drug transmembrane transport	10
<b>Glyma.10G282300</b>	Uncharacterized LOC106794871	10
<b>Glyma.11G121800</b>	Nonsymbiotic hemoglobin oxygen transport	11
<b>Glyma.11G195200</b>	High affinity nitrate transporter 2.4 transmembrane transport	11
<b>Glyma.13G046300</b>	LOB domain-containing protein 41-like	13
<b>Glyma.13G064300</b>	Plant cysteine oxidase 2-like	13
<b>Glyma.13G323800</b>	NRT2 protein Nitrate transmembrane transporter activity	13
<b>Glyma.17G071700</b>	Putative leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine- protein kinase	17
<b>Glyma.18G293600</b>	Uncharacterized LOC100306593	18
<b>Glyma.18G297100</b>	LOB domain-containing protein 41-like	18
<b>Glyma.19G020500</b>	Plant cysteine oxidase 2-like	19
<b>Glyma.19G046300</b>	LOB domain-containing protein 41-like	19
<b>Glyma.19G228700</b>	Universal stress protein A-like protein	19
<b>Glyma.19G259300</b>	Probable L-gulonolactone oxidase 6 D-arabinono-1,4-lactone oxidase activity	19

<b>Glyma.20G001400</b>	Peroxidase 5-like Phenylpropanoid biosynthesis	20
<b>Glyma.20G146800</b>	Non-specific lipid-transfer protein-like protein At2g13820	20
<b>Glyma.U040600</b>	L-ascorbate oxidase	scaffold_614

جدول پیوست (۱۶) زیر شبکه‌های هم بیانی در شبکه‌ی هم بیانی *C4H* در سویا و براکی پودیوم. ستون اول نام زیر و ستون دوم نام ژن‌های هم بیان موجود در هر زیر شبکه را نشان می‌دهد (Phytozome و PLANET)

subnetworks	Genes in subnetworks
<i>G. max</i>	
<b>Gm-C4H1</b>	Glyma.20g146800
<b>Gm-C4H3</b>	Glyma.02g089500,Glyma.05g170900,Glyma.06g292900,Glyma.20g001400, Glyma.07g027600,Glyma.09g146800,Glyma.09g194100,Glyma.u040600, Glyma.09g284400,Glyma.09g284700,Glyma.10g191700,Glyma.10g239000, Glyma.10g282300,Glyma.11g121800,Glyma.11g195200,Glyma.13g046300, Glyma.13g064300,Glyma.13g323800,Glyma.17g071700,Glyma.18g293600, Glyma.18g297100,Glyma.19g020500,Glyma.19g046300,Glyma.19g228700, Glyma.19g259300
<i>Bd.distachyon</i>	
<b>Bd-C4H1</b>	Bradi1g05850,Bradi1g74810,Bradi2g31700,Bradi3g13700,Bradi4g02050
<b>Bd-C4H3</b>	Bradi1g47107,Bradi1g47730,Bradi1g69320,Bradi2g11610,Bradi2g14170, Bradi2g14450,Bradi2g15650,Bradi2g37020,Bradi3g01250,Bradi3g01270, Bradi3g18160,Bradi3g51590,Bradi4g16750,Bradi4g28950

جدول پیوست (۱۷) شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده مربوط به آنزیم *C3H* براکی پودیوم (فیتوزوم و PlaNet)

Gene Id	Function	Choromosom
<b>Bradi1g19660</b>	uncharacterized GPI-anchored protein At3g06035-like	1
<b>Bradi1g31320</b>	4-Coumarate:CoA ligase (4CL)	1
<b>Bradi2g17067</b>	cytochrome b561 and DOMON domain-containing protein At3g61750	2
<b>Bradi2g49912</b>	cellulose synthase A catalytic subunit 4 [UDP-forming]	2
<b>Bradi3g05750</b>	probable 4-coumarate--CoA ligase 3 (4CL)	3
<b>Bradi3g06480</b>	Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)	3
<b>Bradi3g16530</b>	Caffeic acid O-methyltransferase (COMT)	3
<b>Bradi3g28350</b>	cellulose synthase	3
<b>Bradi3g36887</b>	cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR)	3
<b>Bradi3g38950</b>	DNA-3-methyladenine glycosylase I activity	3
<b>Bradi3g48530</b>	Hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase (HCT (CST/CQT))	3
<b>Bradi4g21220</b>	Pthr31218:sf53 - protein walls are thin 1	4
<b>Bradi4g30540</b>	cellulose synthase	4
<b>Bradi4g34040</b>	chitinase activity	4
<b>Bradi4g44860</b>	protein trichome birefringence-like O-acetyltransferase activity cell wall organization or biogenesis	4

جدول پیوست (۱۸) شبکه‌ی هم بیانی حفاظت شده مربوط به آنزیم C3H در سویا (فیتوزوم)

Gene Id	Function	Choromosom
Glyma.01G082000	DNA-3-methyladenine glycosylase	1
Glyma.02G123800	DNA-3-methyladenine glycosylase 1 Base-excision repair	2
Glyma.03G049800	Protein trichome birefringence-like 34	3
Glyma.03G257500	Cytoome b561 and domon domain-containing protein At3g61750	3
Glyma.04G063800	Cellulose synthase A catalytic subunit 8 [UDP-forming]-like	4
Glyma.04G153700	Cellulose synthase A catalytic subunit 7 [UDP-forming]-like	4
Glyma.06G137100	caffeic acid 3-O-methyltransferase-like	6
Glyma.06G225500	Cellulose synthase A catalytic subunit 7 [UDP-forming]	6
Glyma.07G021600	(HCT) Shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase	7
Glyma.08G263200	3-Methyladenine glycosylase I-related DNA-3-methyladenine glycosylase activity	8
Glyma.09G038500	Chitinase-like protein 2	9
Glyma.09G051100	Cellulose synthase A catalytic subunit 4 [UDP-forming]	9
Glyma.10G251000	Uncharacterized LOC100306063	10
Glyma.13G369800	Cinnamoyl-coa reductase 2	13
Glyma.14G216200	Protein WALLS ARE THIN 1-like	14
Glyma.15G157100	Cellulose synthase A catalytic subunit 4 [UDP-forming]-like	15
Glyma.17G064600	4-coumarate:coenzyme A ligase	17
Glyma.20G128600	Probable cinnamyl alcohol dehydrogenase	20
Glyma.20G142700	Uncharacterized LOC100499681	20

جدول پیوست (۱۹) زیرشبکه‌های هم بیانی C3H در سویا و براکی‌پودیوم. ستون اول نام زیر و ستون دوم نام ژن‌های هم بیان موجود در هر زیر شبکه را نشان می‌دهد (Phytozome و PLANET).

subnetworks	Genes in subnetworks
<i>G. max</i>	
Gm-C3H	Glyma.02G123800, Glyma.03G049800, Glyma.03G257500, Glyma.04G063800, Glyma.04G153700, Glyma.06G137100, Glyma.06G225500, Glyma.07G021600, Glyma.08G263200, Glyma.09G038500, Glyma.09G051100, Glyma.10G251000, Glyma.13G369800, Glyma.14G216200, Glyma.15G157100, Glyma.17G064600, Glyma.20G128600, Glyma.20G142700, Glyma.01G082000
<i>Bd. distachyon</i>	
Bd- C3H	Bradi1g19660, Bradi1g31320, Bradi3g48530, Bradi4g21220, Bradi2g17067, Bradi2g49912, Bradi3g05750, Bradi3g38950, Bradi3g06480, Bradi3g16530, Bradi3g28350, Bradi3g36887, Bradi4g30540, Bradi4g34040, Bradi4g44860

جدول پیوست (۲۰) بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم بیان *PAL* در سویا (Phytozome). ستون اول Id مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌هایی که در این مسیر قرار دارند را نشان می‌دهد. ستون p-Value میزان احتمال اتفاقی بودن نتایج را نشان می‌دهد و ستون آخر ژن‌هایی که در این مسیر فعالیت می‌کنند را نشان می‌دهد.

Pathways Id	Pathways Name	No	p-Value	Genes
PWY-1121	suberin monomers biosynthesis	4	0.00195998 0836825164	Glyma.06G137200,Glyma.10G209800, Glyma.13G372000,Glyma.20G180800
PWY-7186	superpathway of scopolin and esculin biosynthesis	3	0.01274869 305717656	Glyma.06G137200,Glyma.10G209800, Glyma.20G180800
PWY1F- 467	phenylpropanoid biosynthesis, initial reactions	2	0.17935309 618099282	Glyma.10G209800,Glyma.20G180800
PWY-361	phenylpropanoid biosynthesis	3	0.23864605 477897352	Glyma.06G137200,Glyma.13G369800, Glyma.13G372000
ARO-PWY	chorismate biosynthesis I	1	1	Glyma.02G208400
PWY-1001	cellulose biosynthesis	1	1	Glyma.04G153700
PWY-2181	free phenylpropanoid acid biosynthesis	1	1	Glyma.06G137200
PWY-5800	xylan biosynthesis	1	1	Glyma.03G178300
PWY-6164	3-dehydroquinate biosynthesis I	1	1	Glyma.02G208400
PWY-6435	4-hydroxybenzoate biosynthesis V	1	1	Glyma.13G372000
PWY1F- FLAVSYN	flavonoid biosynthesis	1	1	Glyma.13G372000

جدول پیوست (۲۱) بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم بیان *PAL* در برآکی بودیوم (Phytozome). ستون اول Id مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌هایی که در این مسیر قرار دارند را نشان می‌دهد. ستون p-Value میزان احتمال اتفاقی بودن نتایج را نشان می‌دهد و ستون آخر ژن‌هایی که در این مسیر فعالیت می‌کنند را نشان می‌دهد.

Pathways Id	Pathway	No	p-Value	Genes
PWY-1121	suberin monomers biosynthesis	7	1.36993232 27624218e- 9	Bradi1g31320,Bradi3g05750,Bradi3g16530, Bradi5g15830,Bradi3g48840,Bradi3g49260, Bradi3g49270
PWY-7186	superpathway of scopolin and esculin biosynthesis	8	1.18583094 0322713e-7	Bradi3g16530, Bradi5g15830,Bradi3g48840, Bradi3g49260,Bradi3g49270
PWY1F- 467	phenylpropanoid biosynthesis, initial reactions	4	2.04218064 2696945e-7	Bradi3g48840,Bradi3g49260, Bradi3g49270,Bradi5g15830
PWY-361	phenylpropanoid biosynthesis	4	0.05211463 193247265	Bradi1g31320,Bradi3g05750,Bradi3g16530, Bradi3g36887
PWY-6673	caffeoylglucarate biosynthesis	2	0.40047498 31063676	Bradi1g31320,Bradi3g05750
ARO-PWY	chorismate biosynthesis I	1	1	Bradi1g60750
PWY-1001	cellulose biosynthesis	1	1	Bradi4g30540
PWY-2181	free phenylpropanoid acid biosynthesis	1	1	Bradi3g16530
PWY-5800	xylan biosynthesis	2	1	Bradi1g65750,Bradi2g37970
PWY-6164	3-dehydroquinate biosynthesis I	1	1	Bradi1g60750
PWY-6435	4-hydroxybenzoate biosynthesis V	2	1	Bradi1g31320,Bradi3g05750
PWY1F- FLAVSYN	flavonoid biosynthesis	2	1	Bradi1g31320,Bradi3g05750

جدول پیوست (۲۲) نتیجه‌ی آنالیز Pathway Enrichment ژن‌های هم بیان *C4H* در سویا (Phytozome). ستون اول Id مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌هایی که در این مسیر قرار دارند را نشان می‌دهد. ستون p-Value میزان احتمال اتفاقی بودن نتایج را نشان می‌دهد و ستون آخر ژن‌هایی که در این مسیر فعالیت می‌کنند را نشان می‌دهد.

Pathways Id	Pathways Name	No	p-Value	Genes
<b>PWY-6824</b>	Justicidin B biosynthesis	5	0.000022032 22069824587	Glyma.09g284400,Glyma.09g284700, Glyma.10g191700,Glyma.u040600, Glyma.20g001400
<b>PWY-5466</b>	Matairesinol biosynthesis	5	0.000119455 81966775754	Glyma.09g284400,Glyma.09g284700, Glyma.10g191700,Glyma.20g001400, Glyma.u040600
<b>PWY-7445</b>	Luteolin triglucuronide degradation	4	0.00382949 4528834609	Glyma.09g284400,Glyma.09g284700, Glyma.10g191700,Glyma.20g001400
<b>PWY-7214</b>	Baicalein degradation (hydrogen peroxide detoxification)	4	0.004664297 119487513	Glyma.09g284400,Glyma.09g284700, Glyma.10g191700,Glyma.20g001400

جدول پیوست (۲۳) نتیجه‌ی آنالیز Pathway Enrichment ژن‌های هم بیان *C4H* در براکی‌پودیوم (Phytozome). ستون اول Id مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌هایی که در این مسیر قرار دارند را نشان می‌دهد. ستون p-Value میزان احتمال اتفاقی بودن نتایج را نشان می‌دهد و ستون آخر ژن‌هایی که در این مسیر فعالیت می‌کنند را نشان می‌دهد.

Id Pathways	Pathways Name	No	p-Value	Genes
<b>PWY-5466</b>	Matairesinol biosynthesis	2	1	Bradi2g37020,Bradi4g28950
<b>PWY-7214</b>	Baicalein degradation (hydrogen peroxide detoxification)	1	1	Bradi2g37020
<b>PWY-7445</b>	Luteolin triglucuronide degradation	1	1	Bradi2g37020

جدول پیوست (۲۴) بررسی Pathway Enrichment ژن‌های هم بیان *C3H* در براکی‌پودیوم (Phytozome). ستون اول Id مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌هایی که در این مسیر قرار دارند را نشان می‌دهد. ستون p-Value میزان احتمال اتفاقی بودن نتایج را نشان می‌دهد و ستون آخر ژن‌هایی که در این مسیر فعالیت می‌کنند را نشان می‌دهد.

Pathways Id	Pathways Name	No	p-Value	Genes
<b>PWY-361</b>	Phenylpropanoid biosynthesis	6	0.0000021081 14535508586	Bradi1g31320,Bradi3g05750, Bradi3g06480,Bradi3g16530, Bradi3g36887,Bradi3g48530
<b>PWY-1001</b>	Cellulose biosynthesis	3	0.0275825879 9778422	Bradi2g49912,Bradi3g28350, Bradi4g30540
<b>PWY-1121</b>	Suberin monomers biosynthesis	3	0.1659901228 379471	Bradi1g31320,Bradi3g05750, Bradi3g16530
<b>PWY-6673</b>	Caffeoylglucarate biosynthesis	2	0.1792817839 6697678	Bradi1g31320,Bradi3g05750
<b>PWY-6435</b>	4-hydroxybenzoate biosynthesis V	2	0.6809142707 201022	Bradi1g31320,Bradi3g05750
<b>PWY-2181</b>	Free phenylpropanoid acid biosynthesis	1	1	Bradi3g16530



جدول پیوست (۲۵) بررسی Pathway Enrichment در ژن‌های هم بیان *C3H* در سویا (Phytozome). ستون اول Id مربوط به مسیر، ستون دوم نام مسیر، ستون سوم تعداد ژن‌هایی که در این مسیر قرار دارند را نشان می‌دهد. ستون p-Value میزان احتمال اتفاقی بودن نتایج را نشان می‌دهد و ستون آخر ژن‌هایی که در این مسیر فعالیت می‌کنند را نشان می‌دهد.

Pathways Id	Pathways Name	No	p-Value	Genes
PWY-1001	Cellulose biosynthesis	5	0.0000048577 5844917542	Glyma.04G063800, Glyma.04G153700, Glyma.06G225500, Glyma.09G051100, Glyma.15G157100
PWY-361	Phenylpropanoid biosynthesis	5	0.000340201 4102546824	Glyma.06G137100, Glyma.07G021600, Glyma.13G369800, Glyma.17G064600, Glyma.20G128600
PWY-1121	Suberin monomers biosynthesis	2	1	Glyma.06G137100, Glyma.17G064600
PWY-2181	Free phenylpropanoid acid biosynthesis	1	1	Glyma.06G137100
PWY-6040	Chlorogenic acid biosynthesis II	1	1	Glyma.07G021600
PWY-6435	4-hydroxybenzoate biosynthesis V	1	1	Glyma.17G064600
PWY-7186	Superpathway of scopolin and esculin biosynthesis	1	1	Glyma.06G137100
PWY1F-FLAVSYN	Flavonoid biosynthesis	1	1	Glyma.17G064600

جدول پیوست (۲۶) آنالیز عملکرد ژن‌ها در شبکه‌های هم بیانی در سویا و براکی پودیوم.

Function	Co-expression genes ( <i>Glycine max</i> )	Co-expression genes ( <i>Brachypodium distachyon</i> )
<b>PAL Co-expression Network</b>		
Protein kinase activity	Glyma.12G192500, Glyma.08G255300, Glyma.03G074300, Glyma.11G144800, Glyma.19G261700	Bradi2g47480, Bradi3g56250, Bradi1g72430, Bradi3g01137
Receptor	Glyma.03G074300, Glyma.19G261700, Glyma.08G255300, Glyma.11G144800	Bradi1g72430, Bradi3g01137, Bradi3g56250
Regulation of transcription	Glyma.04G223300, Glyma.05G037800, Glyma.06G142000, Glyma.15G129700, Glyma.09G261600	Bradi1g13910, Bradi1g63220, Bradi3g52880, Bradi5g16707
Regulation of translation	Glyma.12G002800	Bradi2g56676
Endoglucanase	Glyma.02G293900, Glyma.06G025100	Bradi1g44430, Bradi3g59810, Bradi4g01887, Bradi4g36240
Transporter	Glyma.11G028500, Glyma.05G122800	Bradi4g35477, Bradi5g24240
Phenylpropanoid biosynthesis	Glyma.10G209800, Glyma.20G180800, Glyma.06G137200, Glyma.13G369800, Glyma.13G372000	Bradi1g31320, Bradi3g05750
Uncharacterized	Glyma.19G122200, Glyma.20G142700, Glyma.04G173100	Bradi2g18640, Bradi2g48210, Bradi1g19660
<b>C4H Co-expression Network</b>		
Uncharacterized	Glyma.19G046300, Glyma.18G293600, Glyma.13G046300, Glyma.10G282300, Glyma.07G027600, Glyma.02G089500, Glyma.18G297100	Bradi1g47107, Bradi1g47730

<b>Response to stress</b>	Glyma.20G001400,Glyma.19G228700, Glyma.09G284400,Glyma.09G284700, Glyma.10G191700	Bradi2g11610,Bradi2g37020
<b>Phenylpropanoid biosynthesis</b>	Glyma.20G001400,Glyma.09G284400, Glyma.09G284700,Glyma.10G191700	Bradi2g37020
<b>Nitrate transporter</b>	Glyma.11G195200	Bradi3g01250,Bradi3g01270
<b>CASP-like protein</b>	Glyma.05G170900,Glyma.06G292900	Bradi2g31700 ,Bradi4g02050
<b>Protein detoxification</b>	Glyma.10G239000,Glyma.09G146800	Bradi3g51590
<b>Plant cysteine oxidase</b>	Glyma.19G020500,Glyma.13G064300	Bradi2g14450
<b>-Non-symbiotic hemoglobin oxygen transport</b>	Glyma.11G121800	Bradi1g69320
<b>L-ascorbate oxidase</b>	Glyma.U040600	Bradi4g28950
<b>Probable L-gulonolactone oxidase</b>	Glyma.19G259300	Bradi3g13700
<b>Lipid-transfer protein</b>	Glyma.20G146800	Bradi1g05850
<b>C3H Co-expression Network</b>		
<b>DNA-3-methyladenine glycosylase (base-excision repair)</b>	Glyma.01G082000,Glyma.02G123800, Glyma.08G263200	Bradi3g38950
<b>Cellulose synthase</b>	Glyma.04G063800,Glyma.04G153700, Glyma.06G225500,Glyma.09G051100, Glyma.15G157100	Bradi2g49912,Bradi3g28350, Bradi4g30540
<b>Phenylpropanoid biosynthesis</b>	Glyma.13G369800,Glyma.17G064600, Glyma.20G128600,Glyma.07G021600, Glyma.03G257500 Glyma.06G137100,	Bradi1g31320,Bradi3g16530,Bradi3g06480, Bradi3g05750,Bradi3g36887,Bradi3g48530, Bradi2g17067
<b>Protein walls are thin 1-like</b>	Glyma.14G216200	Bradi4g21220
<b>Chitinase activity</b>	Glyma.09G038500	Bradi4g34040
<b>Uncharacterized</b>	Glyma.20G142700,Glyma.10G251000, Glyma.03G049800	Bradi1g19660, Bradi4g44860

جدول پیوست (۲۷) TFBS های، Co-occurrence در توالی بالادست هر زیر شبکه (*PAL*) در براکی پودیوم (PlantPAN) 2.0

SUBNET WORK	TFBS ID	Family of TFBS/ motif name	Support *	SUBNET WORK	Family of TFBS/ motif name	Family of TFBS	Support
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0382	NAC; NAM	100.0	<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0508	MADS box	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0267	GATA	100.0	<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0268	GATA	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0264	GATA	100.0	<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0159	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0270	GATA	100.0	<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0156	B3	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0271	GATA	100.0	<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0445	WRKY	100.0	<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0172	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0	<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	100.0	<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0161	BHLH	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0468	WRKY	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0159	BHLH	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0224	TCR	100.0
<b>Bd-PAL3</b>	TFmatrixID_0266	GATA	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0551	Myb/SAN T	100.0
<b>Bd-PAL4</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	95.8	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0534	WRKY	100.0
<b>Bd-PAL4</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	95.8	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0382	NAC; NAM	100.0
<b>Bd-PAL5</b>	TFmatrixID_0199	bZIP	93.3	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0443	WRKY	100.0
<b>Bd-PAL5</b>	TFmatrixID_0199	bZIP	93.3	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0264	GATA	100.0

<b>Bd-PAL5</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	93.3	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0445	WRKY	100.0
<b>Bd-PAL5</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0266	GATA	100.0
<b>Bd-PAL6</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0267	GATA	100.0
<b>Bd-PAL6</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0270	GATA	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0271	GATA	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0272	GATA	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0448	WRKY	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0308	MADF	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0449	WRKY	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0319	Myb/SANT	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0458	WRKY	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0326	Myb/SANT	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0508	MADS box	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0328	Myb/SANT	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0463	WRKY	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0335	Myb/SANT	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0465	WRKY	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0336	Myb/SANT	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0361	Myb/SANT	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0421	TCP	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0374	Myb/SANT	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0177	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0382	NAC; NAM	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0444	WRKY	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0172	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0445	WRKY	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0169	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0451	WRKY	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0168	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0452	WRKY	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0161	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0454	WRKY	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0160	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0457	WRKY	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0159	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0459	WRKY	100.0	<b>Bd-PAL8</b>	TFmatrixID_0157	BHLH	100.0
<b>Bd-PAL7</b>	TFmatrixID_0460	WRKY	100.0				

\* فراوانی هر TFBS در ژن‌های هر زیر شبکه

جدول پیوست (۲۸) TFBS های، Co-occurrence در توالی بالادست هر زیر شبکه (PAL) در سویا (PlantPAN 2.0)

SUBNETW ORK	TFBS ID	Family of TFBS/ motif name	Suppo *rt	SUBNETW ORK	Family of TFBS/ motif name	Family of TFBS	Suppo rt
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0357	Myb/SANT	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0449	AUXRETG A1GMGH3	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0570	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0432	GGTCCCA TGMSAUR	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0571	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0278	SEF3MOTI FGM	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0303	CATATGG MSAUR	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0572	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0489	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0585	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0375	SEF4MOTI FGM7S	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0026	B2GMAUX 28	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0211	C2H2	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0083	D3GMAUX 28	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0213	C2H2	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0017	GMHDLG MVSPB	100.0

<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0223	TCR	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0260	OSE2ROO TNODULE	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0255	EIN3	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0336	Myb/SANT	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0419	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0334	Myb/SANT	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0287	Homeodom ain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0323	Myb/SANT	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0288	Homeodom ain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0321	Myb/SANT	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0292	Homeodom ain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0320	Myb/SANT	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0336	Myb/SANT	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0308	MADF	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0569	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0280	Homeodom ain	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0136	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0223	TCR	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0154	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0217	C2H2	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0491	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0214	C2H2	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0152	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0213	C2H2	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0211	C2H2	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0130	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0352	Myb/SANT	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0146	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0051	(Others)	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0517	Homeodom ain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0491	TBP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0142	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0497	BHLH	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0471	Homeodom ain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0518	bZIP ; Homeodom ain; HD-ZIP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0540	Homeodom ain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0419	TBP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0140	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0418	TBP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0129	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0528	AP2; B3	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0138	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0542	bZIP ; Homeodom ain; HD-ZIP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0561	AP2; B3	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	_0*TF_motif_seq 064	Dr5Gmgh3	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0569	TBP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TF_motif_seq_00 83	D3Gmaux2 8	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0570	TBP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TF_motif_seq_02 60	Ose2rootno dule	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0572	TBP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TF_motif_seq_02 78	Sef3motifG m	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0585	TBP	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TF_motif_seq_03 03	CatagtGmsa ur	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0369	Myb/SANT	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TF_motif_seq_03 15	Gt1Gmscam 4	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0364	Myb/SANT	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TF_motif_seq_03 75	Sef4motifG m7s	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0159	BHLH	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TF_motif_seq_04 50	Palindromic cboxGm	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0153	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL2</b>	TF_motif_seq_04 69	Sef1motif	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0152	AT-Hook	100.0

<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0129	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0287	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0146	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0286	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0140	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0284	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0139	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0283	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0137	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0280	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0136	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0227	TCR	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0135	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0226	TCR	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0224	TCR	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0130	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0288	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0129	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0289	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0166	BHLH	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0290	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0169	BHLH	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0471	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0194	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0476	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0489	bZIP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0192	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0491	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0190	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0517	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0188	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0540	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0184	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0569	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0182	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0570	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0181	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0571	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0177	BHLH	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0572	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0585	TBP	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TFmatrixID_0172	BHLH	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0299	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_0315	GT1GMSCAM4	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0295	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0418	TBP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0292	Homeodomain	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0223	TCR	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0223	TCR	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0569	TBP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0570	TBP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0136	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0571	TBP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0137	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0585	TBP	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0138	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0051	(Others)	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0140	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0334	Myb/SANT	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0142	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0283	Homeodomain	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0144	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0286	Homeodomain	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0146	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0129	AT-Hook	100.0

<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0152	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0152	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0154	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0130	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0159	BHLH	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0181	bZIP	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0146	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0184	bZIP	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0136	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0418	TBP	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0140	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0194	bZIP	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TFmatrixID_0137	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0192	bZIP	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0083	D3GMAUX 28	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0190	bZIP	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0450	PALINDRO MICCBOX GM	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TFmatrixID_0198	bZIP	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0449	AUXRETG A1GMGH3	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_00 83	D3GMAUX 28	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0432	GGTCCCA TGMSAUR	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_01 91	C2GMAUX 28	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0375	SEF4MOTI FGM7S	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_02 60	OSE2ROO TNODULE	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0315	GT1GMSC AM4	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_02 78	SEF3MOTI FGM	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0303	CATATGG MSAUR	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_03 03	CATATGG MSAUR	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0260	OSE2ROO TNODULE	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_03 15	GT1GMSC AM4	100.0	<b>Gm-PAL7</b>	TF_motif_seq_0191	C2GMAUX 28	100.0
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_03 46	RBCSCON SENSUS	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0570	TBP	90.9
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_00 64	DR5GMGH 3	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0146	AT-Hook	90.9
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_03 75	SEF4MOTI FGM7S	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0571	TBP	90.9
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_04 49	AUXRETG A1GMGH3	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0288	Homeodom ain	90.9
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_04 50	PALINDRO MICCBOX GM	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0138	AT-Hook	90.9
<b>Gm-PAL3</b>	TF_motif_seq_04 69	SEF1MOTI F	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0280	Homeodom ain	90.9
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0144	AT-Hook	90.9	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0211	C2H2	90.9
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0334	Myb/SANT	90.9	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0213	C2H2	90.9
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0419	TBP	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0146	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0129	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0569	TBP	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0140	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0211	C2H2	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0571	TBP	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0136	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0213	C2H2	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0152	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0585	TBP	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0130	AT-Hook	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	100.0

<b>Gm-PAL4</b>	TF_motif_seq_01 91	C2GMAUX 28	90.9	<b>Gm-PAL8</b>	TF_motif_seq_0191	C2GMAUX 28	90.9
<b>Gm-PAL4</b>	TF_motif_seq_03 15	GT1GMSC AM4	90.9	<b>Gm-PAL8</b>	TF_motif_seq_0276	OSE1ROO TNODULE	90.9
<b>Gm-PAL4</b>	TF_motif_seq_04 50	PALINDRO MICCBOX GM	90.9	<b>Gm-PAL8</b>	TF_motif_seq_0303	CATATGG MSAUR	90.9
<b>Gm-PAL4</b>	TF_motif_seq_02 60	OSE2ROO TNODULE	90.9	<b>Gm-PAL8</b>	TF_motif_seq_0017	GMHDLG MVSPB	90.9
<b>Gm-PAL4</b>	TF_motif_seq_04 32	GGTCCCA TGMSAUR	90.9	<b>Gm-PAL8</b>	TF_motif_seq_0449	AUXRETG A1GMGH3	90.9
<b>Gm-PAL4</b>	TF_motif_seq_04 49	AUXRETG A1GMGH3	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TF_motif_seq_0432	GGTCCCA TGMSAUR	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TF_motif_seq_00 83	D3GMAUX 28	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TF_motif_seq_0375	SEF4MOTI FGM7S	100.0
<b>Gm-PAL4</b>	TF_motif_seq_03 03	CATATGG MSAUR	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TF_motif_seq_0315	GT1GMSC AM4	100.0
<b>Gm-PAL5</b>	TF_motif_seq_04 50	PALINDRO MICCBOX GM	100.0	<b>Gm-PAL8</b>	TF_motif_seq_0083	D3GMAUX 28	100.0

<sup>۱</sup> فراوانی هر TFBS در توالی بالادست ژن‌های هر زیر شبکه  
<sup>۲</sup> فاکتور نسخه برداری برای موتیف شناسایی نشده است.

جدول پیوست (۲۹) TFBS های، Co-occurrence در توالی بالادست هر زیر شبکه *C4H* در سویا و براکی‌پدیوم  
(PlantPAN 2.0)

SUB NETWORK	TFBS ID	Family of TFBS	Support <sup>1</sup>	SUB NETWORK	TFBS ID	Family of TFBS	Support
<b>Bd-C4H1</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0444	WRKY	100.0
<b>Bd-C4H1</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0287	Homeodomain	100.0
<b>Bd-C4H3</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0284	Homeodomain	100.0
<b>Bd-C4H3</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0154	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0571	TBP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0153	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0369	Myb/SANT	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0152	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0364	Myb/SANT	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0357	Myb/SANT	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0146	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0334	Myb/SANT	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0144	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0323	Myb/SANT	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0199	bZIP	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0320	Myb/SANT	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0211	C2H2	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0317	MADF	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0213	C2H2	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0305	MADF	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0138	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0292	Homeodomain	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0137	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0289	Homeodomain	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0136	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0288	Homeodomain	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0135	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0382	NAC; NAM	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0223	TCR	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0418	TBP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0224	TCR	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0419	TBP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0132	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0570	TBP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0569	TBP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0255	EIN3	100.0

<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0572	TBP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0262	GATA	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0540	Homeodomain	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0130	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0585	TBP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0129	AT-Hook	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0517	Homeodomain	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0279	Homeodomain	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0491	TBP	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0281	Homeodomain	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0476	AT-Hook	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0283	Homeodomain	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0471	Homeodomain	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TF_motif_seq_0026	B2GMAUX28	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0460	WRKY	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TF_motif_seq_0083	D3GMAUX28	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0459	WRKY	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TF_motif_seq_0260	OSE2ROOTNODULE	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0454	WRKY	100.0	<b>Gm-C4H1</b>	TF_motif_seq_0303	CATATGGMMSAUR	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0452	WRKY	100.0	<b>Gm-C4H2</b>	TF_motif_seq_0449	AUXRETGA1GMGH3	96.2
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0451	WRKY	100.0	<b>Gm-C4H2</b>	TF_motif_seq_0260	OSE2ROOTNODULE	96.2
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0446	WRKY	100.0	<b>Gm-C4H2</b>	TF_motif_seq_0375	SEF4MOTIFGM7S	96.2
<b>Gm-C4H1</b>	TFmatrixID_0445	WRKY	100.0	<b>Gm-C4H2</b>	TF_motif_seq_0315	GT1GMSCAM4	96.2
<b>Gm-C4H1</b>	TF_motif_seq_0375	SEF4MOTIFGM7S	100.0	<b>Gm-C4H2</b>	TF_motif_seq_0303	CATATGGMMSAUR	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TF_motif_seq_0191	C2GMAUX28	100.0	<b>Gm-C4H2</b>	TF_motif_seq_0083	D3GMAUX28	100.0
<b>Gm-C4H1</b>	TF_motif_seq_0315	GT1GMSCAM4	100.0	<b>Gm-C4H2</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	96.2
<b>Gm-C4H1</b>	TF_motif_seq_0450	PALINDROMICCCBOGM	100.0	<b>Gm-C4H2</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	96.2

<sup>۱</sup> فراوانی هر TFBS در توالی بالادست ژن‌های هر زیر شبکه

جدول پیوست (۳۰) TFBS‌های، Co-occurrence در توالی بالادست هر زیر شبکه *C3H* در سویا و برای پیوست (PlantPAN 2.0).

Subnetwork	TFBS ID	Family of TFBS	Support <sup>1</sup>	Subnetwork	TFBS ID	Family of TFBS	Support
<b>Bd-C3H</b>	TFmatrixID_0211	C2H2	93.8	<b>Gm-C3H</b>	TFmatrixID_0131	AT-Hook	94.7
<b>Bd-C3H</b>	TFmatrixID_0213	C2H2	93.8	<b>Gm-C3H</b>	TFmatrixID_0146	AT-Hook	100.0
<b>Bd-C3H</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	93.8	<b>Gm-C3H</b>	TFmatrixID_0193	bZIP	100.0
<b>Bd-C3H</b>	TFmatrixID_0174	BHLH	100.0	<b>Gm-C3H</b>	TF_motif_seq_0303	CATATGGMMSAUR	94.7
<b>Gm-C3H</b>	TFmatrixID_0213	C2H2	94.7	<b>Gm-C3H</b>	TF_motif_seq_0449	AUXRETGA1GMGH3	94.7
<b>Gm-C3H</b>	TFmatrixID_0211	C2H2	94.7	<b>Gm-C3H</b>	TF_motif_seq_0375	SEF4MTIFGM7S	94.7
<b>Gm-C3H</b>	TFmatrixID_0144	AT-Hook	94.7	<b>Gm-C3H</b>	TF_motif_seq_0315	GT1GMSCAM4	100.0
<b>Gm-C3H</b>	TFmatrixID_0148	AT-Hook	94.7				

<sup>۱</sup> فراوانی هر TFBS در توالی بالادست ژن‌های هر زیر شبکه



جدول پیوست (۳۱) TFBS های، Co-occurrence در توالی بالادست بین زیر شبکه‌های PAL در سویا و براکی‌پودیوم. در ستون اول و دوم به ترتیب Id و نام مربوط TF یا موتیف آورده شده است. ستون آخر حاوی نام زیرشبکه‌هایی که توسط TF یا موتیف مورد نظر تنظیم می‌شود، ذکر شده است.

TFBS Id	Family of TFBS/ motif name	Subnetwork
Tfmatrixid_0193	bZIP	Bd-pal3,Bd-pal4,Bd-pal5,Bd-pal6,Bd-pal7,Bd-pal8,Gm-pal2,Gm-pal4,Gm-pal5,Gm-pal8
Tfmatrixid_0174	BHLH	Bd-pal3,Bd-pal4,Bd-pal5,Bd-pal6,Bd-pal7,Bd-pal8,Gm-pal2,Gm-pal5
Tfmatrixid_0131	AT-Hook	Bd-pal7,Gm-pal2,Gm-pal3,Gm-pal4,Gm-pal5,Gm-pal7,Gm-pal8
Tfmatrixid_0148	AT-Hook	Bd-pal7,Gm-pal2,Gm-pal3,Gm-pal4,Gm-pal5,Gm-pal7,Gm-pal8
Tfmatrixid_0159	BHLH	Bd-pal3,Bd-pal7,Bd-pal8,Gm-pal3,Gm-pal5
Tfmatrixid_0382	NAC;NAM	Bd-pal3,Bd-pal7,Bd-pal8
Tfmatrixid_0336	Myb/SANT	Bd-pal7,Gm-pal2,Gm-pal5

جدول پیوست (۳۲) عملکرد فاکتورهای نسخه برداری. در جدول زیر ستون اول و سوم حاوی نام TF یا Id و نام موتیف‌ها می‌باشد. ستون دوم و چهارم حاوی عملکرد مربوط به آنها است (uniprot and PlantPAN 2.0).

Family of TFBS	Function	Motif Name (Motif Id)	Function
WRKY	defense response signaling pathway response to biotic and abiotic stress response to hormone regulation of lignin biosynthetic process cell differentiation	GMHDLGMVSPB (TF_motif_seq_0017)	Binding site of the soybean homeodomain leucine zipper proteins
GATA	cell differentiation signaling pathway cell differentiation regulation of nitrogen metabolism response to light stimulus response to biotic and abiotic stress cell wall organization	OSE2ROOTNODULE (TF_motif_seq_0260)	MADS box
NAC; NAM	regulation of cellulose and hemicellulose biosynthetic genes regulation of lignin polymerization genes involved in xylan and lignin synthesis response to biotic and abiotic stress response to hormone xylem development regulation of programmed cell death cell wall organization	PalindromiccboxGm (TF_motif_seq_0450)	Palindromic C-box in soybean bZIP factors, STGA1 and STFs (STF1 and STF2)
TCP	cell differentiation regulation of secondary cell wall biogenesis response to hormone long-day photoperiodism, flowering response to abiotic stress	(Others) (TF_motif_seq_0051)	bZIP proteins SGBF-1 and SGBF-2 binding site in soybean
AT-Hook	Plant hormone biosynthesis response to red or far red light chromatin organization flower development	GT1GMSCAM4 (TF_motif_seq_0315)	Plays a role in pathogen- and salt-induced SCaM-4 gene expression
TBP	response to light stimulus signaling pathway found in the promoter of rice PAL RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly	D3GMAUX28 (TF_motif_seq_0083)	DNase I protected sequence found in the soybean auxin responsive genes promoter

<b>Myb/SANT</b>	Common sequence found in the 5'-non-coding regions of eukaryotic genes; "CCAAT box" found in the promoter of heat shock protein genes regulation of transcription by RNA polymerase II	C2GMAUX28 (TF_motif_seq_0191)	DNase I protected sequence found in the soybean auxin responsive genes promoter
<b>bZIP; Homeodomain; HD-ZIP</b>	xylem development	B2GMAUX28 (TF_motif_seq_0026)	DNase I protected sequence found in the soybean auxin responsive genes promoter
<b>BHLH</b>	response to light signaling pathway regulation of growth regulation of reactive oxygen species metabolic process response to abiotic stress Plant hormone biosynthesis response to hormone regulation of cell differentiation positive regulation of flavonoid biosynthetic process	AUXRETGA1GMGH3 (TF_motif_seq_0449)	putative auxin-responsive element
<b>C2H2</b>	Plant hormone biosynthesis response to hormone response to biotic and abiotic stress	GGTCCCATGMSAUR (TF_motif_seq_0432)	putative auxin-responsive element
<b>TCR</b>	cellular response to DNA damage stimulus	CATATGGMSAUR (TF_motif_seq_0303)	Involved in auxin responsiveness
<b>AP2; B3</b>	signaling pathway response to hormone callose deposition in cell wall response to abiotic stress binds to the GCC-box pathogenesis-related promoter element	DR5GMGH3 (TF_motif_seq_0064)	A highly active synthetic auxin response element
<b>EIN3</b>	signaling pathway response to hormone response to biotic and abiotic stress defense response by callose deposition in cell wall	SEF1MOTIF (TF_motif_seq_0469)	SEF1 (soybean embryo factor 1) binding motif
<b>MADF</b>	signaling pathway	Sef3motifGm (TF_motif_seq_0278)	SEF3 binding site
<b>bZIP</b>	response to sucrose response to biotic and abiotic stress Plant hormone biosynthesis directly affects transcription of light-induced genes Abscisic acid responsive elements-binding factor involved in the regulation of vascular development Prevents cell differentiation and shoot formation Transcription factor which may be involved in developmental processes	SEF4MOTIFGM7S (TF_motif_seq_0375)	SEF4 (soybean embryo factor 4) binding site
<b>MADS box</b>	regulation of cell wall organization or biogenesis cellular response to nitrate response to abiotic stress response to hormone cell differentiation regulation of photoperiodism signaling pathway	RBCS CONSENSUS (TF_motif_seq_0346)	rbcS general consensus sequence; AATCCAA or AATCCAAC.

<b>Homeodomain</b>	gene silencing by RNA signaling pathway response to abiotic stress cell differentiation xylem development found in the promoter of heat shock protein genes act in the sucrose-signaling pathway	OSE1ROOTNODULE (TF_motif_seq_0276)	One of the consensus sequence motifs of organ-specific elements(OSE) characteristic of the promoters activated in infected cells of root nodules.
--------------------	---	---------------------------------------	---

جدول پیوست (۳۵) ژن‌های جدید با پتانسیل شرکت در مسیر بیوسنتز لیگنین

شناسه ژن‌ها		عملکرد	
Glyma.02G208400	Bradi1g60750	ژن‌های دخیل در بیوسنتز فنیل آلانین و تیروزین	تنظیم مسیر فنیل پروپانویید و بیوسنتز لیگنین
Glyma.11G195200	Bradi3g01250, Bradi3g0127	پروتئین‌های غشایی دخیل در انتقال نیترات	
Glyma.06G142000, Glyma.15G129700 Glyma.05G037800, Glyma.04G223300 Glyma.09G261600	Bradi1g63220, Bradi5g16707 Bradi3g52880, Bradi1g1391	فاکتورهای نسخه برداری leucine zipper protein (WRKY70) Homeobox-Dof و zinc finger protein (Myb)	
Glyma.19G228700	Bradi2g11610	Universal Stress Protein A	پاسخ به تنش (نور، زخم، سرما، خشکی، شوری و آلودگی قارچی)
Glyma.04G063800, Glyma.04G153700 Glyma.09G051100, Glyma.15G157100 Glyma.06G225500	-	سلولز سنتاز	سنتز پلی ساکاریدهای دیواره‌ی ثانویه
Glyma.03G178300	Bradi1g65750, Bradi2g37970	ژن‌های-UDP گلیکوزیل ترنسفرازهای دخیل در سنتز همی سلولز زایلان	
Glyma.12G192500, Glyma.19G261700 Glyma.03G074300	Bradi1g72430, Bradi3g01137 Bradi2g47480	ژن‌های پروتئین کینازهای	انتقال سیگنال
Glyma.02G293900, Glyma.06G025100	Bradi1g44430, Bradi3g59810 Bradi4g01887, Bradi4g36240	اندوگلوکانازها	پلیمریزاسیون لیگنین

## Abstract

Lignin, a phenolic polymer in the secondary plant cell wall, cross-links with other matrix polysaccharides and cellulose microfibrils. It appears as a nuisance in wall-related industries such as pulp and paper and biofuel. Accordingly, many attempts made towards lignin reduction or improvement of its enzymatic hydrolysis. However, any tampering with lignin biosynthetic genes within the pathway had detrimental effects on plant growth and development, or on plant's resilience before environmental stresses. Therefore, finding other co-expressed genes within the neighboring pathways would be a valuable task for engineering purposes towards subtle reduction of lignin content, with no major effect on plant stature and stress-tolerance level. In this study, a bioinformatic approach was taken into consideration to identify such genes through analysis of co-expressed genes with pivotal lignin biosynthetic genes: *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)*, *cinnamate 4-hydroxylase* or *NADPH ;cytochrome p450 oxidoreductase (C4H)* and *P-coumarate 3-hydroxylase (C3H)*. The study was carried out in two model plants representative of grass family, *Brachypodium distachyon*, with minor lignin content and *Glycine max* as an oilseed dicot plant with greater amounts of lignin. PlaNet and Phytozome for *B. distachyon* and Phytozome for *G. max* were used to predict the co-expressed networks. Pathway Enrichment was carried out in phytozome, functions were assigned in Uniprot and KEGG and co-regulation analysis was performed in PlantPAN 2.0. The genes were classified into groups including but not limited to uncharacterized, response to stress genes, secondary wall biosynthetic genes, other genes involved in lignin biosynthesis and phenylpropanoid pathways, transcription factors, RNA binding proteins, amino acid biosynthetic genes, nitrate transporter proteins, Endoglucanases, and L-ascorbate oxidase. The co-expressed gene networks were confirmed via promoter analysis and further regulatory networks were established through the identification of corresponding transcription factors.

**Key word:** *Phenylalanine ammonia lyase (PAL)*, *cinnamate 4-hydroxylase / NADPH ;cytochrome p450 oxidoreductase (C4H)*, *P-coumarate 3-hydroxylase (C3H)*, lignin biosynthesis, co-expression genes, co-regulation genes



**Shahrood University of Technology**

**Faculty of Agriculture**

**MSc Thesis in Agricultural Biotechnology**

**Comparative Bioinformatic of Lignin Biosynthesis pathway in  
soybean vs. Brachypodium**

**By: Samira Sadat Mousavi Fard**

**Supervisor(s):**

**Dr Naser Farrokhi**

**Dr Shahrokh Gharanjik**

**Advisor:**

**Dr Mahdieh Parsaeian**

**August,2018**