



دانشگاه صنعتی شاهرود
دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

آنالیز بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در واکنش

به تنش شوری در گیاه سویا (*Glycine max*)

نگارنده:

سمیرا محمدی مطلق حسنکلو

استاد راهنما:

دکتر شاهرخ قرنجیک

دی ۱۳۹۸

تقدیم اثر

تقدیم به پدر و مادرم

که از نگاهشان صلابت

از رفتارشان محبت

و از صبرشان ایستادگی را آموختم.

سپاس و قدردانی

سپاس و ستایش مخصوص خداوندی است که نعمت بزرگ تعقل و انسانیت را به آدمی ارزانی داشت و همواره

انسان را از خوان نعمت‌های بی‌دینش بهره‌مند ساخت. ایجاب در طول تحصیل از رهنمودهای ارزنده و بی‌دریغ

افراد بزرگوار می‌برخوردار بودم که بر خود می‌دانم از زحمات بی‌شائبه ایشان بازمانی قاصر قدردانی نمایم.

از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر شاهرخ قریحک تشکر و قدردانی می‌نمایم. همچنین، از مهربان‌ترین

دوستانم سپاسگزاری نموده و از خداوند متعال برای این بزرگواران، توفیق عمری با عزت و سربلندی را مسألت

می‌نمایم.

سعید احمدی مطلق حنکو

دی ۹۸

تعمدنامه

اینجانب سمیرا محمدی مطلق حسنکلو دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، نویسنده پایان نامه آنالیز بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در واکنش به تنش شوری در گیاه سویا (*Glycine max*) تحت راهنمایی آقای دکتر شاهرخ قرنجیک متعهد می‌شوم:

- تحقیقات این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه صنعتی شاهرود» و یا «Shahrood University of Technology» به چاپ خواهند رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده‌اند، در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه‌ی مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه‌ی 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، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.

استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

شناسایی ژن‌های هم بیان و مؤثر در تحمل به شوری در گیاهان و بررسی میزان بیان آن‌ها در مسیرهای بیوشیمیایی در افزایش بهره‌وری و توسعه‌ی سطح زیر کشت گیاهان مؤثر است. به منظور بررسی تأثیر تیمار شوری (۲۰۰ میلی مولار) بر میزان بیان برخی از ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز لیگنین (*CCR* و *COMT*)، ژن‌های هم بیان آن‌ها (*CECCR* و *CECOMT*) و ژن مرتبط با تحمل به شوری در سویا (*GmSALT3*)، در دو بازه‌ی زمانی سه و هفت روز پس از اعمال تیمار در دو رقم مقاوم و حساس به شوری از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز زمان واقعی استفاده شد. نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که موتیف‌های مختلف، از جمله *GATA-motif*، *G-Box* و *TC-rich repeats* نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های مختلف ایفا می‌کنند. بر اساس نتایج آزمایشگاهی، در رقم مقاوم، بیان ژن *COMT* در هر دو بازه‌ی زمانی در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در رقم حساس، سطوح رونوشت این ژن در هر دو بازه‌ی زمانی پس از اعمال تیمار کاهش یافت که این اختلاف معنی‌داری بود. در هر دو رقم، بیان ژن *CECOMT* در هر دو بازه‌ی زمانی کاهش یافت که این اختلاف معنی‌داری بود. در رقم مقاوم، کاهش بیان ژن *CCR* پس از سه روز، اختلاف معنی‌داری داشت، ولی افزایش بیان این ژن پس از هفت روز معنی‌دار نبود. همچنین در رقم حساس، افزایش بیان این ژن در هر دو بازه‌ی زمانی معنی‌دار نبود. در هر دو رقم، بیان ژن *CECCR* در هر دو بازه‌ی زمانی کاهش یافت و این اختلاف معنی‌دار بود. افزایش بیان ژن *GmSALT3* پس از سه روز اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، در حالی که کاهش بیان این ژن پس از هفت روز اختلاف معنی‌داری را نشان داد. همچنین افزایش بیان این ژن در هر دو بازه‌ی زمانی در رقم حساس معنی‌دار نبود. بر اساس نتایج این پژوهش، تیمار شوری تأثیر قابل توجهی بر میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین، ژن‌های هم بیان آن‌ها و ژن متحمل به شوری در سویا در هر دو بازه‌ی زمانی داشت.

کلمات کلیدی: سویا، شوری، لیگنین، ژن‌های هم بیان، آنالیز پروموتور

لیست مقالات مخرج از پایان نامه

۱. شناسایی عناصر تنظیمی القا شونده در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در ناحیه

پروموتری ژن سینامویل کوآنزیم آ- ردوکتاز (*CCR*) در سویا و برنج. سومین همایش

بین‌المللی و یازدهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. سمیرا محمدی مطلق

حسنکلو، شاهرخ قرنجیک. ۱۰ تا ۱۲ شهریور ماه ۱۳۹۸. مرکز همایش‌های بین‌المللی رازی

۲. شناسایی شبکه هم بیان با ژن کافئیک اسید ۳-O- متیل ترانسفراز (*COMT*) در

مسیر بیوسنتز لیگنین در سویا و برنج. سومین همایش بین‌المللی و یازدهمین همایش

ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. سمیرا محمدی مطلق حسنکلو، شاهرخ قرنجیک.

۱۰ تا ۱۲ شهریور ماه ۱۳۹۸. مرکز همایش‌های بین‌المللی رازی

۳. آنالیز بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین در واکنش به تنش شوری

در گیاه سویا (*Glycine max*). چهارمین کنگره بین‌المللی و شانزدهمین کنگره ملی ژنتیک.

سمیرا محمدی مطلق حسنکلو، شاهرخ قرنجیک. ۲۷ تا ۲۹ فروردین ماه ۱۳۹۹. سالن اجلاس

سران

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل ۱: مقدمه و کلیات.....
۲	۱-۱- مقدمه.....
۷	فصل ۲: مروری بر منابع.....
۸	۱-۲- اهمیت و موارد مصرف سویا.....
۹	۲-۲- منشاء و گیاه‌شناسی سویا.....
۱۰	۳-۲- تأثیر تنش شوری بر رشد سویا.....
۱۳	۴-۲- اهمیت لیگنین و مسیر بیوسنتز آن.....
۱۷	۵-۲- آنزیم سینامویل کوآنزیم آ ردوکتاز (CCR).....
۱۸	۶-۲- آنزیم کافئیک اسید O- متیل ترانسفراز (COMT).....
۱۹	۷-۲- ژن تحمل به شوری در سویا (<i>GmSALT3</i>).....
۱۹	۷-۲- ضرورت مطالعه‌ی شبکه‌های هم بیانی ژن.....
۲۱	۹-۲- ضرورت آنالیز پروموتور و مطالعات بیوانفورماتیکی.....
۲۱	۱۰-۲- بیان ژن، کاربرد و روش‌های اندازه‌گیری آن.....
۲۲	۱۱-۲- ژن مرجع در بررسی بیان ژن.....
۲۵	فصل ۳: مواد و روش‌ها.....
۲۶	۱-۳- بخش اول: مطالعات بیوانفورماتیکی.....

۲۶	۱-۱-۳ شناسایی ژن‌های هم بیان.....
۲۹	۲-۱-۳ آنالیز نواحی پرموتری.....
۲۹	۲-۲-۳ بخش دوم: مطالعات آزمایشگاهی.....
۲۹	۱-۲-۳ زمان و محل اجرای آزمایش.....
۲۹	۲-۲-۳ کشت بذرهای سویا.....
۳۰	۳-۲-۳ اعمال تیمارشوری.....
۳۱	۴-۲-۳ استخراج RNA.....
۳۱	۵-۲-۳ سنتز cDNA.....
۳۲	۶-۲-۳ واکنش PCR.....
۳۲	۷-۲-۳ الکتروفورز محصولات PCR.....
۳۳	۸-۲-۳ واکنش Real-Time PCR.....
۳۴	۹-۲-۳ تجزیه و تحلیل داده‌ها.....
۳۵	فصل ۴: نتایج و بحث.....
۳۶	۱-۱-۴ بخش اول: مطالعات بیوانفورماتیکی.....
۳۶	۱-۱-۴ شناسایی ژن‌های هم بیان با ژن <i>COMT</i> در سویا.....
۳۷	۲-۱-۴ شناسایی ژن‌های هم بیان با ژن <i>CCR</i> در سویا.....
۳۸	۳-۱-۴ شناسایی ژن‌های هم بیان با ژن <i>COMT</i> در برنج.....
۴۴	۲-۲-۴ آنالیز پرموتر.....
۵۰	۳-۳-۴ بخش دوم: نتایج آزمایشگاهی.....

۵۱	۴-۳-۱ استخراج RNA کل.....
۵۲	۴-۳-۲ واکنش نسخه برداری معکوس از RNA و ساخت cDNA.....
۵۲	۴-۳-۳ واکنش زنجیره ای پلیمراز.....
۵۴	۴-۳-۴ بررسی منحنی های ذوب محصولات qRT-PCR.....
۵۶	۴-۴ بررسی داده های حاصل از Real Time PCR در سویا رقم مقاوم و حساس به شوری.....
۵۷	۴-۴-۱ الگوی بیان ژن <i>COMT</i> در سویا رقم های مقاوم و حساس به شوری.....
۵۸	۴-۴-۲ الگوی بیان ژن <i>CECOMT</i> در سویا رقم های مقاوم و حساس به شوری.....
۵۹	۴-۴-۳ الگوی بیان ژن <i>CCR</i> در سویا رقم های مقاوم و حساس به شوری.....
۶۰	۴-۴-۴ الگوی بیان ژن <i>CECCR</i> در سویا رقم های مقاوم و حساس به شوری.....
۶۰	۴-۴-۵ الگوی بیان ژن <i>GmSALT3</i> در سویا رقم های مقاوم و حساس به شوری.....
۶۶	نتیجه گیری کلی.....
۶۶	پیشنهادات.....
۶۷	پیوست ها.....
۷۸	منابع.....

فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۱۵.....	شکل ۱-۲- مسیر بیوسنتز لیگنین.....
۳۰.....	شکل ۱-۳- رشد گیاهان سویا در اتاقک کشت در محیط آزمایشگاه.....
۳۱.....	شکل ۲-۳- طرح کلی آزمایش برای یکی از رقم‌ها و شرایط نمونه‌برداری.....
۴۰.....	شکل ۱-۴- شبکه‌ی هم بیانی ژن <i>Os02g0823400</i> در برنج با استفاده از پایگاه ATTED-II.....
۴۱.....	شکل ۲-۴- شبکه‌ی هم بیانی ژن <i>Os08g0157500 /LOC4344702</i> در برنج.....
۴۹.....	شکل ۳-۴- توزیع موتیف‌های شناسایی شده از plantCARE.....
۵۲.....	شکل ۴-۴- استخراج RNA از برگ‌های سویا.....
۵۳.....	شکل ۵-۴- الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز.....
۵۳.....	شکل ۶-۴- الکتروفورز محصولات واکنش RT-PCR بر روی ژل آگارز.....
۵۴.....	شکل ۷-۴- نمودارهای منحنی ذوب ژن‌های <i>COMT</i> ، <i>F-BOX</i> و <i>CECOMT</i>
۵۵.....	شکل ۸-۴- نمودارهای منحنی ذوب ژن‌های <i>CCR</i> ، <i>CECCR</i> و <i>GmSALT3</i>
۵۵.....	شکل ۹-۴- منحنی‌های تکثیر ژن‌ها.....
۵۶.....	شکل ۱۰-۴- منحنی‌های تکثیر ژن‌ها.....
۵۷.....	شکل ۱۱-۴- میزان بیان نسبی ژن <i>COMT</i> تحت تنش شوری.....
۵۸.....	شکل ۱۲-۴- میزان بیان نسبی ژن <i>CECOMT</i> تحت تنش شوری.....
۵۹.....	شکل ۱۳-۴- میزان بیان نسبی ژن <i>CCR</i> تحت تنش شوری.....
۶۰.....	شکل ۱۴-۴- میزان بیان نسبی ژن <i>CECCR</i> تحت تنش شوری.....

شکل ۴-۱۵- میزان بیان نسبی ژن *GmSALT3* تحت تنش شوری ۶۱

شکل پیوست ۴-۱- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *LOC100803633* در سویا ۷۶

شکل پیوست ۴-۲- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *LOC100789621* در سویا ۷۶

شکل پیوست ۴-۳- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *LOC100803241* در سویا ۷۷

شکل پیوست ۴-۴- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *LOC100805558* در سویا ۷۷

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۳- مشخصات آغازگرها.....	۲۸
جدول ۲-۳- ترکیبات سنتز cDNA.....	۳۲
جدول ۳-۳- ترکیبات و چرخه‌های دمایی واکنش PCR.....	۳۳
جدول ۴-۳- پروتکل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز زمان واقعی.....	۳۴
جدول ۱-۴- ژن‌های رمز کننده‌ی آنزیم کافئیک اسید ۳-O- متیل ترانسفراز در سویا.....	۳۶
جدول ۲-۴- ژن‌های رمز کننده‌ی آنزیم سینامویل کو آنزیم آ- ردوکتاز در سویا.....	۳۷
جدول ۳-۴- ژن‌های رمز کننده‌ی آنزیم کافئیک اسید ۳-O- متیل ترانسفراز در برنج.....	۳۹
جدول ۴-۴- عملکرد مهم‌ترین موتیف‌ها در ناحیه‌ی پروموتری ژن <i>LOC4341560</i> در برنج.....	۴۶
جدول ۵-۴- عملکرد مهم‌ترین موتیف‌ها در ناحیه‌ی پروموتری ژن <i>LOC100803241</i> در سویا.....	۴۸
جدول پیوست ۱-۳- عناصر تشکیل دهنده‌ی محلول هوگلدند.....	۷۱
جدول پیوست ۱-۴- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن <i>LOC100803633</i> در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه در سویا.....	۷۲
جدول پیوست ۲-۴- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن <i>LOC100789621</i> در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه در سویا.....	۷۲
جدول پیوست ۳-۴- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن <i>LOC100803241</i> در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه در سویا.....	۷۲

- جدول پیوست ۴-۴- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن *LOC100805558* در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه و توالی‌یابی RNA در گیاه سویا.....۷۳
- جدول پیوست ۴-۵- عملکرد و جایگاه ژن‌های *LOC4331197* و *LOC4344702*.....۷۳
- جدول پیوست ۴-۶- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با *Os02g0823400/LOC4331197* در شبکه-ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه و توالی‌یابی RNA در گیاه برنج.....۷۳
- جدول پیوست ۴-۷- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با *LOC4344702/Os08g0157500* در شبکه-ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه در گیاه برنج.....۷۴
- جدول پیوست ۴-۸- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن‌های *LOC4344702/Os08g0157500* در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی RNA در گیاه برنج.....۷۴
- جدول پیوست ۴-۹- توالی مهم‌ترین موتیف‌ها در ناحیه‌ی پروموتری ژن *LOC4341560* در برنج.....۷۵
- جدول پیوست ۴-۱۰- توالی مهم‌ترین موتیف‌ها در ناحیه‌ی پروموتری ژن *LOC100803241* در سویا.....۷۵

فصل ۱

مقدمه و کلیات

شناسایی ژن‌های هم بیان و مؤثر در تحمل تنش‌های زیستی و غیر زیستی، از جمله تنش شوری در گیاهان و بررسی تغییرات بیان این ژن‌ها در مواجهه با شرایط نامساعد می‌تواند باعث افزایش بهره‌وری محصولات گیاهی شود. به طوری که، این امر می‌تواند موجب توسعه‌ی سطح زیر کشت گیاهان زراعی در جهت بهبود کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی شود. سویا با نام علمی *Glycine max* یکی از محصولات دانه روغنی مهم و خوراکی مناسب برای تغذیه‌ی دام و آبزیان محسوب می‌گردد. این گیاه، منبع مناسبی جهت تأمین سوخت زیستی و پروتئین برای رژیم غذایی انسان است (Sharifi *et al.*, 2007). قرارگیری سویا در معرض تنش‌های غیر زیستی عملکرد آن را کاهش می‌دهد (Sharifi *et al.*, 2007). تنش‌های ناشی از شوری، از جمله کمبود آب و عدم تعادل یون‌ها به گیاهان آسیب می‌رسانند (Munns *et al.*, 2006). در نتیجه، جهت سازگاری با تنش شوری باید تغییراتی در پروفایل بیان ژن و پروتئین گیاه حاصل شود (Ashraf *et al.*, 2007; Parker *et al.*, 2006). به منظور تحمل شوری، گیاهان از تغییرات مختلف بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استفاده می‌کنند و سازگار می‌شوند. بسیاری از ژن‌ها در سطح رونویسی به تنش‌های خشکی، شوری و سرما پاسخ می‌دهند، محصولات این ژن‌ها نیز در پاسخ و تحمل تنش فعالیت می‌کنند (Bray., 2000; Shinozaki and Kazuko., 2000; Thomashow., 1999).

لیگنین‌ها پلیمرهای مهمی جهت حفاظت مکانیکی، دفاع و حمل و نقل آب در گیاهان آوندی محسوب می‌شوند (Freudenberg., 1959; Sarkanen and Charles., 1971). در واقع لیگنین‌ها پلی-فنول‌های گیاهی بهبود دهنده‌ی سلامتی هستند. دیواره‌های سلولی گیاهان، متحمل تغییرات زیادی در مقدار و ساختار لیگنین می‌شوند. (Boerjan *et al.*, 2003). آنزیم‌های متیلاسیون نیز نقش حیاتی در بیوسنتز لیگنین و ایجاد تغییرات ژنتیکی جهت مهندسی لیگنین ایفا می‌کنند (Vanholme *et al.*, 2008; Boerjan *et al.*, 2003). آنزیم سینامویل کوآنزیم آ- ردوکتاز (CCR) تبدیل هیدروکسی

سینامویل - کوآنزیم آ تیو استرها^۱ به سینامالدهیدها^۲ را کاتالیز می کند. این مرحله، اولین گام مهم برای بیوسنتز مونولیگنول است. بنابراین، این آنزیم یک نقطه‌ی کنترلی در تنظیم تغییرات کربن نسبت به بیوسنتز مونولیگنول است (Baucher *et al.*, 1998). آنزیم کافئیک اسید ۳-O- متیل ترانسفراز (COMT) متیلاسیون گروه ۳- هیدروکسیل از کافئیک اسید را برای تولید فرولیک اسید و S- آدنوزیل- L- هوموسیستئین کاتالیز می کند (Vanholme *et al.*, 2012). آنزیم GmSALT3 (مرتبط با تحمل به شوری در سویا) نیز واسطه‌ی تنظیم تجمع یون سدیم و کلر در سویا است. این آنزیم موجب بهبود عملکرد سویا از طریق حفظ وزن دانه تحت تنش شوری می شود (Liu *et al.*, 2016).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز زمان واقعی^۳ روشی قدرتمند جهت تعیین میزان بیان ژن است (Horikoshi *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1990; Noonan *et al.*, 1990). پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، رونویسی معکوس در زمان واقعی مناسب‌ترین روش برای تشخیص و اندازه‌گیری مقدار mRNA است. این روش دارای حساسیت بالا، قابلیت تکثیر مناسب و دامنه‌ی وسیع اندازه‌گیری می باشد. امروزه بیان نسبی به میزان زیادی مورد استفاده قرار می گیرد (Pfaffl and M. Hageleit., Bustin., 2000). بیوانفورماتیک، علمی بین رشته‌ای و در حال رشد است و پیشرفت در این تکنولوژی‌های مولکولی موجب افزایش اطلاعات می شوند (Schneider *et al.*, 2010). شبکه‌های هم بیانی ژن برای ارتباط بین ژن‌های با عملکرد ناشناخته، تعیین اولویت ژن‌های کاندید بیماری‌زا یا درک و تشخیص برنامه‌های تنظیم رونویسی مورد استفاده قرار می گیرند. با پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه‌ی ترانسکریپتومیکس و توالی‌یابی نسل نوین^۴، شبکه‌های هم بیانی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی RNA تشکیل شده‌اند (van Dam *et al.*, 2017). یک هدف مهم در تحقیقات بیولوژیکی، شناسایی سیستماتیکی مولکول‌های درون یک سلول زنده و نحوه‌ی تعامل آن‌ها با یکدیگر است. با این حال،

¹ Hydroxycinnamoyl-CoA thioesters

² Cinnamaldehydes

³ RT-PCR

⁴ next-generation sequencing

عملکرد بسیاری از ژن‌ها هنوز مشخص نشده است، وضعیتی که با شناسایی ژن‌های جدید غیررمز کننده پیچیده‌تر می‌شود (Zhao *et al.*, 2015). نقش‌های تنظیمی چنین ژن‌هایی را می‌توان با ادغام انواع داده‌ها از جمله تعاملات پروتئین- پروتئین، داده‌های متیلوم^۱، تعاملات بین فاکتورهای رونویسی و اهداف آن‌ها، و همچنین با تجزیه و تحلیل توالی موتیف ژن‌های هم بیان بیشتر مورد بررسی قرار داد (Glass *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2014; De Smet and Marchal., 2010).

پایگاه ATTED-II^۲، یک پایگاه داده‌ی هم بیانی برای گونه‌های گیاهی است که یک دید کلی از مجموعه داده‌های متعدد هم بیانی، از طریق ابزارهای تجزیه و تحلیل شبکه فراهم می‌کند (Obayashi and Kengo., 2010; Obayashi *et al.*, 2008; Obayashi *et al.*, 2006). همچنین، مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی^۳ (NCBI) مجموعه‌ای از منابع آنلاین برای اطلاعات بیولوژیکی، از جمله پایگاه‌های داده‌ی GenBank، PubMed و خلاصه‌ای از مستندات را فراهم آورد که می‌توان با استفاده از این پایگاه‌ها به نتایج بسیار ارزشمندی در زمینه‌های مختلف بیولوژیکی دست یافت. عناصر تنظیمی سیس^۴ اجزاء مولکولی مهمی هستند که در تنظیم رونویسی فعالیت‌های ژنی کنترل کننده‌ی فرآیندهای مختلف بیولوژیکی، از جمله پاسخ به تنش‌های غیر زیستی، هورمون‌ها و فرآیندهای رشدی دخیل هستند. یکی از پایگاه‌های مهم در این زمینه، پایگاه PlantCARE^۵ می‌باشد که یک پایگاه داده‌ی متشکل از عناصر سیس تنظیم کننده‌ی گیاهی^۵، تقویت کننده‌ها^۶ و سرکوبگرها^۷ است (Lescot *et al.*, 2002). بنابراین، در این پژوهش با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی به بررسی بیان ژن‌های هم بیان با ژن *COMT* در برنج به عنوان یک گیاه مدل تک لپه‌ای پرداخته شد. همچنین آنالیز نواحی پر موتوری تعدادی از ژن‌ها نیز در هر دو گیاه انجام شد. علاوه

¹ Methylome

² <http://atted.jp/>

³ The National Center for Biotechnology Information

⁴ Cis-acting

⁵ Plant cis-acting regulatory elements

⁶ Enhancers

⁷ Repressors

بر این، پژوهش حاضر به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین، شامل COMT و CCR، ژن‌های هم بیان حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی (*CECCR* و *CECOMT*) و ژن *GmSALT3* در سویا (*GmSALT3*) در پاسخ به تیمار شوری (۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید) در دو بازه‌ی زمانی سه و هفت روز پس از اعمال تیمار با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز زمان واقعی انجام گردید.

فصل ۲

مروری بر منابع

۲-۱- اهمیت و موارد مصرف سویا

پروتئین دانه‌های روغنی منبع مهمی از پروتئین‌های گیاهی برای مصارف انسانی هستند. پروتئین‌های سویا تقریباً ۷۰ درصد از تولید پروتئین دانه‌های روغنی جهان را تشکیل می‌دهند (Fukushima., 1994). سویا سرشار از پلی فنول است و مصرف غذاهای حاوی پلی فنول، منجر به کاهش خطر ابتلا به بیماری قلبی و سرطان می‌شود. همچنین، پلی فنول‌ها نقش‌های مهمی در مقاومت گیاه و دفاع در برابر عفونت‌های میکروبی دارند (Grassmann *et al.*, 2002; Emmons and David., 2001). در کشورهای در حال توسعه، روغن‌های گیاهی به علت هزینه‌ها و مسائل بهداشتی، جایگزین چربی‌های حیوانی شده‌اند. روغن سویا بیش‌ترین روغن گیاهی تولید شده در جهان محسوب می‌گردد (Sutapa and Mitra., 2009). تولید روغن گیاهی خوراکی هر ساله افزایش می‌یابد، به طوری که در برزیل، مصرف عمده‌ی روغن از سویا است (NEHMI *et al.*, 2001). از آن جایی که مقدار زیادی از وزن خشک دانه‌های بالغ بسیاری از لگوم‌ها پروتئین است، بنابراین شناسایی و جداسازی این پروتئین‌ها جهت مطالعات فیزیولوژیکی، تجمع آن‌ها در طی رشد و یا استفاده از آن‌ها در طول جوانه‌زنی ضروری است (Hill and Breidenbach., 1974).

سویا به عنوان یک غذای ارزان قیمت با اثرات بهبود دهنده‌ی سلامتی شناخته می‌شود. ترکیبات سویا شامل ایزوفلاون‌هایی مانند ژنیستئین^۱ و پروتئین‌هایی مانند لکتین‌ها^۲ و مهار کننده‌های پروتئاز هستند که اثرات مفیدی، از جمله فعالیت ضد توموری دارند. یکی از فیتوالکسین‌های سویا، گلیسئولین^۳ نام دارد که خواص پزشکی نیز دارد. در مطالعات اپیدمیولوژیک، مصرف سویا برای کاهش بروز سرطان

¹ Genistein

² Lectins

³ Glyceollin

که ممکن است از طریق القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده صورت گیرد، پیشنهاد شده است. عصاره‌ی سویا از پیشرفت کلیه‌های پلی‌کیستیک نیز جلوگیری می‌کند (Chang., 2000). سویا پتانسیل پیشگیری و سرکوب سرطان را به علت وجود مقادیر زیاد ایزوفلاون ژنیستین دارد. همچنین، این گیاه حاوی ترکیبات دیگری مانند ساپونین، مهارکننده‌های پروتئاز، اسید فیتیک و فیبر است (Simonne *et al.*, 2000). سویا در پیشگیری و درمان بیماری‌های مزمن، به ویژه سرطان، تصلب شرایین، پوکی استخوان و بیماری‌های قلبی-عروقی نقش دارد (Takahata *et al.*, 2001; Malenčić *et al.*, 2012).

عوامل تنش‌زا، از جمله شوری برای رشد و نمو گیاه نامطلوب هستند. این عوامل موجب کاهش عملکرد محصولات زراعی و مهم اقتصادی، از جمله سویا می‌شوند (Tran and Keiichi., 2010; Tran and *et al.*, 2009; Thao and Lam-Son., 2012; Gutierrez-Gonzalez *et al.*, 2010; Neelakandan *et al.*, 2010). با توجه به وجود مقدار زیاد روغن و پروتئین در دانه‌ی سویا این گیاه یک محصول دوطرفه‌ای مهم به شمار می‌رود. با این حال، این گیاه در معرض تنش‌های غیر زیستی قرار می‌گیرد و عملکرد آن کاهش می‌یابد (Luo *et al.*, 2005)، بنابراین درک مکانیسم‌های گیاهان برای مقابله با چنین تنش‌هایی با هدف تولید ارقام سویا متحمل به تنش، ضروری است (Hadiarto and Lam-Son., 2011). (Nakashima *et al.*, 2009 ; Manavalan *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2007;

۲-۲- منشاء و گیاه‌شناسی سویا

سویا بومی آسیای شرقی است که شامل چین نیز می‌شود و دارای سابقه‌ی کشت حداقل ۵۰۰۰ ساله است. در حال حاضر سویا به میزان زیادی در سراسر جهان به عنوان محصولی مهم کشت می‌شود. این گیاه یک ساله است و بذور آن برای تولید دو محصول عمده، یعنی روغن و محصولات غذایی فرآوری می‌شود (Qu, Yue., 2018). سویا یک گیاه علفی و ایستاده است و می‌تواند بیش از دو متر ارتفاع داشته باشد. مانند سایر لگوم‌ها، این گیاه نیز نیتروژن را با استفاده از باکتری‌های تثبیت کننده‌ی نیتروژن به خاک اضافه می‌کند (Pedersen *et al.*, 2004).

۲-۳- تأثیر تنش شوری بر رشد سویا

تنش‌های محیطی از جمله خشکی، شوری بالا و دمای پایین، اثرات نامطلوبی را بر روی رشد گیاهان و تولید بذر می‌گذارند (Luo *et al.*, 2005). اطلاعات محدودی در مورد ژن‌های پاسخ دهنده به شوری در سویا در دسترس است. بررسی بیان پروتئین در پاسخ به شوری ممکن است به شناسایی ژن‌های مسئول برای پاسخ به تنش شوری کمک کند (Aghaei *et al.*, 2009). تنش شوری به میزان زیادی رشد و تولید گیاه را محدود می‌کند (Banzai *et al.*, 2002; Amitai-Zeigerson *et al.*, 1995). سازگاری با تنش شوری نیازمند تغییراتی در تشکیلات سلولی است که به طور مستقیم از تغییر بیان ژن حاصل می‌شود (Parker *et al.*, 2006). شناسایی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش شوری نیازمند ابزارهای مولکولی مهم، از جمله ژنتیک گسترده‌ی ژنوم و نقشه‌های فیزیکی کروموزوم‌ها برای نقشه‌برداری در گیاهان، ابزارهایی برای جداسازی و توالی‌یابی ژن‌های مهم، تجزیه و تحلیل ریزآرایه و پروتئومیک می‌باشند. مطالعات مولکولی و ژنومی نشان می‌دهند که چندین ژن با عملکردهای مختلف، توسط تنش‌های خشکی و سرما القا می‌شوند و عوامل مختلف رونویسی در تنظیم ژن‌های القا شده توسط تنش دخیل هستند. محصولات ژن‌های القایی توسط تنش، نه تنها در تحمل تنش، بلکه در پاسخ به تنش نیز کارایی دارند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki., 2000).

شوری یکی از مهم‌ترین مشکلات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می‌شود که باعث ناباروری زمین می‌شود (Sharifi *et al.*, 2007). پاسخ گیاهان به تنش شوری پیچیده است، زیرا این پاسخ‌ها شامل تغییرات در مورفولوژی، فیزیولوژی و متابولیسم گیاه می‌شوند. به منظور تولید سویا ارقام مقاوم به شوری، شناسایی ژن‌هایی که محصولات آن‌ها موجب بهبود تحمل شوری می‌شود، امری ضروری است. یک همولوگ پروتئینی متصل شونده به اکسیسترول^۱ در سویا شناسایی شده است

¹ OSBP (oxysterol-binding protein)-homologue

که توسط یک ژن القا شده در شوری رمزگذاری می‌شود. ممکن است این همولوگ پروتئینی در بعضی از واکنش‌های فیزیولوژیکی پاسخ به تنش در سویا دخیل باشد (Li, Dong Yan *et al.*, 2008). برخی از ژن‌های القا شده در شرایط شوری در سویا مورد بررسی قرار گرفته‌اند. ایزوفرم اسیدی از پروتئین گروه پنج مرتبط با بیماری‌زایی^۱، مسئول پاسخ به تنش شوری بالا و دهیدراسیون است و در فضای خارج سلولی ریشه‌های سویا قرار دارد (Onishi *et al.*, 2006).

پروتئین مشابه زیپ لوسین در شرایط تنش شوری القا می‌شود و در ساقه‌های سویا فعالیت می‌کند تا تغییرات پتانسیل آب را خنثی کند (Aoki *et al.*, 2005). سویا برای سازگاری با تنش شوری به آنزیمی به نام اسید فسفاتاز وابسته است. این آنزیم در تشکیل و تخریب گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و یا در مسیرهای انتقال پیام پاسخ دهنده به تنش دخیل است (Liao *et al.*, 2003). بیان بیش از حد ژن همولوگ پروتئین متصل شونده به عنصر پاسخ دهنده به دهیدراسیون در سویا^۲ منجر به تجمع سطوح بالاتری از پرولین آزاد در مقایسه با گیاهان نوع وحشی تحت شرایط تنش شوری می‌شود. همچنین، این ژن یک فعال‌کننده‌ی مهم رونویسی است و در بهبود تحمل تنش شوری مشارکت دارد (Chen *et al.*, 2007).

ژن‌های القا شده توسط تنش شوری ممکن است، منجر به افزایش یا کاهش میزان پروتئین‌های مرتبط با تنش شوری شوند (Munns *et al.*, 2006). تأثیرات شوری بر رشد، تشکیل غده یا گره‌ها، فعالیت کاهشی استیلین^۳، میزان لگ هموگلوبین^۴ گره و ظرفیت تنفسی باکترئوئیدها^۵ در نخود^۶، باقلا^۷، لوبیا^۸ و سویا^۹ مشخص شده است. اثر منفی تنش شوری بر روی وزن خشک و فعالیت کاهشی استیلین

¹ PR-5

² *GmDREB2*

³ Acetylene reduction activity

⁴ Leghemoglobin (Lb)

⁵ Bacteroids

⁶ *Pisum sativum* cv. Lincoln

⁷ Faba-bean (*Vicia faba* L. var. minor cv. Alborea)

⁸ *Phaseolus vulgaris* cv. Contender

⁹ *Glycine max* L. var. Williams

گره‌ها به طور مستقیم با کاهش وزن خشک و میزان نیتروژن ساقه‌ها تحت شرایط شوری مرتبط است. نخود به میزان زیادی تحت تأثیر شوری قرار می‌گیرد، درحالی‌که گونه‌های سویا متحمل‌ترین گونه به شوری هستند (Delgado *et al.*, 1994).

گیاهان همیشه تحت فشار انتخابی این تنش‌ها تکامل یافته‌اند و بنابراین، مکانیسم‌های ژنتیکی و مولکولی بسیار پیچیده‌ای را برای بقا در شرایط نامساعد ایجاد کرده‌اند. بسیاری از مکانیسم‌های اولیه گیاهی که با تنش غیر زیستی مواجه می‌شوند، در طول عمرشان به طور مؤثر فعال نیستند، اما در زمان بروز تنش در سطح رونویسی القا می‌شوند (Nakashima *et al.*, 2009 ; Hadiarto and Tran., 2011; Jogaiah *et al.*, 2013; عوامل کلیدی دخیل در این پاسخ‌ها متمرکز هستند و کشف شبکه‌ی ژن‌های القا شده و یا تنظیم شده توسط این عوامل، یکی از قدرتمندترین روش‌ها برای تحلیل تحمل تنش است (Nakashima *et al.*, 2012; Valliyodan and Nguyen., 2006; Xin *et al.*, 2012; Le, Dung Tien *et al.*, 2010; 2009 Ha, Sukbong *et al.*, Choudhary *et al.*, 2012; Ma, Yun *et al.*, 2012 Choudhary *et al.*, 2012; 2012).

تحت تنش شوری، طول و وزن تر هیپوکوتیل و ریشه‌ی سویا کاهش می‌یابد، بنابراین شوری می‌تواند سطح بیان برخی از پروتئین‌های خاصی را در هیپوکوتیل و ریشه‌ی سویا تغییر دهد که این امر به نوبه‌ی خود می‌تواند در سازگاری به شوری نقش داشته باشد (Aghaei *et al.*, 2009). مطالعات انجام شده بر روی گیاهان تراریخته نشان می‌دهند که تغییر بیان ژن می‌تواند منجر به بهبود تحمل به شوری شود (Apse *et al.*, 1999; Shikanai *et al.*, 1998; Van Camp *et al.*, 1996). به طور کلی، تحت تنش شوری فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز¹ و میزان هیدروژن پراکسید کاهش، و فعالیت پراکسیداز محلول و متصل به دیواره‌ی سلولی افزایش معنی‌داری می‌یابد. در نتیجه، مقدار فنول، لیگنین و

¹ PAL

مونومرهای *p*- هیدروکسی فنیل^۱ و سیرینجیل^۲ لیگنین در ریشه‌های تیمار شده افزایش می‌یابد. بنابراین، اثرات ناشی از شوری ممکن است، موجب افزایش تولید لیگنین شود، که این افزایش موجب تقویت دیواره‌ی سلولی شده و رشد ریشه را محدود می‌سازد (Neves *et al.*, 2010).

۲-۴- اهمیت لیگنین و مسیر بیوسنتز آن

لیگنین یک اصطلاح عمومی برای گروه بزرگی از پلیمرها است که از ترکیب اکسیداتیو اتصال پروپانوئیدهای ۴- هیدروکسی فنیل تشکیل شده است (Boerjan *et al.*, 2003). به طور معمول، این پلیمرها در دیواره‌های سلولی رسوب کرده و آن‌ها را سفت و محکم می‌کنند. علاوه بر رسوب برنامه‌ریزی شده‌ی لیگنین، بیوسنتز آن می‌تواند به محض قرارگیری در شرایط تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی، تنش متابولیکی و اختلالات در ساختار دیواره‌ی سلولی نیز القا شود (Caño-Delgado *et al.*, 2003; Tronchet *et al.*, 2010). از آن جایی که لیگنین از پلی‌ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی در مقابل تخریب میکروبی محافظت می‌کند، در نتیجه، باعث مقاومت در برابر پوسیدگی نیز می‌شود. همچنین، لیگنین یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده در تبدیل زیست توده‌ی گیاهی به سوخت‌های زیستی است. حذف لیگنین از بیومس گیاهی فرآیندی پر هزینه است؛ از این رو، تحقیقات بسیاری با هدف طراحی گیاهانی انجام می‌گیرند که یا لیگنین کمتری را رسوب می‌دهند و یا لیگنینی تولید می‌کنند که تمایل بیشتری به تخریب شیمیایی دارد (Mansfield., Sticklen., 2008; Weng *et al.*, 2008; 2009). لیگنین، جزء مهمی از دیواره‌های سلولی ثانویه است که در بافت‌های آوندی رسوب می‌کند (Boerjan *et al.*, 2003) و به طور عمده در دیواره‌ی سلول‌های خاصی نظیر عناصر ترش‌حی، اسکلرانشیم، فیبرهای آوند آبکش و پریدرم قرار می‌گیرد (Dixon., 2001).

¹ p-hydroxyphenyl (H)

² Syringyl (S)

جهت بهبود بهره‌وری می‌توان از تکنولوژی آنتی سنس برای کاهش بیان آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز مونومر لیگنین استفاده کرد. این روش امکان انتخاب هدفمند آنزیم‌های منفرد در مسیر را فراهم می‌آورد و گیاهان تراریخته با تغییر مقدار و ساختار لیگنین به دست می‌آیند (Sewalt *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1998; Piquemal *et al.*, 1998; Halpin *et al.*, 1994; Atanassova *et al.*, 1997). بیوسنتز لیگنین توسط پیام رشدی در بافت‌های آوندی و از طریق پاسخ‌های دفاعی در گیاه تنظیم می‌شود (Lauvergeat *et al.*, 2001). همان‌طور که در شکل (۱-۲) مشاهده می‌شود، لیگنین از دهیدروژناسیون و پلیمریزاسیون سه هیدروکسی سینامویل الکل^۱ مختلف (مونولیگنول‌ها)، یعنی *p*-کوماریل الکل^۲، کونیفریل الکل^۳ و سیناپیل الکل^۴ مشتق شده است. این مونولیگنول‌ها به ترتیب واحدهای *p*-هیدروکسی فنیل (H)، گوایاسیل (G) و سیرینجیل (S) از پلیمر لیگنین را تشکیل می‌دهند (Humphreys and Chapple., 2002).

در گیاهان زراعی، بیوسنتز مونولیگنول‌ها یک فرآیند چند مرحله‌ای است که با اسیدهای آمینه فنیل آلانین و تیروزین آغاز می‌شود (Whetten *et al.*, 1998). الکل‌های کونیفریل و سیناپیل دارای گروه‌های متیل‌هایی هستند که از طریق واکنش متیلاسیون افزوده می‌شوند. متیلاسیون یک مرحله‌ی حیاتی در بیوسنتز لیگنین است که بر ترکیب و ساختار نهایی لیگنین تأثیر می‌گذارد (Iiyama *et al.*, 1993). بیوسنتز لیگنین در مسیر فنیل پروپانویید صورت می‌گیرد. اولین مرحله در این مسیر دی‌آمین شدن فنیل آلانین توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز^۵ برای تولید سینامات است. با فعالیت آنزیم‌های بعدی، سینامات به متابولیت‌های مختلف و همچنین، به مونولیگنول‌های مربوطه تبدیل می‌شود. در مرحله‌ی آخر، آنزیم پراکسیداز^۶ درون دیواره‌ی سلولی، پلیمریزاسیون اکسیداتیو سه *p*-هیدروکسی

¹ Hydroxycinnamyl alcohols

² *p*-coumaryl alcohol

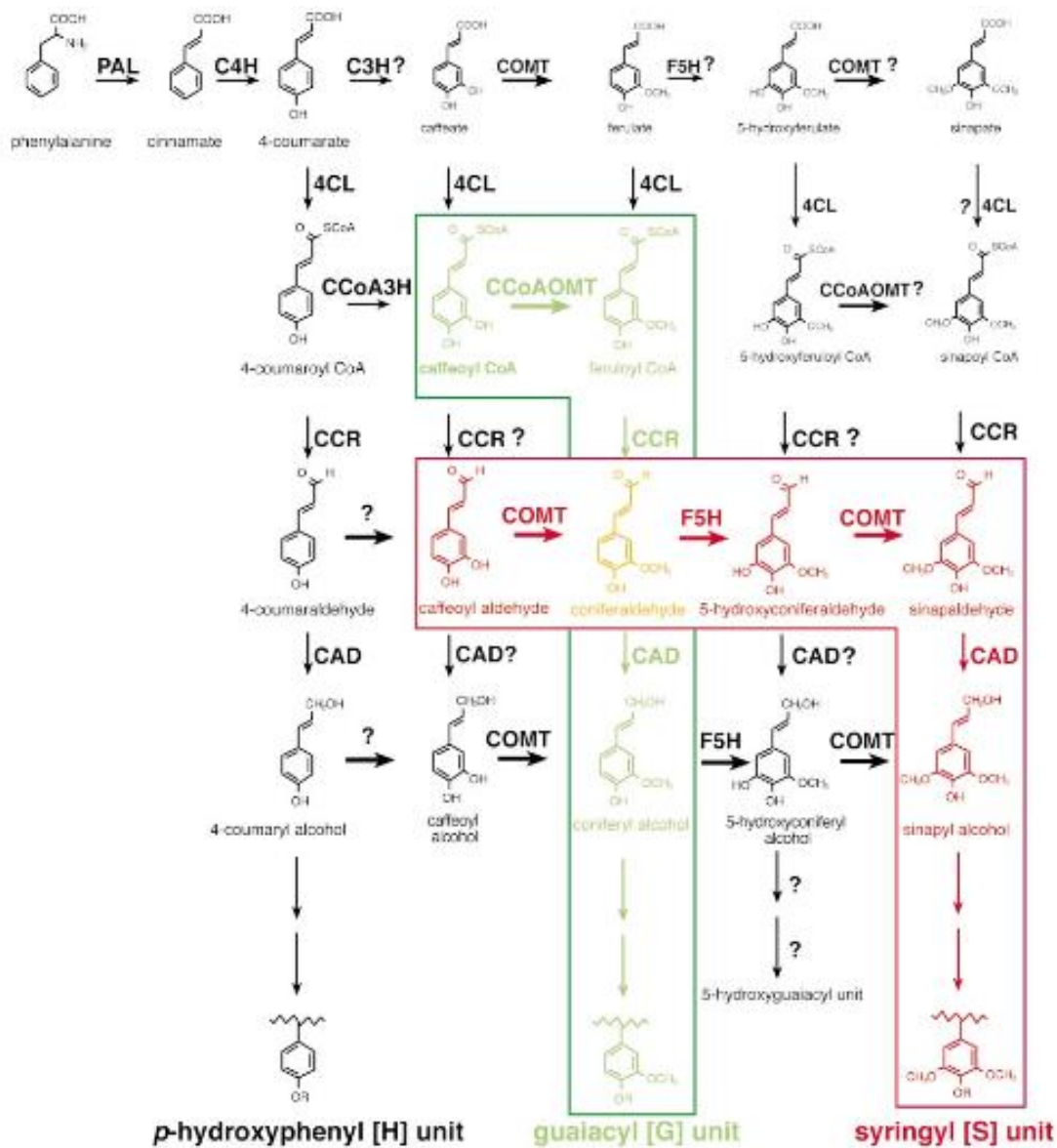
³ Coniferyl alcohol

⁴ Sinapyl alcohol

⁵ PAL

⁶ POD

سینامویل (*p*-کوماریل، کونفریل و سیناپیل) را کاتالیز می‌کند. سپس، آن‌ها به ترتیب واحدهای پلیمر لیگنین، یعنی *p*-هیدروکسی فنیل، گویاسیل و سیرینجیل را تولید می‌کنند (Boerjan *et al.*, 2003).



شکل ۱-۲- مسیر بیوسنتز لیگنین (Guo *et al.*, 2001)

به طور کلی دیواره‌های سلولی تحت تنش، متحمل لیگنیفیکاسیون می‌شوند (Christensen)

فرآیند لیگنیفیکاسیون معمولاً در طی ضخیم شدن دیواره‌ی ثانویه‌ی سلول‌ها با نقش‌های

ساختاری، هدایت یا دفاعی رخ می دهد (Iiyama *et al.*, 1993). در حقیقت، این فرآیند از فنیل آلانین شروع می شود و منجر به تولید سینامویل کوآنزیم آ^۱ ردوکتاز^۱ می شود. برخی از ژن های رمز کننده ی آنزیم CCR از طریق رشد بافت های چوبی و یا تنش زیستی رونویسی می شوند (Lauvergeat *et al.*, 2001). رونوشت CCR اکالیپتوس در اندام های لیگنین شده، مانند برگ ها، ساقه ها و ریشه ها بیان می شود. ژن *EuCCR* به میزان زیادی در ناحیه ی تمایز یافته ی آوند چوبی اکالیپتوس بیان می شود، اما در الیاف ثانویه ی آبکش و یا در پریدرم جوان وجود ندارد (Lacombe *et al.*, 1997).

بیان *OsCCR1* در سوسپانسیون کشت های سلولی تیمار شده با الیسیتور اسفنگولیپید خالص شده از نوعی قارچ^۲ القا می شود (Kawasaki *et al.*, 2006). همچنین بیان این ژن در ریشه های سویا آلوده به نماتد کیست سویا نیز القا می شود (Klink *et al.*, 2009). رونوشت *AtCCR1* نیز در بافت های ساقه و گل بیان می شود (Lauvergeat *et al.*, 2001) و در جهش یافته ی *irx4* دارای نقص در ژن *AtCCR1* میزان لیگنین در مقایسه با نوع وحشی به میزان زیادی کاهش می یابد (Jones *et al.*, 2001). این آنزیم ها در گیاهان و اندام های مختلف شناسایی و جداسازی شده اند. تنها چند گزارش از کلون سازی ژن های مسیر بیوسنتز لیگنین از تک لپه ای ها وجود دارد. cDNA های سینامویل - کوآنزیم آ^۱ ردوکتاز (CCR) از ذرت جداسازی شده اند (Pichon *et al.*, 1998). ژن های کافئیک اسید O- متیل ترانسفراز، سینامویل الکل دهیدروژناز^۳ و سینامویل - کوآنزیم آ^۱ ردوکتاز نیز از گیاه تلخه^۴ جداسازی شده اند (McInnes *et al.*, 2002).

آنزیم CCR از یاس زرد^۵، سویا، سوسپانسیون سلولی صنوبر، شیرهی ساقه ی سپیدار و اکالیپتوس جداسازی شده است (Goffner *et al.*, 1994). cDNA های ژن *COMT* نیز از چندین گیاه

¹ Cinnamoyl coA reductase

² *Magnaporthe grisea*

³ Cinnamoyl -CoA dehydrogenase

⁴ Ryegrass

⁵ Forsythia

مختلف، از جمله زنبق هندی^۱، توتون^۲، آرابیدوپسیس تالیانا^۳ و ذرت^۴ شناسایی شده‌اند (Vincent et al., 2005). فراوانی نسبی انواع زیر واحدها در لیگنین تا حد زیادی بر روی منافع اقتصادی تولید خمیر چوب، قابلیت هضم علوفه و تولید سوخت زیستی تاثیر می‌گذارد (Jung et al., 2012). بنابراین، به نظر می‌رسد که آنزیم‌های متیلاسیون نقش مهمی در بیوسنتز لیگنین و مهندسی ژنتیک لیگنین ایفا می‌کنند (Vanholme et al., 2008). نتایج حاصل از بررسی ژن‌های بیوسنتز کننده‌ی لیگنین در گندم، امکان تفسیر این تعامل پیچیده بین لیگنین و مقاومت به ورس را فراهم آورد، که در آن *CCR* و *COMT* عمدتاً در تنظیم مقاومت به ورس در مراحل زود هنگام بلوغ ساقه‌ی گندم مشارکت می‌کنند. (Ma, Q., 2010).

۲-۵- آنزیم سینامویل کوآنزیم آردوکتاز (*CCR*)

دو مرحله‌ی کاهش / دهیدروژناسیون مسیر منحصر به فرد مونولیگنول به ترتیب توسط سینامویل کوآنزیم آردوکتاز و سینامویل الکل دهیدروژناز کاتالیز می‌شود. سینامویل کوآنزیم آ-ردوکتاز مرحله‌ی اختصاصی در شاخه‌ی خاصی از مونولیگنول در مسیر فنیل پروپانوئید را کاتالیز می‌کند (Boerjan et al., 2003; Lacombe et al., 1997). آنزیم *CCR* تبدیل هیدروکسی سینامویل - کوآنزیم آ تیو استرها^۵ را به سینامالدهیدها^۶ کاتالیز می‌کند، که اولین مرحله مهم برای بیوسنتز مونولیگنول‌ها است. در نتیجه، *CCR* می‌تواند یک آنزیم تنظیمی مهم در تغییرات کربن نسبت به بیوسنتز مونولیگنول-ها باشد (Baucher et al., 1998). بیان ژن *GbCCR* تحت تیمار جیبرلین به میزان زیاد، اما تحت تیمار آگروباکتریوم به میزان کمی افزایش می‌یابد. تجزیه و تحلیل QRT-PCR نشان داده است که فعالیت

¹ *Iris hollandica*

² *Nicotiana tabacum*

³ *Arabidopsis thaliana*

⁴ *Zea mays*

⁵ Hydroxycinnamoyl-CoA thioesters

⁶ Cinnamaldehydes

GbCCR با تغییرات سطح رونویسی ژن *GbCCR* ارتباط دارد و فعالیت *GbCCR* نیز با تجمع لیگنین کل در رشد ساقه گینکو^۱ همبستگی مثبت دارد. با توجه به این خصوصیات و الگوی بیان، می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم مربوطه احتمالاً در لیگنیفیکاسیون و دفاع نقش داشته باشد (Hua, Cheng et al., 2012). همچنین مشخص شده است که حداکثر کاهش و افزایش بیان ژن *HcCCR1* به ترتیب تحت تیمارهای سرما و متیل جاسمونات در گیاه چای ترش^۲ مشاهده شده است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داده است که *HcCCR1* ارتباط تنگاتنگی با پروتئین‌های شبیه به *CCR* و پروتئین‌های *HcCCR2* و *AtCCR* دارد (Ghosh et al., 2015).

۲-۶- آنزیم کافئیک اسید O-متیل ترانسفراز^۳ (COMT)

آنزیم COMT متعلق به خانواده O-متیل ترانسفراز وابسته به S-آدنوزیل-L-متیونین^۴ و یک آنزیم ضروری در مسیر بیوسنتز لیگنین است. این آنزیم، متیلاسیون گروه^۳- هیدروکسیل از کافئیک اسید را برای تولید فرولیک اسید و S-آدنوزیل-L-هوموسیستئین کاتالیز می‌کند (Vanholme et al., 2012). به طور کلی، بسیاری از آنزیم‌های COMT به طور بالقوه می‌توانند در شاخه‌های متعددی از شبکه‌ی بیوسنتز مونولیگنول شرکت کنند (Parvathi et al., 2001). سینامویل کوآنزیم آ-ردوکتاز و کافئیک اسید O-متیل ترانسفراز مراحل کلیدی در بیوسنتز مونولیگنول‌ها را کاتالیز می‌کنند، که به عنوان بلوک‌های اصلی در تشکیل لیگنین گیاهی عمل می‌کنند (Tu, Yi et al., 2010). ژن‌های کافئیک اسید O-متیل ترانسفراز، سینامویل الکل دهیدروژناز و سینامویل کوآنزیم آ ردوکتاز از گیاه تلخه^۵ جداسازی شده‌اند (McInnes et al., 2002; Lynch et al., 2002). ژن‌های رمز

¹ *Ginkgo biloba*

² *Hibiscus cannabinus*

³ Caffeic acid O-methyltransferase

⁴ SAM

⁵ Ryegrass

کننده دو آنزیم CCR و COMT در چاودار چند ساله^۱ شناسایی و مشخص شده است که الگوهای بیان مکانی- زمانی این ژن‌ها در گیاهچه‌ها با رسوب لیگنین ارتباط دارند (Tu, Yi ET AL., 2010).

۲-۷- ژن تحمل به شوری در سویا (*GmSALT3*)

با استفاده از کلون‌سازی مبتنی بر نقشه، از سویای مقاوم به شوری (واریت‌های 8 Tiefeng)، ژنی به نام *Glyma03g32900.1* شناسایی و *GmSALT3* نامگذاری شده است (Guan et al., 2014). این ژن پتانسیل بهبود عملکرد سویا تحت تنش شوری را دارد. این ژن در بهبود میزان جوانه‌زنی گیاهچه و یا در قابلیت زودرسی تحت تنش مشارکت نمی‌کند، بلکه واسطه‌ی تنظیم تجمع یون سدیم و کلر در سویا است و موجب بهبود عملکرد از طریق حفظ وزن دانه تحت تنش شوری می‌شود (Liu et al., 2016). آلل مقاوم *GmSALT3* در ژرم پلاسماهای *G.max* و *G.soja* شناسایی شده است (Guan et al., 2014).

۲-۸- ضرورت مطالعه‌ی شبکه‌های هم بیانی ژن

با توسعه‌ی تکنولوژی‌های در مقیاس بالا^۲، از جمله ریزآرایه^۳ و توالی‌یابی RNA و روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به آن‌ها، وضعیت عملکرد یک ژن می‌تواند از منظر سیستماتیکی شناسایی شود (van Dam et al., 2014). یک روش برای دستیابی به عملکرد ژن از طریق بیان ژن گسترده‌ی ژنوم، تجزیه و تحلیل شبکه‌ی هم بیانی است. شبکه‌های هم بیانی ژن را می‌توان برای اهداف مختلف، از جمله اولویت‌بندی ژن‌های کاندید بیماری‌زا، حاشیه‌نویسی^۴ ژن و شناسایی ژن‌های تنظیمی به کار

¹ *Lolium perenne*

² High-throughput

³ Microarrays

⁴ Annotation

برد. این شبکه‌ها نشان می‌دهند که ژن‌ها به طور همزمان فعال می‌شوند، این امر نشان می‌دهد که اغلب آن‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی مشابهی فعال هستند (Fiannaca *et al.*, 2015).

پایگاه ATTED-II یک پایگاه داده هم بیانی برای گونه‌های گیاهی است که به کشف روابط ژن‌های ناشناخته درون یک گونه کمک می‌کند (Obayashi *et al.*, 2017). با استفاده از این پایگاه می‌توان روابط بین عملکرد ژن‌ها را شناسایی و آزمایش‌هایی را برای تشخیص عملکرد ژن‌ها با استفاده از ژنتیک معکوس و تکنیک‌های رایج ژنتیک مولکولی طراحی کرد. شناسایی شباهت‌ها در پروفایل‌های بیانی ژن‌های مختلف و یا هم بیانی، می‌تواند بینشی جهت کشف عملکرد ژن فراهم آورد (Eisen *et al.*, 1998). از آنجایی که عملکرد بیولوژیکی ژن‌های پارالوگ از طریق شباهت‌های توالی آن‌ها مشخص نشده است، پایگاه داده‌های هم بیانی، منبع مهمی جهت تخمین عملکرد ژن به ویژه در گیاهانی هستند که عموماً دارای ژن‌های پارالوگ بیشتری نسبت به حیوانات هستند (Tang *et al.*, 2008). پایگاه‌های داده‌ی هم بیانی ژن برای وارسته‌های متنوعی از گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Usadel *et al.*, 2009).

تجزیه و تحلیل هم بیانی ژن، که یک رویکرد مبتنی بر پروفایل‌های بیان ژن است، می‌تواند جفت ژن‌های مرتبط از نظر عملکرد را شناسایی کند (Rung and Brazma., Usadel *et al.*, 2009). مقایسه‌ی شبکه‌های ژنی بین گونه‌های مختلف می‌تواند برای شناسایی موتیف یا نواحی ژنومی خاص حفاظت شده در یک زمینه تکاملی استفاده شود (Okamura *et al.*, 2015; Ruprecht *et al.*, 2017). گیاهان به تنش‌های محیطی، نه تنها از طریق فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، بلکه از طریق فرآیندهای مولکولی و سلولی پاسخ می‌دهند و سازگار می‌شوند. بیان بسیاری از ژن‌های گیاهی از طریق تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، سرما و شوری بالا تنظیم می‌شود (Shinozaki *et al.*, 2003).

تجزیه و تحلیل‌ها نشان داده‌اند که چندین سیستم مختلف تنظیم کننده‌ی رونویسی وجود دارد، که در بیان ژن پاسخ دهنده به تنش مشارکت دارند. چندین مجموعه مختلف از عناصر سیس^۱ و فاکتورهای ترانس^۲ شناسایی شده‌اند که در رونویسی پاسخ به تنش دخیل هستند. نواحی پروموتری ژن‌های القایی توسط تنش، حاوی عناصر سیس هستند که در بیان ژن پاسخ دهنده به تنش مشارکت دارند (Shinozaki *et al.*, 2003). بسیاری از ژن‌های القایی توسط تنش غیر زیستی از طریق آپسیزیک اسید کنترل می‌شوند، اما برخی از آن‌ها بدین صورت نمی‌باشند. این امر، نشان می‌دهد که سیستم‌های تنظیمی مستقل از آپسیزیک اسید و وابسته به آپسیزیک اسید در بیان ژن پاسخ دهنده به تنش دخیل هستند (Shinozaki *et al.*, 2003). بسیاری از ژن‌ها توسط تنش‌های خشکی، شوری و سرما القا می‌شوند. این موضوع نشان می‌دهد که بین این مسیرهای پیام‌رسانی از طریق تنش برهمکنش^۳ وجود دارد (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki., 2005).

۲-۹- ضرورت آنالیز پروموتر و مطالعات بیوانفورماتیکی

آگاهی درباره پروموتورهای گیاهی بخش مهمی در بیوتکنولوژی است، که امکان کنترل بیان ژن را در بسیاری از زمینه‌ها فراهم آورد (Rombauts *et al.*, 1999). تا سال ۲۰۰۲ تعداد ۴۱۷ عنصر تنظیمی سیس جمع‌آوری شده است، که ۱۵۰ عنصر از گونه‌های تک لپه‌ای، ۲۳۶ عنصر از گونه‌های دو لپه‌ای و ۴ عنصر متعلق به مخروطیان هستند. تقریباً ۱۶۰ پروموتر منحصر به فرد از ژن‌های گیاهان عالی شناسایی شده‌اند. برنامه‌های طراحی شده برای شناسایی عناصر تنظیمی جدید از داده‌های

¹ Cis-acting

² Trans-acting

³ Cross-talk

ترانسکریپتومی از طریق وب سایت PlantCARE در دسترس هستند. پایگاه داده‌ی PlantCARE می‌تواند بر اساس نام جایگاه فاکتورهای رونویسی، توالی موتیف، عملکرد، گونه، نوع سلول، ژن و فاکتورهای رونویسی مورد جستجو قرار گیرد (Lescot *et al.*, 2002).

۲-۱۰- بیان ژن، کاربرد و روش‌های اندازه‌گیری آن

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی زمان واقعی حساس‌ترین روش برای تشخیص تغییرات بیان ژن است (Nolan *et al.*, 2006). در این فرآیند از رنگ‌های فلورسنت یا پروب‌هایی برای تشخیص مقدار DNA دو رشته‌ای تکثیر شده استفاده می‌شود (Udvardi *et al.*, 2008). تعداد چرخه‌ی بسیار کم PCR که در آن پیام فلورسنت به یک آستانه‌ی تعریف شده می‌رسد، به عنوان مقدار چرخه آستانه^۱ Ct نامیده می‌شود. همانند هیبریداسیون ریزآرایه‌ی DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی زمان واقعی، توانایی غربالگری بسیاری از ژن‌ها را دارد. با این حال، برخلاف ریزآرایه‌های DNA ماهیت ذاتی واکنش PCR برای این روش، امکان حساسیت بالای تشخیص و استفاده از آغازگرهای با اختصاصیت بالا را فراهم می‌کند. این جنبه‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی زمان واقعی آن را به یک ابزار مناسب برای استفاده در مطالعات بیان ژن ناشی از تنش‌های غیر زیستی در گیاهان تبدیل می‌کند (Stolf-Moreira *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011). یک محدودیت اساسی در تفسیر دقیق داده‌های این واکنش، ضرورت استفاده از یک ژن مرجع است که بتواند به عنوان یک معیار استاندارد برای مقایسه‌ی یک نمونه با نمونه‌ی دیگر استفاده شود (Gutierrez *et al.*, 2008). ژن‌های مرجع در تجزیه و تحلیل داده‌های واکنش، برای به حداقل رساندن تأثیرات کیفیت و کمیّت RNA و کارایی واکنش رونویسی معکوس مورد نیاز هستند (Bustin., 2002).

¹ Cycle threshold

۲-۱۱- ژن مرجع در بررسی بیان ژن

در روش کمیّت سنجی نسبی، تغییرات بیان ژن نسبت به ژن مرجع مورد بررسی قرار می‌گیرد. ژن‌های مرجع بسیاری در بررسی بیان ژن‌ها در شرایط گوناگون، از جمله در تنش‌های زیستی و غیر زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Brunner *et al.*, 2024). این ژن‌های مرجع باید در شرایط مختلف آزمایشگاهی و در بافت‌های مختلف دارای بیان پایداری باشد. رایج‌ترین ژن‌های مرجع مورد استفاده شامل بتا-اکتین، گلیسر آلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز، پلی یوبیکوئیتین^۱، آنزیم متصل شونده به یوبیکوئیتین^۲، فاکتور طول‌سازی ترجمه^۳، سیکلوفیلین^۴، فاکتور طول‌سازی A-1^۵ و توبولین^۶ هستند (Kim *et al.*, 2003; Dheda *et al.*, 2004; Bustin., 2002). موتیف *F-box* تقریباً از ۵۰ اسید آمینه تشکیل شده است و به عنوان جایگاه تعامل پروتئین- پروتئین عمل می‌کند (Kipreos and Michele, 2000). این ژن به عنوان پایدارترین ژن رفرنس در شرایط مختلف تنش در سویا گزارش شده است (Mafra *et al.*, 2012; Bansal *et al.*, 2015).

¹ Poly-ubiquitin

² Ubiquitin Binding Enzyme

³ Translation Elongation Factor

⁴ Cyclophilin

⁵ Elongation Factor A-1

⁶ Tubulin

فصل ۳

مواد و روش‌ها

۳-۱- بخش اول: مطالعات بیوانفورماتیکی

۳-۱-۱- شناسایی ژن‌های هم بیان

بررسی ژن‌های هم بیان با ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز لیگنین، یعنی *CCR* و *COMT* با استفاده از پایگاه ATTED-II به نشانی (<http://atted.jp>) انجام شد. ابتدا با مراجعه به سایت NCBI^۱ از قسمت All Databases گزینه‌ی Gene را انتخاب و در کادر مقابل عبارت Search، نام کامل ژن مورد نظر به همراه نام علمی گیاه سویا (*caffaic acid 3-O-methyltransferase [Glycine max]*) وارد شد. با کلیک بر روی کلمه‌ی Search تمام ژن‌های رمز کننده‌ی این آنزیم به همراه جایگاه کروموزومی نمایش داده می‌شوند. برای آنزیم *COMT* تعداد ۱۰ ژن شناسایی و ثبت شده است. جهت شناسایی و طراحی آغازگر برای ژن‌های هم بیان با ژن *LOC100803633* واقع بر روی کروموزوم ۶ بدین ترتیب عمل می‌کنیم: پس از مراجعه به سایت ATTED-II بر روی گزینه‌ی CoExSearch کلیک کرده و کد شناسایی ژن مورد نظر را در محل مشخص شده وارد کرده و بر روی گزینه‌ی Submit کلیک می‌کنیم.

در جدول حاصل از این مراحل، بر روی کد شناسایی ژن مورد نظر، یعنی *100803633* در قسمت Locus کلیک می‌کنیم. ژن‌های هم بیان با ژن مورد نظر به صورت شبکه‌ای از ژن‌های هم بیان

^۱ National Center for Biotechnology Information

ترسیم شده‌اند. همچنین، ژن‌هایی که به صورت مستقیم با ژن مورد نظر ما در شبکه ارتباط داشتند، نیز مشخص شده‌اند. جهت طراحی آغازگر، سعی بر این شد تا ژن هم بیانی انتخاب شود که عملکرد آن شناخته شده باشد. در این شبکه‌ی هم بیانی، از پنج ژنی که به طور مستقیم با ژن مورد نظر ما ارتباط داشتند، دو مورد از آن‌ها فاقد عملکرد شناخته شده‌ای بودند. پس از بررسی‌های لازم ژن *LOC100789621* انتخاب و آغازگر مناسبی با استفاده از پایگاه داده NCBI برای آن طراحی شد. این ژن عملکردی مشابه چاپرون میتوکندریایی BCS1¹ دارد. از این پس، در این پایان نامه، نام ژن هم بیان با *COMT* را ژن *CECOMT*، به معنای *Gene Co-Expression with COMT* می‌نامیم. به طور مشابه، این مراحل را جهت طراحی آغازگر برای ژن هم بیان با *CCR* در سویا انجام دادیم، این ژن با نام *GLYMA_13G369800* و با شناسه *Gene ID: 100796771* نیز شناخته می‌شود. بدین صورت که پس از وارد کردن نام کامل ژن مورد نظر به همراه نام علمی سویا *cinnamoyl-CoA reductase AND Glycine max* در کادر مقابل کلمه‌ی *Search* در سایت NCBI تعداد هجده ژن رمز کننده‌ی این آنزیم در سویا شناسایی شد. جهت شناسایی و طراحی آغازگر ژن‌های هم بیان با ژن *LOC100803241* واقع بر روی کروموزوم دو، با روش مشابه عمل شد. بدین ترتیب که پس از مراجعه به سایت *ATTED-II* بر روی گزینه *CoExSearch* کلیک کردیم و کد شناسایی ژن مورد نظر را در محل مشخص شده وارد و بر روی گزینه *Submit* کلیک کردیم.

در جدول حاصل از این مراحل، بر روی کد شناسایی ژن مورد نظر، یعنی *LOC100803241* در قسمت *Locus* کلیک کردیم. ژن‌های هم بیان با ژن مورد نظر به صورت شبکه‌ای از ژن‌های هم بیان ترسیم شدند. همچنین، ژن‌هایی که در شبکه‌ی هم بیانی به صورت مستقیم با ژن *LOC100803241* ارتباط داشتند، نیز مشخص شدند. در این شبکه‌ی هم بیانی، تمام شش ژنی که به طور مستقیم با *LOC100803241* در ارتباط بودند، عملکرد شناخته شده‌ای داشتند. پس از بررسی‌های لازم ژن

¹ Mitochondrial chaperone BCS1-like

LOC100805558 به عنوان ژن هم بیان با *CCR* انتخاب و آغازگر آن با استفاده از سایت NCBI طراحی شد. این ژن عملکردی مشابه پروتئین پاسخ دهنده به واکنش فوق حساسیت^۱ داشت. از آنجایی که این پایگاه برای برخی از گیاهان، از جمله سویا و برنج از دو منبع جهت شناسایی ژن‌های هم بیان در شبکه‌ی ژنی استفاده می‌کند؛ بنابراین، با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA نیز تعداد سه ژن که به صورت مستقیم با ژن *Os02g0823400* ارتباط داشتند، شناسایی شد. به همین ترتیب، جهت مشاهده‌ی شبکه‌ی ژن‌های هم بیان در اطراف ژن *Os08g0157500* بر روی کد شناسایی ژن مورد نظر در قسمت Locus کلیک کردیم. تعداد ۲۰ ژن هم بیان با این ژن نیز با استفاده از داده‌های ریزآرایه شناسایی شدند. همچنین، تعداد چهارده ژن که به صورت مستقیم با ژن *Os08g0157500* در شبکه ارتباط داشتند نیز با استفاده از داده‌های ریزآرایه مشخص شدند. تعداد دوازده ژن که به صورت مستقیم با ژن *Os08g0157500* در ارتباط هستند، نیز با استفاده از داده‌های توالی‌یابی RNA شناسایی شدند. طراحی آغازگرها نیز به صورت Exon-exon junction و با استفاده از سایت NCBI انجام شد. سنتز آغازگرها توسط شرکت سیناکلون انجام شد (جدول ۳-۱).

جدول ۳-۱- مشخصات آغازگرها

نام ژن	توالی (۵-۳)	دمای اتصال (°C)	طول محصول (bp)
<i>COMT</i>	F- AGCCCTTCTAGCCTCTCACT	۵۹/۳۵	۱۹۶
	R- TTTCAGCTCCGACCAGCTATG	۵۹/۸۲	
<i>CECOMT</i>	F- GAAACTGCTTCTGGCGACTG	۵۹/۳۵	۱۳۱
	R- CAGACAAGGTCAACTGTACGTC	۶۰/۲۵	
<i>CECCR</i>	F- TCTTTGATGTTATCCGGGCATGT	۵۸/۸۷	۱۷۳
	R- CTTCACACGCTCATCCGGT	۵۸/۸۳	
	F- TCG GTC CAC TTT AAG GAT GT	۵۶/۴	

¹ Hypersensitive-induced response protein 1-like

<i>CCR</i>	R- GGT ATC TCG TTG CAT CTT AGG	۵۹/۴	۱۶۸
	F- GTG GGG AAG ATT TTG GGA AC	۵۸/۴	
<i>GmSALT3</i>	R- CGT TAA GCA CCT TCT TCT CTC	۵۹/۴	۱۴۸
	F- ACT CTT TGG ATC AAT CTC TGC	۵۷/۴	
<i>F-BOX</i>	R- ATC CCA GCA CCT TTT TAC AC	۵۶/۴	۱۶۲

F و R نشان دهنده‌ی آغازگرهای رفت و برگشت هستند.

۳-۱-۲- آنالیز نواحی پروموتری

جهت دسترسی به توالی‌های پروموتری ژن *COMT* در سویا و برنج از پایگاه داده‌ی NCBI استفاده شد. بدین منظور، توالی ۱۵۰۰ جفت باز بالادست کدون شروع به عنوان توالی ناحیه‌ی پروموتری استخراج شد. جهت جستجوی موتیف‌ها و عناصر سیس موجود در توالی پروموتری و تعیین عملکرد آن‌ها از پایگاه plantCARE استفاده شد. در پایگاه NCBI از قسمت All Databases کلمه Gene را انتخاب و اسم ژن مورد نظر (*LOC100803633*) در سویا را وارد و کلمه Search را کلیک می‌کنیم. در مرحله بعد، از قسمت Genomic regions, transcripts, and products برای استخراج توالی پروموتری استفاده می‌کنیم. جهت بررسی توالی‌های پروموتری و شناسایی عناصر سیس موجود در آن‌ها نیز از پایگاه plantCARE به آدرس (plantCARE, a database of plant promoters and their cis-acting) استفاده گردید.

۳-۲- بخش دوم: مطالعات آزمایشگاهی

۳-۲-۱- زمان و محلّ اجرای آزمایش

آزمایشات در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۷ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، واقع در شهر بسطام انجام شد.

۳-۲-۲- کشت بذره‌ای سویا

دو رقم سویا حساس (L.17) و مقاوم (Williams) به شوری از مؤسسه‌ی تحقیقات اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. ضدعفونی بذرها توسط هیپوکلریت سدیم^۱ پنج درصد به مدت پانزده دقیقه و دو مرتبه شست‌وشو با آب مقطر استریل به مدت دو دقیقه انجام شد. در مرحله‌ی بعد، بذرها درون پلیت و دستمال مرطوب به مرحله‌ی جوانه‌زنی رسیدند و سپس، در محیط پرلیت و با استفاده از محلول هوگلند رشد کردند. گیاهان در اتاقک کشت و در محیط آزمایشگاه پرورش یافتند (شکل ۳-۱). مطابق جدول پیوست (۳-۱) محلول هوگلند از عناصر ماکرو، میکرو و فسفات تشکیل می‌شود (Hoagland and Arnon., 1950).

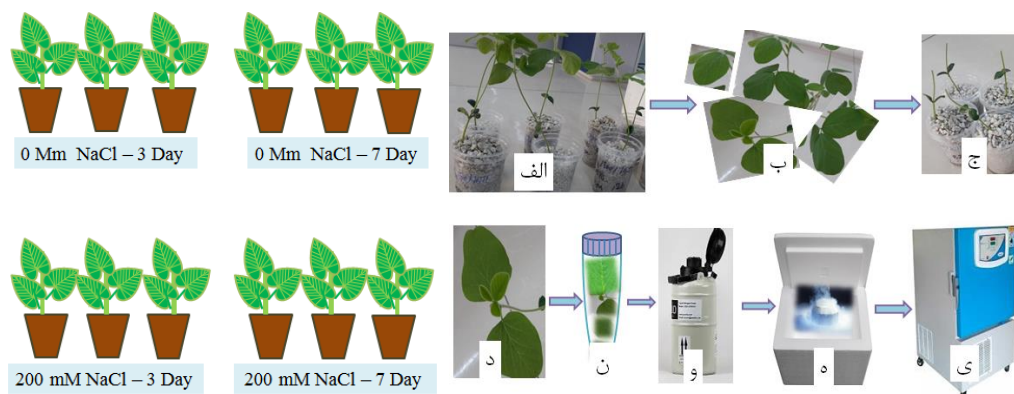


شکل ۳-۱- رشد گیاهان سویا در اتاقک کشت در محیط آزمایشگاه

^۱ Sodium hypochlorite

۳-۲-۳- اعمال تیمارشوری

تیمار شوری (۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید) بر روی گیاهچه‌های ۵-۷ برگی و با سه تکرار در بازه‌های زمانی سه و هفت روز در هر دو رقم مقاوم و حساس به شوری اعمال شد. پس از اعمال تیمار و گذشت مدت زمان‌های تعریف شده، فرآیند نمونه‌برداری از بافت برگ انجام شد. نمونه‌های برگ هر کدام به صورت جداگانه درون ویال و بلافاصله درون ازت مایع قرار گرفتند و جهت نگهداری طولانی مدت به یخچال ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند (شکل ۳-۲).



شکل ۳-۲- طرح کلی آزمایش برای یکی از رقم‌ها و شرایط نمونه‌برداری

۳-۲-۴- استخراج RNA

استخراج RNA به روش دستی طبق پروتکل انجام شد (Oñate-Sánchez and Vicente- 2008). وسایل مورد نیاز (سر سمپلرها، میکروتیوب‌ها، هاون چینی و...) دو مرتبه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. میزکار با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد (پیوست ۳-۱).

۳-۲-۵- سنتز cDNA

سنتز cDNA طبق پروتکل کیت سنتز cDNA شرکت TaKaRa انجام شد. تهیه‌ی ۱۰ میکرولیتر cDNA طبق جدول (۲-۳) انجام شد. برای این کار یک میکرولیتر RNA با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر استفاده شد. سپس، جهت انجام واکنش رونویسی معکوس^۱ نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله‌ی بعد، به منظور غیر فعال‌سازی واکنش رونویسی معکوس از تیمار گرما به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد.

جدول ۳-۲- ترکیبات سنتز cDNA

مواد	مقدار (μl)	غلظت نهایی
5X Primer Script Buffer	۲	۱ X
آنزیم RT	۰/۵	
آغازگر Oligo dT	۰/۵	۲۵ Pmol
Random Hexamer	۰/۵	۵۰ Pmol
RNA کل	۱	
آب دو بار تقطیر	۵/۵	

۳-۲-۶- واکنش PCR

جهت تعیین دمای بهینه‌ی فعالیت آغازگر و اطمینان از سنتز مناسب cDNA، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر طبق جدول (۳-۳) تهیه شد.

^۱ Reverse Transcription

واکنش طبق چرخه‌ی دمایی به تعداد ۳۵ سیکل و با استفاده از دستگاه - T100™ Thermal Cycler Bio-Rad انجام شد.

۳-۲-۷- الکتروفورز محصولات PCR

جهت بررسی عملکرد آغازگرها و اطمینان از صحت سنتز cDNA، محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد به مدت ۵۰ دقیقه و با ولتاژ ۸۰ ولت بارگذاری شد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از Gel Stain انجام شد. به منظور بررسی اندازه‌ی باندهای تکثیر شده، از سایز مارکر 100 bp + 3 Kb DNA Ladder استفاده گردید.

جدول ۳-۳- ترکیبات و چرخه‌های دمایی واکنش PCR

عناصر	مقدار (μl)	مرحله	چرخه	زمان	دما (°C)
آب تیمار شده با DEPC	۶	واسرشت‌سازی اولیه	۱	۵ دقیقه	۹۵
مستر میکس امپلیکون	۱۰	واسرشت‌سازی	۳۸	۳۰ ثانیه	۹۵
آغازگر رفت	۱	اتصال		۳۰ ثانیه	۵۹
آغازگر برگشت	۱	گسترش		۴۵ ثانیه	۷۲
cDNA	۲	اتصال و گسترش	۱	۷ دقیقه	۷۲

۳-۲-۸- واکنش Real-Time PCR

جهت بررسی کمی میزان بیان ژن‌ها از نشانگر فلورسنت با استفاده از رنگ سایبرگرین در واکنش استفاده شد، تا میزان تکثیر محصول ردیابی گردد. در این روش، میزان کل DNAهای دو رشته‌ای در هر زمانی

از واکنش گزارش می‌شود. در این واکنش از cDNA با غلظت نهایی ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر استفاده شد. واکنش‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر و با استفاده از پروتکل کیت SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II طبق جدول (۳-۴) انجام شدند.

جدول ۳-۴- پروتکل واکنش Real-Time PCR

مواد و عناصر	مقدار (μl)	غلظت نهایی
SYBR Prime Ex Taq II (2X)	۱۰	۱ X
آغازگر رفت	۰/۸	۰/۴ μM
آغازگر برگشت	۰/۸	۰/۴ μM
رنگ Rox	۰/۴	۱ X
cDNA	۲	
آب دو بار تقطیر	۶	

۳-۲-۹- تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیز داده‌های بیان ژن، به روش اختلاف در تغییرات چرخه‌ی آستانه ($\Delta\Delta CT$)^۱ و با استفاده از برنامه Excel در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. نمودارها نیز توسط Excel رسم شدند. مطابق فرمول (۳-۱) در این روش مقدار رونوشت ژن مورد نظر، از طریق نسبت میزان رونویسی RNA ژن هدف به میزان رونویسی RNA یک ژن مرجع به دست می‌آید (Livak and Schmittgen., 2001).

$$CT \text{ ژن مرجع در همان نمونه} - CT \text{ ژن هدف} = \Delta CT \text{ نمونه‌ی هدف} \quad (۳-۱)$$

$$CT \text{ ژن مرجع در همان نمونه} - CT \text{ ژن هدف} = \Delta CT \text{ شاهد}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ نمونه‌ی شاهد} - \Delta CT \text{ نمونه‌ی هدف}$$

^۱Delta Delta Cycle Threshold

$$\text{Log}^2 \text{ Fold change} = -\Delta\Delta\text{CT}$$

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

فصل ۴

نتایج و بحث

۴-۱- بخش اول: نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی

۴-۱-۱- شناسایی ژن‌های هم بیان با ژن *COMT* در سویا

ژن‌های رمز کننده‌ی آنزیم کافئیک اسید ۳-O-متیل ترانسفراز مطابق جدول (۴-۱) شناسایی شد. ژن‌های رمز کننده‌ی این آنزیم بر روی کروموزوم‌های مختلف سویا پراکنده شده‌اند. یکی از ژن‌های رمز کننده‌ی این آنزیم؛ یعنی *LOC100803633* واقع بر روی کروموزوم ۱۹ انتخاب و جهت شناسایی

ژن‌های هم بیان با آن از پایگاه ATTED-II استفاده گردید. شبکه‌ی ژن‌های هم بیان با ژن مورد نظر در شکل پیوست (۱-۴) نشان داده شده است.

جدول ۱-۴- ژن‌های رمز کننده‌ی آنزیم کافئیک اسید ۳-O- متیل ترانسفراز با استفاده از پایگاه NCBI در سویا

شناسایی ژن	کروموزوم کد	شناسایی ژن	کروموزوم کد
<i>LOC100806525</i>	۶	<i>LOC100780100</i>	۴
<i>LOC100803633</i>	۱۹	<i>IMT1</i>	۶
<i>LOC100777636</i>	۶	<i>LOC100802981</i>	۱۴
<i>LOC102663764</i>	۱۵	<i>LOC100784957</i>	۱۳
<i>LOC100788873</i>	۷	<i>LOC100781172</i>	۴

نتایج نشان داد که از بین پنج ژنی که با استفاده از داده‌های ریزآرایه شناسایی شدند و با ژن *LOC100803633* در ارتباط مستقیم بودند؛ دو مورد از آن‌ها فاقد عملکرد هستند. ژن‌های هم بیان با این ژن دارای عملکردهایی، از جمله مشابه چاپرون میتوکندریایی *BCS1*، پروتئین کیناز سرین/ترئونین *At2g24230* مشابه گیرنده‌ی LRR و کیناز اینوزیتول پلی فسفات می‌باشند (جدول پیوست ۱-۴).

با استفاده از داده‌های ریزآرایه، تعداد هشت ژن که در شبکه‌ی هم بیانی با ژن *LOC100789621* در ارتباط مستقیم بودند، نیز شناسایی شد (شکل پیوست ۲-۴). از بین ژن‌های موجود در شبکه، ژن *LOC100790421* فاقد عملکرد شناخته شده بود. این ژن‌ها عملکردهایی، از جمله چاپرون میتوکندریایی *BCS1*، حسگر پاسخ به اتیلن، فاکتور رونویسی *bZIP*، کافئیک اسید متیل

ترانسفراز، پروتئین مشابه maf، هیستون H1، پروتئین حاوی دمین U-box دارند (جدول پیوست ۴-۲).

۴-۱-۲- شناسایی ژن‌های هم بیان با ژن CCR در سویا

در پایگاه NCBI تعداد هجده ژن رمز کننده‌ی آنزیم سینامویل کو آنزیم آ- ردوکتاز مطابق جدول (۲-۴) شناسایی شد. این ژن‌ها نیز بر روی کروموزوم‌های مختلف گیاه قرار دارند. ژن *LOC100803241* به عنوان یکی از ژن‌های رمز کننده این آنزیم انتخاب گردید. طراحی آغازگر برای ژن هم بیان با ژن *LOC100803241* نیز به همان روش طراحی آغازگر برای ژن *LOC100803633* انجام شد. شبکه‌ی ژن‌های هم بیان با ژن مورد نظر در شکل پیوست (۳-۴) نشان داده شده است. همچنین، ژن‌هایی که در شبکه‌ی هم بیانی به صورت مستقیم با ژن *LOC100803241* ارتباط دارند، نیز در جدول پیوست (۳-۴) نشان داده شده است. این ژن‌ها نقش‌های مهمی دارند. در این شبکه‌ی هم بیانی تمام شش ژنی که به طور مستقیم با ژن *LOC100803241* در ارتباط بودند، عملکرد شناخته شده‌ای داشتند. پس از بررسی‌های لازم ژن *LOC100805558* به عنوان ژن هم بیان با ژن CCR انتخاب گردید. نام ژن هم بیان با CCR، یعنی *LOC100805558* را *CECCR*^۱ می‌نامیم. این ژن عملکردی مشابه پروتئین پاسخ به واکنش فوق حساسیت^۲ دارد.

جدول ۴-۲- ژن‌های رمز کننده‌ی آنزیم سینامویل کو آنزیم آ- ردوکتاز با استفاده از پایگاه NCBI در سویا

نام کروموزوم	نام ژن	نام کروموزوم	نام ژن

¹ Gene Co- Expression with CCR

² Hypersensitive-induced response protein 1-like

LOC100800492	۱۴	LOC100799994	۸
CCR	۱۳	LOC100816745	۱۸
LOC100793329	۹	LOC100819104	۱۹
LOC100790333	۱	LOC102660653	۱۵
LOC100806281	۱۱	LOC100818076	۵
LOC100803241	۲	LOC100775262	۱۹
LOC100795399	۱۵	LOC113000412	۱۹
LOC100784817	۷	LOC100811026	۸
LOC100811528	۷	LOC100783579	۸

تعداد شش ژن در شبکه‌ی هم‌بیانی با ژن *LOC100805558* در ارتباط مستقیم بودند (شکل پیوست ۴-۴). از بین این ژن‌ها سه مورد از آن‌ها با استفاده از داده‌های ریزآرایه و سه مورد دیگر نیز با استفاده از داده‌های توالی‌یابی RNA شناسایی شده‌اند. این ژن‌ها دارای نقش‌هایی از جمله پروتئین ریبوزومی، اکسید ردوکتاز آهن / آسکوربات، دی‌هیدروفلاونول ردوکتاز، پلی‌گالاکتوروناز و دلتا-استرول متیل ترانسفراز هستند (جدول پیوست ۴-۴).

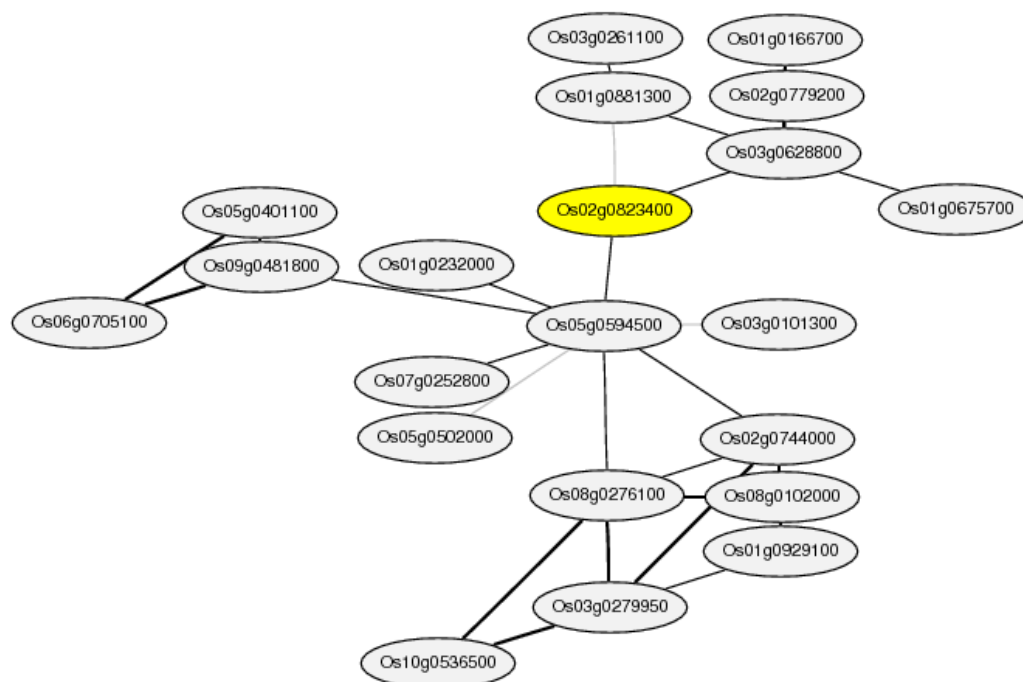
۴-۱-۳- شناسایی ژن‌های هم‌بیان با ژن *COMT* در برنج

بررسی ژن‌های هم‌بیان با ژن *COMT* در برنج نیز با استفاده از پایگاه‌های ATTED-II و NCBI انجام شد. تعداد دو ژن، مطابق جدول (۴-۳) برای *COMT* شناسایی شد. شناسایی ژن‌های هم‌بیان با ژن‌های *LOC4331197* و *LOC4344702* نیز با استفاده از پایگاه ATTED-II صورت گرفت. عملکرد و جایگاه این ژن‌ها در جدول پیوست (۴-۵) نشان داده شده است.

جدول ۳-۴- ژن‌های رمز کننده‌ی آنزیم کافئیک اسید ۳-O- متیل ترانسفراز با استفاده از پایگاه NCBI در برنج

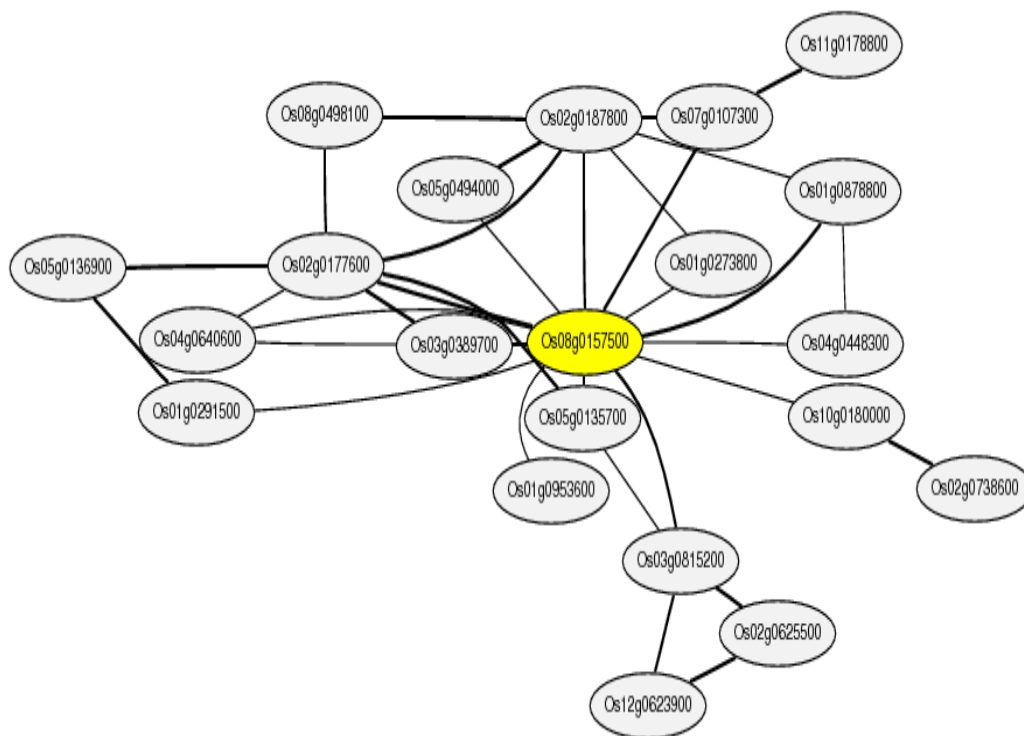
کد شناسایی ژن / نام ژن	کروموزوم
LOC4331197/ID: 4331197	۲
LOC4344702/ID: 4344702	۸

نام دیگر ژن *Os02g0823400* در پایگاه ATTED-II ژن *LOC4331197* است. ژن‌های هم بیان با این ژن به صورت شبکه‌ای نشان داده شده است. این ژن‌ها با استفاده از داده‌های ریزآرایه شناسایی شده‌اند (شکل ۴-۱). همچنین، ژن‌هایی که به طور مستقیم با ژن *Os02g0823400* در ارتباط هستند، نیز با استفاده از داده‌های ریزآرایه و توالی‌یابی RNA شناسایی شدند. نتایج نشان داد که از بین بیست ژنی که در شبکه‌ی هم‌بیانی ژن *LOC4331197* یا همان ژن *Os02g0823400* شناسایی شدند؛ تعداد شش ژن به طور مستقیم با ژن مورد نظر در ارتباط هستند. از بین این ژن‌ها تعداد سه ژن با استفاده از داده‌های ریزآرایه شناسایی شده‌اند. از آن جایی که این پایگاه برای برخی از گیاهان، از جمله سویا و برنج از دو منبع جهت شناسایی ژن‌های هم بیان در شبکه‌ی ژنی استفاده می‌کند؛ بنابراین، با استفاده از توالی‌یابی RNA تعداد سه ژن که به صورت مستقیم با ژن *Os02g0823400* ارتباط داشتند، نیز در جدول پیوست (۴-۶) نشان داده شده‌اند. همچنین، ژن‌های هم بیان با ژن *Os02g0823400* دارای عملکردهایی، از جمله پروتئین فرضی محافظت شده، پروتئین حاوی دمین متصل شونده به سلول *Invasin/intimin*، خانواده‌ی پروتئین غشایی وابسته به saliva و MtN3، پروتئین حاوی هومئودومین، پروتئین مشابه مونو اکسیژناز دی متیل آنیلین و مشابه هسیتون H1 هستند.



شکل ۴-۱- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *Os02g0823400* در برنج با استفاده از پایگاه ATTED-II

ژن‌های هم بیان با ژن *Os08g0157500 / LOC4344702* نیز مطابق شکل (۴-۲) با استفاده از داده‌های ریزآرایه شناسایی شده‌اند. تعداد چهارده ژن که به صورت مستقیم در شبکه‌ی هم بیانی با ژن *LOC4344702 / Os08g0157500* ارتباط داشتند نیز با استفاده از داده‌های ریزآرایه شناسایی شدند (جدول پیوست ۴-۷). این ژن‌ها عملکردهایی، از جمله کومارات کوآنزیم آ لیگاز، پروتئین‌های پاسخ دهنده به مقاومت به بیماری، آدنوزیل متیونین سنتتاز، متیلن تتر هیدروفولات ردوکتاز، مشابه سیتوکروم P450 و خانواده‌ی پروتئینی ترانسفرازها هستند.



شکل ۴-۲- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *Os08g0157500/LOC4344702* در برنج

تعداد دوازده ژن که به صورت مستقیم با ژن *Os08g0157500* در ارتباط هستند و با استفاده از داده‌های توالی‌یابی RNA شناسایی شده‌اند، نیز در جدول پیوست (۴-۸) نمایان است. این ژن‌ها عملکردهایی از جمله فعالیت فلاونوئید هیدروکسیلاز، مشابه سینامویل کوآنزیم آردوکتاز، پروتئین حاوی دُمین استراز/ لیپاز/ تیواستراز، خانواده‌ی پروتئینی پروتئین پاسخ دهنده به مقاومت به بیماری در گیاهان، فنیل آلانین آمونیا لیاز، مشابه سلولاز، پروتئین مشابه گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمال، پیش‌ساز گیرنده‌ی مرتب‌سازی واکوئل^۱، پروتئین خانواده‌ی انتقال دهنده‌ی آمینو اسید/ پلی آمین و خانواده‌ی پروتئینی اکسید ردوکتاز وابسته به FAD دارند.

¹ Similar to Vacuolar sorting receptor 6 precursor (AtVSR6)

مطالعات نشان می‌دهند که ژن *LOC100789621* رمز کننده‌ی پروتئین است. همچنین مشخص شده است که پروتئین Bcs1p یک چاپرون است و به منظور ادغام زیر واحد Rieske در کمپلکس III زنجیره‌ی تنفسی میتوکندری مورد نیاز است (Panozzo *et al.*, 2017). ژن *LOC100778920* نیز یکی از رمز کننده‌های پروتئین کیناز سرین/ترئونین است. پژوهشگران نشان دادند که ژن *LRR receptor-like serine/threonine protein kinase* یکی از ژن‌های مربوط به مقاومت به تنش است (Li *et al.*, 2019). همچنین مشخص شده است که آنزیم 6- inositol polyphosphate kinase از آنزیم‌های مهم مسیر بیوسنتز فسفاتیدیک اسید است (Stevenson-Paulik *et al.*, 2005). از آن جایی که شبکه‌های هم بیانی ژن به میزان زیادی برای کشف عملکرد ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و در این شبکه‌ها، هر ژن با یک گره در ارتباط است. بنابراین اگر مقادیر بیان دو ژن بسیار نزدیک و همبسته باشد، دو ژن به یک ضلع متصل می‌شوند (Zhang and Steve., 2005).

در حقیقت، تجزیه و تحلیل هم بیانی ژن به عنوان ابزاری قدرتمند برای پیش‌بینی عملکرد ژن محسوب می‌شود. ژن‌هایی که به میزان زیادی هم بیان هستند در یک فرآیند بیولوژیکی دخیل باشند (Usadel *et al.*, 2009). علاوه بر این، ژن‌ها و محصولات پروتئینی آن‌ها از طریق شبکه‌ی پیچیده‌ی تعاملات با یکدیگر در ارتباط هستند (Hartwell *et al.*, 1999). همچنین گزارش شده است که پیش ماده‌های آنزیم کوکلئورین متیل ترانسفراز، S-آدنوزیل متیونین و (S)- کوکلئورین هستند و دو محصول، S-آدنوزیل هوموسیستئین و N-(S)- متیل کوکلئورین را تولید می‌کنند. این آنزیم متعلق به خانواده‌ی ترانسفرازها است. نام سیستماتیک این دسته‌ی آنزیمی S-آدنوزیل-L- متیونین: (S)- کوکلئورین-N- متیل ترانسفراز¹ می‌باشد. این آنزیم در بیوسنتز آلکالوئیدها مشارکت می‌کند (Loeffler *et al.*, 1995).

¹ S-adenosyl-L-methionine:(S)-coclaurine-N-methyltransferase

در مطالعه‌ای مشخص شد که آنزیم دی هیدروفلاونول ردوکتاز متعلق به خانواده‌ی اکسید ردوکتازها است. ژن *At4g35420*, *Dihydroflavonol-4-Reductase-Like1* نیز برای رشد دیواره‌ی گرده در گیاهان ضروری است. در حقیقت آنزیم DRL1 باعث تولید پیش ماده‌های گرده می‌شود که این پیش ماده‌ها برای تشکیل گرده مورد نیاز هستند (Tanget *et al.*, 2009). همچنین پژوهش‌ها نشان می‌دهند که پلی گالاکتوروناز یکی از آنزیم‌های مرتبط با تخریب دیواره‌ی سلولی است. این تخریب در چندین فرآیند بیولوژیکی مانند بیماری حاصل از پاتوژن سودوموناس^۱ و رسیدن میوه‌ی گوجه فرنگی رخ می‌دهد (Huang and Schell., 1990). آنزیم پلی گالاکتوروناز نیز در گرده‌ی گراس‌ها شناسایی شده است. فرض بر این است که این آنزیم در رشد لوله‌های گرده نقش دارد (Pressey and Reger., 1989). گزارش‌ها نشان می‌دهند که آنزیم S- آدنوزیل متیونین: ۲۴- استرول - C- متیل ترانسفراز، مسئول آلکیلاسیون استرول‌های مخمر است (Bailey and Parks., 1975).

از آن جایی که هم بیانی ژن، بیانگر شباهت الگوهای بیان ژن در شرایط مختلف آزمایشگاهی است. بنابراین می‌توان از این اطلاعات جهت انجام پژوهش‌های مهم بهره جست و به نتایج مهمی نیز دست یافت. برای استفاده‌ی آسان از داده‌های هم بیانی ژن بدون مهارت‌های برنامه نویسی، چندین پایگاه داده و ابزار هم بیانی برای تعدادی از گونه‌های گیاهی (آرابیدوپسیس، صنوبر، جو و برنج) ساخته شده است (Usadel *et al.*, 2009). بنابراین می‌توان با استفاده از اطلاعات حاصل از شبکه‌های هم بیانی به عملکرد بسیاری از این ژن‌ها و ورودی‌ها و خروجی‌های پیام‌ها پی برد و گامی مؤثر در پیشرفت مسیرهای بیولوژیکی برداشت. همچنین گزارش شده است که تمام اعضای خانواده‌ی *invasin/intimin* با گیرنده‌های یکپارچه در غشاء پلاسمایی سلول میزبان تعامل دارند. این خانواده پیام‌ها را به اسکلت سلولی یوکاریوتی منتقل می‌کنند (Saltzman *et al.*, 1996). همچنین، پژوهش‌ها نشان می‌دهند که اعضای خانواده‌ی ژن *MtN3/saliva/SWEET* در موجودات مختلفی وجود دارند و بسیار محافظت شده

¹ *Pseudomonas solanacearum*

هستند (Miao *et al.*, 2018). پروتئین‌های هومئودمین انتقال رشدی بین مراحل هاپلوئید و دیپلوئید را در چندین رده‌ی یوکاریوتی کنترل می‌کنند (Hedgethorne *et al.*, 2017). علاوه بر این گزارش‌ها نشان می‌دهند که آنزیم 4-coumarate--CoA ligase 1 متعلق به خانواده‌ی لیگازها است، به ویژه آنزیم‌هایی که پیوندهای کربن-گوگرد را به عنوان لیگازهای اسید-تیول تشکیل می‌دهند (Gross and Zenk., 1974). آنزیم (Cinnamyl alcohol dehydrogenase) نیز متعلق به خانواده‌ی اکسید ردوکتازها است، به ویژه آن دسته از آنزیم‌هایی که در گروه دهنده‌ی CH-OH با NAD^+ یا $NADP^+$ به عنوان گیرنده در تعامل هستند. نام سیستماتیک این رده از آنزیم‌ها سینامویل الکل است. این آنزیم در بیوسنتز فنیل پروپانوئید مشارکت می‌کند (WYRAMBIK and GRISEBACH., 1979).

مطالعات نشان می‌دهند که فلاونوئید هیدروکسیلاز یک آنزیم سیتوکروم P450 است که کاتالیز کننده‌ی هیدروکسیلاسیون دی هیدرو فلاونول‌ها است (de Vetten *et al.*, 1999). گزارش شده است که پروتئین‌های مقاومت به بیماری گیاهی اجزای یک سیستم مراقبت از گیاه هستند که آبشارهای انتقال پیام هدف را شناسایی می‌کنند و منجر به دفاع می‌شوند. بزرگ‌ترین دسته از پروتئین‌های مقاومت گیاه حاوی یک جایگاه اتصال نوکلئوتیدی و پایانه کربوکسیلی غنی از لوسین هستند (Dangl and Jones., 2001). اعضای خانواده‌ی گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی¹ با انتقال پیام‌ها برای تکثیر، بقا، مهاجرت و تمایز از محیط خارج سلولی به سلول، نقش مهمی در جنین‌زایی و رشد و توسعه گیاه دارند (Shelton *et al.*, 2005).

۴-۲- آنالیز پروموتر

جهت استخراج توالی‌های پروموتوری ژن‌های رمز کننده‌ی آنزیم سینامویل-کوآنزیم آ ردوکتاز، یعنی ژن *LOC100803241* در سویا و ژن *LOC4341560* در برنج از پایگاه داده‌ی NCBI استفاده

¹ Epidermal growth factor receptor (EGFR)

گردید (Coordinators, N. R. 2017). بررسی عناصر تنظیمی و جایگاه‌های رونویسی نیز با استفاده از پایگاه plantCARE انجام شد ((Lescot et al., 2002). بررسی‌ها نشان داد که در توالی پرموتری ژن *LOC4341560* در برنج تعداد ۳۸ موتیف وجود دارد. از بین جایگاه‌های شناسایی شده، چهار مورد از موتیف‌ها؛ یعنی *CAAT-box*، *MYB*، *TATA-box* و *Unnamed-4* بیش‌ترین فراوانی را در ناحیه پرموتری داشتند. از بین ۳۸ موتیف شناسایی شده، تنها تعداد هفده مورد دارای عملکرد شناخته شده بودند (جدول پیوست ۴-۹ و جدول ۴-۴). موتیف *CAAT-box* به تعداد ۲۲ جایگاه، در گیاهان مختلف (نخود، توتون و آرابیدوپسیس)، به عنوان عنصر رایج سیس در پرموتر و نواحی تقویت کننده به عنوان کاربردی‌ترین موتیف در این توالی شناسایی گردید. موتیف *MYB* به تعداد هفت جایگاه، تنها در آرابیدوپسیس شناسایی شده و فاقد عملکرد است. موتیف *TATA-box* نیز به تعداد هفت جایگاه در آرابیدوپسیس و آفتابگردان، عنصر اصلی پرموتر در ناحیه ۳۰- جایگاه شروع رونویسی بود.

همچنین موتیف *Unnamed-4* به تعداد نوزده جایگاه، در گیاه جعفری شناسایی شده و فاقد عملکرد است. موتیف *ABRE* در پاسخ به آبسزیک اسید مشارکت دارد. موتیف *Box 4* نیز بخشی از یک واحد DNA محافظت شده است که در پاسخ به نور دخیل است. موتیف *CAT-box* عنصر تنظیمی سیس است که در ارتباط با بیان مریستم فعالیت می‌کند. موتیف *CCAAT-box* نیز جایگاه متصل شونده به MYBHv1 است. موتیف‌های *CGTCA-motif* و *TGACG-motif* در پاسخ به متیل جاسمونات مشارکت می‌کنند. موتیف *G-box* در پاسخ به نور فعالیت می‌کند. این موتیف به عنوان *ABRE* (عنصر پاسخ دهنده به آبسزیک اسید) نیز شناخته شده است. این عنصر تنظیم کننده‌ی آبسزیک اسید است و در پاسخ به نور و آبسزیک اسید فعالیت دارد.

موتیف *GARE-motif* یک عنصر پاسخ دهنده به جیبرلین است. موتیف‌های *GATA-motif* و *I-box* به عنوان بخشی از یک عنصر پاسخ دهنده به نور فعالیت می‌کنند. موتیف *GC-motif* یک عنصر

شبه تقویت کننده^۱ است. موتیف *MBS* جایگاه متصل شونده به *MYB* است که در القا توسط خشکی فعالیت دارد. موتیف *MRE* نیز یک جایگاه متصل شونده به *MYB* است که در پاسخ به نور مشارکت دارد. بررسی‌ها نشان داد که در توالی پروموتری ژن *LOC4341560* در برنج، تعداد شش موتیف *Box* *G-box*، *GATA-motif*، *MRE*، *I-box* و *TCT-motif* در پاسخ به نور مشارکت می‌کنند (جدول پیوست ۴-۹ و جدول ۴-۴).

جدول ۴-۴- عملکرد مهم‌ترین موتیف‌ها در ناحیه‌ی پروموتری ژن *LOC4341560* در برنج

اسم جایگاه	عملکرد
A-box	cis-acting regulatory element
ABRE	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
Box 4	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
CAAT-box	common cis-acting element in promoter and enhancer regions
CAT-box	cis-acting regulatory element related to meristem expression
CCAAT-box	MYBHv1 binding site
CGTCA-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
G-box	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
GARE-motif	gibberellin-responsive element
GATA-motif	part of a light responsive element
GC-motif	enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
I-box	part of a light responsive element
MBS	MYB binding site involved in drought-inducibility
MRE	MYB binding site involved in light responsiveness
TATA-box	core promoter element around -30 of transcription start
TCT-motif	part of a light responsive element
TGACG-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness

¹ Enhancer-like element

نتایج نشان داد که از ۲۴ موتیف شناسایی شده برای ژن *LOC100803241* در سویا، تنها تعداد سیزده موتیف دارای عملکرد مشخص بودند. سه موتیف *Box 4*، *CAAT-box* و *TATA-box* بیشترین فراوانی را داشتند. موتیف *Box 4* به تعداد چهار جایگاه در گیاه جعفری شناسایی شده است. این موتیف به عنوان بخشی از یک واحد DNA محافظت شده عمل می‌کند و در پاسخ به نور مشارکت دارد. موتیف *CAAT-box* به تعداد ۳۱ جایگاه، در گیاهانی، از جمله نخود، آرابیدوپسیس و توتون به عنوان عنصر رایج سیس در نواحی پروموتری و تقویت کننده فعالیت می‌کند (جدول پیوست ۴-۱۰ و جدول ۴-۵). موتیف *TATA-box* نیز به تعداد ۶۸ جایگاه، مهم‌ترین موتیف شناخته شده در این توالی می‌باشد. این موتیف در گیاهانی از جمله هویج وحشی، آرابیدوپسیس، خردل چینی، آفتابگردان، نخود، برنج و کلزا گزارش شده است.

موتیف *TATA-box* به عنوان عنصر اصلی پروموتر در ناحیه ۳۰- جایگاه شروع رونویسی فعالیت می‌کند. موتیف‌های *CGTCA-motif* و *TGACG-motif* به عنوان عناصر تنظیمی سیس در پاسخ به متیل جاسمونات و موتیف‌های *G-box* و *GTI-motif* در پاسخ به نور مشارکت می‌کنند (جدول پیوست ۴-۱۰ و جدول ۴-۵). موتیف *GCN4_motif* عنصر تنظیمی سیس است، که در بیان اندوسپرم مشارکت می‌کند. موتیف *MBSI* جایگاه متصل شونده به *MYB* است که در تنظیم ژن‌های بیوسنتز کننده‌ی فلاونوئید نقش دارد. موتیف *TC-rich repeats* در پاسخ به تنش و دفاع ایفای نقش می‌کند. موتیف‌های *TCT-motif* و *chs-CMA1a* به عنوان بخشی از عناصر پاسخ دهنده به نور فعالیت می‌کنند. بررسی‌ها نشان داد که در توالی پروموتری ژن *LOC100803241* در سویا تعداد پنج موتیف (*G-box*، *Box 4*، *GTI-motif*، *TCT-motif* و *chs-CMA1a*) در پاسخ به نور دخیل هستند.

جدول ۴-۵- عملکرد مهم‌ترین موتیف‌ها در ناحیه‌ی پروموتری ژن *LOC100803241* در سویا

اسم جایگاه	عملکرد
ARE	cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
Box 4	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
CAAT-box	common cis-acting element in promoter and enhancer regions
CGTCA-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
G-box	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
GCN4_motif	cis-regulatory element involved in endosperm expression
GT1-motif	light responsive element
MBSI	MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation
TATA-box	core promoter element around -30 of transcription start
TC-rich repeats	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
TCT-motif	part of a light responsive element
TGACG-motif	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
chs-CMA1a	part of a light responsive element

نتایج نشان داد که موتیف *CAAT-box* در نواحی پروموتری برنج و سویا مشترک بود. این موتیف عنصر رایج سیس در نواحی تقویت کننده و پروموتراست. موتیف *TATA-box* نیز در ناحیه‌ی پروموتری دو گیاه مشترک است و به عنوان عنصر اصلی پروموترا در جایگاه شروع رونویسی فعالیت می‌کند. موتیف‌های *TGACG-motif* و *CGTCA-motif* نیز جزء موتیف‌های مشترک بین دو توالی پروموتری بودند. این دو موتیف در پاسخ به متیل جاسمونات مشارکت می‌کنند. همچنین بررسی‌ها نشان داد که سه موتیف (*G-box*، *Box 4* و *TCT-motif*) در ناحیه‌ی پروموتری هر دو ژن *LOC100803241* و *LOC4341560* در گیاهان سویا و برنج مشترک هستند و در پاسخ به نور

مشارکت می‌کنند. همچنین، موتیف‌های *Box 4*, *G-box*, *CGTCA-motif*, *TATA-box*, *CAAT-box* و *TCT-motif* در هر دو ناحیه‌ی پروموتوری در برنج و سویا مشترک هستند. به طور کلی، موتیف‌های *chs-CMA1a*, *TCT-motif*, *Box 4*, *MBS*, *A-box*, *I-box*, *GT1-motif*, *G-Box*, *GATA-motif*، *MRE*، *GC-motif*، *ARE* و *TC-rich repeats* به عنوان عناصر مهم، در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی از جمله، نور، خشکی، شرایط بدون اکسیژن و دفاع مشارکت می‌کنند. مطابق شکل (۳-۴) به طور کلی، این موتیف‌ها نقش‌های مهمی در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی: پاسخ به هورمون‌هایی، از جمله آبسزیک اسید، سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید و عملکردهای سلولی در سطوح رونویسی، بیان اندوسپرم و مریستم دارند.



شکل ۳-۴- توزیع موتیف‌های شناسایی شده از plantCARE، بر اساس عملکردهای بیولوژیکی آن‌ها در ۱/۵ کیلو باز بالادست در سویا و برنج

مطالعات نشان داده‌اند که ژن‌های با پروفایل‌های بیان mRNA مشابه ممکن است توسط مکانیسم‌های یکسانی تنظیم شوند (Altman and Soumya, 2001). این فرضیه مبنای تقریباً همه‌ی تلاش‌ها برای استفاده از داده‌های بیان mRNA از آزمایش‌های ریزآرایه برای کشف شبکه‌های تنظیمی

است. محققان با خوشه‌بندی ژن‌ها بر اساس پروفایل بیان mRNA، شواهد غیرمستقیمی برای این فرضیه ارائه داده‌اند. همچنین گزارش شده است که ژن‌های یک خوشه معمولاً از توالی موتیف بالادست مشترکی برخوردار هستند (Wolfsberg *et al.*, 1999). محققین مثال‌هایی از ژن‌های شناخته شده توصیف می‌کنند که این ژن‌ها توسط فاکتورهای رونویسی مشترکی تنظیم می‌شوند و پروفایل‌های بیان ژن‌های هم تنظیم بسیار همبسته‌ای دارند (Ideker *et al.*, 2001). در راستای مطالعات این پژوهش گزارش شده است که عنصر *G-box* با توالی *CACGTG* به میزان زیادی در بسیاری از ژن‌های گیاهی توزیع شده است و در پیام‌دهی هورمون، پاسخ به نور و سایر شرایط محیطی مشارکت می‌کند (Menkens *et al.*, 1995). عناصر *ARE* (پاسخ دهنده به تنش غیر زیستی یا آنتی‌اکسیدانی) و *ERE* (پاسخ دهنده به اتیلن)، سایر عناصر سیس پاسخ دهنده به تنش اکسیداتیو هستند که در نواحی پرموتری ژن‌های مورد بررسی در سویا و برنج نیز شناسایی شدند (Pastori and Foyer., 2002). موتیف *GCN4* نیز در پرموتر بسیاری از ژن‌های پروتئین ذخیره‌سازی دانه‌ی غلات مانند گلوٹنین گندم، سکالین چاودار، هوردئین جو و گلوٹین برنج محافظت شده است. این موتیف عنصر خاص دانه است و در بیان خاص آندوسپرم و پاسخ به نیتروژن ایفای نقش می‌کند (Onodera *et al.*, 2001). گزارش‌ها نشان می‌دهند که ژن‌های با پروفایل‌های بیان mRNA مشابه به احتمال زیاد مناطق پرموتر خود را محدود به یک عامل رونویسی مشترک می‌کنند. این اثر فقط در سطوح نسبتاً بالایی از شباهت بیان وجود دارد. ژن‌های با عملکردهای مشابه احتمالاً توسط یک فاکتور رونویسی مشترک تنظیم می‌شوند (Allocco and Butte., 2004).

۴-۳- بخش دوم: نتایج آزمایشگاهی

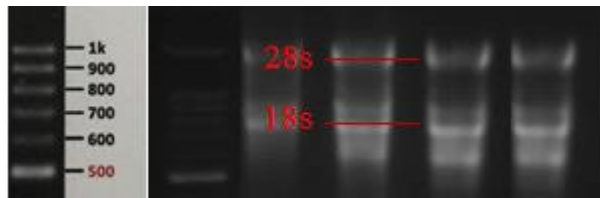
قرارگیری سویا در معرض تنش شوری موجب کاهش عملکرد آن می‌شود. گیاهان به منظور سازگاری با تنش تغییراتی در بیان ژن و در نتیجه پروتئین‌های حاصل ایجاد می‌کنند. لیگنین‌ها پلیمرهای مهمی در گیاهان محسوب می‌شوند و آنزیم‌های متیلاسیون نقش مهمی در بیوسنتز لیگنین

و تغییرات ژنتیکی ایفا می‌کنند. هم بیانی ژن با استفاده از تکامل محافظت شده در ترکیب با داده‌های همولوژی منجر به پیش‌بینی عملکرد ژن می‌شود. علاوه بر این، شبکه‌های هم بیانی ژن، کاربردهای زیادی در شناسایی و ارتباط ژن‌های با عملکرد ناشناخته دارند. در این پژوهش، با استفاده از پایگاه NCBI تعداد ده ژن رمز کننده‌ی آنزیم کافئیک اسید ۳-O-متیل ترانسفراز و تعداد هجده ژن رمز کننده‌ی آنزیم سینامویل کو آنزیم آ-ردوکتاز را شناسایی شدند. این ژن‌ها بر روی کروموزوم‌های مختلف سویا پراکنده شده بودند. در مرحله‌ی بعد با استفاده از پایگاه‌های داده و آنالیزهای بیوانفورماتیکی، ژن‌های هم بیان با *COMT* و *CCR* یعنی به ترتیب *CECOMT// LOC100789621* و *CECCR* *LOC100803633* شناسایی شدند. علاوه بر این، ژن‌های هم بیان با *COMT* در برنج به عنوان یک گیاه مدل تک لپه‌ای با استفاده از بررسی‌های بیوانفورماتیکی بررسی شدند. همچنین، آنالیز نواحی پر موتوری تعدادی از ژن‌ها نیز در این پژوهش انجام شد. در این بخش، میزان بیان ژن‌های هم بیان در شبکه‌های ژنی و ژن‌های *CCR* و *COMT* که در مسیر بیوسنتز لیگنین مشارکت می‌کنند و ژن *GmSALT3* در برگ‌های سویا در پاسخ به تنش شوری با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی زمان واقعی بررسی می‌شوند.

۴-۳-۱- استخراج RNA کل

کمیت و کیفیت RNA استخراجی بر روی ژل آگارز یک درصد نشان داده شده است (شکل ۴-۴). با توجه به شکل، مشاهده می‌شود که RNA استخراج شده کمیت و کیفیت مناسبی دارد، به طوری که باندهای 18s و 28s به وضوح مشاهده می‌شوند. پس از چندین مرحله استخراج و بهینه‌سازی میزان مواد، RNA حداقل آلودگی را به همراه داشت. توصیه می‌شود در استخراج RNA از این گیاه، مقدار گرم نمونه برگ کمتری استفاده شود. همچنین، بهتر است تیمار DNase در حین انجام کار و قبل از مرحله‌ی افزودن محلول آمونیوم استات صورت گیرد. به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی،

می‌توان با یک مرحله رسوب‌دهی توسط اتانول و انجام سانتریفیوژ مشکل آلودگی را برطرف کرد (Roux., 2009). نمونه‌های RNA پس از بارگذاری بر روی ژل از نظر وجود آلودگی بررسی شدند.



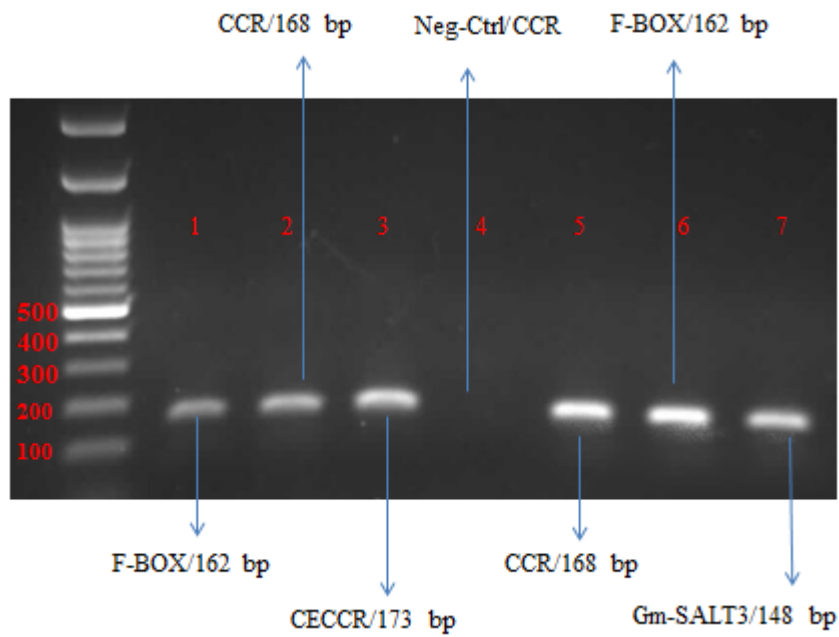
شکل ۴-۴- استخراج RNA از برگ‌های سویا (100 bp+ 3K DNA Ladder)

۴-۳-۲- واکنش نسخه‌برداری معکوس از RNA و ساخت cDNA

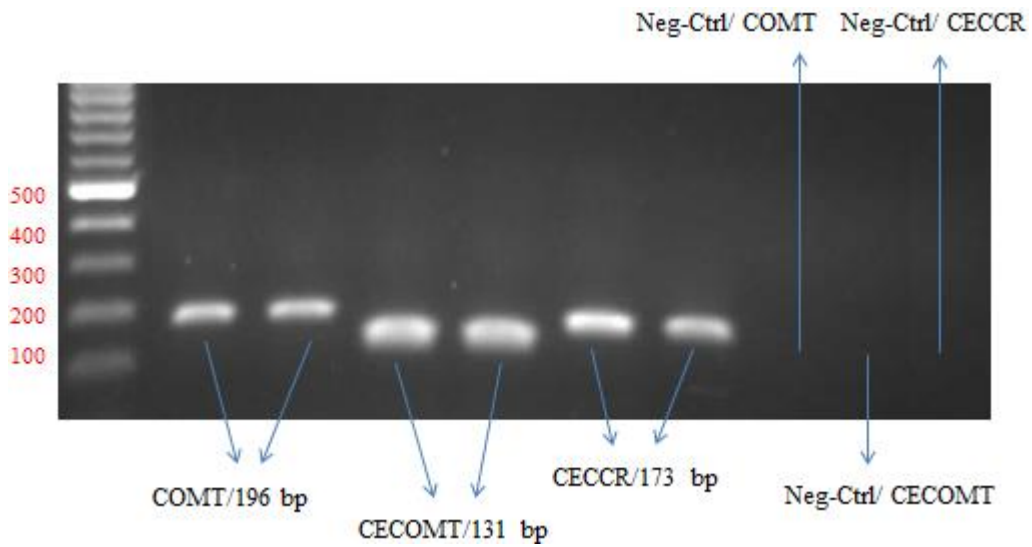
به منظور سنتز cDNA، حدود یک میکروگرم RNA استفاده شد. سپس، محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. cDNA سنتز شده از کیفیت بالایی به منظور استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برخوردار است. وجود برخی ترکیبات، بر روی عملکرد RNA در تکنیک سنتز cDNA تاثیر منفی دارند، زیرا آنزیم رونویسی معکوس به خلوص RNA حساس می‌باشد و در صورتی که RNA کیفیت خوبی نداشته باشد، cDNA سنتز نمی‌شود (Kolossova et al., 2004).

۴-۳-۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

شکل (۴-۵) نتایج واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *F-BOX* به عنوان ژن مرجع، *CCR* و *GmSALT3* به عنوان ژن‌های هدف را در سویا نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، باندهای مورد نظر به خوبی تکثیر شده‌اند. این امر نشان دهنده‌ی تولید cDNA با کمیّت و کیفیت قابل قبول می‌باشد.



شکل ۴-۵- الکتروفورز واکنش PCR بر روی ژل آگارز تحت تنش شوری در گیاه سویا



شکل ۴-۶- الکتروفورز محصولات PCR تحت تنش شوری در گیاه سویا

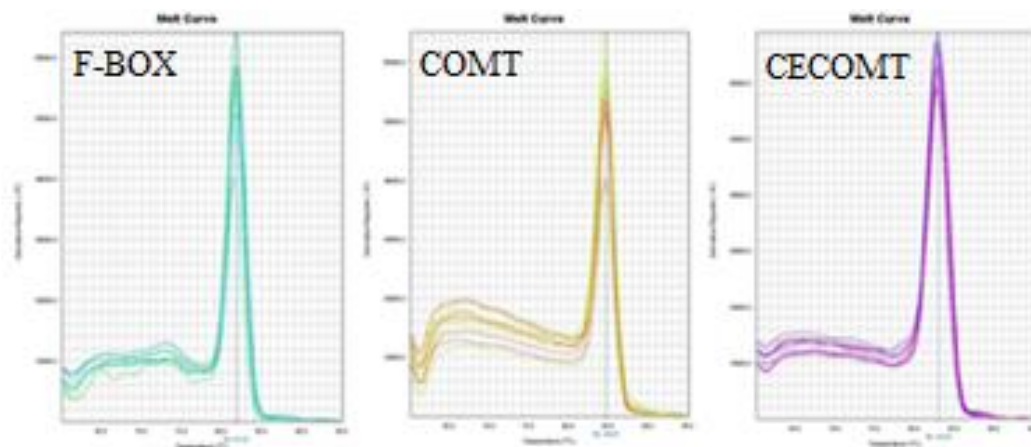
مهم‌ترین عامل در بهینه‌سازی آزمایش، دمای اختصاصی اتصال آغازگر به رشته الگوی DNA

است (Roux., 2009). مطابق شکل (۴-۶) طول باندهای مورد نظر ۱۶۲، ۱۴۸، ۱۶۸، ۱۹۶، ۱۳۱ و ۱۷۳

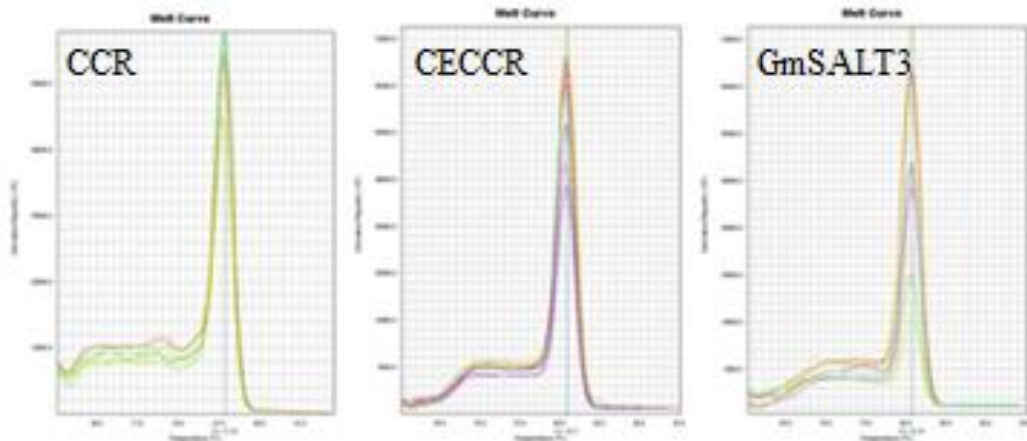
جفت باز، به ترتیب برای آغازگرهای *F-BOX*، *CCR*، *GmSALT3*، *COMT*، *CECOMT* و *CECCR* است.

۴-۳-۴- بررسی منحنی‌های ذوب محصولات Real Time - PCR

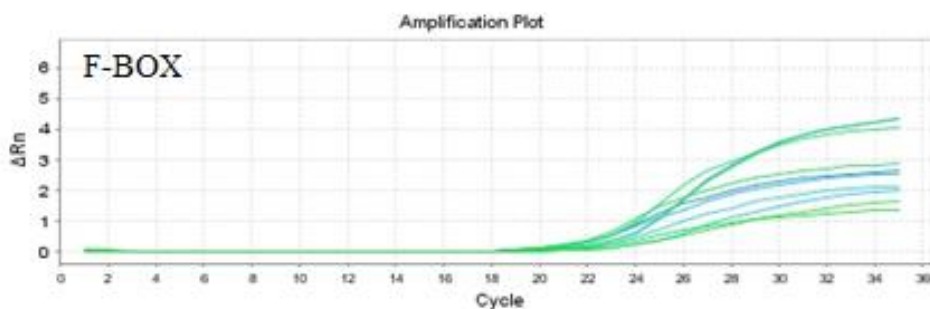
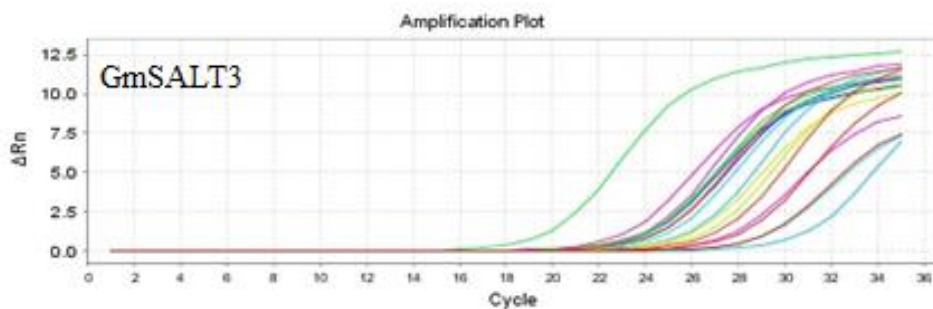
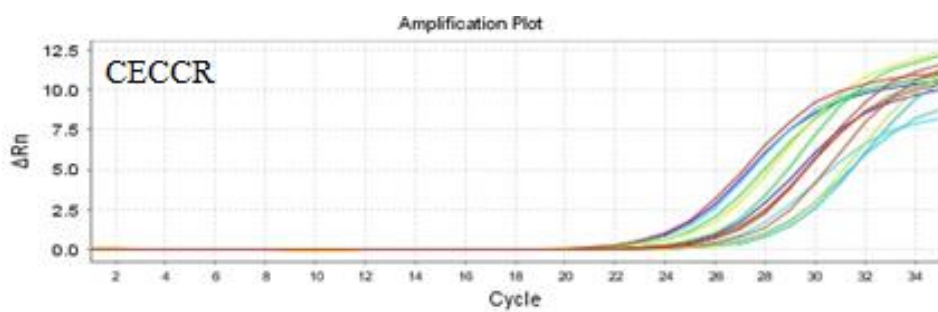
در هر دو مرحله از تکرار آزمایشات، منحنی‌های ذوب ژن‌ها به صورت تک پیک بود. این امر نشان دهنده‌ی عملکرد اختصاصی آغازگرهای طراحی شده و عدم وجود آلودگی در نمونه‌ها می‌باشد. بررسی نمودارهای ژن مرجع *F-BOX* و ژن‌های هدف در مراحل مختلف تکثیر نشان داد که منحنی‌های دمای ذوب از کیفیت مناسبی برخوردار هستند (شکل ۴-۷ و ۴-۸). منحنی‌های تکثیر ژن‌های مورد مطالعه در شکل‌های (۴-۹) و (۴-۱۰) قابل مشاهده است.



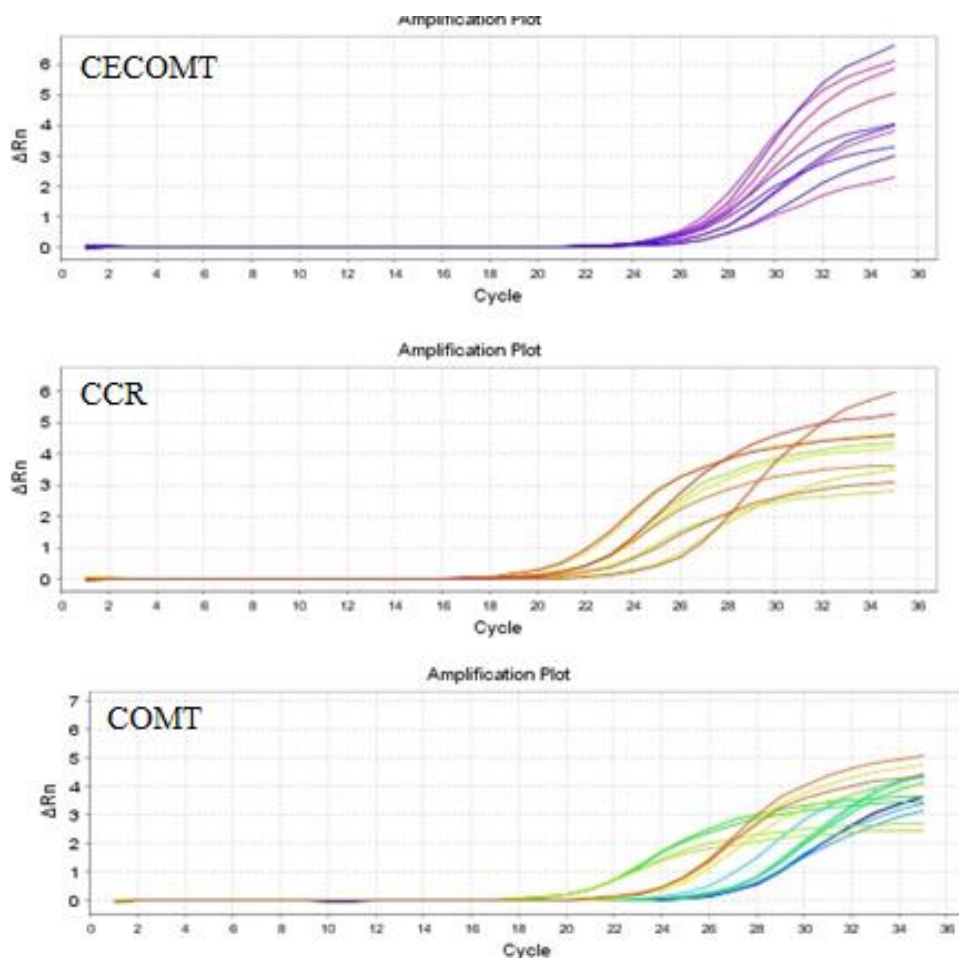
شکل ۴-۷- نمودارهای منحنی ذوب ژن‌ها تحت تنش شوری در گیاه سویا در واکنش Real Time - PCR



شکل ۴-۸- نمودارهای منحنی ذوب ژن‌ها تحت تنش شوری در گیاه سویا در واکنش Real Time - PCR



شکل ۴-۹- منحنی‌های تکثیر ژن‌ها



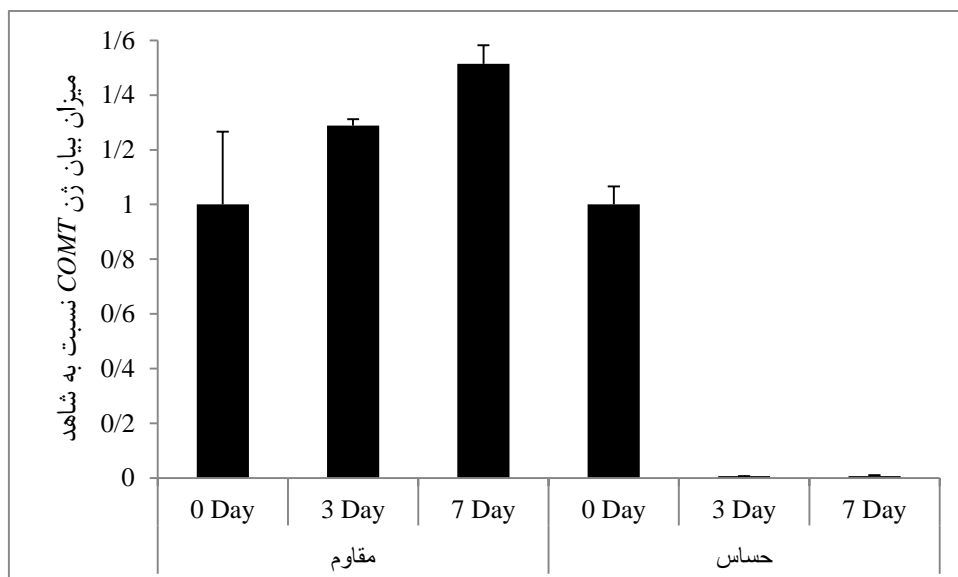
شکل ۴-۱۰- منحنی‌های تکثیر ژن‌ها

۴-۴- بررسی داده‌های حاصل از Real Time PCR در سویا رقم مقاوم و حساس به شوری

بررسی بیان ژن‌های *CECCR*، *CCR*، *CECOMT*، *COMT* و *GmSALT3* تحت تیمار شوری (۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید) در دو بازه‌ی زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار با استفاده از نرم افزار Excel در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. در ادامه به بررسی روند تغییرات بیان ژن پرداخته می‌شود.

۴-۴-۱- الگوی بیان ژن *COMT* در سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری

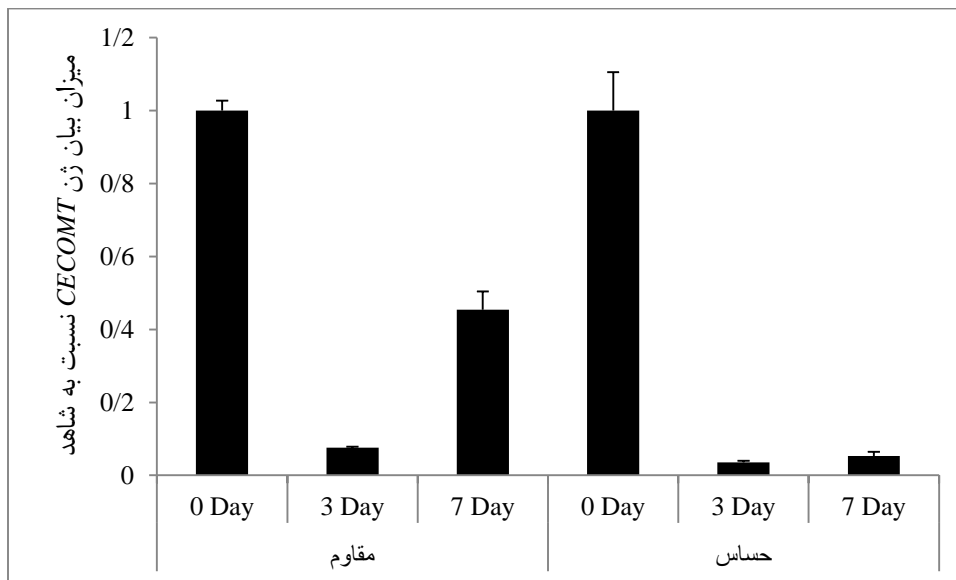
بررسی‌ها نشان داد که در رقم مقاوم، میزان بیان ژن *COMT* در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار شوری (۲۰۰ میلی مولار) به ترتیب $1/28$ و $1/51$ بود، که این میزان افزایش بیان در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۴-۱۱). همچنین مطالعات نشان داد که در رقم حساس به شوری سطوح رونوشت ژن *COMT* در بازه‌های زمانی سه و هفت روز پس از اعمال تیمار به ترتیب $0/006$ و $0/007$ بود که این میزان کاهش بیان در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری را نشان داد.



شکل ۴-۱۱- میزان بیان نسبی ژن *COMT* تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار در برگ‌های سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری.

۴-۲- الگوی بیان ژن *CECOMT* در سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری

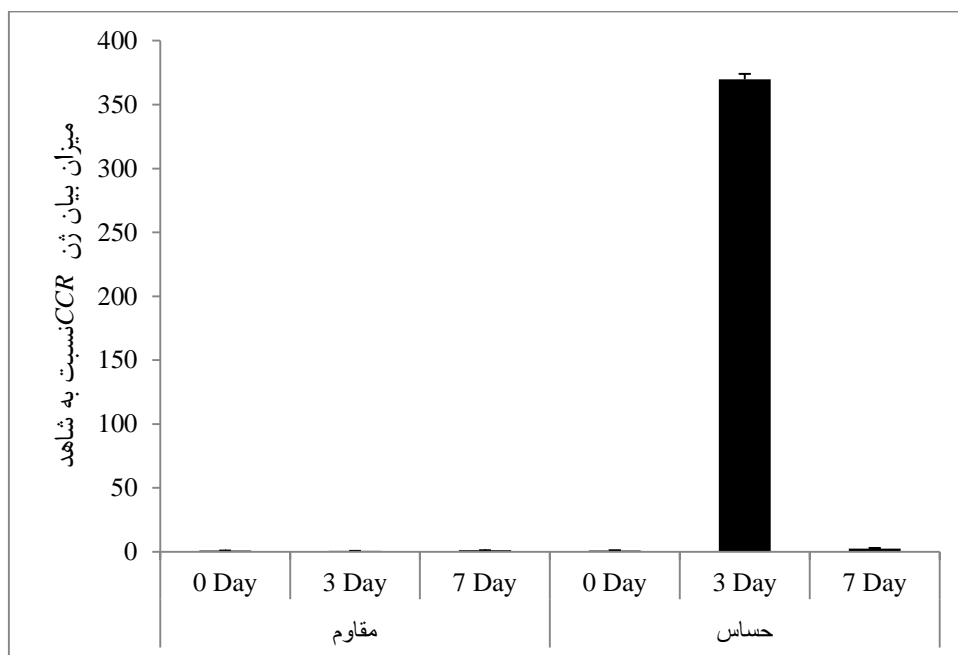
بررسی‌ها نشان داد که سطوح رونوشت ژن *CECOMT* در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار شوری به ترتیب ۰/۰۷ و ۰/۴۵ در رقم مقاوم به شوری بود، که این میزان کاهش بیان در هر دو بازه‌ی زمانی در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴-۱۲). همچنین، مشخص شد که میزان بیان ژن *CECOMT* در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۰۵ در رقم حساس به شوری بود، که این میزان کاهش بیان در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود.



شکل ۴-۱۲- میزان بیان نسبی ژن *CECOMT* تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار در برگ‌های سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری.

۴-۳- الگوی بیان ژن *CCR* در سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری

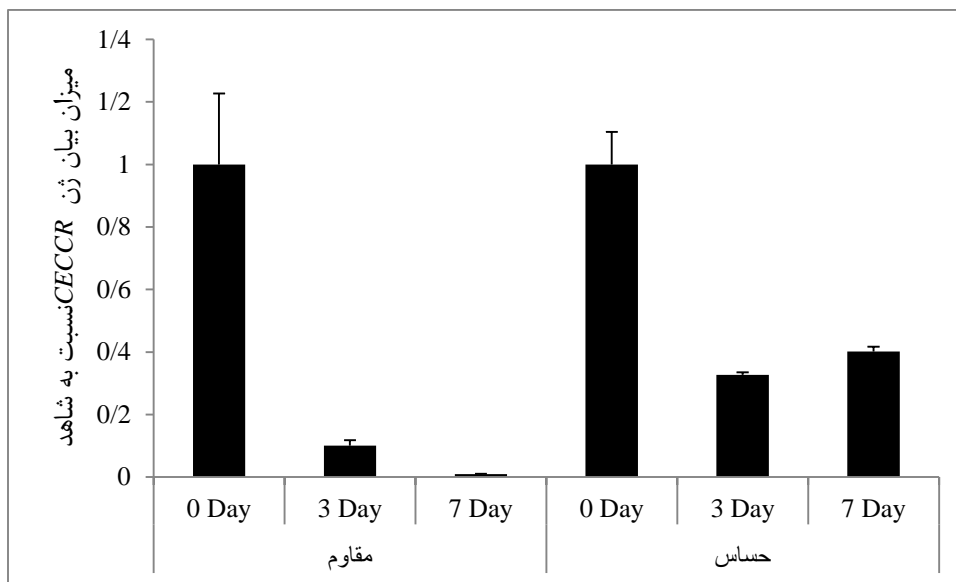
میزان بیان نسبی ژن *CCR* در دو بازه‌ی زمانی سه و هفت روز پس از اعمال تیمار شوری به ترتیب ۰/۶۶ و ۱/۰۸ در رقم مقاوم بود، که این میزان کاهش بیان پس از سه روز در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود و افزایش بیان این ژن پس از هفت روز در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار نبود. همچنین سطوح رونوشت ژن *CCR* در دو بازه‌ی زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال شوری به ترتیب ۳۶۹/۷ و ۲/۳۵ در رقم حساس بود، که این میزان افزایش بیان در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار نبود (شکل ۴-۱۳).



شکل ۴-۱۳- میزان بیان نسبی ژن *CCR* تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار در برگ‌های سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری.

۴-۴-۴- الگوی بیان ژن *CECCR* در سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری

مطالعات نشان داد که سطوح رونوشت ژن *CECCR* در دو بازه‌ی زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار به ترتیب ۰/۱ و ۰/۰۰۹ در رقم مقاوم به شوری بود، که این میزان کاهش بیان در هر دو بازه‌ی زمانی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (شکل ۴-۱۴). همچنین بررسی‌ها نشان داد که میزان بیان ژن *CECCR* در دو بازه‌ی زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار به ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۴ در رقم حساس به شوری بود، که این میزان کاهش بیان در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود.

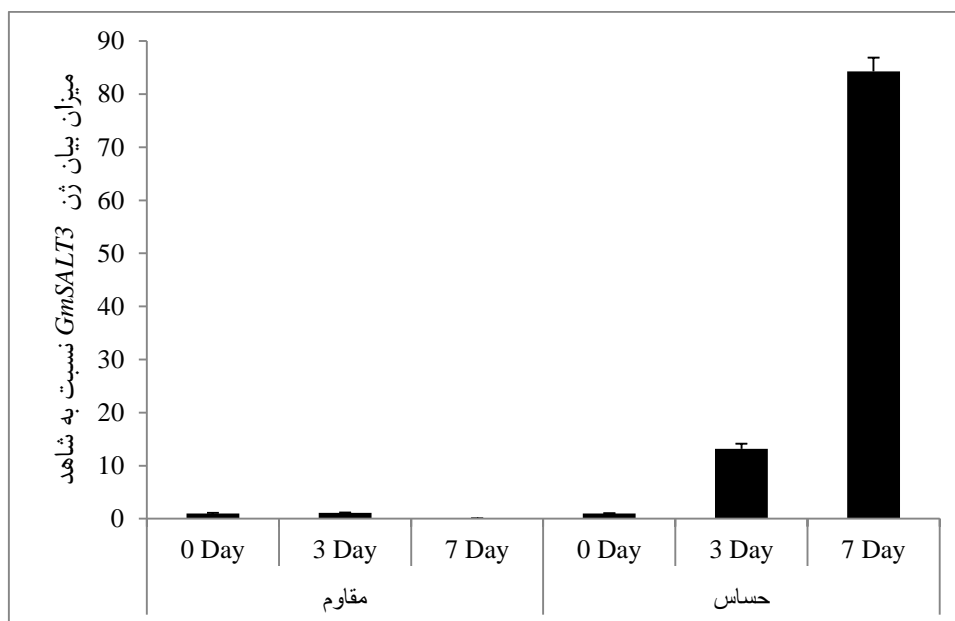


شکل ۴-۱۴- میزان بیان نسبی ژن *CECCR* تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار در برگ‌های سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری.

۴-۴-۵- الگوی بیان ژن *GmSALT3* در سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری

نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی ژن *GmSALT3* در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار به ترتیب ۱/۰۸ و ۰/۰۸ در رقم مقاوم بود، که این میزان افزایش بیان پس از سه روز اعمال تیمار اختلاف معنی‌دار را نشان نداد، در حالی که کاهش بیان این ژن پس از هفت روز اعمال تیمار اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد نشان داد. همچنین میزان بیان ژن *GmSALT3* در

بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار به ترتیب ۱۳/۱۸ و ۸۴/۲۷ در رقم حساس به شوری بود، که این میزان افزایش بیان در هر دو بازه‌ی زمانی در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۴-۱۵).



شکل ۴-۱۵- میزان بیان نسبی ژن *GmSALT3* تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار در برگ‌های سویا رقم‌های مقاوم و حساس به شوری.

مطالعات نشان داده است که بیان ژن *COMT* تحت تنش شوری، نه تنها در جو متحمل به شوری بلکه در سایر گیاهان متحمل به تنش نیز به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Salekdeh et al., 2002; Sugimoto., 2003). نتایج این پژوهش در تناقض با مطالعات سایر پژوهشگران بود، به طوری که در رقم حساس به شوری نمونه‌هایی که تحت تیمار شوری قرار گرفتند، کاهش میزان بیان ژن *COMT* را پس از سه و هفت روز اعمال تیمار نشان دادند. این در حالی است که در رقم مقاوم به شوری میزان بیان ژن *COMT* در بازه‌ی زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار افزایش معنی‌داری نیافت. از آن جایی که ژن *COMT* در مسیر بیوسنتز لیگنین فعالیت می‌کند، بنابراین افزایش بیان ژن

COMT در ریشه‌ی جو متحمل به شوری، از این نظریه حمایت می‌کند که شدت بالای لیگنیفیکاسیون در ریشه‌ی گیاهان متحمل به شوری به کاهش جریان آب عبوری کمک می‌کند. این امر به یون‌های سدیم این امکان را می‌دهد که از طریق یک مسیر آپوپلاستیکی وارد ریشه شده و موجب بهبود تحمل تنش شوری شوند (Lewis and Etsuo., 1990; Jbir *et al.*, 2001; Yeo *et al.*, 1999) در حقیقت، آنزیم *COMT* مرحله‌ی محدود کننده‌ی میزان بیوسنتز مونومر لیگنین را کاتالیز می‌کند (Trabucco *et al.*, 2013). همچنین پژوهش‌ها نشان می‌دهند که تنظیم ژن *COMT* بر ساختار لیگنین تأثیر گذاشت و پیامدهایی برای بیوسنتز پیش ماده‌های سیرینجیل و گویاسیل در مسیر بیوسنتز لیگنین دارد (Tschaplinski *et al.*, 2012). می‌توان گفت از آنجایی که *COMT* یکی از اعضای گروه O - متیل ترانسفرازها برای بیوسنتز لیگنین است، بنابراین افزایش بیان این ژن منجر به افزایش لیگنیفیکاسیون و در نتیجه بهبود تحمل گیاه در برابر شوری می‌شود. به طور کلی در این پژوهش میزان بیان ژن *COMT* در نمونه‌های رقم حساس نه تنها افزایش نمی‌یابد، بلکه تحت تأثیر تیمار آزمایش کاهش بیان نیز نشان می‌دهد.

مطالعات صورت گرفته نشان داده‌اند که می‌توان با استفاده از هم بیانی محافظت شده در ترکیب با داده‌های همولوژی، عملکرد ژن‌ها را پیش‌بینی کرد (van *et al.*, 2003). گزارش شده است که ژن‌هایی با الگوهای بیان mRNA مشابه و ژن‌هایی با عملکردهای مشابه، احتمالاً از طریق مکانیسم‌های یکسانی تنظیم می‌شوند (Allocco and Butte., 2004). از آنجایی که ژن‌ها و محصولات پروتئینی آن‌ها بر اساس فرآیندهای سلولی و مسیرها به مازول‌های عملکردی سازماندهی می‌شوند. به همین دلیل برای توصیف روابط بین رونوشت‌های ژن از شبکه‌های هم بیانی ژن استفاده می‌شود (Langfelder and Horvath., 2007). گزارش شده است که هم بیانی محافظت شده‌ی ژن‌های فرضی *CAT5* و *COQ2*، پیش‌بینی‌های قبلی بر اساس آزمایشات حذفی^۱ و روابط همولوژی را تأیید می‌کند. این هم بیانی محافظت شده نشان می‌دهد که *CAT5* در سنتز یوبیکوئینون نقش دارد، همان طور که *COQ2* در

¹ Knock-out

رمزگذاری پلی‌پرنیل ترانسفراز^۱ مشارکت دارد و این آنزیم نیز در سنتز یوبیکوئینون دخیل است (Rea., 1996; Marbois and Clarke., 2001). بنابراین می‌توان با تکیه بر داده‌های هم‌بیانی به نتایج ارزشمندی در رابطه با بیان ژن و عملکرد ژن‌های ناشناخته پرداخت. از آنجایی‌که *LOC100789621/CECOMT* رمزکننده‌ی پروتئین مشابه چاپرون BCS1 میتوکندریایی^۲ است؛ در نتیجه می‌تواند در زنجیره‌ی تنفسی میتوکندریایی فعالیت کند و به این ترتیب از طریق مکانیسم‌های سلولی و تعاملات خود با سایر اجزای سلولی بیان ژن را کنترل کند. به طور کلی نتایج نشان داد که میزان بیان ژن *CECOMT* در سویا رقم مقاوم و حساس به شوری در دو بازه‌ی زمانی سه و هفت روز کاهش معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد نشان داد.

در منابع گزارش‌های متناقضی در رابطه با تأثیر تیمار شوری بر میزان بیان ژن *CCR* وجود دارد. الگوی بیانی پروتئین *CCR* نشان دهنده‌ی یک الگوی لیگنیفیکاسیون در توسعه‌ی ریشه و ساقه در شرایط تنش است. افزایش لیگنیفیکاسیون در ساقه‌های تیمار شده با مانیتول مشاهده شده است. در این شرایط تجمع پروتئین *CCR* نیز بالاتر از نمونه‌های شاهد و تحت تنش شوری بود. در مقابل، میزان پروتئین *CCR* در ساقه‌های تحت تیمار شوری و رسوب لیگنین کم بود. بافت ریشه‌ی در حال رشد نیز سطح بالایی از مقدار *CCR* و رسوب لیگنین را نسبت به نمونه‌های ساقه تحت هر شرایط آزمایش نشان داد (Srivastava *et al.*, 2015). بیان ژن *CCR* می‌تواند منجر به کاهش میزان لیگنین و تجمع پیش‌ماده‌های مونولیگنول شود (Tu, Yi, *et al.*, 2010; Van der Rest *et al.*, 2006; Dauwe *et al.*, 2007).

همچنین گزارش‌ها حاکی از آن است که تحت تنش‌های مختلف، بیان *PgCCR* در ریشه‌ها از طریق تنش‌های مختلف غیر زیستی به میزان زیادی القا می‌شود و این ژن نقش محافظتی در برابر تنش‌های محیطی دارد (Parvin *et al.*, 2008). علاوه بر این نشان داده شده است که رسوب لیگنین در

¹ Polyphenyl transferase

² Mitochondrial chaperone BCS1-like

پاسخ به شوری در بافت‌های آوندی ریشه‌ی لوبیا افزایش می‌یابد (Cachorro *et al.*, 1993). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که افزایش غلظت سدیم کلراید باعث کاهش سطوح لیگنین ریشه در گیاهچه‌های برنج می‌شود (Lin and Kao., 2001). به طور کلی، فعالیت *CCR* در گیاهان کم است، این امر، نشان می‌دهد که این مرحله‌ی آنزیمی ممکن است نقطه‌ی کنترل کننده‌ی مهمی باشد که تغییرات را برای مونومرهای لیگنین تنظیم می‌کند (Grima-Pettenati *et al.*, 1989; Lacombe *et al.*, 1997). در این پژوهش میزان بیان ژن *CCR* در سویا رقم مقاوم به شوری در بازه‌ی زمانی سه روز بعد از اعمال تیمار کاهش معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد یافت. نتایج این پژوهش در تناقض با نتایج پژوهشگران دیگر است که نشان دادند بیان ژن *PgCCR* در ریشه‌ی گیاه جینسینگ^۱ تحت تنش شوری به میزان زیادی افزایش می‌یابد (Parvin *et al.*, 2008).

مطالعات نشان می‌دهند که شبکه‌های هم‌بیانی ژن متشکل از داده‌های ریزآرایه‌ی بیان ژن، روابط بین رونوشت‌های mRNA را شناسایی می‌کنند که پروفایل بیان آن‌ها بسیار مشابه است (Horvath *et al.*, 2006; Carlson *et al.*, 2006)، بنابراین می‌توان با تکیه بر داده‌های ریزآرایه اطلاعات کاملی از نحوه‌ی تعامل و همکاری ژن‌های مختلف در مسیرهای بیولوژیکی و شبکه‌های ژنی بدست آورد. در پژوهش حاضر نیز میزان بیان ژن *CECCR* در هر دو رقم مقاوم و حساس به شوری در دو بازه‌ی زمانی سه و هفت روز پس از اعمال تیمار کاهش معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد نشان داد. علاوه بر این، بررسی‌ها نشان داد که نتیجه‌ی پژوهش حاضر در تناقض با گزارش پژوهشگران دیگر است که اظهار داشتند، بیان *GmSALT3* در رقم مقاوم سویا (Tiefeng8) بسیار بیشتر از رقم حساس به شوری (Mayibao) تحت تنش ۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید در ریشه است (Yu *et al.*, 2015)، بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که به دلیل متفاوت بودن اندام مورد بررسی (برگ) و یا رقم متفاوت گیاه،

¹ Panax ginseng CA Meyer

این اختلاف نظر وجود دارد و این که احتمالاً ژن‌ها پاسخ‌های متفاوتی در اندام‌های مختلف گیاه به تنش می‌دهند.

همچنین گزارش شده است که بررسی تأثیر عملکرد ژن *GmSALT3* در مزرعه با شرایط نرمال، اختلاف معنی‌داری برای صفات مرتبط با عملکرد در لاین‌های مقاوم و حساس به شوری در سویا نشان نداد. این امر نشان می‌دهد هیچ عملکرد قابل مشاهده‌ای برای ژن *GmSALT3* در شرایط شاهد وجود ندارد. در مقابل، در مزرعه با شرایط شوری، لاین‌های مقاوم به شوری به طور معنی‌داری دارای وزن بذر بیشتری نسبت به لاین‌های حساس به شوری بودند، به این معنی که ژن *GmSALT3* باعث افزایش عملکرد سویا در مزارع شور می‌شود (Qu, Y. 2018). از آن جایی که ژن *GmSALT3* واسطه‌ی تنظیم تجمع سدیم و کلر در سویا است و از طریق حفظ وزن بیشتر دانه در شرایط تنش شوری به بهبود عملکرد سویا کمک می‌کند (Liu et al., 2016). از آن جایی که بررسی تأثیر عملکرد ژن *GmSALT3* بر روی سویا تحت تیمار شوری نشان داده است که لاین‌های مقاوم به شوری به طور معنی‌داری دارای وزن بذر بیشتری نسبت به لاین‌های حساس به شوری بودند، بنابراین می‌توان گفت که این ژن موجب افزایش عملکرد سویا در مزارع شور می‌شود. از آن جایی که تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نیز نشان داده‌اند، بیان ژن *GmSALT3* توسط فاکتورهای مختلفی تنظیم می‌شود؛ بنابراین می‌توان اظهار داشت که مکانیسم‌های تنظیمی بین دو رقم سویا متفاوت هستند (Yu et al., 2015).

نتیجه‌گیری کلی

مطالعات نشان داد که در شبکه‌ی هم‌بیانی ژن‌های برنج، ژن‌هایی که به میزان زیادی هم‌بیان بودند، در فرآیندهای بیولوژیکی مشابهی مشارکت می‌کردند. همچنین نتایج حاصل از آنالیز نواحی پرموتری نشان داد که به طور کلی، موتیف‌ها و عناصر شناسایی شده، از جمله *G-Box*، *GATA-motif*

ARE، *GC-motif*، *MRE*، *chs-CMA1a*، *TCT-motif*، *Box 4*، *MBS*، *A-box*، *J-box*، *GT1-motif*، و *TC-rich repeats* عملکردهای مهمی در پاسخ به تنش‌هایی از جمله آبسیزیک اسید، سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید و عملکردهای سلولی در سطوح رونویسی و بیان اندوسپرم دارند. به طور کلی بر اساس نتایج این پژوهش، تیمار شوری تأثیر قابل توجهی بر میزان بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین، شامل *CCR* و *COMT* و همچنین ژن‌های هم بیان حاصل از مطالعات بیوانفورماتیکی، شامل *CECCR* و *CECOMT* و ژن تحمل به شوری در سویا، یعنی *GmSALT3* در بازه‌های زمانی سه و هفت روز بعد از اعمال تیمار شوری ۲۰۰ میلی مولار سدیم کلراید داشت. از این رو می‌توانیم از طریق انتقال ژن‌های مناسب تحمل گیاهان را در شرایط تنش شوری افزایش داده و شاهد افزایش عملکرد محصول باشیم.

پیشنهادات

- ۱- میزان بیان تعداد بیشتری از ژن‌های هم بیان در شبکه‌ی ژنی بررسی گردد.
- ۲- بررسی بیان پروتئین‌های حاصل از بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز لیگنین جهت آزمایشات تکاملی انجام گیرد.
- ۳- از غلطت‌ها و تیمارهای دیگری، از جمله سالیسیلیک اسید استفاده گردد.

پیوست‌ها

۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز جهت استخراج RNA:

- بافرهای شماره‌ی یک و دو، ایزوپروپانول، اتانول ۱۰۰ درصد، اتانول ۷۰ درصد، آب دی‌پس^۱ شرکت زیست فرآیند ارشیا، بافر (10 X) Dnase، آنزیم دی‌اکسی‌ریبو نوکلئاز I^۲ شرکت زیست فرآیند ارشیا (EURx) و آمونیوم استات
 - دستکش، ماسک، هاون و دسته هاون چینی، میکروتیوب ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌لیتر، سمپلر، ازت مایع، نمونه‌های برگ‌ی، سر سمپلر کریستالی، زرد و آبی، سانتریفیوژ مدل 5810 R ساخت اپندورف آلمان، رک میکروتیوب، سطل زباله
- بافرهای شماره یک (شامل: سدیم دو دسیل سولفات دو درصد، ۶۸ میلی مولار سدیم سیترات، ۱۳۲ میلی مولار سیتریک اسید و ۱ میلی مولار اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) و بافر شماره دو (شامل: ۴ مولار سدیم کلراید، ۱۶ میلی مولار سدیم سیترات و ۳۲ میلی مولار سیتریک اسید) طبق پروتکل تهیه شدند.

۳-۱-۱- روش کار

ابتدا میزان کافی از نمونه (تقریباً ۳۰ میلی‌گرم) را به همراه مقدار کمی ازت مایع درون هاون چینی ساییده تا به شکل پودر درآید. سپس، پودر حاصل را درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل کرده و به میزان ۳۰۰ میکرولیتر از بافر شماره یک را به آن اضافه می‌کنیم. به مدت ۵ ثانیه ورتکس می‌کنیم تا به طور یکنواخت مخلوط و همگن شود. سپس، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌کنیم. به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر شماره دو را به مخلوط درون میکروتیوب اضافه می‌شود. سپس،

¹ DiEthylPyroCarbonate (DEPC)

² Deoxyribonuclease I (DNase I)

به آرامی ۱۵ مرتبه با دست آن را وارونه و بالعکس^۱ می‌کنیم. به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار می‌گردد. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم.

مایع رویی^۲ را به میکروتیوب جدید منتقل می‌کنیم. سپس، به میزان ۳۰۰ میکرولیتر از ایزوپروپانول خیلی سرد را به آن اضافه می‌کنیم. به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ نگهداری می‌کنیم. سپس، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. مایع رویی را به آرامی تخلیه می‌کنیم (به طوری که تنها رسوب انتهایی میکروتیوب باقی بماند). رسوب را دو مرتبه با اتانول ۷۰ درصد شست و شو می‌دهیم. سپس، به میزان ۲۵ میکرولیتر از آب دیس را به رسوب اضافه می‌کنیم. به میزان ۳ میکرولیتر بافر DNase (10 X) و ۲ میکرولیتر Dnase I را اضافه می‌کنیم. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم.

آب دیس به میزان ۷۰ میکرولیتر به مخلوط درون میکروتیوب (۳۰ میکرولیتر) اضافه می‌کنیم. سپس، به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول آمونیوم استات را اضافه می‌کنیم. در مرحله بعد، به میزان ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد را به میکروتیوب اضافه می‌کنیم. سپس، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. مایع رویی را به طور کامل و با احتیاط تخلیه می‌کنیم و رسوب را با الکل ۷۰ درصد شستشو می‌دهیم. سپس، رسوب را به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه بر روی دستمال کاغذی استریل در مجاورت هوا خشک می‌کنیم. رسوب ته میکروتیوب را در ۲۰ میکرولیتر آب دیس حل می‌کنیم و در یخچال ۸۰- نگهداری می‌کنیم.

¹ invert

² supernatant

۳-۱-۲- الکتروفورز RNA استخراج شده از برگ‌ها

۳-۱-۲-۱- تهیه بافر TBE (تریس / بورات / EDTA)

به منظور تفکیک مولکول‌ها بر اساس اندازه، بار الکتریکی و شکل از میان یک شبکه‌ی متخلخل، از الکتروفورز استفاده شد. بافر TBE جهت الکتروفورز در ژل‌های آگارز و آکریل آمید استفاده می‌شود. این بافر متشکل از تریس باز^۱، بوریک اسید و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید است. جهت تهیه ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول استوک ۰/۵ مولار EDTA، مقدار ۹۳/۰۶ گرم از EDTA را وزن کرده و در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل می‌کنیم. مقدار pH را روی ۸ تنظیم می‌کنیم. سپس، محلول را به حجم نهایی ۵۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. غلظت (5X) بافر استوک از TBE را با توزین ۵۴ گرم تریس باز و ۲۷/۵ گرم بوریک اسید تهیه می‌کنیم. این دو ماده را در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل می‌کنیم. سپس، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۵ مولار را اضافه می‌کنیم. محلول را به حجم نهایی یک لیتر رسانده و اتوکلاو می‌کنیم. به طور کلی، برای انجام الکتروفورز از بافر (0.5X) TBE استفاده شد. بدین ترتیب، پس از استخراج RNA به منظور بررسی کیفیت آن، ۳ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. دستگاه بر روی ولتاژ ۱۲۰ ولت تنظیم شد و به مدت ۲۰ دقیقه بارگذاری صورت گرفت. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از رنگ ایمن Gel Stain SMOBIO و رنگ‌آمیزی نمونه‌های RNA با استفاده از (5X) Loading Dye انجام شد.

۳-۱-۳- اسپکتروفتومتری و بررسی کیفیت و کمیّت RNA

برای محاسبه غلظت RNA از نانودراپ استفاده شد. میزان جذب RNAها در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. مقدار این نسبت که نشان دهنده‌ی نسبت اسیدنوکلئیک به پروتئین است،

¹ tris base

بین ۱/۸-۲ بود. از آن جایی که از هر نمونه‌ی بیولوژیک تعداد سه تکرار (تکنیکال) استخراج شده بود؛ بنابراین، در این مرحله نمونه‌های با غلظت و کیفیت نامناسب حذف شدند. نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ پایین‌تر از ۱/۸ نشان دهنده‌ی آلودگی پروتئین می‌باشد، که احتمالاً به دلیل استفاده بیشتر از نمونه مورد نظر در فرآیند استخراج می‌باشد. اگر این نسبت بیشتر از ۲ باشد، نشان دهنده‌ی آلودگی اسیدنوکلئیک است. همچنین، نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر نیز حائز اهمیت است و آلودگی فنول- کلروفرم را نشان می‌دهد. این نسبت بایستی بیشتر از ۲ باشد. نسبت‌های پایین‌تر از ۱/۸ نشان دهنده‌ی آلودگی نمک یا پلی ساکاریدها می‌باشد. برای رفع این مشکل نیز می‌توان چندین بار مرحله‌ی شست و شو با الکل ۷۰ درصد را تکرار کرد.

جدول پیوست ۳-۱- عناصر تشکیل دهنده‌ی محلول هوگلند (Hoagland and Arnon., 1950).

عناصر ماکرو	محلول استوک	یک لیتر/ میلی لیتر محلول استوک
2M KNO ₃	۲۰۲ g/L	۲/۵
1M Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	۲۳۶ g/۰/۵L	۲/۵
Iron	۱۵ g/L	۱/۵
2M MgSO ₄ .7H ₂ O	۴۹۳ g/L	۱
1M NH ₄ NO ₃	۸۰ g/L	۱
عناصر میکرو	محلول استوک	یک لیتر/ میلی لیتر محلول استوک
H ₃ BO ₃	۲/۸۶ g/L	۱
MnCl ₂ .4H ₂ O	۱/۸۱ g/L	۱
ZnSo ₄ .7H ₂ O	۰/۲۲ g/L	۱
CuSo ₄ .5H ₂ O	۰/۰۵۱ g/L	۱
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	۰/۰۹ g/L	۱

جدول پیوست ۴-۱- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن *LOC100803633* در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه در گیاه سویا

جایگاه	عملکرد
LOC100789621	mitochondrial chaperone BCS1-like
LOC100499981	uncharacterized LOC100499981
LOC100778920	probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g24230-like
IPK2	inositol polyphosphate 6-/3-/5-kinase
LOC100527158	uncharacterized LOC100527158

جدول پیوست ۴-۲- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن *LOC100789621* در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه در گیاه سویا

جایگاه	عملکرد
LOC100785070	mitochondrial chaperone BCS1-like
LOC100802569	ethylene response sensor 1-like
BZIP125	bZIP transcription factor bZIP125
LOC100803633	caffeic acid 3-O-methyltransferase-like
LOC100792444	maf-like protein DDB_G0281937-like
LOC100775944	histone H1-like
LOC100790421	uncharacterized LOC100790421
LOC100776534	U-box domain-containing protein 9-like

جدول پیوست ۴-۳- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن *LOC100803241* در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه در گیاه سویا

جایگاه	عملکرد
LOC100807054	(S)-coclaurine N-methyltransferase-like
LOC100808668	probable plastid-lipid-associated protein 10, chloroplastic-like
LOC100779579	protein anoxia up-regulated-like
LOC100775556	short-chain dehydrogenase TIC 32, chloroplastic-like
LOC100805558	hypersensitive-induced response protein 1-like
LOC100806333	protein ZINC INDUCED FACILITATOR-LIKE 1-like

جدول پیوست ۴-۴- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن *LOC100805558* در شبکه‌ی هم بیانی در سویا

جایگاه	عملکرد/ ریزآرایه
LOC100789294	39S ribosomal protein L24, mitochondrial-like
LOC100789278	probable iron/ascorbate oxidoreductase DDB_G0283291-like
LOC100803241	dihydroflavonol-4-reductase-like
جایگاه	عملکرد / (RNAseq)
LOC100817309	probable polygalacturonase-like
LOC548073	S-adenosyl-L-methionine:delta24-sterol-C-methyltransferase
LOC100797579	uncharacterized LOC100797579

جدول پیوست ۴-۵- عملکرد و جایگاه ژن‌های *LOC4331197* و *LOC4344702*

جایگاه	عملکرد
Os02g0823400	Similar to S-adenosyl-L-methionine: beta-alanine N-methyltransferase (Fragment).
Os08g0157500	Similar to Caffeic acid 3-O-methyltransferase (EC 2.1.1.68) (S-adenosyl-L-methionine:caffeic acid 3-O-methyltransferase).

جدول پیوست ۴-۶- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن *LOC4331197* / *Os02g0823400* در شبکه‌ی هم بیانی در برنج

جایگاه	عملکرد/ ریزآرایه
Os03g0628800	Conserved hypothetical protein.
Os05g0594500	Invasin/intimin cell-adhesion domain containing protein.
Os01g0881300	MtN3 and saliva related transmembrane protein family protein.
جایگاه	عملکرد / (RNAseq)
Os08g0484700	Homeodomain-like containing protein.
Os07g0112100	Similar to Dimethylaniline monooxygenase -like protein.
Os03g0799000	Similar to Histone H1.

جدول پیوست ۴-۷- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن *LOC4344702/Os08g0157500* در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های ریزآرایه در گیاه برنج

جایگاه	عملکرد	جایگاه	عملکرد
Os02g0177600	Similar to 4-coumarate--CoA ligase 1 (4-coumaroyl-CoA synthase 1)	Os03g0389700	Similar to M-160-u1_1 (Fragment).
Os02g0187800	Cinnamyl alcohol dehydrogenase.	Os10g0180000	NpGUT1 homolog.
Os07g0107300	Plant disease resistance response protein.	Os05g0494000	Similar to Cytochrome P450 98A1 (EC 1.14.-.-).
Os05g0135700	S-adenosylmethionine synthetase 1 (Methionine adenosyltransferase 1).	Os01g0953600	NADPH-dependent FMN reductase family protein.
Os03g0815200	Similar to Methylenetetrahydrofolate Reductase	Os01g0291500	Transferase family protein.
Os01g0878800	Similar to 4,5-DOPA dioxygenase extradiol.	Os04g0448300	Peptidase A1, pepsin family protein.
		Os04g0640600	Shikimate kinase domain containing protein.
		Os01g0273800	FAD dependent oxidoreductase family protein.

جدول پیوست ۴-۸- عملکرد ژن‌های در ارتباط مستقیم با ژن *LOC4344702/Os08g0157500* در شبکه‌ی هم بیانی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی RNA در گیاه برنج

جایگاه	عملکرد
Os03g0367200	Similar to Flavonoid 3',5'-hydroxylase (EC 1.14.13.88) (F3'5'H) (Cytochrome P450 75A2) (CYPLXXVA2) (P-450EG1).
Os08g0441500	Similar to Cinnamoyl-CoA reductase.
Os06g0214800	Esterase/lipase/thioesterase domain containing protein.
Os07g0107300	Plant disease resistance response protein family protein.
Os04g0518200	Phenylalanine ammonia-lyase.
Os02g0151300	Similar to Cellulase (Fragment).
Os06g0664300	Similar to Vacuolar sorting receptor 6 precursor (AtVSR6) (Epidermal growth factor receptor-like protein 6) (AtELP6) (BP80-like protein d) (AtBP80d).
Os12g0580400	Amino acid/polyamine transporter I family protein.
Os01g0562600	Protein of unknown function DUF247, plant family protein.
Os01g0273800	FAD dependent oxidoreductase family protein.
Os12g0145200	Similar to Protein MONOCULM 1.
Os03g0400200	Plant disease resistance response protein family protein.

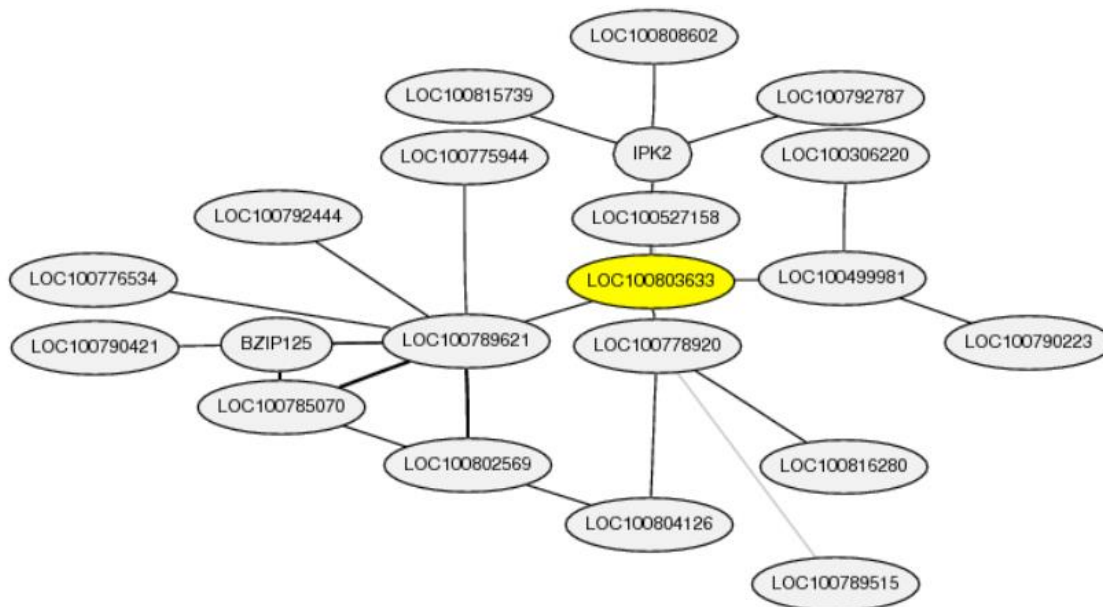
جدول پیوست ۴-۹- توالی مهم‌ترین موتیف‌ها در ناحیه‌ی پروموتوری ژن *LOC4341560* در برنج

اسم جایگاه	موجود	توالی	اسم جایگاه	موجود	توالی
A-box	<i>Petroselinum crispum</i>	CCGTCC	GATA-motif	<i>Pisum sativum</i>	GATAGGG
ABRE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ACGTG	GC-motif	<i>Zea mays</i>	CCCCCG
Box 4	<i>Petroselinum crispum</i>	ATTAAT	I-box	<i>Solanum tuberosum</i>	TGATAATGT
CAAT-box	<i>Pisum sativum</i>	CAAAT	MBS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAACTG
CAT-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GCCACT	MRE	<i>Petroselinum crispum</i>	AACCTAA
CCAAT-box	<i>Hordeum vulgare</i>	CAACGG	TATA-box	<i>Helianthus annuus</i>	TATAAA
CGTCA-motif	<i>Hordeum vulgare</i>	CGTCA	TCT-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TCTTAC
G-box	<i>Zea mays</i>	CACGAC	TGACG-motif	<i>Hordeum vulgare</i>	TGACG
GARE-motif	<i>Brassica oleracea</i>	TCTGTTG			

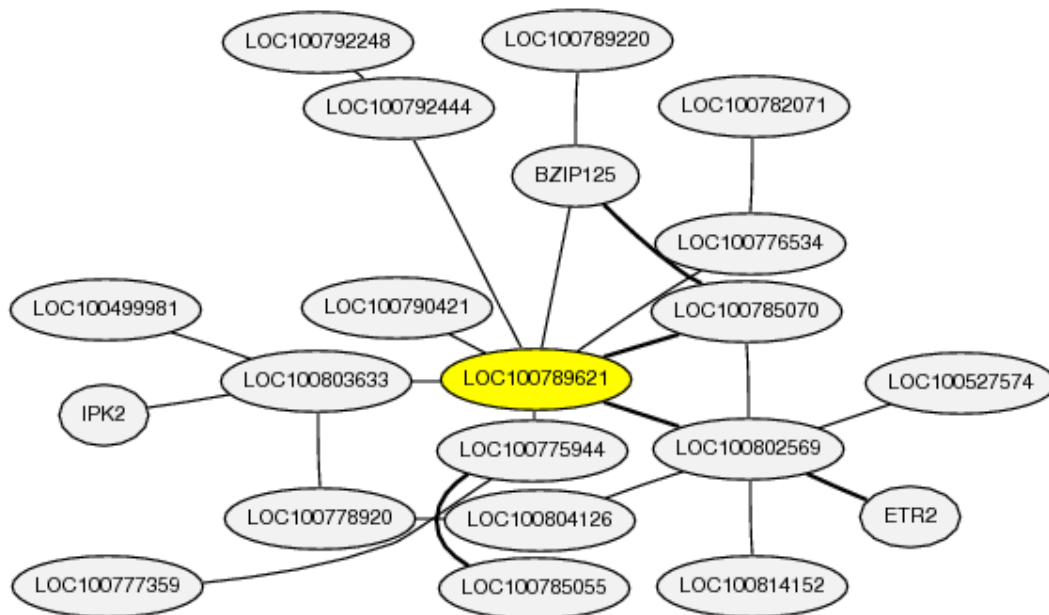
جدول پیوست ۴-۱۰- توالی مهم‌ترین موتیف‌ها در ناحیه‌ی پروموتوری ژن *LOC100803241* در سویا

اسم جایگاه	موجود	توالی
ARE	<i>Zea mays</i>	AAACCA
Box 4	<i>Petroselinum crispum</i>	ATTAAT
CAAT-box	<i>Pisum sativum</i> , <i>Nicotiana glutinosa</i>	CAAAT, CAAT
CGTCA-motif	<i>Hordeum vulgare</i>	CGTCA
G-box	<i>Brassica oleracea</i>	TAACACGTAG
GCN4_motif	<i>Oryza sativa</i>	TGAGTCA
GT1-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GGTTAA
MBSI	<i>Petunia hybrida</i>	aaaAaaC(G/C)GTTA
TATA-box		TATAAATA, TATA
TC-rich repeats	<i>Daucus carota</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	GTTTTCTTAC
TCT-motif	<i>Nicotiana tabacum</i>	TCTTAC
TGACG-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TGACG
chs-CMA1a	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Daucus carota</i>	TTACTTAA

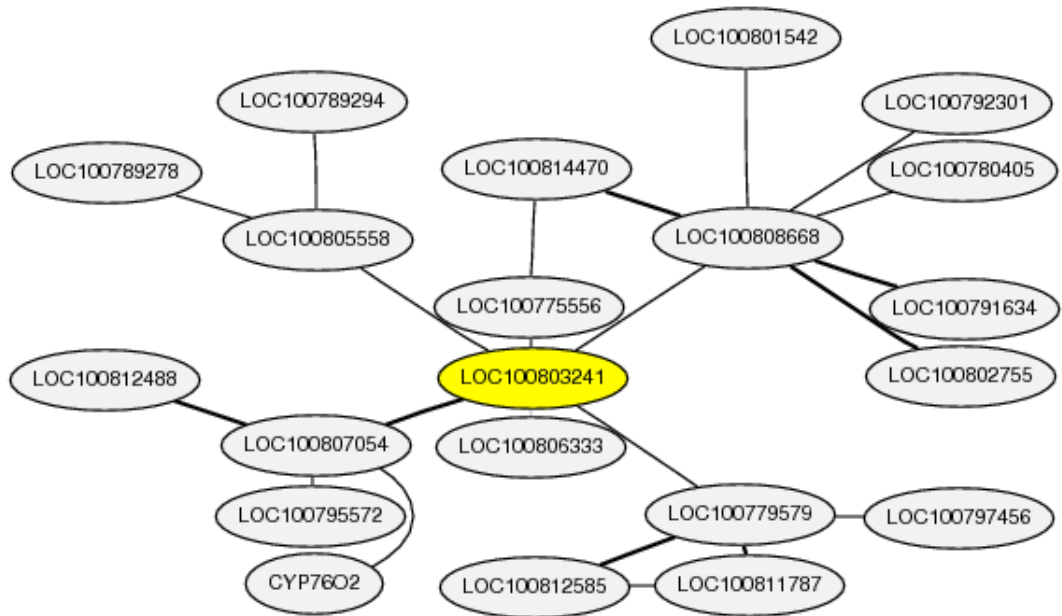
اشکال پیوست



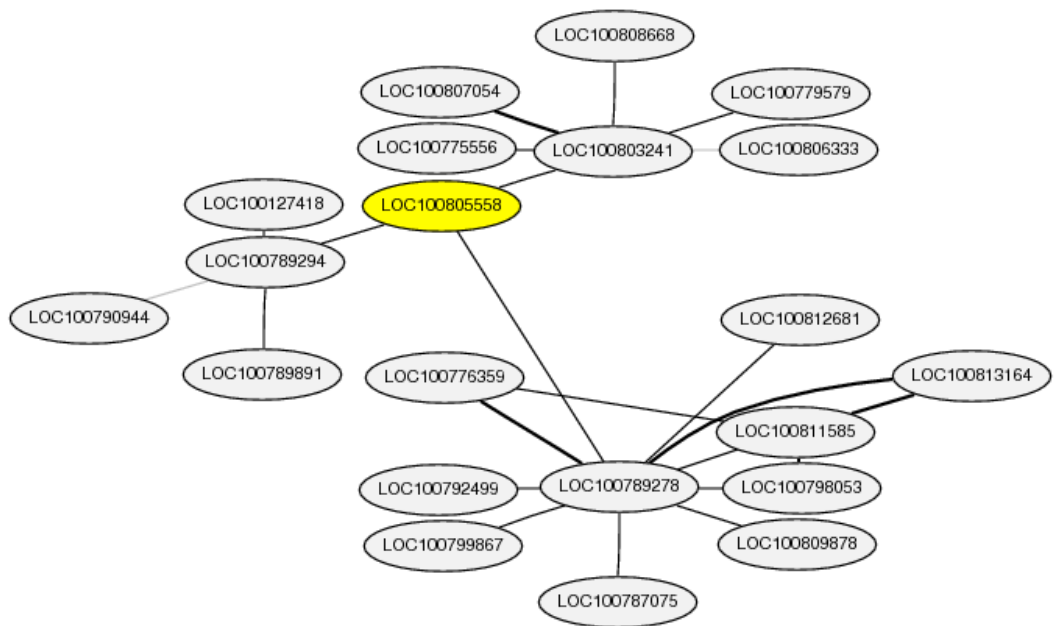
شکل پیوست ۴-۱- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *LOC100803633* در سویا با استفاده از پایگاه ATTED-II



شکل پیوست ۴-۲- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *LOC100789621* در سویا با استفاده از پایگاه ATTED-II



شکل پیوست ۳-۴- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *LOC100803241* در سویا با استفاده از پایگاه ATTED-II



شکل پیوست ۴-۴- تصویر شبکه‌ی هم بیانی ژن *LOC100805558* در سویا با استفاده از پایگاه ATTED-II

1. Aghaei, K., A. A. Ehsanpour, A. H. Shah, and S. Komatsu. (2009). "Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress." *Amino acids* 36(1): 91-98.
2. Allocco, D. J., Kohane, I. S., & Butte, A. J. (2004). Quantifying the relationship between co-expression, co-regulation and gene function. *BMC bioinformatics*, 5(1), 18.
3. Altman, Russ B., and Soumya Raychaudhuri. (2001). Whole-genome expression analysis: challenges beyond clustering. *Current opinion in structural biology*, 11(3), 340-347.
4. Amitai-Zeigerson, Hagit, Pablo A. Scolnik, and Dudy Bar-Zvi. (1995). "Tomato Asr1 mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid." *Plant Science* 110(2): 205-213.
5. Aoki, Ayako, Akemi Kanegami, Michiko Mihara, Toshio Kojima, Masakazu Shiraiwa, and Hidenari Takahara. (2005). "Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine-zipper-like protein induced to salt stress." *Gene* 356: 135-145.
6. Apse, Maris P., Gilad S. Aharon, Wayne A. Snedden, and Eduardo Blumwald. (1999). "Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis." *Science* 285(5431): 1256-1258.
7. Ashraf, M. F. M. R., and MRv Foolad. (2007). "Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance." *Environmental and experimental botany* 59(2): 206-216.
8. Atanassova, Rossitza, Noëlle Favet, Françoise Martz, Brigitte Chabbert, Marie-Thérèse Tollier, Bernard Monties, Bernard Fritig, and Michel Legrand. (1995). "Monties, 8.; Fritig, 8.; Legrand, M. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and at: Itisense orientation." *Plant J*: 8,465-477.
9. Bailey, R. B., and LoW Parks. (1975). "Yeast sterol esters and their relationship to the growth of yeast." *Journal of bacteriology* 124, no. 2: 606-612.
10. Banzai, Toshiaki, Gitit Hershkovits, Don J. Katcoff, Nobutaka Hanagata, Zvy Dubinsky, and Isao Karube. (2002). "Identification and characterization of mRNA

transcripts differentially expressed in response to high salinity by means of differential display in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*." *Plant Science* 162(4): 499-505.

11. Bansal, Raman, Priyanka Mittapelly, Bryan J. Cassone, Praveen Mamidala, Margaret G. Redinbaugh, and Andy Michel. (2015). "Recommended reference genes for quantitative PCR analysis in soybean have variable stabilities during diverse biotic stresses." *PLoS One* 10, no. 8: e0134890.
12. Baucher, Marie, Bernard Monties, Marc Van Montagu, and Wout Boerjan. (1998). "Biosynthesis and genetic engineering of lignin." *Critical reviews in plant sciences* 17(2): 125-197.
13. Boerjan, Wout, John Ralph, and Marie Baucher. (2003). "Lignin biosynthesis." *Annual review of plant biology* 54(1): 519-546.
14. Bray, Elizabeth A. (2000). "Response to abiotic stress." *Biochemistry and molecular biology of plants*: 1158-1203.
15. Brunner, Amy M., Igor A. Yakovlev, and Steven H. Strauss. (2004). "Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies." *BMC plant biology* 4, no. 1: 14.
16. Bustin, Stephen A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *Journal of molecular endocrinology* 25(2): 169-193.
17. Bustin, S. A. (2002). "INVITED REVIEW Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *Journal of molecular endocrinology* 29: 23-39.
18. Cachorro, Pilar, Antonio Ortiz, A. Ros Barcelo, and A. Cerda. (1993). "Lignin deposition in vascular tissues of *Phaseolus vulgaris* roots in response to salt stress and Ca²⁺ ions." *Phyton* 33: 33-40.
19. Caño-Delgado, Ana, Steven Penfield, Caroline Smith, Merryn Catley, and Michael Bevan. (2003). "Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* 34(3): 351-362.
20. Carlson, Marc RJ, Bin Zhang, Zixing Fang, Paul S. Mischel, Steve Horvath, and Stanley F. Nelson. (2006). "Gene connectivity, function, and sequence conservation: predictions from modular yeast co-expression networks." *BMC genomics* 7, no. 1: 40.

21. Chang, Joseph. (2000). "Medicinal herbs: drugs or dietary supplements?" *Biochemical pharmacology* 59(3): 211-219.
22. Chen, Fang, and Richard A. Dixon. (2007). "Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production." *Nature biotechnology* 25(7): 759.
23. Choudhary, Sikander Pal, H. Volkan Oral, Renu Bhardwaj, Jing-Quan Yu, and Lam-Son Phan Tran. (2012). "Interaction of brassinosteroids and polyamines enhances copper stress tolerance in *Raphanus sativus*." *Journal of experimental botany* 63(15): 5659-5675.
24. Choudhary, Sikander Pal, Jing-Quan Yu, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki, and Lam-Son Phan Tran. (2012). "Benefits of brassinosteroid crosstalk." *Trends in plant science* 17(10): 594-605.
25. Christensen, J. H., H. Bauw, Karen Gjesing Welinder, M. V. Montagu, and W. Boerjan. (1998). "Peroxidases Correlated with Lignification in Poplar Xylem: Purification and Characterisation." *Plant Physiology* 118: 126-135.
26. Coordinators, NCBI Resource. (2017). "Database resources of the national center for biotechnology information." *Nucleic acids research* 45(Database issue): D12.
27. Craigon, David J., Nick James, John Okyere, Janet Higgins, Joan Jotham, and Sean May. (2004). "NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service." *Nucleic acids research* 32, no. suppl_1: D575-D577.
28. Dangl, Jeffery L., and Jonathan DG Jones. (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." *nature* 411, no. 6839: 826.
29. Dauwe, Rebecca, Kris Morreel, Geert Goeminne, Birgit Gielen, Antje Rohde, Jos Van Beeumen, John Ralph et al. (2007). Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. *The Plant Journal*, 52(2), 263-285.
30. Delgado, M. J., F. Ligeró, and Cl Lluç. (1994). "Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants." *Soil Biology and Biochemistry* 26(3): 371-376.
31. De Smet, Riet, and Kathleen Marchal. (2010). "Advantages and limitations of current network inference methods." *Nature Reviews Microbiology* 8(10): 717.

32. de Vetten, Nick, Jeroen ter Horst, Henk-Peter van Schaik, Albertus de Boer, Joseph Mol, and Ronald Koes. (1999). "A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3', 5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, no. 2: 778-783.
33. Dheda, Keertan, Jim F. Huggett, Stephen A. Bustin, Margaret A. Johnson, Graham Rook, and Alimuddin Zumla. (2004). "Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR." *Biotechniques* 37(1): 112-119.
34. Dixon, Richard A. (2001). "Natural products and plant disease resistance." *Nature* 411(6839): 843.
35. Eisen, Michael B., Paul T. Spellman, Patrick O. Brown, and David Botstein. (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(25): 14863-14868.
36. Emmons, Cheryl L., and David M. Peterson. (2001). "Antioxidant activity and phenolic content of oat as affected by cultivar and location." *Crop Science* 41(6): 1676-1681.
37. Fehr, Walter R., and Charles E. Caviness. (1977). "Stages of soybean development."
38. Fiannaca, Antonino, Massimo La Rosa, Laura La Paglia, Riccardo Rizzo, and Alfonso Urso. (2015). "Analysis of miRNA expression profiles in breast cancer using biclustering." *BMC bioinformatics* 16(4): S7.
39. Freudenberg, Karl. (1959). "Biosynthesis and constitution of lignin." *Nature* 183(4669): 1152.
40. Fukushima, D. (1994). "Recent progress on biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products." *Food biotechnology* 8(2-3): 83-135.
41. Ghosh, Ritesh, Bosung Choi, Jonggeun Kim, Mi-Jeong Jeong, Tapan Kumar Mohanta, and Hanhong Bae. (2015). "Developmental-and stress-mediated expression analysis of cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) from *Hibiscus cannabinus*." *Journal of plant interactions* 10, no. 1: 158-166.
42. Glass, Kimberly, Curtis Huttenhower, John Quackenbush, and Guo-Cheng Yuan. (2013). "Passing messages between biological networks to refine predicted interactions." *PloS one* 8(5): e64832.

43. Goffner, Deborah, Malcolm M. Campbell, Christian Campargue, Marc Clastre, Gisele Borderies, Annie Boudet, and Alain Michel Boudet. (1994). "Purification and characterization of cinnamoyl-coenzyme A: NADP oxidoreductase in *Eucalyptus gunnii*." *Plant physiology* 106(2): 625-632.
44. Grassmann, Johanna, Susanne Hippeli, and Erich F. Elstner. (2002). "Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress." *Plant Physiology and Biochemistry* 40(6-8): 471-478.
45. Grima-Pettenati, J., D. Chriqui, P. Sarni-Manchado, and E. Prinsen. (1989). "Stimulation of lignification in neofomed calli induced by *Agrobacterium rhizogenes* on bean hypocotyls." *Plant Science* 61(2): 179-188.
46. Gross, Georg G., and Meinhart H. Zenk. (1974). "Isolation and properties of hydroxycinnamate: CoA ligase from lignifying tissue of *Forsthia*." *European journal of biochemistry* 42(2): 453-459.
47. Guan, Rongxia, Yue Qu, Yong Guo, Lili Yu, Ying Liu, Jinghan Jiang, Jiangan Chen et al. (2014). "Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in G m SALT 3." *The Plant Journal* 80(6): 937-950.
48. Guo, Dianjing, Fang Chen, Kentaro Inoue, Jack W. Blount, and Richard A. Dixon. (2001). "Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin." *The plant cell* 13, no. 1. 73-88.
49. Gutierrez-Gonzalez, Juan J., Satish K. Guttikonda, Lam-Son Phan Tran, Donovan L. Aldrich, Rui Zhong, Oliver Yu, Henry T. Nguyen, and David A. Sleper. (2010). "Differential expression of isoflavone biosynthetic genes in soybean during water deficits." *Plant and cell physiology* 51(6): 936-948.
50. Gutierrez, Laurent, Mélanie Mauriat, Stéphanie Guénin, Jérôme Pelloux, Jean-François Lefebvre, Romain Louvet, Christine Rusterucci et al. (2008). "The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants." *Plant biotechnology journal* 6(6): 609-618.
51. Halpin, Claire, Mary E. Knight, Geoffrey A. Foxon, Malcolm M. Campbell, Alain M. Boudet, Jaap J. Boon, Brigitte Chabbert, Marie-Thérèse Tollier, and Wolfgang

- Schuch. (1994). "Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase." *The Plant Journal* 6(3): 339-350.
52. Hartwell, Leland H., John J. Hopfield, Stanislas Leibler, and Andrew W. Murray. (1999). "From molecular to modular cell biology." *Nature* 402, no. 6761supp: C47.
53. Ha, Sukbong, Radomira Vankova, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki, and Lam-Son Phan Tran. (2012). "Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses." *Trends in plant science* 17(3): 172-179.
54. Hedgethorpe, Katy, Sebastian Eustermann, Ji-Chun Yang, Tom EH Ogden, David Neuhaus, and Gareth Bloomfield. (2017). "Homeodomain-like DNA binding proteins control the haploid-to-diploid transition in *Dictyostelium*." *Science Advances* 3(9): e1602937.
55. Hill, J. E., and R. W. Breidenbach. (1974). "Proteins of soybean seeds: II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation." *Plant Physiology* 53(5): 747-751.
56. Hoagland, Dennis Robert, and Daniel Israel Arnon. (1950). "The water-culture method for growing plants without soil." *Circular. California agricultural experiment station* 347, no. 2nd edit
57. Horvath, S., B. Zhang, M. Carlson, K. V. Lu, S. Zhu, R. M. Felciano, M. F. Lurance et al. (2006). "Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 46: 17402-17407.
58. Horikoshi, Tetsuro, Kathleen D. Danenberg, Thomas HW Stadlbauer, Matthias Volkenandt, Luke CC Shea, Karl Aigner, Bengt Gustavsson et al. (1992). "Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction." *Cancer Research* 52(1): 108-116.
59. Hua, Cheng, Li Linling, Cheng Shuiyuan, Cao Fuliang, Xu Feng, Wang Yan, Jiang Dezhi, Yuan Honghui, and Wu Conghua. (2012). "Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase gene in *Ginkgo biloba*: effects on lignification and environmental stresses." *African Journal of Biotechnology* 11, no. 26: 6780-6794.

60. Huang, J. H., and M. A. Schell. (1990). "DNA sequence analysis of pglA and mechanism of export of its polygalacturonase product from *Pseudomonas solanacearum*." *Journal of bacteriology* 172, no. 7: 3879-3887.
61. Humphreys, John M., and Clint Chapple. (2002). "Rewriting the lignin roadmap." *Current opinion in plant biology* 5(3): 224-229.
62. Ideker, Trey, Vestein Thorsson, Jeffrey A. Ranish, Rowan Christmas, Jeremy Buhler, Jimmy K. Eng, Roger Bumgarner, David R. Goodlett, Ruedi Aebersold, and Leroy Hood. (2001). Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, 292(5518), 929-934.
63. Iiyama, K., T. B. T. Lam, P. J. Meikle, K. Ng, D. I. Rhodes, and B. A. Stone. (1993). "Cell wall biosynthesis and its regulation." *Forage cell wall structure and digestibility* (foragecellwalls): 621-683.
64. Izawa, Takeshi, and Ko Shimamoto. (1996). "Becoming a model plant: the importance of rice to plant science." *Trends in Plant Science* 1(3): 95-99.
65. Jogaiah, Sudisha, Sharathchandra Ramsandra Govind, and Lam-Son Phan Tran. (2013). "Systems biology-based approaches toward understanding drought tolerance in food crops." *Critical Reviews in Biotechnology* 33(1): 23-39.
66. Jones, Louise, A. Roland Ennos, and Simon R. Turner. (2001). "Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*." *The Plant Journal* 26(2): 205-216.
67. Jung, Hans-Joachim G., Deborah A. Samac, and Gautam Sarath. (2012). "Modifying crops to increase cell wall digestibility." *Plant Science* 185: 65-77.
68. Kawasaki, Tsutomu, Hisako Koita, Tomoyuki Nakatsubo, Kana Hasegawa, Kenichi Wakabayashi, Hiroki Takahashi, Kenji Umemura, Toshiaki Umezawa, and Ko 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* 103(1): 230-235.
69. Kim, Bo-Ra, Hee-Young Nam, Soo-Un Kim, Su-Il Kim, and Yung-Jin Chang. (2003). "Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice." *Biotechnology letters* 25(21): 1869-1872.
70. Kipreos, Edward T., and Michele Pagano. (2000). "The F-box protein family." *Genome biology* 1, no. 5: reviews3002-1.

71. Klink, Vincent P., Parsa Hosseini, Prachi Matsye, Nadim W. Alkharouf, and Benjamin F. Matthews. (2009). "A gene expression analysis of syncytia laser microdissected from the roots of the *Glycine max* (soybean) genotype PI 548402 (Peking) undergoing a resistant reaction after infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode)." *Plant molecular biology* 71(6): 525-567.
72. Kolosova, Natalia, Barbara Miller, Steven Ralph, Brian E. Ellis, Carl Douglas, Kermit Ritland, and Jörg Bohlmann. (2004). "Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees." *Biotechniques* 36 (5): 821-824.
73. Lacombe, Eric, Simon Hawkins, Jan Van Doorselaere, Joël Piquemal, Deborah Goffner, Odile Poeydomenge, Alain-M. Boudet, and Jacqueline Grima-Pettenati. (1997). "Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships." *The Plant Journal* 11(3): 429-441.
74. Langfelder, Peter, and Steve Horvath. (2007). "Eigengene networks for studying the relationships between co-expression modules." *BMC systems biology* 1, no. 1: 54.
75. Lauvergeat, Virginie, Christophe Lacombe, Eric Lacombe, Eric Lasserre, Dominique Roby, and Jacqueline 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* 57(7): 1187-1195.
76. Le, Dung Tien, Jung-Do Choi, and Lam-Son Phan Tran. (2010). "Amino acids conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxyacid synthase." *GM crops* 1(2): 62-67.
77. Lescot, Magali, Patrice Déhais, Gert Thijs, Kathleen Marchal, Yves Moreau, Yves Van de Peer, Pierre Rouzé, and Stephane Rombauts. (2002). "PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences." *Nucleic acids research* 30(1): 325-327.
78. Lewis, Norman G., and Etsuo Yamamoto. (1990). "Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496.
79. Liao, Hong, Fuk-Ling Wong, Tsui-Hung Phang, Ming-Yan Cheung, Wing-Yen Francisca Li, Guihua Shao, Xiaolong Yan, and Hon-Ming Lam. (2003).

- "GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency." *Gene* 318: 103-111.
80. Li, Dong Yan, Hayami Inoue, Masayuki Takahashi, Toshio Kojima, Masakazu Shiraiwa, and Hidenari Takahara. (2008). "Molecular characterization of a novel salt-inducible gene for an OSBP (oxysterol-binding protein)-homologue from soybean." *Gene* 407(1-2): 12-20.
 81. Lin, Chuan Chi, and Ching Huei Kao. (2001). "Cell wall peroxidase against ferulic acid, lignin, and NaCl-reduced root growth of rice seedlings." *Journal of Plant Physiology* 158(5): 667-671.
 82. Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method." *methods* 25(4): 402-408.
 83. Li, Wenqi, Yubing Yong, Yue Zhang, and Yingmin Lyu. (2019). "Transcriptional Regulatory Network of GA Floral Induction Pathway in LA Hybrid Lily." *International journal of molecular sciences* 20(11): 2694.
 84. Liu, Ying, Lili Yu, Yue Qu, Jingjing Chen, Xiexiang Liu, Huilong Hong, Zhangxiong Liu et al. (2016). "GmSALT3, which confers improved soybean salt tolerance in the field, increases leaf Cl-exclusion prior to Na⁺ exclusion but does not improve early vigor under salinity." 7: 1485.
 85. Loeffler, Susanne, Brigitte Deus-Neumann, and Meinhart H. Zenk. (1995). "S-Adenosyl-L-methionine:(S)-coclaurine-N-methyltransferase from *Tinospora cordifolia*." *Phytochemistry* 38(6): 1387-1395.
 86. Luo, Qingyun, Bingjun Yu, and Youliang Liu. (2005). "Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress." *Journal of plant physiology* 162(9): 1003-1012.
 87. Lynch, Damian, Angela Lidgett, Russell McInnes, Helen Huxley, Elizabeth Jones, Natalia Mahoney, and German Spangenberg. (2002). "Isolation and characterisation of three cinnamyl alcohol dehydrogenase homologue cDNAs from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)." *Journal of Plant Physiology* 159(6): 653-660.
 88. Mafra, Valéria, Karen S. Kubo, Marcio Alves-Ferreira, Marcelo Ribeiro-Alves, Rodrigo M. Stuart, Leonardo P. Boava, Carolina M. Rodrigues, and Marcos A.

- Machado. (2012). "Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions." *PLoS one* 7, no. 2: e31263.
89. Malenčić, Djordje, Zoran Maksimović, Milan Popović, and Jegor Miladinović. (2008). "Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts." *Bioresource technology* 99(14): 6688-6691
90. Malenčić, Djordje, Jelena Cvejić, and Jegor Miladinović. (2012). "Polyphenol content and antioxidant properties of colored soybean seeds from Central Europe." *Journal of medicinal food* 15(1): 89-95.
91. Manavalan, Lakshmi P., Satish K. Guttikonda, Lam-Son Phan Tran, and Henry T. Nguyen. (2009). "Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean." *Plant and Cell Physiology* 50(7): 1260-1276.
92. Mansfield, Shawn D. (2009). "Solutions for dissolution—engineering cell walls for deconstruction." *Current Opinion in Biotechnology* 20(3): 286-294.
93. Marbois, B. Noelle, and Catherine F. Clarke. (1996). "The COQ7 gene encodes a protein in *Saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis." *Journal of Biological Chemistry* 271, no. 6: 2995-3004.
94. Ma, Qing-Hu. (2010). "Functional analysis of a cinnamyl alcohol dehydrogenase involved in lignin biosynthesis in wheat." *Journal of Experimental Botany* 61(10): 2735-2744.
95. McInnes, Russell, Angela Lidgett, Damian Lynch, Helen Huxley, Elizabeth Jones, Natalia Mahoney, and German Spangenberg. (2002). "Isolation and characterization of a cinnamoyl-CoA reductase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*)." *Journal of Plant Physiology* 159(4): 415-422.
96. McInnes, Russell, Angela Lidgett, Damian Lynch, Helen Huxley, Elizabeth Jones, Natalia Mahoney, and German Spangenberg. (2002). "Isolation and characterization of a cinnamoyl-CoA reductase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*)." *Journal of Plant Physiology* 159(4): 415-422.
97. Menkens, Anne E., Ulrike Schindler, and Anthony R. Cashmore. (1995). "The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins." *Trends in biochemical sciences* 20(12): 506-510.
98. Meyer, Knut, Amber M. Shirley, Joanne C. Cusumano, Dolly A. Bell-Lelong, and Clint Chapple. (1998). "Lignin monomer composition is determined by the

- expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(12): 6619-6623.
99. Miao, Liming, Yanxia Lv, Lijun Kong, Qizhen Chen, Chaoquan Chen, Jia Li, Fanhuan Zeng et al. (2018). "Genome-wide identification, phylogeny, evolution, and expression patterns of MtN3/saliva/SWEET genes and functional analysis of BcNS in Brassica rapa." *BMC genomics* 19(1): 174.
 100. Munns, Rana, Richard A. James, and André Läuchli. (2006). "Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals." *Journal of experimental botany* 57(5): 1025-1043.
 101. Murphy, Lizabeth Deutsch, Cynthia Elaine Herzog, Joanthan Brett Rudick, Antonio Tito Fojo, and Susan Elaine Bates. (1990). "Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression." *Biochemistry* 29(45): 10351-10356.
 102. Nakashima, Kazuo, Yusuke Ito, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. (2009). "Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses." *Plant physiology* 149(1): 88-95.
 103. Neelakandan, Anjanasree K., Hanh TM Nguyen, Rajesh Kumar, Lam-Son Phan Tran, Satish K. Guttikonda, Truyen Ngoc Quach, Donovan L. Aldrich, W. David Nes, and Henry T. Nguyen. (2010). "Molecular characterization and functional analysis of Glycine max sterol methyl transferase 2 genes involved in plant membrane sterol biosynthesis." *Plant molecular biology* 74(4-5): 503-518.
 104. NEHMI, IMD, JV FERRAZ, V. A. NEHMI FILHO, and MLM da SILVA. (2001). "AGRIANUAL 2003: anuário da agricultura brasileira." *São Paulo: FNP Consultoria & Comércio*: 136-137.
 105. Neves, G. Y. S., R. Marchiosi, M. L. L. Ferrarese, R. C. Siqueira-Soares, and O. Ferrarese-Filho. (2010). "Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean." *Journal of Agronomy and crop science* 196(6): 467-473.
 106. Nolan, Tania, Rebecca E. Hands, and Stephen A. Bustin. (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nature protocols* 1(3): 1559.
 107. Noonan, K. E., C. Beck, T. Aet Holzmayer, J. E. Chin, J. S. Wunder, I. L. Andrulis, A. F. Gazdar et al. (1990). "Quantitative analysis of MDR1 (multidrug

- resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(18): 7160-7164.
108. Obayashi, Takeshi, Kengo Kinoshita, Kenta Nakai, Masayuki Shibaoka, Shinpei Hayashi, Motoshi Saeki, Daisuke Shibata, Kazuki Saito, and Hiroyuki Ohta. (2006). "ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in Arabidopsis." *Nucleic acids research* 35(suppl_1): D863-D869.
109. Obayashi, Takeshi, and Kengo Kinoshita. (2010). "Coexpression landscape in ATTED-II: usage of gene list and gene network for various types of pathways." *Journal of plant research* 123(3): 311-319.
110. Obayashi, Takeshi, Kozo Nishida, Kota Kasahara, and Kengo Kinoshita. (2011). "ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants." *Plant and cell physiology* 52(2): 213-219.
111. Obayashi, Takeshi, Yasunobu Okamura, Satoshi Ito, Shu Tadaka, Yuichi Aoki, Matsuyuki Shirota, and Kengo Kinoshita. (2014). "ATTED-II in 2014: evaluation of gene coexpression in agriculturally important plants." *Plant and Cell Physiology* 55(1): e6-e6.
112. Obayashi, Takeshi, Shinpei Hayashi, Motoshi Saeki, Hiroyuki Ohta, and Kengo Kinoshita. (2008). "ATTED-II provides coexpressed gene networks for Arabidopsis." *Nucleic acids research* 37(suppl_1): D987-D991.
113. Obayashi, Takeshi, Yuichi Aoki, Shu Tadaka, Yuki Kagaya, and Kengo Kinoshita. (2017). "ATTED-II in 2018: a plant coexpression database based on investigation of the statistical property of the mutual rank index." *Plant and Cell Physiology* 59(1): e3-e3.
114. Okamura, Yasunobu, Takeshi Obayashi, and Kengo Kinoshita. (2015). "Comparison of gene coexpression profiles and construction of conserved gene networks to find functional modules." *PloS one* 10(7): e0132039.
115. Oñate-Sánchez, Luis, and Jesús Vicente-Carbajosa. (2008). "DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques." *BMC research notes* 1(1): 93.
116. Onishi, M., H. Tachi, T. Kojima, M. Shiraiwa, and H. Takahara. (2006). "Molecular cloning and characterization of a novel salt-inducible gene encoding

- an acidic isoform of PR-5 protein in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.)." *Plant Physiology and Biochemistry* 44(10): 574-580.
117. Onodera, Yasuyuki, Akihiro Suzuki, Chuan-Yin Wu, Haruhiko Washida, and Fumio Takaiwa. (2001). "A rice functional transcriptional activator, RISBZ1, responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif." *Journal of Biological Chemistry* 276, no. 17: 14139-14152.
 118. Panozzo, Cristina, Anaïs Lalève, D. Tribouillard-Tanvier, J. Ostojić, C. H. Sellem, G. Friocourt, Alexa Bourand-Plantefol et al. (2017) ."Chemicals or mutations that target mitochondrial translation can rescue the respiratory deficiency of yeast *bcs1* mutants." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1864, no. 12: 2297-2307.
 119. Parvin, Shohana, Rama Krishna Pulla, Ju-Sun Shim, Yu-Jin Kim, Dea-Yeoung Jung, Se-Hwa Kim, and Deok-Chun Yang. (2008). "Isolation and characterization of cinnamoyl-CoA reductase gene from *Panax ginseng* CA Meyer." *Journal of Ginseng Research* 32, no. 3: 232-237
 120. Parker, Robert, Timothy J. Flowers, Anthony L. Moore, and Nicholas VJ Harpham. (2006). "An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina." *Journal of Experimental Botany* 57(5): 1109-1118.
 121. Parvathi, Kota, Fang Chen, Dianjing Guo, Jack W. Blount, and Richard A. Dixon. (2001). "Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols." *The Plant Journal* 25(2): 193-202.
 122. Pastori, Gabriela M., and Christine H. Foyer. (2002)."Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls." *Plant physiology* 129, no. 2: 460-468.
 123. Pedersen, Palle, S. Kumudini, J. Board, and S. Conley. (2004). *Soybean growth and development*, Iowa State University, University Extension Ames, IA.
 124. Pereira, S. S., F. C. M. Guimarães, J. F. C. Carvalho, R. Stolf-Moreira, M. C. N. Oliveira, A. A. P. Rolla, J. R. B. Farias, N. Neumaier, and A. L. Nepomuceno. (2011). "Transcription factors expressed in soybean roots under drought stress." *Genetics and Molecular Research*: 3689-3701.

125. Peyrano, Gabriela, Edith Taleisnik, Mónica Quiroga, S. Milrad de Forchetti, and Horacio Tigier. (1997). "Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots." *Plant Physiology and Biochemistry (France)*.
126. Pfaffl, Michael W., and M. Hageleit. (2001). "Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR." *Biotechnology Letters* 23(4): 275-282.
127. Piquemal, Joël, Catherine Lapierre, Kate Myton, Ann O'connell, Wolfgang Schuch, Jacqueline Grima-pettenati, and Alain-M. Boudet. (1998). "Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants." *The Plant Journal* 13(1): 71-83.
128. Pressey, Russell, and Bonnie J. Reger. (1989). "Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses." *Plant Science* 59, no. 1: 57-62.
129. Qu, Yue. (2018). "Functional characterisation of GmSALT3: a candidate gene for conferring salt tolerance in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]." PhD diss.
130. Rea, Shane. (2001). "CLK-1/Coq7p is a DMQ mono-oxygenase and a new member of the di-iron carboxylate protein family." *FEBS letters* 509, no. 3: 389-394.
131. Rombauts, Stephane, Patrice Déhais, Marc Van Montagu, and Pierre Rouzé. (1999). "PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database." *Nucleic acids research* 27(1): 295-296.
132. Roux, Kenneth H. (2009). "Optimization and troubleshooting in PCR." *Cold Spring Harbor Protocols*, no. 4: pdb-ip66.
133. Rung, Johan, and Alvis Brazma. (2013). "Reuse of public genome-wide gene expression data." *Nature Reviews Genetics* 14(2): 89.
134. Ruprecht, Colin, Sebastian Proost, Marcela Hernandez-Coronado, Carlos Ortiz-Ramirez, Daniel Lang, Stefan A. Rensing, Jörg D. Becker, Klaas Vandepoele, and Marek Mutwil. (2017). "Phylogenomic analysis of gene co-expression networks reveals the evolution of functional modules." *The Plant Journal* 90(3): 447-465.
135. Salekdeh, Gh H., J. Siopongco, L. J. Wade, B. Ghareyazie, and J. Bennett. (2002). "A proteomic approach to analyzing drought-and salt-responsiveness in rice." *Field Crops Research* 76, no. 2-3 : 199-219.

136. Saltzman, W. Mark. (1996). "Growth-factor delivery in tissue engineering." *MRS Bulletin* 21, no. 11: 62-65.
137. Sarkanen, Kyosti V., and Charles Heberle Ludwig. (1971). *Liguins. Occurrence, formation, structure, and reactions.*
138. Šavikin, Katarina, Gordana Zdunić, Teodora Janković, Slavoljub Tasić, Nebojša Menković, Tatjana Stević, and Boban Đorđević. (2009). "Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia." *Plant foods for human nutrition* 64(3): 212-217.
139. Schneider, Maria Victoria, James Watson, Teresa Attwood, Kristian Rother, Aidan Budd, Jennifer McDowall, Allegra Via et al. (2010). "Bioinformatics training: a review of challenges, actions and support requirements." *Briefings in bioinformatics* 11(6): 544-551.
140. Sewalt, Vincent JH, Weiting Ni, Jack W. Blount, Hans G. Jung, Sameer A. Masoud, Paul A. Howles, Chris Lamb, and Richard A. Dixon. (1997). "Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase." *Plant physiology* 115(1): 41-50.
141. Sharifi, Mozafar, Mahlagha Ghorbanli, and Hassan Ebrahimzadeh. (2007). "Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi." *Journal of plant physiology* 164(9): 1144-1151.
142. Shelton, John G., Linda S. Steelman, Steve L. Abrams, Fred E. Bertrand, Richard A. Franklin, Martin McMahon, and James A. McCubrey. (2005). "The epidermal growth factor receptor gene family as a target for therapeutic intervention in numerous cancers: what's genetics got to do with it?." *Expert opinion on therapeutic targets* 9, no. 5: 1009-1030.
143. Shikanai, Toshiharu, Toru Takeda, Haruko Yamauchi, Satoshi Sano, Ken-ichi Tomizawa, Akiho Yokota, and Shigeru Shigeoka. (1998). "Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts." *FEBS letters* 428(1-2): 47-51.
144. Shinozaki, Kazuo, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, and Motoaki Seki. (2003). "Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses." *Current opinion in plant biology* 6(5): 410-417.

145. Shinozaki, Kazuo, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. (2000). "Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways." *Current opinion in plant biology* 3(3): 217-223.
146. Simonne, A. H., D. B. Weaver, and Cheng-I. Wei. (2000). "Immature soybean seeds as a vegetable or snack food: acceptability by American consumers." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1(4): 289-296.
147. Srivastava, Sameer, Rishi K. Vishwakarma, Yasir Ali Arafat, Sushim K. Gupta, and Bashir M. Khan. (2015). Abiotic stress induces change in Cinnamoyl CoA Reductase (CCR) protein abundance and lignin deposition in developing seedlings of *Leucaena leucocephala*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(2), 197-205.
148. Stevenson-Paulik, Jill, Robert J. Bastidas, Shean-Tai Chiou, Roy A. Frye, and John D. York. (2005). "Generation of phytate-free seeds in Arabidopsis through disruption of inositol polyphosphate kinases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, no. 35: 12612-12617.
149. Sticklen, Mariam B. (2008). "Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol." *Nature Reviews Genetics* 9(6): 433.
150. Stolf-Moreira, Renata, Eliana GM Lemos, Lúcia Carareto-Alves, Jackson Marcondes, Selma S. Pereira, Amanda AP Rolla, Rodrigo M. Pereira et al. (2011). "Transcriptional profiles of roots of different soybean genotypes subjected to drought stress." *Plant molecular biology reporter* 29(1): 19-34.
151. Sugimoto, Manabu, Yoshihiro Okada, Kazuhiro Sato, Kazutoshi Ito, and Kazuyoshi Takeda. (2003). "A root-specific O-methyltransferase gene expressed in salt-tolerant barley." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67, no. 5: 966-972.
152. Sutapa, Mukherjee, and Mitra Analava. (2009). "Health effects of palm oil." *Journal of Human Ecology* 26(3): 197-203.
153. Takahata, Yasuhiro, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Shu Furuta, Masakazu Takahashi, and Ikuo Suda. (2001). "Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity." *Journal of agricultural and food chemistry* 49(12): 5843-5847.

154. Tang, Haibao, John E. Bowers, Xiyin Wang, Ray Ming, Maqseudul Alam, and Andrew H. Paterson. (2008). "Synteny and collinearity in plant genomes." *Science* 320(5875): 486-488.
155. Tang, Lee Kwan, Hung Chu, Wing Kin Yip, Edward C. Yeung, and Clive Lo. (2009). "An anther-specific dihydroflavonol 4-reductase-like gene (DRL1) is essential for male fertility in Arabidopsis." *New Phytologist* 181, no. 3: 576-587.
156. Thao, Nguyen Phuong, and Lam-Son Phan Tran. (2012). "Potentials toward genetic engineering of drought-tolerant soybean." *Critical reviews in biotechnology* 32(4): 349-362.
157. Thomashow, Michael F. "Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. (1999). "Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms." *Annual review of plant biology* 50(1): 571-599.
158. Tran, Lam-Son Phan, and Keiichi Mochida. "Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions. (2010). "Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions." *Functional & integrative genomics* 10(4): 447-462.
159. Tran, Lam-Son Phan, Truyen N. Quach, Satish K. Guttikonda, Donavan L. Aldrich, Rajesh Kumar, Anjanasree Neelakandan, Babu Valliyodan, and Henry T. Nguyen. (2009). "Molecular characterization of stress-inducible GmNAC genes in soybean." *Molecular genetics and genomics* 281(6): 647-664.
160. Tran, Lam-Son Phan, Kazuo Nakashima, Yoh Sakuma, Yuriko Osakabe, Feng Qin, Sean D. Simpson, Kyonoshin Maruyama, Yasunari Fujita, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki. (2007). "Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis." *The Plant Journal* 49(1): 46-63.
161. Trabucco, Gina M., Dominick A. Matos, Scott J. Lee, Aaron J. Saathoff, Henry D. Priest, Todd C. Mockler, Gautam Sarath, and Samuel P. Hazen. (2013). "Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid O-methyltransferase in *Brachypodium distachyon*." *BMC Biotechnol* 13: 61.
162. Tronchet, Maurice, Claudine Balague, Thomas Kroj, Lise Jouanin, and Dominique Roby. (2010). "Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key

- enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in Arabidopsis." *Molecular Plant Pathology* 11(1): 83-92.
163. Tschaplinski, Timothy J., Robert F. Standaert, Nancy L. Engle, Madhavi Z. Martin, Amandeep K. Sangha, Jerry M. Parks, Jeremy C. Smith et al. (2012). "Down-regulation of the caffeic acid O-methyltransferase gene in switchgrass reveals a novel monolignol analog." *Biotechnol Biofuels* 5(1): 71.
164. Tu, Yi, Simone Rochfort, Zhiqian Liu, Yidong Ran, Megan Griffith, Pieter Badenhorst, Gordon V. Louie et al. (2010). Functional analyses of caffeic acid O-methyltransferase and cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *The Plant Cell*, 22(10), 3357-3373.
165. Tu, Yi, Simone Rochfort, Zhiqian Liu, Yidong Ran, Megan Griffith, Pieter Badenhorst, Gordon V. Louie et al. (2010). "Functional analyses of caffeic acid O-methyltransferase and cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*)." *The Plant Cell* 22(10): 3357-3373.
166. Udvardi, Michael K., Tomasz Czechowski, and Wolf-Rüdiger Scheible. (2008). "Eleven golden rules of quantitative RT-PCR." *The Plant Cell* 20(7): 1736-1737.
167. Usadel, Björn, Takeshi Obayashi, Marek Mutwil, Federico M. Giorgi, George W. Bassel, Mimi Tanimoto, Amanda Chow, Dirk Steinhauser, Staffan Persson, and Nicholas J. Provart. (2009). "Co-expression tools for plant biology: opportunities for hypothesis generation and caveats." *Plant, cell & environment* 32(12): 1633-1651.
168. Valliyodan, Babu, and Henry T. Nguyen. "Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. (2006). "Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants." *Current opinion in plant biology* 9(2): 189-195.
169. Van Camp, Wim, Katelijne Capiou, Marc Van Montagu, Dirk Inze, and Luit Slooten. (1996). "Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts." *Plant physiology* 112(4): 1703-1714.
170. van Dam, Sipko, Thomas Craig, and Joao Pedro de Magalhaes. (2014). "GeneFriends: a human RNA-seq-based gene and transcript co-expression database." *Nucleic acids research* 43(D1): D1124-D1132.

171. van Dam, Sipko, Urmo Vosa, Adriaan van der Graaf, Lude Franke, and Joao Pedro de Magalhaes. (2017). "Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions." *Briefings in bioinformatics* 19(4): 575-592.
172. Van der Rest, Benoît, Saïda Danoun, Alain-Michel Boudet, and Soizic F. Rochange. (2006). Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. *Journal of experimental botany*, 57(6), 1399-1411.
173. Vanholme, Ruben, Kris Morreel, John Ralph, and Wout Boerjan. (2008). "Lignin engineering." *Current opinion in plant biology* 11(3): 278-285.
174. Vanholme, Ruben, Kris Morreel, Chiarina Darrah, Paula Oyarce, John H. Grabber, John Ralph, and Wout Boerjan. (2012). "Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops." *New Phytol* 196(4): 978-100
175. van Noort, Vera, Berend Snel, and Martijn A. Huynen. (2003). "Predicting gene function by conserved co-expression." *TRENDS in Genetics* 19, no. 5: 238-242.
176. Vincent, Delphine, Catherine Lapierre, Brigitte Pollet, Gabriel Cornic, Luc Negroni, and Michel Zivy. (2005). "Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation." *Plant Physiol* 137(3): 949-960.
177. Weng, Jing-Ke, Xu Li, Nicholas D. Bonawitz, and Clint Chapple. (2008). "Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production." *Current opinion in biotechnology* 19(2): 166-172.
178. Whetten, Ross W., John J. MacKay, and Ronald R. Sederoff. (1998). "Recent advances in understanding lignin biosynthesis." *Annual review of plant biology* 49(1): 585-609.
179. Wolfsberg, Tyra G., Andrei E. Gabrielian, Michael J. Campbell, Raymond J. Cho, John L. Spouge, and David Landsman. (1999). Candidate regulatory sequence elements for cell cycle-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome research*, 9(8), 775-792.
180. WYRAMBIK, Dorothea, and Hans GRISEBACH. (1979). "Enzymic Synthesis of Lignin Precursors: Further Studies on Cinnamyl-Alcohol

- Dehydrogenase from Soybean-Cell-Suspension Cultures." *European journal of biochemistry* 97(2): 503-509.
181. Xin, Haibo, Feng Qin, and Lam-Son Phan Tran. (2012). Transcription factors involved in environmental stress responses in plants. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*, Springer: 279-295.
182. Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko, and Kazuo Shinozaki. (2005). "Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters." *Trends in plant science* 10(2): 88-94.
183. Yeo, A. R., S. A. Flowers, G. Rao, K. Welfare, N. Senanayake, and T. J. Flowers. (1999). "Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow." *Plant, Cell & Environment* 22, no. 5: 559-565.
184. Yue, Feng, Yong Cheng, Alessandra Breschi, Jeff Vierstra, Weisheng Wu, Tyrone Ryba, Richard Sandstrom et al. (2014). "A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome." *Nature* 515(7527): 355.
185. Yu, Lili, Rongxia Guan, and Lijuan Qiu. (2015). "Characterization of Two GmSALT3 Promoters Involved in Salt Tolerance in Soybean." *中国作物学会—2015 年学术年会论文摘要集*
186. Zhang, Bin, and Steve Horvath. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 4(1).
187. Zhao, Yi, Hui Li, Shuangfang Fang, Yue Kang, Wei Wu, Yajing Hao, Ziyang Li et al. (2015). "NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs." *Nucleic acids research* 44(D1): D203-D208.

Abstract

Identification of co-expression genes that are effective in salt tolerance in plants and evaluation of their expression in biochemical pathways are effective in increasing productivity and development of crop area. In order to investigate the effect of salinity treatment (200 mM) on expression of some key genes of lignin biosynthesis pathway (*CCR* and *COMT*), their co-expression genes (*CECCR* and *CECOMT*) and salinity tolerance gene in Soybean (*GmSALT3*) real-time polymerase chain reaction was used at two time intervals three and seven days after treatment in two salinity resistant and susceptible cultivars. The results of bioinformatics studies showed that different motifs, including *GATA-motif*, *G-Box* and *TC-rich repeats* play important roles in response to different stresses. According to the experimental results, in the resistant cultivar, the expression of *COMT* gene at both time intervals was not significantly different at 5% probability level. In susceptible cultivar, transcript levels of this gene decreased at both time intervals after treatment, which this difference was significant. In both cultivars, *CECOMT* gene expression decreased at both time intervals when this difference was significant. In resistant cultivar, there was a significant difference in *CCR* gene expression after three days, but no significant increase in *CCR* gene expression after 7 days. Also in susceptible cultivar, the increase of expression of this gene was not significant at both time intervals. In both cultivars, *CECCR* gene expression decreased at both time intervals and this difference was significant. Increase in *GmSALT3* gene expression after three days did not show any significant difference, whereas decrease in expression of this gene after seven days showed no significant difference. Also, the increased expression of this gene was not significant in both time intervals in susceptible cultivars. According to the results of this study, salinity treatment had a significant effect on the expression of genes involved in lignin biosynthesis pathway, its co-expression genes and the salt tolerant gene in soybean at three and seven days intervals.

Keywords: Soybean, Salinity, Lignin, Co-expression genes, Promoter analysis



Shahrood University of Technology
Faculty of Agriculture
M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

**Expression analysis of some genes involved in lignin
biosynthesis pathway under salt stress in soybean (*Glycine
max*)**

By:

Samira Mohammadi Motlagh Hasanakloo

Supervisor:

Dr. Shahrokh Gharanjik

January 2020