

Comparative transcriptome analysis of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) with oilseed crops to identify genes involved in seed oil quantity and quality

Soheil Nahranbad¹, Ghasemali Garoosi² , Seyed Mehdi Alavi³, Mohammad Amin Bagheri⁴

1. M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

2. Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

3. Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

4. Researcher, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Correspondence:

Ghasemali Garoosi

Email: agaroosi90@yahoo.com
garoosi@eng.ikiu.ac.ir

Received: 13, May 2024

Accepted: 15, Feb. 2025

How to cite:

Nahranbad, S., Garoosi, Gh., Alavi, S. M., & Bagheri, M.A. (2025). Comparative transcriptome analysis of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) with oilseed crops to identify genes involved in seed oil quantity and quality. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 1-17. (DOI: [10.30473/cb.2025.71265.1968](https://doi.org/10.30473/cb.2025.71265.1968))

ABSTRACT

This study aimed to identify genes involved in seed growth and development using RNA-Seq and comparative transcriptomics. For this purpose, the transcriptome data of oilseed plants safflower, camelina, and soybean were extracted from relevant databases. After checking the quality of the data, they were edited, cleaned, and reassembled using the reference genome. Annotation of genes involved in seed fatty acid biosynthesis by identifying Arabidopsis homologs and then analyzing differentially expressed genes (DEGs) was performed. Genes with differential expression during seed development stages were identified, and in this way genes with significant expression and involved in seed fatty acid metabolism and synthesis pathways were extracted. Finally, the relationship between genes was drawn by protein-protein interaction network, and based on this, FAD2, FATB, and ACX4 genes were found to be effective in the lipid biosynthesis pathway during filling and maturation stages. In these plants in the glycerophospholipid metabolism pathway, NPC3, PDAT1, and LPAT1 genes showed significant differential expression during the start of seed growth and seed filling stages. The results showed that SDP1 and LPAT5 genes have an increased expression in the maturation stage compared to seed formation. In the fatty acid elongation pathway, KCS5 and C86A1 genes, in the fatty acid degradation pathway AIM1 gene, and in the fatty acid biosynthesis pathway FABH gene showed significant expression in the seed filling and maturation stages. Based on the protein-protein interaction network and gene relationships, it is likely that FAD2, FATB, and PDAT1 genes play a key role in seed development and oil biosynthesis.

KEYWORDS

Bioinformatics, comparative transcriptome, fatty acids, Oilseeds, safflower.



«مقاله پژوهشی»

بررسی ترنسکرپتوم مقایسه‌ای گلرنگ با دانه‌های روغنی به منظور شناسایی ژن‌های دخیل در کمیت و کیفیت روغن دانه

سهیل نهران‌باد^۱، قاسمعلی گروسی^۲ , سیدمهدی علوی^۳، محمد امین باقری^۴

چکیده

در این مطالعه که برپایه فناوری RNA-Seq و ترنسکرپتومیکس مقایسه‌ای بنا شده، به تجزیه و تحلیل و شناسایی ژن‌های دخیل در رشد و نمو دانه پرداخته شده است. بدین منظور داده‌های ترنسکرپتوم دانه گیاهان روغنی گلرنگ (رقم گلدشت)، کمینا و سویا از پایگاه داده‌های مربوطه استخراج شد. پس از بررسی کیفیت، ویرایش، پاکسازی و سرهم‌بندی مجدد آن‌ها با استفاده از ژنوم مرجع انجام شد. حاشیه‌نویسی ژن‌های درگیر در بیوسنتز اسید چرب دانه توسط شناسایی هومولوگ‌های آرآیدوپسیس و سپس آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها (DEG) انجام شد. ژن‌هایی که دارای تفاوت بیان در مراحل نمو دانه بودند شناسایی و بدین ترتیب ژن‌های واجد بیان معنی‌دار و دخیل در مسیرهای متابولیسم و سنتز اسید چرب دانه استخراج شدند. در نهایت ارتباط بین ژن‌ها توسط شبکه پروتئین-پروتئین ترسیم و بر این اساس، ژن‌های FATB، FAD2، ACX4 و در مسیر بیوسنتز لیپیدها در مرحله پرشدن و بلوغ موثر شناخته شدند. در این گیاهان در مسیر متابولیسم گلیسرولیپید نیز ژن‌های NPC3، PDAT1 و LPAT1 بین مرحله شروع رشد دانه تا پر شدن دارای تفاوت بیان معنی‌داری بودند. نتایج نشان داد که ژن‌های SDP1 و LPAT5 در مرحله بلوغ نسبت به تشکیل دانه افزایش بیان دارند. در مسیر تولید اسید چرب، ژن‌های KCS5 و C86A1، در مسیر تجزیه اسید چرب ژن AIM1 و در مسیر بیوسنتز اسید چرب ژن FABH دارای افزایش بیان در مراحل پرشدن و بلوغ دانه بیان معنی‌داری را نشان دادند. بر اساس شبکه پروتئین-پروتئین و روابط بین ژن‌ها احتمال می‌رود ژن‌های FATB، FAD2، PDAT1 نقش کلیدی در نمو دانه و بیوسنتز روغن دانه داشته باشند.

واژه‌های کلیدی

اسیدهای چرب، بیوانفورماتیک، ترنسکرپتوم مقایسه‌ای، دانه‌های روغنی، گلرنگ.

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران.
۲. استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران.
۳. دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
۴. پژوهشگر، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

نویسنده مسئول:

قاسمعلی گروسی

ایمانامه: agaroosi90@yahoo.com

garoosi@eng.ikiu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۷

استناد به این مقاله:

نهران‌باد، سهیل؛ گروسی، قاسمعلی؛ علوی، سیدمهدی و باقری، محمدامین (۱۴۰۴). بررسی ترنسکرپتوم مقایسه‌ای گلرنگ با دانه‌های روغنی به منظور شناسایی ژن‌های دخیل در کمیت و کیفیت روغن دانه، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۱-۱۷.

(DOI: [10.30473/cb.2025.71265.1968](https://doi.org/10.30473/cb.2025.71265.1968))

مقدمه

روغن به عنوان یکی از منابع اصلی تامین انرژی نقش ارزنده‌ای در تغذیه انسان دارد و پس از مواد نشاسته‌ای در زمره مهم‌ترین کالاهای ضروری محسوب می‌شود. از سوی دیگر دانه‌های روغنی پس از غلات، دومین ذخیره غذایی جهان را تشکیل می‌دهند. تولید جهانی روغن از دانه‌های روغنی در سال ۲۰۲۲ حدود ۶۴۰ میلیون تن و با ارزش ۳۴۸ میلیارد دلار بوده است. پیش‌بینی می‌شود که مصرف روغن نباتی تا سال ۲۰۴۰ دو برابر شود. با توجه به افزایش جمعیت و افزایش مصرف سرانه روغن، افزایش سطح زیر کشت دانه‌های روغنی و افزایش عملکرد آنها برای کاهش وابستگی به کشورهای دیگر ضروری است. بنابراین افزایش عملکرد روغن بذر در واحد سطح کشت اهمیت فراوانی در صنایع تولید روغن برای مصارف غذایی و غیرغذایی پیدا کرده است (Oecd, 2022). در بین دانه‌های روغنی گلرنگ به دلیل دارا بودن مقادیر بالای اسید لینولئیک یا اسید اولئیک و پایداری بالا در برابر حرارت برجسته است. گلرنگ قدیمی‌ترین محصول زراعی است که بیش از ۴۰۰۰ سال با تولید روغن باکیفیت و غنی از اسیدهای چرب غیراشباع، دارای خواص دارویی بوده که می‌تواند بسیاری از بیماری‌های مزمن را درمان کند. این گیاه یک محصول دانه روغنی مقاوم به خشکی است که تحت شرایط دیم نیز در سراسر جهان قابل کشت است. در حال حاضر به صورت تجاری در ۶۰ کشور جهان کشت می‌شود (Singh & Nimbkar, 2016). از سوی دیگر، کشت گلرنگ از زمان‌های بسیار قدیم در شرایط اقلیمی متنوع با داشتن تیپ‌های بهاره و پاییزه سازگار با شرایط آب و هوای کشور آینده نویدبخشی را برای توسعه کشت این دانه روغنی رقم زده است (Omidi et al., 2011).

پروفاایل اسیدهای چرب روغن گلرنگ حاکی از وجود ۱۴ نوع اسید چرب در مقادیر مختلف می‌باشد (Andhale & Md, 2018). بر اساس آخرین پژوهش‌های انجام شده درصد ترکیب اسیدهای چرب روغن دانه گلرنگ اسید لینولئیک ۶۱ درصد و اسید اولئیک ۳۳٫۷ درصد می‌باشد (Yesilyurt et al., 2020). در حال حاضر مطالعات در مورد ویژگی‌های بیولوژیکی این گیاه در طول ذخیره‌سازی روغن بذر به ویژه

تغییرات در قابلیت متابولیک و ساختار سلولی محدود می‌باشد. لذا چنین دانشی برای بهبود و کنترل طول عمر بذر گلرنگ و حفظ بانک‌های ژنی مورد نیاز است (Zhou et al., 2022). پژوهشگران با استفاده از آنالیز ترنسکریپتوم مقایسه‌ای توانستند برای افزایش محتوای روغن دانه گیاه کم‌لینا پروفاایل‌های متابولیتی مسیر سنتز تری آسید گلیسرول و پروفاایل رونویسی ژن‌هایی که در طول روند نمو بذر به صورت بالقوه باعث سنتز و تحریک واکنش‌های شیمیایی شبکه اپی‌ژنی می‌شود را شناسایی کرده و مقدار عملکرد دانه و روغن آن را افزایش دهند (Abdullah et al., 2018). Geng و همکاران (۲۰۱۸) با مقایسه آنالیز ترنسکریپتوم گیاه کلزا توسط فناوری RNA-Seq، مکانیسم‌های تنظیم‌کننده وزن بذر را تشخیص داده همچنین ژن‌های کاندید مربوط به مسیرهای متابولیکی نمو بذر و تجزیه و تحلیل این مسیرها را در پایگاه داده KEGG مورد مطالعه قرار دادند و پروتئین‌های دخیل در تنظیم کمیت روغن دانه را شناسایی کردند (Geng et al., 2018). Chen و همکاران (۲۰۲۴) با آنالیز ترنسکریپتوم مقایسه‌ای در گیاه سویا با سایر دانه‌های روغنی موفق به شناسایی ژن تنظیم‌کننده عامل ازدیاد سنتز روغن سویا (سینامیل الکل دهیدروژناز ۹) در مرحله گلیکولیز/ گلوکونئوژنز شدند (Chen et al., 2024).

با وجود این که تحقیقات گسترده‌ای برای به‌نژادی کلاسیک و مولکولی دانه‌های روغنی به منظور افزایش میزان روغن در مناطق مختلف جهان صورت گرفته است اما، همچنان فقدان اطلاعات لازم ژنتیکی در مورد این گیاهان خصوصا گلرنگ احساس می‌شود. بنابراین در راستای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها و شناسایی سیستماتیک ژن‌های دخیل و پاسخگو در افزایش کمیت و کیفیت روغن گلرنگ، این پژوهش به صورت متاآنالیز طراحی گردید تا از طریق بررسی In Silico ترنسکریپتوم نمو بذر از مرحله شروع رشد، پرشدن و بلوغ در دانه روغنی گلرنگ و مقایسه پروفاایل بیانی آن با ترنسکریپتوم دیگر دانه‌های روغنی نظیر کم‌لینا و سویا بتوان نسبت به شناسایی و گزارش اطلاعات تازه‌تری از ژن‌های عملکردی و تنظیمی مرتبط با بهبود کمی و کیفی در روغن دانه این گیاه دست یافت.

مواد و روش‌ها

مراحل رشد گیاه و توالی‌یابی به روش RNA-Seq

ابتدا بذر گلرنگ (رقم گلدشت) از مرکز تحقیقات دانه‌های روغنی تهیه و در گلخانه پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تحت شرایط اپتیمم با دمای شبانه روز ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰٪ کشت گردید. پس از طی مراحل رشدی و گلدهی گیاهان، نمونه‌برداری همزمان با شروع دانه بستن از دانه‌ها در دو تکرار بیولوژیک و در سه دوره رشد ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روزه (دوره رشد دانه، پرشدن و بلوغ) انجام شد. RNA کل نمونه‌ها توسط دستورالعمل کیت RNX Plus استخراج گردیده و برای تعیین توالی به شرکت BGI ارسال شد. غنی‌سازی و قطعه‌سازی mRNA سنتز کتابخانه cDNA، ترمیم انتهای رشته‌ها و اتصال آداپتورها توسط شرکت BGI (موسسه ژن پکن، شنژن، چین) انجام شده و همه کتابخانه‌ها با استفاده از پلتفرم BGISEQ-500 توالی‌یابی شدند (PE 100bp).

دریافت و بارگیری داده‌های InSilico

داده‌های ترنسکریپتوم گیاهان کمپلینا و سویا از مراحل شروع رشد دانه، پرشدن و بلوغ انتخاب شده از پایگاه داده NCBI به ترتیب با شناسه‌های PRJNA313565 و PRJNA192234 که نتایج حاصل از دستگاه‌های توالی‌یابی خوانش‌های خام می‌باشند در قالب فایل Fastq ذخیره شدند.

پردازش داده‌ها

تصحیح و ویرایش توالی‌ها توسط برنامه Trimmomatic v0.39 با پارامترهای LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:4:15, MINLEN:50 و میانگین Phred Score معادل ۳۰ انجام شد (Bolger et al., 2014).

همردیفی خوانش‌ها

برای همردیفی خوانش‌های خام گلرنگ با توجه به اینکه برای این گیاه ژنوم مرجع در دسترس نبود از روش سرهم‌بندی از نو و همچنین برای مابقی گیاهان مانند کمپلینا،

سویا از ژنوم مرجع استفاده گردید. خوانش‌های با کیفیت به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Trinity v2.9.1 به روش سرهم‌بندی از نو با هم ادغام شده و در نهایت رونوشت‌های مرجع برای گلرنگ به دست آمد (Grabherr et al., 2011). برای گیاهان کمپلینا و سویا از ژنوم مرجع موجود در پایگاه داده NCBI به ترتیب تحت شناسه‌های GCF_000004515 و GCF_000633955 استفاده گردید. در نهایت کلیه داده‌ها در برنامه HISAT2 ایندکس شده و خوانش‌های هر گیاه با مرجع متناظرشان تطبیق داده شدند.

کمیت‌سنجی (Quantification) خوانش‌های

همردیف شده

کمیت‌سنجی خوانش‌های همردیف شده برای نمونه‌های هر گیاه با استفاده از برنامه RSEM انجام شد (Li & Dewey, 2011). ماتریس بیانی ژن‌ها بر اساس ماتریس رونوشت‌ها با استفاده از بسته tximport محاسبه گردید (Soneson et al., 2015). سپس نرمال‌سازی داده‌ها به روش TMM با استفاده از بسته edgeR تحت پلتفرم R انجام شد.

تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها (DEG)

ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEG) در مراحل پرشدن و بلوغ دانه نسبت به شروع رشد دانه برای نمونه‌های هر گیاه توسط بسته edgeR تحت پلتفرم R محاسبه گردید (Liu et al., 2015). سپس DEG های به دست آمده با مقدار p-value تنظیم شده ≤ 0.05 (FDR) و $\log_2FC \geq 2$ به عنوان ژن‌های دارای بیان متفاوت معنی‌دار تعیین گردید.

حاشیه‌نویسی ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEG)

به منظور یافتن DEG های فعال در مسیر بیوستز لپیدها در گلرنگ حاشیه‌نویسی داده‌ها با استفاده از پایگاه داده KEGG انجام گرفت. برای توالی‌های از نو سرهم‌بندی شده به دلیل در دسترس نبودن حاشیه‌نویسی KEGG از هومولوگ‌های متناظر در آرآبیدوپسیس استفاده شد. بدین

روش ترانسکریپتوم مرجعی متشکل از ۳۱۴۳۸۱ رونوشت (ایزوفرم) و ۲۲۰۸۷۴ ژن تهیه گردید.

پس از تطبیق خوانش های هر نمونه با مرجع تهیه شده آنالیز بیان متفاوت انجام گردید. نتایج به دست آمده از آنالیز بیان نمونه های دانه طی مرحله پرشدن دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه گلرنگ نشان داد که ژن های MDHM1 با بیان نسبی ۷/۷۰، ژن FAD2 با بیان نسبی ۷/۵۹ و ژن AL2B4 با بیان نسبی ۶/۳۷ دارای بیشترین افزایش بیان هستند. از سوی دیگر در شرایط مشابه ژن های SFR2 با بیان نسبی ۲/۴۸- و SQD2 با بیان نسبی ۲/۵۳- از بیشترین کاهش بیان برخوردار بودند (جدول ۲).

اما در مرحله بلوغ دانه نسبت به شروع رشد دانه ژن های MDHM1 با بیان نسبی ۵/۸۱ و FAD2-1 با بیان نسبی ۵/۲۲ و AL2B7 با بیان نسبی ۵/۰۶، به ترتیب با بیشترین افزایش بیان و ژن های FAD2-2 با بیان نسبی ۸/۶۷- و ژن AL2B4 با بیان نسبی ۹/۳۹- به ترتیب بیشترین کاهش بیان را از خود در گلرنگ نشان دادند (جدول ۳). شکل الگوی بیانی ژن ها در (شکل ۱) ترسیم شده است.

منظور ژن های سرهم بندی شده گلرنگ با استفاده از برنامه Blastx با توالی پروتئینی آراییدوپسیس تطبیق داده شدند. از مجموعه ژن های به دست آمده ژن های فعال در مسیر بیوسنتز لیپید که حداقل در گلرنگ و یکی از گیاهان مورد مطالعه، DEG بودند به عنوان متاژن فعال در بیوسنتز لیپیدها در نظر گرفته شدند. در آخر از متاژن های شناسایی شده برای ترسیم شبکه میانکنشی پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING و نرم افزار Cytoscape استفاده شد (Szkłarczyk et al., 2016).

نتایج و بحث

شناسایی و جداسازی ژن های بیانی معنی دار

شناسایی ۵ ژن با تفاوت بیانی در گلرنگ

مشخصات عمومی داده های خام بدست آمده از توالی یابی نمونه های گلرنگ در جدول ۱ آورده شده است. پس از پیش پردازش و حذف داده های با کیفیت پایین سرهم بندی از نو بر روی خوانش های خام انجام گرفت. با این

جدول ۱. خلاصه نتایج توالی یابی RNA (RNA-Seq) از نمونه های گلرنگ

Table 1. Summary of RNA sequencing (RNA-Seq) results from safflower samples

نام فایل	نوع فایل	سیستم کدکننده	تعداد کل توالی ها	توالی های با کیفیت پایین	طول توالی (bp)
Saff.10.fq1.gz	Conventional base calls	Sanger/BGI 1.9	۳۵۱۵۵۷۲۲	.	۴۸
Saff.10.fq2.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۶۲۵۴۹۰۳	.	۴۶
Saff.20.fq1.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۵۹۹۷۷۱۲	.	۴۶
Saff.20.fq2.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۶۱۳۲۳۹۱	.	۴۶
Saff.30.fq1.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۵۹۸۱۱۰۷	.	۴۷
Saff.30.fq2.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۵۹۵۱۲۲۱	.	۴۸

جدول ۲. پنج ژن با بالاترین افزایش و کاهش بیان در مرحله پرشدن دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه گلرنگ

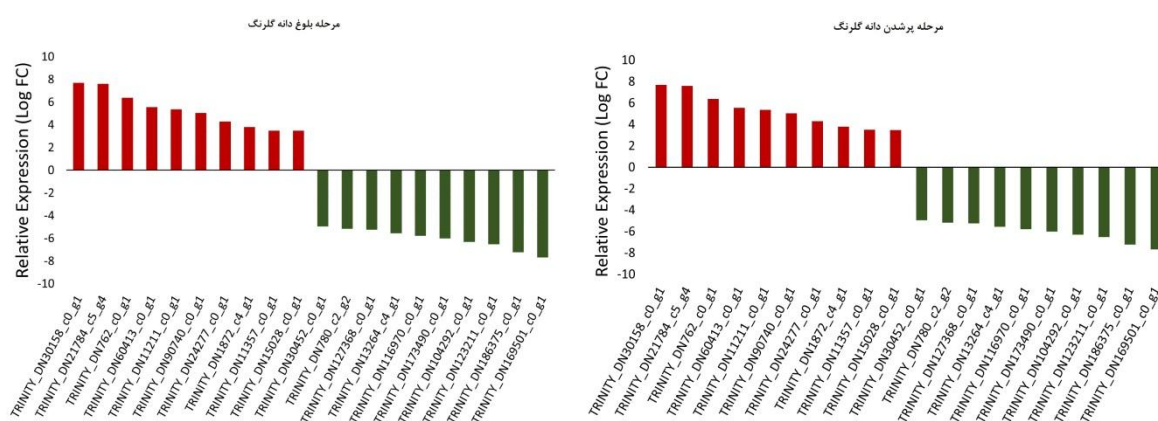
Table 2. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed filling stage compared to the initiation stage of seed development in the safflower plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
گلرنگ	MDHM1	TRINITY_DN30158_c0_g1	-	۷/۷۰	پرشدن
	FAD2	TRINITY_DN21784_c5_g4	-	۷/۵۹	پرشدن
	AL2B4	TRINITY_DN762_c0_g1	-	۶/۳۷	پرشدن
	SFR2	TRINITY_DN2101_c0_g1	-	۲/۴۸-	پرشدن
	SQD2	TRINITY_DN32838_c1_g1	-	۲/۵۳-	پرشدن

جدول ۳. پنج ژن با بالاترین افزایش و کاهش بیان در مرحله بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه گلرنگ

Table 3. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed maturation stage compared to the initiation stage of seed development in the safflower plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
گلرنگ	MDHM1	TRINITY_DN45428_c0_g1	-	۵/۸۱	بلوغ
	FAD2-1	TRINITY_DN61173_c0_g1	-	۵/۲۲	بلوغ
	AL2B7	TRINITY_DN14177_c6_g1	-	۵/۰۶	بلوغ
	FAD2-2	TRINITY_DN25756_c0_g1	-	-۸/۶۷	بلوغ
	AL2B4	TRINITY_DN64432_c0_g2	-	-۹/۳۹	بلوغ



شکل ۱. الگوی بیانی ۱۰ ژن دارای بالاترین و پایین‌ترین تفاوت بیان در مرحله پرشدن و بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه گلرنگ

Figure 1. The expression pattern of the top 10 genes with the highest up- and down-regulation at the seed maturation and filling stage compared to the initiation stage of seed development in the safflower plant

شناسایی ۱۰ ژن با تفاوت بیانی در سویا

با توجه به نتایج آنالیز بیان در نمونه‌های دانه سویا ژن‌های C86A1، KCS10-1 و KCS19 با بیان نسبی ۱۲/۲۸، ۱۱/۸۱ و ۷/۷۵ به ترتیب با بیشترین افزایش بیان و ژن‌های BCCP2 و LACS1-2 با بیان نسبی ۲/۱۱- و ۲/۱۸- به ترتیب با بیشترین کاهش بیان در مسیر پرشدن دانه نسبت به شروع رشد دانه را از خود نشان دادند (جدول ۶).

نتایجی که از آنالیز بیان ژن‌ها در نمونه‌های دانه سویا طی مرحله بلوغ نسبت به مرحله شروع رشد دانه مشاهده شد نشان داد که ژن‌های C86A1 با بیان نسبی ۱۰/۱۰، KCS10-1 با بیان نسبی ۹/۵۰ و KCS19 با بیان نسبی ۶/۹۲ بیشترین افزایش بیان و ژن‌های ADHX با بیان نسبی ۳/۵۸- و ژن FAD2 با بیان نسبی ۷/۹۴- به ترتیب بیشترین کاهش بیان را دارند (جدول ۷).

شناسایی ۵ ژن با تفاوت بیانی در کملینا

نتایج آنالیز بیان نمونه‌های دانه کملینا در مرحله پرشدن دانه نسبت به شروع رشد دانه نشان داد که ژن‌های DPEP1 با بیان نسبی ۵/۰۳، F7A7 با بیان نسبی ۴/۹۱، NOL با بیان نسبی ۳/۳۲ به ترتیب با بیشترین افزایش بیان و ژن‌های LPP و FAC17 به ترتیب با بیان نسبی ۱/۳۳- و ۱/۳۴- با بیشترین کاهش بیان شناسایی شدند (جدول ۴).

از سوی دیگر نتایج آنالیز ژن‌های F7A7-1 با بیان نسبی ۷/۴۳ و ژن F7A7-2 با بیان نسبی ۷/۱۰، KCS1 با بیان نسبی ۴/۷۱ به ترتیب بیشترین افزایش بیان در مسیر بلوغ دانه نسبت به شروع رشد دانه و ژن‌های FATA و LPAT5 با بیان نسبی ۱/۱۴- بیشترین کاهش بیان را در مسیر بلوغ دانه نسبت به شروع رشد دانه در کملینا از خود نشان دادند (جدول ۵).

جدول ۴. پنج ژن با بالاترین افزایش و کاهش بیان در مرحله پرشدن دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه کملینا

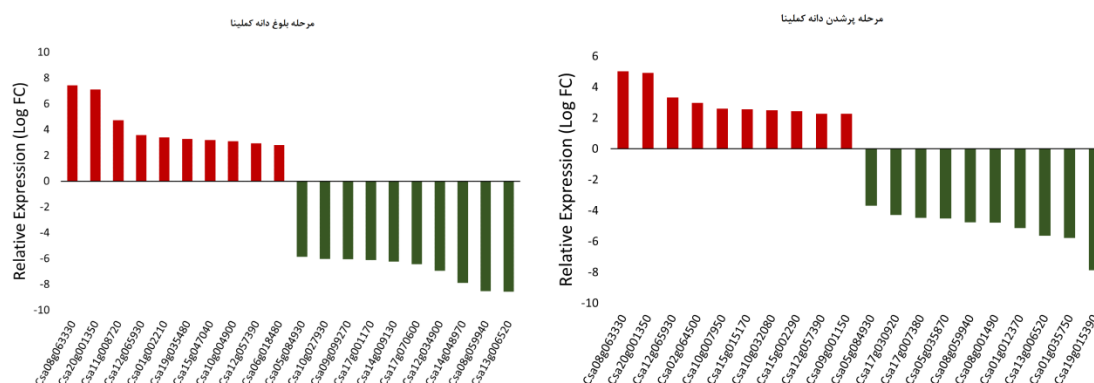
Table 4. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed filling stage compared to the initiation stage of seed development in the camelina plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
کملینا	DPEP1	104709017	XP_010423981	۵/۰۳	پرشدن
	F7A7	104768291	XP_010490521	۴/۹۱	پرشدن
	NOL	104732452	XP_010450301	۳/۳۲	پرشدن
	LPP	104740194	XP_010459030	-۱/۲۳	پرشدن
	FAC17	104704077	XP_010418506	-۱/۲۴	پرشدن

جدول ۵. پنج ژن با بالاترین افزایش و کاهش بیان در مرحله بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه کملینا

Table 5. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed maturation stage compared to the initiation stage of seed development in the camelina plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
کملینا	F7A7-1	104709017	XP_010423981	۷/۴۳	بلوغ
	F7A7-2	104768291	XP_010490521	۷/۱۰	بلوغ
	KCS1	104721377	XP_010437646	۴/۷۱	بلوغ
	FATA	104732428	XP_010450273	-۱/۱۴	بلوغ
	LPAT5	104765750	XP_010487812	-۱/۱۴	بلوغ



شکل ۲. الگوی بیانی ۱۰ ژن با بالاترین و پایین‌ترین تفاوت بیان در مرحله پرشدن و بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه کملینا

Figure ۲/ The expression pattern of the top ۱۰ genes with the highest up- and down-regulation at the seed-maturation and filling stage compared to the initiation stage of seed development in the camelina plant

جدول ۶. پنج ژن با بیشترین افزایش و کاهش بیان در مرحله پرشدن دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه سویا

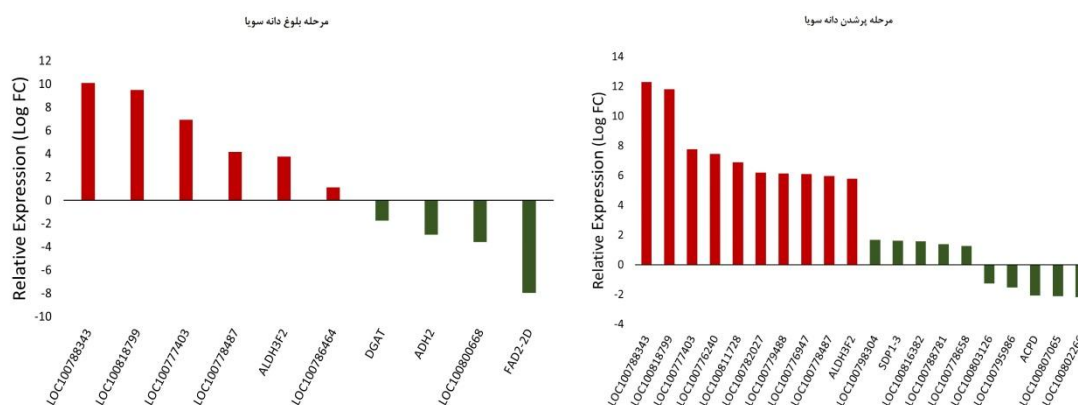
Table 6. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed filling stage compared to the initiation stage of seed development in the soybean plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
سویا	C86A1	100788343	XP_003544876	۱۲/۲۸	پرشدن
	KCS10-1	100818799	XP_003526086	۱۱/۸۱	پرشدن
	KCS19	100777403	XP_003536780	۷/۷۵	پرشدن
	BCCP2	100807065	XP_003543944	-۲/۱۱	پرشدن
	LACS1-2	100802266	XP_003542188	-۲/۱۸	پرشدن

جدول ۷. پنج ژن با بیشترین افزایش و کاهش بیان در مرحله بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه سویا

Table 7. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed maturation stage compared to the initiation stage of seed development in the soybean plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
سویا	C86A1	100788343	XP_003544876	۱۰/۱۰	بلوغ
	KCS10-1	100818799	XP_003526086	۹/۵۰	بلوغ
	KCS19	100777403	XP_003536780	۶/۹۲	بلوغ
	ADHX	100800668	XP_003544738	-۳/۵۸	بلوغ
	FAD2	100780912	XP_014617578	-۷/۹۴	بلوغ



شکل ۳. الگوی بیانی ۱۰ ژن با بالاترین و پایین‌ترین تفاوت بیان در مرحله پرشدن و بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه سویا

Figure 3. The expression pattern of the top 10 genes with the highest up- and down-regulation at the seed-maturation and filling stage compared to the initiation stage of seed development in the soybean plant

شوری را افزایش می‌دهد (Dar et al., 2017). یافته‌های Du و همکاران نشان داد که این ژن عامل اصلی تعیین‌کننده سطح اسیدهای چرب غیر اشباع ضروری (PUFAs) در روغن دانه بوده و نقش مهمی در بیوسنتز اسیدهای چرب دارد (Du et al., 2018). در پژوهش گان و همکاران مشخص گردید ژن‌های FAD و FATB دارای یک الگوی بیان بسیار مشابه در مسیر بیوسنتز اسید چرب می‌باشند (Gan et al., 2018). Yuan و همکاران در مطالعه‌ای بر روی بادام زمینی ۳ جهش Hotspot در هومولوگ‌های ژن FAD2 را شناسایی کرده و sgRNA های هدف را در یک پلاسمید بیانی CRISPR/Cas9 کلون کردند. آن‌ها گزارش دادند این گیاهان دارای جهش G448A در FAD2 دارای محتوای

شناسایی، تفسیر و طبقه‌بندی عملکردی ژن‌های بیانی افتراقی در دانه

در پژوهش حاضر به منظور شناسایی ژن‌های بیانی افتراقی ترنسکرپتوم بذر گیاهان مورد مطالعه گلرنگ (رقم گلدشت)، گیاه کم‌لینا و گیاه سویا بصورت جداگانه از مرحله شروع رشد دانه تا مرحله بلوغ مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد ژن FAD2 (اسید چرب غیراشباع) دارای افزایش بیان معنی‌داری در مسیر متابولیسم اسید چرب می‌باشد. این ژن مسئول کاتالیز اسید اولئیک به اسید لینولئیک می‌باشد. فعالیت FAD2 منجر به افزایش محتوای اسیدهای چرب دی‌نویک می‌شود. از این رو مقاومت در برابر سرما و تنش

‡ Polyunsaturated fatty acids

5) Oleic Acid

γ Linoleic Acid

را نشان داد. ژن‌های KCS5 و KCS1 در مراحل پر شدن و بلوغ دانه دارای افزایش بیان در مسیر تولیدسازی اسید چرب بودند و اما ژن KCS1 در ۲ گیاه دیگر کمینا و سویا نیز مشترک بوده و فعال نیز می‌باشد. به نظر می‌رسد ژن PDAT1 در هر دو مرحله پر شدن و بلوغ دانه دارای بیشترین فعالیت در مسیر متابولیسم گلیسرولیپید بوده است (جدول ۸).

ژن‌های درگیر در مسیرهای رشد دانه

در این مطالعه نقش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز و متابولیسم دانه مسیر متابولیسم گلیسرولیپید و بیوسنتز اسید چرب (شکل ۸) گیاه گلرنگ آنالیز شده است. بر این اساس مشخص گردید که ژن ADHX با شناسه (1.1.1.2) فعال در بیوسنتز گلیسرول و گلیسرآلدئید و ژن‌های GPAT1 با شناسه (3.1.3.106) و LPP2 با شناسه (3.1.3.4) در مسیر سنتز گلیسرول ۳-فسفات و دی‌آسیل گلیسرول افزایش بیان معنی‌داری داشته‌اند. در ژن ALDH2 با شناسه (1.2.1.3) نیز که در پایین‌دست ژن‌های مذکور و در مسیرهای سنتز گلیسرات و فسفولیپید واقع شده افزایش بیان معنی‌داری مشاهده گردید. از سوی دیگر ژن کدکننده آنزیم PDAT با شناسه (2.3.1.158) مسئول سنتز تری‌آسیل گلیسرول از ۲-ادی‌آسیل گلیسرول که در بالادست مسیر گلیکولیز و متابولیسم گلیسروفسفولیپید واقع شده، دارای بیشترین افزایش بیان می‌باشد (شکل ۴).

نتایج نشان داد که در مسیرهای گلیسرول، گلیسرول ۳-فسفات، آسیل گلیسرول ۳-فسفات، ژن‌های LPAT3 با شناسه (2.3.1.15) و GPAT4 با شناسه (2.3.1.15) کاهش بیان معنی‌داری دارند. همچنین ژن‌های AGAL2 با شناسه (3.2.1.22) و DGD1 با شناسه (2.4.1.241) ۲-ادی‌آسیل ۳-گلیسرول از ۲-ادی‌آسیل ۳-بتاگلیسرول در بالادست ژن‌هایی که در مسیر اصلی متابولیسم گلیسرولیپید، شامل دی‌فسفو دی‌گلیسرات و آسیل فسفات واقع شده‌اند کاهش بیان معنی‌داری نشان دادند. در این میان ژن کدکننده آنزیم SQD2 که در بالادست ژن‌های مسیر سنتز گلیکولیز و گلیسروفسفولیپید فعالیت دارد با بیشترین کاهش بیان شناسایی شد (شکل ۴).

اولئیک اسید بالایی بودند. بنابراین مشخص گردید جهش‌های القا شده در FAD2B برای توسعه لاین‌های دارای اولئیک اسید بالا مفید می‌باشد (Yuan et al., 2019). در مطالعه حاضر افزایش بیان و فعالیت این ژن در هر دو مرحله رشدی پر شدن و بلوغ دانه مشاهده شد. ژن FATB که در ژن‌های بیانی افتراقی نمونه‌های مورد مطالعه شناسایی شد دارای فعالیت تیواسترازهای پروتئین حامل آسیل-آسیل گیاهی (ACP) بوده و نقش کلیدی در تامین اسیدهای چرب اشباع لازم برای رشد گیاه و نمو بذر دارد (Bonaventure et al., 2003). در تحقیقی دورمن و همکاران متوجه شدند این ژن به تولید و تجمع بالای اسید پالمیتات در دانه کمک کرده و احتمال می‌رود در سنتز اسیدهای چرب با زنجیره بلند نقش داشته باشد. همچنین، این ژن نقش اساسی در خاتمه زنجیره در طول سنتز اسیدهای چرب جدید داشته و فعالیت هیدرولیتیکی در شرایط آزمایشگاهی برای پروتئین‌های حامل آسیل-آسیل با زنجیره بلند از خود نشان می‌دهد (Dörmann et al., 2000).

شناسایی ژن‌های کاندید مشترک با بیان بالا در

مسیر بیوسنتز لیپید گیاهان مورد مطالعه

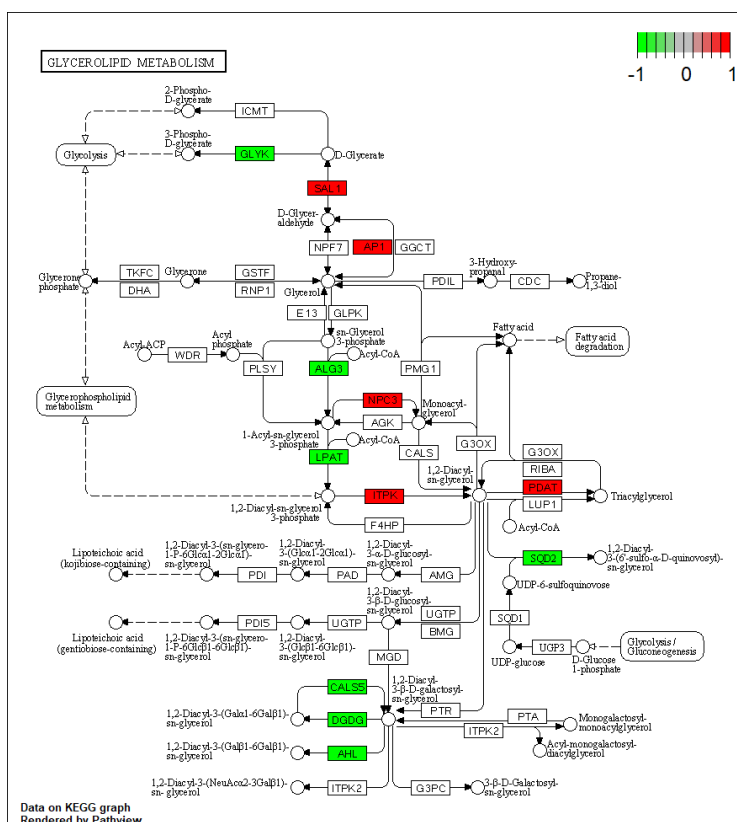
ژن‌های مشترک بیان بالا که در مسیر بیوسنتز لیپیدها در گیاه گلرنگ فعال می‌باشند

مسیر بیوسنتز لیپیدها در دانه‌های روغنی دارای ۵ مرحله مهم و اصلی در تولید اسید چرب که شامل مسیرهای متابولیسم اسید چرب، متابولیسم گلیسرولیپید، تولیدسازی اسید چرب، تجزیه و بیوسنتز اسید چرب می‌باشد. بررسی الگوهای بیانی نشان می‌دهد که ژن‌های FAD2 و FATB در مسیر متابولیسم اسید چرب در مرحله پر شدن و همچنین بلوغ دانه در هر گیاه گلرنگ، کمینا و سویا دارای بیان بالا می‌باشند. همچنین ژن NPC3 در مرحله پر شدن و بلوغ دانه دارای بیان معنی‌دار طی مسیر متابولیسم گلیسرولیپید فعال می‌باشد. FABH در مرحله پر شدن دانه دارای بیان بالا طی مسیر متابولیسم گلیسرولیپید می‌باشد. AIM1 در مرحله پر شدن دانه با بیان بالا در مسیر متابولیسم اسید چرب مشاهده شد. ژن ACOX در هر دو مرحله پر شدن و بلوغ دانه بیان بالایی

جدول ۸. اسامی ژن‌های مشترک کاندید با بیان معنی‌دار در مسیر بیوسنتز لیپیدها

Table 8. The name of candidate genes with significant expression in the lipid biosynthesis pathway

نام ژن	شناسه ژن	مراحل تشکیل دانه				تفاوت بیان معنی‌دار (DEG)		مسیر
		پرشدن	بلوغ	گل‌رنگ	کملینا	سویا	بیوسنتز	
FAD2	TRINITY_DN21784_c5_g4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	متابولیسم
FATB	TRINITY_DN24277_c0_g1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	اسید چرب
ACX4	TRINITY_DN11211_c0_g1	✓	✓	✓	✓		✓	
NPC3	TRINITY_DN27243_c0_g1	✓	✓	✓	✓		✓	متابولیسم
PDAT1	TRINITY_DN11357_c0_g1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
LPAT1	TRINITY_DN85846_c0_g1	✓	✓	✓	✓		✓	گلیسرولیپید
SDP1	TRINITY_DN10972_c0_g2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
LPAT5	TRINITY_DN3348_c0_g1	✓	✓	✓	✓		✓	
KCS5	TRINITY_DN90740_c0_g1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	طول‌سازی
KCS1	TRINITY_DN919_c0_g1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
KCS1	TRINITY_DN12002_c0_g2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
C86A1	TRINITY_DN16624_c0_g1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	اسید چرب
KCS1	TRINITY_DN919_c0_g1	✓	✓	✓	✓		✓	
AIM1	TRINITY_DN1512_c0_g2	✓	✓	✓	✓		✓	تجزیه اسید
C86A1	TRINITY_DN16624_c0_g1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	چرب
FABH	TRINITY_DN1512_c0_g2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	بیوسنتز
								اسید چرب



شکل ۴. ژن‌های درگیر در مسیرهای رشد دانه گلرنگ با تفاوت بیان معنی‌دار (ژن‌ها با p-value های کمتر از ۰/۰۵). رنگ قرمز:

بیشترین افزایش بیان و سبز: بیشترین کاهش بیان در مسیرهای سنتز دانه

Figure 4. Genes involved in safflower seed development pathways with significant differential expression (genes with p-values less than 0.05). Red: the highest up-regulation and Green: the highest down-regulation in seed development pathways

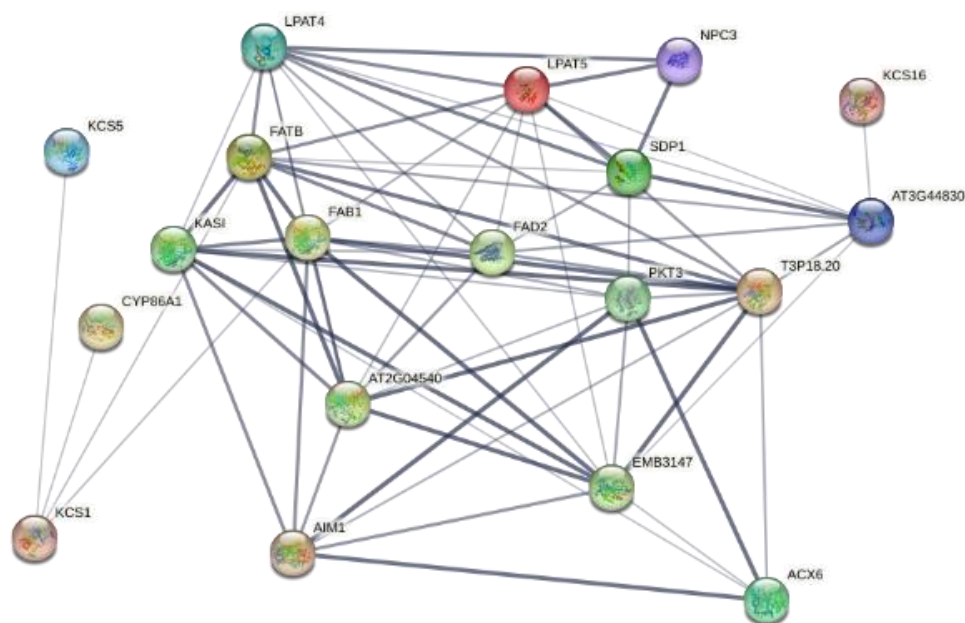
بتااکسیداسیون اسید چرب در طول رشد اولیه و پس از جوانه زنی در گونه های دانه های روغنی را مشاهده کردند. کارکرد این ژن برای استیلاسیون هیستون هسته ای و دی متیلاسیون DNA در برخی مکان های ژنومی مورد نیاز شناخته شده است (Wang *et al.*, 2019).

ژن NPC3 در مسیر متابولیسم گلیسرولیپید فعالیت داشته و در دوره شروع رشد و بلوغ دانه دارای تفاوت بیان معنی داری در گیاهان مورد مطالعه بود. از سوی دیگر این ژن دارای فعالیت خاص فسفاتاز نسبت به اسید لیزوفسفاتییدیک (LPA) بوده و احتمال می رود در انتقال سیگنال و ذخیره سازی سنتز لیپید نقش داشته باشد. در مطالعه ی Ngo و همکاران در رابطه با گیاه آراییدوپسیس مشخص گردید که این ژن فسفاتیدیل کولین (PC) را برای تولید فسفوکولین و دی آسیل گلیسرول DAG کاتالیز می کند (Ngo *et al.*, 2018). همچنین ممکن است در سیگنال دهی با واسطه براسینوئید در توسعه دانه و ریشه نقش داشته باشد. بیان بالایی از این ژن در طول گرسنگی گیاه و فقدان فسفات و همچنین تنش های غیرزیستی گزارش شده است (Wimalasekera *et al.*, 2010).

ترسیم شبکه میانکنشی پروتئین-پروتئین ژن های شناسایی شده به نرم افزار

در آنالیز پژوهش حاضر شبکه میانکنش ژن های کاندید در بیوسنتز اسید چرب دانه با استفاده از مجموعه اطلاعات پایگاه های داده UniProt, IMEx, BioGrid, BAR پس از فیلترکردن داده های مربوط به گیاهانی غیر از آراییدوپسیس تالینا شبکه بدست آمده در پایگاه داده STRING آنالیز شد. سپس در شبکه میانکنشی پروتئین-پروتئین ژن های کاندید و ژن های با بیان معنی دار در نرم افزار Cytoscape نسخه ۳,۹ شکل سازی شد. تعداد ژن های مرتبط بیانی بصورت گره های شبکه ای در نرم افزار مشاهده می شود و رنگ هر یک از گره ها به پروتئین مورد نظر اشاره دارد.

ژن ACX4 در مسیر متابولیسم اسید چرب دارای فعالیت معنی داری (بیان بالا) می باشد. این ژن در بتااکسیداسیون پراکسی زومی اسیدهای چرب در ذخیره سازی بذر فعال می باشد (Adham *et al.*, 2005). در مرحله پرشدن دانه و به خصوص مرحله بلوغ دانه گیاه گلرنگ بیان معنی داری مشاهده شد. وانگ و همکاران با مطالعه ی ژن مورد نظر فعالیت کاتالیزی در اولین مرحله



شکل ۵. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن های کاندید در بیوسنتز اسید چرب دانه

Figure 5. Protein-protein interaction network of candidate genes involved in fatty acid biosynthesis of seed

هیدرولیز تری گلیسرول بوده تا اسیدهای چرب و گلیسرول را آزاد کند.

ژن KCS5 در تولیدسازی اسید چرب دارای بیان بالا بوده و در مراحل غنی‌سازی و بلوغ دانه فعالیت بالایی دارد. این ژن در برخی دانه‌های روغنی مانند سویا در هر دو مسیر دکربونیل‌اسیون و سنتز آسید نقش دارد که عمدتاً با اسیدهای چرب اشباع، به ویژه 16:0، 16:1، 18:0، 20:0 فعال است و واسطه سنتز VLCFA از ۲۰ تا ۲۶ کربن می‌باشد. این ژن در بیوسنتز سوبرین و موم کوتیکولی نقش داشته و فعالیت آن در گلرنگ نیز مانند دیگر گیاهان دانه روغنی می‌باشد (Todd et al., 1999).

ژن C86A1 که در مسیر تولیدسازی اسید چرب فعالیت داشته در هر دو مرحله شروع رشد و بلوغ دانه بیان معنی‌داری (بیشترین بیان) دارد و در اکثر گیاهان مورد مطالعه دارای بیان معنی‌داری می‌باشد (Rupasinghe et al., 2007). در مطالعات انجام شده این ژن در هیدروکسیلاسیون اسیدهای چرب مختلف و کاتالیز آنها فعالیت مستقیم و موثری دارد. بدینگونه که روی اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع با طول زنجیره C12 تا C18 عمل می‌کند.

ژن PAS2 در تولیدسازی اسید چرب فعال بوده و دارای بیان معنی‌دار (با بیشترین کاهش بیان) می‌باشد. این ژن سومین واکنش از چهار واکنش چرخه افزایش طول اسیدهای چرب زنجیره بلند را کاتالیز می‌کند. در شبکه آندوپلاسمی باعث افزوده شدن دو کربن به زنجیره اسیدهای چرب با زنجیره بلند VLCFA در هر چرخه می‌شود. ژن PAS2 در هر چرخه ازدیاد طول اسید چرب، ۳-هیدروکسی سیل-CoA را به ترانس-۲،۳-انیول-CoA کاتالیز می‌کند. بنابراین در تولید VLCFA با طول‌های زنجیره مختلف که در فرآیندهای بیولوژیکی متعدد به عنوان پیش‌ساز لیپیدهای غشایی و واسطه‌های لیپیدی درگیر هستند شرکت می‌کند (Yang et al., 2018). همچنین در کنترل هورمونی تقسیم و تمایز سلولی نقش دارد (Bach et al., 2011).

ژن AIM1 که مطالعات بسیار کمی درباره عملکرد این ژن در گیاهان دانه روغنی وجود دارد، در پژوهش

ژن PDAT به عنوان محصول نهایی در سنتز تری‌آسید گلیسرول (تری‌گلیسرید) می‌باشد که به نظر می‌رسد PDAT در مسیر شروع رشد دانه بیشترین فعالیت را دارد. ژن فسفولیپید دی‌آسید گلیسرول که باعث تجمع اسید چرب هیدروکسی و TAG در دانه شده و دارای چندین هومولوگ می‌باشد با ژن DAG1 همپوشانی داشته و ذخیره اسید چرب را تا ۲۵ درصد افزایش می‌دهد (Kim et al., 2011)، که برای سنتز تری گلیسرول و رشد طبیعی دانه‌ها و گرده‌ها ضروری است (Li et al., 2010).

در پژوهش خوزه ماریا و همکاران ژن LPAT2 باعث افزایش سنتز اسید چرب گشته و یکی از مهم‌ترین ژن‌ها در مسیر و چرخه بیوسنتز TGA می‌باشد (Rupasinghe et al., 2007) و لایزوفسفاتیدیک اسید را به فسفاتیدیک اسید تبدیل کرده و همزمان با تجمع تری گلیسرول در دانه بیان می‌شود (Arroyo-Caro et al., 2013). همچنین این ژن باعث افزایش میزان روغن و دوره رشد جنین در آراییدوپسیس و گیاه کرچک می‌شود (Arroyo-Caro et al., 2013). در مطالعات حاضر این ژن بیان معنی‌داری را در مراحل رشد دانه به خصوص در گیاهان کم‌لینا و سویا نشان داد.

ژن SDP1 ژن تنظیمی بوده و باعث ازدیاد اسیدهای چرب در بذر گشته و نقشی اساسی در چرخه زندگی بسیاری از گیاهان ایفا می‌کند اما همواره مکانیسم مولکولی این ژن ناشناخته است. این ژن تری‌آسید گلیسرول‌ها و دی‌آسید گلیسرول‌ها را هیدرولیز می‌کند (Eastmond, 2006). نتایج تحقیقات Fan و همکاران نشان می‌دهد که لیپین‌های آراییدوپسیس همراه با SDP1، به طور هم‌افزایی در هدایت FA^۱ (اسید چرب) به سمت اکسیداسیون بتا پراکسی‌زومال از طریق واسطه‌های TAG عمل می‌کنند و در نتیجه هموستاز لیپید غشایی را در برگ‌ها حفظ می‌کنند (Fan et al., 2014). در پژوهش حاضر ژن SDP1 در مسیر متابولیسم گلیسرولیپید شناسایی شد و بیان آن در مرحله پرشدن دانه مشخص گردید. احتمال دارد این ژن در گلرنگ عامل

^۱Fatty acid

مطالعه حاضر بر روی شبکه ژنی و رابطه بین ژنی احتمال می‌رود این ژن‌ها در گلرنگ نیز در بالا رفتن سطح اسیدهای چرب غیراشباع نقش کلیدی داشته باشد. از طرفی دیگر ژن SDP1 یک ایزوآنزیم در پایین دست ژن FATB بوده و ژنی کلیدی در بیوسنتز تری آسید گلیسرول TAG می‌باشد (Brown *et al.*, 2012). براساس پژوهش Jingyu Xu و همکاران (Xu *et al.*, 2012)، رابطه ژن‌های PDAT و LPAT که هر دو در مراحل شروع رشد، پرشدن و همچنین بلوغ دانه اثر مستقیم داشته و باعث افزایش تری گلیسرول در دانه می‌شوند، به عنوان سوبسترای مشترک برای کاتالیز TAG در دانه فعالیت دارند و طبق آنالیز بیانی این دو ژن احتمال می‌رود در گلرنگ نیز فعالیت مشابهی را داشته باشند. در پژوهشی که توسط مرکز بیولوژی مولکولی دانشگاه نوادا انجام شده است نتایجی در مورد روابط بین ژن‌های KCS و C86A1 منتشر شده که نشان می‌دهد هر دو ژن در یک شبکه ژنی مشترک در سیگانالینگ و بیوسنتز اسید چرب در اثر تنش به خشکی گیاه دارای فعالیت بالقوه و کلیدی می‌باشند (Cochetel *et al.*, 2020). چن و همکاران با مطالعه ژن‌های فعال با بیشترین بیان مؤثر در سنتز اسید چرب و همچنین فاکتورهای رونویسی دخیل در مسیرهای متابولیسم اسید چرب گیاه کلزا، رابطه ژن‌های FABH و KAS و همچنین ژن پایین دست این گروه مانند AIM1 که در بیوسنتز لیپید دانه و همچنین سنتز اسید اولئیک نقش تنظیمی و کلیدی دارد را شناسایی کرده و مورد نقشه‌برداری قرار دادند (Chen *et al.*, 2015). به دلیل ارتباط شبکه‌ای این ژن‌ها در گیاه کلزا و فعالیت در مسیر بیوسنتز اسید چرب گلرنگ احتمال ارتباط این ژن‌ها در گلرنگ نیز بسیار زیاد است.

در نتایج حاصل از آنالیز شبکه ژنی و روابط بین ژن‌ها Abdullah و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی متاترنسکرپتوم ژن‌های دخیل در سنتز و ذخیره اسیدهای چرب گیاه کم‌لینا، با افزایش بیان ژن‌های کدکننده لیپید مانند پیرووات، لیپازها و فسفولیپازها افزایش بیان ژن DGAT که در پایین دست مسیر بیانی قرار دارد و همچنین با بیان آنزیم آسید ترانسفراز افزایش بیان ژن‌های LPAT و SDP نیز که در طول‌سازی اسید چرب و ذخیره‌سازی دانه‌های در حال رشد ضروری

حاضر دارای فعالیت در هر دو مرحله رشد دانه دارای بیان معنی‌داری بود. این ژن در بتاکسیداسیون اسیدهای چرب پراکسیزومال نقش داشته و فعالیت enoyl-CoA هیدراتاز در زنجیره کوتاه (C4-C6) و فعالیت ۳-hydroxyacyl-CoA دهیدروژناز در زنجیره‌های کربنی (C6-C16) دارد (Podkovyrov & Larson, 1996). در تحقیق Delkar و همکاران این ژن در مسیر پراکسیزومی بتاکسیداسیون بیوسنتز اسید بنزوئیک (BA) نقش داشته و برای تجمع گلوکوزینولات‌های بنزوئیک (BGs) و استرهای کولین هیدروکسی بنزوئیک در دانه‌ها که متابولیت‌های ثانویه حاوی BA هستند نقش کلیدی دارد. همچنین وجود این ژن برای سنتز اسید سالیسیلیک (SA) دانه‌ها ضروری است (Delker *et al.*, 2007).

ژن FABH که در نمونه‌های حاضر مورد مطالعه شناسایی شد در متابولیسم گلیسرولیپید فعالیت داشته و در مراحل رشد دانه شامل پرشدن و بلوغ بیان معنی‌داری دارد. پیشتر این ژن در گیاهان دانه روغنی مانند سویا و کلزا شناسایی شده بود که اسیدهای چرب را با افزودن دو کربن از مالونیل-ACP به یک گیرنده آسیدی کاتالیز می‌کند، دارای هر دو فعالیت استواسیتیل-ACP سنتاز و استیل ترانس اسیلاز بوده و آنزیم‌های بیوسنتزی اسیدهای چرب را کد می‌کند (Verwoert *et al.*, 1995).

شبکه ژنی

پس از یافتن ژن‌های کلیدی درگیر در مسیرهای بیوسنتز اسید چرب برای تعیین روابط موجود بین آنها شبکه‌ای بر پایه روابط پروتئین-پروتئین ژن‌های شناسایی شده از طریق پایگاه داده STRING بدست آمد و برهمکنش شبکه ژنی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape شکل‌سازی گردیده (شکل ۵) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ژن‌های FAD2 در بالادست ژن SDP1 و همچنین ژن FATB به عنوان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز اسید چرب و در طول زنجیره‌های کربنی دساجورازها (اسیدهای چرب غیراشباع) نقش اساسی دارند. به گفته هانگ و همکاران (Huang *et al.*, 2016)، سطح بالای بیانی در این ژن‌ها با بالا رفتن سنتز اسید لینوئیک به کلیدی بودن این ژن‌ها دلالت دارد و در

نتیجه‌گیری

به طور کلی در این تحقیق با استفاده از فناوری ترنسکریپتومیکس مقایسه‌ای به تجزیه و تحلیل و شناسایی ژن‌های موثر در مسیر رشد و نمو دانه گلرنگ پرداخته شده است. نتایج به دست آمده از این پژوهش با رویکرد متاترنسکریپتومی اطلاعات ارزشمندی از فرایند سنتز و ذخیره روغن دانه گلرنگ ارائه داده است. بر این اساس، ژن‌های FAD2 و FATB در مراحل پرشدن و بلوغ دانه با بیان معنی‌دار و ژن PDAT1 در مسیر متابولیسم گلیسرولیپید، ژن AIM1 در مسیر تجزیه اسید چرب و همچنین بر پایه شبکه پروتئین-پروتئین و روابط بین ژن‌ها ژن PDAT1 به عنوان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز روغن دانه شناسایی شدند. بنابراین با بررسی و شناسایی روابط تنظیم‌کننده‌ها و روابط تنظیمی ژن‌های شناسایی شده به عنوان بیومارکر در مسیر تولید و ارقام مهندسی شده با استفاده از فرایبان ژن‌های گزارش شده می‌تواند در برنامه‌های پژوهشی آینده در جهت بهبود تولید و کمیت و کیفیت روغن دانه مورد استفاده قرار گیرد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

می‌باشند به ترتیب شناسایی شده‌اند. (Abdullah et al., 2018). علاوه بر این بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسیر سنتز آسیل ترانسفراز ۴ (GPAT4) و لیزوفسفاتیديل آسیل ترانسفراز ۴ (LPAT4) و ژن‌های کدکننده فسفولیپیدهای موضعی غشایی، فسفاتیدیک اسید فسفاتاز (PAP2) و فسفولیپاز غیر اختصاصی (NPC) برای تامین دی‌آسیل‌گلیسرول‌ها (DAGs) همزمان با بیان DGAT بالا می‌رود (Sharma et al., 2008). لذا از آنجا که بسیاری از ژن‌هایی که در مسیر بیانی معنی‌دار شناسایی شدند، احتمال می‌رود ژن‌های کاندید NPC، SDP و LPAT در مطالعه حاضر نیز در مسیر پرشدن، حمل و نقل و به‌خصوص بلوغ و ذخیره سازی لیپیدها نقش کلیدی داشته باشند. طبق پژوهش و تحقیق Khan و همکاران روی بتاکسیداسیون اسیدهای چرب در آراییدوپسیس، نقش ژن ACX4 و هومولوگ‌های آن در پراکسی‌زوم‌ها که اکسیداسیون اولیه اسیدهای چرب در این ناحیه صورت می‌گیرد و هر ژن ACX روی طول زنجیره خاصی فعالیت دارد و با افزایش بیان این ژن فعالیت بتاکسیداسیون بتا نیز افزایش می‌یابد (Khan et al., 2012). در مطالعه حاضر نیز دیده شد که ژن ACX6 با ژن AIM1 فعالیت مشابهی داشته و هر دو ژن در مراحل پرشدن و بلوغ دانه فعال می‌باشند. لذا احتمال می‌رود این دو ژن با یکدیگر همپوشانی داشته باشند که منجر به بتاکسیداسیون اسید چرب دانه گلرنگ شود.

References

- Abdullah, H. M., Chhikara, S., Akbari, P., Schnell, D. J., Pareek, A., & Dhankher, O. P. (2018). Comparative transcriptome and metabolome analysis suggests bottlenecks that limit seed and oil yields in transgenic *Camelina sativa* expressing diacylglycerol acyltransferase 1 and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biotechnol Biofuels*, 11, 335. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1326-2>
- Adham, A. R., Zolman, B. K., Millius, A., & Bartel, B. (2005). Mutations in Arabidopsis acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in beta-oxidation. *Plant J*, 41(6), 859-874. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.02343.x>
- Andhale, R., & Md, S. (2018). Fatty acid profile and quality assessment of safflower (*Carthamus tinctorius*) oil. 7(2).
- Arroyo-Caro, J. M., Chileh, T., Kazachkov, M., Zou, J., Alonso, D. L., & García-Maroto, F. (2013). The multigene family of lysophosphatidate acyltransferase (LPAT)-related enzymes in *Ricinus communis*: cloning and molecular characterization of two LPAT genes that are expressed in castor seeds. *Plant Sci*, 199-200, 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.09.015>
- Bach, L., Gissot, L., Marion, J., Tellier, F., Moreau, P., Satiat-Jeunemaître, B., Palauqui, J. C., Napier, J. A., & Faure, J. D. (2011). Very-long-chain fatty acids are required for cell plate formation during cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci*, 124(Pt 19), 3223-3234. <https://doi.org/10.1242/jcs.074575>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

- Bonaventure, G., Salas, J. J., Pollard, M. R., & Ohlrogge, J. B. (2003). Disruption of the FATB gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell*, 15(4), 1020-1033. <https://doi.org/10.1105/tpc.008946>
- Brown, A. P., Kroon, J. T., Swarbreck, D., Febrer, M., Larson, T. R., Graham, I. A., Caccamo, M., & Slabas, A. R. (2012). Tissue-specific whole transcriptome sequencing in castor, directed at understanding triacylglycerol lipid biosynthetic pathways. *PLoS One*, 7(2), e30100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030100>
- Chen, J., Hu, Y., Zhao, T., Huang, C., Chen, J., He, L., Dai, F., Chen, S., Wang, L., Jin, S., & Zhang, T. (2024). Comparative transcriptomic analysis provides insights into the genetic networks regulating oil differential production in oil crops. *BMC Biology*, 22(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12915-024-01909-x>
- Chen, J., Tan, R. K., Guo, X. J., Fu, Z. L., Wang, Z., Zhang, Z. Y., & Tan, X. L. (2015). Transcriptome Analysis Comparison of Lipid Biosynthesis in the Leaves and Developing Seeds of Brassica napus. *PLoS One*, 10(5), e0126250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126250>
- Cochetel, N., Ghan, R., Troups, H. S., Degu, A., Tillett, R. L., Schlauch, K. A., & Cramer, G. R. (2020). Drought tolerance of the grapevine, Vitis champinii cv. Ramsey, is associated with higher photosynthesis and greater transcriptomic responsiveness of abscisic acid biosynthesis and signaling. *BMC Plant Biol*, 20(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2012-7>
- Dar, A. A., Choudhury, A. R., Kancharla, P. K., & Arumugam, N. (2017). The FAD2 Gene in Plants: Occurrence, Regulation, and Role. *Front Plant Sci*, 8, 1789. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01789>
- Delker, C., Zolman, B. K., Miersch, O., & Wasternack, C. (2007). Jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana requires peroxisomal beta-oxidation enzymes—additional proof by properties of pex6 and aim1. *Phytochemistry*, 68(12), 1642-1650. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.024>
- Dörmann, P., Voelker, T. A., & Ohlrogge, J. B. (2000). Accumulation of palmitate in Arabidopsis mediated by the acyl-acyl carrier protein thioesterase FATB1. *Plant Physiol*, 123, 644-657. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.637>
- Du, C., Chen, Y., Wang, K., Yang, Z., Zhao, C., Jia, Q., Taylor, D. C., & Zhang, M. (2018). Strong co-suppression impedes an increase in polyunsaturated fatty acids in seeds overexpressing FAD2. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 985-994. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery378>
- Eastmond, P. J. (2006). SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell*, 18(3), 665-675. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040543>
- Fan, J., Yan, C., Roston, R., Shanklin, J., & Xu, C. (2014). Arabidopsis lipins, PDAT1 acyltransferase, and SDP1 triacylglycerol lipase synergistically direct fatty acids toward β -oxidation, thereby maintaining membrane lipid homeostasis. *Plant Cell*, 26(10), 4119-4134. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130377>
- Gan, Y., Song, Y., Chen, Y., Liu, H., Yang, D., Xu, Q., & Zheng, Z. (2018). Transcriptome analysis reveals a composite molecular map linked to unique seed oil profile of Neocinnamomum caudatum (Nees) Merr. *BMC Plant Biol*, 18(1), 303. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1525-9>
- Geng, X., Dong, N., Wang, Y., Li, G., Wang, L., Guo, X., Li, J., Wen, Z., & Wei, W. (2018). RNA-seq transcriptome analysis of the immature seeds of two Brassica napus lines with extremely different thousand-seed weight to identify the candidate genes related to seed weight. *PLoS One*, 13(1), e0191297.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, 29(7), 644-652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Huang, J., Zhang, T., Zhang, Q., Chen, M., Wang, Z., Zheng, B., Xia, G., Yang, X., Huang, C., & Huang, Y. (2016). The mechanism of high contents of oil and oleic acid revealed by transcriptomic and lipidomic analysis during embryogenesis in Carya cathayensis Sarg. *BMC genomics*, 17, 113. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2434-7>
- Khan, B. R., Adham, A. R., & Zolman, B. K. (2012). Peroxisomal Acyl-CoA oxidase 4 activity differs between Arabidopsis accessions. *Plant Mol Biol*, 78(1-2), 45-58. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9843-4>

- Kim, H. U., Lee, K. R., Go, Y. S., Jung, J. H., Suh, M. C., & Kim, J. B. (2011). Endoplasmic reticulum-located PDAT1-2 from castor bean enhances hydroxy fatty acid accumulation in transgenic plants. *Plant Cell Physiol*, 52(6), 983-993. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr051>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12, 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, R., Yu, K., & Hildebrand, D. F. (2010). DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids*, 45(2), 145-157. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3385-4>
- Liu, R., Holik, A. Z., Su, S., Jansz, N., Chen, K., Leong, H. S., Blewitt, M. E., Asselin-Labat, M. L., Smyth, G. K., & Ritchie, M. E. (2015). Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. *Nucleic Acids Res*, 43(15), e97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv412>
- Ngo, A. H., Lin, Y. C., Liu, Y. C., Gutbrod, K., Peisker, H., Dörmann, P., & Nakamura, Y. (2018). A pair of nonspecific phospholipases C, NPC2 and NPC6, are involved in gametophyte development and glycerolipid metabolism in Arabidopsis. *New Phytol*, 219(1), 163-175. <https://doi.org/10.1111/nph.15147>
- Oecd, F. (2022). OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031 .
- Podkovyrov, S. M., & Larson, T. J. (1996). Identification of promoter and stringent regulation of transcription of the fabH, fabD and fabG genes encoding fatty acid biosynthetic enzymes of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, 24(9), 1747-1752. <https://doi.org/10.1093/nar/24.9.1747>
- Omidi, A. H., Shahsavari, M. R., Elhani, a., Jahanbin, A. (2011). Selection of New Safflower (*Carthamus tintorius* L.) Genotypes for Different Climatic Conditions Using some Stability Parameters. *Seed and Plant*, 27(3), 278-303. <https://doi.org/10.22092/spij.2017.111065>
- Rupasinghe, S. G., Duan, H., & Schuler, M. A. (2007). Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in Arabidopsis thaliana. *Proteins*, 68(1), 279-293. <https://doi.org/10.1002/prot.21335>
- Sharma, N., Anderson, M., Kumar, A., Zhang, Y., Giblin, E.M., Abrams, S.R., Zaharia, L.I., Taylor, D.C., & Fobert, P.R. (2008). Transgenic increases in seed oil content are associated with the differential expression of novel Brassica-specific transcripts. *BMC genomics*, 9, 619. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-619>
- Singh, V., & Nimbkar, N. (2016). Chapter 7- Safflower. In S. K. Gupta (Ed.), *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production* (pp. 149-167). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801309-0.00007-0>
- Soneson, C., Love, M. I., & Robinson, M. D. (2015). Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res*, 4, 1521. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7563.2>
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D362-D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
- Todd, J., Post-Beittenmiller, D., & Jaworski, J. G. (1999). KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, 17(2), 119-130. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00352.x>
- Verwoert, II, van der Linden, K. H., Walsh, M. C., Nijkamp, H. J., & Stuitje, A. R. (1995). Modification of Brassica napus seed oil by expression of the Escherichia coli fabH gene, encoding 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *Plant Mol Biol*, 27(5), 875-886. <https://doi.org/10.1007/bf00037016>
- Wang, L., Wang, C., Liu, X., Cheng, J., Li, S., Zhu, J. K., & Gong, Z. (2019). Peroxisomal β -oxidation regulates histone acetylation and DNA methylation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(21), 10576-10585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904143116>
- Wimalasekera, R., Pejchar, P., Holk, A., Martinec, J., & Scherer, G. F. (2010). Plant phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipases C NPC3 and NPC4 with roles in root development and brassinolide signaling in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant*, 3(3), 610-625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq005>
- Xu, J., Carlsson, A. S., Francis, T., Zhang, M., Hoffman, T., Giblin, M. E., & Taylor, D. C. (2012). Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on re-acylation of LPC by LPCAT2. *BMC Plant Biol*, 12, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-4>
- Yang, T., Yu, Q., Xu, W., Li, D.-z., Chen, F., & Liu, A. (2018). Transcriptome analysis reveals crucial genes involved in the biosynthesis of nervonic acid in woody Malania oleifera oilseeds. *BMC Plant Biology*, 18(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1463-6>

- Yesilyurt, M. K., Cesur, C., Aslan, V., & Yilbasi, Z. (2020). The production of biodiesel from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil as a potential feedstock and its usage in compression ignition engine: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109574>
- Yuan, M., Zhu, J., Gong, L., He, L., Lee, C., Han, S., Chen, C., & He, G. (2019). Mutagenesis of FAD2 genes in peanut with CRISPR/Cas9 based gene editing. *BMC Biotechnology*, 19(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0516-8>
- Zhou, L., Lu, L., Chen, C., Zhou, T., Wu, Q., Wen, F., Chen, J., Pritchard, H. W., Peng, C., & Pei, J. (2022). Comparative changes in sugars and lipids show evidence of a critical node for regeneration in safflower seeds during aging. *Frontiers in Plant Science*, 13.