

Toward evaluation of the monolignol biosynthesis gene network with contemplation on the role of cinnamoyl coA reductase (CCR) gene family in camelina sativa

Naser Darvishi 

Ph.D. Candidate, Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran. Tel: +989908127525, E-mail: naser1762@yahoo.com

Morteza Sabri 

MSc. in Plant Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran. Tel: +989120520015, E-mail: morteza2001sabri@gmail.com

Mehdi Alavi 

* corresponding author: Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran. Tel: +989128361873, E-mail: mealavi@nigeb.ac.ir , ORCID ID: 0000-0002-5875-3537

Abstract **Objective**

Camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) is a fast-growing oil crop belonging to the Brassicaceae family that can tolerate drought, salinity, cold, and many diseases and pests. Camelina seed has precious oil and protein with a number of potential attributes or benefits in both the human food and animal feed industry. Camelina also is being deemed as promising species to produce biodiesel and jet fuel in margin lands of the globe. Monolignols, as the precursor of lignin, are the common compounds in both lignification and soluble chemicals that have important roles in both normal development of healthy plants and defense-related responses in infected plant subjects. The regulatory mechanisms underlying the biosynthesis of these multifaceted secondary metabolites are poorly understood.

Material and Methods

Our current study presents the mode of gene expression and analyzes data to investigate the role of monolignol biosynthesis genes in the normal development growth of Camelina. We considered the transcript level of those genes that were covered 12 different tissues in major developmental stages during the life cycle of the Camelina. Using the R programming environment, we could have visualized the pattern of gene expressions with transcript per million (TPM) data in the heatmap.

Results

The results revealed the similarities as well as differences in gene expression patterns in both regulatory and functional gene groups among different tissues. Moreover, tissue-specific genes in different developmental stages were recognized.

Conclusions

The scrutiny in the literature related on biotic stress experiments in Camelina and also other species determined considerable differences in transcript levels and gene regulation patterns for the genes especially for members of the gene group encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR). Association of the latter genes CsCCR4 and CsCCR2 in particular involved in monolignol biosynthesis with the resistance of Camelina to pathogens contributes to providing a preliminary view to contemplate the future research options in various Camelina breeding programs.

Key words: Biofuel, Camelina oilseed crop, Cinnamoyl CoA reductase, Monolignol Biosynthesis

Paper Type: Research Paper.

Citation: Darvishi N, Sabri M, Alavi M (2020). Toward Evaluation of the Monolignol Biosynthesis Gene Network with Contemplation on the Role of Cinnamoyl CoA Reductase (CCR) Gene Family in Camelina sativa. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (4), 101-124.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (4), 101-124. DOI: 10.22103/jab.2020.16043.1245

Received: November 3, 2020.


Accepted: December 2, 2020.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production,
Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.




© the authors


بازسازی شبکه بیوستنزی منولیگنولها و بررسی نقش ژنهای سیناموئیل کوآ (CsCCR) در مراحل مختلف نمو دانه روغنی کاملینا (*Camelina sativa*)

ناصر درویشی 

دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۹۰۸۱۲۷۵۲۵،
ایمیل: naser1762@yahoo.com

مرتضی صبری 

کارشناسی ارشد زیست شناسی از دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۰۵۲۰۰۱۵، ایمیل:
morteza2001sabri@gmail.com

سید مهدی علوی 

* نویسنده مسئول، عضو هیئت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری گروه زیست فناوری گیاهی، تهران، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۸۳۶۱۸۷۶، ایمیل: mealavi@nigeb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۳

چکیده

هدف: امروزه کشت کاملینا به دلیل بروز بحرانهای ناشی از مصرف انرژیهای فسیلی، علاوه بر مصارف خوراکی، با هدف تولید سوخت زیستی هم مورد توجه قرار گرفته است. پژوهش حاضر ژنهای درگیر در بیوستنزی منولیگنولها را به لحاظ بیان در مراحل نمو مختلف در دانه روغنی کاملینا بررسی نموده است. منولیگنولها جریان کربن را یا به سمت تقویت جداره سلول با افزایش لیگنینی شدن می‌برند و یا به سوی تولید ترکیبات شیمیایی مثل کملکسین هدایت می‌کنند. هر دو خصوصیت در اعطای مقاومت گیاه به بیماری‌ها اهمیت دارند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از داده‌های TPM مربوط به ژنهای کارکردی و عوامل رونویسی درگیر در بیوستنزی منولیگنول در گیاه کاملینا استفاده شد. بیان این ژن‌ها در مراحل نرمال نمو مختلف دچار تغییر می‌شوند. با استفاده از زبان برنامه نویسی R این داده‌ها برای ساده‌سازی نمایش نتایج، تحلیل گردیدند.

نتایج: ژن‌های CsCCR1 و CsCCR4 به خوبی در بافت‌های مختلف بیان شدند درحالیکه ژن CsCCR2 به میزان بسیار ناچیزی در شرایط نرمال بیان می‌شود. در عوض مدارک دیگر نشان دادند که ژن اخیر و ژن CsCCR4 تحت القای قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در کاملینا افزایش چشمگیری در بیان نشان می‌دهد. مقایسه شرایط نرمال رشد و مواقع حمله پاتوژن نشان داد که ژن CsCCR4 بطور مداوم درحال بیان است و گویای اینست که این ژن همزمان دارای نقش ساختاری و دفاعی می‌باشد. این دو ژن اخیر می‌توانند به عنوان منبع بالقوه مقاومت به بیماری مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرند. بطور خودکار، شبکه‌های تنظیمی بیان ژن از جمله کلیدهای اصلی نمو و عوامل رونویسی در کاملینا در برقراری تعادل میان دوگانه رشد طبیعی و سازوبرگ‌های دفاعی حاصل از مسیر بیوسنتز منولیگنول بسته به نوع پیام‌های دریافتی، عمل می‌کنند هرچند که پاسخ آفریده شده وابسته به جوهره و هویت رقم می‌باشد.

واژگان کلیدی: بیوسنتز منولیگنول، دانه روغنی کاملینا، سوخت زیستی، سیناموئیل کوآ ردوکتاز

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: درویشی ناصر، صبری مرتضی، علوی سید مهدی (۱۳۹۹) بازسازی شبکه بیوسنتزی منولیگنول‌ها و بررسی نقش ژن‌های سیناموئیل کوآ (CsCCR) در مراحل مختلف نمو دانه روغنی کاملینا (*Camelina sativa*). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۰۱-۱۲۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production,
Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

در عصر حاضر موضوع انرژی اهمیت فراوانی برای دولت‌ها و ملت‌ها دارد. تاریخ بشر مسیری را طی نموده که استفاده فراوان از انرژی برای سبک زندگی دوره مدرن و پسامدرن را ضروری ساخته‌است. به عنوان جایگزین اخیرا سوخت‌های زیستی در کنار دیگر انرژی‌های پاک تر و پایدارتر، پس از ناکامی در استحصال بیش از اندازه سوخت‌های فسیلی و تجدید ناپذیر بودن و به ته کشیده شدن آن‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. در حال حاضر سوخت‌های فسیلی شامل نفت، گاز و زغال سنگ ۸۰ درصد از مجموع منابع انرژی مورد استفاده بشر را شامل می‌شوند (Smil 2016). اکنون که همگان خطر استفاده از سوخت‌های فسیلی را به لحاظ اتمام منابع و محدودیت در استخراج در سال‌های پیش رو و نیز به جهت پیامدهای مخرب زیست محیطی برای طبیعت و جوامع انسانی درک نموده اند (بروز بحران‌های دوقلو)، سوخت‌های زیستی به دست آمده از گیاهان، خصوصا از دانه روغنی گیاه

کاملینا ((*Camelina sativa* L. Cranz) از خانواده براسیکاسه و خویشاوند نزدیک *Arabidopsis thaliana* و خویشاوند دور گیاه روغنی کلزا (*Brassica napus*) می‌باشد (Kiefer et al. 2013)) نویدبخش بدیلی مناسب برای گذار از درک کنونی ما از انرژی و نحوه تولید آن خواهد بود. بذر کاملینا معمولا حاوی ۳۸ تا ۴۳ درصد روغن، ۴۵ درصد پروتئین خام و ۸ تا ۱۱ درصد رطوبت می‌باشد. (Russo & Reggiani 2017). هم اکنون روغن کاملینا کاربردهای فراوانی دارند و در تحقیقات متعدد کاربرد آن مورد مذاقه و مطالعه قرار گرفته‌است. بطور کلی روغن کاملینا به صورت دیزل زیستی (Moser 2016) و سوخت هواپیما (Li et al. 2018) و در تولید مواد شیمیایی مثل منومرهای آبدوست، چسب‌ها و رزین (Balanuca et al. 2015) مورد استفاده قرار می‌گیرد و از تفاله پروتئینی آن موسوم به کیک کاملینا به عنوان محصول جانبی به دلیل ارزش غذایی بالای آن، به عنوان مکمل غذایی در جدول جیره بندی تغذیه دام (Bayat et al. 2018; Mierlita et al. 2018;)، طيور (Juodka et al. 2018) و آبزبان (Anderson et al. 2018) استفاده می‌شود. کشت کاملینا می‌تواند چرخه‌ی تولید انرژی را که در سوخت‌های فسیلی میلیون‌ها سال طول می‌کشد را به کمتر از صد روز کاهش دهد. همچنین کل فرایند تولید و مصرف سوخت زیستی، در مقایسه با سوخت‌های فسیلی گاز گلخانه‌ای کمتری را تولید می‌کند (Krohn & Fripp 2012) و دیگر اینکه تولید سوخت از روغن کاملینا برخلاف سوخت‌های حاصل از دیگر کاندیداهای تولید سوخت زیستی مثل سویا و کلزا که به ترتیب سالانه ۳۵۴ و ۷۵ میلیون تن از روغن آن‌ها در جهان تولید می‌شود (Service 2019) رقیبی برای غذای انسان محسوب نمی‌شود (Augustin et al. 2015)، بنابراین منبعی تجدیدپذیر و در عین حال پاک و پایدار محسوب می‌شود بطور کلی اهداف اصلاحی که در کاملینا دنبال می‌شود شامل تولید ارقام زودرس با عملکرد بذر بالا، ایجاد ارقام با کیفیت روغن و پروتئین بالا، افزایش در اندازه بذر، مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و همچنین ایجاد مقاومت به علفکش‌های مخصوص پهن برگ‌ها می‌باشد. در پژوهش اما هدف اصلی توصیف الگوی بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز منولیگنول‌ها (به عنوان پیش سازان ساخت لیگنین و متابولیت‌های ثانویه) در گیاه کاملینا می‌باشد. مطالعه بیوسنتز لیگنین به لحاظ اصلاح برای استقامت گیاه در برابر ورس و مهم تر از آن اعطای مقاومت فیزیکی با تقویت ساختار ساقه و مقاومت شیمیایی با تولید متابولیت‌های ثانویه دفاعی در برابر حمله پاتوژن‌ها اهمیت پیدا می‌کند. ضمن اینکه، مسیر بیوسنتز منولیگنول‌ها در چهارراه پدیده‌های گوناگون تکوینی از جمله تعیین سرنوشت سلول، تعیین ریخت گیاه، پاسخ به نور و عوامل متعدد دیگر درگیر می‌باشد که به نوبه خود ضرورت چنین مطالعاتی را به لحاظ فهم محض این پدیده زیست‌شناختی و ارائه تصویری روشن تر از این مسیر را یادآوری می‌نماید.

در اینجا سعی شده ژن‌های کارکردی و عوامل رونویسی درگیر در تنظیم این مسیر همگی در بازسازی تصویر نهایی این مسیر در گیاه کاملینا در درون یک قاب نمایش داده شوند. به دلیل اهمیت ژن‌های CCR (ژن سیناموئیل کوآ ردوکتاز) در این گیاه به دلیل نقش برخی از آن‌ها در اعطای مقاومت به بیماری‌ها که در مسیر قرار دارد، جزئیات بیشتری از آن‌ها نسبت به سایر ژن‌ها ارائه خواهد شد. در ادامه برای تعیین حیطه‌ی بحث، بطور اجمالی شرحی از ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین که در عموم گیاهان در حال وقوع است، بیان می‌گردد. بطور کلی سه نوع زیرواحد منومری هیدروکسی سینامیل الکل شامل □ - هیدروکسی

فنیل(H)، گایاسیل (G) و سیرینجیل (S) موسوم به منولیگنولها پلیمر لیگنین را می‌سازند. منولیگنولها در سیتوپلاسم تولید و فراوری شده و در فضای خارج سلولی پلیمریزه می‌شوند. مسیر بیوسنتز لیگنین برای چندین بار توسط پژوهشگران مختلف بازسازی شده‌است و مناقشه برای ترسیم مجدد این شبکه همچنان ادامه دارد (Humphreys & Chapple Dixon et al. 2001) ; Dixon & Barros 20192002). اما، بر مسیر شناخته شده تا کنون که در ادامه توضیح داده می‌شود، تا حدود زیادی توافق حاصل شده و تغییرات و کشفیات جدید با محوریت این مسیر در حال تدوین و افزایش دقت در صورت بندی همین مسیر هستند.

آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) با تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید گام اول در بیوسنتز منولیگنولها را برمی‌دارد. کاهش در بیان ژنهای PAL باعث بروز اختلالات گسترده ای شامل کاهش رشد، تغییرات ساختاری در شکل برگ و گل و ساقه در گیاهان می‌شود. پس از آن سینامیک اسید ۴- هیدروکسیلاز (C4H)، سینامیک اسید را به ۵-کوماریک اسید تبدیل می‌کند و در ادامه ۴-کومارات کوآ لیگاز (4CL)، پیش ساز منولیگنول به نام ۵-کوماریل کوآ را می‌سازد. این پیش ماده در قدم بعدی یا توسط آنزیم ۳- کومارات ۳-هیدروکسیلاز(C3H) به کافوئیل کوآ تبدیل شده و یا توسط آنزیم سیناموئیل کوآ ردوکتاز(CCR) به کوماریل آلدئید تبدیل خواهد شد. سپس کافوئیل کوآ توسط آنزیم کافوئیل کوآ ۳-۵-متیل ترانسفراز(CCoAOMT) متیله شده و فرولیل کوآ را می‌سازد. این ترکیب نیز توسط CCR به کنیفریل آلدئید تبدیل می‌شود. آنزیم کنیفرآلدئید ۵-هیدروکسیلاز(F5H) که یک منوکسیژناز وابسته به سیتوکروم p450 می‌باشد باعث تولید ۵-هیدروکسی کنیفرآلدئید از کنیفرآلدئید می‌شود. آنزیم F5H با این تبدیل باعث می‌شود که تولید لیگنین نوع S در گیاه تقویت شود. در واکنش بعدی، آنزیم کافئیک اسید ۵-متیل ترانسفراز (COMT)، ۵-هیدروکسی کنیفریل آلدئید را به سیناپالدهید تبدیل می‌کند. سیناپالدهید در کنار کنیفریل آلدئید و ۵-کوآرآلدئید (دو فراورده آنزیم CCR) توسط آنزیم سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) به ترتیب سیناپیل الکل (پیشساز لیگنین S)، کنیفریل الکل (پیشساز لیگنین G) و ۵-کوماریل الکل (پیشساز لیگنین H) تبدیل می‌شوند. نحوه بیان این ژن‌ها در مراحل نمو مختلف و بافت‌های گوناگون تحت انواع تنظیم‌ها در سطح رونویسی قرار دارند که در نتیجه آن بیوسنتز لیگنین به میزان کافی و در تناسب با نمو طبیعی گیاه تولید می‌شود.

مواد و روش‌ها

داده‌های نرمال شده‌ی مربوط به سطح رونوشت ژن‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین از نوع TPM از پایگاه داده اطلس ترانسکریپتوم تکوینی کاملینا از آدرس http://bar.utoronto.ca/efp_camelina/cgi-bin/efpWeb.cgi به منظور تشریح و توصیف وضعیت و نقش هر ژن استخراج و در محیط برنامه نویسی R میانگین بیان ژن‌های این مسیر با سه تکرار و در ۱۲ بافت و مرحله نمو لاین دابل‌هاپلوئید DH55 شامل جوانه زنی (GS)، کوتیلدونی(C)، ساقه(S)، ریشه(R)، گل انگیزی (IF)، گل دهی (F)، برگ جوان (YL)، برگ پیر (OL)، مرحله نمو اولیه بذر (ESD)، مرحله میانی نمو بذر (EMSD)، مرحله

نزدیک به اواخر نمو بذر (LMSD) و انتهای نمو بذر (LSD) مورد مقایسه و تحلیل قرار گرفتند (Kagale et al. 2016) و نتایج به صورت هیت مپ به نمایش درآمدند (شکل ۱). از آنجا که گیاه کاملینا آلوهگزاپلوئید (n=20) بوده و ژن‌ها در سه زیرژنوم (CsG1=6, CsG2=7, CsG3=7) مستقل تقسیم بندی شده‌اند، برای هر ژن مشخص در شرایط معمول شاهد سه نسخه هستیم. بالطبع سطح بیان هر نسخه چنانچه خواهیم دید ممکن است با همدیگر متفاوت باشند (جدول ۱ داده‌های تکمیلی).

برای بدست آوردن توالی ژن‌های CsCCR4 (که اهمیت زیادی در سیستم دفاعی لاین‌های مقاوم دارد) به پایگاه داده camelinadb.ca/ مراجعه و به منظور انطباق توالی ژن‌های مورد مطالعه با همولوگ‌های خود در گیاه آرابیدوپسیس و بررسی کارکردها و دیگر نشان ویژه‌های هر ژن از پایگاه‌های arabidopsis.org / plantpan2.itps.ncku.edu.tw/ (برای مطالعه میانکشی عوامل رونویسی با راه انداز ژن CCR4) و برای استخراج سطح رونویسی برخی ژن‌ها در آرابیدوپسیس از bar.utoronto.ca/efp2/Arabidopsis/Arabidopsis_eFPBrowser2.html استفاده گردید. برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی مقایسه ژن‌های مسیر بیوستنز کاملینا و آرابیدوپسیس از نرم افزار CLC genomic workbench استفاده گردید. برای تفسیر کارکرد بالقوه هر رونوشت از ژن‌های CsCCR جستجوی شباهت با استفاده از BLASTX در مقابل پروتئوم آرابیدوپسیس (پایگاه داده NCBI non-redundant) با $E\text{-value cut-off} \leq 10^{-5}$ برای یافتن بهترین جفت شدگی برای هر رونوشت انجام شد. سپس برای هر رونوشت شاخص کارکرد مولکولی، فرایند بیولوژیک، مکان سلولی آن‌ها، وزن مولکولی و. و. مقایسه توالی ژن‌های کاملینا با پروتئین‌های آرابیدوپسیس در پایگاه داده Arabidopsis.org مشخص گردید.

نتایج

براساس داده‌های ترانسکریپتوم کاملینا و تحلیل افتراقی بیان ژن‌های بیوستنز لیگنین مشخص شد که ژن CsPAL1 و CsPAL2 در ابتدای مسیر ساخت منولیگنول، CsC4H، CsC4CL، CsC3H، CsCCR، CsCCR10 تا CCR1، CsF5H در میانه و ژن‌های CsCAD1 تا CsCAD5 در انتهای مسیر در حداکثر سطح خود (گوشه سمت راست پایین شکل ۱) در ریشه و ساقه بیان شده‌اند. زیر همچینی چندگانه این ژن‌ها در کاملینا با متناظر خود در گیاه مدل آرابیدوپسیس نشان داد که تمامی آن‌ها در سطح توالی آمینواسیدی محافظت شده‌هستند. درخت فیلوژنتیکی ژن‌های ساخت منولیگنول براساس توالی اسیدآمینو ای این ژن‌ها در کنار متناظرهای خود در آرابیدوپسیس ترسیم شد که نشان دهنده پدیده سه برابر شدگی ژن‌ها در کاملینا نسبت به آرابیدوپسیس می‌باشد (شکل ۲). بر همین اساس مسیر بیوستنز منولیگنول در کاملینا با تمرکز بر میزان و نقش هر ژن در زیر ژنوم با استفاده از میانگین داده‌های بیان ژن‌های حاضر در این مسیر بازسازی و بازنمایی گردید (شکل ۳).

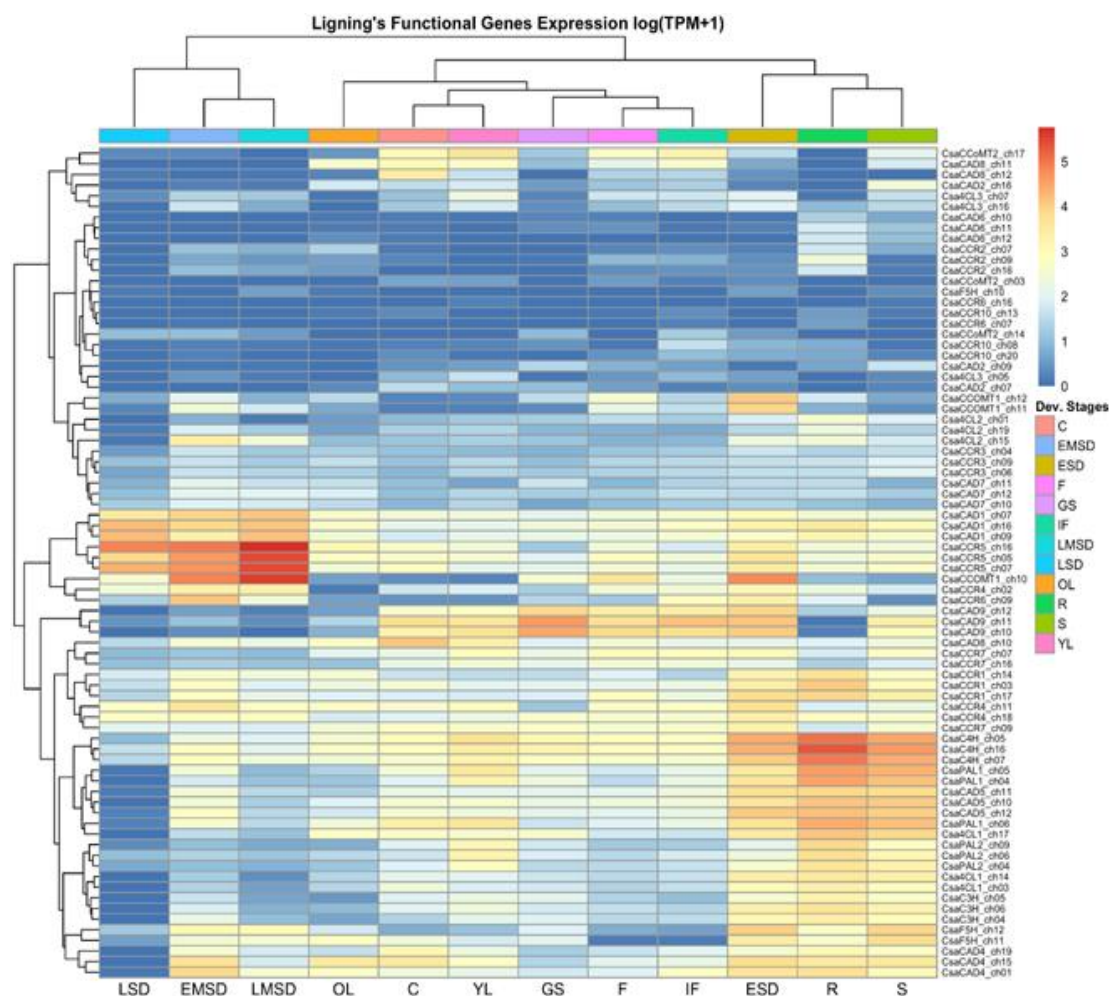
الگوی بیان ژن‌های گروه CsCCR: همانطور که اشاره شد ژنوم گیاه کاملینا دارای سه زیر ژنوم می‌باشد و معمولاً برای هر ژن در گیاه آرابیدوپسیس سه ژن متناظر وجود دارد (Kagale et al. 2014). معلوم گردیده که از میان ۱۰ ژن CCR از

از CCR1 تا CCR10) همه ژن‌ها به استثنای CCR8 (که احتمالا توالی‌های متناظر آن در کاملینا حشو باشند) در ژنوم بازسازی شده کاملینا موجود می‌باشد. برخی از ژن‌های این گروه از جمله CsCCR2 و CsCCR4 به دلیل نقش دفاعی که در برابر بیماری‌های قارچی در گیاه کاملینا دارند، حائز اهمیت می‌باشند و در برنامه‌های اصلاحی (چنانچه در ادامه توضیح خواهیم داد) اعطای مقاومت مورد بررسی قرار گرفته اند. در ژن CCR9 نیز در زیر ژنوم‌های یک و سه دارای ژن متناظر بوده در حالیکه در زیر ژنوم شماره دو متناظر آن وجود ندارد. چنانچه در تصویر آمده‌است (شکل ۴) پس از برش خوشه‌ی ژن‌ها توسط خط چین قرمز رنگ (شناسه ژن‌ها یا gi هر کدام در سمت راست شکل مشخص شده‌است)، می‌توانند به دو زیر گروه کم بیان و متوسط بیان (به لحاظ سطح رونوشت) تقسیم بندی شوند.

در ادامه به شرح کارکرد بالقوه هر رونوشت از ژن‌های گروه CsCCR بدست آمده به ترتیب الگوی قرار گرفتن ژن‌ها در هیت مپ، از بالا به سمت پایین خواهیم پرداخت: همانطور که ملاحظه می‌شود ژن‌های CCR2 و CCR10 در هر سه نسخه خود در ژنوم به طور کلی نسبت به بقیه کمتر بیان شده‌اند.

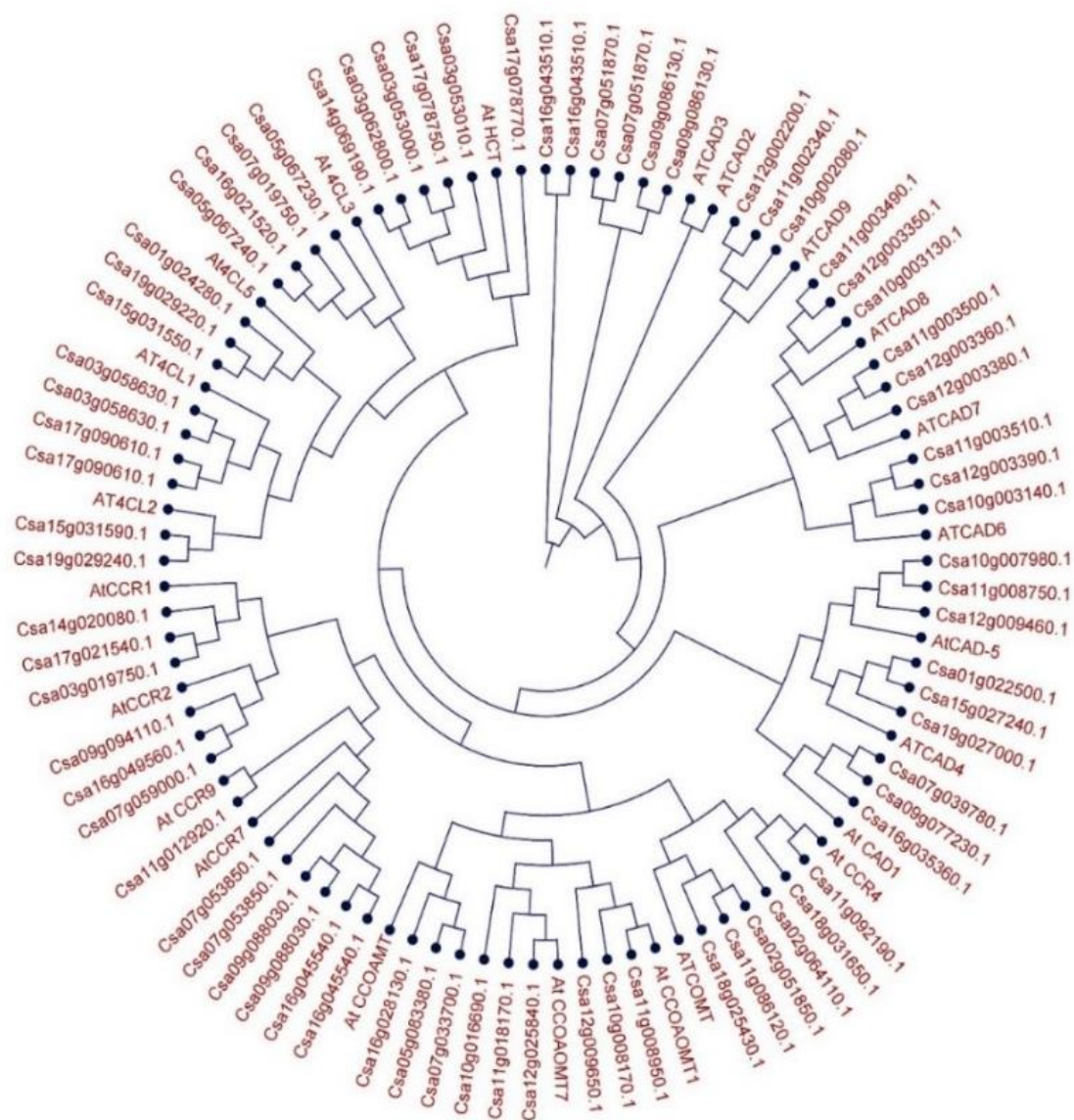
CsCCR2: در مطالعه نحوه واکنش ژن‌های گروه CsCCR پس ایجاد بیماری پوسیدگی ساقه توسط اسکروتینیا در ساقه کاملینا توسط Eynck و همکاران (۲۰۱۲)، رونوشت ژن CsCCR2 پس از ۴۸ ساعت در شرایط حمله پاتوژن چه در گیاه مقاوم چه در گیاه حساس چندین برابر افزایش بیان نشان دادند البته در گیاه مقاوم افزایش بیان بسیار معنی دار تر بوده‌است. این نتیجه گویای آنست که این ژن در ارقام مقاوم طی سازوکاری نامعلوم افزایش بیان نشان داده که متعاقب آن افزایش ترسیب لیگنین در محل آلودگی رخ می‌دهد. هر سه نسخه ژن CsCCR2 در ریشه بیان بالاتری دارند این افزایش بیان در زیر ژنوم شماره دو که بر روی کروموزوم ۹ قرار دارد شدیدتر می‌شود.

در حالیکه در بقیه بافت‌ها یا اصلا بیان نمی‌شود و یا بیان آن بسیار ناچیز است. از طرفی این ژن در شرایط نمو طبیعی در ژنوم گیاه حساس به بیماری لاین DH55 در ریشه بیان بالایی را نسبت به بقیه‌ی بافت‌ها و اندام‌ها از خود نشان می‌دهد. مطالعه نحوه تقسیم کار بین نسخه‌های این ژن در زیر ژنوم‌های مختلف نقش دوگانه این ژن و افتراق در تنظیم بافتی-دفاعی آن (فعالیت در ساقه به عنوان سد دفاعی علیه پاتوژن و فعالیت در ریشه احتمالا به عنوان یک ژن ساختاری) می‌تواند شیوه اعمال نیروهای هدایت کننده و کارکرد جالب توجه آن را آشکار نماید. نکته دیگر اینکه ژن AtCCR2 به لحاظ بیوشیمیایی از ژن AtCCR1 (به عنوان ژن اصلی و ضروری شناخته شده در تولید منولیگنول برای ایجاد شرایط رشد نرمال (Miedes et al. 2014) دو هویت مجزا هستند و در طول نمو و در پاسخ به پاتوژن نیز الگوی بیان متفاوتی را نشان می‌دهند (Lauvergeat et al. 2001). مطالعات متعددی نقش ژن‌های ساخت لیگنین در ابتدا یا در انتهای مراحل ساخت (از سنتز فنیل پروپانوئید گرفته تا انتهای ساخت منولیگنول) که در پاسخ به عوامل بیماری زا افزایش بیان دارند را نشان می‌دهد.



شکل ۱. هیت مپ الگوی بیانی ژن‌های کارکردی مسیر بیوسنتز لیگنین در کاملینا. شناسه ژن‌ها (GI) در سمت راست نمودار آورده شده‌است. مراحل مختلف نموی و بافت‌های مختلف به صورت نوار رنگی در بالای شکل و سطح بیان ژن‌ها به صورت $\log(\text{TPM}+1)$ ترسیم شده و راهنمای هر مرحله با علامت اختصاری در سمت راست (نوار پایین) شامل کوتیلدون (C)، ساقه (S)، ریشه (R)، برگ جوان (YL)، برگ پیر (OL)، گل انگیزی (IF)، گلدهی (F)، جوانه زنی بذر (GS)، مرحله اول نمو بذر (ESD)، مرحله پس از نمو اولیه بذر (EMSD)، مرحله ماقبل نمو بذر (LMSD) و مرحله پایانی نمو بذر (LSD) نمایش داده شده‌است.

Figure 1: Expression pattern of monolignol biosynthesis functional genes among different tissues and developmental stages using $\log(\text{TPM}+1)$ in normal condition in *Camelina* line DH55. GIs are represented on right of the graph. Tissues and developmental stages are illustrated by a colorful bar on top of the figure. Legend: red= high and blue= low level of expression. Abbreviations: C: Cotyledon, S: Stem, R: Root, YL: Young Leaf, OL: Old Leaf, IF: Inflorescence, F: Flowering, GS: Germinating seed, ESD: Early Seed Development, EMSD: Early-Mid Seed Development, LMSD: Late-Mid Seed Development and LSD: Late Seed Development.



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز لیگنین و ژن‌های متناظر آن‌ها در آرابیدوپسیس بیان می‌دارد که پدیده سه برابر شدگی در ژنوم کاملینا نسبت به این خویشاوند خود رخ داده‌است.

Figure 2: Phylogenetic tree of monoglignol biosynthesis genes in Camelina rooted with Arabidopsis which indicates the gene triplication in Camelina relative to Arabidopsis.

CsCCR2 به استثنای ریشه که به خوبی بیان دارد، تقریباً در هیچ یک از بافت‌ها یا بیان نمی‌شود یا بیان بسیار ناچیزی نشان می‌دهد و مشابه آرابیدوپسیس در مقابل حمله پاتوژن‌ها در سیستم دفاعی و یا در پاسخ به سایر تنش‌ها فعال خواهد شد. در عوض ژن CsCCR1 در همه بافت‌ها به صورت مداوم بیان شده که به نحوی بیانگر نقش ساختاری این ژن در گیاه کاملینا می‌باشد. CsCCR2 توسط پاتوژن اسکروتینا بخوبی القا شده که با رسوب لیگنین‌های منومرهای نوع گایاسیل مرتبط است (Eynck et al. 2012). در گیاه مقاوم و حساس در ناحیه پیرامونی محل آلوده به پاتوژن افزایش سطح رونوشت CsCCR2 مشاهده شده هرچند که این افزایش در رقم مقاوم ۴ برابر بیشتر از رقم حساس بود.

CsCCR9: ژن AtCCR9 (At4g30470) از بالا خانواده پروتئین‌های متصل شونده به (-Rossmann-fold) NADP هستند و دارای فعالیت اکسیدوردوکتازی می‌باشند. تابحال نقش دفاعی در مقابل عوامل بیماری‌زا برای این ژن گزارش نشده‌است. بیان ژن‌های CsCCR9 محدود به زیر گروه سوم ژنوم Csa09g081220.1 کاملینا می‌شود و بجز بیان ناچیز Csa07g048050.1 از زیر ژنوم دوم در ریشه، تقریباً زیر ژنوم سوم به همراه Csa16g040620.1 از زیر ژنوم اول بیانی در شرایط رشد نرمال نشان نمی‌دهند.

CsCCR6: بیشترین میزان تجمع رونوشت در ژن‌های CsCCR6 در زیر ژنوم سوم در مراحل نمو اولیه بذر ESD و EMSD و پس از آن مرحله گل‌انگیزی IF در مرتبه دوم قرار می‌گیرد. رتبه سوم سطح بیان ژن CsCCR6 در زیر ژنوم سوم به مرحله انتهایی نمو بذر (LSD) اختصاص می‌یابد. در بقیه بافت‌ها و مراحل نموی بیان به شدت افت می‌نماید هرچند که در ریشه همچنان این ژن بخوبی بیان می‌شود. الگوی بیان ژن CsCCR6 در مرحله گل‌انگیزی و تکمیل نمو بذر و همچنین عدم تغییر معنی دار آن تحت شرایط تنش زیستی (Eynck et al. 2012) پیشنهاد می‌کند که بیان آن تحت تاثیر شرایط مکانی و زمانی از گل‌انگیزی تا تشکیل بذر (مراحل مرتبط با تشکیل جنین) قرار دارد. بنابراین استنباط می‌شود که واریانت‌های مختلف ژن CsCCR هرکدامشان به لحاظ تکوینی و تکاملی وظیفه منحصر به فردی را بر عهده دارند که نیاز به دسته بندی و سامان دهی علمی دارند. ژن CsCCR6 (نسخه سوم آن) الگوی بیانی شبیه ژن CsCCR5 دارد.

CsCCR5: هر سه نسخه ژن CsCCR5، Csa07g007780، Csa16g007630 و Csa05g022760 در هیت مپ ترسیم شده بیشترین سطح بیان را داشته اند و خود یک زیر گروه متمایز از بقیه را تشکیل داده اند. این ژن نیز مشابه ژن CsCCR6 در مراحل ESD، LSD، EMSD و LMSD (همگی مرتبط با مراحل تکوین بذر) حداکثر بیان را نسبت به بقیه بافت‌ها و مراحل نموی نشان می‌دهند. نسخه اول این ژن در کروموزوم ۱۶ بیشترین میزان بیان را در مرحله نزدیک به انتهای نمو بذر (LMSD) رونوشت در بین تمامی ژن‌های مورد مطالعه داشته‌است. همچنین این ژن در تمامی بافت‌ها و مراحل نموی بیان مداوم از خود نشان داده‌است. هرچند که در مواجهه با تنش تغییر چندانی در بیان آن در بافت ساقه آماده گلدهی مشاهده نشد. ژن متناظر CsCCR5 در آرابیدوپسیس At2g33600 و At2g33590 می‌باشد الگوی بیانی این دو ژن نیز مشابه با آنچه در

کاملینا رخ می‌دهد می‌باشد به این معنی که در تمامی بافت‌ها و مراحل نمو و بویژه مراحل تکوین بذر حداکثر بیان را نشان می‌دهند. این ژن نوعی از پروتئین بیان می‌کند که با اعضای بالا خانواده دهیدروفلاونول-۴-ردوکتاز (DFR) مشابه است و گویای آن است که این ژن در جنین زایی و جوانه زنی بذر نقش دارد. همچنین بیان این ژن در گیاه آرابیدوپسیس توسط هورمون آبسزیک اسید، خشکی و گرما و نیتریک اکسید تحریک می‌شود (Østergaard et al. 2001; Lauvergeat et al. 2001; Parani et al. 2004). علاوه بر این ژن AtCCR5 به تنش فلز سنگین کادمیوم بعد از ۲۴ ساعت واکنش نشان می‌دهد (Sarry et al. 2006). در ذرت معلوم‌گردید از مجموع ۶ واریانت برای ZmCCR5، واریانت‌های مختلف به لحاظ سطح بیان تفاوت نشان می‌دادند بعضی واریانت‌ها کاهش بیان و بعضی دیگر افزایش بیان نشان دادند. این نوسانات در بیان ژن و پویایی در تنظیم مداوم آن بجای بیان یکسان در ذرت نیز مشاهده می‌شود (Bosch et al. 2011). در گندم بیان ژن CCR5 تحت شرایط خشکی القا می‌شود بنابراین احتمالاً در سازگار شدن گیاه به کاهش آب در دسترس و جلوگیری از پژمردگی نیز نقش ایفا می‌کند (Bray et al. 2002).

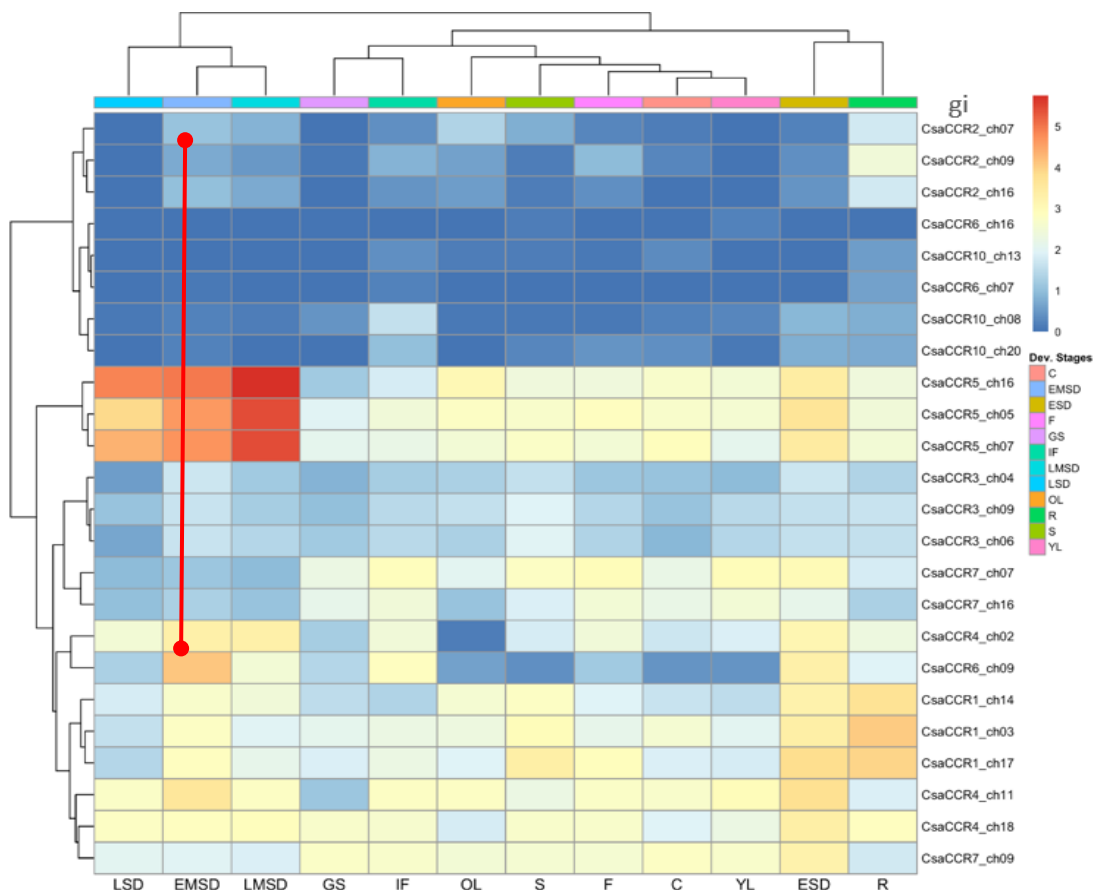
CsCCR7: این ژن در آرابیدوپسیس کم و بیش در همه بافت‌ها بیان می‌شود اما بیشترین میزان آن در بذر در حال بلوغ و رسیدن می‌باشد. بیشترین بیان این ژن در کاملینا در بذر در حال جوانه زنی و گلدهی و مراحل اولیه تشکیل بذر (ESD) می‌باشد. بیان این ژن در مراحل LMSD، LSD و ریشه ناچیز می‌باشد. CCR7 در آرابیدوپسیس در هسته قرار داشته و مشابه CCR8 فعالیت اکسیدوردوکتازی دارد. این ژن به طور متوسط در کاملینا در هر سه نسخه فعال بوده و در همه بافت‌ها و مراحل نمو بیان می‌شود. بلافاصله پس از جوانه زنی بیان آن افزایش یافته و در مرحله کوتیلدونی به حداکثر تجمع رونوشت می‌رسد و پس از آن در مرحله ساقه دهی و تشکیل برگ‌های جوان و ریشه دهی بیان آن به نصف مرحله کوتیلدونی می‌رسد. این افت تا مرحله گل‌انگیزی ادامه می‌یابد سپس دوباره در مرحله گلدهی تا مراحل اولیه نمو بذر افزایش بیان رخ می‌دهد و دوباره در اواسط نمو بذر کاهش شدید بیان مشاهده می‌شود. برعکس، در آرابیدوپسیس حداکثر بیان ژن متناظر At2g23910 (CsCCR7) در مراحل یک تا هشت روز پس از خشک شدن گل‌ها بالاترین سطح بیان این ژن دیده می‌شود و در مرحله جوانه زنی کوتیلدونی و ریشه سطح بیان این ژن نسبت به مرحله مذکور ناچیز می‌شود البته در آرابیدوپسیس نیز پس از جوانه زنی افزایش سطح بیان این ژن در سومین مرحله جوانه زنی می‌رسد ولی بر خلاف کاملینا در مرحله کوتیلدونی سطح بیان آن کاهش می‌یابد (Schmid et al. 2005). بیان ژن CCR7 در آرابیدوپسیس توسط کاریکین (یک گروه از محرک‌های جوانه زنی که در دود آتش سوزی‌های طبیعی وجود دارد) در مرحله جوانه زنی و نمو گیاهچه افزایش می‌یابد (Nelson et al. 2010).

CsCCR8: این ژن نیز، ساقه، ریشه و به میزان زیاد در مرحله گلدهی و مراحل سه گانه تشکیل بذر بیان می‌شود. نسخه‌های Csa16g007630 و Csa07g007780.1 در تمامی بافت‌ها بیان می‌شود و به طور شاخص حداکثر بیان آن در اواخر مرحله نمو بذر (LMSD) رخ می‌دهد. برعکس نسخه Csa05g022760.1 در مراحل جوانه زنی، کوتیلدونی، برگ جوان و

برگ پیر اصلا بیانی ندارد. دو نسخه Csa05g022760.1 و Csa07g007780.1 دارای دارای ۳۹۵ اسید آمینه و بسیار شبیه به هم هستند درحالیکه نسخه Csa16g007630 طول آن ۳۰۰ اسید آمینه است و نزدیک به ۹۵ اسید آمینه از قسمت انتهایی توالی آن حذف شده است. چنین برمی آید که این ژن در تعیین ساختار و رشد و نمو آن دخالت دارد. پاسخ به نور از پدیده‌هایی است که در گیاهان به دلیل تاثیر عمیقی که بر کارایی اجزای حیاتی خود شامل فرآیندهای متابولیکی و یا استقرار آرایش و چیدمان برگ‌ها و ساقه‌ها و شاخه‌ها می‌گذارد. Rogers و همکاران (۲۰۰۵) تنظیم بیوسنتز لیگنین توسط ساعت زیستی، نور و جذب قند بررسی نمودند. برای این منظور گیاهان آرابیدوپسیس در چرخه ۱۲ ساعت شب / ۱۲ ساعت روز رشد داده شدند و سپس به مدت ۴۸ ساعت در زیر نور دائم قرار داده شدند. خیلی از ژن‌ها بویژه ژن‌هایی که ذکر شد در این شرایط نوسان نشان می‌دهند. جالب اینکه عموماً تجمع رونوشت ژن‌ها در مرحله غروب مصنوعی آغاز و در شب مصنوعی به اوج می‌رسید که به دلیل اثرات نور تابیده شده در روز می‌باشد. برعکس تجمع رونوشت با نور سپیده دم مصنوعی در روز دوم آزمون رخ نداد. بدین معنی که تغییر در فراوانی رونوشت ژن‌ها قبل از اینکه به تحریک نوری نیاز داشته باشد به یک دوره تاریکی وابسته است. محققان در این مطالعه ثابت نمودند که بیان ژن CCR1 و بعضی دیگر از ژن‌های درگیر در ساخت لیگنین مثل CCOAMT، COMT، CAD6 با ساعت زیستی تنظیم می‌شوند (Rogers et al. 2005).

CsCCR3: این ژن مشابه CsCCR1 در پاسخ به حمله پاتوژن در کاملینا چه در رقم حساس و چه در رقم مقاوم افزایش بیان نشان نداده است (Eynck et al. 2012). احتمالاً این ژن نیز در فرآیندهای نموی دخیل است تا اینکه ژنی کلیدی در مسیرهای دفاعی باشد.

نحوه تنظیم ژن CCR4: ژن CCR4 در آرابیدوپسیس فعال در سیتوزول دارای ۳۲۴ اسید آمینه است وزن مولکولی آن ۳۵٫۷ کیلو دالتون و نقطه ایزوالکتریک آن (PI) برابر ۵٫۸۱ می‌باشد. این ژن در اکثر بافت‌ها و اندام‌ها به خوبی بیان می‌شود. اما بالاترین سطح بیان آن در بذر در حال جوانه زنی است.



شکل ۴. الگوی میزان بیان ژن‌های CsCCR در بافت‌ها و مراحل مختلف نمو در کاملینا

Figure 4: Heatmap of CsCCR family gene expression in different tissues and developmental stages.

کشف این ژن توسط Raes و همکاران (۲۰۰۳) به دنبال بازنویسی و ترسیم مجدد ژن‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین، انجام شده‌است (Raes et al. 2003). آن‌ها با آنالیزهای بیوانفورماتیکی بر روی ۳۴ ژن کاندیدا در ساخت لیگنین براساس مطالعات فیلوژنی و تفسیر آن‌ها دریافتند که ژن‌های AtCCR1 و AtCCR2 ژن‌های واقعی سیناموئیل کوآرودکتاز هستند و بقیه ژن‌های CCR ۳ تا ۱۰ همگی پروتئین‌های شبیه به CCR می‌باشند. سوال اینجاست که ژن CCR4 به عنوان عامل کلیدی در پدیده‌های نمو و دفاعی چگونه تنظیم می‌شود؟ عوامل دخیل در تنظیم این ژن کدامند؟ برای پاسخ دهی به این سوالات منابع موجود مورد مطالعه قرار گرفتند در نهایت معلوم شد که تابحال به این موضوع پرداخته نشده‌است.

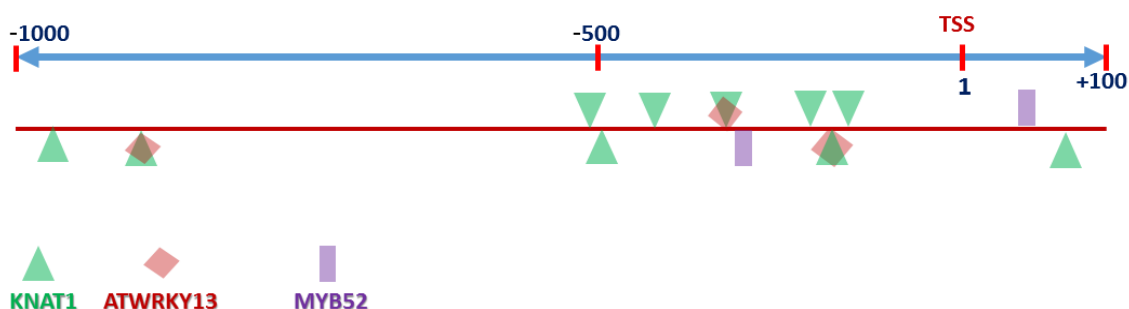
برای پاسخ دهی مسیر زیر تعریف‌گردید: ابتدا براساس مرور منابع لیستی از عوامل رونویسی درگیر در تنظیم بیان ژن مسیر

بیوسنتز لیگنین تهیه شد. این عوامل عبارتند از:

MYB43, MYB52, MYB54, MYB69, MYB103, MYB85, NAC076, VND2, NAC007, KNAT7

BP و PNY, WRKY13, NST2, NST1, SND3, SND2, MYB20 (برای مشاهده ژن‌های متناظر این عوامل به جدول ۲

داده‌های تکمیلی رجوع شود). این فاکتورهای رونویسی یا به طور مستقیم و یا غیر مستقیم (به عنوان سوئیچ‌های اصلی) در تنظیم ساخت لیگنین نقش دارند. پس از آن در پایگاه داده plantpan2.itps.ncku.edu.tw برای یافتن جایگاه اتصال عوامل رونویسی ذکر شده در فاصله ۱۰۰۰ جفت باز بالادست ژن AtCCR4 (آرابییدوپسیس به عنوان نزدیکترین گونه به کامیلینا انتخاب گردید بدین دلیل که در پایگاه داده مذکور امکان مطالعه ژنوم کامیلینا وجود ندارد) اقدام گردید.، از بین هفده فاکتور رونویسی ارزیابی شده *KNAT1* (BP)، *WRKY13* و *MYB52* در بالادست ژن *AtCCR4* جایگاه اتصال اختصاصی دارند و مابقی براساس محاسبات بیوانفورماتیکی فاقد جایگاه اتصال بودند (جدول ۳ داده‌های تکمیلی). در شکل ۵ طرح واره اندر کنش فاکتورهای رونویسی و راه انداز ژن *CCR4* به نمایش درآمده است.



شکل ۵. محل اتصال عوامل رونویسی درگیر در تنظیم ساخت لیگنین بر روی توالی راه انداز *AtCCR4*

Figure 5: Schematic view of the sequence recognition of transcription factors on *AtCCR4* promoter that are involved in lignin biosynthesis.

طبق مسیر بیوستنز فنیل پروپانوئید در KEGG Orthology مشخص گردید ژن *CsCCR4* با سه عدد دسترسی ۱۰۴۷۳۵۶۳۸، ۱۰۴۷۳۵۶۳۸ و ۱۰۴۷۲۶۴۲۱ در ساخت منولیگنول قرار ندارند (بدین معنی که *CsCCR4* به عنوان ژن کارکردی با اهمیت و فعال در این مسیر تفسیر نشده است تنها توالی شبه *CCR* (Cinnamoyl CoA reductase- Like) قرار داده شده در مسیر با شماره دسترسی ۱۰۴۷۰۳۳۴۹ (*CsCCR2*- Like) به دو ژن *AtCCR1* و *AtCCR2* شباهت نشان می‌دهد و با دیگر ژن‌های *AtCCR* که قبلا به آن‌ها اشاره شده باشد شباهتی ندارد- اینکه ژن *CsCCR4* و دیگر ژن‌های شبه *CCR* از *CsCCR3* تا *CsCCR10* چگونه در تولید منولیگنول‌ها و یا احتمالا مسیرهای دیگر دخالت می‌کنند، می‌توانند موضوع تحقیقات آتی باشد. همچنین معلوم شد که شش ژن *CCR* (شامل سه نسخه *CsCCR1* و سه نسخه *CsCCR2*) در مسیر بیوستنز منولیگنول فعال هستند که یکی از آن‌ها با شماره دسترسی ۱۰۴۷۰۳۳۴۹ شبه *CCR* بوده و در کنار بقیه *CCR*‌ها در مسیر ساخت منولیگنول تفسیر شده است (جدول ۴ داده‌های تکمیلی).

بحث

دیواره سلولی گیاهان شامل دیواره اولیه و ثانویه عمدتاً متشکل از سلولز، همی سلولز و لیگنین بسته به نوع بافت می‌باشد. لیگنین پس از سلولز دومین پلیمر زیستی است و تقریباً ۳۰ درصد کربن آلی زیست کره را در خود جای داده‌است که تنها در گیاهان یافت می‌شود. این ماده در ساختار دیواره سلول وجود دارد و در استقرار گیاه در خاک و نمو ساقه و ریشه و آرایش شاخه‌ها بطور اساسی نقش آفرینی می‌کند (Sarkanen & Ludwig 1971). ژن‌های درگیر در بیوسنتز لیگنین عمدتاً در سلول‌های غلاف آوندی برگ‌ها و ساقه‌ها بیان می‌شوند و باعث ترسیب لیگنین در آن‌ها می‌شوند (Wang et al. 2013). رسوب لیگنین موجب ضد آب شدن دیواره سلولی شده که در نتیجه آن آب و مواد معدنی و سایر ترکیبات از طریق دستگاه آوندی انتقال می‌یابند. جلوگیری از بیوسنتز لیگنین با سرکوب ژن‌های کلیدی در این مسیر سبب بروز فنوتیپ‌های غیرطبیعی می‌شود که معمولاً همراه با از بین رفتن اوند چوبی، ایجاد ساقه‌های ضعیف و تاخیر در رشد می‌باشد. در حوزه اصلاح نباتات، تغییر در میزان و کیفیت لیگنین در گیاه یکی از راهبردهای دستیابی به هدف اصلاح گر می‌باشد. اگر هدف اصلاحی شامل مقاومت در برابر بیماری‌ها (Mutuku et al. 2019) و یا افزایش استحکام گیاه در برابر ورس (Zheng et al. 2017; Wei et al. 2017)؛ و یا جلوگیری از ریزش دانه (Yoon et al. 2017) باشد، افزایش در محتوی لیگنین در گیاه می‌تواند موثر باشد. برعکس در صنعت تولید سوخت زیستی از پیکره‌ی گیاه و همچنین در صنعت دامپروری کاهش در میزان لیگنین و افزایش میزان سلولز اهمیت دارد (Lam et al. 2017)؛ (Halpin 2019). به دلیل چنین ویژگی‌های جالبی موضوع لیگنین در تحقیقات اهمیت پیدا می‌کند. در پژوهش حاضر فهم نحوه تنظیم شبکه ژنی بیوسنتز لیگنین برای اعمال تغییرات اصلاحی و دستورزی در سوژه گیاهی مثل کاملینا اهمیت پیدا می‌کند. دانه روغنی کاملینا اخیراً به دلیل ویژگی‌های منحصر بفرد خود در حوزه تولید سوخت زیستی توجه زیادی را بخود جلب نموده‌است. در همین راستا مطالعات مولکولی گسترده‌ای برای دستیابی به بینش صحیح از کارکرد ژنوم و ترانسکریپتوم آن صورت پذیرفته‌است (Nguyen et al. 2014; Kagale et al. 2016; Kagale et al. 2013). همچنین به لحاظ توسعه روش‌های دستورزی ژنتیکی در دو دهه اخیر شامل انتقال ژن از طریق فنون مهندسی ژنتیک (Lu & Kang 2008) و ویرایش ژنوم (Lyzenga et al. 2019) و یا تولید دابل‌هاپلوئید (Ferrie & Bethune 2011) و همچنین تلافی‌های بین گونه‌ای برای انتقال کلاسیک صفات (Sigareva & Earle 1997; Jiang et al. 2009)؛ در این گیاه پیشرفت‌های شگرفی رخ داده‌است طوری که به راحتی می‌توان آن را به عنوان گیاه مدل دانه‌های روغنی قلمداد نمود. در این تحقیق از داده‌های توالی یابی RNA کاملینا بصورت گزینشی صرفاً برای تدقیق در نحوه تغییرات در سطح رونوشت ژن‌های بیوسنتز منولیگنول‌ها استفاده شد. این داده‌ها صرفاً نمو کاملینا در مراحل مختلف را توصیف می‌کنند، برای تفسیر نتایج بدست آمده، با مرور منابع تا حدودی توانستیم رفتار ژن‌های مذکور را با رویکرد ارزش اصلاحی که به آن‌ها داشتیم (بطور خاص در مورد CsCCR‌ها که از طریق فناوری CRISPR/Cas9 توسط نویسندگان اول و دوم مورد تحقیق قرار گرفته‌اند و مقاله آن در نشریه‌ای دیگر در دست چاپ می‌باشد) را توصیف نماییم. ژن CCR در بافت‌های در حال لیگنینی شدن مثل کامبیوم آوندی و آوندهای چوب در حال تمایز به شدت بیان می‌شوند. آنزیم CCR به لحاظ تنظیم جریان کربن در منطقه حساسی قرار دارد. در واقع ژن CCR بین مسیر عمومی فنیل پروپانوئید و شاخه اختصاصی

سنتز لیگنین قرار گرفته و جریان کربن را به سمت تولید لیگنین هدایت می‌کند (Lauvergeat et Lacombe et al. 1997); (al. 2001). CCRها شباهت بالایی به لحاظ توالی پروتئینی نشان می‌دهند. با این وجود، از جهت خصوصیات شیمیایی، ترجیح سوبسترا و الگوی بیان در بافت‌های مختلف، کاملاً از همدیگر متمایز و مستقل از هم عمل می‌کنند. مثلاً ژن *AtCCR1* ترجیح می‌دهد که بر روی سوبسترهای لیگنین مثل فرولیل کوآ و سیناپوئیل کوآ واکنش انجام دهد (Derikvand et al. 2008). برعکس، ژن *AtCCR2* نیز فرولیل کوآ را به عنوان سوبسترا ترجیح می‌دهد هرچند که میل ترکیبی آن به سوبسترای خود ۵ برابر کمتر از *AtCCR1* می‌باشد. یا اینکه *AtCCR1* بیشتر در ساقه (به عنوان ژن اصلی در بیوسنتز لیگنین) بیان می‌شود. برعکس *AtCCR2* به مقدار خیلی کم در بافت‌های سالم قابل رصد است و بنابراین خیلی نمی‌تواند در لیگنینی شدن ایفای نقش کند. (Lauvergeat et al. 2001; Lacombe et al. 1997). در عوض در اثر آلودگی باکتریایی *Xanthomonas campestris* که واکنش فوق حساسیت ایجاد می‌کند سطح بیان *AtCCR2* افزایش یافته درحالی‌که ژن تفاوت معنی داری در سطح بیان آن رخ نداده بود (Buell & Somerville 1995). در مطالعه ای که اثر فنیل پروپانویدهای محلول مثل کنیفرین، سیناموئیل گلوکز و کنیفریل الکل بر دفاع درمقابل قارچ خاکزاد *Verticillium longisporum* در آرابیدوپسیس را بررسی کرد معلوم گردید که این ترکیبات همگی به صورت یک فرآورده‌ی متابولیکی در کاهش حساسیت به این بیماری نقش دارند. در اثر آلودگی ورتیسیلیوم در آرابیدوپسیس محصول نهایی مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانویدها شامل نوع لیگنین S، G و H افزایش نیافت. لیگنین G به دلیل داشتن پیوندهای مقاوم بیشتر، از لیگنین S مقاوم تر است. (König et al. 2014). لیگنین S به دلیل داشتن تنها یک گروه متوکسی (Boerjan et al. 2003) خطی تر و غیر فشرده تر است. بنابراین چنین پیشنهاد می‌شود که این نوع لیگنین بهتر بتواند پلی ساکاریدهای دیواره سلولی را از تجزیه توسط آنزیم‌های هیدرولیتیک محافظت کند (Wuyts et al. 2006; Eynck et al. 2012; Menden et al. 2007). اخیراً داده‌های ما نشان داد (در حال انتشار) که روش ویرایش ژن CRISPR/Cas برای ایجاد ناک اوت در گیاه کاملینا با ژنوم پیچیده‌ی آلوهرگزاپلوئید، با اهداف مختلف به لحاظ مکان ژنومی به دقت قابل اجراست. که بواسطه جهش در سه نسخه ژن *CsCCR4* گیاه موتانت خالص در نسل سوم تولید شد. تحلیل کارکردی با انجام آزمون اندرکنش گیاه-پاتوژن، همبستگی مثبت بین وقوع جهش در ژن *CsCCR4* و حساسیت به پاتوژن اسکروتینیا را نشان داد. مطالعات ژنتیکی زیادی بر روی تداخل لیگنین در فرایندهای نموی انجام شده‌اند. کاهش بیان *CCR1* و *C4H* در آرابیدوپسیس با بازدارندگی نرخ رشد همراه بوده‌است (Vanholme et al. 2012). در جدی ترین مطالعه صورت گرفته (Eynck et al. 2012) برروی اساس مولکولی دفاع کاملینا در مقابل پاتوژن اسکروتینیا با روش اندازه گیری سطح بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز لیگنین محدود به اطراف منطقه‌ی آلوده به قارچ با روش qRT-PCR طی زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از آلودگی ساقه‌های کاملینا با اسکروتینیا دریافتند که سطح بیان ژن *CsCCR4* در لاین مقاوم تفاوت معناداری (۱۲ برابر) در مقایسه با لاین حساس دارد. علاوه بر این، تمام ژن‌هایی که بعد از آلودگی چه در گیاه حساس و چه در گیاه مقاوم افزایش بیان

نشان دادند همگی متعلق به خانواده‌ی سیناموئیل CoA ردوکتاز (CCR) بودند. در واقع سطح رونویسی ۷ ژن CCR شامل CCR2 و CCRهای ۴ تا ۱۰ افزایش نشان داد. در مورد CCR1 القای رونویسی پس از رونویسی رخ نداد. ژن CCR2 در هر دو لاین حساس و مقاوم با القای پاتوژن بیشترین سطح بیان را نسبت به بقیه‌ی ژن‌های خانواده‌ی CCR نشان داد. پس از مایه زنی با اسکروتینیا CsCCR4 در گیاه حساس کاهش بیان به میزان ۳۰ برابر نسبت به گیاه مقاوم نشان داد. مقایسه‌ی محتوای لیگنین دو لاین با استخراج لیگنین معلوم نمود که مقدار لیگنین G در لاین حساس و مقاوم برابر است درحالیکه مقدار لیگنین S در رقم مقاوم ۴۰ درصد بیشتر از رقم حساس است. نتیجه اینکه نسبت لیگنین S/G در لاین مقاوم ۱,۷ و بزرگتر از رقم حساس (۱,۲) بوده‌است.

اینطور به نظر می‌رسد که عوامل رونویسی تنظیم کننده مثبت بیوستنز لیگنین اگر افزایش بیان داشته باشند مقاومت فیزیکی گیاه افزایش می‌یابد. افزایش بیان عوامل رونویسی MYB و NAC باعث رسوب خارج از محل لیگنین در بافت‌های غیر معمول همراه با بازدارندگی رشد همراه است (Zhong et al. 2006)(Zhou et al. 2009). علاوه بر اثر لیگنین بر شقوق مختلف نموی، این ماده در فرایندها و سازوگرهای دفاعی نقش دارد. چنین تلقی می‌شود که لیگنین به نوعی خاصیت ضد میکروبی دارد و یک سد فیزیکی برای بلوکه کردن حمله پاتوژن و جلوگیری از تزریق و انتشار سموم پاتوژن ایجاد می‌کند. این نوع نگاه و انتظار همیشه درست نبوده و در برخی مطالعات ژنتیکی معلوم شده که کاهش یا بازدارندگی از ساخت لیگنین، مقاومت در مقابل پاتوژن را تقویت می‌نماید. مثلاً بازدارندگی ژن HCT در آرابیدوپسیس و یونجه تجمع هورمون دفاعی سالیسیلیک اسید و در نتیجه بیان ژن‌های PR را منجر می‌شود (Gallego-Giraldo et al. 2011) که متعاقباً مقاومت در برابر پاتوژن را سبب‌گردید هرچند که سطح لیگنین کاهش و اختلالات نموی ایجاد شده بود. برای ایجاد تعادل بین رشد مناسب و توسعه سازوکارهای دفاعی در گیاهان، تنظیم هماهنگ ژن‌ها ضروری می‌باشد. شبکه‌های رونویسی پایین دست هورمون جاسمونیک اسید (JA) و پیام رسانی فیتوکروم B در همکاری برای ایجاد یک پایانه برای برقراری تعادل بین رشد و دفاع هستند (Campos et al. 2016). چندین فاکتور رونویسی یافت شده‌اند که پاسخ‌های دفاعی و بیوستنز لیگنین را تحت تاثیر قرار می‌دهند. مثلاً ژن مربوط به پاسخ به اتیلن (ERF) در آرابیدوپسیس افزایش بیان داده شد و سبب افزایش قابل ملاحظه رونویسی ژن‌های بیوستنز لیگنین/فنیل پروپانوئید مثل PAL3، C4H، C3H، HCT، AMT1، CCR1 و پروتئین‌های PR (پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن) شامل PR3، PR4 و PDF1.2 گردید.

در سطحی بالاتر امکان تنظیم همزمان رونویسی ژن‌های درگیر در فرایندهای رشد، دفاع و بیوستنز لیگنین وجود دارد. در موتانت‌های c4h و ccr1 که کاهش تجمع لیگنین را در پی دارند، اکثر ژن‌های پاسخ‌های دفاعی و ژن‌های مرتبط با رشد (مثل ژن‌های پاسخ به اکسین) کاهش بیان نشان دادند (Vanholme et al. 2012). اخیراً معلوم شده فاکتور رونویسی AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) نقش تنظیمی در بیوستنز لیگنین دارد (Cosio et al. 2017). AGL15 به طور مستقیم بازدارنده بیان PRX17 برای تنظیم تولید لیگنین می‌باشد. لازم به ذکر است که AGL15 یک فاکتور رونویسی جعبه

MADS می‌باشد که بیان miRNA15b را تنظیم می‌کند. این مولکول نیز به نوبه خود تنظیم کننده منفی گل انگیزی است و در مقابل به طور مثبت مقاومت به تنش‌های محیطی را تقویت و تنظیم می‌کند. با مسلم فرض نمودن دوگانه دفاع و رشد در سیستم گیاهی چنین جمع بندی می‌نماییم که فعالیت دفاعی، رابطه منفی با رشد پیکره گیاه و قدرت تولیدمثلی آن دارد. در عمل گیاهان همواره در حال سبک سنگین کردن بین رشد و دفاع خود هستند. در گزاره‌ای دیگر داریم: "ساخت لیگنین فرایندی است که در آن هرچه از طرف گیاه برای آن هزینه شود به طور کلی بنیه و توان گیاه قوی‌تر و سالم‌تر می‌شود. با کاربرد روش‌ها و رویکردهای مطالعاتی در ابعاد ژنومی، بررسی جایگاه‌های صفات کمی قابل بیان، روش‌های کارای تعیین ویژگی و روایی عناصر موجود در سلول، توالی یابی RAN و ChIPseq، ویرایش ژنوم و غیره می‌توان به تصویر دقیقی از پدیده‌های در حال وقوع نزدیک شد و با چشمانی باز از آن‌ها برای به نژادی کاملینا و یا گونه‌های خویشاوند بهره برداری نمود.

سپاسگزاری: بدینوسیله نگارندگان بر خود لازم می‌دارند از حمایت‌های مادی و معنوی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و

زیست فناوری گروه زیست فناوری گیاهی تشکر را بجا آورند.

References

- Anderson DM, MacPherson MJ, Collins SA et al. (2018) Yellow-and brown-seeded canola (*Brassica napus*), camelina (*Camelina sativa*) and Ethiopian mustard (*Brassica carinata*) in practical diets for rainbow trout fingerlings. *J Appl Aquac* 30, 187-195.
- Augustin JM, Higashi Y, Feng X et al. (2015) Production of mono-and sesquiterpenes in *Camelina sativa* oilseed. *Planta* 242, 693-708.
- Balanuca B, Stan R, Hanganu A et al. (2015) Design of new camelina oil-based hydrophilic monomers for novel polymeric materials. *JAACS* 92, 881-891.
- Bayat A, Kairenius P, Stefański T et al. (2015) Effect of camelina oil or live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal methane production, rumen fermentation, and milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets. *J. Dairy Sci.* 98, 3166-3181.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annu. Rev Plant Biol* 54, 519-546.
- Bosch M, Mayer C-D, Cookson A et al. (2011) Identification of genes involved in cell wall biogenesis in grasses by differential gene expression profiling of elongating and non-elongating maize internodes. *Annu. Rev Plant Biol* 62, 3545-3561.
- Brandao V, Dai X, Paula E et al. (2018) Effect of replacing calcium salts of palm oil with camelina seed at 2 dietary ether extract levels on digestion, ruminal fermentation, and nutrient flow in a dual-flow continuous culture system. *J Dairy Sci* 101, 5046-5059.

- Bray EA (2002) Classification of genes differentially expressed during water- deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann Bot* 89, 803-811.
- Buell C, Somerville S (1995) Expression of defense-related and putative signaling genes during tolerant and susceptible interactions of *Arabidopsis* with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *MPMI* 8, 435-443.
- Campos ML, Yoshida Y, Major IT et al. (2016) Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nat Commun* 7, 12570.
- Cosio C, Ranocha P, Francoz E et al. (2017) The class III peroxidase PRX 17 is a direct target of the MADS- box transcription factor AGAMOUS- LIKE15 (AGL 15) and participates in lignified tissue formation. *New Phytol* 213, 250-263.
- Derikvand MM, Sierra JB, Ruel K et al. (2008) Redirection of the phenylpropanoid pathway to feruloyl malate in *Arabidopsis* mutants deficient for cinnamoyl-CoA reductase 1. *Planta* 227, 943-956.
- Dixon RA, Barros J (2019) Lignin biosynthesis: old roads revisited and new roads explored. *Open Biol* 9, 190215.
- Dixon RA, Chen F, Guo D et al. (2001) The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochem* 57, 1069-1084.
- Eynck C, SÉGUIN- SWARTZ G, Clarke WE et al. (2012) Monolignol biosynthesis is associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Camelina sativa*. *Mol Plant Pathol* 13, 887-899.
- Ferrie A, Bethune T (2011) A microspore embryogenesis protocol for *Camelina sativa*, a multi-use crop. *PCTOC* 106, 495-501.
- Gallego-Giraldo L, Escamilla-Trevino L, Jackson LA et al. (2011) Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. *PNAS* 108, 20814-20819.
- Halpin C (2019) Lignin engineering to improve saccharification and digestibility in grasses. *Curr Opin Biotechnol* 56, 223-229.
- Humphreys JM, Chapple C (2002) Rewriting the lignin roadmap. *Curr Opin Plant Biol.* 5, 224-229.
- Jiang J, Zhao X, Tian W et al. (2009) Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Camelina sativa* with high linolenic acid content. *PCTOC* 99, 91-95.
- Juodka R, Juška R, Juškienė V et al. (2018) The effect of feeding with hemp and *Camelina* cakes on the fatty acid profile of duck muscles. *Arch Anim Breed*, 293-303.
- Kagale S, Koh C, Nixon J et al. (2014) The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure. *Nat Commun* 5, 3706.

- Kagale S, Nixon J, Khedikar Y et al. (2016) The developmental transcriptome atlas of the biofuel crop *Camelina sativa*. *Plant J*. 88, 879-894.
- Keen N, Littlefield L (1979) The possible association of phytoalexins with resistance gene expression in flax to *Melampsora lini*. *Physiol Plant Pathol* 14, 265-280.
- Kiefer M, Schmickl R, German DA et al. (2013) BrassiBase: introduction to a novel knowledge database on Brassicaceae evolution. *Plant Cell Physiol* 55, e3-e3.
- König S, Feussner K, Kaefer A et al. (2014) Soluble phenylpropanoids are involved in the defense response of *A. rabiidopsis* against *V. eriticillium longisporum*. *New Phytol* 202, 823-837.
- Krohn BJ, Fripp M (2012) A life cycle assessment of biodiesel derived from the “niche filling” energy crop camelina in the USA. *Appl Energy* 92, 92-98.
- Lacombe E, Hawkins S, Van Doorselaere J et al. (1997) Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J* 11, 429-441.
- Lam PY, Tobimatsu Y, Takeda Y et al. (2017) Disrupting flavone synthase II alters lignin and improves biomass digestibility. *Plant Physiol* 174, 972-985.
- Lauvergeat V, Lacomme C, Lacombe E et al. (2001) Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochem* 57, 1187-1195.
- Li X, Mupondwa E, Tabil L (2018) Technoeconomic analysis of biojet fuel production from camelina at commercial scale: Case of Canadian Prairies. *Bioresour Technol* 249, 196-205.
- Lu C, Kang J (2008) Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant cell reports* 27, 273-278.
- Lyzenga WJ, Harrington M, Bekkaoui D et al. (2019) CRISPR/Cas9 editing of three CRUCIFERIN C homoeologues alters the seed protein profile in *Camelina sativa*. *BMC Plant Biol* 19, 292.
- Menden B, Kohlhoff M, Moerschbacher BM (2007) Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochem* 68, 513-520.
- Miedes E, Vanholme R, Boerjan W et al. (2014) The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front Plant Sci* 5, 358.
- Mierlita D, Pop IM, Lup F et al. (2018) The fatty acid composition and health lipid indices in sheep raw milk under a pasture-based dairy system. *Rev Chim* 69, 160-165.

- Moser BR (2016) Fuel property enhancement of biodiesel fuels from common and alternative feedstocks via complementary blending. *Renew Energ.* 85, 819-825.
- Mutuku JM, Cui S, Hori C et al. (2019) The structural integrity of lignin is crucial for resistance against *Striga hermonthica* parasitism in rice. *Plant Physiol* 179, 1796-1809.
- Nelson DC, Flematti GR, Riseborough J-A et al. (2010) Karrikins enhance light responses during germination and seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 107, 7095-7100.
- Nguyen HT, Silva JE, Podicheti R et al. (2013) Camelina seed transcriptome: a tool for meal and oil improvement and translational research. *Plant Biotechnol J* 11, 759-769.
- Østergaard L, Lauvergeat V, Næsted H et al. (2001) Two differentially regulated *Arabidopsis* genes define a new branch of the DFR superfamily. *Plant Sci* 160, 463-472.
- Parani M, Rudrabhatla S, Myers R et al. (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J.* 2, 359-366.
- Raes J, Rohde A, Christensen JH et al. (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133, 1051-1071.
- Rogers LA, Dubos C, Cullis IF et al. (2005) Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis. *J Exp Bot* 56, 1651-1663.
- Russo R, Reggiani R (2017) Glucosinolates and Sinapine in camelina meal. In: *Food Nutr Sci* pp 1063-1073.
- Sarkanen KV, Ludwig CH (1971) Lignins. Occurrence, formation, structure, and reactions.
- Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C et al. (2006) The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *J Proteom* 6, 2180-2198.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR et al. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 37, 501.
- Service FA (2019) oilseed world markets and trade. United States Department of Agriculture
- Sigareva M, Earle E (1997) Intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid cycling *Brassica oleracea*. *Cruciferae Newsletter* (United Kingdom).
- Smil V (2016) Energy transitions: global and national perspectives. ABC-CLIO.
- Vanholme R, Morreel K, Darrah C et al. (2012) Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol* 196, 978-1000.
- Wang Y, Chantreau M, Sibout R et al. (2013) Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Front Plant Sci* 4, 220.
- Wei L, Jian H, Lu K et al. (2017) Genetic and transcriptomic analyses of lignin-and lodging-related traits in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 130, 1961-1973.

- Wuyts N, Lognay G, Swennen R et al. (2006) Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant Arabidopsis and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism. *J Exp Bot* 57, 2825-2835.
- Yoon J, Cho L-H, Antt HW et al. (2017) KNOX protein OSH15 induces grain shattering by repressing lignin biosynthesis genes. *Plant Physiol* 174, 312-325.
- Zheng M, Chen J, Shi Y et al. (2017) Manipulation of lignin metabolism by plant densities and its relationship with lodging resistance in wheat. *Sci Rep* 7, 1-12.
- Zhong R, Demura T, Ye Z-H (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 3158-3170.
- Zhou J, Lee C, Zhong R et al. (2009) MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 248-266.