



Scan online to view this article

A survey of evolutionary changes of fatty acids and storage proteins in three Brassica species by comparative genomics method

Shadi Heidari¹, Peivand heidari¹, Baharak Heidari^{2*}

1. Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Computer Engineering, Faculty of Engineering, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.

Abstract

Aim and Background: *Brassica napus* has one of the most important oilseed crops in the world, which has undergone extensive genome reconstruction following an interspecies hybridization of *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. In order to understand the functional changes of *B. napus* genome during the evolution, comparison of gene expression was performed in three species of Brassica.

Materials and Methods: Seed preliminary data of three Brassica libraries were collected from the Harvard university database. To find similarities between three libraries, all EST sequences were assembled using EGassembler software. Then, all contigs were analyzed by X-blast using CLC Protein workbench software against nonredundant proteins of gene bank. IDEG6 software was used to identify genes with different expression between libraries. MapMan comparative classification tool was used to classify functional catalogs.

Results: Comparison of gene expression between the three species showed that 23 genes in 5 functional groups including fatty acids, storage proteins, amino acids, transcriptional regulation and signaling were statistically significant.

Conclusion: While *B. rapa* and *B. oleracea* encode the largest number of ESTs involved in the biosynthesis of erucic acid and linolenic acid, genome in *B. napus* has evolved to produce more oleic acid and linoleic acid, which may have resulted from the deletion or duplication of the genome during evolution. In addition, Cruciferin transcripts accounted for 40% of total seed storage protein transcripts. This study paves the way for further research on the genetic consequences of polyploidy during canola breeding evolution.

Key words: Gene expression, Expressed sequence tags, Functional catalogs, Hybridization, Iau Science

Corresponding author:

Department of Computer Engineering, Faculty of Engineering, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.

Email: b_heidari@iau.ksh.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بررسی تغییرهای تکاملی اسیدهای چرب و پروتئین‌های ذخیره‌ای در سه گونه *Brassica* با روش ژنومیکس مقایسه‌ای شادی حیدری^۱، پیوند حیدری^۱، بهارک حیدری^{۲*}

۱. گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه مهندسی کامپیوتر، دانشکده فنی و مهندسی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *Brassica napus* دارای یکی از مهم‌ترین محصولات روغنی در جهان است که به‌دنبال هیبریداسیون بین گونه‌ای *Brassica rapa* و *Brassica oleracea* تحت بازسازی گسترده ژنوم قرار گرفته است. به‌منظور درک تغییرهای کارکردی ژنوم *B. napus* در طی تکامل، مقایسه بیان ژن در سه گونه *Brassica* انجام شد.

مواد و روش‌ها: اطلاعات اولیه بذر سه کتابخانه *Brassica* از بانک اطلاعات دانشگاه هاروارد جمع‌آوری شد. برای پیدا کردن شباهت بین سه کتابخانه، همه توالی‌های EST با استفاده از نرم‌افزار EGassembler دسته‌بندی شدند. سپس همه کانتیگ‌ها به‌وسیله جستجوگر بلاست X توسط نرم‌افزار CLC Protein Workbench در مقابل پروتئین‌های غیر تکراری بانک ژن آنالیز شدند. برای شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت در بین کتابخانه‌ها، نرم‌افزار IDEG6 مورد استفاده قرار گرفت. برای دسته‌بندی کاتالوگ‌های عملکردی، ابزار طبقه‌بندی MapMan استفاده شد.

یافته‌ها: مقایسه بیان ژن بین ۳ گونه نشان داد که ۲۳ ژن در ۵ گروه کارکردی شامل اسیدهای چرب، پروتئین‌های ذخیره‌ای، اسیدهای آمینه، تنظیم رونویسی و پیام‌رسانی از نظر آماری تفاوت معنی‌دار دارند.

نتیجه‌گیری: در حالی که *B. rapa* و *B. oleracea* بیش‌ترین تعداد EST مؤثر در بیوسنتز اسید چرب اروسیک و اسید لینولیک را رمزگذاری می‌کنند، ژنوم در *B. napus* به‌سمت تولید اسید اولئیک و اسید لینولئیک بیش‌تر تکامل یافته است که ممکن است به‌دنبال حذف و یا مضاعف‌شدگی ژنوم در طی تکامل ایجاد شده باشد. به‌علاوه، رونوشت‌های کروسفرین ۴۰ درصد کل رونوشت‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای بذور را تشکیل داد. این مطالعه زمینه‌ساز انجام تحقیقات بیش‌تر در زمینه پیامدهای ژنتیکی پلی‌پلوئیدی طی تکامل در راستای به‌نژادی کلزا است.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، برچسب‌های توالی بیان شده، گروه‌های کارکردی، هیبریداسیون، Iau Science

مقدمه

حال حاضر از کلزا برای اهداف خاص صنعتی استفاده نمی‌شود. پیشرفت فناوری اما می‌تواند کاربردهای جدیدی مانند بیودیزل در مصارف صنعتی برای روغن کلزا ایجاد کند. بنابر گزارش وزارت جهادکشاورزی، در سال زراعی ۹۷-۹۸، ۴۲۰ هزار تن کلزا در سطح کشور تولید شد (۲). این مقدار تولید جوابگوی نیاز کشور نیست و وابستگی شدید کشور به واردات دانه‌های روغنی، کنجاله و روغن وجود دارد و سالانه قریب ۴ میلیارد دلار ارز برای واردات این محصولات از کشور خارج می‌شود. لذا استفاده از ارقام زراعی اصلاح شده می‌تواند به رفع نیاز کشور بپردازد. در حال حاضر فقط تعداد محدودی از ارقام دوصفر (۰۰) کلزا موجود است و اکثر آن‌ها به‌طور

کلزا یکی از مهم‌ترین محصولات روغنی در جهان است. حدود ۴۰-۴۵ درصد وزن دانه روغن است. روغن کلزا ۶ درصد چربی اشباع دارد که کم‌تر از روغن‌های گیاهی دیگر است. همچنین ۵۸ درصد چربی تک اشباع نشده تشکیل شده است که این ویژگی مورد پسند مصرف‌کنندگان است. کنجاله کلزا از ۳۲ تا ۳۸ درصد پروتئین دارد. کنجاله کلزا، بخشی از دانه باقی‌مانده پس از استخراج روغن، برای صنعت دام ارزش دارد (۱). در

نویسنده مسئول:

گروه مهندسی کامپیوتر، دانشکده فنی و مهندسی، واحد کرمانشاه،
دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران
پست الکترونیکی: b_heidari@iauuksh.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸

EST به عنوان روش مؤثر، ارزان و سریع و قدرتمند برای تجزیه الگوی بیان تعداد بسیار زیادی ژن به طور همزمان در مراحل تکوینی و تکاملی مختلف، به طور گسترده استفاده می شود (۸). Heidary و همکاران با استفاده از تجزیه و تحلیل EST داده های جمع آوری شده از پایگاه داده دانشگاه هاروارد، مهم ترین ژن های مربوط به تنش خشکی گندم، برنج، پنبه و فستوکا را گزارش دادند و از نرم افزار IDEG6² برای شناسایی ژن هایی با بیان افتراقی بین کتابخانه ها استفاده کردند. آن ها هم چنین ژن های تفسیر شده را با استفاده از ابزار Mapman به گروه های کارکردی طبقه بندی کردند (۹). مطالعه های مقایسه ای بیان ژن اندکی بر اساس تعیین توالی cDNA به منظور روشن کردن تغییرهای بیان ژن مربوط به تکامل در بذور سه گونه Brassica انجام شده است. در این تحقیق با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی های EST تغییرهای احتمالی در بیان برخی ژن های مؤثر در مسیرهای بیوسنتز اسیدهای چرب و پروتئین های ذخیره ای در طی تکامل در بذور سه گونه Brassica بررسی شد.

مواد و روش ها

داده های اولیه سه کتابخانه *B. napus* (BN238-Na) با EST ۷۸۹۵، *B. rapa* (BR304-Ra) با EST ۷۵۳۴ و *B. oleracea* (BO51-Ol) با EST ۶۹۲۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده ها از پایگاه داده دانشگاه هاروارد ([Http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi](http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi)) جمع آوری شد. کتابخانه زیست محاسباتی و کتابخانه های ژنومیکس عملکردی پروژه های شاخص ژن ها در طیف گسترده ای از ارگانیسم ها هستند (۱۰). توالی cDNA با استفاده از نرم افزار EGassembler به صورت خوشه ای دسته بندی شد ([Http://egassembler.hgc.jp](http://egassembler.hgc.jp)). در مرحله پیش پردازش، خالص سازی توالی های EST شامل پاک سازی توالی، پوشاندن تکرار، پوشاندن وکتور، پوشاندن اندامک و دسته بندی توالی با درصد تطابق cutoff $N \geq 95$ انجام شد. در مرحله بعد، توالی های EST در کانتیگ ها شامل دو یا چند EST و سینگلتون شامل فقط یک EST دسته بندی شدند (۱۱). برای یافتن شباهت های سه کتابخانه، تمام توالی های EST توسط نرم افزار Egassembler دسته بندی شد. سپس همه کانتیگ ها با استفاده از X-blast توسط نرم افزار CLC bio در برابر پایگاه داده پروتئین های غیر تکراری با $E\text{-value} \leq 10^{-5}$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۲). برای شناسایی ژن ها با بیان افتراقی در کتابخانه ها، از نرم افزار IDEG6 و آماره Audic-Claverie ([Http://telethon.bio.unipd.it/ideg6](http://telethon.bio.unipd.it/ideg6)) استفاده شد (۱۳). توالی های مربوط به کانتیگ و سینگلتون هر

کامل متناسب با مناطقی نیستند که در آن پرورش داده می شوند و از نظر انواع ترکیب بیوشیمیایی بذر به وضوح با ارقام سنتی تفاوت دارند. اسید اروسیک از محتوای روغن بذر حذف شده است و مقدار گلوکوزینولات در دانه ها به طور قابل توجهی کاهش یافته است. در کل، این دست کاری های ژنتیکی برای دست-یابی به خصوصیات مفید در ارقام دوصفر به طور قابل توجهی تنوع ژنتیکی و فنوتیپی کلزا را کاهش داده است. بنابراین، در خانواده Brassica، به منابع جدیدی برای تغییرات ژنتیکی نیاز است. یکی از راه های گسترش منابع ژنتیکی برای تولید دانه های روغنی به دست آوردن آلپولی پلوئیدهای مصنوعی به وسیله تلاقی با گونه های مولد *B. rapa* و *B. oleracea* است. پلی پلوئیدی پدیده ای رایج در تکامل گیاهان گل دهنده است که منجر به تنوع زیستی و شکل گیری سریع گونه های جدید می شود. *B. napus* یک گیاه آلوتراپلوئید (دانه روغنی، AACC، $2n=4x=38$) و مهم ترین گونه زراعی جنس Brassica است که از هیبریداسیون اتفاقی و دو برابر شدن طبیعی کروموزوم ها بین *B. rapa* (شلغم، AA، $2n=2x=20$) و *B. oleracea* (کلم، CC، $2n=2x=18$) حاصل و با تغییرهای پیچیده محیطی روبرو شده است. این تغییرها، در نتیجه انتخاب طبیعی، در ژنوم آن ها رمزگذاری شده و سرنخ هایی برای واگرایی ژنتیکی آن از اجدادش فراهم می کند (۳). بنابراین استنباط تغییرها بین گونه ها با تجزیه و تحلیل ترکیب های موجودی ژن در را به شاخه غنی ژنومیکس مقایسه ای باز می کند. تکامل واگرا می تواند برای تشخیص صفات، در زیست شناسی ملکولی توسط توالی های نوکلئوتیدی و پروتئینی که از دو یا چند ژن همولوگ مشتق شده اند به کار برده شود (۴). مقایسه ژنوم بذر کلزا در مقایسه با اجداد آن در فهم تغییرهای کارکردی ژنوم در طی تکامل مؤثر است تا بدین وسیله بتوان از آن ها در گسترش تنوع ژنتیکی کلزا اقدام نمود. Niu و همکاران با استفاده از بررسی پروفایل بیان کم تر از ۸۰۰۰ توالی EST^۱ در بذر *B. napus* نشان دادند که بیوسنتز و تنظیم اسیدهای چرب بین *B. napus* و آرابیدوپسیس حفاظت شده است (۵). Fu و همکاران با استفاده از تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن نشان دادند که ژن هایی مانند ساکارز سنتاز، پیروات کیناز و ۶ فسفو گلوکونات دهیدروژناز که مربوط به متابولیسم قند هستند، در ارقامی با محتوای روغن بالاتر فرا تنظیم می شوند. نتایج آن ها اطلاعات مهمی از مکانیسم ژنتیکی مولکولی اختلاف محتوای روغن کلزا را فراهم کرد (۶). وجود تنوع در ارقام و گونه ها نه تنها روند انتخاب را تسریع می کند بلکه باعث افزایش کارایی انتخاب صفات مطلوب در سطح سلولی می شود (۷). در حال حاضر، از روش های ژنومیکس کارکردی تجزیه و تحلیل توالی

² Identification of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments

¹ Expressed sequence tag

پیام‌رسانی را نشان دادند. گروه‌های کارکردی متفاوت به همراه ژن‌ها با بیان افتراقی و تعداد EST در هر کتابخانه در جدول ۲ مشخص شده است.

بحث

گروه کارکردی اسیدهای چرب

از ژن‌هایی که در گروه کارکردی اسیدهای چرب در سه کتابخانه *B. oleracea*، *B. rapa*، *B. napus* اختلاف بیان داشتند می‌توان به ژن‌های مؤثر در بیوسنتز اسیدهای چرب غیر اشباع چند باندی ($FAD2^F$)، ($FAD3^F$) اشاره نمود. اسید چرب $FAD2$ ، نقشی اساسی در تولید اسید لینولئیک (۱۸:۲) در شبکه آندوپلاسمی^۵ دارد و اولین مرحله مورد نیاز برای تولید اسیدهای چرب اشباع نشده چندگانه موجود در بذر را کاتالیز می‌کند. $FAD3$ جزء اسیدهای چرب اشباع نشده با چند پیوند مضاعف ($PUFA^F$) در دانه‌های روغنی است و نقش زیادی در تبدیل اسید لینولئیک امگا ۶ (۱۸:۲) به اسید لینولئیک امگا ۳ (۱۸:۳) دارد. اسیدهای چرب امگا ۳ به‌دلیل حضور در غشای سلول عملکرد مهمی در فعالیت فیزیولوژیکی گیاه دارند. در مطالعه حاضر $FAD2$ در کتابخانه *B. napus* و *B. rapa* اختلاف معنی‌داری با *B. oleracea* نشان داد. $FAD3$ در کتابخانه *B. rapa* و *B. oleracea* با کتابخانه *B. napus* اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). Lee و همکاران در مطالعه‌ای ۴ ژن $FAD2$ را از گونه‌های مختلف جنس *Brassica* بررسی نمودند و از طریق مطالعات فیلوژنی گزارش نمودند که ژن $FAD2-3$ *B. napus* یک شبه ژن غیرفعال جهش‌یافته با حذف و الحاق چندین نوکلئوتید از *B. rapa* به ارث رسیده است (۳). این در حالیست که در مطالعه ما، *B. napus* و *B. rapa* از نظر بیان ژن $FAD2$ اختلاف معنی‌دار نداشتند. $FAB2^Y$ (SAD) ژن دیگری است که اختلاف معنی‌داری بین *B. napus* با دو کتابخانه *B. rapa* و *B. oleracea* نشان داد. $FAB2$ گروه‌هایی از آنزیم‌های موضعی در پلاستیدها هستند که در گیاهان عالی پیوند مضاعفی به اسیدهای استئاریک اشباع اضافه می‌کند تا آنها را به اسیدهای اولئیک اشباع نشده تبدیل کند. این اسیدهای اولئیک به‌نوبه خود به‌عنوان پیش‌ماده بیوسنتز اسیدهای چرب عمل می‌کنند. این امر در ساخت اسیدهای چرب غیر اشباع چند باندی، مانند تشکیل اسید لینولئیک (۱۸:۲) توسط $FAD2$ و $FAD3$ و تشکیل اسید لینولئیک (۱۸:۳) در ER کمک می‌کنند. علاوه بر این، $FAD4$ و $FAD5$ اسید پالمیتییک

کتابخانه توسط برنامه X-blast در برابر منبع اطلاعاتی آرآبیدوپسیس بارگیری شده از پایگاه داده TAIR^۱ ([Ftp://ftp.arabidopsis.org](http://ftp://ftp.arabidopsis.org)) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۴). برای دسته‌بندی کاتالوگ‌های عملکردی، ابزار طبقه‌بندی مقایسه‌ای MapMan (<http://www.gommapman.org>) به‌صورت آنلاین استفاده شد (۱۵). از خروجی‌های Mapman برای توصیف کاتالوگ‌های مختلف در کتابخانه‌ها استفاده شده است. از نرم‌افزار IDEG6 و آزمون Audic-Claverie برای یافتن کاتالوگ‌های مختلف عملکردی در دو کتابخانه استفاده شد. توالی‌های شناسایی شده به سه دسته هستی‌شناسی ژن GO^۲ (بیولوژیکی، سلولی و مولکولی) طبقه‌بندی شدند.

یافته‌ها

نتایج دسته‌بندی EST ها با میانگین طول EST ۵۷۱-۸۴۷ از سه کتابخانه *B. napus*، *B. rapa* و *B. oleracea* در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد که به‌ترتیب در کتابخانه بذر *B. napus*، *B. rapa* و *B. oleracea* ۱۰۶۱، ۹۴۸ و ۹۱۲ کانتیگ و ۳۲۸۲، ۳۱۷۲ و ۳۰۲۷ سینگلتن ایجاد شد. ۱۹۸۶ (۲۵/۱۵)٪، ۱۵۴۰ (۲۰/۴۴)٪ و ۱۶۵۴ (۲۳/۸۹)٪ در کتابخانه بذر *B. napus*، *B. rapa* و *B. oleracea* سهم خیلی ضعیفی ($E\text{-value} \geq 1 \times 10^{-5}$) در همولوژی با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها داشتند و یا هیچ توالی مشابهی با آنها وجود نداشت در حالی که ۵۹۹۴، ۵۹۰۹ و ۵۲۶۹ EST به‌ترتیب همولوژی بالا یا متوسطی را نشان دادند ($E\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$).

جدول ۱. تعداد کانتیگ و سینگلتن‌های هر کتابخانه بر اساس خروجی نرم‌افزار EGAssembler.

کتابخانه‌ها	<i>B. napus</i>	<i>B. rapa</i>	<i>B. oleracea</i>
تعداد کل EST ها	۷۸۹۵	۷۵۳۴	۶۹۲۳
تعداد کانتیگ‌ها	۱۰۶۱	۹۴۸	۹۱۲
تعداد EST در کانتیگ	۴۶۱۳	۴۳۶۲	۳۸۹۶
تعداد سینگلتن	۳۲۸۲	۳۱۷۲	۳۰۲۷
کانتیگ‌هایی که hit مشخصی ندارند	۱۹۸	۱۵۶	۳۱۴
سینگلتن‌هایی که hit مشخصی ندارند	۶۵۴	۳۲۶	۳۷

بر پایه نتایج ما، توالی‌هایی که در نشان دادن همولوژی معنی‌دار برای هر پروتئین در پایگاه داده‌های عمومی شکست خوردند، کاندیدای مناسبی برای ژن‌های جدید هستند. مقایسه بیان ژن و ژنومیکس کارکردی *B. napus*، *B. rapa* و *B. oleracea* با استفاده از تجزیه و تحلیل منابع EST بذر این سه گونه، تفاوت معنی‌دار ۲۳ ژن از نظر آماری در ۵ گروه کارکردی تعیین شده در سایت Mapman شامل پروتئین‌های ذخیره‌ای، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، تنظیم رونویسی و

³ Omega-6 fatty acid desaturase

⁴ Omega-3 fatty acid desaturase

⁵ Endoplasmic Reticulum (ER)

⁶ Polyunsaturated fatty acids

⁷ Δ-9 stearoyl-ACP desaturase

¹ The Arabidopsis Information Resource

² The Gene Ontology

جدول ۲. تفسیر و سطح بیان EST ها با اختلاف معنی دار بین کتابخانه ها. ستون های *B. rapa*، *B. napus* و *B. oleracea*، تعداد EST ها برای هر یک از کتابخانه ها را نشان می دهد.

p-value	<i>B. oleracea</i>	<i>B. napus</i>	<i>B. rapa</i>	فرایند های بیولوژیکی	اجزای سلولی	تطابق احتمالی (Map Man)
$4E^{-50}$	۹	۱۸*	۱۷*	بیوسنتز اسیدهای چرب	غشاء اینتگرال	اسید چرب امگا ۶ دساتوراز (FAD2)
$2E^{-31}$	۱۵*	۸	۱۷*	بیوسنتز اسیدهای چرب	شبکه اندوپلاسمی	سید چرب امگا ۳ دساتوراز (FAD3)
$3E^{-27}$	۳	۱۹*	۸	بیوسنتز اسیدهای چرب	استرومای کلروپلاست	Δ-9 استاروئیل-ACP دساتوراز (FAB2)
$5E^{-9}$	۴۷*	۳	۴۷*	فرآیند بیوسنتزی CoA - مالونیل	استرومای کلروپلاست	استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز کربوکسیل- ترانسفراز- زیر واحد بتا (accD)
$3E^{-22}$	۱۹*	۲	۲۶*	بیوسنتز اسیدهای چرب	غشاء اینتگرال	اسید چرب الونگاز ۱ (FAE1)
$1E^{-52}$	۲	۷*	۳	فرآیند بیوسنتزی سرامید	شبکه اندوپلاسمی	اسفنگولیپید دلتا-۴ دساتوراز (DES1)
$2E^{-30}$	۶	۱۱*	۸	فرآیند بیوسنتزی اسفنگولیپید	شبکه اندوپلاسمی	اسفنگولیپید دلتا - ۸ دساتوراز (SLD)
$6E^{-29}$	۱	۵*	۳	غشاء اینتگرال	فرآیند متابولیک لیپید	اسید چرب دساتوراز ۴ (FAD4)
$2E^{-32}$	۱۰	۲۹*	۱۴	فرآیند بیوسنتزی اسیدهای چرب غیراشباع	غشاء	آسیل-CoA دساتوراز (ADS)
$4E^{-27}$	۰	۱۷*	۹*	پروتئین ذخیره ای بذر	شبکه اندوپلاسمی	کروسفرین
$2E^{-41}$	۰	۳*	۱	پروتئین ذخیره ای بذر	-	ناپین
$2E^{-47}$	۲	۷*	۳	انتقال چربی	-	پروتئین انتقال چربی (LTP)
$1E^{-32}$	۳	۹*	۲	پاسخ تنش	سیتوزول	پروتئین فراوان اواخر جنین زایی (LEA)
$2E^{-20}$	۹	۲۹*	۱۱	بیوسنتز سیستئین	میتوکندری	سیستئین سنتاز
$7E^{-47}$	۷	۲۱*	۸	بیوسنتز متیونین	سیتوزول	متیونین سنتاز
$2E^{-32}$	۲۵	۷۲*	۵۴*	بیوسنتز اسید آمینه	سیتوزول	گلوتامین سنتاز
$3E^{-22}$	۲۷*	۱۹	۱۴	متابولیسم پرولین	میتوکندری	پرولین دهیدروژناز (ProDH)
$3E^{-50}$	۲۳	۱۵	۳۲*	فرآیند بیوسنتزی آرژنین	کلروپلاست	پروتئین دو عملکردی بیوسنتز آرژنین Arg1
$2E^{-5}$	۷	۱۲*	۸	انتقال آمینو اسید	غشا سلولی	آمینو اسید پرمناز ۱ (AAP)
$1E^{-8}$	۲	۹*	۳	تنظیم رونویسی	سیتوپلاسم، هسته	فاکتور رونویسی شوک حرارتی A4a (HSFA4a)
$3E^{-27}$	۵	۱۴*	۷	تنظیم رونویسی	هسته	غیر حساس به آپسیزیک اسید ۳ (ABI3)
$1E^{-64}$	۱	۷*	۲	انتقال سیگنال درون سلولی	هسته، سیتوپلاسم	پروتئین کیناز فعال شده با میتوز (MAPK)

p-value به آماره Audic-Claverie برای بیان متفاوت اشاره دارد. اختلافات معنی دار با * در جدول نشان داده شده است.

گونه های گیاهی شناسایی و مشخص شده اند و ارتباط زیادی بین فعالیت های *SAD* و سطح اسیدهای چرب به طور گسترده ای وجود دارد (۱۸). از طرف دیگر در *B. rapa* و *B. oleracea* ژن های مؤثر در بیوسنتز اسیدهای چرب اوریسیک در سطح بالاتری بیان شدند. از ژن های مهم درگیر در بیوسنتز اسیدهای چرب اوریسیک می توان به $(accD)^2$ اشاره نمود که در کتابخانه های *B. rapa* و *B. oleracea* افزایش بیان معنی دار داشتند. این آنزیم در بیوسنتز اسید اوریسیک نقش دارد. در توافق با نتایج ما Town و همکاران در بررسی

(۱۶:۰) را به اسید پالمیتولیک (۱۶:۱) تبدیل می کنند (۱۶). این اعمال نقش کلیدی آنزیم های *SAD* را در تعیین محتوای کلی اسیدهای چرب اشباع نشده (UFA^1) مشخص می کند و توجه محققان را به خود جلب کرده است. نتایج مطالعه ما در توافق با نتایج Knutzon و همکاران است که افزایش بیان *FAB2* را در *B. napus* گزارش دادند و نشان دادند که کاهش فعالیت آنزیمی *SAD* منجر به افزایش چشم گیر سطح (۱۸:۰) در بذر *B. napus* از ۲٪ به ۴۰٪ شده است (۱۷). با توجه به اهمیت عملکردی اشباع اسیدهای چرب در توسعه گیاهان و کاربردهای صنعتی، ژن های *SAD* از بسیاری از

² Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl-Transferase subunit beta

¹ Unsaturated fatty acids

ژنومیکس مقایسه‌ای گونه‌های *Brassica*، افزایش بیان ژن *accD* ناشی از تغییرهای ژنتیکی را در *B. oleracea* گزارش دادند (۱۹). در کتابخانه‌های *B. rapa* و *B. oleracea* افزایش بیان ژن (*FAE1*^۱) نیز مشاهده شد. FAE1 مرحله تراکم اولیه در مسیر طولیل شدن بیوسنتز VLCFA^۲ (اسید چرب با زنجیره بسیار طولانی) را کاتالیز می‌کند و بنابراین یک ژن اصلی در بیوسنتز اسید اورسیک است (۲۰). Sun و همکاران در توافق با نتایج ما تنها دو ایزوفرم از ژن FAE1 را در *B. napus* گزارش کردند که هر کدام را به‌صورت جداگانه از گونه‌های دیپلوئید والدین خود *B. oleracea* و *B. rapa* دریافت کرده است (۲۰). ژن (*DES1*^۳) ژن دیگری است که در کتابخانه *B. napus* افزایش بیان داشت و اختلاف معنی‌داری با دو کتابخانه *B. rapa* و *B. oleracea* نشان داد. *DES1* برای بیوسنتز اسفنگولیپیدها دلتا ۴ اشباع نشده و مشتقات آن مورد نیاز است. اسفنگولیپیدهای گیاهی در ساخت ماتریس غشای سلولی، انسجام ساختاری غشا، تشکیل دومین غشاء و در مسیرهای پیام‌رسانی فرآیندهای فیزیولوژیکی به‌خصوص انتقال سیگنال وابسته به اسید ابسیزیک^۴ و به‌عنوان متابولیت‌های میانجی فرآیند سلولی مانند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی محیطی نقش دارند (۲۱). با این حال، اطلاعات مربوط به نقش آن‌ها در بذر ناشناخته است. ژن‌های دیگر با افزایش بیان در *B. napus* که اختلاف معنی‌داری با دو کتابخانه *B. rapa* و *B. oleracea* نشان دادند (*FAD4*^۵)، (*SLD*^۶) و (*ADS*^۷) بودند. که در کتابخانه *B. napus* افزایش بیان داشت در تولید گونه‌های مولکولی فسفاتیدیل گلیسرول اختصاصی کلروپلاست حاوی (۳E) ۱۶:۱ نقش دارد و تشکیل پیوند دوگانه ترانس را کاتالیز می‌کند. Xue و همکاران در توافق با نتایج ما در بررسی ژنومی و توصیف خانواده ژن *FAD4* در *B. napus* و گونه‌های والدین آن نشان دادند که به‌ترتیب، *B. rapa*، *B. napus*، *B. oleracea*، آرابیدوپسیس و برنج حاوی هفت، چهار، چهار، یک و یک رونوشت ژن *FAD4* بودند (۲۲). *ADS* و *SLD* در مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب اشباع نشده چندگانه که بخشی از متابولیسم لیپید است نقش دارد. در کل سطح بیش‌تر بیان ژن‌های مؤثر در بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع در کتابخانه *B. napus* نسبت به دو کتابخانه *B. rapa* و *B. oleracea* بالاتر بود. در *B. napus* به‌ترتیب ژن‌های کد کننده اسید

اولئیک *FAB2*، اسید لینولئیک *FAD2* دارای بیش‌ترین میزان EST و کم‌ترین رونوشت اسید اروسیک در کتابخانه بذر بودند. در *B. rapa* و *B. oleracea* به‌ترتیب ژن‌های کد کننده اسید اروسیک (*accD*) و (*FAE1*) و اسید لینولئیک (*FAD3*) بیش‌ترین مقدار را داشتند. در *B. oleracea* کم‌ترین میزان بیان ژن‌های کد کننده اسید اولئیک و اسید لینولئیک مشاهده شد. روغن بذر جنس *Brassica* با مقدار قابل توجهی اسیدهای چرب اشباع نشده زنجیره بلند، به‌طور عمده اسید اروسیک که در اکثر روغن‌های دیگر گیاهی تجاری وجود ندارد، مشخص می‌شود. این درحالیست که در *B. napus* کاهش چشم‌گیر بیان EST مؤثر در بیوسنتز اسید اروسیک مشاهده شد. این امر به‌احتمال به‌دنبال حذف اصلاح شده اسید اروسیک از ارقام دو صفر کلزا روی داده است. از آنجا که *B. rapa* و *B. oleracea* "به‌عنوان اجداد کلزا" بیش‌ترین تعداد EST مؤثر در بیوسنتز اسید اروسیک و اسید لینولئیک را رمزگذاری می‌کنند، لذا لزوم انتقال ژن‌های مؤثر در بیوسنتز اسید اروسیک به *B. napus* از اجداد آن اهمیت زیادی در برنامه‌های اصلاحی پیدا می‌کند.

گروه کارکردی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

ژن‌های افتراقی در گروه کارکردی پروتئین ذخیره‌ای بذر (*SSP*^۸) شامل کروسیفرین، ناپین، (*LTP*^۹) و (*LEA*^{۱۰}) بودند. *SSPs* مجموعه‌ای از پروتئین‌ها هستند که در مراحل مختلف تکامل دانه در سطوح بالایی در دانه‌ها تجمع می‌یابد. در طول جوانه‌زنی دانه، *SSPs* تخریب می‌شود و اسیدهای آمینه حاصل توسط گیاهچه‌های در حال توسعه به‌عنوان یک منبع تغذیه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. کروسیفرین در *B. napus* و *B. rapa* افزایش بیان نشان دادند. ناپین، *LTP* و *LEA* در کتابخانه *B. napus* افزایش بیان داشتند. رونوشت‌های مربوط به کروسیفرین حدود ۴۰٪ رونوشت‌های مربوط به *SSPs* را شامل شد. در حالی که سهم پروتئین ناپین در بذر بسیار کم‌تر بود. Delisle و همکاران نرخ رونویسی و بیان هر دو کروسیفرین و ناپین را در بذر *B. napus* بالا و به‌ترتیب ۱۱ و ۸ درصد میزان رونوشت‌های کل گزارش نمودند که در توافق با میزان بیان بالای کروسیفرین در نتایج ما بود (۲۳). علاقه تجاری روزافزونی برای بررسی و کنترل تنوع ژنتیکی ترکیب پروتئین ذخیره بذر دانه‌های روغنی وجود دارد، زیرا ناپین و کروسیفرین دارای خواص ساختاری، حرارتی، عملکردی و بیولوژیکی به‌طور کامل متفاوتی هستند که آن‌ها را برای تعدادی از برنامه‌های کاربردی در تولید مواد غذایی و غیر غذایی جذاب می‌سازد (۲۴). علاوه‌بر این، پروتئین‌های شبه ناپین به‌عنوان خاصیت ضد میکروبی و ضد

^۸ Seed storage proteins

^۹ Lipid transfer proteins

^{۱۰} Late embryogenesis abundant

^۱ Fatty acid elongase 1

^۲ Very-long-chain fatty acid

^۳ Sphingolipid delta-4 desaturase

^۴ Abscissic acid (ABA)

^۵ Fatty acid desaturase 4

^۶ Sphingolipid delta-8 desaturase

^۷ Acyl-CoA desaturase

بیان ژن *ProDH* را در بذر *B. napus* (بر خلاف ریشه و سایر ارگان ها) گزارش نمودند و این را از نظر تکامل مولکولی ناشی از این دانستند که همه توالی های *BnaProDH* تحت انتخاب تصفیه کننده قوی قرار گرفته اند و برخی از نسخه ها غیرفعال شده اند (۲۹). تعیین نقش *ProDH* در بذر گونه های *Brassica* برای ایجاد چارچوبی جهت تحقیقات آینده پیشنهاد می شود. (AAP^2) در کتابخانه *B. napus* نسبت به دو کتابخانه دیگر افزایش بیان نشان داد. *AAP* یک پروتئین میل ترکیبی با اختصاصیت سوبسترا گسترده در نظر گرفته می شود. در گیاهان، *AAP* نیز در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی، از جمله جذب آمینو اسیدها، بارگیری فلوئم یا انتقال زایلیم- فلوئم، بارگیری بذر و عملکرد بذر نقش دارند (۳۰). *AAP* های بومی سازی شده در غشای پلاسما در جذب سلولی همراه با H^+ طیف وسیعی از آمینواسیدها نقش دارند. Zhou و همکاران در توافق با نتایج ما میزان بیان بالای *AAP* را در *B. napus* گزارش کردند که ناشی از ۳۴ ژن *AAP* است و نتایج آنها نشان داد که *BnaAAPs* تحت فشار انتخاب تصفیه کننده قوی قرار گرفته اند (۳۱). یک مطالعه اخیر گزارش کرده است که دست کاری ژنتیکی *AAP* باعث بهبود نقل و انتقال آمینواسیدها از منابع به مقاصد می شود و باعث افزایش کارایی استفاده $N (NUE^3)$ می شود. هر یک از اعضای خانواده *AAP* الگوی بیان زمانی و مکانی اختصاصی را نشان می دهد که نشان دهنده نقش های غیر اضافی *AAP* در گیاهان است (۳۲). بنابراین با استفاده از انتقال ژن *AAP* اختصاصی بذر می توان محتوای آمینواسیدهای انتخابی و حتی پروتئین های ذخیره ای مورد نیاز جهت مصارف مختلف را بهبود بخشید. به عنوان مثال Schmidt و همکاران نشان دادند که جهش یافته های فاقد تمایل بالا *AAP8* یک فنوتیپ بذر شدید را نشان می دهند. فنوتیپ بذر با یک ترکیب آمینواسیدی به طور اختصاصی تغییر یافته ارتباط دارد. اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک در جهش یافته ها به طور قابل توجهی کاهش می یابد. *AAP8* نقش مهمی در جذب اسیدهای آمینه به آندوسپرم و تأمین اسیدهای آمینه جنین در حال رشد در طی جنین زایی اولیه دارد (۳۳).

گروه کارکردی تنظیم رونویسی

در گروه کارکردی تنظیم رونویسی، عوامل رونویسی شوک حرارتی (Hsf^4) در کتابخانه *B. napus* افزایش بیان داشتند که به عنوان اجزای انتهایی در زنجیره انتقال سیگنال محسوب می شوند که با واسطه فعال کردن ژن های پاسخ دهنده به گرما و سایر تنش ها با شناسایی موتیف اتصال پالیندرومیک

باکتریایی نسبت داده می شوند (۲۵). Cameron و همکاران نشان دادند که *LTP* های گیاهی در غلظت های بالا در بافت های اپیدرمی وجود دارد و توانایی اتصال اسیدهای چرب مورد نیاز برای سنتز کوتین و سوبرین را دارند (۲۶). به علاوه، القاء سنتز *LTP* با ضخیم شدن لایه کوتیکول همراه است و حذف ژن های *LTP* منجر به تغییر در ترکیب چربی و چگالی لایه کوتیکول می شود. از این رو اختلاف در بیان ژن های *LTP* در بین کتابخانه ها ممکن است به ترکیب ها و ساختار مونومرهای که در پوشش بذر رسوب می کنند مربوط باشد. پروتئین های (*LEA*) گروه متنوعی و گسترده ای از پلی پتیدها هستند که نقش مهمی در خشک شدن و تحمل انجماد در گیاهان دارند. Liang و همکاران در توافق با نتایج ما نشان دادند که بیان اکثر *BnLEA* ها در بذر *B. napus* افزایش یافته و تکثیر قطعه ای و تکثیر کل ژنوم نقش عمده ای در گسترش خانواده ژن های *BnLEA* داشته است (۲۷). بنابراین به احتمال افزایش بیان ژن *LEA* در مطالعه حاضر در کتابخانه *B. napus* نسبت به دو کتابخانه دیگر ناشی از فرآیند آلو پلی پلوئیدی و تکثیر ژن در طی تکامل است.

گروه کارکردی اسیدهای آمینه

در کل، کتابخانه ها دارای سطح بیان کمتری از ژن های مؤثر در بیوسنتز اسیدهای آمینه گوگردی شامل سیستئین و متیونین نسبت به سایر اسیدهای آمینه بودند. با وجود بیان پایین این ژن ها در هر سه کتابخانه، تفاوت معنی داری نیز بین کتابخانه *B. napus* با دو کتابخانه دیگر وجود داشت (جدول ۲). شاید مقدار کم این اسیدهای آمینه به محتوای پایین پروتئین ذخیره ای ناپین مربوط باشد چرا که ناپین نسبت به کروسیفرین دارای محتوای بیش تری از اسیدهای آمینه گوگرد سیستئین، متیونین و لیزین است. Malabat و همکاران گزارش کردند که اختلاف موجود در محتوای اسید آمینه بین ژنوتیپ های کلزا ممکن است نماینده محتویات مختلف ناپین و کروسیفرین باشد (۱). بنابراین اصلاح ژنتیکی ترکیب پروتئین های ذخیره بذر به طور مستقیم بر ترکیب اسید آمینه تأثیر می گذارد. در کتابخانه *B. oleracea* افزایش معنی دار بیان ژن ($ProDH^1$) نسبت به دو کتابخانه دیگر مشاهده شد. *ProDH* یک آنزیم فراگیر در موجودات زنده است که نه تنها برای کاتابولیسم پرولین ضروری است بلکه نقش اصلی را در تأمین انرژی، قطع پتانسیل اکسایش اکسیداسیون بین محفظه های سلولی و تولید گونه های اکسیژن واکنش پذیر دارد. نقش های بیولوژیکی *ProDH* در هموستاز سلول و سازگاری از طریق فرآیندهای انرژی، رشدی، سازگاری، فیزیولوژیکی و آسیب شناختی در یوکاریوت ها به شدت مورد تحقیق قرار گرفته است (۲۸). Faës و همکاران در توافق با نتایج ما کاهش

² Amino acid permease 1

³ Nutrient use efficiency

⁴ Heat shock transcription factor

¹ Proline dehydrogenase

محافظت شده در پروموتورهای ژن‌های القا شده با تنش گرمایی به عنوان عناصر تنش گرمایی شناخته می‌شوند. *Hsf* گیاهان نه تنها در پاسخ به تنش گرمایی نقش دارند، بلکه در پاسخ به سایر عوامل تنش‌زا و نیز در طول رشد اندام و مراحل توسعه‌ای عمل می‌کنند (۳۴) و گروه *Hsf A4* در کنترل هموستاز گونه‌های اکسیژن فعال گیاهان نقش دارند (۳۵). گزارش شده است که *HsfA9* در رشد و نمو رویان و رشد دانه در آرابیدوپسیس و آفتابگردان شرکت می‌کند (۳۶). علاوه بر این، بیان بیش از حد *HaHsfA9* اختصاصی دانه در تنباکو تحمل کم آبی شدید را در مرحله رویشی ایجاد می‌کند (۳۷). در مطالعه حاضر، از آنجا که سطح بالای بیان *Hsf* در ژنوم *B. napus* مشاهده شد، تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای ژن *Hsf* در سه گونه نقش هیبریداسیون و آلویلی‌پلوئیدی در تکامل ژن *Hsf* در *B. napus* برجسته می‌کند. Lohani و همکاران در توافق با نتایج ما نشان دادند که همولوگ ژن *Hsf* در گونه‌های *Brassica* یافت می‌شود اما در آرابیدوپسیس وجود ندارد پس پلی‌پلوئیداسیون منجر به تشکیل خوشه‌های ژنی اختصاصی *Brassica* شده است (۳۸). تغییرهای ژنتیکی می‌تواند صفات مختلفی را در یک موجود معرفی کند. در طی تکامل، با تکثیر نسل، افراد دارای ویژگی‌های مزیت دار به‌طور فزاینده‌ای در جمعیت رایج می‌شود و باعث می‌شود جمعیت متفاوت از اجداد ایجاد شوند. بنابراین بررسی پیچیدگی روابط تکاملی در ارزیابی تنوع ژنتیکی از اهمیت زیادی برخوردار است و کمک زیادی به اصلاحگران می‌کند (۳۹). از طرفی در کتابخانه *B. napus* افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز فلاونوئیدها و فنیل پروپانویدها مشاهده شد (این نتایج در جدول ۲ نشان داده نشده است). بنابراین، این احتمال وجود دارد که *HsfA4a* در تنظیم بیان و فعالیت برخی از ژن‌ها مانند فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی و سایر فاکتورهای پاسخ تنش در تحمل خشک‌شدگی بذریه عمل کند. البته باید این نکته را مدنظر قرار داد که الگوی بیان فضایی و زمانی *Hsf* می‌تواند در بافت‌های مختلف گیاه بر پاسخ‌های مختلف تأثیر بگذارد. این ویژگی‌ها به این معنی است که مسیرهای انتقال سیگنال *Hsf* شبکه‌های بسیار اضافه و اختصاصی هستند (۳۶). نتایج این مطالعه کمک می‌کند تا زمینه‌ای برای مطالعه‌های عملکردی ژن‌های *Hsf* در بذرگونه‌های *Brassica* فراهم شود و درک ما از تنوع عملکردی ژن‌های *Hsf* گیاهی در طی تکامل بهبود یابد ضمن این‌که تلاش زیادی برای شناسایی بسترهای هدف به‌منظور درک بهتر عملکرد *Hsf* در بذور *Brassica* لازم است. در کتابخانه *B. napus* افزایش بیان ژن *ABI3*^۱ نسبت به دو کتابخانه دیگر مشاهده شد. ABA بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از جمله القای بسته

شدن روزنه، خواب دانه، مهار رشد ریشه و پاسخ استرس محیطی را کنترل می‌کند. آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی نشان داده است که ژن رمزگذار فاکتور رونویسی *ABI3* یکی از مهم‌ترین ژن‌های تنظیم‌کننده در مسیر پیام‌رسانی ABA برای رشد بذر در گیاهان است (۴۰). در آرابیدوپسیس فاکتورهای رونویسی از قبیل *ABI3* که به‌طور اختصاصی در بذر بیان می‌شوند، شناخته شده است که در تجمع SSP و کنترل بیان بسیاری از تنظیم‌کننده‌های دیگر مسیرهای متابولیکی نقش دارند. Xu و همکاران گزارش دادند که پروتئین *ABI3* با تنظیم مستقیم توسعه پوسته دانه علاوه بر تنظیم پروتئین‌های ذخیره‌سازی در تحمل خشک شدن نقش دارد (۴۱). بنابراین می‌توان استنباط نمود، تفاوت در بیان *ABI3* در گونه‌های *Brassica* ممکن است به تفاوت در ساختار پوسته بذر و یا تجمع پروتئین‌های ذخیره‌سازی مرتبط با خشک شدن بذر ربط داشته باشد. Verdier و همکاران گزارش دادند که تنظیم تجمع ذخیره بذر با تعامل پیچیده هورمون‌ها با فاکتورهای رونویسی همراه است (۴۲). ABA تنظیم‌کننده اصلی بیان ژن در بذور است و با تنظیم‌کننده اصلی *ABI3* تعامل دارد و نشان داده شده است که در *B. napus* هنگامی که توسط ABA القا شود، سطح کرسیفیرین و ناپین بالاتر است (۲۳). پروتئین فسفاتاز *ABII* که تنظیم‌کننده پاسخ ABA در گیاهان است برای تنظیم بیان ژن‌های ناپین در *B. napus* یافت شد (۴۳).

گروه کارکردی پیام‌رسانی

EST تفسیر شده دیگری که در کتابخانه *B. napus* با سایر کتابخانه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت می‌توان به پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (*MAPK*^۲) اشاره نمود که مربوط به گروه کارکردی پیام‌رسانی است. فسفوریلاسیون برگشت پذیر توسط کینازهای پروتئینی کاتالیز می‌شود که γ-فسفات را از ATP به باقی‌مانده اسیدهای آمینه پروتئین منتقل می‌کند. فسفوریلاسیون می‌تواند به‌طور چشم‌گیری آنزیم‌ها را فعال یا مهار کند و بر تعامل پروتئین-پروتئین تأثیر بگذارد. از طریق فسفوریلاسیون، پروتئین کینازها می‌توانند سیگنال‌های سلولی را تقویت و گسترش دهند. به‌طور فزاینده‌ای در گیاهان و بذرها، پروتئین کینازهای درگیر در پاسخ‌های هورمونی، دفاعی و استرس محیطی در حال کلون‌سازی و مشخص شدن هستند. با این وجود، گزارش‌های اندکی در مورد تکامل خانواده *MAPK* در گیاهان وجود دارد. به‌عنوان مثال Kalapos و همکاران تکامل *MAPK* را در ۱۳ گونه گیاهی بررسی کردند (۴۴) و تاکنون هیچ گزارشی در مورد تکامل این کینازها در گونه‌های *Brassica* گزارش نشده است و همین امر لزوم تحقیق در این زمینه را نشان می‌دهد.

^۲ Mitogen-activated protein kinase

^۱ Absciscic acid insensitive 3

نتیجه گیری

تنوع ژنتیکی محدود و عدم وجود اشکال وحشی طبیعی، یک مشکل عمده در پرورش کلزا است. شناخت خوب از دامنه تنوعی که بر یک ویژگی مشخص تأثیر می گذارد، درک درستی از مجموعه ژن های موجود را فراهم می کند و برای بهبود تنوع از طریق انتخاب ضروری است (۴۵). چنین انتخابی از گیاهان بر اساس تکامل واگرا ژنتیکی در بسیاری از محصولات موفقیت آمیز بوده است. از طرفی میزان محتوا و هم چنین ترکیب اسیدهای چرب بذر به شدت تحت تأثیر اثر متقابل ژنوتیپ در محیط است. بنابراین تلاش های اصلاحی زمانی از دقت بالا برخوردار خواهند بود که مطالعه های ژنتیکی به همراه درک اهمیت اثر متقابل ژنوتیپ در محیط در برنامه های طولانی مدت اصلاح گیاهان زراعی با استفاده از آزمایش های مزرعه ای تکرار شده و در چند محیط انجام شود (۴۶). چنین تلاش هایی در نهایت امکان دستکاری ژن های خاص در گونه *B. napus* برای مهندسی هدفمند متابولیکی در تجمع محتوا و ترکیب های مختلف در جهت مصارف مختلف تغذیه ای و صنعتی فراهم می کند. این مهندسی هدفمند از یک طرف می تواند به گونه ای طراحی شود که روغن کلزا با اسید اروسیک بالا برای اهداف صنعتی مانند تولید بیودیزل تولید کند چرا که اسید اروسیک و مشتقات آن از مواد اولیه مهم تجدیدپذیر برای صنعت اولئوشیمی هستند. از طرف دیگر با تولید کلزا دارای ارزش تغذیه ای با محتوای اسید لینولنیک و لینولئیک بیش تر به حفظ سلامتی انسان کمک کند. علاوه بر این، تکنیک های اصلاحی ممکن است برای استفاده از تنوع ژنتیکی موجود در ترکیب پروتئین و اصلاح آن به سمت کریسفرین بالاتر یا محتوای ناپین بالاتر به کار گرفته شود.

1. Malabat C, Atterby H, Chaudhry Q, Renard M. Guéguen J. Genetic variability of rapeseed protein composition. In: the 11th international rapeseed conference, Copenhagen, pp 205-208; 2003.
2. Agriculture Jihad Organization, Statistics-Crop-Products, 2018; [Https://amar.maj.ir](https://amar.maj.ir)
3. Lee KR, In Sohn S, Jung JH, Kim SH, Kim JB. Kim HU. Functional analysis and tissue differential expression of four FAD2 genes in amphidiploid *B. napus* derived from *B. rapa* and *B. oleracea*. *Gene*, 2013; 531(2): 253-262.
4. Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB. Rieseberg LH. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A*, 2009; 106: 13875-13879.
5. Niu Y, Wu GZ, Ye R, Lin WH, Shi QM, Xue LJ. Xue HW. Global Analysis of Gene Expression Profiles in *B. napus* Developing Seeds Reveals a Conserved Lipid Metabolism Regulation with *A. thaliana*. *Mol Plant*, 2009; 2(5): 1107-1122.
6. Fu SX, Cheng H. Qi C. Microarray analysis of gene expression in seeds of *B. napus* planted in Nanjing (altitude: 8.9 m), Xining (altitude: 2261.2) and Lhasa (altitude: 3658) with different oil content. *Mol Biol Rep*, 2009; 36(8):2375-86.
7. Heidari Sh, Azizinezhad R, Haghparast R. Investigation on genetic diversity in *Triticum turgidum* L. var. durum using agro-morphological characters and molecular markers. *Indian J Genet*, 2017; 77(2): 242-250.
8. Vassilev D, Leunissen J, Atanassov A, Nenov A, Dimov G. Application of bioinformatics in plant breeding. *Biotechnol Equip*, 2005; 19: 139-152.
9. Heidary P, Maleki Zanjani B, Heidary S. A study of gene expression and functional genomics of wheat, rice, cotton and festuca plants under drought stress by analyzing expressed sequence tags (EST). *Modern Genetics Journal*, 2012; 7(2 (29)): 129-140.
10. Neerinx P. Leunissen J. Evolution of web service in bioinformatics. *Brief Bioinform*, 2005; 6: 178-188.
11. Masoudi Nejad A, Tonomura K, Kawashima Sh, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo T. Goto S. EGAssembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Res*, 2006; 34:459-462.
12. McGinnis S. Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 2004; 32:20-25.
13. Romualdi C, Bortoluzzi S, d' Alessi F. Danieli G A. IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiol Genomics*, 2003; 12(2): 159-162.
14. Bassel GW, Glaab E, Marquez J, Bacardit J. Functional network construction in *Arabidopsis* using rule-based machine learning on large-scale data sets. *Plant Cell*, 2011; 23: 3101-3116.
15. Ramšak Ž, Baebler Š, Rotter A, Korbar M, Mozetič I, Usadel B. Gruden K. GoMapMan: integration, consolidation and visualization of plant gene annotations within the MapMan ontology. *Nucleic Acids Res*, 2014; 42: 167-175.
16. Wallis JG, Watts JL, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci*, 2002; 27: 467-473.
17. Knutzon DS, Thompson GA, Radke SE, Johnson WB, Knauf VC, Kridl JC. Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 1992; 89: 2624-2628.
18. Schluter PM, Xu S, Gagliardini V, Whittle E, Shanklin J. Grossniklaus U. Stearyl-acyl carrier protein desaturases are associated with sexually deceptive orchids. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 2011; 108 (14) 5696-5701.

19. Town CD, Cheung F, Maiti R, Crabtree J, Haas BJ, Wortman JR, Hine EE, Althoff R, Arbogast TS, Tallon LJ, Vigouroux M, Trick M, Bancroft I. Comparative genomics of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana* reveal gene loss, fragmentation, and dispersal after polyploidy. *Plant Cell*, 2006; 18(6): 1348-59.
20. Sun X, Pang H, Li M, Peng B, Guo H, Yan Q, Hang Y. Evolutionary Pattern of the FAE1 Gene in Brassicaceae and Its Correlation with the Erucic Acid Trait. *PLoS ONE*, 2013; 8(12): e83535.
21. Michaelson LV, Napier JA, Molino D, Faure JD. Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaption. *Biochim. Biophys. Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2016; 1861(9): 1329-1335.
22. Xue Y, Chen B, Wang R, Win AN, Li J, Chai Y. Genome-Wide Survey and Characterization of Fatty Acid Desaturase Gene Family in *Brassica napus* and Its Parental Species. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018;184(2): 582-598.
23. Delisle AJ, Crouch ML. Seed storage protein transcription and messenger-RNA levels in *B. napus* during development and in response to exogenous abscisic-acid. *Plant Physiol*, 1989; 91: 617-623.
24. Wanasundara JPD. Proteins of Braciceae oilseeds and their potential as a plant protein source. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2011; 51: 635-677.
25. Polya GM. Protein and non-protein protease inhibitors from plants. *Stud Nat Pro. Chem*, 2003.29: 567-641.
26. Cameron KD, Teece MA, Smart LB. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol*, 2006; 140: 176-183.
27. Liang Y, Xiong Z, Zheng J. Genome-wide identification, structural analysis and new insights into late embryogenesis abundant (LEA) gene family formation pattern in *B. napus*. *Sci Rep*, 2016; 6: 24265.
28. Servet C. Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Front Biosci*, 2012; 17(1), 607.
29. Faës P, Deleu C, Aïnouche A, Le Cahérec F, Montes E, Clouet V, Gouraud AM, Albert B, Orsel M, Lassalle G, Leport L, Bouchereau A, Niogret MF. Molecular evolution and transcriptional regulation of the oilseed rape proline dehydrogenase genes suggest distinct roles of proline catabolism during development. *Planta*, 2015; 241(2): 403-19.
30. Karmann J, Müller B, Hammes UZ. The long and winding road: transport pathways for amino acids in *Arabidopsis* seeds. *Plant Reprod*, 2018; 31: 253-61.
31. Zhou T, Yue C, Huang J. Genome-wide identification of the amino acid permease genes and molecular characterization of their transcriptional responses to various nutrient stresses in allotetraploid rapeseed. *BMC Plant Biol*, 2020; 20, 15.
32. Perchlik M, Tegeder M. Improving plant nitrogen use efficiency through alteration of amino acid transport processes. *Plant Physiol*, 2018. 175: 235-47.
33. Schmidt R, Stransky H, Koch W. The amino acid permease AAP8 is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2007; 226(4): 805-813.
34. Wang X, Huang W, Liu J, Yang Z, Huang, B. Molecular regulation and physiological functions of a novel FaHsfA2c cloned from tall fescue conferring plant tolerance to heat stress. *Plant Biotechnol*, 2017; 15: 237-248.
35. Baniwal SK, Chan KY, Scharf KD, Nover L. Role of heat stress transcription factor HsfA5 as specific repressor of HsfA4. *J Biol Chem*, 2007; 282: 3605-3613.
36. Almoguera C, Personat JM, Prieto-Dapena P, Jordano J. Heat shock TF involved in seed desiccation tolerance retard vegetative senescence in transgenic tobacco. *Planta*, 2015; 242: 461-475.
37. Prieto-Dapena P, Castaño R, Almoguera C, Jordano J. The ectopic overexpression of a seed-specific transcription factor, HaHSFA9, confers tolerance to severe dehydration in vegetative organs. *PlantJ*, 2008; 54 (6): 104-1014.

38. Lohani N, Golicz A, Singh M, Bhalla P. Genome-wide analysis of the Hsf gene family in *B. oleracea* and a comparative analysis of the Hsf gene family in *B. rapa* and *B. napus*. *Funct Integr Genomics*, 2019; 19(3): 515-531.
39. Heidari Sh, Azizinezhad R, Haghparast R, Heidari P. Evaluation of the association among yield and contributing characters through path coefficient analysis in advanced lines of durum wheat under diverse conditions. *J Anim Plant Sci*, 2019; 29(5): 1325-1335.
40. Nambara E, Marion-Poll A. ABA biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol*, 2005; 56: 165-185.
41. Xu P, Cai W. Function of *Brassica napus* BnABI3 in *Arabidopsis* gs1, an Allele of AtABI3, in Seed Development and Stress Response. *Frontiers in Plant Sci*, 2019; 10: 67.
42. Verdier J, Thompson RD. Transcriptional regulation of storage protein synthesis during dicotyledon seed filling. *Plant Cell Physiol*, 2008; 49: 1263-1271.
43. Ezcurra I, Wycliffe P, Nehlin L, Ellerstrom M, Rask L. Transactivation of the *B. napus* napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant J*, 2000; 24:57-66.
44. Kalapos B, Hlavová M, Nádai TV. Early Evolution of the Mitogen-Activated Protein Kinase Family in the Plant Kingdom. *Sci Rep*, 2019; 9, 409.
45. Heidari Sh, Heidari P, Azizinezhad R, Etminan A, Khosroshahli M. Assessment of genetic variability, heritability and genetic advance for agro-morphological and some in-vitro related-traits in durum wheat. *Bulg J Agric Sci*, 2020; 26(1): 120-127.
46. Heidari SH, Azizinezhad R, Haghparast R. Yield stability analysis in advanced durum wheat genotypes by using AMMI and GGE biplot models under diverse environment. *Indian J Genet*, 2016; 76(3): 274-283.