ISSN: 2676-7309

Plant Genetic Researches

Volume 10, Issue 2 (2024)

Lorestan University

Research Article

http://dx.doi.org/10.22034/pgr.10.2.5

Identification and Investigation of WRKY Gene Family in Camelina Plant (*Camelina sativa*) and Identification of the Most Important Gene Members Involved in Drought Stress

Seyede Maryam Seyed Hassan Pour[1], Leila Nejadsadeghi[2,*], Zahra Sadat Shobbar[3] and Danial Kahrizi[4]

1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Associate Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agricultural Science and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran

**Corresponding author* ✉: *l.nejadsadeghi@scu.ac.ir*

Citation: Seyed Hassan Pour, S.M., Nejadsadeghi, L., Shobbar, Z.S. and Kahrizi, D. (2024). Identification and investigation of WRKY gene family in camelina plant (*Camelina sativa*) and identification of the most important gene members involved in drought stress. *Plant Genetic Researches*, **10(2):** 63-78. http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.2.5

(Received: August 13, 2023; Final Revised: October 2, 2023; Accepted: October 11, 2023; Published online: March 17, 2024)

Extended abstract

Introduction

Camelina (Camelina sativa L.) is an annual, self-pollinating, allohexaploid and with diploidization inheritance belonging to the Brassicaceae family, showing significant similarities to the model plant, *Arabidopsis thaliana*. As an important oil crop, Camelina exhibits robust tolerance to various environmental stresses. WRKY transcription factors serve as crucial gene regulators involved in regulating biological processes and stress responses in plants. Characterized by the presence of a conserved functional domain comprising 60 amino acids (WRKYGQK motif), WRKY gene family members play key roles in numerous developmental and physiological processes, including embryogenesis, seed coat development, trichome development, anthocyanin biosynthesis, and as well as hormone signaling. Moreover, many WRKY genes are crucial players in mediating camelina responses to different stresses such as H2O2, UV radiation, drought, cold, heat, and salinity. Despite their importance, our knowledge regarding the WRKY gene family roles in Camelina remains limited. In this study, we conducted a comprehensive genome-wide in silico analysis to identify and characterize the WRKY genes in Camelina genome, aiming to pinpoint candidate WRKY genes associated with drought stress responses.

Materials and methods

In order to identify the WRKY gene family members within the Camelina genome, a consensus sequence was constructed from the conserved WRKY domain found in various plant species. This consensus sequence was then aligned against the Camelina plant genome using tBLASTn algorithm. Among the sequences obtained from tBLASTn algorithm, sequences exhibiting the WRKY conserved domain were kept and assigned as WRKY genes. The chromosomal position, chromosomal distribution, ORF length, protein length, conserved functional domains

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

and conserved motifs were identified for identified WRKY genes. Phylogenetic analysis was performed using MEGA v7.0 software. To identify WRKY genes potentially involved in drought stress response in Camelina, a comparative analysis was performed by aligning selected WRKY genes with WRKY genes from Arabidopsis. To assess the expression response of camelina WRKY gene family to drought stress, two double haploid lines drought tolerant (DH91) and drought sensitive (DH101) were used. Drought stress was applied at the 6-8 leaves stage using interrupting irrigation method. After 7-8 days of drought stress, the leaves of both sensitive and tolerant lines were harvested. The harvested tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and transferred to a -80°C freezer. The drought stress experiment was designed as a factorial completely randomized design with three replications. The quantity and quality of the extracted RNA was assessed using nanodrop and agarose gel electrophoresis, respectively. Genomic DNA contamination was removed using DNase I enzyme treatment. The cDNA synthesis was performed from RNA samples using NEB kit. Primers were designed by Primer v6.0 software. The optimal annealing temperature of the designed primers was determined using gradient PCR. The expression pattern of WRKY genes in response to drought stress was investigated using qRT-PCR. Analysis of qRT-PCR data was done by Microsoft Excel software.

Results and discussion

The results of the gene expression analysis showed that both genes had high expression in drought stress conditions in tolerant line in comparison to normal conditions, whereas no significant expression was found in drought sensitive line. The findings of the present study offer valuable insights for evolutionary investigations and enhance our understanding of the functional roles of the WRKY gene family in Camelina, thereby laying a foundation for future research endeavors in this field.

Conclusions

Environmental stresses are one of the most important factors limiting growth and production of plants. To cope with stress condition, plants have developed numerous adoptive strategies which include regulatory mechanism. Transcription factors play a central and important role in regulatory mechanism in plants. In the present study 214 members of the WRKY gene family were identified and characterized in the genome of camelina plant.

Keywords: Environmental stresses, Gene family, Conserved domain, WRKY transcription factors, Phylogenetic

پژوهش‌های ژنتیک گیاهی
جلد ۱۰، شماره ۲، ۱۴۰۲
شاپا الکترونیکی: ۷۳۰۹-۲۶۷۶
دانشگاه لرستان
مقاله پژوهشی
http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.2.5

شناسایی و بررسی خانواده ژنی WRKY در گیاه کاملینا (*Camelina sativa*) و شناسایی مهم‌ترین اعضای ژنی درگیر در تنش خشکی

سیده مریم سیدحسن‌پور[۱]، لیلا نژادصادقی[۲*]، زهرا سادات شبر[۳] و دانیال کهریزی[٤]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
۲- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
٤- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰۵/۲۲؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱٤۰۲/۰۷/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰۷/۱۹؛ تاریخ انتشار برخط: ۱٤۰۲/۱۲/۲۸)

چکیده

کاملینا با نام علمی *Camelina sativa* گیاهی یک‌ساله، خودگشن، آلوهگزاپلوئید با توارث دیپلوئیدی و متعلق به خانواده‌ی براسیکاسه می‌باشد که شباهت زیادی به گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* دارد. عوامل رونویسی WRKY یکی از مهم‌ترین خانواده‌های ژنی در گیاهان هستند که نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های مختلف ایفا می‌کنند. در این پژوهش با استفاده از ابزارها و پایگاه‌های داده، اعضای خانواده ژنی WRKY در گیاه کاملینا شناسایی و ویژگی‌های مختلف آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی تعداد ۲۱٤ عضو از خانواده ژنی WRKY را در ژنوم گیاه کاملینا مشخص کرد. تمامی ژن‌های شناسایی شده دارای دمین عملکردی محافظت شده WRKY و موتیف‌های مختلفی در ساختار خود بودند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی اعضای شناسایی شده خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا را به چهار گروه اصلی تقسیم‌بندی کرد. بررسی موقعیت کروموزومی نشان داد که ۲۱٤ عضو خانواده ژنی WRKY شناسایی شده به‌طور نامساوی روی کروموزوم‌های این گیاه توزیع شده‌اند. به‌منظور اعتبارسنجی پژوهش، بیان دو ژن *Csa11g065620* و *Csa07g035970* که ارتولوگ‌های دو ژن *WRKY8* و *WRKY57* درگیر در تنش خشکی بودند، در دو لاین دابل‌هاپلوئید متحمل (DH 91) و حساس (DH 101) به تنش خشکی در شرایط تنش خشکی بررسی شد. نتایج بررسی بیان ژن‌ها نشان داد که دو ژن مذکور در شرایط تنش خشکی در لاین متحمل (DH 91) بیان بالایی نسبت به شرایط نرمال داشتند، ولی در لاین حساس (DH 101) تفاوت بیان معنی‌داری بین ژن‌ها مشاهده نشد. نتایج این پژوهش اطلاعات مناسبی را برای مطالعه تکاملی و عملکرد خانواده ژنی WRKY در کاملینا فراهم آورده است و می‌تواند گامی مفید در پیشبرد مطالعات بیشتر در مورد نقش خانواده ژنی WRKY در گیاه کاملینا باشد.

واژگان کلیدی: تنش‌های محیطی، خانواده ژنی، دمین حفاظت‌شده، عوامل رونویسی WRKY، فیلوژنتیکی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: l.nejadsadeghi@scu.ac.ir

مقدمه

کاملینا با نام علمی *Camelina sativa* یک گیاه یک‌ساله، خودگشن، آلوهگزاپلوئید با توارث دیپلوئیدی از اعضای خانواده‌ی براسیکاسه می‌باشد که شباهت زیادی به گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* دارد (Gehringer *et al*., 2006; Lu and Kang, 2008; Marchler-Bauer *et al*., 2014). این گیاه از دسته گیاهان روغنی بوده که پس از غلات ، دومین گروه ذخایر غذایی جهان را تشکیل می‌دهند (Vafaei *et al*., 2010). کاملینا بومی مناطق معتدل اروپا از جمله غرب کوه‌های آرال است و از مناطق جنوب شرقی اروپا و جنوب غربی آسیا سرچشمه گرفته است (Larsson, 2013). کشت کاملینا تا دهه‌ی ۱۹٤۰ در اروپا برای تهیه‌ی روغن چراغ رواج داشت و در سال‌های بعد از جنگ جهانی دوم، با گسترش سیستم‌های پرنهاده و تک‌کشتی، کشاورزان به گیاهان صنعتی و اقتصادی‌تر روی آورده‌اند، اما از دهه‌ی ۱۹۸۰ به‌دلیل افزایش نیاز به غذا و سوخت‌های زیستی علاقه‌مندی به کاملینا شروع شد (Mondor and Hernández-Álvarez, 2022; Zanetti *et al*., 2021). کاملینا دارای دو گروه واریته‌های بهاره و زمستانه بوده و بسته به ژنوتیپ و شرایط رشدی دارای دوره‌ی زندگی تقریباً کوتاهی در حدود ۱۰۰–۸۵ روز است (Berti *et al*., 2016). این گیاه برخلاف دیگر محصولات صنعتی به‌عنوان یک دانه‌ی روغنی می‌تواند در حاشیه‌ی مزارع رشد کند، جایی که برای رشد محصولات غذایی مناسب نیست (Zubr, 2003). اهمیت اقتصادی این گیاه به این دلیل است که تولیدات ثانویه‌ی با ارزشی تولید می‌کند و به‌دلیل داشتن مقدار زیاد روغن (٤۰–۳۰ درصد)، احتیاجات کم به آب و دارا بودن فصل رشد کوتاه برای تولید بیودیزل نیز حائز اهمیت می‌باشد (Blackshaw *et al*., 2011; Li and Mupondwa, 2014; Mondor and Hernández-Álvarez, 2022). علاوه‌بر این، روغن کاملینا غنی از آنتی‌اکسیدان‌های فنولئیک، ویتامین E و اسیدچرب امگا–۳ بوده و به‌دلیل داشتن قابلیت مهندسی و دست‌کاری ژنتیکی برای تولید مولکول‌های جدید مثل پلیمرهای زیستی، استرهای مومی و اسیدهای چرب هیدروکسیلی مورد توجه محققین زیادی قرار گرفته است (Snell and Peoples, 2013; Ruiz-Lopez *et al*., 2014).

سالانه بخش قابل‌توجهی از عملکرد محصولات توسط تنش‌های زیستی و غیرزیستی از دست می‌رود. تنش‌های غیرزیستی مهم‌ترین عوامل محدودکننده‌ی رشد و تولید گیاهان محسوب می‌شوند. تنش‌های غیرزیستی، همگی اثرات منفی بر رشد و نمو سلول‌ها دارند. گیاهان به‌دلیل عدم قدرت جابجایی قادر به فرار از تغییرات ایجادشده در محیط اطراف خود نیستند به همین علت به‌طور دائم در معرض تنش‌های محیطی مختلف قرار می‌گیرند. درنتیجه گیاهان برای ادامه حیات، تکثیر و تولید نیازمند سیستمی برای تنظیم سازگاری در پاسخ به تنش‌های محیطی هستند (Pessarakli, 2019). سلول به‌محض احساس تغییرات محیطی، واکنش مناسبی در جهت افزایش تحمل به تنش وارد شده اتخاذ می‌نماید. تقریباً در تمامی موارد، واکنش به تنش قبل از هر چیز مبتنی‌بر بیان ژن‌های القا شونده به‌وسیله تنش و در مرحله بعد مبتنی‌بر واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می‌باشد. سلول‌ها با بیان گروه خاصی از ژن‌ها که بر اثر تنش القاء می‌شوند، قادر به احساس یک تنش معین و اتخاذ پاسخ مناسب به آن هستند که نقش بسیار مهمی در سازگاری سلول‌ها با انواع مختلفی از تنش دارد (Merah *et al*., 2012; Pessarakli, 2019). محدودیت آبی یا خشکی یکی از دلایل اصلی محدود کردن رشد گیاه و کاهش عملکرد آن در جهان است. به‌طور کلی کمبود آب سبب کاهش رشد و تولیدات گیاه شده و سبب فعال شدن تعدادی از مکانیسم‌های تنظیمی مثل تغییر اندازه روزنه‌ها و تغییر سیستم ریشه می‌شود تا گیاه بتواند شرایط تنش را تحمل کند (Hosseini *et al*., 2019; Yang *et al*., 2021).

یکی از مهم‌ترین ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش در گیاهان، اعضای خانواده عوامل رونویسی WRKY هستند (Jiang *et al*., 2017; Raeesi Sadati *et al*., 2021). این عوامل رونویسی در بسیاری از تنش‌های زیستی و غیرزیستی و دیگر مراحل نموی نقش اساسی دارند (Jiang *et al*., 2017; Li *et al*., 2020). به‌دلیل وجود یک دمین عملکردی ٦۰ اسید آمینه‌ای حفاظت‌شده (حاوی موتیف WRKYGQK) در ساختار پروتئینی، ژن‌های این خانواده WRKY نامیده می‌شوند (Gonzalez, 2015). اعضای خانواده WRKY فقط با توالی نوکلئوتیدی حفاظت‌شده‌ی (C/TTGACT/C) معروف به

W-box موجود در راه‌انداز ژن‌های هدف پاسخ می‌دهند. در گیاهان عالی خانواده‌ی ژنی WRKY نقش مهمی را در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و توسعه گیاهان دارد (Li *et al*., 2020; Rushton *et al*., 2010; Wani *et al*., 2021).

خانواده‌ی ژنی WRKY در تعداد زیادی از فرایندهای رشدی و فیزیولوژیکی مثل جنین‌زایی، پوشش بذر، توسعه کرک، بیوسنتز آنتوسیانین و سیگنال‌دهی‌های هورمونی شرکت می‌کند. تعدادی از اعضاء خانواده‌ی ژنی WRKY نسبت به H_2O_2، اشعه‌UV، خشکی، سرما، گرما و سطح بالای شوری مقاومت دارند. در پژوهشی در سال ۲۰۲۰، میزان بیان ژن‌های اعضای خانواده ژنی WRKY در گیاه کاملینا تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که ژن‌های این خانواده دارای بیان متفاوتی در گیاه کاملینا تحت تنش شوری بودند (Song *et al*., 2020). در پژوهشی مشابه، اعضای خانواده ژنی WRKY در گیاه گندم شناسایی شدند و بیان آن‌ها در تنش‌های غیرزیستی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که ژن‌های این خانواده دارای بیان متفاوتی در تنش‌های غیرزیستی مختلف در گیاه گندم بودند. پژوهش‌های مشابهی نیز در گیاهان مختلفی مانند پنبه (Guo *et al*., 2022)، یونجه (Mao *et al*., 2020)، صنوبر (Jiang *et al*., 2014)، پرتقال (Vives-Peris *et al*., 2018) و سایر گیاهان انجام شده است (Rushton *et al*., 2010). همچنین شواهد نشان می‌دهد که ژن‌های WRKY در پاسخ به مسیرهای فیزیولوژیکی مانند پیری، دوره‌ی خواب، بیوسنتز لیگنین و مورفولوژی کرک و رشد گیاه نیز دخالت دارند (Goyal *et al*., 2023; Khoso *et al*., 2022).

با توجه به نقش خانواده ژنی WRKY در تحمل به تنش و همچنین با توجه به اهمیت گیاه کاملینا، پژوهش حاضر با هدف بررسی بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی ژن‌های این خانواده و شناسایی مهم‌ترین اعضای درگیر در تنش خشکی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده ژنی WRKY در ژنوم گیاه کاملینا: برای شناسایی خانواده ژنی WRKY در ژنوم گیاه کاملینا، ابتدا تمامی توالی‌های پروتئینی مربوط به خانواده ژنی WRKY گیاه آرابیدوپسیس از پایگاه پروتئین سایت NCBI و هم‌چنین پایگاه TAIR دریافت شدند (Lamesch *et al*., 2012). در مرحله‌ی بعد، تمامی توالی‌های دریافت شده با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v20.0 هم‌ردیف شده و یک توالی موردتوافق از دمین حفاظت‌شده WRKY ایجاد و برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت. توالی موردتوافق ایجاد شده با استفاده از دو نرم‌افزار BLASTp و tBLASTn موجود در سایت NCBI در برابر پروتئین‌های گیاه کاملینا مورد هم‌ردیفی قرار گرفته و نتایج حاصل جمع‌آوری شد. توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار موجود در پایگاه داده دمین‌های محافظت‌شده CDD سایت NCBI برای وجود یا عدم وجود دمین محافظت شده WRKY مورد بررسی قرار گرفتند (Marchler-Bauer *et al*., 2014). تنها توالی‌هایی که دارای دمین محافظت شده WRKY در ساختار خود بودند، به‌عنوان توالی‌های WRKY در گیاه کاملینا انتخاب و بقیه توالی‌ها حذف شدند. به‌منظور ایجاد اطمینان بیشتر، توالی‌های WRKY نهایی با توالی‌های موجود در پایگاه عوامل رونویسی گیاهی نیز مقایسه شدند (Jin *et al*., 2016).

بررسی ساختار ژنی و پروتئینی اعضای خانواده ژنی WRKY در ژنوم گیاه کاملینا: موقعیت کروموزومی و پراکنش اعضای خانواده ژنی WRKY روی ۲۰ کروموزوم در ژنوم گیاه کاملینا توسط نرم‌افزار MapChart مشخص و به‌صورت گرافیکی رسم شد (Voorrips, 2002). طول قاب خوانش باز (Open Reading Frame: ORF) و طول توالی اسید آمینه‌ای با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v20.0 مشخص شد. دمین‌های عملکردی محافظت شده در ساختار اعضای خانواده ژنی WRKY با استفاده از نرم‌افزار CDD سایت NCBI مشخص شدند (Marchler-Bauer *et al*., 2014). موتیف‌های محافظت شده در ساختار اعضای خانواده ژنی WRKY با استفاده از نرم‌افزار MEME شناسایی شدند (Bailey *et al*., 2015).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی اعضای خانواده ژنی WRKY در ژنوم گیاه کاملینا: ابتدا اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا در نرم‌افزار MEGA v7.0 و با استفاده از الگوریتم Clustal W هم‌ردیف شدند. در مرحله‌ی بعد، درخت

فیلوژنتیکی برای اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا در نرم‌افزار MEGA v7.0 و با استفاده از روش Maximum Likelihood ترسیم شد. درخت ترسیم شده با روش Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار بازسازی و مورد آزمون قرار گرفت (Kumar *et al*., 2018).

شناسایی عوامل رونویسی WRKY درگیر در تنش خشکی کاملینا با استفاده از داده‌های گیاه مدل آرابیدوپسیس: به‌دلیل عدم وجود اطلاعات ترنسکریپتومی مربوط به تنش خشکی در گیاه کاملینا، در ابتدا بررسی بیان اعضای خانواده ژنی WRKY در شرایط تنش خشکی در خویشاوند نزدیک این گیاه یعنی گیاه مدل آرابیدوپسیس صورت گرفت و ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش خشکی مشخص شدند. در مرحله‌ی بعدی با استفاده از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ارتولوگ‌های ژن‌های WRKY درگیر در پاسخ به تنش خشکی گیاه آرابیدوپسیس در گیاه کاملینا شناسایی شدند. توالی‌های ژنی WRKY مربوط به گیاه کاملینا از پایگاه داده نوکلئوتید سایت NCBI دریافت و عوامل رونویسی درگیر در تنش خشکی از طریق رسم درخت فیلوژنتیکی برای عوامل رونویسی آرابیدوپسیس و گیاه کاملینا حاصل شد، بدین صورت که عوامل رونویسی که باهم قرابت داشتند و در یک شاخه با عوامل رونویسی درگیر در تنش خشکی گیاه آرابیدوپسیس قرار گرفتند، به‌عنوان عوامل رونویسی درگیر در تنش خشکی کاملینا شناسایی شدند.

مواد گیاهی و شرایط رشدی: در این تحقیق به‌منظور بررسی بیان خانواده‌ی ژنی WRKY در گیاه کاملینا تحت تنش خشکی، دو لاین دابل‌هاپلوئید متحمل (DH91) به خشکی و حساس به خشکی (DH101) تهیه شدند. بذور به‌صورت سطحی در گلدان‌های با اندازه متوسط (قطر دهانه ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۸ تا ۱۰ سانتی‌متر) کشت و سطح رویی بذرها با یک لایه‌ی ۲ سانتی‌متری از پیت‌ماس پوشانده شد. برای هر لاین در شرایط تنش و نرمال تعداد سه گلدان (سه تکرار) در نظر گرفته شد. گلدان‌ها پس از کشت به‌طور کامل آبیاری و در شرایط کنترل گلخانه نگهداری شدند. آبیاری به‌طور منظم صورت گرفت و کود دهی با کود استاندارد ۲۰-۲۰-۲۰ شرکت اکسیر کشاورزی یزد انجام شد.

پس از ٦ هفته از رشد گیاهان در گلخانه (مرحله ٦ تا ٨ برگی)، برای اعمال تنش خشکی از روش قطع آبیاری استفاده شد. در این روش برای اعمال تنش خشکی، قطع آبیاری در تیمارهای خشکی تا رسیدن ظرفیت زراعی به سطح تنش (حدود ۲۰ درصد ظرفیت زراعی) صورت گرفت. بعد از گذشت ۷ تا ۸ روز از اعمال تنش، از برگ‌های هر دو لاین حساس و متحمل نمونه‌برداری صورت گرفت. بافت‌های برداشت شده بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شده و به یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: استخراج RNA از بافت‌های برگی فریز شده مطابق با روش کریستو و همکاران (Christou *et al*., 2014) انجام پذیرفت. برای بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ مدل ND-Thermo ONE و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، آلودگی DNA ژنومی احتمالی با استفاده از آنزیم *DNAse* I شرکت NEB (New England Biolabs) با شماره دسترسی (M0303) و مطابق با شیوه‌نامه شرکت سازنده حذف شد. ساخت cDNA از نمونه‌های RNA با استفاده از کیت شرکت NEB (New England Biolabs) و مطابق با شیوه‌نامه شرکت سازنده کیت انجام گرفت. پس از اتمام مراحل ساخت cDNA، نمونه‌ها در یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت انجام مراحل بعدی نگهداری شدند.

طراحی آغازگرها و انجام qPCR: پس از مشخص کردن ژن‌های درگیر در تنش خشکی در گیاه کاملینا، توالی این ژن‌ها به‌همراه دو ژن مرجع *PP2A* و *Beta actin* از بانک ژن پایگاه NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت شد. طراحی آغازگرها توسط نرم‌افزار Primer premier 6.0 انجام شد و توالی آغازگرهای طراحی شده جهت سنتز به شرکت متابیون کشور آلمان ارسال گردید (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌هایPCR و qRT-PCR

Table 1. Characteristics of primers used for PCR and qRT-PCR analysis

نام آغازگر Primer Name	توالی (5′→3′) Sequence (5′→3′)	دمای ذوب Tm	درصد GC %GC	طول (جفت باز) Length (bp)
Csa11g065620.1-F	TTACGAGAGTCAGCACAACCA	60	47.6	21
Csa11g065620.1-R	GCACACGGAAGAGATCATCATT	60	45.5	22
Csa07g035970.1-F	CTTCTTGTTCCTCATCCGTAGC	60	50	22
Csa07g035970.1-R	TTCTCCTTCACTGGTGTCTCC	60	52.4	22
PP2A-F	GTCAACAATCCGCACTACCTACA	59	47.8	23
PP2A-R	CAACCACGACGGGAAGAAAC	59	55	20
Beta actin-F	TGGAATGGTCAAGGCTGGAT	59	50	20
Beta actin-R	GCTCAATCGGATACTTCAAGGT	59	45.5	22

دمای اتصال بهینه‌ی آغازگرهای طراحی شده با استفاده از واکنش PCR با شیب دمایی و در دستگاه ترموسایکلر (SimpliAmp-Thermal Cycler) تعیین گردید. به‌منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های WRKY در پاسخ به تنش خشکی از واکنش qRT-PCR بر روی دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR (شرکت ABI) و مسترمیکس 2X Real-time PCR Master Mix (SYBR Green) شرکت یکتاتجهیزآزما استفاده شد. تعیین بازده واکنش هرکدام از آغازگرهای مورد استفاده با استفاده از روش استانداردسازی در غلظت‌های مختلف cDNA انجام گرفت. ژن‌های مرجع *PP2A* و *Beta actin* به‌عنوان کنترل داخلی در نرمال‌سازی نتایج مورد استفاده قرار گرفتند. داده‌های حاصل از واکنش توسط فرمول $2^{-\triangle\triangle CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسات آماری و رسم نمودار توسط نرم‌افزار Microsoft Excel (نسخه 2013) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از BLASTp و tBLASTn در برابر پروتئوم و ژنوم گیاه کاملینا، توالی‌ها و نواحی مختلفی را مشخص کرد. پس از بررسی وجود دمین عملکردی محافظت شده WRKY در توالی‌ها و نواحی مذکور و حذف بخش‌های فاقد دمین عملکردی محافظت شده WRKY و همچنین حذف بخش‌های تکراری، تعداد ۲۱۴ توالی WRKY شناسایی شدند. به‌منظور ایجاد اطمینان بیشتر، ۲۱۴ توالی WRKY شناسایی شده با توالی‌های موجود در پایگاه عوامل رونویسی گیاهی مقایسه شده و نتایج این مقایسه نیز صحت شناسایی ۲۱۴ عضو خانواده ژنی WRKY در گیاه کاملینا را مورد تأیید قرار داد.

بررسی موقعیت کروموزومی ۲۱۴ عضو خانواده ژنی WRKY شناسایی شده در گیاه کاملینا نشان داد که بیشترین فراوانی حضور اعضای خانواده ژنی WRKY روی کروموزوم شماره ۱۱ (۲۱ ژن WRKY) و کمترین فراوانی روی کروموزوم‌های شماره ۱۵ و ۱۹ (۳ ژن WRKY) بود (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین نتایج نشان داد که اعضای خانواده ژنی WRKY در گیاه کاملینا دارای طول ORF در محدوده‌ی ۲۶۷ تا ۵۱۰۳ جفت‌باز بودند و پروتئین‌هایی در محدوده‌ی طولی ۸۸ تا ۱۷۰۰ اسیدآمینه را تولید می‌کنند. بررسی طول توالی پروتئینی اعضای خانواده ژنی WRKY همچنین نشان داد که تعداد ۳۸ توالی در محدوده‌ی طولی ۸۸ تا ۲۵۰ اسیدآمینه، ۱۳۱ توالی در محدوده‌ی طولی ۲۵۰ تا ۵۰۰ اسیدآمینه، ۳۸ توالی در محدوده‌ی طولی ۵۰۰ تا ۷۵۰ اسیدآمینه، ۲ توالی در محدوده‌ی طولی ۷۵۰ تا ۱۰۰۰ اسیدآمینه، ۱ توالی در محدوده‌ی طولی ۱۰۰۰ تا ۱۲۵۰ اسیدآمینه، ۳ توالی در محدوده‌ی طولی ۱۲۵۰ تا ۱۵۰۰ اسیدآمینه و ۱ توالی در محدوده‌ی طولی ۱۵۰۰ تا ۱۷۵۰ اسیدآمینه قرار گرفته بودند (شکل ۳).

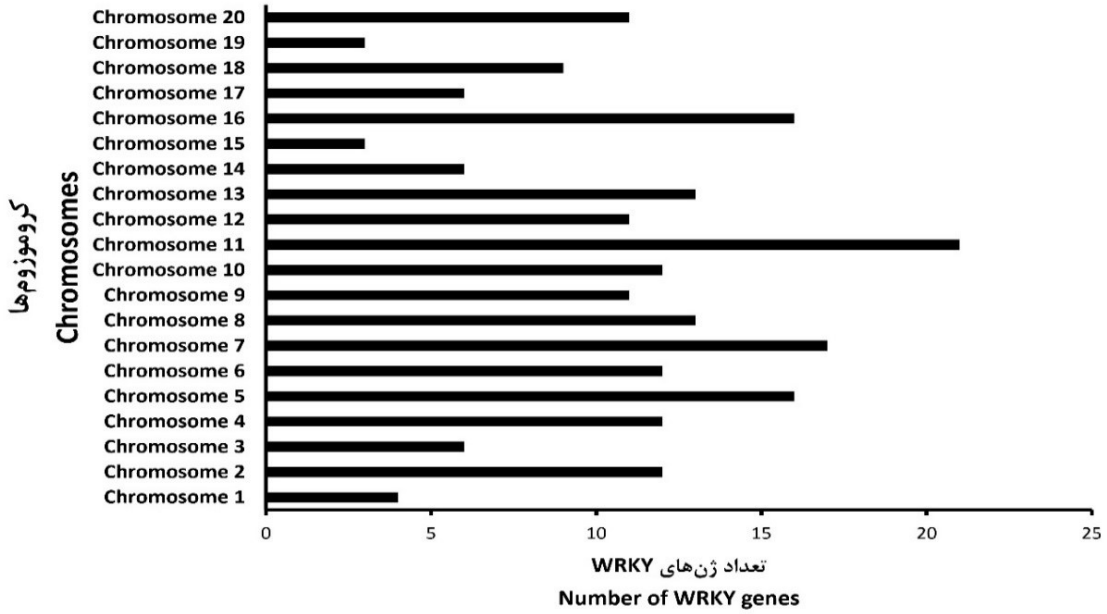
نتایج بررسی دمین‌های عملکردی محافظت شده در ساختار اعضای خانواده ژنی WRKY با استفاده از نرم‌افزار CDD سایت NCBI، وجود دمین عملکردی محافظت شده WRKY را در ساختار تمام اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا نشان داد. دمین عملکردی محافظت شده WRKY در اغلب اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا به‌صورت تکی موجود بود و در برخی از اعضاء به‌صورت دوتایی وجود داشت. علاوه‌بر دمین عملکردی محافظت

شده WRKY، دمین محافظت شده Plant Zn cluster نیز در ساختار برخی از اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا مشاهده شد. علاوه‌بر دو دمین مذکور، در تعداد محدودی از اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا دمین‌های عملکردی محافظت‌شده‌ی دیگری مانند zf-RVT، PKc_like، Sin3 و LRR و TIR نیز مشاهده شد.

نتایج بررسی موتیف‌های محافظت شده در ساختار اعضای خانواده ژنی WRKY با استفاده از نرم‌افزار MEME، موتیف‌های مختلفی را در ساختار اعضای این خانواده مشخص کرد. برخی از این موتیف‌ها مانند موتیف حاوی توالی WRKY در ساختار تمام اعضای خانواده ژنی WRKY مشاهده شدند، درحالی‌که برخی دیگر از موتیف‌ها تنها در ساختار برخی از این اعضاء وجود داشتند.

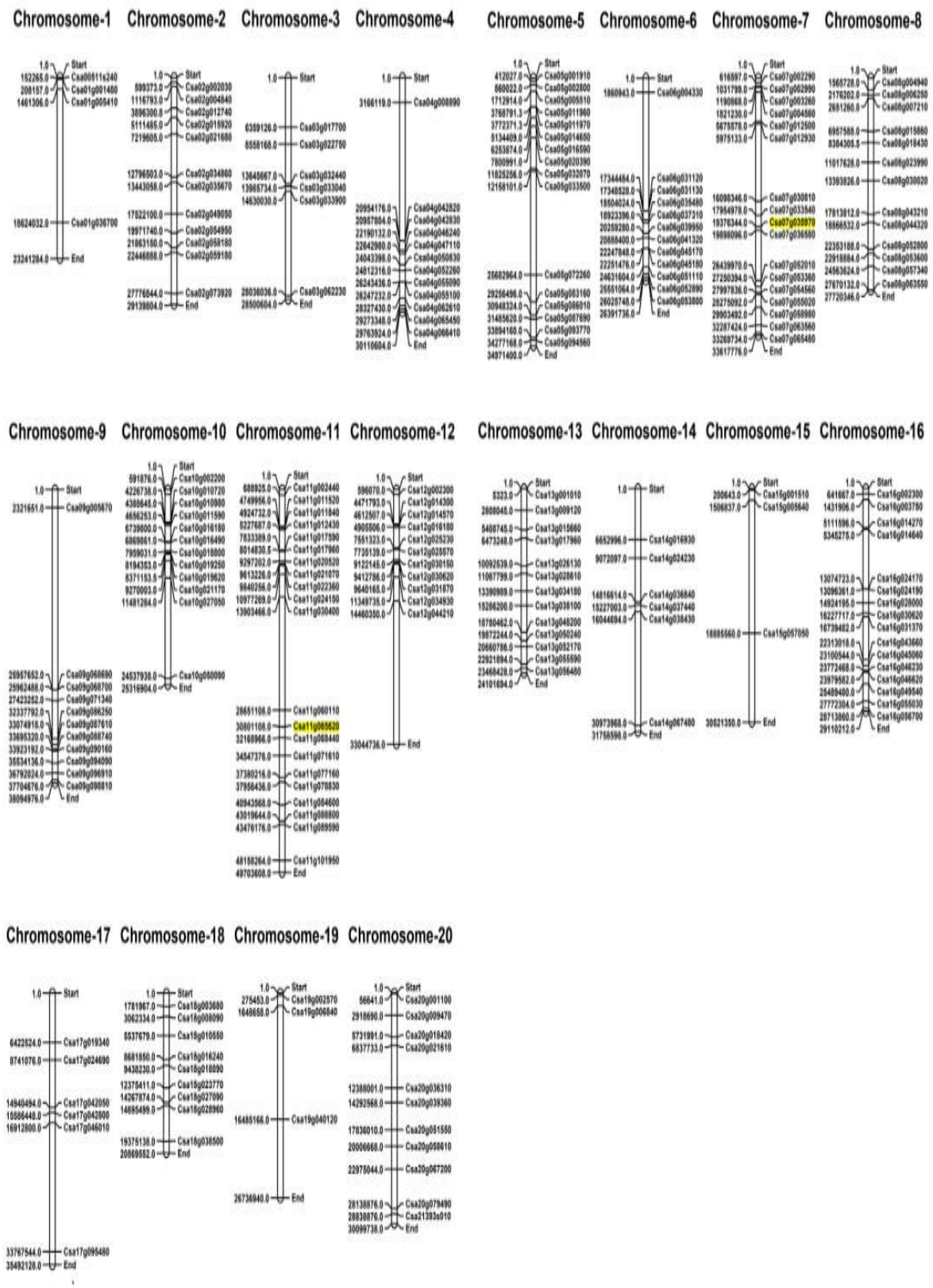
نتایج بررسی فیلوژنتیکی اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا نشان داد که این اعضاء از لحاظ تکاملی به چهار گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند. هر کدام از این چهار گروه اصلی خود به زیرگروه‌هایی تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل ٤). این گروه‌های مختلف تکاملی احتمالاً به‌دلیل تعداد دمین WRKY متفاوت و همچنین وجود یا عدم وجود دمین محافظت شده Plant Zn cluster و سایر دمین‌های عملکردی در ساختار اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا، به وجود آمده‌اند.

به‌منظور شناسایی اعضای خانواده ژنی WRKY درگیر در تنش خشکی و به‌دلیل عدم وجود اطلاعات ترنسکریپتومی مربوط به تنش خشکی در گیاه کاملینا، بررسی بیان بیوانفورماتیکی اعضای خانواده ژنی WRKY در شرایط تنش خشکی در خویشاوند نزدیک این گیاه (آرابیدوپسیس) انجام گرفت و ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش خشکی مشخص شدند. در مرحله‌ی بعدی با استفاده از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ارتولوگ‌های ژن‌های WRKY درگیر در پاسخ به تنش خشکی گیاه آرابیدوپسیس در گیاه کاملینا شناسایی شدند. نتایج این بررسی دو ژن (AT1G69310 و AT5G46350) را در گیاه آرابیدوپسیس مشخص کرد که در تنش خشکی نقش مهمی را به عهده داشتند که پس از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، دو ژن Csa11g065620 (ارتولوگ ژن AT5G46350) و Csa07g035970 (ارتولوگ ژن AT1G69310) به‌عنوان نزدیک‌ترین ارتولوگ‌های آن‌ها در گیاه کاملینا انتخاب شدند (شکل ٥). در مراحل بعدی، برای تأیید نقش دو ژن Csa11g065620 و Csa07g035970 در تنش خشکی، از روش qRT-PCR استفاده شد.



شکل ١- توزیع اعضای خانواده ژنی WRKY روی کروموزوم‌های گیاه کاملینا.

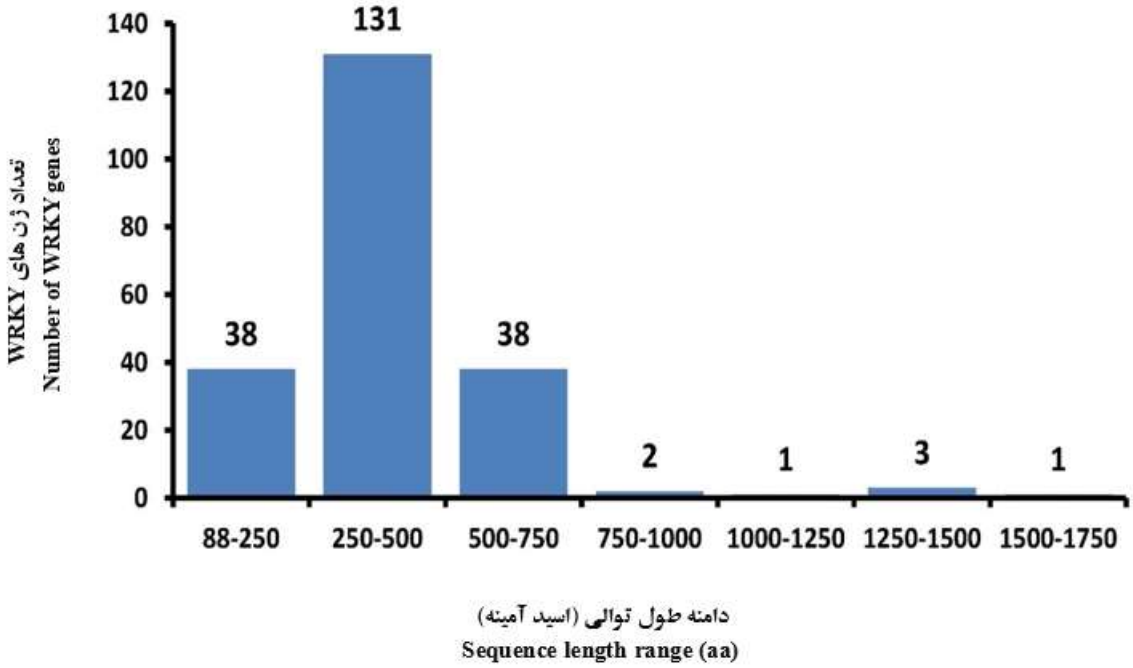
Figure 1. The distribution of the WRKY gene family members on Camelina plant chromosomes.



شکل ۲- پراکنش ۲۱۴ عضو خانواده ژنی WRKY روی ۲۰ کروموزوم گیاه کاملینا.

مکان‌های ژنی درگیر در تنش خشکی با رنگ زرد مشخص شده‌اند.

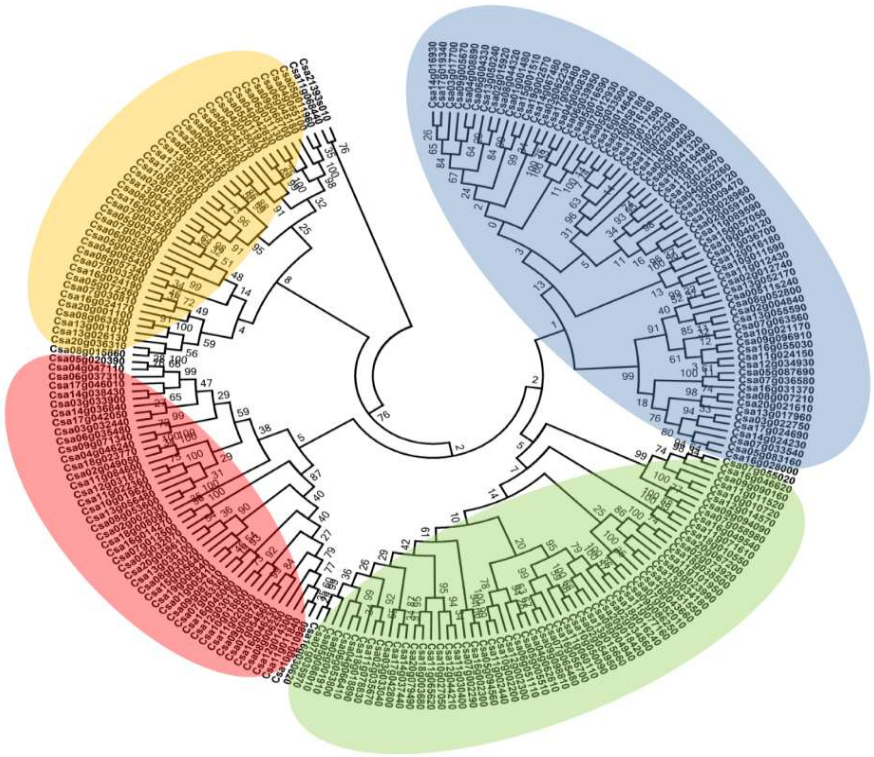
Figure 2. Distribution of 214 WRKY genes on 20 chromosomes of Camelina plant. Loci involved in drought stress are highlighted in yellow.



شکل ۳- دامنه طول توالی‌های پروتئینی اعضای خانواده ژنی WRKY در گیاه کاملینا.

اعداد روی ستون‌ها نشان‌دهنده تعداد پروتئین WRKY در هر محدوده‌ی طولی است.

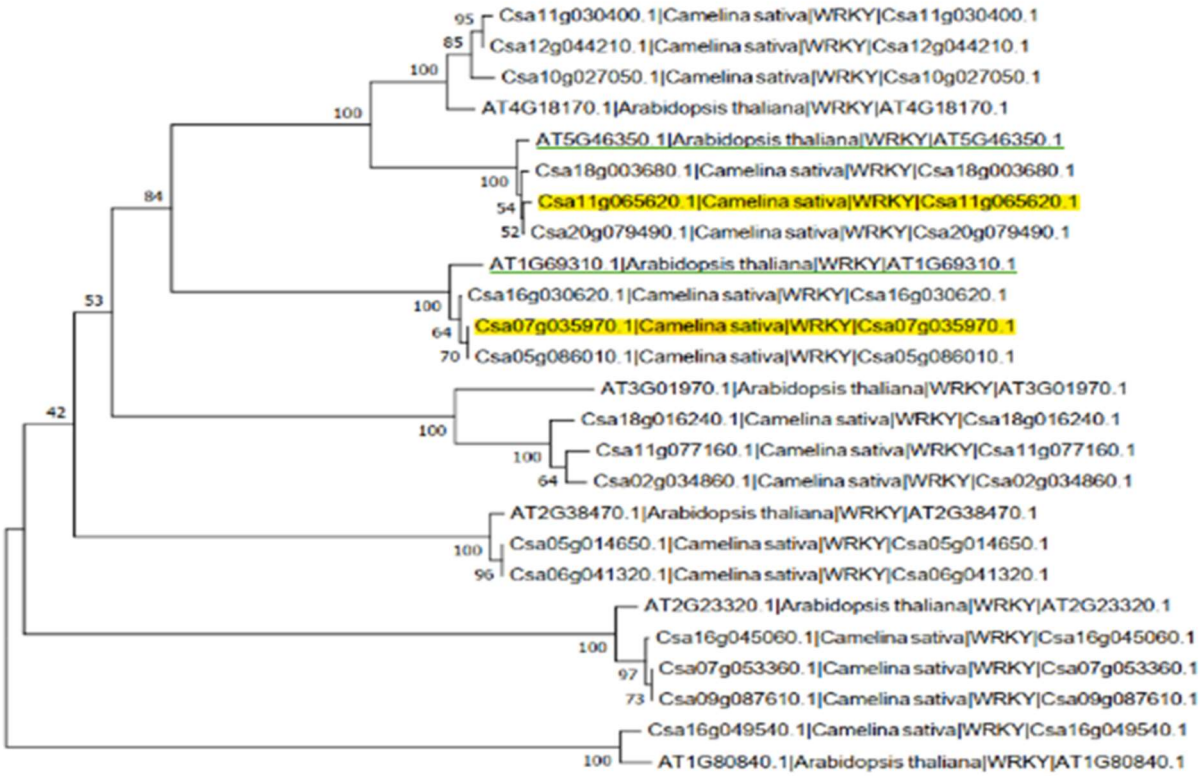
Fig 3. Length range of protein sequences of WRKY gene family members in Camelina plant. The numbers on the columns indicate the number of WRKY proteins in each length range.



شکل ٤- تحلیل فیلوژنتیکی پروتئین‌های اعضای خانواده WRKY گیاه کاملینا.

گروه‌های مختلف با بیضی‌های رنگی مشخص شده‌اند.

Figure 4. Phylogenetic analysis of camelina plant WRKY proteins. Different groups are marked with colored ellipses.



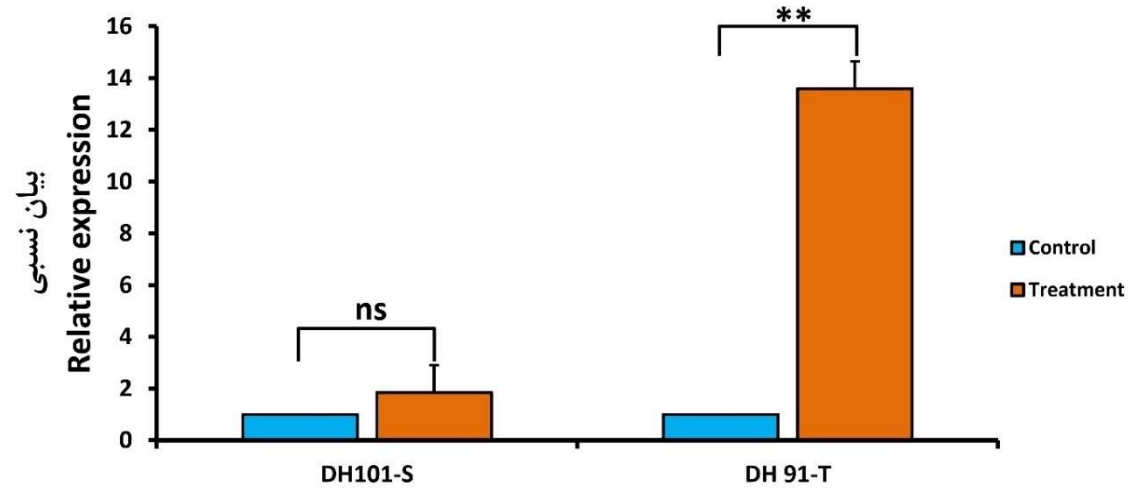
شکل ۵- آنالیز فیلوژنتیکی برای شناسایی ارتولوگ ژن‌های درگیر در تنش خشکی گیاه آرابیدوپسیس در گیاه کاملینا.

ژن‌های درگیر در تنش خشکی گیاه آرابیدوپسیس با خط سبز و ارتولوگ‌های آن‌ها در گیاه کاملینا با زنگ زرد مشخص شده‌اند.

Figure 5. Phylogenetic analysis to identify orthologs of genes involved in Arabidopsis drought stress in Camelina. The genes involved in Arabidopsis drought stress are marked with green lines and their orthologs in Camelina are highlighted in yellow.

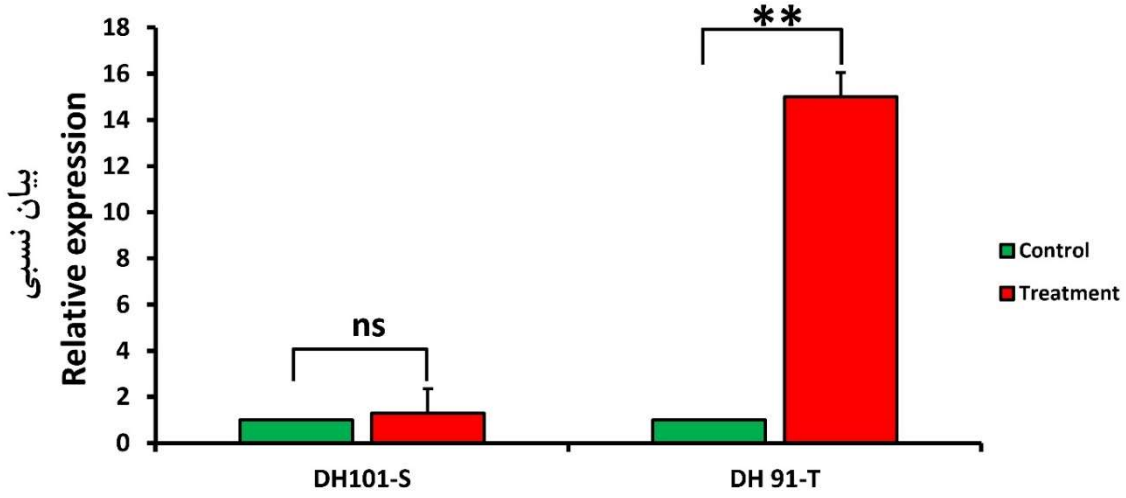
بررسی الگوی بیان ژن Csa07g035970 در شرایط تنش خشکی نشان داد که بیان این ژن در دو لاین حساس و متحمل در شرایط تنش خشکی متفاوت است (شکل ٦). بیان ژن Csa07g035970 افزایش قابل‌توجهی در لاین متحمل نسبت به شاهد در شرایط تنش خشکی نشان داد، درحالی‌که در لاین حساس تغییر بیان معنی‌داری از این ژن در شرایط تنش خشکی مشاهده نشد (شکل ٦). روند مشابهی در الگوی بیان ژن Csa11g065620 در شرایط تنش خشکی مشاهده شد (شکل ۷). بیان ژن Csa11g065620 افزایش قابل‌توجهی در لاین متحمل نسبت به شاهد در شرایط تنش خشکی نشان داد، درحالی‌که در لاین حساس تغییر بیان معنی‌داری از این ژن در شرایط تنش خشکی مشاهده نشد (شکل ۷). الگوی بیان هردو ژن انتخاب شده در شرایط تنش حاکی از میزان اهمیت و تأثیرگذاری آن ژن می‌باشد. نتایج بررسی بیان نشان داد که هر دو ژن کاندید تحت تنش خشکی در واریته‌های متحمل بیشترین بیان را داشته و در واریته‌های حساس بیان معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان نداده‌اند.

این تفاوت در بیان ژن‌های Csa07g035970 و Csa11g065620 در لاین‌های حساس و مقاوم به خشکی می‌تواند به‌دلیل ترکیب متفاوت عناصر تنظیمی در توالی‌های راه‌انداز ژن‌های مذکور در لاین‌های مقاوم و حساس به خشکی باشد. راه‌اندازها در منطقه بالادست ژن قرار دارند و دارای عناصری تنظیمی مختلفی به نام عناصر سیس هستند که فرآیند اولیه رونویسی را کنترل کرده و نقش کلیدی در تنظیم بیان ژن در مراحل مختلف رشدی و پاسخ به محیط دارند. این عناصر تنظیمی سبب اختصاصی شدن زمان و مکان بیان ژن می‌شوند و برای الگوهای بیانی خاص همچون پاسخ به تنش‌ها در گیاهان ضروری می‌باشند (Priest *et al*., 2009; Villao-Uzho *et al*., 2023).



شکل ٦- الگوی بیان ژن Csa07g035970 در شرایط تنش خشکی در دو لاین حساس (DH101) و متحمل (DH91) گیاه کاملینا. **: تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد، ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

Figure 6. Csa07g035970 gene expression pattern under drought stress conditions in two sensitive (DH101) and tolerant (DH91) lines of Camelina plant. **: Significant difference at the 0.01, ns: Non-significant.



شکل ۷- الگوی بیان ژن Csa11g065620 در شرایط تنش خشکی در دو لاین حساس (DH101) و متحمل (DH91) گیاه کاملینا.

**: تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد؛ ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

Figure 7. Csa11g065620 gene expression pattern under drought stress conditions in two sensitive (DH101) and tolerant (DH91) lines of Camelina plant.
**: Significant difference at the 1%; ns: Non-significant

در پژوهش حاضر تعداد ۲۱٤ عضو از خانواده عوامل رونویسی WRKY در گیاه کاملینا شناسایی شد. شناسایی تعداد ۲۱٤ ژن نشان داد که خانواده WRKY یک خانواده بزرگ ژنی در گیاه کاملینا است. تاکنون پژوهش‌های زیادی به بررسی خانواده WRKY در گیاهان مختلف پرداخته‌اند و نشان داده‌اند که این خانواده یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های ژنی گیاهی را تشکیل می‌دهد (Eulgem *et al.*, 2000; Goyal *et al.*, 2023). ژن‌های WRKY برای اولین بار در گیاه سیب‌زمینی شیرین شناسایی شدند (Ishiguro and Nakamura, 1994). پس از آن به‌ترتیب در گیاهان دیگر از جمله برنج، آرابیدوپسیس، سیب‌زمینی، جو، پنبه، درخت کاج، آفتابگردان و بسیاری دیگر از گیاهان شناسایی شده‌اند (Eulgem *et al.*, 2000; Giacomelli *et al.*, 2010; Goyal *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2017; Khoso *et al.*, 2022;

(Rushton *et al*., 2010). لینگ و همکاران (Ling *et al*., 2011) تعداد ۵۷ ژن کدکننده WRKY را در گیاه خیار شناسایی کردند که در بافت‌های مختلف این گیاه دارای بیان متفاوتی بودند (Ling *et al*., 2011). در پژوهشی دیگر، تعداد ۹۶ عضو از خانواده WRKY در گیاه جو شناسایی شد که به گروه‌های عملکردی مختلفی تقسیم‌بندی شدند (Yazdani et al., 2015). در پژوهشی مشابه تعداد ۱۲۷ ژن کدکننده WRKY در گیاه سیب شناسایی شد که به‌طور نامساوی روی کروموزوم‌های سیب توزیع شده و دارای بیان متفاوتی در بافت‌های مختلف بودند (Meng *et al*., 2016). در پژوهش دیگری با بررسی ژنوم ذرت تعداد ۱۳۶ ژن کدکننده WRKY شناسایی شد و خصوصیات آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Wei *et al*., 2012). این پژوهش‌ها نشان داده‌اند که خانواده‌ی ژنی WRKY یکی از ۱۰ خانواده‌ی بزرگ عوامل رونویسی در گیاهان است (Goyal *et al*., 2023).

نتایج بررسی دمین‌های عملکردی محافظت شده وجود تعداد یک یا دو دمین عملکردی محافظت شده WRKY در ساختار تمام اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا را نشان داد. علاوه‌بر دمین عملکردی محافظت شده WRKY، دمین محافظت شده Plant Zn cluster نیز در ساختار برخی از اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا مشاهده شد. علاوه‌بر دو دمین مذکور، در تعداد کاملاً محدودی از اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا دمین‌های عملکردی محافظت‌شده‌ی zf-RVT، PKc_like، Sin3 و LRR و TIR نیز مشاهده شد. خانواده ژنی WRKY بر مبنای تعداد دمین WRKY و همچنین دمین Plant Zn cluster آن‌ها به سه گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول دارای دو دمین WRKY و گروه دو و سه دارای یک دمین WRKY می‌باشند. در هر کدام از گروه‌های زیر ممکن است دمین Plant Zn cluster حضور داشته باشد (Eulgem *et al*., 2000).

نتایج بررسی با استفاده از نرم‌افزار MEME، موتیف‌های مختلفی را در ساختار اعضای این خانواده مشخص کرد. برخی از این موتیف‌ها مانند موتیف حاوی توالی WRKY در ساختار تمام اعضای خانواده ژنی WRKY مشاهده شدند، درحالی‌که برخی دیگر از موتیف‌ها تنها در ساختار برخی از این اعضاء وجود داشتند. نتایج بررسی فیلوژنتیکی اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا نشان داد که این اعضاء از لحاظ تکاملی به چهار گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند. هر کدام از این چهار گروه اصلی خود به زیرگروه‌هایی تقسیم‌بندی می‌شوند. این گروه‌های مختلف تکاملی احتمالاً به‌دلیل تعداد دمین WRKY متفاوت و همچنین وجود یا عدم وجود دمین محافظت شده Plant Zn cluster و سایر دمین‌های عملکردی در ساختار اعضای خانواده ژنی WRKY گیاه کاملینا، به وجود آمده‌اند. بسته به نوع گونه گیاه و همچنین درجه تکاملی آن، ممکن است تمام یا برخی از گروه‌های WRKY در یک گیاه وجود داشته باشند (Eulgem *et al*., 2000; Goyal *et al*., 2023). دمین عملکردی WRKY به‌دلیل وجود موتیف WRKYGQK که نزدیک به انتهای آمینی آن‌ها قرار گرفته است، قابلیت اتصال به DNA را داشته و فعالیت خود را انجام می‌دهد. هرگونه تغییر در توالی آمینواسیدی موتیف WRKYGQK باعث کاهش فعالیت اتصال به DNA عامل نسخه‌برداری WRKY شده و یا فعالیت آن را به‌طور کامل از بین می‌برد (Eulgem *et al*., 2000; Jiang *et al*., 2017; Rushton *et al*., 2010).

بررسی الگوی بیان ژن‌های Csa07g035970 و Csa11g065620 در شرایط تنش خشکی نشان داد که بیان این دو ژن در دو لاین حساس و متحمل در شرایط تنش خشکی متفاوت است. به‌طوری‌که بیان دو ژن مذکور افزایش قابل‌توجهی در لاین متحمل نسبت به شاهد نشان داد، درحالی‌که در لاین حساس تغییر بیان معنی‌داری از این دو ژن در شرایط تنش خشکی مشاهده نشد. الگوی بیان هردو ژن انتخاب شده در شرایط تنش خشکی حاکی از اهمیت میزان تأثیرگذاری آن ژن می‌باشد. به‌طور معمول در هر خانواده عوامل نسخه‌برداری، اعضاء مختلف هم‌زمان با انجام عمل اصلی و عمومی خانواده یعنی اتصال به DNA راه‌انداز و تحریک شروع نسخه‌برداری، دارای تفاوت‌های عملکردی نیز هستند. به‌طور مثال ممکن است برخی فقط در مراحل نموی تأثیر داشته باشند و برخی در پاسخ به شرایط تنش‌های محیطی عمل خود را انجام دهند (Khoso *et al*., 2022). ژن Csa07g035970 ارتولوگ WRKY57 گیاه آرابیدوپسیس است که نقش مهمی در ایجاد تحمل به تنش

خشکی در گیاه آرابیدوپسیس بازی می‌کند. افزایش بیان WRKY57 باعث ایجاد تحمل نسبت به تنش خشکی شده و خاموشی آن باعث حساسیت گیاه به تنش خشکی می‌شود (Jiang *et al*., 2012; Jiang *et al*., 2016). با توجه به این‌که گیاه آرابیدوپسیس نزدیک‌ترین خویشاوند گیاه کاملینا می‌باشد، نتایج بررسی بیان ژن Csa07g035970 در پژوهش حاضر مطابق با پژوهش‌های گذشته بود. ژن Csa11g065620 ارتولوگ WRKY8 گیاه آرابیدوپسیس است که نقش مهمی در ایجاد تحمل به تنش‌های شوری و خشکی در گیاه آرابیدوپسیس بازی می‌کند. این ژن بیشترین بیان را در بافت ریشه داشته و القای آن باعث ایجاد مقاومت نسبت به تنش‌های شوری و خشکی می‌شود (Hu *et al*., 2013).

تنش‌های محیطی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده‌ی رشد و تولید در گیاهان است. گیاهان به‌دلیل عدم توانایی در جابه‌جایی و گریز از تنش‌ها و تغییرات ایجاد شده برای ادامه‌ی حیات، تکثیر و تولیدمثل نیازمند یک مکانیسم تنظیمی در پاسخ به تنش‌های زیستی هستند. گیاهان از طریق بیان ژن‌های القاء شونده با تنش به تنش‌های محیطی پاسخ می‌دهند که در این بین عوامل رونویسی نقش مرکزی و مهمی در تنظیم این پاسخ‌ها به عهده دارند. در این پژوهش تعداد ۲۱٤ ژن کدکننده WRKY از طریق بررسی‌های بیوانفورماتیکی در سطح ژنوم کاملینا شناسایی شد و ویژگی‌های مختلف آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش می‌توانند شروعی برای مطالعات بیشتر در مورد نقش خانواده ژنی WRKY در گیاه کاملینا باشد.

References

Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E. and Noble, W.S. (2015). The MEME suite. *Nucleic Acids Research*, **43(1):** 39-49.

Berti, M., Samarappuli, D., Johnson, B.L. and Gesch, R.W. (2017). Integrating winter camelina into maize and soybean cropping systems. *Industrial Crops and Products*, **107:** 595-601.

Blackshaw, R., Johnson, E., Gan, Y., May, W., McAndrew, D., Barthet, V., McDonald, T. and Wispinski, D. (2011). Alternative oilseed crops for biodiesel feedstock on the Canadian prairies. *Canadian Journal of Plant Science*, **91:** 889-896.

Christou, A., Georgiadou, E.C., Filippou, P., Manganaris, G.A. and Fotopoulos, V. (2014). Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. *Gene*, **537:** 169-173.

Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. and Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, **5:** 199-206.

Gehringer, A., Friedt, W., Lühs, W. and Snowdon, R. (2006). Genetic mapping of agronomic traits in false flax (Camelina sativa subsp. sativa). *Genome*, **49:** 1555-1563.

Giacomelli, J.I., Ribichich, K.F., Dezar, C.A. and Chan, R.L. (2010). Expression analyses indicate the involvement of sunflower WRKY transcription factors in stress responses, and phylogenetic reconstructions reveal the existence of a novel clade in the Asteraceae. *Plant Science*, **178:** 398-410.

Gonzalez, D.H. (2015) *Plant transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

Goyal, P., Devi, R., Verma, B., Hussain, S., Arora, P., Tabassum, R. and Gupta, S. (2023). WRKY transcription factors**:** Evolution, regulation, and functional diversity in plants. *Protoplasma*, **260:** 331-348.

Guo, X., Ullah, A., Siuta, D., Kukfisz, B. and Iqbal, S. (2022). Role of WRKY transcription factors in regulation of abiotic stress responses in cotton. *Life*, **12:** 1410.

Hosseini, S.Z., Ismaili, A. and Sohrabi, S.S. (2019). Evaluation of Drought Tolerance in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Under Water Deficit Stress Conditions. *Plant Genetic Researches*, **5:** 55-72 (In Persian).

Hu, Y., Chen, L., Wang, H., Zhang, L., Wang, F. and Yu, D. (2013). A rabidopsis transcription factor WRKY 8 functions antagonistically with its interacting partner VQ 9 to modulate salinity stress tolerance. *The Plant Journal*, **74:** 730-745.

Ishiguro, S. and Nakamura, K. (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5′ upstream regions of genes coding for sporamin and β-amylase from sweet potato. *Molecular and General Genetics MGG*, **244:** 563-571.

Jiang, J., Ma, S., Ye, N., Jiang, M., Cao, J. and Zhang, J. (2017). WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, **59:** 86-101.

Jiang, Y., Duan, Y., Yin, J., Ye, S., Zhu, J., Zhang, F., Lu, W., Fan, D. and Luo, K. (2014). Genome-wide identification and characterization of the Populus WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses. *Journal of Experimental Botany*, **65:** 6629-6644.

Jiang, Y., Liang, G. and Yu, D. (2012). Activated expression of WRKY57 confers drought tolerance in Arabidopsis. *Molecular Plant*, **5:** 1375-1388.

Jiang, Y., Qiu, Y., Hu, Y. and Yu, D. (2016). Heterologous expression of AtWRKY57 confers drought tolerance in Oryza sativa. *Frontiers in Plant Science*, **7:** 145.

Jin, J., Tian, F., Yang, D.C., Meng, Y.Q., Kong, L., Luo, J. and Gao, G. (2016). PlantTFDB 4.0**:** toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, **45(D1):** 1040-1045.

Khoso, M.A., Hussain, A., Ritonga, F.N., Ali, Q., Channa, M.M., Alshegaihi, R.M., Meng, Q., Ali , M., Zaman, W. and Brohi, R.D. (2022). WRKY transcription factors (TFs)**:** Molecular switches to regulate drought, temperature, and salinity stresses in plants. *Frontiers in Plant Science*, **13:** 1039329.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X**:** molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35:** 1547.

Lamesch, P., Berardini, T.Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L. and Garcia-Hernandez, M. (2012). The Arabidopsis information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research,* **40(1),** 1202-1210.

Larsson, M. (2013). Cultivation and processing of Linum usitatissimum and Camelina sativa in southern Scandinavia during the Roman Iron Age. *Vegetation History and Archaeobotany*, **22:** 509-520.

Li, W., Pang, S., Lu, Z. and Jin, B. (2020). Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants. *Plants*, **9:** 1515.

Li, X. and Mupondwa, E. (2014). Life cycle assessment of camelina oil derived biodiesel and jet fuel in the Canadian Prairies. *Science of the Total Environment*, **481:** 17-26.

Ling, J., Jiang, W., Zhang, Y., Yu, H., Mao, Z., Gu, X., Huang, S. and Xie, B. (2011). Genome-wide analysis of WRKY gene family in Cucumis sativus. *BMC Genomics*, **12:** 1-20.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25:** 402-408.

Lu, C. and Kang, J. (2008). Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop Camelina sativa by Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, **27:** 273-278.

Mao, P., Jin, X., Bao, Q., Mei, C., Zhou, Q., Min, X. and Liu, Z. (2020). WRKY transcription factors in Medicago sativa L.**:** Genome-wide identification and expression analysis under abiotic stress. *DNA and Cell Biology*, **39:** 2212-2225.

Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M. and Hurwitz, D.I. (2014). DD**:** NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, **43:** D222-D226.

Meng, D., Li, Y., Bai, Y., Li, M. and Cheng, L. (2016). Genome-wide identification and characterization of WRKY transcriptional factor family in apple and analysis of their responses to waterlogging and drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **103:** 71-83.

Merah, O., Langlade, N., Alignan, M., Roche, J., Pouilly, N., Lippi, Y., Vear, F., Cerny, M., Bouniols, A. and Mouloungui, Z. (2012). Genetic analysis of phytosterol content in sunflower seeds. *Theoretical and Applied Genetics*, **125:** 1589-1601.

Mondor, M. and Hernández-Álvarez, A.J. (2022). Camelina sativa composition, attributes, and applications**:** A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **124:** 21-35.

Pessarakli, M. (2019) *Handbook of Plant And Crop Stress*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Priest, H.D., Filichkin, S.A. and Mockler, T.C. (2009). Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Current opinion in Plant Biology*, **12:** 643-649.

Raeesi Sadati, S.Y., Jahanbakhsh Godehkahriz, S., Ebadi, A. and Sedghi, M. (2021). Study of Expression Pattern of Some Transcription Factors in Wheat under Drought Stress and Zinc Nanoparticles. *Plant Genetic Researches*, **7:** 135-144 (In Persian).

Ruiz-Lopez, N., Haslam, R.P., Napier, J. A. and Sayanova, O. (2014). Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. *The Plant Journal*, **77(2):** 198-208.

Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. and Shen, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, **15:** 247-258.

Snell, K.D. and Peoples, O.P. (2013). Production of value-added co-products in industrial oilseeds. *Inform*, **24(10):** 640-643.

Song, Y., Cui, H., Shi, Y., Xue, J., Ji, C., Zhang, C., Yuan, L. and Li, R. (2020). Genome-wide identification and functional characterization of the Camelina sativa WRKY gene family in response to abiotic stress. *BMC Genomics*, **21:** 1-17.

Vafaei, N., Tavakolipour, H. and Ghodsvali, A. (2010). Some biophysical properties of oily sunflower achenes in Golestan province. *Journal of food science and technology (Iran)*, **7(25):** 103-115 (In Persian).

Villao-Uzho, L., Chávez-Navarrete, T., Pacheco-Coello, R., Sánchez-Timm, E. and Santos-Ordóñez, E. (2023). Plant promoters**:** their identification, characterization, and role in gene regulation. *Genes*, **14:** 1226.

Vives-Peris, V., Marmaneu, D., Gómez-Cadenas, A. and Pérez-Clemente, R. (2018). Characterization of Citrus WRKY transcription factors and their responses to phytohormones and abiotic stresses. *Biologia Plantarum*, **62:** 33-44.

Voorrips, R. (2002). MapChart**:** software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, **93:** 77-78.

Wani, S.H., Anand, S., Singh, B., Bohra, A. and Joshi, R. (2021). WRKY transcription factors and plant defense responses**:** Latest discoveries and future prospects. *Plant Cell Reports*, **40:** 1071-1085.

Wei, K.F., Chen, J., Chen, Y.F., Wu, L.J. and Xie, D.X. (2012).Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize. *DNA Research*, **19:** 153-164.

Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z. and Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, **7:** 50.

Yazdani, B., Asghari-Zakaria, R. and Shobbar, Z.S. (2015). Identification and classification of the WRKY transcription factors family in barley. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, **4:** 41-54.

Zanetti, F., Alberghini, B., Marjanović Jeromela, A., Grahovac, N., Rajković, D., Kiprovski, B. and Monti, A. (2021). Camelina, an ancient oilseed crop actively contributing to the rural renaissance in Europe. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **41:** 1-18.

Zubr, J. (2003). Qualitative variation of Camelina sativa seed from different locations. *Industrial Crops and Products*, **17:** 161-169.