مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی online
دوره ۱٤، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱٤۰٤
صفحه ۲۳٤-۲٤۷

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2026
Volume 14, Number 2, Pages: 234-247

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61882/gebsj.14.2.6

شناسایی ژن‌های هاب و تنظیم مرحله‌ای مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها در پوست نازک مغز گردو با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی و RT-qPCR

Identification of hub genes and stepwise regulation of the polyphenol biosynthesis pathway in thin skin of walnut kernel using co-expression network analysis and RT-qPCR

هانیه شهرکی جزینکی[۱]، براتعلی فاخری[۲*]، نفیسه مهدی نژاد[۳]، مریم الله‌دو[٤]

Hanieh Shahraki-Jazinakhi[1], Barat Ali Fakheri[2*], Nafiseh Mahdinezhad[3], Maryam Allahdou[4]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، ۲- استاد، ۳- استاد، ٤- دانشیار
گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

1. PhD Student, 2. Full Professor, 3. Full Professor, 4. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran

*Corresponding Author, Email: fakheri@uoz.ac.ir
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۴/۱- تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۴/۱)
Received: 2026/02/20 | Accepted: 2026/06/22 | Published: 2026/06/22

Abstract

Identification of Hub Genes and Stage-Specific Regulatory Patterns of the Polyphenol Biosynthesis Pathway in Walnut Pellicle Using Co-Expression Network Analysis and RT-qPCR. Despite the importance of polyphenols in walnut, the stage-specific regulation and key regulatory genes involved in the their biosynthesis pathway during walnut pellicle development remain poorly understood. In this study, the expression patterns of ten key genes involved in polyphenol biosynthesis, including PAL, C4H, 4CL, CHS, CHI, F3H, DFR, ANS, ANR, and LAR, were investigated in thin skin of walnut kernel across different developmental stages (8 to 19 weeks after flowering) using co-expression network analysis and RT-qPCR. Heatmap and correlation analyses revealed that week 9 after flowering represents a critical stage with the highest transcriptional activity of the polyphenol biosynthesis pathway, characterized by significant upregulation of most downstream genes. Co-expression network analysis identified CHS, CHI, F3H, DFR, ANR, C4H, and 4CL as hub genes with strong positive correlations, whereas PAL exhibited strong negative correlations with downstream genes, suggesting a potential feedback regulatory role in the pathway. RT-qPCR results confirmed the significant upregulation of hub genes at week 9 and showed strong consistency with the bioinformatic and network-based analyses. Overall, this study is the first to demonstrate that week 9 is a key regulatory stage in walnut pellicle development and to identify major hub genes governing polyphenol biosynthesis. These findings provide valuable insights into the regulatory mechanisms underlying polyphenol production and offer potential genetic targets for improving phenolic content and quality in walnut.

Key words: Thin skin of walnut kernel, Polyphenol biosynthesis, Flavonoid pathway, Hub genes, Co-expression network analysis, RT-qPCR

چکیده

شناسایی ژن‌های هاب و الگوهای تنظیمی مرحله‌ای مسیر بیوسنتز پلی‌فنول در پوست نازک مغز گردو با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی و RT-qPCR. با وجود اهمیت پلی‌فنول‌ها در گردو، تنظیم مرحله‌ای و ژن‌های کلیدی تنظیمی درگیر در مسیر بیوسنتز آن‌ها در طی نمو پوست نازک مغز گردو هنوز به خوبی شناخته نشده است. در این مطالعه، الگوهای بیان ده ژن کلیدی درگیر در بیوسنتز پلی‌فنول، شامل PAL، C4H، 4CL، CHS، CHI، F3H، DFR، ANS، ANR و LAR، در پوست نازک مغز گردو در مراحل مختلف نمو (۸ تا ۱۹ هفته پس از گلدهی) با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی و RT-qPCR بررسی شد. تحلیل‌های هیت‌مپ و همبستگی نشان دادند که هفته ۹ پس از گلدهی یک مرحله بحرانی با بالاترین فعالیت رونویسی مسیر بیوسنتز پلی‌فنول است که با افزایش معنادار بیان اکثر ژن‌های پایین‌دست مشخص می‌شود. تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن‌های CHS، CHI، F3H، DFR، ANR، C4H و 4CL را به عنوان ژن‌های هاب با همبستگی مثبت قوی شناسایی کرد، در حالی که PAL همبستگی منفی قوی با ژن‌های پایین‌دست نشان داد که نشان‌دهنده نقش احتمالی بازخورد منفی در مسیر است. نتایج RT-qPCR افزایش معنادار بیان ژن‌های هاب در هفته ۹ را تأیید کرد و سازگاری قوی با تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و مبتنی بر شبکه نشان داد. در مجموع، این مطالعه نخستین گزارشی است که هفته ۹ را به عنوان یک مرحله کلیدی تنظیمی در تکامل پوست نازک مغز گردو معرفی می‌کند و ژن‌های هاب اصلی تنظیم‌کننده بیوسنتز پلی‌فنول را شناسایی می‌کند. این یافته‌ها بینش ارزشمندی در مورد مکانیسم‌های تنظیمی زیربنای تولید پلی‌فنول ارائه می‌دهند و اهداف ژنتیکی بالقوه‌ای برای بهبود محتوا و کیفیت فنولی در گردو پیشنهاد می‌کنند.

کلمات کلیدی: پوست نازک مغز گردو، بیوسنتز پلی‌فنول، مسیر فلاونوئید، ژن‌های هاب، تحلیل شبکه هم‌بیانی، RT-qPCR

رفرانس دهی این مقاله Citation

Shahraki-Jazinaki H, Fakheri B, Mahdinezhad N, Allahdou M. (2026). Identification of hub genes and stepwise regulation of the polyphenol biosynthesis pathway in thin skin of walnut kernel using co-expression network analysis and RT-qPCR. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (2): 234-247. Doi: 10.61882/gebsj.14.2.6
URL: http://gebsj.ir/article-1-541-en.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 14, Number 2, 2026

خلاصه

پلی‌فنول‌ها از مهم‌ترین ترکیبات ثانویه در گردو بوده و نقش کلیدی در کیفیت تغذیه‌ای و خواص آنتی‌اکسیدانی پوست نازک هسته گردو ایفا می‌کنند. با وجود اهمیت این ترکیبات، الگوی تنظیم مرحله‌ای ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها و ژن‌های کلیدی تنظیم‌کننده این مسیر در طول رشد پوست گردو به‌طور کامل شناخته نشده است. در این مطالعه، الگوی بیان ده ژن کلیدی مسیر بیوسنتز پلی‌فنول شامل PAL، C4H، 4CL، CHS، CHI، F3H، DFR، ANS، ANR و LAR در پوست نازک مغز گردو طی مراحل مختلف رشد با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی و RT-qPCR بررسی شد. نتایج نقشه حرارتی و تحلیل همبستگی بیان ژن‌ها نشان داد که هفته نهم پس از گل‌دهی نقطه اوج فعالیت مسیر بیوسنتز پلی‌فنول بوده و اکثر ژن‌های پایین‌دستی مسیر در این مرحله افزایش بیان معنی‌داری را نشان می‌دهند. تحلیل شبکه هم‌بیانی نشان داد که ژن‌های CHS، CHI، F3H، DFR، ANR، C4H و CL4 به‌عنوان ژن‌های هاب با همبستگی مثبت بسیار قوی شناسایی شدند، در حالی که ژن PAL همبستگی منفی قوی با سایر ژن‌ها داشته و به‌عنوان یک ژن تنظیمی با نقش بازخوردی احتمالی مطرح شد. نتایج RT-qPCR افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های هاب در هفته نهم را تأیید کرده و همخوانی بالایی با داده‌های بیوانفورماتیک و تحلیل شبکه نشان داد. این مطالعه برای نخستین بار نقش محوری هفته نهم را در تنظیم هماهنگ مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها در پوست نازک مغز گردو مشخص کرد. یافته‌های حاضر می‌تواند مبنایی برای درک بهتر مکانیسم‌های تنظیمی تولید پلی‌فنول‌ها و شناسایی اهداف ژنتیکی جهت بهبود کیفیت و غنی‌سازی ترکیبات فنولیک در گردو باشد.

کلمات کلیدی: پوست نازک مغز گردو، پلی‌فنول‌ها، مسیر بیوسنتز فلاونوئی، ژن‌های هاب، تحلیل شبکه هم‌بیانی، RT-qPCR

مقدمه
Introduction

گردو (*Juglans regia* L.) یکی از مغزیجات ارزشمند درختی از خانواده Juglandaceae است که به طور گسترده در سراسر جهان مصرف می‌شود و دارای ترکیبات زیست فعال بسیار مفیدی برای سلامتی است (Chashman *et al*., 2025). اخیراً، توجه علمی به مشخصات فیتوشیمیایی فرآورده‌های جانبی گردو به دلیل ترکیبات فعال ارزشمند آنها در حال افزایش است. از جمله ترکیبات زیست فعال گردو می‌توان به پلی‌فنول‌ها، اسیدهای چرب امگا-۳، فیتواسترول‌ها، کاروتنوئیدها و ملاتونین اشاره کرد. این ترکیبات در بخشهای مختلف گردو وجود دارند و دارای اثرات فیزیولوژیکی و محافظتی متعددی بر بدن انسان هستند. به عنوان مثال، اسیدهای چرب امگا-۳ موجود در گردو می‌تواند باعث کاهش سطح کلسترول LDL و افزایش کلسترول HDL شود، همچنین پلی‌فنول و فیتواسترول نقش مهمی در کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب مزمن ایفا می‌کنند (Hardman *et al*., 2019; Ebrahimi *et al*., 2017).

پلی‌فنول‌های طبیعی ترکیبات مهم و ارزشمندی هستند که در گردو وجود دارند و برای درمان التهاب، سرطان یا اثر ضد پیری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات بیش از یک گروه هیدروکسیل (OH-) متصل به حلقه‌ی آروماتیک دارند و به همین دلیل قادرند فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و پرواکسیدانی از خود بروز دهند (Croitoru *et al*., 2019). این ترکیبات از طریق خنثی سازی گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS)و مداخله در مسیرهای التهابی، نقش مهمی در کاهش خطر بیماری‌های مزمن از جمله سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و عصبی ایفا می‌کنند (Sanchez-Gonzalez *et al*., 2017). همچنین مطالعات گذشته نشان داده‌اند که ترکیبات فنولیک استخراج شده از ضایعات گیاهی می‌توانند جایگزین طبیعی مناسبی برای ترکیبات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی سنتزی در مواد غذایی باشند (Rahimipanah *et al*., 2010; Chashman *et a.l,* 2025; Ghasemi-Nezhad *et al*., 2025).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]

در میان بافت‌های مختلف گردو، پوسته‌ی مغز(pellicle)، لایه بیرونی نازک اطراف مغز، یک جزء بسیار ارزشمند اما کمتر مورد استفاده قرار گرفته است و با وجود اینکه تنها ۱۰ درصد از کل جرم مغز را تشکیل می‌دهد، تجمع زیادی از پلی‌فنول‌ها (به ویژه پروآنتوسیانیدین‌ها و تانن‌های متراکم) در آن مشاهده شده است. این پوسته نازک می‌تواند بر ویژگی‌های حسی گردو مانند تلخی یا گسی تأثیر بگذارد. همچنین، این بخش قادر است اثرات زیستی متنوعی از جمله مهار تکثیر سلولی، القای آپوپتوز و ممانعت از متاستاز را در مدل‌های آزمایشگاهی از خود نشان دهند (Sanchez-Gonzalez *et al*., 2017; Sheng *et al*., 2021). در سال‌های گذشته، با استفاده از تکنیک‌های توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا، امکان بررسی پروفایل بیان ژن‌ها در سطح رونوشت (RNA-Seq) در انواع گیاهان از جمله گردو به طور گسترده‌ای فراهم شده است، که به محققان این امکان را داده است تا بیان متفاوت ژن‌ها (DEGs) را بررسی کنند. به عنوان مثال، مطالعات قبلی نشان داده‌اند که چندین DEG با تغییر فاز گردو از جوانی به بلوغ مرتبط هستند (Hardman *et al*., 2019)، همچنین در دسترس بودن ژنوم مرجع با کیفیت بالا، امکان هم‌ترازی دقیق خوانش‌ها در گردو را فراهم آورده است (Ni *et al*., 2022). مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها از مسیر فنیل‌پروپانوئید (Phenylpropanoid pathway)آغاز شده و از طریق شاخه فلاونوئیدی به تولید ترکیباتی نظیر فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها (تانن‌ها) منتهی می‌شود (Wang *et al*. 2024). در این مسیر، مجموعه‌ای از ژن‌های کلیدی نقش تنظیمی و کاتالیتیکی اساسی ایفا می‌کنند. ژن PAL (Phenylalanine ammonia-lyase) نخستین آنزیم محدودکننده مسیر فنیل‌پروپانوئید بوده و با تبدیل فنیل‌آلانین به اسید سینامیک، آغازگر سنتز ترکیبات فنولی محسوب می‌شود. ژن‌های C4H (Cinnamate 4-hydroxylase) و CL4 (4-Coumarate-CoA ligase) مراحل اولیه این مسیر را تکمیل کرده و پیش‌سازهای لازم برای ورود به مسیر فلاونوئیدی را فراهم می‌کنند (Chouhan *et al*., 2017). در ادامه، ژن‌های CHS (Chalcone synthase) و CHI (Chalcone isomerase) آغازگر مسیر فلاونوئیدی بوده و نقش تعیین‌کننده‌ای در سنتز فلاونوئیدها دارند. ژن F3H (Flavanone 3-hydroxylase) در تولید دی‌هیدروفلاونول‌ها دخیل است و ژن DFR (Dihydroflavonol 4-reductase) یکی از آنزیم‌های کلیدی در هدایت متابولیت‌ها به سمت تولید آنتوسیانین‌ها و تانن‌ها به‌شمار می‌رود. در مراحل انتهایی مسیر، ژن‌های ANS (Anthocyanidin synthase)، LAR (Leucoanthocyanidin reductase) و ANR (Anthocyanidin reductase) نقش اساسی در تولید آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها ایفا می‌کنند که از مهم‌ترین پلی‌فنول‌های تجمع‌یافته در پوست نازک مغز گردو هستند (Sonam Chouhan *et al*., 2017; Mao *et al*., 2025).

با توجه به اهمیت این ژن‌ها در مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها و تغییرات دینامیک متابولیسم ثانویه در طول رشد میوه، هدف از این مطالعه بررسی الگوی بیان ژن‌های PAL، C4H، CL4، CHS، CHI، F3H، DFR، LAR، ANS و ANR در مراحل مختلف رشد گردو می‌باشد. تحلیل تغییرات سطح بیان این ژن‌ها در هر مرحله رشدی امکان شناسایی ژن‌های کلیدی و مراحل بحرانی سنتز پلی‌فنول‌ها را فراهم کرده و می‌تواند در درک بهتر سازوکارهای مولکولی مؤثر بر کیفیت تغذیه‌ای و بیوشیمیایی گردو نقش مهمی ایفا کند. این مطالعه گامی برای درک شبکه‌های تنظیمی ژن‌ها در مسیر سنتز ترکیبات فنولی در گردو است و می‌تواند به به‌نژادی ژنتیکی گردو برای بهبود طعم و ارزش دارویی آن کمک کند.

مواد و روش‌ها
Materials and Methods

دریافت و آماده‌سازی داده‌های RNA-Seq : به منظور بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها در مراحل مختلف رشد پوست نازک مغز گردو(*Juglans reg*ia L.) ، داده‌های ترنسکریپتومی RNA-Seq از پایگاه داده عمومی Gene Expression Omnibus (GEO) وابسته به NCBI دریافت شد. مجموعه داده انتخاب‌شده تحت شماره دسترسی GSE209790 ثبت شده است که شامل داده‌های بیان ژن مربوط به بافت kernel pellicle گردو در مراحل مختلف رشد می‌باشد. این مجموعه داده شامل چندین نمونه زیستی از مراحل مختلف رشد پوست نازک مغز گردو بوده که امکان بررسی تغییرات دینامیک بیان ژن‌ها در طول فرآیند رشد را فراهم می‌سازد. با توجه به هدف این مطالعه که تحلیل توصیفی الگوی بیان ژن‌های منتخب و مقایسه روند تغییرات بیان آن‌ها در مراحل مختلف رشد بود، از مقادیر نرمال‌شده FPKM

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]

ارائه‌شده در مجموعه داده GSE209790 استفاده شد. از آنجا که این پژوهش بر پایه داده‌های پردازش‌شده موجود در پایگاه GEO انجام شد، مراحل پیش‌پردازش شامل کنترل کیفیت(QC)، حذف خوانش‌های کم‌کیفیت و نرمال‌سازی مطابق مطالعه اصلی انجام شده بود و در این مطالعه مجدداً تکرار نشد (Jin et al., 2022) .

پس از دانلود فایل بیان ژن، داده‌ها در محیط نرم‌افزار R (نسخه ٤.٣.٢) بارگذاری شدند. در مرحله نخست، ستون‌های مربوط به مقادیر FPKM استخراج و یک ماتریس بیان ژنی تشکیل شد. سپس، بر اساس مطالعات پیشین، ده ژن کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتز تانن‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها انتخاب شدند و داده‌های بیان مربوط به این ژن‌ها از کل مجموعه استخراج گردید. به‌منظور کاهش واریانس و بهبود قابلیت مقایسه بین نمونه‌ها، داده‌های FPKM با استفاده از تبدیل log2(FPKM + 1) نرمال‌سازی شدند (Zhao *et al*,. 2021).

ترسیم نقشه حرارتی (Heatmap) و تحلیل الگوی بیان ژن‌ها: ابتدا ماتریس بیان ژن شامل ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها شامل PAL، C4H، CL٤، CHS، CHI، F3H، DFR، LAR، ANSو ANR در تمامی نمونه‌ها تشکیل شد. داده‌های بیان ژن از مجموعه داده RNA-seqمربوط به پوست نازک مغز گردو (*Juglans regia* L.) در مراحل مختلف رشد شامل هفته‌های هشتم، نهم، یازدهم، سیزدهم، پانزدهم و هفدهم پس از گل‌دهی استخراج شدند. پردازش و سازمان‌دهی داده‌ها در محیط نرم‌افزار R (نسخه ٤.٣.٢) انجام شد. برای برجسته‌سازی تغییرات نسبی بیان هر ژن در طول مراحل مختلف رشد و حذف اثر اختلاف مقیاس بین ژن‌ها، ماتریس بیان نرمال‌شده با استفاده از توابع پایه Rبه‌صورت استانداردسازی سطری (row-wise scaling) پردازش شد، به‌طوری‌که مقادیر بیان هر ژن حول میانگین صفر و واریانس واحد مقیاس‌بندی شدند (Soneson & Delorenzi, 2013).

همبستگی (correlation) بین ژن‌ها و همچنین بین هفته‌های رشد: برای بررسی روابط بین ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها، هفته‌ای که بیشترین سطح بیان در اکثر ژن‌های مورد مطالعه مشاهده شد، به‌عنوان نماینده مرحله اوج فعالیت مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها شناسایی و انتخاب شد و تحلیل همبستگی در این مرحله انجام گرفت تا روابط هم‌بیانی ژن‌ها در شرایط بیشترین فعالیت زیستی مسیر ارزیابی شود. تحلیل همبستگی بر اساس داده‌های بیان تبدیل‌شده با log2(FPKM + 1) انجام شد. ماتریس همبستگی بین ژن‌ها در آن هفته با استفاده از آزمون Pearson محاسبه گردید. این تحلیل به منظور درک بهتر روابط تنظیمی بین ژن‌ها و نقش آن‌ها در مسیر تولید پلی‌فنول انجام شد. نتایج به صورت نقشه حرارتی (Heatmap) با استفاده از بسته pheatmap در R (نسخه ٤.٣.٢) ترسیم شد و برای مشاهده شبکه ژنی، شبکه Co-expressionبا بسته igraph ساخته شد؛ در این شبکه، ژن‌ها به صورت گره و همبستگی‌ها به صورت یال با رنگ و ضخامت متناسب با شدت همبستگی نمایش داده شدند (Soneson & Delorenzi, 2013 ; Khalil *et al*., 2024). علاوه بر این، برای مقایسه الگوی بیان ژن‌ها بین هفته‌های مختلف، ماتریس میانگین بیان ژن‌ها در هر هفته بر اساس مقادیر log2(FPKM + 1) تشکیل شد و همبستگی Pearson بین ستون‌ها (week-wise correlation)محاسبه گردید تا مشخص شود کدام هفته‌ها از نظر الگوی بیان ژن‌ها با یکدیگر همبستگی مشابه یا متضاد دارند. این تحلیل نیز به صورت Heatmap ترسیم شد تا مقایسه بصری و بررسی روند تغییرات بیان ژن‌ها بین مراحل مختلف رشد امکان‌پذیر باشد (Dai *et al*., 2007). لازم به ذکر است که استانداردسازی Z-score تنها برای ترسیم نقشه‌های حرارتی و نمایش الگوی نسبی بیان ژن‌ها به‌کار رفت و در محاسبه ضرایب همبستگی استفاده نشد.

آنالیز RT-qPCR: نمونه‌های گردو رقم چیتگر با چهار تکرار بیولوژیکی هر دو هفته یکبار از هفته هشتم تا نوزدهم پس از گل‌دهی در سال ١٤٠٣ جمع‌آوری شدند. پس از برداشت، پوست نازک هسته (kernel pellicle) جدا شد و نمونه‌ها سریعاً در نیتروژن مایع منجمد شده و در دمای ٨٠- درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA نگهداری شدند. کل RNA از نمونه‌ها با استفاده از محلول استخراج RNA (RNA X-Plus) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. پس از استخراجRNA، نمونه‌ها با استفاده از آنزیم DNaseI (شرکت *Thermo Scientific*) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تیمار شدند تا آلودگی احتمالی DNA ژنومی حذف شود. غلظت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد و خلوص RNA بر اساس نسبت جذب نوری A260/A280 ارزیابی گردید. همچنین، به‌منظور

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]

بررسی یکپارچگی RNA و اطمینان از کیفیت نمونه‌ها، الکتروفورز روی ژل آگارز 2%انجام شد. نمونه‌های RNA با کیفیت مناسب و فاقد تخریب قابل‌توجه برای مراحل بعدی سنتز cDNA و تحلیل بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند. سنتز cDNA از ۱ میکروگرم RNA با کیفیت بالا با استفاده از کیت FastKing RT (TIANGEN, Beijing) انجام شد. cDNA به‌عنوان الگو در واکنش qRT-PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. این واکنش با کیت SYBR Green (Amplicon, Denmark) و دستگاه Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Qiagen) انجام گردید. پرایمرهای مورد استفاده با نرم افزار oligo7 طراحی و توسط شرکت ژن فناوران سنتز شد (جدول۱). چرخه حرارتی شامل: پیش‌دمای اولیه (Initial Denaturation): 95°C به مدت ۳ دقیقه و چرخه‌های تکراری ۴۰ دور:(دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر: ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. فلورسانس SYBR Greenدر هر دور در مرحله بسط اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه، سه تکرار فنی اجرا شد. اختصاصیت محصولات PCR با نمودارذوب (Melt curve) بررسی شد تا از ایجاد محصولات غیر اختصاصی یا دیمر پرایمر جلوگیری شود. همچنین، بازدهی (Efficiency) پرایمرها پیش از اجرای qRT-PCR تعیین شد تا از صحت محاسبه بیان نسبی ژن‌ها اطمینان حاصل گردد. ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع داخلی انتخاب شد. انتخاب این ژن بر اساس گزارش‌های پیشین مبنی بر پایداری نسبی بیان آن در بافت‌های گیاهی و مراحل مختلف رشد انجام شد. همچنین، الگوی بیان GAPDH در نمونه‌های مورد بررسی ارزیابی شد و به‌عنوان ژن مناسب برای نرمال‌سازی داده‌های qRT-PCR استفاده گردید. سطوح بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$محاسبه شدند (Dorak. 2007; Schmittgen *et al*., 2008).

جدول ۱-توالی و اطلاعات پرایمرهای qRT-PCR استفاده شده در گردو

Table 1. Sequence and information of qRT-PCR primers used in walnut

Gene name	Gene ID	Full name	Forward primer (5'-3')	Reverse perimer (5'-3')
PAL	Jr5DG00165400	phenylalanine ammonia-lyase 2	ATGACCCATGTAGTGCCACA	ACTCTTGCACTCTCCACCTC
C4H	Jr7SG00052000	cinnamate 4-hydroxylase	AGTCAAGGAGAGGAGGTTGC	TTCACAAGTTCTGCAAGCCC
4CL	Jr7DG00117800	CoA ligase-like protein	TCATCGCCGCGTCTTTAATG	TTCTCCAGGTCGAACTTCCC
CHS	Jr1SG00082400	naringenin-chalcone synthase	AAGATCACCCACGTCGTCTT	TTGTTCTCAGCGAGGTCCTT
CHI	Jr1DG00284600	chalcone isomerase	GCGGATGAGTTGTCGGAATC	CTGAGTACTGGTGACCCGTT
F3H	Jr4DG00063100	flavanone 3-hydroxylase	CCCTTCAGGCAAGCTTTGTT	CAGGCCTCGACGATTTTCTG
DFR	Jr4DG00161700	dihydroflavonol reductase	GATGATGCTGCTCAGGTTCG	TGCCGTTGACATGCTTTTCA
LAR	Jr8SG00081600	leucoanthocyanidin reductase-like	TTTCCGCTGCCAACGATATG	GATGGCATCTTTGGAGCTGG
ANS	Jr6DG00150000	anthocyanidin synthase	GGACATAGACTCCCAGGACG	GCCATAGCCTTGAATCCTGC
ANR	Jr5DG00075400	anthocyanidin reductase	TACTCCTCTCACTCCGGACA	GCTCGGGAACACTGCTATTG
GAPDH	-	-	TGTTCGTCATGGGTGTGAAC	ATGGCATGGACTGTGGTCAT

آنالیز آماری: برای بررسی همبستگی بین ژن‌ها و همچنین بین مراحل مختلف رشد، ضریب همبستگی پیرسون محاسبه شد. به منظور تحلیل تغییرات بیان ژن‌ها بین نمونه‌ها و مراحل مختلف رشد، تست ANOVA یک‌طرفه استفاده گردید و تفاوت‌های معنی‌دار با $p\text{-value} < 0.05$ در نظر گرفته شدند. تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزارR (نسخه ۴.۳.۲) و GraphPad Prism10.4 انجام شد. نتایج در قالب نمودارهای هیستوگرام و نقشه‌های حرارتی (Heatmap) ارائه گردید تا روابط بیان ژن‌ها و الگوهای همبستگی بین ژن‌ها در مراحل مختلف رشد به وضوح نمایش داده شوند (Motulsky, 2003).

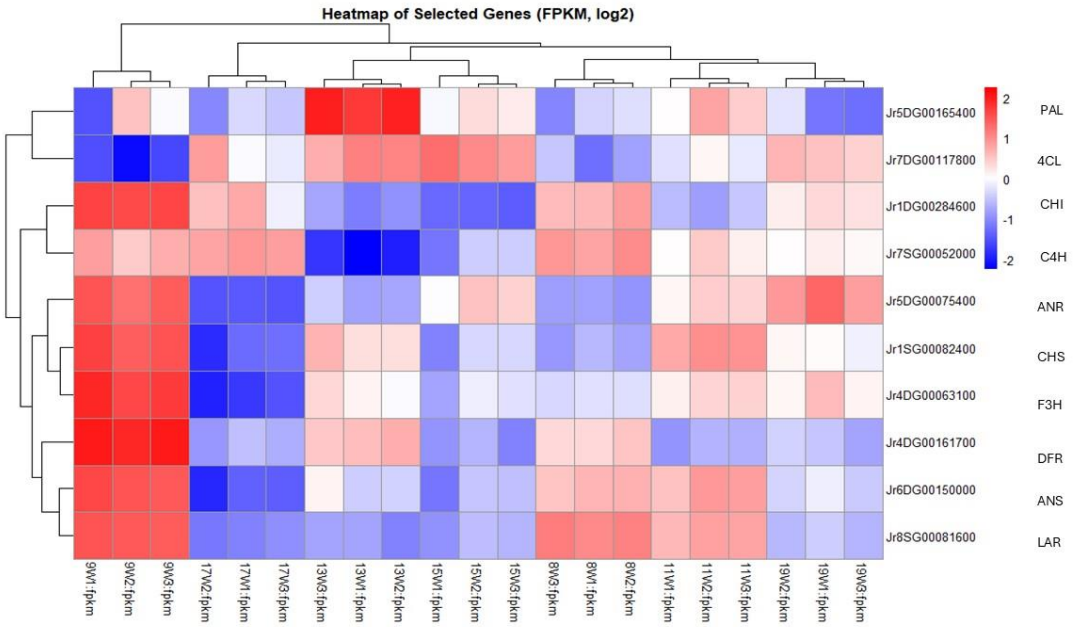
نتایج و بحث
Results and Discussion

افزایش الگو بیان ژن‌های کلیدی در هفته نهم

نقشه حرارتی (Heatmap) بررسی و مقایسه الگوی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز پلی‌فنول در پوست نازک هسته گردو نشان داد که هشت ژن از ده ژن مورد مطالعه شامل C4H، CHS، CHI، F3H، DFR، LAR، ANS و ANR در هفته نهم پس از گل‌دهی به‌طور معنی‌داری افزایش

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]

بیان داشته‌اند (شکل ۱). تنها دو ژن PAL و CL4 در این هفته افزایش معنی‌داری نشان ندادند. این یافته‌ها نشان‌دهنده افزایش فعالیت مسیر تولید پلی‌فنول در این مرحله رشدی و نقش برجسته اکثر ژن‌ها در شکل‌گیری و تجمع این ترکیبات فنولیک است. الگوهای بیان ژن‌ها در هفته‌های دیگر (۸، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۷ و ۱۹) نسبتاً پایین‌تر بود و افزایش بیان مشابه هفته نهم مشاهده نشد، که نشان‌دهنده تفاوت مرحله‌ای در فعالیت مسیر تولید پلی‌فنول است. این تغییرات مرحله‌ای و مقایسه‌ای در شکل یک نمایش داده شده است و برجسته‌ترین بیان ژن‌ها در هفته نهم قابل مشاهده است.



شکل ۱ – نقشه حرارتی ژن‌های انتخاب‌شده در پوست گردو در مراحل مختلف رشد.

Figure 1. Heatmap of selected genes in walnut shell at different growth stages.

*سطوح بیان ژن‌ها به صورت لگاریتم دو (log_2) مقادیر FPKM نمایش داده شده‌اند. خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی نمونه‌ها و ژن‌ها بر اساس شباهت بیان انجام شده است، که رنگ قرمز نشان‌دهنده بیان بالا و رنگ آبی نشان‌دهنده بیان پایین است.

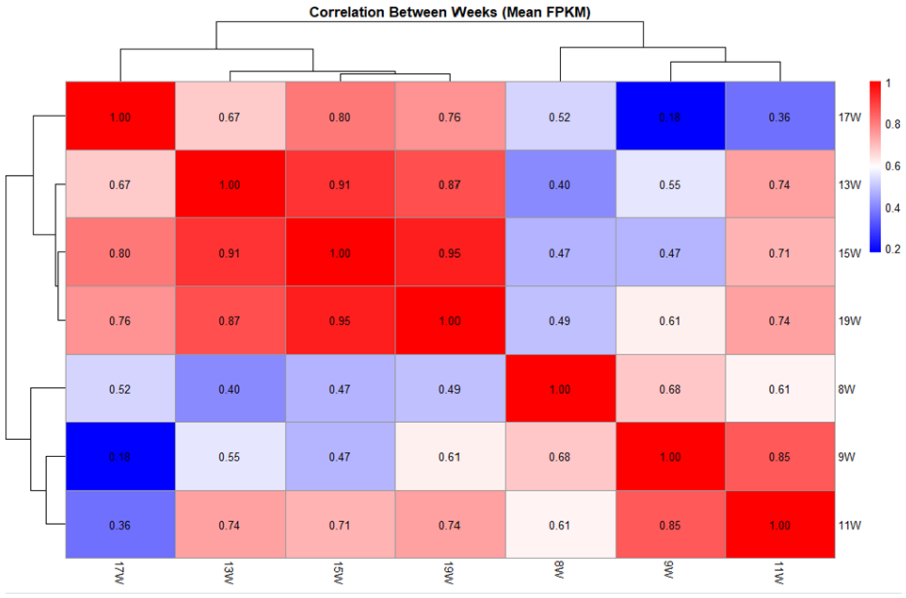
Gene expression levels are displayed as log_2 of FPKM values. Hierarchical clustering of samples and genes was performed based on expression similarity, with red indicating high expression and blue indicating low expression

مقایسه الگو بیان ژن‌ها در هفته‌ها

تحلیل نقشه حرارتی و همبستگی بیان ژن‌ها بین هفته‌های مختلف نشان داد که الگوی بیان و همبستگی بیانی ژن‌های مسیر تولید پلی‌فنول در هفته‌های نهم و یازدهم بیشترین شباهت را دارند ($r = 0.85$) و یک همبستگی مثبت قابل توجه بین آن‌ها مشاهده شد. در مقابل، هفته‌های سیزدهم، پانزدهم و نوزدهم نیز بیشترین همبستگی بیانی را با یکدیگر داشتند و الگوی بیان ژن‌ها در این هفته‌ها مشابه بود. همچنین، هفته نهم و هفته هفدهم بالاترین میزان همبستگی بیانی را نشان دادند، اما از نظر الگوی بیان ژن‌ها تفاوت قابل توجهی وجود داشت، به طوری که برخی ژن‌ها در هفته نهم افزایش بیان بیشتری نسبت به هفته هفدهم داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت ژن‌های مسیر تولید پلی‌فنول در طول مراحل رشد پوست گردو به صورت مرحله‌ای تغییر می‌کند و الگوی بیان و روابط همبستگی ژن‌ها بسته به هفته نمونه‌برداری متفاوت است (شکل ۲).

.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]



شکل ۲- همبستگی بین بیان ژن‌های مورد بررسی (FPKM) در پوسته نازک گردو در هفته‌های مختلف

Figure 2. Correlation between expression of studied genes (FPKM) in walnut thin shell in different weeks

11W هفته یازدهم، 9W هفته نهم، 8W هفته هشتم، 19W هفته نوزدهم، 15W هفته پانزدهم، 13W هفته سیزدهم و 17W هفته هفدهم

رنگ‌ها نشان‌دهنده شدت همبستگی هستند، به طوری که قرمز نشان‌دهنده همبستگی مثبت بالا و آبی نشان‌دهنده همبستگی مثبت پایین است. دندروگرام بالا و چپ گروه‌بندی نمونه‌ها بر اساس شباهت بیان ژن را نمایش می‌دهد.

Colours indicate the strength of the correlation, with red indicating high positive correlation and blue indicating low positive correlation. The dendrogram above and left shows the grouping of samples based on gene expression similarity

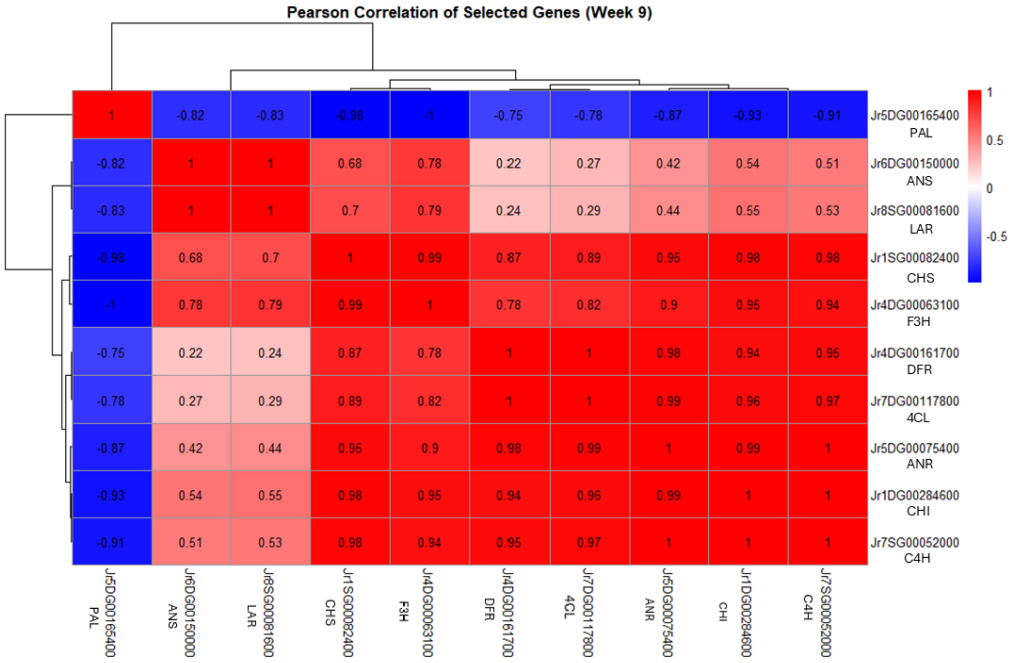
همبستگی بیان ژن‌ها در هفته نهم

نتایج نشان داد ژن‌های CHS (Jr1SG00082400)، F3H (Jr4DG00063100)، DFR (Jr4DG00161700)، CL4 (Jr7DG00117800)، ANR (Jr5DG00075400)، CHI (Jr1DG00284600) و C4H (Jr7SG00052000) همبستگی مثبت بسیار قوی با یکدیگر دارند (مقادیر همبستگی بین ۰/۸۷ تا ۱). همچنین ANS (Jr6DG00150000) و LAR (Jr8SG00081600) همبستگی مثبت بالایی با CHS، DFR و سایر ژن‌های مسیر دارند($r\approx0.7–0.79$) . از طرفی ژن PAL (Jr5DG00165400) بیشترین همبستگی منفی با سایر ژن‌ها را نشان می‌دهد، به ویژه با ژن‌های CHS، F3H، DFR، CL4، ANR و C4H که مقادیر همبستگی منفی نزدیک به ۰/۹- تا ۱- دارند (شکل ۳). این نشان می‌دهد که PALبرخلاف سایر ژن‌های مسیر تولید پلی‌فنول در هفته نهم، الگوی بیان متفاوتی دارد و افزایش یا کاهش آن با سایر ژن‌ها همزمان نیست. هفته نهم مرحله‌ای است که اکثر ژن‌های مسیر تولید پلی‌فنول به طور همزمان افزایش بیان داشته‌اند و همبستگی مثبت بالایی بین آن‌ها مشاهده شد، به جز PAL که روند مخالف دارد.

ژن‌های کلیدی و هاب ژن‌های مسیر

درجه هر ژن برابر اتصالات بین ژن‌هاست و معمولا ژن‌هایی که بیشترین اتصالات با بقیه ژن‌ها دارند می‌توانند بیشترین نقش را در شبکه داشته باشند و به عنوان ژن‌های کلیدی و هاب ژن در نظر گرفته شوند. ژن‌هایی مثل F3H و PAL بیشترین درجه را دارند (جدول ۲ و شکل ٤) (۹ اتصال). ژن PAL بیشترین همبستگی منفی را با سایر ژن‌ها، به ویژه با CHS، F3H، DFR، CL4، ANR و C4H دارد (شکل ٤). ژن‌هایی مثل ANS و LAR کمترین درجه (۳ اتصال) را دارا بوده و با ژن‌های مسیر مانند CHS و DFR همبستگی مثبت بالایی دارند ($r\approx0.7–0.79$).ژن‌هایی با درجه بالا به عنوان ژن‌های هاب (hub gene) شناخته می‌شوند. این ژن‌ها نقش مهمی در شبکه و احتمالا در مسیرهای زیستی مرتبط با آن دارند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]



شکل ۳– همبستگی پیرسون ژنهای مورد بررسی در پوسته نازک گردو در هفته نهم

Figure 3. Pearson correlation of genes studied in walnut thin shell in the ninth week

رنگ‌ها نشان‌دهنده شدت و جهت همبستگی هستند؛ قرمز بیانگر همبستگی مثبت و آبی بیانگر همبستگی منفی است. اعداد داخل خانه‌ها مقدار ضریب همبستگی را نشان می‌دهند.

The colours indicate the strength and direction of the correlation; red indicates positive correlation and blue indicates negative correlation. .The numbers inside the boxes indicate the value of the correlation coefficient

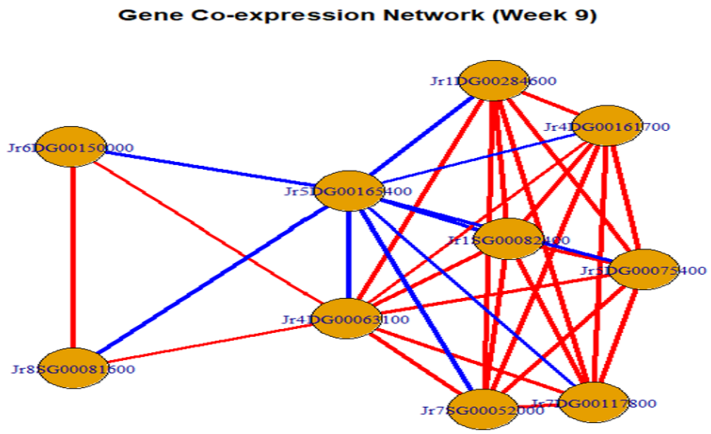
جدول ۲– نتایج آنالیز شبکه هم بیانی ژن‌ها، تعداد ارتباطات (degree) و وزن یال‌ها(weight / correlation)

Table 2. Results of gene co-expression network analysis, number of connections (degree) and edge weight (weight / correlation)

Gene name	Degree	Weight (Edge)
Jr1DG00284600	7	0.9831128
Jr1SG00082400	7	0.9468388
Jr4DG00063100	9	0.9423786
Jr4DG00161700	7	0.9919103
Jr5DG00075400	7	-0.9256279
Jr5DG00165400	9	0.9582607
Jr6DG00150000	3	0.9995575
Jr7DG00117800	7	0.9897222
Jr7SG00052000	7	0.8652419
Jr8SG00081600	3	0.9519295

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]



شکل ٤-شبکه هم بیانی ژنهای مورد بررسی در پوسته نازک گردو در هفته نهم*

Figure 4. Co-expression network of studied genes in walnut thin shell in the ninth week

*درجه هر ژن نشان‌دهنده تعداد اتصالات آن در شبکه است و ژن‌هایی با درجه بالا (مانند Jr4DG00063100 و Jr5DG00165400) به‌عنوان ژن‌های هاب شناخته می‌شوند. وزن یال‌ها نشان‌دهنده میزان همبستگی بین ژن‌ها است؛ مقادیر مثبت نشان‌دهنده همبستگی مستقیم و مقادیر منفی همبستگی معکوس هستند.

The degree of each gene indicates the number of connections it has in the network, and genes with high degrees (such as Jr4DG00063100 and Jr5DG00165400) are known as hub genes. The weights of the edges indicate the degree of correlation between genes; positive values indicate direct correlation and negative values indicate inverse correlation.

بررسی بیان ژن‌های مورد بررسی با استفاده از Real Time PCR

تغییرات بیان ژن‌های مسیر فلاونوئید شامل CHS (Jr1SG00082400)، CHI (Jr1DG00284600)، F3H (Jr4DG00063100)، DFR (Jr4DG00161700)، CL4 (Jr7DG00117800)، ANR (Jr5DG00075400)، C4H (Jr7SG00052000)، ANS (Jr6DG00150000)، LAR (Jr8SG00081600) و ژن تنظیم کننده PAL (Jr5DG00165400) در طول هفته‌های پایش شده بررسی شد (شکل ۵). نتایج نشان داد که هفته نهم نقش محوری داشته و لذا با سایر هفته‌ها مقایسه شد. ژن CL4 در هفته نهم نسبت به هفته‌های یازدهم و پانزدهم افزایش بیان معنی‌داری داشت، در حالی که ژن PAL در هفته‌های یازدهم و سیزدهم نسبت به هفته نهم افزایش بیان معنی‌داری نشان داد. ژن F3H به طور معنی‌داری در هفته نهم بیشترین میزان بیان را نسبت به سایر هفته‌ها داشت. ژن CHS در هفته‌های پانزدهم و هفدهم نسبت به هفته نهم کاهش بیان معنی داری نشان داد، در حالی که ژن CHI تغییرات بیان نسبتاً بالایی در طول تمام هفته‌ها داشت اما در هفته‌های یازدهم، پانزدهم، هفدهم و نوزدهم نسبت به سایر هفته‌ها مقدار بیان کمی پایین تر مشاهده شد. ژن‌های LAR، ANS، ANR و DFR در هفته نهم به طور معنی‌داری بالاترین میزان بیان را نسبت به سایر هفته‌ها نشان دادند. به طور کلی، نتایج بیان ژن‌ها نشان دهنده هماهنگی بیان ژن‌های مسیر فلاونوئید و اهمیت هفته نهم در افزایش بیان اکثر ژن‌ها است، در حالی که برخی ژن‌ها مانند PAL و CHS کاهش بیان را در هفته‌های بعد نشان دادند. نتایج مربوط به تغییرات بیان ژن‌ها و نمودارهای مربوط به تغییرات بیان و روند هماهنگی و اختلافات بین هفته‌ها را در جدول ۲ و شکل۵ نشان داده شده است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]

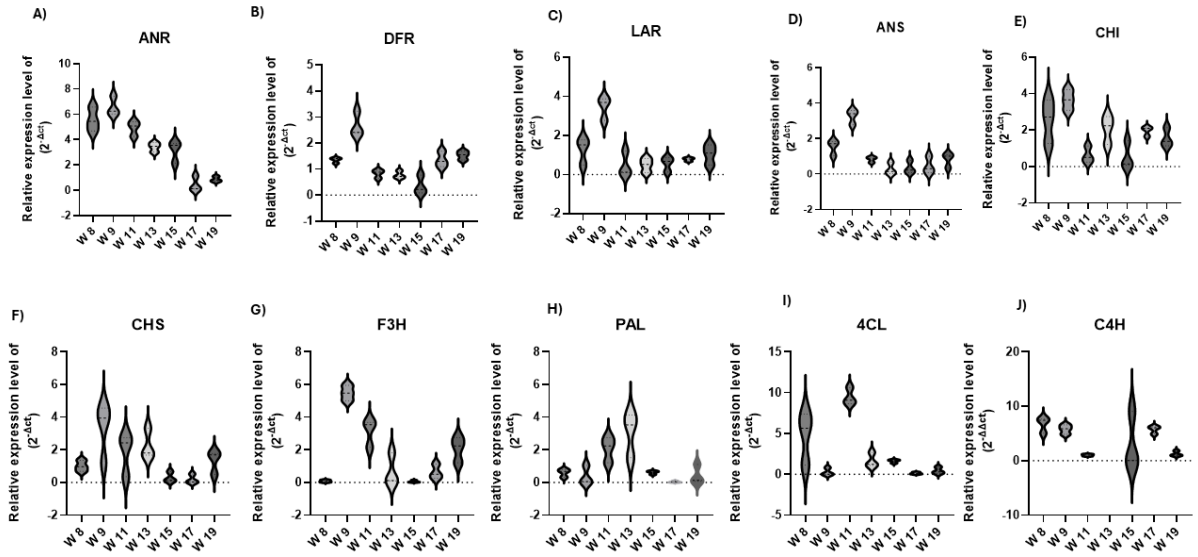
جدول۳-آنالیز آماری ژنهای مورد بررسی در پوسته نازک گردو و نتایج Real Time PCR

Table 3. Statistical analysis of genes studied in walnut thin shell and Real Time PCR results

Gene	Comparison	Mean Diff	95% CI	Significance	Adjusted P Value
ANR	W9 vs W8	1.006	-0.5773 to 2.588	ns	0.3068
	W9 vs W11	1.657	0.07446 to 3.240	*	0.0387
	W9 vs W13	3.16	1.577 to 4.743	***	0.0002
	W9 vs W15	3.447	1.864 to 5.030	****	<0.0001
	W9 vs W17	6.122	4.540 to 7.705	****	<0.0001
	W9 vs W19	5.715	4.132 to 7.298	****	<0.0001
DFR	W9 vs W8	1.333	0.6766 to 1.990	***	0.0002
	W9 vs W11	1.853	1.196 to 2.509	****	<0.0001
	W9 vs W13	1.906	1.249 to 2.562	****	<0.0001
	W9 vs W15	2.32	1.663 to 2.977	****	<0.0001
	W9 vs W17	1.318	0.6612 to 1.975	***	0.0002
	W9 vs W19	1.149	0.4927 to 1.806	***	0.0008
LAR	W9 vs W8	2.187	0.9900 to 3.384	***	0.0006
	W9 vs W11	2.971	1.774 to 4.168	****	<0.0001
	W9 vs W13	2.966	1.769 to 4.163	****	<0.0001
	W9 vs W15	2.893	1.696 to 4.090	****	<0.0001
	W9 vs W17	2.67	1.474 to 3.867	****	<0.0001
	W9 vs W19	2.412	1.215 to 3.609	***	0.0002
ANS	W9 vs W8	1.733	0.8160 to 2.650	***	0.0004
	W9 vs W11	2.427	1.510 to 3.344	****	<0.0001
	W9 vs W13	2.98	2.063 to 3.898	****	<0.0001
	W9 vs W15	2.895	1.978 to 3.812	****	<0.0001
	W9 vs W17	2.793	1.876 to 3.710	****	<0.0001
	W9 vs W19	2.438	1.521 to 3.355	****	<0.0001
CHI	W9 vs W8	1.115	-0.5613 to 2.791	ns	0.2689
	W9 vs W11	3.03	1.354 to 4.706	***	0.0006
	W9 vs W13	1.594	-0.08205 to 3.270	ns	0.065
	W9 vs W15	3.111	1.435 to 4.787	***	0.0005
	W9 vs W17	1.7	0.02337 to 3.376	*	0.0464
	W9 vs W19	2.109	0.4324 to 3.785	*	0.0121
CHS	W9 vs W8	2.435	0.2967 to 4.573	*	0.0228
	W9 vs W11	1.6	-0.5377 to 3.738	ns	0.189
	W9 vs W13	1.175	-0.9629 to 3.313	ns	0.4555
	W9 vs W15	3.141	1.003 to 5.279	**	0.0034
	W9 vs W17	3.247	1.109 to 5.385	**	0.0026
	W9 vs W19	2.12	-0.01852 to 4.258	ns	0.0525
F3H	W9 vs W8	5.398	3.907 to 6.889	****	<0.0001
	W9 vs W11	2.351	0.8602 to 3.842	**	0.0021
	W9 vs W13	4.797	3.306 to 6.288	****	<0.0001
	W9 vs W15	5.421	3.930 to 6.912	****	<0.0001
	W9 vs W17	4.85	3.359 to 6.341	****	<0.0001
	W9 vs W19	3.414	1.924 to 4.905	****	<0.0001
PAL	W9 vs W8	-0.2202	-1.835 to 1.395	ns	0.9969
	W9 vs W11	-1.687	-3.303 to -0.07204	*	0.0393
	W9 vs W13	-2.682	-4.297 to -1.067	**	0.0013
	W9 vs W15	-0.2354	-1.851 to 1.380	ns	0.9956
	W9 vs W17	0.3427	-1.273 to 1.958	ns	0.972
	W9 vs W19	-0.05476	-1.670 to 1.561	ns	>0.9999
4CL	W9 vs W8	-4.449	-7.652 to -1.247	**	0.0058
	W9 vs W11	-9.191	-12.39 to -5.988	****	<0.0001
	W9 vs W13	-1.386	-4.589 to 1.817	ns	0.6523
	W9 vs W15	-1.335	-4.538 to 1.868	ns	0.683
	W9 vs W17	0.1539	-3.049 to 3.357	ns	>0.9999
	W9 vs W19	-0.1534	-3.356 to 3.049	ns	>0.9999
C4H	W9 vs W8	-0.946	-5.937 to 4.045	ns	0.9835
	W9 vs W11	4.743	-0.2480 to 9.735	ns	0.0652
	W9 vs W13	5.763	0.7719 to 10.75	*	0.0214
	W9 vs W15	2.733	-2.259 to 7.724	ns	0.4398
	W9 vs W17	0.04121	-4.950 to 5.033	ns	>0.9999
	W9 vs W19	4.5	-0.4912 to 9.491	ns	0.0844

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]



شکل ۵- نمودارهای مربوط به تغییرات بیان ژنهای مورد بررسی در پوسته نازک گردو

Figure 5. Graphs related to changes in the expression of the studied genes in walnut thin shell

در مطالعات پیشین، پوست نازک هسته گردو (pellicle) به‌عنوان یکی از غنی‌ترین بافت‌ها از نظر ترکیبات پلی‌فنولی، به‌ویژه فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین‌ها (تانن‌ها) معرفی شده است و نقش مهمی در ارزش تغذیه‌ای، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و طعم گردو ایفا می‌کند (Jahanban-Esfahlan *et al*. 2019; Wu *et al*. 2023). پژوهش‌های مبتنی بر متابولومیکس و RNA-seq نشان داده‌اند که تجمع پلی‌فنول‌ها در طی نمو میوه گردو یک فرایند مرحله‌ای و وابسته به تنظیم ژنی است که عمدتاً توسط مسیر فنیل‌پروپانوئید–فلاونوئید کنترل می‌شود (Huang *et al*. 2022; Wang *et al*. 2022). در این مسیر، ژن‌های بالادستی مانند PAL، C4H و CL4 مسئول تأمین پیش‌ماده‌ها بوده و ژن‌های پایین‌دستی شامل CHS، CHI، F3H، DFR، ANS، ANR و LAR نقش کلیدی در تولید فلاونوئیدها و ترکیبات نهایی تانینی دارند (Mao *et al*. 2025; Nagar *et al*. 2022). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ژن‌هایی مانند ANR، LAR و DFR ارتباط مستقیمی با میزان تجمع پروآنتوسیانیدین‌ها در گردو دارند، اما اغلب این مطالعات به بررسی الگوی کلی بیان ژن‌ها بسنده کرده و همبستگی بیان ژن‌ها در مراحل رشدی مشخص یا شناسایی ژن‌های هاب شبکه هم‌بیانی را به‌صورت دقیق گزارش نکرده‌اند. همچنین نقش ژن‌های تنظیمی اولیه مانند PAL بیشتر به‌عنوان تأمین‌کننده شار متابولیکی مسیر مطرح شده و کمتر به عملکرد بازخوردی یا تنظیم مخالف آن در مراحل خاص رشد توجه شده است. بنابراین، درک شبکه هم‌بیانی و شناسایی ژن‌های هاب در مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها می‌تواند دیدگاه عمیق‌تری نسبت به مکانیسم‌های مولکولی کنترل کیفیت فنولیک گردو فراهم کند و اهداف جدیدی را برای اصلاح ژنتیکی و بهبود ارزش تغذیه‌ای این محصول معرفی نماید. در مطالعه ما تحلیل بیان ژن‌ها و شبکه همبستگی در مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها در پوست گردو نشان داد که هفته نهم پس از گل‌دهی نقش محوری در فعال شدن این مسیر دارد. نتایج نقشه همبستگی و تحلیل شبکه بیان ژنی امکان تبیین الگوی مشاهده شده را به خوبی فراهم می‌کند.

برخلاف مطالعات قبلی که صرفاً بیان ژن‌ها را در کل دوره توسعه بررسی کرده و به مقایسه مرحله‌ای بین هفته‌ها و همبستگی بیان ژن‌ها اشاره‌ای نداشتند، یافته‌های ما نشان دادند که هفته نهم نقطه اوج همبستگی و هماهنگی ژن‌های پایین‌دستی مسیر پلی‌فنول است. ژن‌های PAL، C4H و CL4 که در ابتدای مسیر فنیل‌پروپانوئید قرار دارند و پیش‌ماده‌های اولیه مسیر مانند Cinnamic acid و p-Coumaric acid را تولید می‌کنند، الگوی بیان متفاوتی نسبت به ژن‌های پایین‌دستی مسیر نشان دادند. به‌ویژه، PAL همبستگی منفی با اکثر ژن‌های پایین‌دستی مسیر داشت، در حالی که C4H و CL4 همبستگی نسبی پایین‌تری با ژن‌های انتهایی مسیر نشان دادند. این الگو می‌تواند ناشی از تنظیم مرحله‌ای

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]

مسیر باشد؛ به‌طوری که PAL در آغاز مسیر فعالیت دارد، اما در هفته نهم بیشتر ژن‌های پایین‌دستی مسیر مانندCHS ، CHI، F3H، DFR، ANS و ANR فعال شده‌اند و بنابراین همبستگی منفی با PAL مشاهده شد.

ژن‌های CHS و CHI برای تبدیل Coumaroyl CoA4-به‌Naringenin، فلاونوئید اولیه مسیر، ضروری هستند و در هفته نهم همبستگی مثبت بالایی با ژن‌های پایین‌دستی مسیر (F3H، DFR، ANS، ANR) نشان دادند. این یافته بیانگر فعالیت همزمان مراحل میانی و پایین‌دستی مسیر و تولید هماهنگ پلی‌فنول‌ها است. ژن‌های میانی و پایین‌دستی مسیر شاملF3H، DFR، ANS، ANR و LAR در تولید دی‌هیدروفلاوونول‌ها، لوکوآنتوسیانیدین‌ها، آنتوسیانیدین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها نقش دارند. همبستگی مثبت بسیار بالا بین این ژن‌ها ($r\approx0.87$–1) نشان داد که در هفته نهم اکثر ژن‌های تولیدکننده پلی‌فنول به‌طور همزمان فعال بوده و مسیر به صورت هماهنگ و یکپارچه عمل می‌کند. ژن‌های نهایی مسیر، ANS و ANR ، که در مرحله تولید پروآنتوسیانیدین‌ها نقش دارند، نیز همبستگی مثبت قوی با DFR و سایر ژن‌های پایین‌دستی داشتند و نشان‌دهنده فعال شدن همزمان مراحل میانی و نهایی مسیر است.به طور کلی، هفته نهم به عنوان نقطه اوج همبستگی مثبت ژن‌های پایین‌دستی مسیر پلی‌فنول شناخته شد، در حالی که ژن‌های ابتدایی مسیر، به ویژهPAL، الگوی متفاوتی داشتند که نشان‌دهنده تنظیم مرحله‌ای است. این الگو همسو با افزایش بیان پلی‌فنول‌ها در هفته نهم و اهمیت هماهنگی ژن‌ها در تولید آنتوسیانیدین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها است.

بر اساس تحلیل شبکه ژنی، ژن‌هایCHS، F3H، DFR، CL4، ANR، CHI و C4H به عنوان ژن‌های هاب مثبت مسیر شناسایی شدند. این ژن‌ها به دلیل داشتن بیشترین اتصالات با سایر ژن‌ها، احتمالاً نقش کلیدی در کنترل جریان متابولیک مسیر و تولید پلی‌فنول‌ها دارند. ژن‌های ANSو LAR به عنوان ژن‌های همراه مسیر (co-expressed genes) با همبستگی متوسط تا بالا عمل کردند، در حالی که PAL با همبستگی منفی، به عنوان ژن تنظیمی مخالف و با احتمال دخالت در کنترل سرعت جریان مسیر مشخص شد.

نتایج RT-qPCR برای ژن‌های کلیدی مسیر(PAL، C4H، CL4، CHI، CHS، F3H، DFR، ANS، ANR و LAR) این یافته‌ها را تایید کرد. در این آزمایش، اکثر ژن‌ها در هفته نهم افزایش بیان معنی‌دار نشان دادند و نتایج با داده‌های بیوانفورماتیک تحقیق حاضر همسو بود، که نشان می‌دهد ژن‌های هاب مسیر به صورت همزمان فعال هستند و نقش مرکزی در مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها دارند. لازم به ذکر است که سایر ژن‌های مسیر که در RNA-seq شناسایی شدند، در RT-qPCR مطالعات گذشته آزمایش نشده بود ولی در مطالعه ما، الگوی هماهنگی و همبستگی بیان ژن‌ها در داده‌های RNA-seq و-RT qPCR به خوبی ژن‌های کلیدی و هاب مسیر را مشخص کرده و عملکرد تنظیمی آنها را تایید می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها در پوست گردو تحت کنترل پیچیده‌ای از هماهنگی و بازخورد بین ژن‌های کلیدی و پایین‌دستی قرار دارد و ژن‌های هاب مسیر نقش مهمی در همزمانی فعالیت مراحل میانی و نهایی مسیر ایفا می‌کنند. این الگو همچنین نشان‌دهنده اهمیت هفته نهم در فعالیت همزمان و تجمع پلی‌فنول‌ها است و اطلاعات ارزشمندی درباره مکانیسم‌های تنظیم مرحله‌ای مسیر فلاونوئید و نقش ژن‌های کلیدی در تولید ترکیبات فنولیک فراهم می‌کند.

نتیجه گیری کلی: برای اولین بار مشخص شد که هفته نهم نقطه اوج فعالیت و همبستگی مثبت ژن‌های پایین‌دستی مسیر بیوسنتز پلی‌فنول در پوست نازک هسته گردو است. در این هفته، ژن‌های CHS، CHI، F3H، DFR، ANR، C4H و CL_4 به عنوان هاب مثبت مسیر شناسایی شدند، در حالی که ژن PAL نقش تنظیمی مخالف دارد. نتایج RT-qPCR افزایش بیان این ژن‌ها در هفته نهم را تایید کرده و با تحلیل شبکه ژنی و داده‌های بیوانفورماتیک کاملاً مطابقت دارد. با توجه به اینکه ژن‌های هاب مسیر به صورت همزمان فعال هستند و نقش مرکزی در مسیر بیوسنتز پلی‌فنول‌ها دارند، اطلاعات ارزشمندی درباره سازوکار تنظیمی مسیر پلی‌فنول و نقش ژن‌های هاب در تولید فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین‌ها ارائه می‌کنند و پایه‌ای برای دستکاری ژنتیکی این ژن‌ها جهت افزایش ترکیبات فنولیک در هفته نهم خواهند بود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]

References

منابع

Chashman, S., Sanghvi, G., Menon, S.V., Rasheed, M., Kashyap, A., Devi, A., et al. (2025). Nutritional composition, phytochemical profile, health benefits and food applications of walnuts (*Juglans regia* L.). European Food Research and Technology, 251(12), 4149-4163. https://doi.org/10.1007/s00217-025-04909-5

Chouhan, S., Sharma, K., Zha, J., Guleria, S., & Koffas, M.A. (2017). Recent advances in the recombinant biosynthesis of polyphenols. Frontiers in Microbiology, 8, 2259. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02259

Croitoru, A., Ficai, D., Craciun, L., Ficai, A., & Andronescu, E. (2019). Evaluation and Exploitation of Bioactive Compounds of Walnut, Juglans regia. Curr Pharm Des, 25(2), 119-131. https://doi.org/10.2174/1381612825666190329150825

Dai, Y., Sun, X., Wang, C., Li, F., Zhang, S., Zhang, H., et al. (2021). Gene co-expression network analysis reveals key pathways and hub genes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) during vernalization. BMC Genomics, 22(1), 236. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07510-8

Dorak, M.T. (2007). Real-time PCR. Garland Science. Taylor & Francis Group, https://doi.org/10.4324/9780203967317

Ebrahimi, S., Jamei, R., Nojoomi, F., & Zamanian, Z. (2017). Persian Walnut Composition and its Importance in Human Health. International Journal of Enteric Pathogens, 6(1), 3-9. https://doi.org/10.15171/ijep.2018.02

Ghasemi-Nezhad, L., Goli, S.A.H., & Soleimanian-Zad, S. (2025). Improving phenolics extractability from pomegranate seed meal applying roasting and cold plasma pretreatment; their application in mayonnaise as antioxidant and antimicrobial agents. Applied Food Research, *5*(1), 101050. https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101050

Hardman, W.E., Primerano, D.A., Legenza, M.T., Morgan, J., Fan, J., & Denvir, J. (2019). Dietary walnut altered gene expressions related to tumor growth, survival, and metastasis in breast cancer patients: A pilot clinical trial. Nutrition Research, 66, 82-94. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.03.004

Huang, R., Zhou, Y., Jin, F., Zhang, J., Ji, F., Bai, Y., et al. (2022). Metabolome and transcriptome profiling unveil the mechanisms of polyphenol synthesis in the developing endopleura of walnut (*Juglans regia* L.). International Journal of Molecular Sciences, 23(12), 6623. https://doi.org/10.3390/ijms23126623

Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Tabibiazar, M., Amarowicz, R. (2019). A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) fruit and tree. Molecules, 24(11), 2133. https://doi.org/10.3390/molecules24112133

Jin, Q., Gao, S., Mo, R., Sheng, F., Zhang, Q., Wu, C., et al. (2022). A preliminary study for identifying genes associated with pellicle development in Xinjiang walnut (Juglans regia L.). Horticulture, 8(9), 784. https://doi.org/10.3390/horticulturae8090784

Khalil, N.Z., Kong, N., & Fricke, H. (2024). The influence of GNP on the mechanical and thermomechanical properties of epoxy adhesive: Pearson correlation matrix and heatmap application in data interpretation. Polymer Composites, 45(10), 8997-9018. https://doi.org/10.1002/pc.28390

Mao, Y., Luo, J., & Cai, Z. (2025). Biosynthesis and Regulatory Mechanisms of Plant Flavonoids: A Review. Plants, 14(12), 1847. https://doi.org/10.3390/plants14121847

Motulsky, H. (2003). Prism 4 statistics guide—statistical analyses for laboratory and clinical researchers. GraphPad Software Inc, San Diego, CA, 122-126.

Nagar, S., Dey, S., Das, A., & Basu, S. (2023). Flavonoids: Recent Advances and Applications in Crop Breeding. In Flavonoid Metabolism - Recent Advances and Applications in Crop Breeding. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.107565

Ni, Z.-J., Zhang, Y.-G., Chen, S.-X., Thakur, K., Wang, S., Zhang, J.-G., et al. (2022). Exploration of walnut components and their association with health effects. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 62(19), 5113-5129. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1881439

Rahimipanah, M., Hamedi, M., & Mirzapour, M. (2011). Analysis of some factors affecting the phenolic compounds extracted from green husk of walnut (Juglans regia L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27 (3), 419-430. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2011.6383 [in Persian].

Sanchez-Gonzalez, C., Ciudad, C.J., Noe, V., Izquierdo-Pulido, M. (2017). Health benefits of walnut polyphenols: An exploration beyond their lipid profile. Crit Rev Food Sciences Nutrition, *57*(16), 3373-3383. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126218

Soneson, C., & Delorenzi, M. A (2013). Comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. BMC Bioinformatics, 9, 14:91. https://doi.org/ 10.1186/1471-2105-14-91.

Schmittgen, T.D., & Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, 3(6), 1101-1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]

Sheng, F., Hu, B., Jin, Q., Wang, J., Wu, C., & Luo, Z. (2021). The Analysis of Phenolic Compounds in Walnut Husk and Pellicle by UPLC-Q-Orbitrap HRMS and HPLC. Molecules, 26(10), 3013. https://doi.org/10.3390/molecules26103013

Wang, P., Zhong, L., Yang, H., Hou, X., Wu, C., Zhang, R., et al. (2022). Systematic transcriptomic and metabolomic analysis of walnut (*Juglans regia* L.) fruit to trace variations in antioxidant activity during ripening. Scientia Horticulturae, 295, 110849. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110849

Wang, Y., Jiang, W., Li, C., Wang, Z., Lu, C., Cheng, J., et al. (2024). Integrated transcriptomic and metabolomic analyses elucidate the mechanism of flavonoid biosynthesis in the regulation of mulberry seed germination under salt stress. BMC Plant Biology, 24(1), 132. https://doi.org/10.1186/s12870-024-04804-3

Wu, S., Mo, R., Wang, R., Li, Q., Shen, D., & Liu, Y. (2023). Identification of key antioxidants of free, esterified, and bound phenolics in walnut kernel and skin. Foods, 12(4), 825. https://doi.org/10.3390/foods12040825

Zhao, Y., Li, M.-C., Konaté, M.M., Chen, L., Das, B., Karlovich, C., et al. (2021). TPM, FPKM, or normalized counts? A comparative study of quantification measures for the analysis of RNA-seq data from the NCI patient-derived models' repository. Journal of Translational Medicine, 19(1), 269. https://doi.org/10.1186/s12967-021-02936-w

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.6]