

Comprehensive Identification of Candidate Genes and Regulatory Transcription Factors Governing Sesquiterpene Lactone Biosynthesis in Sunflower via Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)

Saadat Mohammadnejad¹, Mohammad Majdi^{2*}, Ghader Mirzaghaderi³, Asad Maroufi⁴

1. Ph.D. Student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran.

2. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran.

3. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran.

4. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Kurdistan University, Sanandaj, Iran.

Correspondence:

Mohammad Majdi

Email: majdi60@gmail.com

Received: 8, Sep. 2025

Accepted: 17, Nov. 2025

How to cite:

Mohammadnejad, S., Majdi, M., Mirzaghaderi, Gh., & Maroufi, A. (2025). Comprehensive Identification of Candidate Genes and Regulatory Transcription Factors Governing Sesquiterpene Lactone Biosynthesis in Sunflower via Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA). *Crop Biotechnology*, 15 (1), 46-61.

(DOI: [10.30473/cb.2025.75726.2016](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75726.2016))

ABSTRACT

Sesquiterpene lactones (STLs) are a group of bioactive secondary metabolites synthesized in the sunflower mevalonate pathway through the action of key upstream enzymes, including *HaGAS1/2*, *HaGAO1/2*, *HaCOS*, and *HaG8H*. These compounds, such as dehydrocostuslactone, 8-epixanthatin, and tomentosin, play important biological roles, yet the precise genes involved in their biosynthesis remain incompletely characterized. In this study, transcriptomic data under treatments with ethylene, salicylic acid, methyl jasmonate, and polyethylene glycol were analyzed, and several candidate genes were identified using gene co-expression network analysis, including putative costunolide synthases (LOC110928784, LOC110928786) and genes involved in DBR2-like reduction reactions (LOC110893694, LOC110886996). Promoter analysis of key pathway genes revealed gene-specific distributions of cis-regulatory motifs, including W-box, G-box, GCC-box, bZIP, and CBF2/RAA. Several candidate genes encoding bZIP (XP_022029119 and XP_022023437) and ERF (XP_021969365, XP_022017763, and XP_022002255) transcription factors were also identified as potential regulators of key pathway genes. Gene expression analysis by qPCR in six selected genes showed that upstream genes (*HaGAS1*, *HaGAO1*, *HaG8H*, *HaCOS*) were predominantly expressed in leaves and glandular trichomes. In contrast, downstream genes (LOC110928784, LOC110893694) exhibited preferential expression in roots, indicating spatial partitioning of STL biosynthesis in sunflower. Overall, these findings reveal new components of the STL biosynthetic pathway and its regulatory factors, providing valuable targets for metabolic engineering and novel biocontrol strategies in sunflower.

KEYWORDS

Sesquiterpene Lactone, Sunflower, Transcriptome, Weighted Gene Co-Expression Network Analysis



«مقاله پژوهشی»

شناسایی ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی دخیل در بیوستتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی وزندارژن‌ها

سعادت محمدنژاد^۱، محمد مجدی^۲ , قادر میرزاقادری^۳، اسعد معروفی^۴

چکیده

سزکویی‌ترین لاکتون‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه زیست‌فعال هستند که در مسیر موالونات آفتابگردان با دخالت آنزیم‌های بالادستی کلیدی شامل *HaGAS1/2*، *HaGAO1/2*، *HaCOS* و *HaG8H* سنتز می‌شوند. این ترکیبات، مانند دهیدروکاستوس لاکتون، ۸-اپیزانتاتین و تومتوسین، نقش‌های زیستی مهمی دارند، اما ژن‌های دقیق دخیل در بیوستتز آن‌ها به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند. در این مطالعه، داده‌های ترنسکریپتومی تحت تیمارهای اتیلن، سالیسیلیک‌اسید، متیل‌جاسمونات و پلی‌اتیلن‌گلیکول تحلیل شد و با استفاده از شبکه هم‌بیانی ژن‌ها چندین ژن کاندید شناسایی گردید، از جمله سنتتازهای احتمالی کاستونولید (*LOC110928784*، *LOC110928786*) و ژن‌های دخیل در واکنش‌های کاهش مشابه *DBR2* (*LOC110893694*). تحلیل پروموتور ژن‌های کلیدی مسیر نشان داد موتیف‌های سیس‌تنظیمی اختصاصی شامل *G-box*، *W-box*، *GCC-box*، *bZIP* و *CBF2/RAA* در ژن‌ها توزیع ژن اختصاصی دارند. همچنین چندین ژن کاندید مربوط به فاکتورهای رونویسی *ERF* و *bZIP* به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های احتمالی ژن‌های کلیدی مسیر شناسایی شدند. بیان ژن‌ها با روش *qPCR* در شش ژن منتخب بررسی شد و نتایج نشان داد ژن‌های بالادستی (*HaGAS1*، *HaGAO1*، *HaG8H*، *HaCOS*) عمدتاً در برگ‌ها و ترکیب‌های غده‌ای و ژن‌های پایین‌دستی (*LOC110928784*، *LOC110893694*) در ریشه‌ها بیان ترجیحی دارند، که نمایانگر تقسیم فضایی بیوستتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها است. به‌طور کلی، یافته‌ها اجرای جدیدی از مسیر بیوستتزی سزکویی‌ترین لاکتون‌ها و فاکتورهای تنظیمی آن را آشکار می‌کنند و اهداف ارزشمندی برای مهندسی متابولیک و توسعه رویکردهای نوین کنترل بیولوژیک گل‌جالیز فراهم می‌سازند.

واژه‌های کلیدی

آفتابگردان، ترانسکریپتوم، سزکویی‌ترین لاکتون، شبکه هم‌بیانی وزندارژن‌ها.

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۲. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۳. استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۴. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

نویسنده مسئول:

محمد مجدی

رایانامه: majidi60@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۶

استناد به این مقاله:

محمدنژاد، سعادت؛ مجدی، محمد؛ میرزاقادری، قادر و معروفی، اسعد (۱۴۰۴). شناسایی ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی دخیل در بیوستتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان با استفاده از تحلیل شبکه هم‌بیانی وزندار ژن‌ها، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۴۶-۶۱.

(DOI: [10.30473/cb.2025.75726.2016](https://doi.org/10.30473/cb.2025.75726.2016))

مقدمه

سزکویی ترین لاکتون ها گروهی متنوع از متابولیت های ثانویه ایزوپرنوئیدی هستند که عمدتاً در تیره کاسنیان تجمع می یابند. این ترکیبات با ساختارهای گوناگون خود نقش مهمی در دفاع گیاه، برهم کنش های زیستی و تحریک جوانه زنی انگل های ریشه ای ایفا می کنند. تاکنون بیش از ۵۰۰۰ ساختار شناسایی شده که بسیاری از آن ها دارای خواص دارویی ارزشمند و کاربردهای مهم در کشاورزی هستند (Majdi et al., 2016).

در آفتابگردان، مجموعه ای از سزکویی ترین لاکتون ها شامل کاستونولید، ۸-β-هیدروکسی کاستونولید، ۸-پی-زانتاتین، تومننوزین و دهیدروکاستوس لاکتون در اندام های مختلف گیاه سنتز و ترشح می شوند. این ترکیبات هم در دفاع شیمیایی و هم در القای جوانه زنی گونه های *O. minor* و *Orobanche cumana* نقش دارند (Spring, 2021; Spring et al., 2020). مسیر بیوسنتزی آن ها تا حدی شناخته شده است و شامل آنزیم های کلیدی مانند *HaGAO1/2*، *HaGAS1/2*، *HaG8H (CYP71BL1)* و *HaCOS (CYP71BL9)* می شود. این آنزیم ها در تولید کاستونولید و ۸-β-هیدروکسی جرماکرین A اسید نقش دارند که به ترتیب پیش ساز ترکیبات دهیدروکاستوس لاکتون ها، ۸-پی-زانتاتین و آرگوفیلین B محسوب می شوند (Frey et al., 2018). علاوه بر این، آنزیم اوپاتولید سنتاز (*HaES*) تبدیل مستقیم ۸-β-هیدروکسی جرماکرین A اسید به اوپاتولید را کاتالیز می کند و بدین ترتیب نقش مهمی در تکمیل این مسیر دارد (Frey et al., 2019).

بیوسنتز متابولیت های ثانویه به طور عمده توسط عوامل رونویسی تنظیم می شود. این پروتئین ها با اتصال به عناصر سیس در پروموتور ژن ها، بیان آن ها را فعال یا سرکوب کرده و در نتیجه جریان های متابولیکی را کنترل می کنند. همچنین عوامل رونویسی با یکپارچه سازی سیگنال های محیطی و توسعه ای، می توانند به طور همزمان چندین ژن را در یک مسیر بیوشیمیایی تنظیم کنند. تاکنون نقش این تنظیم کننده ها در مسیرهای مختلف متابولیت های ثانویه، از جمله فلاونوئیدها،

آلکالوئیدها و فیتوالکسین های سزکویی ترینی گزارش شده است (Chen et al., 2017; Li et al., 2015).

با وجود شناسایی چند ژن کلیدی در مسیر بیوسنتزی سزکویی ترین لاکتون ها در آفتابگردان، این مسیر تنها تا مراحل میانی (کاستونولید و ۸-β-هیدروکسی جرماکرین A اسید) مشخص شده و ژن های دخیل در واکنش های پایین دستی و تشکیل مشتقات نهایی، به ویژه دهیدروکاستوس لاکتون ها، همچنان ناشناخته اند. همچنین اطلاعات اندکی در مورد سازوکارهای تنظیمی و ترشحی این ترکیبات وجود دارد. پر کردن این خلأ دانشی برای توسعه ابزارهای زیست فناوریانه در بهبود مقاومت گیاه و مدیریت آفات اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش، با استفاده از تحلیل ترنسکرپتومیک و شبکه هم بیانی وزنی ژن ها تحت شرایط تنشی (اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی اتیلن گلیکول)، ژن های احتمالی مراحل پایین دستی بیوسنتز و عوامل رونویسی مرتبط با آن ها شناسایی و از جنبه های فیلوژنتیکی، ساختاری و بیانی بررسی شدند. این مطالعه به عنوان نخستین رویکرد جامع در آفتابگردان، بینش های تازه ای درباره کنترل مولکولی تولید سزکویی ترین لاکتون ها ارائه می دهد و می تواند پایه ای برای راهبردهای نوین در بهبود مقاومت گیاه، مدیریت پایدار آفات و بهره برداری دارویی از این ترکیبات فراهم کند

روش شناسی پژوهش

تحلیل ترنسکرپتوم

برای تحلیل و شناسایی ژن های کاندید و فاکتورهای رونویسی مرتبط با مسیرهای بیوسنتزی سزکویی ترین لاکتون ها، داده های RNA-seq عمومی از ریشه های آفتابگردان تحت تیمار با هورمون ها و تنش اسمزی (اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی اتیلن گلیکول) از پایگاه NCBI (SRA, PRJNA328564) بازیابی شدند. پس از کنترل کیفیت و حذف خوانش های نامناسب با Fastq 123، داده ها برای هم ترازی و تحلیل آماده گردیدند (Eidi et al., 2024). خوانش های پاک با (Kim et

مواد گیاهی، استخراج RNA و آنالیز کمی RT-PCR
برای بررسی بیان ژن‌های کاندید در مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها، بذرها *H. annuus* L. در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای در دانشگاه آمستردام، هلند کشت شدند و از بافت‌های ریشه و برگ گیاهچه‌های دو هفته‌ای، RNA کل با استفاده از معرف TRIzol بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و سنتز cDNA رشته اول با SuperScript™ III Reverse Transcriptase انجام گرفت.

شش ژن کاندید (*G8H*, *COS*, *GAO1*, *GAS1*) برای آنالیز qRT-PCR انتخاب و پرایمرهای اختصاصی آن‌ها با Primer-BLAST طراحی شدند (جدول ۱). سنجش بیان با qRT-PCR و کیت SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix در دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR انجام شد. واکنش‌ها شامل ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی بودند و *Actin2* به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی استفاده گردید. محاسبه بیان نسبی ژن‌ها بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ صورت گرفت.

تحلیل عناصر تنظیمی سیس در پروموتورهای

ژن‌های کلیدی بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها توالی‌های پروموتور (۲ کیلوباز بالادست کدون آغازین *HaGAO1/2*, *HaGAS1/2* (ATG NCBI از پایگاه داده *HaES*, *HaG8H*, *HaCOS* بازیابی شدند. شناسایی و حاشیه‌نویسی عناصر تنظیمی سیس با استفاده از پایگاه داده PlantCARE انجام شد (Maqsood et al., 2022). تا موتیف‌های تنظیمی رونویسی پیش‌بینی کردند. توزیع مکانی و نمایش گرافیکی عناصر تنظیمی سیس با بهره‌گیری از نرم‌افزار TBtools تولید شد تا تصویر دقیقی از چارچوب تنظیمی بالقوه کنترل‌کننده بیوسنتزی در آفتابگردان ارائه دهد.

HISAT2 v2.2.1 (al., 2019) به ژنوم مرجع آفتابگردان (HanXRQR2.0-SUNRISE) (Fernández-Aparicio et al., 2022) هم‌تراز شدند و خروجی‌های SAM با SAMtools به فرمت BAM تبدیل شدند (Li et al., 2009). در ادامه، کمیت‌بندی در سطح ژن با استفاده از featureCounts از بسته Subread انجام شد و داده‌های شمارشی خام برای تحلیل بیان تفاضلی و تفسیر عملکردی ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (Liao et al., 2014).

ساخت شبکه هم‌بیانی وزندارژن‌ها، ساختار ژن و موتیف‌های محافظت‌شده

برای شناسایی ژن‌های کاندید پایین دست و عوامل رونویسی ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی، تحلیل شبکه هم‌بیانی وزندارژن‌ها با بسته WGCNA در R v4.4.0 انجام شد (Fasoli et al., 2018). تحلیل شامل تمام ژن‌های بیان‌شده تحت تیمار با اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی‌اتیلن گلیکول بود. ماتریس مجاورت بر اساس همبستگی زوجی ژن‌ها محاسبه شد و با انتخاب آستانه نرم مناسب، معیار توپولوژی بدون مقیاس برقرار شد ($R^2=0.9$). ماتریس مجاورت سپس به ماتریس همپوشانی توپولوژیک تبدیل و خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی برای شناسایی ماژول‌ها انجام شد ($\text{minModuleSize}=30$). ماژول‌های مشابه بر اساس تشابه ($\text{merge CutHeight}=0.25$) ادغام شدند. ماژول‌های ژنی شامل ژن‌های کلیدی *HaGAS1/2*, *HaGAO1/2*, *HaCOS*, *HaG8H* و *HaES* شناسایی شدند و ژن‌های هم‌بیان مرتبط با آن‌ها استخراج شدند. شبکه‌های هم‌بیان‌ژنی با (v3.10.3) Cytoscape تجسم شدند.

ساختار اگزون-اینترون ژن‌های کاندید دخیل در مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها با استفاده از نرم‌افزار TBtools تجسم شد. موتیف‌های محافظت‌شده با بهره‌گیری از ابزار MEME Suite شناسایی شدند (Chen et al., 2020). در مجموع، ۱۵ موتیف محافظت‌شده با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض آنالیز شدند.

سزکویی ترین لاکتون های مرتبط در آفتابگردان، تحلیل هم بیانی وزندارژن ها بر داده های RNA-seq حاصل از ریشه گیاهان تحت تیمارهای اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی اتیلن گلیکول انجام شد. این تحلیل چندین ماژول هم بیان متمایز در پاسخ به هر تیمار شناسایی کرد. بیشترین تعداد ماژول در تیمار اتیلن (۴۲ ماژول) و سالیسیلیک اسید (۳۵ ماژول) و کمترین در متیل جاسمونات و پلی اتیلن گلیکول هر کدام (۲۴ ماژول) مشاهده شد. این تفاوت بیانگر تنوع بالای الگوهای تنظیمی در شرایط مختلف هورمونی و تنشی است.

شبکه هم بیانی ژن های کلیدی مسیر بیوسنتز

سزکویی ترین لاکتون ها در آفتابگردان

ژن های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی ترین لاکتون ها در آفتابگردان شامل *HaCOS* *HaGAO1/2* *HaGAS1/2* *HaES* و *HaG8H* هستند (Frey et al., 2020; Spring et al., 2020). تحلیل داده های RNA-seq ریشه تحت تیمارهای اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی اتیلن گلیکول نشان داد این ژن ها در ماژول های هم بیانی مشخصی خوشه بندی شده اند. هر ماژول شامل مجموعه ای از ژن هاست (۱۰۰ تا ۳۰۰ ژن هم بیان) که به طور هماهنگ با ژن های کلیدی مسیر بیان می شوند. شبکه هم بیانی بین ژن های کانید مسیر پایین دستی و فاکتورهای رونویسی شناسایی شده تحت تیمارهای مختلف، همراه با ژن های کلیدی مسیر، در شکل (۱) با استفاده از نرم افزار Cytoscape نمایش داده شده است.

تحلیل مقایسه ای همولوژی، ساختار ژنی و

موتیف های محافظت شده در ژن های کانیدی مرتبط با بیوسنتز سزکویی ترین لاکتون ها در

آفتابگردان

شناسایی ژن های مرتبط با بیوسنتز کاستونولید در

آفتابگردان

تحلیل شبکه هم بیانی داده های ترنسکرپتومی ریشه آفتابگردان تحت چهار تیمار اتیلن، سالیسیلیک اسید،

رده بندی فیلوژنتیک خانواده های ژنی bZIP و

ERF در آفتابگردان

براساس نتایج WGCNA، ۵ ژن bZIP و ۱۲ ژن ERF شناسایی شدند. برای بررسی روابط تکاملی و رده بندی فیلوژنتیک، توالی های پروتئینی ژن های bZIP و ERF از پایگاه داده TAIR بازیابی شدند (Wu et al., 2021).

تراز چندتایی توالی های آمینواسیدی با استفاده از الگوریتم ClustalW در نرم افزار (v12) MEGA انجام شد (Li et al., 2012). بازسازی درخت فیلوژنتیک با روش Neighbor-Joining، مدل جایگزینی پویسون و حذف جفتی شکاف ها صورت گرفت، پشتیبانی آماری هر گره از طریق تحلیل bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد. درخت فیلوژنتیک بدون ریشه حاصل، به عنوان چارچوبی برای رده بندی اعضای خانواده های bZIP و ERF در مقایسه با همولوگ های آن ها در آرکیدوپسیس مورد استفاده قرار گرفت.

تحلیل بیان ژن های کانید فاکتورهای رونویسی در

ریشه آفتابگردان تحت شرایط آزمایشی مختلف

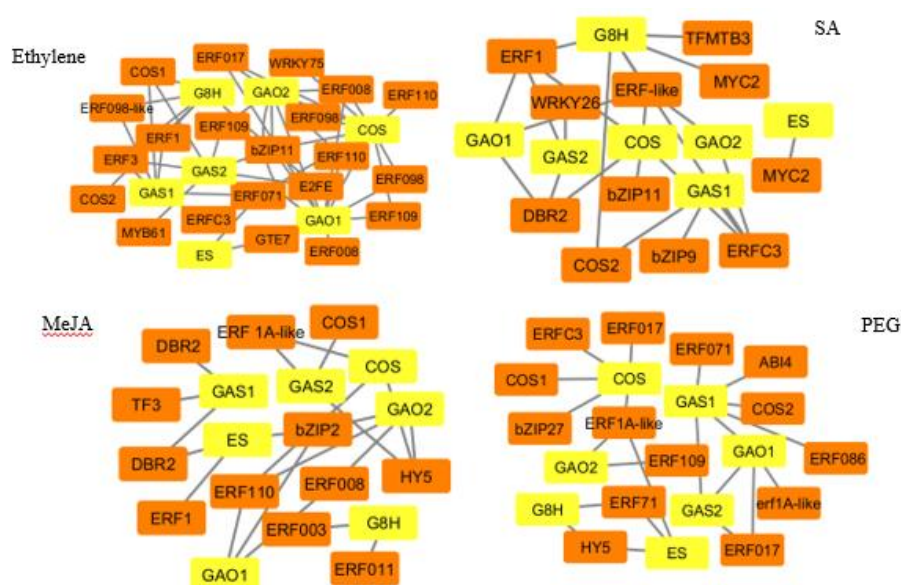
بر اساس داده های RNA-Seq استخراج شده پیشین، الگوهای بیان ژن های کانید فاکتورهای رونویسی تحلیل شدند. میزان بیان ژن ها به صورت تعداد قطعات در هر کیلوباز ژن نسبت به میلیون (FPKM) کمی سازی شد. برای نرمال سازی داده ها، مقادیر FPKM با استفاده از فرمول $\log_2(n+1)$ لگاریتمی شدند، که در آن n نشان دهنده مقدار FPKM هر ژن است. سپس، با استفاده از نرم افزار TBtools، نقشه حرارتی ایجاد شد تا پروفایل بیان ژن های کانید فاکتورهای رونویسی در بافت ریشه آفتابگردان تحت شرایط آزمایشی مختلف به طور دقیق نمایش داده شود.

یافته های پژوهش و نتیجه گیری

شناسایی ماژول های هم بیان مرتبط با ژن های کانید به منظور شناسایی ژن های کانید دخیل در مراحل پایین دستی و عوامل رونویسی ژن های کلیدی مسیر بیوسنتز

کاستونولید سنتاز در گونه‌های مختلف خانواده کاسنیان دارند. همان‌طور که در جدول (۲) آمده است، درصد هویت اسیدهای آمینه برای *HaCOS* بین ۵۶/۲۵ تا ۶۲/۳۷ درصد، برای *LOC110928784* بین ۵۷/۷۸ تا ۶۴/۸۰ درصد و برای *LOC110928786* بین ۵۸/۳۸ تا ۶۴/۷۷ درصد متغیر بود. نکته مهم آنکه شباهت دو ژن جدید به ارتولوگ‌های *COS* از *HaCOS* بیشتر بود که این موضوع احتمال نقش فعال آن‌ها در بیوستنز کاستونولید را تقویت می‌کند.

متیل‌جاسمونات و پلی‌اتیلن‌گلیکول، به شناسایی دو ژن جدید از خانواده *CYP450* منجر شد *LOC110928784* و *LOC110928786*. این دو ژن هم‌پایان با *HaCOS (CYP71BL9)* بودند؛ آزمیمی که پیش‌تر توسط Frey و همکاران (2020) به‌عنوان یکی از عناصر کلیدی مسیر بیوستنز کاستونولید معرفی شده بود. بررسی شباهت توالی نشان داد که پروتئین‌های پیش‌بینی‌شده حاصل از *LOC110928784* و *LOC110928786* شباهت بالایی با ارتولوگ‌های



شکل ۱. شبکه‌های هم‌پایانی ژنی تحت تیمارهای اتیلن، SA، سالیسیلیک اسید، MeJA، متیل‌جاسمونات، و PEG: پلی‌اتیلن‌گلیکول. ژن‌های هدف *HaGAS 1/2*، *HaGAO1/2*، *HaCOS*، *HaG8H* و *HaES* به همراه ژن‌های هم‌پایان آن‌ها نشان داده شده‌اند. جعبه‌های زرد ژن‌های هدف و جعبه‌های نارنجی ژن‌های هم‌پایان را مشخص می‌کنند.

Figure 1. Co-expression networks of target genes (*HaGAS1/2*, *HaGAO1/2*, *HaCOS*, *HaG8H*, *HaES*) and their partners under ethylene, SA, MeJA, and PEG treatments in sunflower. Yellow: target genes; orange: co-expressed genes

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده برای qRT-PCR در آفتابگردان

Table 1. Primers used for qRT-PCR analysis in sunflower

Gene	Primer (5'-3')	Ta(°C)	Reference
HaGAS1	GTGGGACATTAGTGCTATGAATCAA TCACCCATTCCCACTAAAGCA	60	—
HaGAO1	CCGCCCAACGGAAGATACTC GATCCCGAATACTGGAAAGACGC	60	Frey <i>et al.</i> 2018
HaG8H	TACGTTAGGCGATGTTAGCGAAGAC CACGTGGTCTACTTCTGTGTCCCTCAA	64	Frey <i>et al.</i> 2018
HaCOS	GATACTTATAAATGCGTGGGCTTGTG CGGCCCAACGGAAGGAACCTC	64	Frey <i>et al.</i> 2018
Actin2	AACTATTATGTAAGACTGGCAGAC TCACAACCACTCTCCAACCTAC	60	—
LOC110928784	TGCCCCATCCTTTTCTGCTA TGGCCAAGCTTCTAAGCACT	59	—
LOC110893694	TAGGGCGGTGAACAGCATAC ACCTGGTACATGCGGGAATC	60	—

عملکردی بالقوه میان ژن‌های جدید و *HaCOS* باشد (شکل B-۲).

شناسایی ژن‌های کاندید جدید با فعالیت احتمال DBR2 در آفتابگردان

DBR2^۱ یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز سزکویی‌ترین‌لاکتون‌های فعال زیستی است که کاهش پیوند دوگانه خارج حلقه‌ای در موقعیت دلتا ۱۱ (۱۳) پیش‌سازهای سزکویی‌ترین‌لاکتون‌ها را کاتالیز می‌کند و این امر موجب تنوع ساختاری و تغییر مسیر جریان متابولیک می‌شود. در *Artemisia annua*, *AaDBR2* آلئیدآرتیمیزینیک را به آلئیددی‌هیدروآرتیمیزینیک تبدیل می‌کند که پیش‌ساز آرتیمیزین است (Zhang et al., 2008). همچنین مطالعات دیگری نشان داده‌اند که آنزیم DBR2 در گونه‌های مختلف خانواده کاسنیان نقش کلیدی در تبدیل کاستونولید و پارتونولید به ترتیب به دی‌هیدروکاستونولید در *C. intybus* و دی‌هیدروپارتونولید در *T. parthenium* ایفا می‌کند (Kashkooli et al., 2019). در این پژوهش، دو ژن کاندید به نام‌های LOC110886996 و LOC110893694 به‌عنوان همولوگ‌های احتمالی *DBR2* در آفتابگردان شناسایی شدند. تحلیل شباهت توالی اسیدهای آمینه نشان داد که LOC110893696 بین ۸۲/۵۱ تا ۸۶/۹۵ درصد و LOC110886996 بین ۸۱/۷۵ تا ۸۴/۸۷ درصد با گونه‌های مختلف خانواده کاسنیان مشابهت دارند. بیشترین شباهت هر دو ژن با *T. cinerariifolium* و کمترین شباهت با *Erigeron canadensis* مشاهده شد (جدول ۲). علاوه بر این، هر دو ژن شباهت قابل توجهی با *AaDBR2* از *A. annua* نشان دادند (به ترتیب ۸۵/۶ و ۸۲/۹۴ درصد). نکته قابل توجه آن است که این دو ژن برخلاف سایر ژن‌های کاندید، هیچ شباهت معناداری یا *T. parthenium* نداشتند که احتمالاً ناشی از واگرایی مسیرهای اختصاصی گونه، تنوع ژنتیکی یا کمبود داده‌های حاشیه‌نویسی است. این یافته‌ها بر ضرورت

یافته‌های Frey و همکاران (2020) نیز نشان می‌دهد که توالی پروتئینی *HaCOS* شباهت بیشتری به *HaG8H* (*CYP71BL1*) دارد تا سنتازهای شناخته‌شده دیگر کاستونولید، که این موضوع از احتمال واگرایی عملکردی *HaCOS* حمایت می‌کند (Frey et al., 2020). این واگرایی عملکردی ممکن است ناشی از زیروظیفه‌ای شدن (subfunctionalization) یا نووظیفه‌ای شدن (neofunctionalization) در خانواده (*CYP71BL*) باشد، که تحت تأثیر انتخاب طبیعی و فشارهای اکولوژیکی شکل گرفته است (Moore et al., 2019).

مطابقت با یافته‌های پیشین درباره وجود چندین پاراگ عملکردی متمایز ژن‌های *HaGAS* (*HaGAS1*) تا *HaGAS3* (Göpfert et al., 2010) نشان می‌دهد که مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین‌لاکتون‌ها ممکن است ویژگی‌های بافتی یا وابسته به شرایط خاص داشته باشد. در نتیجه، تکثیر و واگرایی ژنی به نظر می‌رسد که اساس تنوع ساختاری ترکیبات گویانولید، مانند کاستونولید و یوپاتولید در آفتابگردان باشد. این یافته‌ها، پیچیدگی بیوشیمیایی و تکاملی مسیرهای سزکویی‌ترین‌لاکتون‌ها را برجسته کرده و اهداف امیدوارکننده‌ای برای مطالعات عملکردی آینده ارائه می‌دهند که می‌توان آن‌ها را با استفاده از ویرایش ژن و متابولومیکس بررسی کرد.

بررسی ساختار اگزون-اینترون ۳ ژن *HaCOS*، LOC110928784 و LOC110928786 (شکل A-۲) نشان داد که هر یک تنها دارای یک و دو، اگزون و اینترون به ترتیب هستند؛ موضوعی که بیانگر معماری ساده این ژن‌هاست. به‌منظور شناسایی نواحی حفاظت‌شده درگیر در بیوسنتز کاستونولید، تحلیل موتیف با نرم‌افزار MEME Suite انجام شد. در مجموع ۱۵ موتیف متمایز با طولی بین ۱۱ تا ۵۰ اسید آمینه شناسایی گردید. نتایج نشان داد که موتیف‌های ۱۴ و ۱۵ در هیچ‌یک از ژن‌ها حضور ندارند. از سوی دیگر، موتیف ۱۲ تنها در ژن‌های LOC110928784 و LOC110928786 مشاهده شد و در *HaCOS* غایب بود. این تفاوت در توزیع موتیف‌ها می‌تواند بیانگر واگرایی

مورد تحلیل قرار گرفتند. در برگ‌ها، چهار ژن *HaGAS1*، *HaGAO1*، *HaCOS* و *HaG8H* سطح بیان به‌طور معناداری بالاتری نسبت به ریشه نشان دادند، به‌طوری‌که *HaGAO1* بیشترین میزان رونویسی را داشت و نقش کلیدی آن در مراحل اولیه بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در برگ‌ها را برجسته می‌کند. این نتایج با یافته‌های پیشین مطابقت دارد (Göpfert et al., 2010; Spring et al., 2020) و نقش تریکوم‌های غده‌ای به‌عنوان مکان‌های اصلی سنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها را تأیید می‌کند (Ikezawa et al., 2011).

در مقابل، ژن‌های LOC110928784 و LOC110893694 بیان بالاتری در ریشه‌ها داشتند (شکل ۳)، که نشان‌دهنده دخالت آن‌ها در مراحل میانی بیوسنتزی و تولید پیش‌سازهای ترکیباتی مانند ۸-پی گزانتاتین، تومنتوزین و دهیدروکاستوسولاکتون است و با تجمع این ترکیبات در بافت ریشه همخوانی دارد (Raupp & Spring, 2013; Spring et al., 2020; Wu et al., 2022).

اعتبارسنجی عملکردی این ژن‌های کاندید برای تأیید نقش آن‌ها در بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان تأکید دارند.

بررسی ساختار ژنی نشان داد که هر دو ژن شامل ۵ اگزون و ۴ اینترون هستند (شکل A-۲). همچنین تحلیل موتیف‌های حفاظت‌شده نشان داد که این دو ژن تنها دارای ۳ موتیف (۱۱، ۱۳ و ۱۵) هستند و این تعداد کمترین میزان بود (شکل B-۲). این الگوی توزیع منحصربه‌فرد موتیف‌ها، احتمال عملکرد ویژه این ژن‌ها را در مقایسه با سایر اعضای خانواده ژنی تقویت می‌کند.

الگوهای بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در برگ و ریشه آفتابگردان برای بررسی الگوهای بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها، ۶ ژن کاندید (*HaGAS1*، *HaGAO1*، *HaG8H*، *HaCOS*، LOC110928784 و LOC110893694) در بافت‌های برگ و ریشه‌ی نشاهای دو هفته‌ای آفتابگردان با استفاده از qRT PCR

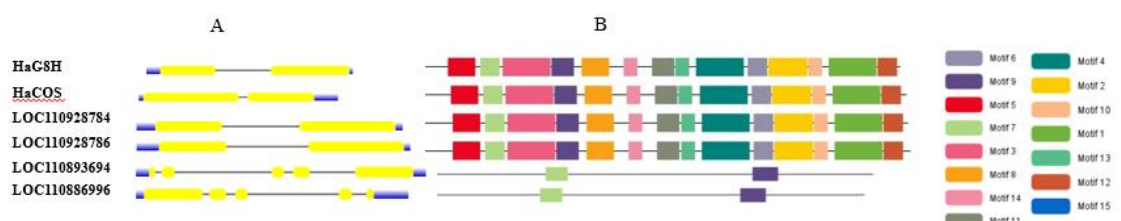
جدول ۲. درصد همسانی آمینواسیدی ژن‌های کاندیدای آفتابگردان با ارتولوگ‌های خانواده کاسنیان (BLAST, E < 0.05)

Table 2. Amino acid sequence identity between sunflower candidate genes and their orthologs in Asteraceae species (BLAST, E < 0.05)

Species	<i>Cichorium intybus</i>	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>	<i>Tanacetum parthenium</i>	<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Artemisia annua</i>
Genes							
HaGAS1	67.03	69.29	84.55	84.55	88.73	64.75	84.55
HaGAS2	67.58	70.79	84.55	84.55	88.1	65.31	84.55
HaGAO1	89.34	83.68	89.14	53.03	89.34	50.81	89.14
HaGAO2	63.35	60.79	62.28	54.79	63.35	58.7	62.28
HaCOS	62.37	62.17	61.35	61.35	61.99	56.25	65.24
HaG8H	67.35	66.6	66.46	66.06	66.74	57.32	66.6
LOC110928784	64.8	63.78	62.75	62.75	63.75	57.78	63.91
LOC110928786	64.77	63.18	62.75	62.55	63.75	58.38	63.88
LOC110893694	84.48	84.18	-	86.95	83.67	82.51	84.9
LOC110886996	83.63	83.6	-	84.87	82.82	81.75	82.25

A dash (-) denotes no significant similarity

- نشان‌دهنده نبود شباهت معنادار



شکل ۲. A) سازمان دهی اگزون-اینترون (آبی: نواحی غیرترجمه، زرد: اگزون‌ها، خطوط سیاه: اینترون‌ها). **B)** موتیف‌های حفاظت‌شده شناسایی‌شده با MEME (جعبه‌های رنگی نشان‌دهنده موتیف‌های متمایز).

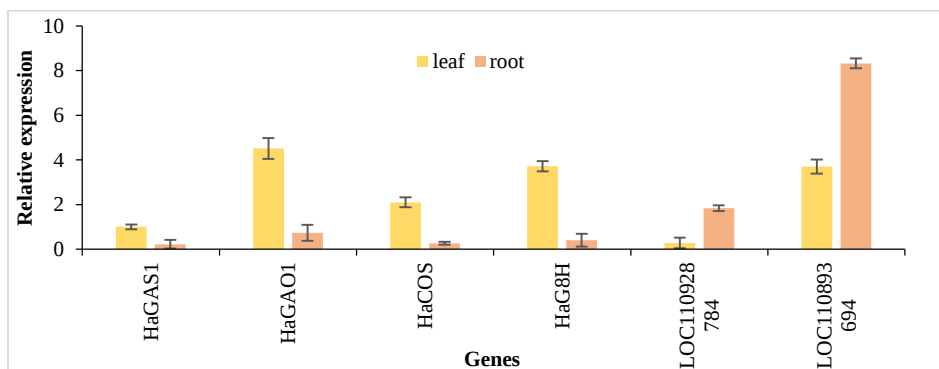
Figure 2. A) Exon-intron organization: blue, untranslated regions; yellow, exons; black, introns. B) Conserved motifs identified using MEME, with colored boxes representing distinct motifs

تحلیل عناصر تنظیمی وابسته به پروموتور ژن‌های کلیدی مسیر سزکویی ترپن لاکتون در آفتابگردان ناحیه ۲ کیلوباز بالادست پروموتور ژن‌های *GAS1/2*، *GAO1/2*، *COS*، *G8H* و *ES* با پایگاه PlantCARE بررسی شد تا عناصر تنظیمی سیس کلیدی شامل *bZIP*، *GCC-box*، *G-box*، *W-box* و *CBF2/RAA* شناسایی گردیدند که قبلاً به عنوان جایگاه اتصال عوامل رونویسی خانواده‌های *WRKY*، *ERF* و *bZIP* تأیید شده‌اند (شکل ۴) (Matías-*et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2015).

تحلیل پروموتور نشان داد (شکل ۴) که موتیف‌های *W-box* در تمام ژن‌ها به جز *HaES* (۲-۱۱ جایگاه) حضور دارند. *G-box*‌ها در همه ژن‌ها به جز *HaGAO1* شناسایی شدند، در حالیکه موتیف‌های *GCC-box* محدود به *HaGAO2* و *HaG8H* بودند. موتیف‌های *bZIP* در *HaGAS1*، *HaGAO2*، *HaCOS*، *HaG8H* و *HaES* حضور داشت. این نتایج نشان‌دهنده ساختار پیچیده و اختصاصی موتیف‌های تنظیمی سیس در ژن‌های مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌هاست که بیان ژن‌ها را تحت تأثیر قرار داده و پاسخ به هورمون‌ها، سیگنال‌های رشدی و عوامل محیطی را تنظیم می‌کند. این داده‌ها چارچوب جامعی برای تحلیل عملکردی و مهندسی ژنتیکی هدفمند مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان فراهم می‌آورند.

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که کلاس‌های مختلف سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در بافت‌های متمایز سنتز و ذخیره می‌شوند؛ به گونه‌ای که جرماکرونولیدها و هاگتانولیدها در تریکوم‌ها و ۸-پی‌گزانتاتین و دهیدروکاستوس لاکتون‌ها عمدتاً در ریشه‌ها تجمع می‌یابند (Spring, 2021; Spring *et al.*, 2020). این تفاوت‌های مکانی، وجود مسیرهای بیوسنتزی بافت‌محور و وابسته به محیط آنزیمی ویژه را نشان می‌دهد.

حمایت از این یافته‌ها توسط Frey و همکاران (2019) ارائه شد؛ آن‌ها دو مسیر جداگانه برای بیوسنتز اوپاتولید شناسایی کردند: یکی از طریق کاستونولید با مشارکت *CYP71BL9* و *HaG8H* و دیگری تبدیل مستقیم ۸- β هیدروکسی جرماکریل A اسید به اوپاتولید توسط *HaES*. در این مسیر، ۸- β هیدروکسی جرماکریل A اسید به عنوان نقطه انشعاب متابولیک عمل می‌کند که منجر به تولید مشتقات موجود در تریکوم‌ها یا ریشه می‌شود و اهمیت زمینه آنزیمی و مکان‌یابی بافتی را برجسته می‌کند (Frey *et al.*, 2019; Frey *et al.*, 2018). به طور کلی، الگوهای بیان ژنی نشان می‌دهند که مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌های کانونیکال در ریشه‌ها فعالیت کمتری دارد و مسیرهای جایگزین و تخصصی غالب هستند. درک دقیق این مسیرها برای مهندسی متابولیک هدفمند و افزایش تولید سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان ضروری است و می‌تواند راه را برای بهینه‌سازی بیوتکنولوژیک تولید این ترکیبات هموار کند.



شکل ۳. الگوهای بیان شش ژن مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در ریشه و برگ بررسی شده با qRT-PCR (*HaGAS1* در برگ به عنوان مرجع)
Figure 3. Expression patterns of six sesquiterpene lactone pathway genes in root and leaf tissues were analyzed by qRT-PCR (*HaGAS1* in leaf used as reference).

می‌کند (Illescas-Miranda *et al.*, 2025; Ortiz-Espín *et al.*, 2017). همچنین، ژن XP_022023437.1 با AT5G11260 هم‌خانواده است که عملکرد گروه HY5 را دارد و رشد، جوانه‌زنی، پاسخ به تنش‌ها و تجمع آنتوسیانین در پاسخ به نور را تنظیم می‌کند (Bhagat *et al.*, 2021; Qiu *et al.*, 2019).

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که *AaHY5* مستقیماً به توالی G-box در پروموتور *AaGSW1* متصل شده و مسیر بیوسنتز آرتیمیزین را به‌طور غیرمستقیم تنظیم می‌کند. علاوه بر این، *AabZIP9* به توالی‌های DNA دارای هسته ACGT در پروموتورهای *ADS* و *CYP71A1* متصل شده و تولید آرتیمیزین را افزایش می‌دهد. در آنالیز پروموتوری این مطالعه مشاهده شد (شکل ۴) که ژن‌های *HaGAS2* و *HaG8H* به‌ترتیب دارای ۱ و ۲ جایگاه G-box هستند و پروموتورهای *HaGAS2*، *HaGAO1* و *HaG8H* به‌ترتیب دارای ۱، ۳ و ۳ جایگاه احتمالی اتصال *bZIP9* می‌باشند.

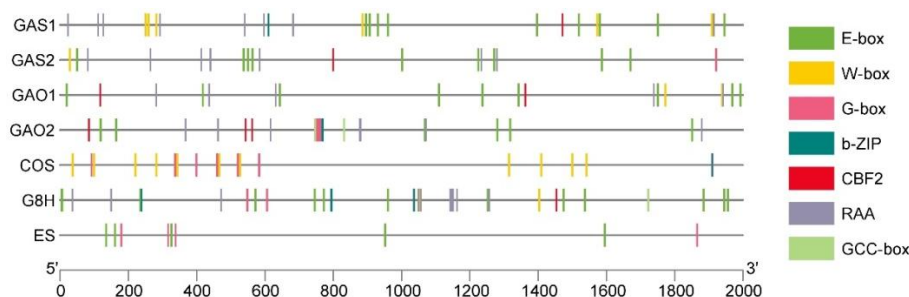
بر اساس نتایج این مطالعه، XP_022029119.1 و XP_022023437.1 در آفتابگردان با AT5G24800 و AT5G11260 هم‌خوشه شدند، مشابه *AaHY5* و *AabZIP9* در *A. annua* (Hao *et al.*, 2019; Xiang *et al.*, 2022). این یافته‌ها نشان می‌دهند که این ژن‌ها احتمالاً نقش کلیدی در تنظیم مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها دارند و مکانیسم‌های تنظیمی *bZIP* در گیاهان مختلف تا حد زیادی حفظ شده‌اند. با این حال، تعیین نقش دقیق آن‌ها نیازمند آزمایش‌های تعیین عملکرد در سیستم هیبریدی مخمر است.

شناسایی فاکتورهای رونویسی هم‌بیان با ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان

تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی ۵ ژن *bZIP* و ۱۲ ژن *ERF* به‌عنوان فاکتورهای رونویسی هم‌بیان با ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان شناسایی کرد (شکل ۱). برای ارزیابی روابط تکاملی و نقش‌های احتمالی این ژن‌ها، تحلیل فیلوژنتیک بر اساس توالی‌های آمینواسیدی ۱۲۷ ژن *bZIP* و ۱۳۹ ژن *ERF* در آرکیدوپسیس همراه با ژن‌های کاندیدای آفتابگردان انجام شد. نتایج فیلوژنتیک نشان داد که ژن‌های کاندیدا در خوشه‌های همولوگ با ژن‌های شناخته‌شده آرکیدوپسیس قرار دارند، که این امر بیانگر حفاظت عملکردی میان گونه‌ها است. بر این اساس، ژن‌های شناسایی شده می‌توانند به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها عمل کنند.

شناسایی همولوگ‌های *bZIP* مرتبط با تنظیم

بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان بازسازی درخت فیلوژنتیک نشان داد (شکل ۵) که ژن XP_021983768.1 در یک خوشه با ژن AT1G75319 قرار دارد که در جوانه‌زنی بذر، سنتز نیکوتیانامین و تحمل به کمبود آهن نقش دارد (Iglesias-Fernández *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024). ژن XP_022029119.1 با AT5G24800 خوشه‌بندی شد که فرآیندهایی از جمله رشد اولیه گیاهچه‌ها، افزایش تحمل به تنش شوری و تنظیم رونویسی ژن‌های مرتبط با بذر و میوه را کنترل



شکل ۴. توزیع و جایگاه عناصر تنظیمی سیس در نواحی پروموتور ژن‌های مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها

Figure 4. Distribution and positions of cis-regulatory elements in the promoter regions of sesquiterpene lactone pathway genes

و ۱ جایگاه GCC-box بودند، که نشان‌دهنده یک الگوی محافظت‌شده و محدود از این موتیف در مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها است.

مقایسه تطبیقی با گونه‌های دیگر نشان داد که ژن XP_021969365.1 عملکردی مشابه *SmERF73* دارد و ژن‌های XP_022017763.1 و XP_022002255.1 الگوهای مشابه *AaORA* و *AaERF1* در *A. annua* نشان دادند که در افزایش تولید آرتمیزینین مؤثر هستند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که ژن‌های XP_021969365.1، XP_022017763.1 و XP_022002255.1 احتمالاً به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون در آفتابگردان عمل می‌کنند و حفظ الگوهای تنظیمی ERF در گونه‌های گیاهی مختلف را تأیید می‌کنند.

الگوی بیان فاکتورهای رونویسی bZIP و ERF در پاسخ به تیمارهای هورمونی و تنشی

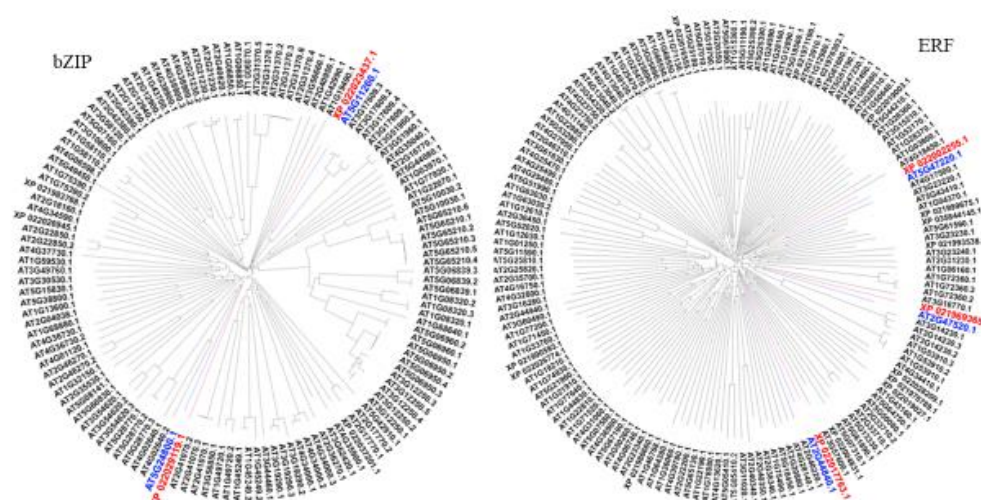
به‌منظور بررسی نقش فاکتورهای رونویسی در پاسخ گیاه به تیمارهای هورمونی و تنشی، الگوی بیان ژن‌های bZIP و ERF که از طریق تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی شناسایی شدند، مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۶). در شرایط کنترل، ژن XP_021986660.1 بیان بسیار بالایی داشت و ۲ ژن XP_022023437.1 و XP_022029119.1 بیان متوسطی نشان دادند. در مقابل، تیمار اتیلن بیشترین تغییرات را القا نمود؛ به‌طوری‌که ژن‌های XP_021986660.1، XP_022017763.1 و XP_021993538.1 از خانواده ERF بیان بسیار بالایی نشان داده و در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین القا را تجربه کردند. این یافته‌ها بیانگر نقش کلیدی مسیر سیگنالینگ وابسته به اتیلن در تنظیم عوامل رونویسی مرتبط با پاسخ‌های دفاعی است.

تیمار پلی‌اتیلن‌گلیکول عمدتاً باعث تغییرات متوسط بیان در تعدادی از ژن‌های bZIP شد، در حالی که تیمار متیل‌جاسمونات افزایش نسبی بیان ژن‌های bZIP (XP_021983768.1، XP_022023437.1) و ERF (XP_021986660.1) را سبب گردید. این نتایج با

تحلیل فیلوژنتیک همولوگ‌های ERF مرتبط با تنظیم بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون در آفتابگردان تحلیل فیلوژنتیک همولوگ‌های ERF در آفتابگردان نشان داد (شکل ۵) که ژن‌های XP_022017763.1، XP_021993538.1 و XP_021990593.1 به‌ترتیب با ژن‌های AT1G19210، AT2G44840 و AT3G23240 خوشه‌بندی شدند که در فرآیندهایی نظیر مهار رشد ریشه‌های جانبی، مقاومت به تنش‌های سرما، شوری و اسمزی و تجمع اکسین نقش دارند (Hu et al., 2018; Liao et al., 2024; Lv et al., 2021; Mao et al., 2016). ژن XP_021969365.1 با AT2G47520 هم‌خانواده شد که در افزایش مقاومت به *Fusarium graminearum* و تنظیم تعادل ROS دخیل است، درحالی‌که ژن XP_022002255.1 با AT5G47220 خوشه‌بندی شد که در مقاومت به *Stemphylium alternata* و *lycopersici* مؤثر است (Mao et al., 2016; Yao et al., 2017). همچنین ژن XP_022019003.1 با AT1G28360 هم‌خانواده گردید که در تنظیم رشد جنین، تشکیل گل و بذر و تعاملات میکوریزایی نقش دارد (Chandler & Werr, 2020; Xu et al., 2022). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که *AaERF1* با اتصال به موتیف‌های CBF2 و RAA در پروموتورهای *ADS* و *CYP71AV1*، تولید آرتمیزینین را افزایش می‌دهد (Yu et al., 2012). تحلیل‌های ما نشان داد که برای موتیف CBF2، ژن‌های *HaGAS1*، *HaGAS2* و *HaG8H* هر کدام یک جایگاه و ژن‌های *HaGAO1* و *HaGAO2* به ترتیب ۲ و ۳ جایگاه دارند. برای موتیف RAA، ژن‌های *HaGAS1* و *HaGAS2* دارای ۹ جایگاه، *HaGAO1* دارای ۵ جایگاه، *HaGAO2* و *HaG8H* هر کدام ۸ جایگاه و *HaES* ۳ جایگاه شناسایی شد. در *S. miltiorrhiza*، *SmERF73* عناصر پروموتوری GCC-box ژن‌های مرتبط با بیوسنتز تانن‌سینون (*CPS1*، *DXR1*، *KSL1* و *CYP76AH3*) را شناسایی کرده و بیان آن‌ها را فعال می‌کند (Zheng et al., 2021). در تحلیل حاضر، تنها دو ژن آفتابگردان، *HaGAO2* و *HaG8H*، به‌ترتیب دارای ۲

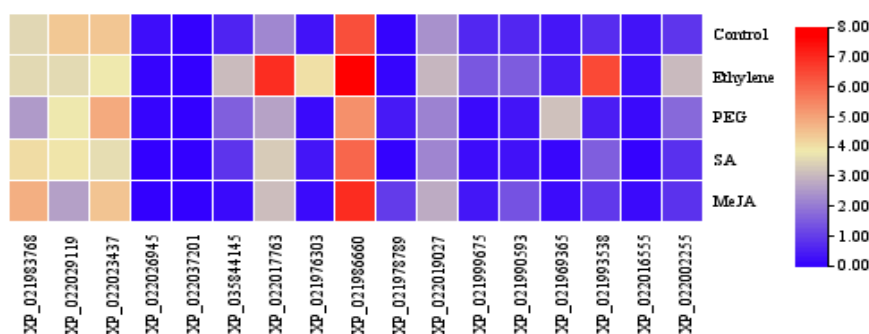
به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فاکتورهای رونویسی منتخب، به‌ویژه ژن‌های خانواده ERF، عمدتاً تحت تأثیر سیگنالینگ وابسته به اتیلن قرار دارند، در حالی که مسیرهای مرتبط با متیل جاسمونات و پلی‌اتیلن گلیکول نقش مکمل و مسیر سالیسیلیک اسید نقش بسیار محدودی در تنظیم آن‌ها ایفا می‌کند.

مطالعات پیشین همخوان است که نقش مکمل متیل جاسمونات در کنار اتیلن (Song *et al.*, 2019) و دخالت bZIP در سازگاری با خشکی را گزارش کرده‌اند (Castilhos *et al.*, 2014). در تیمار سالیسیلیک‌اسید نیز ژن XP_021986660.1 بیان متوسطی داشت و ژن‌های XP_022029119.1، XP_021983768.1 و XP_022023437.1 تغییرات اندکی نشان دادند.



شکل ۵. درخت فیلوژنتیک ژن‌های فاکتورهای رونویسی bZIP و ERF در آفتابگردان و همولوگ‌های آرابیدوپسیس بر اساس توالی کامل آمینواسیدی، با خوشه‌بندی مرتبط با مسیرهای متابولیک کلیدی و نقش احتمالی در بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها. شاخه‌های قرمز ژن‌های آفتابگردان و شاخه‌های آبی همولوگ‌های آرابیدوپسیس را نشان می‌دهند.

Figure 5. Phylogenetic tree of bZIP and ERF transcription factor genes in sunflower and their Arabidopsis homologs based on full-length amino acid sequences, clustered according to key metabolic pathways with potential roles in sesquiterpene lactone biosynthesis. Red branches indicate sunflower genes, and Blue branches indicate Arabidopsis homologs



شکل ۶. نقشه حرارتی بیان ژن‌های فاکتوررونویسی در ریشه‌های آفتابگردان در پاسخ به تیمارهای اتیلن، سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات و پلی‌اتیلن گلیکول، و رنگ‌های آبی، کرم و قرمز به ترتیب بیان کم، متوسط و زیاد را نشان می‌دهند

Figure 6. Heatmap of transcription factor gene expression in sunflower roots in response to ethylene, salicylic acid, methyl jasmonate, and polyethylene glycol treatments. Blue, cream, and red indicate low, medium, and high expression levels, respectively.

این یافته‌ها نه تنها درک عمیق‌تری از مبانی مولکولی و تکاملی بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها فراهم می‌آورند، بلکه اهداف ارزشمندی برای مطالعات عملکردی آینده و مهندسی متابولیک در راستای بهینه‌سازی تولید ترکیبات فعال زیستی در آفتابگردان معرفی می‌کنند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

این پژوهش با بهره‌گیری از شبکه‌های هم‌بیانی ژنی و تحلیل‌های فیلوژنتیک مجموعه‌ای از ژن‌های کاندید و فاکتورهای رونویسی مرتبط با مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان را شناسایی کرد. شناسایی ژن‌های جدید از خانواده‌های CYP450 و DBR2 در کنار فاکتورهای رونویسی bZIP و ERF همولوگ با ژن‌های شناخته‌شده در گونه‌های دارویی، نشان‌دهنده نقش تکثیر و واگرایی ژنی و نیز حفاظت مکانیسم‌های تنظیمی میان گونه‌ها است. در مجموع،

منابع

- Bhagat, P. K., Verma, D., Sharma, D., & Sinha, A. K. (2021). HY5 and ABI5 transcription factors physically interact to fine tune light and ABA signaling in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, 107(1), 117-127.
- Castilhos, G., Lazzarotto, F., Spagnolo-Fonini, L., Bodanese-Zanettini, M. H., & Margis-Pinheiro, M. (2014). Possible roles of basic helix-loop-helix transcription factors in adaptation to drought. *Plant science*, 223, 1-7.
- Chandler, J., & Werr, W. (2020). A phylogenetically conserved APETALA2/ethylene response factor, ERF12, regulates arabidopsis floral development. *Plant molecular biology*, 102(1), 39-54.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.
- Chen, M., Yan, T., Shen, Q., Lu, X., Pan, Q., Huang, Y., Tang, Y., Fu, X., Liu, M., & Jiang, W. (2017). GLANDULAR TRICHOME-SPECIFIC WRKY 1 promotes artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *New Phytologist*, 214(1), 304-316.
- Eidi, M., Abdolalizadeh, S., Nasirpour, M. H., Zahiri, J., & Garshasbi, M. (2024). 123FASTQ: an intuitive and efficient tool for preprocessing Illumina FASTQ reads. *bioRxiv*, 2024.2003.2008.584032.
- Fasoli, B., Lin, J. C., Bowling, D. R., Mitchell, L., & Mendoza, D. (2018). Simulating atmospheric tracer concentrations for spatially distributed receptors: updates to the Stochastic Time-Inverted Lagrangian Transport model's R interface (STILT-R version 2). *Geoscientific Model Development*, 11(7), 2813-2824.
- Fernández-Aparicio, M., Del Moral, L., Muños, S., Velasco, L., & Pérez-Vich, B. (2022). Genetic and physiological characterization of sunflower resistance provided by the wild-derived Or Deb2 gene against highly virulent races of *Orobanche cumana* Wallr. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(2), 501-525.
- Frey, M., Klaiber, I., Conrad, J., Bersch, A., Pateraki, I., Ro, D.-K., & Spring, O. (2019). Characterization of CYP71AX36 from sunflower (*Helianthus annuus* L., Asteraceae). *Scientific Reports*, 9(1), 14295.
- Frey, M., Klaiber, I., Conrad, J., & Spring, O. (2020). CYP71BL9, the missing link in costunolide synthesis of sunflower. *Phytochemistry*, 177, 112430.
- Frey, M., Schmauder, K., Pateraki, I., & Spring, O. (2018). Biosynthesis of Eupatolide—A metabolic route for sesquiterpene lactone formation involving the P450 enzyme CYP71DD6. *ACS Chemical Biology*, 13(6), 1536-1543.
- Göpfert, J., Bülow, A.-K., & Spring, O. (2010). Identification and functional characterization of a new sunflower germacrene A synthase (HaGAS3). *Natural Product Communications*, 5(5), 1934578X1000500507.
- Hao, X., Zhong, Y., N tzmman, H.-W., Fu, X., Yan, T., Shen, Q., Chen, M., Ma, Y., Zhao, J., & Osbourn, A. (2019). Light-induced artemisinin biosynthesis is regulated by the bZIP transcription factor AaHY5 in *Artemisia annua*. *Plant and Cell Physiology*, 60(8), 1747-1760.
- Hu, X., Xu, X., & Li, C. (2018). Ectopic expression of the LoERF017 transcription factor from *Larix olgensis* Henry enhances salt and osmotic-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Reports*, 12(2), 93-104.

- Iglesias-Fernández, R., Barrero-Sicilia, C., Carrillo-Barral, N., Oñate-Sánchez, L., & Carbonero, P. (2013). Arabidopsis thaliana bZIP 44: a transcription factor affecting seed germination and expression of the mannanase-encoding gene AtMAN7. *The Plant Journal*, 74(5), 767-780.
- Ikezawa, N., Göpfert, J. C., Nguyen, D. T., Kim, S.-U., O'Maille, P. E., Spring, O., & Ro, D.-K. (2011). Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21601-21611.
- Illescas-Miranda, J., Llanos-Casado, V., Contreras, E., Carrillo-Barral, N., & Iglesias-Fernández, R. (2025). Temporal and spatial expression analysis of AtbZIP9 during seed and silique development in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Gene*, 100536.
- Kashkooli, A. B., van der Krol, A. R., Rabe, P., Dickschat, J. S., & Bouwmeester, H. (2019). Substrate promiscuity of enzymes from the sesquiterpene biosynthetic pathways from *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium* allows for novel combinatorial sesquiterpene production. *Metabolic engineering*, 54, 12-23.
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature biotechnology*, 37(8), 907-915.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & Subgroup, G. P. D. P. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Li, J., Sima, W., Ouyang, B., Wang, T., Ziaf, K., Luo, Z., Liu, L., Li, H., Chen, M., & Huang, Y. (2012). Tomato SIDREB gene restricts leaf expansion and internode elongation by downregulating key genes for gibberellin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 63(18), 6407-6420.
- Li, S., Wang, H., Li, F., Chen, Z., Li, X., Zhu, L., Wang, G., Yu, J., Huang, D., & Lang, Z. (2015). The maize transcription factor EREB 58 mediates the jasmonate-induced production of sesquiterpene volatiles. *The Plant Journal*, 84(2), 296-308.
- Liao, Y., Liu, X., Xu, N., Chen, G., Qiao, X., Gu, Q., Wang, Y., & Sun, J. (2024). Fine mapping and identification of ERF transcription factor ERF017 as a candidate gene for cold tolerance in pumpkin. *Theoretical and Applied Genetics*, 137(10), 230.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.
- Lv, B., Wei, K., Hu, K., Tian, T., Zhang, F., Yu, Z., Zhang, D., Su, Y., Sang, Y., & Zhang, X. (2021). MPK14-mediated auxin signaling controls lateral root development via ERF13-regulated very-long-chain fatty acid biosynthesis. *Molecular plant*, 14(2), 285-297.
- Majdi, M., Ashengroph, M., & Abdollahi, M. R. (2016). Sesquiterpene lactone engineering in microbial and plant platforms: parthenolide and artemisinin as case studies. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(3), 1041-1059.
- Mao, J.-L., Miao, Z.-Q., Wang, Z., Yu, L.-H., Cai, X.-T., & Xiang, C.-B. (2016). Arabidopsis ERF1 mediates cross-talk between ethylene and auxin biosynthesis during primary root elongation by regulating ASA1 expression. *PLoS genetics*, 12(1), e1005760.
- Maqsood, H., Munir, F., Amir, R., & Gul, A. (2022). Genome-wide identification, comprehensive characterization of transcription factors, cis-regulatory elements, protein homology, and protein interaction network of DREB gene family in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1031679.
- Matías-Hernández, L., Jiang, W., Yang, K., Tang, K., Brodelius, P. E., & Pelaz, S. (2017). Aa MYB 1 and its orthologue At MYB 61 affect terpene metabolism and trichome development in *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 90(3), 520-534.
- Moore, B. M., Wang, P., Fan, P., Leong, B., Schenck, C. A., Lloyd, J. P., Lehti-Shiu, M. D., Last, R. L., Pichersky, E., & Shiu, S.-H. (2019). Robust predictions of specialized metabolism genes through machine learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(6), 2344-2353.
- Ortiz-Espín, A., Iglesias-Fernández, R., Calderón, A., Carbonero, P., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017). Mitochondrial AtTrxo1 is transcriptionally regulated by AtbZIP9 and AtAZF2 and affects seed germination under saline conditions. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 1025-1038.
- Qiu, Z., Wang, H., Li, D., Yu, B., Hui, Q., Yan, S., Huang, Z., Cui, X., & Cao, B. (2019). Identification of candidate HY5-dependent and-independent regulators of anthocyanin biosynthesis in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 60(3), 643-656.
- Raupp, F. M., & Spring, O. (2013). New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobancha cumana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), 10481-10487.

- Shen, Q., Lu, X., Yan, T., Fu, X., Lv, Z., Zhang, F., Pan, Q., Wang, G., Sun, X., & Tang, K. (2016). The jasmonate-responsive Aa MYC 2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *New Phytologist*, 210(4), 1269-1281.
- Song, N., Ma, L., Wang, W., Sun, H., Wang, L., Baldwin, I. T., & Wu, J. (2019). An ERF2-like transcription factor regulates production of the defense sesquiterpene capsidiol upon *Alternaria alternata* infection. *Journal of Experimental Botany*, 70(20), 5895-5908.
- Spring, O. (2021). Sesquiterpene lactones in sunflower oil. *Lwt*, 142, 111047.
- Spring, O., Schmauder, K., Lackus, N. D., Schreiner, J., Meier, C., Wellhausen, J., Smith, L. V., & Frey, M. (2020). Spatial and developmental synthesis of endogenous sesquiterpene lactones supports function in growth regulation of sunflower. *Planta*, 252(1), 2.
- Wang, X., Sun, W., Fang, S., Dong, B., Li, J., Lv, Z., Li, W., & Chen, W. (2023). AaWRKY6 contributes to artemisinin accumulation during growth in *Artemisia annua*. *Plant science*, 335, 111789.
- Wu, W., Huang, H., Su, J., Yun, X., Zhang, Y., Wei, S., Huang, Z., Zhang, C., & Bai, Q. (2022). Dynamics of germination stimulants dehydrocostus lactone and costunolide in the root exudates and extracts of sunflower. *Plant Signaling & Behavior*, 17(1), 2025669.
- Wu, X., Jia, Y., Ma, Q., Wang, T., Xu, J., Chen, H., Wang, M., Song, H., & Cao, S. (2024). The transcription factor bZIP44 cooperates with MYB10 and MYB72 to regulate the response of *Arabidopsis thaliana* to iron deficiency stress. *New Phytologist*, 242(6), 2586-2603.
- Wu, Z., Li, L., Liu, H., Yan, X., Ma, Y., Li, Y., Chen, T., Wang, C., Xie, L., & Hao, X. (2021). AaMYB15, an R2R3-MYB TF in *Artemisia annua*, acts as a negative regulator of artemisinin biosynthesis. *Plant science*, 308, 110920.
- Xiang, L., He, P., Shu, G., Yuan, M., Wen, M., Lan, X., Liao, Z., & Tang, Y. (2022). AabHLH112, a bHLH transcription factor, positively regulates sesquiterpenes biosynthesis in *Artemisia annua*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 973591.
- Xu, S., Hou, H., Wu, Z., Zhao, J., Zhang, F., Teng, R., Chen, F., & Teng, N. (2022). *Chrysanthemum* embryo development is negatively affected by a novel ERF transcription factor, CmERF12. *Journal of Experimental Botany*, 73(1), 197-212.
- Yao, Y., Chen, X., & Wu, A.-M. (2017). ERF-VII members exhibit synergistic and separate roles in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 12(6), e1329073.
- Yu, Z.-X., Li, J.-X., Yang, C.-Q., Hu, W.-L., Wang, L.-J., & Chen, X.-Y. (2012). The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Molecular plant*, 5(2), 353-365.
- Zhang, F., Fu, X., Lv, Z., Lu, X., Shen, Q., Zhang, L., Zhu, M., Wang, G., Sun, X., & Liao, Z. (2015). A basic leucine zipper transcription factor, AabZIP1, connects abscisic acid signaling with artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Molecular plant*, 8(1), 163-175.
- Zhang, Y., Teoh, K. H., Reed, D. W., Maes, L., Goossens, A., Olson, D. J., Ross, A. R., & Covello, P. S. (2008). The molecular cloning of artemisinic aldehyde $\Delta 11$ (13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21501-21508.
- Zheng, H., Jing, L., Jiang, X., Pu, C., Zhao, S., Yang, J., Guo, J., Cui, G., Tang, J., & Ma, Y. (2021). The ERF-VII transcription factor SmERF73 coordinately regulates tanshinone biosynthesis in response to stress elicitors in *Salvia miltiorrhiza*. *New Phytologist*, 231(5), 1940-1955.