

Bioinformatic analysis of bHLH transcription factors involved in sesquiterpene lactone biosynthesis in sunflowerSaadat Mohammadnejad¹, Mohammad Majdi^{1*}, Ghader Mirzaghaderi¹, Asad Maroufi¹

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

*Corresponding Author Email: m.majdi@uok.ac.ir

Abstract

Introduction: Sesquiterpene lactones in sunflower play crucial roles in plant defense and allelopathy. The synthesis of these compounds is regulated by transcription factors, particularly the large bHLH family, which are recognized as key regulators of growth and metabolic processes. Although the key genes in the biosynthetic pathway of these compounds have been identified, their regulatory mechanisms remain largely unknown. The present study aimed to identify and characterize the bHLH family in sunflower using transcriptomic data under stress treatments and gene co-expression network analysis.

Materials and Methods: To investigate bHLH transcription factors involved in sesquiterpene lactone biosynthesis in sunflower, leaf RNA-seq data under methyl jasmonate, abscisic acid, and salicylic acid treatments were retrieved from the NCBI database (PRJNA328564). Raw reads underwent quality control using 123fastq, removing low-quality sequences and adapters. Clean reads were aligned to the sunflower reference genome using HISAT2. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was conducted in R to identify modules of co-expressed genes, with scale-free topology used to construct correlation matrices. Modules associated with key biosynthetic genes (HaGAS, HaGAO, HaCOS, HaG8H) were identified, and co-expressed bHLH transcription factors were extracted and visualized in Cytoscape. Promoter regions of key genes were retrieved from NCBI and analyzed for cis-regulatory elements using PlantCARE, with motif distribution visualized through TBtools. For evolutionary and structural characterization, bHLH protein sequences were aligned with Arabidopsis homologs, and a phylogenetic tree was reconstructed using the Neighbor-Joining method in MEGA.

Results: Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was performed on leaf RNA-seq data of sunflower under methyl jasmonate, abscisic acid, and salicylic acid treatments, revealing multiple distinct co-expression modules in response to each treatment. The highest number of modules was observed under methyl jasmonate (38 modules) and salicylic acid (35 modules), whereas abscisic acid treatment generated only 20 modules, indicating hormone-specific regulatory patterns. Promoter analysis revealed that W-box, E-box, ABRE, and GARE motifs—associated with WRKY and bHLH transcription factors—were present in the key genes. W-box motifs occurred in all genes (2–11 sites), while E-box motifs were detected in all genes except HaCOS, with HaG8H exhibiting the highest number (21 sites). Hormone-responsive motifs (ABRE and GARE) displayed specific and widespread distributions. Based on phylogenetic analysis four bHLH genes were identified as key regulators of the biosynthetic pathway. Gene structure analysis (0–8 introns), conserved motif examination, and bHLH domain characterization confirmed the classical DNA-binding and HLH architecture.

Conclusion: This study demonstrates that bHLH family transcription factors play a central and conserved role in regulating sesquiterpene lactone biosynthesis in sunflower. These factors act by binding to E-box motifs within the promoters of key pathway genes (HaGAS, HaGAO, HaCOS, and HaG8H), forming a complex network of gene interactions that coordinates responses to developmental and environmental signals. Phylogenetic evidence and conserved motif analysis indicate that the function of these bHLH factors is similar across other plant species, providing a foundational framework for targeted genetic engineering and enhancing the production of terpenoid compounds with pharmaceutical and ecological applications.

Keywords: Cis-regulatory elements, Hormonal treatment, Phylogenetics, Secondary metabolites**Received:** 20-09-2025**Accepted:** 30-12-2025

Citation: Mohammadnejad, S., Majdi, M., Mirzaghaderi, G.A., & Maroufi, A. (2026). Bioinformatic analysis of bHLH transcription factors involved in sesquiterpene lactone biosynthesis in sunflower *Plant Production and Genetics*, 7(1), 17-30. <https://doi.org/10.22034/plant.2025.144559.1175>

Copyrights:

Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



مطالعه بیوانفورماتیکی عوامل رونویسی bHLH دخیل در بیوسنتز سزکویی ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان

سعادت محمدنژاد^۱، محمد مجدی^{*}، قادر میرزاقدری^۱، اسعد معروفی^۱

۱. گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول: m.majdi@uok.ac.ir

چکیده

مقدمه: سزکویی ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان در دفاع گیاهی و آللوپاتی نقش حیاتی دارند. تنظیم سنتز این ترکیبات توسط عوامل رونویسی، به ویژه خانواده بزرگ bHLH صورت می‌گیرد که به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی فرآیندهای رشدی و متابولیکی شناخته می‌شوند. هر چند ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی این ترکیبات شناسایی شده‌اند، اما سازوکارهای تنظیمی آن‌ها همچنان ناشناخته باقی مانده است. هدف پژوهش حاضر، شناسایی و تحلیل خانواده bHLH در آفتابگردان با استفاده از داده‌های ترنسکریپتومیک تحت تیمارهای تنش و شبکه هم‌بیانی ژنی بود.

مواد و روش‌ها: برای شناسایی عوامل رونویسی خانواده bHLH مرتبط با بیوسنتز سزکویی ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان، داده‌های RNA-seq برگ تحت تیمار متیل‌جاسمونات، آبسزیک‌اسید و سالیسیلیک‌اسید از پایگاه NCBI (PRJNA328564) بازیابی شد. خوانش‌های خام پس از کنترل کیفیت با fastq۱۲۳ و حذف داده‌های کم‌کیفیت، با نرم‌افزار HISAT2 به ژنوم مرجع آفتابگردان هم‌تراز گردیدند. به منظور شناسایی ژن‌های هم‌بیان، تحلیل شبکه هم‌بیانی وزنی ژن‌ها (WGCNA) در محیط R اجرا شد. ماتریس همبستگی ژنی بر اساس توپولوژی بدون مقیاس ایجاد و ماژول‌های ژنی مرتبط با ژن‌های کلیدی HaGAS، HaGAO، HaCOS، HaG8H شناسایی شدند. سپس ژن‌های bHLH هم‌بیان استخراج و شبکه‌ها با Cytoscape تجسم شدند. جهت تحلیل عناصر تنظیمی سیس، توالی پروموتور ژن‌های کلیدی از NCBI دریافت و با پایگاه PlantCARE بررسی گردید و موتیف‌ها با TBtools نمایش داده شدند. برای رده‌بندی تکاملی، توالی پروتئینی ژن‌های bHLH با همولوگ‌های آراییدوپسیس هم‌تراز و درخت فیلوژنتیک با روش Neighbor-Joining در نرم‌افزار MEGA بازسازی شد. **نتایج:** تحلیل شبکه هم‌بیانی وزنی ژن‌ها (WGCNA) بر داده‌های RNA-seq برگ آفتابگردان تحت تیمارهای متیل‌جاسمونات، آبسزیک‌اسید و سالیسیلیک‌اسید انجام شد و چندین ماژول هم‌بیان متمایز در پاسخ به هر تیمار شناسایی گردید. بیشترین تعداد ماژول‌ها در تیمار متیل‌جاسمونات (۲۸ ماژول) و سالیسیلیک‌اسید (۳۵ ماژول) مشاهده شد، در حالی که تیمار آبسزیک‌اسید تنها ۲۰ ماژول ایجاد کرد که نشان‌دهنده الگوهای تنظیمی اختصاصی هورمونی است. تحلیل پروموتورها نشان داد موتیف‌های E-box، W-box، ABRE و GARE، مرتبط با عوامل رونویسی WRKY و bHLH، در ژن‌های کلیدی حضور دارند. W-boxها در تمام ژن‌ها (۲-۱۱ جایگاه) یافت شدند و E-boxها به جز HaCOS در سایر ژن‌ها حضور داشتند، با بیشترین تعداد (۲۱ جایگاه) در HaG8H موتیف‌های پاسخ‌دهنده به هورمون (GARE و ABRE) توزیع اختصاصی و گسترده داشتند. بر اساس تحلیل فیلوژنتیک چهار ژن bHLH به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی ژن‌های مسیر بیوسنتزی معرفی شدند. بررسی ساختار ژنی ۰-۸ اینترون و تحلیل موتیف‌های محافظت‌شده پروتئین‌ها همراه با دامین bHLH تأییدکننده ساختار کلاسیک DNA-binding و HLH بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که فاکتورهای رونویسی خانواده bHLH، نقش مرکزی و حفاظت‌شده‌ای در تنظیم بیوسنتز سزکویی ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان دارند. این عوامل با اتصال به موتیف‌های E-box در پروموتور ژن‌های کلیدی مسیر (HaGAS، HaGAO، HaCOS، HaG8H) فعالیت می‌کنند و شبکه‌ای پیچیده از تعاملات ژنی را شکل می‌دهند که پاسخ به سیگنال‌های رشدی و محیطی را هماهنگ می‌کند. شواهد فیلوژنتیک و موتیف‌های محافظت‌شده نشان می‌دهد که عملکرد این bHLHها در گونه‌های دیگر گیاهی مشابه است و می‌تواند چارچوبی برای مهندسی ژنتیک هدفمند و بهبود تولید ترکیبات ترپنی با کاربردهای دارویی و اکولوژیکی فراهم آورد. **کلید واژگان:** تیمار هورمونی، عوامل تنظیمی سیس، فیلوژنتیک، متابولیت ثانویه

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۲۹

منبع: محمدنژاد، س.، مجدی، م.، میرزاقدری، ق.، و معروفی، ا. (۱۴۰۵). شناسایی تنظیم‌کننده‌های bHLH بیوسنتز سزکویی ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان با استفاده از تحلیل شبکه‌های هم‌بیانی وزندار ژنی، *مجله تولید و ژنتیک گیاهی*، ۱۷(۱): ۳۰-۱۷. <https://doi.org/10.22034/plant.2025.144559.1175>



مقدمه

فعالیت‌های مهمی نظیر خاصیت ضدالتهابی، ضدسرطانی، درمان میگرن و مالاریا بوده و همچنین در دفاع گیاه از طریق آللوپاتی، دفع حشرات و سمیت علیه جانداران دیگر ایفای نقش می‌کنند (Amrehn *et al.*, 2016; Majdi *et al.*, 2011; Spring, 2021).

در آفتابگردان، علاوه بر کرک‌های غده‌ای (glandular trichome)، مسیره‌های بیوسنتزی فعال در بافت‌های ریشه، ساقه و کوتیلدون گزارش شده‌اند که ترکیباتی چون کاستونولید، دهیدروکاستوس‌لاکتون، ۸-اپی‌زانتاتین و تومنوزین را تولید می‌کنند (Galisteo *et al.*, 2024; Spring, 2021; Spring *et al.*, 2020). برخی از این ترکیبات با ترشح از طریق ریشه به‌عنوان مواد آللوپاتیک عمل کرده و جوانه‌زنی بذر گل جالیز (*Orobancha cumana*) را تحریک می‌کنند (Spring *et al.*, 2020).

ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین‌لاکتون‌ها شامل جرماکرین A سنتاز (*HaGAS*)، جرماکرین A اکسیداز (*HaGAO*)، کاستونولید سنتاز (*HaCOS*) و جرماکرین A اسید β -۸ هیدروکسیلاز (*HaG8H*) هستند. این آنزیم‌ها در تولید کاستونولید و β -۸ هیدروکسی‌جرماکرین A اسید نقش دارند که به‌ترتیب پیش‌ساز ترکیبات دهیدروکاستوس‌لاکتون‌ها و ۸-اپی‌زانتاتین محسوب می‌شوند (Álvarez-Calero *et al.*, 2018; Frey *et al.*, 2018). با وجود شناسایی ژن‌های کلیدی، سازوکارهای تنظیمی بیوسنتز سزکویی‌ترین‌لاکتون‌ها همچنان ناشناخته باقی مانده است.

با پیشرفت‌های اخیر در حوزه بیوانفورماتیک و تحلیل‌های ترنسکریپتومی، روش‌های شبکه‌ای نوینی همچون تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزنی امکان شناسایی تنظیم‌کننده‌های بالقوه و ژن‌هایی با عملکرد ناشناخته را فراهم کرده‌اند. این روش بر مبنای این اصل استوار است که ژن‌های دارای عملکرد مشابه، الگوهای بیان همسانی نشان می‌دهند و می‌توان با تحلیل ساختار هم‌بیانی، ماژول‌های عملکردی را شناسایی کرد. روش هم‌بیانی ژنی وزنی با ایجاد شبکه‌ای مبتنی بر همبستگی میان ژن‌ها و گروه‌بندی آن‌ها در ماژول‌هایی با عملکرد مشترک، ابزاری قدرتمند برای کشف سازوکارهای تنظیمی و ژن‌های کلیدی در مسیره‌های پیچیده زیستی فراهم می‌آورد (Serin *et al.*, 2016).

یکی از ویژگی‌های برجسته این روش، استفاده از وزن‌دهی پیوسته به یال‌های شبکه است که امکان حفظ اطلاعات

گیاهان به‌عنوان موجوداتی پایدار در محیط، برای بقا و سازگاری با شرایط متغیر زیستی و غیرزیستی، مجموعه‌ای پیچیده از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را به‌کار می‌گیرند. هماهنگی این فرآیندها عمدتاً از طریق تنظیم دقیق بیان ژن در بافت‌ها، اندام‌ها و مراحل مختلف رشد و نمو امکان‌پذیر است (Nouri *et al.*, 2015). در این میان، عوامل رونویسی با اتصال به نواحی پروموتوری ژن‌های هدف، نقش محوری در فعال‌سازی یا سرکوب مسیره‌های مولکولی مرتبط با رشد، توسعه و پاسخ به تنش دارند. تاکنون بر اساس دمین اتصال DNA، ۵۸ خانواده از این عوامل در گیاهان شناسایی شده است که هر یک نقش‌های ویژه‌ای در فرآیندهای زیستی ایفا می‌کنند (Bassolino *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

در میان این خانواده‌ها، عوامل رونویسی basic helix-loop-helix (bHLH) به‌عنوان دومین گروه بزرگ، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این پروتئین‌ها که در گیاهان، جانوران و ریزموجودات حضور گسترده‌ای دارند، با دارا بودن دمین‌های اختصاصی اتصال به DNA و دایمری‌سازی، طیف وسیعی از عملکردهای تنظیمی را ممکن می‌سازند (Wang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). جالب آنکه برخی اعضای فاقد دمین اتصال به DNA از طریق تشکیل کمپلکس‌های غیرفعال، نقش سرکوبگر داشته و بر پیچیدگی تنظیمی این خانواده می‌افزایند (Zhang *et al.*, 2020). فاکتورهای bHLH بر اساس شباهت توالی و ویژگی‌های عملکردی به شش گروه اصلی تقسیم می‌شوند که در این میان، گروه B بیشترین فراوانی را دارد (Zhou *et al.*, 2020).

مطالعات ژنومی اخیر نشان داده است که این خانواده در گونه‌های مختلف گیاهان زراعی و دارویی مانند، ذرت (Castillon *et al.*, 2007)، برنج (Xu *et al.*, 2022)، سیب‌زمینی (Wang *et al.*, 2018) و درمنه (Chang *et al.*, 2023) حضور داشته و در فرآیندهایی هم‌چون بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه، رشد سلولی و تحمل تنش‌های غیرزیستی نقش کلیدی ایفا می‌کنند (Guo *et al.*, 2021; Hong, 2016).

در کنار عوامل رونویسی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی نیز توجه روزافزونی را به‌دلیل نقش‌های اکولوژیک و دارویی خود جلب کرده‌اند. در این میان، سزکویی‌ترین‌لاکتون‌ها به‌عنوان گروهی بزرگ از ترکیبات ایزوپرنوئیدی، دارای

در این پژوهش، با استفاده از تحلیل ترنسکریپتومیک برگ آفتابگردان و شبکه هم‌بیانی ژنی وزنی تحت شرایط تنشی (متیل‌جاسمونات، آبسزیک‌اسید و سالیسیلیک‌اسید)، مجموعه‌ای از فاکتورهای رونویسی خانواده bHLH شناسایی و از نظر فیلوژنتیکی و ساختاری بررسی شدند. نتایج این مطالعه، شکاف دانشی موجود درباره ارتباط بالقوه عوامل رونویسی bHLH و مسیرهای بیوسنتزی سزکویی‌ترین-لاکتون‌ها در آفتابگردان را پر کرده و می‌تواند منبعی ارزشمند برای محققان باشد و زمینه توسعه راهبردهای نوین در بهبود مقاومت گیاه، مدیریت پایدار آفات و بهره‌برداری دارویی از این ترکیبات را فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

تحلیل ترنسکریپتوم

برای شناسایی عوامل رونویسی مرتبط با ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین‌لاکتون‌ها، داده‌ها RNA-seq عمومی از برگ آفتابگردان تحت تیمار با متیل‌جاسمونات، آبسزیک‌اسید و سالیسیلیک‌اسید از آرشیو NCBI (SRA, SRP092742) دریافت شد. کتابخانه‌های RNA-seq به صورت unstranded بودند. کنترل کیفیت اولیه خوانش‌های خام با ابزار 123fastq شامل حذف آداپتورها و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین ($Q < 30$) و حذف خوانش‌های کوتاه‌تر از ۵۰ جفت باز انجام شد (Eidi et al., 2024). خوانش‌های سالم با HISAT2 (Kim et al., 2019) v2.2.1 به ژنوم مرجع آفتابگردان (HanXRQR2.0) (Badouin et al., 2017) SUNRISE هم‌تراز شدند. فایل‌های SAM حاصل با SAMtools (Li et al., 2009) به BAM تبدیل و مرتب‌سازی شدند. سنجش کمیت خوانش‌ها در سطح ژن با featureCounts (Liao et al., 2014) تحت تنظیمات unstranded انجام شد. برای حذف ژن‌های کم بیان، ژن‌هایی که $CPM < 1$ در بیش از دو نمونه داشتند فیلتر شدند. سپس شمارش‌ها با استفاده از تبدیل variance-stabilizing در بسته DESeq2 نرمال‌سازی شدند و برای تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

ساخت شبکه هم‌بیان ژن‌ها

برای شناسایی ژن‌های کاندید عوامل رونویسی bHLH، تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزنی با بسته WGCNA در R v4.4.0 تحت تیمارهای متیل‌جاسمونات، آبسزیک‌اسید و سالیسیلیک‌اسید به‌طور جداگانه انجام شد (Fasoli et al.,

جزئی همبستگی میان ژن‌ها را فراهم می‌آورد و از حذف ناخواسته ارتباطات ضعیف جلوگیری می‌کند به گونه‌ای که با وزن‌دهی پیوسته به ارتباطات، حساسیت و پایداری بیشتری در شناسایی ماژول‌ها و ژن‌های کلیدی فراهم می‌کند. همچنین این روش با خلاصه‌سازی بیان ژن‌ها در قالب eigengene، امکان ارتباط ماژول‌ها با صفات فنوتیپی و ویژگی‌های بیولوژیکی را ساده‌تر می‌کند و می‌تواند ژن‌های بالقوه برای مطالعات عملکردی و مهندسی ژنتیکی را مشخص کند. با وجود کارایی بالای روش تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزنی در شناسایی ماژول‌های عملکردی و ژن‌های کلیدی، این رویکرد با محدودیت‌هایی همراه است که تفسیر و صحت نتایج را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نخست آنکه این روش عمدتاً بر پایه همبستگی بیان ژن‌ها عمل می‌کند؛ بدین معنا که وجود یک رابطه هم‌زمانی لزوماً نشان‌دهنده تعامل مستقیم تنظیمی نیست. در نتیجه، ژن‌های هم‌بیان لزوماً در یک مسیر مولکولی مشترک قرار ندارند و ممکن است تحت تأثیر عوامل خارجی یا نویز تجربی قرار گرفته باشند (Burns et al., 2022). افزون بر این، انتخاب پارامترهای کلیدی همچون توان نرم‌سازی (soft-thresholding power) و معیارهای خوشه‌بندی می‌تواند ساختار شبکه و تعداد ماژول‌های شناسایی‌شده را تغییر دهد و این موضوع نیازمند بهینه‌سازی دقیق و ارزیابی حساسیت است. با وجود این محدودیت‌ها، تحلیل هم‌بیانی ژنی وزنی همچنان یکی از قدرتمندترین و پرکاربردترین ابزارها در تحلیل ترنسکریپتوم برای بررسی مسیرهای تنظیمی پیچیده و شبکه‌های ژنی مرتبط با متابولیت‌های ثانویه مانند سزکویی‌ترین‌لاکتون‌ها محسوب می‌شود (Burns et al., 2022).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که خانواده bHLH در آفتابگردان تنوع بالایی دارد و برخی ژن‌ها مانند HabHLH024 و HabHLH159 تحت تنش خشکی القا می‌شوند (Li et al., 2021). در مطالعه دیگری گزارش شد که در خطوط خودناسازگار آفتابگردان، بیان کاهشی این ژن‌ها تحت خشکسالی غالب بوده و پاسخ ژنتیکی می‌تواند بین گونه‌ها و واریته‌ها متفاوت باشد (Wu et al., 2022). با این حال پژوهش حاضر بر نقش اختصاصی این فاکتورها در تنظیم ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین‌لاکتون‌ها متمرکز شده است.

فیلوژنتیک، توالی‌های پروتئینی ژن‌های bHLH در اراییدوپسیس از پایگاه داده TAIR بازیابی شدند (Wu *et al.*, 2021). تراز چندتایی توالی‌های آمینواسیدی با استفاده از الگوریتم MUSCLE در نرم‌افزار MEGA v12 انجام شد (Jindal & Ali, 2025). بازسازی درخت فیلوژنتیک با روش Neighbor-Joining، مدل جایگزینی Poisson و حذف جفتی شکاف‌ها صورت گرفت، پشتیبانی آماری هر گره از طریق تحلیل bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد. درخت فیلوژنتیک بدون ریشه حاصل، به‌عنوان چارچوبی برای رده‌بندی اعضای خانواده bHLH در مقایسه با همولوگ‌های آن‌ها در اراییدوپسیس مورد استفاده قرار گرفت.

ساختار اگزون-اینترون ژن‌های کاندید bHLH با استفاده از ابزار آنلاین Gene Structure Display Server (GSDS) تجسم شد (Sultana *et al.*, 2025). موتیف‌های محافظت‌شده با بهره‌گیری از ابزار MEME Suite با حداقل و حدکثر طول به ترتیب ۱۰ و ۱۰۰ آمینواسید شناسایی شدند (Chen *et al.*, 2020). در مجموع، ۵ موتیف محافظت‌شده با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض آنالیز شدند. توزیع اسیدآمینوهای زمین‌های bHLH در آفتابگردان با استفاده از نرم‌افزار WebLogo و با پارامترهای پیش‌فرض به‌دست آمد.

نتایج و بحث

شناسایی ماژول‌های هم‌بیان مرتبط با ژن‌های کلیدی

سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان

برای شناسایی عوامل رونویسی bHLH به‌عنوان کاندیدهای احتمالی ژن‌های کلیدی *HaCOS*، *HaGAO*، *HaGAS* و *HaG8H* مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون در آفتابگردان، یک تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزنی با استفاده از بسته WGCNA در محیط Rv4.4.0 انجام شد. مجموعه داده‌های RNA-seq از برگ آفتابگردان، تحت سه نوع تیمار مختلف شامل متیل‌جاسمونات (MeJA)، آبسزیک‌اسید (Zhou *et al.*) و سالیسیلیک‌اسید (SA) استخراج شد و از آرشیو توالی‌های NCBI (با شماره دسترسی SRP092742) بازیابی گردید.

پس از نرمال‌سازی داده‌ها، در مجموع ۱۶۰۰ ژن برای ساخت شبکه حفظ شد. تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی وزنی با پارامترهای زیر انجام شد: واریانس بیان ژن < 0.05 ، میزان

(2018). برای این منظور داده‌های نرمال‌شده و با واریانس ثابت‌شده حاصل از مرحله قبل به‌عنوان ورودی WGCNA استفاده شدند و شبکه هم‌بیان از نوع signed network ساخته شد.

ماتریس مجاورت بر اساس همبستگی زوجی ژن‌ها (Pearson correlation) محاسبه شد و با انتخاب آستانه نرم مناسب، بر اساس معیار مقیاس آزاد بودن شبکه ($R^2 = 0.9$) در نظر گرفته شد که نشان‌دهنده تطابق بالای شبکه با الگوی مقیاس آزاد است. 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 *HaG8H*، *HaCOS*، *HaGAO*، *HaGAS* شناسایی شدند و ژن‌های bHLH هم‌بیان با آن‌ها استخراج و شبکه‌های هم‌بیان ژنی با Cytoscape v3.10.3 تجسم شدند.

تحلیل عناصر تنظیمی سیس در پروموتورهای ژن‌های

کلیدی بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها

توالی‌های پروموتور دو کیلوباز بالادست از ATG ژن‌های کلیدی *HaG8H*، *HaCOS*، *HaGAO*، *HaGAS* از پایگاه داده NCBI بازیابی شدند. زیرا مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اکثر موتیف‌ها و عناصر تنظیمی مهم در پروموتورهای نزدیک به ژن‌ها متمرکز هستند (Schmitz *et al.*, 2022). شناسایی و حاشیه‌نویسی عناصر تنظیمی سیس با استفاده از پایگاه داده PlantCARE انجام شد (Maqsood *et al.*, 2022). تا موتیف‌های تنظیمی رونویسی پیش‌بینی گردید. برای اطمینان از صحت پیش‌بینی موتیف‌ها، نتایج به‌دست آمده با داده‌های موجود در PLACE و PlantPAN مقایسه شدند. علاوه بر این، موتیف‌های اختصاصی مربوط به این خانواده تنظیمی نیز بر اساس شواهد گزارش شده در مقالات مربوط به گونه‌های خانواده آستراسه بررسی شدند. توزیع مکانی و نمایش گرافیکی با بهره‌گیری از نرم‌افزار TBtools تولید شد تا تصویر دقیقی از چارچوب تنظیمی بالقوه کنترل‌کننده بیوسنتزی در آفتابگردان ارائه دهد.

رده‌بندی فیلوژنتیک، ساختار ژن و موتیف‌های

محافظت‌شده عوامل رونویسی bHLH

بر اساس نتایج WGCNA، ۱۳ ژن bHLH در آفتابگردان شناسایی و برای بررسی روابط تکاملی و رده‌بندی

اسید (*diumpurple1*) (شکل ۱B) و در سالیسیلیک اسید (*black*) (شکل ۱C) بودند. در این ماژول‌ها علاوه بر ژن‌هایی با عملکردهای متفاوت، در مجموع ۱۳ ژن عامل رونویسی متعلق به خانواده bHLH نیز حضور داشتند. الگوی هم‌بیانی میان این ژن‌ها احتمال وجود یک ارتباط عملکردی یا مشارکت مشترک در پاسخ‌های رشدی و محیطی را مطرح می‌کند. با این حال، WGCNA تنها همبستگی را نشان می‌دهد و برای تأیید مسیرهای تنظیمی مستقیم نیاز به مطالعات تجربی اضافی است. برای بررسی دقیق‌تر این تعاملات، با بهره‌گیری از نرم‌افزار Cytoscape شبکه‌ای از روابط میان ژن‌های کلیدی و عوامل رونویسی bHLH بازسازی شد (شکل ۲A).

تحلیل عناصر تنظیمی وابسته به پروموتور ژن‌های

کلیدی سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان

به‌منظور شناسایی جایگاه‌های اتصال عوامل رونویسی که پیش‌تر در گیاهان تأیید شده بودند، ناحیه ۲ کیلوباز بالادست پروموتور ژن‌های GAS، GAO، COS، و G8H با پایگاه‌های PlantCARE، PLACE، و PlantPAN بررسی و حضور موتیف‌های W-box، E-box، ABRE، و GARE را نشان داد (شکل ۲B) که جایگاه اتصال عوامل رونویسی WRKY و bHLH هستند (Matías-Hernández *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2015)

تحلیل اختصاصی ژن‌ها نشان داد که تراکم W-box در ژن‌های مختلف متفاوت بود؛ به‌ویژه در HaGAS و HaCOS بیشترین تعداد جایگاه را داشتند (به ترتیب ۱۱ و ۶)، این تنوع نشان می‌دهد که HaGAS و HaCOS ممکن است تحت کنترل مستقیم‌تر WRKY قرار داشته باشند.

داده‌های مفقود برای هر ژن < 0.1 ، توان آستانه نرم برابر با ۱۱ (بر اساس معیار توپولوژی بدون مقیاس) و ارتفاع ادغام ماژول‌ها برابر با ۰.۲۵. این تنظیمات امکان شناسایی ماژول‌های هم‌بیان زیستی مرتبط با مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون و مسیرهای پاسخ به تنش را فراهم کرد.

تعداد ماژول‌های هم‌بیان شناسایی شده در پاسخ به هر تیمار متفاوت بود: بیشترین تعداد ماژول در تیمار متیل‌جاسمونات (۳۵ ماژول) و سالیسیلیک اسید (۲۹ ماژول) و کمترین آبسزیک‌اسید (۲۴ ماژول) مشاهده شد. این تفاوت بیانگر تنوع بالای الگوهای تنظیمی در شرایط مختلف هورمونی است (شکل ۱A,B,C). این ماژول‌ها زمینه مناسبی برای شناسایی ژن‌های کاندید bHLH و تحلیل شبکه‌های هم‌بیانی مرتبط فراهم کردند.

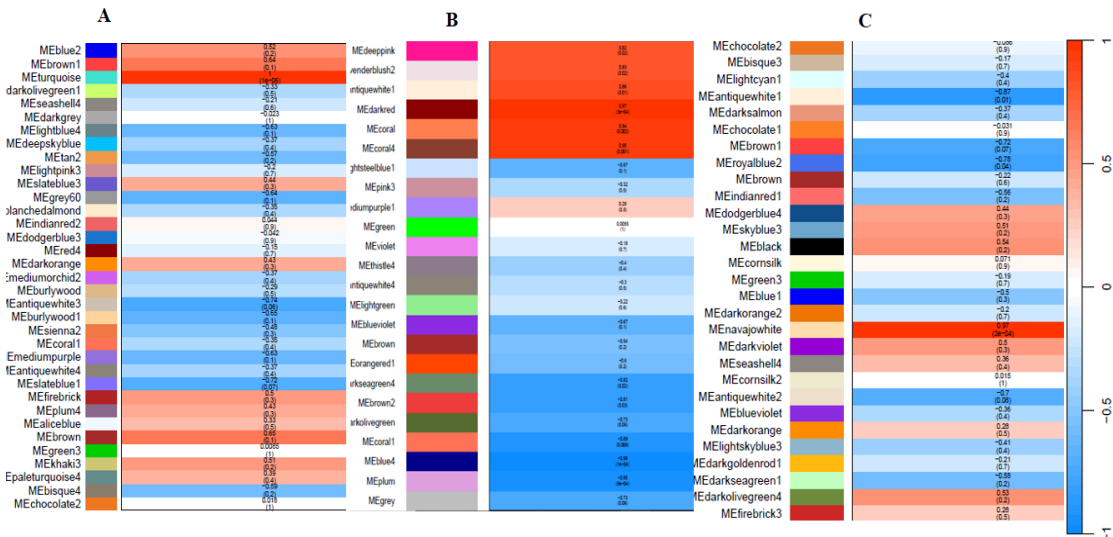
تحلیل WGCNA چندین ماژول هم‌بیانی را شناسایی کرد که به‌طور معنی‌داری با تیمارهای هورمونی مرتبط بودند (جدول ۱). در پاسخ به MeJA، ماژول‌های *brown1* *blue2*، *firebrick* و *turquoise* همبستگی مثبت و قابل توجهی نشان دادند. ماژول *turquoise* با $r = 1$ و $p = 1 \times 10^{-6}$ قوی‌ترین ارتباط را داشت و احتمالاً یک خوشه ژنی کلیدی را در مسیر سیگنالینگ جاسمونات نمایندگی می‌کند.

در تیمار ABA، چندین ماژول از جمله *deppink*، *coral*، *darkred*، *antiquewhite1*، *blenderblush2* و *coral4* با ضرایب همبستگی بالا (۰/۸۲ تا ۰/۹۷) شناسایی شدند. ماژول *darkred* ($r = 0.97$ ، $p = 3 \times 10^{-4}$) برجسته‌ترین پاسخ را نشان داد که بیانگر نقش احتمالی آن در تنظیم مسیرهای وابسته به ABA مانند تحمل تنش و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با استرس است.

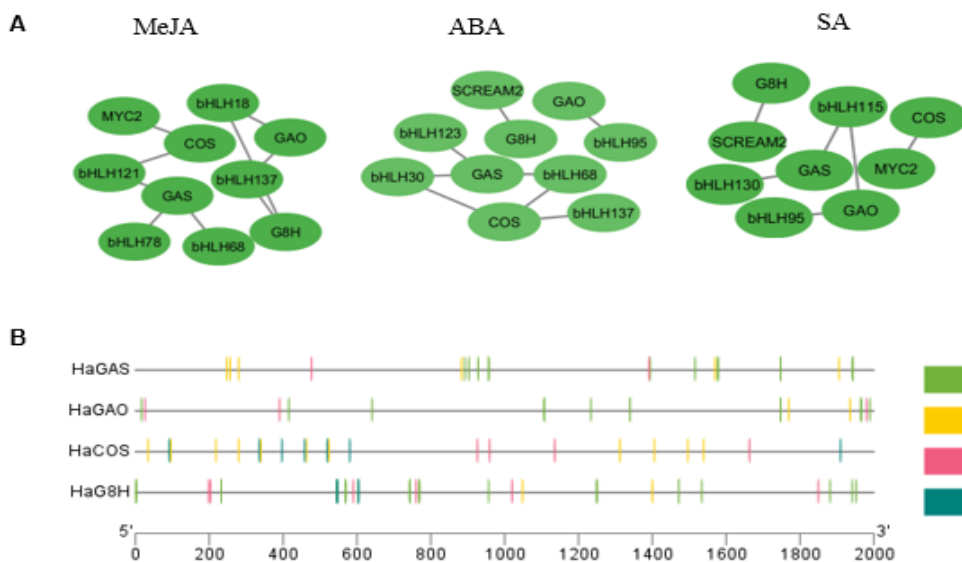
در مورد SA، چهار ماژول *black*، *skyblue3*، *dadgerblue4* و *navajowithe* به‌طور معنی‌داری با این هورمون مرتبط بودند. ماژول *navajowithe* ($r = 0.97$ ، $p = 2 \times 10^{-4}$) قوی‌ترین همبستگی را نشان داد و احتمالاً در تنظیم مسیرهای دفاعی وابسته به سالیسیلیک اسید نقش دارد.

در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که هر هورمون مجموعه‌ای متمایز از ماژول‌های هم‌بیانی را فعال می‌کند و ماژول‌های با همبستگی بالا می‌توانند ژن‌های مرکزی مهمی را در مسیرهای دفاعی و تنظیمی گیاه معرفی کنند.

ماژول‌های حاوی ژن‌های کلیدی در تیمار متیل‌جاسمونات (*turquoise*) (شکل ۱A)، در آبسزیک



شکل ۱- ماژول‌های شناسایی شده در تحلیل همبندی ژنی مرتبط با تیمارهای هورمونی (A) متیل جاسمونات، (B) آبسیزیک اسید و (C) سالیسیلیک اسید. نمودارهای حرارتی میزان همبستگی میان ماژول‌های همبندی ژنی و هر تیمار هورمونی را نشان می‌دهند. شدت رنگ بیانگر ضریب همبستگی است؛ رنگ قرمز نشان‌دهنده همبستگی مثبت و رنگ آبی بیانگر همبستگی منفی می‌باشد.



شکل ۲- (A) شبکه‌های همبندی ژنی عوامل رونویسی bHLH و ژن‌های کلیدی *HaGAS*، *HaGAO*، *HaCOS* و *HaG8H* تحت تیمارهای مختلف شامل متیل جاسمونات، (MeJA)، آبسیزیک اسید (Zhou et al.) و سالیسیلیک اسید (Bassolino et al.). (B) توزیع و جایگاه عناصر

متابولیکی را به شبکه‌های پاسخ به تنش پیوند می‌دهند. با این حال تعیین نقش مستقیم آنها نیازمند ارزیابی‌های عملکردی در مطالعات آینده است. موتیف‌های E-box جایگاه اتصال فاکتورهای bHLH می‌باشند. نتایج تحلیل پروموتور ژن‌های کلیدی سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان نشان داد که ژن *HaG8H* بیشترین تعداد جایگاه (۲۱) را داشت، در حالی که *HaGAS* و *HaGAO* هر کدام ۱۳ جایگاه و *HaCOS* فاقد E-box بود. از این رو نسبت دادن تنظیم مستقیم *HaCOS* به bHLH

شواهد قبلی نیز این نقش را تأیید می‌کنند، به طوری که بیش‌بیان ژن‌های *AaWRKY4* و *AaWRKY17* در *annua* باعث افزایش بیان ژن‌های کلیدی و تجمع آرتمی‌زینین شد (Chen et al., 2021; Huang et al., 2021). همچنین، *SmWRKY1* در *Salvia miltiorrhiza* بیوسنتز تانیشینون را فعال می‌کند (Alfieri et al., 2018). در مجموع، این نتایج نشان می‌دهند WRKYها با یکپارچه‌سازی معماری پروموتور، احتمالاً کنترل پویای ژن‌های سزکویی‌ترین لاکتون‌ها را بر عهده دارند و مسیرهای

در *HaG8H* (۴ جایگاه) یافت شد، در حالی که GARE (وابسته به جیبرلین) در تمامی ژن‌ها توزیع گسترده داشت (۲-۷ جایگاه) (شکل ۲B).

مستند نیست و احتمال می‌رود تنظیم آن به صورت غیرمستقیم و از طریق فاکتورهای واسطه، از جمله WRKYها انجام شود. موتیف‌های پاسخ‌دهنده به هورمون نیز اختصاصی بودند (ABRE وابسته به ABA) در *HaCOS* (۷ جایگاه) و

جدول ۱ - ارتباط‌های معنی‌دار ماژول-صفت شناسایی شده توسط WGCNA

Module	Trait	r	p-value
ME blue2	MeJA	0.62	0.02
ME brown1	MeJA	0.84	0.01
ME turquoise	MeJA	1	1.00E-06
ME firebrick	MeJA	0.5	0.03
ME brown	MeJA	0.65	0.1
ME deeppink	ABA	0.82	0.02
ME blenderblush2	ABA	0.83	0.02
ME intiquewhite1	ABA	0.86	0.01
ME darkred	ABA	0.97	3.00E-04
ME coral	ABA	0.94	0.002
ME coral4	ABA	0.95	0.001
ME dadgerblue4	SA	0.74	0.04
ME skyblue3	SA	0.61	0.03
ME black	SA	0.64	0.02
ME navajowithe	SA	0.97	2.00E-04
ME darkviolet	SA	0.6	0.03

است. تحلیل فیلوژنتیکی، ساختار ژن‌ها و ترکیب موتیف‌های عوامل رونویسی bHLH در آفتابگردان بر اساس نتایج تحلیل شبکه هم‌بیانی ژنی ۱۳ ژن bHLH به‌عنوان عوامل رونویسی هم‌بیان با ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان شناسایی شدند (شکل ۲A). برای ارزیابی روابط تکاملی، رده‌بندی فیلوژنتیک و نقش‌های احتمالی این ژن‌ها، توالی‌های آمینواسیدی ۲۲۵ ژن bHLH در آرآبیدوپسیس از پایگاه داده TAIR بازیابی شد. تراز چندتایی توالی‌های آمینواسیدی با استفاده از الگوریتم ClustalW در نرم‌افزار v12 MEGA انجام شد (Li et al., 2012). بازسازی درخت فیلوژنتیک با روش Neighbor-Joining، مدل جایگزینی پویسون و حذف جفتی شکاف‌ها صورت گرفت، پشتیبانی آماری هر گره از طریق تحلیل bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد. درخت فیلوژنتیک بدون ریشه حاصل، به‌عنوان چارچوبی برای رده‌بندی اعضای خانواده bHLH در مقایسه با همولوگ‌های آن در آرآبیدوپسیس مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳).

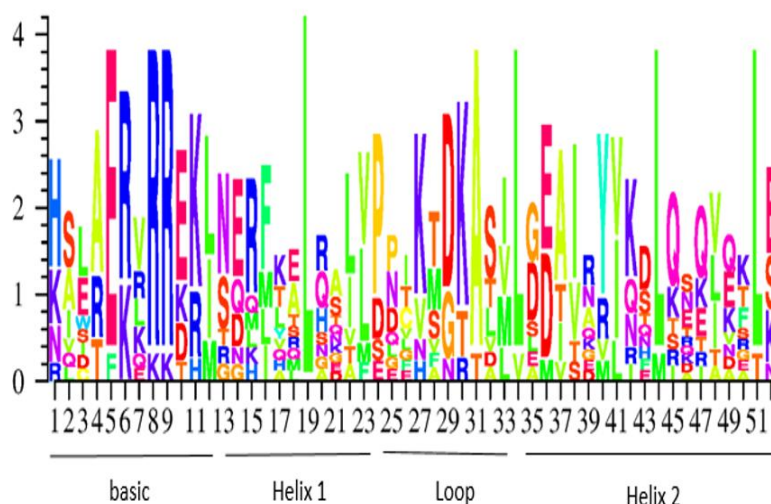
این الگو بیانگر حساسیت متفاوت ژن‌ها به تنظیم bHLH و احتمال وجود مسیرهای تنظیمی جایگزین است. این نتایج با یافته‌های قبلی در *A. annua* همخوانی دارند؛ جایی که پروموتور ژن‌های *ADS* و *CYP71AV1* حاوی چندین جایگاه bHLH هستند و بیش‌بیان *AaMYC2* باعث افزایش آرتمیزینین می‌شود (Majid et al., 2019). همچنین، عوامل *PbbHLH4* در *Phalaenopsis*، *BpMYC4* و *BpbHLH9* در *Betula platyphylla* و *AabHLH112* در *A. annua* تولید ترپن‌ها، از جمله سزکویی‌ترین لاکتون‌ها را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهند (Xiang et al., 2022). در مجموع، نتایج نشان می‌دهند که bHLHها به‌عنوان عوامل بالقوه کلیدی در تنظیم بیوسنتز ترپنوئیدها، به‌ویژه مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها در آفتابگردان مطرح هستند و می‌توانند چارچوبی مناسب برای تحلیل‌های عملکردی و مهندسی ژنتیکی هدفمند ترکیبات ترپنی فراهم کنند. با این حال، تعیین تعامل مستقیم نیازمند انجام آزمون‌های عملکردی و اتصال پروتئین - DNA در مطالعات آینده

در زمینه توسعه و رشد گیاه، ژن XP_035836166.1 با AT1G12860.1 نقش گسترده‌ای در توسعه ریشه‌های جانبی، رشد جنین، رسیدگی میوه و تراکم تریکوم‌ها دارد (Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2022). علاوه بر این، ژن XP_022009808.1 با AT2G41130 خوشه‌بندی شده و با تحمل به تنش شوری و شکل‌گیری رنگ گل مرتبط است (Ahmad *et al.*, 2015). این نتایج بیانگر کارکردهای متنوع bHLHها در پیوند متابولیسم ثانویه با رشد و سازگاری گیاه است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که عوامل *AaMYC2-like* و *Aa6119* با اتصال مستقیم به جایگاه‌های E-box در پروموتور ژن‌های کلیدی بیوسنتز آرتمیزینین عمل می‌کنند، در حالی که *AabHLH112* به‌طور غیرمستقیم و از طریق اتصال به *AabHLH113* تولید آرتمیزینین را افزایش می‌دهد (Hurrah *et al.*, 2025; Majid *et al.*, 2019; Mohammad *et al.*, 2023; Xiang *et al.*, 2022). در این مطالعه، تحلیل پروموتور ژن‌های سزکویی‌ترین لاکتون‌ها نشان داد که به جز *HaCOS*، سایر ژن‌ها دارای تعداد قابل توجهی جایگاه E-box هستند. بر اساس نتایج این مطالعه بررسی فیلوژنتیکی نشان داد که ژن‌های XP_022039009.1 و XP_022037671.1 با XP_035836166.1 و XP_022017352.1 با AT4G34530، AT3G19500، AT1G32640 و AT1G12860.1 در آرایی‌دوپیسیس هم‌خوشه شده‌اند که این الگوی خوشه‌بندی مشابه ژن‌های *AaMYC2*، *AaMYC2-like* و *Aa6119* است. تنظیم‌کننده‌های ژن‌های کلیدی در *A. annua* هستند (Hurrah *et al.*, 2025; Mohammad *et al.*, 2023). این شباهت‌های تکاملی حاکی از حفاظت عملکردی میان گونه‌ها بوده و نشان می‌دهد این ۴ ژن bHLH آفتابگردان با توجه به حضور در DEGs، شدت همبستگی با ژن‌های هدف (وزنی بین صفر و یک)، و وجود جایگاه‌های E-box (به جز *HaCOS* که احتمال تنظیم غیرمستقیم دارد)، به‌عنوان کاندیدهای بالقوه تنظیم‌کننده مسیر سزکویی‌ترین لاکتون‌ها مطرح می‌شوند. پیش‌بینی می‌شود که این تنظیم از طریق سازوکارهای رونویسی محافظت‌شده و شبکه‌های تنظیمی مرتبط رخ دهد، هر چند اعتبارسنجی نقش مستقیم آن‌ها مستلزم آزمون‌های عملکردی آینده است.

نتایج نشان داد که ژن‌های XP_022021551.1 و XP_022039426.1 به‌ترتیب با AT3G19860 و AT3G19500 هم‌خوشه بوده و در جذب آهن، محافظت از گیاه در برابر سمیت آن و همچنین فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی و مرگ سلولی مشابه HR نقش دارند (Gao *et al.*, 2020; Hussain *et al.*, 2021). ژن XP_022039009.1 با AT1G32640 هم‌خانواده است و از طریق اتصال به پروموتور ژن‌های *TPS11* و *TPS21*، تولید و انتشار سزکویی‌ترین‌ها، به‌ویژه β -caryophyllene، را افزایش می‌دهد (Hong *et al.*, 2016). ژن‌های XP_022037671.1 و XP_022017352.1 با AT4G34530 و AT4G29100 هم‌خانواده بوده و در تنظیم گلدهی و مقاومت به خشکی و گرما مشارکت دارند (Ikeda *et al.*, 2021; Le Hir *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2025). ژن XP_022031041.1 با ژن AT1G49770 (RGE1) هم‌خوشه بوده که تنظیم‌کننده رشد جنین است به‌طوری‌که کاهش عملکرد آن به جنین‌های کوچک و افزایش بیان آن در برنج به جنین‌های بزرگ منجر می‌شود (Nallamilli *et al.*, 2013). ژن XP_021974034.1 با ژن At2g22770 هم‌خانواده است که یک فاکتور bHLH با نام NAL1 را کد می‌کند و در تشکیل ساختار ER شبکه آندوپلاسمی نقش دارد (Basak *et al.*, 2022). ژن XP_022016699.1 با AT5G54680 (bHLH105) گروه‌بندی شده که یک فاکتور رونویسی مرکزی در آرایی‌دوپیسیس است که با فعال‌سازی ژن‌های پاسخ‌دهنده به کمبود آهن و مه‌پار ژن‌های مرتبط با ذخیره‌سازی و هموستازی آهن، نقش دوگانه‌ای در کنترل هموستازی آهن ایفا می‌کند و شبکه تنظیمی این فلز در گیاه را یکپارچه می‌سازد (Tissot *et al.*, 2019). ژن XP_021977951.1 با AT3G07340 (CIB3) گروه‌بندی شده به‌طوری‌که CIB3 نقش چندگانه‌ای در گیاهان دارد؛ این ژن هم به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مهم زمان گل‌دهی عمل می‌کند، به‌طوری‌که بیان آن در گیاهان تراریخته باعث گل‌دهی زودهنگام و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فتوسنتز مانند FT و GI می‌شود، و هم یکی از اهداف اصلی TGA1 است که بیان آن توسط TGA1 به‌طور مستقیم تنظیم می‌شود، نشان‌دهنده مشارکت آن در مسیرهای سیگنال‌دهی نوری و تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به نور است (Swift *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2021).

به طور خلاصه، حفاظت فیلوژنتیکی فاکتورهای bHLH در آفتابگردان، در کنار ارتولوگ‌های دارای کارکرد شناخته شده در *A. thaliana* و *A. annua*، بر نقش بالقوه آن‌ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی در بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها دلالت دارد. انجام اعتبارسنجی‌های عملکردی با استفاده از آزمون‌های گزارشگر دوگانه لوسیفراز (dual-luciferase reporter assay) می‌تواند بینش‌های مکانیکی ارزشمندی در خصوص تعامل این فاکتورها با پروموتورها فراهم آورده و مسیر توسعه راهبردهای نوین در مهندسی متابولیک برای بهبود کارایی بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها را هموار سازد.

در موقعیت‌های ۶، ۸ و ۹ مشخص می‌شود. دمین دایمیریزاسیون پروتئین شامل بخشی متشکل از حدود ۴۰ اسیدآمینه حفاظتی که ناحیه هلیکس ۱-لوپ-هلیکس ۲ (HLH) را تشکیل می‌دهد. نواحی هر دو هلیکس با اسیدهای آمینه آب‌گریز حفاظتی مانند ایزولوسینپ (I)، لوسین (L) و والین (Bassolino *et al.*) مشخص می‌شوند. لوپ، که بعد از یک اسیدآمینه حفاظتی پرولین (P) شروع می‌شود و دو هلیکس را از هم جدا می‌کند مشابه با آنچه در بیشتر bHLH‌های گیاهی وجود دارد (Pires & Dolan, 2010)، به طور کلی طول متغیری دارد و در آفتابگردان ۹ اسیدآمینه طول دارد که یک اسیدآمینه لیزین (K) حفاظتی در آن دیده می‌شود.



شکل ۵- لوگوی توالی‌های اجماعی زیرخانواده bHLH. ارتفاع ستون‌ها میزان حفاظت و حروف بزرگ بیش از ۵۰٪ حفاظت را نشان می‌دهند.

و ساختار پروتئینی، عملکرد حفاظت‌شده این bHLH‌ها را در میان گونه‌های گیاهی مختلف تأیید نمود و چهار ژن bHLH بر اساس معیارهای کمی (شدت همبستگی با ژن‌های هدف، حضور در DEGs و E-box) شناسایی و به عنوان تنظیم‌کننده‌های بالقوه مسیر معرفی شدند. این یافته‌ها نقش مهم bHLH‌ها در هماهنگی پاسخ‌های دفاعی و مسیرهای بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها را نشان می‌دهند و چارچوبی برای مطالعات عملکردی و مهندسی ژنتیک هدفمند برای بهبود تولید ترکیبات ترپنی با اهمیت دارویی، کشاورزی و بوم‌شناختی فراهم می‌کند.

سپاسگزاری

از دانشگاه کردستان به خاطر فراهم کردن بودجه این پژوهش، قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه با استفاده از تحلیل هم‌بیانی ژنی وزنی و تلفیق رویکردهای بیوانفورماتیکی، شبکه‌های تنظیمی دخیل در پاسخ آفتابگردان به تیمارهای متیل جاسمونات، آبسزیک‌اسید و سالیسیلیک‌اسید بررسی شد. نتایج نشان داد که عوامل رونویسی خانواده bHLH با نقش محوری و حفاظت‌شده، به‌ویژه از طریق اتصال به موتیف‌های E-box، به عنوان تنظیم‌کننده بالقوه ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز سزکویی‌ترین لاکتون‌ها (*HaG8H*, *HaGAS*, *HaGAO*, *HaCOS*) و *HaG8H*) مطرح هستند. همبستگی این ژن‌ها با موتیف‌های هورمون‌پاسخ‌دهنده (ABRE و GARE) و حضور گسترده W-box‌ها نیز بیانگر شبکه‌ای پیچیده و چندلایه از تعاملات میان سیگنال‌های رشدی و دفاعی است. تحلیل فیلوژنتیک

منابع

- Alfieri, M., Vaccaro, M. C., Cappetta, E., Ambrosone, A., De Tommasi, N., & Leone, A. (2018). Coactivation of MEP-biosynthetic genes and accumulation of abietane diterpenes in *Salvia sclarea* by heterologous expression of WRKY and MYC2 transcription factors. *Scientific Reports*, 8(1), 11009. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29389-4>
- Álvarez-Calero, J. M., Ruiz, E., López-Pérez, J. L., Jaraiz, M., Rubio, J. E., Jorge, Z. D., Suarez, M., & Massanet, G. M. (2018). 15-Hydroxygermacranolides as sources of structural diversity: synthesis of sesquiterpene lactones by cyclization and rearrangement reactions. Experimental and DFT study. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(10), 5480-5495. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00407>
- Amrehn, E., Aschenbrenner, A.-K., Heller, A., & Spring, O. (2016). Localization of sesquiterpene lactone biosynthesis in cells of capitate glandular trichomes of *Helianthus annuus* (Asteraceae). *Protoplasma*, 253(2), 447-455. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0823-4>
- Badouin, H., Gouzy, J., Grassa, C. J., Murat, F., Staton, S. E., Cottret, L., Lelandais-Brière, C., Owens, G. L., Carrère, S., & Mayjonade, B. (2017). The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature*, 546(7656), 148-152. <https://doi.org/10.1038/nature22380>
- Basak, A. (2022). *ER bodies and their impact in shaping root microbiota*. <https://doi.org/10.1038/nature22380>
- Bassolino, L., Buti, M., Fulvio, F., Pennesi, A., Mandolino, G., Milc, J., Francia, E., & Paris, R. (2020). In silico identification of MYB and bHLH families reveals candidate transcription factors for secondary metabolic pathways in *Cannabis sativa* L. *Plants*, 9(11), 1540. <https://doi.org/10.3390/plants9111540>
- Burns, J. J., Shealy, B. T., Greer, M. S., Hadish, J. A., McGowan, M. T., Biggs, T., Smith, M. C., Feltus, F. A., & Ficklin, S. P. (2022). Addressing noise in co-expression network construction. *Briefings in bioinformatics*, 23(1). <https://doi.org/10.1093/bib/bbab495>
- Castillon, A., Shen, H., & Huq, E. (2007). Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in plant science*, 12(11), 514-521. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.001>
- Chang, S., Li, Q., Huang, B., Chen, W., & Tan, H. (2023). Genome-wide identification and characterisation of bHLH transcription factors in *Artemisia annua*. *BMC plant biology*, 23(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04063-8>
- 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, T., Li, Y., Xie, L., Hao, X., Liu, H., Qin, W., Wang, C., Yan, X., Wu-Zhang, K., & Yao, X. (2021). AaWRKY17, a positive regulator of artemisinin biosynthesis, is involved in resistance to *Pseudomonas syringae* in *Artemisia annua*. *Horticulture Research*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>
- 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. <https://doi.org/10.1101/2024.03.08.584032>
- 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. <https://doi.org/10.5194/gmd-11-2813-2018>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00126>
- Galisteo, A., Pérez Rodríguez, Á., González, A., Barrero, A. F., & Quílez del Moral, J. F. (2024). Terpenoid diversity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and their potential in crop protection. *Phytochemistry Reviews*, 23(3), 583-623. <https://doi.org/10.1007/s11101-023-09903-x>
- Guo, J., Sun, B., He, H., Zhang, Y., Tian, H., & Wang, B. (2021). Current understanding of bHLH transcription factors in plant abiotic stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4921. <https://doi.org/10.3390/ijms22094921>
- Guo, X.-J., & Wang, J.-R. (2017). Global identification, structural analysis and expression characterization of bHLH transcription factors in wheat. *BMC plant biology*, 17(1), 90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00003-8>
- Hong, J. C. (2016). General aspects of plant transcription factor families. In *Plant transcription factors*, 35-56. Elsevier. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02049-8>
- Huang, H., Xing, S., Tang, K., & Jiang, W. (2021). AaWRKY4 upregulates artemisinin content through boosting the expressions of key enzymes in artemisinin biosynthetic pathway. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146(1), 97-105. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02049-8>
- Hurrah, I. M., Kumar, A., & Abbas, N. (2025). Synergistic interaction of AaMYC2 and AaMYC2-LIKE enhances artemisinin production in *Artemisia annua* L. *Journal of Biotechnology*, 402, 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2025.03.007>

- Jindal, S., & Ali, A. (2025). First detection and identification of southern tomato virus infecting tomatoes in Oklahoma with complete genome characterization and insights into global genetic diversity. *Viruses*, 17(9), 1193. <https://doi.org/10.3390/v17091193>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- 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. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, J., Li, X., Han, P., Liu, H., Gong, J., Zhou, W., Shi, B., Liu, A., & Xu, L. (2021). Genome-wide investigation of bHLH genes and expression analysis under different biotic and abiotic stresses in *Helianthus annuus* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.072>
- 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers295>
- 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. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Majdi, M., Liu, Q., Karimzadeh, G., Malboobi, M. A., Beekwilder, J., Cankar, K., de Vos, R., Todorović, S., Simonović, A., & Bouwmeester, H. (2011). Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry*, 72(14-15), 1739-1750. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.021>
- Majid, I., Kumar, A., & Abbas, N. (2019). A basic helix loop helix transcription factor, AaMYC2-Like positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products*, 128, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.083>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1031679>
- 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. <https://doi.org/10.1111/tpj.13509>
- Mohammad, H., Hurr, I. M., Kumar, A., & Abbas, N. (2023). Synergistic interaction of two bHLH transcription factors positively regulates artemisinin biosynthetic pathway in *Artemisia annua* L. *Physiologia plantarum*, 175(1), e13849. <https://doi.org/10.1111/pp1.13849>
- Nallamilli, B. R. R., Zhang, J., Mujahid, H., Malone, B. M., Bridges, S. M., & Peng, Z. (2013). Polycomb group gene OsFIE2 regulates rice (*Oryza sativa*) seed development and grain filling via a mechanism distinct from *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 9(3), e1003322. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003322>
- Nouri, M.-Z., Moumeni, A., & Komatsu, S. (2015). Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20392-20416. <https://doi.org/10.3390/ijms160920392>
- Pires, N., & Dolan, L. (2010). Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular biology and evolution*, 27(4), 862-874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp288>
- Schmitz, R. J., Grotewold, E., & Stam, M. (2022). Cis-regulatory sequences in plants: their importance, discovery, and future challenges. *The Plant Cell*, 34(2), 718-741. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab281>
- Serin, E. A., Nijveen, H., Hilhorst, H. W., & Ligterink, W. (2016). Learning from co-expression networks: possibilities and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 7, 444. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00444>
- 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. <https://doi.org/10.1111/nph.13874>
- Spring, O. (2021). Sesquiterpene lactones in sunflower oil. *Lwt*, 142, 111047. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111047>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03409-y>
- Sultana, M., Tayyab, M., Sunil, Parveen, S., Hussain, M., Saeed, S., Riaz, Z., & Shabbir, S. (2025). In silico molecular characterization of TGF- β gene family in *Bufo bufo*: genome-wide analysis. *Journal of*

- Biomolecular Structure and Dynamics*, 43(12), 5834-5848.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2024.2313168>
- Swift, J., Alvarez, J. M., Araus, V., Gutiérrez, R. A., & Coruzzi, G. M. (2020). Nutrient dose-responsive transcriptome changes driven by Michaelis–Menten kinetics underlie plant growth rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(23), 12531-12540. <https://doi.org/10.1073/pnas.191861911>
- Tissot, N., Robe, K., Gao, F., Grant-Grant, S., Boucherez, J., Bellegarde, F., Maghiaoui, A., Marcelin, R., Izquierdo, E., & Benhamed, M. (2019). Transcriptional integration of the responses to iron availability in Arabidopsis by the bHLH factor ILR3. *New Phytologist*, 223(3), 1433-1446. <https://doi.org/10.1111/nph.15753>
- Wang, R., Zhao, P., Kong, N., Lu, R., Pei, Y., Huang, C., Ma, H., & Chen, Q. (2018). Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. *Genes*, 9(1), 54. <https://doi.org/10.3390/genes9010054>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111789>
- Wu, Y., Wang, Y., Shi, H., Hu, H., Yi, L., & Hou, J. (2022). Time-course transcriptome and WGCNA analysis revealed the drought response mechanism of two sunflower inbred lines. *PLoS one*, 17(4), e0265447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265447>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110920>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.973591>
- Xu, F., Tang, J., Wang, S., Cheng, X., Wang, H., Ou, S., Gao, S., Li, B., Qian, Y., & Gao, C. (2022). Antagonistic control of seed dormancy in rice by two bHLH transcription factors. *Nature genetics*, 54(12), 1972-1982. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01240-7>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.004>
- Zhang, Z., Chen, J., Liang, C., Liu, F., Hou, X., & Zou, X. (2020). Genome-wide identification and characterization of the bHLH transcription factor family in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Genetics*, 11, 570156. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.570156>
- Zhou, L., Lu, Y., Huang, J., Sha, Z., Mo, W., Xue, J., Ma, S., Shi, W., Yang, Z., & Gao, J. (2021). Arabidopsis CIB3 regulates photoperiodic flowering in an FKF1-dependent way. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 85(4), 765-774. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbaa120>
- Zhou, X., Liao, Y., Kim, S.-U., Chen, Z., Nie, G., Cheng, S., Ye, J., & Xu, F. (2020). Genome-wide identification and characterization of bHLH family genes from *Ginkgo biloba*. *Scientific reports*, 10(1), 13723. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69305-3>