مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۹۵-۸۷

مطالعه بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان

Study of Expression of Transcription Factors Associated with Resistance to Black Stem Disease in Sunflower

فرامرز هوشیاردل[۱]، حمید حاتمی ملکی[۲]، رضا درویش زاده[۱*] و مراد جعفری[۱]

Faramarz Hoshyardel[1], Hamid Hatami Maleki[2], Reza Darvishzadeh[1*], Morad Jafari[1]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، استاد و دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه.
۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه

1- M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Professor and Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnolgy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2-Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۳)

چکیده

ساقه سیاه از جمله مهمترین بیماری‌های قارچی آفتابگردان می باشد که عامل آن *Phoma macdonaldii* است. در این مطالعه، میزان تظاهر ژن‌های عوامل رونویسی HD-Zip، AP2 domain، MYB related، WRKY family و MYB family در ژنوتیپ‌های ENSAT-B5 (حساس به هر ۳ جدایه قارچ عامل بیماری)، AS613 (مقاوم به MP8، MP10 و حساس به MA6) و ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 (مقاوم به MA6، MP10 و حساس به MP8) آفتابگردان بعد از آلودگی با جدایه‌های MA6، MP8 و MP10 قارچ عامل بیماری و با روش RT-PCR کمی بررسی شد. در میان عوامل رونویسی مورد مطالعه، تظاهر سه عامل رونویسی AP2 domain، WRKY family و MYB family تفاوت معنی‌داری بین ترکیبات مختلف ژنوتیپ- جدایه نشان ندادند. تظاهر ژن‌های مربوط به دو عامل HD-Zip و MYB related در تمام ترکیبات ژنوتیپ- جدایه به طور معنی داری سرکوب شد اما میزان آن بسته به ترکیب ژنوتیپ- جدایه متفاوت بود. نتایج نشان داد که افزایش در سرکوب ژن HD-ZIP و کاهش در سرکوب ژن MYB-Related در ایجاد مقاومت ژنوتیپ AS613 به جدایه‌های MP8 و MP10 موثر است. در این تحقیق، ایجاد مقاومت در ژنوتیپ جهش یافته نسبت به جدایه های MA6 و MP10 با کاهش سرکوب ژن‌های HD-Zip وMYB related در ارتباط است.

واژه‌های کلیدی

آفتابگردان
ساقه سیاه
عوامل رونویسی
تظاهر ژن

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]

مقدمه

آفتابگردان زراعی (*Helianthus annuus* L.) گیاهی دو پایه، یک‌ساله، با مسیر فتوسنتزی سه کربنه از شاخه پیدازادان (Phanerogams)، زیرشاخه نهاندانگان (Angiosperms)، طبقه دولپه‌ای‌ها (Dicotyledon)، تیره آستراسه (Asteracea) و خانواده هلیانته‌آ (Helianteae) با ۲n=۲x=۳۴ کروموزوم است. این گیاه زراعی بیشتر بعنوان منبع پروتئین و روغن گیاهی در بسیاری از کشورها کشت می‌گردد (Hu *et al.* 2010). آفتابگردان به علت داشتن دوره‌ی رشدی کوتاه و سازگاری با شرایط مختلف آب و هوایی، به گیاهی مناسب جهت کشت در نواحی خشک و کم باران تبدیل شده است (Rauf, 2008). علاوه بر تنش‌های غیرزیستی، تنش‌های زیستی بویژه بیماری‌های گیاهی ناشی از عوامل قارچی از علل مهم کاهش محصولات کشاورزی در سراسر جهان می‌باشد. بیماری ساقه سیاه یکی از بیماری‌های مهم در آفتابگردان است که بوسیله قارچ *Phoma macdonaldii* ایجاد می‌شود (Sackston, 1992). این بیماری باعث ایجاد لکه‌های سیاه روی دمبرگ و طول ساقه شده و موجب کاهش ۱۰ الی ۳۰ درصدی عملکرد و همچنین باعث کاهش درصد روغن دانه می‌شود (Carson, 1991). کاهش محصول آفتابگردان بویژه زمانی که عامل بیماری‌زا موجب پیری زودرس گیاه شود، بسیار بالا است (Debaeke and Peres, 2003). همچنین آلودگی با قارچ عامل بیماری در رطوبت بالا و بعد از گلدهی بسیار شدید است (Gulya *et al.* 1997). استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم در مقابل این بیماری، یکی از اقتصادی‌ترین روش‌های کنترل آن است. تاکنون چندین ژنوتیپ آفتابگردان با سطوح مختلف مقاومت به این بیماری مشخص شده است، ولی هنوز ژنوتیپی با مقاومت کامل به بیماری ساقه سیاه شناسائی نگردیده است (Roustaee *et al.* 2000a). مطالعات اولیه نشان داده است که وراثت مقاومت به بیماری فوما در آفتابگردان پیچیده بوده و به صورت چندژنی کنترل می شود (Roustaee *et al.* 2000b). در مطالعات قبلی (Bert *et al.* 2004; Rachid Al-Chaarani *et al.* 2002) QTLهای مختلفی برای مقاومت جزئی به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان شناسایی گردیده است که تائید کننده وجود وراثت چندژنی است.

با توسعه روش‌های مولکولی، مطالعه خصوصیات ژن‌های گوناگون درگیر در مقاومت به بیماری‌ها و مکانیسم‌های دخیل در مقاومت تسهیل گردیده است. برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری، علاوه بر شناسایی و درک نقش ژن‌های مختلف باید با مکانیسم دفاعی گیاهان نیز آشنا بود. بطور کلی دفاع در گیاهان بر پایه پاسخ‌های دفاعی اولیه و پاسخ‌های القایی استوار است. این واکنش‌های اولیه، آغازگر شبکه‌های پیام‌رسانی بوده که سبب راه اندازی پاسخ‌های دفاعی سراسری می‌شوند (Grover and Gowthaman, 2003). از جمله فعال کننده‌های پاسخ دفاعی گیاه میزبان افزایش بیان ژن‌های مقاومت R می‌باشد که می‌توانند از رشد پاتوژن به سبب القا واکنش فوق حساسیت (Hypersensitive Response) و تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis Related Proteins) PR جلوگیری کنند و تولید سالیسیلیک اسید (Salicylic acid) SA ، اتیلن و فیتوالکسین‌ها که از دیگر فعال کننده‌های پاسخ‌های دفاعی گیاه هستند را افزایش داده و همچنین باعث استحکام دیواره سلولی و افزایش تشکیل لیگنین گردند. این پاسخ‌ها مجموعاً منجر به ایجاد یا افزایش سطح مقاومت به قارچ‌های بیماری‌زا می‌گردد. مشخص شده است که بیان این پروتئین‌ها به شدت توسط عوامل رونویسی خاص تنظیم می‌شود (Zhang *et al.* 2013). عوامل رونویسی از اجزای کلیدی در کنترل بیان ژن در همه بافت‌های زنده هستند که تنوع فنوتیپی و سازگاری ارگانیسم‌ها طی تکامل را تعیین می‌کنند (Chew *et al.* 2013). حدود ۱۳۰۰ الی ۱۵۰۰ عامل رونویسی در گیاهان گزارش شده است که برخی از آنها در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند (Riechmann and Ratcliffe, 2000; Gof *et al.* 2002). از میان عوامل رونویسی مختلف، پروتئین‌های AP2 Domain (Aharoni *et al.* 2004)، WRKY (Mare *et al.* 2004)، MYB (Yamaguchi and Shinozaki, 2005) و HD-ZIP (Javelle *et al.* 2011) بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند. تحقیقات مختلفی درباره نقش عوامل رونویسی در پاسخ به تنش‌های مختلف صورت گرفته است. در مطالعه ای دیزار و همکاران (۲۰۰۵) نقش این پروتئین‌ها را در تحمل گیاه آرابیدوپسس در برابر تنش خشکی بررسی نمودند. طبق مطالعات یولکر و سومسیچ (۲۰۰۴) مشخص شد که پروتئین‌های WRKY

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]

نقش ویژه‌ای در مسیر پیام رسانی مقاومت بـه بیمـاری‌هـا دارنـد. همچنین، ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) بیان ژن GmERF3 که نـوعی از فاکتور رونویسـی AP2/ERF مـی‌باشـد را در توتـون ترایخـت مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که گیاه تراریخت مـورد نظر مقاومت قابـل تـوجهی نسـبت بـه بیمـاری‌هـای باکتریـایی و قارچی در مقایسه با تیپ وحشـی از خـود نشـان مـی‌دهـد. طبـق مطالعات وانـگ و همکـاران (۲۰۰۷) مشـخص شـد کـه بیـان ژن مربوط به عامل رونویسی WRKY باعث مقاومت به بیماری‌هـا در برنج می‌شود. در تحقیقی که توسط علیان و همکـاران (۲۰۰۶) بـه منظور شناسـایی تغییـر در میـزان رونوشـت ژن‌هـا در لایـن‌هـای آفتـــابگردان مقـــاوم و حســـاس بـــه جدایـــه MP6 قـــارچ *P. macdonaldii* و با استفاده از تکنیک ریزآرایـه انجـام گرفـت، ۲۰ cDNA مرتبط با پروتئین‌های دفاعی و عوامل رونویسی دخیـل در پیام‌رسانی برای این بیماری شناسایی گردید. در مطالعـه دیگـری، درویش‌زاده و همکاران (۲۰۰۸) بیان سـه عامـل رونویسـی (HD-ZIP، AP2 Domain و MYB) را در دو ژنوتیپ آفتابگردان (M6-54-1 و AS613) که با ۳ جدایه مختلف قـارچ عامـل سـاقه سـیاه (MA6، MP8 و MP10) تلقیح شده بودنـد را مـورد مطالعـه قـرار دادند. نتایج درویش زاده و همکاران (۲۰۰۸) بر اساس ژن کنتـرل داخلی Actin نشان داد که بیان دو عامل رونویسـی AP2 domain و MYB-related در ترکیبات مختلـف ژنوتیـپ–جدایـه متفـاوت بوده در حالی که تفاوتی در بیان عامل رونویسی HD-Zip مشاهده نشد. هدف از این تحقیق، بررسی بیان عوامل رونویسی HD-ZIP، AP2 Domain، MYB-related، MYB-family و WRKY-family در ژنوتیپ‌های آفتابگردان آلوده شده با جدایه‌هـای MA6، MP8 و MP10 قارچ عامل بیماری (*P. macdonaldii*) با استفاده از RT-PCR کمی و ژن کنترل داخلی eEFα1 می باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه‌های قارچ عامل بیماری

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل دو ژنوتیپ ENSAT-B5 و AS613 به همراه ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 آفتابگردان بودند که براساس مطالعات قبلی (Darvishzadeh *et al.* 2007) دارای واکنش متفاوت به جدایه‌های MA6، MP8 و MP10 قارچ عامل بیماری ساقه سیاه می‌باشند (جدول ۱). با توجه به جدول ۱، ژنوتیپ ENSAT-B5 ژنوتیپ حساس بوده و ژنوتیپ های AS16 و M5-54-1 بسته به نوع جدایه مورد بررسی دارای واکنش متفاوت می باشند. ژنوتیپ M5-54-1 یک لاین جهش یافته توسعه یافته با روش بالک تک‌بذری (Single-seed descent) از نتاج در حال تفرق ژنوتیپ AS613 است که با اشعه ۷ تیمار شده بود. بذور ژنوتیپ‌ها قبل از کشت به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۶ درصد ضدعفونی شده و با آب مقطر شسته شدند. در مرحله بعد بذور در جعبه پلاستیکی با یک بستر پیت ماس کشت شده و به اتاقک رشد با شرایط کنترل شده (۱۴ ساعت طول روز، دمای شبانه ۱۸ و روزانه ۲۵ درجه سانتی-گراد، شدت روشنایی ۲۰۰ $\mu Em^{-2} s^{-1}$ که بوسیله لامپ‌های ۶۰۰ وات تامین می‌شدند و رطوبت ۷۵ الی ۸۰ درصد) منتقل شدند (Rustaee *et al.* 2000b). آزمایش بصورت اسپلیت پلات (جدایه در کرت اصلی با ۳ سطح و ژنوتیپ در کرت فرعی با ۳ سطح) با سه تکرار در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی اجرا شد. بعد از ۱۰ روز نگهداری جدایه‌های قارچ در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، پکنیوسپور قارچ‌ها مشاهده شد. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور جدایه‌ها شامل 10^6 پکنیوسپور در هر میلی‌لیتر آب به همراه آب پرتقال ۵/۰ درصد و ژلاتین ۲۵/۰ درصد در محل اتصال دمبرگ‌های کوتیلدون به هیپوکوتیل گیاهچه‌های آفتابگردان ۴ برگی ریخته شد (Rustaee *et al.* 2000b). طی ۴۸ ساعت اولیه بعد از آلودگی, گیاهچه‌ها با یک پوشش شفاف (Plexiglas) در شرایط رطوبت نزدیک به اشباع پوشانده شدند که محیط مناسب برای توسعه قارچ بود. تیمارهای کنترل در سه تکرار بوسیله ۲۰ میکرولیتر محلول بدون اسپور تلقیح شدند. به منظور کنترل کارایی تلقیح، چندین گیاه تلقیح شده از ژنوتیپ‌های AS613 و ENSAT-B5 و ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 تا ۷ روز بعد از تلقیح رشد داده شدند. در این مدت امکان مشاهده نکروز به صورت واضح در ترکیبات حساس وجود دارد (Roustaee *et al.* 2000b).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]

جدول ۱- متوسط رتبه بیماری در ژنوتیپ های آفتابگردان آلوده شده با جدایه های *P. macdonaldii* در شرایط کنترل شده (Darvishzadeh *et al.* 2007)

Table 1- Mean disease severity score of sunflower genotypes inoculated with *P. macdonaldii* isolates under controlled conditions (Darvishzadeh *et al.* 2007)

ژنوتیپ آفتابگردان Genotype	جدایه قارچ Isolate		
	MA6	MP8	MP10
AS613	6.74	2.24	3.63
ENSAT-B5	6.78	7.76	7.50
M5-54-1	1.24	6.46	2.21

درصد نکروز در ناحیه دمبرگ کوتیلدون بعد از ۷ روز تلقیح با قارچ عامل بیماری با سیستم ۱ (مقاوم) تا ۹ (حساس) رتبه بندی شد (Roustaee *et al.* 2000b). رتبه ۱ برای درصد نکروز بین ۰-۵، ۲ برای ۶-۱۰ درصد، ۳ برای ۱۱-۲۰ درصد، ۴ برای ۲۱-۳۰، ۵ برای ۳۱-۴۰، ۶ برای ۱۴-۶۰، ۷ برای ۶۱-۸۰، ۸ برای ۸۱-۹۹ و ۹ برای ۱۰۰ درصد نکروز.

Percentage of cotyledon petiole area showing Phoma black stem were scored from 1 (resistant) to 9 (susceptible) as proposed by Roustaee *et al.* (2000b), seven days after inoculation, where 1, 0−5% petiole area with necrosis spreading downward into the stem; 2, 6−10%; 3, 11−20%; 4, 21−30%; 5, 31−40%; 6, 41−60%; 7, 61−80%; 8, 81−99%; and 9, 100%.

استخراج RNA و سنتز cDNA

در پاتوسیستم آفتابگردان- بیماری ساقه سیاه فوما، مناسب ترین زمان مطالعه سطح بیان ژن ها ۴۸ ساعت بعد از تلقیح می-باشد (Alignan *et al.* 2006). بنابراین ۴۸ ساعت بعد از تلقیح دمبرگ‌های کوتیلدون از تیمارها جمع‌آوری گردید. برای استخراج RNA کل از روش معرفی شده بوسیله Verwoerd و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد. cDNA تک رشته‌ایی از RNA تیمار شده با DNase، با استفاده از کیت پیشرفته RT-for-PCR تهیه گردید (BD Biosciences). بدین صورت که مخلوط واکنش شامل ۵ میکرولیتر RNA کل و ۴۰ پیکومول الیگو T (dT15) در دمای ۷۰ درجه ساتنی گراد بمدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد و سپس ۸ میکرولیتر بافر واکنش ۵ برابر، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۶۲۵/۰ mM از هر کدام)، ۱ میکرولیتر (۱ واحد) محدودکننده RNase و ۲ میکرولیتر (۴۰۰ واحد) آنزیم MMLV ترانس‌کریپتاز معکوس اضافه شد و واکنش به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ۲۰۰ واحد ترانس‌کریپتاز معکوس MMLV دوباره به واکنش اضافه شد و مخلوط بار دیگر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه قرار داده شد و به دنبال آن واکنش توقف سنتز با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

واکنش Real-time RT-PCR

در این تحقیق به منظور ارزیابی بیان هر یک از عوامل رونویسی در اثر آلودگی با قارچ عامل بیماری، از آغازگرهای طراحی شده توسط درویش زاده و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد (جدول ۲). واکنش Real-Time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR Green دو برابر (Biosystems Applied)، ۳۰۰ نانو مول از هر آغازگر و ۱ میکرولیتر محصول RT (*Reverse Transcription*) رقیق شده انجام گردید. پس از تهیه حجم مورد نظر، واکنش PCR در دستگاه ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) با استفاده از برنامه: ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام شد (Alignan *et al.* 2006; Hewezi *et al.* 2008; Poormohammad Kiani *et al.* 2007; Roche *et al.* 2007, 2009). پیرو تکثیر PCR، واکنش ها به منظور تولید منحنی تفکیک تحت تاثیر یک دمای گرادیانت قرار گرفتند. در اینجا تغییرات در میزان فلورسنس به عنوان تابعی از دما تعیین می شود. در این صورت محصولات غیر اختصاصی تشخیص داده می شود. برنامه دمایی تفکیک به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و به دنبال آن ۲۰ دقیقه دمای گرادیانت از ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد می باشد. واکنش‌های PCR در ۳ تکرار انجام گرفت. جهت نرمال نمودن داده‌های حاصل از Real-Time RT-PCR از ژن eEFα1، به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید. در این مطالعه، سنجش تغییرات در بیان ژن‌ها با استفاده از روش $^{-DDCT}$۲ ارائه شده بوسیله Livak و Schmittgen (۲۰۰۱) انجام گرفت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]

جدول ۲- آغازگرهای الیگونوکلوتید مورد استفاده در real-time RT-PCR

Table 2- Oligonucleoitide primers used for quantitative real time RT-PCR

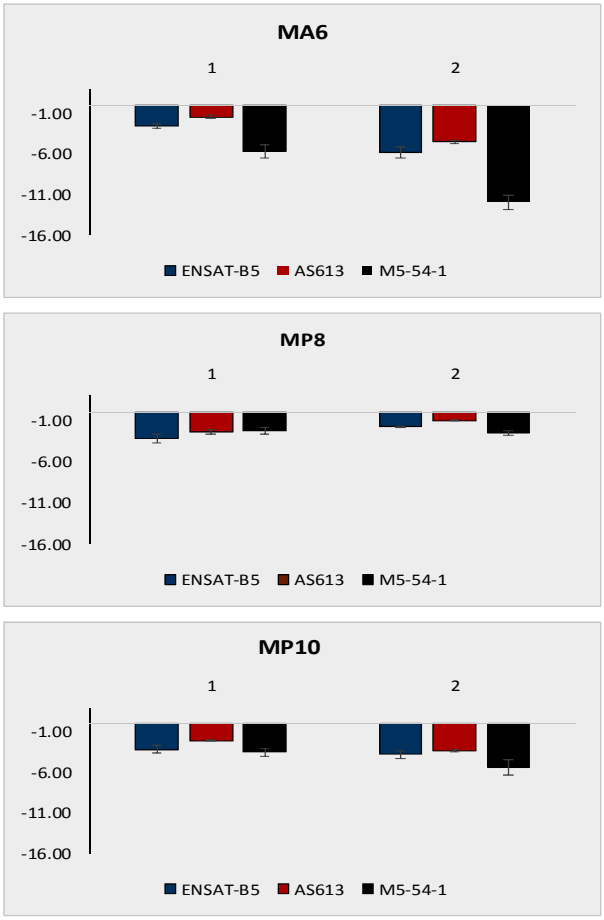
Primer's PCR Efficiency (%)	Tm	آغازگر برگشتی Reveres primer	آغازگر مستقیم Forward primer	شماره ژن Number of gene	عملکرد Function	نام توالی Name of sequence
93	56	AGGAGTAGCAAGGCACCATCA	CAAGAACTCGGCCAATTCGT	CX946549	AP2 domain transcription factor	DH0AQA11ZA10RM1
93	57	GGATCGCACCTCGTGGTTT	GCAGCACATCGAGGACATCA	CX946945	HD-Zip transcription factor	DH0AQA17ZH04RM1
81	54	CCCTATTCAATTCTTCCACCAAA	TTGGATTGAAGATGTCATCTGTGA	AJ412452	-WRKY family transcription factor	AJ412452
84	57	CGAGCGCAGCAGCATCTA	CCGCCACACGCATTCTCT	CD848175	MYB-related transcription factor	DH0AC002ZF08FM1
88	57	CAAGCCGCTCCACTTCAAAG	CCTCCCTGGCACATGAAGTT	CD850032	-MYB family transcription factor	DH0AC028ZC03FM1
88	55	CATCCTGAAGTGGGAGACGAA	CCAAATCAATGAGCCCAAGAG	AY094064	eEFα1	

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]

نتایج و بحث

بر اساس مطالعات فنوتیپی (Darvishzadeh *et al.* 2007) ژنوتیپ AS613 به جدایه MA6 حساس بوده ولی به دو جدایه MP8 و MP10 مقاوم می‌باشد (جدول ۱). ژنوتیپ ENSAT-B5 به هر سه جدایه بیماری (MA6، MP8 و MP10) حساس است. ژنوتیپ M5-54-1 که یک لاین جهش یافته از AS613 می‌باشد به جدایه‌های MA6 و MP10 مقاوم بوده ولی به جدایه MP8 حساسیت نشان می‌دهد (جدول ۱). بنابراین ۲ ژنوتیپ اصلی و جهش یافته (AS613 و M5-54-1) واکنش فنوتیپی متقابل به ۲ جدایه MA6 و MP8 دارند. ژنوتیپ AS613 نسبت به جدایه MA6 حساس بوده در حالی که ژنوتیپ جهش یافته آن (M5-54-1) مقاوم می‌باشد از طرف دیگر ژنوتیپ AS613 نسبت به جدایه MP8 مقاوم بوده در حالی که ژنوتیپ جهش یافته آن حساس است (جدول ۱). مقاومت و حساسیت ایجاد شده می‌تواند به علت تغییر ژنتیکی به واسطه جهش باشد. بر اساس مطالعات ژنتیکی نیز پاسخ ژنوتیپ‌های AS613، ENSAT-B5 و M5-54-1 آفتابگردان به آلودگی ناشی از جدایه‌های قارچ عامل بیماری ساقه سیاه متفاوت می‌باشد (شکل ۱). تجزیه واریانس نتایج حاصل از بررسی بیان عوامل رونویسی نشان داد (جدول ۳) سطح بیان عوامل رونویسی تحت تاثیر جدایه، ژنوتیپ و اثر متقابل ژنوتیپ- جدایه قرار دارند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس بین جدایه‌ها تنها در بیان دو عامل رونویسی AP2 domain و MYB-Related تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳) که این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در میزان عملکرد (بیماری زایی) جدایه-های مختلف باشد. با توجه به جدول ۳، بین ژنوتیپ‌های مختلف آفتابگردان از نظر مقدار بیان عوامل رونویسی AP2 domain، HD-Zip، WRKY-family و MYB-related تفاوت بسیار معنی‌دار وجود دارد. در این مطالعه، اثر متقابل ژنوتیپ- جدایه برای دو عامل رونویسی HD-Zip و MYB-Related بسیار معنی‌دار است (جدول ۳). واکنش ژنوتیپ- جدایه در سطح بیان ژن برای فهم مکانیسم پاسخ گیاه در برابر بیماری‌ها مهم می‌باشد و نشان می-دهد که زمینه ژنتیکی میزبان، ژنوتیپ جدایه و نیز تعامل آنها، چه میزان بیان ژن‌ها را در گیاه آفتابگردان تحت تاثیر قرارداده است.

بررسی مقدار بیان ژن‌های مربوط به عوامل رونویسی مورد مطالعه در ۹ ترکیب حاصل از برهم کنش سه جدایه *P. macdonaldii* (MA6, MP8, MP10) با سه ژنوتیپ آفتابگردان (AS613, ENSAT-B5, M5-54-1) نشان داد که از میان عوامل رونویسی مورد مطالعه، بیان دو ژن کدکننده HD-Zip و MYB-Related تفاوت معنی‌دار در میان ترکیبات مختلف نشان می‌دهد بدین صورت که بیان این دو ژن در ترکیبات مختلف ژنوتیپ- جدایه سرکوب می‌شود ولی درجه سرکوب شدن آنها متفاوت می‌باشد (جدول ۳، شکل ۱).



شکل ۱- الگوی بیان ژن‌های کدکننده عوامل رونویسی HD-Zip (۱)، MYB-related (۲) در ژنوتیپ‌های AS613 و ENSAT-B5 و لاین جهش یافته M5-54-1 آفتابگردان، تلقیح شده بوسیله سه جدایه ساقه سیاه فوما (MA6، MP8 و MP10)

Figure 1- Expression profile of genes encoding transcription factors HD-Zip (1), MYB-related (2) in original lines 'AS613' , 'ENSAT-B5' and mutant line 'M5-54-1' challenged by three Phoma black stem isolates (MA6, MP8 and MP10)

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات سه جدایه قارچ *P. macdonaldii* و سه ژنوتیپ آفتابگردان در بیان ژن های عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه

Table 3- Analysis of variance for the effects of three *P. macdonaldii* isolates and three sunflower genotypes on the expression of transcription factors associated with resistance to black stem disease

Sources of Changes منابع تغییرات	df	MS				
Gene ژن		Rep	Isolate	Rep×Isolate	Genotype	Genotype×Isolate
AP2 domain transcription factor	26	3.26	8.05**	0.47	50.61**	1.83
HD-Zip transcription factor	26	1.06	0.84	0.36	7.89**	4.44**
WRKY–family transcription factor	26	0.65	6.99	3.4	93.3**	4.44
MYB-related transcription factor	26	1.93	72.19**	0.65	33.92**	9.81**
MYB–family transcription factor	26	2.65	2.8	0.22	3.14	2

با توجه به اینکه ژنوتیپ AS613 به جدایه MA6 حساس و به دو جدایه دیگر مقاوم می‌باشد، بررسی بیان عوامل رونویسی HD-Zip و MYB-Related در این ژنوتیپ نشان داد که بیان ژن مربوط به HD-Zip در ترکیب MA6/AS613 نسبت به ترکیبات MP8/AS613 و MP10/AS613 کمتر سرکوب شده و این در حالی است که ژن مربوط به MYB-Related به شدت سرکوب شده است (شکل ۱). بنابراین می‌توان اظهار نمود که افزایش در سرکوب ژن HD-ZIP و کاهش در سرکوب ژن MYB-Related در ایجاد مقاومت ژنوتیپ AS613 به جدایه‌های MP8 و MP10 موثر می‌باشد این موضوع با نتایج بدست آمده توسط درویش‌زاده و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. بررسی بیان دو ژن مذکور در ژنوتیپ جهش یافته M5-54-1 در پاسخ به جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیان HD-Zip و MYB-Related در ترکیب MA6/M5-54-1 بیشتر سرکوب شده و در ترکیبات MP8/M5-54-1 و MP10/M5-54-1 به نسبت کمتر سرکوب می‌شود (شکل ۱). بنابراین ایجاد مقاومت در ژنوتیپ جهش یافته نسبت به جدایه‌های MA6 و MP10 با کاهش سرکوب در بیان دو ژن مذکور در ارتباط است. از آنجایی که ژنوتیپ جهش یافته M6-54-1 نسبت به لاین مادری AS613 مقاومت بیشتری به جدایه MP10 دارد، دو ژن مذکور در ژنوتیپ جهش یافته بیشتر سرکوب شده است.

در مطالعه دیگری درویش‌زاده و همکاران (۲۰۰۸) بیان عوامل رونویسی (HD-Zip, AP2-domain, MYB-related) را در ژنوتیپ‌های AS613 و M5-54-1 آفتابگردان در پاسخ به آلودگی با جدایه‌های مختلف قارچ *P. macdonaldii* (MA6, MP8, MP10) با استفاده از Actin به عنوان ژن کنترل داخلی مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که بیان دو عامل رونویسی HD-Zip, MYB-related در همه ترکیبات ژنوتیپ–جدایه سرکوب شده و بیان عامل رونویسی AP2-domain افزایش پیدا کرده است که با نتایج حاصل در مطالعه حاضر مطابقت دارد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هر دو ژن کنترل داخلی Actin و eEFα1 می‌توانند کاندیدای مناسبی جهت ارزیابی بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان باشند. انتخاب ژن کنترل داخلی ایده‌ال در یک آزمایش بیان ژن حائز اهمیت است. ژن کنترل داخلی مناسب ژنی است که تظاهر آن تحت تاثیر شرایط آزمایشی قرار نگیرد و همچنین می بایستی در بافت‌های مختلف موجود، تظاهر پایدار داشته باشد (Kozera and Rapacz, 2014). Garg و همکاران (۲۰۱۰) برای انتخاب ژن رفرانس، ۱۲ ژن کاندید شامل اکتین، EF1a، گلایسرآلدهید ۳– فسفات دهیدروژناز، IF4a، TUB6، UBC، UBQ5، UBQ10، 18SrRNA، 25SrRNA، GRX و HSP90 را در گیاه نخود بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که مقادیر بیان EF1a و HSP90 در سراسر اندام های مختلف ثابت باقی می ماند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]

در مطالعات دیگر نقش عوامل رونویسی در پاسخ گیاهان به بیماری‌ها مورد بررسی قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) اشاره نمود که توانستند ژن GmERF3، که نوعی عامل رونویسی AP2/EFR می‌باشد را از گیاه سویا به گیاه توتون انتقال دهند و مشاهده نمودند که گیاه گیرنده مقاومت قابل توجهی نسبت به بیماری باکتریایی *Ralstonia solanacearum* و قارچی *Alterna*ta *alternaria* نشان داد. همچنین رهایی و همکاران (۲۰۱۲) تجزیه بیان ژن‌های عوامل رونویسی (bZIP، bHLH، WRKY، MYB و NAC) را در دو ژنوتیپ گندم مقاوم و حساس به تنش شوری مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که تغییر میزان بیان ژن‌ها در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس است. در تعدادی از مطالعات سرکوب عوامل رونویسی در پاسخ به تنش همچون مطالعه اخیر دیده شده است (Janmohammadi and Mahfoozi, 2013). گزارش شده است سرکوب عوامل رونویسی دخیل در تنظیم بیان ژن های مقاومت به سرما کلید حفظ سطح بالای رونوشت ژن‌ها در شرایط تنش است (Agarwal *et al*. 2006; Gao *et al*. 2002; Novillo *et al*. 2004).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که عوامل رونویسی، نقش مهمی در کنترل بیان ژن‌های القا کننده مقاومت گیاه به بیماری ساقه سیاه دارد. تظاهر بیشتر عوامل رونویسی در پاسخ به جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری ساقه سیاه سرکوب می‌شود و بنابراین می‌توان با خاموشی ژن و تولید گیاهان تراریختی که موجب کاهش بیان این فاکتورهای رونویسی می‌شوند، راه را برای کاهش خسارات ناشی از این بیماری در آفتابگردان هموار نمود.

منابع

Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, Arkel GV, Pereira A. 2004. The SHINE Clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. The Plant Cell 16: 2463–2480.

Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong CH, Fujii H, Zheng X, Zhu JK. 2006. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. Journal of Biological Chemistry 49: 37636- 37645.

Alignan M, Hewezi T, Petitprez M, Dechamp-Guillaume G, Gentzbittel L. 2006. A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus* L.) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. ***New Phytologist*** 170: 523–536.

Bert PF, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F. 2004. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. Theoretical and ***Applied Genetics*** 109: 865–874.

Carson ML. 1991. Relationship between Phoma black stem severity and yield losses in hybrid sunflower. Plant Disease 75: 1150−1153.

Chew W, Hrmova M, Lopato S. 2013. Role of Homeodomain Leucine Zipper (HD-Zip) IV transcription factors in plant development and plant protection from deleterious environmental factors. International Journal of Molecular Sciences 14: 8122-8147.

Darvishzadeh R, Dechamp-Guillaume G, Hewezi T, Sarrafi A. 2007. Genotype-isolate interaction for resistance to black stem in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Pathology 56: 654–660.

Darvishzadeh R, Hewezi T, Gentzbittel L, Sarrafi A. 2008. Differential expression of defence-related genes between compatible and partially compatible sunflower–*Phoma macdonaldii* interactions. Crop Protection 27: 740–746.

Debaeke P, Peres A. 2003. Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on Phoma black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). Crop Protection 22: 741–752.

Dezar CA, Gago GM, González DH, Chan RL. 2005. Hahb-4, a sunflower Homeobox-Leucine Zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. Transgenic Research 14: 429-440.

Gao MJ, Allard G, Byass L, Flanagan AM, Singh J. 2002. Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. Plant Molecular Biology 49: 459-471.

Garg R, Sahoo A, Tyagi AK, Jain M. 2010. Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Biochemical and Biophysical Research Communications 396: 283–288.

Gof SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Tomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica). Science 296: 79-92.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]

Grover A, Gowthaman R. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Curr. Sci 84: 330–40.

Gulya T, Rashid KY, Masirevic SM. 1997. Sunflower disease: Phoma black stem. In: Schneiter AA, ed. Sunflower Technology and Production. Madison, WI, USA: ASA, CSSA, SSSA: Agronomy Monograph no 35: 319–22.

Hewezi T, Léger M, Gentzbittel L. 2008. A comprehensive analysis of the combined effects of high light and high temperature stresses on gene expression in sunflower. Annals of Botany 102(1):127-40.

Hu J., Seiler G., and Kole C. 2010. Genetics, genomics and breeding of sunflower. Routledge, USA. Pp: 342.

Janmohammadi M, Mahfoozi S. 2013. Regulatory network of gene expression during the development of frost tolerance in plants. Current Opinion in Agriculture 2(1): 11–19.

Javelle M, Klein-Cosson C, Vernoud V, Boltz V, Maher C, Timmermans M, Depege-Fargeix N, Rogowsky P. 2011. Genome-wide characterization of the HD-ZIP IV transcription factor family in maize: preferential expression in the epidermis. Plant Physiology 157: 790–803.

Kozera B, Rapacz M 2014. Reference genes in real-time PCR. J Appl Genet 54: 391-406.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25: 402–408.

Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia E, Stanca AM, Cattivelli L. 2004. *HvWRKY38*: a new transcription factor involved in cold and drought-response in barley. ***Plant Molecular Biology*** 55: 399–416.

Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J. 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 101: 3985-3990.

Poormohammad Kiani S, Grieu P, Maury P, Hewezi T, Gentzbittel L, Sarrafi A. 2007. Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theoretical and Applied Genetics 114(2):193-207.

Rachid Al-Chaarani G, Roustaee A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Sarrafi A. 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). Theoretical and ***Applied Genetics*** 104: 490–496.

Rahaii M, Gomarian M, Alizadeh H, Melbobi MA, Nagavi MR. 2012. The expression analysis of transcription factors under long term salt stress in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique. Iranian Journal of Crop Sciences 13(3): 580-595. (In Farsi with English abstract)

Rauf S. 2008. Breeding sunflower (*Helianthus annuus* L.) for drought tolerance. Communications in Biometry and Crop Science 3: 29-44.

Riechmann JL, Ratclife OJ. 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. Current Opinion in Plant Biology 3: 423-434.

Roche J, Hewezi T, Bouniols A, Gentzbittel L. 2009. Real-time PCR monitoring of signal transduction related genes involved in water stress tolerance mechanism of sunflower. Plant Physiology and Biochemistry 47(2): 139-45.

Roche J, Hewezi T, Bouniols A, Gentzbittel L. 2007. Transcriptional profiles of primary metabolism and signal transduction-related genes in response to water stress in field-grown sunflower genotypes using a thematic cDNA microarray. Planta 226(3):601-17.

Roustaee A, Costes D, Dechamp-Guillaume G, Barrault G. 2000a. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*) a fungal pathogen of sunflower. Plant Pathology 49: 227–234.

Roustaee A, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, Lesigne P, Sarrafi A. 2000b. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema L.) in sunflower. Plant Pathology 49: 396–401.

Sackston WE. 1992. On a treadmill: breeding sunflower for resistance to disease. Annual Review of Phytopathology 30: 529−551.

Ulker B, Somssich E. 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. Current Opinion in Plant Biology 7: 491–498.

Verwoerd TC, Dekker MM, Hockema A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. ***Nucleic Acids Research*** 17: 2362.

Wang HH, Hao JJ, Chen XJ, Hao ZN, Wang X, Lou YG, Peng YL, Guo ZJ. 2007. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. Plant Molecular Biology 65: 799–815.

Yamaguchi-Shinazaki K, Shinozaki K. 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters. ***Trends*** in ***Plant Science*** 10: 88–94.

Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J, Ma Y. 2009. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. Journal of Experimental Botany 13: 3781–3796.

Zhang Y, Lubberstedt T, Xu M. 2013. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. Hournal of Genetics and Genomics 40: 23-35.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal

Study on Expression of some Transcription Factors Associated with Resistance to Black Stem Disease in Sunflower

Faramarz Hoshyardel[1], Hamid Hatami Maleki[2], Reza Darvishzadeh[1*], Morad Jafari[1]

1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Professor and Associate Professor,

Department of Plant Breeding and Biotechnolgy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

2-Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran.

* Corresponding Author, Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

ABSTRACT

Black stem is one of the most important fungal diseases of sunflower caused by *Phoma macdonaldii*. In this study, expression level of some transcription factors (TF) including HD-Zip, AP2 domain, MYB- related, WRKY family and MYB family were studied using quantitative RT-PCR in sunflower genotypes, including ENSAT-B5 (susceptible to all 3 studied isolates; MA6, MP8, MP10), AS613 (resistant against MP8 and MP10 and susceptible to MA6), and M5-54-1 (a mutant genotype, resistant against MA6 and MP10 and susceptible to MP8) following infection by MA6, MP8 and MP10 isolates of *P. macdonaldii*. Among studied TFs, the expression level of two TFs, HD-Zip and MYB-related, were significantly different in genotype-isolate combinations but the expression level of three other TFs including AP2 domain, WRKY family and MYB family, were not significantly different in several genotype-isolate combinations. The expression of HD-Zip and MYB-related were suppressed in infected genotypes. Results revealed that increased repression of HD-Zip and decreased repression of MYB-related are affective in induction of resistance to MP8 and MP10 isolates in AS613 genotype. In this study, the induction of resistance in mutant genotype against MA6 and MP10 isolates was accompanied with decreased suppression of HD-Zip and MYB-related genes.

Key Words

Sunflower, black stem, transcription factors, gene expression

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.3.6]