ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٦
صفحه ٥٦٥ - ٥٥٥

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی‌های EST گل شاخه بریده ژربرا (*Gerbera hybrid*) به‌منظور شناسایی ژن‌های دخیل در مقاومت به بیماری بوتریتیس

Bioinformatics analysis of Gerbera (*Gerbera hybrid*) cut flower EST sequences to determining genes involved in resistance to Botrytis disease

علیرضا خالقی*[1]، حمید حسنیان خوشرو[2]

۱- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۲- استادیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، مراغه، ایران

Khaleghi AR*[1], Hassaneian Khoshro H[2]

1- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran
2- Assistant Professor, Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: khaleghi979@gmail.com

(تاریخ دریافت: ٩٥/٧/٤ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١٢/١٣)

چکیده

تنش‌های زیستی از جمله بیماری بوترتیس از موانع اصلی در تولید گل ژربرا می‌باشند. این تحقیق به‌منظور شناسایی ژن‌های دخیل در مقاومت به بیماری بوترتیس به کمک تجزیه و تحلیل اطلاعات EST کتابخانه گل ژربرا انجام شد. اطلاعات اولیه کتابخانه گل ژربرا شامل ۱۹۲۰ EST از بانک اطلاعاتی NCBI جمع‌آوری شدند. پس از پیرایش اولیه، توالی‌های EST دسته‌بندی و یکپارچه شدند که منتج به ایجاد ۱۱۳۹ ژن واحد (۳٦۱ توالی همپوشان و ۷۷۸ توالی منفرد) شد. نتایج جستجوی بلاست X نشان داد که ٦٨٨ ژن واحد دارای hit مشخص در بین پروتئین‌های آرابیدوپسیس بودند و برای سایر توالی‌ها hit مشخصی شناسایی نشد. گروه‌بندی و آنالیز غنی‌سازی ژنی، توالی‌های EST کتابخانه ژربرا را بر اساس کارکرد مولکولی، نوع پروتئین و اجزای سلولی به‌ترتیب در ۱۰ ، ۲۵ و ٦ گروه کارکردی مختلف قرار داد که حضور ٦ گروه در سطح آماری یک درصد معنی‌دار شد. شبکه ژنی مربوط به توالی‌های با حضور بالا نشان داد که ژن‌های مربوط به فاکتورهای رونویسی خانواده MYB (*MYB73*، *ATMYB21* و *RHC1A*) که به شدت تحت تأثیر مسیر جاسمونیک اسید بودند، ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، ژن‌های دخیل در فرآیند انتقال پیام کلسیم (مثل ژن کلمودولین *CAM7*) و خانواده پروتئینی UBQ سهم بزرگی از شبکه تنظیمی را به خود اختصاص می‌دهند و نقش کلیدی در مقاومت به بیماری بوتریتیس برعهده دارند. ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند نامزدهای مناسبی برای دست‌ورزی مقاومت به بیماری بوتریتیس در گل ژربرا باشند.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
تنش زیستی
ژنومیکس کارکردی
گروه‌های کارکردی
EST

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]

مقدمه

ژربرا از خانواده Asteraceae و جنس *Gerbera*، دارای حدود ۴۰ گونه علفی و چند ساله می‌باشد. این گل در بین گل‌های شاخه بریده پس از رز، میخک، داودی و لاله، رتبه پنجم را دارد (Reynoird et al. 1997; Dole and Wilkins 2004).

از مهم‌ترین عواملی که باعث کاهش کیفیت و افزایش هزینه‌های تولید گل شاخه بریده ژربرا می‌شود، بیماری‌ها و از جمله مهم‌ترین آن‌ها، بیماری بوتریتیس است. عامل این بیماری با نام علمی *Botrytis cinerea* یک پاتوژن نکروتروف با دامنه وسیع میزبانی است که باعث کاهش کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی تا ۲۰ درصد می‌شود. ژربرا از حساس‌ترین و مستعدترین گونه‌های گیاهی به بوتریتیس است و به‌دلیل عدم وجود مقاومت ژنتیکی در برابر پاتوژن‌های نکروتروف در واریته‌های تجاری ژربرا، این بیماری باعث ایجاد تلفات سنگین در طی تولید و مراحل فروش می‌شود (Vrind 2005; Williamson et al. 2007). Fu et al. (2017) به‌منظور مکان‌یابی QTLهای مربوط به مقاومت به بیماری بوتریتیس در ژربرا، چهار والد از دو جمعیت F_1 را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها ۲۰ QTL_S را شناسایی و گزارش کردند که تعداد QTL شناسایی شده و تغییرات بیان شده در بسیاری از QTLها بیانگر این موضوع است که پاسخ به بیماری بوتریتیس در این گیاه بسیار پیچیده است.

در اصلاح گیاهان زراعی و باغی به منابع ژنتیکی برای تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده نیاز می‌باشد؛ لذا شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به تنش‌های زنده بسیار حائز اهمیت می‌باشد. روش‌های ژنومیکس کارکردی[1] نظیر تجزیه و تحلیل توالی‌های EST[2]، امکان شناسایی، بررسی بیان و مطالعه رونوشت‌های ژنی درگیر در شبکه‌های تنظیمی و متابولیکی را فراهم کرده‌اند (Cushman and Bohnert 2000). می‌توان از ESTها و توالی‌های موجود در پایگاه‌های داده‌های اسید نوکلئیک استفاده نمود و به کمک این داده‌ها به ژن‌های خاصی دست یافت (Hide et al. 1999). طی تحقیقی که توسط Houde et al. (2006) انجام شد، با ایجاد توالی EST از گندم نان در مراحل مختلف نموی و در معرض تنش‌های سرما، شوری و خشکی و ترکیب آن‌ها با توالی‌های EST موجود در بانک‌های اطلاعاتی و دسته‌بندی تمام توالی‌های ترکیب شده، به ۷۵۴۸۸ توالی شامل ۳۱۵۸۰ توالی همپوشان[3] و ۴۳۹۰۸ توالی منفرد[4] دست یافتند. بیش از ۴۳ درصد از این مجموعه‌ها تجزیه کارکردی شد و گروه‌های کارکردی مربوط به آن‌ها تعیین شد.

مکانیسم گیاهان برای محافظت خود در برابر پاتوژن‌ها شامل موانع ساختمانی و تحریک پاسخ‌های دفاعی است. بشره، دیواره سلولی و فیتوآنتی‌سیپین‌ها[5] از موانع از پیش تشکیل شده فیزیکی و شیمیایی هستند که ورود میکروب‌ها به درون سلول‌های گیاهی را محدود می‌کنند (Hael-Conrad et al. 2015). هم‌چنین انواعی از هورمون‌های گیاهی شامل اسید سالیسیلیک، جاسمونیک اسید و اتیلن باعث به وجود آمدن شبکه‌ای از سیگنال‌ها می‌شوند که نقش مهمی را در تنظیم پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر انواع پاتوژن‌ها بازی می‌کنند (Luo et al. 2011). گزارش شده‌است که سیستم دفاعی گیاهان در برابر پاتوژن‌های نکروتروف به‌طور عمده توسط مسیرهای وابسته به جاسمونیک اسید/اتیلن (JA/ET) کنترل می‌شود (Glazebrook 2005).

با استفاده از داده‌های NCBI پروتئین‌های رمزشده در طی آلودگی گندم به بیماری فوزاریوم[6] شناسایی و عنوان شده‌است که پروتئین‌های وابسته به پاتوژن[7] مثل *Thaumatin-like protein* (*PR5*) و *ABC transporter* و هم‌چنین مسیر انتقال سیگنال جاسمونیک اسید در مقاومت به این بیماری بسیار تعیین کننده هستند (Xiao et al. 2013). Kruger et al. (2002) برای شناسایی ژن‌های بیان شده در طی آلودگی فوزاریوم در گندم از ESTها شامل ۲۸۳۱ توالی منفرد و ۷۱۵ توالی همپوشان استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که ژن‌های بیان شده از نظر عملکرد در ۵ گروه شامل ژن‌های ساختاری، متابولیسمی، تنظیمی، متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌های سنتزی و تغییر یافته[8] قرار می‌گیرند. هم‌چنین آن‌ها نشان دادند که ۳۱۲ توالی غیرتکراری رمزکننده آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید، پروتئین‌های وابسته به پاتوژن و چندین

[1] Functional genomics
[2] Expressed Sequenced Tage

[3] Contig
[4] Singleton
[5] Phytoanticipins
[6] *Fusarium graminearum*
[7] Pathogenesis-related proteins
[8] Protein synthesis and modification

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]

پروتئین وابسته به تنش و سیستم دفاعی می‌باشند که می‌توانند باعث افزایش مقاومت به بیماری شوند.

با وجود اینکه تشخیص و ارزیابی ژرم پلاسم‌های مقاوم به تنش‌های زنده فرآیند بسیار سخت و زمان‌گیر است، روش EST یکی از موثرترین روش‌ها برای کشف ژن‌های کارکردی جدید از تمام ژنوم است (Chen et al. 2005). با تکمیل پروژه‌های توالی یابی ژنوم در تعدادی از گیاهان، ESTهای فراوانی برای مطالعه سایر گیاهان فراهم شده‌است. چنانچه یک EST با یک ژن مشخص همانندی قابل قبولی داشته باشد، عملکرد بالقوه مشابهی برای آن EST در نظر گرفته می‌شود. تجزیه و تحلیل‌های مبتنی بر ESTها با مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی موجب افزایش آگاهی مسیرهای بیوشیمیایی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت می‌شود. ژربرا از گیاهان حساس به بیماری بوتریتیس بوده و این بیماری نه تنها در هنگام تولید بلکه در مراحل پس از برداشت و فروش نیز می‌تواند باعث کاهش کیفیت و یا از بین رفتن گل‌های شاخه بریده و در نتیجه خسارت‌های سنگین شود. ارائه ارقام مقاوم به بازار می‌تواند از شدت خسارت‌های مذکور بکاهد. در این پژوهش به‌منظور شناسایی و مقایسه دقیق ژن‌های دخیل در مقاومت به بیماری بوتریتیس در گل شاخه بریده ژربرا، یک کتابخانه EST مربوط به گلبرگ و برگ‌های ژربرا مورد تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۱۹۲۰ توالی EST مربوط به کتابخانه گیاه ژربرا تحت تنش بیماری بوترتیس از پایگاه داده NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت شد. توالی‌ها به‌منظور شناسایی آلودگی‌های ناقل و بررسی طول و کیفیت‌شان با استفاده از سرویس EGassembler (http://egassembler.hgc.jp) مورد ارزیابی قرار گرفتند. توالی‌های مربوط به ناقل، توالی‌های تکرار شونده، توالی‌های کلروپلاستی و میتوکندریایی حذف شدند و از بین توالی‌های ارزیابی شده توالی‌هایی با طول کوتاه‌تر از ۱۰۰ جفت‌باز کنار گذاشته شدند. در ادامه توالی‌های با کیفیت باقی‌مانده با استفاده از همان سرویس بیوانفورماتیک و با در نظر گرفتن ۸۰ درصد همانندسازی دسته‌بندی[1] و یکپارچه[2] شدند. سپس جستجوی بلاست X برای تمام ژن‌های واحد شامل توالی‌های همپوشان (توالی‌های با دو یا تعداد بیش‌تری EST ادغام شده) و توالی‌های منفرد (توالی‌های ESTهای منفرد که وارد هیچ توالی همپوشانی نشدند) با در نظر گرفتن حداکثر E-value برابر با 10^{-5} در مقابل بانک توالی پروتئینی گیاه آرابیدوپسیس به‌صورت Local و با نرم‌افزار Clcbio genomics workbench 8.5.1 انجام شد. برای دسته‌بندی کارکردی ژن‌ها و هم‌چنین به منظور شناسایی گروه‌های کارکردی دارای حضور افزوده یا کاهش یافته معنی‌دار، ۶۸۸ توالی با hit مشخص به‌عنوان ورودی سایت PANTHER (http://pantherdb.org) استفاده شد، این کار با مرجع قرار دادن ژنوم آرابیدوپسیس در سطح ۵٪ ($P<0.05$) انجام شد. پس از تجزیه اولیه شامل یکپارچه‌سازی، بلاست توالی‌های همپوشان و منفرد و در نهایت تعیین گروه‌های کارکردی و آنالیز آماری، شبکه ژنی مربوط به توالی‌های با حضور بالا که نماینده‌ای از ژن‌های با بیان بیشتر در ژربرا تحت تنش بیماری بوتریتیس هستند، تعیین شد. بدین منظور توالی‌های همپوشان با بیش از ۲۰ توالی EST از بین سایر توالی‌ها انتخاب شد. رمزهای پروتئین توالی‌های با بیان بالا که hit مشخصی در بین پروتئین‌های آرابیدوپسیس داشتند، به‌منظور تعیین شبکه ژنی به‌عنوان ورودی سرویس GeneMANIA (http://www.genemania.org) به‌کار گرفته شدند.

نتایج و بحث

پس از ارزیابی اولیه ۱۹۲۰ توالی EST، ۱۹۱۵ توالی با کیفیت و عاری از هرگونه آلودگی باقی ماند. بعد از هم‌گذاری ۱۹۱۵ EST، ۳۶۱ توالی همپوشان و ۷۷۸ توالی منفرد در کتابخانه تحت تنش بیماری ژربرا با استفاده از نرم‌افزار EGassembler تشکیل شد. با نرم‌افزار CLCBio، بلاست موضعی (بلاست در برابر بانک اطلاعاتی آرابیدپسیس) توالی‌های همپوشان و منفرد انجام شد و تبدیل رمزهای ژنتیکی توالی‌های همپوشان و منفرد کتابخانه به رمزهای ژنتیکی گیاه آرابیدوپسیس صورت گرفت. در مجموع

[1] Clustering
[2] Assembling

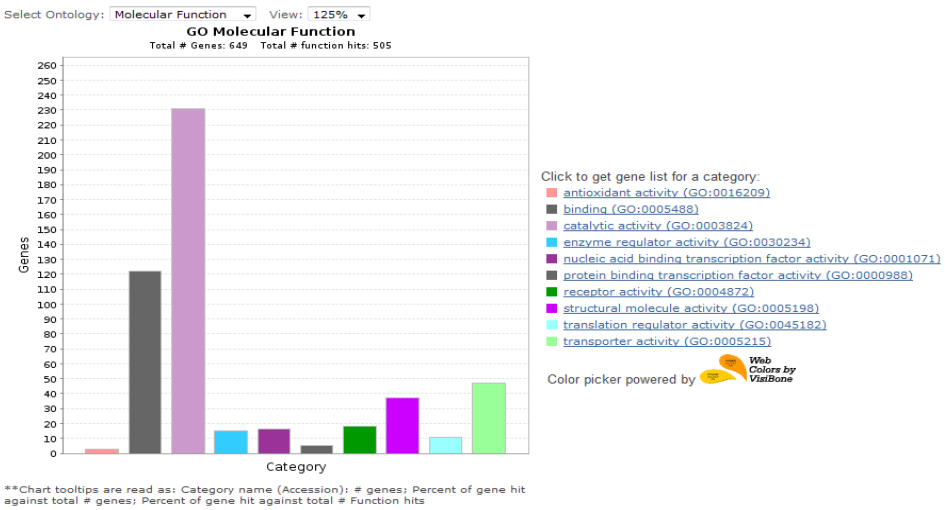
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]

۶۸۸ ژن واحد دارای hit مشخص در بین توالی‌های پروتئینی آرابیدوپسیس بودند و برای ٤٥١ توالی نیز hit مشخصی شناسایی نشد (جدول ۱).

تمام ژن‌های واحد دارای hit مشخص در بین توالی‌های پروتئینی آرابیدوپسیس توسط نرم‌افزار PANTHER بر اساس کارکرد مولکولی، نوع پروتئین و اجزاء سلول به‌ترتیب در ۱۰ ، ۲۵ و ٦ گروه کارکردی مختلف قرار گرفتند (به‌ترتیب شکل‌های ۱، ۲ و ۳). گروه کارکردی با فعالیت کاتالیتی دارای بیش‌ترین ژن واحد بود. در تنش‌های زیستی به‌ویژه بیماری بوترتیس، افزایش فعالیت این آنزیم‌ها منجر به انتقال پیام و پاسخ ژن‌های مناسب خواهد شد. هم‌چنین اتصال بین آنزیم‌ها و دیواره سلولی و هم‌چنین در بین ترکیبات مختلف دیگر باعث افزایش انتقال پیام واکنش ژن‌ها می‌شوند (Ruepp et al. 2004). در بین گروه‌های کارکردی، گروه کارکردی با فعالیت آنتی اکسیدانت دیده می‌شود که مهم‌ترین نقش آن‌ها سمیت‌زدایی و حذف ROSها از سلول می‌باشد (Tausz 2003).

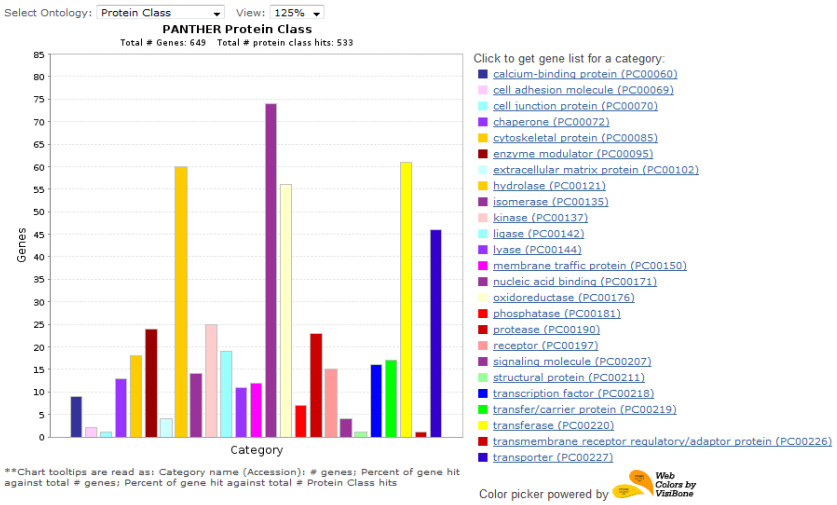
جدول ۱- تعداد ESTهای موجود در کتابخانه گیاه ژربرا تحت تنش بیماری بوترتیس و تعداد توالی‌های همپوشان و منفرد کتابخانه

کتابخانه گیاه ژربرا تحت تنش بیماری بوترتیس	کتابخانه
۱۹۲۰	تعداد کل ESTها
۳٦۱	تعداد توالی‌های همپوشان
۷۸۱	تعداد EST در توالی‌های همپوشان
۷۷۸	تعداد توالی‌های منفرد
۱۱۹	توالی‌های همپوشانی که hit مشخصی ندارند
۳۳۲	توالی‌های منفردی که hit مشخصی ندارند

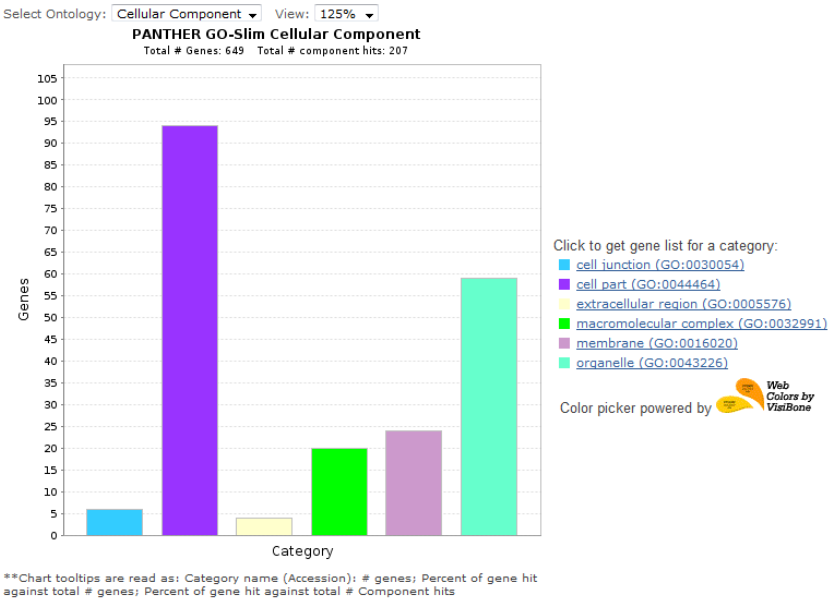


شکل ۱- طبقه‌بندی ژن‌ها بر اساس کارکرد مولکولی ESTهای کتابخانه گیاه ژربرا تحت بیماری بوترتیس

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]



شکل ۲- طبقه‌بندی ژن‌ها بر اساس نوع پروتئین ESTهای کتابخانه گیاه ژربرا تحت بیماری بوترتیس



شکل ۳- طبقه‌بندی ژن‌ها بر اساس اجزاء تشکیل دهنده سلول ESTهای کتابخانه گیاه ژربرا تحت بیماری بوترتیس

با توجه به نتایج طبقه‌بندی بر اساس نوع پروتئین (شکل ۲) مشاهده می‌شود که رونوشت‌های مربوط به گروه‌های کارکردی دیواره و غشای سلولی تحت تنش تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهند. تعداد زیادی از پروتئین‌ها، پروتئین‌های سنتز دیواره سلولی هستند که جزء پروتئین‌های دخیل در شرایط تنش هم محسوب می‌شدند. در واقع از اولین مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر پاتوژن‌ها، موانع ساختمانی است. بشره و دیواره سلولی از موانع از پیش تشکیل شده فیزیکی هستند که ورود میکروب‌ها به درون سلول‌های گیاهی را محدود می‌کنند (Hael-Conrad et al. 2015). در طبقه‌بندی بر اساس اجزای سلولی (شکل ۳)، حداکثر تعداد ژن‌های واحد متعلق به گروه بخش‌های سلولی[1] با ۹۴ ژن واحد و کمترین متعلق به نواحی خارج سلولی[2] با ٤ ژن واحد بود (شکل ۳).

در تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های کارکردی از نرم‌افزار Gene Enrichment سایت PANTHER استفاده شد. این تجزیه بر مبنای آزمون کای اسکور انجام شد و نتایج نشان داد که از ۱۰

[1] Cell part
[2] Extra cellular region

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]

گروه کارکردی مولکولی شناسایی شده، دو گروه کارکردی یعنی گروه‌های ژن‌های با فعالیت اکسیدوردوکتاز[1] و ژن‌های با فعالیت کاتالیتی[2] نسبت به سایر گروه‌ها حضور افزایشی (*P*-value≤0.05) داشته‌اند (جدول ۲).

افزایش بیان آنزیم‌های کاتالیتی منجر به انتقال پیام و پاسخ ژن‌های مناسب به تنش‌های زیستی از جمله بیماری بوترتیس خواهد شد. هم‌چنین افزایش میزان بیان گروه کارکردی اکسیدوردوکتاز تحت تنش بیماری بوترتیس در گیاه ژربرا، با توجه به نقش این گروه در سمیت‌زدایی و حفاظت سلول‌ها در برابر اکسیژن‌های فعال، می‌توان گفت که گیاه ژربرا برای تحمل و مقابله با بیماری بوترتیس از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بهره می‌گیرد. مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت این دسته از آنزیم‌ها تحت تنش‌های محیطی از جمله تنش‌های زیستی به شدت افزایش می‌یابد؛ به‌عنوان مثال در گیاه فرفیون رونویسی و فعالیت این آنزیم‌ها به‌طور گسترده‌ای در بافت‌هایی که تحت تنش‌های محیطی هستند افزایش می‌یابد (Anderson and Davis 2004). بالابردن سطوح بیان ژن آنتی اکسیدان‌ها به‌نظر می‌رسد که توسط گیاهان مقاوم به تنش‌های زیستی و غیر زیستی کنترل می‌شود (Chugh and Khurana 2002).

نتایج مربوط به تجزیه گروه‌ها براساس فرآیند بیولوژیکی نشان داد که گروه‌های فرآیندهای متابولیتی[3]، فرآیندهای سلولی[4]، پروتئین‌های وابسته به فرآیندهای متابولیتی[5] و فرآیندهای متابولیت‌های اولیه[6] نسبت به سایر گروه‌ها حضور افزایشی (*P*-value≤0.05) داشته‌اند (جدول ۳). در نهایت نتایج تجزیه گروه‌ها بر اساس نوع پروتئین نشان داد که از ۲۵ گروه شناسایی شده، دو گروه کارکردی یعنی گروه‌های ناقل آمینواسید[7] و اکسیدوردوکتازها[8] نسبت به سایر گروه‌ها حضور افزایشی (P-value≤0.05) داشته‌اند (جدول ٤). Smith et al. (2014) ژن‌های بیان شده در *S.lycopersicoides* طی آلودگی با پاتوژن بوتریتیس را در ۳ گروه اصلی تقسیم‌بندی کردند: الف) ژن‌های دخیل در فرآیندهای بیولوژیکی ب) ژن‌هایی با عملکرد ملکولی و ج) ژن‌های بیان کننده اجزا سلولی آن‌ها هم‌چنین پیشنهاد کردند که توقف شدید و سریع متابولیسم‌های اصلی در واکنش به *B. cinerea* احتمالاً به دلیل تخصیص مجدد منابع به واکنش‌های دفاعی می‌باشد و دو ژن *Pathogenesis-Related Protein* (*PR1*) و *Subtilisin-like Protein* را به‌عنوان ژن‌های کاندید برای ایجاد مقاومت به پاتوژن‌های نکروتروفیک در *S. lycopersicoides* گزارش کردند. توالی‌های همپوشان با ۲۰ و تعداد بیشتری EST به‌عنوان ژن‌های دارای بیان بالا در گل ژربرا در نظر گرفته شدند. بر این اساس، ۱۵ ژن شناسایی شد (جدول ۵ و شکل ٤). گروه‌بندی کارکردی ژن‌های با بیان بالا نشان داد که ارتباط مستقیمی بین فعالیت گروه‌های کارکردی و بیان ژن‌ها وجود دارد. چراکه بیش‌تر ژن‌های شبکه در گروه‌های کارکردی‌ای قرار گرفتند که خود به شکل معنی‌داری در گل ژربرا تحت بیماری بوتریتیس فعال بوده‌اند (مقایسه جدول‌های ۲ تا ٤).

[1] Oxidoreductase activity
[2] Catalytic activity
[3] Metabolic process
[4] Cellular process
[5] Protein metabolic process
[6] Primary metabolic process
[7] Amino acid transporter
[8] Oxidoreductase

جدول ۲- نتایج مرحله آنالیز غنی‌سازی ژنی برای تمام ژن‌های واحد گل ژربرا تحت تنش بیماری بوترتیس بر اساس کارکرد مولکولی

گروه کارکردی	تعداد ژن واحد	نسبت حضور	P-value(P<0.05)
ژن‌های با فعالیت اکسیدوردوکتاز	۵۵	۱/۸۷	۱/۲۸ E$^{-۰۳}$
ژن‌های با فعالیت کاتالیتی	۲۲۸	۱/۴۳	۱/۵۸ E$^{-۰۷}$
طبقه‌بندی نشده (نا معین)	۳۲۸	۰/۷۸	۰/۰۰ E$^{..}$

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]

جدول ۳- نتایج مرحله آنالیز غنی‌سازی ژنی برای تمام ژن‌های گل ژربرا تحت تنش بیماری بوترتیس بر اساس فرآیند بیولوژیکی

گروه کارکردی	تعداد ژن واحد	نسبت حضور	P-value(P<0.05)
فرآیندهای متابولیتی	۲۹۱	۱/٤	۹/۰۹ E $^{-۱۰}$
فرآیندهای سلولی	۱۲۸	۱/۳۸	۱/۳۹ E $^{-۰۲}$
پروتئین‌های وابسته به فرآیندهای متابولیتی	۱۱۷	۱/۳۷	٤/۰۱ E $^{-۰۲}$
فرآیندهای متابولیت‌های اولیه	۲۳۰	۱/۳۵	۱/۸۹ E $^{-۰۵}$
طبقه‌بندی نشده (نا معین)	۳۰٤	۰/۷۵	۰/۰۰ E $^{··}$

جدول ٤- نتایج مرحله آنالیز غنی‌سازی ژنی برای تمام ژن‌های گل ژربرا تحت تنش بیماری بوترتیس بر اساس نوع پروتئین

گروه کارکردی	تعداد ژن واحد	نسبت حضور	P-value(P<0.05)
ناقل آمینواسید	۱۲	۳/٤۹	۳/۸۳ E $^{-۰۲}$
اکسیدوردوکتاز	٥٦	۱/۸٤	۱/۸۹ E $^{-۰۳}$
طبقه‌بندی نشده (نامعین)	۳۲۱	۰/۷۸	۰/۰۰ E$^{··}$

در بین ژن‌های با بیان بالا، ژن‌هایی وجود داشت که بسیار مهم و کلیدی بودند و خود به‌عنوان یک نقطه کارکردی یا تنظیمی مهم در شبکه فعالیت داشتند. ژن *MYB73* و *ATMYB21* از جمله ژن‌های مهم با بیان بالا می‌باشند. این ژن یک عامل رونویسی از زیر گروه ۷۳ و ۲۱ خانواده R2R3 پروتئین‌های MYB می‌باشند. این عامل رونویسی یک پروتئین اختصاصی می‌باشد که در پایین دست علامت‌دهی جاسمونیک اسید، در سیگنال رسانی نقش بسیار کلیدی دارد. یکی دیگر از عوامل رونویسی تحت تاثیر جاسمونیک اسید یعنی *RING-H2 finger C1A* یا *RHC1A* نیز در این پژوهش دارای بیان بالایی بود. این ژن، رمزکننده یکی از عوامل رونویسی خانواده *RING finger* می‌باشد که گفته شده در تکامل اندام‌های گل نظیر پرچم و هم‌چنین در پاسخ به تنش‌ها نقش دارد (Mandaokar et al. 2006). ژن‌های MYB و MYC به‌ترتیب به عناصر همسوساز MYBR (C/TAACNA/G) و MYCR (CANNTG) در ناحیه پروموتوری ژن‌های هدف متصل شده و از طریق فعال‌سازی ژن‌های پایین دست، منجر به ایجاد مقاومت به تنش‌ها از جمله خشکی و شوری می‌شوند (Tuteja 2007). با استفاده از روش ریزآرایه پیشنهاد شده‌است که مسیر سیگنال‌دهی جاسمونات و اتیلن ممکن است باعث ایجاد مقاومت به بیماری در گیاهانی هم‌چون گندم شود (Li and Yen 2008). مولکول‌های سیگنال دهنده گیاهی مثل سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید، آبسیزیک اسید و اتیلن ترکیبات ضدمیکروبی از جمله فیتوالکسین‌ها و پروتئین‌های PR را القاء می‌کنند (Rossi et al. 2011). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که به احتمال زیاد، افزایش بیان فاکتورهای رونویسی *MYB73*، *ATMYB21* و *RHC1A* به‌دلیل افزایش سیگنال‌رسانی مسیر جاسمونیک اسید تحت تاثیر قارچ بوتریتیس می‌باشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مقاومت به بیماری بوتریتیس در گل ژربرا نیاز به مسیر سیگنال‌رسانی جاسمونیک اسید دارد.

یکی دیگر از ژن‌های مهم و کلیدی در بین ژن‌های با بیان بالا، ژن‌های مربوط به خانواده یوبی‌کوئیتین[1] یا UBQ می‌باشد. حضور وسیع این پروتئین در جایگاه‌های مختلف و ثابت ماندن ساختار مولکولی آن در گونه‌های مختلف، حاکی از نقش یوبی‌کوئیتین در حیات سلولی می‌باشد. اتصال کوالان یوبی‌کوئیتین به پروتئین‌ها، از مهم‌ترین راه‌های هدایت بسیاری از بیومولکول‌های پروتئینی به سمت تجزیه پروتئوزومی به شمار می‌رود (Kimura and Tannaka 2010).

در بین ژن‌های با بیان بالا تعدادی از پروتئین‌های پاسخ به تنش گرمایی یا HSP نیز حضور داشتند. بالا بودن فعالیت این پروتئین‌ها چندان دور از انتظار نبود زیرا بسیاری از ژن‌های پاسخ به تنش اختصاصی نبوده و به‌صورت عمومی در اکثر تنش‌ها فعال بوده و در تکامل اندام‌های گیاهی نیز نقش فعالی دارند (Reeves et al. 2012). ژن‌های دخیل در فرایند انتقال پیام کلسیم[2] نیز در شبکه ژنی حضور معنی‌داری داشتند (جداول ٥، ٦ و شکل ٤). یون Ca^{+2} نه تنها در تولید ولتاژ غشایی بلکه به‌عنوان یک مکانیسم پیام‌دهی عمل می‌کند. از ژن‌هایی که در فرآیند پیام‌دهی کلسیم

[1] Ubiquitin family protein
[2] Calcium signaling

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]

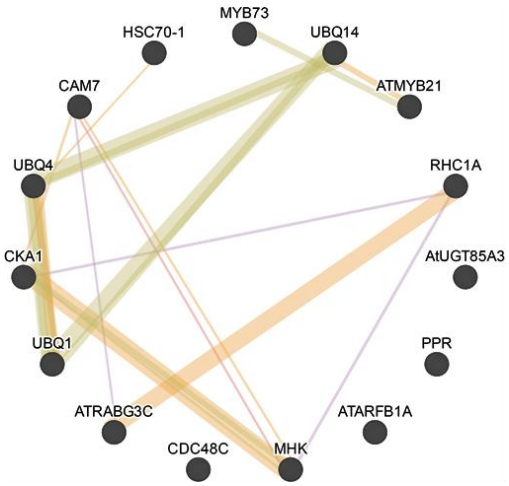
نقش دارند می‌توان به کلمودولین[1] (CAM7) اشاره نمود (جدول ۵). کلمودولین جز پروتئین‌های باند شونده با کلسیم است و می‌تواند با پروتئین‌های دیگر باند شود و عملکرد آن‌ها را تنظیم کند و به این وسیله می‌توانند روی خیلی از عملکردهای سلول نقش داشته باشد. (Kudla et al. 1999) مشخص‌ترین واکنش‌ها به آلودگی پاتوژن‌ها شامل تولید ROSها، جریان کلسیم (Ca^{2+}) از فضاهای خارج سلولی و تغییر در غلظت کلسیم سیتوزولی و تغییر در دیواره سلولی، تولید فیتوآلکسین‌ها، فسفوریلاسیون پروتئین، فعال‌سازی مسیر سیگنال‌دهی MAPK[2] و القاء رونویسی ژن برای حفاظت در برابر پاتوژن‌ها و محدود کردن بیماری می‌شود (Hael-Conrad et al. 2015). لذا می‌توان گفت که علاوه بر مسیر سیگنال‌رسانی جاسمونیک اسید، ژن‌های دخیل در فرایند انتقال پیام کلسیم نیز، نقش مهمی در مقاومت به بیماری بوتریتیس در گل ژربرا بازی می‌کنند.

[1] Calmodulin

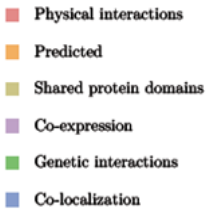
[2] Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

جدول ۵- ژن‌های با بیان بالا (۲۰≤ توالی EST): اسم ژن، شرح ژن و کد ژنی آرابیدوپسیس مربوط به هر ژن آورده شده‌است.

Gene	Description	Gene ID
MYB73	myb domain protein 73	AT4G37260
PPR	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	AT4G35850
ATMYB21	myb domain protein 21	AT3G27810
RHC1A	RING-H2 finger C1A	AT2G40830
MHK	Protein kinase superfamily protein	AT4G13020
AtUGT85A3	UDP-glucosyl transferase 85A3	AT1G22380
UBQ4	ubiquitin 4	AT5G20620
CDC48C	cell division cycle 48C	AT3G01610
HSC70-1	heat shock cognate protein 70-1	AT5G02500
ATRABG3C	RAB GTPase homolog G3C	AT3G16100
UBQ14	Ubiquitin family protein	AT4G02890
UBQ1	ubiquitin extension protein 1	AT3G52590
CKA1	casein kinase alpha 1	AT5G67380
CAM7	calmodulin 7	AT3G43810
ATRABG3F	RAB GTPase homolog G3F	AT3G18820



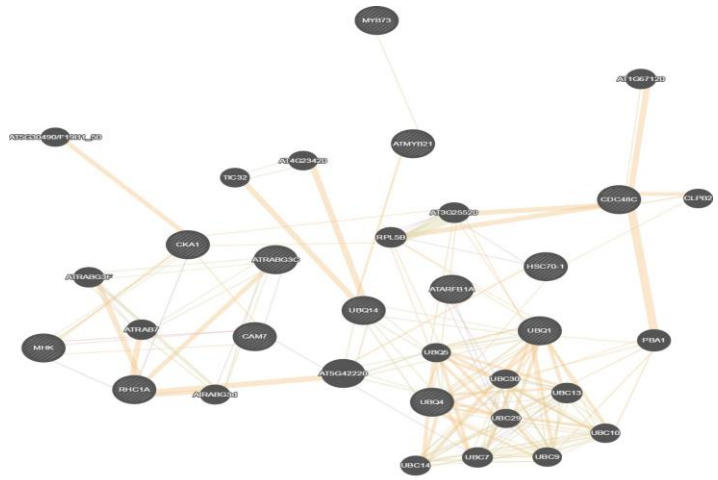
شکل ٤- شبکه‌ژنی ژن‌های با بیان بالا در گیاه ژربرا تحت تنش بیماری بوتریتیس: در این شبکه:



[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]

جدول ٦- ژن‌های با بیان بالا (۲۰≥ توالی EST) به‌همراه ژن‌های اضافه شده: اسم ژن، شرح ژن و کدژنی آرابیدوپسیس مربوط به هر ژن آورده شده‌است.

Gene	Description	Gene ID
MYB73	myb domain protein 73	AT4G37260
PPR	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	AT4G35850
ATARFB1A	ADP-ribosylation factor B1A	AT2G15310
ATMYB21	myb domain protein 21	AT3G27810
RHC1A	RING-H2 finger C1A	AT2G40830
MHK	Protein kinase superfamily protein	AT4G13020
AtUGT85A3	UDP-glucosyl transferase 85A3	AT1G22380
UBQ4	ubiquitin 4	AT5G20620
CDC48C	cell division cycle 48C	AT3G01610
HSC70-1	heat shock cognate protein 70-1	AT5G02500
ATRABG3C	RAB GTPase homolog G3C	AT3G16100
UBQ14	Ubiquitin family protein	AT4G02890
UBQ1	ubiquitin extension protein 1	AT3G52590
CKA1	casein kinase alpha 1	AT5G67380
CAM7	calmodulin 7	AT3G43810
AT5G42220	Ubiquitin-like superfamily protein	AT5G42220
PBA1	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein	AT4G31300
RPL5B	ribosomal protein L5 B	AT5G39740
AT3G25520	ribosomal protein L5	AT3G25520
UBC13	ubiquitin-conjugating enzyme 13	AT3G46460
ATRABG3F	RAB GTPase homolog G3F	AT3G18820
ATRAB7	RAB GTPase homolog G3E	AT1G49300
UBC7	ubiquitin carrier protein 7	AT5G59300
AT1G67120	ATPases;nucleotide binding;ATP binding;nucleoside-triphosphatases; transcription factor binding	AT1G67120
AtRABG3d	RAB GTPase homolog G3D	AT1G52280
UBC14	ubiquitin-conjugating enzyme 14	AT3G55380
TIC32	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	AT4G23430
AT4G23420	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	AT4G23420
CLPB2	casein lytic proteinase B2	AT4G14670
UBC10	ubiquitin-conjugating enzyme 10	AT5G53300
UBC9	ubiquitin conjugating enzyme 9	AT4G27960
UBQ5	ubiquitin 5	AT3G62250
UBC29	ubiquitin-conjugating enzyme 29	AT2G16740
UBC30	ubiquitin-conjugating enzyme 30	AT5G56150



شکل ۵- شبکه ژنی ژن‌های با بیان بالا در گیاه ژربرا تحت تنش بیماری بوتریتیس به‌همراه ژن‌های اضافه شده در این شبکه:

Physical interactions
Predicted
Shared protein domains
Co-expression
Genetic interactions
Co-localization

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]

جدول ٦ و شکل ٥ ژن‌های با بیان بالا (≥۲۰ توالی EST) و شبکه‌ژنی به‌همراه ژن‌های اضافه شده توسط نرم‌افزار به‌عنوان همسایه را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود علاوه بر ژن‌های با بیان بالا که در کتابخانه گل ژربرا شناسایی شده بود خود نرم‌افزار نیز ژن‌هایی را به‌عنوان همسایه و مرتبط با ژن‌های موجود در کتابخانه ژربرا که احتمالاً در مقاومت به بیماری بوتریتیس نقش دارند معرفی کرده است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که ۱۵ ژن نقش کلیدی در مقاومت به بیماری بوتریتیس دارند و همچنین نتایج مربوط به ترسیم شبکه تنظیمی ژن نشان داد که ۱۲ ژن وارد شبکه شدند که مهم‌ترین آن‌ها فاکتورهای رونویسی خانواده MYB (*MYB73*، *ATMYB21* و *RHC1A*) که به شدت تحت تاثیر مسیر جاسمونیک اسید بودند، ژن‌های رمزکننده با فعالیت آنتی‌اکسیدانت، ژن‌های دخیل در فرآیند انتقال پیام کلسیم (مثل ژن کلمودولین CAM7) و خانواده پروتئینی UBQ بودند. به‌طور کلی محصولات ژن‌های القا شده تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی به‌طور وسیعی در دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند. محصولات ژن‌های گروه اول به طور مستقیم سلول را در برابر تنش حمایت می‌کند مانند چاپرون‌ها[1]، پروتئین‌های LEA[2]، پروتئین‌های حفاظت کننده در برابر تنش‌های اسمزی[3]، آنزیم‌های دخیل در دفع مواد سمی از گیاه[4]، حذف کننده‌های رادیکال‌های آزاد[5] و پروتئازهای مختلف (Iuchi et al. 2007)، گروه دوم شامل فاکتورهای رونویسی، پیغام‌برهای ثانویه و فسفاتازها و کینازها مانند کینازهای فعال‌کننده تقسیم سلول[6] و پروتئین‌های وابسته به کلسیم[7] و کینازهای وابسته به رشد و تمایز سلول[8] که بیان ژن‌های دیگر در پاسخ به تنش‌ها را تنظیم می‌کنند (Kovtun et al. 2000).

دسته دوم یعنی ژن‌هایی که بیان ژن‌های دیگر در پاسخ به بیماری بوترتیس را تنظیم می‌کنند، فاکتورهای رونویسی خانواده MYB، آنتی اکسیدان‌ها و کینازهای پاسخ به تنش هستند که در کتابخانه ژربرا تحت تنش بیماری بیان افزایشی داشتند (جداول ٦ و ٧ و شکل‌های ٢ و ٤)، این دسته از ژن‌ها نقش کلیدی را در هماهنگی بیان ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی گوناگون دارند (Dunand-Sauthier et al. 2005).

به‌طور کلی بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های دخیل در دفع مواد سمی از گیاه (آنتی اکسیدان‌ها)، فاکتورهای رونویسی از جمله خانواده MYB و کینازهای پاسخ به تنش بیشترین نقش را در گل ژربرا برای مقابله و تحمل بیماری بوتریتیس دارند.

[1] Chaperons
[2] Late embryogenesis abundant proteins
[3] Osmoprotectant
[4] Detoxifying enzymes
[5] Free radical scavengers
[6] Mitogen-activated kinases (MAPKS)
[7] Calcium dependent protein kinases (CDPKs)
[8] SoS kinases

منابع

Anderson J, Davis D (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. Physiologia Plantarum 120:421-433.

Chen L, Zhao LP, Gao QK (2005) Generation and analysis of expressed sequence tags from the tender shoots cDNA library of tea plant (*Camellia sinensis*). Plant Science 168:359-363.

Chugh A, Khurana P (2002) Gene expression during drought stress recent advances. Current Sience 83:6-25.

Cushman JC, Bohnert HJ (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. Current Opinion in Plant Biology 3:117-124.

Dole JM, Wilkins HF (2004) Floriculture: principles and species, 2nd edition. PearsonPrentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey 347 pp.

Dunand-Sauthier I, Walker CA, Narasimhan J, Pearce AK, Humphrey TC (2005) Stress-Activated Protein Kinase Pathway Functions to Support Protein Synthesis and Translational Adaptation in Response to Environmental stress in Fission Yeast. Eukaryotic Cell 4:1785-1793.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]

Fu Y, van Silfhout A, Shahin A, Egberts R, Beers M, Velde A, Houten A, Tuyl JM, Visser RGF, Arens P (2017) Genetic mapping and QTL analysis of Botrytis resistance in *Gerbera hybrida*. Molecular Breeding 37:13.

Glazebrook J, (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review Phytopathology 43:205-227.

Hael-Conrad V, Abou-Mansour E, Diaz-Riccib J C, Metrauxa JP, Serranoa M (2015) The novel elicitor AsES triggers a defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science 241:120-127.

Hide W, Miller R, Ptitsyn A, Kelso J, Gopallakrishnan C, Christoffels A (1999) EST Clustering Tutorial. ISMB pp. 24.

Houde M, Belcaid M, Ouellet F, Danyluk J, Monroy AF, Dryanova A, Gulick P, Bergeron A, Laroche A, Links MG, MacCarthy L, Corsby WL, Sarhan F (2006) Wheat EST resources for functional genomics for abiotic stress. BMC Genomics 7:149.

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M (2007) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. Plant Journal 27:325-33.

Kimura Y, Tanaka K (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. Journal of Biochemistry 147:793-798.

Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, SheenJ, (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences Journal 97: 2940–2945.

Kruger WM, Pritsch C, Chao S, Muehlbauer GJ (2002) Functional and Comparative Bioinformatic Analysis of Expressed Genes from Wheat Spikes Infected with *Fusarium graminearum*. The American Phytopathological Society 15:445-455.

Kudla J, Xu Q, Harter K (1999) Genes for calcineurin Blike proteins in arabidopsis are differentially regulated by stress signals. Plant Biology 96:4718-4723.

Li Gl, Yen Y (2008) Jasmonate and ethylene signaling pathway may mediate Fusarium head blight resistance in wheat. Crop Science 48:1888-1896.

Luo Y, Shang J, Zhao P, Xi D, Yuan S, Lin H (2011). Application of jasmonic acid followed by salicylic acid inhibits cucumber mosaic virus replication. Plant Pathology 27:53-58.

Mandaokar A, Thines1 B, Shin B, Markus Lange1B, Choi G, Koo YJ, Yoo YJ, Choi YD, Choi G, Browse J (2006) Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. Plant Journal 46:984-1008.

Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Guldener U, Mannhaupt G, Munsterkotter M, Mewes HW (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. Nucleic Acids Research 32: 5539-5545.

Reeves PH, Ellis CM, Ploense SE, Wu M-F, Yadav V, Tholl D, Che telat A, Haupt I, Kennerley BJ, Hodgens C, Farmer EE, Nagpal P, Reed JW (2012) A Regulatory Network for Coordinated Flower Maturation. PLoS Genetics. 8:e1002506

Reynoird JP, Meynet J, Caissard JC, Chriqui D, (1997) Micropropagation of Gerbera. In: Widholm *et al*,. (eds), Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 40. Pp. 147-162.

Rossi FR, Marina AGM, Romero FM, Gonzalez ME, Collado IG, Pieckenstain FL (2011) The sesquiterpene botrydial produced by Botrytis cinerea induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. Molecular Plant-Microbe Interactions 24:888-896.

Smith JE, Mengesha B, Tang U, Mengiste T, Bluhm B (2014) Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* involves widespread transcriptional reprogramming. BMC Genomics 15:334.

Tausz M, Gullner G, Komives T, Grill D (2003) Role of thiols in plant adaptation to environmental stress. In: Abrol YP, Ahmad A (Ed.). Sulphur in plants. Dordrecht, Kluwer 221-244.

Tuteja N (2007) Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. Plant Signaling and Behavior 2:135-138.

Vrind TA (2005) The Botrytis Problem in Figures. In: Proceedings of VIIIth International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants. Netherlands, Doorwerth 99-102.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8:561- 580.

Xiao J, Jin X, Wang H, Cao A, Zhao W, Pei H, Xue Z, He L, Chen Q, Wang X (2013) Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to resistance against *Fusarium* head blight in wheat landrace Wangshuibai. BMC Genomics 14:197.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.7.3]