مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۶
صفحه ۱۴۲-۱۳۱

Archive of SID

بررسی الگوی بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه در آفتابگردان

Gene expression profiling of transcription factors associated with resistance to *Sclerotinia* basal stem rot disease in sunflower

رقیه نجف‌زاده[۱]، رضا درویش‌زاده[۲*]، آرام نوری[۳]، خدیجه موسی‌خلیفانی[۴]

Roghayeh Najafzadeh[1], Reza Darvishzadeh[2*], Aram Nouri[3], Khadijeh Musa-Khalifani[4]

۱- پسادکتری، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، و بنیاد ملی نخبگان
۲- استاد، ۳- کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی، ۴- کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات،
گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

1. Postdoctoral, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, and National Elites Foundation,
2. Professor, 3. M.Sc in Agricultural Biotechnology, 4. M.Sc. in Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۵ - تاریخ پذیرش:۹۶/۵/۱۹)

چکیده

بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه از بیماری‌های قارچی مهم آفتابگردان می‌باشد که رشد و عملکرد محصول را کاهش می‌دهد. هدف از این پژوهش بررسی مقاومت ژنوتیپ ها و راستی-آزمایی صحّت تجزیه QTL انجام گرفته برای مقاومت به این بیماری در پژوهش‌های پیشین به منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان می‌باشد. در این پژوهش بیان ژن‌های کد کننده عوامل رونویسی (AP2 Domain، HD-Zip و MYB Family) دخیل در مقاومت به بیماری در لاین‌های حساس (RHA265) و مقاوم (LC106-C) آفتابگردان به جدایه SSU53 عامل بیماری اسکلروتینیا (*Sclerotinia sclerotiorum*) با روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن کدکننده عوامل رونویسی مورد مطالعه در لاین‌های حساس و مقاوم آفتابگردان متفاوت است. به طوری که میزان بیان ژن کد کننده عوامل رونویسی AP2 Domain و MYB Family در لاین مقاوم LC106-C در مقایسه با لاین حساس RHA265 به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج نشان‌دهنده نقش مثبت عوامل رونویسی AP2 Domain وMYB Family در مکانیسم مقاومت گیاه آفتابگردان در پاسخ به آلودگی قارچ عامل اسکلروتینیا می‌باشد. طبق این نتایج، لاین LC106-C می‌تواند به عنوان لاین مقاوم به بیماری اسکلروتینیا در آفتابگردان معرفی گردد. همچنین بیشتر بودن میزان بیان ژن در لاین مقاوم و کمتر بودن آن در لاین حساس نیز، خود تأییدی بر ارتباط صحیح بین فنوتیپ و نشانگر و صحت تجزیه QTL انجام گرفته در پژوهش‌های پیشین است. نتایج این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان برای تولید ارقام مقاوم به بیماری اسکلروتینیا مفید واقع گردد.

واژه‌های کلیدی

آفتابگردان، بیان ژن، اسکلروتینیا، مقاومت

www.SID.ir

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

Archive of SID

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) متعلّق به تیره مرکبان (Compositae یا Asteraceae) می‌باشد که زراعت آن در سراسر جهان به دلیل زیبایی گل، مصرف آجیلی و تولید روغن انجام می‌گیرد (Vollmann *et al.*, 2010). ارقام روغنی آفتابگردان به دلیل درصد روغن بالا برای استحصال روغن مورد استفاده قرار می‌گیرند. آفتابگردان چهارمین منبع تأمین روغن خوراکی در دنیا می‌باشد (FAO/EBRD, 2010). جنس *Sclerotinia* متعلّق به خانواده Sclerotiniaceae می‌باشد (Gulya *et al.*, 1997) و سه گونه قارچی *S. sclerotiorum*، *S. minor* و *S. trifoliorum* به علت انتشار گسترده، دامنه میزبانی وسیع و خسارت سنگین، مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین گونه‌های این جنس به شمار می‌روند (Saharan & Mehta, 2008). دامنه میزبانی وسیع (Boland & Hall, 1994)، توان تولید اندام مقاوم و بقاء طولانی مدت قارچ در خاک (Bolton, 2006; Bardin & Huang, 2001) و نیز تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف عامل بیماری (Davar *et al.*, 2011)، این قارچ را در زمره یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی قرار داده است. این بیمارگر در تمامی مراحل رشد آفتابگردان باعث پوسیدگی ریشه، ساقه، یقه و طبق می‌گردد و در شرایط آب و هوایی مساعد برای آن، خسارت زیادی به محصول وارد می‌کند (Amoozadeh *et al.*, 2015; Emamgholi *et al.*, 2015). در تمام مناطق دنیا که کشت آفتابگردان مرسوم است، اسکلروتینیا به عنوان یکی از بیمارگرهای بسیار آسیب رساننده به گیاه مطرح می‌باشد که می‌تواند میزان محصول را تا ۱۰۰ درصد کاهش دهد (Micic *et al.*, 2005). در ایران، اسکلروتینیا از بیماری‌های قارچی مهم آفتابگردان می‌باشد که باعث کاهش رشد و عملکرد محصول می‌شود (Ershad, 1995). شیوع و توسعه این بیماری در منطقه شمال‌غرب کشور باعث کاهش سطح زیرکشت این محصول شده است. وسعت خسارت در بعضی مواقع به حدی می‌رسد که از مزارع تحت کشت، عملاً محصولی برداشت نمی‌شود (Emamgholi *et al.*, 2015). بکارگیری ارقام متحمل، یکی از روش‌های مهم مدیریت بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی می‌باشد (Bert *et al.*, 2004; Emamgholi *et al.*, 2015). تاکنون هیچ ژنوتیپی با مقاومت کامل به بیماری مشاهده نشده است (Bert *et al.*, 2004). این امر بخاطر کمّی بودن وراثت مقاومت به بیماری می‌باشد (Davar *et al.*, 2010). اما ژنوتیپ‌های مختلف این محصول، سطوح متفاوتی از مقاومت در برابر بیماری را نشان می‌دهند (Hahn, 2002). 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 از مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر بیمارگرها نیز مطّلع بود (Grover & Gowthaman, 2003). همانطور که بیمارگرها سعی در استثمار گیاهان زنده دارند، گیاهان نیز درصدد توسعه و تکامل سیستم‌های دفاعی برای جلوگیری یا تحمل در برابر حمله بیمارگرها هستند و در این رابطه استراتژی‌های گوناگون توسعه یافته است (Monaim *et al.*, 2011). به طور کلی تنش‌های زیستی و غیرزیستی فرایندهای اکسیداتیو را در سلول‌های گیاهی القاء می‌کنند که این فرایندها با تولید ROSها (Reactive oxygen species) آغاز می‌شود (Heidarvand & Maali Amiri, 2013). ROSها نه تنها محصولات سمی متابولیسم‌های هوازی هستند، بلکه در مسیر سیگنال‌های مولکولی نیز عمل کرده، همچنین در چندین فرایند رشدی تحت تنش‌های زنده و غیرزنده مانند حمله پاتوژن، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، پیری، تنش‌های خشکی، سرما، گرما، نور شدید، فلزات سنگین و غیره مشارکت دارند (Kazemi Shahandashti *et al.*, 2013). تجمع ROSها در سلول منجر به فعال کردن مسیرهای سیگنال‌دهی اختصاصی می‌شود که این نیز باعث تنظیم بیان ژن، تأثیر بر عوامل رونویسی و تغییر در سنتز و فعالیت پروتئین می‌گردد و در نهایت سلول را برای سازگاری با شرایط جدید آماده می‌کند (Dynowski *et al.*, 2008; Lohar *et al.*, 2007). در زمان القای واکنش دفاعی که بر اثر حمله میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ایجاد می‌شود، مجموعه‌ای از ژن‌های دفاعی در میزبان فعال شده و تعدادی پروتئین محلول با وزن مولکولی پایین سنتز می‌شوند که به فضای بین‌سلولی منتقل می‌گردند (Okushima *et al.*, 2000). چنین پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی که به دنبال حمله عوامل بیماری‌زا یا تنش‌های محیطی تولید می‌شوند، پروتئین‌های PR (Pathogenesis related proteins) نامیده می‌شوند که خاصیت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

ضدمیکروبی داشته (Stintzi *et al.*, 1993) و با مقاومت القایی همبستگی دارند (Okushima *et al.*, 2000).

بیان پروتئین‌های PR به شدت توسط عوامل رونویسی خاص تنظیم می‌گردد (Zhang *et al.*, 2013). عوامل رونویسی از اجزای کلیدی در کنترل بیان ژن در همه بافت‌های زنده می‌باشند (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 (Gof *et al.*, 2013; Riechmann and Ratclife, 2000). از میان عوامل رونویسی مختلف، پروتئین‌های AP2 Domain (Aharoni *et al.*, 2004)، WRKY (Mare *et al.*, 2004)، MYB (Yamaguchi Shinazaki & Shinozaki, 2005) و HD-ZIP (Javelle *et al.*, 2001) بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند. تاکنون چندین مطالعه در رابطه با بررسی بیان ژن‌ها و عوامل رونویسی دخیل در مقاومت به بیماری در آفتابگردان انجام گرفته است (Mohamadian Farsani *et al.*, 2014; Nouri, 2015; Hoshyardel *et al.*, 2014; Alignan *et al.*, 2006; Darvishzadeh *et al.*, 2008). در پژوهش حاضر، به منظور بررسی عوامل رونویسی دخیل در مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی و راست‌آزمایی داده‌های فنوتیپی حاصل از اندازه-گیری واکنش لاین‌های آفتابگردان در مقابل قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی که در تجزیه QTL استفاده شده بودند (Amoozadeh, 2012; Davar, 2011)، دو لاین با واکنش حساسیت متفاوت انتخاب گردید و بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری با تکنیک Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و آلودگی با جدایه قارچ عامل بیماری

دو لاین LC106-C و RHA265 آفتابگردان با واکنش حساسیت متفاوت به جدایه SSU53 قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه (*Sclerotinia sclerotiorum*) بر اساس نتایج مطالعات پیشین انتخاب شدند (Amoozadeh, 2012; Davar, 2011). بذر لاین‌ها از مؤسسه تحقیقات آگرونومی فرانسه (INRA) تهیه شد. بذور در گلدان‌های ۶۰ ×۲۰ سانتی‌متری در محیط پیت ماس در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۶ گیاهچه کشت شدند. سپس گیاهان در شرایط کنترل شده با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و با فتوپریود تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعت به مدت شش هفته تا مرحله V6-V8 پرورش یافتند (Schneiter & Miller, 1981). جدایه قارچی در محیط آگار دکستروز سیب‌زمینی یا PDA (Potato Dextrose Agar) به میزان ۳۹ گرم در لیتر با pH=6 کشت و سپس به اتاق تاریک با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی-گراد منتقل شد. تلقیح گیاهچه‌های آفتابگردان با قارچ عامل بیماری در مرحله ۸ -۶ برگی انجام شد. بدین منظور پس از رشد جدایه قارچی، دیسک‌های میسیلیومی به قطر ۳ میلی‌متر از لبه رو به رشد کلنی قطع گردید و در پایه‌های ساقه گیاهان قرار داده شدند. به منظور حفظ رطوبت جهت رشد قارچ، پایه ساقه با پارافیلم و پنبه خیس پوشانده شد. سپس در زمان‌های صفر (شاهد)، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با جدایه قارچی، از محل آلوده نمونه برداشت شد و در نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. به منظور کنترل کارایی تلقیح، چندین گیاه تلقیح شده از لاین‌های LC106-C و RHA265 تا چند روز بعد از تلقیح رشد داده شدند. در این مدت امکان مشاهده نکروز به‌صورت واضح وجود دارد (Davar *et al.*, 2010).

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از نمونه‌ها با استفاده از محلول استخراج RNX-plusTM (شرکت سیناکلون، ایران) طبق پروتکل شرکت سازنده و بر روی یخ انجام گرفت. پس از بررسی کمّیت و کیفیت RNA استخراج‌شده، برای ساخت cDNA از کیت Fermentas LIFE SCIENCE#K1621 استفاده شد. بدین منظور در لوله استریل ۰/۲ میلی‌لیتری، به مقدار ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز ریخته شد. سپس ۶ میکرولیتر RNA استخراج شده و ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dT اضافه شد. پس از انجام یک سانتریفیوژ پالسی، لوله حاوی مواد به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفت. پس از سرد کردن لوله حاوی مواد روی یخ،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

یک ورتکس نرم انجام گرفت. سپس ۴ میکرولیتر بافر واکنش 5x، ۱ میکرولیتر آنزیم RiboLockTM RNase Inhabitor (۲۰ واحد در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار) و ۱ میکرولیتر آنزیم (RevertAidTM M-MuLV Revers Transcriptase) (۲۰۰ واحد در میکرولیتر) به لوله حاوی مواد اضافه شد. بعد از انجام سانتریفیوژ پالسی، لوله حاوی مواد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲°C و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C قرار داده شد. برای بررسی صحّت سنتز cDNA سه واکنش: کنترل منفی RT–، کنترل منفی NTC (بدون الگو) و کنترل مثبت در نظر گرفته شد. همچنین جهت بررسی کیفیت cDNA با استفاده از آغازگرهای ژن ۱۸S rRNA، cDNA موردنظر در فرایند PCR تکثیر شد (Nouri, 2015).

واکنش Real Time RT-PCR

به منظور مقایسه بیان هر یک از عوامل رونویسی (AP2 Domain، HD-Zip و MYB Family) در اثر آلودگی با قارچ عامل بیماری، از آغازگرهای طراحی شده توسط Darvishzadeh و همکاران (Darvishzadeh *et al.*, 2008) استفاده شد (جدول ۱). واکنشReal Time PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Maxima SYBR Green/ Fluorescein qPCR Master Mix (2X)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای Forward و Reverse (۱۰ میکرومولار)، ۱/۲۵ میکرولیتر cDNA (۵۰۰ میکروگرم) و ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز در ۳ تکرار در دستگاه Rotor gene Q-Pure Detection-Qiagen با استفاده از برنامه ۱۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ چرخه شامل ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در دمای مختص هر آغازگر و ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد انجام گرفت. پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی تکثیر و ذوب برای هر ژن به دست آمد و با استفاده از منحنی ذوب درستی تکثیر محصول مربوط به هر ژن تأیید شد. به منظور نرمال نمودن داده‌های حاصل از Real Time RT-PCR از ژن ۱۸s به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱) (Nouri, 2015).

تجزیه‌های آماری

برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن از روش ΔΔCT (Pfaffl *et al.*, 1981) به صورت زیر استفاده شد: ΔCT نمونه هدف= CT ژن مورد نظر در نمونه هدف– CT ژن نرمال کننده در نمونه هدف، ΔCT نمونه شاهد= CT ژن مورد نظر در شاهد– CT ژن نرمال کننده در شاهد، ΔΔCT= (ΔCT نمونه هدف– ΔCT نمونه شاهد). میزان بیان ژن در نمونه تیمار شده نسبت به شاهد به صورت $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. در این روابط CT چرخه آستانه می‌باشد. تجزیه داده‌های حاصل از میزان نسبی بیان ژن‌ها بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. به دلیل نرمال نبودن توزیع اشتباهات آزمایشی، تجزیه آماری با روش ناپارامتری Brunner و همکاران (Brunner *et al.*, 2002) انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام گرفت. نمودارها با Excel رسم شدند.

جدول ۱– آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در Real Time RT-PCR

Table 1. Oligonucleotide primers used in Real Time RT-PCR

توالی نام	عملکرد	شماره ژن	آغازگر Forward و Reverse	TM^0C
DH0AQA11ZA10RM1	AP2 Domain transcription factor	CX946549	F:CAAGAACTCGGCCAATTCGT R:AGGAGTAGCAAGGCACCATCA	۵۸
DH0AQA17ZH04RM1	HD-Zip transcription factor	CX946945	F:GCAGCACATCGAGGACATCA R:GGATCGCACCTCGTGGTTT	۵۸
DH0AC028ZC03FM1	MYB Family transcription factor	CD850032	F:CCTCCCTGGCACATGAAGTT R:CAAGCCGCTCCACTTCAAAG	۶۰
	18srRNA	AK059783	F:CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA′ R:ACACTTCACCGGACCATTCAA	۵۸/۵

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

نتایج و بحث

بر اساس مطالعات فنوتیپی انجام شده، لاین LC106-C به جدایه قارچی SSU53 مقاوم اما لاین RHA265 به جدایه ذکر شده حساس می‌باشد (Amoozadeh, 2012; Davar, 2011). واکنش فنوتیپی لاین های آفتابگردان روغنی به جدایه قارچ عامل بیماری (*Sclerotinia sclerotiorum*) در جدول ۲ ارایه شده است. نتایج جدول تجزیه واریانس روی داده های بیان ژن بر اساس آماره Wald (Wald-type) نشان می‌دهد که اثر لاین روی بیان عامل رونویسی AP2 Domain در سطح احتمال ۱ درصد ($P\leq0.01$) و روی بیان عامل رونویسی MYB Family در سطح احتمال ۵ درصد ($P\leq0.05$) معنی‌دار است. اثر مدت زمان پس از آلودگی روی بیان عوامل رونویسی HD-Zip و MYB Family در سطح احتمال ۱ درصد ($P\leq0.01$) معنی‌دار است. اثر متقابل لاین × زمان نیز در سطح احتمال ۱ درصد ($P\leq0.01$) روی بیان نسبی عامل رونویسی HD-Zip معنی‌دار است. نتایج حاصل از آماره آنوا تیپ (ANOVA-type) نشان می‌دهد که اثر لاین روی بیان عامل رونویسی AP2 Domain و اثر متقابل لاین × زمان روی بیان نسبی عامل رونویسی HD-Zip در سطح احتمال ۵ درصد ($P\leq0.05$) معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). لازم به ذکر است در مواردی همچون آزمایش مذکور که حجم نمونه مورد مطالعه کم است، تجزیه واریانس بر اساس آماره Wald بر آنوا تیپ (ANOVA-type) برتری دارد (Shah & Madden, 2004).

الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی AP2 Domain در دو لاین LC106-C و RHA265 پس از آلودگی با قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه نشان داد که میزان بیان این عامل رونویسی در لاین مقاوم LC106-C در مقایسه با لاین حساس RHA265 طی زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی با قارچ افزایش یافته است. بیشترین و کمترین میزان بیان ژن در این لاین به ترتیب در زمان‌های ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد. میزان بیان ژن در لاین حساس (RHA265) طی زمان‌های پس از آلودگی تفاوتی نداشت (شکل ۱). به نظر می‌رسد عامل رونویسی AP2 Domain با مقاومت به بیماری اسکلروتینیا در آفتابگردان در ارتباط باشد. در رابطه با الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی HD-Zip در دو لاین LC106-C و RHA265 پس از آلودگی با قارچ عامل بیماری اسکلروتینیا مشاهده شد بیان ژن کد کننده عامل رونویسی HD-Zip بسته به ترکیب لاین- زمان متفاوت است. در لاین حساس (RHA265) میزان بیان ژن ۳ ساعت پس از آلودگی با قارچ افزایش یافت (شکل ۲). پس از طی ۱۲ ساعت از آلودگی، میزان بیان این ژن در لاین مقاوم افزایش یافته و در لاین حساس کاهش نشان داد.

جدول ۲- متوسط درصد نکروز در لاین های آفتابگردان روغنی آلوده شده با جدایه SSU53 قارچ عامل بیماری *S. sclerotiorum* در شرایط کنترل شده

Table 2- Mean percentage of necrosis on oily sunflower lines inoculated with *S. sclerotiorum* isolate SSU53

لاین Line	نوع Type	منشا Origin	درصد آلودگی Percentage of inoculation	واکنش به جدایه SSU53 Reaction to SSU53 isolate
RHA265	Breeder line	آمریکا	%۷۴	حساس (Susceptible)
LC1064-C	Breeder line	فرانسه	%۳۶	جزیی مقاوم (Partial resistance)

واکنش فنوتیپی ژنوتیپ های آفتابگردان روغنی به جدایه قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه (*Sclerotinia sclerotiorum*) سه روز پس از آلودگی، که به صورت درصد قسمت نکروزه و پوسیده در ۱ سانتیمتری از پایه ساقه به صورت بصری اندازه‌گیری شده است.

Phenotypic reaction of oily sunflower genotypes to basal stem rot disease isolate scored 3 days after basal stem inoculation based on the percentage of the area exhibiting necrosis symptoms on 1 cm of the stem base and all around it.

www.SID.ir

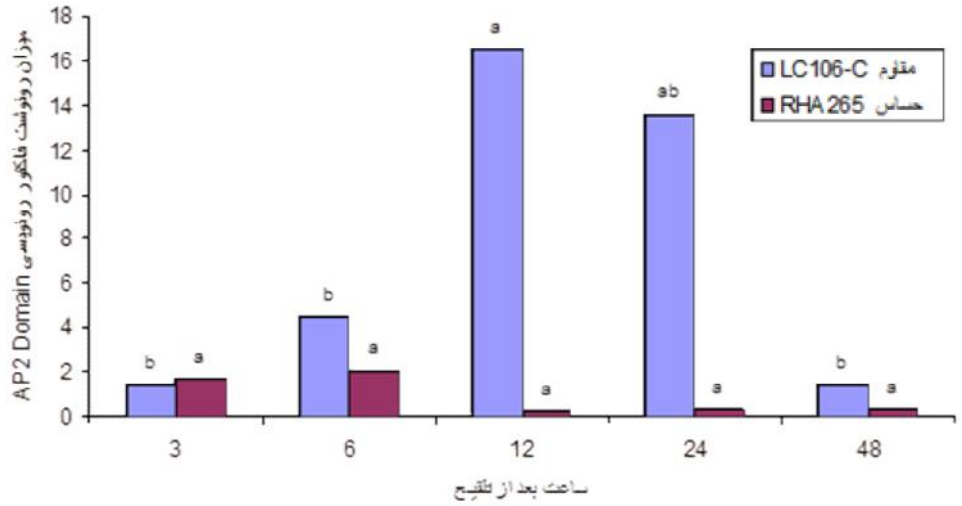
Archive of SID

جـــدول ۳- تجزیـــه واریـــانس تغییـــرات رونوشـــت عوامـــل رونویســـی در لایـــن‌هـــای آفتـــابگردان روغنـــی مـــورد مطالعـــه طـــی زمـــان‌هـــای مختلـــف پس از آلودگی با جدایه SSU53 قارچ اسکلروتینیا

Table 3. Analysis of variance for transcript factors variations in oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes in response to SSU53 isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* post inoculation times.

Wald-type statistic							
منابع تغییرات		لاین		زمان		لاین × زمان	
عوامل رونویسی	df_D	df_N	Chi-Square	df_N	Chi-Square	df_N	Chi-Square
AP2 Domain	۱۰	۱	۷/۳۸**	۴	۱/۹۳^{ns}	۴	۸/۱۰^{ns}
HD-Zip	۱۰	۱	۰/۲۱^{ns}	۴	۳۵/۸۵**	۴	۶۰/۱۲**
MYB Family	۱۰	۱	۴/۲۲*	۴	۴۷/۳۴**	۴	۵/۱۹^{ns}
ANOVA-type statistics							
منابع تغییرات		لاین		زمان		لاین × زمان	
عوامل رونویسی	df_D	df_N	F-value	df_N	F-value	df_N	F-value
AP2 Domain	۳/۹۵	۱	۷/۳۸*	۲/۸۸	۰/۲۲^{ns}	۲/۸۸	۰/۴۴^{ns}
HD-Zip	۴/۶۱	۱	۰/۲۱^{ns}	۳/۲۴	۵/۰۳^{ns}	۳/۲۴	۱۱/۴۱*
MYB Family	۴/۴۷	۱	۴/۲۲^{ns}	۲/۷۲	۳/۹۹^{ns}	۲/۷۲	۱/۲۲^{ns}

df_D: درجه آزادی غیرشمارشی؛ df_N: درجه آزادی شمارشی. **معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد (۰/۰۱)، *معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (۰/۰۵) و ^{ns}عدم معنی-دار.



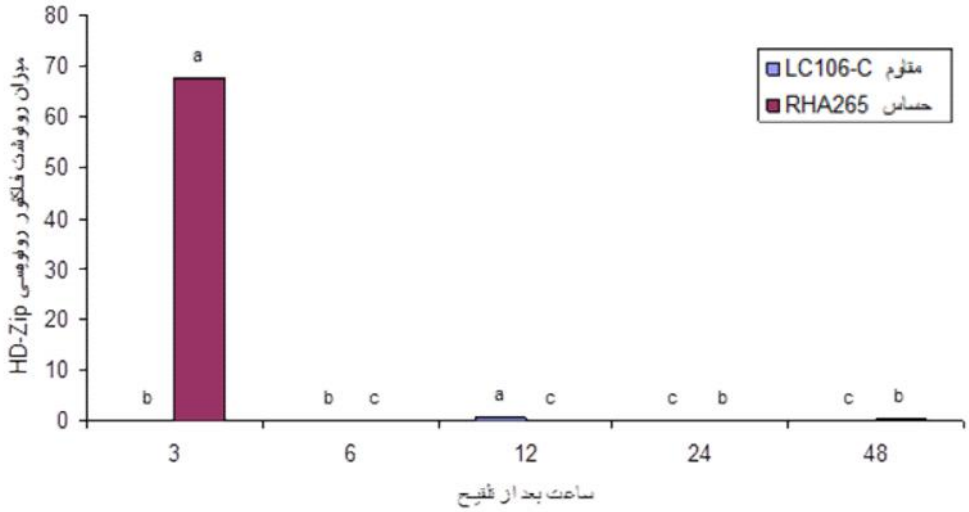
شکل ۱- الگوی بیان ژن عامل رونویسی AP2 Domain در لاین‌های LC106-C و RHA265 آفتابگردان روغنی ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با جدایه SSU53 قارچ اسکلروتینیا (*S. sclerotiorum*) در مقایسه با شاهد (گیاهان آلوده نشده). واحد محور عمودی یا Y: برابر.

Figure 1. Expression profiling of AP2 Domain in oily sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes (RHA265 and LC106-C) 3, 6, 12, 24 and 48 H post inoculation by SSU53 isolate of *S. sclerotiorum* compared to non inoculated plants. Y-axis unit: Fold.

www.SID.ir
Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

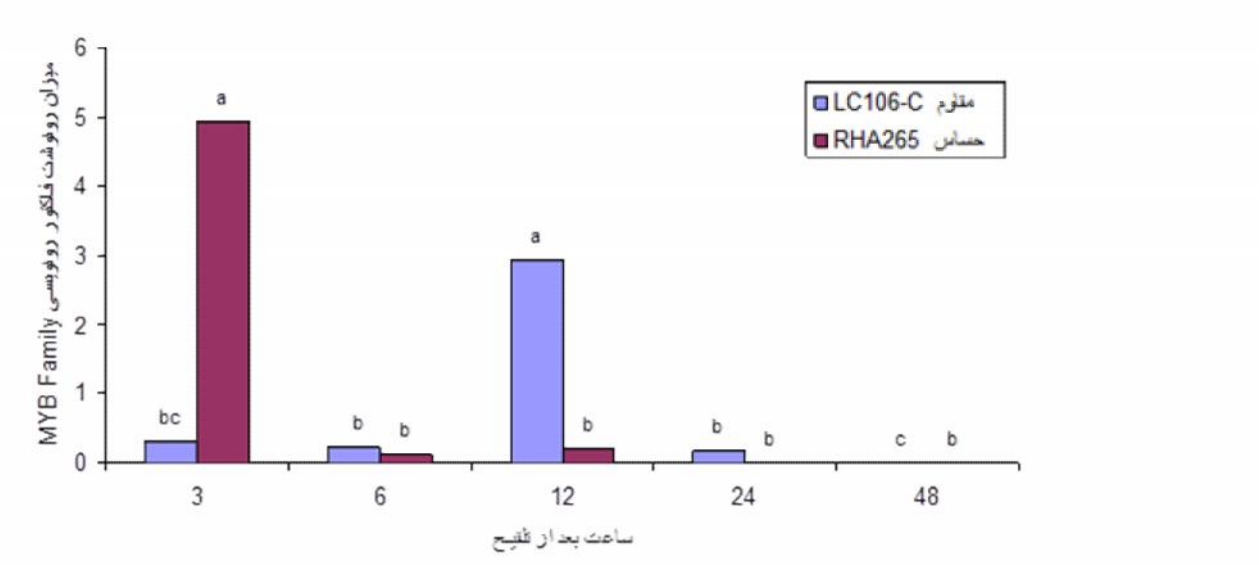
Archive of SID

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017



شکل ۲- الگوی بیان ژن عامل رونویسی *HD-Zip* در لاین‌های LC106-C و RHA265 آفتابگردان روغنی ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با جدایه SSU53 قارچ اسکلروتینیا (*S. sclerotiorum*) در مقایسه با شاهد (آلوده نشده). واحد محور عمودی یا Y: برابر.

Figure 2. Expression profiling of HD-Zip in oily sunflower (*H. annuus* L.) genotypes (RHA265 and LC106-C) 3, 6, 12, 24 and 48 H post inoculation by SSU53 isolate of *S. sclerotiorum* compared to non inoculated plants. Y-axis unit: Fold



شکل ۳- الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی MYB Family در لاین‌های LC106-C و RHA265 آفتابگردان روغنی ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با جدایه SSU53 قارچ اسکلروتینیا (*Sclerotinia sclerotiorum*) در مقایسه با شاهد (گیاهان آلوده نشده). واحد محور عمودی یا Y: برابر.

Figure 3. Expression profiling of MYB Family in oily sunflower (*H. annuus* L.) genotypes (RHA265 and LC106-C) 3, 6, 12, 24 and 48 H post inoculation by SSU53 isolate of *S. sclerotiorum* compared to non inoculated plants. Y-axis unit: Fold

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

طبق نتایج حاصل از الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی MYB Family در دو لاین LC106-C و RHA265 پس از آلودگی با قارچ عامل بیماری اسکلروتینیا، افزایش بیان ژن در لاین حساس RHA265 در زمان اولیه یعنی ۳ پس از آلودگی با قارچ مشاهده شد و بعد از آن روند کاهشی نشان داد (شکل ۳). در مقابل میزان بیان این عامل رونویسی در لاین مقاوم LC106-C در مقایسه با لاین حساس RHA265 ۱۲ ساعت پس از آلودگی با قارچ اسکلروتینیا افزایش نشان داد. عموما بیان ژن کد کننده عامل رونویسیMYB Family در اکثر زمان‌ها (به غیر از زمان اولیه ۳ ساعت) در لاین مقاوم بیشتر می‌باشد. بر این اساس احتمالا عامل رونویسی MYB Family با مقاومت به بیماری اسکلروتینیا در آفتابگردان ارتباط داشته باشد. همچنین میزان بیان عامل رونویسی MYB Family با بیان عامل رونویسی AP2 Domain همخوانی داشت. به نظر می‌رسد دو عامل رونویسی AP2 Domain و MYB Family با افزایش مقاومت به بیماری اسکلروتینیا در آفتابگردان در ارتباط باشند.

نرخ بیان ژن کد کننده عوامل رونویسی AP2 Domain و MYB Family در لاین مقاوم LC106-C در مقایسه با لاین حساس RHA265 به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیان ژن کد کننده عامل رونویسی HD-Zip نیز بسته به ترکیب لاین-زمان متفاوت بود. بیشترین میزان بیان عوامل رونویسی مورد مطالعه در لاین مقاوم طی زمان ۱۲ ساعت و در لاین حساس طی زمان ۳ ساعت پس از آلودگی قارچی مشاهده شد. طبق این نتایج، عوامل رونویسی AP2 Domain و MYB Family بالقوه در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به آلودگی قارچی اسکلروتینیا نقش دارند. با توجه به تایید مقاومت لاین مقاوم (LC106-C) در سطح مولکولی، می‌توان از لاین فوق در تولید رقم مقاوم به بیماری اسکلروتینیا در آفتابگردان استفاده کرد. همچنین بیشتر بودن میزان بیان ژن در لاین مقاوم و کمتر بودن آن در لاین حساس، خود تأییدی بر صحت داده‌های فنوتیپی مورد استفاده در تجزیه QTL در پژوهش‌های پیشین (Amoozadeh., 2012; Davar, 2011) است. شناسایی QTL به دلیل اینکه گزینش ژنوتیپی مقاومت به جدایه های قارچی را امکان‌پذیر می‌سازد، می‌تواند در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان حائز اهمیت باشد.

واکنش ژنوتیپ- جدایه در سطح بیان ژن برای درک مکانیسم پاسخ گیاه در برابر بیماری‌ها مهم می‌باشد و نشان می‌دهد که زمینه ژنتیکی میزبان، ژنوتیپ جدایه و نیز تعامل آن‌ها، چه میزان بیان ژن‌ها را در گیاه آفتابگردان تحت تأثیر قرار داده است (Hoshyardel *et al.*, 2014). گزارش شده است که عوامل رونویسی AP2 Domain (Aharoni *et al.*, 2004)، MYB (Yamaguchi Shinazaki & Shinozaki, 2005) و HD-ZIP (Javelle *et al.*, 2011) بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند. افزایش بیان ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت و دستکاری-های مولکولی ژن‌های مقاومت برای افزایش تأثیر آن‌ها در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا، استفاده تجاری از مهندسی ژنتیک را در گیاهان فراهم می‌کند (Mohamadian Farsani *et al.*, 2014). در رابطه با بررسی بیان ژن‌ها و عوامل رونویسی دخیل در مقاومت به بیماری در آفتابگردان تاکنون مطالعاتی انجام گرفته است. در بررسی تغییرات رونوشت ژن‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز۲ (PAL2) و پروتئین شبه‌توماتین (TLP) در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در پاسخ به جدایه‌های قارچ عامل بیماری ساقه سیاه گزارش شد که سطح رونوشت این ژن‌ها به طور معنی‌داری تحت تأثیر جدایه، ژنوتیپ و اثر متقابل ژنوتیپ-جدایه می‌باشد (Mohamadian Farsani *et al.*, 2014). در مطالعه آن‌ها، ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به ترتیب دارای سطح بالا و پایین از رونوشت ژن‌های مورد نظر بودند. در مطالعه بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان گزارش شد که تظاهر سه عامل رونویسی AP2 Domain، WRKY Family و MYB Family تفاوت معنی‌داری بین ترکیبات مختلف ژنوتیپ-جدایه نشان نمی دهد (Hoshyardel *et al.*, 2014). در مطالعه آن‌ها تظاهر ژن‌های مربوط به دو عامل HD-Zip و MYB Related در تمام ترکیبات ژنوتیپ-جدایه به طور معنی‌داری سرکوب شد، اما میزان آن بسته به ترکیب ژنوتیپ-جدایه متفاوت بود. در بررسی الگوی بیان ژن‌های PAL و TLP در لاین‌های آفتابگردان در پاسخ به جدایه‌های قارچ عامل بیماری اسکلروتینیا گزارش شد که در رابطه با ژن PAL بین دو لاین در زمان‌های ۶ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی و در رابطه با ژن TLP در ۴۸ ساعت پس از آلودگی اختلاف معنی‌داری از نظر بیان وجود دارد (Nouri, 2015). طوری که سطح بیان نسبی PAL

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

در لاین مقاوم در زمان ۶ ساعت پس از آلودگی به میزان ۱۶۶ برابر و در ۴۸ ساعت پس از آلودگی به میزان ۸ برابر بیشتر از لاین حساس بود. سطح بیان نسبی ژن TLP نیز در لاین مقاوم ۶۳۱ برابر بیشتر از لاین حساس بود. در پژوهشی دیگر که توسط Alignan و همکاران (۲۰۰۶) به منظور شناسایی تغییر در میزان رونوشت ژن‌ها در لاین‌های آفتابگردان مقاوم و حساس به جدایه MP6 قارچ عامل بیماری ساقه سیاه با استفاده از تکنیک ریزآرایه انجام گرفت، ۲۰ cDNA مرتبط با پروتئین‌های دفاعی و عوامل رونویسی دخیل در پیام‌رسانی برای این بیماری شناسایی شد. Darvishzadeh و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که بیان عوامل رونویسی AP2 Domain و MYB Related در پاسخ به جدایه‌های قارچ عامل ساقه سیاه در آفتابگردان در ترکیبات مختلف ژنوتیپ-جدایه متفاوت است. این در حالی است که تفاوتی در بیان عامل رونویسی HD-Zip مشاهده نشد. در سایر مطالعات نیز نقش عوامل رونویسی در پاسخ سایر گیاهان به بیماری مورد بررسی قرار گرفته است. از آن جمله می‌توان به مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۰۹) اشاره نمود که توانستند ژن GmERF3 را که نوعی عامل رونویسی AP2/EFR می‌باشد، 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 *Alternata alternaria* نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که بیان عوامل رونویسی AP2 Domain و MYB Family در لاین مقاوم LC106-C در مقایسه با لاین حساس RHA265 به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج نشان‌دهنده نقش مثبت عوامل رونویسی AP2 Domain و MYB Family در مکانیسم مقاومت آفتابگردان به آلودگی قارچی اسکلروتینیا است. با تایید مقاومت لاین LC106-C در مقابل عامل بیماری اسکلروتینیا در سطح مولکولی، می‌توان بالقوه از لاین مذکور در تولید ارقام هیبرید مقاوم در اصلاح نباتات متداول استفاده نمود. همچنین بیشتر بودن میزان بیان ژن در لاین مقاوم و کمتر بودن آن در لاین حساس، خود تأییدی بر صحت تجزیه QTL انجام گرفته در پژوهش‌های پیشین گروه است.

مهندسی ژنتیک از طریق جداسازی و انتقال ژن های موثر نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان به تنش های زیستی داشته است. از آنجا که ژنتیک تحمل به اکثر تنش های زیستی کمی است و تعداد زیادی ژن در کنترل آنها دخیل هستند انتقال و بیان یک ژن عملکردی قادر به ایجاد تغییرات کامل در پاسخ گیاه به تنش ها و ایجاد تحمل در سطح مطلوب در گیاه نیست. عوامل رونویسی که در تنظیم مسیرهای انتقال پیام و بیان ژن ها دخیل هستند در گروه ژن های تنظیمی طبقه بندی می شوند و کاندیدای مطلوب برای انتقال و افزایش تحمل گیاهان می باشند. این عوامل با عناصر تنظمی سیس موجود در ناحیه راه انداز ژن های زیادی که در پاسخ به تنش ها اثربخش اند برهمکنش نشان داده و سبب تنظیم آنها می شوند. بنابراین در بعد دیگر نتایج پژوهش حاضر می تواند در برنامه‌های به‌نژادی مولکولی آفتابگردان برای تولید ارقام مقاوم به بیماری مفید بوده و راه را برای کاهش خسارات ناشی از این بیماری در آفتابگردان هموار نماید.

تشکر و قدردانی

نتایج این مقاله از طرح تحقیقاتی مصوّب دانشگاه و بنیاد ملی نخبگان ریاست جمهوری (قرارداد به شماره ۱۵/۷۶۸۳۲، تاریخ ۱۳۹۴/۱۲/۱۰) مستخرج شده است. بدین وسیله از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه و بنیاد ملی نخبگان ریاست جمهوری به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد. از انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه نیز به خاطر در اختیار قرار دادن بذور لاین‌های آفتابگردان تشکر می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

منابع

Abdel Monaim, M.F., Abo Elyousr, K.A.M. & Morsy, K.M. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop Protection*, 30, 185–191.

Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., Arkel, G.V. & 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. *Plant Cell*, 16, 2463–2480.

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.

Amoozadeh, M., Darvishzadeh, R., Davar, R., Abdollahi Mandoulakani, B., Haddadi, P. & Basirnia A. (2015). Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate non-specific partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, 213–226.

Amouzadeh, M. (2012). QTL mapping of partial resistance to basal stem rot disease in sunflower. M. Sc. Thesis, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University. (In Farsi).

Bardin, S.D. & Huang, H.C. (2001). Research on biology and control of Sclerotinia diseases in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23, 88–98.

Bert, P.F., 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 macdonaldi*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 865–874.

Boland, G.J. & Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16, 93–108.

Bolton, M.D., Thomma, B.P. & Nelson, B.D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Mol Plant Pathol. 7: 1–16.Vollmann J, Rajcan I. 2010. Oil crop breeding and genetics. In: Vollmann, J., Rajcan, I. (eds.). Oil crops. New York: Springer 1–30.

Brunner, E., Domhof, S. & Langer, F. (2002). Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiment. New York: Wiley.

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., 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.

Davar, R. (2011). Interaction of sunflower plant and Sclerotinia: comparative studies of anatomical structure, ontogenesis of stem in susceptible and resistant lines of sunflower and genetic detection of resistance to Sclerotinia. Faculty of Science, Department of Biology, PhD Thesis, Tarbiat Moallem University, Tehran. (In Farsi).

Davar, R., Darvishzadeh, R. & Majd, A. (2011). Genotype-isolate interaction for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 442–449.

Davar, R., Darvishzadeh, R., Majd, A., Ghosta, Y. & Sarrafi, A. (2010). QTL mapping of partial resistance to basal stem rot in sunflower using recombinant inbred lines. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, 330–341.

Dynowski, M., Schaaf, G. & Loque, D. (2008). Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H_2O_2. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 414, 53–61.

Emamgholi, A., Zaefizadeh, M. & Imani, A. (2015). The proteomic analysis of resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* fungus in sunflower seedling stage. *Trends in Life Sciences*, 4, 2319–5037.

Ershad, J. (1995). Fungi of Iran. Tehran: Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO).

FAO/EBR (2010). Anonymous. Agribusiness handbook: sunflower crude and refined oil.

Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

Grover, A. & Gowthaman, R. (2003). Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Current Science*, 84, 330–40.

Gulya, T.J.K., Rashid. Y. & Masirevic, S.N. (1997). Sunflower diseases. In: sunflower technology and production. USA: Madison, Wisconsin; 263–379.

Hahn, V. (2002). Genetic variation for resistance to Sclerotinia head rot in sunflower inbred lines. *Field Crops Research*, 77, 153–159.

Heidarvand, L. & Maali Amiri, R. (2013). Physio biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology*, 170, 459–69.

Hoshyardel, F., Hatami Maleki. H., Darvishzadeh. R. & Jafari. M. (2014). Study of expression of transcription factors associated with resistance to black stem disease in sunflower. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 3, 87-95.

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

Kazemi Shahandashti, S.S., Maali Amiri, R. & Zeinali, H. (2013). Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. *Molecular Biology Reports*, 40, 893–903.

Lohar, D.P., Haridas, S. & Gantt, J.S. (2007). A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytologist*, 173, 39–49.

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

Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Schon, C.C. & Melchinger, A.E. (2005). QTL mapping of resistance to Sclerotinia mid-stalk rot in RIL of sunflower population NDBLOSsel×CM625. *Theoretical and Applied Genetics*, 110, 1490–1498.

Mohamadian Farsani, A., Hatami Maleki. H., Darvishzadeh, R. & Hoshyardel, F. (2014). Study of changes in the phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) and thaumatin-like protein (TLP) genes transcripts in sunflower genotypes in response to fungal isolates associated with the black stem disease. *Crop Biotechnology*, 7, 15–23.

Nouri, A. (2015). Expression pattern of phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) and thaumatin-like protein (TLP) genes in sunflower genotypes in response to Sclerotinia isolates. M. Sc. Thesis, Department of Plant Breeding and Biotecnology, Faculty of Agriculture, Urmia University.

Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T. & Sano, H. (2000). Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: Identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 42, 479–488.

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509–515.

Riechmann, J.L. & Ratclife, O.J. (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 423–434.

Saharan, G.S. & Mehta, N. (2008). Economic importance. In: Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management. Springer, India. 41-45.

Schneiter, A.A. & Miller, J.F. (1981). Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, 21, 901–903.

Shah, D.A. & Madden, L.V. (2004). Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiments. *Phytopathology*, 94, 33–43.

Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. & Fritig, B. (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75, 687–706.

Yamaguchi Shinazaki, K. & Shinozaki, K. (2005). Organization of cisacting 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. *Journal of Genetics and Genomics*, 40, 23–35.

www.SID.ir

Archive of SID

Gene expression profiling of transcription factors associated with resistance to *Sclerotinia* basal stem rot disease in sunflower

Roghayeh Najafzadeh[1], Reza Darvishzadeh[2*], Aram Nouri[3], Khadijeh Musa-Khalifani[4]

1. Postdoctoral, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, and National Elites Foundation,

2. Professor, 3. M.Sc in Agricultural Biotechnology, 4. M.Sc. in Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran.

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

Downloaded from gebsj.ir at 15:01 +0330 on Saturday December 16th 2017

Abstract

Sclerotinia basal stem rot is an important fungal disease of sunflower. It reduces growth and crop yield worldwide. The aim of this study is identification of resistant lines and confirmation of the accuracy of QTL analysis done for resistance to this disease in previous research in order for their use in sunflower breeding programs. In this study the expression of transcription factors (AP2 Domain, HD-Zip and MYB Family) responsible for resistance to disease was studied in susceptible (RHA265) and resistant (LC106-C) sunflower lines challenged with *Sclerotinia* fungal isolate (SSU53) using Real Time PCR. The results showed that the expression of the studied transcription factors is different in resistant and susceptible sunflower lines. In particular, expression of the AP2 domain and MYB Family increased significantly in resistant line LC106-C as compared to a susceptible one (RHA265). The results suggest a positive role of AP2 domain and MYB Family in resistance mechanisms of sunflower plant in response to *Sclerotinia* fungal disease. According to these results, the line LC106-C can be used as a resistant line for resistance to *Sclerotinia* disease. In addition, the highest expression level of genes in the resistant line compared to susceptible one confirmed the phenotypic data used in QTL analysis in our previous research. The findings of this study should be useful in sunflower breeding programs for producing cultivars resistant to disease.

Keywords: Sunflower, Gene expression, Sclerotinia basal stem rot disease, Resistance.

www.SID.ir