



Proline Content, Total Protein, and Protein Electrophoresis Pattern in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Response to Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) Disease

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Darvishzadeh R.* PhD,
Arjomand N.¹ MSc,
Najafzadeh R.² PhD,
Heydari R.³ PhD

How to cite this article

Darvishzadeh R, Arjomand N, Najafzadeh R, Heydari R. Proline Content, Total Protein, and Protein Electrophoresis Pattern in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Response to Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) Disease. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(2):285-291.

*"Institute of Biotechnology" and "Plant Breeding & Biotechnology Department, Agriculture Faculty", Urmia University, Urmia, Iran

¹Biology Department, Science Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

²Plant Breeding & Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

³Biology Department, Science Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

Correspondence

Address: Plant Breeding & Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Urmia University, 11 Kilometer Sero Road, Daneshgah Boulevard, Urmia, Iran. Postal Code: 5756151818

Phone: +98 (44) 31942785

Fax: +98 (44) 32779558

r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

Article History

Received: May 27, 2017

Accepted: January 08, 2018

ePublished: June 21, 2018

ABSTRACT

Aims Sclerotinia is an important fungal disease of sunflower in Iran that affects its yield. The present study was conducted with the aim of evaluating proline content, total protein, and protein electrophoresis pattern in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) disease.

Materials & Methods In this experimental study, proline content, total protein, and protein electrophoresis pattern in sunflower lines (C39 and C100) were compared with control group during different times after inoculation of the lines with the Sclerotinia fungal isolates (SSU107 and SSKH41) under controlled conditions and as a factorial based on completely randomized design (CRD). Separation and isolation of total proteins extracted by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The data were analyzed by SPSS 22 software, using multivariate analysis of variance and Tukey test.

Findings Resistant line C39 in all of the time periods after being infected had higher proline compared with control and other groups. The total protein of all control plants was higher than that of infected plants with both fungal isolates. Fungal infection accumulated low molecular weight proteins in both lines, so that some proteins in the resistant and some proteins in susceptible lines were produced and removed, respectively.

Conclusion Resistant line C39 in sunflower infected with fungal isolate SSU107 *Sclerotinia sclerotiorum* has the highest proline content. Fungal infection, especially in resistant lines, leads to a reduction in total protein levels and the accumulation of low molecular weight proteins in resistant and susceptible lines.

Keywords Sunflower; *Sclerotinia sclerotiorum*; Proline; Protein Electrophoresis Pattern

CITATION LINKS

[1] Genetics, genomics and breeding of ... [2] Sunflower [3] Sclerotinia sclerotiorum ... [4] Sclerotinia diseases of crop plants ... [5] Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary ... [6] Carpogenic germination of Sclerotinia minor and ... [7] Quantitative trait loci associated with ... [8] The proteomic analysis of resistance to ... [9] Accumulation of soluble phenolic compounds ... [10] The role of antioxidant enzymes in plant ... [11] Reactive oxygen species during plant-microorganism ... [12] Effects of water deficit on growth and ... [13] Proline biosynthesis and osmoregulation in ... [14] Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen ... [15] Biological control of soilborne plant ... [16] Mechanisms of resistance to plant ... [17] Cold-induced plant resistance to necrotrophic ... [18] Plant proteome ... [19] Plant proteome analysis ... [20] Study of protein pattern in Brassica ... [21] Changes in antioxidant systems in soybean as affected by Sclerotinia ... [22] Impact of secondary metabolites and related enzymes ... [23] Analysis of gene expression profiles in response to Sclerotinia ... [24] Sclerotinia-induced accumulation of protein in ... [25] Changes in antioxidant systems in sunflower ... [26] A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* ... [27] Tehran: Agricultural Research, Education and ... [28] Interaction of sunflower and fungal Sclerotinia: A comparative study of anatomical structure and structural changes and supplementary of stem in susceptible and resistant ... [29] Identification of the site of minor resistance genes controlling ... [30] Description of sunflower ... [31] A study of variability of isolates of Sclerotinia ... [32] Rapid determination of free proline for water-stress ... [33] Protein measurement with the Folin phenol ... [34] A highly sensitive silver stain for detecting proteins ... [35] Metabolic implications of stress-induced proline accumulation ... [36] ABA level, proline and phenolic concentration and PAL activity induced during cold acclimation in androgenic *Festulolium* forms with contrasting resistance ... [37] Significance of inducible defense-related proteins in ... [38] Induced and ... [39] Quick method for screening of tolerant sunflower ...

محتوای پرولین، پروتئین کل و الگوی الکتروفوری پروتئین در آفتابگردان در واکنش به بیماری قارچی اسکروتینیا اسکروتیوروم

رضا درویش‌زاده* PhD

"پژوهشکده زیست‌فناوری" و "گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی"، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

نجمه ارجمند MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

رقیه نجف‌زاده PhD

گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

رضا حیدری PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اهداف: اسکروتینیا از بیماری‌های قارچی مهم آفتابگردان در ایران است که عملکرد این محصول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. هدف پژوهش حاضر بررسی محتوای پرولین، پروتئین کل و الگوی الکتروفوری پروتئین در آفتابگردان در واکنش به بیماری قارچی اسکروتینیا اسکروتیوروم بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر محتوای پرولین، پروتئین کل و الگوی الکتروفوری پروتئینی لاین‌های حساس و مقاوم آفتابگردان (C39 و C100) در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های قارچی اسکروتینیا اسکروتیوروم (SSU107 و SSKH41) تحت شرایط کنترل شده و به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۱۸ نمونه در داخل هر تکرار، بررسی و با گروه شاهد مقایسه شدند. تفکیک و جداسازی پروتئین‌های کل استخراج شده با سیستم الکتروفوری سدیم‌دودوسیل‌سولفات-ژل پلی‌آکریل‌امید (SDS-PAGE) صورت گرفت. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 22 از طریق آزمون تحلیل واریانس چندمتغیره و آزمون توکی تحلیل شدند.

یافته‌ها: لاین مقاوم C39 در تمامی زمان‌های پس از آلودگی، میزان پرولین بیشتری در مقایسه با شاهد و سایر گروه‌ها داشت. میزان پروتئین کل گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان آلوده شده با هر دو جدایه قارچی بیشتر بود. آلودگی قارچی باعث تجمع پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین در هر دو لاین شد، به طوری که تعدادی از پروتئین‌ها در لاین مقاوم تولید و تعدادی از آنها در لاین حساس حذف شدند.

نتیجه‌گیری: لاین مقاوم C39 آفتابگردان آلوده شده با جدایه قارچی SSU107 اسکروتینیا اسکروتیوروم، بیشترین میزان پرولین را دارد. آلودگی قارچی به خصوص در لاین‌های مقاوم باعث کاهش میزان پروتئین کل و تجمع پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین در لاین مقاوم و حساس می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آفتابگردان، اسکروتینیا اسکروتیوروم، پرولین، الگوی الکتروفوری پروتئین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸

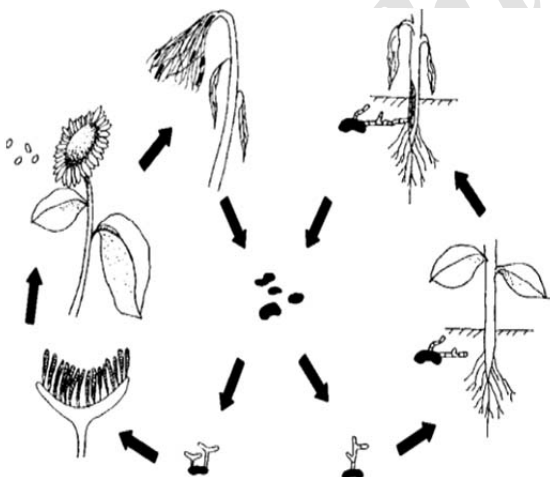
*نویسنده مسئول: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) پنجمین منبع عمده تولید روغن خوراکی در دنیا به شمار می‌رود. روغن آفتابگردان علاوه بر مصرف خوراکی، در مصارف صنعتی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.^[1] اسکروتینیا اسکروتیوروم (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib de Bary) یکی از بیماری‌گرهای گیاهی با دامنه میزبانی گسترده است. این بیمارگر می‌تواند بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی را در مراحل مختلف رشد آلوده نماید.^[3-5] این بیمارگر در آفتابگردان باعث پوسیدگی ریشه، ساقه، یقه و طبق می‌شود (شکل ۱) [6] و در شرایط آب‌وهوایی مساعد برای آن، خسارت زیادی به محصول وارد می‌کند.^[7-9]

تعداد زیادی از گیاهان در مواجهه با تنش‌های زنده از جمله

پاتوژن‌ها دچار تغییرات بیوشیمیایی می‌شوند. یکی از اولین تغییرات بیوشیمیایی و سریع‌ترین پاسخ‌های دفاعی در گیاهان آلوده به پاتوژن، واکنش‌های اکسیداتیو است که باعث تشکیل انواع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) همچون سوپراکسید (O_2^-) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود.^[10, 11] مطالعات نشان داده است که تجمع پرولین آزاد در پاسخ به بسیاری از تنش‌های زیستی همچون آلودگی قارچی رخ می‌دهد.^[12] افزایش سنتز پرولین از طریق افزایش بیان ژن‌های تولیدکننده و سرکوب بیان ژن‌های تجزیه‌کننده آن صورت می‌گیرد.^[13] پرولین به‌عنوان ازبین‌برنده قوی ROS عمل نموده و از مرگ سلول‌ها توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند.^[14] از طرف دیگر مقاومت گیاهان به بیماری‌ها، ارتباط تنگاتنگی با تجمع پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن‌ها (PR) دارد. پروتئین‌هایی که در مواجهه با پاتوژن‌ها فعال شوند، دیواره سلولی قارچ را تخریب می‌کنند و باعث لیز شدن سلول‌ها می‌شوند. مواد ترشح شده توسط پاتوژن نیز، باعث القای مقاومت می‌شود و میزان پروتئین‌های مقاومتی را افزایش می‌دهد. به‌عنوان مثال کیتین و گلوکان، الیگومرهای هستند که در اثر تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها فعال می‌شوند و مکانیزم‌های مقاومتی را در گیاهان فعال می‌کنند.^[15, 16] پلازک و زور^[17] گزارش کرده‌اند که حضور پروتئین‌های وابسته به پاتوژن مثل کیتیناز و توماتین در بافت‌های آلوده، رابطه مثبتی با مقاومت گیاه به میکروارگانیزم‌ها دارد. در سال‌های اخیر بررسی پروتئومیک گیاهان به‌طور وسیعی برای درک پاسخ گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده انجام گرفته است.^[18, 19] الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌امید برای جداسازی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها، روشی رایج و مهم است. این روش ضمن ساده‌بودن، دارای قدرت تفکیک مناسب برای شناسایی و تعیین خلوص پروتئین‌ها است.^[20] تاکنون پژوهش‌های محدودی در رابطه با بررسی میزان پرولین و پروتئین در مواجهه با بیماری اسکروتینیا در گیاهان سویا^[21]، کتان^[22]، کلزا^[23] و آفتابگردان^[8, 24-26] گزارش شده است.



شکل ۱) چرخه زندگی اسکروتینیا اسکروتیوروم روی آفتابگردان (جوانه‌زنی کارپوژنیک اسکروتینیا منجر به آلودگی ساقه و طبق و جوانه‌زنی میسیلیوتیک منجر به آلودگی طوقه آفتابگردان می‌شود)

اسکروتینیا از بیماری‌های قارچی مهم آفتابگردان در ایران است که عملکرد آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد.^[27] در سال‌های اخیر شیوع و توسعه این بیماری در منطقه شمال غرب کشور باعث کاهش سطح زیرکشت این محصول شده است. وسعت خسارت در بعضی مواقع

میزان جذب فاز رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر (Biowave DAD؛ انگلستان) قرائت و منحنی استاندارد نیز با غلظت‌های مشخص پرولین تهیه شد.

میزان پروتئین: اندازه‌گیری میزان پروتئین کل با استفاده از روش لوری و همکاران^[33] انجام شد. به ۰/۲۵ گرم از ماده تر گیاهی پس از ساییده شدن در ازت مایع، ۴ میلی‌لیتر بافر تریس ۰/۲ مولار اضافه و حجم محلول حاصل با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده و اسیدیته محلول با اسیدکلریدریک در pH برابر با ۸ تنظیم شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰°C قرار گرفته و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه با ۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به یک میلی‌لیتر از محلول رویی، ۴ میلی‌لیتر از محلول C اضافه شد. برای تهیه محلول C، ۵ میلی‌لیتر از محلول A و یک میلی‌لیتر از محلول B مخلوط شد. برای تهیه محلول A، ۲ گرم سدیم کربنات (Na₂CO₃)، ۰/۴ گرم سدیم هیدروکسید (NaOH) و ۰/۰۲ گرم نمک راشل (پتاسیم سدیم تاراتارات تتراهیدرات) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و برای تهیه محلول B، ۰/۵ گرم سولفات مس متبلور (CuSO₄.5H₂O) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. پس از طی ۱۰ دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر معرف فولین رقیق شده به نسبت ۱:۹ به نمونه‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند و پس از رقیق نمودن آنها، جذب نوری در طول موج ۶۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر قرائت شد و درصد پروتئین محلول به دست آمد. تفکیک و جداسازی پروتئین‌های کل استخراج شده با سیستم الکتروفورزی سدیم دودسیل سولفات-ژل پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) ۱۵٪ شامل آکریل آمید ۴/۳۵٪، بیس آکریل آمید ۰/۶۲٪ و سدیم دودسیل سولفات ۱۰٪، تریس-کلریدریک اسید یک مولار با pH برابر ۸/۸ و ۶/۸، آمونیوم پرسولفات ۱۰٪ و تیمید (Temed) با دستگاه الکتروفورز ATTA مدل AE-8750 (Atto؛ انگلستان) و ولتاژ ۲۵ ولت برای ۲۰ دقیقه اول و ۲۰۰ ولت برای ۴ ساعت بعدی انجام شد. برای برقراری جریان از بافر تریس-گلیسین استفاده و رنگ آمیزی ژل توسط نیترات نقره^[34] انجام شد. داده‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تحلیل شدند.

داده‌ها با نرم افزار SPSS 22 از طریق آزمون تحلیل واریانس چندمتغیره برای بررسی وجود تفاوت در میزان پرولین، پروتئین کل و الگوی الکتروفورزی پروتئین گروه‌های مختلف و آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه میانگین‌ها تحلیل شدند. حضور یا عدم حضور یک باند در یک لاین با کدهای "صفر و یک" مشخص شد. حرکت نسبی (Rm) باندهای پروتئین نمونه و همچنین پروتئین استاندارد که وزن مولکولی هر باند آن مشخص است، طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$Rm = \frac{\text{فاصله حرکت باند پروتئینی از ابتدای ژل}}{\text{فاصله حرکت رنگ از ابتدای ژل جداکننده}}$$

با استفاده از اطلاعات پروتئین استاندارد منحنی استاندارد رسم و وزن مولکولی هر باند نمونه برآورد شد.

یافته‌ها

اثر ژنوتیپ گیاه میزبان و جدایه قارچی روی میزان تجمع پرولین و پروتئین کل معنی‌دار بود. معنی‌دار بودن اثر متقابل بین تیمارها نشان داد که اختلاف بین لاین‌ها از سطحی به سطح دیگر جدایه

به حدی می‌رسد که از مزارع تحت کشت، عملاً محصولی برداشت نمی‌شود. با توجه به این که مدیریت زراعی این بیماری مشکل بوده، بنابراین در حال حاضر تاکید بر استفاده از ارقام مقاوم است. متأسفانه تعداد ارقام آفتابگردان مقاوم به این بیماری در جهان کم است. بنابراین بررسی واکنش فنوتیپی و مولکولی ژنوتیپ‌ها به عامل بیماری به منظور تولید ارقام هیبرید مقاوم از اهمیت زیادی برخوردار است^[7]. در پژوهش حاضر محتوای پرولین، پروتئین کل و الگوی الکتروفورزی پروتئین در لاین‌های حساس و مقاوم آفتابگردان با واکنش متفاوت به دو جدایه قارچی اسکروتینیا^[28] 29) مورد بررسی قرار گرفت. بنابر مطالب ذکر شده، هدف پژوهش حاضر بررسی محتوای پرولین، پروتئین کل و الگوی الکتروفورزی پروتئین در آفتابگردان در واکنش به بیماری قارچی اسکروتینیا/اسکروتیوروم بود.

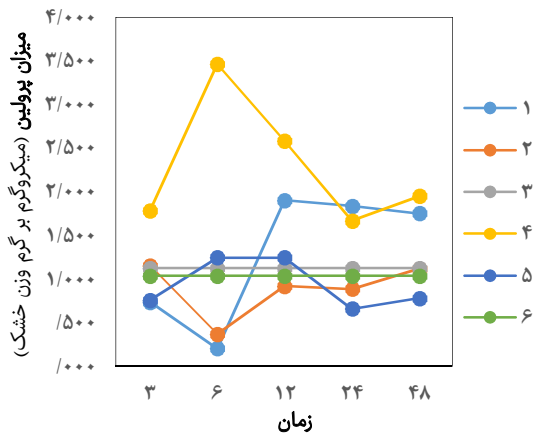
مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، دو لاین آفتابگردان با واکنش متفاوت به دو جدایه قارچی اسکروتینیا/اسکروتیوروم براساس نتایج پژوهش‌های پیشین^[28, 29] انتخاب شدند. بدین منظور از لاین C100 (به ترتیب حساس و مقاوم به جدایه قارچی SSU107 و SSKH41) و لاین C39 (به ترتیب مقاوم و حساس به SSU107 و SSKH41) استفاده شد. بذور لاین‌ها از موسسه آگرونومیک فرانسه (INRA) تهیه و در گلدان‌های مستطیلی شکل در محیط پیت‌ماس در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۱۸ نمونه در داخل هر تکرار کشت شدند. سپس گیاهان کشت داده شده تا مرحله ۸ برگی در شرایط دمایی ۲۵±۱°C، رطوبت ۶۵٪ و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی پرورش یافتند^[30].

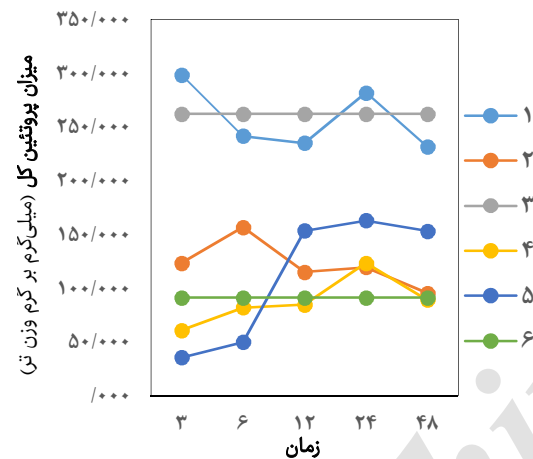
جدایه‌های قارچی و تلقیح آنها: جدایه‌های قارچی از منطقه آذربایجان غربی (ارومیه و خوی) تهیه شدند. این جدایه‌ها در کلکسیون بخش بیماری‌های گیاهی دانشگاه ارومیه موجود بودند و تاکنون نیز به کلکسیون کشت‌های نوع آمریکایی (ATCC) معرفی نشدند. جدایه‌های قارچی جمع‌آوری شده در محیط آگار دکستروز سبب‌زمینی (PDA) با pH برابر با ۶ و ۳۹ گرم بر لیتر، کشت و به اتاق تاریک با دمای ۲۵±۱°C منتقل شدند. سپس دیسک‌های میسیلیومی با قطر ۳ میلی‌متر از حواشی کلنی در حال رشد (با عمر سه روز) بریده شدند و در مرحله ۸ برگی در ناحیه طوقه ساقه گیاهچه‌ها قرار گرفتند. به منظور حفظ رطوبت، براساس روش پریس و کولمان^[31] اطراف ساقه و دیسک میسیلیومی با پارافیلیم بسته شد. نمونه‌برداری از قسمت پایه‌ای ساقه گیاهان در زمان‌های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با قارچ انجام گرفت تا نسبت به ارزیابی صفات مورد مطالعه اقدام شود. لازم به ذکر است که در تیمار شاهد، آلودگی ژنوتیپ‌ها با جدایه‌های قارچی صورت نگرفت.

اندازه‌گیری صفات

میزان پرولین: میزان اسیدآمینه پرولین براساس روش باتر و همکاران^[32] اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۲ گرم از بافت تر ساقه به همراه ۱۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالیسیلیک (C₇H₆O₆S) ۳٪ در هاون ساییده شد و به مدت ۷۲ ساعت در یخچال با دمای ۴°C قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰°C قرار گرفتند. پس از آن به هر نمونه ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. در نهایت



نمودار ۱) تغییرات میزان پرولین لاین‌های C100 و C39 آفتابگردان طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های SSU107 و SSKH41 قارچ اسکروتینیا اسکروتیوروم؛ ۱: لاین حساس C100 پس از آلودگی با SSU107؛ ۲: لاین مقاوم C100 پس از آلودگی با SSKH41؛ ۳: لاین C100 در گروه شاهد؛ ۴: لاین مقاوم C39 پس از آلودگی با SSU107؛ ۵: لاین حساس C39 پس از آلودگی با SSKH41؛ ۶: لاین C39 در گروه شاهد



نمودار ۲) تغییرات میزان پروتئین کل در لاین‌های C100 و C39 آفتابگردان طی زمان‌های مختلف پس از آلودگی با جدایه‌های SSU107 و SSKH41 قارچ اسکروتینیا اسکروتیوروم؛ ۱: لاین حساس C100 پس از آلودگی با SSU107؛ ۲: لاین مقاوم C100 پس از آلودگی با SSKH41؛ ۳: لاین C100 در گروه شاهد؛ ۴: لاین مقاوم C39 پس از آلودگی با SSU107؛ ۵: لاین حساس C39 پس از آلودگی با SSKH41؛ ۶: لاین C39 در گروه شاهد

جدول ۱) وجود یا عدم وجود باندهای پروتئینی در لاین‌های آفتابگردان طی زمان‌های مختلف (ساعت) پس از آلودگی با جدایه قارچی SSU107

شماره پاند	C100 (لاین حساس)						C39 (لاین مقاوم)					
	۳	۶	۱۲	۲۴	۴۸	شاهد	۳	۶	۱۲	۲۴	۴۸	شاهد
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱
۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۴	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۶	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
تعداد کل	۶	۸	۷	۸	۱	۹	۹	۷	۶	۸	۶	۷

باند‌های ۶ و ۸ باندهای شاخص هستند

قارچ و از زمانی به زمان دیگر در مواجهه با قارچ متفاوت بود ($p < 0.001$). آلودگی با جدایه‌های قارچ اسکروتینیا باعث افزایش تغییرات میزان پرولین و الگوی پروتئینی در گیاهان آلوده در مقایسه با شاهد شد. لاین‌های حساس و مقاوم نیز پاسخ‌های متفاوتی در واکنش به این بیماری نشان دادند ($p < 0.001$).

میزان پرولین: بیماری اسکروتینیا باعث افزایش میزان پرولین در گیاهان آلوده به جدایه قارچ SSU107 شد، به طوری که لاین مقاوم به این جدایه (C39؛ گروه ۴) در تمامی زمان‌های پس از آلودگی، میزان پرولین بیشتری در مقایسه با سایر گروه‌ها داشت. پس از آن نیز لاین C100 حساس به این جدایه قارچ (گروه ۱) در مقایسه با سایر گروه‌ها، میزان پرولین بیشتری طی زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی داشت. در رابطه با آلودگی با جدایه قارچی SSKH41 نیز، روند تغییرات پرولین در دو لاین حساس (گروه ۵) و مقاوم (گروه ۲) با هم متفاوت بود، به طوری که لاین حساس به این قارچ (C39)، ابتدا روند افزایشی و سپس روند کاهشی در میزان پرولین داشت. لاین مقاوم به این قارچ (C100)، ابتدا روند کاهشی و سپس روند افزایشی نشان داد. حداکثر تفاوت میزان تجمع پرولین بین دو لاین در آلودگی با جدایه‌های قارچ، در فاصله زمانی ۶ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد (نمودار ۱).

میزان پروتئین: بیشترین میزان پروتئین کل مربوط به لاین حساس به جدایه قارچی SSU107 (C100 یا گروه ۱) بود. به طوری که این لاین در مقایسه با لاین مقاوم به این جدایه (C39 یا گروه ۴) در تمامی زمان‌های پس از آلودگی، میزان پروتئین بیشتری داشت (نمودار ۲). در مقایسه لاین C100 با شاهد خود (گروه ۳)، میزان پروتئین در زمان‌های ۳ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی افزایش داشت. در لاین مقاوم C39 نیز میزان پروتئین طی زمان‌های ۳، ۶ و ۱۲ ساعت نسبت به شاهد کاهش و در زمان ۲۴ ساعت پس از آلودگی اندکی افزایش داشت.

در آلودگی با جدایه قارچی SSKH41 نیز، لاین مقاوم به این جدایه (C100 یا گروه ۲) در مقایسه با شاهد (گروه ۳) در تمامی زمان‌های پس از آلودگی، میزان پروتئین کمتری داشت، در حالی که لاین حساس به این جدایه (C39 یا گروه ۵) در مقایسه با شاهد، طی زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی افزایش معنی‌داری در پروتئین داشت (نمودار ۲).

میزان پروتئین کل در لاین C39 روند افزایشی داشت که این افزایش در آلودگی گیاهان C39 با SSKH41 (گروه ۵؛ ترکیب حساس) نسبت به آلودگی گیاهان C39 با SSU107 (گروه ۴؛ ترکیب مقاوم) بیشتر بود. میزان پروتئین کل در لاین C100 تحت تاثیر هر دو جدایه قارچی روند کاهشی داشت. همچنین در برخی زمان‌های پس از آلودگی با قارچ، میزان پروتئین کل گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان آلوده شده با هر دو جدایه قارچی بیشتر بود. بنابراین در ترکیبات (لاین-جدایه) مقاوم، آلودگی قارچی باعث کاهش پروتئین کل گیاهان آلوده در مقایسه با شاهد شد.

الگوی الکتروفوری پروتئین‌ها: الگوی باندهای پروتئین در گیاهان آلوده با گیاهان شاهد متفاوت بود. به طوری که در هر دو لاین، تعداد باندهای پروتئینی در گیاهان شاهد زیاد بود و به دنبال آلودگی با قارچ اسکروتینیا، تعداد باندهای پروتئینی کم شد. میزان پروتئین کل گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان آلوده بیشتر بود. همچنین لاین‌های C100 و C39 نیز در زمان‌های مختلف پس از آلودگی واکنش متفاوتی از خود نشان دادند (جدول‌های ۱ و ۲، شکل ۲ و ۳).

محتوای پرولین، پروتئین کل و الگوی الکتروفوری پروتئین در آفتابگردان در واکنش به... ۲۸۹ پروتئینی ویژه (باند های شماره ۵ و ۹) مشاهده شد که در لاین حساس C39 حضور نداشتند. همچنین باند پروتئینی (باند شماره ۵) با غلظت کم در محدوده ۴۴ کیلودالتونی در این لاین مقاوم و نمونه شاهد طی همه زمان های پس از آلودگی مشاهده شد. در حالی که این باند در لاین حساس C39 فقط در نمونه شاهد مشاهده و در زمان های مختلف پس از آلودگی محو شد. مشابه این تغییرات پروتئینی در محدوده ۲۸ کیلودالتونی نیز مشاهده شد. با این تفاوت که در این محدوده در همه زمان های پس از آلودگی، باند پروتئینی (باند شماره ۹) با غلظت بالا مشاهده شد، اما این باند در نمونه شاهد (گیاهان آلوده نشده) مشاهده نشد. باند مذکور در لاین C39 نیز به طور کامل حذف شد. در محدوده ۶۳ کیلودالتونی، باند پروتئینی (باند شماره ۳) وجود داشت که فقط در نمونه های شاهد لاین های C39 و C100 ظاهر شد. این در حالی است که این باند، در ترکیبات دیگر طی زمان های مختلف پس از آلودگی وجود نداشت (جدول ۲).

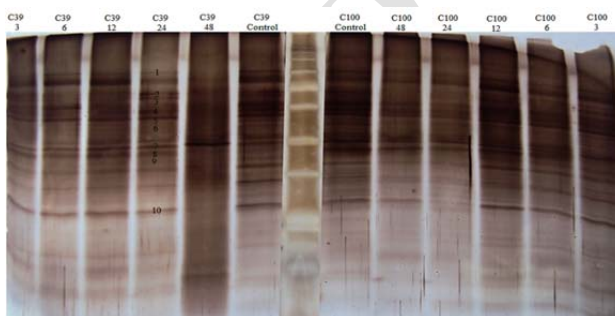
بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی محتوای پرولین، پروتئین کل و الگوی الکتروفوری پروتئین در آفتابگردان در واکنش به بیماری قارچی *اسکلروتینیا اسکروتیوروم* انجام شد. با توجه به اینکه انباشتگی پرولین یک پاسخ اولیه و عمومی در تنش های محیطی است و نقش ویژه ای در تعدیل اسمزی داخل سلول دارد، بنابراین میزان آن طی تنش افزایش می یابد. از این رو، اندازه گیری این اسید آمینه در مواجهه با تنش های محیطی از اهمیت زیادی برخوردار است. گزارش شده که میزان پرولین در پاسخ به تعدادی از تنش های زنده و غیرزنده مثل آلودگی های قارچی افزایش یافته است [12, 35]. آشری و محمد [22] در بررسی میزان پرولین در برگ ها و ساقه های ۱۸ لاین حساس و مقاوم به بیماری کپک پودری در کتان گزارش کرده اند که میزان پرولین به طور قابل توجهی در برگ های آلوده به این بیماری افزایش یافته است. نتایج مشابه نیز توسط *پوسیچا* و همکاران [36] در گیاه *Festulolium* گزارش شده است. *داور* و همکاران [25] در بررسی لاین های حساس و مقاوم آفتابگردان به بیماری *اسکلروتینیا* گزارش کرده اند که میزان پرولین در ساقه های آلوده به *اسکلروتینیا* در گیاهان مقاوم به طور معنی داری افزایش و در گیاهان حساس کاهش یافته است. اگر چه میزان پرولین طی تنش افزایش می یابد و این افزایش در لاین های مقاوم بیشتر است، اما در پژوهش حاضر تغییرات پرولین بسته به ترکیب لاین - جدایه متفاوت بود. به نظر می رسد که افزایش پرولین در یک ترکیب مقاوم و عدم افزایش آن در ترکیب مقاوم دیگر، احتمالاً به دلیل مکانیزم متفاوت مقاومت لاین به جدایه باشد. لاین مقاوم C39 به جدایه قارچی SSU107 در تمامی زمان های پس از آلودگی، میزان پرولین بیشتری در مقایسه با شاهد و سایر گروه ها داشت، در حالی که لاین مقاوم C100 در مواجهه با جدایه قارچی SSKH41 ابتدا روند کاهشی و سپس روند افزایشی داشت. طبق یافته ها به نظر می رسد که آلودگی قارچی در برخی زمان ها تاثیر چندانی در میزان پروتئین لاین های حساس و مقاوم در مقایسه با گیاهان شاهد نداشت، حتی باعث کاهش این میزان لاین ها به خصوص در لاین مقاوم شد. حداکثر تفاوت میزان پروتئین بین دو لاین در آلودگی با جدایه های قارچی SSU107 و SSKH41 به ترتیب ۳ و ۶ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد. هنگام آلودگی به پاتوژن ها، مواد ترشح شده توسط پاتوژن باعث القای مقاومت بیشتر و این نیز باعث تولید پروتئین های مقاومتی

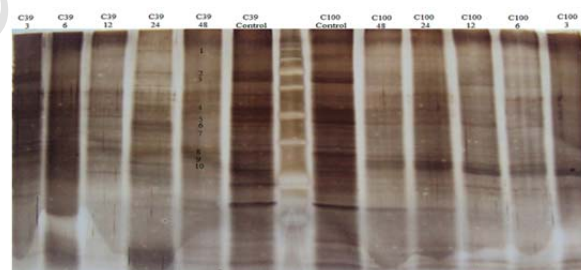
جدول ۲) وجود یا عدم وجود باندهای پروتئینی در لاین های آفتابگردان طی زمان های مختلف (ساعت) پس از آلودگی با جدایه قارچی SSKH41

شماره باند	C100 (لاین مقاوم)						C39 (لاین حساس)						وزن مولکولی (کیلودالتون)
	۳	۶	۱۲	۲۴	۴۸	شاهد	۳	۶	۱۲	۲۴	۴۸	شاهد	
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۷۷/۵
۲	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۶۸/۱
۳	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۶۳/۴
۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۵۰/۵
۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۴۴/۶
۶	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۴۲/۲
۷	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۴۰
۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۳۰/۴
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۸/۱
۱۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲۵/۷
تعداد کل	۶	۶	۶	۶	۶	۹	۹	۷	۷	۶	۶	۶	-

باند های ۳، ۵ و ۹ باندهای شاخص هستند



شکل ۲) الگوی ژل الکتروفوری پروتئین در لاین های C39 و C100 آفتابگردان طی زمان های مختلف (ساعت) پس از آلودگی با جدایه قارچی SSU107 و شاهد



شکل ۳) الگوی ژل الکتروفوری پروتئین در لاین های C39 و C100 آفتابگردان طی زمان های مختلف (ساعت) پس از آلودگی با جدایه قارچی SSKH41 و شاهد

در مواجهه با جدایه قارچی SSU107 (جدول ۱) تغییرات الگوی باندهای پروتئینی C39 (لاین مقاوم) از C100 (لاین حساس) متفاوت بود. در زمان ۶ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی در موقعیت حدود ۵۴ کیلودالتون، در لاین C39 یک باند پروتئینی (باند شماره ۶) مشاهده شد که در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی از الگوی باندی محو شد. این باند فقط در نمونه شاهد لاین C100 وجود داشت و در زمان های مختلف پس از آلودگی حضور نداشت و کاملاً محو شد. همچنین در لاین C39 طی فواصل زمانی ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی، یک باند پروتئینی جدید (باند شماره ۸) در محدوده ۴۳ کیلودالتونی مشاهده شد که در گیاهان شاهد این لاین حضور نداشت.

در مواجهه با جدایه قارچی SSKH41 نیز تغییرات الگوی باندهای پروتئینی C39 (لاین حساس) و C100 (لاین مقاوم) متفاوت بود (جدول ۲). در لاین C100 مقاوم این جدایه قارچی، چند الگوی

داشته باشند و به‌عنوان سرکوبگر ژن‌های مقاومت عمل نمایند و عدم حضورشان در لاین مقاوم باعث مقاومت نسبی به اسکروتینیا شده باشد. در ادامه مکان‌های ژنی مرتبط با مقاومت شناسایی خواهند شد که زمینه را برای گزینش ارقام مقاوم به بیماری اسکروتینیا در پروژه‌های به‌نژادی هموار می‌سازد.

از جمله محدودیت‌های این تحقیق شناسایی دقیق پروتئین‌های متأثر از آلودگی با قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکروتینیا یقه ساقه در آفتابگردان بود. منابع مالی کم نیز از محدودیت‌های اساسی تحقیق بود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی الگوی پروتئوم یقه ساقه در دو لاین حساس و متحمل به بیماری در شرایط آلودگی با قارچ عامل بیماری با استفاده از الکتروفورز دوبعدی بررسی شود.

نتیجه‌گیری

لاین مقاوم C39 آفتابگردان آلوده‌شده با جدایه قارچی SSU107 اسکروتینیا/اسکروتیوروم، بیشترین میزان پرولین را دارد. آلودگی قارچی به‌خصوص در لاین‌های مقاوم باعث کاهش میزان پروتئین کل و تجمع پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین در لاین مقاوم حساس می‌شود.

تشکر و قدردانی: از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه به‌خاطر فراهم‌نمودن امکانات آزمایشگاهی و همچنین از انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه به‌خاطر دراختیار گذاشتن بذور جمعیت لاین‌های مورد مطالعه تشکر و قدردانی می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی بین نویسندگان مقاله وجود نداشته است.

سهم نویسندگان: رضا درویش‌زاده (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ نجمه ارجمند (نویسنده دوم)، روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ رقیه نجف‌زاده (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ رضا حیدری (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: منابع مالی تحقیق حاضر توسط دانشگاه ارومیه تأمین شده است.

منابع

- Hu J, Seiler G, Kole C, editors. Genetics, genomics and breeding of sunflower. Boca Raton: CRC Press; 2010. p. 360.
- Panigo N, Heinz R, Fernandez P, Talia P, Nishinakamasu V, Hopp HE. Sunflower. In: Kole C, editor. Genome mapping and molecular breeding in plants, Oilseeds. 2nd Volume. Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2007. pp. 153-77.
- Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD. Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Mol Plant Pathol. 2006;7(1):1-16.
- Saharan GS, Mehta N. Sclerotinia diseases of crop plants: Biology, ecology and disease management. Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2008. p. 486.
- Sharma P, Meena PD, Verma PR, Saharan GS, Mehta N, Singh D, et al. Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary

می‌شود که در مقاومت گیاهان نقش اساسی ایفا می‌کنند [16, 37]. تولید پروتئین‌های دفاعی (PR) در واکنش به پاتوژن‌های مختلف گزارش شده است [38]. معمول‌ترین ویژگی این پروتئین‌ها، وزن مولکولی کم و pH پایین است که در فضاهای بین‌سلولی، دیواره سلولی و واکوئل‌ها تجمع می‌یابند [16, 37]. ژائو و همکاران [23] گزارش کرده‌اند که میزان پروتئین‌های مقاومتی در کلزا در پاسخ به بیماری اسکروتینیا افزایش یافته است. مالنچیک و همکاران [21] بدین نتیجه رسیده‌اند که میزان پروتئین کل در ژنوتیپ‌های سویا، طی ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی با قارچ اسکروتینیا افزایش یافته است. همچنین آشری و محمد [22] گزارش کرده‌اند که میزان پروتئین کل پس از حمله کپک پودری در برگ‌های کتان مقاوم به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. در پژوهشی دیگر گزارش شده که پروتئین‌ها باعث القای مقاومت در آفتابگردان در مواجهه با بیماری اسکروتینیا شده‌اند [39]. در پژوهش حاضر در اکثر زمان‌های پس از آلودگی، میزان پروتئین کل در لاین حساس در مقایسه با لاین مقاوم افزایش پیدا کرد که با نتایج داور [28] و امام‌قلی و همکاران [8] مبنی بر کاهش میزان پروتئین در برگ‌های لاین مقاوم و افزایش این میزان در لاین حساس آفتابگردان‌های آلوده با قارچ اسکروتینیا همخوانی داشت.

براساس الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها، تعداد باندهای پروتئینی در هر دو لاین مقاوم و حساس در مقایسه با شاهد کم بود. این با نتایج میزان پروتئین کل لاین‌ها مبنی بر کاهش این میزان در گیاهان آلوده در مقایسه با شاهد همخوانی داشت. براساس الگوی الکتروفورزی پروتئین، آلودگی قارچی باعث بیان تعدادی از پروتئین‌ها در لاین مقاوم و حذف بعضی از پروتئین‌ها در لاین حساس شد، به‌طوری که در لاین مقاوم برخی باندهای پروتئینی مشاهده شد، در صورتی که در لاین حساس وجود نداشت.

گیوبیسی و همکاران [26] در طبق‌های آلوده به قارچ اسکروتینیا در آفتابگردان، پروتئین‌های ۱۶ کیلودالتونی را شناسایی کرده‌اند که در جلوگیری از جوانه‌زنی و رشد قارچ نقش دارند. در پژوهش حاضر نیز، پروتئین‌های ۱۶ کیلودالتونی در گیاهان مقاوم و حساس به جدایه قارچ SSU107 مشاهده شد. همچنین در لاین مقاوم به جدایه قارچی SSKH41 (لاین C100) یک باند پروتئینی در همه زمان‌های آلودگی در محدوده ۲۸ و ۴۴ کیلودالتونی مشاهده شد که در لاین حساس این جدایه (C39) وجود نداشت. این نتایج همسو با نتایج داور و همکاران [24] بود. آنها نیز در بررسی الگوی الکتروفورزی باندهای پروتئینی در لاین مقاوم به بیماری اسکروتینیا آفتابگردان، تغییرات مشابهی را گزارش کرده‌اند، به‌طوری که در محدوده ۲۷ کیلودالتون پس از طی ۱۲ و ۲۴ ساعت از شروع بیماری، غلظت باندها افزایش و پس از ۴۸ ساعت رو به کاهش داشت، اما این تغییرات در لاین حساس مشاهده نشد. به احتمال زیاد این افزایش پروتئین در لاین مقاوم و رخ‌ندادن آن در لاین حساس می‌تواند باعث مقاومت جزئی در لاین مقاوم و عدم مقاومت در لاین حساس باشد. کاهش میزان پروتئین‌ها می‌تواند در اثر کاهش سنتز پروتئین، افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکننده، کاهش آمینواسیدهای در دسترس یا تغییر ماهیت آنزیم‌های درگیر در سنتز آمینواسیدها یا پروتئین‌ها باشد. در پژوهش حاضر در لاین حساس C100 هنگام آلودگی با قارچ SSU107، باند پروتئینی در محدوده ۵۵ کیلودالتونی مشاهده شد که فقط در زمان ۶ ساعت حذف شد. این در حالی است که این باند در لاین مقاوم فقط در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت حضور داشت. شاید این پروتئین‌ها، نقشی در ایجاد حساسیت در لاین حساس به عهده

- Sci. 2011;7(1):78-85.
- 23- Zhao J, Wang J, An L, Doerge RW, Chen ZJ, Grau CR, et al. Analysis of gene expression profiles in response to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Planta*. 2007;227(1):13-24.
- 24- Davar R, Darvishzadeh R, Majd A. Sclerotinia-induced accumulation of protein in the basal stem of resistant and susceptible lines of sunflower. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca*. 2012;40(1):119-24.
- 25- Davar R, Darvishzadeh R, Majd A. Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biologia*. 2013;68(5):821-9.
- 26- Giudici AM, Regente MC, De La Canal L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiol Biochem*. 2000;38(11):881-8.
- 27- Ershad D. *Fungi of Iran*. 2nd Edition. Tehran: Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran; 1995. p. 874.
- 28- Davar R. Interaction of sunflower and fungal *Sclerotinia*: A comparative study of anatomical structure and structural changes and supplementary of stem in susceptible and resistant lines and resistant genetic to the disease [Dissertation]. Tehran: Teacher Training University of Tehran; 2011. [Persian]
- 29- Amoo Zadeh M. Identification of the site of minor resistance genes controlling for Crohn's sclerotic cartilage in sunflower (*Helianthus annuus* L.) [Dissertation]. Urmia: Urmia University; 2012. [Persian]
- 30- Schneiter AA, Miller JF. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci*. 1981;21(6):901-3.
- 31- Price K, Colhoun J. A study of variability of isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary from different hosts. *J Phytopathol*. 1975;83(2):159-66.
- 32- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*. 1973;39(1):205-7.
- 33- Lowry OH, Roseberough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
- 34- Switzer RC, Merrill CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1979;98(1):231-7.
- 35- Hare PD, Cress WA. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul*. 1997;21(2):79-102.
- 36- Pocięcha E, Płazek A, Janowiak F, Zwierzykowski Z. ABA level, proline and phenolic concentration and PAL activity induced during cold acclimation in androgenic *Festulolium* forms with contrasting resistance to frost and pink snow mould (*Microdochium nivale*). *Physiol Mol Plant Pathol*. 2008;73(6):126-32.
- 37- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*. 2006;44:135-62.
- 38- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA. Induced and preformed antimicrobial proteins. In: Slusarenko AJ, Fraser RS, Van Loon LC, editors. *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2001. pp. 371-477.
- 39- Zaeifzadeh M, Tahmasebi Enferadi S, Mousavi A, Heidari P, Ahmadzadeh M. Quick method for screening of tolerant sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* at seedling stage. *Biharean Biologist*. 2013;7(1):29-32.
- causing *Sclerotinia* rot in oilseed Brassicas: A review. *J Oilseed Brassica*. 2015;6(Special):1-44.
- 6- Ekins MG, Aitken EAB, Goulter KC. Carpogenic germination of *Sclerotinia minor* and potential distribution in Australia. *Australas Plant Pathol*. 2002;31(3):259-65.
- 7- Amoozadeh M, Darvishzadeh R, Davar R, Abdollahi Mandoulakani B, Haddadi P, Basirnia A. Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate non-specific partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *J Agric Sci Technol*. 2015;17(1):213-26.
- 8- Emamgholi A, Zaeifzadeh M, Imani AA. The proteomic analysis of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* fungus in sunflower seedling stage. *Trends Life Sci*. 2015;4(1):17-26.
- 9- Prats E, Bazzalo ME, León A, Jorrín JV. Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica*. 2003;132(3):321-9.
- 10- Barbosa Nascimento J, FreitasBarrigossi JA. The role of antioxidant enzymes in plant defense against herbivorous insects and phytopathogens. *Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer - Goiânia*. 2014;1(1):234-50. [Portuguese]
- 11- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr Plant Biol*. 2010;52(2):195-204.
- 12- Slama I, Messedi D, Ghnaya T, Savoure A, Abdelly C. Effects of water deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*. *Environ Exp Bot*. 2006;56(3):231-8.
- 13- Delauney AJ, Verma DPS. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*. 1993;4(2):215-23.
- 14- Chen C, Dickman MB. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(9):3459-64.
- 15- Frindlender M, Inbar J, Chet I. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1, 3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol Biochem*. 1993;25(9):1211-21.
- 16- Slusarenko AJ, Fraser RS, Van Loon LC. *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Berlin: Springer Netherlands; 2000. p.160.
- 17- Plazek A, Zur I. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. *Plant Sci*. 2003;164(6):1019-28.
- 18- Cánovas FM, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Jorrin J, Mock HP, Rossignol M. Plant proteome analysis. *Proteomics*. 2004;4(2):285-98.
- 19- Rossignol M, Peltier JB, Mock HP, Matros A, Maldonado AM, Jorrín JV. Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. *Proteomics*. 2006;6(20):5529-48.
- 20- Kakaei M, Zebarjadi AR, Mostafaie A. Study of protein pattern in *Brassica napus* genotypes under non-stress and drought stress conditions. *Agric Biotechnol*. 2010;9(2):49-57. [Persian]
- 21- Malenčić D, Kiproviski B, Popović M, Prvulović D, Miladinović J, Djordjević V. Changes in antioxidant systems in soybean as affected by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Plant Physiol Biochem*. 2010;48(10-11):903-8.
- 22- Ashry NA, Mohamed HI. Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and/or susceptibility to powdery mildew. *World J Agric*