مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۶
صفحه ۲۳-۱۱

مطالعه بیان ژن های فنیل آلانین آمونیالیاز و پروتئین شبه توماتین در گیاه آفتابگردان آلوده به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه

Study of gene expression profiling of phenylalanine ammonia-lyase and thaumatin-like protein in sunflower infected by Sclerotinia stem rot disease

آرام نوری[۱]، رضا درویش زاده[۲]، بابک عبدالهی مندولکانی[۳*]

Aram Nouri[1], Reza Darvishzadeh[2], Babak Abdollahi Mandoulakani[3]*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، ۲- استاد و ۳- دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

1- MSc student, 2- Professor and 3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: **b.abdollahi@urmia.ac.ir**

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۲ - تاریخ پذیرش:۹۶/۴/۱۹)

چکیده

پوسیدگی اسکلروتینیایی ریشه و طوقه که توسط قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی آفتابگردان در ایران به شمار می‌رود. استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری یکی از اقتصادی ترین روش‌های کنترل آن است. در این تحقیق، میزان بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیالیاز ۲ (*PAL2*) و پروتئین شبه توماتین (*TLP*) در ژنوتیپ های LC106-C و RHA265 آفتابگردان بعد از آلودگی با جدایه ی SSU53 قارچ عامل بیماری و با روش Real time PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر ژنوتیپ، زمان پس از آلودگی و همچنین اثر متقابل ژنوتیپ × زمان بر میزان بیان هر دو ژن *PAL* و *TLP* معنی دار است. نتایج برش دهی اثر متقابل نشان داد که در رابطه با ژن *PAL* بین دو ژنوتیپ در زمان های ۶ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی و در رابطه با ژن *TLP* در ۴۸ ساعت پس از آلودگی اختلاف معنی دار وجود دارد. بیشتر بودن میزان بیان ژنهای مورد مطالعه در لاین مقاوم (LC106-C) در مقایسه با لاین حساس (RHA265)، تأییدی بر دخالت ژن های فوق در مقاومت جزئی آفتابگردان به بیماری اسکلروتینیا و مقاومت لاین LC106-C در سطح مولکولی است. نتایج این پژوهش می-تواند در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان برای تولید ارقام مقاوم به بیماری اسکلروتینیا مفید واقع گردد.

واژه‌های کلیدی

آفتابگردان روغنی، پوسیدگی اسکلروتینیایی، qPCR، قارچ های نکروتروف، مقاومت جزئی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

مقدمه

آفتابگردان با نام علمی (*Helianthus annuus* L.) یکی از چهار محصول مهم دانه روغنی (سویا، کلزا، بادام زمینی و آفتابگردان) می باشد (Cerboncini *et al.*, 2002). روغن آفتابگردان به دلیل درصد بالای اسید چرب لینولئیک، نداشتن کلسترول و پایداری بیشتر در برابر اکسیداسیون از کیفیتی مناسبی برخوردار است (Murphy *et al.*, 1994). تنش های زیستی به‌ویژه بیماری های گیاهی ناشی از قارچ ها از عوامل مهم کاهش عملکرد آفتابگردان محسوب می شوند. در تمام مناطق دنیا که کشت آفتابگردان مرسوم است، گونه‌های جنس *Sclerotinia* sp.به عنوان یکی از بیمارگرهای پرآزار مطرح می باشد که می تواند میزان محصول را در شرایط محیطی مناسب تا ۱۰۰٪ کاهش دهد (Micic *et al.*, 2005). بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی آفتابگردان بطور مستقیم باعث کاهش عملکرد و بطور غیرمستقیم باعث افت کیفیت دانه آفتابگردان می شود (Purdy, 1979; Huang & Hoes, 1980; Huang & Kozub, 1991). در ایران آلودگی بخش پایه‌ای ساقه (یقه) عامل اصلی کاهش محصول در بسیاری از مناطق تحت کشت آفتابگردان می‌باشد (Davar, 2011). متداول ترین روش برای مبارزه با بسیاری از بیماری ها استفاده از انواع قارچ کش های شیمیایی است. کنترل شیمیایی بیماری هایی که توسط قارچ های خاکزی ایجاد می شوند مشکل و گاه بی تاثیر است (Weller & Cook, 1983). از طرف دیگر این گونه مواد باعث آلوده شدن محیط زیست و نیز ایجاد گونه های بیماری زای مقاوم به قارچ کش می شوند. تلاش جهت یافتن جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی، منجربه استفاده از روشهای مختلف کنترل بیولوژیک این گونه بیماری ها شده است (Ghorbani *et al.*, 1991; Abdollahzadeh *et al.*, 2006). بکارگیری ارقام متحمل می تواند به عنوان یک روش تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد اما تاکنون ژنوتیپی با مقاومت کامل به بیماری گزارش نشده است (Bert *et al.*, 2004). این امر بخاطر کمی بودن ژنتیک مقاومت به بیماری است (Davar *et al.*, 2010). همانطور که بیمارگرها سعی در استثمار گیاهان زنده دارند گیاهان نیز در صدد توسعه و تکامل سیستم های دفاعی برای جلوگیری یا تحمل در برابر حمله بیمارگرها هستند و در این رابطه استراتِژی-های گوناگون توسعه یافته است. این ها شامل دفاع های ساختمانی یا بیوشیمیایی ذاتی است که از تهاجم بیمارگرها جلوگیری کرده یا یک سری دفاع های ساختمانی و بیوشیمیایی القایی پس از حمله پاتوژن‌ها است. در مقاومت القایی یک محرک واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر بیمارگر را از نظر زمانی یا مقدار، چند برابر افزایش می‌دهد (Daayf *et al.*, 1997). عوامل بیماری‌زای نکروتروف به‌وسیله گزارشگرهایی بنام پروتئین‌های تشخیص الگو (pattern recognition receptors: PRRs) شناسایی می‌شوند از این گزارشگرها می‌توان به پروتئین‌های شبه کینازی (Receptor-like kinases: RLKs) اشاره کرد (Berrocal-Lobo & Molina, 2008). توکسین های اختصاصی میزبان (Host-specific toxins: HSTs) به عنوان یک وسیله بیماری‌زایی به‌وسیله ی قارچ های نکروتروف ظاهر می‌شوند (Van Kan, 2006). فیتوتوکسین ها باعث سرکوب کردن توکسین ها و تجزیه آن‌ها می‌شوند. در گیاهان گروهی از پروتئین‌های غنی از سیستئین نیز شناسایی شده‌اند که فعالیت ضد میکروبی در برابر قارچ‌های نکروتروفی از خود نشان می‌دهند بطوریکه این پروتئین‌ها به‌وسیله ایجاد غشای اسفنجی نفوذپذیر در گیاه باعث پاسخ ایمنی گیاه می‌شوند (Aerts *et al.*, 2007). عامل دیگری که در گیاهان باعث مقاومت به نکروتروف ها می‌شود ژن *PDF 1.2* (Plant defensin 1.2) می‌باشد که به‌وسیله‌ی جاسمونیک اسید تنظیم می‌شود (Veronese *et al.*, 2004). جاسمونیک اسید همراه با اتیلن نقش کلیدی در مقاومت به قارچ‌های نکروتروف بازی می‌کنند (Thomma *et al.*, 1998). با پیشرفت روش های مولکولی، مطالعه خصوصیات ژن های درگیر در مقاومت به بیمارگرها و سازوکارهای دخیل در مقاومت آسان شده است (Grover & Gowthaman, 2003). آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز اولین و کلیدی ترین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد که L- فنیل آلانین را با دآمیناسیون به یون آمونیوم و ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند (Brooks *et al.*, 2005). بیشتر ترکیبات فنولی (شامل لیگنین ها و لیگنان ها) که در گیاهان وجود دارند از مسیر فنیل پروپانوئیدی سنتز می‌شوند و طیف گسترده ای از نقش‌های فیزیولوژیکی را بر عهده دارند. پلی مریزاسیون لیگنین و سایر فنولیک‌ها، دیواره سلولی را در برابر نفوذ و تحلیل رفتن، سخت و محکم می نماید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

در اکثر مواقع، اختلاف در سطح بیان این آنزیم با میزان حساسیت ارقام مختلف یک گیاه به بیماری در ارتباط است (Xu *et al.*, 2010). در تحقیقات گوناگون افزایش بیان ژن *PAL2* هم سو با افزایش بیان ژن های PR (Pathogenesis-related proteins) و نیز القای سریع مرگ سلولی بوده است (Fitzgerald *et al.*, 2004). یک سری از پروتئین‌ها و پپتیدها در گیاه بعد از تماس با بیمارگر بیان می‌شوند که تعداد بیشتری از این ترکیبات مستقیماً خاصیت ضد میکروبی دارند. چنین پروتئین‌هایی با اثر بر روی غشای سلولی بیمارگرها، حفاظت بر علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را فراهم می‌کنند (Butler *et al.*, 2004). این پروتئین‌ها هم به‌صورت سیستمیک و هم به‌صورت موضعی در طی حمله عوامل بیماری زا در غلظت های بالاتری تولید می‌شوند و نقش مهمی در حفاظت گیاه بر عهده دارند (Glazebrook, 1999). چنین پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، پروتئین‌های PR خوانده می‌شوند که شامل گروه مختلفی از پروتئین‌های گیاهی‌اند. وجود پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی با مقاومت القایی ارتباط دارد (Okushima *et al.*, 2000). در حال حاضر راهکار بیان پروتئین‌های ضد قارچی، مثل پروتئین شبه توماتین از طریق مهندسی ژنتیک که باعث اختلال در غشاء سلولی می شود و همچنین پروتئین‌هایی که اثر سمی مستقیم روی عوامل بیماریزا یا کاهش رشد آنها دارند روز به روز در حال افزایش است. هدف از انجام این پژوهش، مطالعه تغییرات رونوشت ژن های *PAL2* و *TLP* (Thaumatin-like protein) در ژنوتیپ های LC106-C و RHA265 آلوده شده با جدایه ی SSU53 قارچ *S. sclerotiorum* می باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه قارچ عامل بیماری

دو لاین LC106-C و RHA265 با واکنش حساسیت متفاوت به جدایه قارچ SSU53 براساس نتایج مطالعات قبل انتخاب شدند (Davar, 2011; Amouzadeh, 2012). بذر لاین های انتخاب شده از موسسه تحقیقات آگرونومی فرانسه (INRA) تهیه گردید. بذور ژنوتیپ ها در گلدان های ۶۰ × ۲۰ سانتیمتری در محیط پیت ماس کاشت داده شد. گیاهان در شرایط کنترل شده با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۶۵٪ و با فتوپریود تاریکی/ روشنایی ۱۲ ساعت به مدت شش هفته تا مرحله V6-V8 پرورش یافتند (Schneiter & Miller, 1981). جدایه قارچ در محیط آگار دکستروز سیب زمینی (Potato Dextrose Agar, 39 gL^{-1}, pH 6.0) کشت و به اتاق تاریک با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد منتقل شد. تلقیح گیاهچه‌های آفتابگردان با قارچ عامل بیماری در مرحله ۸ -۶ برگی، مطابق با الگوی طبیعی آلودگی در مزرعه (Davar, 2011)، انجام شد. بعد از رشد جدایه، دیسک‌هایی از میسیلیوم قارچ به قطر ۳ میلی متر از لبه رو به رشد کلنی قطع و در پایه ساقه ی گیاهان قرار داده شد. پایه‌ی ساقه با پارافیلم و پنبه خیس به منظور حفظ رطوبت به مدت ۷۲ ساعت تحت پوشش قرار گرفت. در زمان‌های صفر (شاهد)، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلودگی با جدایه قارچی، از محل آلوده نمونه‌ها برداشت شد و در نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- منتقل شدند. به منظور کنترل کارایی تلقیح، چندین گیاه تلقیح شده از ژنوتیپ های LC106-C و RHA265 تا چند روز بعد از تلقیح رشد داده شدند. طرح مورد استفاده آزمایش کاملا تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۶ گیاهچه بود.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از نمونه‌های برگی با استفاده از محلول استخراج RNX-plus™ (شرکت سیناکلون، ایران) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. به طورخلاصه ابتدا نمونه گیاهی به اندازه ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در ازت مایع خرد و هموژنیزه شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر بافر RNX-plus به تیوپ حاوی پودر نمونه اضافه شد و بعد از ۱۰ تا ۱۵ ثانیه ورتکس کردن، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در روی یخ قرار داده شد. محلول به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از جدا کردن فاز رویی، هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاصل با الکل ۷۵٪ شستشو و ۲۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به رسوب اضافه شد و در دمای

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

۵۹ درجه سانتی گرد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. برای ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتوفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

برای ساخت cDNA از کیت Fermentas LIFE SCIENCE #K1621 استفاده شد. به طور خلاصه در تیوب استریل ۰/۲ میلی لیتری به مقدار ۵ میکرولیتر آب عاری نوکلئاز ریخته شد. سپس ۶ میکرولیتر RNA استخراج شده به آن اضافه گردید. سپس ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dT به محلول اضافه شد. بعد از انجام سانتریفوژ پالسی، به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گرداد قرار داده شد. پس از سرد کردن محلول روی یخ، یک ورتکس نرم انجام گرفت. چهار میکرولیتر بافر واکنش ۵x، یک میکرولیتر آنزیم RiboLock™ RNase Inhabitor (20u/µl)، دو میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی مولار) و یک میکرولیتر آنزیم RevertAid™ M-MuLV Revers Transcriptase (200u/µl) به محلول اضافه شد. سپس سانتریفیوژ پالسی انجام گرفت تا تمام محتویات تیوب یک جا جمع شود. محلول برای ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد و به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. برای بررسی صحت cDNA واکنش کنترل منفی (RT–)، واکنش کنترل منفی بدون الگو (NTC) و واکنش کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

واکنش Real-time RT-PCR

توالی mRNA مربوط به ژن‌های مورد مطالعه و ژن‌های نرمال کننده از بانک‌های اطلاعاتی ذخیره و آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزار FastPCR طراحی شد. برای بهینه سازی دمای اتصال آغازگر و هم‌چنین اطمینان از صحت محصول تکثیری مربوط به هر ژن، PCR برای هر ژن در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی بافر PCR ۱۰ برابر، dNTP ۰/۲ میلی مولار، $MgCl_2$ ۱/۵ میلی مولار، ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرها، ۰/۵ واحد آنزیم پلیمراز و سه میکرولیتر cDNA رقیق نشده در دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گرفت. الگوی دمایی واکنش‌های PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای بهینه شده (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و سرانجام بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر TBE نیم برابر در ولتاژ ثابت ۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. برای رنگ آمیزی ژل‌ها از اتیدیوم بروماید استفاده شد. پس از اطمینان از صحت محصول تکثیری، واکنش‌های Real time PCR با در نظر گرفتن ۲ تکرار بیولوژیک در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از کیت Maxima SYBER Green/Flourescein qPCR Master Mix بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده (فرمنتاز، آلمان) در دستگاه Rotor gene Q-Pure Detection-Qiagen (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. از ژن Actin و 18s rRNA به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. با توجه به اندازه قطعه قابل تکثیر و توالی آغازگرها، دوره‌های زمانی جهت تکثیر ژن‌های موردنظر تعیین شد. دوره‌های زمانی جهت تکثیر ژن‌های موردنظر در واکنش Real time PCR به صورت: فعال‌سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله باز شدن ۲ رشته در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله چسبیدن آغازگر (دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای 18SrRNA، دمای ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای توماتین (TLP)، دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه برای فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای ژن Actin) و مرحله ساخت رشته مکمل هدف در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (به مدت ۳۰ ثانیه برای 18S rRNA، به مدت ۵۰ ثانیه برای TLP، به مدت ۶۰ ثانیه برای PAL، به مدت ۴۰ ثانیه برای Actin) بود. تعداد ۴۰ چرخه برای تکثیر در نظر گرفته شد. پس از انجام واکنش Real time PCR منحنی تکثیر و منحنی ذوب هر ژن رسم گردید. سنجش تغییرات در بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ انجام گرفت (Livak & Schmittgen, 2001).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

جدول ۱- آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در مطالعه تغییرات رونوشت ژن های فنیل آلانین آمونیا-لیاز۲ (*PAL2*) و پروتئین شبه توماتین (*TLP*) در ژنوتیپ های آفتابگردان در پاسخ به قارچ عامل بیماری اسکلروتینیا

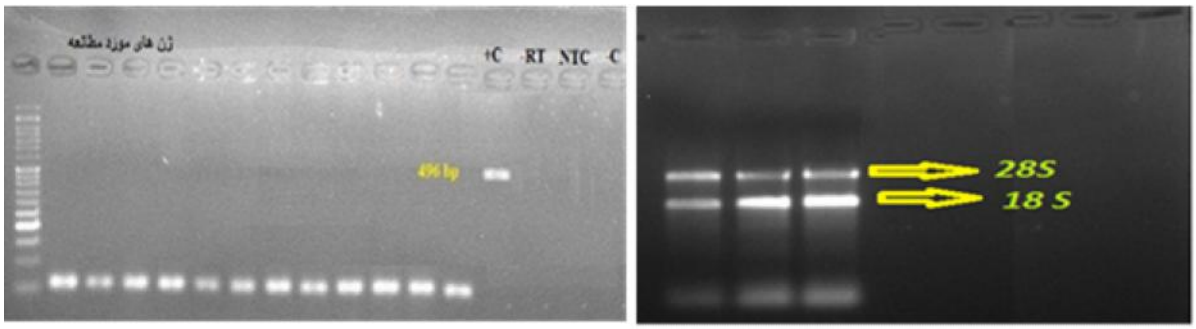
Table 1- Oligonucleotide primers used for studying gene expression profiling of phenylalanine ammonia-lyase and thaumatin-like protein in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes in response to Sclerotinia stem rot disease agent

آغازگر (′ ۵ به ′۳) Primer (5'-3')	طول قطعه تکثیری Amplicon size	دمای اتصال Annealing temperature	نام ژن Gene name	شماره دسترسی Accession number
F: ACCTTCTCGCCGGTCAAGTA R: ACCCGTTGTATCGGTTTGTGA	61	60	PAL	DH0AC016ZD07FM1
F: TTAAGCGCGAATTCAGCTAAAGT R: GGAATGCTCGAATGTCAAGGTT	62	62	TLP	DH0AGB6ZC11RM1
F: GCAGGGATGAGCACAATGT R: CCCACCACTGAGCACACAATGT	180-210	57	Actin	AF282624

نتایج و بحث

براساس مطالعات فنوتیپی، ژنوتیپ LC106-C به جدایه SSU53 مقاوم ولی RHA265 به جدایه فوق حساس می‌باشد (Davar, 2011; Amouzadeh, 2012). واکنش لاین ها به جدایه قارچ عامل بیماری در جدول ۲ نشان داده شده است. به منظور بررسی مقاومت ژنوتیپ به جدایه در سطح مولکولی بررسی بیان ژن‌های *PAL* و *TLP* در ترکیبات ژنوتیپ- جدایه انجام گرفت. شکل ۱ کیفیت RNA استخراج شده و نتایج واکنش کنترل ها بر روی ژل آگارز را نشان می دهد. معمولا تکثیر باند در RT- نشان دهنده ی آلودگی با DNA و عدم تکثیر باند در NTC دلیل بر عدم آلودگی به DNA یا RNA در اجزا واکنش می باشد. وجود باند در کنترل مثبت دلیلی بر درستی انجام واکنش رونویسی معکوس می باشد. منحنی ذوب ژن ها در شکل ۲ نشان داده شده است که نتایج حاکی از درستی تکثیر محصول مربوطه می باشد.

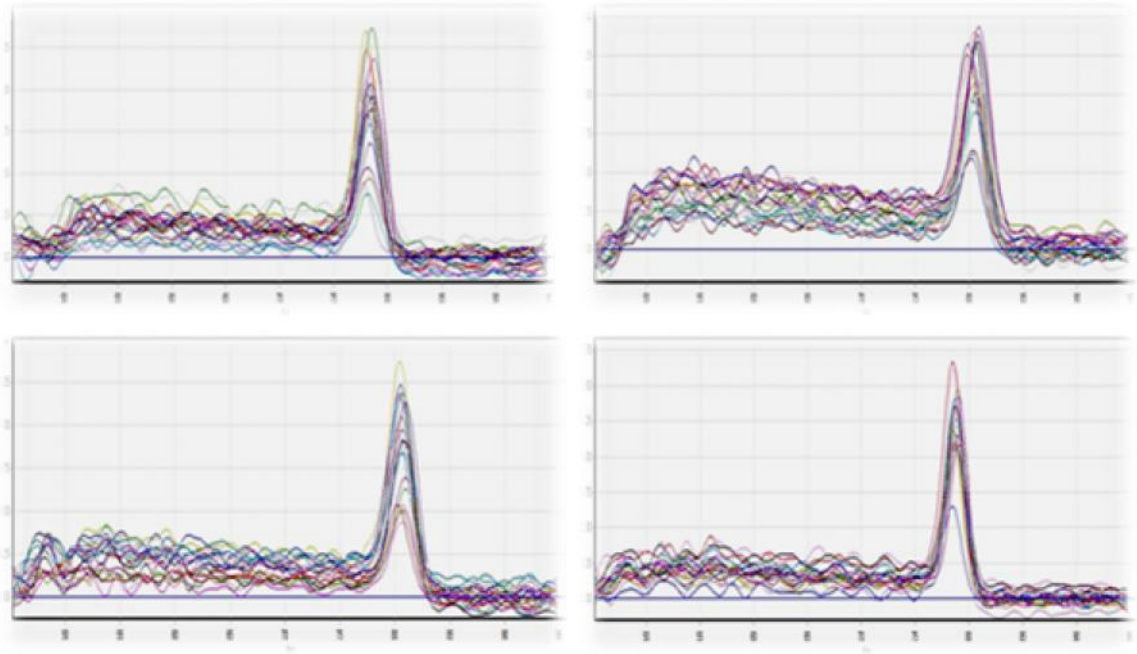
جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ و مدت زمان پس از آلودگی روی بیان ژن توماتین (*TLP*) از لحاظ آماری معنی‌دار است. همچنین اثر متقابل ژنوتیپ × زمان روی بیان نسبی ژن *TLP* معنی‌دار ($P \leq 0.05$) می باشد. به همین دلیل برش دهی اثرات متقابل انجام گرفت (جدول ۳). بر اساس نتایج برش دهی، در زمان ۴۸ ساعت پس از آلودگی بین دو ژنوتیپ مورد بررسی اختلاف معنی‌دار وجود دارد. نتایج تجزیه واریانس داده های مربوط به بیان ژن *PAL* نشان می‌دهد تاثیر ژنوتیپ، زمان پس از آلودگی و اثر متقابل ژنوتیپ × زمان بر روی میزان بیان ژن *PAL* از لحاظ آماری معنی دار می‌باشد. نتایج برش دهی اثر متقابل ژنوتیپ × زمان نشان داد که میزان بیان نسبی ژن *PAL* در زمان های ۶ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی بین دو ژنوتیپ (LC106-C و RHA265) بطور معنی داری متفاوت است.



شکل ۱- کیفیت RNA استخراج شده و نتایج PCR برای بررسی صحت cDNA ۳ ساعت بعد از آلودگی (به ترتیب از راست به چپ).

Figure 1. Quality of extracted RNA and PCR results showing the accuracy of synthesized cDNA 3h after inoculations (from right to left)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]



شکل ۲- منحنی‌های ذوب ژن‌های پروتئین شبه توماتین، فنیل آلانین آمونیالیاز، 18SrRNA و اکتین در واکنش‌های Real time PCR در گیاه آفتابگردان آلوده شـده بـا قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه (از بالا، سمت راست به چپ).

Figure 2. Temperature melting curves of thaumatin-like protein, phenylalanine ammonia-lyase, 18SrRNA and actin genes in real time PCR in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes infected by Sclerotinia stem rot disease agent (from right to left).

جدول ۲- متوسط درصد نکروز در ژنوتیپ های آفتابگردان آلوده شده با جدایه SSU53 قارچ عامل بیماری *Sclerotinia sclerotiorum* در شرایط کنترل شده

Table 2- Mean percentage of necrosis on sunflower genotypes inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* isolate SSU53 under controlled conditions

لاین Line	نوع Type	منشا Origin	واکنش به جدایه SSU53 (درصد) Reaction to SSU53 isolate (Percent)	
RHA265	Breeder Line	آمریکا	۷۴	حساس
LC1064-C	Breeder Line	فرانسه	۳۶	مقاوم (جزیی)

واکنش لاین های آفتابگردان به جدایه قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی سه روز پس از مایه‌زنی، که به صورت درصد قسمت نکروزه و پوسیده در ۱ سانتیمتری از پایه ساقه به صورت بصری اندازه‌گیری شده است.

Reaction of sunflower lines 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

جدول ۳- تجزیه واریانس تغییرات رونوشت ژن‌های فنیل آلانین آمونیالیاز۲ (*PAL2*) و پروتئین شبه توماتین (*TLP*) در ژنوتیپ‌های LC106-C و RHA265 در پاسخ به جدایه SSU53 قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه

Table 3. Analysis of variance for transcript variations of phenylalanine ammonia-lyase and thaumatin-like protein genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes (RHA265 and LC106-C) in response to SSU53 isolate of Sclerotinia basal stem rot disease agent.

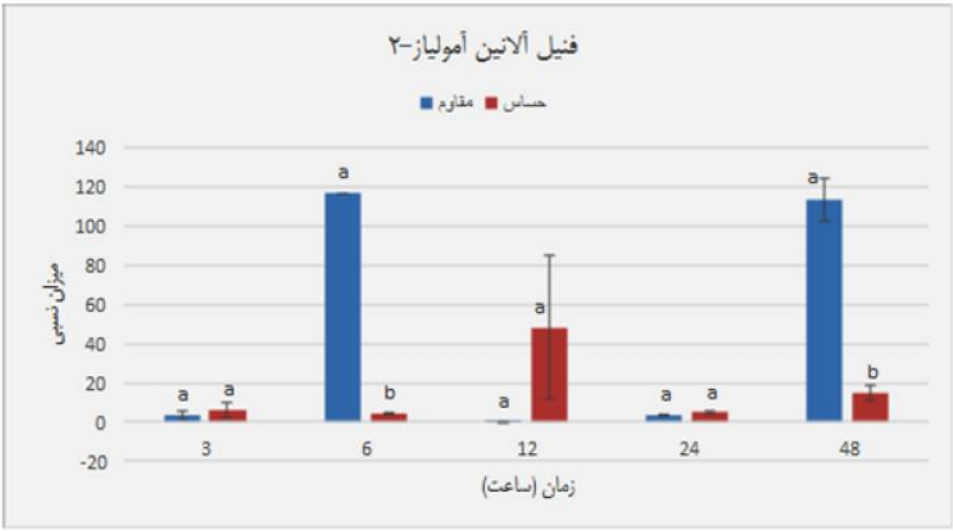
منابع تغییرات	درجه آزادی	فنیل آلانین آمولیاز۲ *PAL*		پروتیئن شبه توماتین *TLP*	
Source of variance	df	MS	*P*-value	MS	*P*-value
ژنوتیپ	۱	۴۶۰۱/۱۵	۰/۰۱۴*	۱۵۱۴۲۸۸۵۱۸	۰/۰۳۱*
زمان	۴	۳۱۵۷/۵۰	۰/۰۱۰*	۱۴۳۱۵۱۸۹۲۳	۰/۰۱۰*
ژنوتیپ × زمان	۴	۴۳۲۸/۹۳	۰/۰۰۳**	۱۴۲۵۶۹۶۹۴۴	۰/۰۱۰*
۳ ساعت بعد از آلودگی	۱	۶/۶۶	۰/۹۱۰ns	۳۴۳۸۰	۰/۹۹۰ns
۶ ساعت بعد از آلودگی	۱	۳۱۲۱/۴۰	۰/۰۰۲**	۱۸۸۴۰	۰/۹۹۳ns
۱۲ ساعت بعد از آلودگی	۱	۲۳۰۴/۹۶	۰/۰۵۹ns	۸۶۳/۷۷	۰/۹۹۸ns
۲۴ ساعت بعد از آلودگی	۱	۲/۱۸	۰./۹۴۸ns	۳۱۹۱۱۴۹۷	۰/۹۱۰ns
۴۸ ساعت بعد از آلودگی	۱	۰/۰۶	۰/۰۰۱**	۷۲۱۳۸۳۳۰۷۱۳	۰/۰۰۰۳*

میزان بیان ژن *PAL* در پاسخ به آلودگی در هر دو ژنوتیپ LC106-C و RHA265 در ساعت های پس از آلودگی افزایش یافت. بیشترین میزان بیان ژن ۶ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد. میزان بیان ژن بعد از اینکه به بیشترین حد خود رسید شروع به کاهش نهاد و مجددا در زمان ۴۸ ساعت پس از آلودگی افزایش یافت. مشابه با این، میزان بیان ژن *PAL* در پاسخ به آلودگی با زنگ (*Puccinia triticina*) در گندم ۱۲ ساعت پس از مایه زنی افزایش یافت و نرخ بیان ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و مجددا در زمان ۴۸ ساعت همزمان با تشکیل هوستوریوم و انشعابات میسیلیومی قارچ افزایش یافت (Asghari *et al.*, 2013). همچنین در پاتوسیستم لوبیا-اسکلروتینیا بیان ژن *PAL* (PvPAL) حدودا چنین روندی را نشان داد (Oliveira *et al.*, 2015). احتمالا دلیل افزایش ثانویه بعد از کاهش بیان، ایجاد عفونت ثانویه در گیاه همزمان با انشعابات شبکه میسلیومی قارچ باشد (Asghari *et al.*, 2013). میزان بیان ژن در ژنوتیپ مقاوم در زمان ۶ ساعت پس از آلودگی ۱۶۶ برابر ژنوتیپ حساس و در ۴۸ ساعت پس از آلودگی ۸ برابر آن بود (شکل ۴). میزان بیان ژن *PAL* در این پژوهش در ژنوتیپ مقاوم LC106-C در مقایسه با ژنوتیپ حساس RHA265 به طور معنی داری افزایش یافت که این نتایج نشان دهنده ی نقش مثبت این ژن در مقاومت گیاه آفتابگردان به قارچ اسکلروتینیا می باشد. آنزیم PAL نقش مهمی در مقاومت گیاهان در مقابل بیمارگرها از طریق دخالت در مسیرهای ساخت ایزوفلاونوییدها و فنیل پروپانوییدها که فعالیت فیتوالکسینی دارند ایفا می‌کند. PAL اولین آنزیم کلیدی و تعیین کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل پروپانوئیدها است و عمل اصلی آن آمین زدایی از اسیدآمینه L- فنیل آلانین و تبدیل آن به ترانس سینامیک اسید می‌باشد که این ترکیب به‌عنوان اولین و مهم ترین حد واسط در مسیر تولید ترکیبات فنولی شناخته می‌شود (Achnine *et al.*, 2004). متابولیت هایی که در نتیجه فعالیت PAL به وجود می‌آیند به‌عنوان مشتقات فنولی طبقه‌بندی می‌شوند و نقش‌های متعددی همچون شرکت در ترکیب ساختاری میزبان و محافظت مکانیکی آن، تشکیل رنگدانه و مسیرهای پیام دهی، محافظ در برابر اشعه‌های UV و نقش ضدمیکروبی و مقاومت در مقابل آفات و قارچها را در گیاه بازی می‌کنند. PAL همچنین در ترکیبات لیگنین، سوبرین و دیگر مواد فنلی دیواره سلولی گیاه میزبان مشارکت می نماید. این ترکیبات به منظور جلوگیری از گسترش هیف های قارچ در محل حمله بیمارگر در ساختارهایی همچون پاپیلا تجمع می‌یابند. با افزایش بیان *PAL* و در اثر آن افزایش میزان ترکیبات فنولی، مقاومت گیاه در برابر تنش‌ها افزایش می یابد (Wen *et al.*, 2005). افزایش بیان ژن‌های دخیل در مقاومت و دستکاری مولکولی ژن‌های مقاومت به منظور افزایش تاثیر آنها در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماریزا استفاده تجاری

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

از مهندسی ژنتیک را در گیاهان فراهم می نماید. ZhanQuan و همکاران (ZhanQuan *et al.*, 2009) در ترکیب گندم-زنگ قهوه‌ای مشاهده کردند که فعالیت آنزیم PAL در مراحل اولیه آلودگی سریعتر از PR ها افزایش می یابد. بررسی نتایج الگوی بیان ژن *PAL* حاکی از آن است که در گیاهان آلوده شده با قارچ عامل سفیدک سطحی در گندم، افزایش بیان ژن در ساعات اولیه بعد از آلودگی (۱۲ ساعت پس از آلودگی) سبب القا سریعتر ژن‌های مقاومت در گیاه می شود که این عمل از نفوذ و رشد قارچ در سلول‌های گیاهی جلوگیری می نماید (Eichmann & Hückelhoven, 2008). بیان ژن PAL در ارقام مقاوم و حساس برنج پس از آلودگی با قارچ عامل بلاست مشاهده شد ولی میزان آن در ارقام مقاوم بیشتر بود (Hao, 2009). در مطالعه ای Powell و همکاران (Powell *et al.*, 2010) فعالیت *PAL* را در مراحل اولیه پس از آلودگی با عامل زنگ زرد گزارش کردند.

بیان ژن توماتین (TLP) افزایش معنی داری در لاین مقاوم پس از آلودگی با قارچ اسکلروتینیا نشان داد. بیشترین میزان بیان ژن ۴۸ ساعت پس از آلودگی با قارچ مشاده شد (شکل ۴). از آنجایی که پروتئین های PR در آخر مسیر سنتزی قرار دارند این انتظار هم می رفت که توماتین در زمان های طولانی تری افزایش نشان دهد. در ۴۸ ساعت پس از آلودگی میزان افزایش توماتین در لاین مقاوم تقریبا ۶۳۱ برابر لاین حساس بود. در صورتی که در لاین حساس در زمان های پس از آلودگی افزایش آنچنانی در میزان بیان این ژن مشاهده نشد. بنابراین به احتمال زیاد افزایش بیان بیشتر ژن توماتین (*TLP*) در ژنوتیپ مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ حساس حاکی از نقش ژن توماتین (*TLP*) در مقاومت ژنوتیپ مقاوم به عامل بیماری قارچ اسکلروتینیا باشد.

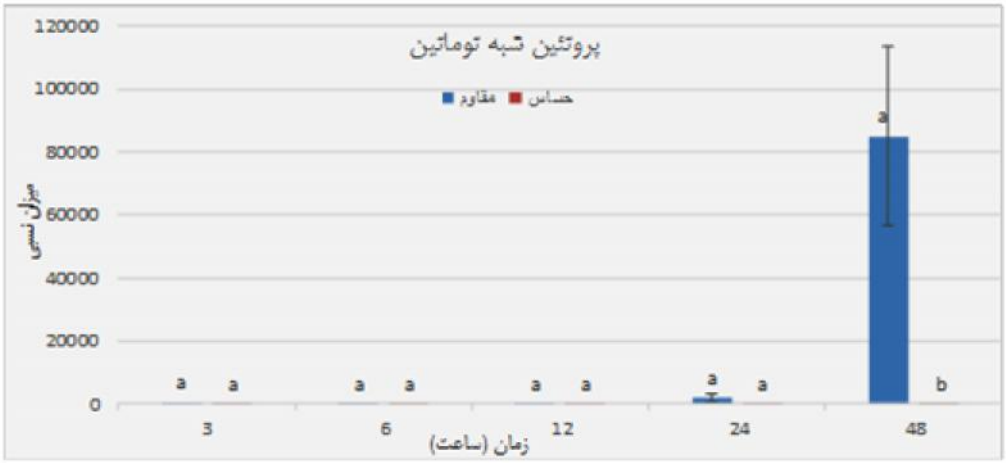


شکل ۳- الگوی بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز۲ (*PAL2*) در ژنوتیپ‌های LC106-C و RHA265 پس از آلودگی با جدایه SSU53 قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه.

Figure 4. Expression profiling of thaumatin-like protein in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes (RHA265 and LC106-C) infected by SSU53 isolate of Sclerotinia basal stem rot disease agent.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]



شکل ۴- الگوی بیان ژن شبه توماتین در ژنوتیپ‌های LC106-C و RHA265 پس از آلودگی با جدایه ی SSU53 قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه ساقه

Figure 3. Expression profiling of phenylalanine ammonia-lyase gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes (RHA265 and LC106-C) infected by SSU53 isolate of Sclerotinia basal stem rot disease agent.

پروتئین شبه توماتین (TLP) یا پروتئین انتقال دهنده لیپید، با وزن مولکولی ۱۵-۳۰ کیلو دالتون متعلق به خانواده PR-5 است. این خانواده به دلیل شباهت توالی آمینواسیدی با پروتئین‌های شیرین مزه توماتین میوه گیاهان قطبی جنس *Thaumatococcus daniellii* به این نام خوانده می شود (Velazhan *et al.*, 1999). با شناسایی زئوماتین در بذر ذرت اولین مدرک فعالیت ضد قارچی TLP در گیاهان بدست آمد (Roberts & Selitrennikoff, 1990). این پروتئین ها ویژه میزبان هستند و بعد از حمله بیمارگرها، حشرات و تحت شرایط تنش زا افزایش بیان نشان می دهند و بدین ترتیب باعث اختلال در فشار درونی سلول های قارچ، ایجاد کانال، جریان یافتن یون‌ها و لیپیدهای مختلف از داخل به خارج سلول ها و در نهایت مرگ عوامل بیماری زا می گردند (Tobias *et al.*, 2007). ویژگی این پروتئین، خاصیت گلوکونازی آن است. در حقیقت پروتئین با اتصال به گلوکان به عملکرد بهتر گلوکانازها کمک می‌کند. همچنین TLP ها قادرند طی تشکیل دیواره قارچ با اتصال به واحدهای گلوکان مانع تشکیل دیواره شوند. TLP ها سبب القا نشت در سلول قارچی از طریق اختلال و ایجاد سوراخ در غشا پلاسمایی می شوند و بدین ترتیب باعث تاخیر در ایجاد علائم بیماری در برابر عوامل بیماری زای گوناگون می گردند (Liu *et al.*, 2010). همچنین توماتین ها با ممانعت از رشد ریسه، جوانه زدن اسپور و همچنین جلوگیری از توسعه ریسه تندشی در صورت جوانه زدن اسپور، از رشد و توسعه قارچ در سلول میزبان جلوگیری می‌نمایند (Chang *et al.*, 2008). بررسی بیان ژن شبه توماتین در گیاهان مختلف در پاسخ به آلودگی‌های قارچی مورد مطالعه قرار گرفته است. در پژوهشی که توسط محمدیان فارسانی و همکاران (Mohammadian Farsani *et al.*, 2014) بر روی گیاه آفتابگردان در پاسخ به جدایه های قارچ عامل بیماری ساقه سیاه فوما انجام گرفت مشاهده شد که در ژنوتیپ های حساس میزان رونوشت *TLP* کاهش یافته و علائم بیماری بیشتر مشاهده می‌شود درحالی‌که در ژنوتیپ هایی با مقاومت جزئی در برابر قارچ عامل بیماری، میزان رونوشت این ژن‌ها افزایش می یابد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. Fitzgerald و همکاران (Fitzgerald *et al.*, 2004) طی مطالعاتی فعالیت ضد قارچیPR5 را در گیاه آرابیدوپسیس طی آلودگی با قارچ‌های ورتیسیلیوم و فوزاریوم مشاهده نمودند. در تحقیق ایشان بیان این ژن ۴۸ ساعت بعد از آلودگی با عامل سفیدک پودری به اوج خود رسید و بعد روند کاهشی نشان داد که این نشان‌دهنده سرکوب شدن موثر آنها بدنبال

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

تشکیل مکینه می‌باشد. در گندم پس از آلودگی با قارچ عامل پوسیدگی ریشه (*Fusarium graminearum*) سطح توماتین افزایش نشان داد (Zhu *et al.*, 2012). همچنین در لاین مقاوم گندم به زنگ قهوه ای در مقایسه با لاین حساس سطح بیان توماتین افزایش نشان داد (Hulbert *et al.*, 2007). Molitor و همکاران (Molitor *et al.*, 2011) در پاتوسیستم در جو- *Puccinia indica* (عامل بیماری فیدک سطحی پودری) افزایش بالای ژن *PR-5* را بعد از آلودگی با قارچ مشاهده نمودند. در پژوهشی نشان داده شد که جاسمونیک اسید (JA) سبب القای ژن توماتین (*PR-5*) و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز در گندم شده و بدین ترتیب باعث افزایش مقاومت به بیماری‌ها می شود (Jayaraj *et al.*, 2004). در تحقیقی در پاتوسیستم کلزا-اسکلروتینیا مشخص شد که سطح بیان ژن های درگیر در تشخیص عامل بیماری زا، آبشار پیام دهی پروتئین کیناز فعال کننده میتوژن، تنظیم کننده نسخه برداری از نوع WRKY، تشخیص پیام دهی اتیلن و جاسمونیک اسید، بیوسنتز پروتئین های مرتبط با دفاع و ایندولیک گلوکوزینولات در لاین مقاوم بسیار بیشتر از لاین حساس است (Wu *et al.*, 2016).

نتیجه گیری

بیشتر بودن میزان بیان ژن های مورد بررسی در لاین مقاوم (LC106-C) در مقایسه با لاین حساس (RHA265)، تأییدی بر دخالت ژن های فوق در مقاومت جزئی آفتابگردان به بیماری اسکلروتینیا و مقاومت لاین LC106-C در سطح مولکولی است. نتایج این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی آفتابگردان برای تولید ارقام هیبرید مقاوم به بیماری اسکلروتینیا مفید واقع گردد.

سپاسگزاری

از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد. از انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه نیز به خاطر در اختیار قراردادن بذور لاین های آفتابگردان تشکر می‌گردد.

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, 185e191.

Abdollahzadeh, J., Mohammadi Goltapeh, E. & Rouhani, H. (2006). Investigation on biocontrol of crown and root rot of sunflower (*Sclerotinia sclerotiorum*) by *Trichoderma* species in laboratory condition. *Journal of Agricultural Sciences Islamic Azad University*, 12(1), 43-56.

Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S. & Dixon, R.A. (2004). Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-Hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 16, 3098-109.

Aerts, A.M., Thevissen, K., Bresseleers, S.M., Sels, J., Wouters, P., Cammue, B.P.A. & Francois, I.E.J.A. (2007). *Arabidopsis thaliana* plants expressing human beta-defensin-2 are more resistant to fungal attack: functional homology between plant and human defensins. *Plant Cell Rep.*, 26, 1391-1398.

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)

Asghari, A., Babaeizad, V., Tajik Ghanbari, M.A. & Mahdian, S.A. (2013). Molecular analysis of two commercial wheat cultivars in response to brown rust agent *Puccinia triticina* E. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 2(1), 81-90. (In Farsi).

Berrocal-Lobo, M., Molina, A. (2008). Arabidopsis defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci.*, 13, 145-150.

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 macdonaldii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 865-874.

Broetto, F., Marchese, J.A., Leonardo, M. & Regina, M. (2005). Fungal elicitor mediated changes in polyamine content, phenylalanine-ammonialyase and peroxidase activities in bean cell culture. *General and Applied Plant Physiology*, 31, 235-246.

Brooks, D.M., Bender, C.L. & Kunkel, B.N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid dependent defences in *Arabidopsis thaliana*.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

Molecular Plant Physiology, 6(6), 629-639.

Butler, P.J., Green, J.A., Boyd, I.L. & Speakman, J.R. (2004). Measuring meatabolic rate in the field: the pros and cons of the doubly labeled water and heart rate methods. *Functional Ecology*, 18, 168-183.

Cerboncini, C., Beine, G., Binsfeld, P.C., Dresen, B., Peisker, H., Zerwas, A. & Schnabl, H. (2002). Sources of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary in natural *Helianthus* gene pool. *Helia*, 25, 167- 176.

Chang, A., Lim, M.H., Lee, S.W., Robb, E.J. & Nazar, R.N. (2008). Tomato PAL gene family: highly redundant but strongly underutilized. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 33591-33601.

Daayf, F., Schmitt, A. & BeÂlanger, R.R. (1997). Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiology*, 113, 719-27.

Darvishzadeh, R., Hewezi, T., Gentzbittel, L. & Sarrafi, A. (2007). 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)

Dickinson, M. (2003). Molecular Plant Pathology. BIOS Scientific Publisher. London, UK, 245p

Eichmann, R. & Hückelhoven, R. (2008). Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *Journal of Plant Physiology*, 165, 5-18.

El Ghaouth, A., Wilson, C.L. & Callahan, A. (2003). Induction of chitinase, beta- 1, 3 glucanase and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. *Phytopathology*, 9, 349-355.

Fitzgerald, H.A., Chern, M.S., Navarre, R. & Ronald, P.C. (2004). Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17(2), 140-151.

Ghorbani, F., Behboodi, K. & Bardi Fotouhifar, K. (2013). A Study of some powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* P4 for the control of sunflower sclerotinia root rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 43(2), 333-344.

Glazebrook, J. (1999). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 280-286.

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

Hao, Z.N., Wang, L.P. & Tao, R.X. (2009). Expression patterns of defence genes and antioxidant defence responses in a rice variety that is resistant to leaf blast but susceptible to neck blast. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 74, 167-174.

Huang, H.C. & Hoes, J.A. (1980). Importance of plant spacing and sclerotial position to development of sclerotinia wilt of sunflower. *Plant Disease*, 64, 81-84.

Huang, H.C. & Kozub, G.C. (1991). Monocropping to sunflower and decline of sclerotinia wilt. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 32, 163-170.

Hulbert, S.H., Bai, J., Fellers, J.P., Pcheco, M.G. & Bowden, R.L. (2007). Gene expression patterns in near isogenic lines for wheat rust resistance gene Lr34/Yr18. *Phytopathology*, 97, 1083-1093.

Jayraj, J., Anand, A. & Muthukrishnan, S. (2004). Pathogenesis-related proteins and their roles in resistance to fungal pathogen. In: Z. K. PUNJA (Ed.): Fungal disease resistance in plants-biochemistry, molecular biology and genetic engineering, 139-178. Food Products Press, New York.

Liu, J.J., Sturrock, R. & Ekramoddoullah, A.K.M. (2010). The super family of thaumatin-like protein its origin, evolution and expression toward biological function. *Plant Cell Reports*, 29, 419-436.

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402–408.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J. & Solano, R. (2003). Ethylene response factors integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15, 165-178.

Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Melchinger, A., Knapp, J., Tang, S. & Schon, C.C. (2005). Identification and validation of QTL for Sclerotinia midstalk rot resistance in sunflower by selective genotyping. *Theoretical and* Applied Genetics, 111, 233–242.

Mohammadian 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 fungi isolates of Black stem disease. Crop Biotechnology, 7, 15-23. (In Farsi)

Molitor, A., Zajic, D., Voll, L., Pons-Kühnemann, J., Samans, B., Kogel, K.H. & Waller, F. (2011). Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and Piriformospora indica-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 1427-1439.

Murphy, D.J. (1994). Designer Oil Crops: Breeding, processing and Biotechnology. VCH Weinheies New York.

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.

Oliveira, M.B., de Andrade, R.V., Grossi-de-Sá, M.F. & Petrofeza, S. (2015) Analysis of genes that are differentially expressed during the Sclerotinia

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

sclerotiorum–Phaseolus vulgaris interaction. *Front. Microbiol.*, 6, 1162. doi: 10.3389/fmicb.2015.01162.

Powell, N.M. (2010). Phenotypic and genetic analysis of yellow rust resistance in the UK winter wheat cultivar Claire. Research final Report. Research, Education and Extension organization. Ph.D thesis. University of East Anglia, Norwich.

Purdy, L.H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*. History, diseases and symptomatology. *Phytopathology*, 69, 875-880.

Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasan, V. & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20, 1-11.

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

Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. & Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 15107-15111.

Tobias, D.J., Manoharan, M., Pritsch, C. & Dahleen, L.S. (2007). Co-bombardment, integration and expression of rice chitinase and thaumatin-like protein genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Conlon). *Plant Cell Reports*, 26, 631–639.

Van Kan, J.A.L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.*, 11, 247-253.

Van Loon, L.C. & Van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 85-97.

Veronese, P., Chen, X., Bluhm, B., Salmeron, J., Dietrich, R. & Mengiste, T. (2004). The BOS loci of Arabidopsis are required for resistance to *Botrytis cinerea* infection. *Plant Journal*, 40, 558-574.

Weller, D. M. & Cook, P. J. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73: 463-469.

Wen, P.F., Chen, J.Y., Kong, W.F., Pan, Q.H., Wan, S.B. & Huang, W.D. (2005). Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science*, 169, 928-34.

Wu, J., Zhao, Q., Yang, Q., Liu, H., Li, Q., Yi, X., Cheng, Y., Guo, L., Fan, C. & Zhou, Y. (2016). Comparative transcriptomic analysis uncovers the complex genetic network for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Sci. Rep.*, 6, 19007; doi: 10.1038/srep19007.

Xu, H., Park, N.I., Li, X., Kim, Y.K., Lee, S.Y. & Park, S.U. (2010). Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis*. *Bioresource Technology*, 101(24), 9715-9722.

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.

Zhu, X., Li, Z., Xu, H., Zhou, M., Du, L. & Zhang, Z. (2012). Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistance to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. *Functional* & Integrative *Genomics*, 12(3), 481-488.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]

Study of gene expression profiling of phenylalanine ammonia-lyase and thaumatin-like protein in sunflower infected by Sclerotinia stem rot disease

Aram Nouri[1], Reza Darvishzadeh[2], Babak Abdollahi Mandoulakani[3]*

1- MSc student, 2- Professor and 3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran

*Corresponding Author: **b.abdollahi@urmia.ac.ir**

Abstract

Sclerotinia stem rot disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* is one of the most important diseases of sunflower. The use of resistant genotypes is potentially an economically useful method for its control. In this study, the expression level of the genes encoding phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2) and thaumatin-like protein (TLP) were measured in the LC106-C and RHA265 genotypes of sunflower inoculated with SSU53 isolate of *S. sclerotiorum* by real time PCR technique. The results revealed that transcript levels of both the PAL2 and TLP genes were significantly affected by genotype, time after inoculation and genotype-time of inoculation interactions. In particular there were significant differences between the expression of PAL in two genotypes 6 and 48 hours after infection. Concerning the expression of the TLP gene, the maximum difference between two genotypes was observed 48 hours after infection. The high expression level of studied genes in a resistant line compared to a susceptible one confirms the involvement of these genes in partial resistance of sunflower to Sclerotinia stem rot disease. It also confirms the resistance of LC106-C to the disease at the molecular level. The findings of this study can be useful in sunflower breeding programs for producing cultivars resistant to Sclerotinia stem rot disease.

Keywords: Necrotrophic fungi, oily sunflower, partial resistance, real time PCR, Sclerotinia rot.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.6.8]