

بررسی تغییرات بیان ژن HaRIC_B و عامل رونویسی از تیپ MYB در پاتوسیستم آفتابگردان - اسکلروتینیا

نوش آفرین بروکانو مادلو^۱، رامین حسینی^۲ و رضا درویش‌زاده^{۳*}

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

۳- استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه.

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

تاریخ دریافت: ۹۸/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۰

چکیده

پوسیدگی اسکلروتینیایی یقه‌ی ساقه که توسط قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی آفتابگردان در ایران به شمار می‌رود. استفاده از ژنوتیپ‌های متحمل به بیماری یکی از اقتصادی‌ترین روش‌های مقابله با بیماری است. اخیراً در مکان‌یابی ارتباطی برای مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی در آفتابگردان، ارتباط معنی‌داری بین بروز کمتر نکروز ناشی از اسکلروتینیا و بیان ژن HaRIC_B مشاهده شده است. از طرف دیگر، بیان ژن‌های دفاعی به شدت توسط عوامل رونویسی تنظیم می‌گردند. در این پژوهش، میزان بیان ژن HaRIC_B و عامل رونویسی از تیپ MYB در لاین‌های LC1064C/8*A (جزئی مقاوم) و SDR19 (حساس) آفتابگردان بعد از آلودگی با جدایه‌ی A37 قارچ عامل بیماری اسکلروتینیا با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی بررسی شد. در بررسی الگوی بیان ژن HaRIC_B در دو لاین مورد مطالعه مشاهده شد که میزان بیان ژن در لاین LC1064C/8*A با گذشت زمان بعد از آلودگی با قارچ عامل بیماری بتدریج افزایش یافته است. همچنین در مقایسه بیان ژن در دو لاین دیده شد که میزان بیان در لاین LC1064C/8*A در مقایسه با لاین SDR19 در هر یک از زمان‌های بعد از آلودگی بیشتر است. در مقایسه‌ی الگوی بیان ژن HaRIC_B و عامل رونویسی از تیپ MYB، یک ارتباط منطقی بین میزان بیان دو ژن مخصوصاً در ژنوتیپ LC1064C/8*A مشاهده شد. بنابراین احتمالاً عامل رونویسی از تیپ MYB در تحریک بیان ژن HaRIC_B و بنابراین در القاء مقاومت به پوسیدگی اسکلروتینیایی در آفتابگردان موثر باشد که البته نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. با تایید مقاومت لاین LC1064C/8*A در مقابل عامل بیماری اسکلروتینیا در سطح مولکولی، می‌توان بالقوه از لاین مذکور در تولید ارقام هیبرید مقاوم در اصلاح نباتات متداول استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان روغنی، بیان ژن، مقاومت کمی، عامل رونویسی، PCR کمی.

مقدمه

Phoebanthus و *Viguiera*، *Tithonia* می‌باشند (Heiser et al., 1969). این گیاه دارای دوره‌ی رشد کوتاه (ارقام زودرس ۹۰-۱۲۰ روز و ارقام دیرس ۱۲۰-۱۶۰ روز) می‌باشد (Bhutta, 1998). آفتابگردان قابلیت رشد در طیف وسیعی از خاک‌ها و شرایط آب و هوایی را دارد (FAO, 2010). از مهم‌ترین ویژگی‌های آفتابگردان پدیده‌ی هلیوتروپیسم قسمت انتهایی ساقه‌ی گل دهنده آن است که

آفتابگردان زراعی (*Helianthus annuus* L.) گیاهی از تیره مرکبان (Asteraceae یا Compositae)، دولپه و یکساله می‌باشد. جنس *Helianthus* دارای گونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید است که آفتابگردان زراعی جزو گونه‌های دیپلوئید با $2n = 2x = 34$ کروموزوم می‌باشد. نزدیکترین خویشاوندان شناخته شده این جنس

پژمردگی می‌کند و در حالت دوم اسکروت‌ها در خاک از طریق زایشی (کارپوژنیک) جوانه زده و تولید آسکوکارپ بشقابی شکل (آپوتسیوم) می‌کنند (Morall et al., 1976). آسکوسپوره‌های حاصل از این اندام می‌توانند در فواصل دورتری انتشار یافته و قسمت‌های بالای ساقه و به خصوص طبق را آلوده نمایند. گونه‌های این قارچ قادر به تولید میکروکنیدی نیز می‌باشند که هنوز نقش آنها در سیکل زندگی قارچ مشخص نشده است (Willetter and Wong, 1980). انتشار ثانویه‌ی بیماری می‌تواند توسط آلودگی گیاه به گیاه به وسیله‌ی رشد میسیلیوم بین قاعده ساقه‌ها یا تماس قسمت‌های هوایی گیاهان آلوده با گیاهان سالم مجاور در اواخر فصل رشد اتفاق بیافتد (Huang and Hoes, 1980). علایم در محل‌های آلوده ابتدا به صورت لکه‌های کشیده و آب سوخته ظاهر می‌شود که به تدریج میسیلیوم سفید رنگ و پنبه مانند قارچ روی آنها را می‌پوشاند و بافت قسمت آلوده نکروزه می‌شود. در مراحل پیشرفته بیماری، علایمی چون زردی و پژمردگی در برگ‌ها و حتی در مواردی در کل گیاه بروز می‌کند و معمولاً در نهایت گیاه خشک شده و از بین می‌رود. ساقه‌ی آلوده ممکن است شکافته شود، در این صورت سختینه‌های کروی تا بی‌شکل به رنگ سفید خاکستری تا سیاه که در داخل بافت ساقه تشکیل شده‌اند، دیده می‌شود که یکی از علایم بارز این بیماری می‌باشد. آسکوسپورها می‌توانند در طول مرحله‌ی کرده افشانی از میان گلچه‌ها به طبق نفوذ کرده و موجب پوسیدگی طبق شوند و علایم آن طی یک دوره‌ی کوتاه کمون در سطح پشتی طبق ظاهر می‌شود (Gulya et al., 1997).

گونه‌های قارچی جنس *Sclerotinia* به جهت انتشار جهانی (Adams and Ayers, 1979; Purday, 1979)، دامنه‌ی میزبانی وسیع (Boland and Hall, 1994; Purday, 1979)، تولید سختینه‌های مقاوم و بقاء طولانی مدت در خاک (معمولاً بیش از سه سال) (Bardin and

باعث کاهش خسارت ناشی از پرندگان و مانع توسعه بیماری‌ها می‌گردد (FAO, 2010). سطح زیر کشت آفتابگردان در جهان در سال ۲۰۱۷ برابر با ۲۶۵۳۳۵۹۶ هکتار و میزان تولید ۴۷۸۶۳۰۷۷ تن با متوسط عملکرد ۱۸۰۳/۹ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است (FAO, 2017). سطح زیر کشت آن در ایران در همین سال برابر ۴۰۰۰۰ هکتار با مقدار تولید ۴۰۰۰۰ تن برآورد شده است (FAO, 2017). ارقام روغنی آفتابگردان حدود هشت درصد از کل تولید دانه‌های روغنی جهان را به خود اختصاص داده‌اند و پس از سویا (۵۵ درصد)، کلزا (۱۴ درصد)، پنبه دانه (۱۰ درصد) و بادام زمینی پنجمین منبع تامین روغن خوراکی در جهان محسوب می‌گردد (FAO, 2010). روغن آفتابگردان حاوی ویتامین‌های محلول در چربی شامل A, D, E و K و غنی از اسیدهای چرب غیراشباع لینولئیک و مرغوبیت بالا محسوب می‌شود (Murphy, 1994). کنجاله به دست آمده بعد از روغن‌کشی به دلیل دارا بودن پروتئین (۳۵ درصد) و کربوهیدرات (۱۸-۲۰ درصد) بالا به عنوان مکمل در برنامه‌های غذایی طیور و دام مورد استفاده قرار می‌گیرد.

عوامل مختلف زنده و غیر زنده باعث افت عملکرد آفتابگردان می‌شوند که از جمله عوامل زنده می‌توان به بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی یقه‌ی ساقه که توسط بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary ایجاد می‌شود، اشاره کرد که خسارت زیادی به این محصول وارد می‌کند (Bolton et al., 2006). قارچ عامل بیماری با تولید اندام‌های استراحتی به نام سختینه (اسکروت) طولانی مدت در خاک بقا می‌یابد. قارچ از طریق دو سازوکار مشخص می‌تواند در میزبان ایجاد بیماری نماید. یکی از طریق جوانه زدن میسیلومی (میسلیوژنیک) اسکروت‌ها در خاک و تولید ریشه می‌باشد که با حمله به ریشه میزبان ایجاد پوسیدگی ریشه و طوقه و در نهایت

بررسی بیان ژن‌ها و عوامل رونویسی دخیل در مقاومت به بیماری در آفتابگردان انجام گرفته است (محمدیان فارسانی و همکاران، ۱۳۹۳؛ نوری و همکاران، ۱۳۹۶؛ هوشیاردل و همکاران، ۱۳۹۳؛ نجف زاده و همکاران، ۱۳۹۶؛ Alignan et al., 2007; Darvishzadeh et al., 2006). در مطالعه‌ای نقش مثبت عامل رونویسی MYB در مقاومت آفتابگردان به آلودگی ناشی از قارچ اسکروتینیا مشاهده شده است (نجف زاده و همکاران، ۱۳۹۶).

با توجه به اهمیت ژن HaRIC_B در دفاع آفتابگردان علیه قارچ عامل بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی (Fusari et al., 2012) و نقش مثبت عامل رونویسی MYB در تحریک مکانیسم‌های دفاعی (نجف زاده و همکاران، ۱۳۹۶)، در این مطالعه به همزمان بیان عامل رونویسی از تیپ MYB و ژن HaRIC_B در دو لاین آفتابگردان با واکنش حساسیت متفاوت به بیماری با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در زمان واقعی (Real time polymerase chain reaction) مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه‌ی قارچ عامل بیماری

لاین‌های خالص LC1064C/8*A (واکنش به بیماری: جزئی مقاوم، منشاء: کشور فرانسه، مرکز تحقیقاتی (ASGROW) و SDR19 (واکنش به بیماری: حساس، منشاء: کشور آمریکا، مرکز تحقیقاتی USDA) با واکنش حساسیت متفاوت به جدایه‌ی A37 قارچ عامل بیماری *Sclerotinia sclerotiorum* طبق نتایج مطالعات پیشین انتخاب شدند (موسی خلیفانی و همکاران، ۱۳۹۷). بذر لاین‌های آفتابگردان انتخاب شده از موسسه تحقیقات آگرونومی فرانسه (Institut national de la recherche agronomique; INRA) تهیه گردید. جدایه مورد مطالعه از مزارع آفتابگردان آلوده به قارچ عامل بیماری پوسیدگی

(Huang, 2001) و تنوع ژنتیکی گسترده در جدایه‌های مختلف عامل بیماری به عنوان یکی از مهمترین بیمارگرهای گیاهی شناخته می‌شوند (Bolton et al., 2006; Davar et al., 2011). شیوع و توسعه این بیماری در منطقه‌ی شمال غرب 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).

با توسعه‌ی روش‌های مولکولی، مطالعه‌ی خصوصیات ژن‌های گوناگون درگیر در مقاومت به بیماری‌ها و سازوکارهای دخیل در مقاومت تسهیل شده است. همانطور که بیمارگرها سعی در استعمار گیاهان زنده دارند، گیاهان نیز درصدد توسعه و تکامل سیستم‌های دفاعی برای جلوگیری یا تحمل در برابر حمله‌ی بیمارگرها هستند و در این رابطه استراتژی‌های گوناگونی توسعه یافته است (Abdel Monaim et al., 2011). در زمان القای واکنش-های دفاعی که بر اثر حمله میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ایجاد می‌شوند، مجموعه‌ای از ژن‌ها در میزبان فعال شده و باعث القاء مقاومت در گیاه میزبان میشوند. به عنوان نمونه اخیراً در مکان‌یابی ارتباطی برای مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی در آفتابگردان، ارتباط معنی‌داری بین بروز کمتر نکروز ناشی از اسکروتینیا و بیان ژن HaRIC_B مشاهده شده است (Fusari et al., 2012).

بیان ژن‌های دفاعی به شدت توسط عوامل رونویسی تنظیم می‌گردند (Zhang et al., 2013). عوامل رونویسی از اجزای کلیدی در کنترل بیان ژن در همه‌ی بافت‌های زنده می‌باشند (Chew et al., 2013). از میان عوامل رونویسی مختلف، پروتئین‌های AP2 Domain (Aharoni et al., 2004)، WRKY (Mare et al., 2004)، MYB (Yamaguchi Shinazaki and Shinozaki, 2005) و HD-ZIP (Javelle et al., 2011) بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند. تاکنون چندین مطالعه در رابطه با

گیاهان پلاگ هایی (دیسک‌هایی) از میسیلیوم با قطر سه میلیمتر در بخش پایه‌ی ساقه گیاه قرار داده شد و بعد از قرار دادن یک پنبه خیس اطراف آن، با پارافیلیم به منظور حفظ رطوبت برای رشد قارچ بسته شد. سپس در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلودگی، از محل تلقیح نمونه برداری شد و نمونه‌ها در نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. به منظور کنترل کارایی تلقیح، چندین گیاه (حداقل ۱۸ گیاه) تلقیح شده از لاین‌های LC1064C/8*A و SDR19، تا چند روز بعد از تلقیح رشد داده شدند. در این مدت امکان مشاهده‌ی نکروز به صورت آشکار وجود داشت و شدت بیماری بر اساس مساحت لکه‌های ایجاد شده در محل تلقیح قابل اندازه‌گیری بود. برای انجام آزمایش از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. هر واحد آزمایشی (کرت) شامل شش گیاهچه بود.

اسکلروتینیایی یقه‌ی ساقه در استان آذربایجان غربی جمع-آوری شده است (موسی خلیفانی و همکاران، ۱۳۹۷). بذور لاین‌ها در گلدان‌های مستطیلی پلاستیکی (ابعاد دهانه: ۶۰ × ۲۰ سانتی متر، ارتفاع: ۱۷ سانتی متر) در محیط پیت ماس کشت داده شدند. در طول آزمایش از هر دو دور آبیاری با آب معمولی، یک دور آبیاری با آب حاوی نیم گرم در لیتر کود ۲۰-۲۰-۲۰ (NPK) انجام شد. گیاهان در شرایط کنترل شده با دمای 25 ± 1 درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵٪ و با فتوپریود تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعت به مدت شش هفته تا مرحله V6-V8 پرورش یافتند (Schneider and Miller, 1981) (شکل ۱). جدایه‌ی A37 قارچ عامل بیماری روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar, 39 gL⁻¹, pH 6.0) (ساخت شرکت مرک، آلمان) کشت داده شده و در انکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تلقیح



شکل ۱- A: نمایی از لاین‌های کشت شده در شرایط کنترل شده، B: گیاه آلوده شده با بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* جدایه A37 و C: شکل ظاهری قارچ بیمارگر در محیط کشت Potato dextrose agar

Figur 1. A: View of cultivated lines under controlled conditions, B: Plant inoculated by A37 isolate of *Sclerotinia sclerotiorum*, C: The appearance of pathogenic fungi in the culture medium; Potato dextrose agar (PDA).

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از نمونه‌های گیاهی با استفاده از محلول استخراج RNX-plus™ (شرکت سیناکلون، ایران) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. به طور خلاصه 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، یک میکرولیتر مرکاپتواتانول به تیوپ حاوی پودر و بافر RNX-plus اضافه گردید و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) 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 rpm (Revolutions per minute) سانتی‌فیوژ (Model: Velocity 14R Benchtop Refrigerated Centrifuge, No. 6727037, Name: Tabletop Centrifuge, Voltage: 220v 50Hz, Power: 800w, French) جدا کرد. بعد از جدا کردن فاز رویی، هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتی‌فیوژ شد. سپس رسوب حاصل با الکل ۷۵٪ شستشو و ۲۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به رسوب اضافه شد و در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. برای ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتوفوتومتری و الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد استفاده شد. قبل از سنتز cDNA، تیمار DNase برای حذف DNA ژنومی طبق دستورالعمل موجود در کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (#K1621, Thermo Scientific, USA) انجام گرفت.

واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت Revert Aid First Strand cDNA Synthesis طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. به طور خلاصه در لوله استریل ۲ میلی‌لیتری به مقدار پنج میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز

ریخته شد. سپس شش میکرولیتر RNA استخراج شده و یک میکرولیتر آغازگر الیگو dT (Oligo dT₁₈) به محلول اضافه شد. بعد از انجام سانتی‌فیوژ پالسی، به مدت پنج دقیقه در ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد کردن محلول روی یخ، یک ورتکس نرم (ورتکس با زمان کوتاه و دور کند) انجام گرفت. چهار میکرولیتر بافر واکنش ۵X، یک میکرولیتر آنزیم RiboLock™ RNase Inhibitor (۲۰u/μl)، دو میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار) و یک میکرولیتر آنزیم RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/μl) به محلول اضافه شد. سپس سانتی‌فیوژ پالسی انجام گرفت تا تمام محتویات تیوپ یک جا جمع شود. محلول برای ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت پنج دقیقه در ۷۰ درجه‌ی 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 کنترل منفی (-RT) جهت تشخیص وجود آلودگی DNA در نمونه‌های RNA استخراج شده است. در این واکنش تمام اجزای واکنش برای سنتز cDNA به جز آنزیم Reverse transcriptase مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به استفاده نکردن از آنزیم، نباید در نمونه cDNA سنتز شده و در مرحله‌ی تکثیر ژن-های مورد مطالعه با استفاده از این cDNA، باندی مشاهده شود. وجود باند بیانگر وجود آلودگی DNA است. واکنش کنترل منفی بدون الگو (NTC) برای تشخیص آلودگی در اجزای واکنش است. در این واکنش تمام اجزای واکنش سنتز cDNA استفاده شده؛ منتها به جای استفاده از RNA استخراج شده از آب عاری از نوکلئاز استفاده می‌شود و مطابق پروتکل سنتز cDNA عمل می‌شود. در این واکنش چون به جای RNA از آب عاری از نوکلئاز استفاده شده است بنابراین cDNA سنتز نمی‌شود و در مرحله‌ی تکثیر ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از این cDNA هیچ باندی نباید مشاهده شود. وجود باند نشانگر آلودگی اجزای واکنش خواهد بود. واکنش کنترل مثبت جهت بررسی صحت

واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه در یک چرخه، واسرشته سازی با همان دما به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه در ۲۵ سیکل انجام گردید.

انجام واکنش رونویسی معکوس (سنتز cDNA) انجام شد. در این واکنش سنتز cDNA برطبق دستورالعمل کیت با استفاده از RNA موجود در کیت انجام شد. RNA موجود در کیت مربوط به ژن GAPDH به طول ۱/۳ کیلوباز می-باشد. cDNA با استفاده از مواد موجود در کیت طبق پروتکل ساخته شد و به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد. دوره‌های زمانی واکنش PCR جهت تکثیر ژن GAPDH شامل

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلی مرز در زمان واقعی برای بررسی تغییرات بیان نسبی ژن HaRIC_B و عامل رونویسی از تیپ MYB (MYB-related transcription) در لاین های SDR19 و LC1064C/8*A آفتابگردان روغنی بعد از آلودگی با بیماریگر *Sclerotinia sclerotiorum* جدایه A37

Table 1. Characteristics of oligonucleotide primers used in real time polymerase chain reaction (real time PCR) for investigating changes in relative expression of HaRIC_B gene and MYB-related transcription factor in oilseed sunflower lines; SDR19 and LC1064C/8*A post inoculation with A37 isolate of *Sclerotinia sclerotiorum*

Primer (5'→3') (آغازگر (۵' به ۳'))	Amplicon size (bp) (طول قطعه تکثیری (جفت باز))	Annealing temperature (°C) (دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد))	Accession number in NCB (شماره دسترسی در NCBI)	Gene name (نام ژن)
Forward: GGCTTGCGTTACATCTCTGA Reverse: CCCAACTAGGAGCATTGGAA	136	57	NM128906.3	HaRIC_B
Forward: CCGCCACACGCATTCTCT Reverse: CGAGCGCAGCAGCATCTA	66	60	CD848175	MYB-related transcription factor
Forward: TCAATGTTCCCGCCATGTAT Reverse: GACCACTGGCATAGAGGGAAAG	60	57	AF282624	Actin

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. برای بررسی بیان ژن از دستگاه Rotor gene Q- (شرکت کیاژن، Pure Detection –Qiagen مدل ۶۰۰۰) (شرکت کیاژن، آمریکا) استفاده شد. برای انجام واکنش PCR در زمان واقعی از کیت Maxima SYBR Green/Fluorescence qPCR Master Mix (2x) شرکت فرمنتاز استفاده شد. از ژن اکتین به عنوان ژن مرجع (کنترل داخلی) جهت نرمال سازی استفاده شد. آزمایش در سه تکرار زیستی (آزمایشی) و دو تکرار بیولوژیکی (آزمایشگاهی) انجام

واکنش PCR در زمان واقعی

در ابتدا توالی ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن HaRIC_B و عامل رونویسی از تیپ MYB (MYB-related transcription) از بانک اطلاعاتی NCBI ذخیره‌سازی شد و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) طراحی گردید (جدول ۱). برای بررسی میزان اختصاصی بودن آغازگرها، Blast هر کدام از آغازگرها در برابر توالی‌های نوکلئوتیدی و ESTهای موجود در NCBI انجام گرفت

¹ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

و اثر متقابل ژنوتیپ \times زمان بر روی بیان ژن در سطح ۱ درصد ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بودند (جدول ۲). در مواردی همچون آزمایش مذکور که حجم نمونه مورد مطالعه کم است تجزیه واریانس بر اساس آماره والد بر آنوا تیپ ارجحیت دارد (Shah and Madden, 2004).

در بررسی الگوی بیان ژن HaRIC_B در لاین LC1064C/8*A، روند افزایشی در بیان ژن در زمان‌های مختلف بعد از آلودگی مشاهده شد (شکل ۲). کمترین میزان بیان ژن در سه ساعت بعد از آلودگی و بیشترین میزان بیان در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد (شکل ۲). در مقایسه الگوی بیان ژن HaRIC_B در دو لاین مورد بررسی مشاهده شد که میزان بیان در هر لاین LC1064C/8*A در مقایسه با لاین SDR19 در هر یک از زمان‌های نمونه برداری بیشتر است (شکل ۲).

تجزیه واریانس بر اساس آماره والد (Wald-type) بر روی داده‌های بیان ژن عامل رونویسی از تیپ MYB(-) MYB (related transcription) نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ و مدت زمان بعد از آلودگی روی بیان ژن در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) معنی‌دار می‌باشد. در لاین LC1064C/8*A کمترین میزان بیان در سه ساعت بعد از آلودگی و بیشترین میزان بیان ژن در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد (شکل ۳). در لاین SDR19 کمترین میزان بیان در سه و ۱۲ ساعت بعد از آلودگی و بیشترین میزان بیان همچون لاین LC1064C/8*A در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد (شکل ۳). در مقایسه دو لاین، میزان بیان در لاین LC1064C/8*A با در نظر گرفتن زمان‌های مختلف نمونه برداری به صورت منظم بتدریج افزایش یافته است در صورتی که در لاین SDR19 منظم نبوده؛ در شش ساعت بعد از آلودگی نسبت به سه ساعت افزایش و در ۱۲ ساعت بعد از آلودگی نسبت به شش ساعت کاهش یافته است (شکل ۳). در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلودگی بیان ژن دوباره افزایش یافته است (شکل ۳).

گرفت. سنجش تغییرات در بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ارایه شده توسط لیواک و اشمیتگان (Livak and Schmittgen, 2001) انجام گرفت.

تجزیه‌های آماری

تجزیه داده‌های حاصل از میزان نسبی بیان ژن‌ها بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. به دلیل نرمال نبودن توزیع اشتباهات آزمایشی، تجزیه آماری با روش ناپارامتری (Brunner et al., 2002) انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 انجام گرفت. نمودارها با Excel ورژن ۲۰۱۶ رسم شدند.

نتایج و بحث

در این پژوهش با توجه به ثبات و پایداری بیان، از ژن اکتین برای نرمال‌سازی بیان ژن‌ها استفاده شد. در تحقیقی (اصغری و همکاران، ۱۳۹۲) برای ارزیابی پاسخ‌های مولکولی دو رقم گندم نان به قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای، برای نرمال‌سازی میزان بیان ژن‌ها از ژن کنترل داخلی اکتین استفاده کردند. در بررسی (حبیبی و همکاران، ۱۳۹۲) الگوی بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی در گندم نان (*Triticum aestivum*)، از ژن بتا اکتین بعنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. همچنین (آهنگر و همکاران، ۱۳۹۳) برای بررسی بیان فنیل آلانین آمونیلایز و ژن‌های مرتبط با بیماریزایی در گندم همزیست شده با قارچ اندومیکوریز *Piriformospora indica* پس از آلودگی با سفیدک پودری از ژن بتا اکتین برای استاندارد نمودن داده‌ها استفاده کردند.

تجزیه واریانس بر اساس آماره والد (Wald-type) بر روی داده‌های بیان ژن HaRIC_B نشان داد که اثر ژنوتیپ و مدت زمان بعد از آلودگی بر روی بیان در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل ژنوتیپ \times زمان نیز بر روی بیان ژن در سطح احتمال ۱ درصد ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج حاصل از آماره آنوا تیپ (ANOVA-Type) نشان داد که اثر ژنوتیپ

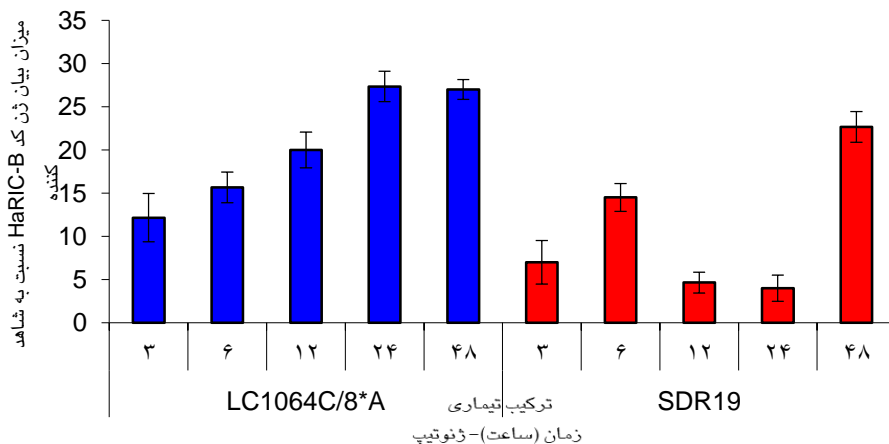
جدول ۲- تجزیه واریانس تغییرات بیان نسبی ژن HaRIC_B و عامل رونویسی از تیپ MYB (MYB-related transcription) در لاین های حساس SDR19 و جزئی مقاوم LC1064C/8*A آفتابگردان روغنی سه، شش، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* جدایه A37 در شرایط کنترل شده.

Table 2. Analysis of variance for changes in relative expression of HaRIC_B gene and MYB-related transcription factor in oilseed sunflower lines; SDR19 and LC1064C/8*A at 3, 6, 12, 24 and 48 hours post inoculation with A37 isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in controlled conditions.

Gene (ژن)	Source of variations (منابع تغییرات)	Statistics (آماره)							
		Wald-type statistic (آماره تیپ والد)				ANOVA-Type statistic (آماره تیپ آنوا)			
		df _N	df _D	Chi-square	P-value	df _N	df _D	Chi-square	P-value
HaRIC_B	Genotype (ژنوتیپ)	1	20	68.45	0.0001	1	43.9	20.82	0.0001
	Time (زمان)	4	20	89.58	0.0001	2.98	43.9	32.92	0.8531
	Genotype × Time (ژنوتیپ × زمان)	4	20	60.10	0.0001	3.36	15.3	11.94	0.0002
MYB-related transcription	Genotype (ژنوتیپ)	1	20	8.03	0.0046	1	14.3	8.03	0.0046
	Time (زمان)	4	20	15.22	0.0043	3.7	14.3	3.67	0.0068
	Genotype × Time (ژنوتیپ × زمان)	4	20	7.96	0.0929	3.7	14.3	1.60	0.1758

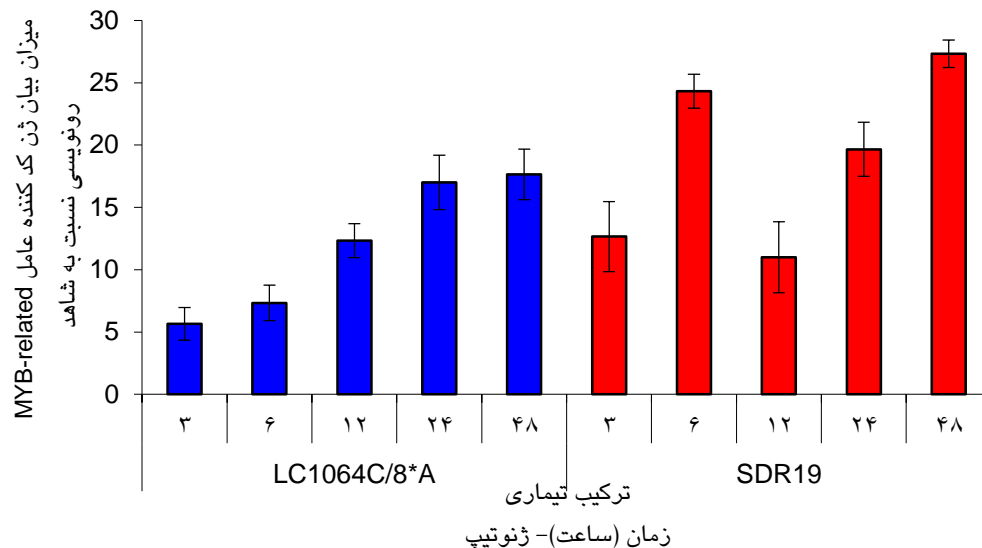
df_N: درجه آزادی صورت (Numerator degrees of freedom), df_D: درجه آزادی مخرج (Denominator degrees of freedom), Chi-square: آماره مربع کای، P-value: مقدار احتمال.

df_N: Numerator degrees of freedom, df_D: Denominator degrees of freedom, Chi-square: Chi-square statistic, P-value: Probability value.



شکل ۲- الگوی بیان ژن HaRIC_B در لاین جزئی مقاوم LC1064C/8*A و حساس SDR19 آفتابگردان روغنی سه، شش، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* جدایه A37 در شرایط کنترل شده.

Figure 2. Expression profiling of HaRIC_B gene in partial resistant (LC1064C/8*A) and susceptible (SDR19) lines of oilseed sunflower (*Helianthus annuus* L.) at 3, 6, 12, 24 and 48 hours post inoculation with A37 isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in controlled conditions.



شکل ۳- الگوی بیان ژن کد کننده عامل رونویسی از تیپ MYB (MYB-related transcription) در لاین جزئی مقاوم LC1064C/8*A و حساس SDR19 آفتابگردان روغنی سه، شش، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی با بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* جدایه A37 در شرایط کنترل شده.

Figure 3. Expression profiling of MYB-related transcription factor in partial resistant (LC1064C/8*A) and susceptible (SDR19) lines of oilseed sunflower (*Helianthus annuus* L.) at 3, 6, 12, 24 and 48 hours post inoculation with A37 isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in controlled conditions.

فرآیند دفاع در مقابل *S. sclerotiorum* شرکت می نماید (Bashi et al., 2010, Fusari et al., 2012).

در مقایسه‌ی الگوی بیان ژن HaRIC_B و عامل رونویسی از تیپ MYB، یک ارتباط منطقی بین میزان بیان دو ژن مخصوصاً در لاین LC1064C/8*A مشاهده شد. بنابراین احتمالاً عامل رونویسی از تیپ MYB در تحریک بیان ژن HaRIC_B و بنابراین در القاء مقاومت به پوسیدگی اسکروتینیایی در آفتابگردان موثر باشد. البته اکثر فاکتورهای رونویسی شامل AP2/ERF، WRKY، NAC، bZIP، bHLH و MYB در یک واکنش گروهی به تنش‌های زیستی و غیر زیستی تحمیل شده به گیاه پاسخ می‌دهند (هومودایمر و هتروداایمر). بنابراین صرف افزایش بیان فاکتور رونویسی MYB هم‌راستا با افزایش بیان ژن HaRIC_B نمی‌تواند نشان‌دهنده‌ی ارتباط مستقیم این دو ژن باشد. به نظر باید تغییرات بیان فاکتورهای رونویسی دیگر نیز مورد بررسی قرار بگیرد تا نتایج مطلوب حاصل

بیان ژن HaRIC_B در لاین جزئی مقاوم LC1064C/8*A به طور قابل توجهی نسبت به لاین حساس SDR19 در هریک از زمان‌های نمونه برداری افزایش نشان داد. نتایج نشان دهنده‌ی نقش مثبت ژن HaRIC-B در سازوکار مقاومت آفتابگردان روغنی به بیماری اسکروتینیا می‌باشد. اتیلن و افزایش سطح نکروز در محل آلوده منجر به القاء دو پپتید SsNep1 و SsNep2 در *S. sclerotiorum* می‌شوند که اخیراً شناسایی و توصیف شده‌اند (Bashi et al., 2010). بیان SsNep2 به غلظت Ca^{2+} وابسته است و ترکیباتی که سطح کلسیم را افزایش می‌دهند (به عنوان مثال کافئین و کلرید لانتانیم) تا حد زیادی باعث کاهش بیان SsNep2 و کاهش تهاجم *S. sclerotiorum* می‌شوند (Bashi et al., 2010). مشخص شده است که HaRIC_B با سرکوب بیان فاکتور نکروز SsNep2، از طریق تنظیم مجدد و افزایش غلظت‌های سیتوزولی Ca^{2+} در بافت هدف حمله عامل بیماری زا، در

Alternata alternaria و قارچی *solanacearum* نشان می‌دهد (Zhang et al., 2009).

افزایش بیان ژن‌های دخیل در مقاومت و دستکاری - مولکولی ژن‌های مقاومت برای افزایش تأثیر آن‌ها در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا، استفاده تجاری از مهندسی ژنتیک را در گیاهان فراهم می‌نماید (محمدیان فارسانی و همکاران، ۱۳۹۳). طبق نتایج این تحقیق، لاین LC1064C/8*A می‌تواند بالقوه به عنوان لاین جزئی مقاوم به بیماری اسکروتینیا در آفتابگردان معرفی گردد. می‌توان از ژنوتیپ LC1064C/8*A در تولید ارقام هیبرید مقاوم به بیماری اسکروتینیا در پروژه‌های اصلاحی استفاده نمود. در ادامه در نظر هست تجزیه بیان ژن در لاین‌های حساس و جزئی مقاوم با روش توالی‌یابی RNA (RNA Sequencing) انجام گیرد تا شبکه ژنی درگیر در مقاومت شناسایی شود. همسانه‌سازی و انتقال ژن‌های عامل مقاومت به ارقام حساس و بررسی مقاومت تراویخته‌ها در سطح مولکولی در تایید نقش ژن‌ها در مقاومت کمک اساسی خواهد نمود.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب همکاری مشترک بین دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) و دانشگاه ارومیه انجام شده است. از دانشکده کشاورزی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام پژوهش و همچنین از انستیتو تحقیقات آگرونومی تولوز فرانسه به خاطر در اختیار قراردادن بذور لاین‌های آفتابگردان تشکر و قدردانی می‌شود.

شود. در مطالعه‌ای مشخص شد که بیان عوامل رونویسی AP2 Domain و MYB Family در لاین جزئی مقاوم آفتابگردان (LC106-C) در مقایسه با لاین حساس RHA265 به طور معنی‌داری افزایش یافت (نجف زاده و همکاران، ۱۳۹۶). نتایج نشان‌دهنده‌ی نقش مثبت عوامل رونویسی AP2 Domain و MYB Family در سازوکار مقاومت آفتابگردان به آلودگی قارچی اسکروتینیا است. در مطالعه‌ی دیگری مشخص گردید که بیان عوامل رونویسی AP2 Domain و MYB در پاسخ به جدایه‌های قارچ عامل ساقه سیاه فوما در آفتابگردان در ترکیبات مختلف ژنوتیپ-جدایه متفاوت است (Darvishzadeh et al., 2007). این درحالی است که تفاوتی در بیان عامل رونویسی HD-Zip مشاهده نشد. گزارش شده است که عوامل رونویسی AP2 Domain (Aharoni et al., 2004)، MYB (Yamaguchi Shinazaki and Shinozaki, 2005) و HD-ZIP (Javelle et al., 2011) بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند. در تحقیقی در پاتوسیستم کلزا-اسکروتینیا مشخص شد که سطح بیان ژن‌های درگیر در تشخیص عامل بیماری‌زا، آبشار پیامدهی پروتئین کیناز فعال کننده‌ی میتوزن، تنظیم کننده‌ی نسخه برداری از نوع WRKY، تشخیص پیامدهی اتیلن و جاسمونیک اسید، بیوسنتز پروتئین‌های مرتبط با دفاع و ایندولیک گلوکوزینولات در لاین مقاوم بسیار بیشتر از لاین حساس است (Wu et al., 2016). در مطالعه‌ای ژن GmERF3 که نوعی عامل رونویسی AP2/EFR می‌باشد، از گیاه سویا به گیاه توتون انتقال داده شد و مشاهده گردید که گیاه گیرنده، مقاومت قابل توجهی به بیماری باکتریایی *Ralstonia*

منابع

آهنگرل، رنجبرغ، بابایی زاد و، نجفی زربینی ح و بیابانی ع، ۱۳۹۳. بررسی بیان فنیل آلانین آمونیا لایز و ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی در گندم همزیست شده با قارچ اندومیکوریز *Piriformospora indica* پس از آلودگی با سفیدک پودری. بیماری گیاهی، ۴(۵۰): ۳۹۶-۳۸۴.

اصغری ع، بابایی زاد و، تاجیک قنبری م ع و مهدیان ص ع، ۱۳۹۲، ارزیابی پاسخهای مولکولی دو رقم گندم به قارچ عامل زنگ قهوه ای، دوفصلنامه مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، ۲(۱): ۹۰-۸۱.

حبیبی م، میرآخوری ن، شیران ب و مردی م، ۱۳۹۲. بررسی الگوی بیان ژنهای مرتبط با مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی در گندم نان (*Triticum aestivum*). فصلنامه علمی ژنتیک نوین. ۸(۲): ۱۴۹-۱۵۸.

محمدیان فارسانی آ، حاتمی ملکی ح، درویش زاده ر و هوشیاردل ف، ۱۳۹۳. مطالعه تغییرات رونوشت ژن های فنیل آلانین آمونیا-لیاز (PAL۲) ۲ (و پروتئین شبه توماتین (TLP) در ژنوتیپ های آفتابگردان در پاسخ به جدایه های قارچ عامل بیماری ساقه سیاه . مجله زیست فناوری گیاهان زراعی، دوره ۷: ۱۵-۲۳.

موسی خلیفانی خ، درویش زاده ر و ابرین بنا م، ۱۳۹۷. نوع قدرت تهاجمی جدایه های *Sclerotinia sclerotiorum* و *S. minor* در استان آذربایجان غربی و برهمکنش اختصاصی لاین های آفتابگردان با جدایه های این بیمارگرها. پژوهش های کاربردی در گیاهپزشکی، دوره ۷، شماره ۱: ۱۳۵-۱۵۰.

نجف زاده ر، درویش زاده ر، نوری آ و موسی خلیفانی خ، ۱۳۹۶. بررسی الگوی بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی یقه ساقه در آفتابگردان. مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. دوره ۶، شماره ۱: ۱۳۱-۱۴۲.

نوری آ، درویش زاده ر و عبدالهی مندولکانی ب، ۱۳۹۶. مطالعه بیان ژن های فنیل آلانین آمونیا-لیاز و پروتئین شبه توماتین در گیاه آفتابگردان آلوده به بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی یقه ساقه. مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. دوره ۶، شماره ۱: ۱۱-۲۳.

هوشیاردل ف، حاتمی ملکی ح، درویش زاده ر و جعفری م، ۱۳۹۳. مطالعه بیان عوامل رونویسی مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه در آفتابگردان. مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. دوره ۲، شماره ۲: ۸۷-۹۵.

Abdel Monaim MF, Abo Elyousr KAM and Morsy KM, 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsk). Crop Protection, 30: 185-191.

Adams PB and Ayers WA, 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. Phytopathology, 69: 896-899.

Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, Arkel GV and 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 and 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.

Bardin SD and Huang HC, 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 23: 88-98.

Bashi ZD, Hegedus DD, Buchwaldt L, Rimmer R and Borhan MH, 2010. Expression and regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* necrosis and ethylene-inducing peptides (NEPs). Molecular Plant Pathology, 11: 43-53.

Bhutta AR, 1998. Biological studies on some fungi associated with sunflower in Pakistan. PhD Thesis, Sindh Agriculture University, Tandojam, Pakistan.

Boland GJ and Hall R, 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Plant Pathology, 16: 93-108.

Bolton MD, Thomma BP and Nelson BD, 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology, 7: 1-16.

- Brunner E, Domhof S and Langer F, 2002. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiment. New York: Wiley.
- Chew W, Hrmova M and 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 and 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, Darvishzadeh R and Majd A, 2011. Genotype-isolate interaction for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: 442-449.
- Emamgholi A, Zaefizadeh M and Imani A, 2015. The proteomic analysis of resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* fungus in sunflower seedling stage. *Trends in Life Sciences*, 4: 2319-5037.
- FAO, 2010. Agribusiness handbook: sunflower crude and refined oils. FAO/EBRD, Rome.
- FAO, 2017. Agribusiness handbook: sunflower crude and refined oils. FAO/EBRD, Rome.
- Fusari CM, Di-Rienzo JA, Troglia C, Nishinakamasu V, Moreno MV, Maringolo C, Quiroz F, Álvarez D, Escande A, Hopp E, Heinz R, Lia VV and Paniego NB, 2012. Association mapping in sunflower for sclerotinia head rot resistance. *BMC PlantBiology*, 12: 93. Doi: 10.1186/1471-2229-12-93.
- Gulya TJ, Rashid KY and Masirevic SM, 1997. Sunflower Diseases. In: Schneiter AA (ed) *Sunflower technology and production*. Soil Science Society of America Inc.. Madison. pp 263–379.
- Heiser CB, Smith DM, Clevenger SB and Martin WC, 1969. The North American sunflowers (*Helianthus*). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, Pp, 218-221.
- Huang HC and Hoes JA, 1980. Importance of plant spacing and sclerotial position to development of sclerotinia wilt of sunflower. *Plant Disease*, 64: 81-84.
- Javelle M, Klein-Cosson C, Vernoud V, Boltz V, Maher C, Timmermans M, Depège-Fargeix N, and Rogowsky PM, 2011. Genome-wide characterization of the HD-ZIP IV transcription factor family in maize: preferential expression in the epidermis. *Plant Physiology*, 157: 790-803.
- Livak KJ and Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402-408.
- Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia E, Stanca AM and Cattivelli L, 2004. HvWRKY38: a new transcription factor involved in cold and drought-response in barley. *Plant Molecular Biology*, 55: 399-416.
- Morall RA, Duzek LJ, Me Kenzie DL and McGee DC, 1976. Some aspects *Sclerotinia sclerotiorum* in Saskatchewan. 1970-75. *Canadian Plant Disease Survey*, 56: 56.
- Murphy DJ, 1994. *Designer Oil Crops: Breeding, processing and Biotechnology*. VCH Weinheies New York.
- Purday LH, 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*. History, diseases and symptomatology. *Phytopathology*, 69: 875-880.
- Schneiter AA and Miller JF, 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, 21: 901-903.
- Shah DA and Madden LV, 2004. Nonparametric analysis of ordinal data in designed factorial experiments. *Phytopathology*, 94: 33-43.
- Willetter HJ and Wong JAL, 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Bot Rev*, 46: 101-165.

- Wu J, Zhao Q, Yang Q, Liu H, Li Q, Yi X, Cheng Y, Guo L, Fan C and Zhou Y, 2016. Comparative transcriptomic analysis uncovers the complex genetic network for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Scientific Reports*, 6: 19007.
- Yamaguchi Shinazaki K and Shinozaki K, 2005. Organization of cisacting regulatory elements in osmotic and cold-stress responsive promoters. *Trends in Plant Science*, 10: 88-94.
- Zhang Y, Lubberstedt T and Xu M, 2013. The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. *Journal of Genetics and Genomics*, 40: 23e35.
- Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J and 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.

Study on differential expression of HaRIC.B gene and MYB-related transcription factor in sunflower-Sclerotinia pathosystem

N Boroukanlou Madlou¹, R Hosseini² and R Darvishzadeh^{3*}

¹Former MSc Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

²Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

³Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

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

Received: 18 October 2019

Accepted: 9 February 2020

:

Abstract

Basal stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* is considered the most important fungal disease of sunflower in Iran. Application of resistant genotypes is one of economic strategies for the disease management. Recently, in association mapping for resistance to sclerotinia rot disease in sunflower, a significant relationship has been observed between the lower Sclerotinia-induced necrosis and HaRIC_B gene expression. On the other hand, expression of defense genes is highly regulated by transcription factors. In this study, using real time PCR technique, the expression level of HaRIC_B gene and MYB-related transcription factor were studied in partial resistant (LC1064C/ 8*A) and susceptible (SDR19) lines of sunflower inoculated with the *S. sclerotiorum* isolate A37. In studying the expression pattern of HaRIC_B gene in two lines, it was seen that the expression pattern in the LC1064C/8*A line was increased regularly from one sampling time to another and the expression rate at any time was more in LC1064C/8*A line than SDR19. Comparison of HaRIC_B gene expression and MYB-related transcription factor revealed a reasonable relationship between the expression level of both genes, especially in the LC1064C/8*A line. This finding highlight the possible major role of MYB-related transcription factor in stimulating HaRIC_B gene expression and consequently inducing resistance to Sclerotinia in sunflower which, of course, needs further investigation. By confirming the resistance of the LC1064C/8*A line to Sclerotinia at the molecular level, this line could potentially be used in the production of resistant hybrid cultivars in conventional plant breeding programs.

Keywords: Gene expression, Oily sunflower, Partial resistance, Quantitative PCR, Transcription factors.