

## بررسی بیان نسبی برخی از ژن‌های مسیر تنفس نوری در واکنش به تنش خشکی در کلزا (*Brassica napus*)

مریم پسندیده ارجمند<sup>۱\*</sup>، حبیب‌الله سمیع‌زاده لاهیجی<sup>۲</sup>، محمد محسن‌زاده گلفزانی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۱۹)

### The investigation of some photorespiration genes relative expression in response to drought stress in canola (*Brassica napus*)

Maryam Pasandideh Arjmand<sup>1\*</sup>, Habibollah Samizadeh Lahiji<sup>2</sup>, Mohammad Mohsenzadeh Golfazani<sup>3</sup>

1. M.Sc. student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Assistant Professor. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: Feb. 18, 2017 - Accepted: Jun. 9, 2017)

#### Abstract

Drought is one of the most devastating environmental stresses that adversely affect plant metabolic processes.

Many plant genes such as photorespiration ones are involve in response to drought stress. In the present study, the effects of drought stress on the expression level of two peroxisomal (Hydroxy pyruvate reductase (*HPRI*) and Glycolate oxidase (*GO*)) and two mitochondrial (Serine hydroxy methyl transferase (*SHMT*) and Glycine decarboxylase (*GDC*)) genes were studied in susceptible (*Hayola308*) and tolerant (*SLM046*) genotypes of canola (*Brassica napus*) under stress (irrigation cut at flowering stage) and non-stress conditions. The result of real time-PCR showed that in *Hayola308* genotype the expression level of *GO* gene at 48, 72 and 96 hours after stress was higher than *SLM046* genotype. In *Hayola308* genotype, the highest expression level of *GDC* gene observed at 48 hours of stress and then decreased. The highest relative expression level of *SHMT* gene in both *Hayola308* and *SLM046* genotypes detected at 24 hours after stress and then in *SLM046* genotype, its level decreased at 48 hours after stress, while in *Hayola308* genotype, its expression declined over the time of exposure to stress. *SLM046* genotype showed highest amount of *HPRI* expression level at 48 hours after stress. It seems that the expression of photorespiration genes in *SLM046* genotype increased at the initial times of exposure to stress and with continue the stress, it showed more adaptation to stress and control the photorespiration unlike *Hayola308*.

**Keywords:** Drought stress, *GDC*, *GO*, *HPRI*, Investigation of genes expression.

#### چکیده

خشکی یکی از مخرب‌ترین تنش‌های محیطی مؤثر بر فرآیندهای متابولیکی گیاه است. در تنش خشکی ژن‌های بسیاری از جمله ژن‌های مسیر تنفس نوری در گیاهان متأثر می‌شوند. در این مطالعه تأثیر تنش خشکی بر بیان نسبی ژن‌های پراکسی‌زومی (*GO Glycolate*) oxidase و *HPRI* (*Hydroxy pyruvate reductase*) و ژن‌های میتوکندریایی (*GDC*) (*Glycine decarboxylase*) و *SHMT* (*Serine hydroxy methyl transferase*) و متحمل (*Hayola308*) و متحمل (*SLM046*) کلزا (*Brassica napus*) در شرایط تنش (قطع آبیاری قبل از مرحله گلدهی) و بدون تنش بررسی شد. نتایج حاصل از time-PCR نشان داد میزان بیان نسبی ژن *GO* در ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تنش در ژنوتیپ *Hayola308* بیش‌تر از ژنوتیپ *SLM046* بود. بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *GDC* در ژنوتیپ *Hayola308* در ۴۸ ساعت پس از تنش مشاهده شد و با افزایش زمان تنش کاهش یافت. بیان نسبی ژن *SHMT* در ۲۴ ساعت پس از تنش در هر دو ژنوتیپ *Hayola308* و *SLM046* در بیش‌ترین حد خود بود و با افزایش زمان تنش در ژنوتیپ *SLM046* به‌طور ناگهانی و در ژنوتیپ *Hayola308* به‌طور تدریجی کاهش یافت. بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *HPRI* در ۲۴ ساعت پس از تنش در ژنوتیپ *SLM046* بود و سپس در ۴۸ ساعت پس از تنش به شدت کاهش یافت. به نظر می‌رسد در ساعات ابتدایی تنش، تنفس نوری در ژنوتیپ *SLM046* افزایش یافته بود و با تداوم تنش، بر خلاف ژنوتیپ *Hayola308* نسبت به شرایط موجود سازگاری یافته و تنفس نوری را مهار کرده است.

**واژه‌های کلیدی:** تنش خشکی، *GDC*، *GO*، *HPRI* بررسی بیان ژن

### مقدمه

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که هر ساله تولید بسیاری از محصولات زراعی را به طور نامطلوبی تحت تأثیر قرار می‌دهد (Parry *et al.*, 2002). با وجود این‌که کلزا (*Brassica napus*) از گیاهان روغنی بسیار مهم در جهان است، اطلاعات کمی از مکانیسم تحمل خشکی و سازگاری ژنتیکی آن وجود دارد (Fletcher *et al.*, 2016). تنش خشکی سبب ایجاد مجموعه‌ای از پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان می‌شود و اثرات زیادی بر فرآیندهای متابولیکی شامل ممانعت از رشد و فتوسنتز، فعال شدن تنفس نوری، تنظیم اسمزی، تغییر در بیان ژن و متابولیسم، تنظیم بسته‌شدن روزنه‌ها دارد و در نهایت می‌تواند منجر به کاهش عملکرد گیاهان شود. پاسخ گیاهان می‌تواند در سطح سلولی یا مولکولی به صورت تجمع اسمولیت‌ها یا پروتئین‌های خاص در جهت القا یا سرکوب بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها باشد (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). رشد و فتوسنتز گیاهان، تحت شرایط محیطی مختلف از جمله تنش خشکی قرار می‌گیرد. توانایی رشد، نمو و فتوسنتز در تنش‌های محیطی به پتانسیل ژنتیکی گیاه وابسته است که به صورت پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی خود را نشان می‌دهد. تنش آب می‌تواند به طور مستقیم از طریق تأثیر در فرآیندهای مختلف بیوشیمیایی در فتوسنتز و به طور غیرمستقیم از طریق کاهش جذب  $\text{CO}_2$  ناشی از بستن روزنه‌ها، بر فتوسنتز اثر بگذارد (Abbaspour & Rezaei, 2014). تحت تنش خشکی ژن‌های بسیاری در گیاهان القاء می‌شود. تصور بر این است که تولیدات حاصل از این ژن‌ها در تحمل به تنش، تنظیم بیان ژن، علامت‌دهی و پاسخ به تنش نقش دارد (Ito *et al.*, 2006). تأثیر تنش بر گیاه در زمان‌های مختلف متفاوت است، به طوری که ژن‌های بیان‌شده در مراحل ابتدایی تنش با ژن‌هایی

که در اثر تداوم تنش بیان می‌شوند کم و بیش متفاوت هستند (Talame *et al.*, 2007). تولید موضعی رادیکال‌های آزاد نقش حیاتی در هدایت پیام در سلول‌ها دارد. هدایت پیام توسط رادیکال‌های آزاد از طریق کنترل تولید و مهار آن صورت می‌گیرد (Serres & Mittler, 2006). بسته شدن روزنه‌ها در خشکی سبب کاهش از دست دادن آب و همچنین کاهش جذب  $\text{CO}_2$  می‌شود. کاهش ظرفیت فتوسنتزی در مواجهه با تنش خشکی را به آنزیم روبیسکو نسبت می‌دهند. بررسی گیاهان تراریخته که دارای آنزیم روبیسکو کم‌تری نسبت به سایرین بودند، نشان داد در شرایط تنش خشکی مقدار و فعالیت آنزیم روبیسکو تغییر می‌کند اما عامل اصلی ایجاد محدودیت در فتوسنتز نیست (Parry *et al.*, 2002). با اتصال  $\text{O}_2$  به روبیسکو، یک مولکول  $\text{C}_3$ -فسفوگلیسرات و همچنین یک مولکول  $\text{C}_2$ -فسفوگلیکولات به عنوان پیش ماده اولیه تنفس نوری تولید شده و پس از دست دادن فسفات به گلیکولات تبدیل می‌شود (Tolbert, 1997; Maier *et al.*, 2012). گلیکولات تولید شده می‌تواند وارد پراکسی‌زوم شده و در آن‌جا توسط آنزیم GO (Glycolate oxidase) موجود در پراکسی‌زوم با گرفتن اکسیژن به گلی‌اکسیلات تبدیل شود. پراکسید هیدروژن ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) به عنوان محصول جانبی در نتیجه فعالیت این آنزیم تولید می‌شود. گلی‌اکسیلات توسط GGAT (Glutamate-glyoxylate aminotransferase) به گلایسین تبدیل می‌شود. گلایسین پس از ورود به میتوکندری می‌تواند توسط آنزیم SHMT (Serine hydroxy methyl transferase) به سرین تبدیل شده و دوباره وارد پراکسی‌زوم شود و یا اینکه گلایسین توسط آنزیم GDC (Glycine decarboxylase) سبب تولید  $\text{NH}_4^+$  و  $\text{CO}_2$  شود (Maier *et al.*, 2012). آنزیم GDC یک کمپلکس پروتئینی متشکل از چهار پروتئین است و نقش مهمی در تولید  $\text{CO}_2$  تنفس

می‌کند. ایجاد جهش در ژن *SHMT* آراییدوپسیس سبب حساسیت گیاه به تنش‌های محیطی شد. در واقع کاهش فعالیت آنزیم *SHMT* سبب به خطر افتادن متابولیسم‌های سلولی در طول تنش اکسیداتیو و در نتیجه کاهش توانایی گیاه برای مقابله با تنش می‌شود (Kido *et al.*, 2012). بررسی تنفس نوری در ژنوتیپ وحشی و موتانت هتروزیگوت جو نشان داد که القای تنش خشکی سبب کاهش بیان *GDC* می‌شود (Wingler *et al.*, 1999). تعیین الگوی بیان ژن *HPR* در آراییدوپسیس نشان داد که بیشترین میزان بیان این ژن در بخش‌های فستوتزکننده به ویژه ساقه و برگ وجود دارد (Schmid *et al.*, 2005). ایزوفرم *HPR* در سیتوزول نیز سبب تبدیل هیدروکسی‌پیروات به گلیسرات می‌شود (Timm *et al.*, 2012a). این نشان‌دهنده گسترش تنفس نوری در سیتوزول است (Jamali *et al.*, 2009). در شرایط فعلی که کمبود آب آبیاری وجود دارد، اطلاع از واکنش گیاهان و تعیین میزان حساسیت مراحل مختلف رشد به کم‌آبی از اهمیت بسزایی برخوردار است (Pirzad *et al.*, 2015). تحمل خشکی و سازگاری با آن ارتباط زیادی با پتانسیل ژنتیکی و وراثت دارد (Fletcher *et al.*, 2016). درک بهتر از نحوه پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی به منظور بهبود تحمل گیاهان حائز اهمیت است (Nakabayashi *et al.*, 2014). با توجه به مسأله کمبود آب در ایران و اهمیت کشت کلزا به عنوان گیاه روغنی، در پژوهش حاضر اثر خشکی بر بیان نسبی برخی ژن‌های میتوکندریایی و پراکسی‌زومی دخیل در تنفس نوری ژنوتیپ حساس و متحمل گیاه کلزا مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

به منظور جوانه‌دار کردن بذره‌های دو ژنوتیپ حساس (Hayola308) و متحمل (SLM046) (Mirzaee *et al.*, 2013) گیاه کلزا (*Brassica napus*)، ۵۵

نوری ایفا می‌کند (Timm *et al.*, 2012b). پس از انتقال گلابسین به میتوکندری، آمونیاک آزاد شده در ماتریکس میتوکندری می‌تواند به کلروپلاست انتشار یابد و در آن‌جا توسط GS (Glutamine synthetase) با مصرف ATP، سبب تبدیل Glu (Glutamate) به Gln (Glutamine) شود. پیروات موجود در پراکسی‌زوم توسط آنزیم HPR1 (Hydroxy pyruvate reductase) با مصرف NADH به گلیسرات تبدیل می‌شود. گلیسرات می‌تواند وارد کلروپلاست شده و در چرخه تنفس مورد استفاده قرار گیرد (Leegood *et al.*, 1995). مطالعه بیان ژن GO در چهار لاین مختلف برنج نشان داد که افزایش بیان این ژن به میزان ۶۰ تا ۱۰۰ درصد سبب بهبود فتوسنتز و افزایش رشد می‌شود. در حالی‌که افزایش بیش‌تر بیان این ژن به میزان ۱۵۰ تا ۲۱۰ درصد سبب کاهش رشد می‌شود. در واقع GO، آنزیم کلیدی در تنفس نوری گیاهان است و نقش مهمی برای مقابله با نور و درجه حرارت بالا ایفا می‌کند (Cui *et al.*, 2016). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که القای تنش خشکی سبب افزایش نابرابر فعالیت آنزیم GO در ژنوتیپ‌های متفاوت می‌شود. در آزمایش انجام شده در دو ژنوتیپ ژوت سفید (حساس) و توساژوت (متحمل) مشاهده شد که خشکی سبب افزایش بیش‌تر GO در توساژوت می‌شود (Chowdhury & Choudhuri, 1985). اعمال تنش‌های زنده و غیرزنده بر گیاه آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) نشان داد که فعالیت آنزیم *SHMT* نقش بسیار مهمی در کنترل خسارت‌های ایجادشده توسط تنش‌های محیطی مانند شوری، پاتوژن و یا نور بیش از حد ایفا می‌کند (Moreno *et al.*, 2005). نتایج مشابهی در ارتباط با افزایش میزان آنزیم *SHMT* در گیاه آراییدوپسیس تحت تنش شوری و خشکی به‌دست آمده است (Kim *et al.*, 2007). ژن *SHMT* نقش مؤثری در ایجاد مقاومت در تنش‌های زنده و غیرزنده ایفا

بافر و آنزیم DNase به RNA استخراج شده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR قرار داده شد. سپس مقدار ۲ میکرولیتر EDTA به آن اضافه گردید و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR قرار داده شد. بررسی کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز افقی با عکس‌برداری از ژل توسط دستگاه ژل داگ (BIORAD) تحت نور UV انجام شد و کیفیت RNA مورد نظر جهت ساخت cDNA مورد تأیید قرار گرفت. نمونه‌های با غلظت بیش از ۹۰ ng/μl برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های فاقد کیفیت و کمیت مناسب، مجدداً استخراج شدند. جهت یکسان کردن غلظت‌های RNA استخراج شده برای سنتز cDNA از غلظت یکسان ۵۰۰ نانوگرم برای تمامی نمونه‌ها از طریق معادله (۱) استفاده شد. که در آن N1 غلظت cDNA تعیین شده براساس نانوگرم بر میکرولیتر توسط دستگاه نانودراپ، N2 غلظت cDNA مورد نیاز جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، V1 حجم محلول پایه مورد نیاز و V2 حجم نهایی محلول می‌باشد.

$$N_1 V_1 = N_2 V_2 \quad (1)$$

مراحل سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل کیت سنتز cDNA شرکت یکتاتجهیز آزما (YT4500) و با استفاده از آنزیم M-Reverse Transcriptase MLV انجام شد. بررسی وجود آلودگی در cDNA سنتز شده توسط یک واکنش کنترل منفی که شامل همه مواد مورد نیاز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به غیر از cDNA بود، انجام شد. به منظور بررسی کیفیت cDNA سنتز شده، مقدار ۸ میکرو از محصول PCR بر روی cDNA و ۲ میکرو محلول رنگی دای و همچنین لدر سیناژن (SL7021(PR901633)) درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شد. مشاهده باندهای ایجاد شده در ژل توسط دستگاه ژل داگ (BIORAD) انجام شد.

عدد بذر در پتری‌دیش استریل همراه با کاغذ صافی مرطوب به مدت ۹۶ ساعت در اتاقک کشت آزمایشگاه و با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تعداد ۵ عدد از بذرهای جوانه دار سالم دارای ریشه‌چه و ساقه‌چه در هر گلدان، با قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر حاوی خاک پیت‌ماس و خاک معمولی مزرعه استریل به نسبت ۱:۱ با ۳ تکرار کشت شدند. گلدان‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۶۵۵۰ لوکس منتقل و در اتاقک رشد آزمایشگاه قرار داده شدند (Navabpour, 2013). آبیاری گلدان‌ها به طور منظم انجام شد. با توجه به اینکه تأثیر تنش بر گیاه در زمان‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد و در شرایط طبیعی بیش‌ترین وقوع تنش در زمان گلدهی می‌باشد، لذا به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر میزان بیان نسبی برخی از ژن‌های مسیر تنفس نوری، آبیاری گلدان‌ها در مرحله قبل از گلدهی قطع شد. ۷۲ ساعت پس از قطع آبیاری که کلیه گلدان‌ها آب خود را از دست داده بودند به عنوان زمان شروع تنش در نظر گرفته شد. نمونه برداری از برگ گیاهان در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از زمان شروع تنش، انجام شد. نمونه‌های شاهد در این مدت به طور کامل و منظم آبیاری شدند. بررسی گیاهان در دو سطح تنش خشکی (قطع آبیاری) و شاهد (آبیاری کامل و منظم) انجام شد. برگ‌های سالم، سبز و کاملاً توسعه یافته گیاه تحت تنش خشکی و کاملاً آبیاری شده کلزا، توسط تیغ تیز برش داده شد و در ورقه‌های آلومینیومی با ضخامت متوسط قرار داده شد. نمونه‌های برگ‌گی پس از قرارگرفتن در ازت مایع، به فریزر ۸۰- منتقل و در آن‌جا تا زمان استخراج نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت ستون‌دار دنازیست (S-1010) و مطابق با دستورالعمل مربوطه انجام شد. جهت حذف DNA باقی‌مانده در RNA استخراج شده، پس از اضافه کردن مقدار ۲ میکرولیتر

باند‌های ایجاد شده در بخش حدوداً ۱۵۰bp نشان دهنده توالی تکثیر شده مورد نظر توسط آغازگرهای ژن اکتین بود. باند‌های ایجاد شده در بخش ۵۰bp نشان‌دهنده وجود آلودگی در cDNA سنتز شده بود. به منظور مطالعه میزان بیان نسبی ژن‌های پراکسی‌زومی *GO Glycolate oxidase* (GO) و *HPRI Hydroxy pyruvate reductase* (HPRI) ژن‌های میتوکندریایی *GDC Glycine decarboxylase* (GDC) و *SHMT Serine hydroxy* (SHMT) و

باند‌های ایجاد شده در بخش حدوداً ۱۵۰bp نشان دهنده توالی تکثیر شده مورد نظر توسط آغازگرهای ژن اکتین بود. باند‌های ایجاد شده در بخش ۵۰bp نشان‌دهنده وجود آلودگی در cDNA سنتز شده بود. به منظور مطالعه میزان بیان نسبی ژن‌های پراکسی‌زومی *GO Glycolate oxidase* (GO) و *HPRI Hydroxy pyruvate reductase* (HPRI) ژن‌های میتوکندریایی *GDC Glycine decarboxylase* (GDC) و *SHMT Serine hydroxy* (SHMT) و

جدول ۱. اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی بیان ژن‌ها در واکنش Real time-PCR

Gene	Primer sequence	Melting Tem (°C)	PCR production length	NCBI accession number
Actin-F	TCCCGAGTATTGTTGGTCGT	54	157	AF111812
Actin-R	TCCATGTCATCCCAGTTGCT			
GO-F	AGCCACTATCTCAGCCCTTG	61	170	AY762614.1
GO-R	CTCCTTCAGCAGCAAGTGAG			
GDC-F	AGGCGGAGTTAGACAGGTTC	58.4	152	XM_009126871.1
GDC-R	CGGCTTCTCCATGTGTCTG			
SHMT-F	AGATCTCGTGTCACTTGCC	58.4	160	XM_013830099.1
SHMT-R	CAACAGCTTGCATCACCGAG			
HPRI-F	TGTTGACTGAGACTACGGCC	58.4	167	XM_009106821.1
HPRI-R	AGCTCCAATCACTCCACAG			

نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود. به دلیل ثبات بروز ژن رفرنس اکتین در تحقیقات مختلف بر کلازا، به منظور نرمال‌سازی بیان ژن‌های هدف از ژن اکتین استفاده شد (Yang *et al.*, 2007; Marmagne *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Aliakbari & Razi, 2013). با توجه به این که در این مطالعه تعداد مطلق کپی ژن‌ها موردنظر نبود، برای کمی‌سازی بیان نسبی ژن‌های موردنظر و نرمال‌سازی داده‌ها در فرایند Real time-PCR از معادله (۲) استفاده شد (Livak & Schmittgen, 2001). استفاده از معادله لیواک یک روش ساده به منظور تحلیل میزان نسبی بیان ژن‌های موردنظر در Real time-PCR می‌باشد (Dorak, 2007).

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{treated}} - \Delta CT_{\text{untreated}} \quad (2)$$

$$\Delta CT = C_t \text{ target gene} - C_t \text{ reference gene}$$

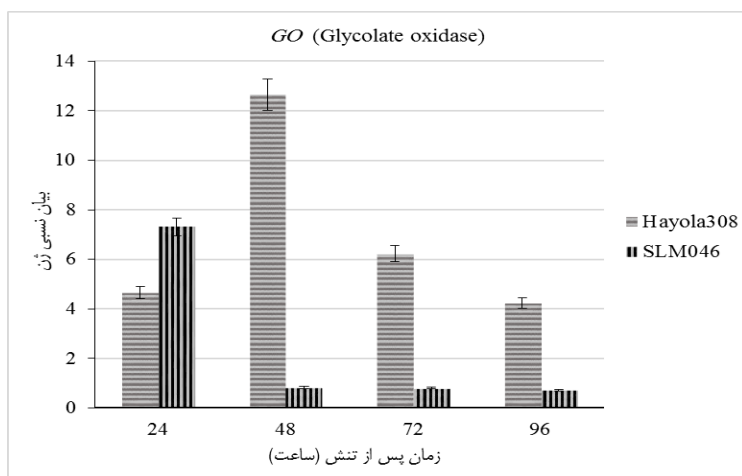
واکنش PCR Real Time- با استفاده از دستگاه واکنش Bio-Rad (CFX Manager™) و در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. در این آزمایش از مستر Real Time-PCR (Syber green Master mix) استفاده شد. مواد مورد نیاز برای هر نمونه در سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی به طور جداگانه اضافه گردید. برای بررسی هر ژن یک کنترل منفی حاوی همه مواد مورد نیاز واکنش Real time-PCR به غیر از cDNA به منظور کنترل صحت تکثیر ژن اختصاصی موردنظر، مورد استفاده قرار گرفت. چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۹ سیکل واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، پس از آن اتصال آغازگر بر اساس دمای اتصال به مدت ۲۰ ثانیه، سپس مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و در نهایت

مقدار CT نمونه‌های کالیبره‌کننده و نمونه‌های موردنظر از یکدیگر کسر و نمودارها در نرم‌افزار اکسل (۲۰۱۶) رسم شد. برای مقایسه ستون‌ها از Standard error استفاده گردید. سطح معنی‌داری بیولوژیکی، میزان بیان نسبی دو برابر در نظر گرفته شد.

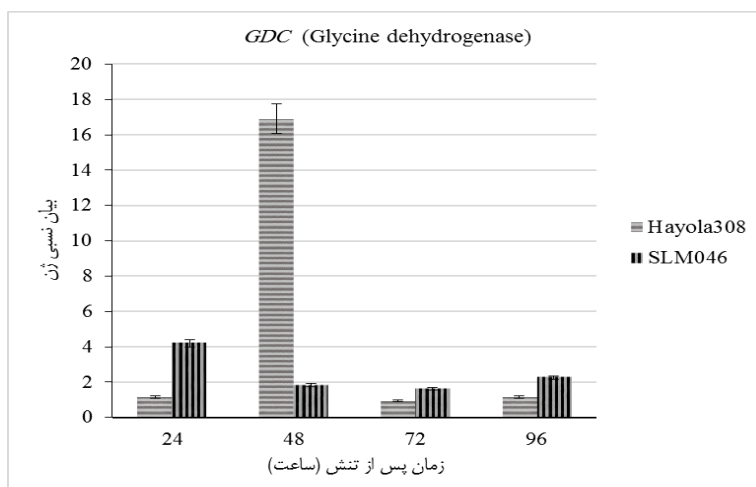
## نتایج و بحث

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *GO* در Hayola308 در ۴۸ ساعت پس از تنش بود. همچنین میزان بیان نسبی ژن *GO* در SLM046 در ۲۴ ساعت پس از تنش در بیش‌ترین حد خود بود. سپس با افزایش زمان تنش به طور ناگهانی کاهش پیدا کرد و در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تنش تقریباً نزدیک به هم بود. اختلاف معنی‌داری از نظر بیان نسبی ژن *GO* در ژنوتیپ Hayola308 و SLM046 در ۲۴ ساعت پس از تنش مشاهده نشد. اما میزان بیان نسبی این ژن در ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تنش، در Hayola308 بیش‌تر از SLM046 بود. نتایج مطالعات نشان می‌دهد بیان ژن *GO* با القای تنش گرما و خشکی افزایش می‌یابد (Corpas et al., 2001). همچنین بررسی فعالیت آنزیمی در گیاه توتون نشان داده است که تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم *GO* می‌شود (Rizhsky et al., 2002). افزایش فعالیت این آنزیم در شرایط تنش خشکی با تولید پراکسید هیدروژن به عنوان محصول جانبی همراه است (Tolbert, 1997). به طور کلی بیش‌ترین اختلاف در میزان بیان این ژن در گیاه Hayola308 و SLM046 در ۴۸ ساعت پس از شروع تنش مشاهده شد. چنان‌چه در شکل ۲ مشاهده می‌شود، بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *GDC* در Hayola308 در ۴۸ ساعت پس از تنش مشاهده گردید. میزان بیان *GDC* در Hayola308 در ۴۸ ساعت پس از تنش بسیار بیش‌تر از SLM046 بوده است. در Hayola308 میزان بیان

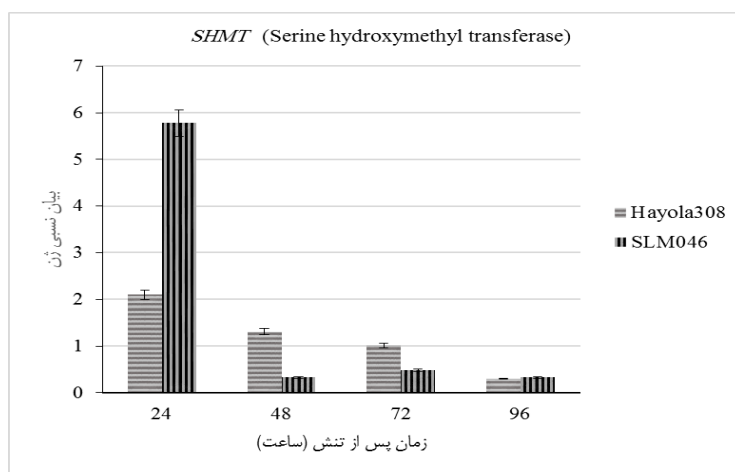
این ژن در ۲۴ ساعت پس از تنش کم بوده اما در ۴۸ ساعت پس از تنش به طور ناگهانی افزایش یافته است و سپس با افزایش زمان تنش کاهش یافته است. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد اصلی‌ترین عامل تولید کننده  $CO_2$  در تنفس نوری کمپلکس پروتئینی GDC موجود در میتوکندری است (Timm et al., 2012b). بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *GDC* در SLM046 در ۲۴ ساعت پس از تنش مشاهده شد و با افزایش زمان تنش میزان بیان این ژن کاهش یافت (شکل ۲). با توجه به الگوی بیان ژن *SHMT* (شکل ۳)، بیش‌ترین میزان بیان نسبی این ژن در SLM046 در ۲۴ ساعت پس از تنش بود. با افزایش زمان تنش، بیان نسبی این ژن به طور ناگهانی کاهش یافت. همچنین میزان بیان نسبی ژن *SHMT* در Hayola308 در ۲۴ ساعت پس از تنش در بیش‌ترین حد خود بود که با افزایش زمان تنش به‌طور تدریجی کاهش یافت. به‌طور کلی در ۲۴ ساعت پس از تنش خشکی، بیان نسبی ژن *SHMT* در هر دو ژنوتیپ Hayola308 و SLM046 در بیش‌ترین حد خود بود. نتایج مطالعات بر روی ژن *SHMT* نشان می‌دهد القای تنش خشکی سبب افزایش میزان بیان نسبی این ژن می‌شود. همچنین جهش در ژن کدکننده این آنزیم سبب کاهش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی شده است (Moreno et al., 2005). همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *HPR1* در ۲۴ ساعت پس از تنش در SLM046 بود. با افزایش زمان تنش خشکی به ۴۸ ساعت، میزان بیان نسبی این ژن به شدت کاهش یافت ولی در ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تنش میزان بیان نسبی این ژن افزایش یافت. بیان نسبی ژن *HPR1* در ۷۲ ساعت پس از تنش در Hayola308 کاهش یافت و سپس در ۹۶ ساعت پس از تنش افزایش یافت. بررسی‌ها نشان می‌دهد آنزیم *HPR1* با تبدیل هیدروکسی پیرووات به گلیسرات نقش مهمی در مسیر تنفس نوری ایفا می‌کند (Maier et al., 2012).



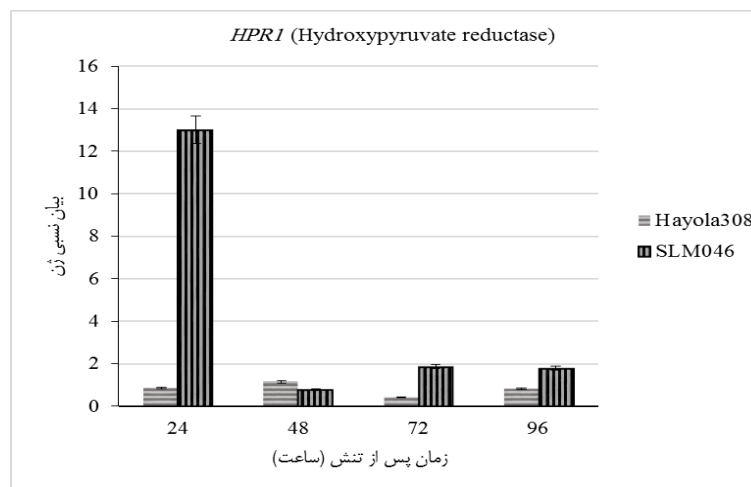
شکل ۱. الگوی بیان ژن *GO* پراکسی‌زومی در دو ژنوتیپ حساس و متحمل کلزا با روش Real time-PCR در خشکی



شکل ۲. الگوی بیان ژن *GDC* میتوکندری در دو ژنوتیپ حساس و متحمل کلزا با روش Real time-PCR در خشکی



شکل ۳. الگوی بیان ژن *SHMT* میتوکندری در دو ژنوتیپ حساس و متحمل کلزا با روش Real time-PCR در خشکی



شکل ۴- الگوی بیان ژن *HPR1* پراکسی‌زومی در دو ژنوتیپ حساس و متحمل کلزا با روش Real time-PCR در خشکی

می‌تواند سبب خسارت به پروتئین، DNA و لیپید شود (Cui *et al.*, 2016). احتمالاً با فعال شدن تنفس نوری در Hayola308 و انتقال گلیکولات به پراکسی‌زوم، میزان بیان نسبی ژن *GO* افزایش یافته است تا سبب هدایت مسیر تنفس نوری به سمت تولید گلی‌اکسیلات شود. بیان ژن *GO* در SLM046 در ۲۴ ساعت پس از تنش خشکی، بیش‌تر از سایر زمان‌ها در این ژنوتیپ بود. با افزایش زمان تنش خشکی، میزان بیان نسبی این ژن در گیاه متحمل کاهش یافت و سپس تقریباً ثابت باقی ماند. احتمالاً ژنوتیپ SLM046 با افزایش زمان تنش، نسبت به شرایط موجود سازگاری بهتری داشته و تنفس نوری را مهار کرده است. بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن *GDC* و *GO* در ۴۸ ساعت پس از تنش در گیاه حساس مشاهده شد. احتمالاً افزایش بیان ژن *GO* و *GDC* در این زمان مرتبط باهم می‌باشد. افزایش بیان ژن *GO* و *GDC* در گیاه حساس در ۴۸ ساعت پس از تنش خشکی به طور همزمان، ممکن است نشان‌دهنده هدایت مسیر تنفس نوری به سمت تولید گلایسین و انتقال آن به میتوکندری باشد. احتمالاً بیان ژن *GO* در این زمان افزایش یافته است تا گلیکولات انباشته شده ناشی از تنفس نوری را به گلی‌اکسیلات تبدیل کند و پس از آن

بسته شدن روزنه‌ها و کاهش دریافت  $CO_2$  در تنش خشکی می‌تواند سبب کاهش فتوسنتز و در نتیجه افزایش تنفس نوری شود (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). فعال شدن تنفس نوری همراه با تولید گلیکولات و انتقال آن به پراکسی‌زوم می‌باشد (Maier *et al.*, 2012). افزایش میزان بیان نسبی ژن *GO* در گیاه حساس (Hayola308) نسبت به گیاه متحمل (SLM046) در ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تنش خشکی، احتمالاً نشان‌دهنده فعال شدن بیش‌تر مسیر تنفس نوری در Hayola308 نسبت به SLM046 است. زیرا *GO* آنزیم کلیدی در تنفس نوری گیاهان است که با افزایش تنفس نوری میزان بیان ژن *GO* نیز افزایش می‌یابد. در خشکی، با افزایش تنفس نوری، میزان فعالیت آنزیم *GO* زیاد شده و سبب افزایش تولید  $H_2O_2$  می‌شود (Mittler & Zilinskas, 1994). با توجه به اینکه محصول جانبی فعالیت آنزیم *GO*، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) است، افزایش بیان نسبی این ژن در Hayola308 ممکن است سبب ایجاد آسیب در سلول گیاهی شود. با وجود اینکه  $H_2O_2$  تولید شده می‌تواند به عنوان مولکول علامت‌دهی در مسیر پاسخ و واکنش گیاه به خشکی مفید واقع شود، اما افزایش بیش از حد این نوع از رادیکال آزاد



مانند ژن *GO* و *GDC* در *SLM046* در حد ثابتی نگه داشته شده است. سرین پس از ورود به پراکسی‌زوم، توسط یک آمینوترانسفراز به هیدروکسی پیرووات تبدیل می‌شود. پس از آن آنزیم *HPR1* سبب تبدیل هیدروکسی پیرووات به گلیسرات می‌شود (Tolbert, 1997; Maier *et al.*, 2012). بنابراین احتمالاً افزایش بیان *SHMT* و *HPR1* در ۲۴ ساعت پس از تنش خشکی در *SLM046* همسو با یکدیگر بوده و در نهایت سبب تولید گلیسرات می‌شود. به دلیل اینکه گلیسرات کیناز در کلروپلاست وجود دارد انتظار می‌رود که گلیسرات با ورود به کلروپلاست، به کمک آنزیم گلیسرات کیناز و هیدرولیز مولکول *ATP* به *ADP* تبدیل به فسفولیگلیسرات شود. این مولکول می‌تواند وارد چرخه کالوین شده و به مولکول‌های قندی تبدیل شود (Tolbert, 1997; Maier *et al.*, 2012). بنابراین ممکن است افزایش بیان ژن *HPR1* در ۲۴ ساعت پس از تنش خشکی در گیاه متحمل سبب تولید گلیسرات شده باشد که پس از آن وارد چرخه کالوین شده و سبب تولید مولکول‌های قندی شود. شاید یکی از دلایل متحمل بودن ژنوتیپ *SLM046* به خشکی، افزایش بیان ژن *SHMT* و *HPR1* در ۲۴ ساعت پس از تنش است که در نهایت سبب تولید گلیسرات و انتقال به کلروپلاست و سپس ورود به چرخه کالوین به منظور تولید مولکول‌های قندی می‌شود. ممکن است بیش‌تر بودن میزان بیان نسبی ژن *GO* در ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تنش در *Hayola308* نسبت به *SLM046* و همچنین افزایش همزمان میزان بیان نسبی ژن *GO* و *GDC* در ۴۸ ساعت پس از تنش در *Hayola308* با هم مرتبط بوده و یکی از عوامل مؤثر در حساسیت ژنوتیپ *Hayola308* به خشکی باشد. افزایش بیان ژن *SHMT* در ۲۴ ساعت پس از تنش در *Hayola308* و *SLM046* احتمالاً بیانگر هدایت مسیر تنفس نوری به سمت تولید سرین در ساعات ابتدایی تنش است. ممکن

گلیسین تولیدشده از گلی اسیلات وارد میتوکندری شده و ژن *GDC* سبب تبدیل گلیسین به آمونیاک و  $CO_2$  شود. بررسی بیان ژن *GDC* در ارقام موتانت و وحشی جو تحت تنش خشکی نشان داد که جهش در این ژن سبب تجمع گلیسین و اختلال در مسیر تنفس نوری می‌شود (Wingler *et al.*, 1999). با این وجود یکی از معایب تنفس نوری که توسط اوگرن اشاره شده است (Ogren, 1984)، از دست دادن یک  $CO_2$  بر اثر فعالیت آنزیم *GDC* در میتوکندری است. ممکن است یکی از دلایل حساسیت ژنوتیپ *Hayola308* به خشکی هدایت مسیر تنفس نوری به سمت تولید  $CO_2$  و آمونیاک در این زمان باشد. بیان ژن *GDC* در ۲۴ ساعت پس از تنش در *SLM046* بیش‌تر از سایر زمان‌ها در این ژنوتیپ بود ولی با افزایش زمان تنش میزان بیان نسبی این ژن کاهش یافت. احتمالاً کاهش بیان این ژن سبب کاهش هدررفت  $CO_2$  در *SLM046* شده است. بیان نسبی ژن *SHMT* در ۲۴ ساعت پس از تنش در هر دو ژنوتیپ بیش‌تر از سایر زمان‌ها بود. احتمالاً افزایش بیان ژن *SHMT* در ساعات ابتدایی تنش نشان‌دهنده هدایت مسیر تنفس نوری به سمت تولید سرین بوده است. از آنجایی که فعالیت آنزیم *SHMT* مستقل از فعالیت آنزیم *GDC* نیست (Maier *et al.*, 2012)، احتمالاً افزایش بیان نسبی ژن *SHMT* مستقل از بیان ژن *GDC* نیست. کاهش بیان نسبی ژن *SHMT* در *Hayola308* با افزایش زمان تنش ممکن است بیانگر تأثیر بیش‌تر تداوم تنش خشکی بر *Hayola308* نسبت به *SLM046* باشد. زیرا اختلاف معنی‌داری از نظر بیان این ژن در تمامی زمان‌ها وجود دارد. در واقع بیان این ژن در *Hayola308* در هر زمان متفاوت از زمان دیگر بوده است. بالعکس بیان ژن *SHMT* در *SLM046* در ۴۸ ساعت پس از تنش به شدت کاهش یافت و سپس تغییر معنی‌داری نداشته است. احتمالاً با افزایش زمان تنش میزان بیان ژن *SHMT*

از چرخه تنفس نوری به‌ویژه در شرایط تنش خشکی است. افزایش بیان نسبی ژن *GO* در گیاه حساس (Hayola308) نسبت به گیاه متحمل (SLM046)، احتمالاً نشان‌دهنده فعال شدن بیش‌تر مسیر تنفس نوری Hayola308 نسبت به SLM046 است. افزایش بیان ژن *GO* در Hayola308 ممکن است با حساسیت این ژنوتیپ نسبت به خشکی مرتبط باشد. با توجه به اینکه در ۴۸ ساعت پس از تنش، میزان بیان نسبی ژن‌های *GO* و *GDC* در گیاه حساس در بیش‌ترین حد خود بود، احتمالاً افزایش بیان این دو ژن مرتبط باهم می‌باشد. افزایش بیان نسبی *SHMT* و *HPR1* در SLM046 در ساعات ابتدایی تنش، ممکن است مرتبط با تحمل به خشکی این ژنوتیپ باشد. با توجه به کاهش بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در SLM046 با افزایش زمان تنش، احتمالاً در ابتدا تنفس نوری در SLM046 افزایش یافته بود و با افزایش زمان تنش، برخلاف ژنوتیپ Hayola308 نسبت به شرایط موجود سازگاری یافته و تنفس نوری را مهار کرده است.

است افزایش بیان *SHMT* و *HPR1* در ۲۴ ساعت پس از تنش خشکی در گیاه متحمل همسو با یکدیگر بوده و مرتبط با تحمل به خشکی ژنوتیپ SLM046 باشد. الگوی بیان ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش نشان می‌دهد که در ۲۴ ساعت پس از تنش بیان ژن‌ها در SLM046 بیش‌تر از سایر زمان‌ها در این ژنوتیپ بود. احتمالاً در ساعات ابتدایی تنش، تنفس نوری در SLM046 افزایش یافته است. در ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از شروع زمان تنش، بیان ژن‌های *GO*، *GDC*، *SHMT* و *HPR1* در SLM046 کم بوده است. با توجه به اینکه تنفس نوری سبب مصرف انرژی بیش‌تری می‌شود (Tolbert, 1997)، احتمالاً ژنوتیپ SLM046 به دلیل دارا بودن خصوصیات برتر مرتبط با تحمل به خشکی، با مهار تنفس نوری توانسته است راندمان فتوسنتز را افزایش دهد. در نتیجه میزان بیان نسبی ژن‌های دخیل در مسیر تنفس نوری کاهش یافته است. فعالیت آنزیم‌های *GDC* و *SHMT* در میتوکندری و *GO* و *HPR1* در پراکسی‌زوم، بخش جدایی‌ناپذیر

## REFERENCES

- Abbaspour H, Rezaei H (2014) Effects of gibberellic effects of gibberellic acid on Hill reaction, photosynthetic pigment and phenolic compounds in Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) in different drought stress levels. *Plant Researches (Iranian Journal of Biology)*. 27(5): 893-903.
- Aliakbari M, Razi H (2013) Isolation of *Brassica napus* MYC2 gene and analysis of its expression in response to water deficit stress. *Molecular Biology Research Communications*. 2(3): 63-71.
- Chowdhury SR, Choudhuri MA (1985) Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute. *Physiologia Plantarum*. 65(4): 476-480.
- Corpas FJ, Barroso JB, del Rio LA (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science*. 6(4): 145-150.
- Cui LL, Lu YS, Li Y, Yang C, Peng XX (2016) Overexpression of glycolate oxidase confers improved photosynthesis under high light and high temperature in rice. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1-12
- Dorak M (2007) Real-time PCR. Taylor, Francis Group Press. 333.
- Fletcher RS, Herrmann D, Mullen JL, Li Q, Schrider DR, Price N, Lin J, Grogan K, Kern A, McKay JK (2016) Identification of polymorphisms associated with drought adaptation QTL in *Brassica napus* by resequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 6(4): 793-803.
- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K,

- Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant and Cell Physiology*. 47(1): 141-153.
- Jamali A, Salomé PA, Schilling SH, Weber AP, McClung CR (2009) Arabidopsis photo respiratory serine hydroxymethyl transferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase. *The Plant Cell*. 21(2): 595-606.
- Kido EA, Neto JRC, LO Silva R, Pandolfi V, Guimaraes ACR, Veiga DT, Chabregas SM, Crovella S, Benko-Iseppon AM (2012) New insights in the sugarcane transcriptome responding to drought stress as revealed by supersage. *The Scientific World*. 2012: 1-14.
- Kim YO, Pan S, Jung CH, Kang H, (2007) A zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein, atRZ-1a, has a negative impact on seed germination and seedling growth of *Arabidopsis thaliana* under salt or drought stress conditions. *Plant and Cell Physiology*. 48(8): 1170-1181.
- Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD, Häusler RE (1995) The regulation and control of photorespiration. *Experimental Botany*. 46: 1397-1414.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 25(4): 402-408.
- Maier A, Fahnenstich H, V Caemmerer S, Engqvist MK, Weber AP, Flüge UI, Maurino VG (2012) Transgenic introduction of a glycolate oxidative cycle into *A. thaliana* chloroplasts leads to growth improvement. *Frontiers in Plant Science*. 3(38): 1-12.
- Marmagne A, Brabant P, Thiellement H, Alix K (2010) Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids: transcriptional changes do not explain differential protein regulation. *New Phytologist*. 186(1): 216-227.
- Mirzaee M, Moieni A, Ghanati F (2013) Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Agricultural Science and Technology*. 15(3): 593-602.
- Mittler R, Zilinskas BA (1994) Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant*. 5(3): 397-405.
- Moreno JI, Martín R, Castresana C (2005) Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *The Plant*. 41(3):451-463.
- Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Michael AJ (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant*. 77(3): 367-379.
- Navabpour S (2013) Induced genes expression pattern in response to drought stress in repeseed (*Brassica napus*). *Seed and Plant Improvement*. 29(3): 535-549.
- Ogren WL (1984) Photorespiration: pathways, regulation and modification. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 35: 415-442.
- Parry MA, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany*. 89(7): 833-839.
- Pirzad A, Jalilian J, Akbari-Bavandi V (2015) Improving grain yield of mung bean (*Vigna radiata* L.) using zeolite

- under water deficit conditions. *Research in Field Crops*. 3(1): 1-13.
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*. 130(3): 1143-1151.
- Schmid M, Davison TS, Hen SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics*. 37(5): 501-506.
- Serres J, Mittler R (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*. 141 (2311):311-311.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Experimental Botany*. 58(2): 221-227.
- Talame V, Ozturk NZ, Bohnert HJ, Tuberosa R (2007) Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Experimental Botany*, 58: 229-240.
- Timm S, Mielewicz M, Florian A, Frankenbach S, Dreissen A, Hocken N, Fernie AR, Walter A, Bauwe H (2012a) High-to-low CO<sub>2</sub> acclimation reveals plasticity of the photorespiratory pathway and indicates regulatory links to cellular metabolism of *Arabidopsis*. *PLoS One*. 7(8): 1-15.
- Timm S, Florian A, Arrivault S, Stitt M, Fernie AR, Bauwe H (2012b) Glycine decarboxylase controls photosynthesis and plant growth. *Federation of European Biochemical Societies*. 586(20):3692-3697.
- Tolbert NE (1997) The C<sub>2</sub> oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1): 1-25.
- Wang N, Qian W, Suppanz I, Wei L, Mao B, Long Y, Meng J, Müller AE, Jung C (2011) Flowering time variation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) is associated with allelic variation in the FRIGIDA homologue BnaA.FRI.a. *Experimental Botany*. 62(15): 5641-5658
- Wingler A, Quick WP, Bungard RA, Bailey KJ, Lea PJ, Leegood RC (1999) The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant, Cell & Environment*. 22(4): 361-373.
- Yang B, Srivastava S, Deyholos MK, Kav NN (2007) Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus* L.) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Science*. 173(2): 156-171.