

ORIGINAL ARTICLE

Gene and regulatory network modeling of transcriptomic patterns in defense priming of rapeseed against *Sclerotinia sclerotiorum* infection

Hengameh Taheri¹ (ORCID: 0000000205918019), Mohamad Hamed Ghodoum Parizipour²

1. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

Correspondence:
Hengameh Taheri
Email: Taheri@asnrukh.ac.ir

Received: 15, Jul. 2024
Accepted: 30, Sep. 2024

ABSTRACT

Sclerotinia stem rot (SSR), caused by the soil-borne fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, adversely impacts seed quality in rapeseed (*Brassica napus*) causing a 10-20% reduction in crop yield. The biological control agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 can protect rapeseed from the deleterious effects of the hemibiotrophic fungus *S. sclerotiorum* by inducing systemic resistance. However, little is known about the molecular mechanisms underlying defense priming and its regulatory processes. In this study, we aimed to identify the protein-protein interaction (PPI) networks, with a particular focus on potential hub genes, gene ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and regulatory network analysis including hub genes promoter analysis and miRNA prediction in canola plants pre-treated by PA23 in the presence of *S. sclerotiorum* using transcriptome data. Using the computational algorithms of the CytoHubba plugin in the Cytoscape platform, nodes with the highest interactions within the gene network were identified as hub genes, which are mainly involved in the maintenance and retrieval of metabolic pathways and photosynthetic activities, controlling cellular oxidation/reduction (redox) status, biosynthesis of aromatic amino acids and plant hormones, activation of MAPK-mediated defense signals, regulation of sulfur assimilation and cysteine biosynthesis. Using clustering analysis based on the IPCA algorithm in the Cytocluster plugin, functional modules effective in defense priming against SSR infection were identified. These modules were primarily involved in the biosynthesis of aromatic amino acids and the production of defensive metabolites in the shikimate pathway. The promoter analysis of 5'UTR region of hub genes identified various cis-regulatory elements (CREs), such as auxin signaling-responsive motifs involved in regulating defense responses against *S. sclerotiorum* infection. Prediction of miRNAs targeting hub genes, using the web-based psRNATarget program, revealed that miRNAs belonging to the families miR172, miR395, miR6028, miR6029, miR6032, miR6035, miR166, miR156, miR396 and miR824 play key roles as regulatory elements in the gene expression network of hub genes. These findings can aid in establishing biological control systems for plant disease management and protection of agricultural systems, as well as in advancing the fundamental mechanisms for developing disease-tolerant varieties.

KEY WORDS

Biological control, canola, differentially expressed genes, microRNAs, protein interaction networks, RNA sequencing, Sclerotinia stem rot.

How to cite:

Taher, H., & Ghodoum Parizipour, M. H. (2024). Gene and regulatory network modeling of transcriptomic patterns in defense priming of rapeseed against *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Crop Biotechnology*, 14 (1), 67-86.

(DOI: 10.30473/cb.2024.71791.1973)



زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال چهاردهم، شماره یکم، پیاپی ۴۷، پاییز ۱۴۰۳ (۸۶-۸۷)

DOI: 10.30473/cb.2024.71791.1973

«مقاله پژوهشی»

مدل‌سازی شبکه ژنی و تنظیمی الگوهای رونوشتی در القای سامانه دفاعی کلزا در

برابر *Sclerotinia sclerotiorum*

هنگامه طاهری^۱ (از رکد: ۰۵۹۱۸۰۱۹)، محمد حامد قدوم پاریزی‌پور^۲

چکیده

پوسیدگی ساقه اسکلروتینیایی (SSR) که توسط قارچ خاکرای *Sclerotinia sclerotiorum* ایجاد می‌شود، علاوه بر کاهش ۱۰-۲۰ درصدی عملکرد محصول، منجر به کاهش کیفیت بذر در کلزا (*Brassica napus*) می‌شود. عامل مهار زیستی *Pseudomonas chlororaphis* PA23 قادر است با القاء مقاومت سیستمیک، گیاه کلزا را از اثرات مخرب قارچ همی‌بیوتروف *S. sclerotiorum* مصون نگه دارد. با این حال سازوکار ملکولی القای مقاومت در برابر این بیمارگر تا حدود زیادی ناشناخته است. از این رو در مطالعه حاضر، الگوهای رونوشتی در گیاه کلزا با استفاده از سیستم کنترل زیستی باکتری PA23 مورد بررسی قرار گرفت تا با بررسی شبکه‌های برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (PPI) بهویژه تمکن بر ژن‌های کلیدی (Hub genes) (احتمالی، هستی‌شناسی ژن‌ها) (Gene Ontology)، مسیرهای بیوشیمیایی و بررسی شبکه‌های تنظیمی از طریق بررسی پرومتر ژن‌های کلیدی و پیش‌بینی miRNA‌ها در برهم‌کنش گیاه-بیمارگر، به اطلاعات جامع‌تری از پاسخ گیاه کلزا پیش‌تیمار شده با PA23 در برابر آلدگی *S. sclerotiorum* رسید. با استفاده از الگوریتم‌های محاسباتی افزونه CytoHubba در نرم‌افزار Cytoscape، گرهای (Nodes) با پیشترین درجه برهم‌کنشی با سایر ژن‌ها در شبکه ژنی تحت عنوان ژن‌های کلیدی شناسایی شدند که عمدها در حفظ و بازیابی مسیرهای متابولیکی و فعالیت فتوستراتی، کنترل وضعیت اکسیداسیون/اچای (redox) سلولی، بیوستر اسیدهای آروماتیک و هورمون‌های گیاهی، فعال‌سازی پیام‌رسان‌های دفاعی وابسته به MAPK، تنظیم اسیمیلاسیون سولفور و بیوستر سیستئین نقش داشتند. همچنین تحلیل خوشبندی شبکه با استفاده از الگوریتم IPCA در افزونه Cytocluster، مازولهای عملکردی را که عمدها در بیوستر اسیدهای آروماتیک و تولید متابولیت‌های دفاعی در مسیر شیکمات نقش داشتند را به عنوان مسیرهای اصلی پاسخ دفاعی حاصل از PA23 در برابر SSR معرفی کرد. آنالیز پرومتر ژن‌های کلیدی در ناحیه ۵'UTR (CRE) عناصر تنظیمی سیس (CRE) متنوعی نظری موتفی‌های وابسته به پیام‌رسان اکسین را در تنظیم پاسخ‌های دفاعی بر علیه آلدگی *S. sclerotiorum* شناسایی کرد. پیش‌بینی miRNA که با ژن‌های کلیدی برهم‌کنش دارند، با استفاده از برنامه وب محور psRNATarget متعلق به خانواده‌های miR156، miR166، miR6035، miR6032، miR6028، miR395، miR172، miR824 و miR396 را به عنوان عناصر اصلی شبکه تنظیمی بیان ژن‌های کلیدی معرفی کرد. شناخت این برهم‌کنش‌ها در القای سامانه دفاعی کلزا در برابر آلدگی قارچی SSR می‌تواند به توسعه سیستم‌های کنترل بیولوژیکی جهت مدیریت بیماری‌های گیاهی و حفاظت از سیستم‌های زراعی کمک کند و مکانیسم‌های پایه جهت ایجاد واریته‌های متحمل به بیماری را توسعه دهد.

واژه‌های کلیدی

پوسیدگی ساقه اسکلروتینیایی، توالی پایی RNA، ریزRNA‌ها، ژن‌هایی با بیان متمایز، شبکه‌های برهم‌کنش پروتئینی، کنترل بیولوژیکی، کلزا.

نویسنده مستنده:
هنگامه طاهری
Taheri@asnrukh.ac.ir
رايانame:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۰۹

استناد به این مقاله:

طاهری، هنگامه و قبوم پاریزی‌پور، محمد حامد (۱۴۰۳). مدل‌سازی شبکه ژنی و تنظیمی الگوهای رونوشتی در القای سامانه دفاعی کلزا در برابر *Sclerotinia sclerotiorum* فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴، ۸۶-۹۷. (DOI: 10.30473/cb.2024.71791.1973)

(مقاله مروی ۲۰۲۳) Hossain *et al.*, 2023). این قارچ علاوه بر توانایی انگلی بسیار بالا، قادر است به صورت اندوفیت در تک‌لپه‌هایی نظیر برنج، گندم، جو و ذرت نیز رشد کند (Tian *et al.*, 2020) و از آن‌جا که بافت‌های پیر را برای شروع آلودگی کلوبنیزه می‌کند، خاصیت نکروتوفی منحصر‌بفردی دارد (مقاله مروی Hossain *et al.*, 2023). با این حال، وجود یک فاز بیوتروفیک جزئی در چرخه آلودگی این قارچ مشاهده شده است. از این رو این بیمارگ را به صورت دقیق‌تر می‌توان جزو همی‌بیوتروفها طبقه‌بندی کرد (Kabbage *et al.*, 2015). ایجاد توده‌های ریشه‌ای سختینه^۱ ویژگی مشترک همه اعضای (Bolton *et al.*, 2006) Sclerotiniaceae می‌باشد (Sclerotiniaceae سختینه در پایان چرخه عفونت ایجاد می‌شود و ممکن است برای چندین سال نیز زنده بماند (Khangura *et al.*, 2015). از این رو امکان بقای بیمارگ را برای دوره‌های طولانی افزایش می‌دهد. این امر باعث کاهش اثربخشی کشت تناوبی به عنوان یک روش کنترل زراعی می‌شود (Derbyshire and Denton- Giles, 2016). از سوی دیگر به دلیل دامنه میزانی وسیع بیمارگ، کنترل بیماری با استفاده از شیوه‌های زراعی بسیار سخت و چالش‌برانگیز است (Wu *et al.*, 2016). کشت انواع کلزا مقاوم به بیماری، کارآمدترین و مقرن به صرفه‌ترین راه برای پیشگیری و کنترل SSR است (Wu *et al.*, 2013; Barbetti *et al.*, 2014; Bastien *et al.*, 2014). با این حال، عدم وجود ژرم پلاسم مقاوم در ارقام کلزای کشت شده و خوبی‌شوندان نزدیک (Li *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016) اصلاح ملکولی آن را با محدودیت مواده ساخته است. دامنه گستره میزانی وسیع این قارچ منجر به وابستگی شدید به قارچ‌کش‌ها برای مدیریت بیماری شده است. با این حال، به دلیل اثرات ناخواسته این مواد بر محیط زیست و نگرانی‌های زیست محیطی، کنترل بیولوژیک به عنوان جایگزینی مطلوب برای حفاظت از محصولات کشاورزی مطرح شده است (Duke *et al.*, 2017). بدین ترتیب که

مقدمه

کلزا، *Brassica napus* به عنوان سومین گیاه روغنی، ۱۳ درصد از تولید روغن گیاهی جهان را به خود اختصاص داده است (Hajduch *et al.*, 2006). کانادا، چین و هند از تولیدکنندگان اصلی این دانه روغنی هستند (FAO, 2022). این محصول زراعی علاوه بر پتانسیل عملکرد بالا، درصد روغن دانه بالاتری (۴۰ تا ۴۵ درصد) در مقایسه با سایر دانه‌های روغنی دارد. ارزش غذایی این محصول و سازگاری به شرایط آب و هوایی مختلف سبب شده است که افزایش سطح زیرکشت این محصول در ایران به عنوان محور برنامه‌های افزایش تولید دانه‌های Zomorodian *et al.*, 2011)، با این حال، با وجود تلاش‌ها برای اصلاح ارقام مقاوم، این گیاه همچنان به طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا حساس است. یکی از مخرب‌ترین عوامل بیماری‌زا کلزا، قارچ (Zomorodian *et al.*, 2011) مورد توجه قرار گیرد (Lib.) de Bary می‌باشد که به عنوان عامل پوسیدگی (SSR) ساقه اسکرتوتینیا^۲، علاوه بر کاهش عملکرد محصول، کمیت و کیفیت روغن آن را بطور چشمگیری تحت تاثیر قرار می‌دهد (Aggarwal *et al.*, 1997). از اصطلاحات متفاوتی Saharan and Mehta, 2008 نظیر کپک سفید، پوسیدگی پنهانی، پوسیدگی ساقه و پوسیدگی طوقه برای بیماری ناشی از این بیمارگ قارچی استفاده شده است (Jahan *et al.*, 2022) که از این میان، کپک سفید متداول‌تر است. دامنه میزانی خاصی برای این بیمارگ تعریف نشده است و قادر است بیش از صد گونه گیاهی تک‌لپه و دولپه را آلود کند. از عوامل موثر بر خاصیت بیماری‌زا این قارچ می‌توان به توانایی آن در تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، اگزالیک اسید و پروتئین‌های افکتور اشاره کرد. هر چند که توالی‌یابی جامع ژنوم این بیمارگ، اطلاعات زیادی در خصوص چگونگی سازماندهی ژنوم و عوامل موثر بر رشد و بیماری‌زا ای آن را ارائه داده است، با این حال اساساً ملکولی بیماری‌زا آن هنوز به طور کامل مشخص نشده است

2. Sclerotinia

1. Sclerotinia stem rot

مانند کوتیکول، مومن و دیواره سلولی می‌باشد (Atkinson and Urwin 2012; Muthamilarasan and Prasad 2013). از سوی دیگر فعال سازی پاسخ‌های دفاعی از طریق شناسایی الگوهای ملکولی مرتبط با میکروبها یا عوامل بیماری‌زا^۴ (MAMPs/PAMPs) یا مولکول‌های افکت‌ور^۵ (Jones and Dangl, 2006; Muthamilarasan and Prasad, 2013 Robert-) (Seilaniantz et al., 2011a).

S. sclerotiorum گیاه کلزا و قارچ در برهم‌کنش گیاه کلزا و قارچ اهمیت برخی عوامل موثر در بیماری‌زایی نظریه‌سازی را باسته به پروکسیزوم همراه با تجزیه دیواره سلولی و Chittem et al., 2020 در خصوص سازوکارهای پاسخ‌های دفاعی ذاتی گیاه کلزا در برابر آلوگی SSR، مشخص شده است که شبکه‌های متابولیتی میزبان تایید شد (Chittem et al., 2020). در خصوص سازوکارهای پاسخ‌های دفاعی ذاتی گیاه کلزا در برابر آلوگی *S. sclerotiorum*، مشخص شده است که شبکه‌های متابولیکی که به واسطه پیام‌رسان‌های هورمونی خصوصاً اسید سالیسیلیک (SA) تنظیم می‌شوند، در القاء مقاومت گیاه بر علیه این آلوگی نقش دارند (Xu et al., 2021). همچنین مشخص شده است که بیش از ژن لیپاز *AtGDSL1* در گیاه کلزا، مقاومت به این قارچ را با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش محتوای SA و کاهش میزان جاسمونات القاء می‌کند (Ding et al. 2020).

هنگامی که گیاهان در معرض میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا قرار می‌گیرند، این عوامل کنترل زیستی قادرند علاوه بر آنتی‌بیوز مستقیم بیمارگر، مقاومت سیستمیک بواسطه القاء سامانه دفاعی را در گیاه فعال کنند. چنین میکروارگانیسم‌هایی نامزدهای خوبی برای Pal and McSpadden (Pal and McSpadden 2006 *Pseudomonas chlororaphis*, 2006 *Pseudomonas chlororaphis*, Gardene, 2006 PA23) یک عامل کنترل زیستی است که قادر به جلوگیری از رشد *S. sclerotiorum* در گونه‌های حساس است (Fernando et al., 2007). مطالعات *B. napus* قبلی نشان داده‌اند که PA23 به طور مستقیم،

میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا با القاء مقاومت سیستمیک در گیاهان، مکانیزم‌های دفاعی میزبان را تقویت می‌کنند و با "القای سامانه دفاعی"^۶ منجر به واکنش‌های قوی‌تر و سریع‌تر گیاه به حملات بعدی بیمارگر می‌شوند (Pieterse et al., 2014).

امروزه به واسطه پیشرفت فناوری توالی‌بایی نسل بعد، از روش‌های ترانسکریپتومیکس برای درک مکانیسم‌های ملکولی برهم‌کنش‌های گیاه میزبان با بیمارگرها استفاده می‌شود (Xu et al., 2021). برای اجرای موفقیت آمیز عوامل کنترل بیولوژیک^۷ در القاء مقاومت سیستمیک بر علیه قارچ *S. sclerotiorum*، درک کامل تعاملات سیستم‌های کنترل زیستی، از جمله تأثیر آن‌ها روی گیاهان میزبان و همچنین درک مکانیسم‌های ملکولی برهم‌کنش‌های *S. sclerotiorum* و *B. napus* جهت ایجاد منابع جدید کلزای مقاوم به بیماری ضروری است. رویکرد زیست‌شناسی سامانه‌ای^۸ با ادغام داده‌های Omics نظریه‌داده‌های حاصل از رونویسی، پروتئوم و متابولوم می‌تواند با پیش‌بینی عملکردهای سلولی و مدل‌سازی پاسخ‌های گیاه به عوامل تنفس‌زای مختلف، ابزار قدرتمندی برای درک بهتر نحوه واکنش گیاهان ارائه دهد (Pazhamala et al., 2021). از این رو در مطالعه حاضر، از این رویکرد برای بررسی اثر عامل بیولوژیکی *Pseudomonas chlororaphis* PA23 بر روی پاسخ دفاعی گیاه کلزا در برابر قارچ *S. sclerotiorum* استفاده شد.

این مطالعه با بررسی اثرات عامل کنترل زیستی بر گیاه کلزا و شناسایی برهم‌کنش‌های پروتئینی می‌تواند گام مهمی در توسعه سیستم‌های کنترل زیستی به عنوان جایگزینی برای آفت‌کش‌های شیمیایی و استفاده از رویکردهای پایدار مدیریت بیماری‌های گیاهی به شمار آید.

پیشنهاد پژوهش

یکی از سازوکارهای دفاعی در برابر تنفس‌های زنده و غیر زنده در گیاهان، ایجاد موائع ریخت‌شناختی و ساختاری

4 Microbial- or pathogen-associated molecular patterns
5. Effector molecules

1. Defense priming
2. Biocontrol agents (BCAs)
3. System biology

مفیدی جهت توسعه محصولات ترарیخته مقاوم به آلودگی *S. sclerotiorum* و مدیریت این بیماری در کلزا و سایر گیاهان در اختیار بهنژادگران قرار دهد.

روش‌شناسی پژوهش

در ابتداء ژنهایی که در گیاه کلزا به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در طول آلودگی *S. sclerotiorum* (Duke *et al.*, 2017) متمایزی ($|log_2FC| > 1$) داشتند (Duke *et al.*, 2017) با استفاده از *RNA-seq* مسیرهای دفاعی القاء شده توسط PA23 شناسایی شدند. سپس این لیست ژنی برای ارزیابی برهمکش بین ژن‌های انتخاب شده، به برنامه مبتنی بر <http://string-db.org> به آدرس بر خط STRING وارد شد و لیست برهمکش پروتئینی (PPI) ایجاد شد. در مرحله بعد برای ترسیم شبکه برهمکشی، لیست PPI به رتبه‌بندی ژن‌های کلیدی از افزونه CytoHubba در Cytoscape (نسخه ۳/۱۰/۱) وارد شد. جهت شناسایی و رتبه‌بندی ژن‌های کلیدی از افزونه CytoHubba استفاده شد. این افزونه قادر است با استفاده از الگوریتم‌های محاسباتی مختلف به رتبه‌بندی و شناسایی ژن‌های کلیدی پردازد (Chin *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر ژن‌های کلیدی بر اساس بررسی حاصل از چهار الگوریتم محاسباتی CytoHubba از جمله MCC و MNC شناسایی شدند و در DEGREE، DMNC و MNC مسیرهای بیوشیمیایی زیرشبکه استفاده شد واز برنامه نهایت برهمکنش‌های آن‌ها با سایر گره‌ها در یک زیرشبکه^۵ نشان داده شد. از پایگاه KEGG برای آنالیز مسیرهای بیوشیمیایی زیرشبکه استفاده شد واز برنامه مبتنی بر وب STRING برای هستی شناسایی ژن‌های کلیدی که مشتمل بر عملکرد ملکولی^۶ (MF)، اجزای سلولی^۷ (CC) و فرآیند بیولوژیکی^۸ (BP) است، استفاده شد. برای خوشبندی ژن‌های زیرشبکه از افزونه CytoCluster در Cytoscape استفاده شد که با استفاده از الگوریتم‌های مختلف، گره‌های زیرشبکه را خوشبندی می‌کند (Li *et al.*, 2017)، در مطالعه حاضر از الگوریتم

sclerotiorum را از طریق ترشح متابولیت‌های ضد قارچی مورد حمله قرار می‌دهد (Poritsanos *et al.*, 2006; Duke *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006) در مطالعه همکاران (۲۰۱۷)، بیان ژن‌ها در پاسخ به PA23 در حضور و عدم حضور *S. sclerotiorum* در بافت‌های برگ *B. napus* با استفاده از توالی‌یابی RNA (RNA) مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که حضور S. PA23 مسیرهای دفاعی القاء شده توسط *sclerotiorum* از جمله تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و القای مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) کاهش داد. با این حال، این عامل کنترل زیستی توانست علاوه بر تقابل مستقیم با *S. sclerotiorum* با آماده‌سازی شبکه‌های دفاعی میزان، اثر حفاظتی خود را اعمال کند. هرچند که در این پژوهش، ژن‌هایی با بیان متمایز در پاسخ به آلودگی SAR در گیاهان پرایم شده با PA23 شناسایی شدند، اما این مطالعه اطلاعاتی در خصوص ژن‌های محوری^۹، عملکرد و چگونگی تقابل آن با سایر ژن‌های بیان شده ارائه نداد. لذا در مطالعه کنونی ابتداء بر اساس ژن‌های شناسایی شده با بیان متمایز که در مطالعه قبلی (Duke *et al.*, 2017) در پاسخ به آلودگی SAR به دنبال القای سامانه دفاعی PA23 با استفاده از تکنیک RNA-seq شناسایی شده بود، شبکه برهمکنش پروتئینی^{۱۰} (PPI) ترسیم شد. سپس ژن‌های محوری که بیشترین تعامل را با سایر اعضای شبکه داشتند، شناسایی شدند. پس از شناسایی ژن‌های کلیدی، عملکرد این ژن‌ها در تعامل با سایر ژن‌ها و نقش عملکردی آن‌ها در مسیرهای بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز پرومتر این ژن‌ها نیز اطلاعات مفیدی در خصوص عناصر تنظیمی^{۱۱} (CREs) ژن‌های محوری مرتبط با پاسخ‌های دفاعی ارائه داد. همچنین میکرو^{۱۲} RNA‌های مهمی که با ژن‌های محوری در پاسخ به بیماری برهمکنش دارند، شناسایی شدند. در مجموع نتایج ملکولی القای سامانه دفاعی در برهمکنش گیاه-بیمارگر می‌تواند اطلاعات

5. Subnetwork

6. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

7. Molecular function

8. Cellular component

9. Biological process

1. Hub genes

2. Protein-Protein interaction

3. Cis-regulatory elements

4. MicroRNAs

Cytoscape ترسیم شد (شکل ۱). این شبکه برهمنش ژن‌هایی که در پاسخ به آلودگی SSR به دنبال القای سامانه دفاعی PA23 در گیاه کلزا افزایش یا کاهش بیان داشته‌اند را نشان می‌دهد. با استفاده از چهار الگوریتم ذکر شده در مواد و روش‌ها، پروتئین‌های کلیدی با بیشترین برهمنش از بین تمامی برهمنش‌های پروتئینی موجود در شبکه شناسایی شدن. لیست پروتئین‌های کلیدی و مشخصات آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. برهمنش ژن‌های کلیدی شناسایی شده با سایر DEG‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی بیان این ژن‌ها بر اساس لیست ژنی تهیه شده از مطالعه Duke و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که ژن‌های کلیدی شناسایی شده تغییرات بیانشان نسبت به گیاهان شاهد مثبت بوده و تقریباً نزدیک ۲ بود. این یافته‌ها بیانگر این نکته است که ژن‌های بزرگ اثر با درجه بالای تعامل با سایر ژن‌ها، الزاماً تغییرات بیانشان در پاسخ به آلودگی بالا نیست و اثرات برهمنشی آن‌ها با سایر ژن‌ها، در بروز پاسخ‌های دفاعی تأثیرگذارتر است.

بر اساس جدول ۱، یکی از ژن‌های کلیدی شناسایی شده، *BnaC04g26180D* باشد که آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز^۳ (GR) را کد می‌کند. این آنزیم سبب تولید فرم احیا شده گلوتاتیون در سلول می‌شود که نقش کلیدی در کنترل سلولی گونه‌های فعال اکسیژن و کنترل وضعیت اکسیداسیون/احیای سلولی (redox) بر عهده دارد (مقاله مروری Couto *et al.*, 2016). مطالعات گسترده‌ای در خصوص نقش گلوتاتیون در پیامرسانی دفاعی و القاء مقاومت به بیمارگرهای مختلف صورت گرفته است Ghanta *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2015;) (Künstler *et al.*, 2019). عملکرد آنزیم GR در تبدیل GSSG به GSH برای محافظت از سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو و افزایش مقاومت اکتسابی سیستمیک از طریق فعال‌سازی ژن‌های *PR* به واسطه SA ضروری است (Chen *et al.*, 2007)

3. Glutathione reductase

^۱ برای گروه‌بندی گره‌های موجود در زیر شبکه استفاده شد. سپس ژن‌های هر خوشه در نسخه STRING برای یافتن مسیرهای KEGG بررسی شدند. جهت شناسایی موتیف‌های پرومتوئی ژن‌های کلیدی، ابتدا با استفاده از سرویس مبتنی بر وب Ensembl Plants (http://plants.ensembl.org) از ناحیه ۱Kb^۲ ژن‌های شناسایی شده، استخراج شد. قابل ترجمه ۵'UTR از ابزار Tomtom به آدرس برخط suite. http://meme.org/tools/tomtom برای شناسایی CRE‌های شناخته شده استفاده شد. (Gupta *et al.*, 2007). این ابزار، لیستی از موتیف‌های احتمالی را بر اساس ارزیابی پایگاه داده JASPAR CORE 2022 موتیف‌هایی با آستانه مقادیر P و E به ترتیب <0.01 و <0.1 انتخاب شدند. سپس جهت شناسایی نقش احتمالی موتیف‌های انتخاب شده، از ابزار GoMo به آدرس برخط http://meme-suite.org/tools/gomo استفاده شد (Buske *et al.*, 2010).

برای شناسایی miRNA‌های احتمالی، ابتدا توالی ژن‌های کلیدی با استفاده از سرویس مبتنی بر وب (http://plants.ensembl.org) Ensembl Plants استخراج شد. miRNA‌های شناخته شده کلزا نیز از (https://www.mirbase.org/) miRbase سرور استخراج شدند. سپس، مقایسه توالی ژن‌های کلیدی با miRNA‌های شناخته شده کلزا با استفاده از psRNATarget (http://lantgrn.noble.org/psRNATarget/) سرور miRNA، نشان داد که کدام miRNA با ژن‌های هدف برهمنش دارند. این لیست جهت ترسیم شبکه به نرم افزار Cytoscape وارد شد.

یافته‌های پژوهش

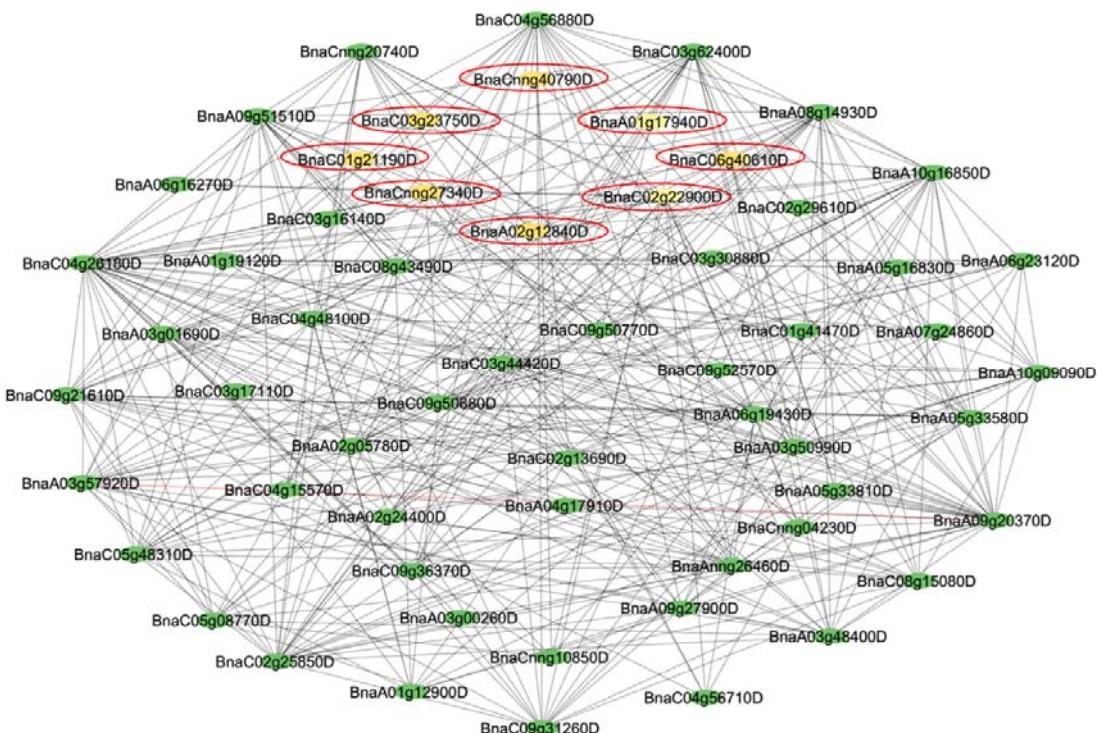
شبکه PPI و شناسایی قطب‌های ژنی شبکه برهمنشی پروتئینی (PPI) بر اساس لیست ژن‌هایی با بیان متمایز و با استفاده از STRING و

1. Identifying Protein Complex Algorithm

2. 5'untranslated region

گوجه‌فرنگی (ToMV)، مانع همانندسازی ژنوم این ویروس می‌شود. این ژن برای اولین بار در گونه *Solanum habrochaites* S. گوجه‌فرنگی وحشی Knapp & D.M. Spooner یافت شد و بعدها از آن به طور گسترده در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی برای محافظت از آن‌ها در برابر عفونت ToMV استفاده شد (Pelham, 1966; Spooner *et al.*, 2010; Ishibashi *et al.*, 2007) همچنین مشخص شده است که پروتئین‌های خانواده TIM-barrel ممکن است نقش عمده‌ای در پاسخ به ویروس موزائیک شلغم (TuMV) نیز داشته باشند (Rubio *et al.*, 2019). از این‌رو این ژن می‌تواند به عنوان یک منع جدیدی از مقاومت در پاسخ به آلودگی‌های میکروبی به کار گرفته شود.

را کد می‌کند که حامل دومین TIM barrel می‌باشد (جدول ۱). پروتئین‌های خانواده آلدولاز نوع TIM-barrel نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های فتوستتری و متابولیکی گیاهان در مواجهه با تشن‌های مختلف از جمله تنش‌های غرقابی و اکسیداتیو دارند. تحت تنش غرقابی، تلاش گیاه برای بازیابی پروتئین‌های خانواده آلدولاز نوع-TIM barrel نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین‌ها در حفظ و بازیابی مسیرهای متابولیکی و فعالیت فتوستتری است (Kazemi Oskuei *et al.*, 2017). بر اساس مطالعات قبلی مشخص شده است که پروتئین Tm-1 در C-ترمینال خود دارای دومین TIM-barrel می‌باشد. این پروتئین از طریق اتصال به آنزیم‌های همانندساز ویروس موزائیک



شکل ۱. شبکه PPI ژن‌هایی با افزایش (سبز رنگ) و کاهش بیان (قرمز رنگ) در پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape. (تعداد گره: ۵۹، تعداد یال: ۳۶۳، میانگین تعداد همسایگان: ۱۲/۸۹۳؛ طول مسیر مشخصه: ۰/۵۷۷، ضریب خوش بندی: ۰/۲۳۴؛ تراکم شبکه: ۰/۹۸).

Figure 1. PPI network of up-regulated (green) and down-regulated (red) genes in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming, using Cytoscape software. Network details: Number of Nodes: 59; Number of Edges: 363; Average Number of Neighbors: 12.89; Characteristic Path Length: 1.98; Clustering Coefficient: 0.577; Network Density: 0.234.

احیاء می شود. سولفید از طریق فعالیت آنزیم های خاص به اسکلت کربنی-O-استیل سرین (OAS) وارد می شود و سبب تولید سیستئین می شود (Kopriva, 2006). سیستئین اولین ترکیب آلی حاوی S برای سنتر سایر ترکیبات مانند متیونین، سولفولیپیده، ویتامین ها، کوآنزیمها و گروههای پروستتیک به کار گرفته می شود Nakai and Maruyama-Nakashita 2020; Li et al., 2020).

یکی دیگر از ژن های کلیدی *BnaC02g25850D* شناسایی شده می باشد (جدول ۱) که آنزیم گلیسرالدهید-۳-فسفات دهیدروژناز^۹ (GAPDH) را کد می کند که در چرخه کالوین-بنسون^{۱۰} (CBC)، فرایند تبدیل ۳-بیس فسفو گلیسرات به گلیسرالدهید-۳-فسفات (GAP) را کاتالیز می کند (Cséke and Buchanan 1986). مطالعات اخیر نشان داد که گلیسرالدهید-۳-فسفات (GAP) با فعال سازی پیام رسان های دفاعی وابسته به MAPK و القاء شبکه رونویسی، دفاع سیستماتیک علیه طیف وسیعی از بیمارگرها را ایجاد می کند. با این حال ابهامات زیادی در خصوص فعال سازی این سیستم دفاعی به واسطه GAP در سیتوزول وجود دارد که نیاز به مطالعات زیستیکی و بیوشیمیابی تکمیلی تر دارد (Zuo et al., 2024).

یکی دیگر از ژن های کلیدی در فعال سازی سامانه دفاعی توسط PA23 در برابر آلوودگی S. *sclerotiorum* *BnaA03g01690D* می باشد (جدول ۱) که زیرواحد آلفای آترانیلات سنتاز^{۱۱} را کد می کند که به عنوان یکی از آنزیم های محدود کننده سرعت در سنتز تریپتوфан مطرح می باشد. مطالعات قبلی نقش ژن های موثر در مسیر شیکمیک اسید (نظیر ژن آترانیلات سنتاز) که منجر به بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک می شوند را در مقاومت گیاه جو در برابر نفوذ قارچ *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* تأیید کرده بودند (Hu et al., 2009).

9. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

10. Calvin-Benson cycle (CBC)

11. Anthranilate synthase alpha subunit 1

یکی دیگر از ژن های کلیدی *BnaC04g56880D* شناخته شده در پاسخ دفاعی بر علیه آلوودگی SSR است (جدول ۱) که با کد کردن آنزیم ۳-فسفو شیکمیات ۱-کربوکسی وینیل ترانسفراز^۱ (که همان ۵-انول پیروویل شیکمیات ۳-فسفات (EPSP) سینتاز است)، نقش مهمی در تولید اسیدهای آمینه آروماتیک نظیر فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان دارد. این آنزیم، یک آنزیم کلیدی در مسیر اسید شیکمیک^۲ است که به طور گسترده در گیاهان عالی و میکرو ارگانیسم ها (باکتری ها و قارچ ها) یافت می شود و نقش مهمی در بیوسنتز کوربیزمات و اسیدهای آمینه آروماتیک ایفاء می کند (Stallings et al., 1991; Santos-Sánchez et al., 2019). اسیدهای آمینه آروماتیک و ترکیبات معطر از طریق مسیر شیکمیک اسید به عنوان یکی از اجزای بقای گیاه و Parthasarathy et al., 2018). همچنین این آنزیم می تواند در بیوسنتز هورمون ها و سایر متابولیت های مهم گیاهی نظیر کینین های رشد، لیگنین، فلاونوئیدها، فنل ها، SA و سایر متابولیت های ثانویه موثر در دفاع گیاه نقش داشته باشد (Priestman et al., 2005; Achary et al., 2020).

یکی دیگر از ژن های کلیدی *BnaA09g20370D* شناسایی شده در این مطالعه (جدول ۱)، آنزیم APS ردوکتاژ^۳ را کد می کند که به عنوان یکی از آنزیم های کلیدی اسیمیلاسیون سولفات^۴ مطرح است. گوگرد (S) یک عنصر ضروری است که در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف نقش حیاتی دارد. گوگرد پس از جذب از خاک به شکل سولفات توسط آنزیم ATP سولفوریلаз^۵ به آدنوزین Prioretti et al., 2014 تبدیل می شود (APS) ۵-فسفوسولفات^۶ (APS) توسط APS ردوکتاژ به سولفیت احیا شده و سپس توسط سولفیت ردوکتاژ^۷ (SIR) به سولفید

1. 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase

2. 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase

3. Shikimic acid

4. APS reductase

5. sulfate assimilation

6. ATP sulfurylase

7. Adenosine 5'-phosphosulfate (APS)

8. Sulfite reductase (SIR)

ترکیبات آروماتیک، نیتروژنی و سولوفوری هستند در پاسخ به القای سامانه دفاعی PA23 در برابر آلودگی SSR فعال شده‌اند (شکل ۳). اصطلاحات غالب در GO برای عملکرد ملکولی (MF) اغلب شامل فعالیت‌های کاتالیتیکی، اتصال یون‌ها، اتصال مولکول‌های کوچک، اکسیدو ردوکتاژ، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، فعالیت گلوتاتیون ترانسفراز، اتصال گلوتاتیون و فعالیت پراکسیداز می‌باشد (شکل ۳). این یافته‌ها نشان داد که پاسخ عملکردی گیاه کلزا در القای سامانه دفاعی PA23 در برابر آلودگی SSR با تقویت واکنش‌های دفاعی، اتصال و تنظیم یون‌های فلزی ضروری، کاهش تنش اکسیداتیو و سمزدایی سلولی همراه است. غالب اصطلاحات GO برای اجزای سلولی (CC) شامل سیتوپلاسم، اندامک‌های سلولی نظیر پلاستیدها و کلروپلاست، تیلاکوئیدها، غشای تیلاکوئید و استرومای کلروپلاست می‌باشد (شکل ۳) که نشان می‌دهد عمدۀ فعالیت‌های متابولیکی و دفاعی در پاسخ به القای سامانه دفاعی PA23 در برابر آلودگی SSR در گیاه کلزا در این مکان‌های سلولی اتفاق افتاده است.

برای دستیابی به اطلاعات مسیرهای موثر در پاسخ گیاه کلزا به آلودگی SSR بواسطه PA23، از بررسی غنی‌سازی مسیرهای KEGG برای ژن‌های زیرشبکه استفاده شد. KEGG یک پایگاه داده برای تخصیص مسیرهای بیولوژیک خاص به گروه‌هایی از ژن‌های متفاوت بیان شده (DEGs) است که با ارتباط دادن داده‌های omics به داده‌های عملکردی، ارتباط بین تغییرات بیان ژن‌ها و تغییرات در عملکردهای سلولی و پاسخ‌های بیولوژیکی را مشخص می‌کند (Kanehisa and Goto, 2000). بر این اساس، نتایج بررسی غنی‌سازی KEGG (شکل ۳) نشان داد که مسیرهای متابولیکی مرتبط با متابولیسم اسیدهای آمینه (گلیسین، سرین، ترئونین، سیستئین، متیونین)، متابولیسم گلوتاتیون و سولوفور، بیوسنتر متابولیت‌های ثانویه و متابولیسم کربن به عنوان مسیرهای کلیدی پاسخ دفاعی گیاه کلزا به دنبال القاء پاسخ دفاعی PA23 در برابر بیماری SSR شناخته شده‌اند.

که آنزیم فسفوسرین Ammonium transaminase^۱ (PSAT) را کد می‌کند، یکی از ژن‌های محوری در این مطالعه شناخته شده است (جدول ۱). این آنزیم که واکنش ترانس آمیناسیون قابل برگشت-۳-فسفوهیدروکسیپرووات^۲ (3-PHP) به ۳-فسفوسرین^۳ (PSer) را در حضور L-گلوتامات (Glu) کاتالیز می‌کند، جزئی از مسیر فسفریلاسیون بیوسنتر سرین^۴ (PPSB) است که در پلاستیدهای گیاهی صورت می‌گیرد (Sekula et al., 2018). مطالعات قبلی نشان داده است که مسیر PPSB پس از آلودگی گیاهان توسط عوامل بیماریزا غال می‌شود (Benstein et al., 2013). به علاوه در گیاهانی که این مسیر در آن‌ها غیرفعال بود، اثرات مثبت قارچ Colletotrichum tofieldiae (Zimmermann et al., 2021)

از ژن‌های BnaA10g09090D و BnaA10g16850D کلیدی شناسایی شده در پاسخ دفاعی حاصل از سامانه القای PA23 می‌باشد (جدول ۱) که در مسیر بیوسنتری تریپتوфан برای نقش دارند. در گیاهان، اسید آمینه آروماتیک تریپتوfan برای سنتز پروتئین ضروری است و پیش‌ساز هورمون‌های رشد آکسین، آکالوئیدها، نیاسین (ویتامین B3) و متابولیت‌های Howe and Jander, 2008; Tzin and Galili, 2010; Sønderby et al., 2010; Maeda and Dudareva, 2012; Zhou et al., 2018. از این رو، مسیر تریپتوfan با تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه نقش محوری در بروز پاسخ‌های دفاعی علیه بیمارگرها در سلسه گیاهان بر عهده دارد.

بررسی هستی‌شناسی و غنی‌سازی مسیرهای

بیوشیمیایی ژن‌های کلیدی

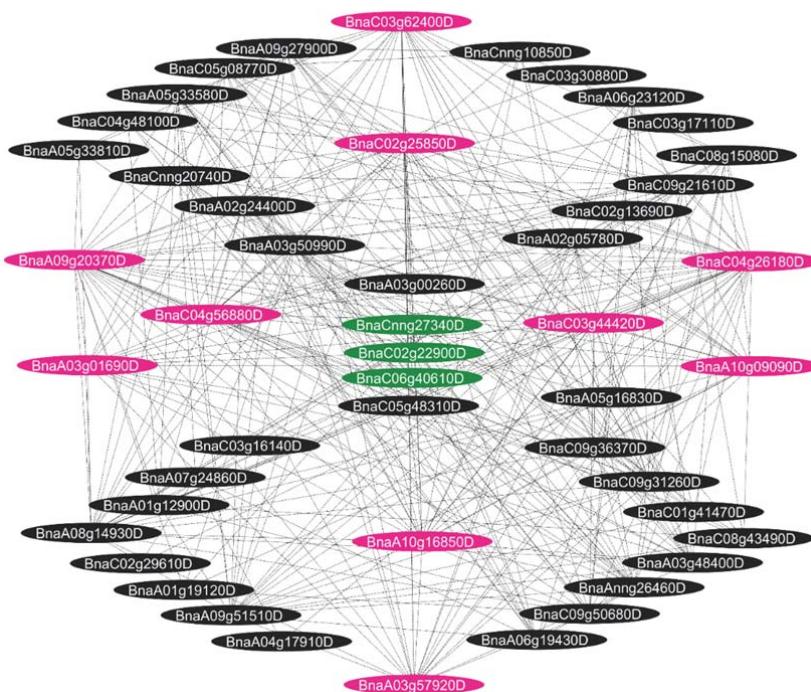
بررسی هستی‌شناسی شبکه تعامل قطب‌های ژنی با سایر ژن‌ها با استفاده از ابزار String نشان داد که در ارتباط با فرایند بیولوژیکی (BP)، مجموعه‌ای از فرآیندهای مختلف متابولیک و بیوسنتری، به ویژه آن‌هایی که مربوط به سنتز

1. Phosphoserine aminotransferase

2. 3-phosphohydroxypyruvate

3. 3-phosphoserine

4. Phosphorylated pathway of serine biosynthesis (PPSB)



شکل ۲. زیرشبکه ای از ژن های کلیدی و برهم کنش آن ها با سایر ژن ها در پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 با استفاده از افزونه CytoHubba (سرخابی: ژن های کلیدی، مشکی: ژن هایی با افزایش بیان، سبز: ژن هایی با کاهش بیان). (تعداد گره: ۴۸، تعداد یال: ۳۳۷، میانگین تعداد همسایگان: ۱۴/۰۴۲، طول مسیر مشخصه: ۱/۷۴۷، ضریب خوش بندی: ۰/۶۲۳، تراکم شبکه: ۰/۲۹۹)

Figure 2. A subnetwork of hub genes and their interactions with other genes in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming using the CytoHubba plugin. (magenta: hub genes, black: up-regulated genes, and green: down-regulated genes). Network details: Number of Nodes: 48; Number of Edges: 337; Average Number of Neighbors: 14.042; Characteristic Path Length: 1.747; Clustering Coefficient: 0.623; Network Density: 0.299.

جدول ۱. رتبه بندی ژن های کلیدی شناسایی شده در پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از CytoHubba در کلزا با استفاده از افزونه PA23

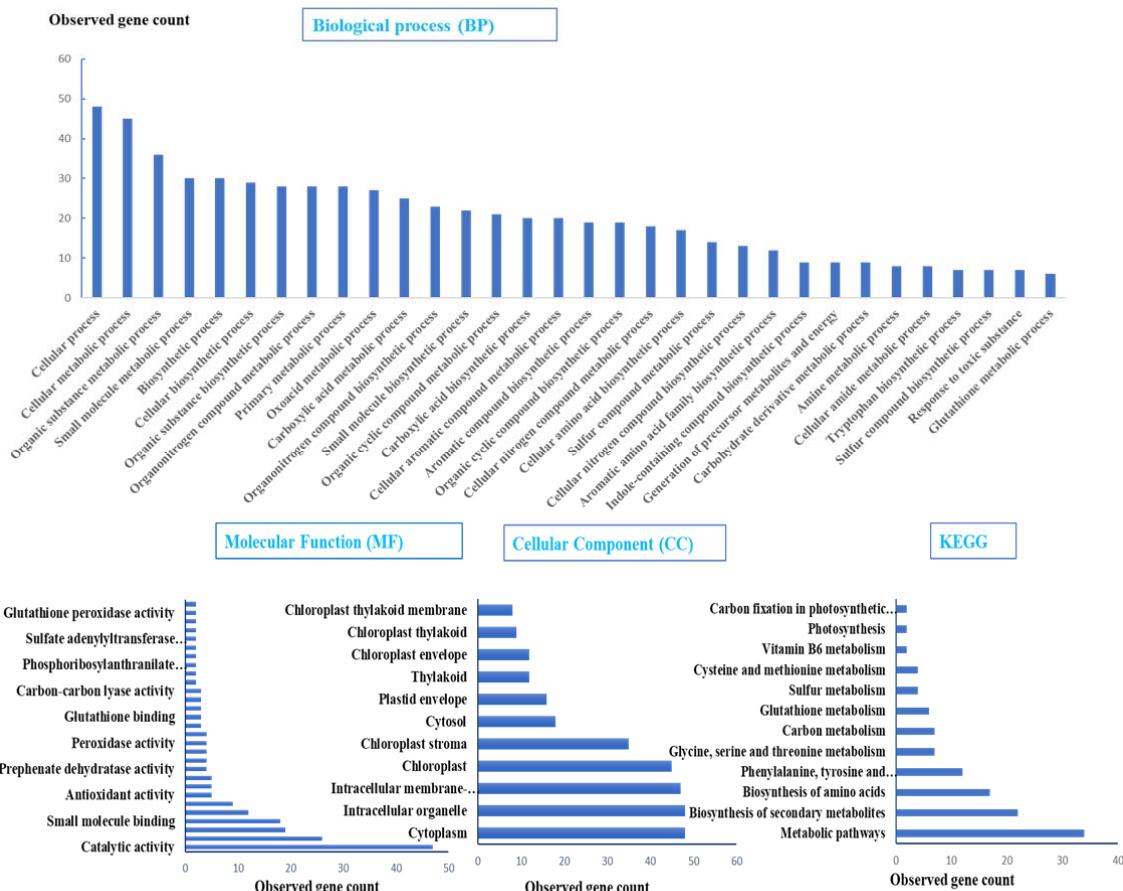
Table 1. Ranking of identified hub genes in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming in rapeseed using CytoHubba plugin

عملکرد ژن، نام ژن Gene Description and Gene name	الگوریتم رتبه بندی Ranking Method	شناسه ژن Gene ID	رتبه Rank
Glutathione reductase (EMB2360 ,GR, ATGR2)	DMNC, MCC	BnaC04g26180D	1
Aldolase-type TIM barrel family protein	DMNC, MCC	BnaC03g44420D	1,2
Aldolase-type TIM barrel family protein	MCC, DMNC	BnaA03g57920D	1,2
3-phosphoshikimate 1- carboxyvinyl transferase (Belongs to the EPSP synthase family)	DMNC, MCC	BnaC04g56880D	1,4
APS reductase 1 (APR1, APR, PRH19, ATAPR1)	MNC, Degree	BnaA09g20370D	2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 2 (GAPCP-2)	MNC, Degree	BnaC02g25850D	3
tryptophan biosynthesis 1 (TRP1, PAT1)	MCC, MNC, Degree	BnaA10g16850D	3,4
Anthranilate synthase alpha subunit 1 (ASA1, TRP5, AMT1, WEI2, JDL1)	MCC, DMNC	BnaA03g01690D	3,5
Phosphoserine aminotransferase (PSAT) tryptophan synthase beta subunit 1 (TSB1, TRPB, TRP2, ATTTSB1)	Degree, MNC	BnaC03g62400D	5
	DMNC	BnaA10g09090D	5

همپوشانی بین مسیرهای متابولیکی شناسایی شده در KEGG و مژولهای عملکردی شناسایی شده در آنالیز خوشه‌بندی تایید کرد که این مسیرها به عنوان مسیرهای اصلی حاصل از کنترل زیستی PA23 در برابر آلودگی SSR در گیاه کلزا مطرح می‌باشند. همان‌طور که در قسمت بالا نیز اشاره شد بیوستتر اسیدهای آمینه آروماتیک و متابولیتهای ثانویه مشتق شده از آن‌ها از طریق مسیر شیکیمیک اسید و کوریزمات نقش مهمی در پاسخ به عوامل بیماریزا در گیاهان دارند. از این‌رو، دستکاری این مسیر می‌تواند به بهبود حفاظت گیاه در برابر بیماری‌های گیاهی کمک شایانی کند.

بررسی خوشه‌بندی شبکه

اطلاعات حاصل از خوشه‌بندی گروههای ژنی با استفاده از الگوریتم IPCA افزونه Cytocluster در جدول ۲ آورده شده است. این گروه‌بندی نشان داد که همگی خوشه‌ها بدست امده در رتبه بندی ۱ تا ۴ در مسیرهای مربوط به بیوستتر اسیدهای آمینه تریپتوфан، فنیل‌آلانین و تیروزین، متابولیسم ویتامین B6، متابولیسم سرین، گلاسین و ترئونین و بیوستتر اسیدهای آمینه مشترک بودند. با این حال، تشییت کردن فقط در خوشه‌هایی با رتبه ۱ و ۲ و متابولیسم سیستئین و متیونین و متابولیسم گوگرد نیز به ترتیب فقط در خوشه‌هایی با رتبه ۳ و ۴ مشاهده شدند.



شکل ۳. بررسی غنی‌سازی Gene Ontology و مسیرهای KEGG ژن‌های کلیدی با استفاده از STRING در پاسخ به آلودگی به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در گیاه کلزا *S. sclerotiorum*

Figure 3. Gene ontology enrichment and KEGG pathways of hub genes using STRING in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming in rapeseed

از فاکتورهای شناخته شده در ناحیه CRE ژن‌های هدف مورد مطالعه، AP2/EREBP می‌باشد. فاکتورهای AP2 نقش مهمی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده دارند. در مطالعه‌ای خاموشی ژن کد کننده این فاکتور رونویسی توسط ویروس موزائیک نواری جو (خاموشی ژن بواسطه ویروس)،^۲ حساسیت گندم (خاموشی ژن بواسطه ویروس)،^۳ *Puccinia striiformis* f. sp. *Triticici* به افزایش داد (Hawku *et al.*, 2021). همچنین مشخص شده است که فاکتورهای AP2/ERF از طریق تاثیر بر مسیر MAPK، تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای پیام‌رسان هورمونی و بیوسنتر متابولیت‌های ثانویه، در بروز پاسخ‌های ایمنی در برابر بیمارگرهای گیاهی نقش دارند (Ma *et al.*, 2024). یکی دیگر از خانواده‌های ژنی شناخته شده که با توالی‌های CRE در ناحیه پروموتوری ژن‌های کلیدی برهم کنش دارند، MADS-box ها هستند (جدول ۳). این خانواده ژنی به عنوان مهمترین عوامل موثر در رشد و نمو گیاه، عملکردشان در پاسخ به تنش‌های محیطی نظیر شوری، خشکی (Li *et al.*, 2021) و سرما (Yan *et al.*, 2021) تایید شده است. با این حال اطلاعات اندکی در خصوص پاسخ آن‌ها به محرك‌های زیستی گزارش شده است. اخیراً نقش یکی از اعضای این خانواده ژنی در *Citrus sinensis* در برابر آلوگی باکتری‌های بیماری‌زا تایید شده است (Yang *et al.*, 2024) HD-ZIP آنکه منحصراً متعلق به سلسله گیاهان هستند، یکی دیگر از فاکتورهای رونویسی شناسایی شده در این مطالعه است. این فاکتورها علاوه بر عملکردشان در فرایندهای مختلف سلولی نظیر تمایز، تنظیم بیوسنتر لیپیدها و انتقال آن‌ها، در پاسخ به تنش‌های زیستی نیز نقش دارند (Chew *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015).

2. Virus-induced gene silencing (VIGS)
3. Homeodomain leucine zipper

بررسی موتیف پروموتوری ژن‌های کلیدی برای شناسایی موتیف‌های حفاظت شده و عناصر تنظیمی Cis ژن‌های کلیدی شناسایی شده در این مطالعه، توالی یک کیلوباز (1Kb) از ناحیه 5'UTR (1Kb) این ژن‌ها از سرویس مبتنی بر وب Ensemble Plant بازیابی و با استفاده از ابزار MEME، موتیف‌های کلیدی با طول ۲۹-۱۵ جفت باز در ناحیه پروموتوری این ژن‌ها شناسایی شدند. چندین عملکرد بیولوژیکی برای موتیف‌های شناسایی شده با استفاده از ابزار GOMO بدست آمد که مشخصات جزئی‌تر آن‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. مسیرهای پیام‌رسان وابسته به اکسین به عنوان یکی از عملکرددهای ملکولی (MF) موتیف‌های موجود در این مطالعه معرفی شد. ژن‌های کلیدی شناسایی شده در این مطالعه معرفی شد. مشخص شده است که اکسین در گیاه میزبان به عنوان یک مولکول پیام‌رسان میکروبی، بیان ژن‌های بیماری‌زا را در باکتری تنظیم می‌کند و نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های دفاعی گیاه در طول فرایند بیماری‌زا عوامل میکروبی دارد (Djami-Tchatchou *et al.*, 2020).
فعالیت سودویورودین سینتاز^۴ نیز یکی دیگر از عملکرددهای ملکولی موتیف‌های شناسایی شده در مطالعه اخیر است که اطلاعات چندانی از عملکرد این آنزیم در گیاهان در دست نیست. اخیراً مشخص شده است که برخی از اعضای این خانواده ژنی در پاسخ به تنش‌های غیر زنده نظیر خشکی، شوری و گرمای القاء می‌شوند (Dhingra *et al.*, 2023). همچنین نقش آن در کنترل آلوگی ویروس موزائیک برآویز (BMV) در *Nicotiana benthamiana* از طریق اتصال آن به رشته مثبت RNA ویروسی و اختلال در کپسوله شدن ویروس و انتشار سیستمیک آن تأیید شده است (Garcia-Ruiz, 2019).
بر اساس جدول ۳، برخی فاکتورهای رونویسی از خانواده انگشت روی (Dof) در ناحیه پروموتوری ژن‌های کلیدی شناسایی شدند. در تحقیقات قبلی نقش این عوامل در القاء مقاومت در برابر بیمارگرهای گیاهی تایید شده بود (Sasaki *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2019).

4. Pseudouridine synthase activity

جدول ۲. آنالیز خوشه‌بندی زیر شبکه‌ای از ژن‌های کلیدی بیان شده در پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در گیاه کلزا با استفاده از الگوریتم IPCA در افزونه CytoCluster

Table 2. Clustering analysis of subnetwork of expressed hub genes in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming in rapeseed using the IPCA algorithm in the CytoCluster Plugin

عملکرد Function	تعداد حاشیه‌ها Edges	تعداد گره‌ها Nodes	رتبه‌بندی کلاستر Cluster Rank
بیوسنتر فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوфан Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متabolیسم ویتامین B6، بیوسنتر آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متabolیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism تثبیت کربن Carbon fixation	506	24	1
بیوسنتر فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوfan Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متabolیسم ویتامین B6، بیوسنتر آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متabolیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism تثبیت کربن Carbon fixation	487	22	2
بیوسنتر فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوfan Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متabolیسم ویتامین B6، بیوسنتر آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متabolیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism متabolیسم سیستئین و متیونین Cysteine and methionine metabolism	377	20	3
بیوسنتر فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوfan Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متabolیسم ویتامین B6، بیوسنتر آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متabolیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism متabolیسم سولفور Sulfur metabolism	376	20	4

جدول ۳. موتیف‌های حفاظت شده در پروموتر قطب‌های ژنی با استفاده از ابزار MEME

Table 3. Conserved motifs identified in the promoter region of hub genes using MEME tool

عملکرد (Function)	توالی لوگو (عناصر سیس) (Cis-elements)	فاکتور رونویسی (Transcription factor)	موتیف (Motif)
MF transcription factor activity CC endomembrane system BP regulation of transcription		SEP1 (MADS box)	MA0584.1
MF transcription factor activity CC endomembrane system		ATHB-40 (HD-ZIP)	MA1214
CC chloroplast		RAP2-9 (ERF/DREB)	MA1251.1
CC chloroplast		DREB2A (ERF/DREB)	MA1258.1
MF transcription factor activity CC nucleus CC plasmamembrane BP regulation of transcription		DOF5.8 (zinc finger-type factors)	MA1267.1
MF transcription factor activity CC nucleus CC plasma membrane BP regulation of transcription		DOF5.1 (zinc finger-type factors)	MA1281.1
CC chloroplast		DEAR3 (AP2/EREBP)	MA1376.1
MF transcription factor activity CC endomembrane system MF pseudouridine synthase activity BP auxin mediated signaling pathway		SOL1 (CPP)	MA1379.1
MF transcription factor activity CC plasmamembrane		Hox1 (Homeo domain factors)	MA1883.1

Sullivan and Ganem, 2005; Navarro *et al.*, 2006). این ریزRNAها با تنظیم بیان ژن‌هایی که در پاسخ‌های دفاعی نقش دارند، به تقویت مقاومت گیاه در برابر بیمارگرهای کمک می‌کنند. به عنوان مثال در *Arabidopsis thaliana* miR396 و miR393 در *tomato* به ترتیب در پاسخ دفاعی به (*Pst*) (Navarro *et al.*, 2006; Hewezi *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2006; Jian *et al.*, 2016 Liu *et al.*, 2009). در پاسخ به آلوودگی (*Pst*) در ۲۰۱۲ miR393 با تنظیم پیام‌رسانی اکسین و تنظیم مسیر گلوکوزینولات در واکنش

شناسایی miRNAهای ژن‌های کلیدی RNAها به عنوان miRNAهای غیرکدکننده، با اتصال Tarver (3'UTR) mRNA به مناطق غیر قابل ترجمه (et al., 2013)، نقش‌های کلیدی در فرآیندهای بیولوژیکی متعدد نظیر رشد، اندامزابی، انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفاء می‌کنند (Achard *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Jian *et al.*, 2016). علاوه بر این، چندین مطالعه نشان داده‌اند که miRNAها نقش کلیدی در پاسخ به آلوودگی‌های میکروبی در گیاهان ایفا می‌کنند

فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی وابسته به MAPK نقش دارد، بیانش توسط دسته‌ای از miRNAهای خانواده miR6028 (شکل ۴). بر اساس بررسی مطالعات قبلی مشخص شد که از بین miRNAهای با بیان تمایزی در پاسخ به آلدگی *S. sclerotiorum*، بیان miR395 در d/e/f و miR6028 در Xie واریته مقاوم نسبت به واریته حساس کلزا کاهاش یافت (Xie et al., 2023). همچنین در مطالعه دیگری میزان بیان miR6028 ۴۸ ساعت پس از تلقیح گیاه کلزا با Jian et al., 2018)، با توجه به نقش منفی miRNAها در تنظیم بیان ژن‌های هدف در مرحله رونویسی یا بعد آن، کاهاش بیان این ریزRNAها می‌تواند در تقویت بیان ژن‌های هدف و تقویت پاسخ‌های دفاعی علیه بیماری SSR در کلزا نقش مثبتی داشته باشد. در پیش‌بینی برهمن کنش miRNA و ژن‌های کلیدی مورد مطالعه مشخص شد بیان ژن miR156 *BnaA10g09090D* (a/d/e/f) تنظیم می‌شود (شکل ۴). ژن *BnaA10g09090D* یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوستتری اسیدامینه تریپتوفان است که تنظیم بیان آن با توجه به نقش کلیدی آن در بیوستتر متabolیت‌های ثانویه نظری IIGها و بروز پاسخ‌های ایمنی در برابر آلدگی‌های میکروبی بسیار حائز اهمیت است. miR156 به عنوان یکی از فراوان‌ترین miRNAها در گیاهان شناخته شده است که نقش آن در تنظیم پاسخ‌های دفاعی علیه عوامل بیماری‌زای *S. sclerotiorum* تأیید شده است (Jian et al., 2018; Yin et al., 2019; Zhang et al., 2020; Sun et al., 2022; Xie et al., 2023).

نتیجه گیری

با توجه به اینکه پوسیدگی ساقه اسکلروتینیا هر ساله خسارات سنگینی به مزارع کلزا وارد می‌کند، لذا بررسی سازوکارهای ملکولی مقاومت به بیمارگر PA23 توسط *S. sclerotiorum*

گیاهان به بیمارگرها مشارکت دارند (Navarro et al., 2006; Robert-Seilantianz et al., 2011b). شناسایی miRNAهای پاسخ‌دهنده به عوامل میکروبی و ژن‌های هدف آن‌ها می‌تواند در شناخت بیشتر شبکه‌های تنظیمی پاسخ گیاه به آلدگی SSR کمک کند. با این حال اطلاعات اندکی در خصوص چگونگی تنظیم مقاومت به آلدگی SSR در گیاه کلزا بواسطه ریزRNAها در دسترس است (Xie et al., 2023).

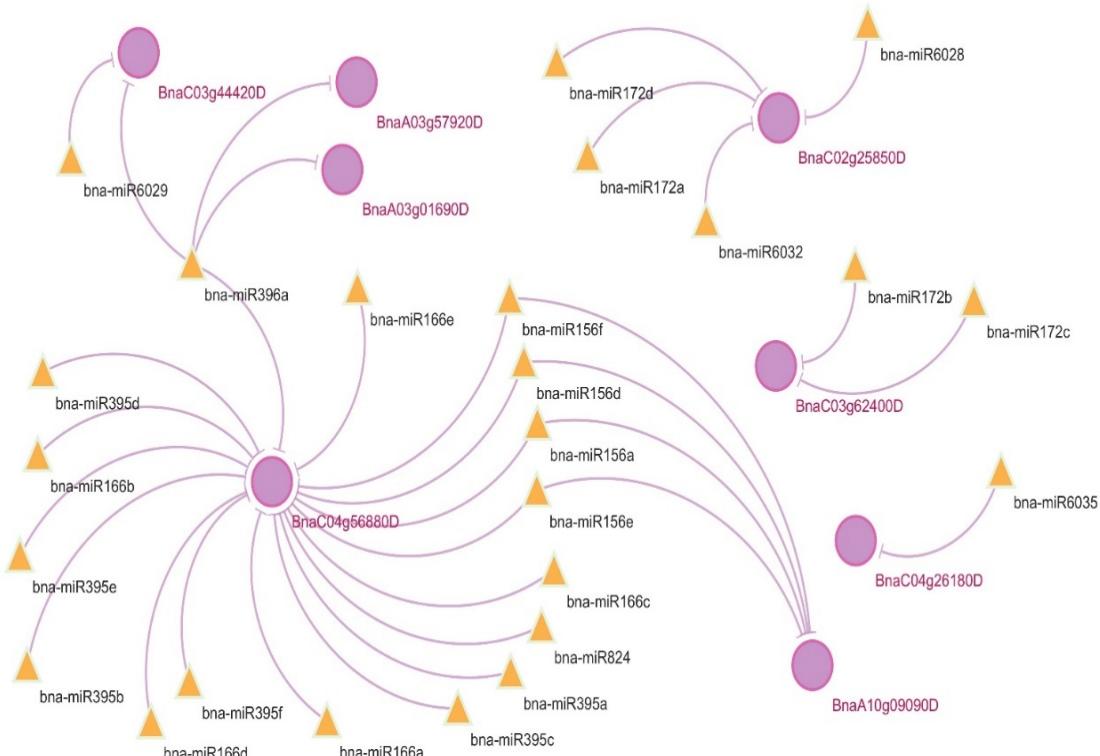
در مطالعه حاضر جهت پیش‌بینی miRNAهایی که با ژن‌های کلیدی برهمن کنش دارند، از برنامه وب محور psRNATarget استفاده شد. شکل ۴ برهمن کنش این miRNAها با ژن‌های کلیدی شناخته شده در این مطالعه را نشان می‌دهد. در مجموع ۲۵ شناسایی شد که miR395 miR172 miR6035 miR6032 miR6029 miR824 miR396 miR156 miR166 *BnaC04g56880D* *BnaC02g25850D* *BnaC03g62400D* *BnaA10g09090D* *BnaA03g57920D* *BnaC04g26180D* *BnaC03g44420D* *BnaA03g01690D* رونویسی و بعد آن تنظیم می‌کنند (شکل ۴). در مطالعات پیشین، نقش miR395 miR172 miR156 miR6028 miR166 miR156 *BnaC04g56880D* *BnaC02g25850D* بیماری SSR با استفاده از مطالعه گسترده ژنوم و روش‌های Xie et al., 2023؛ Jian et al., 2018 توالی‌بایی توان بالا^۱ تایید شده بود (). بر اساس پیشگویی برهمن کنش mRNA/miRNA از بین ژن‌های کلیدی شناسایی شده، *BnaC04g56880D* بیشترین برهمن کنش را با نشان داد (شکل ۴). این ژن که یکی از ژن‌های کلیدی در بیوستتر اسیدهای آمینه آروماتیک مسیر شیکمیات می‌باشد، miR166 miR395 a/b/c/d/e/f miRNA توسط ژن‌های miR824 miR396a miR156 a/d/e/f a/b/c/d/e مورد هدف قرار می‌گیرد (شکل ۴). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد *BnaC02g25850D* که در بیوستتر GAP و

2. Differentially expressed miRNAs (DEMs)

1. High throughput sequencing

فتوصتزر و تولید انرژی، فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و ترکیبات آنتی اکسیدانی در تنظیم ترکیبات ROS و سم زدایی سلول، بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک و متابولیت‌های دفاعی را در القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 برعلیه آلدگی SSR تأیید کرد. نتایج تحلیل پرومودتر نشان داد که عناصر تنظیمی (CREs)، تنظیم بیان ژن‌های محوری مرتب با مقاومت را بر عهده دارند. علاوه بر این، miRNAهای مهمی از ژن‌های محوری شناسایی شدند که در پاسخ به بیماری نقش دارند. از این رو یافته‌های این پژوهش می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص اصلاح ژنتیکی مقاومت کلزا به *S. sclerotiorum* در اختیار بهنژادگران قرار دهد.

جدید برای کنترل بیماری و ایجاد ارقام متحمل کمک می‌کند. یافته‌های مطالعه اخیر نشان داد که ژن‌های کلیدی در کلزا در پاسخ به PA23 در طول آلدگی SSR عمدهاً در حفظ و بازیابی مسیرهای متابولیکی و فعالیت (redox) فتوستتری، کنترل وضعیت اکسیداسیون / احیای (redox) سلولی، فعال سازی پیام‌رسان‌های دفاعی وابسته به MAPK و القاء شبکه رونویسی، بیوسنتز هورمون‌های گیاهی، بیوسنتز کوربیزمات و اسیدهای آمینه آروماتیک در مسیر شیکیمات، بیوسنتر متابولیت‌های دفاعی نظیر ایندول گلکوزینولات‌ها، تنظیم اسیمیلاسیون سولفور و بیوسنتز سیستئین دخیل هستند. بررسی هستی شناسی، مسیرهای KEGG و آنالیز خوشبندی قطب‌های ژنی، اهمیت فرآیندهای متابولیکی و دفاعی گیاه به ویژه



شکل ۴. پیش‌بینی miRNAهای احتمالی در تنظیم بیان ژن‌های کلیدی در پاسخ به آلدگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در گیاه کلزا با استفاده از ابزار psRNATarget (مثلثهای نارنجی psRNATarget tool و دایره‌های بنفش ژن‌های هدف RNAها را نشان می‌دهند).

Figure 4. Prediction of potential miRNAs involved in regulating the expression of hub genes in response to *S. sclerotiorum* infection, following PA23-induced defense priming in rapeseed using the psRNATarget tool (orange triangles represent miRNAs, and purple circles represent miRNA target genes).

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح پژوهشی به شماره ۱۴۰۲/۳۶ مصوب دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان می‌باشد.

References

- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C., & Harberd, N. P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 131, 3357-3365.
- Achary, V. M. M., Sheri, V., Manna, M., Panditi, V., Borphukan, B., Ram, B., ... & Reddy, M. K. (2020). Overexpression of improved EPSPS gene results in field level glyphosate tolerance and higher grain yield in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 18(12), 2504-2519.
- Aggarwal, R. A. K., Kumar, A., & Thakur, H. L. (1997). Effect of Sclerotinia rot on oil quality in low erucic acid cultivars of rapeseed. *Cruciferae Newsletter*, 19, 103-104.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523-3543.
- Barbetti, M. J., Banga, S. K., Fu, T. D., Li, Y. C., Singh, D., Liu, S. Y., ... & Banga, S. S. (2014). Comparative genotype reactions to *Sclerotinia sclerotiorum* within breeding populations of *Brassica napus* and *B. juncea* from India and China. *Euphytica*, 197, 47-59.
- Bastien, M., Sonah, H., & Belzile, F. (2014). Genome wide association mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in soybean with a genotyping□by□sequencing approach. *The Plant Genome*, 7(1), 1-13.
- Benstein, R. M., Ludewig, K., Wulfert, S., Wittek, S., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., ... & Krueger, S. (2013). Arabidopsis phosphoglycerate dehydrogenase1 of the phosphoserine pathway is essential for development and required for ammonium assimilation and tryptophan biosynthesis. *The Plant Cell*, 25(12), 5011-5029.
- Bolton, M. D., Thomma, B. P., & Nelson, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7(1), 1-16.
- Buske, F. A., Bodén, M., Bauer, D. C., & Bailey, T.L. (2010). Assigning roles to DNA regulatory motifs using comparative genomics. *Bioinformatics*, 26(7), 860-866.
- Chen, Y. P., Xing, L. P., Wu, G. J., Wang, H. Z., Wang, X. E., Cao, A. Z., & Chen, P. D. (2007). Plastidial glutathione reductase from *Haynaldia villosa* is an enhancer of powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant and Cell Physiology*, 48(12), 1702-1712.
- Cheng, M. C., Ko, K., Chang, W. L., Kuo, W. C., Chen, G. H., & Lin, T. P. (2015). Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 83(5), 926-939.
- Chew, W., Hrmova, M., & Lopato, S. (2013). Role of homeodomain leucine zipper (HD-Zip) IV transcription factors in plant development and plant protection from deleterious environmental factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 8122-8147.
- Chin, C. H., Chen, S. H., Wu, H. H., Ho, C. W., Ko, M.T., & Lin, C.Y. (2014). CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*, 8, 1-7.
- Chittrem, K., Yajima, W. R., Goswami, R. S., & del Río Mendoza, L. E. (2020). Transcriptome analysis of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* interaction with resistant and susceptible canola (*Brassica napus*) lines. *PLoS One*, 15(3), e0229844.
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95: 27-42.
- Cséke, C., & Buchanan, B. B. (1986). Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 853(1), 43-63.
- Derbyshire, M. C., & Denton- Giles, M. (2016). The control of sclerotinia stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*), current practices and future opportunities. *Plant Pathology*, 65(6), 859-877.
- Dhingra, Y., Lahiri, M., Bhandari, N., Kaur, I., Gupta, S., Agarwal, M., & Katiyar-Agarwal, S. (2023). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis unveil the roles of pseudouridine synthase (PUS) family proteins in rice development and stress response. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 29(12), 1981-2004.
- Ding, L. N., Li, M., Guo, X. J., Tang, M. Q., Cao, J., Wang, Z., ... & Tan, X. L. (2020). Arabidopsis *GDSL1* overexpression enhances rapeseed *Sclerotinia sclerotiorum* resistance and the functional identification of its homolog in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal*, 18(5), 1255-1270.
- Djami-Tchatchou, A. T., Harrison, G. A., Harper, C. P., Wang, R., Prigge, M. J., Estelle, M., & Kunkel, B. N. (2020). Dual role of auxin in regulating plant defense and bacterial virulence gene expression during *Pseudomonas syringae* PtoDC3000 pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(8), 1059-1071.
- Duke, K. A., Becker, M. G., Girard, I. J., Millar, J. L., Dilantha Fernando, W. G., Belmonte, M. F., & de Kievit, T. R. (2017). The biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 primes

- Brassica napus* defenses through distinct gene networks. *BMC Genomics*, 18, 1-16.
- FAO. (2022). Agricultural production statistics 2000-2020. *FAOSTAT analytical brief series no. 41*.
- Fernando, W. G. D., Nakkeeran, S., Zhang, Y., & Savchuk, S. (2007). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26(2), 100-107.
- Garcia-Ruiz, H. (2019). Host factors against plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, 20(11), 1588-1601.
- Ghanta, S., Bhattacharyya, D., Sinha, R., Banerjee, A., & Chatopadhyay, S. (2011). *Nicotiana tabacum* overexpressing γ -ECS exhibits biotic stress tolerance likely through NPR1-dependent salicylic acid-mediated pathway. *Planta*, 233: 895-910.
- Guo, H. S., Xie, Q., Fei, J. F., & Chua, N. H. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *The Plant Cell*, 17(5), 1376-1386.
- Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L., & Noble, W. S. (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*, 8, 1-9.
- Hajduch, M., Casteel, J. E., Hurrelmeyer, K. E., Song, Z., Agrawal, G. K., & Thelen, J. J. (2006). Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus*. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, 141(1), 32-46.
- Hawku, M. D., Goher, F., Islam, M. A., Guo, J., He, F., Bai, X., ... & Guo, J. (2021). TaAP2-15, an AP2/ERF transcription factor, is positively involved in wheat resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2080.
- Hewezi, T., Maier, T. R., Nettleton, D., & Baum, T. J. (2012). The *Arabidopsis* microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant Physiology*, 159(1), 321-335.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Li, W., Tran, L. S. P., & Mostofa, M. G. (2023). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the pathogenomic features of a global pathogen. *Cells*, 12(7), 1063.
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 41-66.
- Hu, P., Meng, Y., & Wise, R. P. (2009). Functional contribution of chorismate synthase, anthranilate synthase, and chorismate mutase to penetration resistance in barley-powdery mildew interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(3), 311-320.
- Ishibashi, K., Masuda, K., Naito, S., Meshi, T., & Ishikawa, M. (2007). An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13833-13838.
- Jahan, R., Siddique, S. S., Jannat, R., & Hossain, M. M. (2022). Cosmos white rot: First characterization, physiology, host range, disease resistance, and chemical control. *Journal of Basic Microbiology*, 62(8), 911-929.
- Jian, H., Ma, J., Wei, L., Liu, P., Zhang, A., Yang, B., ... & Liu, L. (2018). Integrated mRNA, sRNA, and degradome sequencing reveal oilseed rape complex responses to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) infection. *Scientific Reports*, 8(1), 10987.
- Jian, H., Wang, J., Wang, T., Wei, L., Li, J., & Liu, L. (2016). Identification of rapeseed microRNAs involved in early stage seed germination under salt and drought stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 658.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Kabbage, M., Yarden, O., & Dickman, M. B. (2015). Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. *Plant Science*, 233, 53-60.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30.
- Kazemi Oskuei, B. K., Yin, X., Hashiguchi, A., Bandehagh, A., & Komatsu, S. (2017). Proteomic analysis of soybean seedling leaf under waterlogging stress in a time-dependent manner. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1865(9), 1167-1177.
- Khangura, R., Beard, C., & Hills, A. (2015). Managing sclerotinia stem rot in canola. *Department of Agriculture and Food. Australian Government*.
- Kopriva, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Annals of Botany*, 97(4), 479-495.
- Künstler, A., Király, L., Kátay, G., Enyedi, A. J., & Gullner, G. (2019). Glutathione can compensate for salicylic acid deficiency in tobacco to maintain resistance to *tobacco mosaic virus*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1115.
- Li, C. X., Li, H., Sivasithamparam, K., Fu, T. D., Li, Y. C., Liu, S. Y., & Barbetti, M. J. (2006). Expression of field resistance under Western Australian conditions to *Sclerotinia sclerotiorum* in Chinese and Australian *Brassica napus* and *Brassica juncea* germplasm and its relation with stem diameter. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(10), 1131-1135.
- Li, M., Li, D., Tang, Y., Wu, F., & Wang, J. (2017). CytoCluster: a cytoscape plugin for cluster analysis and visualization of biological networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1880.

- Li, Q., Gao, Y., & Yang, A. (2020). Sulfur homeostasis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 8926.
- Li, X., Yu, B., Wu, Q., Min, Q., Zeng, R., Xie, Z., & Huang, J. (2021). OsMADS23 phosphorylated by SAPK9 confers drought and salt tolerance by regulating ABA biosynthesis in rice. *PLoS Genetics*, 17(8), e1009699.
- Liu, Q., Zhang, Y. C., Wang, C. Y., Luo, Y. C., Huang, Q. J., Chen, S. Y., ... & Chen, Y. Q. (2009). Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Letters*, 583(4), 723-728.
- Ma, N., Sun, P., Li, Z. Y., Zhang, F. J., Wang, X. F., You, C. X., ... & Zhang, Z. (2024). Plant disease resistance outputs regulated by AP2/ERF transcription factor family. *Stress Biology*, 4(1), 2.
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1), 73-105.
- Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, 38, 433-449.
- Nakai, Y., & Maruyama-Nakashita, A. (2020). Biosynthesis of sulfur-containing small biomolecules in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3470.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., ... & Jones, J. D. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436-439.
- Pal, K. K., & McSpadden Gardene, B. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant Health Instructor*, 2(5), 1117-1142.
- Parthasarathy, A., Cross, P. J., Dobson, R. C., Adams, L. E., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2018). A three-ring circus: metabolism of the three proteogenic aromatic amino acids and their role in the health of plants and animals. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 29.
- Pazhamala, L. T., Kudapa, H., Weckwerth, W., Millar, A. H., & Varshney, R. K. (2021). Systems biology for crop improvement. *The Plant Genome*, 14(2), e20098.
- Pelham, J. (1966). Resistance in tomato to *tobacco mosaic virus*. *Euphytica*, 15(2), 258-267.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347-375.
- Poritsanos, N., Selin, C., Fernando, W. G., Nakkeeran, S., & Kievit, T. D. (2006). A GacS deficiency does not affect *Pseudomonas chlororaphis* PA23 fitness when growing on canola, in aged batch culture or as a biofilm. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(12), 1177-1188.
- Priestman, M. A., Healy, M. L., Funke, T., Becker, A., & Schönbrunn, E. (2005). Molecular basis for the glyphosate-insensitivity of the reaction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase with shikimate. *FEBS Letters*, 579(25), 5773-5780.
- Prioretti, L., Gontero, B., Hell, R., & Giordano, M. (2014). Diversity and regulation of ATP sulfurylase in photosynthetic organisms. *Frontiers in Plant Science*, 5, 597.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011a). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 317-343.
- Robert-Seilaniantz, A., MacLean, D., Jikumaru, Y., Hill, L., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., & Jones, J. D. (2011b). The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *The Plant Journal*, 67(2), 218-231.
- Rubio, B., Cosson, P., Caballero, M., Revers, F., Bergelson, J., Roux, F., & Schurdi-Levraud, V. (2019). Genome-wide association study reveals new loci involved in *Arabidopsis thaliana* and *Turnip mosaic virus* (Tu MV) interactions in the field. *New Phytologist*, 221(4), 2026-2038.
- Saharan, G. S., & Mehta, N. (2008). Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. *Springer Science & Business Media*.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., & Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*, 1, 1-15.
- Sasaki, N., Matsumaru, M., Odaira, S., Nakata, A., Nakata, K., Nakayama, I., ... & Nyunoya, H. (2015). Transient expression of tobacco BBF1-related Dof proteins, BBF2 and BBF3, upregulates genes involved in virus resistance and pathogen defense. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89: 70-77.
- Sekula, B., Ruszkowski, M., & Dauter, Z. (2018). Structural analysis of phosphoserine aminotransferase (Isoform 1) from *Arabidopsis thaliana*—the enzyme involved in the phosphorylated pathway of serine biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 876.
- Sønderby, I. E., Geu-Flores, F., & Halkier, B. A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15(5), 283-290.
- Spooner, D. M., Gavrilenko, T., Jansky, S. H., Ovchinnikova, A., Krylova, E., Knapp, S., & Simon, R. (2010). Ecogeography of ploidy variation in cultivated potato (*Solanum* sect.

- Petota*). *American Journal of Botany*, 97(12), 2049-2060.
- Stallings, W. C., Abdel-Meguid, S. S., Lim, L. W., Shieh, H. S., Dayringer, H. E., Leimgruber, N. K., ... & Kishore, G. M. (1991). Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 5046-5050.
- Sullivan, C. S., & Ganem, D. (2005). MicroRNAs and viral infection. *Molecular Cell*, 20(1), 3-7.
- Sun, T., Zhou, Q., Zhou, Z., Song, Y., Li, Y., Wang, H. B., & Liu, B. (2022). SQUINT Positively Regulates Resistance to the Pathogen *Botrytis cinerea* via miR156-SPL9 Module in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 63(10), 1414-1432.
- Tarver, J. E., Sperling, E. A., Nailor, A., Heimberg, A. M., Robinson, J. M., King, B. L., ... & Peterson, K. J. (2013). miRNAs: small genes with big potential in metazoan phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2369-2382.
- Tian, B., Xie, J., Fu, Y., Cheng, J., Li, B. O., Chen, T., ... & Jiang, D. (2020). A cosmopolitan fungal pathogen of dicots adopts an endophytic lifestyle on cereal crops and protects them from major fungal diseases. *The ISME Journal*, 14(12), 3120-3135.
- Tzin, V., & Galili, G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 8, e0132.
- Wang, H., Lin, J., Li, X. G., & Chang, Y. (2015). Genome-wide identification of pear HD-Zip gene family and expression patterns under stress induced by drought, salinity, and pathogen. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(9), 189.
- Wu, J., Cai, G., Tu, J., Li, L., Liu, S., Luo, X., ... & Zhou, Y. (2013). Identification of QTLs for resistance to Sclerotinia stem rot and BnAC. IGMT5. a as a candidate gene of the major resistant QTL SRC6 in *Brassica napus*. *PloS One*, 8(7), e67740.
- Wu, J., Zhao, Q., Yang, Q., Liu, H., Li, Q., Yi, X., ... & Zhou, Y. (2016). Comparative transcriptomic analysis uncovers the complex genetic network for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Scientific Reports*, 6(1), 19007.
- Xie, L., Jian, H., Dai, H., Yang, Y., Liu, Y., Wei, L., ... & Liu, L. (2023). Screening of microRNAs and target genes involved in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) infection in *Brassica napus* L. *BMC Plant Biology*, 23(1), 479.
- Xu, B., Gong, X., Chen, S., Hu, M., Zhang, J., & Peng, Q. (2021). Transcriptome analysis reveals the complex molecular mechanisms of *Brassica napus*-*Sclerotinia sclerotiorum* interactions. *Frontiers in Plant Science*, 12, 716935.
- Yan, L. Y., Zhang, H. J., Zheng, Y. Q., Cong, Y. Q., Liu, C. T., Fan, F., ... & Duan, M. J. (2021). Transcription factor OsMADS25 improves rice tolerance to cold stress. *Yi Chuan= Hereditas*, 43(11), 1078-1087.
- Yang, X., Zhang, M., Xi, D., Yin, T., Zhu, L., Yang, X., ... & Liu, X. (2024). Genome-wide identification and expression analysis of the MADS gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*) infested with pathogenic bacteria. *Peer J*, 12, e17001.
- Yin, H., Hong, G., Li, L., Zhang, X., Kong, Y., Sun, Z., ... & He, Y. (2019). miR156/SPL9 regulates reactive oxygen species accumulation and immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, 109(4), 632-642.
- Yu, Y. H., Bian, L., Wan, Y. T., Jiao, Z. L., Yu, K. K., Zhang, G. H., & Guo, D. L. (2019). Grape (*Vitis vinifera*) VvDOF3 functions as a transcription activator and enhances powdery mildew resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 143, 183-189.
- Zhang, L. L., Li, Y., Zheng, Y. P., Wang, H., Yang, X., Chen, J. F., ... & Wang, W. M. (2020). Expressing a target mimic of miR156fhl-3p enhances rice blast disease resistance without yield penalty by improving SPL14 expression. *Frontiers in Genetics*, 11, 327.
- Zhang, Y., Fernando, W. G., Kievit, T. R. D., Berry, C., Daayf, F., & Paulitz, T. C. (2006). Detection of antibiotic-related genes from bacterial biocontrol agents with polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(5), 476-481.
- Zhou, S., Richter, A., & Jander, G. (2018). Beyond defense: multiple functions of benzoxazinoids in maize metabolism. *Plant and Cell Physiology*, 59(8), 1528-1537.
- Zimmermann, S. E., Blau, S., Frerigmann, H., & Krueger, S. (2021). The phosphorylated pathway of serine biosynthesis is crucial for indolic glucosinolate biosynthesis and plant growth promotion conferred by the root endophyte *Colletotrichum tofieldiae*. *Plant Molecular Biology*, 107(1), 85-100.
- Zomorodian, A., Kavoosi, Z., & Momenzadeh, L. (2011). Determination of EMC isotherms and appropriate mathematical models for canola. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 407-413.
- Zuo, D. P., Wang, B., Liu, Y. Z., Chen, Z. S., Hu, R. J., He, M. J., ... & Han, C. G. (2024). The triose phosphate/phosphate translocator exports photosynthetic glyceraldehyde 3-phosphate from chloroplasts to trigger antimicrobial immunity in plants. *bioRxiv*, 2024-01.

