

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

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)

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.



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 روغنی مورد توجه قرار گیرد (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 بیماری‌زای کلزا، قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary می‌باشد که به عنوان عامل پوسیدگی ساقه اسکروتینیا (SSR)، علاوه بر کاهش عملکرد محصول، کمیت و کیفیت روغن آن را بطور چشمگیری تحت تاثیر قرار می‌دهد (Aggarwal et al., 1997; Saharan and Mehta, 2008). از اصطلاحات متفاوتی نظیر کپک سفید، پوسیدگی پنبه‌ای، پوسیدگی ساقه و پوسیدگی طوقه برای بیان بیماری ناشی از این بیمارگر قارچی استفاده شده است (Jahan et al., 2022) که از این میان، کپک سفید متداول‌تر است. دامنه میزبانی خاصی برای این بیمارگر تعریف نشده است و قادر است بیش از صد گونه گیاهی تک‌لپه و دولپه را آلوده کند. از عوامل موثر بر خاصیت بیمارزایی این قارچ می‌توان به توانایی آن در تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، اگزالیک اسید و پروتئین‌های افکتور اشاره کرد. هر چند که توالی یابی جامع ژنوم این بیمارگر، اطلاعات زیادی در خصوص چگونگی سازماندهی ژنوم و عوامل موثر بر رشد و بیمارزایی آن ارائه داده است، با این حال اساس ملکولی بیماری‌زایی آن هنوز به طور کامل مشخص نشده است (مقاله مروری 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 کلونیزه می‌کند، خاصیت نکروتروفی منحصر بفردی دارد (مقاله مروری Hossain et al., 2023). با این حال، وجود یک فاز بیوتروفیک جزئی در چرخه آلودگی این قارچ مشاهده شده است. از این رو این بیمارگر را به صورت دقیق‌تر می‌توان جزء همی‌بیوتروف‌ها طبقه‌بندی کرد (Kabbage et al., 2015). ایجاد توده‌های ریشه‌ای سختینه‌آویزگی مشترک همه اعضای Sclerotiniaceae می‌باشد (Bolton et al., 2006). 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 بیمارگر 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 میزبانی وسیع بیمارگر، کنترل بیماری با استفاده از شیوه‌های زراعی بسیار سخت و چالش‌برانگیز است (Wu et al., 2016). کشت انواع کلزا مقاوم به بیماری، کارآمدترین و مقرون به صرفه‌ترین راه برای پیشگیری و کنترل SSR است (Wu et al., 2013; Barbetti et al., 2014; Bastien et al., 2014). این‌حال، عدم وجود ژرم پلاسما مقاوم در ارقام کلزای کشت شده و خوی‌شاوندان نزدیک (Li et al., 2006; Wu et al., 2016; Wu et al., 2013)، اصلاح ملکولی آن را با محدودیت مواجه ساخته است. دامنه گستره میزبانی 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 بیولوژیکی به عنوان جایگزینی مطلوب برای حفاظت از محصولات کشاورزی مطرح شده است (Duke et al., 2017). بدین ترتیب که میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا با ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاهان، مکانیسم‌های دفاعی میزبان را

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) و به واسطه شبکه‌های پیام‌رسان هورمونی کنترل می‌شوند (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011a).

در برهم‌کنش گیاه کلزا و قارچ *S. sclerotiorum* اهمیت برخی عوامل موثر در بیماری‌زایی نظیر مسیره‌های وابسته به پروکسیزوم همراه با تجزیه دیواره سلولی و سم‌زدایی متابولیت‌های میزبان تایید شد (Chittem *et al.*, 2020). در خصوص سازوکارهای پاسخ‌های دفاعی ذاتی گیاه کلزا در برابر آلودگی SSR، مشخص شده است که شبکه‌های متابولیکی که به واسطه پیام‌رسان‌های هورمونی خصوصاً اسید سالیسیلیک (SA) تنظیم می‌شوند، در القاء مقاومت گیاه بر علیه این آلودگی نقش دارند (Xu *et al.*, 2021). همچنین مشخص شده است که بیش بیان 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 میکروارگانیزم‌های 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 میکروارگانیزم‌هایی نامزدهای خوبی برای جایگزینی مواد شیمیایی هستند (Pal and McSpadden-Gardene, 2006). *Pseudomonas chlororaphis* PA23 یک عامل کنترل زیستی است که قادر به جلوگیری از رشد *S. sclerotiorum* در گونه‌های حساس *B. napus* است (Fernando *et al.*, 2007). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که PA23 به طور مستقیم، *S. sclerotiorum* را از طریق ترشح متابولیت‌های ضد قارچی مورد حمله قرار می‌دهد (Poritsanos *et al.*,

تقویت می‌کنند و با "القای سامانه دفاعی" منجر به واکنش‌های قوی‌تر و سریع‌تر گیاه به حملات بعدی بیمارگر می‌شوند (Pieterse *et al.*, 2014).

امروزه به واسطه پیشرفت فناوری توالی‌یابی نسل بعدی از روش‌های تراز سکریتومیکس برای درک مکانیسم‌های ملکولی برهم‌کنش‌های گیاه میزبان با بیمارگرها استفاده می‌شود (Xu *et al.*, 2021). برای اجرای موفقیت آمیز عوامل کنترل بیولوژیک 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 با ادغام داده‌های Omics نظیر داده‌های حاصل از رونویسی، پروتئوم و متابولوم می‌تواند با پیش‌بینی عملکردهای سلولی و مدل‌سازی پاسخ‌های گیاه به عوامل تنش‌زای 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.

پیشینه پژوهش

یکی از سازوکارهای دفاعی در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان، ایجاد موانع ریخت‌شناختی و ساختاری مانند کوتیکول، موم و دیواره سلولی می‌باشد (Atkinson and Urwin 2012; Muthamilarasan and Prasad 2013). از سوی دیگر فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی از

^۴Microbial- or pathogen-associated molecular patterns

^۵Effector molecules

1Defense priming

2Biocontrol agents (BCAs)

3System biology

sclerotiorum و مدیریت این بیماری در کلزا و سایر گیاهان در اختیار به‌نژادگران قرار دهد.

روش‌شناسی پژوهش

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

و Duke (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-seq) مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که حضور PA23، مسیرهای دفاعی القاء شده توسط *S. sclerotiorum* از جمله تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و القای مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) را کاهش داد. با این حال، این عامل کنترل زیستی توانست علاوه بر تقابل مستقیم با *S. sclerotiorum*، با آماده‌سازی شبکه‌های دفاعی میزبان، 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، عملکرد و چگونگی تقابل آن با سایر ژن‌های بیان شده ارائه نداد. لذا در مطالعه کنونی ابتدا 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 (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 پروموتور این ژن‌ها نیز اطلاعات مفیدی در خصوص عناصر تنظیمی (CREs) ژن‌های محوری مرتبط با پاسخ‌های دفاعی ارائه داد. همچنین میکروRNA^۴ های 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 مفیدی جهت توسعه محصولات تراریخته مقاوم به آلودگی *S.*

6Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
7Molecular function
8Cellular component
9Biological process
10Identifying Protein Complex Algorithm

1Hub genes
2Protein-Protein interaction
3Cis-regulatory elements
4MicroRNAs
5Subnetwork

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 برهم‌کنش از بین تمامی برهم‌کنش‌های پروتئینی موجود در شبکه شنا سایی شدند. لیست پروتئین‌های کلیدی و مشخصات آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. برهم‌کنش 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 برهم‌کنشی آن‌ها با سایر ژن‌ها، در بروز پاسخ‌های دفاعی تأثیرگذارتر است.

بر اساس جدول ۱، یکی از ژن‌های کلیدی شنا سایی شده، *BnaC04g26180D* می‌باشد که آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز^۲ (GR) را کد می‌کند. این آنزیم سبب تولید فرم احیا شده گلوکاتایون 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 گلوکاتایون 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*).

BnaA03g57920D و *BnaC03g44420D* پروتئینی را کد می‌کنند که حامل دومین TIM barrel می‌باشد (جدول ۱). پروتئین‌های خانواده آلدولاز نوع TIM-barrel نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های فتوسنتزی و متابولیکی

استفاده شد. سپس ژن‌های هر خوشه در نسخه STRING برای یافتن مسیرهای KEGG بررسی شدند. جهت شناسایی موتیف‌های پرموتری ژن‌های کلیدی، ابتدا با استفاده از سرویس مبتنی بر وب Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org>)، توالی 1Kb از ناحیه غیر قابل ترجمه 5'UTR ژن‌های شناسایی شده، استخراج شد. از ابزار Tomtom به آدرس <http://meme-suite.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 ارائه داد که از آن میان، 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 <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 Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org>) استخراج شد. miRNAهای شناخته شده کلزا نیز از سرور miRbase (<https://www.mirbase.org/>) استخراج شدند. سپس، مقایسه توالی ژن‌های کلیدی با miRNAهای شناخته شده کلزا با استفاده از سرور psRNATarget (<http://lantgrn.noble.org/psRNATarget/>) نشان داد که کدام miRNAها با ژن‌های هدف برهم‌کنش دارند. این لیست جهت ترسیم شبکه به نرم افزار Cytoscape وارد شد.

یافته‌های پژوهش

شبکه PPI و شناسایی قطب‌های ژنی

شبکه برهم‌کنشی پروتئینی (PPI) بر اساس لیست ژن‌هایی با بیان متمایز و با استفاده از STRING و Cytoscape ترسیم شد (شکل ۱). این شبکه برهم‌کنش ژن‌هایی که در پاسخ به آلودگی SSR به دنبال القای

سبب تولید سیستئین می شود (Kopriva, 2006). سیستئین اولین ترکیب آلی حاوی S برای سنتز سایر ترکیبات مانند متیونین، سولفولوپیدها، ویتامین ها، کوآنزیم ها و گروه های پروستتیک به کار گرفته می شود (Nakai and Maruyama-Nakashita 2020; Li et al., 2020).

BnaC02g25850D یکی دیگر از ژن های کلیدی شناسایی شده می باشد (جدول ۱) که آنزیم گلیسرالدهید-۳-فسفات دهیدروژناز^۹ (GAPDH) را کد می کند که در چرخه کالوین-بنسون (CBC)، فرایند تبدیل ۳-۱ 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 رسانی 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 ژنتیکی و بیوشیمیایی تکمیلی تر دارد (Zuo et al., 2024).

یکی دیگر از ژن های کلیدی در فعال سازی سامانه دفاعی توسط PA23 در برابر آلودگی *Sclerotium sclerotiorum* *BnaA03g01690D* می باشد (جدول ۱) که زیرواحد آلفای آنترانیلات سنتاز^{۱۰} را کد می کند که به عنوان یکی از آنزیم های محدودکننده سرعت در سنتز تربیتوفان مطرح می باشد. مطالعات قبلی نقش ژن های موثر در مسیر شیکیمیک اسید (نظیر ژن آنترانیلات سنتاز) که منجر به بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک می شوند را در مقاومت گیاه جو در برابر نفوذ قارچ *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*، عامل بیماری سفیدک پودری تأیید کرده بودند (Hu et al., 2009).

BnaC03g62400D که آنزیم فسفوسرین آمینوترانسفراز^{۱۲} (PSAT) را کد می کند، یکی از ژن های

BnaC04g56880D یکی دیگر از ژن های کلیدی شناخته شده در پاسخ دفاعی بر علیه آلودگی SSR است (جدول ۱) که با کد کردن آنزیم ۳-فسفوشیکیمات ۱-کربوکسی وینیل ترانسفراز^{۱۱} (که همان ۵-انول پیروویل شیکیمات ۳-فسفات (EPSP) سینتاز است)، نقش مهمی در تولید اسیدهای آمینه آروماتیک نظیر فنیل آلانین، تیروزین و تربیتوفان دارد. این آنزیم، یک آنزیم کلیدی در مسیر اسید شیکیمیک^{۱۳} است که به طور گسترده در گیاهان عالی و میکروارگانیزم ها (باکتری ها و قارچ ها) یافت می شود و نقش مهمی در بیوسنتز کوریزمات و اسیدهای آمینه آروماتیک ایفاء می کند (Stallings et al., 1991; Santos-Sánchez et al., 2019). بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک و ترکیبات معطر از طریق مسیر شیکیمیک اسید به عنوان یکی از اجزای بقای گیاه و میکروب ها ضروری است (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).

BnaA09g20370D یکی دیگر از ژن های کلیدی شناسایی شده در این مطالعه (جدول ۱)، آنزیم APS ردوکتاز^۴ را کد می کند که به عنوان یکی از آنزیم های کلیدی اسیمیلاسیون سولفات^۵ 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 سولفوریلاز^۶ به آدنوزین ۵-فسفو سولفات^۷ (APS) تبدیل می شود (Prioretti et al., 2014). APS توسط APS ردوکتاز به سولفیت احیا شده و سپس توسط سولفیت ردوکتاز^۸ (SIR) به سولفید احیاء می شود. سولفید از طریق فعالیت آنزیم های خاص به اسکلت کربنی O-S (ستیل سرین OAS) وارد می شود و

7 Adenosine 5'-phosphosulfate (APS)

8 Sulfite reductase (SIR)

9 Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase

10 Calvin-Benson cycle (CBC)

11 Anthranilate synthase alpha subunit 1

12 Phosphoserine aminotransferase

13-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase

25-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase

3 Shikimic acid

4 APS reductase

5 sulfate assimilation

6 ATP sulfurylase

ملکولی (MF) اغلب شامل فعالیت‌های کاتالیتیکی، اتصال یون‌ها، اتصال مولکول‌های کوچک، اکسیدو ردوکتاز، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، فعالیت گلوکوتایون ترانسفراز، اتصال گلوکوتایون 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 عمده 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 بیولوژیکی 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 گلوکوتایون و سولفور، بیوسنتز 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.

محوری در این مطالعه شناخته شده است (جدول ۱). این آنزیم که واکنش ترانس آمیناسیون قابل برگشت ۳- فسفوهیدروکسی پیرووات (3-PHP) به ۳-فسفوسرین^۲ (PSer) را در حضور L-گلوتامات (Glu) کاتالیز می‌کند، جزئی از مسیر فسفریلاسیون بیوسنتز سرین^۳ (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 فعال می‌شود (Benstein *et al.*, 2013). به علاوه در گیاهانی که این مسیر در آن‌ها غیرفعال بود، اثرات مثبت قارچ *Colletotrichum tofieldiae* در رشد گیاه مشاهده نشد (Zimmermann *et al.*, 2021).

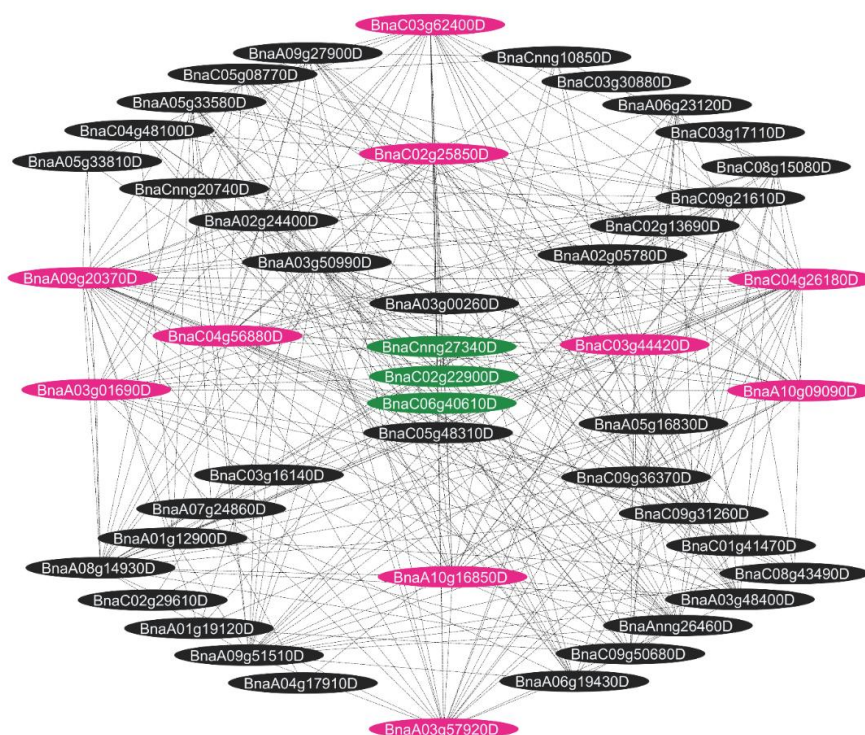
BnaA10g09090D و *BnaA10g16850D* از ژن‌های کلیدی شناسایی شده در پاسخ دفاعی حاصل از سامانه القایی PA23 می‌باشند (جدول ۱) که در مسیر بیوسنتزی تریپتوفان نقش دارند. در گیاهان، اسید آمینه آروماتیک تریپتوفان سنتز پروتئین ضروری است و پیش‌ساز هورمون‌های رشد اکسین، آلکالوئیدها، نیاسین (ویتامین B3) و متابولیت‌های دفاعی نظیر ایندول گلوکوزینولات‌ها است (Howe and Jander, 2008; Tzin and Galili, 2010; Sønderby *et al.*, 2010; Maeda and Dudareva, 2012; Zhou *et al.*, 2018). از این رو، مسیر تریپتوفان با تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه نقش محوری در بروز پاسخ‌های دفاعی علیه بیمارگرها در سلسله 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 بیوسنتزی، به ویژه آن‌هایی که مربوط به سنتز ترکیبات آروماتیک، نیتروژنی و سولفور هستند در پاسخ به القای سامانه دفاعی PA23 در برابر آلودگی SSR فعال شده‌اند (شکل ۳). اصطلاحات غالب در GO برای عملکرد

3Phosphorylated pathway of serine biosynthesis (PPSB)

13-phosphohydroxypyruvate
23-phosphoserine



شکل ۲. زیر شبکه 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 خوشه 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 PA23 در کلزا با استفاده از افزونه CytoHubba

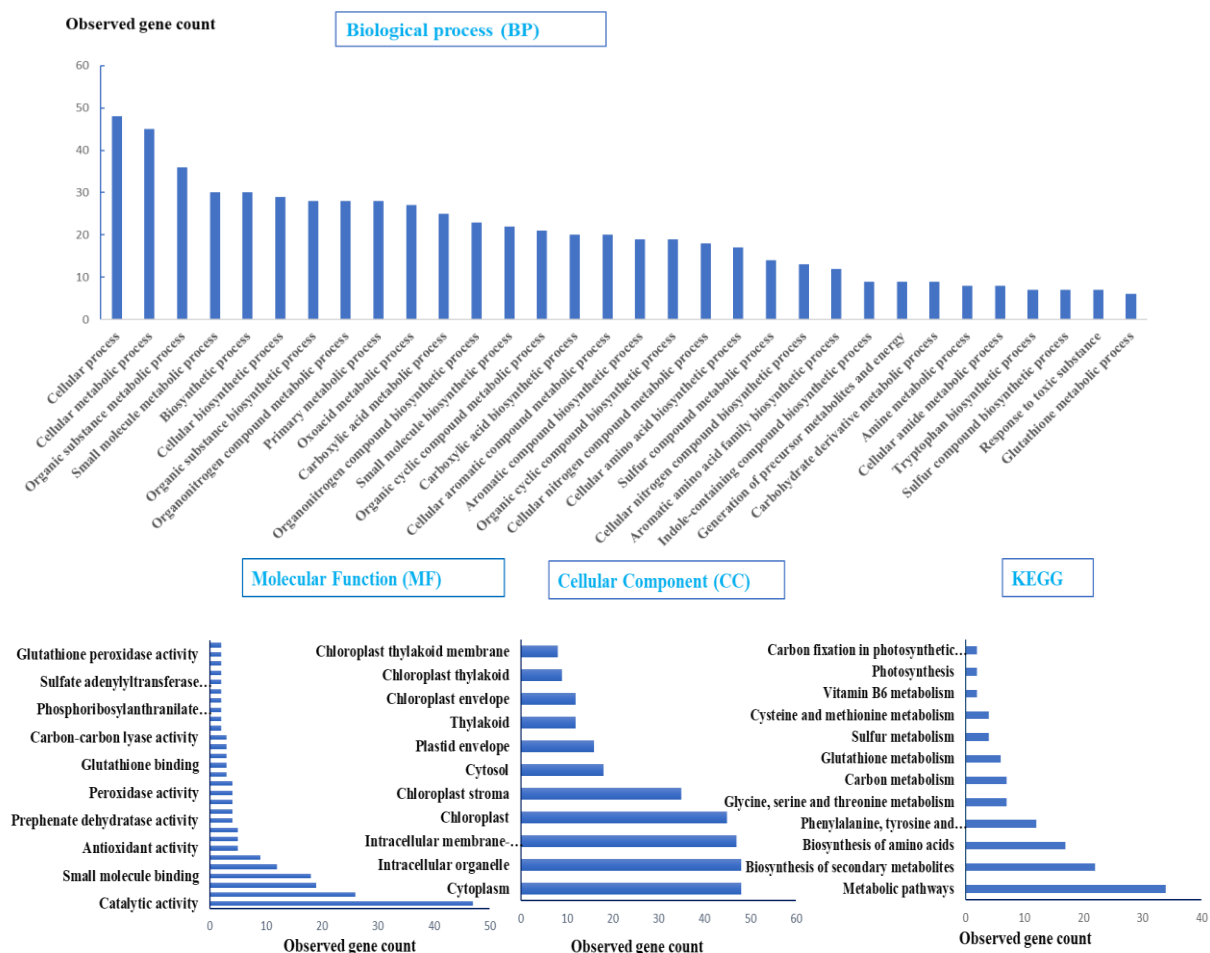
Table 1. Ranking of identified hub genes in response to *S. sclerotiorum* infection following PA23-induced defense priming in rapeseed using CytoHubba plugin

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	<i>BnaC04g26180D</i>	1
Aldolase-type TIM barrel family protein	DMNC, MCC	<i>BnaC03g44420D</i>	1,2
Aldolase-type TIM barrel family protein	MCC, DMNC	<i>BnaA03g57920D</i>	1,2
3-phosphoshikimate 1- carboxyvinyl transferase (Belongs to the EPSP synthase family)	DMNC, MCC	<i>BnaC04g56880D</i>	1,4
APS reductase 1 (APR1, APR, PRH19, ATAPR1)	MNC, Degree	<i>BnaA09g20370D</i>	2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 2 (GAPCP-2)	MNC, Degree	<i>BnaC02g25850D</i>	3
tryptophan biosynthesis 1 (TRP1, PAT1)	MCC, MNC, Degree	<i>BnaA10g16850D</i>	3,4
Anthranilate synthase alpha subunit 1 (ASA1, TRP5, AMT1, WEI2, JDL1)	MCC, DMNC	<i>BnaA03g01690D</i>	3,5
Phosphoserine aminotransferase (PSAT)	Degree, MNC	<i>BnaC03g62400D</i>	5
tryptophan synthase beta subunit 1 (TSB1, TRPB, TRP2, ATTBS1)	DMNC	<i>BnaA10g09090D</i>	5

هم‌پوشانی بین مسیرهای متابولیکی شناسایی شده در KEGG و مازول‌های 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 بیوسنتز 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 این رو، 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 ICA افزونه Cytocluster در جدول ۲ آورده شده است. این گروه‌بندی نشان داد که همگی خوشه‌ها بدست آمده در رتبه بندی ۱ تا ۴ در مسیرهای مربوط به بیوسنتز اسیدهای آمینه تریپتوفان، فیل‌آلانین و تیروزین، متابولیسم ویتامین B6، متابولیسم سرین، گلاستین و ترئونین و بیوسنتز اسیدهای آمینه مشترک بودند. با این حال، تثبیت کربن 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

S. sclerotiorum به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در گیاه کلزا

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

بررسی موتیف پروموتری ژن های کلیدی

برای شناسایی موتیف های حفاظت شده و عناصر تنظیمی Cis ژن های کلیدی شناسایی شده در این مطالعه، توالی یک کیلوباز (1Kb) از ناحیه 5'UTR این ژن ها از سرویس مبتنی بر وب Ensemble Plant بازیابی و با استفاده از ابزار MEME، موتیف های کلیدی با طول ۲۹-۱۵ جفت باز در ناحیه پروموتری این ژن ها شناسایی شدند. چندین عملکرد بیولوژیکی برای موتیف های شناسایی شده با استفاده از ابزار GOMO بدست آمد که مشخصات جزئی تر آن ها در جدول ۳ نشان داده شده است. مسیرهای پیام رسان وابسته به اکسین به عنوان یکی از عملکردهای ملکولی (MF) موتیف های موجود در ناحیه پروموتری ژن های کلیدی شناسایی شده در این مطالعه معرفی شد. مشخص شده است که اکسین در گیاه میزبان به عنوان یک مولکول پیام رسان میکروبی، بیان ژن های بیماریزایی را در باکتری تنظیم می کند و نقش مهمی در تنظیم پاسخ های دفاعی گیاه در طول فرایند بیماریزایی عوامل میکروبی دارد (Djami-Tchatchou et al., 2020).

فعالیت سودوپیرویدین سینتاز نیز یکی دیگر از عملکردهای ملکولی موتیف های 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 تنش های غیر زنده نظیر خشکی، شوری و گرما القاء می شوند (Dhingra et al., 2023). همچنین نقش آن در کنترل آلودگی و ویروس موزا ئیک برآو یز (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 پروموتری ژن های کلیدی شناسایی شدند. در تحقیقات قبلی نقش این عوامل در القاء مقاومت در برابر بیماریگرهای گیاهی تأیید شده بود (Sasaki et al., 2015; Yu et al., 2019).

از فاکتورهای شناخته شده در ناحیه CRE ژن های هدف مورد مطالعه، AP2/EREBP می باشد. فاکتورهای AP2 نقش مهمی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش های زنده و غیر زنده دارند. در مطالعه ای خاموشی ژن کد کننده این فاکتور رونویسی توسط ویروس موزا ئیک نواری جو (خاموشی ژن بواسطه ویروس) حساسیت گندم به *Puccinia striiformis f. sp. Tritici* را افزایش داد (Hawku et al., 2021). همچنین مشخص شده است که فاکتورهای AP2/ERF از طریق تأثیر بر مسیر MAPK، تنظیم بیان ژن های مرتبط با مسیرهای پیام رسان هورمونی و بیوسنتز متابولیت های ثانویه، در بروز پاسخ های ایمنی در برابر بیماریگرهای گیاهی نقش دارند (Ma et al., 2024). یکی دیگر از خانواده های ژنی شناخته شده که با توالی های CRE در ناحیه پروموتری ژن های 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 تنش های محیطی نظیر شوری، خشکی (Li et al., 2021) و سرما (Yan et al., 2021) تأیید شده است. با این حال اطلاعات اندکی در خصوص پاسخ آن ها به محرک های زیستی گزارش شده است. اخیراً نقش یکی از اعضای این خانواده ژنی در *Citrus sinensis* در برابر آلودگی باکتری های بیماریزا تأیید شده است (Yang et al., 2024). HD-ZIP که منحصرأ 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 بیوسنتز لیپیدها و انتقال آن ها، در پاسخ به تنش های زیستی نیز نقش دارند (Chew et al., 2013; Wang et al., 2015).

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
بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متابولیسم ویتامین B6، بیوسنتز آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism تثبیت کربن Carbon fixation	506	24	1
بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متابولیسم ویتامین B6، بیوسنتز آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism تثبیت کربن Carbon fixation	487	22	2
بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متابولیسم ویتامین B6، بیوسنتز آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism متابولیسم سیستئین و متیونین Cysteine and methionine metabolism	377	20	3
بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis متابولیسم ویتامین B6، بیوسنتز آمینو اسیدها Vitamin B6 metabolism, Biosynthesis of amino acids متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین Glycine, serine and threonine metabolism متابولیسم سولفور Sulfur metabolism	376	20	4

جدول ۳. موتیف‌های حفاظت شده در پرموتر 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

این (and Ganem, 2005; Navarro *et al.*, 2006) ریز RNAها با تنظیم بیان ژن‌هایی که در پاسخ‌های دفاعی نقش دارند، به تقویت مقاومت گیاه در برابر بیمارگرها کمک می‌کنند. به عنوان مثال در *Arabidopsis thaliana* miR396 و miR393 به ترتیب در پاسخ دفاعی به *Pst* tomato و *Pseudomonas syringae* pv نقش دارند (Navarro *et al.*, 2006; Hewezi *et al.*, 2012). در پاسخ به آلودگی *Pst*، miR393 با تنظیم پیام‌رسانی اکسین و تنظیم مسیر گلوکوزینولات در واکنش

شناسایی miRNAهای ژن‌های کلیدی

miRNAها به عنوان RNAهای غیرکدکننده، با اتصال به مناطق غیر قابل ترجمه mRNA (3'UTR) (Tarver *et al.*, 2013)، نقش‌های کلیدی در فرآیندهای بیولوژیکی متنوع نظیر رشد، اندام‌زایی، 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 آلودگی‌های میکروبی در گیاهان ایفاء می‌کنند (Sullivan

بیانش توسط دسته‌ای از miRNAهای خانواده miR6028، miR6032 و miR172 a/d تنظیم می‌شود (شکل ۴). بر اساس بررسی مطالعات قبلی مشخص شد که از بین miRNAهای با بیان متمایز آذر پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* بیان miR6028 و miR395 d/e/f در واریته مقاوم نسبت به واریته حساس کلزا کاهش یافت (Xie *et al.*, 2023). همچنین در مطالعه دیگری میزان بیان miR6028 ۴۸ ساعت پس از تلقیح گیاه کلزا با *S. sclerotiorum* بطور معنی‌داری کاهش یافت (Jian *et al.*, 2018). با توجه به نقش منفی miRNAها در تنظیم بیان ژن‌های هدف در مرحله رونویسی یا بعد آن، کاهش بیان این ریزRNAها می‌تواند در تقویت بیان ژن‌های هدف و تقویت پاسخ‌های دفاعی علیه بیماری SSR در کلزا نقش مثبتی داشته باشد. در پیش‌بینی برهم‌کنش miRNA و ژن‌های کلیدی مورد مطالعه مشخص شد بیان ژن *BnaA10g09090D* توسط اعضای خانواده miR156 (شکل ۴). ژن *BnaA10g09090D* یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی اسیدآمینو تریتوفان است که تنظیم بیان آن با توجه به نقش کلیدی آن در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نظیر IGAها و بروز پاسخ‌های ایمنی در برابر آلودگی‌های 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 گیاهی مختلف از جمله *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).

نتیجه‌گیری

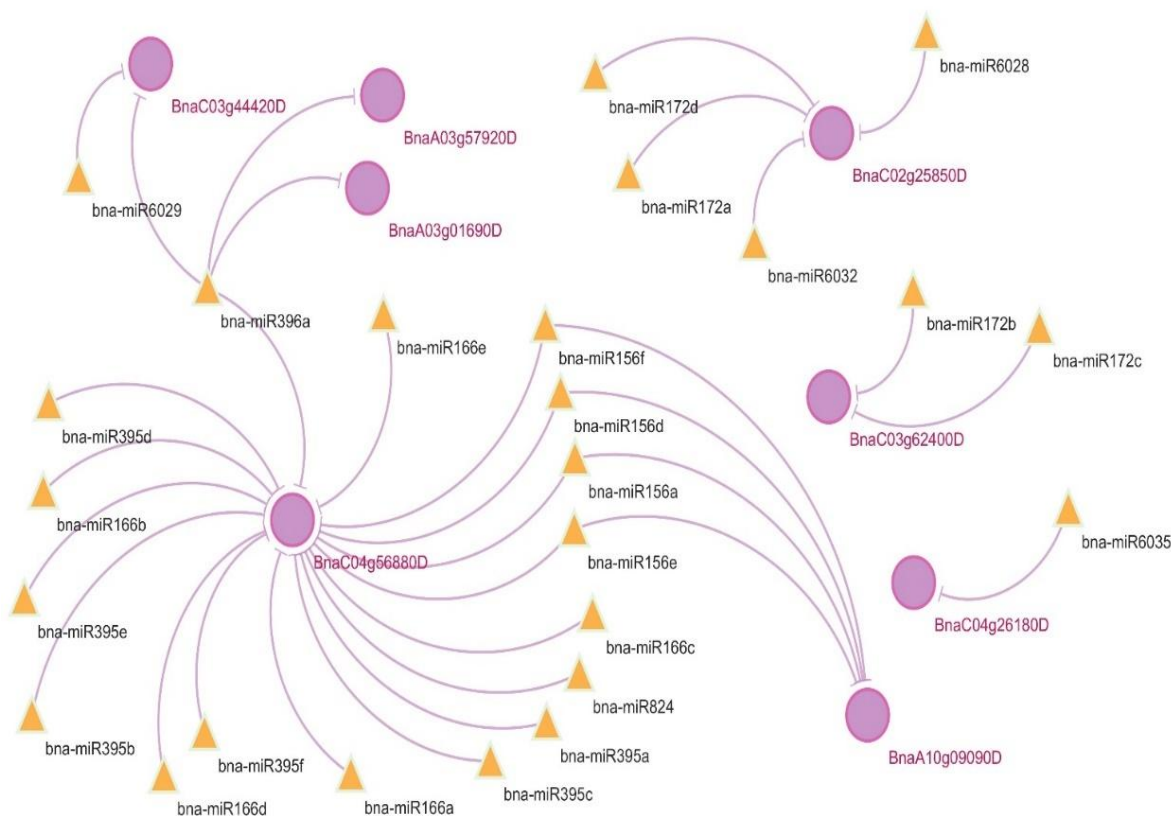
با توجه به اینکه پوسیدگی ساقه اسکروتینیا هر ساله خسارات سنگینی به مزارع کلزا وارد می‌کند، لذا بررسی سازوکارهای مولکولی مقاومت به بیمارگر *S. sclerotiorum* توسط PA23 به توسعه استراتژی‌های جدید برای کنترل بیماری و ایجاد ارقام متحمل کمک می‌کند. یافته‌های مطالعه اخیر نشان داد که ژن‌های

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

در مطالعه حاضر جهت پیش‌بینی miRNAهایی که با ژن‌های کلیدی برهم‌کنش دارند، از برنامه وب محور psRNA Target استفاده شد. شکل ۴ برهم‌کنش این miRNAها با ژن‌های کلیدی شناخته شده در این مطالعه را نشان می‌دهد. در مجموع ۲۵ miRNA شناسایی شد که متعلق به ده خانواده حفاظت شده miR172، miR395، miR6028، miR6029، miR6032، miR6035، miR166، miR156، miR396، miR824 و miR824 بودند که بیان ژن‌های *BnaC04g56880D*، *BnaC02g25850D*، *BnaC03g62400D*، *BnaA10g09090D*، *BnaC04g26180D*، *BnaA03g57920D*، *BnaC03g44420D* و *BnaA03g01690D* را در سطح رونویسی و بعد آن تنظیم می‌کنند (شکل ۴). در مطالعات پیش‌بینی، نقش miRNAهای miR172، miR395، miR166، miR6028 و miR156 در پاسخ گیاه کلزا به بیماری SSR با استفاده از مطالعه گسترده ژنوم و روش‌های توالی‌یابی توان بالایی تأیید شده بود (Xie *et al.*, 2023; Jian *et al.*, 2018). بر اساس پیشگویی برهم‌کنش mRNA/miRNA از بین ژن‌های کلیدی شناسایی شده، بیشترین برهم‌کنش را با miRNAها *BnaC04g56880D* نشان داد (شکل ۴). این ژن که یکی از ژن‌های کلیدی در بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک مسیر شیکیمیات می‌باشد، توسط miRNAهای miR166، miR395 a/b/c/d/e/f، miR824 و 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 بیوسنتز GAP و فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی وابسته به MAPK نقش دارد،

و ترکیبات آنتی اکسیدانی در تنظیم ترکیبات ROS و سم زدایی سلول، بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک و متابولیت های دفاعی را در القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 بر علیه آلودگی SSR تأیید کرد. نتایج تحلیل پروموتور نشان داد که عنا صر تنظیمی (CREs)، تنظیم بیان ژن های محوری مرتبط با مقاومت را بر عهده دارند. علاوه بر این، miRNA های مهمی از ژن های محوری شنا سایی شدند که در پاسخ به بیماری نقش دارند. از این رو یافته های این پژوهش می تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص اصلاح ژنتیکی مقاومت کلزا به *S. sclerotiorum* در اختیار به نژادگران قرار دهد.

کلیدی در کلزا در پاسخ به PA23 در طول آلودگی SSR عمدتاً در حفظ و بازیابی مسیرهای متابولیکی و فعالیت فتوسنتزی، کنترل وضعیت اکسیداسیون / احیای (redox) سلولی، فعال سازی پیام رسانی های دفاعی وابسته به MAPK و القاء شبکه رونویسی، بیوسنتز هورمون های گیاهی، بیوسنتز کوریزمات و اسیدهای آمینه آروماتیک در مسیر شیکیمات، بیوسنتز متابولیت های دفاعی نظیر ایندول گلوکوزینولات ها، تنظیم اسیمیلایون سولفور و بیوسنتز سیستمین دخیل هستند. بررسی هستی شناسی، مسیرهای KEGG و آنالیز خوشه بندی قطب های ژنی، اهمیت فرآیند های متابولیکی و دفاعی گیاه به ویژه فتوسنتز و تولید انرژی، فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز



شکل ۴. پیش بینی miRNA های احتمالی در تنظیم بیان ژن های کلیدی در پاسخ به آلودگی *S. sclerotiorum* به دنبال القای سامانه دفاعی حاصل از PA23 در گیاه کلزا با استفاده از ابزار psRNATarget (مثلث های نارنجی miRNA ها و دایره های بنفش ژن های هدف miRNA را نشان می دهند).

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.
- Chittem, 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 homeostasis 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., & Chattopadhyay, 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 reveal 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., Sivasithamparan, 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., Kavooosi, Z., & Momenzadeh, L. (2011). Determination of EMC isotherms and appropriate mathematical models for canola. *Food and Bioprocess 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.