



بررسی بیان ژنهای *HSP90*، *PR1* و *AGO2a* در پاسخ دفاعی ارقام مختلف گوجه‌فرنگی به ویروس چروکیدگی قهوه‌ای گوجه‌فرنگی

Expression of *HSP90*, *PR1*, and *AGO2a* During the Defensive Response of Tomato Cultivars to *Tomato Brown Rugose Fruit Virus*

گل‌بانو عزیزپور^۱، احمد روحی بخش^۲، داود کولیوند^{۳*}، شاهرخ قوتی^۴

Golbanoo Azizpoor¹, Ahmad Rouhibakhsh², Davoud Koolivand^{3*} Shahrokh Ghovvati Roudsari⁴

۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۴- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

1. Ph.D Student in Plant Pathology, 2. Assistant Professor in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
3. Associate Professor in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran,
4. Assistant Professor in Animal Science, Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: d.koolivand@gmail.com , Koolivand@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۶/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۸/۱ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۸/۶

Received: 2025/09/21 | Accepted: 2025/10/23 | Published: 2025/10/28

Abstract

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV; *Tobamovirus fructirugosum*) is an emerging and highly destructive pathogen threatening tomato production worldwide. This study investigated the expression patterns of three key defense-related genes: *HSP90*, *PR1*, and *AGO2a* in two tomato cultivars exhibiting contrasting levels of tolerance to ToBRFV infection. Four-leaf-stage plants were mechanically inoculated with a verified viral isolate, and systemic leaf samples were collected at 7, 14, and 21 days post-inoculation (dpi). Total RNA was extracted, viral presence was confirmed using specific primers, and gene expression was quantified by real-time PCR. In the tolerant cultivar, all three genes were significantly upregulated following infection. *HSP90* and *PR1* displayed a sustained and consistent increase across all sampling times, while *AGO2a* showed a marked induction at 14 dpi, reaching levels significantly higher than those in the susceptible cultivar ($P < 0.0001$). These expression profiles indicate the activation of stable and effective defense pathways in the tolerant cultivar. By contrast, the susceptible cultivar exhibited minimal or even decreased expression of these genes, particularly *PR1*, suggesting ineffective induction of antiviral defenses. The coordinated upregulation of *HSP90*, *PR1*, and *AGO2a* in the tolerant cultivar highlights their complementary roles in disease mitigation: *HSP90* likely stabilizes defense-related proteins, *PR1* serves as a marker of salicylic acid-mediated signaling, and *AGO2a* contributes directly to viral suppression through RNA silencing. Overall, these findings underscore the importance of rapid and sustained activation of defense genes in conferring tolerance to ToBRFV and provide a molecular basis for breeding strategies, genetic improvement, and the identification of molecular markers for resistant tomato cultivars.

Keywords: disease resistance, heat shock protein (*HSP90*), disease susceptibility, gene silencing, *PR* genes, gene expression responses

چکیده

رفرانس دهی این مقاله Citation

Azizpour G, Rohibakhsh A, Koolivand D, Ghovvati S. (2025). Expression of *HSP90*, *PR1*, and *AGO2a* during the defensive response of tomato cultivars to Tomato brown rugose fruit virus. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 14 (1): 36-47. Doi: [10.61882/gebsj.14.1.3](https://doi.org/10.61882/gebsj.14.1.3)
URL: <http://gebsj.ir/article-1-511-en.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 14, Number 1, 2025

خلاصه

ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی (*Tomato brown rugose fruit virus*) با نام علمی *Tobamovirus fructirugosum* یکی از پاتوژن‌های نوظهور و به شدت خسارت‌زا در تولید گوجه‌فرنگی در جهان به‌شمار می‌رود. هدف این مطالعه، بررسی الگوی بیانی سه ژن کلیدی در پاسخ‌های دفاعی گیاه، شامل *PR1*، *HSP90* و *AGO2a*، در دو رقم گوجه‌فرنگی با سطوح متفاوتی از تحمل به ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی بود. برای این منظور، گیاهان در مرحله چهاربرگی با استفاده از مایه‌زنی مکانیکی و با بهره‌گیری از یک جدایه تاییدشده ویروس آلوده شدند. نمونه‌برداری از برگ‌های فوقانی در سه بازه زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی انجام گرفت و پس از استخراج RNA کل، حضور ویروس با آغازگرهای اختصاصی تایید شد. میزان بیان ژن‌های *PR1*، *HSP90* و *AGO2a* با روش Real-Time PCR کمی‌سازی شد. نتایج نشان داد که در رقم متحمل، بیان هر سه ژن در پاسخ به آلودگی ویروسی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، بیان *HSP90* و *PR1* در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری افزایش پایدار و مداومی را نشان داد. در مقابل، بیان *AGO2a* در رقم متحمل در روز چهاردهم پس از آلودگی به طور قابل توجهی افزایش یافت و بالاتر از رقم حساس بود ($P < 0.0001$). این الگو بیانگر فعال‌سازی پایدار و موثر مسیرهای دفاعی در رقم متحمل است. در مقابل، رقم حساس تغییرات اندک یا کاهشی در بیان ژن‌ها، به‌ویژه *PR1*، نشان داد که حاکی از عدم القای موثر پاسخ‌های دفاعی در این رقم است. افزایش هم‌زمان و هماهنگ بیان *PR1*، *HSP90* و *AGO2a* در رقم متحمل، نشان‌دهنده نقش مکمل آن‌ها در ایجاد تحمل در برابر بیماری است. به‌نظر می‌رسد *HSP90* با تثبیت پروتئین‌های مرتبط با دفاع، بستر مناسبی برای القای مسیرهای دفاعی فراهم کرده و *PR1* به‌عنوان نشانگر فعال‌سازی مسیرهای وابسته به اسید سالیسیلیک، تاییدکننده کارآمدی این پاسخ‌ها است و *AGO2a* از طریق واکنش خاموشی ژن به طور مستقیم با تکثیر ویروس مقابله می‌کند. در مجموع، این نتایج بر اهمیت فعال‌سازی سریع، قوی و پایدار ژن‌های دفاعی در ایجاد تحمل گیاه در برابر ویروس *T. fructirugosum* تاکید دارند و می‌توانند زمینه‌ساز توسعه راهکارهای اصلاح ژنتیکی، شناسایی نشانگرهای زیستی مولکولی و گزینش ارقام مقاوم در برنامه‌های به‌نژادی گوجه‌فرنگی باشند.

واژگان کلیدی: تحمل بیماری، پروتئین شوک حرارتی، حساسیت به بیماری، خاموشی ژن، ژن‌های PR، واکنش‌های بیان ژن

مقدمه

Introduction

خانواده *Solanaceae* شامل برخی از مهم‌ترین سبزیجات اقتصادی جهان مانند گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) و فلفل (*Capsicum annuum*) است که به ترتیب در رتبه اول و هفتم تولید کل سبزیجات جهان قرار گرفته‌اند. در حال حاضر، ایران با تولید حدود ۳/۴ میلیون تن گوجه‌فرنگی در سال ۲۰۲۲، یکی از تولیدکنندگان اصلی این محصول در جهان بوده و در رتبه یازدهم تولید جهانی آن قرار دارد (FAOSTAT, 2022-2023). عوامل متعددی چون آفات و بیماری‌ها در صدر عناصر کاهنده کیفیت محصول گوجه‌فرنگی قرار می‌گیرند؛ از این میان بیماری‌های ویروسی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند.

ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی (*Tobamovirus fructirugosum*) متعلق به جنس *Tobamovirus* و خانواده *Virgaviridae* برای اولین بار در سال ۲۰۱۶ روی گوجه‌فرنگی در اردن گزارش شد (Salem et al. 2016). سپس در سایر نقاط خاورمیانه (اسرائیل و ترکیه) و در کشورهای اروپایی (آلمان، یونان، قبرس، جمهوری چک، فرانسه، ایتالیا، لهستان، اسپانیا، هلند و انگلستان)، آسیای شرقی (چین)، آمریکای شمالی (مکزیک و ایالات متحده آمریکا)، آمریکای جنوبی (شیلی) و شمال آفریقا (مصر و سودان) مشاهده شد. این ویروس اولین

بار در سال ۱۴۰۰ از روی گوجه فرنگی در ایران توسط اسماعیل زاده و کولیوند از چندین گلخانه از روی محصول گوجه‌فرنگی در اطراف تهران و در همین سال توسط قربانی و همکاران در یکی از گلخانه‌های استان اصفهان گزارش شد (Esmailzadeh and Koolivand 2022a, 2021b, 2023, Ghorbani et al. 2021). علائم ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی در گوجه‌فرنگی، اگرچه می‌تواند متنوع باشد، اما مشخص‌ترین و رایج‌ترین ویژگی‌های آن عبارتند از: الگوهای موزائیکی روی برگ‌ها (نقاط روشن و تیره سبز)، زردی موزائیکی، بدشکلی و پیچ‌خوردگی برگ‌ها و زیر و ناهموار شدن سطح برگ (rugosity) مشاهده می‌شود (EPPO Global Database, 2025; Luria et al., 2017). یکی از علائم شاخص و مهم این بیماری، بروز بافت‌مردگی روی کاسبرگ‌ها، دم‌خوشه‌ها و دم‌میوه‌ها است (Bayer Vegetables, 2019; PlantwisePlus Knowledge Bank, 2023). شاخص‌ترین علائم روی میوه شامل تغییر رنگ (مانند نقاط زرد یا سبز)، لکه‌های قهوه‌ای خشن یا چروکیدگی شدید (rugosity) است. در حالت شدت بیماری، قهوه‌ای شدن یا رگه‌های بافت‌مردگی روی ساقه نیز گزارش شده است.

گیاهان برای زنده ماندن، ساز و کارهای دفاعی بسیار پیچیده‌ای را در برابر بیمارگر ایجاد کرده‌اند. در طول حمله بیمارگر، الگوهای مولکولی حفاظت شده (الگوهای مولکولی مرتبط با بیماری‌زایی، Pathogen-associated molecular patterns) در سطح سلول‌های بیمارگر توسط گیاهان شناسایی می‌شوند و پاسخ‌های ایمنی پایه را تحریک می‌کند. این راهبردهای ارتباطی کارآمد دو طرفه، دستگاه ایمنی ذاتی گیاه را تشکیل می‌دهد که نقش‌های مرتبط را به منظور تعدیل پروتئین‌های تنظیمی، پروتئین‌کینازها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) از طریق مسیرهای انتقال سیگنال ایفا می‌کند (Campos et al. 2022). بعد از القا توسط حمله بیمارگر، ژن‌های PR فعال می‌شوند و پاسخ HR توسط TFs تحریک می‌شود (Amorim et al. 2016). در گیاهان میزبان، ویروس‌ها می‌توانند فرآورده‌های سوخت و سازی میزبان را برای ترجمه و تکثیر ماده وراثتی خود دست‌کاری کرده و پاسخ‌های میزبان را از طریق سرکوبگرها متوقف کنند. برهم‌کنش بین گیاه میزبان و ویروس مهاجم باعث می‌شود در سلول‌های میزبان، مسیرهای خاصی فعال یا سرکوب شوند (Pumplin et al. 2013). در یک مطالعه، بیان ژن‌های دفاعی گیاه خیار گلخانه‌ای در گیاه آلوده به ویروس موزاییک خیار کاهش یافت (Asadi-Jaafari et al. 2022).

در پاسخ‌های دفاعی گیاهان به عوامل بیماری‌زا، مجموعه‌ای پیچیده از ژن‌ها و مسیرهای پیام‌رسانی فعال می‌شوند که هماهنگی آن‌ها تعیین‌کننده توانایی گیاه در مقابله با بیمارگر است. از جمله ژن‌های کلیدی که در این پاسخ‌ها نقش دارند، می‌توان به ژن‌های شوک حرارتی (HSPs) به ویژه *HSP90* و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR proteins) نظیر *PRI* اشاره کرد. علاوه بر این، در سال‌های اخیر، نقش پروتئین‌های آرگونات مانند *AGO2a* به عنوان یکی از مهم‌ترین سدهای دفاعی مستقیم گیاه در برابر ویروس‌ها، مورد توجه ویژه قرار گرفته است. نقش *HSP90* (Heat Shock Protein 90) تنها به مقابله با استرس‌های حرارتی محدود نمی‌شود؛ این پروتئین به عنوان یک پروتئین همراه (chaperone) حیاتی عمل می‌کند که در تاخوردگی صحیح و حفظ پایداری ساختاری گستره وسیعی از پروتئین‌های سلولی نقش دارد (Wang et al., 2014). در زمینه پاسخ‌های دفاعی گیاه، *HSP90* به طور ویژه با پروتئین‌های مقاومت (R proteins) گیاه تعامل می‌کند. این پروتئین‌های R، مسئول شناسایی بیمارگرها و فعال‌سازی آبشارهای پیام‌رسانی دفاعی هستند (Li et al., 2010). در همین راستا، *PRI* (Pathogenesis-Related Protein 1) یکی از شناخته‌شده‌ترین و پرکاربردترین نشانگرهای فعال‌سازی مسیرهای دفاعی در گیاهان است. بیان این ژن به شدت در پاسخ به آلودگی با عوامل بیماری‌زا، به ویژه از طریق مسیر پیام‌رسانی اسید سالیسیلیک (SA)، افزایش می‌یابد (Van Loon et al., 2006). *AGO2* (Argonaute 2)، به عنوان یکی از اعضای اصلی خانواده پروتئین‌های آرگونات، نقشی حیاتی در خاموشی RNA (RNA silencing) ایفا می‌کند. هنگامی که ویروس *T. fructurugosum* تکثیر می‌شود، RNA دو رشته‌ای (dsRNA) به عنوان بخشی از چرخه زندگی ویروس تولید می‌شود (Alazem et al., 2017). فعال‌سازی این مسیر، به ویژه با توجه به اینکه برخی ویروس‌ها تلاش می‌کنند تا سازوکارهای خاموشی RNA را سرکوب کنند، نشان‌دهنده یک خط دفاعی کلیدی است (Ludman et al., 2023).

درک چگونگی بیان این ژن‌ها می‌تواند بینش‌های عمیقی در مورد ساز و کارهای تحمل یا حساسیت گیاه به ویروس‌ها فراهم کند و نشان دهد که آیا گیاه قادر به فعال‌سازی یک دفاع موثر و پایدار هست یا خیر. پژوهش حاضر با هدف دستیابی به شناخت مطلوب از ویژگی‌ها و

سازوکارهای بیماری‌زایی و ویروس چروکیدگی قهوه‌ای گوجه‌فرنگی در گیاه گوجه‌فرنگی، با رویکرد بررسی مقایسه‌ای پاسخ دفاعی گیاه در دو رقم حساس و متحمل و با تمرکز ویژه بر بیان ژن‌های *AGO2a*، *PR1* و *HSP90*، با استفاده از روش Real-Time PCR شکل گرفته است.

مواد و روش‌ها

Materials and Methods

کشت گیاه و تلقیح با ویروس: آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار از گیاه‌های آلوده و سالم انجام شد. دو رقم گوجه‌فرنگی با حساسیت متفاوت نسبت به ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی انتخاب شدند: رقم ساخیا به عنوان رقم حساس و رقم ۱۸۲۴ از شرکت Enza Zaden به عنوان رقم متحمل انتخاب شدند. بذور ارقام ابتدا در سینی‌های مخصوص پرورش نشا جوانه‌زنی شدند و سپس گیاهچه‌ها در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۲ سانتی‌متر در گلخانه با دمای ۲۲-۲۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعته (تاریکی: روشنایی) رشد داده شدند. از یک جدایه شناخته شده ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی از آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان (شماره دسترسی: OP557566 پایگاه داده NCBI) جداسازی شده از گیاه گوجه‌فرنگی برای تلقیح استفاده شد. گیاهان در مرحله ۴ برگگی با سوسپانسیون ویروسی حاصل از برگ آلوده با استفاده از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار تلقیح مکانیکی شدند. گیاهان کنترل با بافر تلقیح شدند.

بررسی علائم و نمونه‌برداری از گیاهان مایه‌زنی شده: به منظور ردیابی ویروس و ارزیابی بیان ژن‌های مورد بررسی در میزبان، نمونه‌برداری از برگ‌های جوان بعد از گذشت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز از مایه زنی انجام گرفت. نمونه‌ها بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

استخراج RNA و ردیابی ویروس با RT-PCR: استخراج آران‌ای از حدود ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی از نمونه‌های برداشت شده از تمامی تیمارها، با استفاده از کیت استخراج آران‌ای RiboEx (ساخت شرکت Gene all) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای سنجش کمیت و کیفیت آران‌ای‌های استخراج شده از دستگاه نانودراپ USA Thermo scientific استفاده شد. حضور ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی در نمونه‌ها با استفاده از روش آر تی پی سی آر و با کمک آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. پی سی آر در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر (۵۰۰ میکروگرم DNA) دی‌ان‌ای مکمل الگو، ۰/۵ میکرولیتر آغازگرها (۱۰ پیکومول)، ۵ میکرولیتر Master-mix و ۳ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه پی سی آر به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۳ دقیقه، واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه سانتیگراد و بسط ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۵ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

ساخت cDNA (دی‌ان‌ای مکمل) با استفاده از کیت ساخت Easy™ cDNA Synthesis Kit (2x) طبق دستورالعمل شرکت سازنده (پارس توس، ایران) انجام شد. حدود یک میکرولیتر (۱۰۰۰ نانوگرم) از آران‌ای استخراج شده برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل استفاده شد. ۵ میکرولیتر Buffer-mix (RT Buffer, 1mM dNTP mixture, MgCl₂, Oligo d(t)16, Random Hexamer)، ۱ میکرولیتر Enzyme-mix با یک میکرولیتر از آران‌ای (۱۰۰۰ نانوگرم) استخراج شده توسط آب دیونیزه به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. ضمناً برای ساخت cDNA جهت تکثیر ویروس از یک میکرولیتر آغازگر معکوس (۱۰ پیکومول) استفاده شد. سپس، مخلوط آماده شده در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ده دقیقه، ۴۷ درجه سانتیگراد به مدت شصت دقیقه و ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه قرار داده شد.

پی سی آر در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل الگو، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) آغازگرها (جدول ۱)، ۵ میکرولیتر Master-mix و ۳ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. برنامه پی سی آر به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۳ دقیقه، واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه سانتیگراد و بسط ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد

برای ۳۵ سیکل و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گردید. در تمامی مراحل از گیاه سالم و آب دیونیزه به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. برای ارزیابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، الکتروفورز افقی در ژل آگارز دو درصد و بافر TBE 1X انجام شد.

بررسی بیان ژن: پس از تهیه دی‌ان‌ای مکمل، بیان ژنهای *AGO2a*، *PRI* و *HSP90* در سه بازه زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روزه با کمک روش Real-Time PCR با سه تکرار بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت و از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) ژنهای مذکور و همچنین از آغازگرهای اختصاصی ژن ACT به عنوان ژن استاندارد استفاده شد. بدین منظور از دستگاه Corbett Q Gene Rotar (Qiagene) و محلول سایبرگرین استفاده شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Primers that were used in this research

Primer	Sequence	Region
TBRFV-F-5722	CACAATCGCAACTCCATCGC	CP
ToBRFV-R-6344	GTGCCTACGGATGTGTATGA	
AGO2a F	CTCCTTCACCATTTCCCACAC	AGO2a
AGO2a R	CCCCCAAAGCAGATAAAAACA	
HSP90-F	GCACAGGCACTTAGGGACTC	HSP90
HSP90-R	CTGAGGTGAGAAGGGCAGTC	
PRI-F	GCCAAGCTATAACTACGCTACCAAC	PRI
PRI-R	GCAAGAAATGAACCACCATCC	
Actin-F	GCCCCTCGTCTGTGACAATG	Actin
Actin-R	CCTTGGCCGACCCACAATA	

Real-Time PCR (Ampliqon) در حجم ۱۲ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر دی‌ان‌ای الگو، ۰/۳ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول)، ۶ میکرولیتر سایبرگرین (2x)، ۴/۹ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گرفت. چرخه حرارتی شامل چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه، چهل چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، بسط و گسترش در دمای ۷۲ درجه برای ۳۰ ثانیه و یک چرخه بسط و گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه در دستگاه بهینه‌سازی شد.

داده‌ها مطابق روش ΔC_t بر اساس فرمول $2^{-\Delta C_t}$ آنالیز شدند. چرخه‌ای که در آن تکثیر ژن هدف، وارد فاز صعودی می‌شود به عنوان چرخه مرجع یا چرخه آستانه در نظر گرفته می‌شود (Ramakers et al., 2003). میزان چرخه آستانه ژنهای مورد مطالعه در مقایسه با چرخه آستانه ژن استاندارد ACT محاسبه گردید. برای بررسی تفاوت آماری بیان ژن‌ها بین گیاهان حساس و متحمل آلوده به ویروس و شاهد از آنالیز واریانس داده‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism (ver 10.6.0.890) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار مذکور انجام گرفت.

Results and Discussion

نتایج و بحث

نتایج ردیابی مولکولی ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه فرنگی در گیاه

به‌منظور تایید آلودگی گیاهان مایه‌زنی‌شده به ویروس *T. fructirugosum*، از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR) با آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن پروتئین پوششی این ویروس استفاده شد. نتایج نشان داد که در تمامی نمونه‌های آلوده، قطعه‌ای به طول تقریبی ۶۰۰

جفت‌باز تکثیر شد که به‌طور کامل با ساینز قطعه مورد نظر از *T. fructirugosum* مطابقت داشت. این باند اختصاصی در نمونه‌های شاهد سالم مشاهده نشد و به‌این‌ترتیب حضور ویروس در گیاهان مایه‌زنی‌شده به‌طور قطعی تأیید گردید.

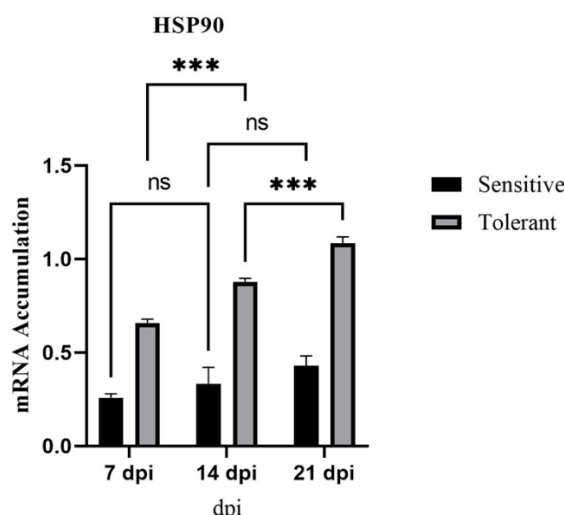
بررسی‌های فنوتیپی در گلخانه نشان داد که در رقم ساخیا، نخستین علائم بیماری در ۷ روز پس از مایه‌زنی (dpi) ظاهر شدند که شامل موزائیک خفیف، کلروز پراکنده و دنداندار شدن حاشیه برگ بود. شدت علائم به‌تدریج افزایش یافت؛ به‌طوری‌که در ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، برگ‌ها دچار زردی گسترده‌تر، بدشکلی و عدم تقارن آشکار، موزائیک برجسته‌تر، چین‌وچروک شدید و کاهش محسوس رشد برگ و کل بوته شدند. در ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، رشد بوته‌ها تقریباً متوقف شد و برگ‌ها به‌شدت باریک و پیچیده شده و تاول‌های مشخصی بر سطح پهنک برگ‌ها پدیدار شد. همچنین، برگ‌ها رشد کامل نداشتند و طول میانگره‌ها و دمبرگ‌ها به‌طور معنی‌داری کوتاه‌تر از گیاهان سالم و نیز رقم متحمل ۱۸۲۴ بود. این الگوی تدریجی و شدید بروز علائم، همخوانی کامل با گزارش‌های پیشین درباره علائم این بیماری در ارقام حساس گوجه‌فرنگی دارد (Panno et al., 2019; Luria et al., 2017) و بیانگر خسارت‌زایی بالای این ویروس در شرایط کنترل‌شده است.

در مقابل، در رقم ۱۸۲۴، بروز علائم با تاخیر مشاهده شد. در ۷ روز پس از مایه‌زنی هیچ علامت بارزی مشاهده نگردید. در ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، علائم محدود به موزائیک خفیف و بدون بروز بدشکلی قابل توجه برگ یا توقف محسوس رشد بودند. این تفاوت آشکار در زمان بروز و شدت علائم بین دو رقم، نشان‌دهنده سطح بالای تحمل رقم ۱۸۲۴ در برابر آلودگی با این ویروس است و می‌تواند به‌عنوان شاخصی مهم در انتخاب والدین برای برنامه‌های به‌نژادی مقاوم‌سازی مورد استفاده قرار گیرد.

بیان ژن *HSP90* در گیاه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس

برای بررسی نقش ژن *HSP90* در پاسخ دفاعی گوجه‌فرنگی به آلودگی با *T. fructirugosum*، ابتدا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در آزمون RT-PCR کارایی آغازگرها در اتصال به ژن‌های هدف و مرجع تأیید شد که منجر به تکثیر قطعه اختصاصی با طول مورد انتظار حدود ۱۰۰ جفت باز شد. سپس، با استفاده از روش Real-Time PCR، میزان انباشت mRNA این ژن در دو رقم گوجه‌فرنگی ساخیا و ۱۸۲۴ سه زمان ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی (dpi) اندازه‌گیری شد (شکل ۱).

نتایج نشان داد که در رقم متحمل، بیان ژن *HSP90* به‌طور معنی‌داری در مقایسه با رقم حساس افزایش یافت. در ۷ روز پس از مایه‌زنی، سطح بیان در رقم متحمل ۲.۵ برابر بیشتر از رقم حساس بود ($P < 0.001$) و این اختلاف بیانگر فعال‌سازی سریع مسیرهای دفاعی در مرحله-های اولیه آلودگی است. در ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، اختلاف بیان *HSP90* در بین دو رقم از نظر آماری بسیار معنی‌دار بود و در رقم متحمل به‌طور قابل توجهی از رقم حساس بالاتر است، این اختلاف نشان‌دهنده یک پاسخ قوی‌تر و موثرتر در رقم متحمل و فعال‌سازی قوی و سریع واکنش خاموشی ژن (RNAi) در مراحل میانی آلودگی است. در ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، اختلاف بین دو رقم همچنان در سطح معنی‌دار بسیار بالا ($P < 0.001$) باقی ماند و بیان ژن در رقم متحمل بیش از دو برابر رقم حساس بود. در رقم حساس، میزان بیان *HSP90* در هیچ یک از زمان‌های ارزیابی افزایش چشمگیری نسبت به گیاهان کنترل سالم نشان نداد و تغییرات مشاهده‌شده فاقد معنی‌داری آماری بود. این امر نشان می‌دهد که در رقم حساس، مسیر وابسته به *HSP90* یا به‌خوبی فعال نمی‌شود و یا فعال‌سازی آن پایدار و کافی نیست تا پاسخ دفاعی موثری ایجاد کند. این الگوی بیان، به‌ویژه اختلاف معنی‌دار در رقم حساس و متحمل در ۷ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، نشان می‌دهد که احتمال دارد *HSP90* در مراحل اولیه به‌عنوان یک محرک سریع پاسخ دفاعی و در مرحله‌های پایانی به‌عنوان یک عامل حفظ پایداری پروتئین‌ها و ساختارهای دفاعی نقش کلیدی ایفا کند. چنین افزایشی در رقم متحمل می‌تواند با تثبیت و فعال‌سازی پروتئین‌های تنظیم‌کننده پاسخ به تنش، از جمله گیرنده‌های تشخیص‌دهنده ویروس و پروتئین‌های پیام‌رسانی، مرتبط باشد. این نتایج موید نقش مستقیم و تقویت‌شده *HSP90* در تحمل به این ویروس در رقم متحمل ۱۸۲۴ بوده و می‌تواند به‌عنوان شاخص مولکولی مهمی در برنامه‌های اصلاحی برای انتخاب رقم‌های مقاوم مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱- بیان ژن *Hsp90* در گیاهان حساس و متحمل در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با جدایه ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی. میزان معنی‌داری $P > 0.05$ (*), $P > 0.01$ (**), $P > 0.001$ (***), $P > 0.0001$ (****), and non-significant differences (ns). آزمون مقایسه چندگانه توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. خطای آزمایش در تکرارهای بیولوژیک به صورت میله‌ای مشخص شده است.

Fig. 1. *HSP90* gene expression in susceptible and tolerant plants at 7, 14, and 21 days post-inoculation with tomato brown rugose fruit virus isolate. P-value significance levels: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.0001$ (****), and non-significant differences (ns). Multiple comparisons were performed using Tukey's test at the 0.05 probability level. Experimental error in biological replicates is indicated by error bars.

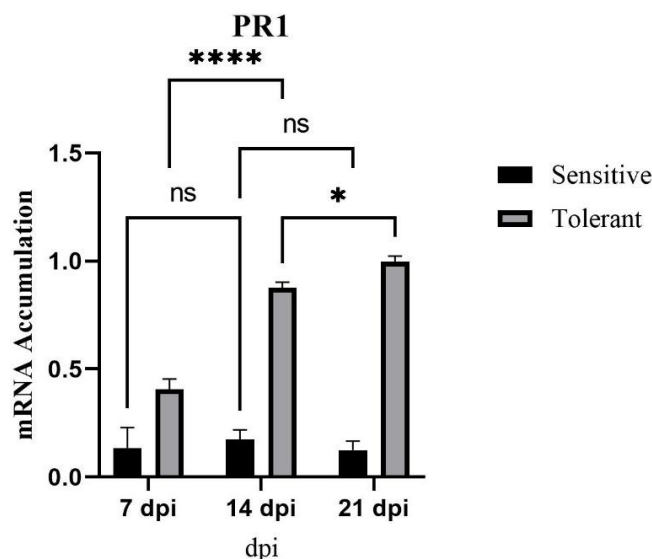
بیان ژن *PRI* در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس

نتایج ارزیابی بیان ژن *Pathogenesis-Related protein 1 (PRI)* به‌عنوان یکی از نشانگرهای زیستی شناخته‌شده این مسیر، با استفاده از Real-Time PCR در دو رقم ساخیا و ۱۸۲۴ در ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی (dpi) نشان داد که در رقم متحمل، بیان *PRI* به‌طور معنی‌داری در واکنش به آلودگی ویروس افزایش یافت. در ۷ روز پس از مایه‌زنی، سطح بیان این ژن حدود ۳ برابر نسبت به گیاهان کنترل سالم افزایش داشت، هرچند اختلاف آن با رقم حساس از نظر آماری معنی‌دار نبود. در ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، میزان بیان *PRI* به بیش از ۷ برابر کنترل رسید و اختلاف بین تیمار آلوده و کنترل بسیار معنی‌دار بود ($P < 0.0001$). در ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، بیان ژن همچنان بالا باقی ماند و به حدود ۱۰ برابر کنترل رسید که اختلاف آن با رقم حساس نیز معنی‌دار بود ($P < 0.001$). این روند صعودی و پایدار بیان *PRI* در رقم متحمل، نشان‌دهنده فعال‌سازی قوی و مستمر مسیر دفاعی وابسته به SA در پاسخ به آلودگی با ویروس *T. fructirugosum* است. در مقابل، در رقم حساس، میزان بیان *PRI* در تمام زمان‌های ارزیابی در سطح بسیار پایین باقی ماند و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با گیاهان کنترل سالم نداشت. حتی در برخی زمان‌ها، کاهش جزئی در سطح بیان مشاهده شد که می‌تواند ناشی از سرکوب مسیر SA توسط ویروس یا ناکارآمدی پاسخ دفاعی رقم حساس باشد (شکل ۲).

این نتایج بیانگر آن است که رقم متحمل توانایی القای قوی و پایدار *PRI* را در طول عفونت دارد، در حالی که رقم حساس فاقد این پاسخ موثر است. چنین الگوی بیانی نشان می‌دهد که *PRI* و به‌طور کلی مسیر SA می‌تواند یکی از عوامل کلیدی در ایجاد تحمل یا مقاومت نسبی به ویروس *T. fructirugosum* در ارقام گوجه‌فرنگی باشد.

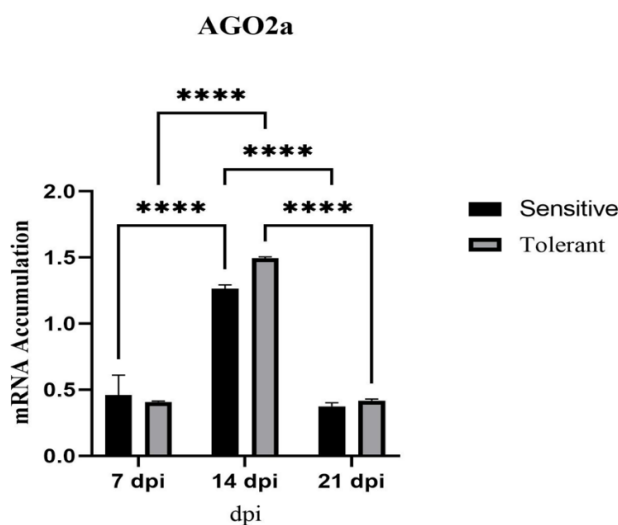
بیان ژن *AGO2a* در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس

برای بررسی نقش ژن Argonaute 2a (*AGO2a*) در پاسخ دفاعی گوجه‌فرنگی به آلودگی با ویروس *T. fructirugosum*، میزان انباشت mRNA این ژن در دو رقم ساخیا و ۱۸۲۴ در ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی (dpi) ارزیابی گردید (شکل ۳).



شکل ۲- بیان ژن *PR1* در گیاهان حساس و متحمل در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با جدایه ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی. میزان معنی‌داری $P > 0.05$ (*), $P > 0.01$ (**), $P > 0.001$ (***), $P > 0.0001$ (****), و عدم تفاوت معنی‌دار (ns). آزمون مقایسه چندگانه توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. خطای آزمایش در تکرارهای بیولوژیک به صورت میله‌ای مشخص شده است.

Fig. 2. *PR1* gene expression in susceptible and tolerant plants at 7, 14, and 21 days post-inoculation with tomato brown rugose fruit virus isolate. P-value significance levels: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.0001$ (****), and non-significant differences (ns). Multiple comparisons were performed using Tukey's test at the 0.05 probability level. Experimental error in biological replicates is indicated by error bars.



شکل ۳- بیان ژن *AGO2a* در گیاهان حساس و متحمل در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با جدایه ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی. میزان معنی‌داری $P > 0.05$ (*), $P > 0.01$ (**), $P > 0.001$ (***), $P > 0.0001$ (****), و عدم تفاوت معنی‌دار (ns). آزمون مقایسه چندگانه توکی در سطح احتمال ۰/۰۵. خطای آزمایش در تکرارهای بیولوژیک به صورت میله‌ای مشخص شده است.

Fig. 3. *AGO2a* gene expression in susceptible and tolerant plants at 7, 14, and 21 days post-inoculation with tomato brown rugose fruit virus isolate. P-value significance levels: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.0001$ (****), and non-significant differences (ns). Multiple comparisons were performed using Tukey's test at the 0.05 probability level. Experimental error in biological replicates is indicated by error bars.

نتایج نشان داد که در رقم متحمل ۱۸۲۴، بیان ژن *AGO2a* به‌طور معنی‌داری در مقایسه با رقم ساخیا افزایش یافت. در ۷ روز پس از مایه‌زنی، سطح بیان در هر دو رقم در سطح پایینی قرار داشت و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم فعال‌سازی قابل توجه این مسیر در مراحل اولیه آلودگی است. در ۱۴ روز پس از مایه‌زنی بیان ژن *AGO2a* در هر دو رقم به اوج خود رسید، اما اختلاف بین دو رقم از نظر آماری بسیار معنی‌دار بود و در رقم متحمل به طور قابل توجهی از رقم حساس بالاتر است ($P < 0.0001$). این اختلاف نشان‌دهنده یک پاسخ قوی‌تر و موثرتر در رقم متحمل و فعال‌سازی قوی و سریع واکنش خاموشی ژن (RNAi) در مراحل میانی آلودگی است. در ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، بیان ژن در هر دو رقم به شدت کاهش یافت و به سطوح اولیه بازگشت و اختلاف معنی‌داری بین دو رقم وجود نداشت. در رقم ساخیا میزان بیان *AGO2a* در ۱۴ روز پس از مایه‌زنی نسبت به ۷ روز پس از مایه‌زنی افزایش یافت، اما این افزایش به اندازه رقم متحمل قابل توجه نبود. این امر نشان می‌دهد که در رقم حساس، مسیر وابسته به *AGO2a* یا به‌خوبی فعال نمی‌شود و یا پاسخ آن به اندازه کافی قوی و پایدار نیست تا پاسخ دفاعی موثری ایجاد کند. این الگوی بیان، به‌ویژه اختلاف معنی‌دار در ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، نشان می‌دهد که *AGO2a* می‌تواند در مراحل میانی آلودگی به‌عنوان یک عامل کلیدی در مهار تکثیر ویروس از طریق تخریب RNA آن عمل کند. افزایش بیان در رقم متحمل می‌تواند با راه‌اندازی یک پاسخ دفاعی سریع و هدفمند برای مقابله با تکثیر ویروس مرتبط باشد. این نتایج موید نقش مستقیم و تقویت‌شده *AGO2a* در تحمل به *T. fructirugosum* در رقم متحمل B بوده و می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مولکولی مهم در برنامه‌های اصلاحی برای انتخاب رقم‌های مقاوم مورد استفاده قرار گیرد.

الگوی تغییرات بیان ژن‌های دفاعی *HSP90*، *AGO2a* و *PR1* در پاسخ به آلودگی با ویروس *T. fructirugosum*

مقایسه‌ی الگوهای بیانی نشان می‌دهد که ژن‌های *HSP90*، *PR1* و *AGO2a* در رقم متحمل (B) به صورت هماهنگ و موثر فعال می‌شوند، در حالی که در رقم حساس (A) این فعال‌سازی ناکافی یا غیرموثر است. ژن *HSP90* در رقم متحمل به‌صورت سریع و پایدار القا می‌شود و احتمال دارد به‌عنوان یک پروتئین همراه (molecular chaperone)، با تثبیت پروتئین‌های کلیدی دخیل در تشخیص ویروس و انتقال پیام‌های دفاعی، زمینه را برای فعال‌سازی مسیر SA فراهم کند. این امر به نوبه‌ی خود منجر به القای پایدار ژن *PR1* می‌شود که یک شاخص کلیدی برای فعال‌سازی مقاومت فراگیر اکتسابی (SAR) است. در مقابل، پاسخ ضعیف یا غیرفعال این دو ژن در رقم حساس، نشان‌دهنده‌ی یک سیستم دفاعی ناکارآمد است. علاوه بر این دو ژن، *AGO2a* نیز در رقم متحمل، به‌ویژه در ۱۴ پس از آلودگی، به طور معنی‌داری بیان می‌شود. این بیان می‌تواند نشان‌دهنده یک پاسخ دفاعی سریع و مستقیم از طریق واکنش خاموشی ژن (RNAi) باشد که RNA ویروسی را هدف قرار می‌دهد و از تکثیر آن جلوگیری می‌کند. در مقابل، بیان ضعیف‌تر *AGO2a* در رقم حساس در این مرحله، نشان‌دهنده‌ی یک پاسخ ناکارآمد در مهار تکثیر ویروس است. فعالیت هماهنگ این سه ژن، نشان‌دهنده‌ی یک استراتژی دفاعی چندلایه در رقم متحمل است. *HSP90* مسیرهای پیام‌رسانی را تثبیت می‌کند، *PR1* یک پاسخ دفاعی فراگیر و پایدار ایجاد می‌کند و *AGO2a* به طور مستقیم با ویروس مقابله می‌کند. این هم‌افزایی و هماهنگی زمانی در فعال‌سازی ژن‌ها، از عامل‌های اصلی تحمل رقم متحمل به *T. fructirugosum* است و می‌تواند به‌عنوان شاخص‌های مولکولی مهمی در برنامه‌های به‌نژادی مقاوم‌سازی مورد استفاده قرار گیرد.

بحث: تولید پایدار گوجه‌فرنگی در شرایط تهدیدهای ویروسی نوظهور، به‌ویژه ویروس چروکیدگی قهوه‌ای گوجه‌فرنگی، مستلزم شناخت دقیق سازوکارهای دفاعی گیاه و به‌کارگیری این دانش در برنامه‌های اصلاحی است. نتایج این پژوهش با مقایسه دو رقم گوجه‌فرنگی با سطوح متفاوت تحمل به *T. fructirugosum*، شواهد روشنی از تفاوت‌های فیزیولوژیک و مولکولی در پاسخ به آلودگی ارائه کرد و نقش کلیدی ژن‌های *HSP90*، *PR1* و *AGO2a* را در این فرایند برجسته ساخت. بررسی‌های فنوتیپی نشان داد که رقم ساخیا به سرعت و با شدت بالایی دچار علائم شاخص آلودگی ویروسی شامل موزائیک بارز، بدشکلی شدید برگ، توقف رشد و کوتاهی میان‌گره‌ها می‌شود. این الگوی پیش‌رونده و شدید علائم، با گزارش‌های قبلی درباره خسارت‌های قابل توجه این ویروس در رقم‌های حساس مطابقت کامل دارد (Panno et al., 2017; Luria et al., 2019). و نشان‌دهنده ناکارآمدی ساز و کارهای دفاعی ذاتی در این ژنوتیپ است.

در مقابل، رقم ۱۸۲۴ بروز علائم را با تاخیر تجربه کرد. این پدیده می‌تواند بیانگر توانایی این رقم در مهار تکثیر ویروس یا محدود کردن جابه‌جایی آن در بافت‌های گیاهی باشد، احتمال دارد این پدیده از طریق فعال‌سازی سریع‌تر و پایدارتر مسیرهای دفاعی در سطح مولکولی بروز یابد. نتایج حاصل از تحلیل بیان ژن نیز این فرضیه را تایید کرد، به طوری که افزایش معنی‌دار و مداوم بیان *PR1*، *HSP90* و *AGO2a* در رقم متحمل، نشان‌دهنده بسیج موثر پاسخ‌های دفاعی در این ژنوتیپ است. به طور کلی، ترکیب داده‌های فنوتیپی و مولکولی این پژوهش، تصویر جامعی از تفاوت‌های دفاعی بین رقم‌های حساس و متحمل ارائه می‌دهد و اهمیت استفاده از ژن‌های مرتبط با تحمل ویروسی، از جمله *HSP90* و *PR1*، را در راهبردهای به‌نژادی گوجه‌فرنگی برای مقابله با این ویروس برجسته می‌سازد.

نتایج حاصل از آزمون Real-Time PCR به وضوح نقش محوری ژن‌های دفاعی در تعیین سطح تحمل یا حساسیت به این ویروس را نشان داد. افزایش معنی‌دار و پایدار بیان ژن *HSP90* در رقم ۱۸۲۴ در تمام بازه‌های زمانی پس از آلودگی، بیانگر فعال‌سازی موثر یکی از مولفه‌های کلیدی سامانه ایمنی گیاه است. *HSP90* به عنوان یک پروتئین همراه (molecular chaperone)، در تاخوردگی صحیح، پایداری ساختاری و عملکرد بهینه پروتئین‌های مقاومت (R proteins) نقش حیاتی ایفا می‌کند. این پروتئین‌ها وظیفه شناسایی مولکول‌های بیمارگر و آغاز آبشارهای پیام‌رسانی دفاعی را بر عهده دارند (Li et al., 2010). احتمال دارد فعال‌سازی قوی و مداوم *HSP90* در رقم متحمل منجر به سازماندهی و پایداری کارآمدتر ترکیب‌های پروتئینی مرتبط با مقاومت شده و در نتیجه سرعت و شدت پاسخ ایمنی گیاه را افزایش داده باشد. چنین سازوکاری می‌تواند توضیح دهد که چرا این رقم قادر است گسترش و علائم بیماری را محدود کند. همسویی این یافته‌ها با گزارش‌های پیشین، که نشان داده‌اند افزایش بیان *HSP*ها در مواجهه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی با افزایش مقاومت گیاهان مرتبط است (Wang et al., 2014)، اعتبار نتایج را تقویت می‌کند. در مقابل، فقدان افزایش معنی‌دار بیان *HSP90* در رقم ساخیا حاکی از ناکارآمدی در شناسایی به‌موقع ویروس و فعال‌سازی مسیرهای دفاعی اولیه است. این ضعف در مرحله آغازین پاسخ ایمنی می‌تواند یکی از عوامل کلیدی در بروز علائم شدید و پیشرفت سریع بیماری در این رقم باشد. در مطالعه‌ای بیان ژن *HSP90* را در گیاه گوجه‌فرنگی در مواجهه با ویروس موزاییک خیار را بررسی شد و نتایج مطالعه نشان داد که بیان این ژن در گیاه آلوده کاهش یافته است (Asghari et al. 2020).

به موازات *HSP90*، الگوهای بیان ژن‌های *PR1* و *AGO2a* نیز تفاوت‌های مشخصی در پاسخ‌های دفاعی دو رقم نشان داد. افزایش معنی‌دار و پایدار بیان *PR1* در رقم ۱۸۲۴ نشان‌دهنده فعال شدن مؤثر مسیر دفاعی وابسته به اسید سالیسیلیک (SA) است. مسیر SA نقش کلیدی در مقاومت فراگیر اکتسابی (SAR) دارد و برای مقابله با بیمارگرهای همزیست اجباری مانند ویروس‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد (Van Loon et al., 2006). فعال‌سازی قوی *PR1* در رقم متحمل بیانگر توانایی گیاه در راه‌اندازی یک پاسخ دفاعی فراگیر و پایدار برای مهار تکثیر و گسترش *Tomato fruit virus* است. پژوهش‌های گذشته نشان داده‌اند که پروتئین‌های PR از جمله *PR1*، می‌توانند فعالیت‌های ضد میکروبی مستقیم داشته باشند و رشد بیمارگرها را مهار کنند (Gamir et al., 2017; Ghorbel et al., 2021). علاوه بر این، *PR1* در طی فرآیند تجزیه پروتئین، پپتیدی پیام‌رسان به نام CAPE1 را در انتهای C آزاد می‌کند که برای فعال‌سازی پاسخ ایمنی گیاه کافی است. این واکنش نشان‌دهنده نقش فعال‌تر و پیچیده‌تر *PR1* در تحریک دفاع گیاهی است (Chen et al., 2014; Breen et al., 2017; Chen et al., 2023). همچنین *PR1* می‌تواند با سایر اعضای خانواده PR مانند *PR5* و *PR14*، مجموعه‌هایی تشکیل دهد تا پاسخ ایمنی میزبان را تقویت کند. این درک جدید از عملکرد *PR1*، اهمیت فعال‌سازی قوی آن در رقم متحمل را بیش از پیش تایید می‌کند. در مقابل، عدم فعال‌سازی معنی‌دار *PR1* در رقم ساخیا نشان‌دهنده پاسخ دفاعی ناکافی یا تاخیری از طریق مسیر SA است که می‌تواند به پیشرفت بدون مهار ویروس در این رقم منجر شود.

علاوه بر این، تحلیل بیان ژن *AGO2a*، فعال‌سازی یک مسیر دفاعی موازی و حیاتی را نشان می‌دهد. نتایج ما حاکی از آن است که بیان ژن *AGO2a* در رقم متحمل به طور معنی‌داری بالاتر از رقم حساس بود. این یافته نشان‌دهنده یک پاسخ دفاعی قوی از طریق واکنش خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS) است که به طور مستقیم RNA ویروسی را هدف قرار می‌دهد (Carbonell & Daròs, 2017). در

مقابل، پاسخ ضعیف‌تر *AGO2a* در رقم حساس در این مرحله، بیانگر ناتوانی آن در مهار تکثیر ویروس از طریق این ساز و کار است. این ناتوانی، به ویروس اجازه می‌دهد تا به سرعت در گیاه پیشرفت کند.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تفاوت در تحمل به این ویروس بین دو رقم گوجه‌فرنگی، به طور قابل توجهی با الگوهای متفاوت فعال‌سازی ژن‌های *PR1*, *HSP90* و *AGO2a* مرتبط است. رقم متحمل با فعال‌سازی قوی و پایدار این ژن‌ها قادر به راه‌اندازی یک پاسخ ایمنی موثر است که منجر به کاهش شدت علائم و افزایش تحمل به بیماری می‌شود. این یافته‌ها اهمیت این ژن‌ها را به عنوان نشانگرهای زیستی مولکولی مقاومت برجسته می‌کند و می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نباتات برای غربالگری و انتخاب رقم‌های مقاوم‌تر به ویروس و همچنین در توسعه راهبردهای مدیریتی جدید برای کنترل این ویروس مخرب مورد استفاده قرار گیرد. پژوهش‌های آینده بر روی سایر ژن‌های دخیل در مسیرهای دفاعی و تحلیل پروتئومیک پاسخ‌های گیاه می‌تواند درک جامع‌تری از سازوکارهای مقاومت به این ویروس ارائه دهد.

References

منابع

- Alazem, M., & Lin, N. S. (2017). Antiviral roles of abscisic acid in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 1760. doi:10.3389/fpls.2017.01760
- Amorim, L. L., da Fonseca Dos Santos, R., Neto, J. P. B., Guida-Santos, M., Crovella, S., & Benko-Iseppon, A. M. (2017). Transcription factors involved in plant resistance to pathogens. *Current Protein & Peptide Science*, 18(4), 335-351. doi:10.2174/1389203717666160619185308
- Asadi Jaefari, S., Maleki, M., & Gholamnejad, J. (2022). The Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on Disease Symptoms and Defense Genes Expression in a Greenhouse Cucumber Infected with CMV. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 10 (2), 206-224. doi: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.7.9
- Asghari, N., Koolivand, D., & Eini, O. 2020. Differential expression of HSP90, AGO1 and AGO4 genes in tomato infected by Cucumber mosaic virus. *Crop Biotechnology*, 9 (4), 31-42: doi: 10.30473/CB.2020.53550.1811
- Bayer Vegetables. (2019). Tomato Brown Rugose Fruit Virus. Available at: <https://www.vegetables.bayer.com/nz/en-nz/resources/growing-tips/cultivation-insights/tomato-brown-rugose-fruit-virus.html>.
- Breen, S., Williams, S. J., Outram, M., Kobe, B., & Solomon, P. S. (2017). Emerging insights into the functions of pathogenesis-related protein 1. *Trends in plant science*, 22(10), 871-879. doi: 10.1016/j.tplants.2017.06.013
- Campos, M. D., Felix, M. D. R., Patanita, M., Materatski, P., Albuquerque, A., Ribeiro, J. A., & Varanda, C. (2022). Defense strategies: The role of transcription factors in tomato-pathogen interaction. *Biology*, 11(2), 235. doi: 10.3390/biology11020235
- Carbonell, A., & Daròs, J. A. (2017). Artificial microRNAs and synthetic trans-acting small interfering RNAs interfere with viroid infection. *Molecular Plant Pathology*, 18(5), 746-753. doi: 10.1111/mpp.12529
- Chen, Y. L., Lee, C. Y., Cheng, K. T., Chang, W. H., Huang, R. N., Nam, H. G., & Chen, Y. R. (2014). Quantitative peptidomics study reveals that a wound-induced peptide from PR-1 regulates immune signaling in tomato. *The Plant Cell*, 26(10), 4135-4148. doi: 10.1105/tpc.114.131185
- Chen, Y. L., Lin, F. W., Cheng, K. T., Chang, C. H., Hung, S. C., Efferth, T., & Chen, Y. R. (2023). XCP1 cleaves Pathogenesis-related protein 1 into CAPE9 for systemic immunity in Arabidopsis. *Nature Communications*, 14(1), 4697. doi: 10.1038/s41467-023-40406-7
- EPPO Global Database. (2025). Tobamovirus fructurugosum (TOBRFV). [Online]. (Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/datasheet>).
- Esmailzadeh, F., & Koolivand, D. (2022a). First report of tomato brown rugose fruit virus infecting bell pepper in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 104(2), 893-893. doi: 10.1007/s42161-022-01094-2
- Esmailzadeh, F., & Koolivand, D. (2022b). Occurrence of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 104(1), 457-457. doi: 10.1007/s42161-021-01009-7
- Esmailzadeh, F., Santosa, A. I., Çelik, A., & Koolivand, D. (2023). Revealing an Iranian Isolate of Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Complete Genome Analysis and Mechanical Transmission. *Microorganisms*, 11(10), 2434. doi: 10.3390/microorganisms11102434

- Gamir, J., Darwiche, R., Van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneider, R., & Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *The Plant Journal*, 89(3), 502-509. doi: 10.1111/tpj.13398
- Ghorbani, A., Rostami, M., Seifi, S., & Izadpanah, K. (2021). First report of Tomato brown rugose fruit virus in greenhouse tomato in Iran. *New Disease Reports*, 44(2), e12040. doi: 10.1002/ndr2.12040
- Ghorbel, M., Brini, F., Sharma, A., & Landi, M. (2021). Role of jasmonic acid in plants: the molecular point of view. *Plant Cell Reports*, 40(8), 1471-1494. doi: 10.1007/s00299-021-02687-4
- Li, Y., Li, S., Bi, D., Cheng, Y. T., Li, X., & Zhang, Y. (2010). SRFR1 negatively regulates plant NB-LRR resistance protein accumulation to prevent autoimmunity. *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001111. doi: 10.1371/journal.ppat.1001111
- Ludman, M., Szalai, G., Janda, T., & Fátýol, K. (2023). Hierarchical contribution of Argonaute proteins to antiviral protection. *Journal of Experimental Botany*, 74(21), 6760-6772. doi: 10.1093/jxb/erad327
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., ... & Dombrovsky, A. (2017). A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PloS one*, 12(1), e0170429. doi: 10.1371/journal.pone.0170429
- Panno, S., Caruso, A. G., & Davino, S. (2019). First report of tomato brown rugose fruit virus on tomato crops in Italy. *Plant Disease*, 103(6), 1443-1443. doi: 10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN
- PlantwisePlus Knowledge Bank. (2023). Tomato brown rugose fruit virus. [Online]. (Available at: <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/full/10.1079/pwkb.species.88757522>).
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 745-760. doi:10.1038/nrmicro3120
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, 339(1), 62-66. doi: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4
- Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., & Turina, M. (2016). A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of virology*, 161(2), 503-506. doi: 10.1007/s00705-015-2677-7
- Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44(1), 135-162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
- Wang, K., Zhang, X., Goatley, M., & Ervin, E. (2014). Heat shock proteins in relation to heat stress tolerance of creeping bentgrass at different N levels. *PLoS One*, 9(7), e102914. doi:10.1371/journal.pone.0102914.g001