Crop Biotechnology Open Access

Winter (2025) 15 (2): 39-57.
DOI: 10.30473/cb.2026.75880.2018

ORIGINAL ARTICLE

Identification of Key Genes and Regulatory Factors Effective in the Response to Tomato Brown Rugose Fruit Virus (TOBRFV) Using RNA-Seq Data

Fatemeh Azimi[1], Hengameh Taheri[2]*, Mohamad Hamed Ghodoum Parizipour[3], Narges Soltani[4]

1. M.Sc. Student, 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 Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
4. Ph.D. Graduate, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agricultures, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

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

Received: 21, Sep. 2025
Accepted: 18, Jan. 2025

How to cite:
Azimi, F., Taheri, H., Ghodoum Parizipour, M. H., & Soltani, N. (2025). Identification of Key Genes and Regulatory Factors Effective in the Response to Tomato Brown Rugose Fruit Virus (TOBRFV) Using RNA-Seq Data . *Crop Biotechnology*, 15 (2), 39-57.
(DOI: 10.30473/cb.2026.75880.2018)

ABSTRACT

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) is a newly emerged *Tobamovirus* that affects most plants of the Solanaceae family; therefore, understanding resistance mechanisms is crucial for disease management and control. The aim of this study was to identify hub genes and understand how their expression is regulated in response to ToBRFV infection in tomato. In this study, RNA-Seq data were used to identify hub genes in response to ToBRFV infection. For this purpose, STRING, Cytoscape, Tomtom, and GOMo bioinformatics tools were used to construct and visualize the network, examine the ontology of hub genes, to identify conserved promoter motifs, and to assess their biological roles, respectively. Accordingly, genes for nitrate reductase, heat shock protein 90, bifunctional nuclease, auxin response factor, and NAC domain-containing protein were identified as the genes with the highest ranking. Gene clustering analysis using the CytoCluster plugin in the Cytoscape platform revealed that the major gene clusters are predominantly associated with the biosynthesis pathways of flavonoids, brassinosteroid, phenylpropanoids, as well as hormone- signaling and MAPK pathways. The majority of cis-regulatory elements identified upstream of hub genes were mainly related to stress signaling and immune responses, which can be used as markers for more effective enrichment and better response of defense-related hub genes. Overall, our findings provided valuable information about the genetic determinants of virus-plant interaction and the development of immune responses against ToBRFV in tomato plants, which can be used in breeding strategies and improved crop yield management.

KEYWORDS

Gene ontology, Gene network, Hub genes, Promoter motifs, *Tomato brown rugose fruit virus*.

© 2024, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال پانزدهم، شماره دوم، پیاپی ۵۲، زمستان ۱۴۰۴ (۵۷-۳۹)

DOI: 10.30473/cb.2026.75880.2018

«مقاله پژوهشی»

شناسایی ژن‌های کلیدی و عوامل تنظیمی مؤثر در پاسخ به ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی (TOBRFV) با استفاده از داده‌های RNA-Seq

فاطمه عظیمی[۱]، هنگامه طاهری[۲*]، محمدحامد قدوم پاریزی‌پور[۳]، نرگس سلطانی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان. ملاثانی. ایران.

۲. دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان. ملاثانی. ایران.

۳. دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان. ملاثانی. ایران.

۴. دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

نویسنده مسئول:
هنگامه طاهری
رایانامه: taheri@asnrukh.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۸

استناد به این مقاله:
عظیمی، فاطمه؛ طاهری، هنگامه؛ قدوم پاریزی‌پور، محمدحامد و سلطانی، نرگس (۱۴۰۴). شناسایی ژن‌های کلیدی و عوامل تنظیمی مؤثر در پاسخ به ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی (TOBRFV) با استفاده از داده‌های RNA-Seq، *فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی*، ۱۵ (۲)، ۵۷-۳۹.
(DOI: 10.30473/cb.2026.75880.2018)

چکیده

ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی (ToBRFV; *Tomato brown rugose fruit virus*)، یک ویروس گیاهی نوظهور از جنس Tobamovirus است که بیشتر گیاهان خانواده Solanaceae را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از این رو شناخت سازوکارهای مقاومت برای مدیریت و کنترل بیماری ضروری است. هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌های کلیدی و چگونگی تنظیم بیان این ژن‌ها در پاسخ به آلودگی ToBRFV در گوجه‌فرنگی است. در این پژوهش از داده‌های RNA-Seq برای شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به آلودگی ToBRFV استفاده شد. برای این منظور از ابزارهای بیوانفورماتیک STRING، Cytoscape، Tomtom و GOMo به‌ترتیب برای ساخت و نمایش گرافیکی شبکه، بررسی هستی شناسی ژن‌های کلیدی، شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده پروموتری و بررسی عملکردی آن‌ها استفاده شد. بر این اساس، ژن‌های نیترات ردوکتاز، پروتئین شوک حرارتی ۹۰، نوکلئاز دو عملکرده، فاکتور پاسخ به اکسین و پروتئین حاوی دمین NAC به‌عنوان ژن‌هایی با بالاترین درجه رتبه‌بندی معرفی شدند. بررسی خوشه‌های ژنی با استفاده از افزونه CytoCluster در پلتفرم Cytoscape، نشان داد که خوشه‌های ژنی عمدتاً مربوط به مسیرهای بیوسنتز فلاونوئیدها، براسینواستروئیدها، فنیل‌پروپانوئیدها و همچنین مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی و MAPK هستند. عمده‌ی عناصر تنظیمی شناسایی شده در ناحیه بالادست ژن‌های کلیدی عمدتاً در پیام‌رسانی تنش‌ها و پاسخ‌های ایمنی نقش داشتند، از این رو می‌توانند به عنوان نشانگرهایی برای غنی‌سازی مؤثرتر و پاسخ‌دهی بهتر ژن‌های دفاعی کلیدی به‌کار گرفته شوند. در مجموع یافته‌های ما اطلاعات ارزشمندی در خصوص عوامل ژنتیکی تعیین‌کننده در برهم‌کنش گیاه-ویروس و بروز پاسخ‌های ایمنی علیه ToBRFV در گیاه گوجه‌فرنگی نشان داد که می‌توانند در استراتژی‌های به‌نژادی و بهبود مدیریت عملکرد محصول به‌کار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی

شبکه ژنی، ژن‌های کلیدی، موتیف‌های پروموتری، ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی، هستی شناسی ژن‌ها.

حق انتشار این مستند، متعلق به نویسندگان آن است. ۱۴۰۳ ©. ناشر این مقاله، دانشگاه پیام نور است.

این مقاله تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) منتشر شده و استفاده از آن با ارجاع صحیح مجاز است.

(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

مقدمه

گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) یکی از سبزیجات مهم اقتصادی از جنس *Solanum* و خانواده Solanaceae می‌باشد که اغلب به‌عنوان یک سیستم مدل برای تحقیقات گیاهی در ژنتیک کلاسیک، سیتوژنتیک، ژنتیک مولکولی و زیست شناسی مولکولی مورد مطالعه قرار می‌گیرد. به دلیل تغییرات آب و هوایی، گیاهان ممکن است دچار تنش آب، خاک و دما شوند که به نوبه خود احتمال آلودگی گیاه به بیمارگر را افزایش می‌دهد و در نتیجه بر عملکرد و امنیت غذایی تأثیر می‌گذارد (Singh *et al*., 2023). یکی از عوامل محدودکننده تولید گیاهان، آلودگی ویروسی است که تأثیرات چندگانه بر سلامت گیاه، کیفیت محصول، سلامت خاک و غیره دارد (García-Estrada *et al*., 2022). در حال حاضر، یک تو باموویروس[1] نوظهور، ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه فرنگی[2] (ToBRFV)، یکی از جدی‌ترین تهدیدات برای تولید گوجه‌فرنگی در جهان محسوب می شود که کشف اولیه آن در سال ۲۰۱۴ در فلسطین اشغالی گزارش شده است. همچنین در سال ۲۰۱۵، علائم خفیف برگی و علائم شدید چروکیدگی قهوه‌ای روی میوه ها در گیاهان گوجه‌فرنگی که در شرایط گلخانه‌ای در اردن کشت شده بودند، مشاهده شد (Salem *et al*., 2016). بر اساس نوع علائم و توزیع بیماری، یک علت ویروسی برای این بیماری پیشنهاد شد. سپس ویروس ناشناخته بر اساس آزمایشات زیست‌سنجی و زیست‌شناسی مولکولی جداسازی و شناسایی شد و توسط کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس ها[3] (ICTV) به عنوان به یک گونه جدید از جنس *Tobamovirus*، یعنی ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی، تعیین شد (Salem *et al*., 2023). این ویروس امروزه به بیش از ۵۰ کشور در آسیا، آفریقا، اروپا و آمریکا گسترش یافته است و محصولات گوجه‌فرنگی و فلفل را در سراسر جهان تهدید می‌کند (Topcu *et al*., 2025). علائم ToBRFV شامل پیچ‌خوردگی برگ، الگوهای موزاییکی روی برگ‌ها و مهمترین آنها، میوه‌های چروکیده قهوه‌ای است (Zhang *et al*., 2022). سازمان حفاظت از گیاهان اروپا و مدیترانه اظهار می‌کند که آلودگی ToBRFV میزان خوشه‌های میوه را در طول برداشت کاهش می‌دهد و ۳۰ تا ۷۰ در صد از عملکرد گوجه‌فرنگی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (EPPO, 2024). ToBRFV یک ویروس پایدار است که به دلیل توانایی گسترده انتقال آن، به یک نگرانی قابل توجه تبدیل شده است. گزارش شده است که انتشار این ویروس از طریق بذر آلوده بسیار پائین و در حد ۰/۰۸٪ تا ۲/۸ ٪ می‌باشد. با این حال، انتقال مکانیکی، مانند آلودگی با شیره گیاهی آلوده و انتقال به واسطه گرده‌افشان هایی نظیر زنبور *Bombus terrestris* به عنوان عامل اصلی انتشار ToBRFV معرفی شده است که می‌تواند منجر به شیوع همه‌گیری در گلخانه‌ها شود (Levitzky *et al*., 2019; Davino *et al*., 2020; Salem *et al*., 2022, Ehlers *et al*., 2023). علاوه بر این، آفت مولد مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*) نیز قادر به انتقال ویروس است و پیچیدگی گسترده‌تری را در انتشار و مدیریت ToBRFV ایجاد می‌کند (Caruso *et al*., 2024). از سوی دیگر، بی‌اثر بودن ژن‌های مقاومت R شناخته شده *Tm* در گوجه‌فرنگی و آلل‌های مقاومت *L* در فلفل و نبود واریته‌های تجاری با مصونیت کامل در برابر ToBRFV، اهمیت حیاتی مقابله با تهدید ناشی از ToBRFV را برجسته می‌کند (Salem *et al*., 2020; Zhang *et al*., 2022). تو باموویروس ها دارای ژنوم RNA رشته‌ای مثبت (ssRNA(+)) با طول تقریبی ۶/۴ کیلوباز هستند که حداقل چهار چارچوب خوانش باز (ORF) را رمزگذاری می‌کند (Ishibashi and Ishikawa, 2016) که شامل پروتئین پوششی که RNA ویروسی را احاطه کرده و از آن محافظت می‌کند، پروتئین حرکتی (MP) که امکان حرکت ویروسی بین سلول‌های مجاور را فراهم می‌کند و دو پروتئین مرتبط با همانندسازی: یک پروتئین زیر واحد

۱ *Tobamovirus*

۲ *Tomato brown rugose fruit virus*

۳ International Committee on Taxonomy of Viruses

کوچک ریلیکاز و دیگری RNA پلیمراز وابسته به RNA را رمزگذاری می‌کنند، می‌باشند. تحقیقات اخیر انجام شده نشان داد که پروتئین حرکتی ویروس ToBRFV عامل بیماری‌زایی مهمی در سازگاری ویروسی است و ویروس را قادر می‌سازد تا بر مقاومت ناشی از *Tm-2*^{2} غلبه کند (Yan *et al*., 2021; Hak and Spiegelman, 2021; Jewehan *et al*., 2022).

آلودگی ویروسی سلول‌ها منجر به برنامه‌ریزی مجدد سریع و گسترده الگوهای بیان ژن در سلول‌های میزبان برای دفاع در برابر حملات ویروسی می‌شود. درک سازوکارهایی که گیاهان از طریق آن‌ها در برابر ویروس‌ها مقاوم می شوند و طراحی محصولات مقاوم به ویروس بر اساس این دانش، ایمن‌ترین و سازگارترین رویکرد با محیط زیست است. با این حال، درک ما از فرآیندهای مولکولی زیربنایی پاسخ‌های گیاه به آلودگی‌های ویروسی همچنان محدود است. با توجه به پیچیدگی برهم‌کنش بین گیاهان میزبان و ویروس‌ها که شامل فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی است، تجزیه و تحلیل داده‌های رونویسی و مطالعه پروفایل‌های بیان ژن‌هایی با بیان افتراقی به گامی حیاتی در مطالعه سازوکارهای این برهم‌کنش‌ها تبدیل شده است. از این رو توالی‌یابی RNA (RNA-Seq)، به عنوان ابزاری قدرتمند برای شناسایی ژن هایی با بیان افتراقی[1](DEGs) در چگونگی پاسخ گیاهان میزبان به آلودگی‌های ویروسی در برهم‌کنش‌های گیاه– ویروس مطرح می‌باشد (Jiao *et al*., 2020; Zhang *et al*., 2023). برهم‌کنش های مستقیم یا غیرمستقیم بین ژن ها در یک شبکه ژنی با معرفی گره‌ها[2] به‌عنوان ژن‌ها و یال‌ها[3] به‌عنوان اتصالات بین ژن‌ها نشان داده می‌شود (Li *et al*., 2015). ارزیابی جایگاه و اهمیت گره‌ها در شبکه‌ها منجر به شناخت عناصر اصلی در سازوکارهای مولکولی فرایندهای زیستی می شود (Chin *et al*., 2014). از سوی دیگر یکی دیگر از رویکردها در شبکه‌ها، بررسی خوشه‌ای شبکه‌های زیستی به عنوان یکی از مهم‌ترین ابزارها برای شناسایی ماژول‌های عملکردی و همچنین پیش‌بینی کمپلکس‌های پروتئینی و نشانگرهای زیستی شبکه است (Li *et al*., 2017a). بر این اساس، مطالعات متعددی در خصوص بررسی شبکه برهم‌کنش گیاه و بیمارگر و شناسایی ژن‌های کلیدی در پاسخ به بیماری و سازوکارهای تنظیمی بیان ژن‌ها صورت گرفته است (Karimipour *et al*., 2025; Porameri *et al*., 2025). از این رو در مطالعه حاضر با واکاوی DEGهای به دست آمده از مطالعه قبلی (Wang *et al*., 2024)، ژن‌های کلیدی با اتصالات بالا در شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین در پاسخ به ToBRFV در گوجه‌فرنگی، شناسایی و عملکرد خوشه‌های ژنی بر اساس مسیرهای KEGG تعیین شد. از سوی دیگر با واکاوی موتیف‌های پروموتری ژن‌های کلیدی، سازوکارهای تنظیمی مقاومت علیه این ویروس در گوجه‌فرنگی تا حد زیادی مشخص شد.

پیشینه پژوهش

امروزه با بهره‌گیری از روش هایی با توان عملیاتی بالا نظیر پروفایل‌بندی گسترده رونوشت‌ها و شناسایی ژن‌های DEG، می‌توان اطلاعات مفیدی در خصوص درک سازوکارهای مولکولی مقاومت در برابر بیماری و پاسخ به عوامل بیماری‌زا فراهم آورد. استفاده از ژنومیک عملکردی، امکان شناسایی ژن‌های عملکردی کلیدی گیاه در پاسخ‌های حساس و مقاوم و درک اساس مولکولی برهم‌کنش‌های سازگار در طول حمله بیمارگر را فراهم می‌کند. فناوری‌های توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) که مقادیر عظیمی از داده های توالی یابی را تولید می‌کنند، فرصت‌های زیادی را برای درک بهتر شبکه‌های مولکولی برهم‌کنش گیاه و بیمارگر ارائه می‌دهند. این یافته ها اطلاعات ارزشمندی از منابع جدید مقاومت مرتبط با سازوکارهای ایمنی ذاتی در گوجه‌فرنگی را برای محافظت در برابر بیمارگرها در اختیار به‌نژادگران قرار می‌دهد که برای مدیریت پایدار بیماری‌های گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است (Campos *et al*., 2021).

1Differentially expressed genes
2Nodes
3Edges

مطالعه پروفایل رونویسی برگ‌های فلفل چیلی با استفاده از فناوری RNA-Seq، ۱۳ روز پس از آلودگی با ToBRFV نشان داد که ژن‌هایی با بیان افتراقی در فرآیندهای بیولوژیکی مانند پاسخ‌های دفاعی، پاسخ به ترکیبات ROS، تاخوردگی پروتئین و برهم‌کنش گیاه–بیمارگر دخیل هستند (Zhang *et al*., 2025). همچنین در مطالعه‌ی دیگری از رویکرد RNA-Seq برای بررسی الگوی بیانی ژن ها در برگ های گوجه‌فرنگی پس از آلودگی ToBRFV استفاده شد که امکان شناسایی DEGهایی را که به طور بالقوه در پاسخ دفاعی گیاه نقش دارند، فراهم کرد. بر اساس این گزارش مشخص شد که آلودگی ویروسی ToBRFV می‌تواند بیان ژن‌های مرتبط با PTI[1] مانند MAPK[2]، فاکتورهای رونویسی WRKY و پروتئین متصل به کلسیم را فعال کند. (Wang *et al*., 2024). در مطالعه‌ی دیگری (Thakare *et al*., 2024)، برای درک اساس مولکولی مقاومت به آلودگی ToBRFV در گوجه‌فرنگی، از رویکردهای مبتنی بر اُمیکس شامل یونومیکس برگ و ترانسکریپتومیکس استفاده شد تا برهم‌کنش بین ترکیب عنصری و تغذیه‌ای و بررسی تأثیر آن بر پروفایل بیان ژنی در آلودگی ToBRFV در گوجه‌فرنگی مشخص شود. آنالیز یونومیکس حاصل از بررسی تجمع عناصر کمیاب در برگ‌ها نشان داد که گیاهان مقاوم به ویروس غلظت‌های قابل توجهی بالاتر از آهن و نیکل را نسبت به گیاهان حساس داشتند. با مرتبط کردن این یافته ها با ترانسکریپتومیکس، برخی از ژن‌های کلیدی دخیل در تنظیم آهن و مسیرهای اسید آبسیزیک (ABA) شناسایی شد که به طور بالقوه مسئول ایجاد مقاومت در برابر این بیمارگر هستند. نقش آهن در تغذیه و ایمنی گیاه، بر فعالیت گیرنده‌های دخیل در گیرنده‌های تشخیص الگو[3] (PRRs) که پاسخ ایمنی را تحریک می‌کنند، تأثیر می‌گذارد .همچنین آهن به عنوان عامل افزایش ترکیبات ROS و پاسخ فوق حساسیت (HR) در گیاهان پس از آلودگی شناخته شده است (Herlihy *et al*., 2020). این یافته‌ها هرچند که تا حدودی سازوکارهای پاسخ گیاه در مواجهه با ویروس ToBRFV را نشان داد، اما اطلاعات چندانی در خصوص عملکرد ژن‌های کلیدی در شبکه هم بیانی ژن‌ها و چگونگی تنظیم بیان این ژن‌ها در گوجه‌فرنگی آلوده ارائه نداد.

روش‌شناسی پژوهش

در این مطالعه، از نتایج حاصل از داده‌های ترانسکریپتومی برگ گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به ToBRFV که توسط وانگ و همکاران (Wang *et al*., 2024) منتشر شده و توالی آن‌ها در پایگاه داده بانک ژن ملی چین با شماره دسترسی CNP0005400 ذخیره شده بود، استفاده شد. بررسی بیوانفورماتیکی جهت شناسایی ژن‌های کلیدی و عوامل تنظیمی بیان ژن‌ها روی ۵۲۲ ژن با بیان افتراقی (DEGs) بین گروه آلوده به ToBRFV و گروه شاهد (بدون تلقیح ToBRFV) انجام شد تا به بینش عمیق‌تری از عملکرد ژن‌های کلیدی و تنظیم رونویسی رونوشت آن‌ها در برهم‌کنش گیاه–ویروس پی برد.

برای ارزیابی روابط متقابل بین مجموعه ژن‌هایی با بیان افتراقی در پاسخ به ToBRFV، از ابزار STRING (نسخه ۱۲) (http://string-db.org) استفاده شد. بدین ترتیب که برای تهیه فهرست برهم‌کنشی پروتئین–پروتئین (PPI) از حداقل امتیاز اطمینان ۰/۱۵ (جهت اطمینان از شناسایی بیشینه روابط متقابل بین ژن‌ها) استفاده شد. سپس برای تجسم بهتر روابط متقابل ژن‌های موجود، فهرست حاصله به پلتفرم Cytoscape (نسخه ۳/۱۰/۲) وارد شد. در مرحله بعد از افزونه CytoHubba به عنوان ابزاری در Cytoscape برای شناسایی ژن‌های کلیدی در بین تمام گره‌ها استفاده شد. چهار الگوریتم محاسباتی از CytoHubba، یعنی MNC (بیشینه مؤلفه همسایگی)؛[4] DMNC (تراکم مؤلفه بیشینه هم سایگی)؛[5] MCC (مرکزیت بیشینه کلیک)[6] و

۱ Pattern-triggered immunity
۲ Mitogen activated protein kinase
۳ Pattern recognition receptors
۴ Maximum Neighborhood Component
۵ Density of Maximum Neighborhood Component
۶ Maximal Clique Centrality

Degree (مرکزیت درجه‌ای)[1] برای شناسایی و رتبه‌بندی ژن‌های کلیدی به‌کار گرفته شدند و بر اساس هر الگوریتم، شش ژن به عنوان ژن‌های کلیدی انتخاب شدند. سپس برهم‌کنش بین ژن‌های کلیدی و همسایگان آن در یک زیرشبکه در پلتفرم Cytoscape به نمایش گذاشته شد.

در این مطالعه جهت ارزیابی عملکرد مولکولی ژن‌های کلیدی و ارتباط آن‌ها با مسیرهای زیستی از ابزار مبتنی بر وب STRING استفاده شد. علاوه بر این، از پایگاه KEGG[2] برای بررسی مسیر بیوشیمیایی ژن‌های کلیدی زیر شبکه استفاده شد. همچنین برای گروه‌بندی گره‌های شبکه PPI در قالب خوشه‌های کمپلکس پروتئینی از یک الگوریتم خوشه‌بندی مبتنی بر چگالی یعنی IPCA[3] در افزونه Cytocluster استفاده شد تا زیرگراف‌های متراکم در شبکه PPI تشخیص داده شوند (Li *et al*. 2017a). سپس خوشه‌ها بر مبنای امتیاز اتصال رتبه‌بندی شدند و شناسایی مسیرهای KEGG گروه‌های ژنی در هر خوشه با استفاده از STRING انجام شد.

یکی دیگر از پارامترهای شناسایی شده ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به آلودگی ToBRFV واکاوی نواحی پروموتر این ژن‌ها به منظور شناسایی عناصر تنظیمی در پاسخ به این تنش زیستی بود. برای این منظور نواحی کناری بالادست ۲ کیلوبازی ژن‌های کلیدی از بخش BioMart پایگاه داده (https://plants.ensembl.org) EnsemblPlant استخراج شدند. از ابزار مقایسه موتیف (Tomtom) نسخه ۸/۵/۵ به آدرس https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom برای شناسایی موتیف‌ها بر اساس پایگاه داده موتیف‌های شناخته‌شده (JASPAR CORE PLANT 2023) استفاده شد. بدین ترتیب که این ابزار، موتیف‌ها را در پایگاه داده رتبه‌بندی کرده و برای هر تطابق معنادار، یک هم‌ترازی ایجاد می‌کند. انتخاب موتیف‌های مناسب و حذف موتیف‌های اضافه با تنظیم مقادیر آستانه P- value کمتر از یک صدم و E-value کمتر از یک ده هزارم انجام شد. سپس، نقش زیست شناختی موتیف‌های انتخاب شده با استفاده از ابزار هستی‌شناسی ژن برای موتیف‌ها (GOMo) نسخه ۸/۵/۵ به آدرس https://meme-suite.org/meme/tools/gomo مشخص شد.

یافته‌های پژوهش

شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به ToBRFV در گوجه‌فرنگی

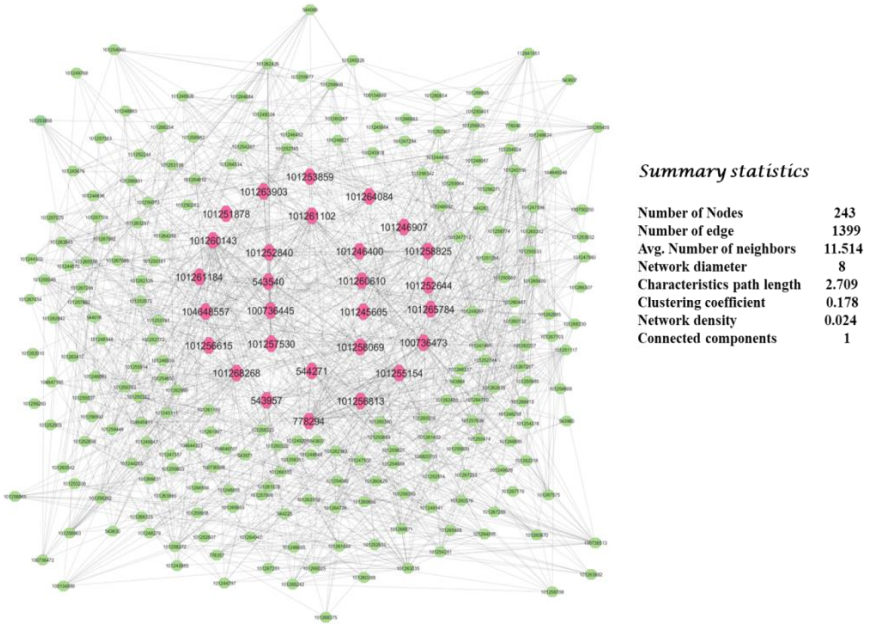
از آن جا که ژن‌های کلیدی (Hub) بر مبنای الگوی برهم‌کنشی با همسایگان در شبکه PPI رتبه‌بندی و شناسایی شده‌اند، می‌توانند نقش کلیدی در پاسخ دفاعی گوجه‌فرنگی به آلودگی ToBRFV ایفاء می‌کنند. بدین منظور بر اساس الگوریتم‌های به‌کار گرفته شده در افزونه CytoHubba، ژن‌هایی با بالاترین رتبه در شبکه برهم‌کنشی پاسخ به آلودگی ToBRFV در گیاه گوجه‌فرنگی، شناسایی شدند (شکل ۱). بر این اساس، ژن *LOC100736473* که نیترات ردوکتاز (NR) را کد می‌کند، یکی از ژن‌های کلیدی معرفی شده با بالاترین درجه‌ی رتبه‌بندی بوسیله الگوریتم‌های Degree و MNC می‌باشد که به عنوان آنزیم اصلی در تبدیل نیترات به نیتریت در گیاهان عمل می‌کند و نقش محوری در تعدیل فعالیت نیترات ردوکتاز و مقاومت به بیماری دارد (Yue *et al*., 2022). افزایش میزان نیتروژن، حساسیت گیاهان را به بیماری‌هایی مانند بیماری بلاست در غلاتی مانند برنج و گندم، افزایش می‌دهد (Beltran-Garcia *et al*., 2021; Joshi & Pokhrel, 2022). افزایش بیان ژن نیترات ردوکتاز، فعالیت نیترات ردوکتاز را افزایش می‌دهد، غلظت نیترات را در برگ‌ها کاهش می‌دهد و جذب نیتروژن گیاه را بهبود می‌بخشد (Du *et al*., 2012; Kyaing *et al*., 2011).

---

۱ Degree Centrality

۲ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

۳ Identifying Protein Complex Algorithm



شکل ۱. زیرشبکه‌ای از ژن‌های کلیدی (هاب) (رنگ قرمز) و همسایگان آن (رنگ سبز) شناسایی شده در گوجه‌فرنگی در پاسخ به ToBRFV با الگوریتم‌های مختلف افزونه CytoHubba در نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳/۱۰/۲)

Figure 1. A subnetwork of hub genes (red) and their neighbors (green) identified of tomato in response to ToBRFV with different algorithms of the CytoHubba plugin in the Cytoscape software (version 3.10.2)

اخیراً مشخص شده است که همبستگی مثبت قابل توجهی بین فعالیت نیترات ردوکتاز و مقاومت به بیماری وجود دارد (Kong *et al.*, 2024). این یافته‌ها اهمیت این آنزیم را به عنوان یک تنظیم‌کننده مولکولی متابولیسم نیترات و مقاومت به بیماری در گوجه‌فرنگی برجسته می‌کند که می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی با هدف توسعه ارقام گوجه‌فرنگی مقاوم به بیماری به کار گرفته شود.

یکی دیگر از ژن‌های کلیدی شناسایی شده، *LOC101260143* می‌باشد که پروتئین شوک حرارتی ۹۰[۱] (HSP90) را کد می‌کند و به عنوان یک چاپرون مولکولی ضروری در یوکاریوت‌ها با تسهیل تاخوردگی پروتئین‌ها، نقش کلیدی در حفظ هموستازی سلولی ایفاء می‌کند (Queitsch *et al.*, 2002; Samakovli *et al.*, 2020). همچنین مشخص شده است که HSP90ها برای مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی و انتقال پیام‌های دفاعی مناسب مورد نیاز هستند (Bao *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014). اخیراً نیز بیان HSP90ها در گیاهان کاساوا تحت تیمار عامل بیماری بلایت باکتریایی (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) القاء شد که نشان‌دهنده ارتباط بالقوه این ژن‌ها در پاسخ به بیماری‌های گیاهی است (Wei *et al.*, 2021a). همچنین همبستگی بین HSP90 و پیام‌رسانی اتوفاژی در القاء مقاومت به بیماری تأیید شد. بدین ترتیب که برهم‌کنش کمپلکس چاپرون HSP90.9با ATGها[۲]سبب فعال‌سازی پیام‌رسانی اتوفاژی و در نهایت مقاومت در برابر بیماری سوختگی باکتریایی کاساوا شد (Wei *et al.*, 2021b). اتوفاژی با بازیافت اجزای تشکیل‌دهنده سیتوپلاسمی سلولی، هموستازی سلولی را حفظ می‌کند.

یکی دیگر از ژن‌های کلیدی شناسایی شده در واکاوی شبکه برهم‌کنش پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به آلودگی ToBRFV با بالاترین درجه‌ی رتبه‌بندی بر

۱ Heat shock protein 90

۲ Autophagy-related genes

اساس الگوریتم DMNC، *LOC101263903* می‌باشد که پروتئین نوکلئاز دوعملکردی ۲ را کد می‌کند. برای اولین بار ژن نوکلئاز دوعملکردی مرتبط با پاسخ‌های دفاعی پایه در گونه برنج وحشی (*Oryza minuta*) شناسایی شد و به سرعت و به شدت در پاسخ به حمله یک بیمارگر قارچی برنج (*Magnaporthe oryzae*) و یک حشره (*Nilaparvata lugens*) و تیمارهای اسید آبسیزیک (ABA) و متیل جاسمونات القاء شد. پروتئین رمزگذار این ژن دارای فعالیت‌های RNase و DNaseی است (You *et al*., 2010). بیش بیان این ژن در آرابیدوپسیس باعث بیان ژن‌های دخیل در رسوب کالوز با واسطه ABA شد که با ایجاد یک مانع دفاعی اولیه در برابر عوامل بیماری‌زا، منجر به بروز پاسخ‌های دفاعی و افزایش مقاومت در برابر *Botrytis cinerea* شد (You *et al*., 2010). با این حال اخیراً عملکرد پروتئینی با فعالیت نوکلئاز دو عملکردی در هندوانه مورد بررسی قرار گرفته است که مقاومت هندوانه را در برابر ویروس موزاییک زرد کدو سبز[۲](ZYMV) کاهش می‌دهد (Kang *et al*., 2024).

LOC100736445 یکی دیگر از ژن‌های کاندیدی شناخته شده با بالاترین درجه‌ی رتبه بندی بر مبنای الگوریتم MCC است که فاکتور پاسخ به اُکسین (ARF) را کد می‌کند. در گوجه‌فرنگی، ژن‌های ARF به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی شبکه اُکسین در طول تهاجم بیمارگرهای گیاهی عمل می‌کنند. بیان آن‌ها در طول آلودگی ویروسی تغییر می‌کند که نشان می‌دهد مسیر اُکسین از طریق تنظیم ژن ARF به پاسخ دفاعی گیاه متصل است (Bouzroud *et al*., 2018). در مطالعه‌ای نشان داده شد miR167a و نشانگرهای اپی‌ژنتیکی به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی در پاسخ‌های ایمنی گوجه‌فرنگی عمل می‌کنند تا آلودگی ناشی از ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی[۴](TSWV) را از طریق اختلال در پیام‌رسانی اُکسین فعال کنند. بر اساس این گزارش تأیید شد که ارتباط مستقیمی بین میزان اُکسین و مقاومت به TSWV از طریق تنظیم ARF8 وجود دارد و کاهش قابل توجهی در غلظت اُکسین در گیاهان گوجه فرنگی حساس به TSWV در مقایسه با رقم متحمل مشاهده شد (Werghi *et al*., 2021).

در واکاوی شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به آلودگی ToBRFV، محصول *LOC101264084* که پروتئین حاوی دمین NAC می‌باشد، به‌عنوان یکی از گره‌های کلیدی بر اساس الگوریتم MCC شناخته شد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که فاکتورهای رونویسی NAC نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های تنش زیستی در گیاهان دارند (Meisrimler *et al*., 2019; Wang *et al*., 2020; Bian *et al*., 2020). فاکتورهای رونویسی NAC به روش‌های مختلفی در تنظیم مقاومت در برابر بیماری‌ها نقش دارند، مانند تنظیم مستقیم ژن‌های دفاعی، پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی، ROS، پاسخ‌های فوق حساسیت (HR) و برهم‌کنش با عوامل بیماری‌زا. پس از تحریک مستقیم یا غیرمستقیم ناشی از تهاجم بیمارگر، این فاکتورها با اتصال به عناصر سیس نواحی پروموتر ژن‌های خاص، بیان ژن‌های مربوط به سنتز هورمون‌های مختلف یا مسیرهای انتقال پیام هورمونی را تنظیم می‌کنند و در نتیجه پاسخ دفاعی گیاه را افزایش می‌دهند (Dong *et al*., 2024). مرگ سلولی ناشی از واکنش‌های فوق حساسیت می‌تواند از گسترش بیشتر عوامل بیماری‌زا جلوگیری کند یا آن را به تأخیر بیندازد و در نتیجه آسیب به سلول‌های گیاهی را کاهش دهد. این اثر معمولاً با انفجار و تجمع ترکیبات ROS در طول این فرآیند همراه است. مطالعات زیادی نقش این فاکتور رونویسی در پاسخ‌های ایمنی از طریق تنظیم سطح ترکیبات ROS و مرگ سلولی را گزارش کرده‌اند (Chen *et al*., 2017; Wang *et al*., 2018; Yan *et al*., 2018; Li *et al*., 2021). همچنین عوامل بیماریزا در طول فرآیند آلوده کردن گیاهان، پروتئین‌های کوچکی به نام افکتورها را ترشح می‌کنند که قدرت تهاجمی آن‌ها را شدت می‌بخشند. مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر

۱ Bifunctional nuclease 2
۲ *Zucchini yellow mosaic virus*
۳ Auxin response factor
۴ *Tomato spotted wilt virus*

نشـــان داده اســـت که افکتورها می‌توانند فاکتورهای رونویسی کلیدی نظیر عناصر NAC را در گیاهان هدف قرار دهند و با تداخل در فعال‌سازی آن‌ها و مهار ژن‌های پایین‌دست، برنامه‌ی رونویســی ژن‌ها را تغییر داده و در نهایت قدرت تهاجمی عوامل بیماری‌زا را افزایش دهند (McLellan *et al*., 2013; Meisrimler *et al*., 2019).

در مجموع، یافته‌های اخیر در خصــوص شــناســایی گره‌هایی با بیشــترین برهم‌کنش در شــبکه‌های مولکولی مرتبط با پاســخ گوجه‌فرنگی به ToBRFV، می‌تواند در شـــناســـایی عوامل موثر مقاومت در برابر آلودگی‌های ویروسی بسیار حائز اهمیت باشد.

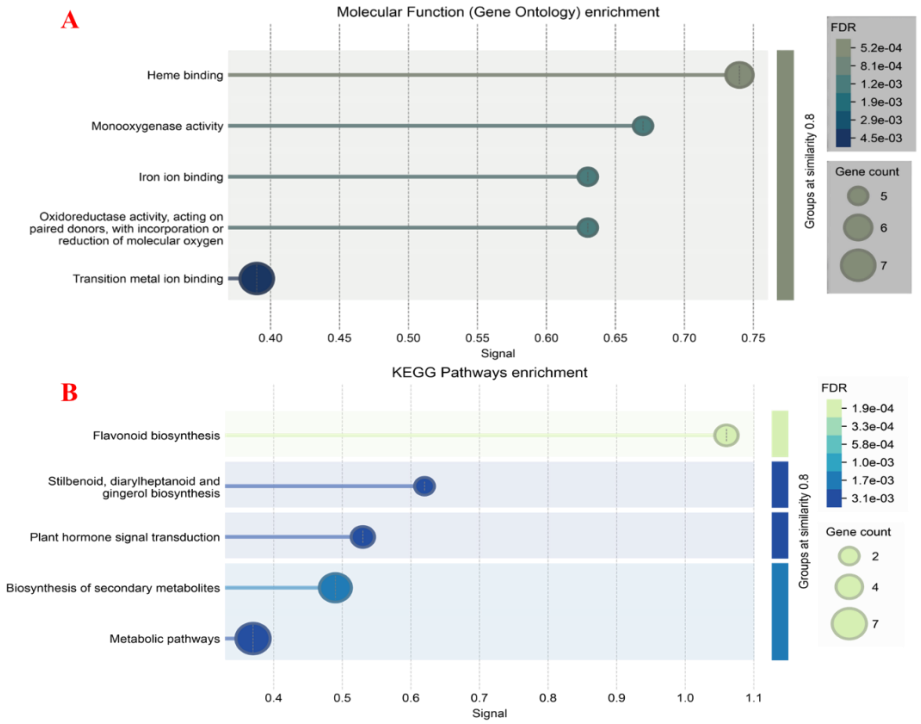
بررسی هستی‌شناسی ژن‌های کلیدی و غنی‌سازی مسیرها در پاسخ به ToBRFV

هستی‌شناسی ژن‌های کلیدی شناسایی شده در پاسخ به ToBRFV نشـان داد این ژن‌ها از نظر عملکرد مولکولی عمدتاً در اتصـــال هِم[1] فعالیت مونواکســـیژنازی، اتصـــال یون آهن و فعالیت اکسیدوردوکتازی دخیل هستند (شکل ۲A). هِم در میان مولکول‌های متصل شونده به آهن در ســـلول، جایگاه برجســـته‌ای دارد. وجود هِم آزاد در ســیتوپلاســم باید در غلظت پایین حفظ شــود تا از تنش اکسیداتیو از طریق اکسیداسیون آهن هِم جلوگیری کند (Khan and Quigley, 2011). هِم‌های آزاد به دلیل واکنش‌پذیری ذاتی پراکســـیداز و ظرفیت تولید ترکیبات ROS، به طور مؤثری باعث آسیب سلولی می شوند. در گیاهان عالی، بیوسنتز هِم عمدتاً در پلاستیدها رخ می‌دهد و پس از سنتز، در اندامک‌های مختلف گیاه توزیع شده و به صــورت کووالانســی و غیرکووالانســی به پروتئین‌ها متصـــل شـــوند. تحقیقات اولیه نشـــان داده‌اند که در آرابیدوپسیس پروتئین‌های متصل شونده به هِم در مسیر آنتی‌اکســـیدانی فعال هســـتند و گیاهانی با بیش بیان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های متصـــل به هِم، تجمع H_2O_2 کمتری را نشـــان می‌دهند (Lee *et al*., 2012).

مطالعات نیز نشان داده است که پروتئین متصل شونده به هِم[2] (HBP) نقش مهمی در فرآیندهای مختلف، از جمله تنفس، فتوســـنتز و دفاع در برابر تنش‌های مختلف ایفاء می‌کند (Vanhee *et al*., 2011; Formosa *et al*., 2022; Farvardin *et al*., 2023). مطالعه‌ی داده‌های ترانســکریپتوم برهم‌کنش عوامل بیماریزا با گیاهان، نقش مونواکسیژنازها را در پاسخ دفاعی تأیید کرد (Akbar *et al*., 2020; Khatri *et al*., 2022). همچنین مشخص شـــده اســـت که برخی مونواکســـیژنازها نظیر زیرخانواده ســـیتوکروم P450 مونواکســـیژناز A98 بواســـطه‌ی عملکردی که در بیوسنتز ترکیبات فنلی نظیر فلاونوئیدها دارنـد، نقش مهمی در افزایش مقـاومـت گیـاهـان به میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهند (Zhou *et al*., 2025). همچنین بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت اکسـیدوردوکتازی در پاســخ به آلودگی ویروس موزائیک ســویا[3] (SMV) و ToBRFV، اهمیت این آنزیم‌ها را در حذف غلظت‌های بالای ترکیبات ROS و بروز پاســخ‌های دفاعی علیه بیمارگرهای مختلف آشـــکار ســـاخت (Raza *et al*., 2025; Zhang *et al*., 2025).

همچنین این ژن‌ها از نظر غنی‌سازی KEGG عمدتاً در مســـیرهای بیوســـنتز فلاونوئید[4]، اســـتیلبنوئید[5]، انتقال پیام‌رســـانی هورمون‌های گیاهی، بیوســـنتز متابولیت‌های ثانویه و ســایر مســیرهای متابولیکی فعالیت دارند (شـکل ۲B). متابولیت‌های ثانویه که به دســـته‌های شـــیمیایی متنوعی مانند فلاونوئیدها، اســـتیلبنوئیدها و ترپنوئیدها تعلق دارند، در عملکردهای بیولوژیکی مختلفی دخیل هســـتند و در برهم‌کنش گیاه با محیط، نقش مهمی در ایمنی گیاه ایفاء می‌کنند (Alseekh *et al*., 2020). مسـیر فنیل پروپانوئید[6] (PPP) منجر به تجمع بسـیاری از خانواده‌های ترکیباتی نظیر فنیل پروپانوئیدها، فلاونوئیدها، لیگنین‌ها، اســیدهای فنولیک، اســتیلبن‌ها و کومارین‌ها می‌شود (Vogt, 2010).

۱ Heme
۲ Heme-binding protein
۳ *Soybean mosaic virus*
۴ Flavonoid
۵ Stilbenoid
۶ Phenylpropanoid pathway



شکل ۲. واکاوی هستی‌شناسی ژن‌های کلیدی در شبکه برهم‌کنش پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به آلودگی ToBRFV گوجه‌فرنگی از نظر A) عملکرد مولکولی و B) مسیرهای بیولوژیکی بر اساس پایگاه داده KEGG با استفاده از وب سایت STRING (نسخه ۱۲).

Figure 2. Ontology analysis of hub genes in the protein interaction network in tomato in response to ToBRFV A) molecular function and B) biological pathways based on the KEGG database using the STRING website (version 12).

استیلبن‌ها در مقایسه با خانواده بزرگ فلاونوئیدها، به یک گروه شیمیایی محدود تعلق دارند (Nabavi *et al.*, 2020). با این حال مطالعات زیادی نقش القاء تولید این ترکیبات را در حفاظت گیاه علیه عوامل بیماریزا تأیید می‌کند (Jeandet *et al.*, 2023). فنیل‌پروپانوئیدها و فلاونوئیدها، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به دلیل فعال‌سازی عوامل مؤثر در پیام‌رسانی در پاسخ به محرک‌های خارجی القاء می‌شوند و در بروز پاسخ‌های دفاعی گیاه نقش دارند. همچنین این ترکیبات به عنوان موانع فیزیکی یا شیمیایی علیه اهداف میکروبی یا حشرات عمل می‌کنند. پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر تنش‌های زیستی توسط فلاونوئیدها و ترکیبات فنیل پروپانوئید یا به طور غیرمستقیم به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان یا به طور مستقیم از طریق اثرات سمی برخی ترکیبات گیاهی نظیر فیتوآلکسین‌ها (ترکیبات فعال تازه سنتز شده پس از تشخیص بیمارگر) تنظیم می‌شود (Naoumkina *et al.*, 2010; Jeandet *et al.*, 2014; Oros & Kállai, 2019). یکی از سازوکارهای ساختاری در پاسخ‌های دفاعی، ایجاد موانع فیزیکی از طریق تجمع مشتقات فنیل پروپانوئید برای تقویت دیواره سلولی است (Matern *et al.*, 1995). قرار گرفتن گیاه در معرض عوامل ویروسی، بیوسنتز اسید سالیسیلیک (SA) را فعال کرده و بیوسنتز سایر متابولیت‌های دفاعی را از مسیر فنیل پروپانوئید القاء می‌کند تا مقاومت اکتسابی سیستمیک[۱](SAR) را آغاز کند (Ramaroson *et al.*, 2022).

واکاوی خوشـه‌بندی زیرشـبکه برهم‌کنش ژن‌های کلیدی با همسایگان در پاسخ به ToBRFV

خوشـه‌بندی شـبکه‌های PPI می‌تواند به عنوان یک ابزار کارآ مد، مجمو عه‌ای از پروتئین هایی که با یـکدیگر

۱ Systemic acquired resistance

برهم‌کنش دارند و در فرآیندهای زیست شناختی یکسانی شرکت می‌کنند یا با هم عملکردهای زیست‌شناختی خاصی را انجام می‌دهند، شناسایی کند (Li *et al*., 2017a). CytoCluster، به عنوان یک افزونه Cytoscape، یک ابزار کاربردی برای ارائه انواع مختلف الگوریتم‌های خو شه‌بندی، از جمله IPCA ا ست که یک الگوریتم خوشه‌بندی مبتنی بر چگالی است و می‌تواند زیرگراف‌های متراکم را در شبکه‌های برهم‌کنش پروتئین شناسایی کند. این الگوریتم ابتدا وزن هر یال را با شمارش همسایه‌های مشترک دو گره متصل به آن محاسبه می‌کند و وزن هر گره را با جمع کردن وزن یال های مجاور آن محاسبه می‌کند. هرچه وزن یک گره بیشتر با شد، احتمال اینکه آن گره به عنوان seed در نظر گرفته شود، بیشتر ا ست. پس از شنا سایی seed اولیه، IPCA، گره های بعدی را با در نظر گرفتن دو شرط احتمال برهم‌کنش و کوتاه‌ترین مسیر بین آن گره و سایر گره‌های موجود در خو شه، به خو شه ا ضافه کرده و آن را گسترش می‌دهد (Li *et al*., 2008). در این مطالعه نیز از الگوریتم IPCA برای شناسایی مجموعه‌های پروتئینی که در پاسخ به آلودگی ToBRFV در مسیرهای بیولوژیکی یکسانی م شارکت و با هم برهم‌کنش دارند، ا ستفاده شد. بر مبنای این برر سی، خو شه‌ی اول شامل ۱۶ ژن با ۹۱ یال می باشد که در مسیر بیوسنتز فلاونوئید ها، متابولیت‌های ثانویه، براسینواستروئیدها، فنیل پروپانوئیدها، ا ستیلبنوئید و م سیرهای متابولیکی می‌با شند که نشان‌دهنده نقش مؤثر این مسیرها در بروز پاسخ‌های دفاعی گیاه علیه ToBRFV می‌باشد. خوشه‌ی دوم شامل ۱۶ گره و ۸۹ یال است که به نقش انتقال پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی و م سیر پیام‌ر سانی MAPK در پا سخ به ToBRFV ا شاره دارد (جدول ۱). مطالعات اخیر رونویسی در مورد مقاومت به ویروس موزاییک سویا (SMV) در بین ارقام و سویه‌های مقاوم مختلف نشان می‌دهد که م سیرهای انتقال پیام‌ر سانی هورمونی و م سیرهای پیام‌ر سانی MAPK جزء م سیرهای اصلی در فرآیند مقاومت می‌باشند (Niu *et al*., 2024; Zhu *et al*., 2024). سیستم دفاعی گیاه توسط چندین هورمون از جمله اُکسین، اسید سالیسیلیک (SA)، سیتوکینین، اتیلن، ا سید جا سمونیک (JA) و ا سید آبسیزیک (ABA) تنظیم می‌شود. اُکسین نه تنها مستقیماً در مسیرهای پیام‌رسانی برای مقاومت شرکت می‌کند، بلکه قادر است این هورمون ها را از طریق انتقال پیام تنظیم کند (Mazzoni-Putman *et al*., 2021). یافته‌های جدید نیز ن شان داد که م سیر MAPK در پیام‌ر سانی دفاع گیاه فلفل در برابر آلودگی ToBRFV نیز نقش دارد (Zhang *et al*., 2025). در گیاهان، آبشار MAPK نقش مهمی در پیام‌رسانی دفاع در برابر حملات بیمارگر ایفاء می‌کند. فعال شدن MAPKها یکی از اولین رویدادهای پیام‌رسانی پس از درک الگو های مولکولی مرتبط با بی مارگر[1](PAMPs) و افکتور بیمارگر است (Meng & Zhang, 2013; Jagodzik *et al*., 2018). همچنین بررسی یوبیکوئیتوم و پروتئوم برگ‌های *Nicotiana benthamiana* آلوده به ToBRFVنشان داد که آلودگی ToBRFV باعث افزایش سطح یوبیکوئیتینا سیون م سیرهای پیام‌ر سانی MAPK و انتقال پیام ر سانی هورمون‌های گیاهی شده ا ست (Yang *et al*., 2025). یوبیکوئیتیناسیون به عنوان یک فرایند کلیدی تغییرات پروتئین پس از ترجمه است که تمام جنبه‌های رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Callis, 2014).

وا کاوی موتیف های پروموتری ژن های کلیدی در پاسخ به ToBRFV

برای شناخت سازوکارهای تنظیم رونوی سی ژن‌های کلیدی که در پا سخ به ToBRFV شنا سایی شده بودند، نواحی کناری بالادست[2](UFR) این ژن‌ها با استفاده از بخش Biomart پایگاه داده Ensemble Plant بازیابی شدند. سپس برای شنا سایی موتیف‌های حفاظت شده و عناصر تنظیمی سیس[3]ژن‌های کلیدی از ابزار MEME استفاده شد. بر این اساس موتیف‌های پروموتری مهم

۱ Pathogen-associated molecular patterns
۲ Upstream flanking regions (UFRs)
۳ Cis-regulatory elements (CREs)

ژن‌های کلیدی که جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی و سایر پروتئین‌های تنظیمی است، شناسایی شدند که فهرست برخی از این موتیف‌ها و توالی‌های آن‌ها به همراه عملکرد بیولوژیکی مستخرج شده آن‌ها از پایگاه GOMo در جدول (۲) ارائه شده است.

جدول ۱. رتبه‌بندی خوشه‌های ژنی موجود در زیرشبکه‌ی برهم‌کنش ژن‌های پاسخ‌دهنده به ToBRFV گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی با استفاده از الگوریتم IPCA افزونه CytoCluster موجود در Cytoscape (نسخه ۳/۱۰/۲)

Table 1. Ranking of gene clusters in the interaction subnetwork of genes in response to ToBRFV infection of tomato seedlings using the IPCA algorithm of the CytoCluster plugin available in Cytoscape (version 3.10.2)

رتبه خوشه Cluster Rank	گره Node	یال Edge	مسیر KEGG
1	16	91	بیوسنتز فلاونوئید Flavonoid biosynthesis بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه Biosynthesis of secondary metabolites بیوسنتز براسینواستروئید Brassinosteroid biosynthesis بیوسنتز فنیل پروپانوئید Phenylpropanoid biosynthesis مسیرهای متابولیکی Metabolic pathways
2	16	89	پیام‌رسان هورمونی Plant hormone signal transduction مسیر پیام‌رسانی MAPK MAPK signaling pathway

این بررسی نشان داد که عمده‌ی CREهای مهم شناسایی شده مربوط به فاکتورهای حاوی دمین Homeo، bZIP، انگشت روی C2H2، AT hook، CPP و پروتئین متصل به TATA بودند. از آن‌جا که مسیرهای پیام‌رسان هورمونی نقش بسیار مهمی در فرآیند مقاومت به بیماری‌های گیاهی دارند، از این رو واسطه‌گری نوعی فاکتور bZIP در تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی متعدد، اثربخشی آن را در تنظیم سازوکارهای مقاومت در برابر بیماری پوسیدگی ریشه در جینسینگ آمریکایی تأیید کرد (Yang *et al*., 2022). متشابهاً نقش مثبت این فاکتور رونویسی در پاسخ ایمنی بر علیه عوامل بیماریزا در سویا بواسطه تأثیر آن در تعدیل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی تأیید شد (Zhang *et al*., 2021). پیشتر نیز بیش بیان ژن‌های bZIP در کاساوا مقاومت به بیماری را بهبود بخشید و بالعکس خاموش کردن این ژن‌ها منجر به فنوتیپ حساس به بیماری شد (Li *et al*., 2017b).

پروتئین انگشت روی C_2H_2 یک خانواده بزرگ از فاکتورهای رونویسی در گیاهان است که نقش حیاتی در پاسخ به تنش و انتقال پیام‌رسانی هورمونی ایفاء می‌کند. نقش عملکردی این فاکتور رونویسی در القاء مرگ سلولی و تجمع ترکیبات ROS و مقاومت در برابر بیمارگر فیتوفترا، اهمیت این فاکتور را در القاء سازوکارهای مقاومت و پاسخ‌های ایمنی گیاه تأیید کرد (Chen *et al*., 2025 a). همچنین اهمیت عملکردی این فاکتورهای رونویسی در مقاومت به شانکر والسا در سیب و فعال‌شدن بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای دفاعی مرتبط با اسید آبسیزیک، ضرورت این فاکتورها را برای اصلاح مقاومت در برابر شانکر والسا در سیب و گلابی تأیید می‌کند (Liu *et al*., 2025).

خانواده ژنی AT-HOOK تنظیم‌کننده‌های رونویسی را کد می‌کنند که با اتصال به نواحی DNA غنی از AT، در بازسازی کروماتین و تنظیم بیان ژن‌های هدف بواسطه فرایندهای اپی‌ژنتیکی و در سطح رونویسی نقش دارند. این ژن‌ها نقش‌های حیاتی در رشد گیاه نظیر فعالیت مریستم، زمان گلدهی یا طویل شدن هیپوکوتیل ایفاء می‌کنند. همچنین از طریق شبکه‌های ژنی پاسخ‌دهنده به تنش و پیام‌رسانی هورمونی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی گیاه و مقاومت به بیمارگرها نقش دارند. تأثیر چند سطحی این عوامل بر بیان ژن و پاسخ‌های پلیوتروپیک، می‌تواند استراتژی‌های نوآورانه‌ای را برای بهره‌وری از تنوع عملکردی این عناصر در کشاورزی

پایدار ارائه دهد. همچنین دستکاری هدفمند این ژن‌ها می‌تواند افزایش مقاومت محصول در برابر تنش‌های ناشی از تغییرات اقلیمی و بهینه‌سازی صفات رشد را به همراه داشته باشد. خانواده ژنی AT-Hook نقش مهمی در دفاع گیاه در برابر بیمارگرها در بسیاری از گونه‌های زراعی دارند و ممکن است بر پاسخ‌های تنش به طور مثبت یا منفی تأثیر بگذارند. بنابراین، تنظیم بیان آن‌ها پتانسیل ایجاد گونه‌های مقاوم به تنش را از طریق روش‌های به‌نژادی یا دستکاری ژنتیکی دارد (Martinčová & Soukup, 2025). اولین گزارش از عملکرد این خانواده ژنی در پاسخ به بیمارگرهای باکتریایی و ویروسی و در طول تیمار با اسید سالیسیلیک در فلفل چیلی شرح داده شد. همچنین گیاهان گوجه‌فرنگی که ژن AT-Hook را بیان کردند، در برابر باکتری‌ها و بیمارگرهای اوومیست مقاوم‌تر بودند که نشان‌دهنده نقش مثبت آن در پاسخ به تنش‌های زیستی است (Kim *et al*., 2007).

خانواده ژنی CPP[1] دسته‌ای از فاکتورهای رونویسی حاوی دامنه‌های ساختاری غنی از سیستئین است که در تنظیم رشد گیاه و تحمل به تنش‌ها نقش دارد (Sun *et al*., 2023). مشخص شده است که یکی از اعضای CPP گوجه‌فرنگی در پاسخ ایمنی به ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی[2] (ToLCV) نقش دارد (Tripathi *et al*., 2018). همچنین فعال‌سازی اعضای این خانواده ژنی توسط *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* نشان‌دهنده‌ی عملکرد آن‌ها در سازوکارهای دفاعی برنج در برابر سوختگی برگ باکتریایی است (Gull *et al*., 2024). گزارشات جدید، بینش جدیدی در مورد عملکرد CPP در برهم‌کنش گیاه-بیمارگر ارائه داد، به‌گونه‌ای که مشخص شد بیان این فاکتور رونویسی تحت تیمار متیل جاسمونات و اسید آبسیزیک افزایش یافت. همچنین سرکوب بیان این ژن در *N. benthamiana* مقاومت در برابر *Ralstonia solanacearum* را افزایش داد. حال آن‌که بیش بیان آن در آرابیدوپسیس، حساسیت را افزایش و فعالیت برخی از آنزیم‌های مرتبط با دفاع را کاهش داد که نشان‌دهنده نقش آن در سرکوب واکنش‌های فوق‌حساسیت و مرگ سلولی و کاهش بیان ژن *PR1* است (Chen *et al*., 2025b).

بر اساس فرایند های بیولوژ یک (BP)، نقش موتیف‌ها در تنظیم رونویسی، مسیرهای پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی نظیر اتیلن، آبسیزیک، جیبرلین، اکسین و جاسمونات تأیید شد (جدول ۲). در این مطالعه، ما به دنبال درک چگونگی تنظیم بیان ژن‌های دفاعی جهت ایجاد مقاومت مؤثرتر و پایدارتر بودیم. از آن‌جا که مسیرهای پیام‌رسان هورمونی و تداخلات بین این مسیرها برای تنظیم رشد و نمو و پاسخ‌های دفاعی گیاه ضروری هستند (Berry & Argueso, 2022)، از این رو می‌توان به اهمیت عملکردی CREهای شناسایی‌شده در پاسخ‌های سازگاری گیاه علیه تنش‌های زیستی و غیرزیستی پی برد. شناخت عملکرد این واسطه‌های رونویسی و نقشی که در کنترل رشد گیاه و پاسخ‌های ایمنی دارند، همراه با مهندسی بیان و فعالیت آن‌ها، منجر به افزایش مقاومت گیاهان در برابر بیمارگرها و افزایش زیست‌توده می‌شود و در نتیجه بر ویژگی‌های مهم زراعی گیاهان تأثیر می‌گذارد (Berry & Argueso, 2022). عموماً شناسایی گروه های موتیفی در نواحی پروموتری ژن‌های دفاعی که مدول‌های تنظیمی سیس[3] (CRM) نامیده می‌شود، در درک سازوکارهای مقاومت به بیماری بسیار حائز اهمیت است و می‌تواند به عنوان نشانگرهایی برای غنی سازی مؤثرتر و پاسخ‌دهی بهتر ژن‌های دفاعی کلیدی در برنامه‌های اصلاحی به کار گرفته شوند (Tonnessen *et al*., 2019). همچنین با هدایت برهم‌کنش های بین فاکتورهای رونویسی و عناصر سیس می‌توان مجموعه‌ای از پروموترهای دوگانه را طراحی کرد که اثرات آنتاگونیستی پیام‌رسان های هورمونی را کاهش داده و در نتیجه

۱ Cysteine-rich polycomb-like protein

۲ *Tomato leaf curl virus*

۳ Cis-Regulatory Modules (CRMs)

می‌توانند به طیف و سیعی از بیمارگرهای گیاهی پا سخ دهند (Li *et al.*, 2023).

جدول ۲. موتیف‌های پروموتری و فاکتورهای رونویسی مرتبط با آن‌ها در ناحیه بالادست ژن‌های کلیدی شناسایی شده در پاسخ به ToBRFV در گوجه‌فرنگی با استفاده از ابزار MEME

Table 2. Promoter motifs and their associated transcription factors in the upstream region of hub genes identified in response to ToBRFV in tomato using the MEME tool

موتیف Motif	توالی Sequence	فاکتور رونویسی Transcription factor	عملکرد Function
MA0108.3		TBP-related factors فاکتور مربوط به پروتئین متصل شونده به TATA	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی BP: response to wounding, regulation of transcription, response to salt stress فرایند بیولوژیکی: پاسخ به تنش زخمی شدن، تنظیم رونویسی، پاسخ به تنش شوری خشکی CC: endomembrane system اجزای سلولی: سیستم غشای داخلی
MA0135.2		Homeo domain factors فاکتور حاوی دومین Homeo	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی CC: endomembrane system اجزای سلولی: سیستم غشای داخلی BP: regulation of transcription فرایند بیولوژیکی: تنظیم رونویسی
MA0284.3		Basic leucine zipper factors (bZIP) فاکتور bZIP	CC: endomembrane system اجزای سلولی: سیستم غشای داخلی MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی
MA0356.1		Homeo domain factors فاکتور حاوی دومین Homeo	BP regulation of transcription, response to gibberellin stimulus, response to jasmonic acid stimulus فرایند بیولوژیکی: تنظیم رونویسی، پاسخ به محرک‌های جیبرلین و جاسمونات
MA0715.1		Homeo domain factors فاکتورهای حاوی دومین Homeo	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی CC: endomembrane system اجزای سلولی: سیستم غشای داخلی BP: regulation of transcription فرایند بیولوژیکی: تنظیم رونویسی
MA0933.1		A.T hook factors فاکتورهای A.T hook	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی CC: endomembrane system اجزای سلولی: سیستم غشای داخلی BP: regulation of transcription فرایند بیولوژیکی: تنظیم رونویسی
MA1125.2		C2H2 zinc finger factors فاکتورهای انگشت روی C2H2	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی BP: regulation of transcription فرایند بیولوژیکی: تنظیم رونویسی CC: plasma membrane اجزای سلولی: غشای پلاسمایی
MA1161.1		TSO1(CPP)	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی
MA0378.2		SFP1 C2H2 zinc finger factors فاکتورهای انگشت روی C2H2	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی CC: endomembrane system اجزای سلولی: سیستم غشای داخلی BP: response to ethylene stimulus فرایند بیولوژیکی: پاسخ به محرک اتیلن
MA0398.2		SUM1 A.T hook factors فاکتورهای A.T hook	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی CC: endomembrane system اجزای سلولی: سیستم غشای داخلی
MA0578.1		SPL8 C3H(C), C2HC zinc fingers factors فاکتورهای انگشت روی C2H2	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی BP: regulation of transcription فرایند بیولوژیکی: تنظیم رونویسی
MA1379.1		SOL1 CPP	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی CC: endomembrane system اجزای سلولی: سیستم غشای داخلی MF: pseudouridine synthase activity فعالیت مولکولی: فعالیت سنتز سودویوریدین BP: auxin mediated signaling pathway فرایند بیولوژیکی: مسیر پیام‌رسانی هدایت شده به‌وسیله اکسین

MA1380.1		TCX6 CPP	MF: transcription factor activity فعالیت مولکولی: فعالیت فاکتور رونویسی BP: response to ethylene stimulus, response to abscisic acid stimulus, response to salt stress response to water deprivation فرایند بیولوژیکی: پاسخ به اتیلن، پاسخ به محرک آبسیزیک اسید، پاسخ به تنش شوری و کمبود آب

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از واکاوی شبکه برهم‌کنش پروتئینی در پاسخ به آلودگی ToBRFV، ۲۸ ژن کلیدی را شناسایی کرد که از آن‌جمله می‌توان به ژن‌های نیترات ردوکتاز، پروتئین شوک حرارتی ۹۰، نوکلئاز دو عملکرده، فاکتور پاسخ به اکسین و پروتئین حاوی دمین NAC اشاره کرد که عمده عملکرد مولکولی آن‌ها شامل اتصال هِم، اتصال یون آهن، فعالیت مونواکسیژنازی و اکسیدوردوکتازی بود. همچنین بررسی مسیر بیوشیمیایی از طریق پایگاه داده KEGG، نقش آن‌ها را در مسیرهای بیوسنتز فلاونوئیدها، انتقال پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و سایر مسیرهای متابولیکی تأیید کرد. بررسی ناحیه پروموتری این ژن‌ها نشان داد که عمده‌ی CREهای مهم شناسایی شده مربوط به فاکتورهای حاوی دمین Homeo، bZIP، انگشت روی C2H2، AT hook، CPP و پروتئین متصل به TATA می‌باشند که عملکرد آن‌ها را در بروز پاسخ‌های سازگاری گیاه علیه تنش‌های زیستی و غیرزیستی مشخص کرد. از این رو به کارگیری این ژن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی می‌تواند در بروز پاسخ‌های دفاعی علیه ToBRFV اثرگذار باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

Akbar, S., Wei, Y., Yuan, Y., Khan, M. T., Qin, L., Powell, C. A., ... & Zhang, M. (2020). Gene expression profiling of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense system following *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) infection. *BMC Plant Biology*, 20(1), 532.

Alseekh, S., de Souza, L. P., Benina, M., & Fernie, A. R. (2020). The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. *Phytochemistry*, 174, 112347.

Bao, F., Huang, X., Zhu, C., Zhang, X., Li, X., & Yang, S. (2014). *Arabidopsis* HSP 90 protein modulates RPP 4-mediated temperature-dependent cell death and defense responses. *New Phytologist*, *202*(4), 1320-1334.

Beltran-Garcia, M. J., Martínez-Rodríguez, A., Olmos-Arriaga, I., Valdes-Salas, B., Di Mascio, P., & White, J. F. (2021). Nitrogen fertilization and stress factors drive shifts in microbial diversity in soils and plants. *Symbiosis*, 84(3), 379-390.

Berry, H. M., & Argueso, C. T. (2022). More than growth: Phytohormone-regulated transcription factors controlling plant immunity, plant development and plant architecture. *Current opinion in plant biology*, *70*, 102309.

Bian, Z., Gao, H., & Wang, C. (2020). NAC transcription factors as positive or negative regulators during ongoing battle between pathogens and our food crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 81.

Bouzroud, S., Gouiaa, S., Hu, N., Bernadac, A., Mila, I., Bendaou, N., ... & Zouine, M. (2018). Auxin response factors (ARFs) are potential mediators of auxin action in tomato response to biotic and abiotic stress (*Solanum lycopersicum*). *PloS one*, 13(2), e0193517.

Callis, J. (2014). The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 12, e0174.

Campos, M. D., Félix, M. D. R., Patanita, M., Materatski, P., & Varanda, C. (2021). High throughput sequencing unravels tomato-pathogen interactions towards a sustainable plant breeding. *Horticulture research*, 8.

Caruso, A. G., Tortorici, S., Davino, S., Bertacca, S., Ragona, A., Lo Verde, G., ...& Panno, S. (2024). The invasive tomato pest *Tuta absoluta* can transmit the emergent *tomato brown rugose fruit virus*. *Entomologia Generalis*, *44*(2), 289-296.

Chen, Q., Niu, F., Yan, J., Chen, B., Wu, F., Guo, X., ... & Jiang, Y. Q. (2017). Oilseed rape NAC56 transcription factor modulates reactive oxygen species accumulation and hypersensitive response-like cell death. *Physiologia Plantarum*, 160(2), 209-221.

Chen, Y., Liu, X., Zhou, Y., Zheng, Y., Xiao, Y., Yuan, X., ... & Chen, X. (2025 a). Functional characterization of four soybean C_2H_2 zinc-finger genes in *Phytophthora* resistance. *Plant Signaling & Behavior*, 20(1), 2481185.

Chen, Y., Cheng, L., Guan, X., Liang, Y., Xue, Y., Zhao, W., ... & Gao, G. (2025 b). StCPP3 interacts with type III secretion protein HrpB7 and negatively regulates plant resistance against *Ralstonia solanacearum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 742, 151105.

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*(Suppl 4), S11.

Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Barone, S., & Panno, S. (2020). *Tomato brown rugose fruit virus*: Seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments. *Plants*, *9*(11), 1615.

Dong, B., Liu, Y., Huang, G., Song, A., Chen, S., Jiang, J., ... & Fang, W. (2024). Plant NAC transcription factors in the battle against pathogens. *BMC Plant Biology*, 24(1), 958.

Du, Y. C., Wang, Y. B., Fan, W. T., Gai, Z. J., Yu, D. S., Gu, W., Zhang, L. L., & Ma, F. M. (2012). Effect of nitrogen fertilization on nitrate reductase and nitrite reductase activities of sugar beet. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 18(3), 717-723.

Ehlers, J., Nourinejhad Zarghani, S., Liedtke, S., Kroschewski, B., Büttner, C., & Bandte, M. (2023). Analysis of the spatial dispersion of *tomato brown rugose fruit virus* on surfaces in a commercial tomato production site. *Horticulturae*, *9*(5), 611.

Farvardin, A., Llorens, E., Liu-Xu, L., Sánchez-Giménez, L., Wong, A., Biosca, E. G., ... & Vicedo, B. (2023). *Solanum lycopersicum* heme-binding protein 2 as a potent antimicrobial weapon against plant pathogens. *Scientific Reports*, 13(1), 20336.

Formosa, L. E., Maghool, S., Sharpe, A. J., Reljic, B., Muellner-Wong, L., Stroud, D. A., ... & Maher, M. J. (2022). Mitochondrial COA7 is a heme-binding protein with disulfide reductase activity, which acts in the early stages of complex IV assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(9), e2110357119.

García-Estrada, R. S., Diaz-Lara, A., Aguilar-Molina, V. H., & Tovar-Pedraza, J. M. (2022). Viruses of economic impact on tomato crops in Mexico: From diagnosis to management—A review. *Viruses*, 14(6), 1251.

Gull, S., Arfan, M., Uddin, S., Qasim, M., Babar, S., Rajput, N., ... & Iqbal, R. (2024). Identification and characterization of cysteine-rich polycomb-like protein (CPP) gene family in rice (*Oryza sativa* L.) in response to phytohormones and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* stress. *Plant Stress*, 14, 100677.

Hak, H., & Spiegelman, Z. (2021). The *tomato brown rugose fruit virus* movement protein overcomes *Tm-2*^{2} resistance in tomato while attenuating viral transport. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(9), 1024-1032.

Herlihy, J. H., Long, T. A., & McDowell, J. M. (2020). Iron homeostasis and plant immune responses: recent insights and translational implications. *Journal of Biological Chemistry*, 295(39), 13444-13457.

Huang, S., Monaghan, J., Zhong, X., Lin, L., Sun, T., Dong, O. X., & Li, X. (2014). HSP 90s are required for NLR immune receptor accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 79(3), 427-439.

Ishibashi, K., & Ishikawa, M. (2016). Replication of *tobamovirus* RNA. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 55-78.

Jagodzik, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., & Ludwikow, A. (2018). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in plant science*, 9, 1387.

Jeandet, P., Hébrard, C., Deville, M. A., Cordelier, S., Dorey, S., Aziz, A., & Crouzet, J. (2014). Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. *Molecules*, 19(11), 18033-18056.

Jeandet, P., Trotel-Aziz, P., Jacquard, C., Clément, C., Mohan, C., Morkunas, I., ... & Aziz, A. (2023). Use of elicitors and beneficial bacteria to induce and prime the stilbene phytoalexin response: applications to grapevine disease resistance. *Agronomy*, 13(9), 2225.

Jewehan, A., Salem, N., Tóth, Z., Salamon, P., & Szabó, Z. (2022). Screening of Solanum (sections *Lycopersicon* and *Juglandifolia*) germplasm for reactions to the *tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129(1), 117-123.

Jiao, Y., An, M., Li, X., Yu, M., Zhao, X., Xia, Z., & Wu, Y. (2020). Transcriptomic and functional analyses reveal an antiviral role of autophagy during pepper mild mottle virus infection. *BMC Plant Biology*, 20(1), 495.

Joshi, A., & Pokhrel, C. P. (2022). Assessment of rice blast (*Pyricularia Grisea*) disease under different concentrations of nitrogen on different rice cultivars. *American Journal of Interdisciplinary Research and Innovation*, 1(1), 25-33.

Kang, B., Liu, L., Liu, L., Liu, M., Wu, H., Peng,

B., ... & Gu, Q. (2024). A bifunctional nuclease promotes the infection of *zucchini yellow mosaic virus* in watermelon by targeting P3. *Plants*, *13*(23), 3431.

Karimipour, R., Koolivand, D., Ghorbani, A., Naderpour, M., & Rostami, M. (2025). Integrated gene network analysis and experimental validation identify key hub genes in potato response to *Potato Virus Y* infection. *PLoS One*, *20*(8), e0329747.

Khan, A. A., & Quigley, J. G. (2011). Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(5), 668-682.

Khatri, P., Wally, O., Rajcan, I., & Dhaubhadel, S. (2022). Comprehensive analysis of cytochrome P450 monooxygenases reveals insight into their role in partial resistance against *Phytophthora sojae* in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 13, 862314.

Kim, S. Y., Kim, Y. C., Seong, E. S., Lee, Y. H., Park, J. M., & Choi, D. (2007). The chili pepper CaATL1: an AT-hook motif-containing transcription factor implicated in defence responses against pathogens. *Molecular plant pathology*, 8(6), 761-771.

Kong, M., Xu, H., Ali, Q., Jing, H., Wang, F., Xu, Q., ... & Shen, Y. (2024). Nitrate reductase drives nutrition control and disease resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Cultivars. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 24(1), 818-830.

Kyaing, M. S., Gu, L. J., & Cheng, H. M. (2011). The role of nitrate reductase and nitrite reductase in plant. *Current Biotechnology*, 1, 159-164.

Lee, H. J., Mochizuki, N., Masuda, T., & Buckhout, T. J. (2012). Disrupting the bimolecular binding of the haem-binding protein 5 (AtHBP5) to haem oxygenase 1 (HY1) leads to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 63(16), 5967-5978.

Levitzky, N., Smith, E., Lachman, O., Luria, N., Mizrahi, Y., Bakelman, H., ... & Dombrovsky, A. (2019). The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of *Tomato brown rugose fruit virus* contributing to disease spread in tomatoes. *PloS one*, 14(1), e0210871.

Li, M., Chen, J. E., Wang, J. X., Hu, B., & Chen, G. (2008). Modifying the DPClus algorithm for identifying protein complexes based on new topological structures. *BMC bioinformatics*, 9(1), 398.

Li, Y., Pearl, S. A., & Jackson, S. A. (2015). Gene networks in plant biology: approaches in reconstruction and analysis. *Trends in plant science*, 20(10), 664-675.

Li, M., Li, D., Tang, Y., Wu, F., & Wang, J. (2017 a). CytoCluster: a cytoscape plugin for cluster analysis and visualization of biological networks. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1880.

Li, X., Fan, S., Hu, W., Liu, G., Wei, Y., He, C., & Shi, H. (2017 b). Two cassava basic leucine zipper (bZIP) transcription factors (MebZIP3 and MebZIP5) confer disease resistance against *cassava bacterial blight*. *Frontiers in plant science*, 8, 2110.

Li, T., Cheng, X., Wang, X., Li, G., Wang, B., Wang, W., ... & Xu, Y. (2021). Glyoxalase I-4 functions downstream of NAC72 to modulate downy mildew resistance in grapevine. *The Plant Journal*, 108(2), 394-410.

Li, X., Niu, G., Fan, Y., Liu, W., Wu, Q., Yu, C., ... & Pei, Y. (2023). Synthetic dual hormone-responsive promoters enable engineering of plants with broad-spectrum resistance. *Plant Communications*, 4(4).

Liu, Z., Zheng, Y., Du, C., Sun, E., Yu, H., Cai, M., ... & Zuo, C. (2025). Genome-wide analysis of C2H2 transcription factors reveals that *PbeCH1* and *PbeCH4* are associated with *Valsa* canker resistance in *Pyrus betulifolia*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110328.

Martinčová, M., & Soukup, A. (2025). Twenty years of AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED (AHL) gene family research–Their potential in crop improvement. *Current Plant Biology*, 100460.

Matern, U., Grimmig, B., & Kneusel, R. E. (1995). Plant cell wall reinforcement in the disease-resistance response: molecular composition and regulation. *Canadian journal of botany*, *73*(S1), 511-517.

Mazzoni-Putman, S. M., Brumos, J., Zhao, C., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2021). Auxin interactions with other hormones in plant development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(10), a039990.

McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., ... & Birch, P. R. (2013). An RxLR effector from *Phytophthora infestans* prevents re-localisation of two plant NAC transcription factors from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *PLoS pathogens*, *9*(10), e1003670.

Meisrimler, C. N., Pelgrom, A. J., Oud, B., Out, S., & Van den Ackerveken, G. (2019). Multiple downy mildew effectors target the stress-related NAC transcription factor Ls NAC 069 in lettuce. *The Plant Journal*, 99(6), 1098-1115.

Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51(1), 245-266.

Nabavi, S. M., Šamec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., ... & Shirooie, S. (2020). Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnology advances*, 38, 107316.

Naoumkina, M. A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L. I. N. A., Dai, X., Zhao, P. X., & Dixon, R. A. (2010). Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular plant pathology*, 11(6), 829-846.

Niu, J., Zhao, J., Guo, Q., Zhang, H., Yue, A., Zhao, J., ... & Du, W. (2024). WGCNA reveals hub genes and key gene regulatory pathways of the response of soybean to infection by *Soybean mosaic virus*. *Genes*, 15(5), 566.

Oros, G., & Kállai, Z. (2019). Phytoanticipins: The constitutive defense compounds as potential botanical fungicides. In *Bioactive Molecules in Plant Defense: Signaling in Growth and Stress* (pp. 179-229). Cham: Springer International Publishing.

Porameri, Z., Ghorbani, A., Mirsoleymani, Z., Karimi, M., Rostami, M., & Hemmati, S. A. (2025). Key regulatory genes in sugar beet's defense against *curly top virus* identified by network analysis and qRT-PCR. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *43*, 102214.

Queitsch, C., Sangster, T. A., & Lindquist, S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 417(6889), 618-624.

Ramaroson, M. L., Koutouan, C., Helesbeux, J. J., Le Clerc, V., Hamama, L., Geoffriau, E., & Briard, M. (2022). Role of phenylpropanoids and flavonoids in plant resistance to pests and diseases. *Molecules*, 27(23), 8371.

Raza, M. M., Jia, H., Gu, S., Gai, J., & Li, K. (2025). Transcriptome insights into resistance mechanisms against *Soybean Mosaic Virus* Strain SC4 in Soybean. *Agronomy*, 15(4), 906.

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.

Salem, N. M., Cao, M. J., Odeh, S., Turina, M., & Tahzima, R. (2020). First report of *tobacco mild green mosaic virus* and *tomato brown rugose fruit virus* infecting *Capsicum annuum* in Jordan. *Plant Disease*, *104*(2), 601.

Salem, N. M., Sulaiman, A., Samarah, N., Turina, M., & Vallino, M. (2022). Localization and mechanical transmission of *tomato brown rugose fruit virus* in tomato seeds. *Plant Disease*, 106(1), 275-281.

Salem, N. M., Jewehan, A., Aranda, M. A., & Fox, A. (2023). *Tomato brown rugose fruit virus* pandemic. *Annual review of phytopathology*, 61(1), 137-164.

Samakovli, D., Tichá, T., Vavrdová, T., Ovečka, M., Luptovčiak, I., Zapletalová, V., ... & Šamaj, J. (2020). YODA-HSP90 module regulates phosphorylation-dependent inactivation of SPEECHLESS to control stomatal development under acute heat stress in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 13(4), 612-633.

Singh, B. K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J. E., Liu, H., & Trivedi, P. (2023). Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nature Reviews Microbiology*, 21(10), 640-656.

Sun, Y., Jia, X., Chen, D., Fu, Q., Chen, J., Yang, W., ... & Xu, X. (2023). Genome-wide identification and expression analysis of cysteine-rich polycomb-like protein (CPP) gene family in tomato. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5762.

Thakare, A. P., Della Lucia, M. C., Mulagala, C., Bertoldo, G., Cagnin, M., & Stevanato, P. (2024). Omics based approaches to decipher the leaf ionome and transcriptome changes in *Solanum lycopersicum* L. upon *Tomato Brown Rugose Fruit Virus* (ToBRFV) infection. *PloS one*, 19(11), e0313335.

Tonnessen, B. W., Bossa-Castro, A. M., Mauleon, R., Alexandrov, N., & Leach, J. E. (2019). Shared cis-regulatory architecture identified across defense response genes is associated with broad-spectrum quantitative resistance in rice. *Scientific reports*, *9*(1), 1536.

Topcu, Y., Yildiz, K., Kayikci, H. C., Aydin, S., Feng, Q., & Sapkota, M. (2025). Deciphering resistance to *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) using genome-wide association studies. *Scientia Horticulturae*, *341*, 113968.

Tripathi, A., Goswami, K., Tiwari, M., Mukherjee, S. K., & Sanan-Mishra, N. (2018). Identification and comparative analysis of microRNAs from tomato varieties showing contrasting response to ToLCV infections. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(2), 185-202.

Vanhee, C., Zapotoczny, G., Masquelier, D., Ghislain, M., & Batoko, H. (2011). The *Arabidopsis* multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *The Plant Cell*, 23(2), 785-805.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2-20.

Wang, Z., Xia, Y., Lin, S., Wang, Y., Guo, B., Song, X., ... & Zhao, H. (2018). Osa-miR164a targets Os NAC 60 and negatively regulates rice

immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Journal*, 95(4), 584-597

Wang, J., Zheng, C., Shao, X., Hu, Z., Li, J., Wang, P., ... & Shi, K. (2020). Transcriptomic and genetic approaches reveal an essential role of the NAC transcription factor SlNAP1 in the growth and defense response of tomato. *Horticulture Research*, *7*, 209

Wang, D., Chen, M., Peng, J., Zheng, H., Lu, Y., Wu, G., ... & Rao, S. (2024). Transcriptome analysis of tomato leaves reveals candidate genes responsive to *tomato brown rugose fruit virus* infection. *International journal of molecular sciences*, 25(7), 4012.

Website. EPPO. (2024). *Tomato brown rugose fruit virus.* EPPO datasheets on pests recommended for regulation. *https://gd.eppo.int*

Wei, Y., Zhu, B., Liu, W., Cheng, X., Lin, D., He, C., & Shi, H. (2021 a). Heat shock protein 90 co-chaperone modules fine-tune the antagonistic interaction between salicylic acid and auxin biosynthesis in cassava. *Cell Reports*, 34(5).

Wei, Y., Zeng, H., Liu, W., Cheng, X., Zhu, B., Guo, J., & Shi, H. (2021 b). Autophagy-related genes serve as heat shock protein 90 co-chaperones in disease resistance against cassava bacterial blight. *The Plant Journal*, 107(3), 925-937.

Werghi, S., Herrero, F. A., Fakhfakh, H., & Gorsane, F. (2021). Auxin drives *tomato spotted wilt virus* (TSWV) resistance through epigenetic regulation of auxin response factor ARF8 expression in tomato. *Gene*, *804*, 145905.

Yan, J., Tong, T., Li, X., Chen, Q., Dai, M., Niu, F., ... & Jiang, Y. Q. (2018). A novel NAC-type transcription factor, NAC87, from oilseed rape modulates reactive oxygen species accumulation and cell death. *Plant and Cell Physiology*, 59(2), 290-303.

Yan, Z. Y., Ma, H. Y., Wang, L., Tettey, C., Zhao, M. S., Geng, C., ... & Li, X. D. (2021). Identification of genetic determinants of *tomato brown rugose fruit virus* that enable infection of plants harbouring the *Tm-2*^{2} resistance gene. *Molecular Plant Pathology*, *22*(11), 1347-1357.

Yang, S., Zhang, X., Zhang, X., Bi, Y., & Gao, W. (2022). A bZIP transcription factor, PqbZIP1, is involved in the plant defense response of American ginseng. *Peer J*, 10, e12939.

Yang, J., Wang, D., Zhang, B., Chen, M., Chen, J., Yan, F., & Rao, S. (2025). Comprehensive ubiquitome analysis of *Nicotiana benthamiana* leaves infected with *tomato brown rugose fruit virus*. *Biology*, 14(6), 656.

You, M. K., Shin, H. Y., Kim, Y. J., Ok, S. H., Cho, S. K., Jeung, J. U., ... & Shin, J. S. (2010). Novel bifunctional nucleases, OmBBD and AtBBD1, are involved in abscisic acid-mediated callose deposition in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 152(2), 1015-1029.

Yue, W., Liu, L., Chen, S., Bai, Y., & Li, N. (2022). Effects of water and nitrogen coupling on growth, yield and quality of greenhouse tomato. *Water*, 14(22), 3665.

Zhang, M., Liu, Y., Li, Z., She, Z., Chai, M., Aslam, M., ... & Qin, Y. (2021). The bZIP transcription factor GmbZIP15 facilitates resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phytophthora sojae* infection in soybean. *Iscience*, 24(6).

Zhang, S., Griffiths, J. S., Marchand, G., Bernards, M. A., & Wang, A. (2022). *Tomato brown rugose fruit virus*: An emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide. *Molecular Plant Pathology*, 23(9), 1262-1277.

Zhang, Z., Chang, X., Luo, S., Wang, Y., Xuan, S., Zhao, J., ... & Chen, X. (2023). Transcriptome analysis of two pepper genotypes infected with *pepper mild mottle virus*. *Frontiers in Genetics*, 14, 1164730.

Zhang, B., Wang, D., Chen, M., Yang, J., Li, J., Chen, J., ... & Rao, S. (2025). Transcriptome analysis of pepper leaves in response to *tomato brown rugose fruit virus* infection. *Plants*, 14(9), 1280.

Zhou, Z., Duan, Y., Li, Y., Zhang, P., Li, Q., Yu, L., ... & Xiao, Y. (2025). CYP98A monooxygenases: a key enzyme family in plant phenolic compound biosynthesis. *Horticulture Research*, 12(6), uhaf074.

Zhu, H., Li, R., Fang, Y., Zhao, X., Teng, W., Li, H., & Han, Y. (2024). Weighted gene co-expression network analysis uncovers critical genes and pathways involved in soybean response to *soybean mosaic virus*. *Agronomy*, 14(11), 2455.