

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

Fatemeh Azimi¹, Hengameh Taheri^{2*} , Mohamad Hamed Ghodoum Parizipour³, Narges Soltani⁴

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 Agriculture, 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](https://doi.org/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*.



«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

چکیده

ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی (Tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV) 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 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 به ترتیب برای ساخت و نمایش گرافیکی شبکه، بررسی هستی‌شناسی ژن‌های کلیدی، شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده پروموتری و بررسی عملکردی آن‌ها استفاده شد. بر این اساس، ژن‌های نیتراژ ردوکتاز، پروتئین شوک حرارتی ۹۰، نوکلئاز دو عملکردی، فاکتور پاسخ به اکسیدان و پروتئین حاوی دمین NAC به عنوان 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، براسینوئیدها، فیل‌پروپانوییدها و همچنین مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی و MAPK هستند. عمده‌ی عناصرتظیمی سیستم 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 به کار 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 به کار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی

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

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.
۲. دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.
۳. دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.
۴. دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

نویسنده مسئول:

هنگامه طاهری

رایانامه: taheri@asnruk.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)، ۳۹-۵۷.

(DOI: [10.30473/cb.2026.75880.2018](https://doi.org/10.30473/cb.2026.75880.2018))

مقدمه

گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) یکی از سبزیجات مهم اقتصادی از جنس *Solanum* و خانواده Solanaceae می‌باشد که اغلب به عنوان یک سیستم مدل برای تحقیقات گیاهی در ژنتیک کلاسیک، سیتوژنتیک، ژنتیک مولکولی و زیست‌شناسی 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 بامو ویروس^۱ نوظهور، ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه فرنگی^۲ (ToBRFV)، یکی از جدی‌ترین تهدیدات برای تولید گوجه فرنگی در جهان محسوب می‌شود 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 میوه‌ها در گیاهان گوجه فرنگی 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 ویروس‌ها^۳ (ICTV) به عنوان به یک گونه جدید از جنس *Tobamovirus*، یعنی ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه فرنگی، 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 گوجه فرنگی 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 درصد از عملکرد گوجه فرنگی 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 گرده‌افشان‌هایی 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 گوجه فرنگی (*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 گوجه فرنگی و آلل‌های مقاومت *L* در فلفل و نبود وارپته‌های تجاری با مصنوعیت کامل در برابر ToBRFV، اهمیت حیاتی مقابله با تهدید ناشی از ToBRFV را برجسته می‌کند (Salem et al., 2020; Zhang et al., 2022). تو بامو ویروس‌ها دارای ژنوم RNA رشته‌ای مثبت ((+)ssRNA با طول تقریبی ۶/۴ کیلو باز هستند که حداقل چهار چارچوب خوانش باز (ORF) را رمزگذاری می‌کند (Ishibashi and Ishikawa, 2016) که شامل پروتئین پوششی که RNA ویروس 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 International Committee on Taxonomy of Viruses^۲ Tobamovirus^۳ Tomato brown rugose fruit virus

کوچک رپلیکاز و دیگری RNA پلیمرز وابسته به RNA را رمزگذاری می‌کند، 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 می‌شوند 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 ژن‌هایی با بیان افتراقی^۴ (DEGs) در چگونگی پاسخ گیاهان میزبان به آلودگی‌های ویروسی در برهم‌کنش‌های گیاه-ویروس مطرح می‌باشد (Jiao et al., 2020; Zhang et al., 2023). برهم‌کنش‌های مستقیم یا غیرمستقیم بین ژن‌ها در یک شبکه ژنی با معرفی گره‌ها؛ به عنوان ژن‌ها و یال‌ها به عنوان 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 می‌شود (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 روش‌هایی 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 داده‌های توالی‌یابی را تولید می‌کنند، فرصت‌های زیادی را برای درک بهتر شبکه‌های مولکولی برهم‌کنش گیاه و بیمارگر ارائه می‌دهند. این یافته‌ها 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).

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 هم‌بیانی 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)،^۴ DMNC (تراکم مؤلفه بیشینه همسایگی)،^۵ MCC (مرکزیت بیشینه کلیک)^۶

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 ژن‌ها در برگ‌های 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^۱ PTI مانند^۲ MAPK، 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 میکس 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 داشته‌اند. با مرتبط کردن این یافته‌ها با ترانسکریپتومیکس، برخی از ژن‌های کلیدی دخیل در تنظیم آهن و مسیرهای اسید آسبازیک (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^۳ (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

^۴ Maximum Neighborhood Component

^۵ Density of Maximum Neighborhood Component

^۶ Maximal Clique Centrality

^۱ Pattern-triggered immunity

^۲ Mitogen activated protein kinase

^۳ Pattern recognition receptors

و Degree (مرکزیت در جهای)؛ برای شناسایی و رتبه‌بندی ژن‌های کلیدی به کار 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^۲ 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^۳ 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 پروموتور 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 (Tomtom) نسخه ۸/۵/۵ به آدرس-مeme-https://meme.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 زیست‌شناختی موتیف‌های انتخاب شده با استفاده از ابزار هستی‌شناسی ژن برای موتیف‌ها (GOMo) نسخه ۸/۵/۵ به آدرس-مeme-https://meme.org/meme/tools/gomo suite.org/meme/ مشخص شد.

یافته‌های پژوهش

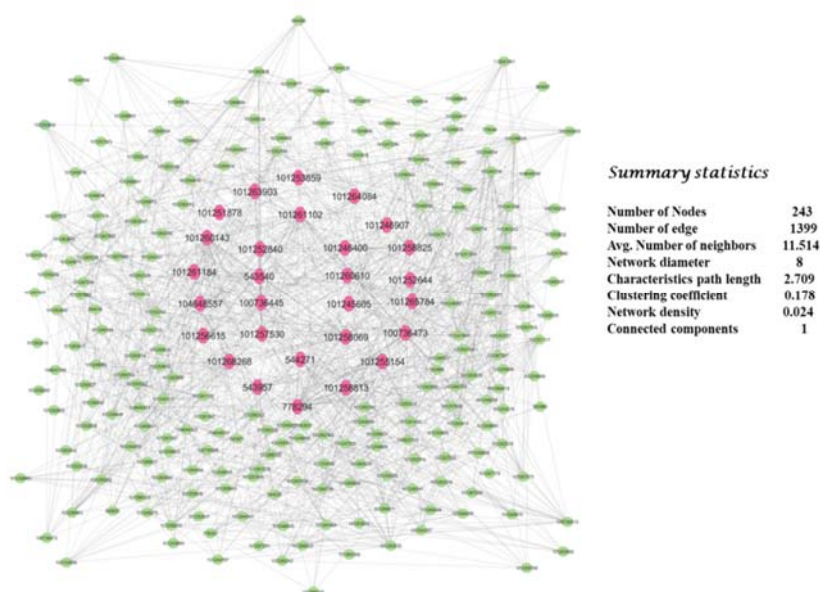
شناسایی ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به ToBRFV در گوجه‌فرنگی

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 به کار 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 نیتريت 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; Kyainig et al., 2011).

^۲ Identifying Protein Complex Algorithm

^۱ Degree Centrality

^۲ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes



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 (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 HSP90 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 HSP90 در گیاهان کاساوا تحت تیمار عامل بیماری بلایت باکتریایی (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam)) 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 HSP90.9 با ATP‌ها 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

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 (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 HSP90 برای مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی و انتقال پیام‌های دفاعی مناسب مورد نیاز هستند (Bao et al.,

اساس الگوریتم DMNC، LOC101263903 می‌باشد که پروتئین نوکلئاز دو عملکردی ۲ را کد می‌کند. برای اولین بار ژن نوکلئاز دو عملکردی مرتبط با پاسخ‌های دفاعی پایه در گونه برنج وحشی (*Oryza minuta*) شناسایی شد و به سرعت و به شدت در پاسخ به حمله یک بیماری‌گر قارچی برنج (*Magnaporthe oryzae*) و یک حشره (*Nilaparvata lugens*) و تیمارهای اسید آبسزیک (ABA) و متیل‌جا سمونات القاء شد. پروتئین رمزگذار این ژن دارای فعالیت‌های RNase و DNase است (You et al., 2010). بیش از بیان این ژن در آراییدوپسیس 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 موزایک زرد کدو سبز^۲ (ZYMV) کاهش می‌دهد (Kang et al., 2024).

LOC100736445 یکی دیگر از ژن‌های کلیدی شناخته شده با بالاترین درجه‌ی رتبه‌بندی بر مبنای الگوریتم MCC است که فاکتور پاسخ به اکسین (ARF) را کد می‌کند. در گوجه‌فرنگی، ژن‌های ARF به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی شبکه اکسین در طول تهاجم بیماری‌گرهای گیاهی عمل می‌کنند. بیان آن‌ها در طول آلودگی ویروسی تغییر می‌کند که نشان می‌دهد مسیر اکسین از طریق تنظیم ژن ARF به پاسخ دفاعی گیاه متصل است (Bouzroud et al., 2018). در مطالعه‌ای نشان داده شد miR167a و نشانگرهای اپی‌ژنتیکی به عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی در پاسخ‌های ایمنی گوجه‌فرنگی عمل می‌کنند تا آلودگی ناشی از ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی^۴ (TSWV) را از طریق اختلال در پیام‌رسانی اکسین فعال کنند. بر اساس این گزارش تأیید شد که ارتباط مستقیمی بین میزان اکسین و

مقاومت به TSWV از طریق تنظیم ARF8 وجود دارد و کاهش قابل توجهی در غلظت اکسین در گیاهان گوجه فرنگی حساس به TSWV در مقایسه با رقم متحمل مشاهده شد (Werghi et al., 2021).

در واکنش شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به آلودگی ToBRFV، محصول LOC101264084 که پروتئین حاوی دمین NAC می‌باشد، به عنوان 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 فوق‌حساسیت (HR) و برهم‌کنش با عوامل بیماری‌زا. پس از تحریک مستقیم یا غیرمستقیم ناشی از تهاجم بیماری‌گر، این فاکتورها با اتصال به عناصر سیس‌نواحی پروموتور 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 فوق‌حساسیت 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 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 فاکتورها را ترشح می‌کنند که قدرت تهاجمی آن‌ها را شدت می‌بخشند. مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر

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

مطالعات نیز نشان داده است که پروتئین متصل شونده به هیم^۲ (HBP) نقش مهمی در فرآیندهای مختلف، از جمله تنفس، فتوسنتز و دفاع در برابر تنش‌های مختلف ایفاء می‌کند (Vanhee et al., 2011; Formosa et al., 2022; Farvardin et al., 2023). مطالعه‌ی داده‌های ترانسکریپتوم برهم‌کنش عوامل بیماری‌زا با گیاهان، نقش مونواکسیژنازها را در پاسخ دفاعی تأیید کرد (Akbar et al., 2020; Khatri et al., 2022). همچنین مشخص شده است که برخی مونواکسیژنازها نظیر زیرخانواده سیتوکروم P450 مونواکسیژناز A98 بواسطه‌ی عملکردی که در بیه‌سنتز ترکیبات فنلی نظیر فلاونوئیدها دارند، نقش مهمی در افزایش مقاومت گیاهان به میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهند (Zhou et al., 2025). همچنین بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت اکسیدوردوکتازی در پاسخ به آلودگی ویروس موزائیک سویا^۳ (SMV) و ToBRFV، اهمیت این آنزیم‌ها را در حذف غلظت‌های بالای ترکیبات ROS و بروز پاسخ‌های دفاعی علیه بیمارگرهای مختلف آشکار ساخت (Raza et al., 2025; Zhang et al., 2025).

همچنین این ژن‌ها از نظر غنی‌سازی KEGG عمدتاً در مسیرهای بیوسنتز فلاونوئید^۴، استیلبنوئید^۵، انتقال پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و سایر مسیرهای متابولیکی فعالیت دارند (شکل ۲B). متابولیت‌های ثانویه که به دسته‌های شیمیایی متنوعی مانند فلاونوئیدها، استیلبنوئیدها و ترپنوئیدها تعلق دارند، در عملکردهای بیولوژیکی مختلفی دخیل هستند و در برهم‌کنش گیاه با محیط، نقش مهمی در ایمنی گیاه ایفاء می‌کنند (Alseekh et al., 2020). مسیر فنیل پروپانوئید^۶ (PPP) منجر به تجمع بسیاری از خانواده‌های ترکیباتی نظیر فنیل پروپانوئیدها، فلاونوئیدها، لیگنین‌ها، اسیدهای فنولیک، استیلبن‌ها و کومارین‌ها می‌شود (Vogt, 2010).

نشان داده است که افکتورها می‌توانند فاکتورهای رونویسی کلیدی نظیر عنا صر NAC را در گیاهان هدف قرار دهند و با تداخل در فعال‌سازی آن‌ها و مهار ژن‌های پایین‌دست، برنامه‌ی رونویسی 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 خصوص شناسایی گره‌هایی با بیشترین برهم‌کنش در شبکه‌های مولکولی مرتبط با پاسخ گوجه‌فرنگی به ToBRFV، می‌تواند در شناسایی 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 نشان داد این ژن‌ها از نظر عملکرد مولکولی عمدتاً در اتصال هیم^۱، فعالیت مونواکسیژنازی، اتصال یون آهن و فعالیت اکسیدوردوکتازی دخیل هستند (شکل ۲A). هیم در میان مولکول‌های متصل شونده به آهن در سلول، جایگاه برجسته‌ای دارد. وجود هیم آزاد در سیتوپلاسم باید در غلظت پایین حفظ شود تا از تنش اکسیداتیو از طریق اکسیداسیون آهن هیم جلوگیری کند (Khan and Quigley, 2011). هیم‌های آزاد به دلیل واکنش‌پذیری ذاتی پراکسیداز و ظرفیت تولید ترکیبات ROS، به طور مؤثری باعث آسیب سلولی می‌شوند. در گیاهان عالی، بیوسنتز هیم عمدتاً در پلاستیدها رخ می‌دهد و پس از سنتز، در اندامک‌های مختلف گیاه توزیع شده و به صورت کووالانسی و غیر کووالانسی به پروتئین‌ها متصل شوند. تحقیقات اولیه نشان داده‌اند که در آراییدوپسیس پروتئین‌های متصل شونده به هیم در مسیر آنتی‌اکسیدانی فعال هستند و گیاهانی با بیش بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های متصل به هیم، تجمع H_2O_2 کمتری را نشان می‌دهند (Lee et al., 2012).

^۴ Flavonoid

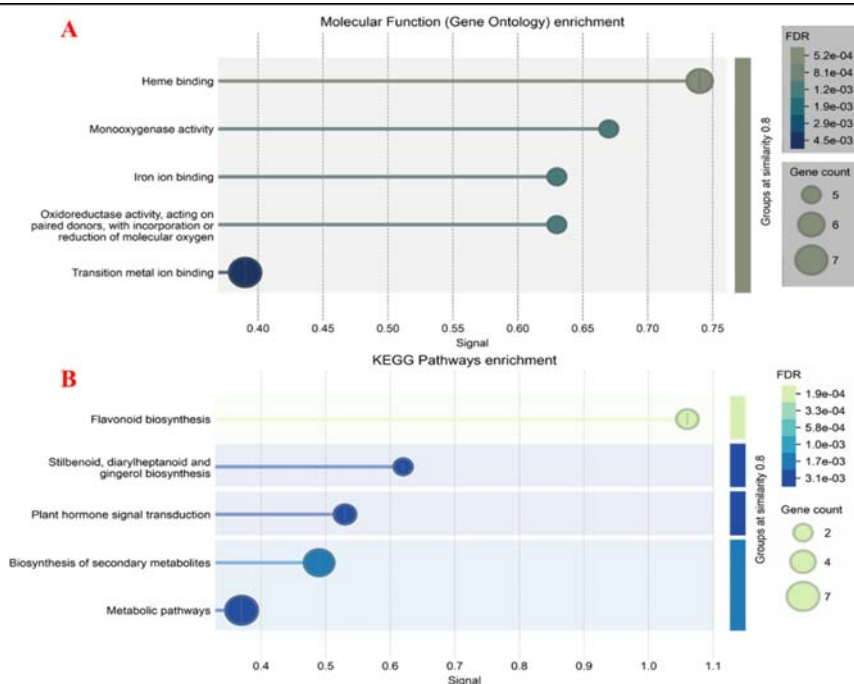
^۵ Stilbenoid

^۶ Phenylpropanoid pathway

^۱ Heme

^۲ Heme-binding protein

^۳ Soybean mosaic virus



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).

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 پروپانویید برای تقویت دیواره سلولی است (Matern *et al.*, 1995). قرار گرفتن گیاه در معرض عوامل ویروسی، بیوستنز اسید سالیسیلیک (SA) را فعال کرده و بیوستنز سایر متابولیت‌های دفاعی را از مسیر فنیل پروپانویید القاء می‌کند تا مقاومت اکتسابی سیستمیک^۱ (SAR) را آغاز کند (Ramaroson *et al.*, 2022).

واکاوی خوشه‌بندی زیرشبکه برهم‌کنش ژن‌های

کلیدی با همسایگان در پاسخ به ToBRFV

خوشه‌بندی شبکه‌های PPI می‌تواند به عنوان یک ابزار کارآمد، مجموعه‌ای از پروتئین‌هایی که با یکدیگر

استیلین‌ها 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). فنیل پروپانوییدها 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 پروپانویید 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

Zhu et al., 2024). سیستم دفاعی گیاه توسط چندین هورمون از جمله اُکسین، اسید سالیسیلیک (SA)، سیتوکینین، اتیلن، اسید جاسمونیک (JA) و اسید آسبیزیک (ABA) تنظیم می‌شود. اُکسین نه تنها مستقیماً در مسیرهای پیام‌رسانی برای مقاومت شرکت می‌کند، بلکه قادر است این هورمون‌ها را از طریق انتقال پیام تنظیم کند (Mazzoni-Putman et al., 2021). یافته‌های جدید نیز نشان داد که مسیر MAPK در پیام‌رسانی 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 الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر (PAMPs) و افکتور بیمارگر است (Meng & Zhang, 2013; Jagodzic et al., 2018). همچنین بررسی یوبیکوئیتوم و پروتئوم برگ‌های *Nicotiana benthamiana* آلوده به ToBRFV نشان داد که آلودگی ToBRFV باعث افزایش سطح یوبیکوئیتینا سیون مسیرهای پیام‌رسانی MAPK و انتقال پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی شده است (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).

واکاوی موتیف‌های پروموتری ژن‌های کلیدی در

پاسخ به ToBRFV

برای شناخت سازوکارهای تنظیم رونویسی ژن‌های کلیدی که در پاسخ به ToBRFV شناسایی شده بودند، نواحی کناری بالادست^۱ (UFR) این ژن‌ها با استفاده از بخش Biomart پایگاه داده Ensemble Plant بازایی شدند. سپس برای شناسایی موتیف‌های حفاظت شده و عناصر تنظیمی سپس ژن‌های کلیدی از ابزار MEME استفاده شد. بر این اساس موتیف‌های پروموتری مهم

برهم‌کنش دارند و در فرآیندهای زیست‌شناختی 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 خوشه‌بندی، از جمله IPCA است 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 یال‌های مجاور آن محاسبه می‌کند. هرچه وزن یک گره بیشتر باشد، احتمال اینکه آن گره به عنوان seed در نظر گرفته شود، بیشتر است. پس از شناسایی seed اولیه، IPCA، گره‌های بعدی را با در نظر گرفتن دو شرط احتمال برهم‌کنش و کوتاه‌ترین مسیر بین آن گره و سایر گره‌های موجود در خوشه، به خوشه اضافه 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 مشارکت و با هم برهم‌کنش دارند، استفاده شد. بر مبنای این بررسی، خوشه‌ی اول شامل ۱۶ ژن با ۹۱ یال می‌باشد که در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها، متابولیت‌های ثانویه، براسینواستروئیدها، فنیل پروپانوئیدها، استیلبنوئید و مسیرهای متابولیکی می‌باشند 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 مسیر پیام‌رسانی MAPK در پاسخ به ToBRFV اشاره دارد (جدول ۱). مطالعات اخیر رونویسی در مورد مقاومت به ویروس موزاییک سویا (SMV) در بین ارقام و سویه‌های مقاوم مختلف نشان می‌دهد که مسیرهای انتقال پیام‌رسانی هورمونی و مسیرهای پیام‌رسانی MAPK جزء مسیرهای اصلی در فرآیند مقاومت می‌باشند (Niu et al., 2024).

^۱ Cis-regulatory elements (CREs)

^۱ Pathogen-associated molecular patterns

^۲ Upstream flanking regions (UFRs)

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	گره	یال	مسیر
Cluster Rank	Node	Edge	KEGG
			بیوسنتز فلاونوئید
			Flavonoid biosynthesis
			بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه
			Biosynthesis of secondary metabolites
1	16	91	بیوسنتز براسینوئید
			Brassinosteroid biosynthesis
			بیوسنتز فنیل پروپانوئید
			Phenylpropanoid biosynthesis
			مسیرهای متابولیکی
			Metabolic pathways
			پیام‌رسان هورمونی
2	16	89	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 C2H2 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 آسبیزیک، 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 پلئوتروپیک، می‌تواند استراتژی‌های نوآورانه‌ای را برای بهره‌وری از تنوع عملکردی این عناصر در کشاورزی

آن که بیش بیان آن در آراییدوپسیس، حساسیت را افزایش و فعالیت برخی از آنزیم‌های مرتبط با دفاع را کاهش داد که نشان‌دهنده نقش آن در سرکوب واکنش‌های فوق حساسیت و مرگ سلولی و کاهش بیان ژن *PR1* است (Chen et al., 2025b).

بر اساس فرایند های بیولوژی یک (BP)، نقش موتیف‌ها در تنظیم رونویسی، مسیرهای پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی نظیر اتیلن، آبسزیک، 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 پایداری 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 گروه‌های موتیفی در نواحی پروموتوری ژن‌های دفاعی که مدول‌های تنظیمی سیس^۳ (CRM) نامیده می‌شود، در درک سازوکارهای مقاومت به بیماری بسیار حائز اهمیت است و می‌تواند به عنوان نشانگرهایی برای غنی‌سازی مؤثرتر و پاسخ‌دهی بهتر ژن‌های دفاعی کلیدی در برنامه‌های اصلاحی به کار گرفته شوند (Tonnessen et al., 2019). همچنین با هدایت برهم‌کنش‌های بین فاکتورهای رونویسی و عناصر سیس می‌توان مجموعه‌ای از پروموتورهای دوگانه را طراحی کرد که اثرات آنتاگونیستی پیام‌رسان‌های هورمونی را کاهش داده و در نتیجه

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 (Martínčová & 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 اوومیسست مقاوم‌تر بودند که نشان‌دهنده نقش مثبت آن در پاسخ به تنش‌های زیستی است (Kim et al., 2007).

خانواده ژنی CPP^۱ 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^۲ (ToLCV) نقش دارد (Tripathi et al., 2018). همچنین فعال‌سازی اعضای این خانواده ژنی توسط *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* نشان‌دهنده 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، به گونه‌ای که مشخص شد بیان این فاکتور رونویسی تحت تیمار متیل جاسمونات و اسید آبسزیک افزایش یافت. همچنین سرکوب بیان این ژن در *N. benthamiana* مقاومت در برابر *Ralstonia solanacearum* را افزایش داد. حال

^۳ Cis-Regulatory Modules (CRMs)

^۱ Cysteine-rich polycomb-like protein

^۲ Tomato leaf curl virus

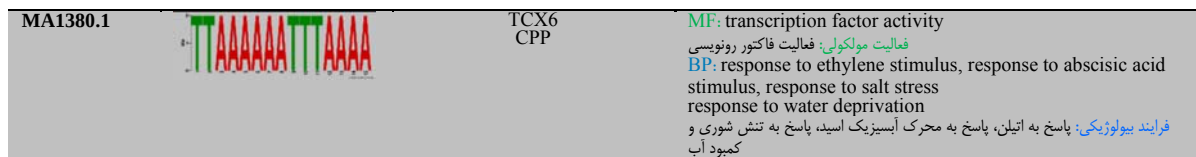
می‌توانند به طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی پاسخ دهند (Li et al., 2023).

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 سودیوریدین BP: auxin mediated signaling pathway فرایند بیولوژیکی: مسیر پیام‌رسانی هدایت شده به‌وسیله اکسین



کرد. بررسی ناحیه پرموتری این ژن‌ها نشان داد که عمده‌ی CRE‌های مهم شناسایی شده مربوط به فاکتورهای حاوی دمین Homeo، bZIP، انگشت روی TATA و پروتئین متصل به CPP، AT hook، C2H2 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.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از واکاوی شبکه برهم‌کنش پروتئینی در پاسخ به آلودگی ToBRFV، ۲۸ ژن کلیدی را شناسایی کرد که از آن جمله می‌توان به ژن‌های نیترات ردوکتاز، پروتئین شوک حرارتی ۹۰، نوکلئاز دو عملکرد، فاکتور پاسخ به اکسین و پروتئین حاوی دمین NAC اشاره کرد که عمده عملکرد مولکولی آن‌ها شامل اتصال هم، 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

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.
- Alseikh, 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 C₂H₂ 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 proteins 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., Nourinejad 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., Díaz-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-2²* 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.
- Jagodzick, 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.
- Levitzy, 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 annum* 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 SINAP1 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-2²* 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, OmBBB and AtBBB1, 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.