مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ٦، شماره ٢، پاییز و زمستان ٩٦
صفحه ٢٣٥-٢٢٣

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

بررسی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانت در بوته‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با ویروس موزاییک خیار پس از تیمار با اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک

Evaluation of antioxidant genes expression in tomato plants inoculated by *Cucumber mosaic virus* after treatment with salicylic and jasmonic acids

سحر قلی‌طلوعی*[١]، نعمت سخندان بشیر[٢]، مهدی داوری[٣]، محمد صدقی[٤]

Sahar Gholi-Tolouie[1]*, Nemat Sokhandan-Bashir[2], Mahdi Davari[3], Mohammad Sedghi[4]

١- دانشجوی دکتری ویروس شناسی گیاهی، ٢- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

٣- دانشیار گروه گیاهپزشکی، ٤- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

1- Ph.D. student in Plant Virology, University of Tabriz, Iran

2- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

3- Department of Plant Protection, 4- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات: tolouie.s@gmail.com or mdavari@uma.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٦/٤/٨ - تاریخ پذیرش: ٩٦/٦/١٥)

چکیده

ویروس موزاییک خیار (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV) یکی از مهم‌ترین ویروس‌های گوجه‌فرنگی است که موجب کاهش عملکرد محصول می‌شود. در این تحقیق، نقش اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک در بیان ژن‌های رمزکنندهٔ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و القای مقاومت به تنش اکسیداتیو ناشی از مایه‌زنی با ویروس CMV در گوجه‌فرنگی (رقم فلات) بررسی گردید. نتایج نشان داد که در گیاهان شاهد، بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های کاتالاز (*CAT*) و پراکسیداز (*POX*) تا روز پانزدهم پس از نشا روند نزولی داشت، ولی در مورد ژن رمز کننده آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز (*SOD*) در روز پانزدهم اندکی افزایش بیان مشاهده شد. در گیاهان مایه‌زنی شده با CMV، ژن *CAT* کاهش بیان نشان داد، ولی ژن *POX* تا روز هشتم افزایش بیان شد. در مورد ژن *SOD* نیز در تیمارهای مایه‌زنی شده با CMV روند افزایشی تا روز پانزدهم ادامه یافت. بیشترین میزان بیان ژن *POX* در روز پانزدهم نمونه‌برداری در تیمار کاربرد توام SA و JA دیده شد که ١٢٠ درصد افزایش نسبت به زمان قبل از اعمال هورمون نشان داد. کاربرد هورمون-ها، شدت بیماری و علایم آن را تا ٨٠ درصد کاهش داد. نقش آنزیم پراکسیداز در گوجه‌فرنگی رقم فلات در پاکسازی رادیکال H_2O_2 بیشتر از نقش کاتالاز بود و به نظر می‌رسد که برای القای مقاومت به CMV می‌توان از هورمون‌های SA و JA قبل از آلودگی ویروسی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

تنش اکسیداتیو،
تنش زیستی،
ویروس،
گوجه فرنگی،
Real- time PCR

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

مقدمه

اسید سالیسیلیک (SA) نقش عمده‌ای در واکنش به تنش‌های زیستی و القای مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) در مقابل بیماری‌های ویروسی دارد (Falcioni *et al.* 2014) و مشخص شده است که در سازگاری گیاهان با تنش‌های غیر زیستی نیز دخالت دارد (Kang *et al.* 2014). این هورمون از طریق بیان ژن‌های پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت موجب بهبود مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌شود (Hayat *et al.* 2009؛ Mahmoodi Jaraghili *et al.* 2016). اسید جاسمونیک (JA) و متیل استر آن نیز قادرند تا مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی را افزایش دهند (El-Khalal, 2007). انباشته شدن اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک در بافت‌های گیاهی یکی از اولین رویدادهای واکنش فوق حساسیت است (Anderson *et al.* 2006) که بر اثر حمله عوامل بیماری‌زا القا می‌گردد و نتیجه آن، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) است. گرچه این رادیکال‌ها در ابتدا به عنوان پیک ثانویه در القای مقاومت عمل می‌کنند، ولی تجمع آن‌ها در غلظت‌های زیاد، خسارات فراوانی به بافت‌های گیاهی وارد می‌سازد (Yadava *et al.* 2015). مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا تحت تنظیم شبکه پیچیده‌ای از مسیرهای ترارسانی علامت که حاوی مولکول‌هایی مانند ROS، SA، JA و اتیلن و برهم‌کنش میان آن‌هاست، قرار دارد (Kunkel and Brooks, 2002). تجمع آنیون سوپراکسید و رادیکال پراکسید هیدروژن در سلول‌های گیاهی ارتباط تنگاتنگی با مقاومت به ویروس‌های گیاهی دارد (Yang *et al.* 2016; Hernandez *et al.* 2015; Tao *et al.* 2015; Bacso *et al.* 2011; Hayat and Ahmad, 2007). گیاهان برای مقابله با بیمارگرها و جلوگیری از تولید ROS، مجهز به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت هستند که در بین آن‌ها آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند سوپراکسید دیسمیوتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) فعالیت بیشتری از خود نشان می‌دهند (Foyer and Noctor, 2003). در یک مطالعه، آلودگی بوته‌های گوجه‌فرنگی و خیار به CMV موجب ایجاد اختلال در فعالیت کمپلکس I زنجیر تنفسی در میتوکندری شده است و این امر تولید ROS به ویژه H_2O_2 را افزایش داده است (Song *et al.* 2009). افزایش H_2O_2 موجب تنش اکسیداتیو در گیاه می‌گردد و تولید و فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و پراکسیداز برای حذف این رادیکال بیشتر می‌شود. حضور رادیکال H_2O_2 در غلظت‌های پایین به عنوان یک سیگنال عمل می‌کند و موجب فعال شدن رونویسی از ژن‌های آنتی‌اکسیدانت و افزایش بیان آن‌ها می‌شود (Song *et al.* 2009).

یکی دیگر از سیستم‌های دفاعی گیاه در برابر تولید بیش از حد H_2O_2، افزایش فعالیت آنزیم AOX (آلترناتیو اکسیداز) است که موجب کاهش تولید H_2O_2 و تنش اکسیداتیو می‌شود. آلودگی به CMV موجب افزایش فعالیت این آنزیم شده است (Malerba *et al.* 2003). فعال شدن سیستم AOX به جای زنجیر تنفسی عادی در گیاه موجب کاهش تولید ATP می‌شود و در درازمدت اثر منفی بر رشد و نمو گیاه خواهد داشت. تولید ROS طی برهم‌کنش ناسازگار گیاه – بیمارگر در واکنش فوق حساسیت یک امر عادی است و موجب اختلال در پراکنش بیمارگر می‌گردد (De Gara *et al.* 2003). طی واکنش فوق حساسیت، سلول‌های محیط بر نقطه نفوذ بیمارگر، ژن‌های ویژه‌ای را فعال می‌کنند که منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (PCD) می‌شود. به نظر می‌رسد که مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، ناشی از افزایش انفجاری در تولید ROS و به تبع آن، فعالیت سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانت باشد (Kuzniak and Sklodowska, 2004). آنزیم‌های پراکسیداز علاوه بر نقش آنتی‌اکسیدانتی در سنتز دیواره سلولی گیاه میزبان از طریق اکسیداسیون فنل‌ها، در سوبرینی شدن و لیگنینی شدن دیواره شرکت دارند و موجب ایجاد سد دفاعی در برابر نفوذ عوامل بیماری‌زا می‌شوند و به نظر می‌-

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

رسد که فعالیت این آنزیم‌ها در روابط متقابل سازگار بین گیاه حساس و بیمارگرها تغییر چندانی ایجاد نمی‌کند (Mohammadi and Kazemi, 2002).

ویروس موزاییک خیار (CMV) یکی از مهم‌ترین ویروس-های گیاهی است که بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاهی در یکصد تیره را آلوده می‌سازد (Nuzzaci *et al.* 2009). برهم‌کنش مستقیم پروتئین 2b ویروس موزاییک خیار و کاتالاز ۳ در آرابیدوپسیس موجب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیداتیو آنزیم کاتالاز و متعاقب آن، افزایش مقدار H_2O_2 موجب مرگ سلولی می‌گردد (Inaba *et al.* 2011). ثابت شده است که در خیار، ایجاد مقاومت القایی سیستمیک (ISR) به تنش‌های زیستی با مسیر علامت‌دهی اسید جاسمونیک به اتیلن ارتباط دارد و تولید این دو هورمون در گیاه موجب افزایش سطح بیان ژن پراکسیداز گردیده است (Shoresh *et al.* 2005). استفاده از عصاره‌های گیاهی حاوی هورمون‌های گیاهی مانند SA موجب افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گوجه-فرنگی آلوده به CMV شده است و این امر بیانگر نقش این هورمون‌ها در القای مقاومت به ویروس است (Shahwan, 2010). افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم پراکسیداز یکی از روش‌های افزایش مقاومت فلفل به آلودگی ویروس موزاییک زرد فلفل (PYMV) گزارش شده است (Goncalves *et al.* 2013).

با توجه به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی و خسارت زیادی که هر ساله از طریق CMV و سایر ویروس‌ها و عوامل بیماری‌زا بر آن وارد می‌شود، بررسی و شناخت راه‌های کنترل غیرشیمیایی و ایجاد مقاومت به این عوامل بیماری‌زا ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، تحقیق حاضر به منظور بررسی امکان ایجاد مقاومت به ویروس CMV گوجه‌فرنگی با استفاده از محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و جاسمونیک و مطالعه بیان سه ژن مهم آنتی‌اکسیدانت (CAT، POX و SOD) انجام گردید.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی و اعمال تیمارها

به منظور بررسی اثر دو هورمون گیاهی اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک (شماره کاتالوگ به ترتیب ۷-۷۲-۶۹ و ۷-۷۷۰۲۶-۹۲ تهیه شده از شرکت سیگما – آلدریچ آمریکا تحت لیسانس مرک آلمان) بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانت در بوته‌های گوجه‌فرنگی آلوده به CMV، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۸ تیمار و ۳ تکرار اجرا شد. ابتدا بستر های کشت، جهت کاشت بذرهای گوجه‌فرنگی (رقم فلات) آماده شدند، بدین ترتیب که مقداری خاک قابل کشت و حاصلخیز تهیه و به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر استریل شد. خاک استریل به بسترهای کشت (لیوان‌های کاغذی و جعبه‌های پلاستیکی) منتقل و بذرهای گوجه‌فرنگی پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و آب‌کشی با آب مقطر استریل، کشت شدند (Ibrahim, 2012; Veladi *et al.* 2013; Hussein *et al.* 2016). در حدود چهار هفته پس از کاشت بذر، نشاها در مرحله دو برگی به گلدان‌های اصلی منتقل شدند. برای آماده‌سازی محیط مناسب برای رشد نشاها و اعمال تیمارهای مختلف در گلخانه، فضای مشخصی انتخاب و حصارکشی شد و با تور پارچه‌ای جهت جلوگیری از ورود حشرات ناقل محصور گردید. در ضمن، گلدان‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد و خاک در اتوکلاو استریل شد. در مجموع، هشت تیمار شامل اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک + اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک + ویروس، اسید جاسمونیک + ویروس، اسید سالیسیلیک + اسید جاسمونیک + ویروس، ویروس و آب (به عنوان شاهد) در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی در نظر گرفته شد. بعد از گذشت دوازده روز پس از انتقال، نشاها به مرحله چهار برگی رسیدند و تیمارها اعمال شدند. محلول اسید سالیسیلیک به غلظت ۱ میلی‌مول و اسید

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

جاسمونیک به غلظت ۰/۵ میلی‌مول تهیه شد. حدود ۲٤ ساعت پس از محلول‌پاشی، نشاها با ویروس موزاییک خیار (متعلق به زیرگروه یک و دریافت شده از گروه گیاهپزشکی دانشگاه تبریز که از منطقه مراغه در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شد) که بر روی گیاه کدو تکثیر شده بود، به طور مکانیکی مایه‌زنی شدند. بدین ترتیب که به ازای ۰/۱ گرم بافت گیاهی، یک میلی‌لیتر از بافر مایه‌زنی استفاده شد و بافت گیاهی در داخل هاون چینی به خوبی ساییده شد و عصاره حاصل برای مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفت (Sudhakar *et al.* 2006).

جهت بررسی علایم ظاهری بیماری در گیاهان تیمار شده، پانزده روز پس از اعمال تیمارها شدت علایم اندازه‌گیری شد. شدت علامت به صورت درصدی از برگ‌های بیمار بیان گردید. برای این کار از روش Sriram *et al.* (1997) و Sudhakar *et al.* (2006) استفاده شد. در این روش، بر اساس شدت بیماری و علایم برگی ناشی از آن، کدهایی به صورت اعداد صفر تا پنج در نظر گرفته شد، به طوری که عدد صفر بیانگر فقدان علامت بیماری بود و عددهای بعدی به ترتیب افزایش شدت علایم را نشان می‌دادند. سپس با استفاده از فرمول زیر شدت بیماری (DS) محاسبه گردید:

$$DS = \frac{\text{کد بیماری هر برگ} \times \text{مجموع تعداد نمونه برگ}}{\text{تعداد نمونه‌های برگ} \times \text{حداکثر کد بیماری مشاهده شده طی آزمایش}}$$

به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، نمونه‌برداری از برگ‌های بالایی نشاها (تیمار شده) در زمان‌های صفر، ۲، ۸ و ۱۵ روز پس از مایه‌زنی (dpi) انجام گرفت، بدین‌ترتیب که نمونه‌های انتخاب شده در داخل نیتروژن مایع به طور سریع منجمد و بلافاصله به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج RNA کل از نمونه‌ها و ساخت cDNA

برای استخراج RNA کل از نمونه‌های برگی، از کیت استخراج RNX-plus شرکت سیناژن استفاده گردید. کیفیت RNA استخراج شده، در ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. جهت تعیین درجه خلوص و غلظت نمونه‌های RNA از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودرآپ (Thermoscientific, 2000c) استفاده و کمیت نمونه‌ها بررسی شد. سپس نمونه‌های RNA با آنزیم DNase I (RNase – free, Fermentase) تیمار و به عنوان الگوی واکنش RT-PCR قرار گرفتند. پس از یکسان‌سازی غلظت نمونه‌های RNA، cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo scientific) طبق دستورالعمل کیت ساخته شد.

اندازه‌گیری بیان ژن‌های مورد مطالعه

بررسی بیان ژن با استفاده از دستگاه Real time PCR مدل Light cycler 96 Roche انجام شد. هر واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/۳ میکرو مولار از هر آغازگر رفت (Forward primer) و آغازگر برگشت (Reverse primer)، ۵۰ نانوگرم cDNA الگو رقیق شده و آب عاری از نوکلئاز بود. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده‌اند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه C و سپس ٤۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه C، ۱ دقیقه در ٦۰ درجه C) بود. پس از پایان واکنش PCR رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ٦۰-۹۵ درجه C با اختلاف ۰/۵ درجه در هر چرخه انجام گرفت. به منظور استاندارد کردن داده‌ها، نمونه‌ها با ژن خانه‌دار اکتین نرمال گردیدند. نرخ بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد. داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون t انجام شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در آزمایش (از Vitti et al. 2015)

Table 1- Primer sequences used in the experiment (From Vitti et al. 2015)

ژن هدف	توالی آغازگر	کد دسترسی
CAT	5´-AGCCGGTGGGAAGATTAGTT-3´ 5´-GATGAGCACACTTTGGAGC-3´	NM-001247257
SOD	5´-AGATGAACGCAGAAGGTGCT-3´ 5´-GCGTGTTCCCAAACGTCTAT-3´	XM-004240820
POX	5´-GGACCTGATGTTCCCTTTCA-3´ 5´-CAAGGTCCCTCAAAACCAGA-3´	AY974805
Actin (ACT)	5´-GTGTTTCCTAGTATTGTTGGTCG-3´ 5´-TGATGCCAGATCTTCTCCAT-3´	BT013524

نتایج

شدت بیماری: بررسی علایم ناشی از ویروس CMV نشان داد که حداکثر شدت بیماری (DS) در تیمار آلودگی به CMV تنها مشاهده شد (۴۸/۳ درصد). در تیمارهایی که هورمون به همراه CMV اعمال شد، شدت علایم، کاهش چشمگیری داشت و به طور متوسط، DS در تیمارهای هورمونی همراه با ویروس به یک چهارم رسید (جدول ۲). وضعیت ظاهری گیاهان در تیمار ویروس، شاهد و تیمارهای هورمون در شکل ۱ نشان داده شده است. کاربرد هورمون‌ها در گیاهان مایه‌زنی شده با ویروس CMV، از شدت علایم ناشی از ویروس کاست (شکل ۲). در یک بررسی، نقش ازن (به عنوان یک آلاینده اتمسفری) در القای مقاومت سیستمیک به CMV در گوجه‌فرنگی مطالعه و مشخص شد که شدت بیماری در تیمار شاهد ویروس در حدود ۹۴ درصد بود، ولی کاربرد ازن در غلظت ۱ میکرومول در مول منجر به کاهش شاخص بیماری به ۳۲ درصد گردید. علت این امر، نقش ازن در تولید SA، تحریک متابولیسم فنل (مسیر فنل پروپانوئید)، بیوسنتز لیگنین و مسیر شیکیمات بیان گردید و حضور ازن موجب تغییر در فعالیت‌های آنزیمی (به ویژه آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت)، سطوح نسخه‌برداری و مقدار پروتئین‌های PR شد که ناشی از افزایش سریع در تولید درون‌زاد SA است (Sudhakar *et al*. 2006).

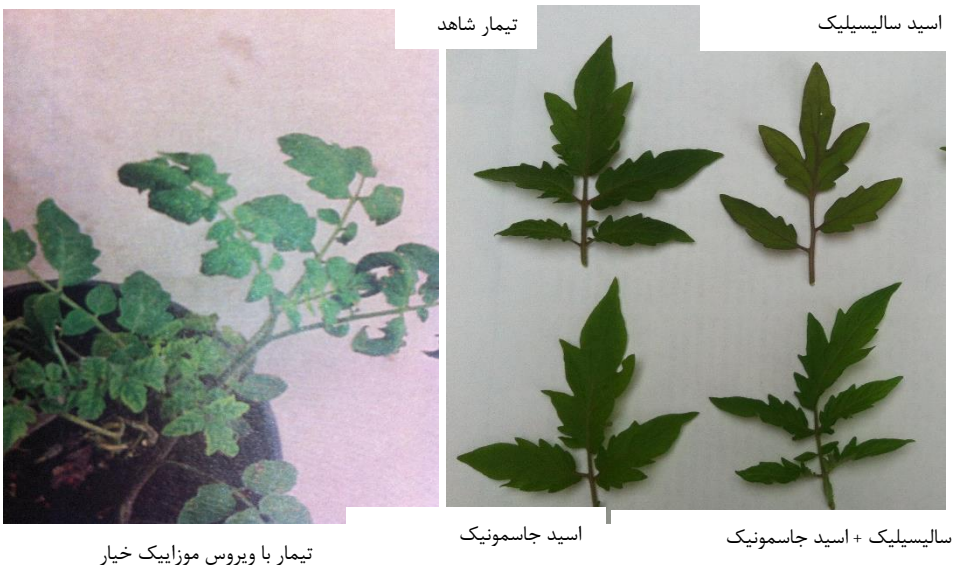
بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانت: تاثیر تیمارهای آزمایش و اثر متقابل آن‌ها بر میزان بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سطح احتمال آماری یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های کاتالاز (*CAT*) و پراکسیداز (*POX*) در گیاهان شاهد به تدریج تا روز پانزدهم پس از اعمال تیمار روند نزولی داشت، ولی در مورد ژن آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز (*SOD*) در روز پانزدهم اندکی افزایش بیان مشاهده شد. در گیاهان آلوده به CMV ژن *CAT* فرو تنظیمی نشان داد (شکل ۳)، ولی ژن *POX* تا روز هشتم فراتنظیم شد و سپس تا روز پانزدهم بیان آن کاهش داشت (شکل ٤). در مورد *SOD* نیز در تیمارهای آلوده به CMV روند افزایشی تا روز پانزده ادامه یافت (شکل ۵). در تیمارهای محلول‌پاشی هورمون و همچنین محلول‌پاشی هورمون‌ها به همراه مایه‌زنی با CMV بیان هر سه ژن *CAT*، *POX*و *SOD* طی زمان افزایش نشان داد. بیشترین میزان بیان ژن *POX* در روز پانزده نمونه‌برداری در تیمار کاربرد توام SA و JA دیده شد که به میزان ۱۲۰٪ افزایش نسبت به زمان قبل از اعمال هورمون نشان داد (شکل ٤). بیشترین میزان بیان *SOD* نیز در تیمار محلول‌پاشی توام SA و JA و در روز پانزده نمونه‌برداری مشاهده شد (شکل ۵).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

جدول ۲- میانگین شدت بیماری در برگ‌های گوجه فرنگی در تیمارهای مختلف

Table 2- Mean of disease severity (DS) in tomato leaves in different treatments

تیمار	درصد شدت بیماری (DS)
شاهد (آب مقطر)	0
ویروس CMV	48.3 ± 6.65
اسید سالیسیلیک (SA)	0
اسید جاسمونیک (JA)	0
SA+JA	0
SA+ CMV	11.5 ± 1.61
JA+ CMV	12.6 ± 1.45
SA+ JA + CMV	9.2 ± 0.82



شکل ۱- علایم بیماری موزاییک خیار در برگ‌های گوجه‌فرنگی (سمت چپ) و برگ‌های بدون علایم در تیمار شاهد و تیمار شده با هورمون‌ها (سمت راست)

Figure 1- Symptoms of *Cucumber mosaic virus* in tomato leaves (left) and leaves without symptoms in control and hormone-treated leaves (right)

شکل ۲- علایم بیماری موزاییک خیار در برگ‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با ویروس و تیمار شده با اسید جاسمونیک (سمت راست)، اسید سالیسیلیک (وسط) و کاربرد توام دو هورمون (سمت چپ)

Figure 2- Symptoms of Cucumber mosaic virus in tomato leaves inoculated with CMV and treated by jasmonic acid (right), salicylic acid (middle) and combination of two hormones (left)

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

جدول ۳-تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایش بر میزان بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس CMV

Table 3- Analysis of variance for the effect of treatments on the expression of antioxidant genes in tomato plants infected by CMV

منابع تغییر SOV	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)		
		CAT	*POX*	*SOD*
تیمار (treatment)	7	0.844 **	1.074 **	0.673 **
زمان (time)	3	0.214 **	2.06 **	1.96 **
تیمار × زمان (t*t)	21	0.26 **	0.301 **	0.142 **
خطا (error)	64	0.052	0.023	0.0202
ضریب تغییر (٪)		18.54	10.9	10.17

** Significant at 1% probability level **، معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۱٪

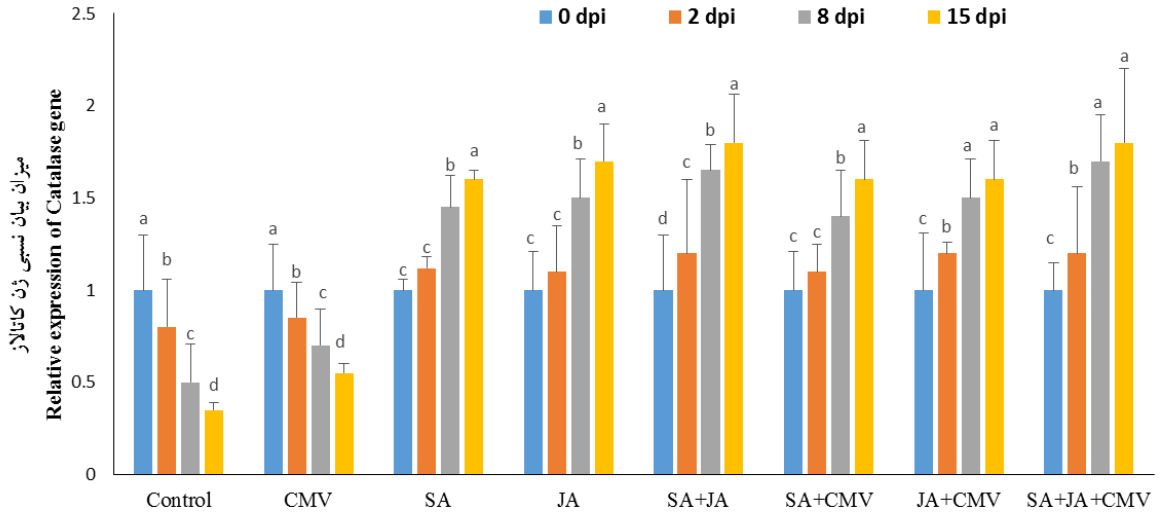
افزایش بیان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تیمارهای هورمونی و گیاهان آلوده به ویروس طی زمان، مطابق با افزایش غلظت ویروس بود، به طوری که غلظت ویروس در همه تیمارهای حاوی ویروس طی زمان بیشتر شد، ولی افزایش آن در تیمارهای کاربرد هورمون به ویژه تیمار توام SA، JA و ویروس بسیار آهسته‌تر از شاهد ویروس بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). این امر بیانگر وقوع تنش اکسیداتیو ناشی از حضور بیمارگر و افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانت جهت مقابله با تنش است.

نتایج حاکی از آن بود که با افزایش رشد گیاه و استقرار نشاهای گوجه‌فرنگی در خاک از میزان شدت فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانت کاسته می‌شود. این امر می‌تواند ناشی از وضعیت سلامت گیاه یا فعال شدن سایر سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی باشد. با وقوع تنش زیستی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به جز CAT افزایش نشان داد (شکل‌های ۳-۵). این یافته‌ها می‌تواند حاکی از این باشد که در گوجه‌فرنگی رقم فلات، آنزیم POX نقش موثرتری نسبت به CAT در پاکسازی رادیکال‌های H_2O_2 دارد. محلول‌پاشی هورمون‌ها چه در حضور ویروس و چه در غیاب آن، موجب افزایش بیان ژن هر سه آنزیم آنتی‌اکسیدانت شد و این امر نشان می‌دهد که این هورمون‌های دفاعی، از سیگنال‌های اولیه SAR و ISR برای مقابله با تنش‌های زیستی هستند (Li *et al.* 2017).

آلودگی‌های ویروسی مانند CMV هر ساله خسارات فراوانی به محصولات اقتصادی مانند گوجه‌فرنگی، فلفل و خیار وارد می‌کند و از طریق تداخل در ظرفیت فتوسنتزی گیاهان موجب افزایش تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) می‌گردند (Chaerle *et al.* 2006). بررسی اثر اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک بر فعالیت فسفولیپاز-D و سطح اکسیژن فعال در گیاهچه‌های سویا نشان داد که تنش‌های زیستی و کاربرد اسید سالیسیلیک موجب فعال شدن فسفولیپاز-D که عامل تولید پیک ثانویه‌ای به نام اسید فسفاتیدیک است، می‌شود و واکنش‌های دفاعی فعال شده بر اثر اسید سالیسیلیک، موجب تغییر تعادل رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌گردند (Kalachova *et al.* 2012).

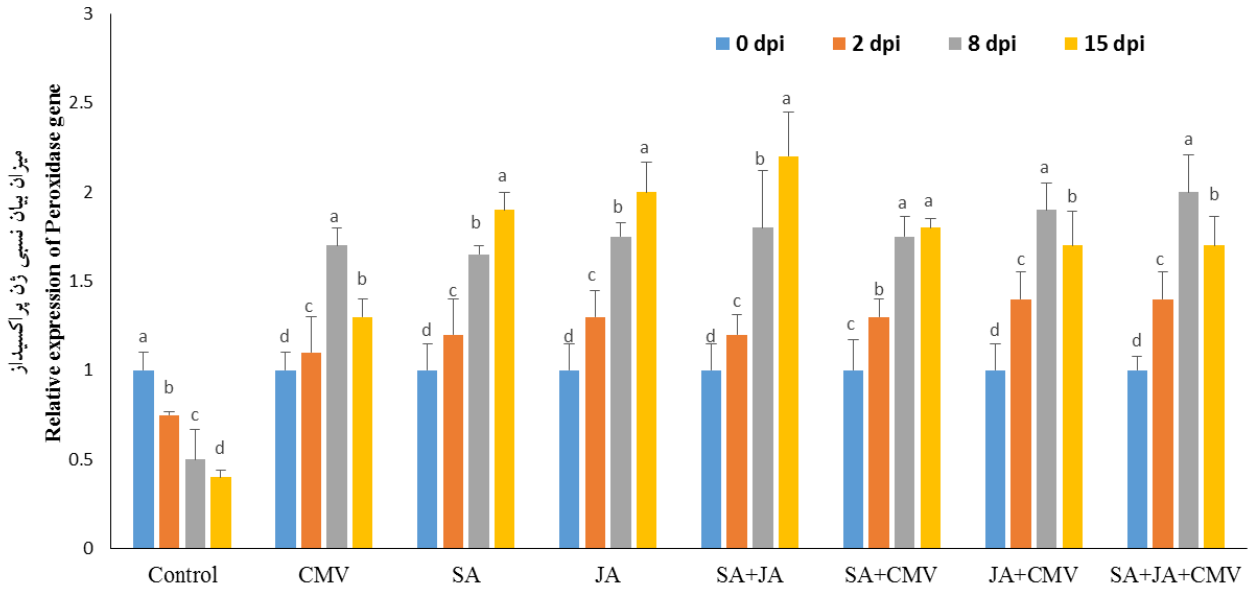
طبق نتایج این تحقیق، بر اثر آلودگی به CMV، میزان بیان ژن *CAT* کاهش و میزان بیان نسبی ژن *POX* افزایش داشت. اسید سالیسیلیک در گیاهان نقش دفاعی دارد و با اتصال به کاتالاز از فعالیت آن جلوگیری و موجب افزایش تولید H_2O_2 می‌شود. محققان نشان داده‌اند که SA با بیان ژن‌های *PR* که آغازگر آن H_2O_2 است، ارتباط دارد (Goy *et al.* 1992). SA از طریق جلوگیری از نسخه‌برداری ویروسی و حرکت سیستمیک آن نیز موجب القای مقاومت می‌گردد (Singh *et al.* 2004).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن کاتالاز (*CAT*) در برگ‌های گوجه‌فرنگی تحت تیمارهای مختلف طی زمان‌های پس از آلودگی (dpi بر حسب روز) به ویروس CMV

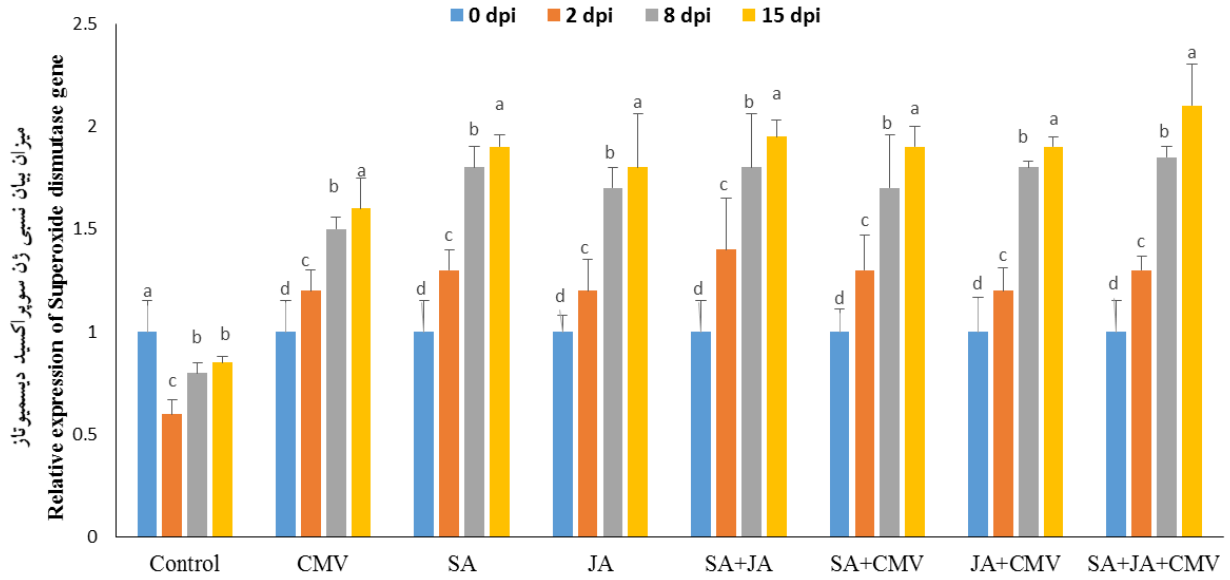
Figure 3- Relative expression of catalase gene (*CAT*) in tomato leaves under different treatments over days post inoculation (dpi) and CMV infection



شکل ٤- میزان بیان نسبی ژن پراکسیداز (*POX*) در برگ‌های گوجه‌فرنگی تحت تیمار طی زمان‌های پس از آلودگی (dpi) به ویروس CMV

Figure 4- Relative expression of peroxidase gene (*POX*) in tomato leaves under different treatments over days post inoculation (dpi) and CMV infection

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]



شکل ۵- میزان بیان نسبی ژن سوپراکسید دیسمیوتاز (*SOD*) در برگ‌های گوجه‌فرنگی تحت تیماره طی زمان‌های پس از آلودگی (dpi) به ویروس CMV

Figure 5- Relative expression of superoxide dismutase gene (*SOD*) in tomato leaves under different treatments over days post inoculation (dpi) and CMV infection

مقاومت القایی در گیاهان با پرایمینگ (پیش آماده‌سازی) سلولی همراه است و این پدیده می‌تواند سلول را قادر سازد تا به کمترین محرک‌های محیطی در کوتاه‌ترین زمان ممکن واکنش نشان دهد (Conrath *et al*. 2002; Borges and Sandalio, 2015). SA از طریق القای مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) موجب پرایمینگ سلولی می‌شود (Goellner and Conrath, 2008; Oliveira *et al*. 2016). SA و JA از تکثیر و حرکت ویروس جلوگیری می‌کنند و به نظر می‌رسد که این عمل از طریق ژن‌های ویژه‌ای به نام *MAPK* صورت می‌پذیرد (Meldau *et al*. 2012; Agrawal *et al*. 2003; Hettenhausen *et al*. 2014).

بررسی بیان مازاد ژن *MAPK3* در برگ‌های گوجه‌فرنگی و مقایسه آن با گیاهان شاهد نشان داد که در گیاه جهش‌یافته، میزان تولید H_2O_2 به شدت کاهش یافت و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش داشت. کاربرد خارجی هورمون‌های SA و JA موجب افزایش بیان ژن‌های *MAPK* و به تبع آن، افزایش مقاومت SAR از طریق ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گردید (Li *et al*. 2017).

محققان اظهار داشته‌اند که انباشته شدن H_2O_2 موجب افزایش تولید SA و در نتیجه، بیان ژن‌های *PR* در حضور ویروس می‌گردد (Devadas and Raina, 2002). همچنین SA نه تنها موجب خاموشی RNA ویروس می‌شود، بلکه انباشته شدن RNA ویروس را به تاخیر می‌اندازد (Lewsey *et al*. 2009).

نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن است که تنش زیستی ناشی از حمله CMV موجب تغییر عمده‌ای در سطح مولکولی در گوجه‌فرنگی می‌شود و این تغییرات، زمینه القای مقاومت در گیاه را فراهم می‌کند. در صورتی که گیاه حساس به بیمارگر باشد، سیستم‌های دفاعی آن در برابر ویروس ناکارآمد خواهد بود و ویروس می‌تواند به سرعت در کل گیاه پخش گردد. بنابراین، کاربرد هورمون‌های گیاهی SA و JA می‌تواند سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی گیاه را فعال و تقویت کند و موجب کاهش علایم ناشی از ویروس تا ۸۰ درصد در کاربرد توام دو هورمون گردد. برای بررسی کارایی کاربرد این هورمون‌ها زمانی که گیاه به ویروس آلوده شده است، نیاز به تحقیقات بیشتری است تا نشان دهد که آیا هورمون‌های دفاعی SA و JA قادرند پس از ورود ویروس، سیستم دفاعی گیاه را تقویت کنند یا خیر؟

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

منابع

Agrawal GK, Tamogami S, Iwahashi H, Agrawal VP, Rakwal R. 2003. Transient regulation of jasmonic acid-inducible rice *MAP* kinase gene (*OsBWMK1*) by diverse biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 41(4): 355-361.

Anderson MX, Hamberg M, Kourtchenko O, Brunnstro M, McPhail KL, Gerwick WH, et al. 2006. Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 281: 31528–31537.

Bacso R, Hafez YM, Kiraly Z, Kiraly L. 2011. Inhibition of virus replication and symptom expression by reactive oxygen species in tobacco infected with Tobacco mosaic virus. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica Journal* 46(1): 1–10.

Borges AA, Sandalio LM. 2015. Induced resistance for plant defense. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-2.

Chaerle L, Pineda M, Romero-Aranda R, Van Der Straeten D, Baron M. 2006. Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiology* 47: 1323–1336.

Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7(5): 210-216.

De Gara L, de Pinto MC, Tommasi F. 2003. The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 863–870.

Devadas SK, Raina R. 2002. Preexisting systemic acquired resistance suppresses hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis* hrl1 mutant. *Plant Physiology* 128(4): 1234-1244.

El-Khallal SM. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid & salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1(4): 717-732.

Falcioni T, Ferrio JP, del Cueto AI, Giné J, Achón MÁ, Medina V. 2014. Effect of salicylic acid treatment on tomato plant physiology and tolerance to Potato virus X infection. *European Journal of Plant Pathology* 138: 331–345.

Foyer CH, Noctor G. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355–364.

Goellner K, Conrath U. 2008. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 121(3): 233-242.

Gonçalves LSA, Rodrigues R, Diz MSS, Robaina RR, do Amaral Júnior AT, Carvalho AO, Gomes VM. 2013. Peroxidase is involved in Pepper yellow mosaic virus resistance in *Capsicum baccatum* var. Pendulum. *Genetics and Molecular Research* 12 (2): 1411-1420.

Goy PA, Felix G, Metraux JP, Meins F. 1992. Resistance to disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi* is associated with high levels of beta-1, 3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41:11-21.

Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2009. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany* 68(1): 14–25.

Hayat S, Ahmad A. 2007. Salicylic acid: a plant hormone. The Netherlands. Springer.

Hernandez JA, Gullner G, Clemente-Morenoc MJ, Künstlerb A, Juhasz C, Díaz-Vivancos P, Kiraly L. 2015. Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.09.001.

Hettenhausen C, Heinrich M, Baldwin IT, Wu J. 2014. Fatty acid-amino acid conjugates are essential for systemic activation of salicylic

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

acid-induced protein kinase and accumulation of jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *BMC Plant Biology* 14:326-337.

Hussein W, Awad H, Fahim S. 2016. Systemic resistance induction of tomato plants against ToMV virus by surfactin produced from *Bacillus subtilis* BMG02. *American Journal of Microbiological Research* 4(5): 153-158.

Ibrahim YE. 2012. Activities of antioxidants enzymes in Salicylic acid treated tomato against Xanthomonas vesicatoria. *African Journal of Microbiology Research* 6(27): 5678-5682.

Inaba J, Kim BM, Shimura H, Masuta C. 2011. Virus-induced necrosis is a consequence of direct protein-protein interaction between a viral RNA-silencing suppressor and a host catalase. *Plant Physiology* 156(4): 2026–2036.

Kalachova TA, Lakovenko OM, Kretinin SV, Kravetes VS 2012. Effects of salicylic and jasmonic acid on phospholipase D activity on the level of active oxygen species in soybean seedling. *Membrane Cell Biology* 6: 243-248.

Kang G, Li G, Guo T. 2014. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. *Acta Physiologia Plantarum* 36: 931–943.

Kunkel BN, Brooks DM. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 5(4): 325–331.

Kuzniak E, Sklodowska M. 2004. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany* 55: 605–612.

Lewsey M, Surette M, Robertson FC, Ziebell H, Choi SH, Ryu KH, et al. 2009. The role of the cucumber mosaic virus 2b protein in viral movement and symptom induction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(6): 642-654.

Li Y, Qin L, Zhao J, Muhammad T, Cao H, Li H, Zhang Y, Liang Y. 2017. *SlMAPK3* enhances tolerance to tomato yellow leaf curl virus (*TYLCV*) by regulating salicylic acid and jasmonic acid signaling in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS ONE* 12(2): 172-180.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.

Mahmoodi Jaraghili P, Mohajjel Shoja H, Mohajjel Kazemi E. 2016. Evaluation of the effect of salinity on the germination and expression of antioxidant genes in two cultivars of tomato plant. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 5(1): 51-60 (In Farsi with English abstract).

Malerba M, Crosti P, Cerana R, Bianchetti R. 2003. Fusicoccin stimulates the production of H_2O_2 in sycamore cell cultures and induces alternative respiration and cytochrome c leakage from mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 480–488.

Meldau S, Ullman-Zeunert L, Govind G, Bartram S, Baldwin IT. 2012. *MAPK*-dependent JA and SA signaling in *Nicotiana attenuata* affects plant growth and fitness during competition with conspecifics. *BMC Plant Biology* 12: 213-227.

Mohammadi M, Kazemi H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science* 162: 491-498.

Nuzzaci M, Bochicchio I, De Stradis A, Vitti A, Natilla A, Piazzolla P, Tamburro AM. 2009. Structural and biological properties of Cucumber mosaic virus particles carrying hepatitis C virus-derived epitopes. *Journal of Virological Methods* 155(2): 118–121.

Oliveira MDM, Varanda CMR, Fe Â lix MRF. 2016. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters* 15: 152-158.

Shahwan ES. 2010. Inducing systemic resistance against some tomato virus diseases. Ph.D. dissertation. Agricultural Botany Department (Plant Pathology) Faculty of Agriculture, Moshtohor Banha University.

Shoresh M, Yedidia I, Chet I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95(1): 76-84.

Singh DP, Moore CA, Gilliland A, Carr JP. 2004. Activation of multiple antiviral defense

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

mechanisms by salicylic acid. *Molecular Plant Pathology* 5: 57-63.

Song XS, Wanga YJ, Maoa WH, Shi K, Zhoua YH, Nogues S, Yu JQ. 2009. Effects of cucumber mosaic virus infection on electron transport and antioxidant system in chloroplasts and mitochondria of cucumber and tomato leaves. *Physiologia Plantarum* 135: 246–257.

Sriram S, Raguchander T, Vidhyasekaran P, Muthukrishnan S, Samiyappan R. 1997. Genetic relatedness with special reference to virulence among the isolates of *Rhizoctonia solani* causing sheath blight in rice. *Journal of Plant Diseases and Protection* 104: 260–271.

Sudhakar N, Nagendra-Prasad D, Mohan N, Murugesan K. 2006. Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against Cucumber mosaic virus by using ozone. *Journal of Virological Methods* 139(1): 71-77.

Tao Y, Yu Q, Zhou Y, Shi K, Zhou J, Yu J, Xia XJ. 2015. Application of 24-epibrassinolide decreases susceptibility to Cucumber mosaic virus in zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Scientiae Horticulturae* 195: 116-123.

Veladi S, Soleimani-Pari MJ, Khodakaramian G, Ghiasvand T. 2013. Effect of salicylic acid and chitosan on induction of resistance in chickpea against fusarial wilt and root rot. *Plant Disease* 49(2): 181-199 (In Farsi with English abstract).

Vitti A, La Monaca E, Sofo A, Scopa A, Cuypers A, Nuzzaci M. 2015. Beneficial effects of *Trichoderma harzianum* T-22 in tomato seedlings infected by Cucumber mosaic virus (CMV). *BioControl* 60: 135–147.

Yadava P, Thirunavukkarasu N, Kaur P, Shiriga K, Singh I. 2015. Salicylic acid alleviates methyl viologen induced oxidative stress through transcriptional modulation of antioxidant genes in *Zea mays* (L). *Maydica* 60: 1-9.

Yang T, Meng Y, Chen L, Lin H, Xi D. 2016. The roles of alpha-Momorcharin and jasmonic acid in modulating the response of *Momordica charantia* to cucumber mosaic virus. *Frontiers in Micobiology* 7: 1-12.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

Evaluation of antioxidant gene expression in tomato plants inoculated by *Cucumber mosaic virus* after treatment with salicylic and jasmonic acids

Sahar Gholi-Tolouie[1]*, Nemat Sokhandan-Bashir[2], Mahdi Davari[3], Mohammad Sedghi[4]

1- Ph.D. student in Plant Virology, University of Tabriz, Iran

2- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

3- Department of Plant Protection, 4- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran

*Email corresponding author: tolouie.s@gmail.com or mdavari@uma.ac.ir

Abstract

Cucumber mosaic virus (CMV) is one of the most important viruses which causes yield reduction in tomato. In this experiment, the role of salicylic and jasmonic acids was investigated in the gene expression of antioxidant enzymes and induction of resistance to oxidative stress due to CMV inoculation in tomato (Falat cultivar). Results showed that in control plants expression of genes encoding catalase (*CAT)* and peroxidase (*POX)* enzymes gradually decreased to 15 days post inoculation (dpi), but expression of superoxide dismutase encoding gene (*SOD)* was increased at 15 dpi. In CMV inoculated plants, *CAT* gene was down-regulated, but *POX* gene was up-regulated to 8 dpi. *SOD* gene expression also increased in CMV inoculated plants to 15 dpi. The highest expression rate of *POX* observed at 15 dpi in SA+JA treated plants which was 120% greater than before hormone application. Hormone application decreased the disease severity and symptoms to 80%. In Falat cultivar, peroxidase role in scavenging of H_2O_2 was greater than catalase and in order to inducing resistance, we can use SA and JA just before virus infection.

Keywords: oxidative stress, biotic stress, virus, tomato, Real time PCR, disease index.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-04]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.6.0]