

## ارزیابی دگرگونی‌های زیست‌شیمیایی و مولکولی گیاه گوجه‌فرنگی در برهمکنش با بیمارگر *Alternaria solani*

بتول صادقی<sup>۱</sup>، محمد سالاری<sup>۲\*</sup>، سعید میرزایی<sup>۳</sup>، ناصر پنجه‌که‌آ و سید کاظم صباغ<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، ایران

۲. دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، ایران

۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات

تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

۴. استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۲۵)

### چکیده

لکه‌موجی از بیماری‌های مهم گیاه گوجه‌فرنگی است که سبب کاهش کمی و کیفی محصول می‌شود. با توجه به کاربرد بی‌رویه آفت‌کش‌ها در مهار این بیماری شناسایی سازوکارهای دفاعی گیاه در برابر بیمارگر می‌تواند در شناساندن ارقام مقاوم و مهار زیان بیمارگر سودمند واقع شود. در این پژوهش برخی دگرگونی‌های زیست‌شیمیایی و الگوی تظاهر ژن‌های *WRKY33* و *PR1b1* به روش qRT-PCR در رقم مقاوم Super 2270 و حساس CH Flat در برابر *Alternaria solani* بررسی شدند. نمونه‌برداری در پنج بازه زمانی با سه تکرار انجام شد. نتیجه‌ها نشان دادند که فعالیت گواپیکول پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز و میزان رونوشت ژن‌های موردبررسی پس از مایه‌زنی گیاه با بیمارگر در رقم مقاوم و حساس افزایش یافت ولی میزان این افزایش در رقم مقاوم بیشتر بود. میزان تجمع پراکسید هیدروژن در رقم مقاوم در ساعت‌های نخستین به سرعت افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود رسید درحالی‌که تجمع آن در رقم حساس در مراحل پسین آلودگی نیرومندتر و بیشتر بود. نتیجه‌ها نشان دادند که القاء پاسخ‌های اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی و همچنین فعالیت ژن‌های موردبررسی بخشی از سازوکارهای دفاعی گوجه‌فرنگی در برابر *A. solani* است.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، بیماری‌زایی، زیست‌شیمیایی، واکنش دفاعی.

## Evaluation of biochemical and molecular changes of tomato plants interacted with *Alternaria solani*

Batul Sadeghi<sup>1</sup>, Mohammad Salari<sup>2\*</sup>, Saeid Mirzaei<sup>3</sup>, Naser Panjehkeh<sup>2</sup> and Seyed Kazem Sabbagh<sup>4</sup>

1. Ph. D. Candidate, Department of Plant Protection, University of Zabol, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Protection, University of Zabol, Iran

3. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science, High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

4. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Iran

(Received: May 29, 2018 - Accepted: Oct. 17, 2018)

### ABSTRACT

Early blight disease is one of the most common foliar diseases of tomato, which causes a great reduction in the quantity and quality of its yield. Regarding the use of fungicides in controlling this disease, identification of plant defense mechanism against the pathogen can be useful in introducing resistant cultivars and controlling the damage of the pathogen. In this research, several biochemical changes and expression patterns of *PR1b1* and *WRKY33* genes were investigated by qRT-PCR in a resistant cultivar Super 2270 and a susceptible cultivar CH Flat infected with the fungus *Alternaria solani*. Sampling was done during five intervals with three replications. The hydrogen peroxide accumulation, activity of defense enzymes Guacul peroxidase, Catalase and Superoxide dismutase enzymes, and the number of transcripts of genes was found to be increased in a challenge with the pathogen. The activity of these enzymes and genes were higher in the resistant cultivar.  $H_2O_2$  accumulated rapidly in the resistant cultivar leaf tissues and peaked during the early stages of infection, whereas accumulation was stronger and more intense in the susceptible cultivar tissues in later stages. These results indicated that the induction of oxidant/antioxidant responses and the activity of genes in this study are a part of the tomato defense mechanism against the necrotrophic fungus *A. solani*.

**Keywords:** Biochemical, defense reaction, gene expression, pathogenecity.

\* Corresponding author E-mail: salari21m@yahoo.com

### مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) یکی از مهم‌ترین سبزی‌ها است که به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان کشت می‌شود. این محصول در جهان پس از سیب‌زمینی دومین محصول سبزی پر ارزش کشاورزی از دیدگاه اقتصادی انگاشته می‌شود. هم‌چنین این گیاه به‌عنوان گیاه‌الگو در بسیاری از پژوهش‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده به‌کار می‌رود (Salim et al., 2011).

بیماری لکه موی از مهم‌ترین بیماری‌های گوجه‌فرنگی در جهان است که باعث کاهش مقدار فرآوری و کیفیت محصول می‌شود (Grigolli et al., 2011). این بیماری در ایران کم‌وبیش در همه منطقه‌های کشت‌وکار گوجه‌فرنگی گسترده است و زیان آن روی ارقام گوجه‌فرنگی نزدیک به ۶۰-۹۰ درصد برآورد شده است (Hajianfar & Zorbakhsh, 2006). کاربرد بی‌رویه آفت‌کش‌های شیمیایی برای مهار این بیماری افزون بر زیان‌ها زیست‌محیطی، بهداشتی و مالی سبب پیدایش نژادهای مقاوم بیمارگر نیز می‌شود؛ بنابراین دانش ژنتیک مقاومت در اصلاح گیاه گوجه‌فرنگی به این بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ارقام مقاوم به دلیل شناسایی به‌موقع بیمارگر و فعال کردن سریع سازوکارهای دفاعی کارآمد از ارقام حساس جدا می‌شوند.

مؤثرترین و مطمئن‌ترین راه برای مهار بیماری لکه موی به‌کارگیری ارقام مقاوم و گیاهان تراریخته دربرگیرنده ژن‌های مقاومت است (Adhikari et al., 2017)؛ بنابراین بررسی دگرگونی‌های زیست‌شیمیایی و الگوی بیان ژن‌های درگیر مقاومت می‌تواند داده‌های سودمندی را در زمینه حساسیت و مقاومت گیاه به بیمارگر فراهم آورد. سامانه‌های دفاعی آنزیمی مانند سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) در پاسخ‌های دفاعی گیاه دخیل هستند و از آن‌ها به‌عنوان نشانگرهای زیست‌شیمیایی سودمندی در پژوهش‌های برهمکنش گیاه با بیمارگرها استفاده می‌شود. فعال شدن SOD نخستین گام دفاع در برابر رادیکال‌های آزاد است (Sharma et al., 2012) در طول پاسخ گیاه به بیمارگرهای

نکروتروف، پراکسیدازها در تنظیم سطوح رادیکال‌های کُنشگر اکسیژن دخیل هستند و سبب کاهش جابجایی الکترون‌های  $H_2O_2$  به انواع مولکول‌های گیرنده می‌شوند. این فرایندهای زیست‌شیمیایی مربوط به مقاومت می‌شوند (Ardila et al., 2014). کاتالازها در سنجش با دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سرعت واکنش بالایی داشته به‌طوری‌که در هر ثانیه می‌توانند میلیون‌ها مولکول  $H_2O_2$  را تجزیه نمایند (Sharma et al., 2012). پژوهش‌ها بی‌شماری نشان می‌دهند که آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز و کاتالاز در مقاومت گیاه به بیمارگر *Alternaria* نقش دارند (Ray et al., 2015; Lubaina & Murugan, 2013). تجمع  $H_2O_2$  به‌عنوان پیام‌رسان دفاع گیاه گزارش شده است (Nikraftar et al., 2013). در همکنش گیاه میزبان با یک بیمارگر بیوتروف، شاید تجمع  $H_2O_2$  در سرکوب بیمارگر نقش داشته باشد درحالی‌که در بیمارگرهای نکروتروف به پیشروی بیماری یاری می‌کنند (Taheri et al., 2014).

در میان ژن‌های مقاومت جهت تولید ارقام مقاوم، ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) و فاکتورهای رونویسی مانند *WRKY* که مسئول تنظیم فرآیندهای رشدونمو و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان هستند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Rushton et al., 2010). ژن‌های متعلق به خانواده‌های PR از جمله *PR1* به‌طور فراوانی به سازوکارهای مقاومت گیاه در برابر بیمارگرهای قارچی پیوسته هستند و نشانگرهای قابل‌قبولی در مقاومت گیاهان در برابر بیمارگرها به‌شمار می‌روند (Jain et al., 2018). در پژوهش‌هایی الگوی بیان پروتئین‌های PR در گیاه گوجه‌فرنگی و آرابیدوسیس در رویارویی با بیمارگر *Alternaria* بررسی شد و نتیجه‌ها نشان دادند که بیان این پروتئین‌ها در رویارویی با بیمارگر افزایش یافته و باعث ایجاد مقاومت گیاه می‌شود (Mukherjee et al., 2009; Upadhyay et al., 2014). از طرفی پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده همواره با دگرگونی‌هایی در بیان ژن‌ها همراه است که این دگرگونی‌ها از طریق انواع گوناگونی از فاکتورهای رونویسی انجام می‌شود. از مهم‌ترین

گلخانه انجام شد و جدایه RF-4 که بیماری‌زایی بالاتری را در برابر دیگر جدایه‌ها داشت جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

#### آماده کردن سوسپانسیون قارچی

جدایه بیماری‌زای قارچ جهت تکثیر و اسپورزایی روی محیط PCA کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای زمانی برابر یک هفته نگهداری شد. پس از رشد کامل جدایه قارچی، اندکی آب مقطر سترون در سطح کلنی‌های قارچ ریخته شد و با به‌کارگیری اسکالپل تیز سطح آن‌ها کاملاً خراش داده شد. سوسپانسیون به‌دست‌آمده از پارچه ململ دولایه رد و صاف شد و برای زمانی برابر ده دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه داده شد. ته‌نشست‌های اسپور جدایه قارچی به آرامی جدا و آب مقطر به آن‌ها افزوده شد و با به‌کارگیری لام گلبول شمار، شمار اسپور سوسپانسیون به میزان  $2 \times 10^5$  اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد (Shahbazi et al., 2010).

#### غربالگری ارقام گوناگون گوجه‌فرنگی به بیمارگر *A. solani* در شرایط گلخانه

بذرهای ارقام گوجه‌فرنگی پس از گندزدایی سطحی با محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم (NaOCl) و چند بار آبشویی با آب مقطر سترون درون گلدان‌های پلاستیکی حاوی پرلیت کاشته شدند. گلدان‌ها در شرایط کنترل‌شده گلخانه (رطوبت نسبی ۷۰٪) نگهداری شدند و با محلول غذایی هوگلند (جدول ۱) آبیاری شدند. نشاهای گوجه‌فرنگی ۵۰ روزه با سوسپانسیون اسپوری قارچ بیمارگر با غلظت  $10^5 \times$  ۲ اسپور در میلی‌لیتر مایه‌زنی شدند. با پیدایش نشانه‌ها، شمار لکه‌های روی برگ‌ها یادداشت شد و بر پایه سامانه نمره‌دهی ۵-۰ (Martinez et al., 2002) به شرح زیر شناسه بیماری برای هرکدام از ارقام تعیین شد: ۰- بدون آلودگی، ۱- آلودگی بسیار کم و شمار بسیار اندک لکه، ۲- آلودگی کم، شمار لکه کم، ۳- آلودگی میانه، شمار لکه میانه، ۴- آلودگی گسترده، شمار لکه بسیار و ۵- آلودگی شدید و مرگ بوته‌ها. نمرات ۰ و ۱ به‌عنوان ارقام مقاوم، ۲ ارقام

فاکتورهای رونویسی کارآمد در سامانه دفاعی گیاهان خانواده WRKY هستند که کم‌وبیش به‌طور انحصاری در گیاهان یافت شده‌اند (Figueiredo et al., 2012). نتیجه‌های پژوهش‌های بی‌شمار نشان می‌دهند که همه زیر خانواده‌های WRKY در مقاومت گیاه در برابر انواع تنش‌های زنده نقش دارند (Chen et al., 2018). فاکتورهای رونویسی WRKY33 و WRKY1 به ترتیب در مقاومت به بیمارگر *Botrytis cinerea* (Liu et al., 2014) و *A. solani* (Shinde et al., 2018) در گوجه‌فرنگی گزارش شده‌اند.

در این پژوهش به‌منظور دریافت بهتر سازوکارهای مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی در برابر *A. solani* در آغاز واکنش ارقام گوناگون گوجه‌فرنگی بر پایه شناسه شدت بیماری‌زایی به بیماری لکه موجی ارزیابی شد و ارقام حساس و مقاوم گزینش شدند. سپس به‌منظور آشکار ساختن اثرات آنزیم‌ها و ژن‌های موردبررسی در مقاومت به بیمارگر *A. solani*، دگرگونی‌های زیست‌شیمیایی و الگوی تظاهر بیان ژن‌های *PR1b1* و *WRKY33* به روش Real Time PCR در بازه‌های زمانی گوناگون پس از آلودگی ارزیابی شد.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی و جدایه قارچ *A. solani*

در این پژوهش از ۱۷ رقم گوجه‌فرنگی استفاده شد. بذر ارقام گوجه‌فرنگی از شرکت فلات دریافت شد. جدایه *A. solani* از گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده از مزارع زیر کشت گوجه‌فرنگی در منطقه‌های گوناگون استان کرمان جداسازی و شناسایی گردید. شناسایی گونه بر پایه روش استانداردشده سیمونز (Simmons, 2007) و بررسی ریخت‌شناسی جدایه‌ها انجام شد. برای بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، حلقه‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از پیرامون در حال رشد پرگنه‌های مربوط به هر جدایه برداشته شد و به تشتک‌های پتری دربرگیرنده محیط غذایی Potato Carrot Agar (PCA) منتقل گردید. این تشتک‌ها در دمای ۲۵-۲۳ درجه سلسیوس زیر نور سفید فلورسنت با چرخه نوری/ تاریکی ۸/۱۶ ساعت نگهداری شدند و پس از ۷-۵ روز بررسی شدند. بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط

فعالیت آنزیمی نمونه‌های مورد بررسی استفاده شد (Alves et al., 2016).

#### سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری آنزیم گایاکول پراکسیداز دربرگیرندهٔ بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، گایاکول ۹ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۱۹ میلی‌مولار و عصارهٔ آنزیمی (۵۰ میکرولیتر) بود. جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (S2100 Biowave, England) خوانش شد. دگرگونی‌های جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین به‌عنوان واحد فعالیت پراکسیداز در نظر گرفته شد (Lin & Kao, 1999).

#### سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز با به‌کارگیری روش پیشنهادی Aebi (1984) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش دربرگیرندهٔ ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار pH=7 دربرگیرندهٔ ۰/۲ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱ درصد و ۰/۳ میلی‌لیتر عصارهٔ استخراجی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز در طول موج ۲۴۰ نانومتر برآورد شد. دگرگونی‌های جذب برحسب واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه به‌عنوان واحد آنزیمی بیان شد.

#### سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر پایهٔ توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیترو بلو تترازولیم کلراید انجام شد (Giannopolitis & Ries, 1997). مخلوط واکنش دربرگیرندهٔ بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7/8)، ۱۳ میلی‌مولار متیونین، ۰/۰۷۵ میکرومولار NBT، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۰/۰۰۲ میکرومولار ریبوفلاوین و ۵۰ میکرومولار عصارهٔ آنزیمی بود. برای استاندارد نمودن داده‌ها، میزان فعالیت ویژه آنزیم با برآورد نسبت واحد فعالیت آنزیمی به میلی‌گرم پروتئین کل اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان تجمع پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) میزان تجمع پراکسید هیدروژن با به‌کارگیری روش

متحمل و نمرات ۵-۳ به‌عنوان ارقام حساس در نظر گرفته شدند آزمایش در چارچوب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد.

جدول ۱. ترکیب نمکی محلول غذایی هوگلند

Table 1. Salt composition of the Hougland solution

Salt	غلظت	Salt	غلظت
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.002 M	Zn SO <sub>4</sub>	0.22 g/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.004 M	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.81 g/l
Fe-EDTA	5 ppm	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g/l
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.001 M	CuSO <sub>4</sub>	0.08 g/l
KNO <sub>3</sub>	0.006 M	MoO <sub>3</sub>	0.02 g/l

M: Molar, g/l: gram/liter

M: Molar, g/l: gram/liter

#### بررسی سازوکارهای دفاعی

##### کاشت گلخانه‌ای و تلقیح گیاهان با بیمارگر *A. solani*

بر پایهٔ نتیجه‌های آزمون غربالگری مقاوم‌ترین و حساس‌ترین رقم جهت آزمایش‌های زیست‌شیمیایی و مولکولی گزینش شدند. بذرها را ارقام گزینش‌شده درون گلدان‌های پلاستیکی دربرگیرندهٔ پرلیت سترون‌شده کاشته شدند. گلدان‌ها در شرایط کنترل‌شده گلخانه نگهداری شدند و با محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند. برگ گیاهان گوجه‌فرنگی ۳۰ روزه با سوسپانسیون اسپوری قارچ بیمارگر با غلظت  $2 \times 10^5$  اسپور در میلی‌لیتر مایه‌زنی شدند و در بازه‌های زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی جمع‌آوری شده و جهت بررسی‌های پسین استفاده و ارزیابی شدند. برای تیمار شاهد به‌جای سوسپانسیون اسپور از آب مقطر استفاده شد (Ray et al., 2015).

#### استخراج عصارهٔ آنزیمی

به‌منظور استخراج عصارهٔ آنزیمی برگ، ۳۰۰ میلی‌گرم بافت یخ‌زدهٔ گیاهی در هاون چینی با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=6/8) که دارای اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۰/۱ میلی‌مولار، فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF) ۱۰۰ میلی‌مولار و پلی‌وینیل پیرولیدین ۲ درصد بود ساییده شدند. عصارهٔ به‌دست‌آمده برای زمانی برابر ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (Universal 32R, Sigma Aldrich) در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس و ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. از محلول رویی به‌منظور بررسی

انجام شد. ژن *Actin* به عنوان ژن داخلی و نیز نرمال سازی و کمیّت سنجی بیان ژن‌ها استفاده شد. پیش از تجزیه داده‌ها منحنی ذوب برای هر ژن به دست آمد و با بررسی این منحنی‌ها درستی پیک مربوط به ژن مورد نظر و نبود پرایمر دایمر تأیید شد. برای هر آزمایش سه تکرار زیستی و سه تکرار آزمایشگاهی در نظر گرفته شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل سه عاملی با دو عامل رقم (در دو سطح)، بیمارگر (دو سطح) و زمان (در ۵ سطح) در چارچوب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. داده‌ها با به کارگیری نرم افزار SAS و پیرایش ۹ تجزیه و تحلیل شدند. هم‌سنجی میانگین داده‌ها با به کارگیری آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد (Shahbazi et al., 2011). تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی با به کارگیری نرم افزار Rest 2009 و پیرایش Real Time که تخصصی داده‌های خروجی Real Time است انجام شد (Pffafi, 2001).

#### نتایج

**نتیجه‌های غربالگری ارقام گوجه‌فرنگی به *A. solani***  
جدول تجزیه واریانس داده‌های صفت شناسه بیماری‌زایی نشان داد که میان ارقام گوجه‌فرنگی از دید حساسیت به *A. solani* در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). برآورد شناسه بیماری لکه موجهی در ارقام گوناگون بر پایه سامانه نمره‌دهی ۵-۰ نشان داد که رقم Supper 2270 با میانگین نمره ۱/۳ کمترین میزان شناسه بیماری‌زایی را به خود اختصاص داد و به عنوان رقم کم‌وبیش مقاوم در نظر گرفته شد. ارقام King Stone، DFT3003، DFT300، T97301، CH-Flat، Imperial و Sunseed نیز بر پایه شناسه بیماری‌زایی در گروه ارقام حساس قرار گرفتند اما هم‌سنجی میانگین‌ها نشان داد که این ارقام از دید آماری با هم تفاوت معنی‌داری دارند و رقم CH-Flat با میانگین نمره ۴/۲۲ به عنوان حساس‌ترین رقم برگزیده شد. ارقام Chef، Kalgi، Kimia، ZD633 و Lesto به عنوان ارقام متحمل شناخته شدند (جدول ۴).

Velikova et al. (2000) انجام شد. بافت برگ‌ها با تری کلرواستیک اسید ۰/۰۱ درصد روی یخ ساییده شد. مخلوط برای زمانی برابر ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به فاز رویی ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه شد. جذب محلول‌ها در ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. سپس مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با به کارگیری نرخ خاموشی  $0.28 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  و بر حسب میلی‌مولار بر میلی‌گرم وزن تر بیان گردید.

#### ارزیابی میزان نسبی بیان ژن *PR1b1* و فاکتور رونویسی *WRKY33*

به منظور ارزیابی بیان ژن برگ گیاهان گوجه‌فرنگی در بازه‌های زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی قارچی برداشت شد. RNA کل نمونه‌ها با به کارگیری کیت RNX™ plus (Cinnagen, Iran) برابر دستورکار کیت استخراج شد. کمیّت و کیفیت RNA با به کارگیری دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نیز ژل آگارز ۲ درصد تعیین شد. یک میکروگرم RNA با آنزیم DnaseI (Fermentase, USA) تیمار شد و ساخت cDNA با به کارگیری آغازگر پلی (Oligo (dt) T و برابر دستورکار کیت cDNA Synthesis (Yekta Tajhiz) انجام شد. طراحی آغازگرهای ژن‌های مورد بررسی به وسیله نرم افزار 3 Primer انجام شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی با به کارگیری دستگاه Rotor gene RG-3000 (Australia Corbett Research) و کیت سایبرگرین (RealQ Plus 2x Master Mix Green, Ampliqon) انجام شد. ارزیابی کمی بیان ژن در حجم ۱۰ میکرولیتر دربرگیرنده ۵ میکرولیتر از مخلوط سایبرگرین، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگرهای جلوبرنده و پس‌برنده و ۰/۵ میکرولیتر cDNA انجام شد. واکنش‌های qRT-PCR با برنامه دمایی ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس برای واسرشتن نخستین، ۴۵ تکرار از چرخه دمایی، ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۶۰ ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس و ۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس

جدول ۲. ویژگی‌ها پرایمرهای استفاده‌شده در واکنش qRT-PCR

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Accession number
WRKY33	GCATTACTGTCAACCATCGC	AACTTCGGATTCTCATT	XM_010326377.1
PR1b1	TTGGTGACTGCGGGATGA	GGCGGGGCTAGGTTT	NM_001247385
Actin	TGGTCGGAATGGGACAGAAG	CTCAGTCAGGAGAACAGGGT	NM_001330119.1

رقم تحت تأثیر عامل بیماری، زمان و اثر رودرروی آنها قرار دارد (جدول ۵). فعالیت آنزیم‌های دفاعی موردبررسی و میزان تجمع پراکسید هیدروژن در رقم مقاوم و حساس پس از مایه‌زنی با بیمارگر در هم‌سنجی با گیاهان شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

#### نتیجه‌های فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

در این پژوهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در کنترل‌های هر دو رقم به‌طور معنی‌داری پائین‌تر از گیاهان آلوده بود؛ بنابراین فعالیت این آنزیم در هر دو رقم به‌طور معنی‌داری پس از آلودگی با *A. solani* افزایش یافت. میزان فعالیت آنزیم در همه زمان‌ها پس از آلودگی در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود. بیشینه فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو رقم در ۴۸ ساعت پس از آلودگی دیده شد که در رقم مقاوم ۱/۵ برابر بیشتر از رقم حساس بود. سپس در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش یافت؛ اما سطح این فعالیت همچنان در رقم مقاوم در سنجش با رقم حساس بالاتر بود. کاهش فعالیت پراکسیداز در رقم مقاوم روندی تدریجی داشت درحالی‌که در رقم حساس در زمان ۷۲ ساعت میزان فعالیت پراکسیداز به‌شدت کاهش یافت و در زمان ۹۶ ساعت یک افزایش جزئی در میزان فعالیت مشاهده شد.

جدول ۵. تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی در رویارویی با *Alternaria solani*

Source of variations	df	Means square			
		POX	CAT	SOD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Cultivars (C)	1	133.3482614**	2.24254282**	31.12325667**	0.00823706**
Inoculation (I)	1	795.9516277**	5.10725867**	99.19865488**	1.22990220**
Time (T)	4	131.7010181**	1.09230797**	14.12884446**	0.08946276**
C × T	1	35.8473650**	0.50428794**	4.14434035**	0.01395206**
C × I	4	14.7262340**	0.01587733**	1.50141109**	0.09054182**
I × T	4	112.1769266**	0.76341722**	8.88992157**	0.07826775**
C × T × I	4	13.6745166**	0.01811992**	0.64692429**	0.07370714**
Error		0.339539	0.00439660	0.0425875	0.00001989
CV%		7.688937	9.873164	2.878554	0.804241

\*\* : Significant at 1% of probability levels.

\*\* : تیمارها در سطح ۰/۰۱ دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۳. تجزیه واریانس شناسه بیماری‌زایی ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی در واکنش به بیماری لکه موی

Table 3. Analysis of variance of disease index of tomato seedlings in reaction to *Alternaria solani*

S.O.V	df	Disease index
Cultivar	16	2.802**
Error	34	0.001047
C.V		1.195

\*\* : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

\*\* : Significant at 1% of probability levels

جدول ۴. مقایسه میانگین شناسه بیماری‌زایی ژنوتیپ‌های گوناگون گوجه‌فرنگی برای بیمارگر *Alternaria solani*

Table 4. Mean comparison of disease index in different genotypes of tomato for *Alternaria solani*

Cultivars	Disease index	Cultivars	Disease index
CH-Flat	4.42 a	Lesto	2.45 h
Chef	2.45 h	RFT112	2.12i
DFT300	3.5 d	Soria	3g
DFT3003	3.65 c	Super 2270	1.3 k
Early urbano	2.45 h	Sunseed	3.6 c
Imperial	4.25b	T97301	3.2 f
Kalgi	2.1 i	ZD633	2 j
Kimia	2.15 i	ZD634	2.15 i
King Stone	3.43 e		

میانگین‌های با حرف‌های مشترک بدون اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

Means with similar letters are not significantly difference at 5% of probability level.

#### نتیجه‌های ارزیابی تغییرات زیست‌شیمیایی

نتیجه‌های به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس دگرگونی‌های زیست‌شیمیایی نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و هم‌چنین میزان تجمع پراکسید هیدروژن در هر دو

مقاوم تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی میزان فعالیت آنزیم روندی افزایش داشت. بیشینه فعالیت آنزیم در ۷۲ ساعت و به میزان ۱/۷۴ برابر در سنجش با زمان صفر افزایش داشت. کمترین فعالیت آنزیم در هر دو رقم در ۹۶ ساعت پس از آلودگی بود که این میزان در رقم مقاوم ۱/۱۶ برابر رقم حساس بود (شکل ۱).

### نتیجه‌های ارزیابی میزان تجمع H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

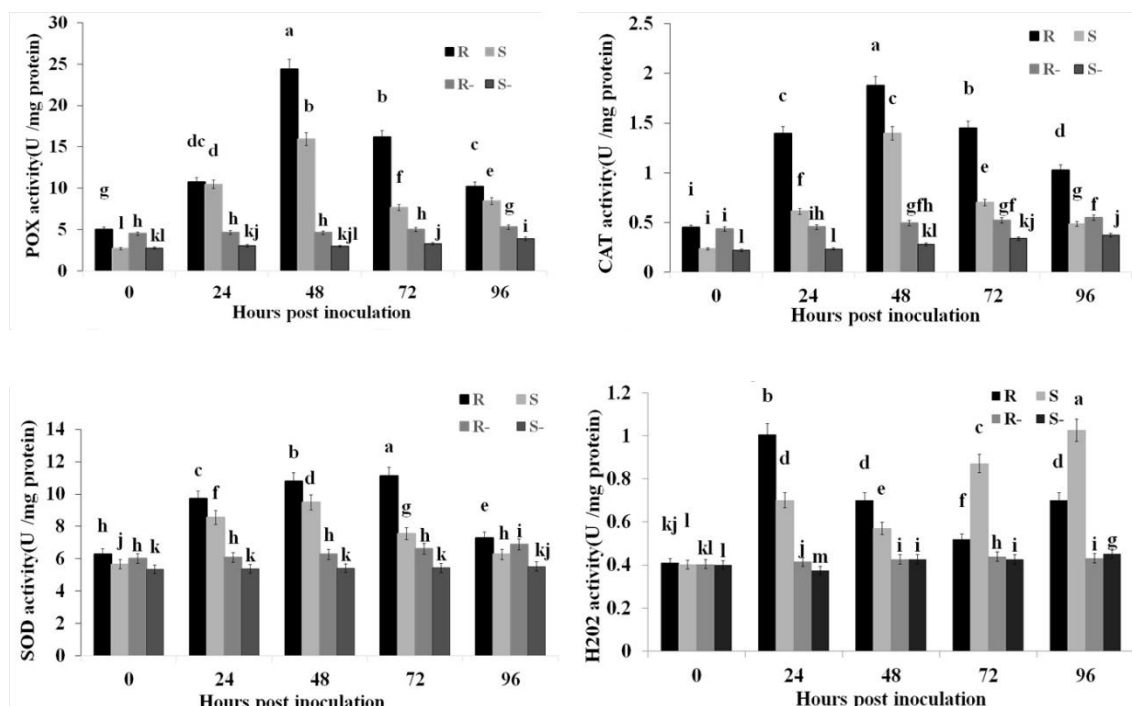
در رقم مقاوم و حساس میزان تجمع H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> پس از مایه‌زنی گیاه با بیمارگر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در رقم مقاوم سطوح H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی گیاه با بیمارگر به‌طور معنی‌داری به بیشترین میزان خود رسید. پس‌ازاین زمان، مقدار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> روند کاهشی داشت. در رقم حساس القای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> پس از مایه‌زنی گیاه با بیمارگر آغاز به افزایش کرد و این میزان در زمان ۹۶ ساعت به بیشینه خود رسید. در رقم حساس و مقاوم در شرایط کنترل دگرگونی‌های معنی‌داری در میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> دید نشد.

### نتیجه‌های فعالیت آنزیم کاتالاز

در این پژوهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم مقاوم به‌طور معنی‌داری در همه زمان‌ها بیشتر از رقم حساس بود. فعالیت این آنزیم در زمان ۲۴ ساعت پس از آلودگی در رقم حساس و مقاوم به ترتیب ۳ و ۲/۶ برابر در سنجش با زمان صفر افزایش نشان داد و سپس در زمان ۴۸ ساعت به بیشترین مقدار خود رسید. از زمان ۴۸ ساعت به بعد فعالیت آنزیم در رقم مقاوم به‌تدریج کاهش یافت درحالی‌که در رقم حساس فعالیت آنزیم به‌شدت کاهش یافت.

### نتیجه‌های فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز

نتیجه‌های فعالیت آنزیم سوپراکسید ديسموتاز نشان دادند که فعالیت آنزیم در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به میزان ۱/۵ برابر در سنجش با زمان صفر در هر دو رقم افزایش داشت. در زمان ۴۸ ساعت در رقم حساس میزان فعالیت به بیشترین میزان خود رسید و از این زمان میزان فعالیت روندی کاهشی داشت. در رقم



شکل ۱. دگرگونی‌های فعالیت آنزیم‌های CAT، POX، SOD و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در برگ گوجه‌فرنگی رقم حساس و مقاوم پس از تلقیح با بیمارگر در فواصل زمانی گوناگون. R: رقم مقاوم، S: رقم حساس، R-: رقم مقاوم شاهد و S-: رقم حساس شاهد (P < 0.01).

Figure 1. Changes in POX, SOD, CAT, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activity of susceptible and resistant tomato genotypes with time after inoculation with *Alternaria solani*. R: resistance cultivar, S: susceptible cultivar R-: resistance control and S-: susceptible control (P < 0.01).

حساس بود و این افزایش در سطح یک درصد معنی‌دار بود. در ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی میزان بیان در رقم حساس در سنجش با زمان صفر ۳ برابر افزایش یافت در حالی که در رقم مقاوم میزان بیان در ۷۲ ساعت پس از آلودگی ۶/۲۹ برابر و در ۹۶ ساعت ۵/۱۳ برابر در سنجش با زمان صفر افزایش داشت. بررسی الگوی بیان ژن *WRKY33* پس از ۴۸ ساعت از آلودگی نشان داد که در رقم حساس مقدار رونوشت‌ها در سنجش با رقم مقاوم به شدت کاهش یافته است.

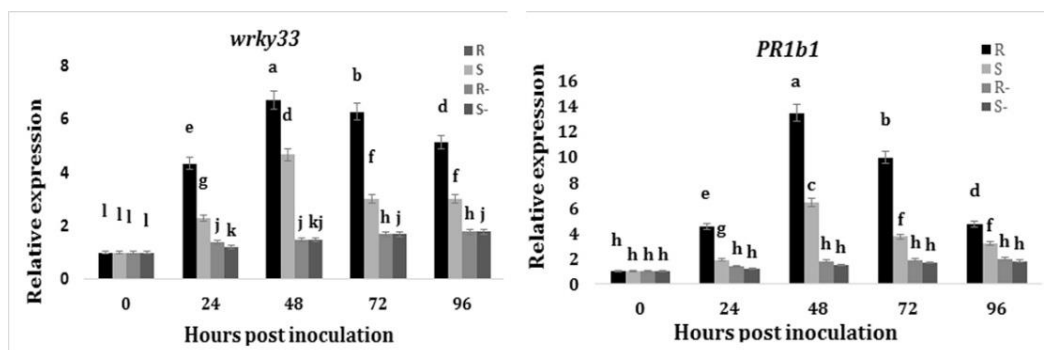
### بحث

به‌کارگیری ارقام مقاوم مهم‌ترین راهکار برای مهار بیماری لکه موی است. در این پژوهش به‌منظور شناسایی منابع مقاومت، واکنش ۱۷ رقم گوجه‌فرنگی در برابر قارچ بیمارگر *A. solani* بررسی شد و ارقام بر پایه شناسه شدت بیماری‌زایی مقاوم‌ترین و حساس‌ترین ارقام گزینش شدند. رقم Super2270 با کمترین آلودگی و CH Flat با بیشترین شناسه آلودگی به ترتیب به‌عنوان مقاوم‌ترین و حساس‌ترین ارقام گزینش شدند. Hajianfar & Zarbakhsh (2006) واکنش ۲۱ رقم و ژنوتیپ گوجه‌فرنگی را در برابر بیماری لکه موی ارزیابی کردند و رقم Super2270 و CH Flat را به ترتیب به‌عنوان ارقام مقاوم و حساس به *A. tenuissima* عامل بیماری لکه موی گوجه‌فرنگی معرفی کردند که با نتیجه‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد.

### نتیجه‌های بیان نسبی ژن *PR1b1* و فاکتور رونویسی *WRKY33*

تجزیه و تحلیل الگوی دگرگونی‌های ژن‌های *WRKY33* و *PR1b1* پس از اعمال آلودگی گیاه در هر دو رقم حساس و مقاوم در سنجش با گیاهان کنترل افزایش یافت که در سطح یک درصد معنی‌دار بود ولی میزان این افزایش در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود. بررسی دگرگونی‌های بیان ژن *PR1b1* در ۲۴ ساعت پس از آلودگی نشان داد که بیان ژن در رقم مقاوم و حساس به ترتیب ۴/۵۸ و ۱/۹۲ برابر در سنجش با گیاه کنترل افزایش داشت و در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیان ۱۳/۵۲ و ۶/۴۸ به ترتیب در رقم مقاوم و حساس در سنجش با زمان صفر به اوج خود رسید (شکل ۲). با گذشت زمان میزان بیان این ژن در هر دو رقم کاهش یافت به‌طوری‌که در رقم مقاوم و حساس در ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی میزان بیان ژن به ترتیب ۹/۹۸ و ۳/۷۵ برابر و در ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی به ۴/۷۵ و ۳/۲۱ برابر در سنجش با زمان صفر رسید.

تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن *WRKY33* نشان داد که بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به ترتیب در رقم مقاوم و حساس ۴/۳۵ و ۲/۳۱ برابر در سنجش با زمان صفر افزایش داشته است. بیشینه بیان ژن در هر دو رقم در ۴۸ ساعت پس از آلودگی بود. ولی هم‌سنجی میزان رونوشت‌ها روشن‌گر آن بود که میزان بیان در رقم مقاوم ۱/۴۳ برابر بیشتر از رقم



شکل ۲. دگرگونی‌های بیان ژن‌های *PR-1* و *WRKY33* در برگ گوجه‌فرنگی رقم حساس و مقاوم پس از تلقیح با بیمارگر در فواصل زمانی گوناگون. r: رقم مقاوم، s: رقم حساس r<sup>-</sup>: مقاومت شاهد و s<sup>-</sup>: حساس شاهد (P ≤ 0.01).

Figure 2. Changes in gene expression of *PR1b1* and *WRKY33* in healthy and infected plants of susceptible and resistant tomato genotypes. r: resistance cultivar, s: susceptible cultivar r<sup>-</sup>: resistance control, and s<sup>-</sup>: susceptible control (P ≤ 0.01).



$H_2O_2$  در طول مراحل آلودگی گوجه‌فرنگی با بیمارگر *A. solani* دانست که در نتیجه موجب گسترش نشانه‌های آلودگی در گیاه می‌شود. در پژوهشی دگرگونی‌های زیست‌شیمیایی در جوهره‌های حساس و مقاوم گیاه گندم در برابر بیمارگر *Pyricularia oryzae* هم‌سنجی شد (Debona et al., 2012). نتیجه‌ها نشان دادند که فعالیت آنزیم کاتالاز در جوهره مقاوم به‌طور فراوانی بیشتر است که روشنگر نقش این آنزیم در مقاومت گیاه در برابر بیمارگر است. در پژوهشی دیگر نشان داده شد که میزان بالای بیمارگر *Fusarium oxysporum* در گوجه‌فرنگی به دلیل کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز بوده که منجر به کاهش کارایی در سامانه‌های آنزیمی مهارکنندگی ROSها شده است (Mandal et al., 2008). در گیاهان گوجه‌فرنگی که با *A. alternata* مایه‌زنی شدند فعالیت کاتالاز در سنجش با گیاهان کنترل افزایش یافت و چنین نتیجه‌گیری شد که آنزیم کاتالاز در واکنش‌های دفاعی و افزایش مقاومت گیاه نقش دارد (Meena et al., 2017) که با نتیجه‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد.

آنزیم SOD از کارآمدترین آنزیم‌های درون سلولی است که نقش مثبتی در مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. در واقع SOD نخستین صف دفاعی در برابر تنش‌های اکسیداتیو است و در دیسموتاز کردن  $O_2^-$  به  $H_2O_2$  و  $O_2$  دخالت دارد (Gill & Tuteja, 2010).  $O_2^-$  در سلول گیاهی تحت تنش زیان جدی به ترکیب‌های سلولی مانند میتوکندری، پراکسیسوزم‌ها، کلروپلاست و آپوپلاست‌ها می‌زند؛ بنابراین افزایش فعالیت آنزیم SOD ترکیب‌های سلول گیاهی را در برابر این آسیب‌ها نگهداری می‌کند و گسترش نشانه‌های بیماری و شدت بیماری‌زایی را کاهش می‌دهد (Youssef et al., 2018). قارچ‌های نکروتروف برای کلونیزه کردن و حمله به بافت گیاهی تولید ROS را در گیاه القا می‌کنند (Nikraftar et al., 2013). بنابراین در این پژوهش فعالیت بالای آنزیم SOD در رقم مقاوم می‌تواند گونه‌ای راهبرد در جهت محدود کردن بیمارگر از راه زدودن ROSهای اضافی باشد. El-Komy et al. (2014) نیز نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در رقم

سامانه دفاعی گیاهان از راه الفاکندنده‌های گوناگونی از جمله حمله بیمارگرها برانگیخته می‌شود و سرانجام مقاومت سیستمیک از راه روش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاه القا می‌شود. القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند GPX، CAT و SOD به‌عنوان یک نشانگر قابل قبول در القای پاسخ‌های دفاعی در نظر گرفته می‌شود (Youssef et al., 2018).

فعالیت اصلی پراکسیداز سنتز لیگنین است که سبب استواری دیواره سلولی و کاهش آسیب‌پذیری سلول در برابر آنزیم‌های قارچی تجزیه‌کننده دیواره سلولی می‌شود. هم‌چنین می‌تواند به‌عنوان یک سد مکانیکی در برابر رخنه بیمارگر عمل کند (Salim et al., 2011; Youssef et al., 2018). هم‌چنین گویکول پراکسیداز می‌تواند به‌طور مستقیم اثرات ویرانگر پراکسید هیدروژن را که در تنش گیاه با بیمارگر به وجود آمده‌اند خنثی کند. در این پژوهش افزایش فعالیت آنزیم گویکول پراکسیداز در رقم مقاوم هم در گیاهان کنترل و هم در گیاهان آلوده بیشتر از رقم حساس بود. می‌توان چنین برداشت کرد که این آنزیم از راه استواری دیواره سلولی و هم‌چنین سم‌زدایی  $H_2O_2$  سبب افزایش مقاومت گیاه شده است. این نتیجه‌ها با نتیجه‌های پژوهشگرانی که مقاومت گیاه در برابر آلترناریا را مرتبط با افزایش میزان فعالیت پراکسیداز گزارش دادند هم‌خوانی دارند (Hameed et al., 2010).

گیاهان با به‌کارگیری سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی دارای یک گنجایش درونی برای از میان بردن اثرات زیان‌بخش ROS هستند. آنزیم کاتالاز مهم‌ترین آنزیم است که سلول گیاه را در برابر زیان اکسیداتیو برآمده از ROSها پشتیبانی می‌کند (Gill & Tuteja, 2010). در این پژوهش افزایش فعالیت کاتالاز از زمان ۰ تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی در رقم مقاوم نشان می‌دهد که شاید این آنزیم در زدودن پس‌مانده  $H_2O_2$  اضافی نقش دارد (Meena et al., 2017). فعالیت کمتر این آنزیم پس از ۴۸ ساعت را می‌توان بخشی از فعالیت دفاعی دانست تا گیاه بتواند غلظت‌های بالای  $H_2O_2$  را تحمل کند. فعالیت پایین‌تر این آنزیم در رقم حساس را می‌توان از برای کارایی کمتر آن در کاهش سطوح

مقاوم باقلا در سنجش با رقم حساس در رویارویی با قارچ بیمارگر *Botrytis fabae* افزایش یافت. در پژوهش اکنون یک افزایش معنی‌دار در میزان تجمع  $H_2O_2$  در رقم حساس و مقاوم پس از آلودگی دیده شد. می‌توان چنین برداشت کرد که یکی از راهکارهای پاسخ دفاعی گوجه‌فرنگی به بیمارگرهای نکروتروف افزایش  $H_2O_2$  است. در رقم مقاوم، تولید بیشتر  $H_2O_2$  در مراحل نخستین برهمکنش برگ گوجه‌فرنگی با بیمارگر می‌تواند از برای نقش ضد میکروبی آن باشد و یا می‌تواند نقش یک پیام را برای راه انداختن دیگر پاسخ‌های دفاعی داشته باشد (Asselbergh *et al.*, 2007). در پژوهشی نشان داده شد که مقاومت گوجه‌فرنگی به *Rhizoctonia solani* به دلیل القای سریع  $H_2O_2$  است (Nikraftar *et al.*, 2013)، که با نتیجه‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد. از طرفی با گذشت زمان بالاترین تجمع  $H_2O_2$  در رقم حساس مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده سطوح بالای ROS در پیوستگی با حساسیت برگ گوجه‌فرنگی به بیمارگر *A. solani* باشد؛ بنابراین می‌توان چنین برداشت کرد که در رقم حساس سطوح بالای  $H_2O_2$  در مراحل پیشروی آلودگی سبب دگرگونی‌های ویرانگری در بافت برگ شده و پیشروی و گسترش قارچ نکروتروف *A. solani* را در بافت مرده آسان‌تر کرده است. در پژوهشی میزان تجمع  $H_2O_2$  در برگ گوجه‌فرنگی رقم حساس بیشتر از رقم مقاوم در رویارویی با بیمارگر *A. solani* (Balbi- Peña *et al.*, 2014) گزارش شد که با نتیجه‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد.

در این پژوهش تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن‌های *PR1b1* و *WRKY33* روشن‌گر افزایش فراوان این ژن‌ها در گیاهان پس از مایه‌زنی با بیمارگر بود؛ به طوری که بیان آنها در گیاهان تا ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی گیاه که زمان اوج حمله بیمارگر است القا شدند و به بیشترین میزان رونوشت خود رسیدند و به تدریج در ساعات پسین کاهش یافتند؛ بنابراین چنین برداشت می‌شود که کارآمد بودن این ژن‌ها یک پیش‌نیاز برای نگهداری نخستین گیاه در برابر بیمارگر *A. solani* است که با نتیجه‌های Upadhyay *et al.* (2014) و

Joshi *et al.* (2016) هم‌خوانی دارد. از سوی دیگر در این پژوهش بیان ژن‌های *PR1b1* و *WRKY33* در رقم مقاوم در همهٔ زمان‌ها به طور معنی‌داری بیشتر از رقم حساس بود؛ بنابراین می‌توان نقش کارآمد این ژن‌ها را در القای مقاومت گوجه‌فرنگی به قارچ *A. solani* نسبت داد و چنین برداشت کرد که القای سریع *WRKY33* و *PR1b1* در برگ گوجه‌فرنگی پس از آلودگی قارچی می‌تواند دلیل این باشد که این ژن‌ها از دست‌اندرکاران بنیادین آغاز پیام‌رسانی و پاسخ دفاعی گیاه در برابر *A. solani* باشند و اینکه این ژن‌ها می‌توانند در گوجه‌فرنگی به عنوان یک نشانگر مطمئن در مقاومت گیاه به بیمارگر لکه موی در نظر گرفته شوند. نقش ضد قارچی *PR1b1* (Sharma *et al.*, 2017) و *WRKY33* (Liu *et al.*, 2014) در القای مقاومت گوجه‌فرنگی به بیمارگرهای نکروتروف گزارش شده است. از طرفی القای نخستین مسیرهای پیام‌رسان و فعال شدن ژن‌های دفاعی نیازمند فاکتورهای رونویسی مربوط به خود هستند تا گیاه توانا به رانش حمله بیمارگر باشد. فاکتورهای رونویسی بیشتر به عناصر عمل *cis* ژن‌های مسئول دفاع پیوسته می‌شوند و نقش بالارزشی را در برابرسازی راه‌های پیام‌رسان در هنگام حمله بیمارگر بازی می‌کنند (Alves *et al.*, 2014). در آراییدوبسیس، گروهی از ژن‌ها از جمله *PR-1* شناسایی شدند که جایگاهی برای پیوستن پروتئین‌های *WRKY* (W-box, TTGAC) دارند و این نشان می‌دهد که این ژن‌ها از راه پروتئین‌های *WRKY* هماهنگ می‌شوند (Tang *et al.*, 2013). نتیجه‌های پژوهش اکنون نیز نشان دادند که با افزایش رونوشت‌های فاکتور رونویسی *WRKY33* بیان ژن دفاعی *PR1b1* نیز افزایش یافته است.

#### نتیجه‌گیری کلی

نتیجه‌های این پژوهش نشان دادند که میزان تجمع پراکسید هیدروژن و آنزیم‌های پراکسیداز، سوپر اکسیددیسموتاز، کاتالاز و هم‌چنین ژن‌های *WRKY33* و *PR1b1* نقش مهمی در مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی به بیمارگر *A. solani* دارند. نتیجه‌ها به خوبی نشان دادند که القا و افزایش به هنگام آنزیم‌ها و ژن‌های مورد

مقاوم باقلا در سنجش با رقم حساس در رویارویی با قارچ بیمارگر *Botrytis fabae* افزایش یافت.

در پژوهش اکنون یک افزایش معنی‌دار در میزان تجمع  $H_2O_2$  در رقم حساس و مقاوم پس از آلودگی دیده شد. می‌توان چنین برداشت کرد که یکی از راهکارهای پاسخ دفاعی گوجه‌فرنگی به بیمارگرهای نکروتروف افزایش  $H_2O_2$  است. در رقم مقاوم، تولید بیشتر  $H_2O_2$  در مراحل نخستین برهمکنش برگ گوجه‌فرنگی با بیمارگر می‌تواند از برای نقش ضد میکروبی آن باشد و یا می‌تواند نقش یک پیام را برای راه انداختن دیگر پاسخ‌های دفاعی داشته باشد (Asselbergh *et al.*, 2007). در پژوهشی نشان داده شد که مقاومت گوجه‌فرنگی به *Rhizoctonia solani* به دلیل القای سریع  $H_2O_2$  است (Nikraftar *et al.*, 2013)، که با نتیجه‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد. از طرفی با گذشت زمان بالاترین تجمع  $H_2O_2$  در رقم حساس مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده سطوح بالای ROS در پیوستگی با حساسیت برگ گوجه‌فرنگی به بیمارگر *A. solani* باشد؛ بنابراین می‌توان چنین برداشت کرد که در رقم حساس سطوح بالای  $H_2O_2$  در مراحل پیشروی آلودگی سبب دگرگونی‌های ویرانگری در بافت برگ شده و پیشروی و گسترش قارچ نکروتروف *A. solani* را در بافت مرده آسان‌تر کرده است. در پژوهشی میزان تجمع  $H_2O_2$  در برگ گوجه‌فرنگی رقم حساس بیشتر از رقم مقاوم در رویارویی با بیمارگر *A. solani* (Balbi- Peña *et al.*, 2014) گزارش شد که با نتیجه‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد.

در این پژوهش تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژن‌های *PR1b1* و *WRKY33* روشن‌گر افزایش فراوان این ژن‌ها در گیاهان پس از مایه‌زنی با بیمارگر بود؛ به طوری که بیان آنها در گیاهان تا ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی گیاه که زمان اوج حمله بیمارگر است القا شدند و به بیشترین میزان رونوشت خود رسیدند و به تدریج در ساعات پسین کاهش یافتند؛ بنابراین چنین برداشت می‌شود که کارآمد بودن این ژن‌ها یک پیش‌نیاز برای نگهداری نخستین گیاه در برابر بیمارگر *A. solani* است که با نتیجه‌های Upadhyay *et al.* (2014) و

بررسی در این پژوهش نقش بسیار مهمی در مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی در برابر بیماری لکه موجی برآمده از *A. solani* داشته است. آنزیم‌ها و ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای قابل‌قبولی برای پیش‌بینی ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی به بیماری‌گر *A. solani* در نظر گرفته شوند.

## REFERENCES

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
2. Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. B., de Souza, G. B., Barros, V. A. & Fietto, L. G. (2014). Transcription factor functional protein-protein interactions in plant defense responses. *Proteomes*, 2(1), 85-106.
3. Adhikari, P., Oh, Y. & Panthee, D. R. (2017). Current status of early blight resistance in tomato: an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2019-2041.
4. Asselbergh, B., Curvers, K., França, S. C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F. & Höfte, M. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology*, 144(4), 1863-1877.
5. Balbi-Peña, M. I., Schwan-Estrada, K. R. F. & Stangarlin, J. R. (2014). Oxidative burst and the activity of defense-related enzymes in compatible and incompatible tomato-*Alternaria solani* interactions. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(5), 2399-2414.
6. Chen, F., Hu, Y., Vannozzi, A., Wu, K., Cai, H., Qin, Y. & Zhang, L. (2018). The WRKY Transcription Factor Family in Model Plants and Crops. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-25.
7. Debona, D., Rodrigues, F. Á., Rios, J. A. & Nascimento, K. J. T. (2012). Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 102(12), 1121-1129.
8. El-Komy, M. H. (2014). Comparative analysis of defense responses in chocolate spot-resistant and-susceptible Faba Bean (*Vicia faba*) cultivars following infection by the necrotrophic fungus *Botrytis fabae*. *The plant pathology journal*, 30(4), 355-366.
9. Figueiredo, A., Monteiro, F., Fortes, A. M., Bonow-Rex, M., Zyprian, E., Sousa, L. & Pais, M. S. (2012). Cultivar-specific kinetics of gene induction during downy mildew early infection in grapevine. *Functional and Integrative Genomics*, 12(2), 379-386.
10. Gill, S. S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
11. Giannopolitis, C. N. & Reis, S. K. (1997). Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59, 309-314.
12. Grigolli, J. F. J., Kubota, M. M., Alves, D. P., Rodrigues, G. B., Cardoso, C. R., Silva, D. J. H. D. & Mizubuti, E. S. G. (2011). Characterization of tomato accessions for resistance to early blight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11(2), 174-180.
13. Hajianfar, R. & Zarbakhsh, A. (2006). Evaluation of reaction of some cultivars and tomato genotypes to *Alternaria tenuissima* the causal agent of ring spot. *Journal Agriculture Science*, 4(13), 61-74. (in Farsi)
14. Hameed, A., Akhtar, K. P., Saleem, M. Y. & Asghar, M. (2010). Correlative evidence for peroxidase involvement in disease resistance against *Alternaria* leaf blight of tomato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(6), 1171-1176.
15. Jain, D. & Khurana, J. P. (2018). Role of Pathogenesis-Related (PR) proteins in plant defense mechanism. In *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 265-281). Springer, Singapore.
16. Joshi, R. K., Megha, S., Rahman, M. H., Basu, U. & Kav, N. N. (2016). A global study of transcriptome dynamics in canola (*Brassica napus* L.) responsive to *Sclerotinia sclerotiorum* infection using RNA-Seq. *Gene*, 590(1), 57-67.
17. Lin, C. C. & Kao, C. H. (1999). NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil*, 216(1), 147-153.
18. Lubaina, A. S. & Murugan, K. (2012). Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between sesame (*Sesamum indicum* L.) in response to *Alternaria sesami*. In *Prospects in Bioscience: Addressing the Issues* (pp. 243-250). Springer, India.
19. Mandal, S., Mitra, A. & Mallick, N. (2008). Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1), 56-61.
20. Martinez, B., Bernal, A., Perez, S. & Muniz, Y. (2002). Pathogenic variability of *Alternaria solani* Sor. isolates. *Revista de Protection Vegetal*, 17(1), 45-53.
21. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.

22. Meena, M., Zehra, A., Dubey, M. K., Aamir, M., Gupta, V. K. & Upadhyay, R. S. (2016) Comparative Evaluation of Biochemical Changes in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Infected by *Alternaria alternata* and Its Toxic Metabolites (TeA, AOH, and AME). *Front Plant Science*, 7, 1408.
23. Mukherjee, A. K., Horwitz, B. A., Gepstein, S. & Lev, S. (2009). A compatible interaction of *Alternaria brassicicola* with *Arabidopsis thaliana* ecotype DiG: evidence for a specific transcriptional signature. *BMC Plant Biology*, 9(1), 31-42.
24. Nikraftar, F., Taheri, P., Rastegar, M. F. & Tarighi, S. (2013). Tomato partial resistance to *Rhizoctonia solani* involves antioxidative defense mechanisms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81, 74-83.
25. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45-51.
26. Ray, S., Mondal, S., Chowdhury, S. & Kundu, S. (2015). Differential responses of resistant and susceptible tomato varieties to inoculation with *Alternaria solani*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 90, 78-88.
27. Salim, A. P., Saminaidu, K., Marimuthu, M., Perumal, Y., Rethinasamy, V., Palanisami, J. R. & Vadivel, K. (2011). Defense responses in tomato landrace and wild genotypes to early blight pathogen *Alternaria solani* infection and accumulation of pathogenesis-related proteins. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(12), 1147-1164.
28. Shahbazi, H., Aminian, H., Sahebani, N. & Halterman, D. A. (2010). Biochemical evaluation of resistance responses of potato to different isolates of *Alternaria solani*. *Phytopathology*, 100(5), 454-459.
29. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 1, 1-26.
30. Shi, H., Cui, R., Hu, B., Wang, X., Zhang, S., Liu, R. & Dong, H. (2011). Overexpression of transcription factor AtMYB44 facilitates Botrytis infection in Arabidopsis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 90-95.
31. Shinde, B. A., Dholakia, B. B., Hussain, K., Aharoni, A., Giri, A. P. & Kamble, A. C. (2018). *WRKY1* acts as a key component improving resistance against *Alternaria solani* in wild tomato, *Solanum arcanum* Peralta. *Plant Biotechnology Journal*, 16(8), 1502-1513
32. Tang, Y., Kuang, J. F., Wang, F. Y., Chen, L., Hong, K. Q., Xiao, Y. Y., and Chen, J. Y. (2013). Molecular characterization of PR and WRKY genes during SA- and MeJA-induced resistance against *Colletotrichum musae* in banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 79, 62-68.
33. Taheri, P., Irannejad, A., Goldani, M. & Tarighi, S. (2014). Oxidative burst and enzymatic antioxidant systems in rice plants during interaction with *Alternaria alternata*. *European Journal of Plant Pathology*, 140(4), 829-839.
34. Upadhyay, P., Rai, A., Kumar, R., Singh, M. & Sinha, B. (2014). Differential expression of pathogenesis related protein genes in tomato during inoculation with *Alternaria solani*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 5(1), 752-753.
35. Youssef, S. A., Tartoura, K. A. & Greash, A. G. (2018). *Serratia proteamaculans* mediated alteration of tomato defense system and growth parameters in response to early blight pathogen *Alternaria solani* infection, *Physiological and Molecular Plant Pathology*. (in Press)