

## تأثیر آلودگی به واریانت ملایم ویروئید غده دوکی سیب زمینی بر پروفیل متابولیکی رقم راتگرز گوجه‌فرنگی\*

### EFFECT OF INFECTION BY MILD VARIANT OF POTATO SPINDLE TUBER VIROID ON METABOLIC PROFILES OF TOMATO CULTIVAR 'RUGERS'

سید علی اکبر باقریان<sup>۱</sup>، کرامت‌اله ایزدپناه<sup>۱</sup>، حبیب‌الله حمزه زرقانی<sup>۱\*</sup>، محمد جواهری<sup>۱</sup>  
و یونس قاسمی<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۷)

#### چکیده

ویروئیدها به عنوان کوچک‌ترین عوامل بیمارگر گیاهی متشکل از آر آن ۱ حلقوی تک لا بوده و بدون داشتن ژنوم رمزگذار، قادرند در میزبان گیاهی خود تکثیر شوند. به رغم مطالعات زیاد، هنوز تصویر روشنی از سازوکار بیماری‌زایی ویروئیدها به دست نیامده است. در مطالعه حاضر، پروفیل متابولیکی گوجه‌فرنگی رقم راتگرز آلوده به واریانت ملایم ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی (PSTVd) مشخص و با گیاه مایه‌زنی شده با بافر مقایسه شده است. بدین منظور سه برگچه انتهایی برگ سوم گیاهان گوجه‌فرنگی به صورت مکانیکی با سی دی آن ای ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی مایه‌زنی شد و ۱۹ روز بعد، نمونه‌برداری از برگ هشتم این گیاهان به انجام رسید. متابولیت‌ها استخراج و به کمک دستگاه GC/MS شناسایی و اندازه‌گیری شده و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که در سطح آماری P ≤ 0.2، تعداد ۴۰ متابولیت نسبت به شاهد خود تغییرات معنی‌داری نشان دادند که نتیجه تغییرات در چهارده مسیر متابولیکی در سلول‌های گیاه بود. مسیرهای تغییر یافته در برگ‌های گوجه‌فرنگی آلوده به PSTVd شامل این موارد بودند: پنج مسیر مرتبط با ساخت موم و کوتین، چهار مسیر تولید ترکیبات دفاعی، سه مسیر ساخت هورمون، یک مسیر تولید انرژی و یک مسیر تخریب کلروفیل. با توجه به پیچیدگی پاسخ‌های گیاه به آلودگی به ویروئید، با استفاده از رویکرد متابولومیکس، برهمکنش ویروئید-میزبان بررسی و تغییرات در سطح مسیرهای بیوشیمیایی گیاه مورد بحث قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی، کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی، تعیین پروفیل متابولیک، برهمکنش ویروئید-گیاه

\*: بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

\*\* :مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: [zarghani@shirazu.ac.ir](mailto:zarghani@shirazu.ac.ir)

۱. به ترتیب دانشجوی سابق دکتری، استاد و استادیاران بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۲. استاد بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، شیراز

## مقدمه

ویروئیدها کوچک‌ترین عوامل بیمارگر گیاهی‌اند که تا کنون شناخته شده‌اند و با وجود فقدان چارچوب خوانش (ORF) در ژنومشان قادر به تغییر بیان ژن‌های میزبان از طریق ابزاری غیر از پروتئین‌های رمزگذاری شده هستند (Qi & Ding 2003). تغییرات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی مرتبط با آلودگی ویروئیدی به خوبی مطالعه شده‌اند. در سطح سلولی، تغییر دیواره‌های سلولی و تخریب غشای سیتوپلاسمی از علائم بارز ایجاد شده توسط این بیمارگرهاست (Itaya et al. 2002, Tessitori et al. 2007). آلودگی ویروئیدی در سطح سلولی با تغییراتی در ساختمان دیواره‌های سلولی، کلروپلاست‌ها و سازه‌های غشادار در سیتوپلاسم (Plasmalemmasome) و تجمع نقاط پر چگال همراه است (Diener 1987). چگونگی ایجاد این پاسخ‌های قوی میزبان به این عوامل کوچک فاقد پروتئین، توسط محققین بسیاری جستجو شده است. چندین مطالعه مروری جدید، بیولوژی مولکولی برهمکنش ویروئید/میزبان را بررسی کرده‌اند (Ding 2009, Flores et al. 2009, Gomez et al. 2005).

طبقه‌بندی اخیر ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses)، ۳۱ گونه شناسایی شده ویروئیدها را در دو تیره *Pospiviroidae* که اعضای آن دارای پنج دامانه عملکردی/ساختاری حفاظت شده هستند و در هسته همانندسازی می‌کنند و تیره *Avsunviroidae* که اعضای آن فعالیت ریبوزیمی (Ribozyme activity) داشته و در کلروپلاست همانندسازی می‌کنند، قرار داده است. ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی (PSTVd) عضو

تیره *Pospiviroidae*، اولین ویروئیدی بود که کشف شد (Diener 1971). حتی پیش از آن که توالی کامل نوکلئوتیدی PSTVd مشخص شود (Gross et al. 1978)، مطالعات انگشت‌نگاری آر آن<sup>۱</sup> نشان دادند که وجود کمترین تفاوت نوکلئوتیدی بین جدایه‌های مختلف این ویروئید باعث تغییر در شدت علائم تولیدی در ارقام حساس گوجه‌فرنگی می‌گردد (Dickson et al. 1979). در ادامه تحقیقات وسیعی از طریق تعیین توالی و ایجاد جهش در ژنوم ویروئیدها انجام شد (Sano et al. 1992, Schnolzer et al. 1985, Qi & Ding 2003, Zhong et al. 2008) و مشخص شد که بیماری‌زایی در PSTVd توسط چندین منطقه خاص از ژنوم ویروئید (مثل لوپ E (Zhong et al. 2006)) کنترل می‌شود که برخی از آنها در خارج از دامنه از پیش معرفی شده بیماری‌زایی (P) (Keese & Symons 1985) قرار دارند. روش (های) القای بیماری توسط این عوامل هنوز روشن نشده است ولی همانندسازی ویروئید در گوجه‌فرنگی یکی از سیستم‌های آزمایشگاهی پر استفاده جهت مطالعه بیماری‌زایی ویروئیدها محسوب می‌شود.

کی و دینگ در سال ۲۰۰۳ (Qi & Ding 2003) همبستگی مثبتی بین کوتولگی گیاه آلوده به PSTVd و کاهش بیان *LeExp2* (ژنی که با تولید یک پروتئین خاص، رشد سلول‌های جوان را از طریق نرم کردن دیواره‌های سلولی، تسهیل می‌کند) مشاهده نمودند. شاید مهم‌ترین تغییرات درون سیتوپلاسمی ناشی از آلودگی‌های ویروئیدی، اختلال در ساختار کلروپلاست و به ویژه غشاهای تیلاکوئید و تخریب گرانای باشد (Rodio et al. 2007).

به آلودگی (مایه زنی به صورت مکانیکی، ده روز پس از کاشت) به CEVd که برهمکنشی فاقد نکروز است، تحریک می‌گردد. تولید این متابولیت یک روز پس از ظهور علائم (علائم ده روز پس از مایه‌زنی مشاهده شده است) در این گیاهان قابل ردیابی است و پنج روز پس از ظهور علائم به حداکثر مقدار خود می‌رسد، در حالی که در آلودگی خیار و گوجه‌فرنگی به *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* همراه با نکروز است، تولید gentisic acid تحریک نمی‌شود. بر این اساس پیشنهاد شده که احتمالاً gentisic acid یک پیام دفاعی تحریک شده توسط CEVd است (Belles et al. 2006, Fayos et al. 2006). البته از آنجا که تحریک تولید این پیام پس از ایجاد علائم صورت می‌گیرد، پیشنهاد این پیام به عنوان پیام حساسیت، منطقی به نظر نمی‌رسد (Baker et al. 2010). علاوه بر این لویز-گرسا و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به CEVd (در هفته‌های دوم و چهارم پس از مایه‌زنی) با استفاده از روش طیف‌سنج رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR) نشان دادند که تولید مقادیر کمی از متابولیت‌های اولیه مثل گلوکز و مالیک اسید (malic acid) توسط این آلودگی تحریک می‌گردد (López-Gresa et al. 2010). بیکر و همکاران در سال ۲۰۱۰ تغییرات متابولیت‌های فنولی آپوپلاست برگ‌های مختلف (برگ‌های شماره ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱) گوجه‌فرنگی که در مرحله ۳-۴ برگی به صورت مکانیکی با نسخه‌های آر آن‌ای مربوط به ژنوم کامل PSTVd، مایه‌زنی شده بودند را با استفاده از روش HPLC-UV (high-performance liquid chromatography with UV detection) (در هفته‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ پس از مایه‌زنی)

در یکی از جدیدترین مطالعات انجام شده، محققین با تلفیق فن‌آوری ریزآرایه و تعیین توالی وسیع آر آن<sup>۱</sup> نشان دادند که بیان بیش از نیمی از ده هزار ژن مطالعه شده در رقم حساس راتگرز در اثر آلودگی به جدایه‌ای از PSTVd تغییر می‌کند و در این میان کاهش بیوزن کلروپلاست و تغییرات ملموس در پیامدهی هورمون‌های مختلف و به ویژه اسید جیبرلیک در گیاهان حساس و متحمل گوجه‌فرنگی، مشخص و قابل تفکیک بوده است (Owens et al. 2012).

متابولومیکس (Metabolomics) به آنالیز جامع همه متابولیت‌های موجود در یک بافت یا سلول گفته می‌شود (Sumner et al. 2003) و این امکان را فراهم می‌آورد که تعداد زیادی از متابولیت‌ها به سرعت و به دقت قابل شناسایی و اندازه‌گیری باشند و از این طریق اطلاعات مهمی از برهمکنش میزبان/بیمارگر فراهم آید (López-Gresa et al. 2012). تا کنون در میان ویروئیدها، مطالعه دینامیک متابولیت‌های ثانویه، تنها در مورد گیاهان آلوده به ویروئید آگزوکورتیس مرکبات (CEVd) و PSTVd (هر دو از تیره *Pospiviroidae*) به انجام رسیده است. بررسی اسانس (Essential oil) برگ‌های پنج تا هفت ماهه و پوست میوه‌های سه ماهه‌ی مرکبات ۱۲ ساله آلوده به CEVd به کمک کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنج جرمی (GC/MS) نشان داد که آلودگی به CEVd، میزان این ترکیبات را در برگ کاهش می‌دهد و نوع این ترکیبات را در پوست میوه نسبت به برگ‌های سالم تغییر می‌دهد (Vekari et al. 2002).

بئز و همکاران (Belles et al. 1999) نیز گزارش کردند که در خیار و گوجه‌فرنگی، تولید gentisic acid (2,5-dihydroxybenzoic acid) در پاسخ

این هدف، بایستی انجام پذیرد. بررسی عمومی پروفیل متابولیت‌ها با استفاده از آنالیزهای مبتنی بر GC/MS به عنوان یکی از قوی‌ترین روش‌های تشخیص مکانیسم‌های متابولیکی (از جمله بیماری‌زایی)، شناخته می‌شود (Tang et al. 2009). از آنجا که سیستم گوجه فرنگی - PSTVd یکی از بهترین سیستم‌های بررسی بیماری‌های ویروئیدی است، در این مطالعه پروفیل متابولیکی حاصل از برهمکنش واریانت ملایم PSTVd و رقم حساس راتگرز، گوجه‌فرنگی به کمک دستگاه GC/MS، مورد کنکاش قرار گرفته است تا قدمی هر چند کوچک در راه روشن‌تر شدن مکانیسم بیماری‌زایی ویروئیدها و مسیرهای درگیر در زمان وقوع آلودگی برداشته شود.

## مواد و روش‌ها

### ساخت همسانه عفونت‌زای ویروئید

شواهد حاکی از آن است که نسخه‌های تک پار (مونومر) ژنوم ویروئید بدون داشتن هیچ پیشبری، قادر به تکثیر در گیاه میزبان می‌باشند (Candresse et al. 1990). دی‌ان‌ای تک پار واریانت ملایم PSTVd (رس شماره: M93685) توسط شرکت بیومتیک (Biomatik Corp., Cambridge, Ont., Canada) ساخته شده و در داخل تنها سایت برشی آنزیم SmaI در پلاسمید pUC19 قرار گرفته است. میکروتیوب حاوی پلاسمید نوترکیب دریافت شده از شرکت بیوتیک، سانتریفوژ و محتویات آن در آب فاقد نوکلئاز به حالت تعلیق در آورده شد (غلظت نهایی: 10 ng/μl). از آنجا که سی دی ان‌ای خطی تهیه شده از PSTVd توانایی آلوده‌کنندگی دارد (Gora et al. 1994)، قطعات کامل ژنوم ویروئید از روی الگوی ارسال شده توسط شرکت بیومتیک به روش گرا و

بررسی نموده و مشخص کردند که متابولیت‌های موجود در برگ‌هایی از گیاه آلوده که ویروئید در آنها وجود دارد و تکثیر می‌شود، تغییر می‌کند. علاوه بر این نشان داده شد که بیشتر ترکیبات فنولی آپوپلاست برگ‌های مذکور کاهش می‌یابد، هرچند که مقدار برخی از این ترکیبات زیاد می‌شود. بیکر و همکاران نشان دادند که تغییر ترکیب متابولیت‌های آپوپلاست، به زمان و مراحل رشدی برگ وابسته است (Baker et al. 2010).

روش تجزیه‌ای GC/MS تاریخچه‌ای طولانی در آنالیزهای هدفمند و یا عمومی متابولیت‌های موجودات مختلف دارد (Oursel et al. 2007, Lee et al. 2007, Wu et al. 2009). البته از آنجا که GC/MS فقط برای آنالیز ترکیبات با قابلیت فرار است، انجام عملیات مشتق‌سازی (Derivatization) پیش از تزریق نمونه به منظور فرارسازی متابولیت‌های مقاوم‌تر به حرارت، در نمونه‌های گیاهی لازم می‌باشد (Qiu et al. 2007, Duan et al. 2009, Peris-Vicente et al. 2006, Gao et al. 2009).

گزارش‌های معدودی در خصوص تغییرات متابولیکی برهمکنش ویروس و یا ویروئید/گیاه به چاپ رسیده‌اند و تنها دو مطالعه جامع در مورد پروفیل متابولیکی توتون و گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس موزائیک توتون (TMV) (Choi et al. 2006 و López-Gresa et al. 2012) وجود دارد و هنوز هیچ مطالعه‌ای در مورد پروفیل متابولیکی گیاهان آلوده به ویروئیدها ارائه نشده است.

با وجود مطالعات گسترده، هنوز مکانیسم (های) بیماری‌زایی ویروئیدها ناشناخته مانده است. واضح است که آلودگی گیاه به ویروئید مجموعه‌ای پیچیده از واکنش‌های میزبان را تحریک می‌کند و مطالعات بیشتری از طریق روش‌های بهبود یافته و فراگیرتر جهت نیل به

### مایه‌زنی مکانیکی بوته‌ها و نمونه‌برداری

پس از جوانه‌زنی و انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی یک و نیم کیلوگرمی و با رسیدن به مرحله ۳-۴ برگگی (گیاهان بیست روزه)، ۲ میکروگرم از قطعات ویروئیدی استخراج شده از ژل در ۱۰ میکرولیتر بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار، pH ۷، حل و با استفاده از پودر کاربوراندوم و به صورت مکانیکی (Manzer & Merriam 1961) به برگچه انتهایی برگ حقیقی شماره ۳ گیاهان گوجه‌فرنگی ۲۰ روزه مایه‌زنی شد. چند دقیقه پس از مایه‌زنی، برگ مایه‌زنی شده با مقدار کمی آب مقطر شسته شد (Allam et al. 2005). گروهی از گیاهان شاهد با بافر نمونه، به روش فوق مایه‌زنی و مورد بررسی قرار گرفتند. نوزده روز پس از مایه‌زنی، برگ هشتم گیاهان شاهد و آلوده گوجه‌فرنگی (بر اساس تحقیقی که توسط آونز و همکاران در سال ۲۰۱۲ و همچنین بیکر و همکاران در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت (Owens et al. 2012 و Baker et al. 2010)، جهت استخراج متابولیت و آنالیز توسط دستگاه GC/MS نمونه‌برداری شد. برای کاهش واکنش‌های آنزیمی، برگ‌های برداشت شده، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند و توسط هاون، آسیاب و بلافاصله جهت استخراج متابولیت مورد استفاده قرار گرفتند. دو هفته پس از این نمونه‌برداری، مجدداً نمونه‌ای از همین گیاهان برداشته شد و جهت حصول اطمینان از تکثیر ویروئید در گیاهان آلوده و عدم وجود ویروئید در گیاهان شاهد، عملیات استخراج آر. آن، ترانویسی معکوس، آزمون زنجیره‌ای پلیمرز و تعیین توالی به انجام رسید.

### استخراج متابولیت

همکاران (Gora et al. 1994) و با استفاده از آنزیم دی‌ان‌ا۱ پلیمرز (Fermentas) Pfu و آغازگرهای اختصاصی P1 (GGGGATCCCTGAAGCGC) و P2 (GGGGAAACCTGGAGCGA)، تکثیر شد. محصول واکنش به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد، در بافر TBE (۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم بوریک اسید و ۰/۷۳ گرم EDTA در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH ۸/۳) بررسی و با استفاده از BIONEER) AccuPrep® Gel Purification Kit) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده تیمار و دی‌ان‌ای ویروئیدی از آن جدا شد و پس از تعیین غلظت به کمک دستگاه نانودراپ، جهت مایه‌زنی مکانیکی برگچه انتهایی برگ سوم گیاهان گوجه‌فرنگی ۲۰ روزه مورد استفاده قرار گرفت.

### کشت و پرورش گیاهان

بذور گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) رقم راتگرز از West Coast Seeds Ltd. کانادا تهیه گردید. چند روز پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۵ سانتیمتر (یک و نیم کیلوگرمی) و حاوی مخلوطی از پیت، پرلیت و ورمی‌کولایت (۱:۱:۱) منتقل شدند. برای هر تیمار و هر شاهد سه بوته به عنوان تکرارهای بیولوژیکی در نظر گرفته شد و آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی تنظیم گردید. همه گیاهان در اتاقک رشد با شرایط کنترل شده (۱۶ ساعت روشنایی ۳۵۰۰ لوکس (با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و ۸ ساعت تاریکی (با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد)) نگهداری شده و در فواصل ۷ روزه با ده میلی‌لیتر از محلول یک درصد کود (Plant Products Co. Ltd., Ontario, Canada) 20N-20P-20K تغذیه شدند.

از آنجا که عمل مشتق‌سازی مستقیم قندهائی مثل فروکتوز، به دلیل حلقوی شدن این قندها، باعث اختلال در تشخیص هگزوزها (hexoses) می‌شود، پس از خشک شدن یک میلی‌لیتر باقیمانده از بخش قطبی (توسط دستگاه تغلیظ کننده)، عمل متوکسی آمین‌دار کردن (Methoxiamination) روی آن به انجام رسید. این عملیات با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از محلول ۲۰ میلی گرم methoxiamine hydrochloride در یک میلی‌لیتر pyridine در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۹۰ دقیقه (در داخل حمام آب گرم شیکردار) صورت پذیرفت (Roessner et al. 2000).

از آنجا که بیشتر متابولیت‌ها غیر فرار هستند، عمل مشتق‌سازی با اضافه کردن ۸۰ میکرولیتر N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه (در داخل حمام آب گرم شیکردار، Fiehn et al. 2000) به انجام رسید. در پایان، ۰/۲ میکرولیتر از بخش قطبی با نسبت ۱:۱ در داخل دستگاه GC تزریق شد.

پس از خشک شدن ۷۰۰ میکرولیتر باقیمانده از بخش غیرقطبی توسط دستگاه تغلیظ کننده، ۹۰۰ میکرولیتر کلروفرم و یک میلی‌لیتر متانول حاوی ۳٪ حجمی H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> به آن اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در داخل حمام آب گرم شیکردار قرار داده شد. پس از این مرحله، چهار میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و سپس در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفوژ شد. فاز آبی حاصل حذف و عملیات شستشو ۲ مرتبه دیگر تکرار شد. فاز حاوی کلروفرم با کمک سولفات سدیم بی‌آب (Anhydrous sodium sulfate) خشک گردید و روشنین به لوله‌های شیشه‌ای منتقل و با استفاده از

نوزده روز پس از مایه‌زنی، برگ هشتم گیاهان گوجه‌فرنگی جهت استخراج متابولیت به روش فین و همکاران (Fiehn et al. 2000) با انجام تغییراتی، برداشت شد. بدین منظور ۳۰ میلی‌گرم بافت یخ - خشک شده و یا ۳۰±۳۰ میلی‌گرم بافت گیاهی تازه (خرد شده در ازت مایع) در ۱/۴ میلی‌لیتر متانول ۱۰۰٪ به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. اضافه کردن متانول، واکنش‌های آنزیمی و در نتیجه تغییرات احتمالی در متابولیت‌ها را پس از برداشت نمونه متوقف می‌کند. ۵۰ میکرولیتر محلول ریبتول (ribitol) (به عنوان استاندارد داخلی فاز قطبی) با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب، ۵۰ میکرولیتر nonadecanoic acid methyl ester (به عنوان استاندارد داخلی فاز غیرقطبی) با غلظت ۲ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر CHCl<sub>3</sub> و ۵۰ میکرولیتر آب دی‌یونیزه شده (de-ionized) به مخلوط قبلی اضافه و pH بین ۵ و ۶ تنظیم شد. مخلوط به دست آمده در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه به هم خورد و در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه، سانتریفوژ و روشنین نگهداری و به رسوب ۰/۷۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به هم زده شد و در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه، سانتریفوژ شد و رسوب حذف گردید. روشنین‌های این سانتریفوژ کردن و سانتریفوژ کردن قبل، از میکروفیلتر ۰/۲۲ میکرونی (با کمک سانتریفوژ کردن در ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲ دقیقه) عبور داده شد و پس از اضافه کردن ۱/۴ میلی‌لیتر آب مقطر و ورتکس کامل، در ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفوژ گردید. مقدار ۲/۸ میلی‌لیتر از روشنین (بخش قطبی) و ۸۰۰ میکرولیتر از ته نشین (بخش غیرقطبی) برای انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

ابتدا به فرمت mzML و یا mzXML تبدیل و سپس به کمک برنامه MetAlign (Version 041012) به فرمت عمومی "net.cdf" در آمدند. انجام این تبدیل به خاطر سازگاری بیشتر داده‌ها با نرم افزارهای مورد استفاده در چنین مطالعاتی صورت پذیرفت. در اولین مرحله، اختلالات موجود در پس‌زمینه و تغییرات تدریجی اشتباه در کروماتوگرام‌ها توسط مجموعه نرم افزارهای موجود (مانند MetAlign) اصلاح شد (Tikunov et al. 2005).

خط پایه (baseline) نیز به کمک نرم افزار Masshunter Qualitative Analysis (=MQA) (Agilent Technologies, Inc. 2009, Version B.03.01 Build 3.1.346.0) تصحیح شد. پس از انجام این اصلاحات، مجدداً با کمک نرم افزار MQA نقاط اوج یا پیک مربوط به هر یک از ترکیبات از دیگر نقاط اوج، جدا شد و ترکیباتی که با هم از GC خارج شده بودند، از هم تفکیک و زمان نگهداری (Retention time) هر ترکیب و طیف جرمی آن برای تطبیق با پایگاه‌های اطلاعاتی NIST08.L و یا Wiley275.L به کار رفت. شبیه‌ترین طیف جرمی به یک طیف جرمی، از طریق جستجو در این دو پایگاه اطلاعاتی، به صورت تجربی تعیین شد. پیک به دست آمده برای هر طیف جرمی با ده مورد از مشابه‌ترین انتخاب‌های پایگاه‌های اطلاعاتی NIST و یا Wiley و با توجه به زمان نگهداری آنها، مقایسه و به صورت تجربی نام ترکیب مشخص شد.

گزارش آنالیز توسط نرم افزار MQA به صورت یک فایل متنی ذخیره و در یک صفحه گسترده نرم افزار MS-EXCEL وارد و مجدداً با فرمت "\*.xls" ذخیره شد. در این نرم افزار با استفاده از رویه Pivot Table نقاط اوج دارای نسبت سیگنال به اختلال (signal to noise ratio) کمتر از ۲۰ و یا متغیر در تکرارهای همان تیمار، حذف

دستگاه تغلیظ کننده حجم آن به ۸۰ میکرولیتر رسانده شد و به آن ۱۰ میکرولیتر pyridine و ۱۰ میکرولیتر MSTFA اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل حمام آب گرم شیکردار قرار گرفت. در پایان، ۰/۲ میکرولیتر از بخش غیرقطبی با نسبت ۱:۱ در داخل دستگاه GC تزریق شد (Hamzehzarghani et al. 2007).

### آنالیز توسط GC/MS

دو دهم میکرولیتر از هر یک از فازهای آب-متانول و یا کلروفرم به صورت جداگانه در ورودی دستگاه Agilent 7000 Triple Quadrupole GC/MS تزریق شد. در زمان تزریق دمای ورودی دستگاه، ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود و از ستون موئین از نوع DB1 (غیر قطبی) با ۱۰۰ درصد Dimethylpolysiloxane، ضخامت دیواره ۰/۳۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و طول ۲۴ متر) و گاز بی اثر هلیوم به عنوان حامل (سرعت جریان برابر با یک میلی‌لیتر در دقیقه) استفاده شد. دمای آوه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه ثابت ماند و سپس به ازای هر دقیقه ۵ درجه سانتی‌گراد به دمای آن اضافه و پس از رسیدن به دمای ۳۱۰ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در این دما ثابت ماند. پس از یونیزه شدن گاز، دامنه ۴۵ تا ۶۰۰ جرم بر یون (بار الکتریکی) (m/z) توسط واکاوی Triple Quadrupole، با سرعت ۱/۱ طیف در ثانیه تشخیص داده شد.

### تعیین پروفیل متابولیتی

داده‌های خروجی از دستگاه GC/MS به صورت فایل‌هایی با فرمت "\*.d" بودند که توسط نرم‌افزار msConvert (ProteoWizard Library, Version 3.0.4309) program

شدند. پروفیل متابولیت‌های نمونه شامل نام‌ها، زمان‌های نگهداری و مساحت زیر هر یک از نقاط اوج (مقدار هر متابولیت نسبت به مجموع یون ورودی) بود. در نهایت مقایسه فراوانی نسبی هر پیک بین نمونه‌های مختلف با تقسیم آنها بر فراوانی استانداردهای داخلی، تغییر مقیاس داده شد و برای تجزیه و تحلیل‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. سپس متابولیت‌های تکراری و غیر تکراری در تیمارهای مختلف به همراه سایر مشخصات، به ترتیب جهت انجام آنالیزهای کمی و کیفی از هم جدا و در فایل‌های جداگانه ذخیره شدند.

داده‌های به‌دست آمده از فراوانی پروفیل متابولیتی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS (SAS Institute Inc., 1999) و با در نظر گرفتن معنی‌داری در سطح ۰/۲، تحت تجزیه واریانس (ANOVA) قرار گرفتند. متابولیت‌های کمی دارای تفاوت معنی‌دار آماری به همراه متابولیت‌های کیفی، جهت بررسی‌های بعدی به مرحله بعد راه یافتند.

در آخرین مرحله، با استفاده از نرم‌افزار 17.1 Pathway Tools (Caspi et al. 2012)، مسیرهای مرتبط با متابولیت‌های دارای تغییرات معنی‌دار، مشخص گردید و داده‌های گزارش شده توسط آونز و همکاران (Owens et al. 2012) از فایل ضمیمه مقاله ایشان، اخذ و از طریق وارد کردن شماره مرتبط با منبع اطلاعاتی آرآبیدوپسیس (Arabidopsis Information Resource, TAIR) در نرم‌افزار MetaCyc DB، تطابق نتایج این دو مطالعه، بررسی شد.

## نتایج

بیست روز پس از مایه‌زنی گیاهان ۳-۴ برگی رقم راتگرز گوجه‌فرنگی با واریانت ملایم PSTVd، به تدریج علایم در گیاهان مایه‌زنی شده با ویروئید نمایان شد. علایم مشاهده شده شامل کوتولگی، روخمش و بد شکلی برگ و رشد جوانه‌های جانبی بود (شکل ۱- A تا D). وجود ویروئید در گیاهان مایه زنی شده، پس از انجام آزمون زنجیره‌ای پلیمرز و با رؤیت باند ویروئیدی با اندازه حدود ۳۶۰ جفت باز، تأیید شد (شکل ۱- E) و انجام تعیین ترادف نیز صحت توالی تکثیر شده را نشان داد.

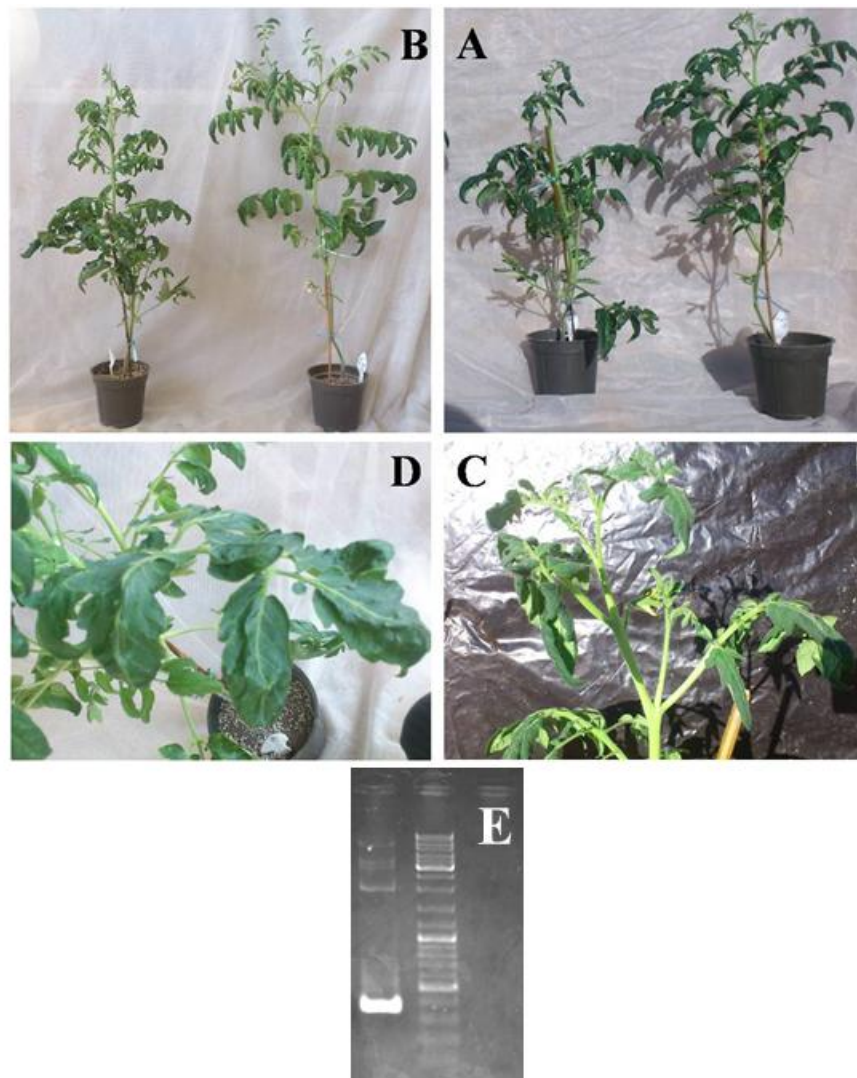
عملیات استخراج متابولیت از برگ گیاهان گوجه‌فرنگی انجام و ۰/۲ میکرولیتر از فازهای قطبی و غیر قطبی متابولیت‌ها (به صورت مجزا) توسط دستگاه GC/MS بررسی شد. پس از تصحیح اختلالات موجود در پس زمینه و تغییرات تدریجی اشتباه در کروماتوگرام‌ها و خط پایه حدود ۶۰۰ پیک شناسایی شد که حدود ۴۵۰ پیک دارای نسبت سیگنال به خطای بیش از ۲۰ بودند و در تحلیل‌های آماری مورد استفاده قرار گرفتند. نتیجه تجزیه و تحلیل آماری به صورت لیستی از ۴۰ متابولیت متفاوت بین گیاهان شاهد و آلوده، ذخیره گردید (جدول ۱). این لیست شامل ده قند، چهار ترکیب الکلی، سه کربوهیدرات و یا مشتقات آن، دو اسید چرب، دو ترپنوئید، دو آلکان، دو ترکیب آروماتیک، یک کربوکسیلات، یک گلیکولیپید، یک اسید نوکلئیک، یک استروئید، یک ویتامین، یک ترکیب آرگانیک و نه ترکیب با گروه نامشخص است. از این تعداد ۲۷ متابولیت ۲ برابر یا بیشتر تغییر کرده‌اند (متابولیت‌های پر رنگ شده در جدول ۱).

آنالیزهای انجام شده توسط نرم‌افزار 17.1 Pathway Tools (Caspi et al. 2012) نشان داد که ۱۱ متابولیت از ۴۰ متابولیت شناسایی شده در این تحقیق، در ۱۴ مسیر از ۸۱۹ مسیر معرفی شده برای گوجه‌فرنگی



phosphate utilization in cell و cutin biosynthesis I  
wall regeneration که پنج مسیر دخیل در ساخت موم و  
کوتین هستند، مسیر I glutathione redox reactions

وجود دارد (جدول ۲). مسیرهای متابولیکی زیر با کاهش  
فعالیت روبرو بودند: مسیرهای acyl-CoA hydrolysis  
fatty acid  $\beta$ -oxidation I alkane biosynthesis II



شکل ۱. علائم آلودگی به واریانت ملایم PSTVd (A-D) و نقوش الکتروفورزی قطعات تکثیر شده ویروئید (E) در رقم رانگرز گوجه‌فرنگی. A و B: علائم کوتولگی، به ترتیب ۲۸ و ۵۰ روز پس از مایه‌زنی با PSTVd (راست، سالم و چپ، آلوده). C: روخمشی برگ و رشد جوانه‌های جانبی ۲۸ روز پس از مایه‌زنی با PSTVd. D: بد شکلی برگ ۵۰ روز پس از مایه‌زنی با واریانت ملایم PSTVd. E: راهک سمت چپ، گیاه آلوده که قطعه‌ای در حدود ۳۶۰ جفت باز را نشان داده است. راهک وسط = مارکر. راهک سمت راست = شاهد سالم.

**Fig. 1.** Symptoms of PSTVd-mild variant (A-D) and electrophoretic patterns of RT-PCR amplified viroid fragments (E) on tomato cultivar 'Rugers'. A and B: Stunting following inoculation with PSTVd 28 and 50 days post inoculation, respectively (right: healthy control, left: infected). C: Leaf epinasty and growth of dormant axillary buds 28 dpi. D: Leaf rugosity 28 dpi. E: Left lane, Infected sample showing specific band of ~360 bp. Middle lane, DNA ladder. Right lane, healthy control.

tetrahydroxyxanthone biosynthesis, biosynthesis I  
 ascorbate glutathione cycle و (from benzoate)  
 indole-3-acetate مسیره‌های ساخت هورمون شامل  
 volatile benzenoid biosynthesis I و activation II  
 جدول ۱. لیست متابولیت‌های گوجه فرنگی رقم راتگرز که مقدار آنها ( $10^{+6}$ ) به علت آلودگی به واریانت ملایم PSTVd تغییرات معنی‌دار  
 (P≤0.20) یافته است.

**Table 1. List of metabolites with abundance ( $10^{+6}$ ) that varied significantly (P≤0.20) in mild PSTVd infected- tomato cultivar 'Rutgers'.**

مایه زنی شده با بافر Inoculated With Sample Buffer	مایه زنی شده با ویروئید Inoculated With Viroid	گروه Group	فاز قطبی یا غیر قطبی Polar or Non- Polar Phase	زمان بازداری Retention Time	نام متابولیت Metabolite Name	شماره No.
1.69	3.48	carbohydrate	P	47.789	Turanose (S)	۱
0.57	1.73	carbohydrate derivative	P	26.458	1-o-methyl- $\alpha$ -d-glucuronate (S)	۲
2.54	13.07	carbohydrate derivative	P	31.943	Methyl- $\alpha$ -d-galactoside (S)	۳
1.98	3.01	carboxylate	NP	39.74	an 11,13-eicosadienoate (HS)	۴
6.96	10.67	cyclic alcohol	P	34.254	Neo-inositol (S)	۵
1215.00	1945.00	cyclic alcohol	P	37.804	Myo-inositol (HS)	۶
0.46	0.90	glycolipid	P	26.318	Trans,octacis- decaprenylphospho-b-D- erythro-pentofuranosid-2-ulose (BS)	۷
0.92	0.00	long-chain alcohol	NP	30.086	Hexadecanol (S)	۸
41.49	16.17	long-chain fatty acid	NP	35.754	Palmitate (HS)	۹
0.48	0.00	medium- chain fatty acid	NP	28.481	Laurate (BS)	۱۰
7.56	14.29	nucleic acid component	P	33.129	dimp (HS)	۱۱
1.06	0.58	steroid	NP	52.036	Cholesterol (HS)	۱۲
1.88	14.14	sugar	P	31.429	Galactosamine (BS)	۱۳
22.08	33.67	sugar	P	35.336	D-arabinopyranose (S)	۱۴
19.89	34.34	sugar	P	35.153	DL-glyceraldehyde (HS)	۱۵
0.00	3.36	sugar	P	30.836	2'-deoxyribose (S)	۱۶
0.00	0.55	sugar	P	31.568	$\alpha$ -D-fructofuranose (BS)	۱۷
0.00	62.03	sugar	P	32.318	Galactose, 2-(acetylamino) (HS)	۱۸
0.91	3.51	sugar	P	30.103	D-Glucose (BS)	۱۹
5.07	6.83	sugar	P	35.841	L-mannose (S)	۲۰
7.39	31.00	sugar	P	32.65	D-fructose (HS)	۲۱

شماره	نام متابولیت	زمان بازداری	فاز قطبی یا غیر قطبی	گروه	مایه زنی شده با ویروئید	مایه زنی شده با بافر
No.	Metabolite Name	Retention Time	Polar or Non-Polar Phase	Group	Inoculated With Viroid	Inoculated With Sample Buffer
۲۲	D-galactose (S)	34.089	P	sugar	58.67	9.09
۲۳	Tuberculostearate (BS)	46.385	NP	terpenoid	0.00	0.34
۲۴	Viridiflorene (BS)	44.527	NP	terpenoid	0.00	0.21
۲۵	L-ascorbate (HS)	33.888	P	vitamin	2.73	1.16
۲۶	Phytol (S)	32.371	NP	alcohol	1.37	24.97
۲۷	Octadecane (HS)	30.408	NP	alkane	1.91	2.90
۲۸	Hexadecane (BS)	31.115	NP	alkane	0.22	0.61
۲۹	Benzoate (S)	17.746	NP	aromatic compound	0.00	1.80
۳۰	3-methylbenzaldehyde (BS)	20.048	NP	aromatic compound	0.00	1.12
۳۱	Cyclohex-2-enone (BS)	27.583	NP	organic compound	0.00	0.20
۳۲	Ht-2-toxin derivative (BS)	38.309	NP	N/A	0.00	0.50
۳۳	(+)-5-[(tert-butylamino)-2'-hydroxypropoxy]-3,4-dihydro-1(2H)-naphthalenone (S)	26.153	NP	N/A	0.41	0.31
۳۴	Salicylamide (HS)	6.322	NP	N/A	2.37	22.14
۳۵	D-Erythro-Pentitol (S)	26.318	P	N/A	2.83	1.68
۳۶	Bacimethrin (HS)	18.714	P	N/A	9.37	1.63
۳۷	Pre-vitamin D3 (BS)	26.449	NP	N/A	0.00	0.41
۳۸	Tetrapentacontane (HS)	51.294	NP	N/A	0.71	0.35
۳۹	Octadecane, 1-chloro- (BS)	19.229	NP	N/A	1.39	1.10
۴۰	1,2,2,3,4,4,5,5,6,6-Decamethylhexasilinane-1,3-diol (HS)	31.028	P	N/A	15.55	4.97

N/A: بدون مصداق

متابولیت‌های جدا شده از فازهای قطبی و غیر قطبی به ترتیب با P و NP نشان داده شده‌اند.

سطح معنی‌داری آماری بر اساس ANOVA: مقادیر با  $P \leq 0.01$  خیلی معنی‌دار (HS)،  $P \leq 0.05$  معنی‌دار (S) و  $P \leq 0.20$  (BS) هستند.

N/A: not applicable.

Extracted metabolites from polar and non-polar phases shown by P and NP, respectively.

Significance level based on univariate ANOVA: values  $P \leq 0.01$  are highly significant (HS),  $P \leq 0.05$  is significant (S),  $P \leq 0.20$  is of borderline significance (BS).

یک مسیر تولید انرژی (مسیر sucrose degradation III).

مطالعات متعددی، تغییرات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی ناشی از آلودگی‌های ویروئیدی را بررسی کرده‌اند (Semancik & Conejero-Tomas 1987). در سطح

بحث

مرتبط با دیواره سلولی در گوجه‌فرنگی‌های آلوده به PSTVd افزایش می‌یابد (Owens *et al.* 2012). اکستنسین‌ها (Extensins)، گلیکوپروتئین‌هایی غنی از هیدروکسی پرولین هستند که یکی از گروه پروتئین‌های

سلولی بیشترین تغییر در دیواره سلولی و غشای پلاسمایی رخ می‌دهد ( Momma & Takahashi 1982; Paliwal & Singh 1981; Semancik & Vanderwoude 1976; Wahn *et al.* 1980). آونز و همکاران با طبقه‌بندی عملکردی بیان ژن‌ها، نشان دادند که بیان پروتئین‌های

جدول ۲. مسیرهایی از گوجه‌فرنگی که با متابولیت‌های تغییر کرده (جدول ۱) ارتباط دارند. ↓، ↑

**Table 2. Tomato pathways that were related to altered metabolites (Table 1).**

تغییرات ایجاد شده Accrued d Changes	نام مسیر Pathway Name
(↓) Palmitate	acyl-CoA hydrolysis*
(↓) Laurate	
(↓) Palmitate	alkane biosynthesis II
(↑) L-ascorbate	ascorbate glutathione cycle
(↓) Phytol	chlorophyll <i>a</i> degradation I*
(↓) Hexadecanol	cutin biosynthesis
(↓) <i>Myo-inositol</i>	
(↓) <i>Neo-inositol</i>	
(↑↑) Palmitate	ethylene biosynthesis I (plants)*
(↓) Phytol	
(↑↑) L-ascorbate	fatty acid $\square$ -oxidation I*
ولی در مقابل، تولید پیش ماده مصرف آن کم شده است (Owens <i>et al.</i> 2012)	
(↓) Palmitate	glutathione redox reactions I
(↓) Hexadecanol	
(↓) Viridiflorene	indole-3-acetate activation II
(↑) $\square$ -D-galactose	
(↑) D-glucose	phosphate utilization in cell wall regeneration
(↓) Hexadecanol	
(↓) <i>Myo-inositol</i>	
(↓) <i>Neo-inositol</i>	
(↓) Phytol	sucrose degradation III*
(↑) $\square$ -D-fructofuranose	
(↑) D-glucose	terminal olefins biosynthesis I
(↑↑) Palmitate	
(↑↑) Benzoate	tetrahydroxyxanthone biosynthesis (from benzoate)*

تغییرات ایجاد شده Accrued d Changes	نام مسیر Pathway Name
(↑↑) Benzoate	volatile benzenoid biosynthesis I (ester formation)

\*: نتایجی که با مطالعات آونز و همکاران تشابه دارد (Owens *et al.* 2012).

↓: کاهش تولید، ↑: افزایش تولید، ↑↑: افزایش مصرف.

\*: Results that were similar to those of Owens and colleagues (Owens *et al.* 2012).

↓: Decreased production, ↑: Increased production, ↑↑: Increased consumption.

biosynthesis II که به احتمال قوی به خاطر حساسیت رقم راتگرز رخ داده است.

تولید ترکیبات دفاعی گیاهی یکی از راهکارهای مقابله‌ی گیاهان با بیمارگرهای گیاهی است. از اولفین‌های انتهایی (terminal olefins) (Binder *et al.* 1975; Ney & Boland 1987) و tetrahydroxylated xanthenes (Jankovic *et al.* 2002) می‌توان به عنوان ترکیب‌های دفاعی مهمی نام برد که تولیدشان در گیاه پس از حمله بیمارگر، تحریک می‌گردند. فعال‌تر شدن مسیرهای biosynthesis tetrahydroxyxanthone و terminal olefins biosynthesis I در گوجه‌فرنگی آلوده به واریانت ملایم PSTVd، احتمالاً نشانگر مقاومت گیاه از طریق این دو مسیر در برابر آلودگی ویروئیدی است. افزایش تولید ascorbate، به عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیبات خنثی‌کننده پراکسید هیدروژن، در مسیر ascorbate glutathione cycle نیز در برهمکنش جدایه ملایم PSTVd و راتگرز دیده شد. نکته قابل توجه، کاهش تولید ترپنوئید viridiflorene و الکل بلند زنجیر hexadecanol و بالطبع کاهش فعالیت مسیر glutathione redox reactions I (به عنوان مسیری برای مقابله با گونه‌های فعال نیتروژن و اکسیژن) در برهمکنش مورد مطالعه است.

تشکیل‌دهنده دیواره سلولی گیاهان بوده و پس از ترشح به درون دیواره سلولی، از طریق تشکیل باندهای درون و بیرون مولکولی، به صورت غیر محلول در می‌آیند (Roberts & Shirsat 2006). نشان داده شده است که تولید اکستنسین‌ها به وسیله طیف وسیعی از تنش‌ها، مثل زخم شدن، آلودگی توسط بیمارگر و تیمار به وسیله مواد شیمیایی تحریک‌کننده دفاع گیاه، القا می‌گردد (Merkouropoulos & Shirsat 2003). افزایش مقدار اکستنسین، بهبود زخم و تشکیل یک سد فیزیکی در مقابل حمله‌ی بیمارگر و جلوگیری از پخش سیستمیک آلودگی را پیشنهاد می‌کند (Tessitori *et al.* 2007). ایتایا و همکاران نشان دادند که بیان چندین پروتئین دیواره سلولی (شامل Cell wall protein, Glycine rich protein و b-1,3-glucanase) به صورت معنی‌داری در گوجه‌فرنگی آلوده به PSTVd افزایش می‌یابد (Itaya *et al.* 2002). در این مطالعه، کاهش در چندین مسیر متابولیکی مرتبط با ساخت و بیوسنتز موم و کوتین شامل مسیرهای acyl-CoA hydrolysis و fatty acid oxidation I اتفاق افتاده است که نشان‌دهنده تقویت دیواره‌های سلولی گیاه، پس از آلودگی ویروئیدی است. همچنین کاهش در مسیرهای phosphate utilization in cell wall و biosynthesis regeneration alkane و cutin

(Auxin response factors) متصل شده و مانع از بیان ژن‌های پاسخ اکسین شود. در این بررسی، مشخص شد که پیرو افزایش فعالیت مسیر indole-3-acetate activation II در رقم راتگرز گوجه فرنگی آلوده به واریانت ملایم ویروئید، افزایش می‌یابد که این تغییرات، کاهش غالبیت انتهایی را نشان می‌دهد. علاوه بر این، مشخص شده است که طیف متنوعی از بیمارگرهای گیاهی مثل TMV (Culver & Padmanabhan 2007)، قادر به تغییر پیامدهی اکسین و شروع بیماری هستند. از سوی دیگر در مورد ویروس پیچیدگی برگ کلم (CaLCuV = *Cabbage leaf curl virus*) (جمینی ویروسی که مثل PSTVd در هسته سلول آلوده همانندسازی می‌کند) نشان داده شده است که بیان اجزای مسیر پیامدهی اکسین (شامل TIR1) پس از آلودگی، افزایش می‌یابد (Ascencio-Ibáñez et al. 2008). آونز و همکاران نیز نشان دادند که بیان سه ژن مهم در مسیر پیامدهی اکسین (*ASK2*, *IAA3/SHY2* و *IAR1*) پس از آلودگی ویروئیدی افزایش می‌یابد (Owens et al. 2012). در این تحقیق، کاهش مقدار benzoate احتمالاً به خاطر تبدیل آن به methylbenzoate می‌باشد که یکی از مهمترین پیام‌های دفاعی هوابرد گیاه می‌باشد (Shulaev et al. 1997). از سوی دیگر مشخص گردید که مسیر volatile benzenoid biosynthesis I پس از آلودگی به PSTVd تحریک می‌گردد (جدول ۲) و یکی از ترکیب‌های مهم در این مسیر، سالیسیلیک اسید است که در همین مسیر به methylsalicylate (پیامی دفاعی و هوابرد) تبدیل می‌شود. یکی از مهمترین ترکیبات تنظیمی در پیامدهی سالیسیلیک اسید، NPR1 (پروتئینی که از طریق برهمکنش با عوامل نسخه‌برداری ویژه، در تحریک

برگر و همکاران (Berger et al. 2007) نشان دادند که کاهش فتوسنتز و افزایش نیاز همزمان به قندهای ساده در برهمکنش بیمارگر-گیاه، اغلب باعث تبدیل بافت‌های منبع به بافت‌های مصرف کننده (Sink) می‌گردد. یکی از شواهد رخداد این وضعیت، افزایش فعالیت آنزیم اینورتاز دیواره سلولی (Cell wall invertase) است. این آنزیم با فعالیت خارج سلولی خود، شکسته شدن سوکروز به گلوکز و فروکتوز را باعث می‌شود (Roitsch et al. 2003). در این مطالعه نیز میزان قندهای فروکتوز و گلوکز پس از رخداد آلودگی به شدت افزایش یافته است. این موضوع در مورد برهمکنش‌های متعدد دیگری همچون ویروس موزاییک توتون- توتون، زنگ سیاه گندم- گندم و *Arabidopsis candida* - آرابیدوپسیس نیز به اثبات رسیده است (Wright et al. 1995; Chou et al. 2000; Herbers et al. 2000; Scharte et al. 2005) که نشان دهنده آن است که این تغییر، پاسخی عمومی به طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی است (Berger et al. 2007). البته باید خاطر نشان کرد که قندها علاوه بر اینکه در رشد، تنفس نوری و یا ذخیره انرژی نقش دارند، می‌توانند به عنوان پیام‌های تنظیمی بیان ژن‌ها نیز عمل کنند (Koch 1996). به عنوان مثال در گزارش‌هایی، کاهش بیان ژن‌های فتوسنتز به تجمع هگروزها ربط داده شده است (Scholes et al. 1994; Chou et al. 2000; Pego et al. 2004; Berger et al. 2004). البته نتیجه این رویدادها هنوز به خوبی درک نشده است.

اکسین باعث تخریب گروهی از عوامل بازدارنده نسخه‌برداری با نام پروتئین‌های auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA) می‌شود. پروتئین Aux/IAA قادر است به عوامل پاسخ اکسین

مرکبات (Brown & Lee 1993) و کپک خاکستری (*B. cinerea*) در گوجه‌فرنگی، فلفل، خیار، سویا، رز و میخک را افزایش می‌دهد (Boller 1991).

ارتباط احتمالی بیماری ویروئیدی و اتیلن در گوجه‌فرنگی و گیاه *Gynura aurantiaca* آلوده به CEVd مشخص گردیده (Conejero & Granell 1986) و نشان داده شده‌است که پس از رخداد آلودگی توسط CEVd، میزان اتیلن و پیش‌سازهایش (مثل aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)) افزایش می‌یابد (Belles & Conejero 1989). از سوی دیگر، تیمار گوجه‌فرنگی رقم پیرسون (Pearson) با اتفن (ترکیب آزاد کننده اتیلن)، باعث کوتولگی و تحریک پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در این گیاه می‌گردد (Xin-xi et al. 2011). البته در تأیید نتایج این مطالعه بایستی اشاره کرد که بروز علائم کوتولگی و روخمشگی برگ، تخریب مسیرهای بیوسنتز و یا پیامدهی اتیلن و یا جیبرلیک اسید را پیشنهاد می‌کند. البته گزارش آونز و همکاران مشابه با نتایج تحقیق حاضر و بر خلاف نتایج گرفته شده در مورد TCDVd و CEVd، نشان داد که میزان ACC در راتگرز آلوده به PSTVd کاهش یافته‌است (Owens et al. 2012).

انواع متنوعی از تنش‌های زنده و غیر زنده مثل حمله بیمارگر و یا نور زیاد (Karpinski et al. 2003) قادر به آسیب رساندن به بافت‌های گیاهی هستند. این مسئله ممکن است باعث آزادسازی کلروفیل از غشاهای تیلاکوئیدی گردد. در چنین وضعیتی برای جلوگیری از آسیب سلولی ناشی از فعالیت فتودینامیک این مولکول‌ها، لازم است کلروفیل‌ها به سرعت تجزیه شوند (Takamiya et al. 2000). پس، ناتوانی در تجزیه کلروفیل ممکن است باعث افزایش مقدار گونه‌های فعال

تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی نقش اساسی دارد) است. مشخص شده است که میزان نسخه‌برداری NPR1 در رقم راتگرز گوجه‌فرنگی آلوده به PSTVd افزایش می‌یابد (Owens et al. 2012). جالب است که آلودگی گوجه‌فرنگی به PSTVd باعث تحریک تعدادی از ژن‌های خانواده *Cab* (*Cab1, Cab2, Cab3, 3a, 9, 10b*) می‌گردد (Itaya et al. 2002). از سوی دیگر نشان داده شده‌است که تیمار با سالیسیلیک اسید باعث تحریک بیان ژن‌های این خانواده (خانواده *Cab*) می‌گردد (Schenk et al. 2000).

در این مطالعه، نیز نشان داده شد که فعالیت مسیر بیوسنتز اتیلن (Ethylene biosynthesis I) در برهمکنش مورد بررسی کاهش یافته است. اتیلن نقش مهمی در جلوگیری از رشد و تحریک پیری برگ و گل و پاسخ به عوامل خارجی داشته و این کار را از طریق تنظیم فرآیندهای متابولیکی مختلف انجام می‌دهد (Broekaert et al. 2006; Kosugi et al. 2000). نقش اتیلن در برهمکنش گیاه - بیمارگر، پیچیده است و به گونه گیاه و بیمارگر وابستگی کامل دارد. اتیلن همچنین باعث افزایش نفوذپذیری غشاهای سلولی می‌شود که معمولی‌ترین پیامد عفونت‌هاست (Agrios 2005). تیمار گیاه با اتیلن تعداد زیادی از مولکول‌های مرتبط با دفاع، شامل پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) را فعال کرده و مقاومت به *Botrytis cinerea* در گوجه‌فرنگی (Diaz et al. 2002)، *Erysiphe necator* (Belhadj et al. 2008) و TMV در توتون (Knoester et al. 2001) را باعث می‌شود. هر چند که نشان داده شده است که اتیلن حساسیت به *Penicillium italicum* و *Diplodia natalensis*

در این تحقیق، مشخص شد که آلودگی ویروئیدی منجر به تغییر در دیواره سلولی میزبان می‌شود. در این برهمکنش سه مسیر از مسیرهای دخیل در تقویت دیواره سلولی تضعیف شده و در مقابل، دو مسیر دیگر تقویت می‌گردند. دیده شد که به دنبال پیشرفت آلودگی ویروئیدی، سه مسیر تولید ترکیب‌های دفاعی، نیز در گیاه فعال‌تر می‌شوند ولی یک مسیر تولید این ترکیبات تضعیف می‌شود. افزایش شدید مقدار گلوکز و فروکتوز و تحریک مسیر تجزیه سوکروز، نیز پاسخی رایج به عوامل بیمارگر گیاهی است که توسط ویروئید نیز تحریک شده است. رخداد کوتولگی و رشد جوانه‌های جانبی در گیاهان بیمار را می‌توان به تغییرات مسیر مرتبط با هورمون اکسین گزارش شده در این تحقیق ربط داد. یکی از دیگر راه‌های مورد اشاره در این تحقیق برای بیماری‌زایی ویروئیدها، سرکوب مسیرهای مرتبط با تولید آنزیم بتا گالاکتوسیداز است. با توجه به این مطالب می‌توان گفت که مطالعه حاضر، دید ما را نسبت به تغییرات متابولیکی و مسیرهای تحریک شده در بیماری‌زایی ویروئیدها بهبود بخشیده و نحوه بیماری‌زایی ویروئیدها و دفاع گیاه را مشخص‌تر نموده است. به خاطر پیچیدگی و تنوع در اندازه و مقدار متابولیت‌ها، تعیین نوع و مقدار همه متابولیت‌های یک سیستم بیولوژیکی معضلی بزرگ و غیر قابل حل است (Dunn 2008). تاکنون هیچ روش استخراج و یا روش تجزیه‌ای واحدی که قادر به ردیابی هر تک متابولیتی باشد، معرفی نشده است (Hall 2006). البته انجام آزمایش‌های مشابه در بازه‌های زمانی متنوع (تعیین دینامیک زمانی متابولوم) و استخراج متابولیت از برگ‌های مختلف و استفاده همزمان از چند روش استخراج و یا چند روش تجزیه‌ای برای هر نمونه به تکمیل هر چه

اکسیژن شود. تا حدی که سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی ظرفیت سم‌زدایی آن را نداشته باشند. این مولکول‌های سمی تولید شده قادرند به اندامک‌های سلولی صدمه وارد کرده و یا به عنوان پیام‌های سلولی ایفای نقش کنند (Foyer *et al.* 1994; Wojtaszek 1997). در این مطالعه کاهش فعالیت مسیر chlorophyll a degradation I نیز در برهمکنش PSTVd- رقم حساس گوجه‌فرنگی، افزایش مقدار گونه‌های اکسیژن فعال را در پی داشته است. البته این مسیر نیز همانند مسیر ساخت اتیلن، در تحریک پیری برگ دخالت دارد (Matile, Hortensteiner 2006). Matile *et al.* 1999, 2000, Pruzinska *et al.* 2005 و Roca & Minguéz-Mosquera 2003 و پیشتر نیز در مطالعه آونز و همکاران مدارکی دال بر کاهش بیان آنزیم مرتبط با آن ارائه شده است (Owens *et al.* 2012). ارتباط تغییر واقع شده در این مسیر با بیماری‌زایی ویروئیدها به خوبی مشخص نمی‌باشد. نتایج مطالعه حاضر حاکی از افزایش بتا-گالاکتوسید (احتمالاً به خاطر کاهش بتا-گالاکتوسیدازها) است (جدول ۱). بتا-گالاکتوسیدازها خانواده بزرگی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده بتا-گالاکتوسیدها هستند و نقش عمده در رسیدن میوه و همچنین سازگاری گیاه به تنش‌های مختلف را دارا هستند. یکی از واکنش‌های آراییدوپسیس به تنش سرمایی و یا شوری، افزایش بیان این آنزیم است (Kreps *et al.* 2002) و این در حالی است که مواجهه نارنج سه برگچه‌ای و نارنگی آنشو با سرما، بیان بتا-گالاکتوسیدازها را کم می‌کند (Lang *et al.* 2005). دلیل احتمالی افزایش بتا-گالاکتوسید و کاهش بتا-گالاکتوسیداز را می‌توان به ناتوانی گیاه در افزایش این آنزیم در جهت مقابله با تنش حاصل از آلودگی ویروئیدی و یا توانایی احتمالی ویروئید در سرکوب این واکنش دفاعی گیاه حساس ربط داد.



بیشتر اطلاعات در مورد این عوامل بیمارگر کمک خواهد کرد.

### منابع

جهت ملاحظه به صفحات (113-118) متن انگلیسی مراجعه شود.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از بنیاد ملی نخبگان و شورای قطب‌های علمی به خاطر حمایت مالی و معنوی در انجام این تحقیقات سپاسگزاری می‌کنند.