

بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک، بر میزان علایم
بیماری و بیان ژن های دفاعی روی گیاه خیار گلخانه ای آلوده به
بیمار گر CMV

The Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on Disease
Symptoms and Defense Genes Expression in a Greenhouse
Cucumber Infected with CMV

سعید اسدی جعفری^۱، مژده ملکی^{۱*}، جلال غلام نژاد^۲

Saeid Asadi Jaefari¹, Mojdeh Maleki^{1*}, Jalal Gholamnezhad²

۱- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، ایران

1. Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic
Azad University, Varamin, Iran

2. Agriculture and Natural Resource Faculty, Ardakan University, Ardakan, Iran

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: mojdehmaleki@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۲۲)

چکیده

واژه های کلیدی

ویروس موزائیک خیار،

اسید سالیسیلیک،

اسید جاسمونیک،

بیان ژن

مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) از جمله دفاع هایی است که می تواند موجب ایجاد مقاومت گیاهان در برابر آلودگی ها سیستمیک ویروسی شود. مقاومت سیستمیک اکتسابی با بروز پاسخ فوق حساسیت در میزبان همراه است و اسید سالیسیلیک به عنوان سیگنال آن شناخته می شوند. در این مطالعه تأثیر اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک روی ویروس موزائیک خیار *Cucumber mosaic virus, CMV* و نیز بیان برخی ژن های دفاعی مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل گیاهان تیمار شده با CMV، اسید سالیسیلیک (با غلظت ۱/۵ میلی مول) به همراه CMV، اسید جاسمونیک (با غلظت ۱/۵ میلی مول) و CMV و همچنین اسید سالیسیلیک و جاسمونیک همراه CMV بودند. نتایج این مطالعه نشان داد حداکثر شدت بیماری ناشی از CMV، در گیاه آلوده شده تنها به میزان ۶۸/۸۵ درصد مشاهده شد. در تیماری که اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک به همراه ویروس CMV اعمال شدند، شدت علایم کاهش چشمگیری داشت و به میزان ۱۰/۲۳ درصد رسید. تأثیر تیمارها روی میزان بیان چهار ژن پراکسیداز (POX)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیان همه این ژن ها در گیاهان تیمار شده تا روز نهم پس از اعمال تیمارها روند صعودی داشت. اما این روند صعودی در مورد گیاهان شاهد (تیمار شده با آب و ویروس) بسیار کمتر بود. بیشترین میزان بیان ژن در مورد آنزیم های مورد مطالعه نسبت به گیاه شاهد مربوط به آنزیم کاتالاز به میزان ۴۰۱/۷ برابر و بعد از آن به ترتیب مربوط به آنزیم های پراکسیداز به میزان ۲۶۶/۸، سوپراکسید دیسموتاز به میزان ۱۵۲/۷ و فنیل آلانین آمونیا لایز به میزان ۱۰۱/۸ می باشد. بر اساس نتایج این مطالعه اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک با القای هر چه بیشتر مکانیسم های دفاعی گیاه موجب افزایش مقاومت گیاه در برابر ویروس CMV و باعث کاهش علایم این ویروس در گیاه خیار شد.

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 10, Number 2, 2022

Abstract

Acquired systemic resistance (SAR) is one of the defenses that can make plants resistant to systemic viral infections. Acquired systemic resistance is associated with a hypersensitivity response in the host, and salicylic acid is known as its signal. In this study, the effect of plant inducers such as salicylic acid and jasmonic acid on cucumber viral disease with cucumber mosaic virus, CMV and the expression of some defense genes were investigated. Treatments included plants treated with CMV, salicylic acid (with a concentration of 1.5 mmol), jasmonic acid (with a concentration of 1.5 mmol), as well as salicylic acid and jasmonic with CMV. The results of this study showed that the maximum severity of CMV-induced disease was observed in plants treated only with CMV (68.85%). In the treatment of salicylic acid and jasmonic acid with CMV, the severity of symptoms was significantly reduced (10.23%). Then, the effect of these treatments on the expression of four genes Peroxidase (POX), Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD) and Phenylalanine Ammonialyase (PAL) was investigated. The results showed that the expression of these genes in treated plants had an upward trend until the ninth day after treatment. But this upward trend was much less observed in control plants (treated with water and virus). The highest level of gene expression in the studied enzymes compared to the control plant was related to the catalase enzyme (401.7 times), followed by peroxidase enzymes (266.8), superoxide dismutase (152.7) and phenylalanine ammonialyase (101.8). According to these results, salicylic acid and jasmonic acid, increased plant resistance to CMV and reduced the symptoms of the virus in cucumber plant by inducing plant defense mechanisms.

Keywords: Cucumber mosaic virus, Salicylic acid, Jasmonic acid, Gene expression

مقدمه

خسارت زیادی وارد می کند و ویروس را CMV است. این ویروس، در فصل زمستان بر روی میزبانهای واسط و یا ریشه های علف های هرز بقا می یابد. در اوایل بهار که علف های هرز میزبان در اطراف مزارع رویش می یابند، به تدریج ویروس نیز به برگ های آنها انتقال یافته و سپس به وسیله حشرات مکنده (شته ها)، ویروس از علف ها به بوته های جالیز منتقل می شود. همچنین ویروس از طریق تجهیزات و لباس کارگران به طریق مکانیکی از بوته های بیمار به بوته های سالم انتقال می یابد. علاوه بر این نشان داده شده که سوسک راه راه خیار (*vittatum* Jones,) نیز می تواند این بیماری را منتقل کند (2008). بیمارگر CMV طفیفی از علایم ایجاد می کند، که براساس نوع میزبان و نژاد ویروس و همچنین شرایط محیطی ممکن است شامل موزائیک یا لکه لکه شدن برگ، زرد شدن، لکه های حلقه ای، رشد کوتاهی و برگ و بدشکلی گل و میوه است. ویروس CMV در بسیاری از میزبان ها، باعث بندکشی شدن برگ ها می شود. در بندکشی شدن، علی رغم این که گیاه رشد می کند، برگ ها به صورت باریک باقی می ماندند. جدایه های CMV باعث ایجاد موزائیک در کدوئیان و به خصوص خیار و بلایت اسفناج، برگ نخی شدن گوجه فرنگی، موزائیک کرفس و بسیاری از گونه های زینتی و زراعی می شود (Kanievski et al., 1999).

ویروس موزائیک خیار *Cucumber mosaic virus*, CMV یکی از شایع ترین و مهم ترین ویروس های گیاهی در بسیاری از گونه های سبزیجات، حبوبات و گیاهان زینتی در ایران می باشد. دامنه ی میزبانی این ویروس بسیار وسیع بوده و قادر است بیش از ۱۳۰۰ گونه گیاهی تک لپه و دولپه ای را آلوده کند (Nematollahi, 2012). ویروس موزائیک خیار عضو شاخص جنس *Cucumovirus* و خانواده *Bromoviridae* می باشد و از نظر اقتصادی یکی از مهم ترین ویروس های گیاهی محسوب می شود. پیکره های CMV ایزومتریکی به قطر ۲۰ نانومتر و ژنوم آن از آن ای مثبت تک رشته ای سه بخشی می باشد (Palukaitis et al., 2003).

در سال های اخیر در اغلب نقاط دنیا و به خصوص در ایران کشت گلخانه ای خیار بسیار رواج یافته است. شرایط دمایی و رطوبت موجود در محیط بسته گلخانه برای رشد و تکثیر بسیاری از آفات و بیمارگرهای گیاهی مناسب است به همین دلیل پس از ورود این گونه عوامل به گلخانه به سرعت زمینه رشد و تکثیرشان فراهم و باعث خسارات کمی و کیفی بر روی محصول شده که در نتیجه کشاورز باید از سموم شیمیایی کند (Balodi et al., 2017). یکی از بیماری های که در گلخانه و حتی در مزارع به این محصول

اسید سالیسیلیک برای فعال شدن مقاومت اکتسابی سیستمیک در برگ‌های سالم ضروری است. یکی از نشانه‌های SAR القای مجموعه‌ای از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis related Proteins) است (Durrant et al., 2004).

از دیگر ترکیباتی که در دفاع گیاه در برابر شرایط تنشی نقش دارند می‌توان به اسید جاسمونیک اشاره نمود. اسید جاسمونیک و متیل استر آن قادر است تا مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی را افزایش دهند (El- Khalal, 2007). تجمع اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک در بافت‌های گیاهی یکی از اولین رویدادهای واکنش فوق حساسیت در گیاهان است (Anderson et al., 2006) که بر اثر حمله عوامل بیماری‌زا القاء می‌شوند و نتیجه آن تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) است. اگرچه این رادیکال‌ها در ابتدا به عنوان پیک ثانویه در القای مقاومت عمل می‌کنند، اما تجمع آن‌ها در غلظت‌های زیاد، خسارت‌های فراوانی به بافت‌های گیاهی وارد می‌کنند (Yadava et al., 2015). بررسی اثر اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک بر فعالیت D- فسفولیپاز و سطح اکسیژن فعال در گیاهچه‌های سویا نشان داد که تنش‌های زیستی و کاربرد اسید سالیسیلیک موجب فعال شدن D-فسفولیپاز، 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 آنتی-اکسیدان می‌گردند (Kalachova et al., 2012).

محققان نشان داده‌اند که اسید سالیسیلیک با بیان ژن‌های PR که آغازگر آن H_2O_2 است، ارتباط دارد (Goy et al., 1992)، اسید سالیسیلیک از طریق جلوگیری از نسخه‌برداری ویروسی و حرکت سیستمیک آن نیز موجب القای مقاومت می‌شود (Singh et al., 2004).

اسید سالیسیلیک بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی را از طریق یک مسیر وابسته به NPR1 در طول HR و SAR القا می‌کند، به-اینین صورت که اسید سالیسیلیک باعث القای استقرار NPR1 در هسته شده و اتصال NPR1 به فاکتورهای رونویسی TGA باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی یا ژن‌های دفاعی می-شود (Durrant and Dong, 2004). گیاهان جهش یافته nahG

برای کنترل ویروس‌ها از روش‌های سنتی مانند تناوب زراعی و روش‌های دیگر زراعی، مانند کشت زود یا دیر هنگام، تشخیص زود هنگام، از بین بردن گیاهان آلوده به عنوان منبع آلودگی، حفاظت تقاطعی (Cross protection)، استفاده از ارقام مقاوم و کنترل شیمیایی حشرات ناقل استفاده می‌شود (Durrant et al., 2004). مبارزه با ویروس موزائیک خیار به دلیل داشتن میزبان‌های مختلف بسیار دشوار می‌باشد (White, 1979). افزایش اطلاعات در مورد ژنتیک مولکولی ویروس‌های گیاهی و سیستم دفاع طبیعی گیاه میزبان، راه‌های جدیدی برای کنترل بیماری‌های ویروسی در گیاهان، به وجود آورده است. از راه‌های مقابله گیاهان با ویروس‌های گیاهی می‌توان به مقاومت طبیعی گیاهان به ویروس‌های گیاهی و حفاظت تقاطعی اشاره نمود. روش‌هایی که در مهندسی ژنتیک جهت مبارزه با ویروس‌های گیاهی استفاده می‌شود شامل استفاده از ژن‌های مقاومت به ویروس‌ها در گیاهان و استفاده از پلنتی‌بادی‌ها (Plantibodies) اشاره نمود. (Suzuki et al., 2004). از راه‌های کنترل دیگر بیماری‌های ویروسی استفاده از ترکیباتی است که می‌توانند گیاه را در مقابل عوامل بیمارگر ویروسی مقاوم سازند. مقاومت سیستمیک اکتسابی (Systemic Acquired Resistance, SAR) باعث مقاومت طولانی مدت به آلودگی‌های ثانویه طیف وسیعی از بیمارگرها مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌شود (Durrant et al., 2004). برای تعدادی از بیمارگرها مسیرهای سیگنال‌دهی اتیلن و اسید جاسمونیک، در فرایند SAR شناسایی شده است، اما نقش این ترکیبات در فرایند SAR القا شده توسط ویروس نامشخص است. بسیاری از مسیرهای سیگنال‌دهی و اجزای آن‌ها در پاسخ فوق حساسیت (Hypersensitive Response) HR و SAR نقش دارند. برای نمونه، اسید سالیسیلیک اهمیت زیادی در طول HR دارد اما یک عملکرد ثابت در طول HR تا ۹۵ درصد در یک پاسخ دفاعی ایجاد شده توسط گیاه مقاوم به ویروس موزائیک توتون کاهش یابد (White, 1979). توسعه مقاومت اکتسابی سیستمیک نیاز به حرکت یک سیگنال از طریق آوند آبکش از بخش میاه‌زنی شده با بیمارگر به بخش‌های دیگر گیاه دارد (Ross, 1966). در خیار و توتون میزان اسید سالیسیلیک در آوند آبکشی در زمان فعال شدن مقاومت اکتسابی سیستمیک افزایش می‌یابد (Métraux et al.,

های دفاعی، حداقل در ایران انجام نشده است، لذا این تحقیق با هدف استفاده از ترکیبات اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک بر علایم ناشی از بیماری ویروسی موزائیک کدوئیان (CMV) و همچنین تأثیر آن بر روی بعضی از مکانیسم های دفاعی گیاه خیار انجام شد.

مواد و روش ها

ایزوله بیمارگر: منبع ویروس از آزمایشگاه بیماری شناسی دانشگاه کردستان (اهدایی از دکتر عبدالباسط عزیزی، دانشگاه کردستان) دریافت شد. به منظور آلوده سازی گیاهان خیار از عصاره گیاه خیار آلوده به CMV به عنوان مایه بیمارزا استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا برگ های جوان و دارای علایم موزائیک و بدشکلی از گیاه آلوده جدا شدند و سپس عصاره گیاهی آلوده به ویروس با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار با pH=۷ تهیه شد. محلول حاصل روی برگ های جوان گیاه سالمی که قبلاً با پودر کاربوراندوم گردپاشی شده است، مالیده شد. گیاهان مایه-زنی شده تا ظهور نشانه های آلودگی در شرایط گلخانه نگهداری شدند. از میزبان توتون جهت تکثیر ویروس CMV در گلخانه استفاده شد. پس از گذشت بیست الی بیست و پنج روز بعد از مایه زنی، با مشاهده علایم بیماری، برگ های آلوده به CMV جمع آوری و در دمای منفی هشتاد درجه سلسیوس جهت انجام آزمایش های بعدی نگهداری شدند.

مطالعات گلخانه ای: این آزمایش در گلخانه دانشکد کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین انجام شد. در این پژوهش از بذر خیار رقم ناگین استفاده شد. ابتدا دو بذر در هر گلدان استریل حاوی پیت ماس، خاک و پرلیت استریل به نسبت (۱:۱:۱) کشت شدند. گلدان ها با آب مقطر استریل آبیاری و در مواقع لزوم از کود قابل حل در آب (20;20;20 NPK) به مقدار مساوی در هر تیمار استفاده شد (Hussein et al., 2016). برای آماده سازی محیط مناسب برای رشد بوته های خیار و اعمال تیمارهای مختلف در گلخانه، فضای مشخصی انتخاب و محصور شد و با تور پارچه ای جهت جلوگیری از ورود حشرات ناقل محصور

ناتوان در تولید اسید سالیسیلیک به ویروس چروکیدگی شلغم، حساس باقی می ماند. مقاومت به ویروس رگبرگ روشنی شلغم می تواند توسط اسید سالیسیلیک در جهش یافته npr1 آراییدوپسیس القا شود (Wang et al., 2002).

اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک از تکثیر و حرکت ویروس جلوگیری می کنند و به نظر می رسد که این عمل از طریق ژن های ویژهای به نام MAPK صورت می پذیرد (Hettenhausen et al., 2014).

گیاهان برای مقابله با بیمارگرها و جلوگیری از تولید ROS، مجهز به سیستم آنتی اکسیدان هستند که در بین آن ها آنزیم های پراکسیداز (POX)، کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (Gholamnezhad, 2019; Gholi-Tolouie et al., 2017). افزایش H_2O_2 موجب تنش اکسیداتیو در گیاه شده و باعث افزایش فعالیت آنزیم های مانند کاتالاز و پراکسیداز می شود. حضور رادیکال H_2O_2 در غلظت های پایین به عنوان یک سیگنال عمل نموده و موجب فعال شدن رونویسی از ژن های آنتی اکسیدان و افزایش بیان آن ها می شود (Song et al., 2009). برهمکنش مستقیم پروتئین 2b ویروس موزائیک خیار و کاتالاز سه در آراییدوپسیس موجب کاهش فعالیت آنتی اکسیداتیو آنزیم کاتالاز و متعاقب آن، افزایش مقدار H_2O_2 موجب مرگ سلولی می گردد (Inaba et al., 2011). استفاده از عصاره های گیاهی حاوی هورمون های گیاهی مانند اسید سالیسیلیک موجب افزایش بیان آنزیم های آنتی اکسیدان در خیار آلوده به CMV شده و این امر بیانگر نقش این هورمون ها در القای مقاومت به ویروس است (Lewsey et al., 2009). افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم پراکسیداز یکی از روش های افزایش مقاومت فلفل به آلودگی ویروس موزائیک زرد فلفل (PYMV) گزارش شده است (Goncalves et al., 2013).

از آنجایی که بیماری ویروس موزائیک خیار یکی از بیماری های مهم ویروسی این گیاه می باشد و از طرفی دیگر تا به حال تحقیقی در مورد استفاده از القاگرهای گیاهی مانند اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک در مورد بیماری ویروسی خیار گلخانه ای با عامل ویروس CMV و همچنین بررسی بیان ژن

گردید. در مجموع، چهار تیمار شامل اسید سالیسیلیک با غلظت ۱/۵ میلی مول (مرک آلمان) + ویروس، اسید جاسمونیک با غلظت ۱/۵ میلی مول (مرک آلمان) + ویروس، اسید سالیسیلیک با غلظت ۱/۵ میلی مول + اسید جاسمونیک با غلظت ۱/۵ میلی مول + ویروس، و ویروس و آب (به عنوان شاهد) در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در نظر گرفته خواهد شد. بعد از گذشت ۱۵ روز که گیاهان به مرحله چهار برگی رسیدند، تیمارهای مذکور بر روی گیاهان انجام شدند. محلول اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک به غلظت ۱/۵ میلی مول تهیه شدند. حدود ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی، گیاهان با ویروس موزائیک خیار (متعلق به زیرگروه یک) به طور مکانیکی مایه زنی شدند. این ویروس بر روی گیاه توتون تکثیر شد. بدین ترتیب که به ازای ۰/۱ گرم بافت گیاهی، یک میلی لیتر از بافر مایه زنی استفاده شد و بافت گیاهی در داخل هاون چینی به خوبی ساییده شد و عصاره حاصل برای مایه زنی مورد استفاده قرار گرفت (Sudhakar et al., 2006).

به منظور بررسی علائم ظاهری بیماری در گیاهان تیمار شده، بیست و پنج روز پس از اعمال تیمارها شدت علائم اندازه گیری شد. شدت بیماری به صورت درصدی از برگ های دارای علائم بیان شد. ی این کار طبق پروتکل Sudhakar et al., 2006 استفاده شد. در این روش، بر اساس شدت بیماری و علائم برگ های ناشی از آن، کدهایی به صورت اعداد صفر تا پنج در نظر گرفته شد، به طوری که عدد صفر بیانگر عدم علامت بیماری و امتیازهای بعدی به ترتیب افزایش شدت بیماری را نشان می دهد. سپس با استفاده از فرمول زیر شدت بیماری (DS) محاسبه شد:

(مجموع تعداد نمونه برگ $\times$ کد بیماری هر برگ) / (تعداد نمونه های برگ $\times$ حداکثر کد بیماری مشاهده شده طی آزمایش) = DS

بررسی بیان ژن های دفاعی: به منظور بررسی میزان بیان ژن های آنزیم های آنتی اکسیدان، نمونه برداری از برگ های بالای گیاهان تیمار شده در زمان های صفر، سه، شش، نه، دوازده و پانزده روز پس از مایه زنی انجام گرفت. نمونه های انتخاب شده در داخل نیتروژن مایع به طور سریع منجمد و بلافاصله به فریزر -۸۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. در حدود چهار هفته پس از کاشت

بذر، نشاها در مرحله دو برگی به گلدان های اصلی منتقل شدند. برای آماده سازی محیط مناسب برای رشد نشاء ها و اعمال تیمارهای مختلف در گلخانه، فضای مشخصی انتخاب و با تور پارچه ای جهت جلوگیری از ورود حشرات ناقل محصور گردید. در ضمن، گلدان ها با محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد استریل و خاک مورد نیاز برای کشت، در اتوکلاو استریل شد. برای این آزمون نیز، در مجموع، چهار شامل اسید سالیسیلیک (مرک آلمان) + ویروس، اسید جاسمونیک (مرک آلمان) + ویروس، اسید سالیسیلیک + اسید جاسمونیک + ویروس، و ویروس و آب (به عنوان شاهد) در سه تکرار در قالب طرح کاملاً 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 و اسید جاسمونیک هر دو، مانند آزمون قبلی، به غلظت ۱/۵ میلی مول انتخاب شدند. حدود ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی، نشاها با ویروس موزائیک خیار که روی گیاه خیار تکثیر شده بود، به طور مکانیکی مایه زنی شدند. به این صورت که به ازای ۰/۱ گرم از بافت گیاهی یک میلی لیتر از بافر مایه زنی استفاده شد و بافت گیاهی در داخل هاون چینی به خوبی ساییده شد و عصاره حاصل برای مایه زنی مورد استفاده قرار گرفت (Sudhakar et al., 2006).

استخراج RNA: برای استخراج RNA کل از نمونه های برگ، از کیت استخراج RNX-plus شرکت سیناژن استفاده شد. کیفیت RNA استخراج شده، به وسیله آگارز یک درصد ارزیابی شد. جهت تعیین درجه خلوص و غلظت نمونه های RNA از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (Thermoscientific, 2000c) استفاده شد. سپس نمونه های RNA با استفاده از آنزیم DNaseI (-RNase) RT-PCR (free, Fermentase) تیمار و به عنوان الگوی واکنش مورد استفاده قرار گرفت. پس از یکسان سازی غلظت نمونه های RNA، cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo scientific) طبق دستورالعمل کیت ساخته شد.

اندازه‌گیری بیان ژن‌های مورد مطالعه: میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش کمی Real time PCR انجام گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان آمده است. واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت ده دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس، سپس ۴۰ چرخه بود. پس از پایان واکنش PCR رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۶۰ الی ۹۵ درجه سلسیوس با اختلاف ۰/۵ درجه سلسیوس در هر چرخه انجام گرفت. به منظور استاندارد کردن داده‌ها، نمونه‌ها با ژن خانه‌دار Tef1 α نرمال شدند. نرخ بیان ژن با استفاده از روش

$\Delta\Delta\text{-CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS ver.9 تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. آنالیز آماری: طرح آماری استفاده شده در این تحقیق در مورد همه آزمون‌ها طرح کاملاً تصادفی است، آنالیز نتایج با استفاده از روش تجزیه واریانس انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش چند دامنه دانکن انجام گرفت. برای آنالیز نتایج از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ استفاده شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در آزمایش
Table 1- Sequence of primers used in the research

ژن هدف	توالی آغازگر	طول قطعه
	Primer sequences	The length of the fragment
پراکسیداز (POX) Peroxidase	F: GGACCTGATGTTCCCTTCA R: CAAGGTCCTCAAAACCAGA	۲۱۰
کاتالاز (CAT) Catalase	F: AGCCGGTGGGAAGATTAGTT R: GATGAGCACACTTTGGAGC	۲۱۵
سوپراکسید دیسموتاز (SOD) Superoxide dismutase	F: AGATGAACGCAGAAGGTGCT R: GCGTGTCCCAAACGTCTAT	۱۹۶
فنیل آلانین آمونیالیز (PAL) Phenylalanine ammonialyase	F: GTTAATCTAACC AAAATGG R: GCGATTGGGTGATGGAGAGTATG	۱۸۵
ژن خانه‌دار (Tef1 α) The housekeeping gene	F: GGGATCTCAAAGGCAAAACA R: AAAAGGGCTTGCGGAGTAAT	۲۱۰

نتایج و بحث

شدت علائم بیماری: نتایج آزمون به کارگیری تیمارهای مختلف بر روی میزان شدت بیماری، نشان داد که بین این تیمارها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۲). علائم بیماری ناشی از CMV نشان داد که حداکثر شدت بیماری DS در گیاه تیمار شده با CMV به میزان ۶۸/۸۵ درصد مشاهده شد. در تیماری که اسید سالیسیلیک یا اسید جاسمونیک به همراه ویروس CMV اعمال شدند، شدت علائم کاهش چشمگیری داشت و به طوری که شدت بیماری در تیمارهای هورمونی (اسید سالیسیلیک+اسید جاسمونیک) همراه با ویروس به میزان ۱۰/۲۳ درصد رسید (شکل ۱).

بیان ژن‌های آنتی اکسیدان: تأثیر روزهای نمونه برداری (A) و تیمارهای آزمایش (B) و اثر متقابل آن‌ها (A×B) بر میزان بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). الگوی بیانی چهار ژن منتخب، با استفاده از روش کمی Real-time PCR بررسی شد. میزان بیان ژن‌ها در این تحقیق با استفاده از روش کمیت سنجی نسبی و با کمک پرایمرهای طراحی شده توسط نرم‌افزار Oligo5 انجام شد. در محاسبات، ژن خانه‌دار (House keeping)، (Tef1 α) Translation Elongation factor به عنوان مرجع در نظر گرفته شد. چهار ژن مورد مطالعه شامل ژن‌های رمزکننده پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و فنیل آلانین آمونیالیز بودند. نتایج حاصل از بررسی بیان این چهار ژن در نقاط زمانی مختلف نشان داد که این

به تنهایی، گیاهان تلقیح شده با بیمارگر و هورمون های گیاهی، می باشد. به بیان دیگر میزان بیان ژن در این چهار مذکور با گیاهان خیار سالم به تنهایی مقایسه شد. خلاصه داده ها (میانگین مربعات) مربوط به تجزیه واریانس میزان بیان ژن ها در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از تجزیه واریانس برای هر ژن، میانگین مربوط به هر ژن با استفاده از روش دانکن مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها به صورت نمودار بیان شده است.

ژن ها در زمان های مختلف و همچنین تحت تیمارهای مختلف تغییرات بیان نشان دادند. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن ها در طی نقاط زمانی از روش لیواک استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ به منظور بررسی تغییر بیان ژن استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001).

میزان بیان چهار ژن، به صورت مقایسه چهار تیمار گیاهان تلقیح شده با آب مقطر استریل به تنهایی، گیاهان تلقیح شده با بیمارگر

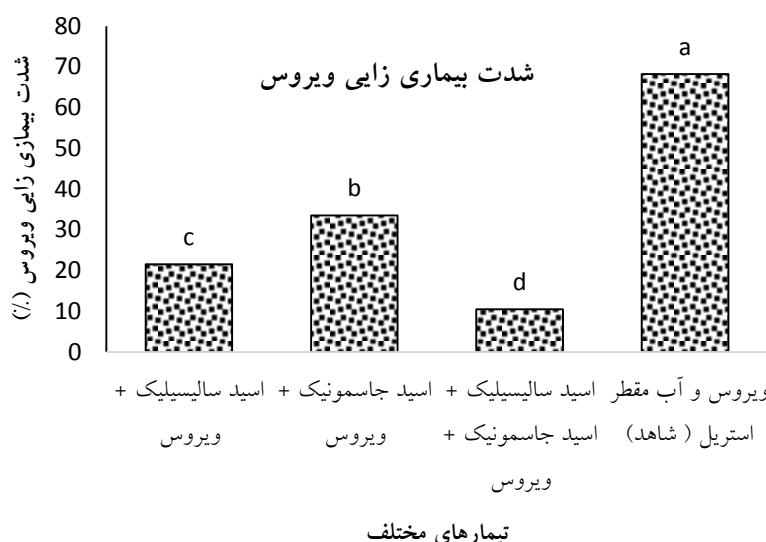
جدول ۲- تجزیه واریانس آزمون تأثیر تیمارهای مختلف بر شدت بیماری ناشی از ویروس CMV بر روی گیاه خیار در شرایط گلخانه

Table 2 - Analysis of variance of the effect of different treatments on the severity of CMV virus disease of cucumber in greenhouse conditions

منابع تغییرات (Source of variation)	درجه آزادی (Degrees of freedom)	مجموع مربعات (Sum of squares)	میانگین مربعات (Mean of squares)	F
تیمار	۳	۵۶۲۷/۷۵	۱۸۷۵/۹۱	۴۰۷/۷**
خطا	۸	۳۶/۸۰	۴/۶۰	
کل	۱۱	۵۶۶۴/۵۶		

** به احتمال ۹۹ درصد ($P \leq 0.01$) اختلاف معنی دار است. C.V = ۶/۴۱٪، داده ها نرمال بودند.

41.6% C.V =, data were normal. ** 99% ($P \leq 0.01$) probability of significant difference.



شکل ۱- میزان بیماری ایجاد شده بعد از ۲۵ روز بر روی گیاه خیار (رقم نگین) توسط ایزوله CMV بیماری زا در آزمون میزان شدت بیماری. هر تیمار دارای سه تکرار بوده و تیمارهایی که دارای حروف مشترک نیستند در آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند ($P \leq 0.01$). داده ها نرمال بودند.

Fig 1. The amount of disease created after 25 days on cucumber plant (Negin cultivar) by pathogenic CMV isolate in disease severity test. Each treatment has three replications and the treatments that have common letters are not significantly different in Duncan test ($P \leq 0.01$). Data were normal.

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد بررسی درگیر در برهمکنش گیاه خیار و هورمون‌های گیاهی و بیمارگر CMV

Table 3 - Analysis of variance of changes in the expression of genes involved in the interaction of cucumber plant and plant hormones and CMV pathogen

نام آنزیم Enzyme name	پراکسیداز Peroxidase	کاتالاز Catalase	سوپراکسیددیسموتاز Superoide dismutase	فنیل آلانین آمونیالایز Phenylalanine ammonialyase
تیمار	۳۲/۶۹**	۴۵/۱۹**	۲۱/۵۶**	۹۳/۳۷**
خطا	۰/۹۹	۳/۲۷	۲/۹۸	۳/۷۷
ضریب تغییرات	۷/۲۱	۷/۷۱	۸/۳۶	۳/۲۲

** به احتمال ۹۹ درصد ($P \leq 0.01$) اختلاف معنی‌دار است. هر عدد میانگین چهار تکرار است.

** 99%probability ($P \leq 0.01$) difference is significant. Each number is an average of four repetitions

تمام روزهای نمونه‌برداری معنی‌دار بود. همان‌طوری‌که ذکر شد بیشترین میزان بیان ژن کاتالاز مربوط به تیمار کاربرد توأم هر سه عامل در روز نهم به میزان نسبی ۴۰۱/۷۱ برابر میزان بیان این ژن در گیاه مایه‌زنی شده با آب مقطر در همین روز می‌باشد. کمترین میزان بیان ژن هم مربوط به کاربرد همه تیمارها در روز صفر (بلافاصله بعد از مایه‌زنی به وسیله تیمارها) بود که هیچ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. باتوجه به این موضوع که بیمارگر به تنهایی باعث میزان کمی القا در تمام روزهای نمونه‌برداری نسبت به شاهد سالم بود، اما در هر صورت بین چهار تیمار مورد بررسی، در تمام روزهای نمونه‌برداری، کمترین میزان بیان را به خود اختصاص داده بود. و کمترین میزان بیان ژن کاتالاز در تمام روزهای نمونه‌برداری (به غیر از روز صفر) مربوط به روز سوم و به میزان بیان نسبی ۲/۶۰، مورد مشاهده قرار گرفت.

پراکسیداز (Peroxidase) یا POX

بر اساس شکل ۳ میزان بیان ژن رمزکننده آنزیم پراکسیداز روندی مانند میزان بیان ژن کاتالاز داشت که قبلاً در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفته بود. بیشترین میزان بیان ژن پراکسیداز را تیمار کاربرد توأم بیمارگر و هر دو هورمون نشان داد و این تیمار همواره با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. بعد از این تیمار، تیمار کاربرد اسید سالیسیلیک قرار داشت و در رتبه سوم هم تیمار کاربرد اسید جاسمونیک قرار داشت. در مورد این آنزیم القا به‌وسیله بیمارگر به تنهایی صورت گرفت اما مانند ژن‌بررسی شده قبلی (کاتالاز) کاربرد توأم اسید سالیسیلیک، اسید

بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق، در طول ۱۵ روز بعد از آلودگی با ویروس CMV و همچنین تیمار با استفاده از هورمون‌های گیاهی دستخوش تغییرات شد.

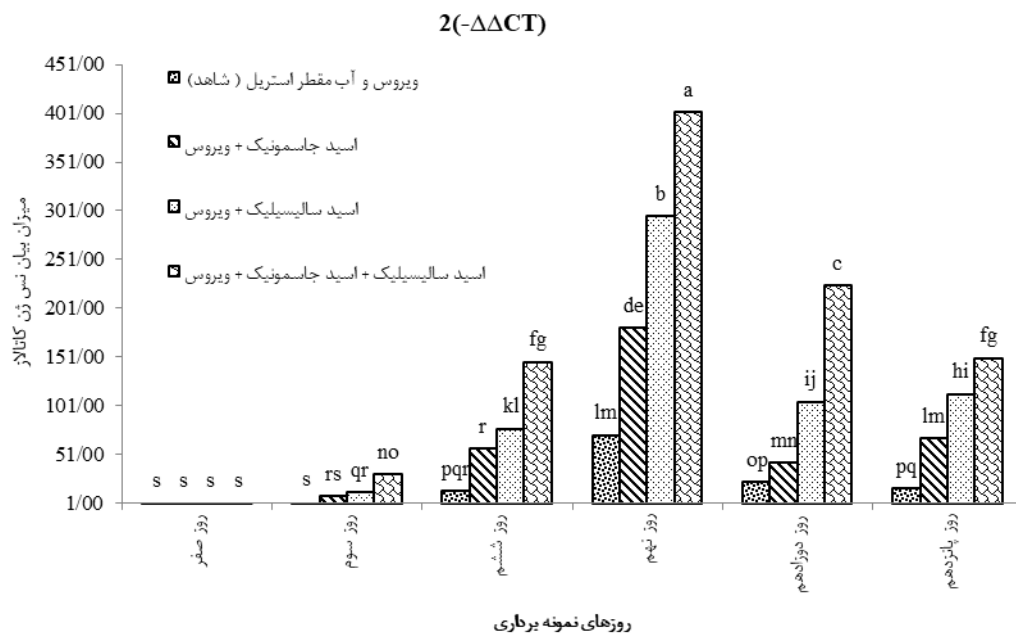
بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های پراکسیداز (POX)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسیددیسموتاز و فنیل آلانین دیسموتاز در گیاهان تیمار شده تا روز نهم پس از اعمال تیمارها روند صعودی داشت. اما این روند صعودی در مورد گیاهان شاهد (تیمار شده با آب ویروس) به صورت بسیار کمتر مورد مشاهده قرار گرفت. بیشترین میزان بیان ژن در مورد آنزیم‌های مورد مطالعه نسبت به گیاه شاهد (مایه زنی شده با استفاده از مقطر) مربوط به آنزیم کاتالاز (۴۰۱/۷)، و بعد از آن به ترتیب مربوط به آنزیم‌های پراکسیداز (۲۶۶/۸)، سوپراکسیددیسموتاز (۱۵۲/۷) و فنیل آلانین-آمونیلایز (۱۰۱/۸) است.

بیان ژن کاتالاز (Catalase) یا CAT

بر اساس شکل ۲ میزان بیان ژن رمزکننده آنزیم کاتالاز در طول پانزده روز نمونه‌برداری، تا روز نهم افزایش در همه تیمارها نشان داد. بیشترین میزان بیان ژن این آنزیم در تمام روزهای نمونه‌برداری مربوط به تیمار ترکیب اسید سالیسیلیک و جاسمونیک همراه با بیمارگر بود و میزان این افزایش همواره در تمام روزهای نمونه‌برداری دارای اختلاف معنی‌دار با بقیه تیمارها بود. میزان بیان این ژن در تیمار بیمارگر تنها نیز همواره بیشتر از تیمار شاهد (گیاه مایه زنی شده با آب مقطر) بود و این اختلاف نیز در

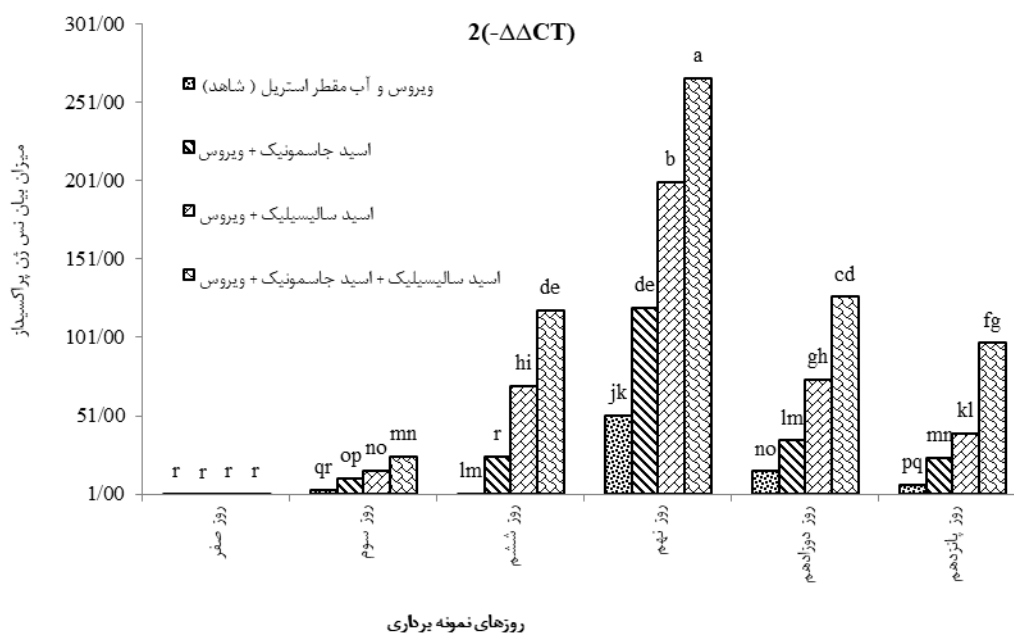
بیمارگر به تنهایی باعث میزان کمی القا در تمام روزهای نمونه برداری نسبت به شاهد سام بود، اما در هر صورت بین چهار تیمار مورد بررسی، در تمام روزهای نمونه برداری، کمترین میزان بیان را به خود اختصاص داده بود. و کمترین میزان بیان ژن پراکسیداز در تمام روزهای نمونه برداری (به غیر از روز صفر) مربوط به روز سوم و به میزان بیان نسبی ۳/۵۹، مورد مشاهده قرار گرفت.

جاسمونیک و بیمارگر بود که در عمل القای این ژن دفاعی موفق- تر از بیمارگر، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک عمل نمود. بیشترین میزان بیان ژن پراکسیداز مربوط به تیمار کاربرد توأم هر سه عامل در روز نهم به میزان نسبی ۲۶۶/۸۰ برابر میزان بیان این ژن در گیاه مایه‌زنی شده با آب مقطر در همین روز می‌باشد. کمترین میزان بیان ژن هم مربوط به کاربرد همه تیمارها در روز صفر (بلافاصله بعد از مایه‌زنی به وسیله تیمارها) بود که هیچ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. باتوجه به این موضوع که



شکل ۲- الگوی بیان ژن رمزکننده آنزیم ژن کاتالاز در گیاه خیار تحت تیمار ویروس، اسید جاسمونیک و ویروس، اسید سالیسیلیک و ویروس، و همچنین کاربرد توأم اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک و ویروس در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی با بیمارگر، ستون‌هایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد ($p \leq 0.01$) بر اساس آزمون چند دامنه دانکن هستند.

Fig 2. Expression pattern of catalase gene encoding gene in cucumber plant treated with virus, jasmonic acid and virus, salicylic acid and virus, as well as combined use of jasmonic acid and salicylic acid and virus on different days after inoculation with pathogen, columns with different letters Have been shown to have a significant difference at the level of one percent ($p \leq 0.01$) based on Duncan's multiple range test.

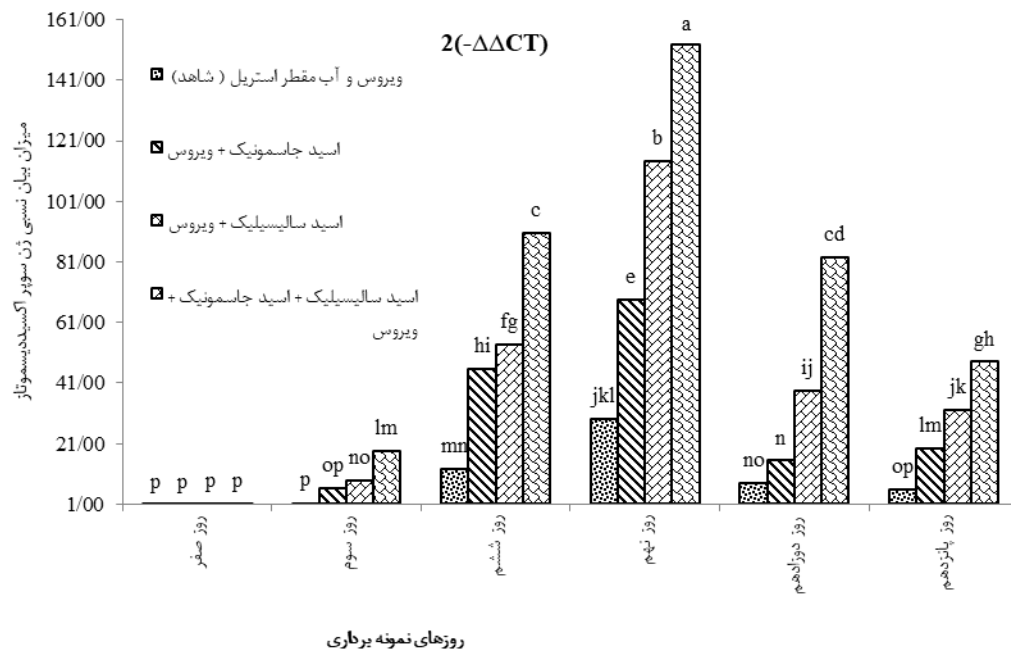


شکل ۳- الگوی بیان ژن رمزکننده آنزیم ژن پراکسیداز در گیاه خیار تحت تیمار ویروس، اسید جاسمونیک و ویروس، اسید سالیسیلیک و ویروس، و همچنین کاربرد توأم اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک و ویروس در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی با بیمارگر، ستون‌هایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد ($p \leq 0.01$) بر اساس آزمون چند دامنه دانکن هستند.

Fig 3. Expression pattern of peroxidase gene encoding gene in cucumber plant treated with virus, jasmonic acid and virus, salicylic acid and virus, as well as combined use of jasmonic acid and salicylic acid and virus on different days after inoculation with pathogen, columns with different letters They are shown to have a significant difference at the level of one percent ($p \leq 0.01$) based on Duncan's multiple range test.

کاربرد توأم قارچ بیمارگر و هورمون‌های گیاهی در روز نهم به میزان نسبی ۱۵۲/۷۵ برابر میزان بیان این ژن در گیاه مایه‌زنی شده با آب مقطر در همین روز می‌باشد. کمترین میزان بیان ژن هم مربوط به همه تیمارها در روز صفر (روز اول نمونه برداری) می‌باشد که هیچ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. باتوجه به این موضوع که بیمارگر به تنهایی باعث میزان کمی القا در تمام روزهای نمونه برداری نسبت به شاهد سالم بود، اما در هر صورت بین چهار تیمار مورد بررسی، در تمام روزهای نمونه برداری (به غیر از روز صفر)، کمترین میزان بیان را به خود اختصاص داده بود، و کمترین میزان بیان ژن نیز در تمام روزهای نمونه برداری (به غیر از روز صفر) مربوط به روز سوم و به میزان بیان نسبی ۲/۰۱، مورد مشاهده قرار گرفت.

سوپراکسید دیسموتاز (Super Oxide Dismotase) یا SOD با توجه به شکل ۴ میزان بیان ژن رمزکننده سوپراکسید دیسموتاز (Super Oxide Dismotase) یا SOD در طول روزهای نمونه برداری دارای روند افزایشی بود. ترتیب تیمارها در افزایش بیان ژن‌های دفاعی مانند قبل بودند، در این مورد نیز ترکیب توأم عامل بیمارگر (CMV) و هورمون‌های گیاهی (اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک) توانست میزان بیان این ژن را نسبت به سایر تیمارها افزایش دهد، در رتبه بعدی اسید سالیسیلیک به همراه ویروس بیمارگر بود که توانست میزان بیان ژن را افزایش دهد، و اسید جاسمونیک در رتبه سوم و ویروس بیمارگر نیز در رتبه چهارم، از نظر افزایش میزان بیان این ژن، قرار داشتند. اختلاف بین تیمارهای مذکور در تمام روزهای نمونه برداری همواره معنی‌دار دیده شد. بیشترین میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز به تیمار



شکل ۴- الگوی بیان ژن رمزکننده آنزیم ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در گیاه خیار تحت تیمار ویروس، اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک و کاربرد توأم اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک در روزهای مختلف پس از مایه زنی با بیمارگر، ستون‌هایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد ($p \leq 0.01$) بر اساس آزمون چند دامنه دانکن هستند.

Fig 4. Expression pattern of superoxide dismutase (SOD) gene encoding gene in cucumber plant treated with virus, jasmonic acid, salicylic acid and combined use of jasmonic acid and salicylic acid on different days after inoculation with pathogen, columns marked with different letters Significant differences at the 1% level ($p \leq 0.01$) are based on Duncan's multiple range test.

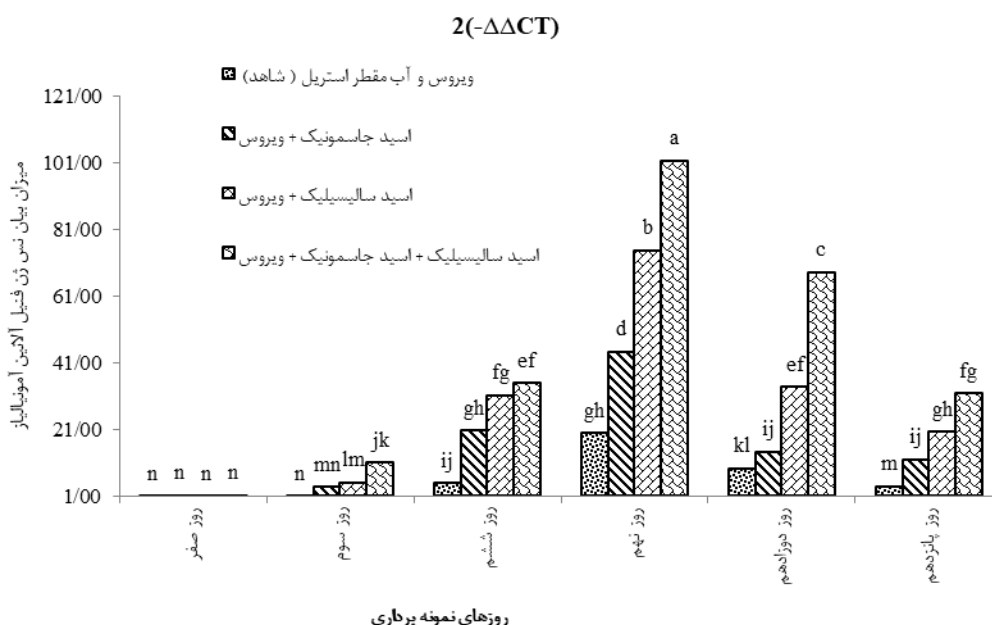
توأم ویروس بیمارگر و هورمون‌های گیاهی بیشترین تأثیر را بر روی میزان بیان این ژن داشت و این نکته نشان می‌دهد که این ژن در حضور هورمون‌های گیاهی و ویروس بیمارگر در گیاه خیار دارای بیان بیشتری است، به عبارت دیگر این هورمون‌ها دارای ترکیباتی هستند که می‌توانند بر روی بیان این ژن اثر بگذارد و آن را فعال کند. بیشترین میزان بیان ژن فنیل‌آلانین-آمونیلایز در روز نهم به میزان نسبی ۱۰۱/۸۳ برابر میزان بیان این ژن در گیاه مایه زنی شده با آب مقطر در همین روز می‌باشد. کمترین میزان بیان ژن هم مربوط به همه تیمارها در روز صفر (روز اول نمونه برداری) می‌باشد که هیچ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. باتوجه به این موضوع که بیمارگر به تنهایی باعث میزان کمی القا در تمام روزهای نمونه برداری نسبت به شاهد سالم بود، اما در هر صورت بین چهار تیمار مورد بررسی، در تمام روزهای نمونه برداری (به غیر از روز صفر)، کمترین میزان بیان را به خود

فنیل‌آلانین‌آمونیلایز (Phenyle alanine aminolase) یا PAL با توجه به شکل ۵ میزان بیان ژن فنیل‌آلانین‌آمونیلایز (Phenyle alanine aminolase) نیز مانند ژن‌های دیگر مورد مطالعه در این تحقیق تا روز نهم در همه تیمارها افزایش یافته و سپس تا روز پانزدهم دارای روند کاهش بوده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار استفاده توأم بیمارگر و هورمون‌های گیاهی (اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک) مورد مشاهده قرار گرفت و در تمام روزهای نمونه‌برداری به غیر از روز دوازدهم این تیمار با بقیه تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود. بعد از تیمار استفاده توأم بیمارگر و هورمون‌های گیاهی تیمار کاربرد اسید سالیسیلیک به همراه بیمارگر بیشترین القا را در بیان این ژن به وجود آورد و در رتبه‌های بعدی به ترتیب تیمارهای اسید جاسمونیک به همراه ویروس بیمارگر و در آخر هم کاربرد ویروس بیمارگر به تنهایی بود. در مورد این آنزیم نیز ویروس بیمارگر به میزان کمتری توانست که ژن این آنزیم را القا کند. همانطور که گفته شد کاربرد

آینده نگری و در نظر گیری منافع دراز مدت، با هجوم بی وقفه و استفاده بی رویه از منابع، منافع کوتاه مدت را ترجیح داده و با تداوم این خط مشی، مسیر قهقرایی و زوال آن را برای خویش رقم زده است. از سوی دیگر رشد فزاینده جمعیت مستلزم غذای بیشتر و در نهایت استفاده از نهاده های شیمیایی اجتناب پذیر است (Gholamnezhad, 2017). تیمار خارجی گیاهان با اسید سالیسیلیک (SA)، جاسمونات ها و برخی مواد دیگر سبب تجمع پروتئین های مرتبط با بیماریزایی، القای ژن های مقاومت به پاتوژن ها PR و در نهایت کاهش خسارت ناشی از چندین عامل بیمارگر روی محصولات مختلف شده است (Kalachova et al., 2012).

اختصاص داده بود، و کمترین میزان بیان ژن نیز در تمام روزهای نمونه برداری (به غیر از روز صفر) مربوط به روز سوم و به میزان بیان نسبی ۱/۱۸، مورد مشاهده قرار گرفت.

استفاده بی رویه از سموم شیمیایی توسط انسان لطمه های جبران ناپذیری را به محیط زیست وارد نموده، علاوه بر این به علت استفاده مداوم از این ترکیبات، آفات و بیماری های گیاهی به این سموم مقاوم شده و در دفعات بعدی استفاده از این ترکیبات شیمیایی، باید مقدار بیشتری از این مواد را استفاده نمود (Gholamnezhad et al., 2016). مشکلات زیست محیطی که دنیای امروز با آن روبروست ناشی از برخورد غیر منطقی انسان با محیط زیست و استفاده از منابع پایه است به طوری که به جای



شکل ۵- الگوی بیان ژن رمزکننده آنزیم ژن فنیل آلانین آمونیالایز (PAL) در گیاه خیار تحت تیمارهای متفاوت عصاره پوست گردو روزهای مختلف پس از مایه زنی با بیمارگر، ستون هایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، دارای اختلاف معنی دار در سطح یک درصد ($p \leq 0.01$) بر اساس آزمون چند دامنه دانکن هستند.

Fig 5. Expression pattern of phenylalanine ammonialyase (PAL) gene encoding gene in cucumber plant under different treatments of walnut skin extract on different days after inoculation with the pathogen, columns marked with different letters, with a significant difference in level one Percentages ($p \leq 0.01$) are based on Duncan's multiple range test.

مسافت طولانی جلوگیری کند. فاکتورهای رونویسی خانواده های MYB، TGA و WRKY در مقاومت اسید سالیسیلیک به ویروس ها نقش دارند. اسید سالیسیلیک بیان پروتئین های مرتبط با بیماریزایی را از طریق یک مسیر وابسته به NPR1 در پاسخ فوق حساسیت و مقاومت اکتسابی سیستمیک القا می کند. مسیر سیگنال دهی مستقل از NPR1 شکل متفاوتی از انتقال سیگنال وابسته به

اسید سالیسیلیک نقش مهمی در دفاع گیاهان علیه ویروس ها ایفا می کند. مقاومت اکتسابی سیستمیک القا شده توسط اسید سالیسیلیک باعث مقاومت طولانی مدت به طیف وسیعی از بیمارگرها از جمله ویروس ها می شود. در مورد ویروس ها، اسید سالیسیلیک می تواند از سه مرحله اساسی در چرخه بیماریزایی ویروس شامل همانندسازی، حرکت سلول به سلول و حرکت در

شیکیمات نسبت داد و همچنین حضور ازن موجب تغییر در فعالیت های آنزیمی (به ویژه آنزیم های آنتی اکسیدان)، سطوح نسخه برداری و مقدار پروتئین های PR شد که ناشی از افزایش سریع در تولید درون زاد اسیدسالیسیلیک است (Sudhakar et al., 2006).

در تحقیقی، تأثیر اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک در بیان ژن های رمزکننده ی آنزیم های آنتی اکسیدانت و القای مقاومت به تنش اکسیداتیو ناشی از مایه زنی با ویروس CMV در گوجه فرنگی (رقم فلات) بررسی گردید. نتایج نشان داد که در گیاهان شاهد، بیان ژن های رمزکننده آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز تا روز پانزدهم پس از نشا روند نزولی داشت، ولی در مورد ژن رمز کننده آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز در روز پانزدهم اندکی افزایش بیان مشاهده شد. در گیاهان مایه زنی شده با CMV، ژن CAT کاهش بیان نشان داد، ولی ژن POX تا روز هشتم افزایش بیان شد. کاربرد هورمون ها، شدت بیماری و علائم آن را تا ۸۰ درصد کاهش داد. نقش آنزیم پراکسیداز در گوجه فرنگی رقم فلات در پاکسازی رادیکال H_2O_2 بیشتر از نقش کاتالاز بود و به نظر می رسد که برای القای مقاومت به CMV می توان از هورمون های اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک قبل از آلودگی ویروسی استفاده کرد (Gholi-Tolouie et al., 2007).

انفجار اکسایشی که در پاسخ به اسید سالیسیلیک القا می شود نه تنها سلول را از آسیب اکسایشی حفاظت می کند بلکه باعث احیا شدن سلول می شود که منجر به فعال شدن مکانیسم های آنتی اکسیدانی و در نهایت فعال شدن مقاومت اکتسابی سیستمیک می شود. بعضی از ژنها مانند گلوکاتایون-S - ترانسفراز که به میزان بالایی بعد از انفجار اکسایشی توسط اسید سالیسیلیک بیان می شوند در حفاظت گیاه علیه استرس اکسایشی لازم هستند (Uquillas et al., 2004). در توتون به دنبال مقاومت ایجاد شده توسط ژن N به ویروس موزائیک توتون، اسید سالیسیلیک باعث بیان ژن MYB1 می شود (Yang et al., 2016).

در مورد میزان بیان ژن آنزیم کاتالاز مشاهده می شود که این آنزیم با بیمارگر بیشتر از عصاره گیاهی در گیاه خیار القا شده است. با توجه به بالا رفتن بسیار زیاد بیان این ژن در گیاه خیار بعد از

اسید سالیسیلیک بوده و برای مقاومت اختصاصی علیه ویروس ها لازم است. اسید سالیسیلیک همچنین بیان ژن های RNA پلی مرز وابسته به RNA آرابیدوپسیس و توتون را القا می کند که نقش مهمی در خاموشی RNA ایفا می کند. در نهایت با شناخت بیولوژی اسید سالیسیلیک و مسیرهای سیگنال دهی آن می توان مقاومت به تنش ها و عملکرد محصولات را افزایش داد (Tahmasebi et al., 2011; Hadian and Rahnama, 2011).

تحقیقات دیگری نشان داده است که اسیدها شامل اسید سیتریک، اسید سالیسیلیک، اسید گلووتاریک می توانند اثر ضدویروسی داشته باشند. بیشتر ویروس ها به کاهش pH حساس هستند و اسیدها که دارای PH پایین هستند می توانند با اثر بر پروتئین های کپسیدی یا لیپیدهای و گلیکوپروتئین های موجود در پوشش (انولوپ) ویروس باعث تغییرات برجسته در این اجزا و در نهایت باعث جلوگیری از عفونت زایی ویروس شوند. این مکانیسم با اثر بر پروتئین VP4 کپسید راینوویروس باعث جلوگیری از عفونت- زایی ویروس می شود. بیشتر ویروس ها به محلولهای اسیدی (با pH پایین) و قلیایی (با pH بالا) که به عنوان تمیزکننده های بهداشتی کاربرد دارند، حساس می باشند (Shahbaz et al., 2015).

آزمون به کارگیری تیمارهای مختلف بر روی میزان شدت بیماری ناشی از ویروس CMV نشان داد که حداکثر شدت بیماری در گیاه تیمار شده با ویروس CMV تنها به میزان ۶۸/۸۵ درصد مشاهده شد، و استفاده از تیمار توأم اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک به همراه ویروس CMV شدت علائم بیماری را کاهش چشمگیری دادند، به طوری که شدت بیماری در تیمارهای هورمونی (اسید سالیسیلیک+اسید جاسمونیک) همراه با ویروس به پایین ترین مقدار خود رسید. در پژوهشی نقش ازن (به عنوان یک آلاینده اتمسفری) در القای مقاومت سیستمیک به ویروس CMV در گوجه فرنگی مورد مطالعه قرار گرفت، نتایج نشان داد که شدت بیماری در تیمار شاهد ویروس در حدود ۹۴ درصد بود، اما کاربرد ازن در غلظت یک میکرومول منجر به کاهش شاخص بیماری به میزان ۳۲ درصد شد که دلیل این موضوع را می توان، به نقش ازن در تولید اسید سالیسیلیک، تحریک متابولیسم فنل (مسیر فنیل پروپانویید)، بیوستز لیگنین و مسیر

و به تبع آن، فعالیت سیستمهای آنزیمی آنتی اکسیدان باشد (Kuzniak and Sklodowska, 2004).

اسیدسالیسیلیک از طریق مسیری که مستقل از NPR1 است، سیگنال دهی می کند. مسیر انتقال از NPR1 اختصاصی برای مقاومت به ویروس ها لازم است، که در سال ۱۹۹۷ شناخته شده است. در چرخه آلودگی گیاه توسط ویروس، احتمالاً اسید سالیسیلیک می تواند سه مرحله همانندسازی، حرکت سلول به سلول و حرکت طولانی مسافت را توسط کاهش بیان ژنهای گیاهی رمزکننده (فاکتورهای میزبانی) که همانندسازی و حرکت ویروس را حمایت می کنند مورد هدف قرار دهد. همچنین اسید سالیسیلیک ممکن است تجمع بازدارنده های همانند سازی و حرکت ویروس را القا کند. به طور مثال اسید سالیسیلیک همانند سازی ویروس موزائیک یونجه را در پروتوپلاست لوبیا چشم بلبلی ممانعت کرده و باعث ایجاد اختلال در همانندسازی ویروس موزائیک توتون و ویروس ایکس سیب زمینی در توتون می شود (Murphy et al., 1999).

تیمار اسید سالیسیلیک از ورود ویروس موزائیک خیار به آوند آبکشی جلوگیری می کند. البته قابل ذکر است که در میان ویروس ها ممکن است درجات متفاوتی از حساسیت به اثرات اسیدسالیسیلیک وجود داشته باشد. برای مثال آلودگی ویروس Y سیب زمینی در توتون توسط کاربرد اسید سالیسیلیک تحت تأثیر قرار نمی گیرد (Pennazio et al., 1985).

POX و CAT آنزیم های آنتی اکسیدانی هستند که غلظت پراکسید هیدروژن را تنظیم می کنند (Barcelo, 1997). پراکسید هیدروژن می تواند از ورود بیمارگر به داخل بافت گیاهی جلوگیری کند و به سلول های گیاه فرصت داده می شود که واکنش های دفاعی خود را که برای فعال شدن به زمان بیشتری نیاز دارد، تنظیم کند (Kang et al., 2014). با این حال گونه های اکسیژن فعال (AOS) وقتی در طی فرایند بیماری زایی در غلظت های بالا تولید شوند، موجب انجام واکنش های تجزیه، پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب غشاء سلولی، تجزیه پروتئین و تخریب کلروفیل می شوند (Bowler et al., 1992). بنابراین میزان مورد نیاز فعالیت آنتی اکسیدانی برای نگه داشتن غلظت AOS در

اعمال تیمارهای مورد نظر، این نکته تأکید می شود که اولاً باید میزان اکسیژن های فعال در گیاه باید افزایش یابد تا میزان کاتالاز هم بالا رود و ثانیاً میزان القا بسیار زیاد این ژن (بیشترین میزان بیان را در ژن های مورد مطالعه داشت) نشان دهنده نقش مؤثر آن در مکانیسم های دفاعی بر علیه بیمارگرهاست. بیشترین میزان این ژن مربوط به تیمار کاربرد توأم قارچ بیمارگر و عصاره گیاهی در روز نهم به میزان نسبی ۳۱۴/۰۸ برابر میزان بیان این ژن در گیاه مایه زنی شده با آب مقطر در همین روز می باشد. کمترین میزان بیان ژن هم مربوط به تیمار کاربرد عصاره در روز سوم به میزان نسبی ۴/۱۵ برابر میزان بیان این ژن در گیاه سالم در همین روز می باشد.

در مطالعه ای که به وسیله غلام نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۰ در مورد القای پاسخ های دفاعی و کنترل بیولوژیک بیماری کپک آبی میوه سیب *P. expansum* به وسیله مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* (A1) انجام گرفت نتایج نشان داد که این مخمر باعث افزایش فعالیت آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز و همچنین ترکیبات فنلی در میوه سیب شد که میزان این سه نشانگر در روز ششم بعد از مایه زنی با بیمارگر به بیشترین مقدار خود رسیدند، و همراه با افزایش فعالیت این ترکیبات میزان مقاومت القا شده در میوه سیب هم افزایش نشان داد (Golamnezhad et al., 2009).

یکی از سیستم های 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 می شود. آلودگی به CMV موجب افزایش فعالیت این آنزیم می شود (Malerba et al., 2003). فعال شدن سیستم AOX به جای زنجیر تنفسی عادی در گیاه موجب کاهش تولید ATP می شود 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 می گردد (De Gara et al., 2003). طی واکنش فوق حساسیت، سلول های محیط بر نقطه نفوذ بیمارگر، ژن های ویژه ای را فعال می کنند که منجر به مرگ برنامه ریزی شده سلولی (PCD) می شود. به نظر می رسد که مرگ برنامه ریزی شده سلولی، ناشی از افزایش انفجاری در تولید ROS

سطوح نسبتاً پایین ضروری می‌باشد (Larrigaudiere et al., 2004). گونه‌های اکسیژن دوارفعال (ROS) شامل همه مشتقات اکسیژن مولکولی هستند که از اکسیژن فعالتر هستند. این ROS ها قابلیت تأثیرگذاری بر روی تعدادی از فرایندهای سلولی که در واکنش میزبان- بیمارگر درگیر هستند را دارد (Wojtaszek, 1997). در صورتی که انفجار اکسیداسیونی در سلول‌های گیاه مهار نشود منجر به خسارت شدید به گیاه در واکنش ناسازگار می‌گردد و این انفجار به وسیله یک سیستم آنتی‌اکسیدانتی در گیاه راهبری می‌شود (Bakry et al., 2019). زمانی که یک بیمارگر تعامل ناسازگار با گیاه ایجاد می‌کند ابتدا میزان پراکسید هیدروژن در گیاه بالا می‌رود، ولی در ادامه با بیان شدن ژن‌های رمزکننده این آنزیم، میزان کاتالاز در گیاه بالا رفته و سطح پراکسید هیدروژن را در گیاه پایین می‌آورد (Mohamadi et al., 2012). نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز موید همین مطالب است.

آنزیم های پراکسیداز علاوه بر نقش آنتی‌اکسیدانتی در سنتز دیواره سلولی گیاه میزبان از طریق اکسیداسیون فنل‌ها، در سوپرینی شدن و لیگنینی شدن دیواره شرکت دارند و موجب ایجاد سد دفاعی در برابر نفوذ عوامل بیماریزا می‌شوند و به نظر می‌رسد که فعالیت این آنزیم‌ها در روابط متقابل سازگار بین گیاه حساس و بیمارگرها تغییر چندانی ایجاد نمی‌کند (Mohammadi and Kazemi, 2002).

در مقایسه نتایج بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز و مقایسه آن با سه آنزیم دیگر در این مطالعه میزان بیان ژن کاتالاز، هماهنگی بسیار چشمگیری بین بیان این ژن‌ها وجود دارد. به عبارت دیگر درست زمانی که ما شاهد بیشترین بیان ژن کاتالاز هستیم، بیشترین میزان بیان ژن را در بقیه ژن‌ها نیز مشاهده می‌کنیم؛ زمانی که ترکیبات پیام‌رسان مولکولی (Signalling) در سلول (مانند رادیکال‌های آزاد اکسیژن) مقدارشان بالا می‌رود این ترکیبات بر روی بیان ژن‌های متعددی از جمله آنزیم‌های دفاعی تأثیر گذاشته و افزایش بیان آن‌ها را در پی خواهند داشت.

دیواره سلولی یکی از اولین سطوح دفاعی گیاه علیه حمله بیمارگر می‌باشد و پراکسیداز یک آنزیم کلیدی در فرآیند سنتز دیواره سلولی است (Bradford, 1976). پراکسیدازها در فرآیند ساختن

دیواره سلولی مثل اکسیداسیون فنل، سوپرینی کردن و لیگنینی- شدن سلول گیاهی در حین دفاع علیه عامل بیماری شرکت دارند. افزایش فعالیت پراکسیداز با القاء مقاومت ارتباط دارد. در گیاهانی که دفاع خیلی دیر اتفاق می‌افتد، عامل بیماری به راحتی بافت گیاه را کلونیزه میکند. آنزیم کاتالاز پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند و پراکسیداز با اکسیداسیون ترکیبات فنلی آب را تجزیه می‌کند. این آنزیم‌ها به همراه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سیستم‌های اصلی آنزیمی سلول در برابر صدمات اکسیداتیو هستند. پراکسیدازها می‌توانند سوبستراهای مختلفی را در حضور پراکسید هیدروژن اکسید کنند (Yu et al., 2006). آنزیم‌های پراکسیداز در ایزوفرم‌های متعدد در گیاهان و جانوران وجود دارند. پراکسیدازهای گیاهی در دامنه وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی مانند متابولیسم اکسین، بیوسنتز اتیلن، تشکیل لیگنین، فرایندهای نوری، تنفس، رشد و مرگ گیاه علیه عوامل بیمارگر شرکت دارند (Chandru et al., 2007). دی گارا و همکاران بیان کردند که H_2O_2 با تسهیل و کاتالیز واکنش‌های پراکسیداز در ترکیبات ساختاری دیواره سلولی و پلیمریزاسیون لیگنین و سخت شدن دیواره سلولی باعث کاهش سرعت نفوذ عامل بیماری می‌شود. با این حال گونه‌های فعال اکسیژن (Species Oxygen Active) در غلظت‌های بالا در طی بیماری زایی ممکن است موجب انجام واکنش‌های تجزیه‌ای، پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب غشاء سلولی، تجزیه پروتئین و خاموش شدن کلروفیل شوند. بنابراین میزان مورد نیاز فعالیت آنتی‌اکسیدانتی برای نگه داشتن غلظت AOS در سطوح نسبتاً پایین ضروری می‌باشد.

افزایش فعالیت پراکسیداز با القاء مقاومت ارتباط دارد. آنزیم پراکسیداز به صورت ایزوفرم‌های متفاوت باعث جذب اکسیژن فعال در سلول می‌شوند (Prusky, 2003). پراکسیدازهای گیاهی در چرخه فعالیت معمول خود باعث احیا H_2O_2 می‌شوند. علی- رغم نقش بارز این آنزیم در فعالیت‌های دفاعی گیاه علیه عوامل زنده و غیرزنده تعیین دقیق نقش فیزیولوژیک این آنزیم به علت وجود تعداد زیاد ایزوآنزیم‌ها در گیاهان و عدم وجود یک ارتباط دقیق بین ساختار و عملکرد این آنزیم با مشکل روبه‌رو است (Bae et al., 2009).

(2009). ژن‌های *PAL1*، *PAL2* و *PAL4* به مقدار زیادی در اندام‌های گل دهنده که دارای تجمع لیگنین هستند بیان می‌شوند در حالی‌که ژن *PAL3* دارای بیان کمی در این اندام‌هاست.

همان‌گونه که قبلاً هم ذکر شد وقتی بافت‌های گیاه در معرض تنش‌های زیستی و همچنین غیرزیستی قرار می‌گیرند تولید گونه‌های اکسیژن فعال در آن‌ها افزایش پیدا می‌کند. این مولکول‌ها باعث تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک سلول‌ها و همچنین غشاهای زیستی می‌شوند. سلول‌های گیاهی برای کاهش اثرات تخریبی این مولکول‌ها، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان خود از جمله آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) را افزایش می‌دهند (Apel and Hirt, 2004). در تحقیقی مشاهده شد وقتی که اسید سالیسیلیک در غلظت‌های مناسب به صورت خارجی بر روی گیاه استفاده می‌گردد، باعث بالا رفتن توان سیستم آنتی‌اکسیدانی بافت‌های گیاهی از طریق فعال نمودن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز می‌شود (Cao et al., 2010).

سوپراکسیددیسموتاز جز آن دسته از آنزیم‌هایی است که واکنش دیسموتاسیون آنیون سوپراکسید (O_2^-) به اکسیژن و پراکسیدهایروژن را کاتالیز می‌کنند. دیسموتاسیون نوع خاصی از واکنش‌های ردوکس است که در آن یک گونه همزمان، اکسیده و کاهشده شده و دو محصول متفاوت ایجاد می‌کند. بنابراین، سوپراکسیددیسموتازها، آنتی‌اکسیدان‌های دفاعی مهمی تقریباً در تمامی سلول‌ها هستند. آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز از گروه متالوپروتئین‌ها هستند و دارای چندین فرم رایج می‌باشند. بر اساس کوفاکتور فلزی، سه خانواده بزرگ سوپراکسیددیسموتاز وجود دارد: نوع Cu/Zn که هم به مس و هم به روی متصل است، نوع Fe یا Mn که به آهن یا منگنز متصل می‌باشد و نوع Ni که به نیکل متصل است. نوع Cu/Zn اغلب در یوکاریوت‌ها مانند گیاهان، نوع آهن یا منگنز در پروکاریوت‌ها و میتوکندری، و نوع نیکل نیز در پروکاریوت‌ها یافت شده است (Hull, 2013).

جمع‌بندی: در مورد بیماری زایی ویروس CMV و به طور کلی اکثر ویروس‌های بیمارگر گیاهی اطلاعات کاملی در دسترس نیست. جانوران و همچنین گیاهان از یک شبکه پیچیده مسیرهای سیگنال دهی برای افزایش پاسخ‌های دفاعی علیه عوامل مهاجم به

برهمکنش مستقیم پروتئین 2b ویروس موزائیک خیار و کاتالاز سه در گیاه آرابیدوپسیس موجب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیداتیو آنزیم کاتالاز و متعاقب آن، افزایش مقدار H_2O_2 موجب مرگ سلولی می‌شود (Inaba et al., 2011). تحقیقات نشان داده است که در خیار، ایجاد مقاومت القایی سیستمیک (ISR) به تنش‌های زیستی با مسیر سیگنال‌دهی 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 اسیدسالیسیلیک موجب افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گوجه‌فرنگی آلوده به CMV شده است و این امر بیانگر نقش این هورمون‌ها در القای مقاومت به ویروس است (Shahwan, 210).

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز مسئول سنتز ترکیبات فنلی است و با آمین زدائی از اسید آمینه فنیل آلانین آن را به سینامیک‌اسید تبدیل نموده و با فراهم آوردن زنجیره‌ای هیدروکربن حلقه‌ای موجب تولید ترکیبات فنلی ضد بیمارگر در سلول‌ها می‌شود (Z et al., 2011).

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز اولین و کلیدی‌ترین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد که L- فنیل آلانین را با دامیناسیون به یون آمونیوم و ترانس سینامیک‌اسید تبدیل می‌کند (Thuan et al., 2006). بیشتر ترکیبات فنلی (مانند لیگنین‌ها و لیگنان‌ها) که در گیاهان وجود دارند از مسیر فنیل پروپانوئیدی سنتز می‌شوند و طیف گسترده‌ای از نقش‌های فیزیولوژیکی را بر عهده دارند. پلی-مریزاسیون لیگنین و سایر ترکیبات فنلی، دیواره سلولی را در برابر نفوذ و تحلیل رفتن سخت و محکم نگه می‌دارد (Xu et al., 2008).

PAL نقش مهمی در فعالیت‌های دفاعی گیاه مانند بیوستز اسید سالیسیلیک (به عنوان پیام مقاومت سیستمیک در گیاهان عمل می‌کند)، بازی می‌کند (Campos-Vargas and Saltveit, 2002). ژن‌های متعددی در گندم، جو و گیاه مدل آرابیدوپسیس شناسایی شده‌اند که آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید را رمز می‌کنند (Boddu et al., 2007). در گیاه *Arabidopsis thaliana* آنزیم PAL به وسیله چهار ژن *PAL1* تا *PAL4* رمز می‌شود (Huang et al., 2007).

تأثیرگذار است. با درک بهتر مسیرهای سیگنال دهی مقاومت اکتسابی سیستمیک، می توان به راه های مطمئن تری جهت حفاظت گیاهان در برابر عوامل بیمارگر به خصوص ویروس ها دست یافت. مقاومت اکتسابی سیستمیک یک هدف عالی برای کنترل خسارت بیماری های گیاهی مانند ویروس ها می باشد. با شناخت و درک درست از فرایندهای دفاعی و همچنین کارکردهای اسید سالیسیلیک می توان به راه های ایمن تر برای مبارزه با بیمارگرهای گیاهی به جای استفاده از ترکیبات مضر شیمیایی دست یافت.

منابع

- Apel K, Hirt H. 2004.** Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-379.
- Bae YA, Cai GB, Kim SH, ZO YG, Kong Y. 2009.** Modular evolution of glutathione peroxidase genes in association with different biochemical properties of their encoded proteins in invertebrate animals. *BMC Evolutionary Biology* 9:7-18.
- Bakry AB, Abdelraouf RE, Ahmed MA. 2013.** Effect of drought stress and ascorbic acid foliar application on productivity and irrigation water use efficiency of wheat under newly reclaimed sandy soil. *Agriculture* 57: 14398-14403.
- Balodi R, Bisht. S, Ghatak A, Rao, K. 2017.** Plant disease diagnosis: technological advancements and challenges. *Indian Phytopathology* 70(3): 275-281.
- Barcelo AR, 1997.** Lignification in plant cell walls. *International Review of Cytology* , 176: 87-132.
- Boddu J, Cho S, Muehlbauer GJ. 2007.** Transcriptome analysis of tricho-ecene-induced gene expression in barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1364-1375.
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D. 1992.** Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.
- Bowles DJ, 1990.** Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review Biochemistry* 59: 873-907.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Campos-Vargas R, Saltveit ME. 2002.** Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. *Physiology Plant* 114:73-84.
- Cao SF, Hu ZC, Zheng YH, Lu BH. 2010.** Synergistic effect of heat treatment and salicylic acid on alleviating internal browning in cold-stored peach fruit. *Postharvest Biology and Technology* 58(2): 93-97.
- Chandra AR, Saxena A, Dubey P. 2007.** Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 361-367.
- 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.
- 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. Kuzniak
- Duarte LM, Rivas L, Alexandre EB, Harakava MAV, Veauvy MCD. 2013.** Genealogy of Cucumber mosaic virus isolated from ornamental species. *American Journal of Plant Sciences* 4:1081-1087.
- Durrant WE, Dong X. 2004.** Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology* 42: 185- 209.
- El-Argawy E, Adss IA. 2016.** Quantitative gene expression of peroxidase, polyphenoloxidase and catalase as molecular markers for resistance against *Ralstonia solanacearum*. *American Journal of Molecular Biology* 6 (02): 88-100.
- Gholamnezhad J, Sanjarian F, Goltapeh EM, Safaei N, Razavi K. 2016.** Effect of Salicylic Acid on Enzyme Activity in Wheat on Immediate Early Time after Infection with *Mycosphaerella graminicola*. *Scientia agriculturae bohémica* 47 (1): 1-8.
- Gholamnezhad J. 2017.** Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology In Food Industries* 3(1): 53-66.
- Gholamnezhad J. 2019.** Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with

- Botrytis cinerea. Journal of Integrative Agriculture 17(0): 1-10.
- Gholi-Tolouie S, Sokhandan-Bashir N, Davari M, Sedghi M. 2017.** Evaluation of antioxidant genes expression in tomato plants inoculated by Cucumber mosaic virus after treatment with salicylic and jasmonic acids. Genetic Engineering and Biosafety Journal 6(2): 223-235.
- Gorran A, Farzaneh M, Shivazad M, Rezaeian M, Ghasempour A. 2013.** Aflatoxin B1-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (Lamiaceae). Food Control 31: 218-223.
- Hadian S, Rahnema K. 2011.** Comparing Neem extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. Advances in Environmental Biology 5(8): 2052-2057.
- Hettenhausen C, Heinrich M, Baldwin IT, Wu J. 2014.** Fatty acid-amino acid conjugates are essential for systemic activation of salicylic acid-induced protein kinase and accumulation of jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. BMC Plant Biology 14:326-337.
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas W, Wang X. 2009.** The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nature genetics 41 (12): 1275-1281.
- Hull R. 2013.** Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. Phytopathology 92: 51-58.
- 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.
- 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.
- Jones, R.A.C. 2008.** Seed-transmitted of Cucumber mosaic virus (CMV) in chickpea. J. Agri. Research. 130(3):43-47.
- 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.
- Kim CY, Zhang S. 2004.** Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. Plant Journal 38: 142-151.
- Kuzniak E, Skłodowska M. 2004.** The effect of Botrytis cinerea infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. Journal of Experimental Botany 55: 605-612.
- Larrigaudiere C, Vilaplana R, Soria Y, Recasens I. 2004.** Oxidative behaviour of Blanquilla Pars treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. Journal of the Science of Food and Agriculture 84: 1871-1877.
- Lewsey M, Surette M, Robertson FC, Ziebell H, Choi SH, Ryu KH. 2009.** The role of the cucumber mosaic virus 2b protein in viral movement and symptom induction. Molecular Plant-Microbe Interactions 22(6): 642-654.
- 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.
- Louro D, Vicente M, Vaira A, Accotto G, Nolasco G. 2000.** Cucurbit yellow stunting disorder virus (Genus Crinivirus) associated with the yellowing disease of cucurbit crops in Portugal. Plant Disease 84(10): 1156-1156.
- 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 H₂O₂ in sycamore cell cultures and induces alternative respiration and cytochrome c leakage from mitochondria. Physiologia Plantarum 119: 480-488.
- Mardani H, Rakhshandihroo F, Shahbazi S, Shahraeen N. 2019.** Study on the effect of low doses of gamma irradiation alone or in associated with the salicylic acid and indirect temperature on seed borne infection of Bean common mosaic virus in bean plant. Applied Entomology and Phytopathology 87(1 (108)):87-105.
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, WyssBenz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W and Inverardi B. 1990.** Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. Science, 250: 1004-1006.
- 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.
- Murphy AM, Chivasa S, Singh DP, Carr JP. 1999.** Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? Trends plant sciences, 4: 155- 160.
- Nematollahi S, Bashir, NS, Rakhshandehroo F, Zamanizadeh HR. 2012.** Phylogenetic Analysis of New Isolates of Cucumber mosaic virus from Iran on the Basis of Different Genomic Regions. The Plant Pathology Journal 28(4): 381-389.
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki R. 1992.** Cucumber mosaic virus. Advances in virus research 41: 281.
- Pennazio S, Roggero P, Gentile IA. 1985.** Effects of salicylate on virus-infected tobacco plants. Phytopathol 114: 203-213.
- Pieterse CMJ, Van Loon LC. 2004.** NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Curr. Opin. Plant Biology 7: 456-464.
- Prusky D. 2003.** Mechanism of resistance of fruits and vegetables to postharvest diseases. In: Bartz, J., Brecht, J., (Eds), Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables. Marcel Dekker, New York, pp. 581-598.
- Requesens DR, Renee Malone R, Philip D. 2014.** Expression of a Barley Peroxidase in Transgenic Apple (*Malus domestica* L.) Results in Altered Growth, Xylem Formation and

- Tolerance to Heat Stress. *Journal of Plant Sciences* 9(2):58-66.
- Ross AF. 1966.** Systemic effects of local lesion formation. In: Beemster ABR, Dijkstra, eds. *Virus-es of plants*, Amsterdam, North-Holland, 127-150.
- Shahbaz, B., Norouzi, M., Tabatabai, H. 2015.** Mechanism of action and application of virocid in health care associated viral infections, *Tehran University Medical Journal*, 73 (12): 837-855.
- 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.
- 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.
- 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.
- Suzuki H, Xia Y, Cameron R, Shadle G, Blount J, Lamb C and Dixon RA. 2004.** Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *J. Exp. Bot.* 55: 169-179.
- Tahmasebi A, Zangeneh M, Tahmasebi A, Dizaji A, Koohi Habibi M. 2011.** Role of salicylic acid in resistance to plant viruses. *Genetics in the 3rd millennium*, 8(4), 2203-2212.
- Thuan NTN, Bigirimana J, Roumen E, Van Der Straeten D, Höfte M. 2006.** Molecular and Pathotype Analysis of the Rice Blast Fungus in North Vietnam. *European Journal of Plant Pathology* 114(4): 381-396.
- Uquillas C, Letelier I, Blanco F, Jordana X and Holuigue L. 2004.** NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 34- 42.
- Wang CE, Carson RA and Carr JP. 2002.** Chemically induced virus resistance in *Arabidopsis thaliana* is independent of pathogenesis-related protein expression and the NPR1 gene. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 15: 75-81.
- Wang Y, Gaba V, Yang J, Palukaitis P, Galon A. 2001.** Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology* 92: 51-58.
- White RF. 1979.** Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus. *Virology* 99: 410-412.
- Wojtaszek, P. 1997.** Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322: 681- 692.
- 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 J, Kloepper JW, Ryu CM. 2009.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Science*, 14: 1-4
- 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 Microbiology* 7: 1-12.
- Yang YO, Klessig DF. 1996.** Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 14972-14977.
- Yu T, Wu P, Qi J, Zheng X, Jiang F, Zhen X. 2006.** Improved control of postharvest blue mold rot in pear fruit by a combination of *Cryptococcus laurentii* and gibberellic acid. *Biological Control* 39: 128-134.
- Zitter TA, Murphy JF. 2009.** The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research* 71: 9-21.