



مقاله پژوهشی

تأثیر کاربرد چند تنظیم‌کننده رشد و عنصر سیلیسیم بر عکس‌العمل خیار گلخانه‌ای در برابر آلودگی به ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی*

مطهره کریمی^۱، جهانگیر حیدر نژاد^{۲*}، محمد جواد آروین^۳، حسین معصومی^۲ و حمید محمدی^۲

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۷)

چکیده

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (tomato leaf curl Palampur virus, ToLCPaIV) یک بگومو ویروس مخرب است که در سال‌های اخیر باعث خسارت‌های زیادی به محصول گوجه‌فرنگی و انواع کدوئیان در ایران شده است. در پژوهش حاضر، تأثیر چند تنظیم‌کننده رشد شامل سالیسیلیک اسید (SA)، متیل جاسمونات (MJ) و براسینواستروئید (BR)، عنصر سیلیسیم (Si) و اثرات متقابل آنها در برابر واکنش خیار گلخانه‌ای به آلودگی توسط ToLCPaIV مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی و به صورت گلدانی اجرا گردید. قبل از کاشت، بذرها را خیار به مدت ۲۴ ساعت به طور جداگانه در سه تنظیم‌کننده رشد شامل محلول‌های نیم میلی‌مولار SA، پنج میکرومولار MJ و یک میکرومولار BR خیسانده شدند. محلول‌پاشی گیاهچه‌ها با محلول Si با غلظت یک میلی‌لیتر بر لیتر، در مرحله دو تا سه برگگی و مایه‌زنی آنها با استفاده از سازه عفونت‌زای ToLCPaIV یک هفته بعد در مرحله سه تا چهار برگگی انجام شد. به منظور ارزیابی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و شیمیایی شامل شاخص‌های وزن تر بوته، ارتفاع ساقه، و میزان آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز ۳۰ روز پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده نشان داد که تیمارهای SA، ترکیب MJ+Si و ترکیب BR+Si با افزایش فعالیت آنزیم‌ها، باعث تأخیر در بروز نشانه‌های ویروسی و کاهش وزن تر بوته و ارتفاع ساقه شدند. براساس نتایج این تحقیق، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد به تنهایی و یا به همراه عنصر سیلیسیم شامل SA، MJ، MJ+Si و BR+Si می‌تواند باعث افزایش مقاومت گیاه خیار گلخانه‌ای در برابر آلودگی به ToLCPaIV گردد. واژه‌های کلیدی: ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی، تنظیم‌کننده‌های رشد، سیلیسیم، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

*بخشی از رساله کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
**مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jheydarnejad@uk.ac.ir

۱ دانش‌آموخته دوره کارشناسی ارشد، رشته بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲ استاد بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۳ استاد بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان



DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021783.439

Research Article

Effect of application of several growth regulators and silicon element on greenhouse cucumber in response to tomato leaf curl Palampur virus infection

Motahare Karimi¹, Jahangir Heydarnejad^{2**}, Mohammad Javad Arvin³, Hossain Massumi² and Hamid Mohammadi²

(Received: 14.02.2024; Accepted: 05.04.2024)

Abstract

Tomato leaf curl Palampur virus (ToLCPaV) is a destructive bipartite begomovirus which recently is responsible for huge losses to tomato and cucurbits production in Iran. In this research, the effect of the silicon element, growth regulators including salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MJ), brassinosteroids (BR), silicon element (Si) and their interactions to response of ToLCPaV infection of the greenhouse cucumber was studied. The study was performed as factorial experiment based on randomized complete block design and carried out under greenhouse conditions in pots. Before planting, cucumber seeds were presoaked separately in SA (0.5 millimolar), MJ (5 micromolar) and BR (1 micromolar). Subsequently, two or three-leaf stage of cucumber seedlings was sprayed by Si solution (1 ml/lit), one week before agroinoculation with ToLCPaV infectious clone. To analyze morphological and chemical characteristics, plant growth parameters including fresh weight and plant height parameters and amount of the catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase enzymes were assessed 30 days post agroinoculation with ToLCPaV infectious clone. Results indicated that, SA and combination of MJ+Si and BR+Si treatments resulted in raising the enzyme levels which leads to delay in appearance of ToLCPaV symptoms and decrease fresh weight and plant height parameters of plants. Based on the results of this research, application of plant growth regulators with or without silicon element including SA, MJ, MJ+Si and BR+Si could be resulted in increasing resistance in greenhouse cucumber against ToLCPaV infection.

Keywords: tomato leaf curl Palampur virus, growth regulators, silicon, antioxidant enzymes

*A part of MS thesis of the first author submitted to College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

**Corresponding author's E-mail address: jheydarnejad@uk.ac.ir

1. Graduated MS student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
2. Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3. Professor of Horticultural Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

مقدمه

و مشتقات آن‌ها از ترکیبات فنلی هستند (Raskin 1992). این هورمون سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شود (El-Tayeb 2005; Khan *et al.* 2022). مهم‌ترین عملکرد SA پاسخ و مقاومت گیاه میزبان نسبت به برخی تنش‌ها از جمله بیمارگرهای گیاهی (Davis 2005; Singh *et al.* 2004) است و تا حدود زیادی اختلالات ناشی از این نوع تنش‌ها را کاهش می‌دهد. براسینواس‌تروئیدها (BR) گروه دیگری از هورمون‌ها هستند که دارای محدوده فعالیت زیست‌شناسی گسترده‌ای در گیاهان می‌باشند. کاربرد خارجی براسینواس‌تروئید باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده و فعالیت این آنزیم‌ها از جمله سوپراکسیداز دیسموتاز، آسکوربیک‌اسید، توکوفرول‌ها، کارتنوئیدها، گلوکاتینون و غیره را تحت تنش‌های مختلف افزایش می‌دهد (Xiong *et al.* 2022).

جاسمونیک‌اسید (Jasmonic acid, JA) و مشتقات آن‌ها گروه جدیدی از هورمون‌ها هستند که با دخالت در بیان ژن‌های مختلف، گیاهان را در مقابل تنش‌های مختلف محیطی محافظت می‌کنند. این هورمون‌ها بعد از حمله باکتری‌ها و قارچ‌ها به گیاهان و پاسخ‌های ایجاد شده توسط گیاه، در سلول‌های خسارت دیده ترشح می‌شوند و در سازوکارهای دفاعی گیاه در پاسخ به آسیب‌های ایجاد شده توسط حشرات، بیمارگرهای متنوع و تنش‌های محیطی نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Hussain *et al.* 2009; Wu and Ye 2020).

سیلیسیم یک عنصر مفید برای گیاهان به شمار می‌آید. گیاهان تولید شده بدون سیلیسیم، ضعیف‌تر بوده و رشد و تمایز طبیعی را ندارند. کاربرد صحیح این عنصر می‌تواند موجب افزایش سازگاری و تحمل به بیماری‌ها، کاهش بروز کمبودهای غذایی، بهبود کیفیت محصولات و در نهایت افزایش عملکرد محصولات کشاورزی شود (Liagan *et al.* 2005).

مواد شیمیایی القاء‌کننده مقاومت در سال‌های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. این ترکیبات از یک سو سبب فعال‌سازی سازوکارهای دفاعی گیاه قبل از رویارویی با بیمارگر می‌شوند و از سویی دیگر خطرات زیست‌محیطی قابل ملاحظه‌ای به همراه ندارند (Jan *et al.* 2020). یکی از این مواد القاء‌کننده، هورمون‌های گیاهی هستند که سازوکارهای دفاعی مختلفی علیه بیمارگرها را فعال می‌کنند. سازوکارهای دفاعی که توسط تیمار گیاهان با هورمون‌های متفاوت علیه بیمارگرهای مختلف ایجاد می‌شود شامل بیان ژن‌های وابسته به دفاع (Durrant and Dong 2004)، القای پروتئین‌های وابسته به بیمارگرها (pathogenesis related proteins, PRP) و تجمع این پروتئین‌ها در گیاه می‌باشند (dos Santos and Franco 2023).

هورمون‌ها، ترکیبات آلی هستند که به صورت طبیعی در گیاهان عالی ساخته شده و روی رشد و نمو تأثیر دارند. علاوه بر هورمون‌های طبیعی، ترکیبات مصنوعی نیز ساخته شده‌اند که با انواع طبیعی، مطابقت دارند. مجموع هورمون‌ها و ترکیبات مصنوعی تولید شده، تنظیم‌کننده‌های رشد نامیده می‌شوند (George *et al.* 2008). هورمون‌های گیاهی شامل اکسین (auxin)، جیبرلین (gibberelline)، سیتوکینین (cytokinine)، اتیلن (ethylene)، آبسیزیک‌اسید (abscisic acid)، جاسمونات‌ها (jasmonates)، براسینوستروئیدها (brassinosteroids) و سالیسیک‌اسید (salicylic acid) می‌باشند. بعضی از این ترکیبات شامل جاسمونیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید و اتیلن علاوه بر نقشی که در نمو گیاه دارند، تنظیم‌کننده‌های اصلی مقاومت القائی نیز محسوب می‌شوند (dos Santos and Franco 2023; Durrant and Dong 2004).

سالیسیلیک‌اسید (SA) یا ارتو‌هیدروکسی بنزوئیک‌اسید

جاسمونات (پنج میکرومولار) همراه با کاربرد عنصر سیلیسیم با تنظیم کننده های رشد یا بدون کاربرد این عنصر بودند. فاکتور دوم، مایه زنی تیمارهای فوق با سازه عفونت زای ToLCPaIV و عدم مایه زنی ویروس بود. گلدانها با ترکیبی از کود برگی و ماسه بادی (به نسبت ۱:۱) پر شدند. سپس به تعداد شش عدد بذریه خیار رقم Hybrid davose asgrow در هر گلدان و در عمق ۱/۵-۱ سانتی متری از خاک کشت و در دمای °C ۲۵-۲۰ در گلخانه تحت شرایط دمایی کنترل شده و ۱۲ ساعت نور و ۱۲ تاریکی نگهداری شدند. نرمال بودن داده های بدست آمده با استفاده از آزمون های Shapiro-Wilk و Kolmogorov-Smirnov و نرم افزار SPSS (ویرایش ۲۴) مورد بررسی قرار گرفت و نرمال بودن آنها تأیید شد. واکاوی آماری داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS و آزمون GLM صورت گرفت. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ و رسم نمودارها نیز با نرم افزار Excel انجام شد. ویژگی های ریخت شناسی با اندازه گیری وزن تر و ارتفاع گیاهان و ویژگی های بیوشیمیایی با اندازه گیری آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و پروتئین کل مورد بررسی قرار گرفت. قبل از کاشت، بذریه های خیار به مدت ۲۴ ساعت و به صورت جداگانه برای هر هورمون خیسانده شدند (Saheed Ibrahim et al. 2022). یک هفته قبل از تزریق ویروس، محلول پاشی گیاهچه ها در مرحله دو تا سه برگی با عنصر سیلیسیم با غلظت یک میلی لیتر بر لیتر انجام شد.

آماده سازی و مایه زنی سازه عفونتزا

منبع اولیه ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی در این مطالعه، دو سازه دوپار برای قطعات ژنومی A و B بود که قبلاً ساخته شده بود (Sabouri and Heydarnejad 2013b). باکتری های حاوی سازه عفونتزا شامل قطعات

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی یک بگومو ویروس با ژنوم دوبخشی است که نخستین بار از گوجه فرنگی از کشور هند (Kumar et al. 2008) و سپس از محصولات متعددی مانند گوجه فرنگی، لوبیا و برخی از انواع کدوئیان شامل خیار، طالبی، خربزه، شَما و کدو در گلخانه های تجاری، تونل های پلاستیکی و مزارع روباز از ایران گزارش گردید (Heydarnejad et al. 2009; Heydarnejad et al. 2013). در میان انواع مختلف کدوئیان، خیار گلخانه ای یکی از محصولات بسیار حساس نسبت به این ویروس است. در یک مطالعه، واکنش ۱۶ رقم مختلف خیار گلخانه ای در برابر این ویروس با استفاده از سازه عفونت زای ToLCPaIV مورد بررسی قرار گرفت و تمامی ارقام مورد مطالعه به این ویروس، حساس تشخیص داده شدند (Sabouri and Heydarnejad 2013a). در مطالعه ای دیگر، میزان آلودگی طبیعی ناشی از این ویروس در برخی از مزارع و گلخانه های خیار در شهرستان جیرفت صد درصد تخمین زده شد (Heydarnejad et al. 2009). با توجه به ظرفیت بالای ایجاد خسارت توسط این ویروس، یافتن روش های کم هزینه، آسان و سالم ضروری به نظر می رسد. به همین منظور در این تحقیق، تأثیر تنظیم کننده های رشد شامل SA، BR و MJ به همراه عنصر سیلیسیم در برابر بیماری ناشی از ToLCPaIV در خیار مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش بررسی

طرح آزمایشی

آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی (Factorial experiment based on randomized complete block design) با دو فاکتور و در سه تکرار اجرا گردید. فاکتور اول شامل تیمارهای براسینواستروئید (یک میکرومولار)، سالیسیلیک اسید (نیم میلی مولار) و متیل

در هفته سم‌پاشی شدند. گیاهان مورد آزمایش، از هفت تا ده روز بعد از مایه‌زنی جهت مشاهده نشانه‌های مورد نظر و تأثیر هورمون‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی و ارزیابی گیاهان برای تأثیر هورمون‌های مورد نظر تا ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی ادامه یافت.

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

ده روز بعد از مایه‌زنی، نشانه‌های آلودگی به ToLCPaIV در گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه ظاهر شد. دو هفته بعد از مشاهده نشانه‌های ویروس، جهت اطمینان از آلودگی، از بافت برگ‌های جدید و دارای نشانه آلودگی، نمونه‌گیری شده و استخراج دی‌ان‌ا به روش CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) با استفاده از روش ارائه شده توسط ژانگ و همکاران انجام شد (Zhang et al. 1998).

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ToLCPaIV-F1217A و ToLCPaIV-R1709A که قادر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۵۰۰ جفت باز از قطعه ژنومی A ویروس بودند، انجام شد (Sabouri and Heydarnejad 2013b). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۲ میکرولیتری شامل دو میکروگرم دی‌ان‌ا، یک میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۱/۵ میکرومولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۱/۲ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با غلظت ۱۰ برابر و ۲/۵ واحد آنزیم تک دی‌ان‌ا پلی‌مراز (Fermentas) انجام شد و محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بعد از الکتروفورز در ژل آگاروز یک درصد، مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی تأثیر هورمون‌ها بر آلودگی ویروسی

برای مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی،

ژنومی A و B چهار تا پنج روز قبل از مایه‌زنی، روی محیط کشت جامد ال‌بی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین با غلظت $50 \mu g/ml$ در دمای $28^\circ C$ به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در انکوباتور کشت شدند، تا باکتری به رشد مناسب در محیط کشت برسد. تهیه سوسپانسیون جهت عمل مایه‌زنی، براساس روش ارائه شده توسط گریمسلی و همکاران انجام شد (Grimsley et al. 1986). باکتری‌های حاوی قطعات A و B توسط کاردک سترون از روی محیط کشت جامد جمع‌آوری و هر دو به یک لوله حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شدند. با تکان دادن لوله، باکتری کاملاً در آب حل شده و سوسپانسیونی شیری رنگ با $OD_{600}=0.5$ بدست آمد که از آن برای مایه‌زنی به گیاهان استفاده شد.

مایه‌زنی ویروس در مرحله سه تا چهار برگی با استفاده از سرنگ‌های یک میلی‌لیتری و تزریق سوسپانسیون حاوی مخلوطی از هر دو سازه عفونت‌زا در آوند آبکش انجام گردید. مایه‌زنی با تزریق دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون به ازاء هر گیاه و در سه ناحیه طوقه، بالاتر از طوقه و محل انشعاب اولین دمبرگ انجام گردید. گیاهان مایه‌زنی شده در دمای تقریبی $27^\circ C$ در گلخانه نگهداری شدند. باکتری حاوی پلاسمید بدون قطعات ژنومی ویروس نیز به عنوان شاهد منفی به ۱۰ عدد از گیاهان مایه‌زنی گردید. بنابراین در این مطالعه، شاهد منفی به گیاهانی اطلاق می‌گردد که با پلاسمید بدون قطعات ژنومی ویروس مایه‌زنی شده‌اند و تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد و عنصر سیلیسیم نیز قرار نگرفته‌اند. شاهد مثبت نیز به گیاهانی اطلاق می‌گردد که با سازه‌های حاوی ژنوم ویروس مایه‌زنی شده‌اند، ولی با تنظیم‌کننده‌های رشد و عنصر سیلیسیم تیمار نشده‌اند. به منظور مبارزه با سفیدبالک، گیاهان در شرایط گلخانه قبل و بعد از مایه‌زنی، با استفاده از سم کونفیدر (متوکلوپراید) با غلظت یک میلی‌لیتر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب و یک بار

دلیل اکسیداسیون گایاکول، در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت سه دقیقه اندازه گیری شد (Plewa et al. 1991). در این آزمایش یک واحد آنزیمی معادل مقدار آنزیمی است که یک میلی مول گایاکول را در مدت یک دقیقه اکسید می کند.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) براساس روش ناکانو و آسادا اندازه گیری شد (Nakano and Asada 1981). یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که یک میلی مول آسکوربیک اسید را در مدت یک دقیقه اکسید کند. فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) براساس روش نیکولی و همکاران اندازه گیری شد (Nicoli et al. 1991). در این روش، از پیروگال (Pyrogallol) به عنوان پیش ماده آنزیم استفاده گردید. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره به دست آمده از روش برادفورد محاسبه گردید (Bradford 1976). برای سنجش مقدار پروتئین کل، به لوله های آزمایش حاوی پنج میلی لیتر معرف بیوره، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی افزوده شد و بلافاصله ورتکس گردید. پس از پنج دقیقه، میزان جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. غلظت پروتئین با کمک منحنی استاندارد آلبومین و بر اساس معادله خط در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از فرمول $Y=0.0008X+0.01$ محاسبه گردید (Bradford 1976). در این فرمول Y برابر مقدار جذب خوانده شده و X برابر غلظت پروتئین بر حسب میلی گرم بر لیتر است.

نتایج

ارزیابی شدت نشانه های ToLCPaIV در گیاهان

براساس نتایج بدست آمده، در گیاهان خیار آلوده به ویروس، نشانه های غالب به شکل موزائیک، زردی بین رگبرگ ها و کوتولگی بود (جدول ۱ و شکل ۱). شدت

نمونه برداری در یک مرحله و ۳۰ روز پس از کشت انجام گرفت.

مطالعه ویژگی های ریخت شناسی

مطالعه ویژگی های ریخت شناسی با اندازه گیری وزن تر اندام هوایی (بوته ها) و اندازه گیری طول ساقه انجام شد. برای اندازه گیری وزن تر اندام هوایی بوته ها، پس از جدا کردن بخش های هوایی از بالای خاک، وزن هر بوته بر حسب گرم با ترازو اندازه گیری شد. طول ساقه نیز با استفاده از خط کش و براساس واحد سانتی متر از محل طوقه تا قسمت انتهایی بوته اندازه گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم های مختلف

مطالعه ویژگی های بیوشیمیایی به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم های گایاکول پراکسیداز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و مقدار پروتئین صورت گرفت. برای سنجش فعالیت آنزیم های گفته شده، ۵۰۰ میلی گرم از بافت تازه گیاه در پنج میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7) که حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) یک درصد و EDTA یک میلی مولار بود، در مجاورت یخ عصاره گیری شد و عصاره ها به مدت ۲۰ دقیقه در $5000 \times g$ و در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ شدند. در نهایت، مایع روشن شده در مرحله بعد برای سنجش فعالیت آنزیم ها مورد استفاده قرار گرفت (Bradford 1976).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) براساس کاهش جذب آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد (Velikova et al. 1998). یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیمی است که یک میلی مول آب اکسیژنه را در مدت یک دقیقه تجزیه کند، زیرا میزان فعالیت آنزیم براساس غلظت آب اکسیژنه تجزیه شده محاسبه شده است. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) با استفاده از افزایش جذب به

در گیاهان، با تأخیر و در مرحله هفت تا هشت برگی شروع شد. درحالی که در گیاهان شاهد نشانه‌های آلودگی در مرحله سه تا چهار برگی ظاهر گردید. در تمام تیمارهای مورد آزمایش، بعد از مایه‌زنی ویروس، یک قطعه ۵۰۰ جفت‌بازی در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید (شکل ۲).

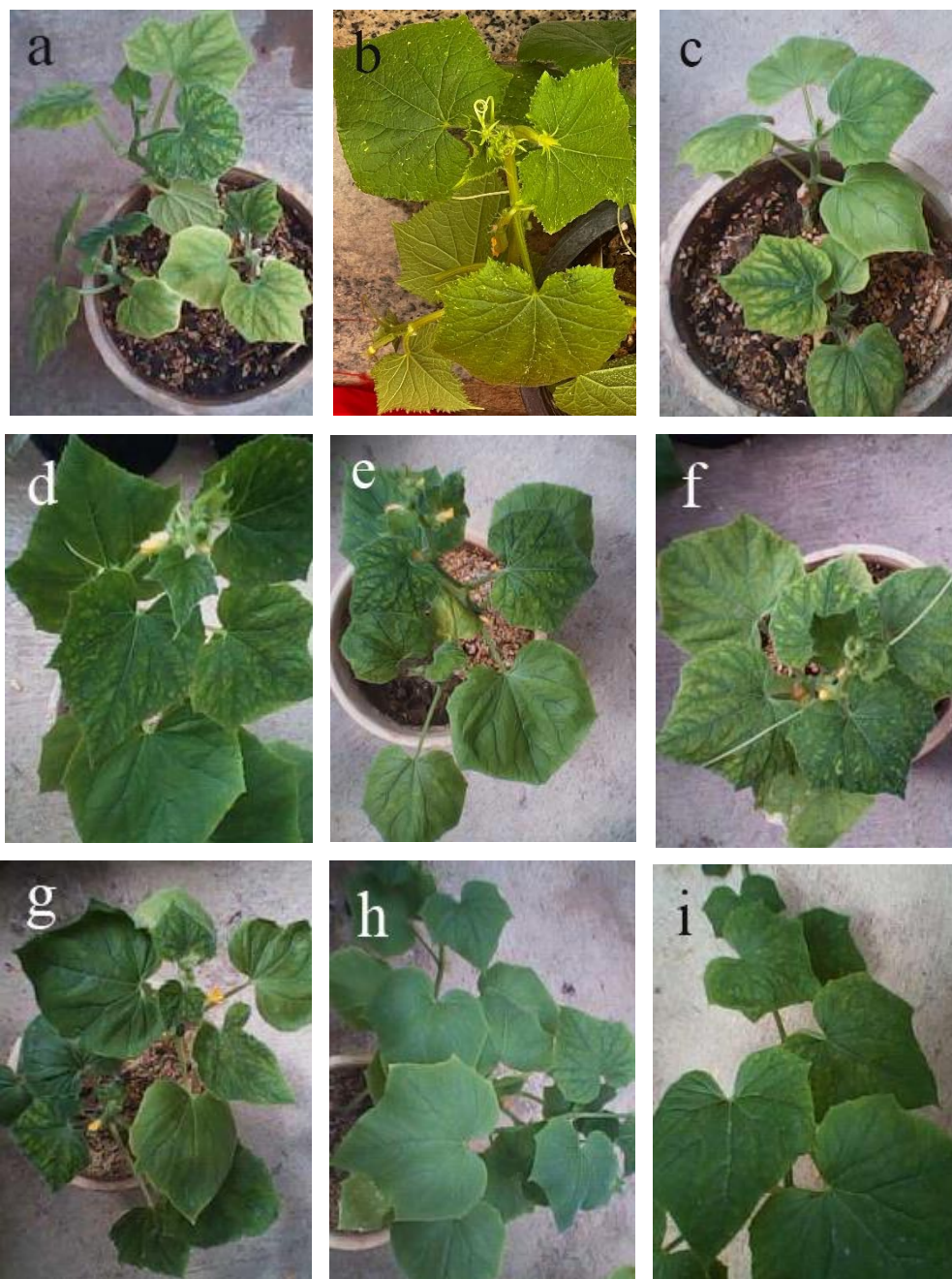
این نشانه‌ها در گیاهان شاهد و تیمار سیلیسیم بیشتر بود و گیاهان از یک هفته بعد از تزریق سازه عفونت‌زای ویروس، نشانه‌های موزائیک و زردی را از خود نشان دادند. در تیمارهای SA، MJ+Si و BR+Si شدت نشانه‌های بیماری بسیار خفیف‌تر بود و علاوه بر این، در تیمارهای فوق، ظهور نشانه‌های آلودگی ویروسی

جدول ۱- مقیاس شدت نشانه‌های بیماری در گیاهان خیار گلخانه‌ای تیمار شده با تنظیم‌کننده‌های رشد و عنصر سیلیسیم به منظور ارزیابی مقاومت گیاهان مایه‌زنی شده با ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی. برای دیدن جزئیات نشانه‌ها به شکل ۱ مراجعه گردد.

Table 1. Symptom severity scale for greenhouse cucumber plants treated with growth regulators and silicon element to evaluate plant resistance following agroinoculation with tomato leaf curl Palampur virus. See Fig. 1 for detail of symptoms.

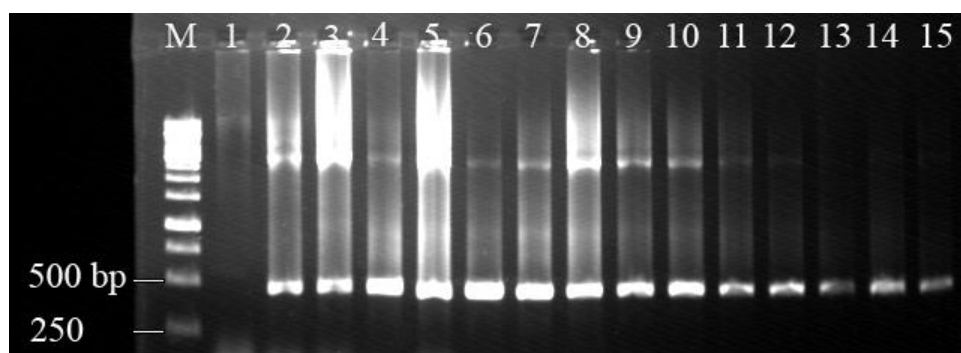
Treatment	Severity rating	Symptoms	Figure
Positive control (plant agroinoculated with ToLCPaV construct)	+++	General dwarfing and yellowing, marginal leaf necrosis and interveinal chlorosis	1a
Negative control (non-inoculated plant)	-	No symptoms	1b
Silicon (Si)	+++	General dwarfing, mild yellowing and interveinal chlorosis	1c
Salicylic acid (SA)	+	Mild dwarfing and interveinal chlorosis	1d
Methyl jasmonate (MJ)	++	Mild dwarfing and yellowing and interveinal chlorosis	1e
Brassinosteroids (BR)	++	General dwarfing and yellowing and interveinal chlorosis	1f
SA+Si	++	Mild dwarfing and yellowing and interveinal chlorosis	1g
MJ+Si	+	Mild interveinal chlorosis	1h
BR+Si	+	Mild interveinal chlorosis	1i

+++ represent severe symptoms; ++, moderate symptoms; +, mild symptom and -, no symptoms



شکل ۱- نشانه‌های گیاهان خیار گلخانه‌ای تیمار شده با تنظیم کننده‌های رشد و عنصر سیلیسیم ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی با سازه عفونت‌زای ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی. برای توضیحات نشانه‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

Fig. 1. Symptoms of greenhouse cucumber plants treated with growth regulators and silicon element following agroinoculation with infectious clone of tomato leaf curl Palampur virus at 30 dpi. See Table 1 for description of symptoms.



شکل ۲- نتایج حاصل از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور تعیین آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده با سازه ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و عنصر سیلیسیم.

Fig. 2. Results of the PCR assay to check the ToLCPaV infection of agroinoculated plants treated with different growth regulators and silicon element (lanes 1-15). M, 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA).

ویژگی‌های ریخت‌شناسی

داده‌های بدست آمده از تیمار بوته‌های خیار با سیلیسیم و تنظیم‌کننده‌های رشد ۳۰ روز پس از مایه‌زنی با سازه عفونت‌زای ToLCPaV نشان داد که وزن تر بوته‌های آلوده (شاهد مثبت) نسبت به گیاهان سالم (شاهد منفی) ۴۵٪ کاهش داشت (شکل ۳a). در شرایط آلودگی به ویروس، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد با ترکیب سیلیسیم (Si)، مانند تیمار MJ+Si و BR+Si نسبت به شاهد مثبت (گیاه آلوده و تیمار نشده با تنظیم‌کننده‌های رشد)، باعث بیشترین افزایش وزن تر بوته به ترتیب به میزان ۲۸/۸ و ۳۷/۱ درصد شد؛ در صورتیکه وزن تر بوته‌ها در تیمارهای Si، SA+Si و BR نسبت به گیاهان شاهد مثبت تفاوت معنی‌داری نداشتند. در شرایط بدون آلودگی ویروسی، تیمارهای SA، BR، SA+Si، MJ+Si و BR+Si بدون آلودگی ویروسی، با شاهد منفی، تفاوت معنی‌داری داشتند که نشان می‌دهد کاربرد تیمارهای SA، MJ+Si و BR+Si باعث افزایش طول ساقه به ترتیب به میزان ۲۱/۰، ۲۴/۵ و ۳۳/۰ درصد نسبت به شاهد منفی و در نتیجه رشد سریع‌تر گیاه شده است.

براساس نتایج بدست آمده، ویژگی ریخت‌شناسی دوم

یعنی طول ساقه نیز در گیاهان شاهد و آلوده به ویروس، نسبت به گیاهان شاهد منفی (فاقد آلودگی)، ۳۶/۷٪ کاهش رشد نشان داد (شکل ۳b). در شرایط آلودگی به ویروس، تیمارهای Si، MJ و SA+Si با گیاهان شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری نداشتند. این نتایج نشان می‌دهد که تنظیم‌کننده‌های مورد نظر در گیاهان آلوده به ویروس، تأثیری بر طول ساقه نداشتند. در حالی که استفاده از ترکیبات SA، BR، BR+Si و MJ+Si در گیاهان آلوده به ویروس، نسبت به گیاهان شاهد آلوده به ترتیب به میزان ۲۶/۱، ۱۰/۶، ۲۹/۵ و ۲۳/۲ درصد باعث افزایش طول ساقه شدند. در مقایسه، تیمار Si و MJ با شاهد منفی (بدون آلودگی ویروسی)، تفاوت معنی‌داری نداشتند. تیمارهای SA، BR، SA+Si، MJ+Si و BR+Si بدون آلودگی ویروسی، با شاهد منفی، تفاوت معنی‌داری داشتند که نشان می‌دهد کاربرد تیمارهای SA، MJ+Si و BR+Si باعث افزایش طول ساقه به ترتیب به میزان ۲۱/۰، ۲۴/۵ و ۳۳/۰ درصد نسبت به شاهد منفی و در نتیجه رشد سریع‌تر گیاه شده است.

گردید.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

بر اساس نتایج بدست آمده، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاهان شاهد مثبت نسبت به شاهد منفی ۳۲٪ کاهش را نشان داد (شکل ۳e). در شرایط آلودگی ویروسی، فعالیت این آنزیم در تیمارهای Si و BR نسبت به شاهد مثبت تفاوت معنی داری نداشت؛ در حالیکه سایر تیمارها نسبت به همین شاهد تفاوت معنی داری از خود نشان دادند. در این شرایط بیشترین افزایش فعالیت آنزیم نسبت به گیاهان شاهد مثبت، در تیمارهای SA، MJ، MJ+Si و BR+Si به ترتیب به میزان ۱۰۱/۵، ۸۰/۹، ۱۳۸/۲ و ۱۴۱/۲ درصد مشاهده شد. در شرایط بدون آلودگی ویروسی نیز، تنها تیمارهای Si و BR با شاهد منفی تفاوت معنی داری نداشتند.

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

نتایج حاصل از مایه زنی بوته های خیار با سازه عفونت زای ToLCPaIV و اندازه گیری آنزیم ها نشان داد که در گیاهان شاهد آلوده به ویروس، فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نسبت به گیاهان شاهد بدون آلودگی ویروسی افزایش داشته است (شکل ۳f). میزان این آنزیم، هم در شرایط آلودگی به ویروس و هم در شرایط بدون آلودگی در تیمارهای Si، MJ، BR و SA+Si نسبت به شاهد مربوط به آن، تفاوت معنی داری نداشتند. در شرایط بدون آلودگی، تیمارهای SA، BR+Si و MJ+Si با شاهد، دارای تفاوت معنی داری به ترتیب به میزان ۲۵/۴، ۵۴/۲ و ۴۵/۸ درصد بودند. در شرایط آلودگی به ویروس، بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمارهای BR+Si و MJ+Si به ترتیب به میزان ۱۶۰/۳ و ۱۰۷/۹ درصد نسبت به شاهد آلوده می باشد.

شاخص های بیوشیمیایی

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

آلودگی به ویروس پلامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی در گیاهان خیار باعث افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به میزان بیش از دو برابر (۱۱۳/۳ درصد) نسبت به شاهد منفی (گیاه سالم) شد (شکل ۳c). بیشترین افزایش فعالیت این آنزیم در تیمارهای آلوده به ویروس مربوط به کاربرد MJ، SA، MJ+Si و BR+Si نسبت به گیاه شاهد آلوده از همان تیمار به ترتیب به میزان ۴۸/۱، ۳۵/۹، ۵۷/۲ و ۹۶/۹ درصد ثبت شد. در حالیکه کاربرد ترکیبات Si، BR و SA+Si نسبت به تیمار شاهد مثبت، از نظر میزان فعالیت این آنزیم تفاوت معنی داری نداشتند. گیاهان تیمار شده با سیلیسیم و بدون تیمار با ویروس، نسبت به شاهد منفی، تفاوت معنی داری در فعالیت آنزیم آسکوربات نشان ندادند. همه گیاهان تیمار شده و مایه زنی نشده با ویروس به غیر از تیمار Si و BR، از نظر فعالیت آنزیم آسکوربات با تیمار شاهد منفی، تفاوت معنی داری نداشتند.

فعالیت آنزیم کاتالاز

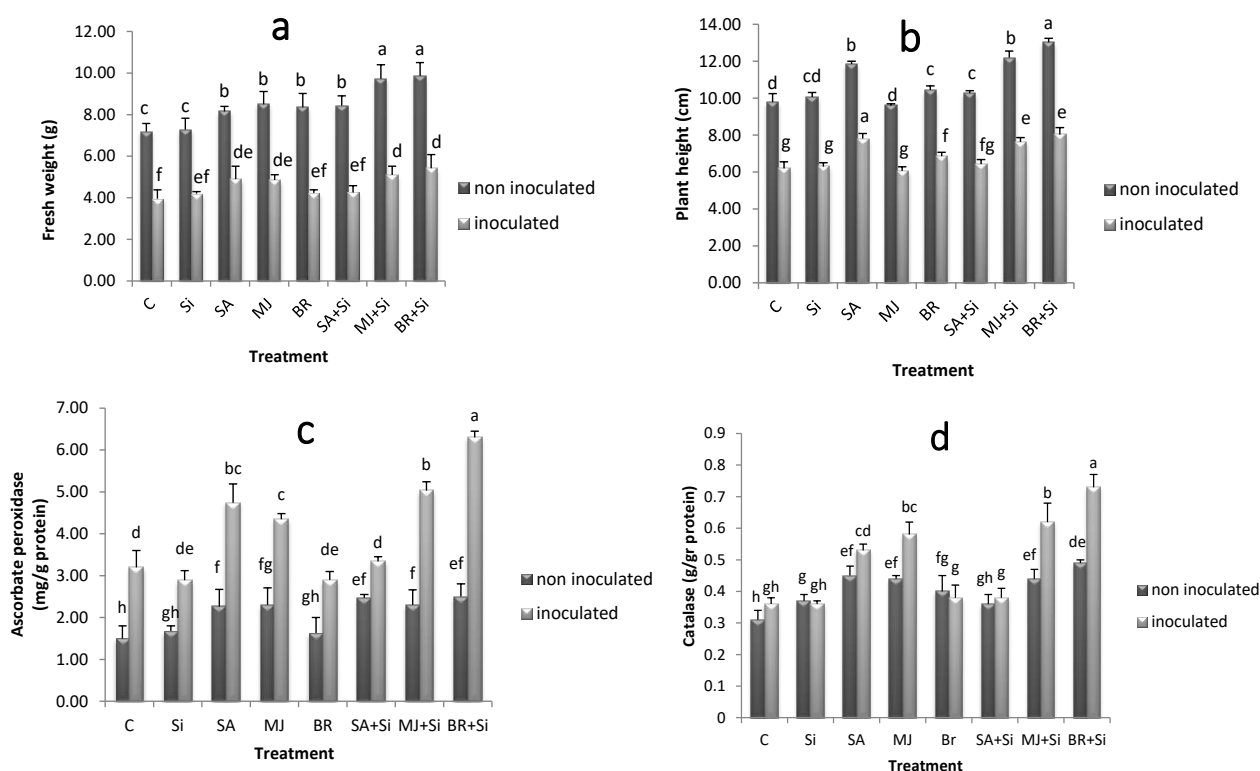
بر اساس شکل ۳d، فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط آلودگی به ویروس، در گیاهان شاهد مثبت و گیاهان تحت تیمار Si، BR و SA+Si نسبت به گیاهان شاهد مثبت و تیمار نشده، تفاوت معنی داری نداشت ولی بیشترین فعالیت آنزیم در تیمارهای SA، MJ، MJ+Si و BR+Si نسبت به شاهد مثبت به ترتیب به میزان ۴۷/۲، ۶۱/۱، ۷۲/۲ و ۱۰۲/۸ درصد دیده شد. در شرایط بدون آلودگی ویروسی نیز بیشترین فعالیت آنزیم نسبت به شاهد منفی، در تیمارهای SA، MJ، MJ+Si و BR+Si به ترتیب به میزان ۴۵/۲، ۴۱/۹، ۴۱/۹ و ۵۸/۱ درصد ثبت

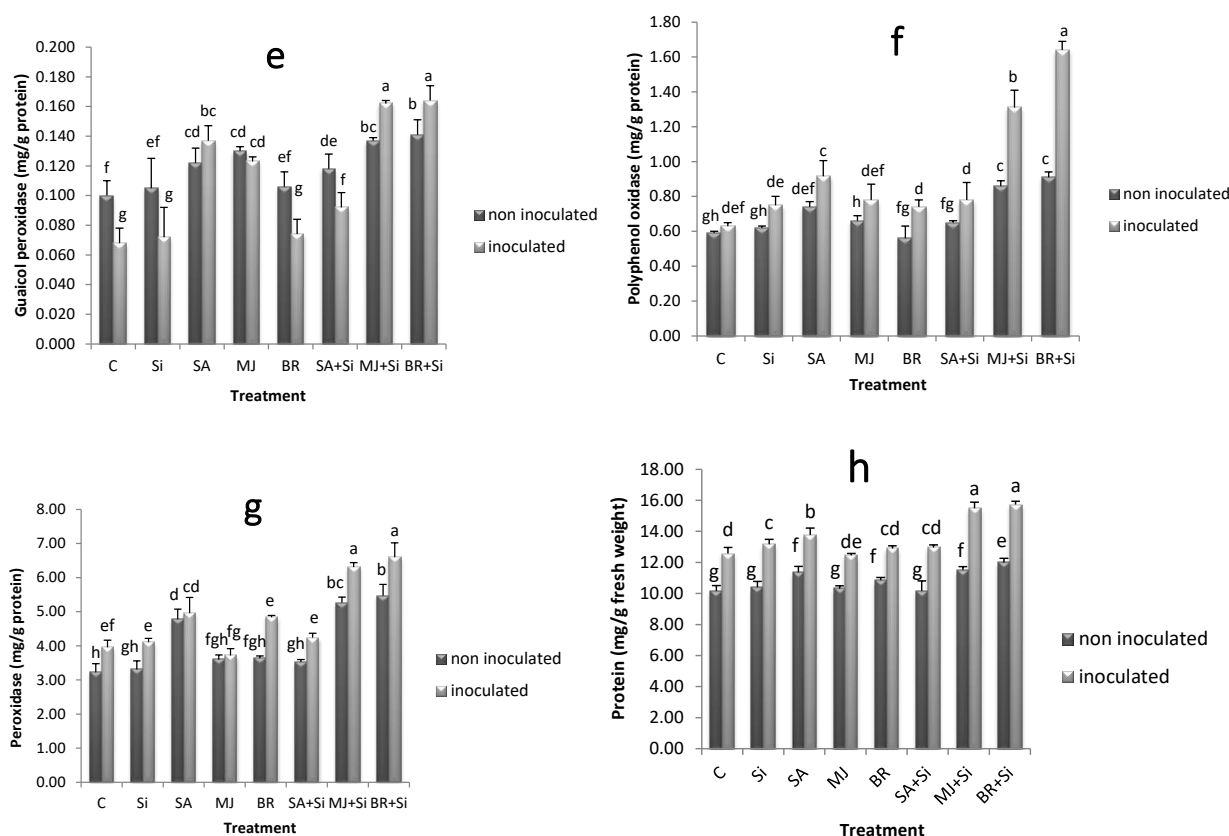
فعالیت آنزیم پراکسیداز

پروتئین

واکاوای شکل ۳g نشان می‌دهد که در شرایط آلودگی گیاه به ویروس، فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان شاهد مثبت نسبت به شاهد منفی، افزایش معنی‌داری به میزان ۲۲/۶ درصد وجود دارد. در شرایط آلودگی ویروسی، تنها تیمارهای SA، MJ+Si و BR+Si نسبت به شاهد مثبت به ترتیب با درصدهای ۲۵/۳، ۵۹/۳ و ۶۶/۷ بیشترین افزایش فعالیت را نشان دادند؛ در حالی که در سایر تیمارها نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در شرایط بدون آلودگی ویروسی، همه تیمارها به غیر از MJ+Si و BR+Si، با شاهد منفی، تفاوت معنی‌داری نداشتند.

ارزیابی شکل ۳h نشان می‌دهد که مقدار پروتئین در گیاهان آلوده به ویروس نسبت به شاهد منفی ۲۳/۷ درصد افزایش دارد. در شرایط آلودگی به ویروس، تنها تیمارهای SA، MJ+Si و BR+Si نسبت به شاهد مثبت به ترتیب به میزان ۴/۸، ۹/۵، ۲۳/۳ و ۲۵/۱ درصد افزایش معنی‌داری نشان دادند؛ ولی در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در شرایط بدون آلودگی، تیمار SA، MJ و SA+Si با شاهد منفی تفاوت معنی‌داری نداشتند در حالی که سایر تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری از خود نشان دادند.





شکل ۳- تاثیر عنصر سیلیسیم (Si) با غلظت یک میلی لیتر بر لیتر و تنظیم کننده های رشد شامل سالیسیلیک اسید (SA) با غلظت ۰/۵ میلی مولار، متیل جاسمونات (MJ) با غلظت پنج میکرومولار و براسینوستروئید (BR) با غلظت یک میکرومولار و برهم کنش Si با تنظیم کننده های رشد بر وزن تر گیاه (a) و ارتفاع بوته (b) و فعالیت آنزیم های آسکوربات پراکسیداز (c)، کاتالاز (d)، گایاکول (e)، پلی فنل اکسیداز (f)، پراکسیداز (g) و پروتئین (h) در گیاه خیار آلوده به ویروس پلامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی. میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند از نظر آماری و با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند.

Fig 3. Effect of silicon element (Si, 1 ml/L) and growth regulators including salicylic acid (SA, 0.5 mmolar), methyl jasmonate (MJ, 5 micromolar) and brassinosteroids (BR, 1 micromolar) and interaction of Si with growth regulators on plant fresh weight (a) and plant height (b), and activity of ascorbate peroxidase (c), catalase (d), guaiacol (e), polyphenol oxidase (f), peroxidase (g), total protein (h) on infected cucumber with tomato leaf curl Palampur virus. Means with a minimum one common letter, do not show statically significant difference in Duncan test ($p>0.05$).

همبستگی بین شاخص‌های مختلف

نتایج بدست آمده نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین وزن تر بوته در گیاهان آلوده به ویروس با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سطح احتمال پنج درصد وجود دارد (جدول ۲). با افزایش فعالیت آنزیم‌ها وزن تر بوته افزایش داشت. همچنین بین فعالیت آنزیم‌ها با ارتفاع ساقه نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد. بین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گاپاکول‌پراکسیداز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با شدت نشانه‌های بیماری همبستگی منفی و معنی‌داری وجود دارد. با افزایش فعالیت آنزیم‌های ذکر شده، شدت نشانه‌های بیماری کاهش پیدا کرد. بین مقدار پروتئین و شدت نشانه‌ها، همبستگی معنی‌دار و منفی مشاهده شد. با افزایش پروتئین، شدت نشانه‌ها کاهش پیدا کرد. بین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با شدت نشانه‌های بیماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. از طرف دیگر، نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که در گیاهان مایه‌زنی نشده با ویروس، بین شاخص‌های بیوشیمیایی با وزن تر بوته و ارتفاع ساقه، همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد وجود دارد. با افزایش مقدار آنزیم‌ها، وزن تر بوته و ارتفاع ساقه در گیاه افزایش پیدا کرد (جدول ۳). بین مقدار پروتئین با وزن تر بوته نیز در سطح پنج درصد نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد.

بحث

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که مایه‌زنی گیاهچه‌های خیار با سازه عفونت‌زای ToLCPalV باعث کاهش وزن تر بوته و کاهش ارتفاع ساقه می‌گردد. تیمار خیساندن بذرهای خیار با محلول ۰/۵ میلی‌مولار SA در گیاهان مایه‌زنی شده با ویروس، باعث به حداقل رساندن کاهش شاخص‌های وزن تر بوته و ارتفاع ساقه نسبت به شاهد شد. همچنین، کاربرد این تنظیم‌کننده باعث تأخیر

ظهور نشانه‌های ویروس در گیاهان مایه‌زنی شده گردید. نتایج این آزمایش، همسو با نتایج مطالعه‌ای است که قبلاً روی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) انجام شده است. بدین صورت که کاهش وزن تر بوته و ارتفاع گیاه ناشی از TYLCV با کاربرد SA جبران گردید. علاوه بر این، براساس گزارش طهماسبی و همکاران، این هورمون توانست شدت نشانه‌های ویروس را هم کاهش دهد (Tahmasebi et al. 2016). بطور مشابه، تیمار گیاهان توتون و گوجه‌فرنگی با SA به ترتیب باعث القای مقاومت به ویروس موزائیک توتون (tobacco mosaic virus) و TYLCV شده است (Lewsey et al. 2009; Li et al. 2019). همچنین، نتایج مشابهی در مورد نقش موثر این ترکیب در افزایش مقاومت گیاه میزبان در مقابل چندین ویروس بدست آمده است (Asadi Jaefari et al. 2022; Falcioni et al. 2014; Mayers et al. 2005; Naylor et al. 1998; Radwan et al. 2007).

براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق، استفاده از SA در گیاهان، بدون مایه‌زنی آن‌ها با سازه عفونت‌زای ToLCPalV، نسبت به شاهد منفی باعث افزایش شاخص‌های ریخت‌شناسی (وزن تر و ارتفاع ساقه) و در نتیجه افزایش رشد گیاه خیار شد. براساس مطالعات انجام شده، ترکیبات فنلی با تأثیر بر فرآیندهایی مانند فتوسنتز، تنفس، جذب یون، نفوذپذیری غشاء، فعالیت آنزیم و هورمون‌ها، میزان رشد و تولید زیست‌توده را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Hayet et al. 2007). اثرات مثبت SA بر روی رشد را می‌توان به علت تأثیر آن بر سایر هورمون‌های گیاهی نیز ارتباط داد. به عنوان مثال در گیاه گندم، SA موجب تغییر در تعادل هورمون‌های اکسین، سیتوکینین و آبسزیزیک‌اسید می‌شود که نتیجه آن افزایش رشد در شرایط غیرتنش، بهبود رشد و افزایش مقاومت در تنش شوری است (Shakirova et al. 2003).

جدول ۲- ضریب همبستگی بین ویژگی های ریخت شناسی (شامل وزن تر و ارتفاع ساقه) و بیوشیمیایی (آنزیم های آنتی اکسیدانت) در گیاهان خیار گلخانه ای تیمار شده با تنظیم کننده های رشد و عنصر سیلیسیم، ۳۰ روز بعد از مایه زنی با ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی.

Table 2. Correlation coefficient between morphological (fresh weight and height) and biochemical (antioxidant enzymes) characters in greenhouse cucumber plants treated with growth regulators and silicon element after agroinoculation with tomato leaf curl Palampur virus at 30 dpi.

Variants	Height (cm)	Catalase (mg/g)	Guaiacol Peroxidase (mg/g)	Ascorbate Peroxidase (mg/g)	Polyphenol oxidase (mg/g)	Peroxidase (mg/g)	Protein (mg/g)	Fresh weight	Leaf symptoms
Height (cm)	1	0.70**	0.61**	0.56**	0.53**	0.70**	0.78**	0.70**	-0.78**
Catalase (mg/g)		1	0.64**	0.56**	0.54**	0.86**	0.93**	0.91**	-0.92**
Guaiacol Peroxidase (mg/g)			1	0.63**	0.42*	0.66**	0.70**	0.64**	-0.70**
Ascorbate Peroxidase (mg/g)				1	0.61**	0.73**	0.60**	0.61**	-0.60**
Polyphenol oxidase (mg/g)					1	0.64**	0.59**	0.51*	0.54 ^{ns}
Peroxidase (mg/g)						1	0.89**	0.91**	-0.89**
Protein (mg/g)							1	0.88**	-0.95**
Fresh weight								1	-0.87**
Leaf symptoms									1

Asterisk *, ** and ns, represent significant level at 5% (p<0.5%), 1% (p<0.1%) and non-significant, respectively

جدول ۳- ضریب همبستگی بین ویژگی های ریخت شناسی (شامل وزن تر و ارتفاع ساقه) و بیوشیمیایی (آنزیم های آنتی اکسیدانت) در گیاهان خیار گلخانه ای مایه زنی نشده با ویروس و تیمار شده با تنظیم کننده های رشد و عنصر سیلیسیم.

Table 3. Correlation coefficient between morphological (fresh weight and height) and biochemical (antioxidant enzymes) characters in non-agroinoculated greenhouse cucumber plants treated with growth regulators and silicon element.

Variants	Height (cm)	Catalase (mg/g)	Guaiacol Peroxidase (mg/g)	Ascorbate Peroxidase (mg/g)	Polyphenol oxidase (mg/g)	Peroxidase (mg/g)	Protein (mg/g)	Fresh weight
Height (cm)	1	0.61**	0.82**	0.76**	0.73**	0.71**	0.64**	0.51**
Catalase (mg/g)		1	0.66**	0.17**	0.74**	0.76**	0.84**	0.65**
Guaiacol Peroxidase (mg/g)			1	0.91**	0.93**	0.83**	0.77**	0.50**
Ascorbate Peroxidase (mg/g)				1	0.91**	0.81**	0.81**	0.50**
Polyphenol oxidase (mg/g)					1	0.85**	0.82**	0.51**
Peroxidase (mg/g)						1	0.92**	0.69**
Protein (mg/g)							1	0.63**
Fresh weight								1

Asterisk ** represents significant level at 5% (p<0.5%)

(Breusegem *et al.* 2001). در این آزمایش، کاربرد تیمارهای SA، MJ+Si و BR+Si در گیاهان آلوده به ویروس سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد. این آنزیم در گیاهان آلوده به بیمارگرها هنگام افزایش تنفس در زنجیره فسفریلاسیون اکسیداتیو در غشاء میتوکندری قرار می‌گیرد و موجب انتقال انرژی به مولکول‌های هیدروژن و در نهایت تولید آب می‌گردد. در نهایت، از این طریق، موجب افزایش جذب اکسیژن و فعال‌شدن چرخه اکسیداتیو می‌شود (Mayers *et al.* 2005). در آلودگی‌های ویروسی افزایش فعالیت این آنزیم می‌تواند به دلیل افزایش تنفس باشد. از آنجایی که افزایش تنفس می‌تواند تأمین‌کننده انرژی لازم برای واکنش‌های دفاعی در گیاه باشد و علاوه بر این، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در جهت کنترل بیمارگرها نیز از این طریق صورت می‌پذیرد، می‌توان آن را به عنوان یک شاخص مقاومتی در پاسخ‌های میزبان به آلودگی‌های ویروسی به حساب آورد (Rakhshandehrou *et al.* 2009). آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز، از جمله آنزیم‌هایی هستند که در هنگام بروز آلودگی‌های ویروسی، سبب جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژنی تولید شده در اثر انفجار اکسیژنی از سلول می‌شوند. از طرف دیگر، با اکسیداسیون‌های متفاوت، در دفاع گیاهان در برابر آلودگی‌های ویروس نقش دارند (Diaz-Vivancos *et al.* 2006; Milavec *et al.* 2008).

کاتالاز آنزیمی کلیدی در جارو کردن پراکسید هیدروژن می‌باشد. سرعت واکنش این آنزیم زیاد ولی میل ترکیبی آن با H_2O_2 کم می‌باشد. این آنزیم برای حفظ تعادل واکنش، طی تنش اکسیداتیو ضروری است (Parasad *et al.* 1994). هرچند که شدت فعالیت این آنزیم و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، به نوع، شدت و مدت تنش، نوع گیاه و اندام مورد مطالعه، مرحله نمو گیاه و دیگر عوامل محیطی بستگی دارد (Wang *et al.* 2003). در تحقیق حاضر، کاربرد SA در گیاهان آلوده به ToLCPaIV سبب افزایش

ترکیب یک میلی‌لیتر بر لیتر Si با غلظت یک میکرومولار BR و همچنین غلظت مشابه Si با غلظت پنج میکرومولار MJ در گیاهان آلوده به ویروس، سبب افزایش وزن تر بوته و افزایش ارتفاع ساقه نسبت به شاهد مثبت گردید. علاوه بر این، کاربرد این ترکیبات سبب تأخیر ظهور نشانه‌های بیماری در گیاهان آلوده به ویروس شد. عنصر Si اثرات مفیدی بر روی رشد، عملکرد و بهبود تحمل برخی از گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد. این ماده از تخریب ساختمان چربی دیواره سلولی گیاهان برنج در شرایط خشکی جلوگیری نموده و باعث ثبات و جلوگیری از اختلال عمل در دیواره سلولی گیاهان رشد یافته در شرایط تنش می‌گردد (Fatemy *et al.* 2009). با این وجود در تحقیق حاضر، کاربرد عنصر Si به تنهایی، به استثنای تأثیر آن در افزایش میزان پروتئین کل (شکل ۳h)، تأثیری در شدت نشانه‌های ویروس، وزن تر بوته، ارتفاع ساقه و سایر شاخص‌های بیوشیمیایی نداشت؛ ولی ترکیب آن با برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد، تأثیرات معنی‌داری بر وزن تر بوته و ارتفاع ساقه و شاخص‌های بیوشیمیایی در گیاهان آلوده به ویروس نسبت به گیاه سالم داشت.

در گیاهان مابه‌زنی شده با ToLCPaIV، بیشترین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز مربوط به تیمارهای SA، MJ+Si و BR+Si بود. پلی‌فنل‌اکسیداز یکی از آنزیم‌هایی است که در اکسیداسیون ترکیبات فنلی محلول و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی دخالت می‌کند. لیگنین به عنوان اولین سد مکانیکی، سازوکارهای دفاعی گیاه را تقویت می‌کند. مطالعات نشان داده است که آنزیم‌های اکسیدکننده فنل‌ها، در واکنش‌های دفاعی از جمله مقاومت به تنش‌ها دخالت دارند (Dixit *et al.* 2001). ترکیبات فنلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی در گیاهان تحت تنش غیرزنده ایفا می‌کنند. این ماده، سلول را از آسیب حفاظت کرده و استحکام غشای سلولی را افزایش می‌دهد

فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. نتایج این آزمایش مشابه آزمایشی است که توسط طهماسبی و همکاران بر روی TYLCV انجام شده است و در آن میزان آنزیم کاتالاز در گیاهان آلوده به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی، در تیمارهای SA، جاسمونیک‌اسید و کنترل به ترتیب بیشترین میزان را نشان داد (Tahmasebi et al. 2016). این آنزیم باعث افزایش عملکرد سازوکارهای دفاعی گیاه در پاسخ به عفونت‌های ویروسی با مداخله در مسیر ارسال پیام‌های دو هورمون اکسین و سالیسیلیک‌اسید می‌گردد (Huang et al. 2023).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در گیاهان مایه‌زنی شده با ToLCPaIV با کاربرد SA، MJ+Si، MJ، BR+Si افزایش پیدا می‌کند. افزایش آسکوربات‌پراکسیداز می‌تواند دلیل غیرمستقیمی بر افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش باشد. میل ترکیبی زیاد آسکوربات‌پراکسیداز به آب اکسیژنه نشان می‌دهد که چرخه آسکوربات-گلوتاتیون نقش حیاتی در کنترل سطح رادیکال‌های آزاد در اندامک‌های سلولی دارد (Sharma and Dubey 2005).

نقش SA در بسیاری از فرآیندها و تنش‌های گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. این ترکیب فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز، گلوتاتیون رداکتاز و گایاکول‌پراکسیداز را تغییر می‌دهد (Li et al. 2019; Senaranta et al. 2002). گیاهان مایه‌زنی شده با ویروس، تحت تیمار تنظیم‌کننده SA، باعث کاهش نشانه‌های بیماری ناشی از ویروس و همچنین سبب افزایش رشد گیاه می‌گردد و گیاه دیرتر نشانه‌های ویروس را بروز می‌دهد. زمانی نشانه‌های ویروس ظاهر می‌شود که گیاه به رشد قابل توجهی می‌رسد و می‌تواند در مقابل ویروس تا حدودی مقاومت کند. در نتیجه می‌تواند تا حدودی

خسارت ناشی از این ویروس را کاهش دهد. در این مطالعه به لحاظ میزان پروتئین، تنها تیمارهای BR، SA، MJ+Si و BR+Si در شرایط آلودگی به ویروس، نسبت به شاهد مثبت افزایش معنی‌داری را در گیاه نشان دادند درحالی‌که در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری ثبت نشد. در شرایط بدون آلودگی، تیمار Si و BR با شاهد منفی تفاوت معنی‌داری نداشتند؛ درحالی‌که سایر تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشتند. بطور کلی، هورمون‌های گیاهی سازوکارهای دفاعی مختلفی را علیه بیمارگرها فعال می‌کنند که یکی از آنها همان پروتئین‌های وابسته به بیمارگرها (PRP) می‌باشد. SA، القاء‌کننده ژن‌های مسئول بیان پروتئین‌های PRP در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌باشد (Durrant and Dong 2004). این پروتئین‌ها به واسطه پیرشدن و مرگ سلول‌ها، از انتشار و تکثیر ویروس جلوگیری می‌کنند. پروتئین‌های PRP به گروه‌های مختلفی تقسیم می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که گروه‌های یک تا پنج این نوع پروتئین‌ها (PRP1-PRP5) فعالیت آنزیمی ندارند، در حالی که PRP6 تا PRP11 همگی دارای خاصیت آنزیمی هستند (Jameson et al. 1987).

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های مزارع کدوئیان و برخی از گیاهان گلخانه‌ای از جمله خیار در مناطق مرکزی و جنوبی ایران است (Heydarnejad et al. 2009; Heydarnejad et al. 2013). براساس نتایج بدست آمده از این تحقیق، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد به تنهایی و یا به همراه عنصر سیلیسیم شامل SA، MJ، MJ+Si و BR+Si در گیاه خیار گلخانه‌ای می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با مقاومت گیاه، تا حد زیادی خسارت ناشی از این ویروس را کاهش دهد.

References

Asadi Jaefari S., Maleki M. and Gholamnezhad J. 2022. The effect of salicylic acid and jasmonic acid on

- disease symptoms and defense genes expression in a greenhouse cucumber infected with CMV. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 10 (2): 206-224.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Breusegem F.V., Vranova E., Dat J.F. and Inze D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00452-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00452-6)
- Davis P.J. 2005. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Springer, 3rd Edition. Kluwer Academic Publisher, Netherlands 700 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7>
- Diaz-Vivancos P., Rubio M., Mesonero V., Periago P.M., Ros Barcelo A., Martinez-Gomez P. and Hernandez J.A. 2006. The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany* 57: 3813–3824. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl138>
- Dixit V., Pandey V. and Shyam R. 2001. Differential antioxidative response to cadmium in roots and leaves of pea. *Journal of Experimental Botany* 52: 1101-1109. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.358.1101>
- dos Santos C. and Franco O.L. 2023. Pathogenesis-related proteins (PRs) with enzyme activity activating plant defense responses. *Plants* 12: 2226. <https://doi.org/10.3390/plants12112226>
- Durrant W.E. and Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- El-Tayeb M.A. 2005. Response of barley gains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation* 45: 215-225. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-4928-1>
- Falcioni T., Ferrio J.P., del Cueto A.I., Gine J., Achon M.A. and Medina V. 2014. Effect of salicylic acid treatment on tomato plant physiology and tolerance to *Potato virus X*. *European Journal of Plant Pathology* 138: 331-345. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0333-1>
- Fatemy L.S., L. Tabatabaei S.J. and Fallahi E. 2009. The effect of silicon on the growth and yield of strawberry grown under saline conditions. *Journal of Horticultural Science* 23(1): 88-95, (in Persian with English Summary).
- George E.F., Hall M.A. and Klerk G.J.D. 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. pp 175–204. In: George E.F., Hall M.A. and Klerk G.J.D. (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht, the Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_5
- Grimsley N., Hohn B., Hohn T. and Walden R. 1986. Agroinfection, an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 3282-3286. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3282>
- Hayet S., Hayet Q., Irfan M. and Ahmad A. 2007. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 4-25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.005>
- Heydarnejad J., Hesari M., Massumi H. and Varsini A. 2013. Incidence and natural hosts of Tomato leaf curl Palampur virus in Iran. *Australasian Plant Pathology* 42: 195-203. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0164-0>
- Heydarnejad J., Mozaffari A., Massumi H., Fazeli R., Gray A.J., Meredith S., Lakay F., Shepherd D.N., Marthin D.P. and Varsani A. 2009. Complete sequences of tomato leaf curl Palampur virus isolates infecting cucurbits in Iran. *Archives of Virology* 154: 1015-1018. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0389-6>
- Huang W., Jiao B., Ji C., Peng Q., Zhou J., Yang Y. and Xi D. 2023. Catalases mediate tobacco resistance to virus infection through crosstalk between salicylic acid and auxin signaling pathways. *Physiologia Plantarum* 175(5): e14012. <https://doi.org/10.1111/pp1.14012>
- Hussain M., Farooq M., Jarban K. and Wahid A. 2009. Foliar application of glycinebetaine and salicylic acid improves growth, yield water productivity of hybrid sunflower planted by different sowing methods. *Journal of Agronomy and Crop Science* 196: 136-145. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2009.00402.x>
- Jameson P.E., Letham D.S., Zhang R., Parker C.W. and Badenoch-Jones J. 1987. Cytokinin translocation

- and metabolism in lupin species. I. Zeatin riboside introduced into the xylem at the base of *Lupinus angustifolius* stems. *Australian Journal of Plant Physiology* 14: 695-718. <https://doi.org/10.1071/PP9870695>
- Jan S., Singh R., Bhardwaj R., Ahmad P. and Kapoor D. 2020. Plant growth regulators: a sustainable approach to combat pesticide toxicity. *3 Biotech* 10(11): 466. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02454-4>.
- Khan M.I.R., Poor P. and Janda T. 2022. Salicylic acid: a versatile signaling molecule in plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 41: 1887–1890. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10692-4>
- Kumar Y., Hallan V. and Zaidi A.A. 2008. Molecular characterization of a distinct bipartite begomovirus species infecting tomato in India. *Virus Genes* 37: 425–431. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0286-1>
- Lewsey M.G., Murphy A.M., Maclean D., Dalchau N. and Westwood J.H. 2009. Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. *Molecular Plant Microbe Interactions* 23: 835-845. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0835>
- Li T., Huang Y., Xu Z.S., Wang F. and Xiong A.S. 2019. Salicylic acid-induced differential resistance to the *Tomato yellow leaf curl virus* among resistant and susceptible tomato cultivars. *BMC Plant Biology* 19 (1): 173. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1784-0>
- Liagan Y., Wong J.W.C. and Long W. 2005. Silicon mediated enhancement of cadmium tolerance in maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium contaminated soil. *Chemosphere* 58: 475-483. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.034>
- Mayers C.N., Lee K.C., Moore C.A., Wong S.M. and Carr J.P. 2005. Salicylic acid-induced resistance to *Cucumber mosaic virus* in squash and *Arabidopsis thaliana*: contrasting mechanisms of induction and antiviral action. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 428-434. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0428>
- Milavec M., Gruden K., Ravnkar M. and Kova M. 2008. Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by *Potato virus Y^{NTN}*. *Plant Pathology* 57: 861-869. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01833.x>
- Nakano Y. and Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Naylor M., Murphy A.M., Berry J.O. and CARR J.P. 1998. Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11: 860-868. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.9.860>
- Nicoli M.C., Anese M., Aglio G.D. and Leric C.R. 1991. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenolase activities. *Journal of Food Biochemistry* 18: 285-293. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1994.tb00503.x>
- Parasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A. and Steward C.R. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedling and a regulatory role of hydrogen peroxide. *The Plant Cell* 6: 65-74. <https://doi.org/10.2307/3869675>
- Plewa M.J., Smith S.R. and Wanger E.D. 1991. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research* 247: 57-64. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90033-K](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90033-K)
- Radwan D.E., Fayez K.A., Mahmoud S.Y., Hamad A. and Lu G. 2007. Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 480-489. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.03.002>
- Rakhshandehrou F., Shahsavan-Behboudi B. and Zamani-zadeh H.R. 2009. Tobacco antioxidant enzymes involvement in resistance to the systemic infection of potato virus Y (PVY⁰). *Journal of Science* 35(1): 9-16, (in Persian with English Summary).
- Raskin I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 439-463. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.002255>
- Sabouri M. and Heydarnejad J. 2013a. Evaluation of the reaction of greenhouse cucumber cultivars inoculated by the infectious clone of tomato leaf curl Palampur virus. *Journal of Agricultural Biotechnology* 5(1): 83-95.

- Sabouri M. and Heydarnejad J. 2013b. Construction and demonstration of infectivity of the infectious clone of the bipartite genome of Tomato leaf curl Palampur virus-Iranian isolate. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49(4): 403-409.
- Saheed Ibrahim M., Moses N. and Ikhajiagbe B. 2022. Seed Priming with Phytohormones. pp 1-15. In: Christophe H. (Eds.), *Plant Hormones - Recent Advances, New Perspectives and Applications*, IntechOpen, London, UK. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.102660>.
- Senaranta T., Touchell D., Bum M.E. and Dixon K. 2002. Acetylsalicylic (aspirin) and salicylic acid induced multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation* 30: 157-161. <https://doi.org/10.1023/A:1006386800974>
- Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A. and Fatkhutdinova D.R. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedling induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164: 317-322. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00415-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00415-6)
- Sharma P. and Dubey R.S. 2005. Lead toxicity in plant. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35-52. <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-04202005000100004>
- Singh D.P., Moore C.A., Gilliland A. and Carr J.P. 2004. Activation of multiple antiviral defense mechanisms by salicylic acid. *Molecular Plant Pathology* 5(1): 57-63. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00203.x>
- Tahmasebi A., Afsharifar A.R., Tabein S. and Behjatnia S.A.A. 2016. Effects of salicylic acid and jasmonic acid on defensive enzymes, symptom induction and growth factors of tomato plants in response to Abadeh isolate of Tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of 22nd Iranian Plant Protection Congress*. Karaj, Iran. p. 385.
- Velikova V.B., Yordanov I.T., Georgieva K.M., Tsonev T.D. and Goltsev V. 1998. Effect of exogenous polyamines applied separately and in combination with simulated acid rain on functional activity of photosynthetic apparatus. *Journal of Plant Physiology* 153: 299-307. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80155-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80155-7)
- Wang W., Vinocur B. and Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-4. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Wu X. and Ye J. 2020. Manipulation of jasmonate signaling by plant viruses and their insect vectors. *Viruses* 12(2): 148. <https://doi.org/10.3390/v12020148>
- Xiong J., Wan X., Ran M., Xu X., Chen L. and Yang F. 2022. Brassinosteroids positively regulate plant immunity via BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1-mediated glucan synthase-like 8 transcription. *Frontiers in Plant Science* 13: 854899. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.854899>
- Zhang Y.P., Uyemoto J.K. and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71(1): 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)