

اثر هرم سازی ژن های کنترل کننده صفت مقاومت نسبت به بیماری

ویروسی پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (Tomato yellow leaf curl

virus, TYLCV) بر سیستم های دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی در

لاین های مختلف

The effect of Pyramiding resistance control genes on viral disease of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on enzymatic and non-enzymatic defense systems in different lines

کمال صالحی^۱، غلامرضا شریفی سیرچی^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری، بخش مهندسی باغبانی دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران

۲- دانشیار، بخش مهندسی بیوتکنولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

Salehi K¹, Sharifi-sirchi GhR^{*2}

1- PhD Student, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, University of Hormozgan, Hormozgan, Iran

2- Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology Engineering, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Sharifi-sirchi@uk.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

چکیده

بیماری ویروسی پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) از جمله عوامل اصلی محدود کننده است که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان خسارت بسیار بالایی را به محصول گوجه فرنگی وارد می نماید. جهت ارزیابی نقش انتقال و هرم سازی ژن های TY-2 و TY-1/3 در ایجاد مقاومت نسبت به این بیماری ویروسی در تعدادی از لاین های مختلف گوجه فرنگی (حساس اما با عملکرد مطلوب) پژوهش حاضر صورت گرفت. به این منظور بعد از تلاقی والد مقاوم با لاین های مورد نظر سه مرحله تلاقی برگشتی و یک مرحله خودگشتی انجام گرفت (به منظور شناسایی و غربالگری افراد دارای مکان ژنی مورد نظر در هر نسل از نشانگر اسکار T0302 پیوسته با مکان ژنی TY-2 و نشانگر اسکار P6-25 برای مکان ژنی TY-1/3 استفاده شد) و سپس تعدادی از صفات دخیل در سیستم دفاعی گیاه و همچنین میزان غلظت ژنوم ویروس TYLCV با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی به منظور ارزیابی مقاومت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که آلودگی ویروسی باعث افزایش سطح ترکیبات فنول و فلاونوئید و همچنین آنزیم های آنتی اکسیدانی در گیاه شاهد شد. در حالی که لاین های حاوی ژن های TY-2 و TY-1/3 سطح پایین تری از سنتز و بیان ترکیبات آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی (فنول و فلاونوئید) و آنزیم های آنتی اکسیدانی (کاتالاز، پروکسیداز، گاباکول پروکسیداز و پلی فنول اکسیداز) را داشتند. همچنین در بررسی میزان غلظت ژنوم ویروس TYLCV مشاهده شد که لاین های حاوی دو مکان ژنی TY-2 و TY-1/3 نسبت به گیاه شاهد کمترین میزان ژنوم ویروس را دارا بودند. این نتایج بیانگر پایین بودن میزان تکثیر ویروس و بروز مقاومت در نتیجه حضور این دو مکان ژنی در گیاه میزبان است. با توجه به مشاهدات این مطالعه می توان با ادغام ژن های مختلف TY سطح مطلوبی از مقاومت را در لاین های با عملکرد بالا اما حساس گوجه فرنگی در برابر ویروس TYLCV حاصل نمود.

واژه های کلیدی

پروکسیداز
پلی فنول اکسیداز
ژن های TY
فلاونوئید
فنول
کاتالاز
گاباکول پروکسیداز

مقدمه

بیماری ویروسی پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی یکی از مخرب‌ترین بیماری‌هایی است که باعث بروز خسارت‌های سنگین به محصول گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) در سرتاسر دنیا می‌شود (Al-Abedy et al. 2021; Lee et al. 2021). برای اولین بار این ویروس در فلسطین گزارش شده است (Mabvakure 2016) و در سال ۱۳۷۵ نیز برای اولین بار در مزارع ایران گزارش شد (Hajimorad et al. 1996). این ویروس متعلق به خانواده جمینی ویریده^۱ و جنس بگوموویروس‌ها^۲ می‌باشد (Zerbini et al. 2017). میزبان اعضای این جنس معمولاً گیاهان دو لپه می‌باشند (Beam et al. 2020) مکانیسم انتقال بگوموویروس‌ها عمدتاً به صورت طبیعی توسط سفیدبالک^۳ و به روش پایا و چرخشی است (Czosnek et al. 2017). از لحاظ مطالعات فیلوژنی اعضای این جنس به ۲ دسته تک قسمتی^۴ و دو قسمتی^۵ تقسیم‌بندی می‌شوند. افراد با ژنوم تک قسمتی دارای اجزای ژنومی به طول تقریبی 2.8 kb (DNA-A) که معمولاً متعلق به دنیای قدیم (آسیا، آفریقا و شبه جزیره هند) می‌باشند. اعضای بگوم‌های دو قسمتی نیز دارای ژنومی به طول تقریبی 2.6 kb (دارای هر دو ژنوم DNA-A و DNA-B) می‌باشند و از لحاظ پراکنش بیشتر متعلق به دنیای جدید (قاره آمریکا) می‌باشند (Zerbini et al. 2017; Singh et al. 2019; Gupta et al. 2021). در مطالعات متعددی ایجاد مقاومت از طریق اینتروگرسیون مکان‌های ژنی مقاومت از گونه‌های *Solanum chilense*، *Solanum peruvianum*، *pimpinellifolium* و *Solanum habrochaites* به‌طور موفقیت‌آمیزی صورت گرفته است (Dhaliwal et al. 2020). از بین این منابع مشخصات تعداد کمی از ژن‌های مقاومت شرح و نقشه‌ی ژنی آن‌ها ثبت شده است. ژن *TY-1* با غالبیت نسبی از گونه *S. chilense* در اینبردلاین LA1969 اینتروگرسیون شد و جایگاه کروموزومی این ژن در نقشه ژنی بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶ تعیین شد (Verlaan et al. 2013). ژن *TY-2* (et al. 2013; Butterbach et al. 2014) بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۱ اینبردلاین B6013 گونه S. *habrochaites* شناسایی شد. این مکان ژنی پروتئین‌های سیتوپلاسمی دارای محل اتصال به نوکلئوتید و غنی از تکرار لوسین را کد می‌کند. ژن *TY-2* مقاومت به بگوموویروس‌های تک قسمتی را فراهم می‌سازد و این در حالی است که نسبت به ایجاد مقاومت به بگوموویروس‌های دو قسمتی غیر مؤثر می‌باشد (Yamaguchi et al. 2018; et al. 2014). هر سه ژن *Ty-1*، *Ty-3* و *Ty-3a* آل‌های مختلف یک مکان ژنی واحد می‌باشند که به ترتیب از اینبردلاین‌های LA1969، LA2779 و LA1932 گونه S. *chilense* منشاء گرفته و بر روی کروموزوم شماره ۶ قرار دارند. آل‌های این مکان ژنی کدکننده یک RNA polymerase وابسته به RAN (RDR) می‌باشند (Verlaan et al. 2013). در مطالعات Hutto et al. (2012) ژن مقاومت *Ty-5* از لاین‌های مشتق شده از کولتیوار Tyking بر روی کروموزوم شماره ۴ شناسایی شده است و سرانجام ژن *TY-6* مسئول ایجاد مقاومت در برابر TYLCV بر روی کروموزوم شماره ۱۰ تعیین شد. حضور این ژن در گیاه، مقاومت در برابر چندین گونه بگوموویروس تک قسمتی و دو قسمتی را فراهم می‌سازد (Gill et al. 2019). با این وجود که بیشتر این منابع به‌عنوان پاسخ‌های مقاومت در برابر ویروس شناخته می‌شوند، سطح فعالیت و علائم ویروس در لاین‌های داری این منابع (ژن‌های *TY*) کمتر از لاین‌های حساس می‌باشد. ایجاد و توسعه ژنتیک مولکولی و تکنولوژی مرتبط با انتخاب به‌کمک نشانگر مولکولی (MAS^۶) منجر به ایجاد زمینه‌های جدیدی در اصلاح گیاهان شد که از آن جمله می‌توان به هرم‌سازی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت در گیاهان را نام برد. هرمی‌سازی ژن منجر به انباشته شدن چندین ژن و بیان هم‌زمان بیش از یک ژن به‌منظور ایجاد بیان مقاومتی پایدار در یک وارته می‌شود. همچنین هرم‌سازی ژن علاوه بر اینکه سبب بهبود کارایی در انجام اصلاح گیاهان می‌شود، منجر به توسعه ذخایر ژنتیکی و ایجاد طیف وسیعی از پتانسیل‌های مقاومت در گیاهان می‌شود (Lee et al. 2021). هرم‌سازی ژن‌های *TY* در ژنوتیپ‌های حساس TYLCV باعث ایجاد مقاومت در برابر ویروس TYLCV

بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱۱ اینبردلاین B6013 گونه S. *habrochaites* شناسایی شد. این مکان ژنی پروتئین‌های سیتوپلاسمی دارای محل اتصال به نوکلئوتید و غنی از تکرار لوسین را کد می‌کند. ژن *TY-2* مقاومت به بگوموویروس‌های تک قسمتی را فراهم می‌سازد و این در حالی است که نسبت به ایجاد مقاومت به بگوموویروس‌های دو قسمتی غیر مؤثر می‌باشد (Yamaguchi et al. 2018; et al. 2014). هر سه ژن *Ty-1*، *Ty-3* و *Ty-3a* آل‌های مختلف یک مکان ژنی واحد می‌باشند که به ترتیب از اینبردلاین‌های LA1969، LA2779 و LA1932 گونه S. *chilense* منشاء گرفته و بر روی کروموزوم شماره ۶ قرار دارند. آل‌های این مکان ژنی کدکننده یک RNA polymerase وابسته به RAN (RDR) می‌باشند (Verlaan et al. 2013). در مطالعات Hutto et al. (2012) ژن مقاومت *Ty-5* از لاین‌های مشتق شده از کولتیوار Tyking بر روی کروموزوم شماره ۴ شناسایی شده است و سرانجام ژن *TY-6* مسئول ایجاد مقاومت در برابر TYLCV بر روی کروموزوم شماره ۱۰ تعیین شد. حضور این ژن در گیاه، مقاومت در برابر چندین گونه بگوموویروس تک قسمتی و دو قسمتی را فراهم می‌سازد (Gill et al. 2019). با این وجود که بیشتر این منابع به‌عنوان پاسخ‌های مقاومت در برابر ویروس شناخته می‌شوند، سطح فعالیت و علائم ویروس در لاین‌های داری این منابع (ژن‌های *TY*) کمتر از لاین‌های حساس می‌باشد. ایجاد و توسعه ژنتیک مولکولی و تکنولوژی مرتبط با انتخاب به‌کمک نشانگر مولکولی (MAS^۶) منجر به ایجاد زمینه‌های جدیدی در اصلاح گیاهان شد که از آن جمله می‌توان به هرم‌سازی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت در گیاهان را نام برد. هرمی‌سازی ژن منجر به انباشته شدن چندین ژن و بیان هم‌زمان بیش از یک ژن به‌منظور ایجاد بیان مقاومتی پایدار در یک وارته می‌شود. همچنین هرم‌سازی ژن علاوه بر اینکه سبب بهبود کارایی در انجام اصلاح گیاهان می‌شود، منجر به توسعه ذخایر ژنتیکی و ایجاد طیف وسیعی از پتانسیل‌های مقاومت در گیاهان می‌شود (Lee et al. 2021). هرم‌سازی ژن‌های *TY* در ژنوتیپ‌های حساس TYLCV باعث ایجاد مقاومت در برابر ویروس TYLCV

¹ Geminiviridea² Begomovirus³ Bemisia tabaci⁴ Monopartite⁵ Bipartite⁶ Marker Associated Selection

TYLCV (TY-2, TY-1/3) کنترل کننده مقاومت در برابر ویروس TYLCV انجام گرفت.

مواد و روش ها

به منظور غربالگری و شناسایی ژنوتیپ های دارای ژن های کنترل کننده مقاومت از آغازگرهای اسکار¹ برای دو مکان ژنی TY-2 (T0302) و TY-1/3 (P6-25) استفاده شد. پس از شناسایی افراد دارای این مکان های ژنی به منظور انتقال این دو ژن به یک ژنوتیپ واحد و ایجاد ژنوتیپ پایه که دارای هر دو مکان ژنی باشد، با یکدیگر تلاقی داده شدند. سپس نتاج به دست آمده (F₁) با ۸ لاین مطلوب و حساس تلاقی داده شدند. به منظور افزایش سهم ژنوم والد دوره ای (لاین های مطلوب و حساس) و کاهش سهم ژنوم والد دهنده (مقاوم) ۳ مرحله تلاقی برگشتی صورت پذیرفت. در مرحله انتهایی به منظور تثبیت ژن های کنترل کننده مقاومت به شکل هموزیگوت یک مرحله خودگشنی انجام شد. پس از کشت بذرها حاصل از مرحله خودگشنی و استخراج DNA و غربالگری و شناسایی افراد دارای دو مکان ژنی TY-2 و TY-1/3 به منظور آلوده سازی به اتاقت توری آلوده سازی انتقال داده شدند.

¹ Scar

می شود. این ژن ها مسئولیت مهار فعالیت ژنوم ویروس در گیاه میزبان را دارند (Tabein et al. 2017). در هنگام ایجاد آلودگی توسط پاتوژن های مختلف و بروز تنش اکسیداتیو در گیاهان مکانیسم های دفاعی میزبان به شکل موضعی یا سیستمیک با شناسایی عوامل بیمارگر یا غیر بیمارگر فعال می شوند. این مکانیسم ها شامل افزایش تولید و سنتز آنزیم های مانند کاتالاز، پروکسیداز، گایاکول پروکسیداز، پلی فنول اکسیداز و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می باشد (sofy et al. 2021; Pappi et al. 2021; Amoako et al. 2015). گیاهان با تولید این ترکیب و انباشت آن ها در مکان های از قبیل واکوئل سلول های لایه اپیدرمی برگ و ساقه می توانند موجب کاهش اثرات تنش اکسیداتیو حاصل از فعالیت پاتوژن های مختلف شوند (Agrios 2005). با بررسی پتانسیل میزان تولید ترکیبات فنولی (Singh et al. 2010,) و آنزیم های آنتی اکسیدانی ژنوتیپ های گوناگون می توان به منظور شناسایی و غربالگری ژنوتیپ های مقاوم و حساس در برابر تنش های متفاوت همانند آلودگی ویروس TYLCV استفاده نمود.

از آنجایی که ویروس TYLCV در کل کشور و خصوصاً نواحی جنوبی کشور خسارت سنگینی را وارد می نماید، مطالعه و ایجاد ارقام مقاوم به این ویروس امری مهم و اجتناب ناپذیر است. از این رو تحقیق حاضر به منظور ارزیابی انتقال و هرم سازی ژن های



شکل ۱- آغازگرهای اسکار به منظور شناسایی و ردیابی دو مکان ژنی TY-2 (T0302) و TY-1/3 (P6-25) در ژنوتیپ های مختلف گوجه فرنگی. هتروزیگوت

نانومتر در زمان یک دقیقه قرائت شد. تغییرات جذب به دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب واحد گرم بر وزن تر بیان شد (Beers and Sizer, 1952). فعالیت آنزیم گایاکول پروکسیداز بر حسب واحد در گرم وزن تر بیان شد. به این منظور میزان جذب آب اکسیژنه در عصاره آنزیمی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 470 نانومتر در زمان یک دقیقه قرائت شد. تغییرات جذب به دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ است تقسیم شد (Nakano and Asada, 1981).

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز جذب کمپلکس واکنشی در طول موج 290 نانومتر یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد (Sairam et al. 2002).

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در طول موج 420 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت این آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی آنزیم PPO با پیش ماده پیروکاتکول ($1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد (Shatta and EI-Shamei 1999).

به منظور استخراج DNA با کیفیت و خلوص بالا از روش موری و تامسون (Murry and Thompson 1984) استفاده شد. در این روش مقدار $0/5$ گرم از برگ تازه با ماده CTAB $2\% - 5\%$ در یک بافر تک مرحله‌ای استفاده شد. که به منظور ممانعت از اکسیداسیون از ماده ۲- مرکاپتواتانول در بافر استخراج استفاده شد.

به منظور استخراج RNA کل از برگ گیاه گوجه‌فرنگی از بافر Iraizol شرکت زیست فناوری رنا (RNA) همراه با کلروفورم، ایزوپروپانول، اتانول بر طبق دستورالعمل استفاده شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت دو مرحله‌ای شرکت یکتا تجهیز آزما بر اساس دستورالعمل انجام شد. برای بررسی غلظت سنجی میزان ژنوم ویروس در بافت میزبان (برگ گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده) از ژن β -tubulin به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. تکثیر بخشی از پروتئین پوششی ویروس TYLCV با استفاده از آغازگر

پس از انتقال لاین‌های مورد نظر به زیر قفسه توری آلوده‌سازی، یک بوته آلوده به ویروس TYLCV پس از شناسایی و تأیید نهایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی سنس^۱ و آنتی‌سنس^۲ (Pico et al. 1998)، که قطعه‌ای در حدود 670 جفت‌باز از ژن‌های پروتئین پوششی و حرکتی ویروس را تکثیر می‌کند، نیز به داخل قفسه آلوده‌سازی در کنار سایر لاین‌ها قرار داده شد. سپس تعدادی از برگ‌های آلوده به کلونی‌های مگس سفید بالغ به منظور آلوده‌سازی لاین‌ها در زیر توری قفسه آلوده‌سازی قرار داده شدند. برای اطمینان کامل از فرایند آلوده‌سازی در حدود 50 مگس سفید برای هر گیاه در نظر گرفته شد. پس از 48 ساعت از آغاز دوره آلوده‌سازی (IAP^۳) از سم حشره‌کش در فضای زیر قفسه به منظور حذف کامل حشره ناقل استفاده شد. پس از گذشت 30 روز نمونه بافت‌های گیاهی برای مطالعات بعدی برداشت و در دمای 80°C - درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Griffiths and Scott 2001). اندازه‌گیری ترکیبات فنلی بر اساس روش Folin-Ciocalteu با شدت جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج 725 نانومتر انجام شد. به منظور محاسبه غلظت ترکیب‌های فنولی از منحنی استاندارد گالیک اسید بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه استفاده شد (Soland and Laima 1999).

میزان فلاونوئید کل با روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد (Toor and Savage 2005). شدت جذب در طول موج 510 نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین بر اساس میزان معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره به دست آمد.

ابتدا $0/2$ گرم از نمونه‌ی گیاهی را وزن و سپس در هاون گذاشته و به آن 4 میلی‌لیتر بافر Ice-cold اضافه شد. و سپس در هاون کاملاً ساییده تا به صورت همگن پدید آمد. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی به عنوان عصاره پروتئین برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (de Azevedo et al. 2006).

به منظور بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز میزان جذب آب اکسیژنه در عصاره آنزیمی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 240

¹ Sense

² Antisense

³ Inoculation access period

نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین ها بر اساس روش LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج

با توجه به جدول تجزیه واریانس (۲) آلودگی ویروسی اثر بسیار معنی داری بر میزان محتویات فنول کل دارد. بیشترین میزان در لاین شماره ۱۲۸ (۰/۷۹۰ میلی گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه)، لاین شماره ۷ (۰/۶۰۰ میلی گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه) و سپس در ژنوتیپ شاهد (۰/۵۱۶ میلی گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه) مشاهده شد که در گروه های آماری (a, b, c) مختلف قرار گرفتند. همچنین کمترین میزان تجمع این ترکیب در لاین شماره ۴ (۰/۳۸۶ میلی گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه) مشاهده شد (جدول ۳).

تجزیه واریانس داده های مربوط به اندازه گیری میزان فلاونوئید نشان داد که اثرات ناشی از آلودگی ویروسی بر روی لاین های مختلف گوجه فرنگی در سطح یک درصد بر مقدار تجمع این ترکیب اختلاف معنی داری وجود دارد.

TYLCVp و β -tubulin به منظور اندازه گیری غلظت ژنوم ویروس توسط واکنش Real Time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی انجام گرفت. کمیت نسبی در Real Time PCR به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ SYBR Green (Ampliqon, Denmark) انجام گرفت. کل اجزای واکنش در حجم نهایی $20 \mu\text{M}$ بود، که شامل Master Mix ($10 \mu\text{M}$)، cDNA ($5 \mu\text{M}$) و هر آغازگر ($0/5 \mu\text{M}$) بود که با افزودن آب به حجم نهایی رسید. دمای مطلوب برای اتصال هر سه آغازگر بر اساس منابع انتخاب و همچنین آزمایشات qRT-PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی 94°C به مدت ۵ دقیقه، و در ادامه 40°C چرخه به صورت یک دقیقه در دمای 94°C ، یک دقیقه در دمای 58°C و یک دقیقه در دمای 72°C و در ادامه به منظور بسط واکنش مدت ۵ دقیقه در دمای 72°C صورت گرفت. در انتهای واکنش داده های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و از روش $\Delta\Delta\text{Ct}$ برای تجزیه داده ها استفاده شد. همه آزمایش ها با سه تکرار و با سه نمونه مستقل انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

| Gene | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') | References |
|------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------|
| TYLCVp | F-GCTCGTAGAGGGTGACGAAG | R-TCTGCAATCCAGGACCTACC | Ghorbani et al. 2020 |
| β -tubulin | F-AACCTCCATTCAGGAGATGTTT | R-TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT | Aime et al. 2013 |
| TYLCV sense/ antisense | F- CGCCCGTCTCGAAGGTTC | R-GCCATATACAATAACAAGGC | Pico et al. 1998 |
| T0302 | F-TGGCTCATCTGAAGCTGATAGCGC | R- AGTGTACATCCTTGCCATTGACT | Garcia et al. 2007 |
| P6-25 | F- GGTAGTGGAAATGATGCTGCTC | R- GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC | Ji et al. 2007b |

جدول ۲- تجزیه واریانس فنول کل، فلاونوئید، کاتالاز، پروکسیداز، گایاکول پروکسیداز و پلی فنول اکسیداز

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | | TYLCV غلظت ژنوم |
|----------------|------------|----------------|-----------|-------------------|------------------|----------|-----------|-----------------|
| | | کاتالاز | پروکسیداز | گایاکول پروکسیداز | پلی فنول اکسیداز | فنول کل | فلاونوئید | |
| تیمار (ژنوتیپ) | ۹ | ۰/۰۰۷۶** | ۰/۱۰۴۴** | ۰/۰۲۰۰** | ۰/۰۰۵۴** | ۰/۰۰۴۵** | ۱۰/۳۸۲** | ۱۸/۳۸۵** |
| خطا | | ۰/۰۰۰۱۹ | ۰/۰۰۰۵۱ | ۰/۰۰۰۰۹۵ | ۰/۰۰۰۳۳ | ۰/۰۰۰۱۱ | ۱/۰۸۸ | ۰/۳۸۹ |
| C.V | | ۳/۹۹۲ | ۱۳/۱۴۲ | ۱۱/۶۶۲ | ۷/۰۲۹ | ۸/۶۱۸ | ۴/۴۱۴ | |

** به معنی سطح معنی داری در سطح یک درصد است

در حالی است که لاین های حاوی مکان ژنی *TY-1/3* از میزان سنتز کمتری برخوردار بوده اند و در گروه های آماری متفاوتی قرار گرفته اند. در نتیجه با توجه به افزایش این ترکیبات در ۲ لاین ذکر شده می توان نتیجه گرفت که این دو لاین بیشتر از سایر لاین های حاوی مکان ژنی *TY-1/3* بوده اند تحت تنش بوده اند لذا به منظور غلبه بر اثرات ناشی از آلودگی ویروسی ترکیبات فنولی بیشتری را سنتز نموده اند. مشاهده شده که تغییر در بیان ژن های تشکیل دهنده اجزاء فنولی و بیان ژن های موجود در مسیر بیوسنتز فلاونوئید در لاین های مشتق شده از گونه های *S. habrochaites* در مواجهه با آلودگی TYLCV افزایش می یابد که این واکنش منجر به تجمع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها می شود که در ایجاد و بروز مقاومت در برابر بیماری ویروسی TYLCV است (Sade et al. 2014).

همچنین مشاهده شده است که در ژنوتیپ های مقاوم تا ۴ برابر میزان سنتز و انباشت ترکیبات فنولی بیشتر است و در گیاهان حساس تجمع ترکیبات فنولی نسبت به گیاهان مقاوم در مواجهه با آلودگی TYLCV بسیار پایین تر است (Sudhakar et al. 2006). ترکیبات فنولی در تنظیم فرایندهای متابولیکی همانند سنتز لیگنین و همچنین در خنثی سازی اثرات مخرب گونه های فعال اکسیژن^۱ (ROS) نقش بسیار مهمی را ایفا می کند (Sofy et al. 2017). گزارشات متعددی در رابطه بانقش ترکیبات فنولی و ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن ها ارائه شده است (Aseel 2019). نتایج این تحقیق با سایر گزارشات مطالعه شده در گیاه گوجه فرنگی در مواجهه با آلودگی بیماری ویروسی TYLCV مطابقت کامل دارد (Sofy et al. 2017; Li et al. 2019; Pappi et al. 2021). پاسخ عمومی گیاهان در برابر انواع تنش ها، ایجاد و سنتز بالاتر رادیکال های آزاد اکسیداتیو (ROS) است که این واکنش منجر به ایجاد عدم توازن فرایندهای متابولیکی در گیاهان (میزبان) می شود. گیاهان به منظور جلوگیری از خسارت رادیکال های آزاد اکسیداتیو، حذف و کاهش سطح این ترکیبات سیستم های دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی را تکامل داده اند (Cai et al. 2021; Xi 2019). آنزیم های آنتی اکسیدانی سلول های گیاهی به منظور کاهش میزان H_2O_2 در بافت های آلوده سنتز می شود (Tran et al.

در بررسی اثر آلودگی بیماری ویروسی TYLCV بر روی لاین های مختلف گوجه فرنگی مقدار آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز، پروکسیداز، گایاکول پروکسیداز و پلی فنول اکسیداز اندازه گیری شد. تجزیه واریانس داده ها بیانگر وجود اختلاف معنی دار در احتمال یک درصد برای همه آنزیم آنتی اکسیدانی مورد مطالعه بود (جدول ۲). در بررسی جدول مقایسه میانگین ها (جدول ۳) بیشترین میزان آنزیم کاتالاز (0.489 میلی گرم بر بافت تازه)، آسکوربات پروکسیداز (0.952 میلی گرم بر بافت تازه) و گایاکول پروکسیداز (0.413 میلی گرم بر بافت تازه) در ژنوتیپ شاهد مشاهده شد. و در مورد آنزیم پلی فنول اکسیداز بیشترین میزان تولید این آنزیم در هر دو ژنوتیپ شاهد (0.768 میکرومول بر گرم بافت تازه) و لاین ۱۲۸ (0.719 میکرومول بر گرم بافت تازه) مشاهده شد که از نظر آماری در یک گروه (a) قرار گرفتند. غلظت ژنوم TYLCV:

بر اساس داده های جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) میزان غلظت ژنوم TYLCV بر روی لاین های مختلف گوجه فرنگی اثر بسیار معنی داری (در سطح یک درصد) دارد. بر اساس نمودار (شکل ۲) بیشترین میزان غلظت ژنوم ویروس در گیاه شاهد ($23/586$)، لاین ۱۲۸ ($21/916$) و سپس در لاین شماره ۷ ($20/353$) مشاهده شد و این در حالی است که در لاین های ۲۱۰ ($16/10$)، لاین ۱۸۹ ($16/25$) و لاین ۱۴۱ ($16/38$) به ترتیب کمترین میزان غلظت ژنوم ویروس TYLCV مشاهده شد.

بحث

گیاهان به منظور کاهش اثرات تنش های مختلف مکانیسم های متفاوتی را به کار می گیرند که از جمله ای این مکانیسم ها سنتز و انباشته نمودن ترکیبات فنولی می باشد. ترکیبات فنولی باعث القاء انباشت ترکیبات فیتوالکسین ها، بیوسنتز لیگنین ها، و تشکیل ساختار دیواره غشاء سلولی می شود. این ترکیبات نقش مهمی در بروز مقاومت در برابر بیماری های ویروسی را ایفا می کنند (Abo-Zaid 2020). همان گونه که در نتایج مشاهده شد دو لاین ۱۲۸ و ۷ نسبت به گیاه شاهد میزان بیشتری از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را در مواجهه با آلودگی ویروسی سنتز نموده اند و این

¹ Reactive oxygen species

ژن پس از رونویسی (PTGS)² است که منجر به عدم تکثیر ویروس در سلول‌های میزبان می‌شود (Gupta et al. 2021). نتایج مطالعات گوناگون نشان داده که حضور *TY-1/3* نسبت به سایر مکان‌های ژنی به صورت منفرد سطح مقاومت بالاتری را در برابر بگومو ویروس‌های تک قسمتی و دو قسمتی ایجاد می‌کند (Garcia et al. 2008). گیاهان حاوی *TY-1/3* سطح بالایی از siRNA خاص TYLCV را نشان می‌دهند که متیلاسیون هم‌زمان بازهای سیتوزین منطقه پروموتور خود و منطقه پروموتور V1 بازهای ویروس را هدف قرار می‌دهند، که این عمل مکانیسم مقاومت TGS پیشرفته را ایجاد می‌کند و مانع از تکثیر ژنوم ویروس در میزبان می‌شود (Butterbach et al. 2014). لاین ۷ که تنها دارای مکان *TY-2* بود نسبت به گیاه شاهد سطح کمتری از ژنوم ویروس را در برگ‌های خود نشان داد در حالی که نسبت به لاین‌های حاوی دو مکان ژنی میزان بیشتری از غلظت ژنوم ویروس در برگ‌هایش مشاهده شد. *TY-2* جزء ژن‌های اصلی (R) مقاومت است که پروتئین‌های گروه NBS-LRR را کد می‌کند و در گروه مقاومت تک ژنی قرار می‌گیرد (Mahmoudabadi et al. 2017). مکانیسم مقاومت تک ژنی بر اساس فرضیه ژن برای ژن بوده و باعث بروز مقاومت عمودی می‌شود. همه ژن‌های مقاومت تک ژنی، ایمنی کامل را نشان نمی‌دهند و تک ژن‌های R ممکن است سطوح نسبی مقاومت را ایجاد کنند (Michelmore et al. 2013). آسیب پذیر بودن مقاومت *TY-2* در برابر برخی از سویه‌های بیماری ویروسی پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی در برخی گزارشات ارائه شده است که با نتایج این مطالعه در یک راستا قرار دارد (Ohnishi et al. 2016; Barbieri et al. 2010). تا به اکنون شش مکان ژنی کنترل‌کننده مقاومت در گیاه گوجه‌فرنگی در برابر بیماری ویروسی TYLCV شناسایی شده است که به‌درستی مکانیسم اثر برخی از آن‌ها در ایجاد مقاومت درک نشده است (Hutton and Scott 2015; Verlaan et al. 2013). بر اساس نتایج یک پژوهش میزان تجمع و انباشت DNA ژنومی ویروس TYLCV در ژنوتیپ‌های مقاوم گوجه‌فرنگی نسبت به ژنوتیپ‌های حساس بسیار ناچیز بوده و علائم ظاهری بیماری در برخی ژنوتیپ‌های مقاوم آشکار نشد و در برخی نیز بسیار علائم

(2012) آنزیم‌های پروکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز سلول‌های گیاهی را در برابر اثرات سمی H_2O_2 به‌واسطه کاتالیز نمودن تجزیه مواد آسمزی فنولی محافظت می‌نماید (Radwan et al. 2007). همچنین آنزیم‌های کاتالاز، همانند گایاکول پروکسیداز و آسکوربات پروکسیداز H_2O_2 را در سلول‌های زنده می‌شکنند و از اثرات مخرب آن بر غشاء و اندام‌های سلولی جلوگیری می‌نمایند (Anuradha 2015). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مواجهه با آلودگی ویروسی در گیاه گوجه‌فرنگی نیز در سایر گزارشات ارائه شده است (Sofy et al. 2021; Sofy et al. 2017; Bassiouny et al. 2015). میزان تشکیل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۳) در لاین‌های حاوی ژن‌های *TY-1/3* و *TY-2* نسبت به گیاه شاهد سطح پایین تری را داشته است. پایین‌تر بودن میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این ژنوتیپ‌ها می‌تواند به این علت باشد که گیاه در شرایط پایین‌تری از تنش قرار دارد. بر اساس مطالعات انجام شده، ژنوتیپ‌های مقاوم گوجه‌فرنگی نسبت به ژنوتیپ‌های حساس در مقابله با آلودگی بیماری ویروسی TYLCV میزان کمتری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در برگ‌های خود تولید نموده‌اند و این در حالی است که در ژنوتیپ‌های حساس این میزان در حداکثر مقدار خود قرار دارد که با نتایج این تحقیق در هماهنگی کامل قرار دارد (El-DougDoug et al. 2013). در بررسی و مطالعه غلظت ژنوم ویروس در لاین‌های مختلف در مواجهه با آلودگی ویروسی از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (qRT-PCR) که تقریباً ۱۰۰۰ برابر حساس‌تر و دقیق‌تر از روش‌های متداول است استفاده شد (Papayiannis et al. 2010). با توجه به نتایج، لاین‌های حاوی دو مکان ژنی *TY-1/3* و *TY-2* سطح کمتری از غلظت ژنوم و آلودگی ویروس را از خود نشان دادند. گیاهان به‌منظور مقابله با آلودگی ناشی از فعالیت پاتوژن‌ها، به چندین سازکار دفاعی مجهز می‌باشند تا در برابر این عوامل بیماری‌زا از خود مقاومت نشان دهند. یک نوع از این واکنش‌های دفاعی بر اساس خاموشی بیان ژن‌های ویروسی می‌باشد، که شامل دو مکانیسم خاموشی ژن در مرحله رونویسی (TGS)¹ و خاموشی

² post-transcriptional gene silencing¹ Transcriptional gene silencing

است و بهتر است که در برنامه های اصلاحی سایر ژن های TY کنار ژن *TY-1/3* به کار گرفته شود. همان گونه که مشاهده شد لاین ۱۲۸ که فاقد مکان ژنی کنترل کننده صفت مقاومت در برابر بیماری ویروسی TYLCV است با توجه به مکانیزم های مقاومت فردی از قبیل توانایی سنتز بالاتر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در مواجهه با آلودگی ویروس توانسته به آثار سوء ویروس بر گیاه نسبت به گیاه شاهد عملکرد بهتری را از خود نشان دهد. لذا در برنامه های اصلاحی انتخاب افراد با توانایی سنتز بالاتر ترکیبات فنولی نیز در کنار به کارگیری ژن های TY به منظور غلبه بر آثار زیان بار بیماری های ویروسی باید مدنظر قرار گیرد.

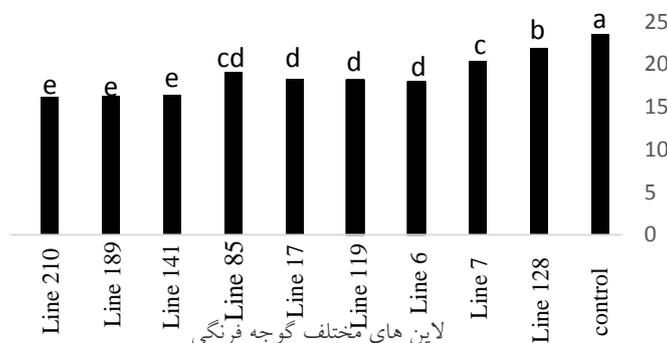
خفیفی مشاهده شد در حالی که میزان تجمع و انباشت ژنوم ویروس و همچنین علائم ظاهری مانند کلروزیس و زرد شدن رنگ برگ ها در ژنوتیپ های حساس بسیار بالا بوده است (Yamaguchi et al. 2013). افزایش DNA ژنوم ویروس TYLCV در ژنوتیپ های حساس و در مقابل سطح پایین تجمع و انباشت ژنوم ویروس در ژنوتیپ های مقاوم گوجه فرنگی در گزارشات متعددی ارائه شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت کامل دارد (Tabein et al. 2017; Al-Shihia et al. 2018). با توجه به نتایج، مشاهده شد لاین ۷ که تنها دارای مکان ژنی *TY-2* است، در ایجاد مقاومت در برابر سویه موجود در ایران ناکارآمد

جدول ۳- مقایسه میانگین فنول کل، فلاونوئید، کاتالاز، پروکسیداز، گایاکول پروکسیداز و پلی فنول اکسیداز با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد.

| پلی فنول اکسیداز μmol/g FW | گایاکول پروکسیداز mg/g FW | پروکسیداز mg/g FW | کاتالاز mg/g FW | فلاونوئید mg QE/G | فنول کل Ga/g DW / (mg) | ژنوتیپ (لاین) |
|-------------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|---------------------------|--|
| ۰/۷۶۵ a | ۰/۴۱۳ a | ۰/۹۵۲ a | ۰/۴۸۹ a | ۱۳/۶۴ ^b | ۰/۵۱۶ ^c | لاین شاهد (-) |
| ۰/۷۱۹ a | ۰/۳۲۵b | ۰/۸۰۹ b | ۰/۳۷۰b | ۱۶/۰۰ ^a | ۰/۷۹۰ ^a | لاین ۱۲۸ (-) |
| ۰/۵۵۱ b | ۰/۲۷۹ b | ۰/۶۴۲c | ۰/۳۶۷ b | ۱۴/۱۵ ^b | ۰/۶۰۰ ^b | لاین ۷ (<i>TY-2</i>) |
| ۰/۴۰۱ c | ۰/۲۰۳ c | ۰/۴۶۳ de | ۰/۲۸۲c | ۱۱/۲۲ ^c | ۰/۳۸۶ ^e | لاین ۶ (<i>TY-2</i> . <i>TY-1/3</i>) |
| ۰/۳۹۶ c | ۰/۱۹۰ cd | ۰/۵۱۱ d | ۰/۲۶۸c | ۱۰/۵۲ ^c | ۰/۴۱۶ ^{de} | لاین ۱۱۹ (<i>TY-2</i> . <i>TY-1/3</i>) |
| ۰/۳۹۳ c | ۰/۲۱۷ c | ۰/۵۳۵ dc | ۰/۲۷۶c | ۱۰/۶۴ ^C | ۰/۴۱۰ ^{de} | لاین ۱۷ (<i>TY-2</i> . <i>TY-1/3</i>) |
| ۰/۳۸۷ c | ۰/۲۲۳ c | ۰/۴۸۷ d | ۰/۲۸۹c | ۱۰/۳۹ ^C | ۰/۴۴۰ ^{de} | لاین ۸۵ (<i>TY-2</i> . <i>TY-1/3</i>) |
| ۰/۴۱۴ c | ۰/۱۷۴ cd | ۰/۴۲۴ de | ۰/۲۹۳c | ۱۱/۱۲ ^C | ۰/۴۲۳ ^{de} | لاین ۱۴۱ (<i>TY-2</i> . <i>TY-1/3</i>) |
| ۰/۴۳۸ c | ۰/۱۸۹ cd | ۰/۴۵۱ de | ۰/۳۰۵c | ۱۱/۳۸ ^c | ۰/۴۴۶ ^d | لاین ۱۸۹ (<i>TY-2</i> . <i>TY-1/3</i>) |
| ۰/۴۴۴ c | ۰/۱۴۰ d | ۰/۳۵۱ e | ۰/۲۹۴c | ۱۱/۶۶ ^c | ۰/۴۵۰ ^d | لاین ۲۱۰ (<i>TY-2</i> . <i>TY-1/3</i>) |

تفاوت حروف در هر ستون به معنی وجود اختلاف معنی دار می باشد.

میزان غلظت ژنوم ویروس



شکل ۲- نمودار غلظت ژنوم ویروس TYLCV در لاین های مختلف گوجه فرنگی

منابع

- Abo-Zaid GA, Matar SM, Abdelkhalek A (2020) Induction of plant resistance against tobacco mosaic virus using the biocontrol agent *Streptomyces cellulosa* isolate Actino 48. *Agronomy* 10:1620.
- Agati G, Brunetti C, Fini A, Gori A, Guidi L, Landi M, Sebastiani F, Tattini M (2020) Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation. *Antioxidants* 9:10-98.
- Agrios GN (2005) *Plant Pathology*. 5th (ED). Academic Press. New York. 922 pp.
- Al-Shihi AA, Hanson P, Al-Sadi AM, Al-Yahyai RA, Bridson RW, Deadman M, Shahid MS (2018) Evaluation of tomato inbred lines for resistance to the tomato yellow leaf curl disease complex in Oman. *Crop Protection* 110:91-98.
- Amoako S, Yahaya A, Sarfo JK (2015) Catalase activity of cassava (*Manihot esculenta*) plant under African cassava mosaic virus infection in Cape coast, Ghana. *African Journal of Biotechnology* 14:1201-1206.
- Anuradha C, Selvarajan R, Vasantha S, Suresha GS (2015) Biochemical Characterization of Compatible Plant Virus Interaction: A Case Study with Bunchy Top Virus-Banana Host-Pathosystem.
- Aseel DG, Rashad YM, Hammad SM (2019) Arbuscular mycorrhizal fungi trigger transcriptional expression of flavonoid and chlorogenic acid biosynthetic pathways genes in tomato against Tomato Mosaic Virus. *Scientific reports* 9:1-10.
- Bahar T, Qureshi AM, Qurashi F, Abid M, Zahra MB, Haider MS (2021) Changes in Phyto-Chemical Status upon Viral Infections in Plant: A Critical Review. *Phyton* 90:75.
- Barbieri M, N Acciarri, E Sabatini, L Sardo, G Accotto, N Pecchioni (2010) Introgression of resistance to two Mediterranean virus species causing tomato yellow leaf curl into a valuable traditional tomato variety. *Journal of Plant Pathology* 485-493.
- Bassiouny FM, Khalil RR, El-Dougdo KA, Abo-Elmaty S, Yousef MS (2015) Geminivirus Modified Antioxidant Systems and Proline Accumulation in Tomato Plant. *Journal of Functional and Environmental Botany* 5:31-40.
- Beam K and Ascencio-Ibáñez JT (2020) Geminivirus resistance: a minireview. *Frontiers in Plant Science* 11:11-31.
- Beers R and Sizer T (1952) Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen peroxide by Catalase. *Journal of Biological Chemistry* 195: 133-138.
- Butterbach P, Verlaan MG, Dulleman A, Lohuis D, Visser RGF, Bai Y, Kormelink R (2014) The TYLCV Resistance Gene *Ty-1* confers resistance in tomato through enhanced transcriptional gene silencing. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 111:12942-12947.
- Cai L, Liu C, Fan G, Liu C, Sun X (2019) Preventing viral disease by ZnONPs through directly deactivating TMV and activating plant immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Environmental Science: Nano* 6:3653-3669.
- Chague V, Mercier JC, Guenard M, de Courcel A, Vedel F (1997) Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 95:671-7.
- Czosnek H, Hariton-Shalev A, Sobol I, Gorovits R, Ghanim M (2017) The incredible journey of begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses* 9:273-291.
- de Azevedo Neto, Prisco AD, Enéas-Filho TJ, de Abreu C EB, Gomes-Filho E (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 56:87-94.
- Dhaliwal MS, Jindal SK, Sharma A, Prasanna HC (2020) Tomato yellow leaf curl virus disease of tomato and its management through resistance breeding: A review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 95:425-444.
- El-DougDoug NK, Mahfouze SA, Ahmed SA, Othman BA, Hazaa MM (2013) Identification of Biochemical and Molecular Markers in Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistant Tomato Species. *Agri Sciences* 2:46-53.
- Garcia BE, Graham E, Jensen KS, Hanson P, Mejia L, Maxwell DP (2007) Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance *TY-2* locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 57:21-24.
- Garcia BE, Mejía L, Melgar S, Teni R, Sánchez-Pérez A, Barillas AC, Montes L, Keuler NS, Salus MS, Havey MJ, Maxwell DP (2008) Effectiveness of the *TY-3* introgression for conferring resistance in F3 families of tomato to bipartite begomoviruses in Guatemala. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 58:22-28.
- Gill U, Scott JW, Shekasteband R, Ogundiwin E, Schuit C, Francis DM, Sim SC, Smith H, Hutton SF (2019) *Ty-6*, a major begomovirus resistance gene on chromosome 10, is effective against Tomato yellow leaf curl virus and Tomato mottle virus. *Theoretical and Applied Genetics* 132:1543-1554.
- Griffiths PD, Scott JW (2001) Inheritance and linkage of tomato mottle virus resistance genes derived from *Lycopersicon chilense* accession LA 1932. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126:462-467.
- Gupta N, Reddy K, Bhattacharyya D (2021) Plant responses to geminivirus infection: guardians of the plant immunity. *Virology Journal* 18:1-25.
- Hajimorad MR, Kheyr-Pour A, Alavi V, Ahoonmanesh A, Bahar M, Rezaian MA, Gronenborn, B (1996) Identification of whitefly transmitted tomato yellow leaf curl geminivirus from Iran and a survey of its distribution with molecular probes. *Plant Pathology* 45:418-425.
- Hanson PM, Bernacchi D, Green. S (2000) Mapping a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. *Journal of American Society of Horticultural Science* 125:15-20.
- Hutton SF, Scott JW, Schuster DJ (2012) Recessive resistance to tomato yellow leaf curl virus from the tomato cultivar Tyking is located in same region as *Ty-5* on chromosome 4. *Journal of American Society of Horticultural Science* 47:324-7.

- Jabar AK, Aldhahi HHK, Salim HA (2020) Effect of manufactured iron oxides in control of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Plant Archives* 20:2131-2134.
- Ji Y, Salus MS, van Betteray B, Smeets J, Jensen KS, Martin CT, Mejía L, Scott JW, Havey MJ, Maxwell DP (2007a) Co-dominant SCAR markers for detection of the *Ty-3* and *Ty-3a* loci from *Solanum chilense* at 25 cM of chromosome 6 of tomato. *Report Tomato Genetics Cooperative* 57:25-28.
- Ji Y, Schuster DJ, Scott JW (2007b) *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* 20:271-284.
- Kenyon L, Tsai WS, Shih SL, Lee LM (2014) Emergence and diversity of begomoviruses infecting solanaceous crops in East and Southeast Asia. *Virus Research* 186:104-113.
- Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: Imperato, F. (Ed.), *Phytochemistry: Advances in Research*. Research Signpost, Trivandrum, pp. 2367.
- Lee JH, Chung DJ, Lee JM, Yeom I (2021) Development and application of gene-specific markers for Tomato Yellow Leaf Curl Virus resistance in both field and artificial infections. *Plants* 10:9-20.
- Li T, Huang Y, Xu ZS, Wang F, Xiong AS (2019) Salicylic acid-induced differential resistance to the Tomato yellow leaf curl virus among resistant and susceptible tomato cultivars. *BMC plant biology* 19:1-14.
- Mabvakure B, Martin DP, Kraberger S, Cloete L, van Brunschot S, Geering ADW, Thomas JE, Bananej K, Lett J.-M, Lefeuvre P (2016) Ongoing geographical spread of Tomato yellow leaf curl virus *Virology* 498:257-264.
- Mahmoudabadi G, Milo R (2017) Phillips. Energetic cost of building a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:E4324-33.
- Mamdouh M, Mahmoud Y, Omar E, Zeinab B (2002) Kinetin regulation of growth and secondary metabolism in waterlogging and salinity treated *Vigna sinensis* and *Zea mays*. *Acta Physiologiae Plantarum* 24:19-27.
- Michelmore RW, Christopoulou M, Caldwell KS (2013) Impacts of resistance gene genetics, function and evolution on a durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 51:291-319.
- Mittler, R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* 7: 405-410.
- Murray HG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research* 8:4321-4325.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22:867-880.
- Nevame AYM, Xia L, Nchongboh CG, Hasan MM, Alam MA, Yongbo L, Wenting Z, Yafei H, Emon RM, Ismail M R, Efiuse A, Gang S, Wenhui L, Longting S (2018) Development of a new molecular marker for the resistance to tomato yellow leaf curl virus. *BioMed Research International* 2018:
- Ohnishi J, Yamaguchi H, Saito A (2016) Analysis of the Mild strain of tomato yellow leaf curl virus, which overcomes *Ty-2*. *Archives of Virology* 161:2207-2217.
- Papayiannis LC, Iacovides TA, Katis NI, Brown JK (2010) Differentiation of Tomato yellow leaf curl virus and Tomato yellow leaf curl Sardinia virus using real-time TaqMan® PCR. *Journal of virological methods* 165:238-245.
- Pappi P, Nikoloudakis N, Fanourakis D, Zambounis A, Delis C, Tsaniklidis G (2021) Differential triggering of the phenylpropanoid biosynthetic pathway key genes transcription upon cold stress and viral infection in tomato leaves. *Horticulturae* 7:448.
- Pico B, Diez MJ, Nuez F (1998) Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* L and wild relatives for resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Euphytica* 101:259-271.
- Radwan DEM, Fayez KA, Mahmoud SY, Hamad A, 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 Biochem* 45:480-489
- Sade D, Shriki O, Cuadros-Inostroza A, Tohge T, Semel Y, Haviv Y, Willmitzer L, Fernie AR, Czosnek H, Brotman Y (2014) Comparative metabolomics and 169 transcriptomics of plant response to Tomato yellow leaf curl virus infection in resistant and susceptible tomato cultivars. *Metabolomics* 1-17.
- Sairam RK, Rao KV and Srivastava GC (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163:1037-1046.
- Shatta A, El-Shamei Z (1999) Differentiation of eggplant (*Solanum melongena* L.) polyphenoloxidase, laccase and peroxidase using selective substrates and inhibitors. *Advanced Food Science* 21:79-83.
- Siddique Z, Akhtar KP, Hameed A, Sarwar N, Imran-Ul-Haq, Khan SA (2014) Biochemical alterations in leaves of resistant and susceptible cotton genotypes infected systemically by cotton leaf curl Burewala virus. *Journal of Plant Interactions* 9:702-711.
- Singh RK, Rai NM, Singh SN, Srivastava K (2015) Selection of tomato genotypes resistant to Tomato leaf curls virus disease using biochemical and physiological markers. *The Journal of Agricultural Science Cambridge Core* 153:646-655.
- Singh RK, Rai N, Singh AK, Kumar P, Singh B (2019) A critical review on Tomato leaf curl virus resistance in tomato. *International Journal of Vegetable Science* 25:373-393.
- Singh RK, Rai N, Singh SN (2010) Response of tomato genotypes to tomato leaf curl virus. *The Indian Journal of Agricultural Sciences* 80:755-758.
- Sofy AR, El-Dougdoug KA, Mousa AA, Refaey EE (2017) Impact of two TYLCV Egyptian isolates on metabolic and antioxidant activities in some tomato cultivars. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 4:110-133.

- Sofy AR, Sofy MR, Hmed AA, Dawoud RA, Refaey EE, Mohamed HI, El-Dougoudg NK (2021) Molecular characterization of the Alfalfa mosaic virus infecting *Solanum melongena* in Egypt and the control of its deleterious effects with melatonin and salicylic acid. *Plants* 10:459.
- Sofy A, El-Dougoudg RKA, Mousa AA, Refaey EE (2017) Impact of two TYLCV Egyptian isolates on metabolic and antioxidant activities in some tomato cultivars. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 4:110-133.
- Soland SF, Laima SK (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1:1-5.
- Sudhakar N, Nagendra-Prasad D, Mohan N and Murugesan K (2006) Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv PKM1 (tomato) against Cucumber mosaic virus by using ozone. *Journal of Virological Methods* 139:71-77.
- Tabein S, Behjatnia SAA, Laviano L, Pecchioni N, Accotto GP, Noris E, Miozzi L (2017) Pyramiding *Ty-1/Ty-3* and *Ty-2* in tomato hybrids dramatically inhibits symptom expression and accumulation of tomato yellow leaf curl disease inducing viruses. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50:213-227.
- Toor RK, Savage GP (2005) Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International* 38:487-494.
- Tran LT, Taylor JS, Constabel CP (2012) The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC genomics* 13:395.
- Verlaan MG, Hutton SF, Ibrahim RM, Kormelink R, Visser RGF, Scott JW, Edwards JD, Bai Y (2013) The tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-Class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genet* 9:1-11.
- Xi D, Li X, Gao L, Zhang Z, Zhu Y, Zhu H (2021) Application of exogenous salicylic acid reduces disease severity of *Plasmodiophora brassicae* in pakchoi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino). *Plos one* 16:e0248648.
- Yamaguchi H, Ohnishi J, Miyatake K, Nunome T, Ohyama A, Negoro S, Fukuoka H (2013) A simple, efficient agroinoculation soaking procedure for Tomato yellow leaf curl virus. *Journal of general plant pathology* 79:243-248.
- Yamaguchi H, Ohnishi J, Saito A, Ohyama A, Nunome T, Miyatake K, Fukuoka H (2018) An NB-LRR gene, *TYNBS1*, is responsible for resistance mediated by the *Ty-2* Begomovirus resistance locus of tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 131:1345-1362.
- Zerbini FM, Briddon RW, Idris A, Martin DP, Moriones E, Navas-Castillo J, Rivera-Bustamante R, Varsani A, Consortium IR (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *Journal of General Virology* 98: 131-133.