

برهمکنش ویروس موزاییک شلغم یا ویروس موزاییک کلم گل با *Phoma lingam* در گیاه کلزا*

علی زرین‌جو، مهدی سعادت‌تی، ناصر صفائی و مسعود شمس‌بخش^{۱*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۹)

چکیده

در طبیعت احتمال آلودگی گیاهان به بیمارگرهای مختلف در یک زمان امکان‌پذیر است. در اکثر موارد آلودگی مخلوط ویروس و قارچ منجر به افزایش حساسیت گیاه می‌شود. در پژوهش حاضر برهمکنش ویروس موزاییک شلغم (*turnip mosaic virus, TuMV*) یا موزاییک کلم گل (*cauliflower mosaic virus, CaMV*) با قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا در رقم طلائی کلزا بررسی شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد و برای مایه‌زنی ویروس به گیاهان، از برگ‌های شلغم آلوده به ویروس و به روش مکانیکی و برای مایه‌زنی قارچ به گیاهان از قرص قارچ عامل بیماری استفاده گردید. در بررسی این برهمکنش‌ها، علاوه بر شاخص‌های شدت علائم بیماری، واکنش‌های دفاعی آنزیمی (کاتالاز و گایاکول پراکسیداز) و غیر آنزیمی (کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها) گیاه نیز سنجیده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که شدت علائم ناشی از قارچ عامل بیماری در آلودگی اولیه با ویروس موزاییک شلغم افزایش معنی‌داری داشت، اما در آلودگی اولیه با ویروس موزاییک کلم‌گل تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. محتوی کلروفیل، کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها در تیمارهای آلوده به بیمارگرهای مورد مطالعه نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری و محتوی آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در تیمارهای آلوده به بیمارگرهای مورد مطالعه نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان دادند. با توجه به اثر هم‌افزایی قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا و ویروس موزاییک شلغم در آلودگی مخلوط و گزارش وقوع هر دو عامل بیماری از مناطق زیر کشت کلزا در ایران توصیه می‌شود رقم‌هایی برای کشت انتخاب شوند که نسبت به هر دو بیمارگر مقاوم باشند.

کلیدواژه: پراکسیداز، پوتی‌ویروس، کاروتنوئید، پراکسیداز، کاتالاز، کلروفیل

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس..

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دکتری، دانشیار و استاد گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

Interaction of *Turnip mosaic virus* or *Cauliflower mosaic virus* with *Phoma lingam* in Canola*

A. Zarinjoo^{1*}, M. Saadati², N. Safaie³, and M. Shams-bakhsh^{4**}

(Received: 28.5.2020; Accepted: 19.9.2020)

Abstract

Plant infections to several pathogens at a same time are expected in nature. In most cases, plant mixed infections with viruses and fungi could result in increased susceptibility in plant host. In the present study, the interaction between turnip mosaic virus or cauliflower mosaic virus with *Phoma lingam* in canola (*Brassica napus* L.) was investigated. Experiments were carried out using a completely randomized design. Plants were mechanically inoculated with virus-infected turnip leaf saps and by medium plug of fungal causal agent. To evaluate the interactions, in addition to recording the type and severity of symptoms, enzymatic (catalase and guaiacol peroxidase) and non-enzymatic (carotenoids and flavonoids) defense responses of treated plants were measured. The results showed that the severity of *Phoma* symptoms significantly increased in primary infection with turnip mosaic virus and then phoma inoculation, but no significant changes of *Phoma* symptoms were observed in initial infection with cauliflower mosaic virus. All treatments infected with case studied pathogens compared to the control treatment (no pathogen infection) showed a significant decrease in chlorophyll content, quantity of carotenoids, and flavonoids. While, catalase and guaiacol peroxidase content in the treatments infected with case studied pathogens showed a significant increase compared to the control treatment. Due to the synergistic effect of *Phoma lingam* and turnip mosaic virus in mixed infection of canola and reporting the incidence of both causal agents in canola cultivated areas in Iran, it is recommended to select canola cultivars that are resistant to both pathogens.

Keywords: carotenoids, catalase, chlorophyll, peroxidase, *Potyvirus*.

* Part of M.Sc. Thesis of the First Author Submitted to Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

** Corresponding author's E-mail: shamsbakhsh@modares.ac.ir

1. M.Sc. Student, Ph.D. Student, Associate Professor, Professor respectively, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

مقدمه

ویروس موزاییک کلم گل گونه تیپ جنس *Caulimovirus* از خانواده *Caulimoviridae* است و حدود ۲۷ گونه شسته به روش نیمه پایا ناقل این ویروس می‌باشند (Gardner et al. 1981). ویروس موزاییک کلم گل به طور گسترده‌ای از مناطق معتدل گزارش شده است (Sohi et al. 2013) و در گیاهان آلوده علاوه بر کاهش رشد و نمو، بازدهی دانه‌های روغنی را تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (Sutic et al. 1999).

آلودگی مخلوط گیاهان به چندین بیمارگر در طبیعت امری اجتناب ناپذیر است، بنابراین تاکنون برهمکنش بین بیمارگرهای ویروسی و قارچی گیاهان در مطالعات متعددی بررسی شده است. نتیجه بررسی برهمکنش در بیشتر گزارش‌ها حاکی از این است که بیمارگرهای ویروسی باعث حساسیت میزبان گیاهی به آلودگی قارچی می‌شوند به طوری که شدت بیماری ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* در گیاهچه‌های مارچوبه آلوده به *Asparagus virus II* (AV-II) (Evans & Stephens 1989)، *Rhizoctonia solani* در سیب‌زمینی (potato leaf roll) و ویروس لوله شدن سیب زمینی (*Cochliobolus virus*, PLRV) (Ito et al. 2017) در برنج *miyabeanus* (rice hoja blanca virus, RHBV) (Lamey & Everette, 1967) یا *Cercospora sp.* یا *Alternaria sp.* در چغندر آلوده به ویروس زردی چغندر (beet yellows virus) (Crane & Calpouzos, 1969)، *Rhizoctonia sp.* کدوئیان آلوده به ویروس موزاییک کدوئیان (cucumber mosaic virus CMV) (Bateman, 1961)، *Fusarium moniliforme* در ذرت شیرین آلوده به ویروس موزاییک ذرت (maize dwarf mosaic virus) (Futrell & Scott, 1969)، *Bipolaris maydis* یا *Gibberella zea*

کلزا (*Brassica napus* L.) متعلق به تیره چلیپائیان (*Brassicaceae*) و از محصولات مهم دانه روغنی محسوب می‌شود. سطح زیر کشت کلزا در ایران در سال زراعی ۹۶-۹۷ تقریباً حدود ۲۰۰ هزار هکتار بوده که بیش از نیمی از آن به استان‌های گلستان، فارس، خوزستان و مازندران تعلق داشته است (Anonymous, 2016). این گیاه نیز مانند سایر گیاهان توسط آفات و بیمارگرهای متعددی مورد حمله قرار می‌گیرد، از میان بیماری‌های مهم کلزا می‌توان به بیماری قارچی ساق سیاه و بیماری موزاییک ناشی از ویروس موزاییک شلغم (*turnip mosaic virus*, TuMV) و ویروس موزاییک کلم-گل (*cauliflower mosaic virus*, CaMV) اشاره کرد (Shahraeen 2012, Tabarestani et al. 2010, West et al. 2001). عامل بیماری مهم ساق سیاه کلزا قارچی با مرحله جنسی *Leptosphaeria maculans* و مرحله غیرجنسی *Phoma lingam* است که در سراسر جهان و همچنین ایران انتشار دارد و بطور موثری در نواحی اصلی کشت کلزا شامل اروپا، استرالیا و آمریکای شمالی خسارت می‌زند (West et al. 2001, Zaman Mirabadi et al. 2008). ویروس موزاییک شلغم متعلق به جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* است و به صورت ناپایا توسط گونه‌های شته انتقال می‌یابد (Edwardson & Christie 2000, Coutts & Jones 1986). این ویروس در سراسر جهان از مناطق معتدل و گرمسیری گزارش شده است (Shattuck 1992). خسارت ناشی از ویروس موزاییک شلغم در گیاه میزبان به صورت کاهش کمی و کیفی محصول گزارش شده است (Hunter et al. 2002, Shattuck & Stobbs 1987, Hardwick et al. 1994).

f.sp. avena در گندم و جو آلوده به ویروس زردی و کوتولگی جو (barley yellow dwarf virus, BYDV) (Potter, 1982) بدون تغییر بوده است و شدت بیماری ناشی از *Septoria apiicola* در گیاهان کرفس آلوده به ویروس موزاییک کرفس (celery mosaic virus, CeMV) یا ویروس لکه زرد هویج (parsnip yellow fleck virus, PYFV) به ترتیب به میزان ۱۷-۳۹ و ۵۴-۹۱ درصد نسبت به گیاهان عاری از ویروس کاهش داشته است (Ataga et al. 1999). علائم *Sphaerotheca fuliginea* در آلودگی اولیه خیار با ویروس نکروز (بافت مردگی) توتون (tobacco necrosis virus, TNV) کاهش یافت و نشان داده شد که ویروس باعث القای مقاومت گیاه در برابر بیمارگر بعدی شده است (Farrage et al, 2007).

به دلیل گزارش‌های متعدد از آلودگی‌های همزمان بیماری قارچی ساق سیاه کلزا ناشی از قارچ فوما و ویروس موزاییک شلغم و موزاییک کلم گل و گزارش‌هایی از شکست مقاومت در آلودگی‌های مخلوط، در پژوهش حاضر تاثیر ویروس موزاییک شلغم و موزاییک کلم گل روی پیشرفت بیماری ساق سیاه کلزا در رقم متحمل طلائی در شرایط گلخانه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

رقم کلزا و منابع ویروس

در این آزمایش از یک رقم تجاری تیپ زمستانه کلزا و سازگار با شرایط آب و هوایی ایران بنام رقم طلائی، که از موسسه تحقیقات دانه‌های روغنی کشور تهیه شده بود، استفاده شد. این رقم متحمل در برابر بیماری ساق سیاه کلزا (Banaei et al. 2009) و نیمه متحمل در برابر موزاییک کلم گل (Ghasemzadeh & Shams-bakhsh

Helminthosporium pedicellatum در ذرت آلوده به ویروس موزاییک کوتولگی ذرت (maize dwarf mosaic virus) (Tu & Ford, 1971; Bateman, 1961; Stevens & Gudauskas, 1982) یا *Botrytis fabae* یا *Botrytis cinerea* در باقلای سبز آلوده به ویروس موزاییک زرد لوبیا (bean yellow mosaic virus) یا ویروس لوله شدن برگ لوبیا (bean leaf roll virus) (Omar et al., 1986)، *F.oxysporum f.sp. conglutinans* در کلم آلوده به *TuMV* (Reyes & Chadha, 1972) و *Cochliobolus sativus* در گندم آلوده به ویروس کوتولگی زرد جو (barley yellow dwarf virus) (Scott, 1968) نسبت به گیاهان عاری از ویروس‌های مذکور افزایش نشان دادند. بررسی‌های بیشتر مشخص شده که این افزایش علائم با افزایش نشت سلولی و مواد غذایی (کربوهیدرات‌ها و آمینواسیدها)، افزایش سطح اینوکولوم بیمارگرهای ریزوسفر و کاهش سنتز لیگنین همبستگی مثبتی دارند (Evans & Stephens 1989; Tu & Ford, 1971)، تغییرات سیتولوژیکی و فیزیولوژیکی در سلول‌های آلوده به ویروس شامل کاهش در اندازه و تعداد کلروپلاست، افزایش در مواد هسته‌ای و تخریب سول‌های مزوفیل اتفاق افتاده است (Beniwal and Gudauskas 1974; Naqavi and Futrell 1969). در همین حال گزارش‌های دیگری موجود است که نشان می‌دهد حساسیت ذرت آلوده به ویروس رگه ای ذرت (maize streak virus, MSV) در برابر بیماری‌های سفیدک داخلی ناشی از *Peronosclerospora philippinensis* و *P. sorghi* نسبت به ذرت عاری از ویروس (Common rust) (Damsteegt & Bonde 1993) در ذرت آلوده به (maize dwarf mosaic virus) (Meyer & Pataky, 2010) و بیماری‌های زنگ ناشی از *Puccinia P. coronata* یا *P. hordei* یا *recondite f.sp. tritici*

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای انجام واکنش زنجیره پلی‌مراز

Table 1. Oligonucleotides used in polymerase chain reactions

Primer names	Forward	Reverse	Reference
TuMV-CP	5'-CAAGCAATCTTTGAGGATTATG-3'	5'-TATTTCCCATTAAGCGAGAATAC-3'	(Sanchez et al. 2003)
CaMV-P6	5'-GAGAACATAGAAAACTCCTCAT-3'	5'-GGATGAAGTTCAACCTATCTG-3'	(Shams-Bakhsh et al. 2007)

تیمار با پودر کاربراندوم و بافر فسفات بدون ویروس) و گیاه سالم (شاهد منفی) اجرا گردید. پس از تیمار کردن گیاهان، آن‌ها در دمای 20 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. ویروس‌ها در مرحله سه برگگی گیاه (Jafari et al. 2016, Ghasemzadeh & Shams-bakhsh 2016, McGee & Petrie 1979). پس از توسعه علائم ناشی از قارچ فوما و همچنین توسعه برگ هفتم کلزا نمونه‌برداری‌ها انجام شد و تیمارها مورد مقایسه قرار گرفتند.

برای تایید آلودگی گیاهان به ویروس موزاییک شلغم استخراج آرنا‌ای به روش RNX-Plus و نسخه برداری معکوس با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis Kit (Parstous) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از کیت تجاری Taq master mix (2X) شرکت Amplicon با جفت آغازگر اختصاصی ویروس موزاییک شلغم (جدول ۱) تکثیر کننده قطعه ۹۸۶ جفت بازی شامل بخشی از طول ژن رمز کننده پروتئین پوششی با برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (جدول ۲) انجام شد. همچنین برای تایید آلودگی گیاهان به ویروس موزاییک کلم‌گل استخراج دی‌ان‌ای به روش CTAB (Dellaporta et al. 1983)، انجام گرفت و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با جفت آغازگر اختصاصی ویروس موزاییک کلم‌گل (جدول ۱) تکثیر کننده بخشی از ژن P6 و برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (جدول ۲)

(2016) و ویروس موزاییک شلغم (Jafari et al. 2016) است.

جدایه ویروس موزاییک شلغم خالص شده از گیاه *Brassica chinensis* از کشور هلند با رس‌شمار Ku535893 (Jafari et al. 2016) و جدایه ویروس موزاییک کلم‌گل استفاده شده در این پژوهش همسانه عفونت‌زای جدایه CM1841 (Anderson et al. 1991) با رس‌شمار V00140 بود.

به منظور استفاده از همسانه عفونت‌زای CaMV، ابتدا پلاسمید pCa122 حامل همسانه به باکتری *Escherichia coli* DH5 α منتقل شده و از باکتری‌های ترانسفرم شده پلاسمید استخراج گردید (Sambrook et al. 1989). سپس پلاسمید بدست آمده به برگ‌های گیاه شلغم در مرحله سه برگگی مایه‌زنی شد. به منظور فعال‌سازی ویروس موزاییک شلغم برگ‌های آلوده در بافر فسفات یکدهم مولار و پی‌اچ ۷/۴ عصاره‌گیری گردید و با پودر کاربراندوم به برگ‌های شلغم در مرحله ۳-۵ برگگی مایه‌زنی شد.

کاشت بذر و اجرای آزمایش

بذرهای کلزا در گلدان‌های پلاستیکی کشت گردید و در اتاقک رشد در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار شامل تیمارهای آزمایش *TuMV*، *CaMV*، *Phoma*، *Mock-virus-Phoma*، *CaMV-Phoma*، *TuMV-Phoma*

جدول ۲. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر بخشی از ژنوم ویروس موزاییک شلغم و ویروس موزاییک کلم گل

Table 2. Polymerase chain reactions program to amplify a part of the genomes of turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus

PCR cycle	TuMV		CaMV	
	Temperature (°C)	Time	Temperature (°C)	Time
Initial denaturing	95	4 min	95	3 min
Denaturing	94	20 s	94	1 min
Annealing	56	30 s	56	40 s
Extension	72	1 min	72	1 min
Final extension	72	5 min	72	5 min

انجام شد.

برداری انجام شد و پس از تعیین مقیاس اندازه‌گیری، مساحت برگ، مساحت کل لکه کلروز و نکروز، مساحت لکه سبزد و مساحت لکه بافت مرده به تفکیک با برنامه ImageJ اندازه‌گیری شد و شدت علائم هر برگ از تقسیم مساحت قسمت سبزد و بافت مرده بر مساحت کل برگ محاسبه گردید (Banaei et al. 2009).

اندازه‌گیری کلروفیل

جهت اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید، نمونه‌برداری انجام شد. طبق این روش ۱۰ میلی گرم بافت تازه برگ توزین و سه میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید به آن اضافه و به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق در حالت تاریکی قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در حمام آب‌گرم قرار داده شدند؛ بعد از آن در میزان جذب نوری در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل UV/VIS UV2150 ساخت شرکت UNICO آمریکا، قرائت و محتوای کلروفیل a و b و کاروتنوئید طبق روش ارایه شده توسط (Hiscox & Israelstam 1979) محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فلاونوئید

به ۲۰۰ میلی‌گرم بافت برگ هر نمونه، پس از خرد

قارچ بیمارگر و نحوه مایه زنی

قارچ فوما استفاده شده در این پژوهش از آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس دریافت و مایه‌زنی آن با استفاده از قرص قارچ به روش بنایی و همکاران (Banaei et al. 2009) انجام شد. بدین منظور قرص‌هایی به قطر شش میلی‌متر از کشت ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت عمومی متشکل از عصاره سیب‌زمینی، دکستروز و آگار برداشته شد و روی رگبرگ اصلی برگ ششم در مرحله شش‌برگی گیاه، که از قبل با سوزن استریل سوراخ‌های ریزی در آن ایجاد شده و با توپین ۲۰ آغشته شده بود قرار داده شد و به مدت ۴۸ ساعت گلدان‌ها در شرایط رطوبتی اشباع قرار داده شدند. برای تایید مشاهدات گیاهان حاوی قارچ و عاری از قارچ، بطور تصادفی از برگ‌های مورد مطالعه نمونه‌برداری شد و پس از ضدعفونی سطحی و خردکردن آن به قطعات کوچک روی محیط کشت یاد شده رشد داده شد و نمونه‌ها از روی مشاهدات میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری شدت بیماری

برای تخمین میزان شدت بیماری ناشی از قارچ فوما، پس از توسعه علائم ناشی از فوما، نمونه‌برداری و عکس-

شدن، سه میلی لیتر محلول ۱٪ اتانول-استیک اسید (۹۹: ۱ حجمی: حجمی) افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در 4000 g سانتریفیوژ شد. فاز رویی در حمام آبگرم در دمای 80 درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس در دمای اتاق قرار گرفت. سپس میزان جذب عصاره در سه طول موج 270 ، 300 و 330 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. ضریب خاموشی $\epsilon = 33000 \text{ cm}^{-2} \text{ mol}^{-1}$ جهت محاسبه محتوی فلاونوئیدی مورد استفاده قرار گرفت و بر حسب $\mu\text{mol/g FW}$ گزارش شد (Krizet al. 1993).

استخراج عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و کاتالاز

استخراج عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و کاتالاز به روش کار و میشر (Kar & Mishra 1976) انجام شد. مقدار 500 میلی گرم برگ - تازه گیاه که در روز ۱۰ پس از مایه زنی با فوما نمونه برداری شده بود با 2 میلی لیتر بافر فسفات $0/1$ مولار با $6/8$ pH در هاون چینی سرد هموزن گردید. آنگاه به مدت 15 دقیقه با سرعت 10000 دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس با سانتریفیوژ یخچال دار مدل Eppendorf کشور آلمان، سانتریفیوژ شد. از فاز شفاف رویی برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی استفاده شد.

تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز بر اساس روش چنس و مهلی (Chance & Maehly 1955) همراه با کمی تغییرات انجام شد. مخلوط واکنش به حجم سه میلی لیتر شامل $2/7$ میلی لیتر بافر فسفات 25 میلی مولار با $6/8$ pH، 100 میکرولیتر گایاکول $0/6$ مولار، 100 میکرولیتر عصاره

آنزیمی 100 میکرولیتر آب اکسیژنه $1/2$ مولار بود. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. افزایش جذب نور در طول موج 470 نانومتر در یک دقیقه اول بعد از افزودن آب اکسیژنه با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV/VIS UV2150، ساخت شرکت UNICO آمریکا، اندازه گیری شد. در نهایت سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از اندازه گیری میزان جذب تترایاکول تشکیل شده از گایاکول با ضریب خاموشی (ϵ) برابر با $26/6 \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ در یک دقیقه به ازای یک میلی گرم وزن تر برگ بیان گردید.

تعیین فعالیت کاتالاز

سنجش فعالیت کاتالاز بر اساس روش چنس و مهلی (Chance & Maehly 1955) با کمی تغییرات انجام شد. مخلوط واکنش به حجم سه میلی لیتر شامل $2/8$ میلی لیتر بافر فسفات 50 میلی مولار با $6/8$ pH، عصاره آنزیمی (100 میکرولیتر)، آب اکسیژنه $0/45$ مولار اضافه شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب آب اکسیژنه در طول موج 240 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV2150 UV/VIS ساخت شرکت UNICO آمریکا، قرائت گردید. در نهایت فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس ضریب خاموشی (ϵ) برابر با $40 \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ در دقیقه به ازای یک میلی گرم وزن تر برگ بیان گردید.

آنالیز داده‌ها

واکاوی واریانس (Analysis of variance, ANOVA) و داده‌ها با استفاده از مدل خطی عمومی (General linear

TuMV در این افزایش بیشتر مشاهده شد (شکل ۲- B)، ولی شدت علائم بیماری فقط در آلودگی اولیه با TuMV افزایش پیدا کرد و در آلودگی اولیه با CaMV تاثیری در افزایش شدت علائم مشاهده نشد و با تیمار قارچ به تنهایی و Mock-Phoma تفاوت معنی دار آماری نداشت (شکل ۲- A).

محتوی کلروفیل

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اندازه گیری کلروفیل نشان داد که بین بعضی تیمارهای آزمایشی در سطح احتمال یک درصد در مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل اختلاف معنی داری وجود داشت. در هر نوع کلروفیل، تیمار قارچ *Phoma* به تنهایی با شاهد یک گروه آماری تشکیل دادند. هر یک از تیمارهای ویروسی به تنهایی یا ترکیب آنها با قارچ فوما در میزان هر سه نوع کلروفیل با شاهد اختلاف معنی دار داشتند. بالاترین میزان کاهش کلروفیل در هر سه نوع کلروفیل مربوط به تیمارهای *TuMV-Phoma* و *CaMV-Phoma* بود. مقدار کاهش کلروفیل b در تیمار *Mock-Phoma* از لحاظ آماری تفاوتی با تیمارهای قارچ و شاهد نداشت ولی این تیمار باعث کاهش مقدار کلروفیل a و کلروفیل کل در مقایسه با تیمارهای قارچ و شاهد شد (شکل ۳).

کاروتنوئید

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اندازه گیری مقدار کاروتنوئید در تیمارهای مورد بررسی نشان داد که تمام تیمارهای آزمایشی بجز تیمار قارچ به تنهایی در سطح یک درصد با تیمار شاهد تفاوت معنی داری داشتند. کمترین میزان کاروتنوئید مربوط به تیمار *TuMV-Phoma* بود. تیمار بیمارگرهای ویروسی به تنهایی باعث کاهش مقدار

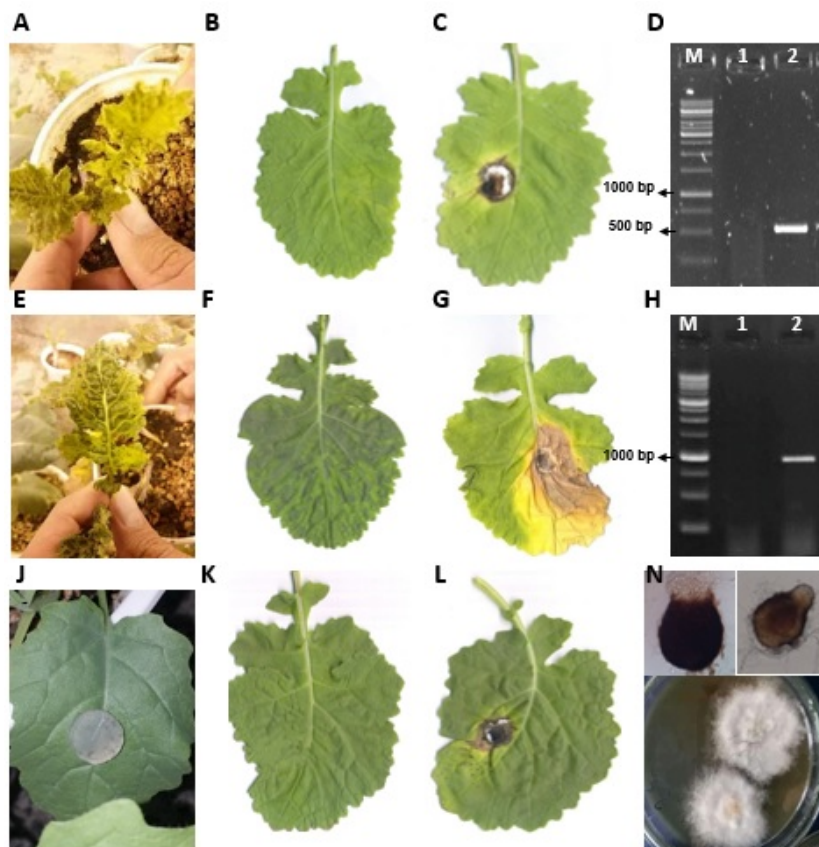
Statistical Analysis (model, GLM) با نرم افزار SAS Institute Inc., Cary, NC,) System, SAS 9.4 (USA) انجام گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با روش (P) Least significant difference, LSD (= 0.05) پذیرفت. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار GraphPad Software Inc, San Diego, CA,) Prism 8.3 (USA) انجام شد.

نتایج

نتایج این پژوهش نشان داد که در آلودگی توأم قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا با یکی از ویروس‌های موزاییک شلغم یا موزاییک کلم گل در رقم طلائی کلزا، شدت بیماری ناشی از *Phoma lingam* در آلودگی اولیه با ویروس موزاییک شلغم (شکل ۱- g) افزایش یافت اما در آلودگی اولیه با ویروس موزاییک کلم گل (شکل ۱- c) افزایش معنی داری مشاهده نشد.

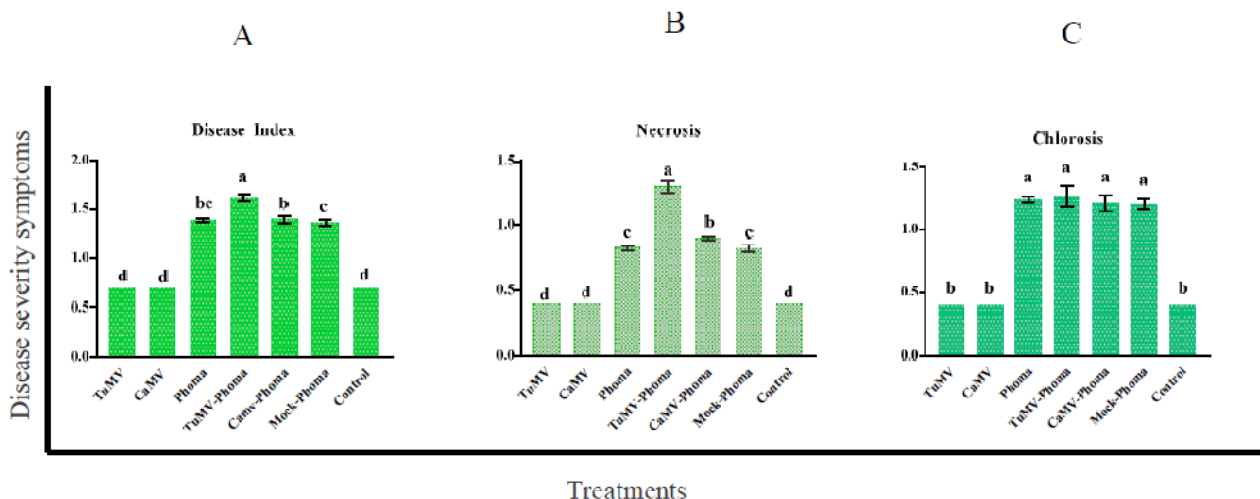
شدت علائم بیماری (سبزدی و بافت مردگی)

تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر این بود که در سطح احتمال یک درصد بین تیمارها در شاخص‌های شدت علائم بیماری قارچی (مجموع بافت مردگی و سبزدی)، بافت مردگی و سبزدی به تنهایی اختلاف معنی دار آماری وجود داشت. با توجه به اینکه شدت علائم بیماری و دیگر صفات بررسی شده تحت تاثیر بیمارگر قارچی بود، بنابراین تیمارهای جداگانه ویروسی با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند. تیمارهای همزمان ویروسی و قارچ در شدت کلروز اندازه‌گیری شده هیچ تاثیری نداشتند و با تیمار قارچ (*Phoma*) و *Mock-Phoma* در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۲- C). شدت بافت مردگی در آلودگی اولیه با هر دو ویروس افزایش داشت و اثر



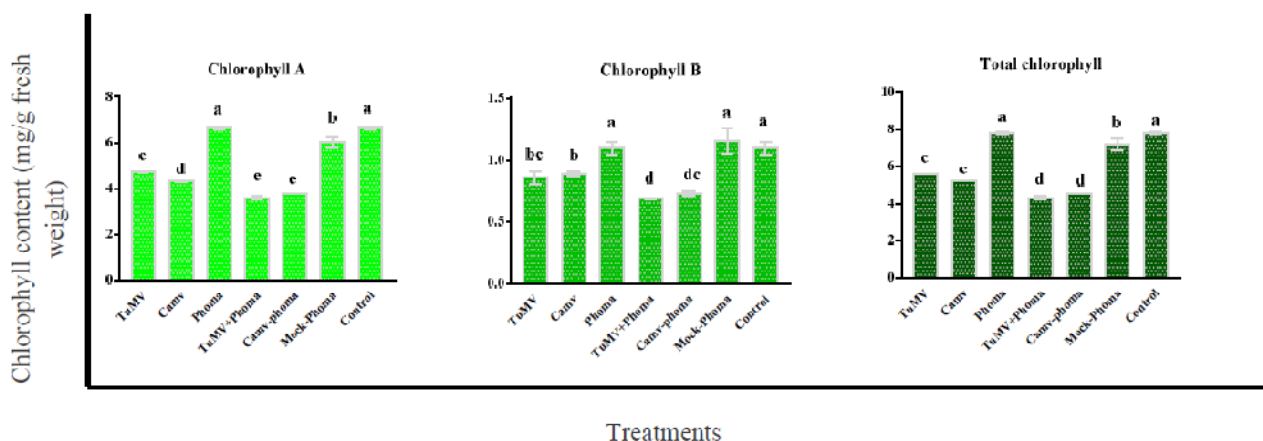
شکل ۱. A: شلغم آلوده به CaMV، B: یک برگ کلزای آلوده به CaMV، C: یک برگ کلزای آلوده به CaMV-Phoma، D: نقوش الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس CaMV با استفاده از آغازگرهای CaMV-p6 (تکنیر قطعه‌ای به اندازه ۵۹۳ جفت باز در ژل آگاروز یک درصد)، M: نشانگر اندازه دی.ان.ای (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas)، راهک ۱ کنترل منفی (گیاه سالم مایه زنی نشده با ویروس) و راهک ۲ قطعه‌ی ۵۹۳ جفت بازی تکنیر شده از دی‌ان‌ای استخراج شده از گیاه کلزای مایه‌زنی شده با CaMV، E: شلغم آلوده به TuMV، F: یک برگ کلزای آلوده به TuMV، G: یک برگ کلزای آلوده به TuMV-Phoma، H: نقوش الکتروفورزی محصول واکنش نسخه برداری معکوس و زنجیره‌ای پلی‌مراس TuMV با آغازگرهای TuMV-CP تکنیر کننده بخشی از ژن پروتئین پوششی ویروس با اندازه ۹۸۶ جفت باز در ژل آگاروز یک درصد، M: نشانگر اندازه دی.ان.ای (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas)، راهک ۱ کنترل منفی (گیاه سالم مایه زنی نشده با ویروس) و راهک ۲ قطعه‌ی ۹۸۶ جفت بازی تکنیر شده از گیاه کلزای مایه‌زنی شده با TuMV، L: یک برگ کلزا حاوی قرص فوما برای مایه زنی، K: یک برگ سالم کلزا، L: یک برگ کلزای آلوده به *Phoma lingam*، N: مشاهده میکروسکوپی میسلیم‌ها و پیکنیدیوسپورهای قارچ *Phoma* از نمونه‌های دارای علائم برگ آلوده کلزا.

Fig. 1. A: A CaMV infected turnip plant, B: A CaMV infected canola leaf, C: A CaMV-Phoma infected canola leaf, D: Agarose gel electrophoresis pattern of PCR product (a 593 bp fragment, lane 2) using CaMV-p6 specific primers (Table 1). lanes: M; Molecular marker (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas) 1; negative control and 2; A 593 bp fragment amplified from DNA extracted from a canola plant inoculated with CaMV E: A TuMV infected turnip plant, F: A TuMV infected canola leaf, G: A TuMV-Phoma infected canola leaf, H: Agarose gel electrophoresis pattern of RT-PCR product (a 986 bp fragment, lane 2) using TuMV-CP specific primers (Table 1). lanes: M; Molecular marker (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas), 1; negative control, and 2; A 986 bp fragment amplified from RNA extracted from a canola plant inoculated with TuMV J: A healthy canola leaf containing a *Phoma* plug, K: A healthy canola leaf, K: A Canola leaf infected with *Phoma lingam*, N: Microscopic observation of pycnidiospor and myceli from symptomatic canola leaves infected with *Phoma*.



شکل ۲. شاخص های اندازه گیری شده در آزمایش، A: شاخص شدت بیماری، B: شدت نکروز، C: شدت کلروز. تیمارهای با گروه آماری یکسان تفاوت معنی دار آماری ندارند.

Fig. 2. Indicators measured in the experiment. A: Disease severity index, B: necrosis index, C: chlorosis index
* Means with the same letter are not significantly different.



شکل ۳. مقایسه میانگین کلروفیل a, b و کل در تیمارهای مورد آزمایش

* تیمارهای با حروف یکسان تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال یک درصد ندارند

Fig. 3. Comparison of means chlorophyll a, b and total chlorophyll in the treatments

* Means with the same letter are not significantly different at $p=1$.

محتوی فلاونوئید

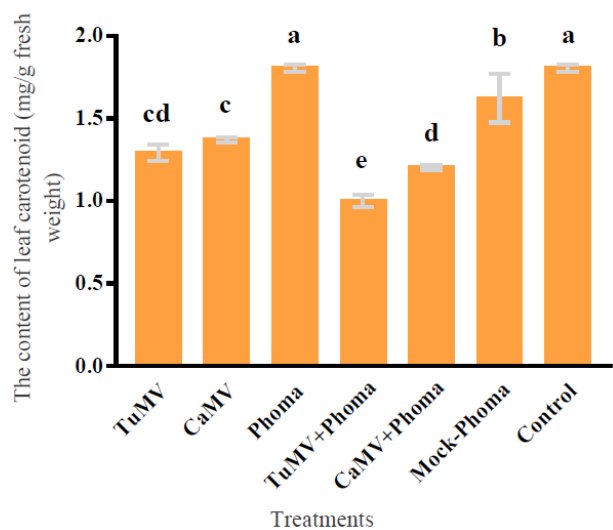
اندازه گیری میزان غلظت فلاونوئید در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ انجام شد، تجزیه واریانس داده‌ها نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بود. تیمارهای *Phoma* و *Mock-Phoma* گروه آماری یکسانی با شاهد

کاروتنوئید در مقایسه با تیمار شاهد شدند، بعلاوه در تیمارهای آلودگی مخلوط قارچ *Phoma* با هر یک از ویروس‌ها نسبت به تیمار تکی ویروس‌های متناظر مقدار کاروتنوئید بیشتر کاهش داشت و تفاوت معنی‌دار آماری داشت (شکل ۴).

و *Phoma* دارای بالاترین میزان کاتالاز بودند. کمترین میزان کاتالاز مربوط به تیمار *TuMV-Phoma* بود. تیمار *TuMV* به تنهایی با تیمارهای *Mock-Phoma* و *CaMV-* تیمارهای *Phoma* در یک گروه آماری قرار گرفتند. تیمارهای *CaMV* و *Phoma* دارای بالاترین میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز بودند اما در تیمار همزمان این دو بیمارگر (*CaMV-Phoma*) این مقدار کاهش یافت، تیمار *TuMV* و تیمار شاهد کمترین میزان آنزیم مورد بررسی را داشتند و تیمار همزمان *TuMV-Phoma* اثری در مقدار آنزیم نداشت و با تیمار *Mock-TuMV* در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۶).

بحث

پاسخ گیاه آلوده به ویروس نسبت به سایر بیمارگرهای گیاهی می‌تواند حساسیت، محافظت و یا بدون تاثیر باشد. نتایج شدت علائم در پژوهش حاضر نشان داد که در رقم طلائی کلازا آلودگی توام بیماری قارچی ساق سیاه ناشی از *Phoma lingam* با ویروس‌های موزائیک شلغم یا موزائیک کلم‌گل، باعث افزایش معنی‌داری شدت بیماری ساق سیاه در آلودگی اولیه با ویروس موزائیک شلغم شد، اما در آلودگی با ویروس موزائیک کلم‌گل افزایش معنی‌داری نداشت. در سایر برهمکنش‌های قارچ و ویروس مانند آلودگی مخلوط ویروس لوله شدن برگ سیب زمینی *PLRV* و *Rhizoctonia solani* در سیب‌زمینی (Ito et al. 2017)، افزایش شدت بیماری مشاهده شده است در حالیکه ذرت آلوده به ویروس راگه ای ذرت (MSV) در برابر بیماری‌های سفیدک داخلی ناشی از *Peronosclerospora philippinensis* و *P. sorghi* نسبت به گیاهان عاری از ویروس بدون تغییر بودند (Damsteegt & Bonde, 1993).



شکل ۴. مقایسه میانگین محتوی کاروتنوئید در تیمارهای مورد آزمایش

* تیمارهای با حروف یکسان تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال یک درصد ندارند

Fig. 4. Comparison of mean carotenoid content in the treatments

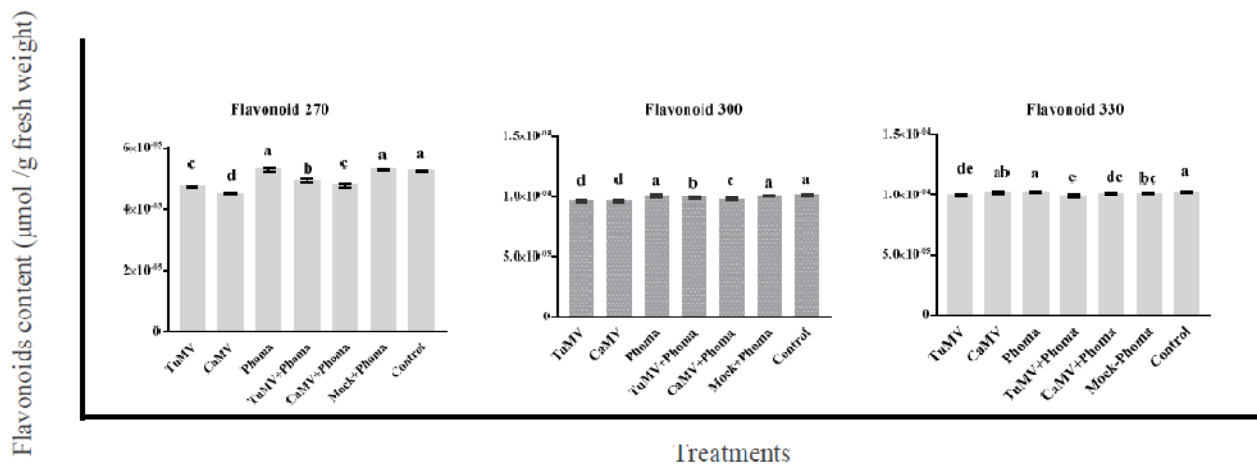
* Means with the same letter are not significantly different at $p=1$.

داشتند و بالاترین میزان فلاونوئید در هر سه طول موج اندازه گیری شده رو به خود اختصاص دادند. مقدار فلاونوئید در دو طول موج ۲۷۰ و ۳۰۰ در تیمارهای ویروسی کمترین میزان را داشت ولی در طول موج ۳۳۰ تیمار *CaMV* با شاهد تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد نداشت (شکل ۵). تغییرات میزان فلاونوئید کل به شرح زیر مشاهده شد.

Total Flavnoeid: Control=Phoma= Mock-Phoma > TuMV-Phoma=CaMV-Phoma>CaMV=TuMV

پارامترهای واکنش‌های دفاعی آنزیمی

در بررسی تیمارهای مورد آزمایش، مقدار دو آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز اندازه گیری شد. تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد برای هر دو پارامتر بود. تیمار *CaMV*

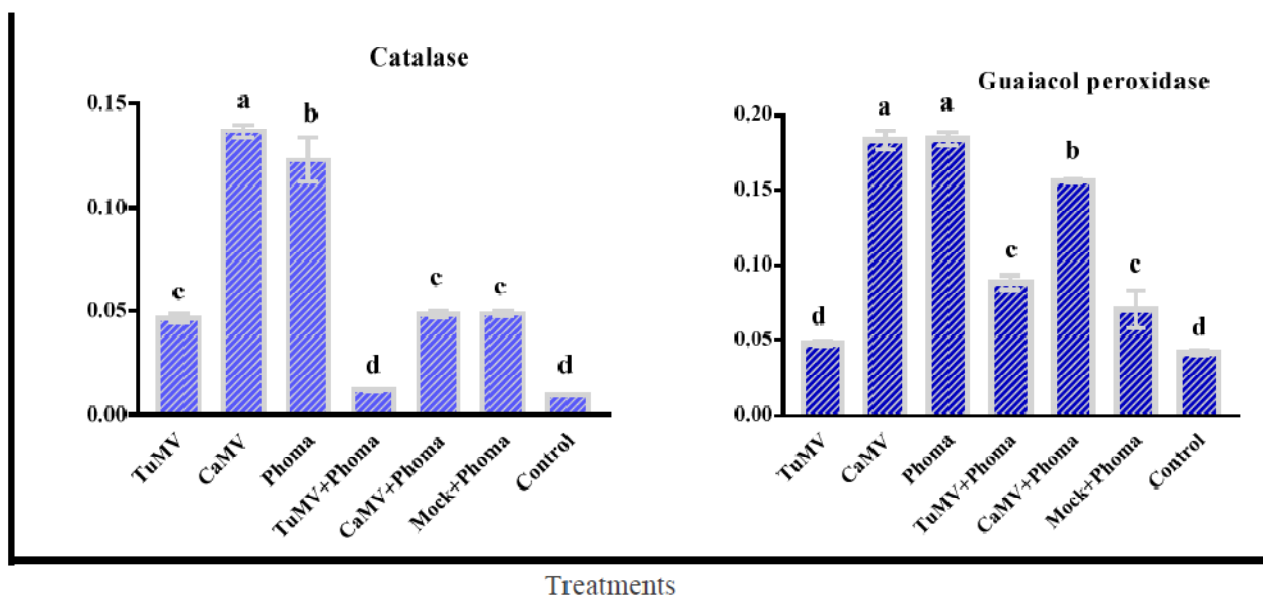


شکل ۵. مقایسه میانگین محتوی فلاونوئید در تیمارهای مورد آزمایش

* تیمارهای با حروف یکسان تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال یک درصد ندارند

Fig. 5. Comparison of mean Flavonoid content in the treatments

* Means with the same letter are not significantly different at $p=1$.



شکل ۶. مقایسه میانگین غلظت کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در تیمارهای مورد آزمایش

* تیمارهای با حروف یکسان تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Fig. 6. Comparison of mean content of catalase and guaiacol peroxidase in the treatments

* Means with the same letter are not significantly different at $p=1$.

می‌گردد (Sulman et al. 2001). این آنزیم در لیگنین-سازی، سوپرینی شدن، تنظیم کشش دیواره سلولی، بهبود زخم و مقاومت علیه بیمارگر در گیاهان نقش دارد

گایاکول پراکسیدازها از پارامترهای واکنش‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی، جزء اولین آنزیم‌هایی است که در برابر بیمارگرهای گیاهی پاسخ و محافظت سریع را باعث

علائم را داشت. می‌توان نتیجه گرفت که این مواد در گیاهان مقاوم نسبت به گیاهان حساس مقدار بیشتری را به خود اختصاص می‌دهند. احتمالاً می‌توان بیان کرد که کاهش مقدار این آنزیم‌ها و افزایش شاخص شدت علائم مربوط به تغییراتی دفاعی در گیاه بوده است و در تیمار *TuMV-Phoma* با کمترین میزان آنزیم و بالاترین مقدار شاخص شدت علائم تحمل رقم طلائی شکسته شده است.

نتیجه‌ساز و کارهای دفاعی علیه بیمارگرهای مختلف در گیاهان، تنظیم‌های متفاوتی از فرآیندهای مختلف و متابولیت‌های اولیه و ثانویه می‌باشد (Gambino et al. 2016, Montero et al. 2012). کلروفیل با دریافت انرژی، مسئولیت اصلی در انجام فتوسنتز را برعهده داشته (Asch et al. 2000) و نقش بسیار مهمی در رشد و عملکرد گیاهان دارد. کاروتنوئیدها از ترکیبات تتراترپنی می‌باشند و به عنوان حامی رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیر فتوسنتزی، فرآیند اکسیداسیون را متوقف می‌کند و نقش مهمی در تعدیل اثرات تنش و محافظت از کلروفیل در مقابل فیتواکسیداسیون دارند (Mittler 2002). بررسی محتوی کاروتنوئیدی و مقدار کلروفیل در تیمارهای آزمایشی، بیانگر اثر برهمکنش بیمارگرهای مورد بررسی بر این عناصر بوده و تیمار همزمان *TuMV-Phoma* و *CaMV* باعث کاهش مقدار کلروفیل و محتوی کاروتنوئیدی نسبت به تیمار *Phoma* شدند. تیمار همزمان *TuMV-Phoma* که بالاترین شاخص شدت علائم رو داشت همچنین بالاترین میزان بافت مردی را داشته و با تیمارهای دیگر در شاخص بافت مردگی دارای اختلاف معنی‌دار بود. فلاونوئیدها گروه پیچیده‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند و نقش‌های گسترده‌ای را مانند پیام‌رسانی در برهم‌کنش بین گیاهان و میکروارگانیسم‌های

(Yoshida et al. 2003, Maksimov et al. 2014). کاتالاز هم که نقش پراکسیداسیون خاصی را ایفا می‌کند از سلول-ها در برابر اثرات سمی پراکسید هیدروژن در طول نمو محافظت می‌کند (Choodamani et al. 2009, Hameed & Iqbal 2014). بالا بودن سطح اولیه و بیان زیاد آنزیم‌های دفاعی مختلف از ویژگی مهم مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا است (Vanitha & Umesha 2008). افزایش محتوی کاتالاز بعد از مایه‌زنی ویروس در همه ژنوتیپ-های مقاوم و حساس جو مایه زنی شده با قارچ *Blumeria graminis* گزارش شده است اما این میزان افزایش در ارقام مقاوم بیشتر بوده است (Siddique et al. 2014, Vanacker et al. 1998). آلودگی با بیمارگرهای گیاهی منجر به القای فعالیت پراکسیداز در بافت‌های گیاهی شده که افزایش آن در گیاهان مقاوم در مقایسه با گیاهان حساس بیشتر می‌باشد (Mydlarz & Harvell 2007). در این پژوهش محتوی گایاکول پراکسیداز و کاتالاز اندازه‌گیری شدند که بالاترین میزان محتوی این آنزیم‌ها در تیمار *CaMV* و *Phoma* به تنهایی مشاهده شد. محتوی گایاکول پراکسیداز در آلودگی همزمان *CaMV-Phoma* نسبت به تیمار تکی این دو عامل کاهش معنی‌داری داشت که احتمالاً تیمار همزمان هر دو عامل بیماری باعث شکست مقاومت القایی در گیاه در مقایسه با تیمار تکی این عوامل شده است. مقدار محتوی کاتالاز در تیمار همزمان *TuMV-Phoma* با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت و نسبت به تیمار *Phoma* و تیمار *CaMV* کمترین میزان را به خود اختصاص داد. تغییرات ایجاد شده در محتوی این آنزیم‌ها در شاخص شدت علائم موثر بوده و با شاخص شدت علائم همبستگی مثبتی داشته‌اند، به نحوی که تیمار همزمان *TuMV-Phoma* با کمترین میزان از دو آنزیم بالاترین مقدار شاخص شدت

مشخص شد که آلودگی ویروس موزاییک شلغم و قارچ عامل بیماری اثر هم افزایی داشتند. در این تیمار میزان شاخص شدت علائم قارچی افزایش پیدا کرد و واکنش تحمل در گیاه به حساسیت تغییر کرد. با توجه به اینکه این عوامل بیماری در مناطق کشت کلزا گزارش شده‌اند، توصیه می‌شود برهمکنش‌های هر دو عامل بیماری در شرایط مزرعه و با میزبان‌های مقاوم مورد بررسی قرار بگیرد، همچنین با توجه به تغییر میزان شدت علائم قارچی توصیه می‌شود اپیدمیولوژی این عامل بیماری در شرایط مزرعه مورد بررسی قرار گیرد.

بیماری‌های گیاهی و همچنین سازگاری گیاهان به شرایط تنش محیطی ایفا می‌کنند (Zou et al. 2004, Martens & Mithofer 2005). محتوی فلاونوئید در طول موج‌های متفاوت بررسی شده در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری آماری را نشان داد. در دو طول موج ۲۷۰ و ۳۰۰ کمترین میزان فلاونوئید مربوط به تیمارهای دو ویروس بدون ترکیب با قارچ بود اما در طول موج ۳۳۰ تیمار *TuMV-Phoma* کمترین میزان را داشت. بنابراین رابطه همبستگی معنی‌داری بین محتوی فلاونوئیدی اندازه‌گیری شده در طول موج‌های مختلف مشاهده نشد. در بررسی برهمکنش بین تیمارهای مورد بررسی

منابع

- Anderson E. J., Qiu S. G. and Schoelz J. E. 1991. Genetic analysis of determinants of disease severity and virus concentration in *Cauliflower mosaic virus*. *Virology* 181: 647-655.
- Anonymous, 2016. Statistical Book of Agriculture of Iran. Statistical Center of Iran.
- Asch F., Dingkuhn M. and Droffling K. 2000. Salinity increases CO₂ assimilation but reduces growth in field irrigated rice. *Plant and Soil* 218: 1-10.
- Ataga A. E., Epton H. A. S. and Frost R. R. 1999. Interaction of virus-infected celery and *Septoria apiicola*. *Plant Pathology* 48: 620-626.
- Banaei R., Minasian V. and Safaie N. 2009. Evaluation of relative resistance of ten canola cultivars to *Phoma lingam*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 44: 347-354 (in Persian with English Summary).
- Bateman D. F. 1961. Synergism between *Cucumber mosaic virus* and *Rhizoctonia damping-off* of cucumber. *Phytopathology* 51: 574-575.
- Beniwal S. P. S. and Gudauskas R. T. 1974. Maize dwarf mosaic virus increases susceptibility of sorghum and corn to *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology*. 64: 1197-1201.
- Chance B. and Maehly A. C. 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Choodamani M. S., Hariprasad P., Sateesh M. K. and Umesha S. 2009. Involvement of catalase in bacterial blight disease development of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryza*. *International Journal Pest Management* 55: 121-127.
- Coutts B.A. and Jones R. A. C. 2000. Viruses infecting canola (*Brassica napus*) in south-west Australia: incidence, distribution, spread and infection reservoirs in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Australian Journal of Agricultural Research* 51(7): 925-936.
- Crane G. L. and Calpouzos L. 1969. Synergism of *Cercospora beticola* and beet yellows virus in killing sugar beet leaves. *Phytopathology* 59: 1338-1339.
- Damsteegt V. D. and Bonde M. R. 1993. Interactions between *Maize streak virus* and downy mildew fungi in susceptible maize cultivars. *Plant Disease* 77(4): 390-392.
- Dellaporta S. L., Wood J. and Hicks J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Edwardson J. R. and Christie R. G. 1986. *Turnip mosaic virus*. In 'Viruses infecting forage legumes. *Sciences* 14: 438-453.
- Evans T. A. and Stephens C. T. 1989. Increased susceptibility to *Fusarium crown and root rot* in virus-infected

- asparagus. *Phytopathology* 79 (3): 253-258.
- Farrag E. S., Zeidan E. S. H. and Mahmoud S. Y. 2007. Systemic acquired resistance induced in cucumber plants against powdery mildew disease by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. *Plant Pathology Journal*. 6: 44-50.
- Futrell M. C. and Scott G. E. 1969. Effect of *Maize dwarf mosaic virus* infection on invasion of corn plants by *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease* 53: 600-602.
- Gambino G., Cuzzo D., Fasoli M., Pagliarani C., Vitali M., Boccacci P., Pezzotti M. and Mannini F. 2012. Co-evolution between Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and *Vitis vinifera* L. leads to decreased transcription of genes related to photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 63:5919-5933.
- Gardner R. C., Howarth A. J., Hahn P., Brown-Luedi M., Shepherd R. J. and Messing J. 1981. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of *Cauliflower mosaic virus* shotgun sequencing. *Nucleic Acids Research* 9: 2871-2888.
- Ghasemzadeh A., and Shams-bakhsh M. 2016. Reaction of canola to *Cauliflower mosaic virus* and co-infection of *Turnip mosaic virus* and *Cauliflower mosaic virus* under greenhouse condition. *Journal of Plant Protection* 39: 71-82 (in Persian with English Summary)
- Hameed A. and Iqbal N. 2014. Chemo-priming with mannose, mannitol and H₂O₂ mitigate drought stress in wheat. *Cereal Research Communication* 42: 450-462.
- Hardwick N. V., Davies J. M. L. and Wright D. M. 1994. The incidence of three virus diseases of winter oilseed rape in England. *Plant Pathology* 43:1045-1049.
- Hiscox J. D. and Israelstam G.F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* 57: 1332-1334.
- Hunter P. J., Jones J. E. and Walsh J. A. 2002. Involvement of *Beet western yellows virus*, *Cauliflower mosaic virus* and *Turnip mosaic virus* in internal disorders of stored white cabbage. *Phytopathology* 92: 816-826.
- Ito M., Meguro-Maoka A., Maoka T., Akino S. and Masuta C. 2017. Increased susceptibility of potato to *Rhizoctonia* diseases in Potato leafroll virus-infected plants. *Journal of General Plant Pathology* 83: 169-172.
- Jafari M., Shams-bakhsh M. and Moieni A. 2016. Reaction of commercial canola varieties and lines against Turnip mosaic virus (TuMV) isolate. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52: 147-159 (in Persian with English Summary).
- Kar M., and Mishra D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.
- Krize B. A., Merkle D. A. and Berg J. A. 1993. Ligand variation and metal ion binding specificity in zinc finger peptides. *Inorganic Chemistry* 32: 937-940.
- Lamey H. A. and Everette T. R. 1967. Increased susceptibility of *Rice hoja Blanca virus* infected rice leaves to *Cochliobolus miyabeanus*. *Phytopathology* 57:227.
- Maksimov I., Troshina N., Surina O., and Cherepanova E. 2014. Salicylic acid increases the defense reaction against bunt and smut pathogens in wheat calli. *Journal of Plant Interactions* 9: 306-314.
- Martens S. and Mithofer A. 2005. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* 66: 2399-2407.
- McGee D. C. and Petrie G. A. 1979. Seasonal patterns of ascospore discharge by *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape. *Phytopathology* 69: 586-589.
- Meyer M. D. and Pataky J. K. 2010. Increased severity of foliar diseases of sweet corn infected with maize dwarf mosaic and sugarcane mosaic viruses. *Plant disease*, 94: 1093-1099.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Montero R., Mundy D., Albright A., Grose C., Trought M. C. T., Cohen D., Chooi K. M., MacDiarmid R., Flexas J. and Bota J. 2016. Effect of Grapevine Leafroll associated Virus 3 (GLRaV-3) and duration of infection on fruit composition and wine chemical profile of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon balance. *Food Chemistry* 197: 1177-1183.
- Mydlarz L. D. and Harvell C. D. 2007. Peroxidase activity and inducibility in the sea fan coral exposed to a fungal pathogen. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146: 54-62.
- Naqvi N. Z., and Futrell M. C. 1969. Pathological histology of corn and sorghum plants infected with maize dwarf mosaic virus and *Sclerospora sorghi*. *Plant disease reporter* 53: 741-751.
- Omar S. A. M., Bailiss K. W. and Chapman G. P. 1986. Virus-induced changes in the response of faba bean to

- infection by *Botrytis*. *Plant Pathology* 35: 86-92.
- Potter L. R. 1982. The effects of barley yellow dwarf virus and powdery mildew in oats and barley with single and dual infections. *Annals of Applied Biology* 94: 11-17.
- Reyes A. A., and Chadha K. C. 1972. Interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. conglutinant and *Turnip mosaic virus* in *Brassica campestris* var. *chinensis* seedlings. *Phytopathology* 62: 1424-1428.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual* 2nd ed. Cold spring harbor laboratory press
- Sanchez F., Wang X., Jenner C. E., Walsh J. A. and Ponz F. 2003. Strains of *Turnip mosaic potyvirus* as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Research* 94: 33-43.
- Scott D. H. 1968. Effect of Barley yellow dwarf virus infection on the development of root rot caused by *Cochliobolus sativus* in *Avena sativa* and *Triticum durum*. Ph.D. Thesis, University of Illinois.
- Shahraeen N. 2012. An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran. *International Research Journal of Microbiology* 3: 24-28.
- Shams-Bakhsh M., Canto T. and Palukaitis P. 2007. Enhanced resistance and neutralization of defense responses by suppressors of RNA silencing. *Virus Research* 130: 103-109.
- Shattuck V. I. 1992. The biology, epidemiology, and control of *Turnip mosaic virus*. *Horticultural Reviews*. 14: 199-238.
- Shattuck V. I. and Stobbs L. W. 1987. Evaluation of rutabaga cultivars for *Turnip mosaic virus* resistance and the inheritance of resistance. *Horticultural Science* 22: 935-937.
- Siddique Z., Akhtar K. P., Hameed A., Sarwar N., Imran-Ul-Haq and Khan S. A. 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.
- Sohi M. G., Shahraeen N. and Rakhshandehroo F. 2013. Biological and Phylogenetic Study of *Cauliflower mosaic virus* on Canola in Iran. *Iranian Journal Plant Pathology* 49: 29-30 (in Persian with English Summary).
- Stevens C. and Gudauskas, R. T. 1982. Relation of maize dwarf mosaic virus infection to increased susceptibility of coms to *Helminthosporium maydis* race O. *Phytopathology* 72: 1500-1502.
- Sulman M., Fox G., Osman A., Inkerman A., Williams P. and Michalowitz M. 2001. Relationship between total peroxidase activity and susceptibility to black point in mature grain of some barley cultivars. In *Proceeding of the 10th Australian Barley Technical Symposium*.
- Sutic D. D. Ford R. E. and Tosic M. T. 1999. *Handbook of plant virus diseases*. CRC Press.
- Tabarestani A. Z., Shams-bakhsh M. and Safaei N. 2010. Distribution of three important aphid borne canola viruses in Golestan province. *Iranian journal of plant protection science* 41: 251-259 (in Persian with English Summary).
- Tu J. c. and Ford R. E 1971. *Maize dwarf mosaic virus* predisposes com to root rot infection. *Phytopathology* 61: 800-803.
- Vanacker H., Carver T. L. W. and Foyer C. H. 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* 117: 1103-1114.
- Vanitha S. C. and Umesha S. 2008. Variations in defense related enzyme activities in tomato during the infection with bacterial wilt pathogen. *Journal of Plant Interactions* 3: 245-253.
- West J. S., Kharbanda P. D., Barbeti M. J. and Fitt B. D. 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* 50: 10-27.
- Yoshida K., Kaothien P., Matsui T., Kawaoka A. and Shinmyo A. 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 665-70
- Zaman M. A., Rahnama K., Sadravi M. and Rezapour A. M. 2008. First report of *Leptosphaeria maculans* teleomorph on canola stem in the north of Iran. *Rostaniha*. 30: 128-130 (in Persian with English Summary).
- Zou Y., Lu Y. and Wei D. 2004. Antioxidant activity of flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52: 5032-5039.