

نشریه پژوهشی:

اثر هرم سازی ژن های مقاومت به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) بر رنگدانه های فتوسنتزی و برخی صفات فیزیولوژی در لاین های مختلف

کمال صالحی^۱ و غلام رضا شریفی سیرچی^۲

۱. دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲. استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۵)

چکیده

بیماری ویروسی پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) یکی از خسارت زاترین عواملی است که در سرتاسر جهان باعث تلفات بسیار بالایی به محصول گوجه فرنگی می شود و در بیشتر مناطق ایران نیز پراکنش یافته است. راهکارهای متعددی برای مقابله با این بیماری صورت گرفته که عملاً این روش ها ناکارآمد بوده اند. به منظور بررسی نقش انتقال و ترکیب دو مکان ژنی *TY-2* و *TY-1/3* در تعدادی لاین حساس و مطلوب مطالعه حاضر صورت پذیرفت. نتایج نشان داد لاین های حاوی دو مکان ژنی *TY-2* و *TY-1/3* میزان خسارت کمتری را در میزان کلروفیل و محتویات پروتئین کل خود تجربه کردند. در بررسی میزان پرولین و میزان بیان ژن *PAL* مشاهده شد لاین های حاوی دو مکان ژنی سطح کمتری از میزان پرولین و بیان ژن *PAL* را در خود نشان دادند. همچنین ردیابی آلودگی ویروسی به وسیله واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بیانگر عدم تکثیر ژنوم ویروس در لاین های حاوی هر دو مکان ژنی بود. در مجموع نتایج این تحقیق بیانگر نقش بالای حضور و هرم سازی دو مکان ژنی *TY-2* و *TY-1/3* به منظور ایجاد مقاومت در گوجه فرنگی در برابر TYLCV می باشد که منجر به کاهش خسارت در برابر این ویروس می شود.

واژه های کلیدی: رنگدانه های فتوسنتزی، ژن *PAL*، مقاومت، مکان ژنی *TY-2* و *TY-1/3*، هرم سازی ژن.

The effect of pyramiding resistance control genes on viral disease of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on photosynthetic pigments and some physiological traits in different lines

Kamal Salehi^{1*} and Gholam-Reza Sharifi-Sirchi²

1. Ph.D. Candidate, College of Agriculture, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

2. Professor, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

(Received: Nov. 23, 2021 - Accepted: Jan. 25, 2022)

ABSTRACT

Tomato yellow leaf viral disease (TYLCV) is one of the most damaging agents that causes very high yield losses worldwide and has spread to most parts of Iran. Numerous strategies have been developed to combat this disease, but these methods have been practically ineffective. In order to investigate the role of transmission and combination of *TY-2* and *TY-1/3* gene loci in a number of sensitive and desirable line, the present study was performed. Results showed that the lines containing the two *TY-2* and *TY-1/3* gene loci experienced less damage regarding chlorophyll content and total protein content. In the study of proline content and *PAL* gene expression, it was observed that lines containing two gene loci showed lower levels of proline and gene expression. Also, in order to detect viral infection by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers, it indicated that the virus genome does not replicate in the lines containing both gene loci. In general, the results of this study indicate the high role of the presence and pyramiding of two gene sites *TY-2* and *TY-1/3* in order to create resistance in tomato against TYLCV and lead to a reduction in damage against this virus.

Keywords: Gene pyramiding, gene locations *Ty-2* and *TY-1/3*, *PAL* gene, photosynthetic pigments, resistance.

* Corresponding author E-mail: sharifisirchi@gmail.com

مقدمه

تعرق و تنفس ارائه شده است (El Dougdoug *et al.*, 2014; Sofy *et al.*, 2017). فتوسنتز یکی از اجزای اصلی فرایندهای مهم فیزیولوژیکی در رشد گیاه است (Arfan *et al.*, 2007) که به شدت تحت تاثیر عفونت ویروسی قرار می‌گیرد (Radwan *et al.*, 2010). ویروس‌های گیاهی از طریق تخریب فتوسیستم II و برخی از پروتئین‌های دخیل در فرایند فتوسنتز منجر به کاهش محتویات رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شوند (Bertamini *et al.*, 2003; Hemida, 2005). همچنین مشاهده شده است که فعالیت ویروس‌ها در گیاهان میزبان باعث کاهش میزان محتویات پروتئین کل در ژنوتیپ‌های حساس به علت کاهش سنتز و تخریب ساختار پروتئینی می‌شود (Bassiouny, 2015). پرولین اسید آمینه ذخیره شده در سیتوپلاسم می‌باشد و احتمالاً در حفاظت از ساختمان ماکرومولکول‌ها و هیدروکسی پرولین نیز در سنتز دیواره سلول در برابر عفونت ویروسی و سایر تنش‌ها نقش دارد (Heuer, 2004). فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL= Phenylalanine ammonia-lyase) آنزیم کلیدی در مسیر سنتز ترکیبات فنیل پروپانوییدی است و افزایش در فعالیت PAL به طور متعدد در مواجهه با آلودگی پاتوژن‌ها و یا زخم‌ها به عنوان یک واکنش دفاعی مورد نظر قرار گرفته است (Diniz, 2003). با توجه به تغییر در میزان و ماهیت صفت‌های ذکر شده در برابر بیماری‌های ویروسی و سایر تنش‌ها، می‌توان با اندازه‌گیری و مطالعه آنها در ژنوتیپ‌های مختلف اقدام به شناسایی، غربالگری و انتخاب افراد مقاوم نمود. تا کنون روش‌های متعددی جهت کنترل این بیماری صورت گرفته است، که بیشتر این روش‌ها دارای نتایج مطلوبی نبوده است. لذا، اصلاح ژنتیکی برای مقاومت در برابر این ویروس سودمندترین رویکرد جهت کنترل آسیب‌های ناشی از بیماری پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی می‌باشد.

روش‌های سنتی اصلاحی به زمان طولانی برای به‌دست‌آوردن یک رقم اصلاحی موفق نیاز دارند (Chen *et al.*, 2011). هرم سازی ژن‌های مقاومت در یک لاین خالص اصلاحی در روش سنتی اصلاح نباتات ۱۰ الی ۱۵ سال زمان نیاز دارد. این کار همچنین نیاز

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های گیاهی در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان محسوب می‌شود که در بیش از ۷۰ کشور جهان آلودگی این ویروس گزارش شده است (Yan *et al.*, 2018). بیشتر بیشتر ارقام زراعی گوجه‌فرنگی‌های کشت شده مستعد ابتلا به این بیماری هستند که علائمی مانند ریزش گل، توقف شدید رشد، فنجان شدن برگ‌ها، پیچ‌خوردگی و زرد شدن رنگ برگ‌ها را نشان می‌دهد که می‌تواند منجر به کاهش ۱۰۰ درصدی محصول شود (Yan *et al.*, 2018). این ویروس در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۷۲ در مزارع استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان گزارش شد (Hajimorad *et al.* 1993). سپس این ویروس در کل کشور گسترش یافت و امروزه به عنوان یک عامل اصلی ایجاد خسارت به محصول گوجه‌فرنگی شناخته شده است (Bananej *et al.* 2009; Bananej *et al.* 2016). با توجه به میزان خسارت وارده و انتشار گسترده آن در بسیاری از نقاط دنیا، این ویروس به عنوان یکی از ده ویروس گیاهی مهم در دنیا (رتبه سوم) معرفی شده است (Scholthof *et al.*, 2010; Rybicki, 2015). بر اساس لیست کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها ۱۳ گونه از ویروس مذکور در ارتباط با بیماری (TYLCV) گزارش شده است (Yan *et al.*, 2021). اعضای تیره ویروس‌های دوقلو دارای ژنوم از نوع داکسی ریبونوکلیک اسید تک لای حلقوی (circular single-stranded DNA) می‌باشند که در پیکره‌های دو قلو (geminata) بسته بندی می‌شوند (Lazarowitz *et al.*, 1991) و توسط سفید بالک (*Bemisia tabaci*) به روش پایا و چرخشی منتقل می‌شود (Stanley *et al.*, 2005). تغییرات بیوشیمیایی مهمی در گیاهان آلوده شده توسط بیماری‌های ویروسی به وجود می‌آید که منجر به کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شود. گزارشات متعددی در مورد تکثیر ویروس درون سلول‌های گیاه و تغییر ساختار بیوشیمیایی مختلف گیاه و تخریب فرایندهای فیزیولوژیکی همانند فتوسنتز،

نقشه‌ی ژنی آنها ثبت شده‌است. از آنجایی که ویروس TYLCV در کل کشور و به‌ویژه نواحی جنوبی کشور خسارت سنگینی را وارد نموده‌است، مطالعه و ایجاد ارقام مقاوم به این ویروس امری مهم و اجتناب‌ناپذیر است. بر این اساس، اثر انتقال و هرم‌سازی دو مکان ژنی *TY-2* و *TY-1/3* در لاین‌های مختلف گوجه‌فرنگی در پاسخ به آلودگی بیماری ویروسی TYLCV مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

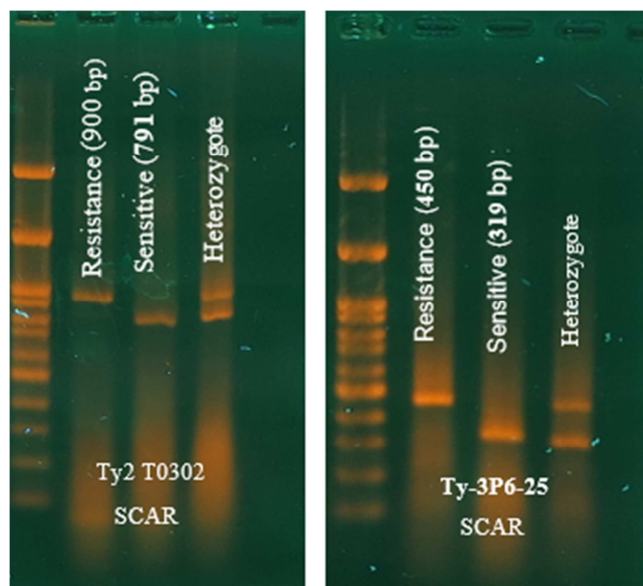
ژنوتیپ‌های گیاهی و برنامه تلاقی

به منظور غربالگری و شناسایی ژنوتیپ‌های دارای ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت برای مکان ژنی *TY-2* از نشانگر SCAR با آغازگر T0302 استفاده شد که محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در افراد دارای مقاومت ۹۰۰ (جفت باز bp)، حساس ۷۹۱ (جفت باز bp) و نتایج الکتروفورز افراد هتروزیگوت هر دو طول قطعه در را نشان دادند (شکل ۱). همچنین به منظور غربالگری و شناسایی ژنوتیپ‌های دارای ژن *TY-1/3* از آغازگر P6-25 استفاده شد که نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز افراد مقاوم طول قطعه ۴۵۰ (جفت باز bp)، حساس ۳۱۹ (جفت باز bp) و افراد هتروزیگوت هر دو طول قطعه در را تشکیل داد (شکل ۱). پس از شناسایی افراد دارای این مکان‌های ژنی به‌منظور 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 بدست‌آمده (F_1) با ۸ لاین حساس و مطلوب تلاقی داده‌شد. به منظور افزایش سهم ژنوم والد دوره‌ای (لاین‌های حساس و مطلوب) و کاهش سهم ژنوم والد دهنده (مقاوم) ۳ مرحله تلاقی برگشتی صورت پذیرفت و در مرحله انتهایی، به‌منظور تثبیت ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به شکل هموزیگوت یک مرحله خودگشنی انجام‌شد (شکل ۲). 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 آلوده‌سازی به اتافک توری‌آلوده‌سازی، انتقال داده‌شدند.

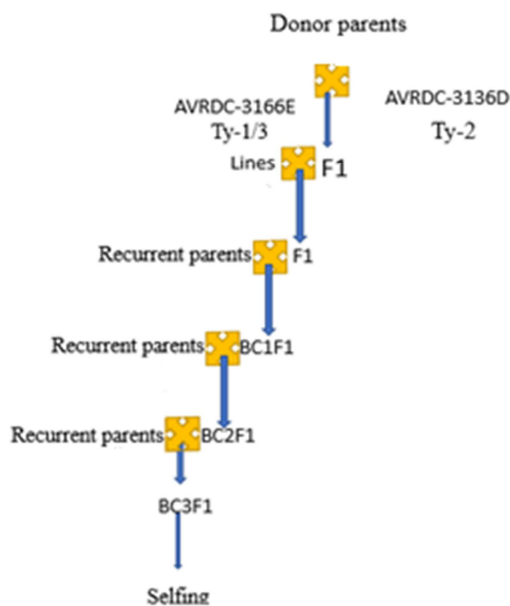
به صرف وقت فراوان برای دستیابی به فنوتیپ‌های مقاوم دارد (Francia *et al.*, 2005). برای شناسایی ارقام مقاوم می‌توان از نشانگرهایی استفاده کرد که به جایگاه‌های ژنی مقاومت به بیماری متصل می‌شوند. بنابراین می‌توان از آنها برای برنامه‌های اصلاحی انتخاب بر مبنای نشانگرها استفاده نمود. در دسترس‌بودن نشانگرهای مبتنی بر PCR برای بسیاری از ژن‌های مقاومت این امکان را فراهم می‌کند تا انتخاب بر مبنای نشانگر (Marker assisted selection) برای مقاومت در گوجه‌فرنگی به‌صورت موفقیت‌آمیزی در آزمایشگاه بدون نیاز به تکنولوژی بالا انجام گیرد (Hulbert *et al.*, 2001).

معمولاً ارقامی که فقط یک ژن مقاومت اصلی در مقابل یک بیماری را دارند، بعد از چند سال مقاومت خود را از دست می‌دهند. به عبارت دیگر مقاومت آنها به علت تغییرات بیماری‌زایی در بیمارگر شکسته می‌شود. اما انتقال و تلفیق توأم چند ژن مقاوم، موجب بروز طیف گسترده مقاومت در مقابل انواع گونه می‌شود. پایداری این‌گونه مقاومت‌ها، طولانی است و با تغییرات بیماری‌زایی و نوترکیبی در ژنوم ویروس به راحتی از بین نمی‌رود (Chen *et al.*, 2000). شش مکان ژنی (*Ty1*, *Ty-2*، *Ty-3*، *Ty-4*، *Ty-5*، *Ty-6*) که نحوی توارث آنها به شکل غالب و *ty-5* که به صورت مغلوب به فرزندان انتقال می‌یابد) برای مقاومت به بیماری پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی شناسایی شده و از گونه‌های وحشی گوجه‌فرنگی به گونه‌های زراعی منتقل شده‌اند. به‌دست آوردن اطلاعات مربوط به ژن‌های *Ty* و ترکیبات ژنی آنها و همچنین انتقال آنها برای دستیابی به ارقام مقاوم ضروری می‌باشد (Elbaz *et al.*, 2016). در مطالعات متعددی ایجاد مقاومت از طریق انتقال و تلفیق مکان‌های ژنی مقاومت از گونه‌های خویشاوند وحشی گوجه‌فرنگی *Solanum pimpinellifolium*، *Solanum peruvianum* و *Solanum habrochaites* در ارقام زراعی به طور موفقیت‌آمیزی صورت گرفته است (Schuster & Scott, 2007) از بین این منابع، مشخصات تعداد کمی از ژن‌های مقاومت شرح و



شکل ۱. آغازگرهای اسکار به منظور شناسایی و ردیابی دو مکان ژنی *TY-2* (T0302) و *TY-1/3* (P6-25) در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی.

Figure 1. Oscar primers to identify and trace two gene loci *TY-2* (T0302) and *TY-1/3* (P6-25) in different tomato genotypes.



شکل ۲. مراحل مختلف برنامه اصلاحی به منظور ایجاد مقاومت در برابر ویروس TYLCV.

Figure 2. The various steps of the correctional program in order to make resistance to the TYLCV virus.

۶۷۰ جفت باز از ژن‌های پروتئین پوششی و حرکتی ویروس را تکثیر می‌کند، نیز به داخل قفسه آلوده‌سازی در کنار سایر لاین‌ها قرار داده‌شد. سپس تعدادی از برگ‌های آلوده به کلونی‌های مگس سفید بالغ به منظور آلوده‌سازی لاین‌ها در زیر توری قفسه آلوده‌سازی قرار داده‌شدند. برای اطمینان کامل از فرایند آلوده‌سازی در حدود ۵۰ مگس سفید برای هر

آلوده‌سازی

آلوده‌سازی ژنوتیپ‌ها با ویروس توسط ناقل ویروس TYLCV (مگس سفید *B. tabaci*, biotype B): 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 (Pico *et al.*, 1998)، که قطعه‌ای در حدود

ساخت شرکت Bio-Rad انجام شد. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ژل آگارز ۱٪ و در بافر TBE (شامل Tris-Base [pH=8.0], Boric Acid، EDTA) با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۷۵ دقیقه با استفاده از الکتروفورز افقی (پدیده نوژن پارس) انجام شد. برای مشاهده کیفی و عکس برداری از ژل، پس از رنگ آمیزی نمونه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ژل رد (به نسبت ۱ ژل رد و ۹۹ آب مقطر)، در دستگاه ژل داگ (Gel document) مدل SB-14006 ساخت شرکت سلول بافت زیست) و در زیر نور UV صورت پذیرفت. همچنین برای تشخیص و شناسایی ژنوم ویروس در بوته‌های گوجه‌فرنگی آلوده شده به ویروس TYLCV از آغازگرهای اختصاصی سنس (Sense) و آنتی سنس (Antisense) (Pico *et al.*, 1998)، که قطعه‌ای در حدود ۶۷۰ جفت باز از ژن‌های پروتئین پوششی و حرکتی ویروس را تکثیر می‌کنند، با برنامه حرارتی و مراحل ذکر شده در بالا استفاده شد.

استخراج و سنجش رنگی‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کاروتنوئید)

به جهت اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل و همچنین سنجش میزان کاروتنوئیدها از روش (Lichtenthaler, 1987) از طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئیدها توسط اسپکتروفتومتر استفاده شد. در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست آمد.

$$\text{Chl. a} = (12.25 \text{ A663.2} - 2.79 \text{ A646.8})$$

$$\text{Chl. b} = (21.21 \text{ A646.8} - 5.1 \text{ A663.2})$$

$$\text{Chl. T} = \text{Chl. a} + \text{Chl. B}$$

$$\text{Car} = ((1000 \text{ A470} - 1.8 \text{ Chl. a} - 85.02 \text{ Chl. b}) / 198)$$

گیاه کافی است. پس از ۴۸ ساعت از آغاز دوره آلوده‌سازی (Inoculation access period=IAP) از سم حشره‌کش در فضای زیرقفسه به منظور حذف کامل حشره ناقل استفاده شد. پس از گذشت ۳۰ روز نمونه بافت‌های گیاهی برای مطالعات بعدی برداشت و در دمای ۸۰- قرار داده شد (Griffiths & Scott, 2001).

استخراج DNA بافت گیاهی

به منظور استخراج DNA با کیفیت و خلوص بالا از روش Murry & Thompson (1984) استفاده شد. در این روش، مقدار DNA ۰/۵ گرم از برگ تازه با استفاده از ماده (2-5%) CTAB در یک بافر تک‌مرحله‌ای استخراج شد. که به منظور ممانعت از اکسیداسیون از ماده ۲-مرکاپتواتانول در بافر استخراج استفاده شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

برای تشخیص و غربالگری بوته‌های گوجه‌فرنگی حاوی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده مقاومت TY-2 و TY-1/3 از آغازگرهای اسکار (SCAR) برای دو مکان ژنی TY-2 (T0302) و TY-1/3 (P6-25) استفاده شد (شکل ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۰ μM شامل ۱۰ μM ماسترمیکس (2X Red PCR) (Ampliqon, Denmark)، ۵ μM DNA نمونه، و هر آغازگر (0/5 μM) که با آب دیونیزه به حجم نهایی رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با یک چرخه حرارتی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته شدن، اتصال آغازگرها و بسط به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد برای هر دو آغازگر و مدت زمان دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در پایان جهت بسط نهایی یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده.

Table 1. Specifications of primers used.

Gene Name	Forward	Reverse	Reference
PAL	F-ACGGGTTGCCATCTAATCTG	R-AGCTCTTTTCCTGGCTGAAA	Aime <i>et al.</i> , 2013
β-tubulin	F-AACTCCATTCAGGAGATGTTT	R-TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT	Aime <i>et al.</i> , 2013
TYLCV sense/antisense	F-CGCCCGTCTCGAAGGTTTC	R-GCCATATACAATAACAAGGC	Pico <i>et al.</i> , 1998
T0302	F-TGGCTCATCCTGAAGCTGATAGCGC	R-AGTGTACATCCTTGCCATTGACT	Garcia <i>et al.</i> , 2007
P6-25	F-GGTAGTGGAAATGATGCTGCTC	R-GCTCTGCCTATTGTCCCATATAAACC	Ji <i>et al.</i> , 2007

سنجش میزان پرولین

میزان پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و از تولوئن به‌عنوان شاهد استفاده شد و با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد. میزان پرولین استخراجی براساس میکرومول در گرم وزن‌تر، از جدول استاندارد به‌دست آمد (Bates et al., 1973).

سنجش غلظت پروتئین کل

سنجش غلظت پروتئین کل محلول با استفاده از روش Bradford (1976) در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. میزان غلظت پروتئین کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم بافت تر محاسبه شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام واکنش qRT-PCR

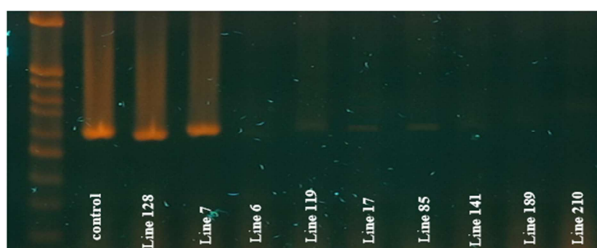
به منظور استخراج RNA کل از برگ گیاه گوجه‌فرنگی از بافر Iraizol شرکت زیست‌فناوران رنا (RNA) همراه با کلروفورم، ایزوپروپانول، اتانول بر طبق دستورالعمل استفاده شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت دو مرحله‌ای شرکت یکتا تجهیز آزما براساس دستورالعمل انجام شد. برای بررسی و کنترل بیان ژن *PAL* از ژن β -*tubulin* به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. تکثیر ژن‌های *PAL* و β -*tubulin* به منظور اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real Time PCR براساس روش استاندارد به‌صورت نسبی انجام گرفت. کمیت نسبی در Real Time PCR به وسیله اندازه‌گیری 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 μM)، 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 دو آغازگر بر اساس منابع (جدول ۱) انتخاب و همچنین آزمایشات qRT-PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و در ادامه ۴۰ چرخه به صورت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در ادامه به منظور بسط واکنش مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در انتهای واکنش داده‌های خام به‌صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شدند. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و از روش $\Delta\Delta\text{Ct}$ برای تجزیه داده‌ها استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001).

همه آزمایش‌ها با سه تکرار و با سه نمونه مستقل انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها بر اساس روش LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

ایجاد آلودگی بیماری و ردیابی ویروس TYLCV با استفاده از واکنش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی sense و antisense (Pico et al., 1998) پس از گذشت ۳۰ روز از ایجاد آلودگی (IAP) نمونه‌برداری و ردیابی شد (شکل ۳). بررسی‌های نتایج واکنش PCR نشان داد که پس از گذشت ۳۰ روز از آغاز آلودگی لاین‌های شاهد، ۱۲۸ و لاین ۷ باند با وضوح بسیار بالاتری (قطعه‌ای در حدود ۶۷۰ جفت باز از ژن‌های پروتئین پوششی و حرکتی ویروس) را تشکیل دادند و این در حالی است که سایر لاین‌ها باند مشخصی را تشکیل نداده‌اند.



شکل ۳. نتایج الکتروفورزی محصولات PCR با استفاده از جفت آغازگرهای sense و antisense (Pico et al., 1998) در ژل آغاز ۱ درصد. Figure 3. Electrophoretic results of PCR products using a pair of sense and antisense primers (Pico et al., 1998) in 1% agarose gel.

polymerase وابسته به RAN (RDR) می‌باشد. با توجه شکل ۳ در لاین شماره ۷ با توجه به حضور مکان ژنی *TY-2* در گیاه ژنوم ویروس به میزان بسیار بالای تکثیر یافته که این مطلب بیانگر شکسته شدن مقاومت حاصل از این مکان ژنی در برابر ویروس TYLCV است. *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 می‌گردد. همه ژن‌های مقاومت تک ژنی، ایمنی کامل را نشان نمی‌دهند و تک ژن‌های R ممکن است سطوح نسبی مقاومت را ایجاد کنند (Michelmor et al. 2013). آسیب‌پذیر بودن مقاومت *TY-2* در برابر برخی از سویه‌های بیماری ویروسی پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی در برخی گزارشات (Barbieri et al., 2010) و (Ohnishi et al., 2016) ارائه شده است که با نتایج این مطالعه در یک راستا قرار دارد.

در بررسی مقایسه میانگین‌ها (آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد) در کلروفیل a کمترین میزان در گیاه شاهد (۱۰/۹۶ میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) و در لاین ۱۲۸ (۱۲/۱۰ میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) مشاهده شد. لاین شماره ۷ (با میزان ۱۴/۳۲ میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) در گروه مجزای (c) قرار گرفت و در لاین ۶ (۱۸/۳۳ میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) و لاین شماره ۲۱۰ (۱۸/۶۹ میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) بیشترین میزان دیده شد و از نظر آماری در یک گروه (a) قرار گرفتند (جدول ۲).

همان‌گونه که در نتایج مطالعه بررسی آلودگی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مشاهده شد، در لاین‌های حاوی دو مکان ژن *TY-2* و *TY-1/3* تشکیل باند مورد نظر همانند سایر لاین‌ها صورت نگرفت این مطلب بیانگر ایجاد مقاومت ناشی از حضور دو مکان ژنی *TY-2* و *TY-1/3* در لاین‌های مختلف گوجه‌فرنگی می‌باشد که مانع از تکثیر بالای ژنوم ویروس در گیاهان می‌باشد. به منظور مقابله با آلودگی ناشی از فعالیت پاتوژن‌ها، گیاهان 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 (Transcriptional gene silencing= TGS) و خاموشی ژن پس از رونویسی (post-transcriptional gene silencing=PTGS) است که منجر به عدم تکثیر ویروس در سلول‌های میزبان می‌گردد (Gupta et al., 2021). مشاهده شده که در لاین‌های حاوی مکان ژنی *TY-1/3* میزان تکثیر ژنوم ویروس بسیار پایین‌تر از گیاهان حساس می‌باشد. 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 ویروس را هدف قرار می‌دهند، که این عمل مکانیسم مقاومت (TGS) پیشرفته را ایجاد می‌کند و مانع از تکثیر ژنوم ویروس در میزبان می‌شوند (Butterbach et al., 2014). هر سه ژن *Ty-3*، *l*، *Ty-3a* و آل‌های مختلف یک مکان ژنی واحد می‌باشند. آل‌های این مکان ژنی کد کننده یک RNA

جدول ۲. مقایسه میانگین‌های صفات کلروفیل a، b و کل، کارتنوئید، پرولین و پروتئین کل لاین‌های گوجه فرنگی.

Table 2. Mean comparison of chlorophyll a, b and total, carotenoids, proline and total protein of tomato lines.

Genotypes (Line)	Chlorophyll a (mg/g FW)	Chlorophyll b (mg/g FW)	Total chlorophyll (mg/g FW)	Carotenoids (mg/g FW)	Proline ($\mu\text{mol/g}^{-1}\text{FW}$)	Total protein (mg/g FW)
Line of control (-,-)	(10.96 ± 0.5) c	(4.90 ± 0.53) d	(15.86 ± 0.5) e	(2.92 ± 0.6) c	(11.55 ± 0.3) a	(4.86 ± 0.75) d
Line 128 (-,-)	(12.10 ± 0.5) d	(6.89 ± 0.5) c	(18.99 ± 0.64) d	(3.70 ± 0.4) c	(10.25 ± 0.9) b	(7.433 ± 0.63) c
Line 7(TY-2)	(14.32 ± 0.6) c	(8.35 ± 0.49) b	(22.67 ± 0.63) c	(4.93 ± 0.62) d	(9.01 ± 0.6) bc	(8.98 ± 0.5) bc
Line 6(TY-2, TY-1/3)	(18.33 ± 0.5) a	(10.80 ± 0.6) a	(29.14 ± 0.5) ab	(7.22 ± 0.5) bc	(6.86 ± 0.4) d	(10.99 ± 0.5) ab
Line 119(TY-2, TY-1/3)	(17.87 ± 0.7) ab	(10.21 ± 0.51) a	(28.00 ± 0.95) b	(6.65 ± 0.65) c	(7.306 ± 0.35) d	(10.85 ± 0.7) ab
Line 17(TY-2, TY-1/3)	(17.92 ± 0.6) ab	(11.12 ± 0.6) a	(29.05 ± 0.5) ab	(7.95 ± 0.5) ab	(7.763 ± 0.3) cd	(10.93 ± 0.65) ab
Line 85(TY-2, TY-1/3)	(17.55 ± 0.5) b	(10.43 ± 0.52) a	(27.98 ± 0.95) b	(7.64 ± 0.35) bc	(6.99 ± 0.25) d	(10.96 ± 0.6) ab
Line 141(TY-2, TY-1/3)	(18.40 ± 0.5) ab	(10.17 ± 0.5) a	(28.39 ± 0.7) ab	(8.19 ± 0.7) ab	(8.126 ± 0.39) c	(11.69 ± 0.8) a
Line 189(TY-2, TY-1/3)	(18.21 ± 0.5) ab	(10.85 ± 0.51) a	(29.07 ± 0.4) ab	(7.35 ± 0.39) bc	(6.916 ± 0.3) d	(11.19 ± 0.59) a
Line 210(TY-2, TY-1/3)	(18.69 ± 0.5) a	(11.27 ± 0.58) a	(29.97 ± 0.4) a	(8.88 ± 0.5) a	(7.703 ± 0.45) cd	(12.11 ± 1) a

در هر ستون میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

In each column, means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5 percent probability level.

نسبت به ژنوتیپ‌های حساس در برابر آلودگی ویروسی در مطالعات بسیاری مانند مطالعه‌ای که بر روی گیاه خیار (*Cucumis sativus* L.) صورت گرفت مشاهده شد که میزان کاهش کلروفیل در ژنوتیپ مقاوم Betalpa نسبت به سایر ژنوتیپ‌های حساس در برابر بیماری ویروسی موزائیک خیار (CMV) بسیار کمتر بوده است (Shakeel et al., 2016). تغییرات و کاهش سطح غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل *a*، *b*، کل و کاروتنوئید) بر اثر آلودگی ویروسی در گزارشات متعددی از جمله مطالعه‌ی مبنی بر تاثیر آلودگی ویروس TYLCV بر گیاهان گوجه‌فرنگی (Sofy et al., 2017) و همچنین نتایج مشابهی بر روی اثر آلودگی بیماری ویروسی موزائیک (CMV) بر رنگدانه‌های فتوسنتزی خیار (*Cucumis sativus*) ارائه شده (Sofy et al., 2018) که با نتایج این تحقیق مطابقت کامل دارد.

بر اساس جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) میزان تجمع پرولین در ژنوتیپ شاهد (۱۱/۵۵) میکرومول بر گرم وزن تر) و لاین ۱۲۸ (۱۰/۲۵) میکرومول بر گرم وزن تر) بود. این در صورتی است که لاین‌های (۶، ۱۷، ۸۵، ۱۱۹، ۱۸۹، ۲۱۰) تجمع و انباشت کمتری از پرولین را در برگ‌های خود ایجاد نمودند. این میزان در لاین شماره ۷ برابر با ۹/۰۱ (میکرومول بر گرم وزن تر) بود.

همانگونه که در نتایج این تحقیق مشاهده شد، در برخی لاین‌ها سطح تولید پرولین در برگ‌های گیاه در مواجهه با آلودگی ویروس TYLCV افزایش یافت. در گیاهان آلوده به بیماری‌های ویروسی غالباً میزان سطح پرولین به منظور کاهش اثرات تنش افزایش می‌یابد، که این فرایند ممکن است به دلیل نقش حفاظتی پرولین به عنوان یک ماده تنظیم کننده اسمزی باشد. تجمع و انباشت پرولین در گیاهان یک پاسخ متداول در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده است. سنتز پرولین به عنوان یک فرایند تنظیمی است که در فعالیت بیوسنتز ژن‌ها و همچنین کاهش بیان ژن‌های که در فرایند تخریب سلولی نقش دارند، دخیل می‌باشند. در این شرایط احتمالاً نیتروژن موجود در برگ‌ها به منظور مقابله با تنش ایجاد شده و تنظیم پتانسیل اسمزی به جای استفاده در سنتز کلروفیل به سمت سنتز و تولید پرولین

میزان کلروفیل *b* در لاین شاهد (۴/۹۰) میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه)، لاین ۱۲۸ (۶/۸۹) میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) و لاین ۷ (۸/۳۵) میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) مشاهده شد و سایر لاین‌ها از نظر آماری در یک گروه واحد (a) قرار گرفتند (جدول ۲).

با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها، میزان کلروفیل کل به ترتیب در گیاه شاهد (۱۵/۸۶) میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه)، لاین ۱۲۸ (۱۸/۹۹) میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) و لاین ۷ (۲۲/۶۷) میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) در گروه‌های متفاوت آماری (e,d,c) مشاهده شدند. همچنین این میزان در لاین ۲۱۰ (۲۹/۹۷) (میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

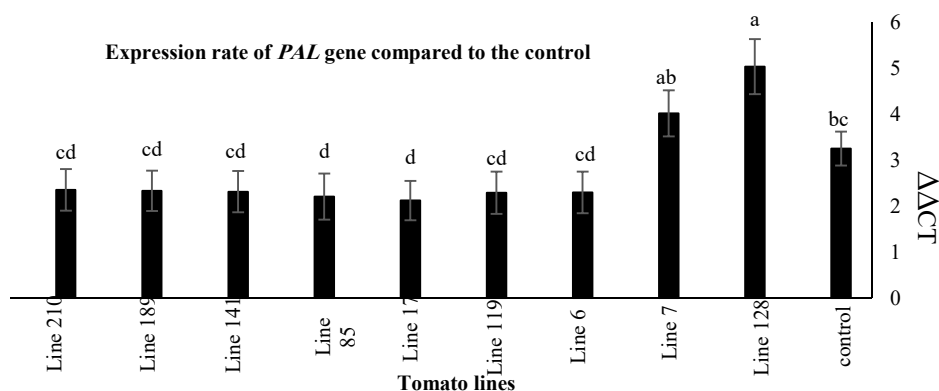
بر اساس جدول ۲، میزان کارتنوئید در گیاه شاهد (۲/۹۲) میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) و لاین ۱۲۸ (۳/۷۰) میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) مشاهده شد، در صورتی که این میزان در لاین شماره ۲۱۰ (۸/۸۸) میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه) محاسبه شد. با توجه به نتایج حاصله در این مطالعه، آلودگی ویروسی باعث کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی شد. در بیشتر آلودگی‌های ویروسی که منجر به ایجاد کلروزیس بر روی برگ‌های گیاهان میزبان خود می‌گردند، یک اتفاق عمومی، کاهش محتویات کلروفیل در هر ناحیه برگ است که به دلیل جلوگیری از توسعه کلروپلاست و یا تخریب رنگدانه‌های کلروپلاست می‌باشد (Halldorson & Keller, 2018). کاهش در میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌تواند به دلیل کاهش کلروفیل II و یا تخریب کروموپلاست (Goodman et al., 1967) ناشی از آلودگی ویروس باشد. رابطه بین ظهور علائم پیری برگ و علائم ویروسی همانند کلروزیس و زرد شدن رنگ برگ بیانگر فعالیت مجموعه‌ای از ژن‌های است که توسط این دو فرایند القا می‌شود (Espinoza et al., 2007a, 2007b; Pageau et al., 2006). همانگونه که از مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) مشاهده شد لاین‌های دارای مکان ژنی *TY-2* و *TY-1/3* در مواجهه با آلودگی ویروس، خسارت کمتری را متحمل شدند. کاهش تخریب رنگدانه‌های فتوسنتزی در ژنوتیپ‌های مقاوم

کاهش در میزان محتویات پروتئین کل و در نتیجه ایجاد خسارت در میزان این محتویات در اثر آلودگی ویروسی در تعدادی از لاین‌ها مشاهده شد. این واکنش به دلیل کاهش سنتز پروتئین و یا تخریب بیشتر پروتئین‌ها به دلیل فعالیت مخرب گونه‌های اکسیژن آزاد (ROS) در برابر آلودگی ویروس TYLCV است (Sofy *et al.*, 2017). با توجه به نتایج، لاین‌های حاوی دو مکان ژنی *TY-2* و *TY-1/3* میزان بالاتری از محتویات پروتئینی را نسبت به لاین ۷ که تنها حاوی مکان ژنی *TY-2* و دو لاین شاهد و ۱۲۸ که فاقد مکان ژنی مقاومت بوده‌است را دارا بوده که نشان از تخریب کمتر این ترکیبات در برابر آلودگی ویروسی می‌باشد. کاهش در میزان محتویات پروتئین کل در برابر آلودگی‌های ویروسی در بسیاری از مطالعات مبنی بر تاثیر ویروس TYLCV بر روی گیاه گوجه‌فرنگی نیز گزارش شده‌است (Bassiouny *et al.*, 2015; Sofy *et al.*, 2017). پایین بودن میزان کاهش و تخریب پروتئین در ژنوتیپ‌های مقاوم در برابر بیماری‌های ویروسی نسبت به ژنوتیپ‌های حساس نیز گزارش شده‌است (Siddiquea *et al.*, 2014) که با نتایج این تحقیق مطابقت کامل دارد.

بررسی داده‌های مقایسه میانگین‌ها بیانگر این مطلب است که میزان بیان ژن *PAL* در دو لاین ۱۲۸ (۵/۰۳۶) و لاین ۷ (۴/۰۲۰) نسبت به شاهد بیشتر (۳/۲۳۵) بوده‌است و این در حالی است که سایر لاین‌ها سطح پایین تری از بیان ژن *PAL* را از خود نشان داده‌اند (شکل ۴).

می‌رود (Sumithra & Reddy, 2004). همانطور که در نتایج مشاهده می‌شود لاین‌های حاوی دو مکان ژنی *TY-1/3* و *TY-2* سطح پایین‌تری از تولید پرولین را در برگ‌های خود نسبت به گیاه شاهد تجربه کرده‌اند. که این پیامد ممکن است به علت مقاومت بدست‌آمده ناشی از حضور این دو مکان ژنی باشد که باعث شده گیاه در سطح پایین‌تری از تنش قرار گیرد، لذا نیاز کمتری به سنتز این ترکیب در برگ‌های خود داشته‌است. افزایش میزان پرولین در گیاهان تحت تنش در اثر آلودگی ویروسی نیز در گزارشات سوفی و همکاران (Sofy *et al.*, 2017) در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده شده به جدایه TYLCV Egyptian و همچنین در مطالعات بر روی گیاهان فلفل آلوده شده به ویروس موزائیک توتون (TMV) (Pazarlar *et al.*, 2013) اشاره شده‌است که با نتایج این تحقیق مطابقت کامل دارد.

بر توجیه به جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) کمترین میزان پروتئین کل در گیاه شاهد (۴/۸۶ میلی‌گرم بر گرم بافت تازه) مشاهده شد. این در حالی است که سه لاین ۲۱۰ (۱۲/۱۱) میلی‌گرم بر گرم بافت تازه، ۱۴۱ (۱۱/۶۹) میلی‌گرم بر گرم بافت تازه) و لاین ۱۸۹ (۱۱/۱۹) میلی‌گرم بر گرم بافت تازه) دارای محتویات بیشتری از پروتئین کل بودند و از نظر آماری در یک گروه واحد (a) قرار گرفته‌اند (جدول ۲). بر طبق داده‌های جدول مقایسه میانگین‌ها لاین ۱۲۸ با میزان پروتئین ۷/۴۳ (میلی‌گرم بر گرم بافت تازه) نسبت به گیاه شاهد میزان تولید پروتئین کل کمتری را از خود نشان داده‌است (جدول ۲).



شکل ۴. بیان ژن *PAL* در لاین‌های مختلف گوجه‌فرنگی.

Figure 4. *PAL* gene expression in different tomato lines.

شد، نتایج نشان داد که میزان فعالیت *PAL* در گیاهان آلوده شده نسبت به شاهد سالم افزایش بیشتری داشته که به موازات این واکنش سنتز ترکیبات فنولی نیز افزایش یافته است (Bassiouny *et al.*, 2015)، که با نتایج این تحقیق و همچنین با مشاهدات Schovankova & Opatova (2011) هم‌مانگی کامل دارد.

نتیجه‌گیری کلی

مشاهدات این تحقیق نشان داد که انتقال ژن‌های *TY* باعث کاهش تخریب رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و محتویات پروتئین کل در برابر آلودگی ویروس TYLCV شد. همچنین میزان سطح سنتز پرولین و بیان ژن *PAL* در لاین‌های حاوی این دو مکان ژنی نسبت به سایرین کمتر بود و گیاه سطح تنش کمتری را تجربه نمود. این مطلب بیانگر نقش موثر انتقال این مکان‌های ژنی در فرایند ایجاد مقاومت در برابر بیماری ویروسی TYLCV می‌باشد. با توجه به مشاهدات، لاین ۷ که تنها دارای مکان ژنی *TY-2* است، مشخص شد که اولاً مقاومت حاصل از این مکان ژنی در برابر سویه موجود در ایران ناکارآمد است و دوماً با توجه به صرف زمان و هزینه بسیار بالا بهتر است در برنامه‌های اصلاحی، تلفیق مکان ژنی *TY-1/3* با سایر ژن‌های همانند *TY-5* و *TY-6* به جای مکان ژنی *TY-2* صورت پذیرد.

آنزیم *PAL* یا فنیل آلانین آمونیالیاز به عنوان یک آنزیم کلیدی است که ماده L-فنیل آلانین را به ترانس سینامیک اسید که به عنوان یک ماده پیش ساز اولیه در مسیر ترکیبات فنیل پروپانویدهای مانند لیگنین-ها، کومارین‌ها و فلاونوئیدها است، تبدیل می‌کند (Schuster and Rétey, 1995). افزایش در فعالیت *PAL* به طور متعدد در مواجهه با آلودگی پاتوژن‌ها و یا زخم‌ها به عنوان یک واکنش دفاعی مورد نظر قرار گرفته است (Diniz, 2003). بر اساس نتایج تحقیقات یک رابطه مسقیم و مثبتی بین افزایش فعالیت *PAL* و افزایش بیوسنتز ترکیبات فنولی وجود دارد (Baque *et al.*, 2010). از این رو عموماً فعالیت *PAL* به عنوان یک نشانگر در برابر تنش‌های مختلف در گونه‌های مختلف گیاهی مورد مطالعه قرار می‌گیرد (Wako *et al.*, 2010). از آنجای که میزان بیان ژن *PAL* در لاین‌های حاوی دو مکان ژنی *TY-2* و *TY-1/3* بر اساس داده‌های شکل ۴ نسبت به لاین‌های دیگر از سطح پایین تری برخوردار است می‌توان نتیجه گرفت که لاین‌های مورد نظر خسارت پایین‌تری را در برابر تنش تجربه کرده، لذا نیازی به فعالیت بالای *PAL* و سنتز ترکیبات دفاعی مانند فنول و فلاونوئید نسبت به گیاه شاهد نبوده است. در مطالعه‌ای که بر روی گیاه گوجه‌فرنگی در برابر آلودگی بیماری ویروسی TYLCV انجام

REFERENCES

1. Aimé, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., & Olivain, C. (2013). The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(8), 918-926.
2. Anbinder, I., Reuveni, M., Azari, R., Paran, I., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Lapidot, M. & Levin, I. (2009). Molecular dissection of tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 119, 519-530.
3. Bananej, K. (2016). An analysis on the status of tomato yellow leaf curl disease. *Applied Entomology and Phytopathology*, 84, 157-173.
4. Bananej, K., Vahdat, A., & Hosseini-Salekdeh, G. (2009). Begomoviruses associated with yellow leaf curl disease of tomato in Iran. *Journal of Phytopathology*, 157(4), 243-247.
5. Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
6. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
7. Butterbach, P., Verlaan, M. G., Dulleman, A., Lohuis, D., Visser, R. G., Bai, Y., & Kormelink, R. (2014). The TYLCV resistance gene *Ty-1* confers resistance in tomato through enhanced transcriptional gene silencing. Characterization of major resistance genes to tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 12942-12947.

8. Chen, D. H., Nelson, R. J., Wang, G. L., Inukai, T., Mackill, D. J., & Ronald, P. C. (2000). Characterization of blast resistance in the durably resistant rice cultivar Moroberekan. *In Advances in Rice Blast Research* (pp. 17-27). Springer, Dordrecht.
9. Chen, H., He, H., Zou, Y., Chen, W., Yu, R., Liu, X., & Deng, X. W. (2011). Development and application of a set of breeder-friendly SNP markers for genetic analyses and molecular breeding of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 123(6), 869-879.
10. Elbaz, M., Hanson, P., Fgaier, S., & Laarif, A. (2016). Evaluation of tomato entries with different combinations of resistance genes to tomato yellow leaf curl disease in Tunisia. *Plant Breeding*, 135(4), 525-530.
11. Espinoza, C., Medina, C., Somerville, S., & Arce-Johnson, P. (2007). Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3197-3212.
12. Espinoza, C., Vega, A., Medina, C., Schlauch, K., Cramer, G., & Arce-Johnson, P. (2007). Gene expression associated with compatible viral diseases in grapevine cultivars. *Functional & Integrative Genomics*, 7(2), 95-110.
13. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (Eds.). (2005). *Virus taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.
14. Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., & Valè, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(3), 317-342.
15. Garcia, B. E., Graham, E., Jensen, K. S., Hanson, P., Mejía, L., & Maxwell, D. P. (2007). Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance *Ty-2* locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm. *Tomato Genetic Cooperative Report*, 57, 21-24.
16. Goodman, R. N., Kiraly, Z., & Zaitlin, M. (1967). The biochemistry and physiology of infectious plant diseases. *The biochemistry and physiology of infectious plant diseases*. David Van Nostrand. Princeton, 354 pp.
17. Griffiths, P. D., & Scott, J. W. (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(4), 462-467.
18. Hajimorad, M. R., & Ahoonmanesh, A. (1993). Occurrence and identification of tomato leaf curl geminivirus in Iran. In *Proceedings of the 11th Plant Protection Congress of Iran* 28 Aug.-2 Sep., Rasht, Iran (in Farsi).
19. Halldorson, M. M., & Keller, M. (2018). Grapevine leafroll disease alters leaf physiology but has little effect on plant cold hardiness. *Planta*, 248(5), 1201-1211.
20. Hanson, P. M., Bernacchi, D., Green, S., Tanksley, S. D., Muniyappa, V., Padmaja, A. S., & Chen, J. T. (2000). Mapping a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(1), 15-20.
21. Hulbert, S. H., Webb, C. A., Smith, S. M., & Sun, Q. (2001). Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 285-312.
22. Ji, Y., Schuster, D. J., & Scott, J. W. (2007). *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(3), 271-284.
23. Ji, Y., Scott, J. W., Schuster, D. J., & Maxwell, D. P. (2009). Molecular mapping of *Ty-4*, a new Tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(2), 281-288.
24. Lazarowitz, S. G. (1991). Molecular characterization of two bipartite geminiviruses causing squash leaf curl disease: role of viral replication and movement functions in determining host range. *Virology*, 180(1), 70-80.
25. Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes. *Method in Enzymology*, 148, 350-382.
26. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
27. Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4326.
28. Mushtaq, S., Shamin, F., Shafique, M., & Haider, M. S. (2014). Effect of whitefly transmitted geminiviruses on physiology of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and tobacco (*Nicotiana benthamiana* L.) plants. *Journal of Natural Science Research*, 4(9), 109-119.
29. Nevame A Y M, Xia L, Nchongboh C G, Hasan M M, Alam M A, Yongbo L, Wenting Z, Yafei H, Emon R M, Ismail M R, Efsue A, Gang S, Wenhu L & Longting S (2018) Development of a new molecular marker for the resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology Research International*, 1, 1-10

30. Pageau, K., Reisdorf-Cren, M., Morot-Gaudry, J. F., & Masclaux-Daubresse, C. (2006). The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 547-557.
31. Pazarlar, S., Gümüş, M. U. S. T. A. F. A., & Öztekin, G. B. (2013). The effects of tobacco mosaic virus infection on growth and physiological parameters in some pepper varieties (*Capsicum annum* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(2), 427-433.
32. Picó, B., Díez, M. J., & Nuez, F. (1998). Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Euphytica*, 101(3), 259-271.
33. Pontier, D., Gan, S., Amasino, R. M., Roby, D., & Lam, E. (1999). Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Molecular Biology*, 39(6), 1243-1255.
34. Rybicki, E. P. (2015). A top ten list for economically important plant viruses. *Archives of Virology*, 160(1), 17-20.
35. Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., & Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938-954.
36. Shakeel, M. T., Amer, M. A., Al-Saleh, M. A., Ashfaq, M., & Haq, M. I. (2016). Changes in chlorophyll, phenols, sugars and mineral contents of cucumber plants infected with cucumber mosaic virus. *Journal of Phytopathology and Pest Management*, 3, 1-11.
37. Siddique, Z., Akhtar, K. P., Hameed, A., Sarwar, N., Imran-Ul-Haq, & 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(1), 702-711.
38. Sofy, A.R., El-DougDoug, K.A., Mousa, A.A. & Refaey, E. E. (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(2), 110-133.
39. Sofy, M. R., Sharaf, A. M. A., El-Nosary, M. E., & Sofy, A. R. (2018). *Salix alba* extract induces systemic resistance in *Cucumis sativus* infected by cucumber mosaic virus. *Nature and Science*, 16, 107-113.
40. Sumithra, K., & Reddy, A. R. (2004). Changes in proline metabolism of cowpea seedlings under water deficit. *Journal of Plant Biology*, 31(3), 201-204.
41. Taiwo, M. A., & Akinjogunla, O. J. (2006). Cowpea viruses: Quantitative and qualitative effects of single and mixed viral infections. *African Journal of Biotechnology*, 5(19).
42. Thind, S. K., Monga, P. K., Kaur, N., & Cheema, S. S. (1996). Analysis of some biochemical and micro-nutrient constituents of yellow mosaic virus infected moong. *Indian Journal of Virology*, 12(2), 157-159.
43. Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G., Scott, J. W., & 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 Genetics*, 9(3), e1003399.
44. Yan, Z., Wolters, A. M. A., Navas-Castillo, J., & Bai, Y. (2021). The global dimension of tomato yellow leaf curl disease: Current status and breeding perspectives. *Microorganisms*, 9(4), 740.
45. Zamir, D., Ekstein-Michelson, I., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., & Czosnek, H. (1994). Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(2), 141-146.