

## بررسی اثر تابش دزهای پایین پرتوی گاما به تنهایی و یا همراه با اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم بر آلودگی بذرزاد ویروس موزاییک معمولی لوبیا در گیاه لوبیا

حمیده مردانی مهرآباد<sup>۱</sup>، فرشاد رخشنده رو<sup>۱</sup>، سمیرا شهبازی<sup>۲</sup>، نوح شهرآئین<sup>۳</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛

۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای (NSTRI)، سازمان انرژی اتمی ایران (AEOI)، البرز، ایران؛

۳- دانشیار، بخش تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۸)

### چکیده

در این پژوهش تأثیر دزهای پایین پرتوی گاما (۱۰، ۲۰ و ۳۰ گری) به تنهایی و همچنین همراه با اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم بر ویروس بذرزاد موزاییک معمولی لوبیا (BCMV)، بررسی شد. بذور لوبیای رقم تجاری "صدری" دارای آلودگی بذرزاد به ویروس BCMV کشت شدند. گیاهچه‌های آلوده و عاری از ویروس بر اساس آزمون الایزای غیرمستقیم (PTA-ELISA) تفکیک و از آن‌ها بدرگیری شد. نتایج نشان داد که شاخص‌های رشدی در گیاهچه‌های آلوده و عاری از ویروس (شاهد) تیمار شده با تابش گاما به تنهایی و نیز همراه با اسید سالیسیلیک و یا حرارت غیرمستقیم در مقایسه با گیاهچه‌هایی که پرتوتابی نشده‌اند در سطح احتمال ۵ درصد افزایش معنی‌داری یافته است. پرتوتابی گاما موجب القاء فعالیت اختصاصی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (PAL، CAT، POX، PPO) و همچنین افزایش چگالی پروتئین در گیاهچه‌های آلوده و سالم و کاهش میزان غلظت پروتئین‌های BCMV در گیاهچه‌های آلوده تیمار شده با پرتو گاما به تنهایی و نیز همراه با اسید سالیسیلیک و یا حرارت غیرمستقیم در مقایسه با گیاهچه‌های پرتو ندیده شد. نتایج این پژوهش بیانگر القاء مقاومت نسبی در گیاهچه‌های دارای آلودگی بذرزاد به BCMV تیمار شده با دزهای ۲۰ و ۳۰ گری پرتوی گاما به تنهایی و نیز همراه با اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم بود.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، الگوی پروتئینی، پرتوتابی گاما، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، BCMV

### Study on the effect of low doses of gamma irradiation alone or in associated with the salicylic acid and indirect temperature on seed borne infection of *Bean common mosaic virus* in bean plant

H. MARDANI-MEHRABAD<sup>1</sup>, F. RAKHSHANDEHROO<sup>1</sup>✉, S. SHAHBAZI<sup>2</sup>, N. SHAHRAEEN<sup>3</sup>

1. PhD. student and Assistant Professor respectively, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences and Food Industries Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran;
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization, Karaj, Iran;
3. Associate Professor, Research Department of Plant Virology, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Tehran, Iran

### Abstract

In this study, the effect of the low doses of gamma irradiation (10, 20, and 30 Gy) alone and in associated with the salicylic acid and indirect temperature on the seed borne infection of *Bean common mosaic virus* (BCMV) was assessed. Commercial bean seeds called "Sadri" with seed borne infection to BCMV were sowed. The seedlings were tested for the infection of BCMV by indirect plate-trapped antigen (PTA-ELISA) test and seeded. Results indicated that the growth factors in the irradiated seeds alone and in associated with the salicylic acid or indirect temperature significantly increased ( $P \leq 0.05$ ) in healthy and infected seedlings compared to the non-irradiated seedlings. Gamma irradiation induced the specific activity of various antioxidant enzymes (PPO, POX, CAT and PAL) as well as the total protein density in treated healthy and infected beans, and decreased the concentration of BCMV proteins in the infected and irradiated seeds alone and so in associated with the salicylic acid or indirect temperature compared to the non-irradiated seedlings. Results of this research indicated to the induction of the relative resistance against BCMV in infected bean seedlings treated with the 20 and 30 Gy doses of gamma irradiation alone or in associated with the salicylic acid and indirect temperature.

**Keywords:** Antioxidant enzymes activity, BCMV, gamma irradiation, protein pattern, salicylic acid.

✉ Corresponding author: Rakhshandehroo\_fa@srbiau.ac.ir

## مقدمه

حبوبات شامل انواع لوبیا و نخود منابع نسبتاً ارزان و سرشار از پروتئین و ریزمغذی‌ها می‌باشد و بخش قابل توجهی از سلامت و معیشت مردم را به خصوص در کشورهای در حال توسعه تأمین می‌کند. امروزه اهمیت حبوبات در تأمین نیاز غذایی جهان به اندازه‌ای است که سازمان خواروبار و کشاورزی ملل متحد (فائو) سال ۲۰۱۶ را تحت عنوان سال حبوبات نامگذاری کرده است (FAO STAT, 2016). از بین حبوبات، لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) از ارقام مختلفی برخوردار بوده و متعلق به خانواده *Leguminosae* بوده و از سطح زیر کشت و اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است، به طوری که بیشترین سطح زیر کشت لوبیا در ایران مربوط به ارقام نوع چیتی می‌باشد. سطح زیر کشت لوبیا در ایران در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴، در حدود ۱۰۷/۵۱۵ هزار هکتار بوده است (آبی ۱۰۷/۰۳۰ و دیم ۴۸۵ هکتار)، که معادل ۱۳/۷ درصد از کل سطح حبوبات می‌باشد. میزان تولید کل محصول لوبیا ۲۲۹/۹۴۱ هزار تن (آبی ۲۲۹/۳۱۵ و دیم ۶۲۶ تن) برآورد شده است (Anonymous, 2017). میزان پروتئین موجود در دانه‌های لوبیا دو تا سه برابر غلات می‌باشد و عمدتاً در استان‌های لرستان، مرکزی، چهارمحال بختیاری، فارس، زنجان و اصفهان کشت می‌گردد (Dorri et al., 2008). این گیاه زراعی نیز مانند بسیاری از گیاهان تحت تأثیر بسیاری از بیماری‌گرها قرار می‌گیرد که راندمان کمی و کیفی این محصول را کاهش می‌دهند. ویروس‌ها از مهم‌ترین این بیماری‌گرها بوده و در میان آن‌ها جنس پوتی ویروس (*Potyvirus*) از خانواده *Potyviridae* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. مهم‌ترین ویروس خسارت‌زا در گیاه لوبیا، ویروس موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*) (BCMV) شناخته شده است که میزان کاهش محصول در اثر این ویروس تا ۹۰ درصد نیز گزارش شده است (Strausbaugh et al., 2003). این ویروس دامنه میزبانی گسترده‌ای ندارد و بیشتر در گونه‌های جنس *Phaseolus* بیماری‌زا است و در

طبیعت توسط بذر و شته به‌روش ناپایا و در گلخانه از طریق مایه‌کوبی مکانیکی منتقل می‌شود و دارای ژنوم از نوع RNA تک‌رشته‌ای مثبت به اندازه حدود ۱۰ هزار جفت باز می‌باشد (Zheng et al., 2002). در ایران تحقیقات زیادی در زمینه ردیابی و شناسایی BCMV در استان‌های مختلف کشور انجام شده که بر اساس آن‌ها این ویروس شایع‌ترین و خسارت‌زا-ترین ویروس در مزارع لوبیای کشور شناخته شده و وجود آن در استان‌های مختلف کشور گزارش شده است (Peyambari et al., 2011; Naderpour et al., 2000; Salari et al., 2013).

از آنجایی که BCMV از توان انتقال عمودی از طریق بذر برخوردار است، لذا تولید بذور عاری از ویروس امری ضروری در تولید و صادرات این محصول می‌باشد. در حالی-که ارقام شکوفا و پاک نسبت به این ویروس مقاوم ارزیابی و گزارش شده‌اند (Mazandarani et al., 2010)، اما در بسیاری از موارد به دلیل آلودگی همزمان عوامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک، تولید ارقام مقاوم که سطح قابل قبولی از مقاومت را نشان دهد کار آسانی نمی‌باشد و به همین دلیل در حال حاضر بیشتر توجه محققان بر ارائه راهکارهای مدیریت تلفیقی برای کنترل بیماری‌های ویروسی گیاهی بویژه گیاه لوبیا معطوف شده است. در گذشته تحقیقاتی در ایران در خصوص عاری‌سازی گیاهچه‌ها و بذور لوبیا از BCMV از طریق شیمی‌درمانی و الکتروتراپی انجام پذیرفته است (Hormozi-Nejad et al., 2010). با این وجود به دلیل مخاطرات زیست محیطی مواد شیمیایی و همچنین صدمه روش الکتروتراپی به بذرهای تیمار شده و کارآمد نبودن روش‌های مذکور در عاری سازی بذور آلوده از ویروس، معضل آلودگی به BCMV همچنان در حبوبات کشور باقی مانده و دسترسی به ژرم پلاسماهای عاری از ویروس ممکن نبوده است. بنابراین ارائه روشی نوین و کارآمد که از هزینه کمی برخوردار باشد، با محیط سازگار بوده و در حذف آلودگی BCMV از بذور آلوده حبوبات از راندمان بالایی برخوردار باشد، امری ضروری می‌نماید. در سال‌های اخیر با توسعه دانش و محصولات مبتنی

است که تابش دزهای پایین پرتو گاما روی گیاهان و ریزموجودات فتوسنتزکننده می‌تواند موجب افزایش میزان تقسیمات سلولی، افزایش نرخ جوانه‌زنی، افزایش رشد سلول، افزایش فعالیت آنزیمی، مقاومت به بیمارگرهای گیاهی و افزایش میزان عملکرد تولید شود (Chakravarty and Sen, 2001; Jeong *et al.*, 2015). تاکنون تحقیقی در خصوص بررسی سازوکار اثر کنترلی دزهای پایین پرتوی گاما در غیرفعال نمودن ویروس‌های گیاهی به خصوص در مورد ویروس بذرزاد موزائیک معمولی لوبیا BCMV انجام پذیرفته است. در این پژوهش علاوه بر بررسی اثر دزهای پایین پرتوی گاما در کاهش آلودگی گیاهچه‌های لوبیا به ویروس BCMV تحت شرایط آزمایشگاهی، مکانیسم اثر تابش نیز مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین تأثیر پرتوی گاما به تنهایی و نیز همراه با اسید سالیسیلیک و یا حرارت غیرمستقیم بر روی شاخص‌های رشدی و فعالیت اختصاصی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، فینیل آلانین آمونیلایز و تغییرات چگالی پروتئینی در گیاهچه‌های آلوده در مقایسه با گیاهچه‌های سالم (شاهد) نیز بررسی شد. در این پژوهش برای اولین بار با تمرکز بر سازوکار نوین استفاده از تابش دزهای پایین پرتوی گاما (پایین‌تر از محدوده جهش‌زایی در ژنوم لوبیا و ژنوم ویروس) به لوبیا رقم تجاری "صدری"، اهدافی همچون القاء مقاومت نسبی به BCMV در بذر، کاهش آلودگی به ویروس و پرایمینگ بذور (جهت افزایش شاخص قدرت زیستی و بهبود جوانه‌زنی) به عنوان روشی سریع، فاقد هر نوع باقیمانده سم، دوست‌دار اکوسیستم و با کارایی بالا با موفقیت به منظور ایجاد دانش فنی تولید اقتصادی ارقام تجاری متحمل به آلودگی ویروسی مد نظر قرار گرفت.

#### روش بررسی

تفکیک بذور آلوده و عاری از ویروس (شاهد) و نیز سنجش غلظت ویروس در نمونه‌های تیمار شده: در این تحقیق، بذور رقم تجاری تحت عنوان "صدری" که آلودگی بذرزاد آن‌ها به ویروس

بر فناوری هسته‌ای و ادغام آن با بخش کشاورزی تحت معاهده آژانس بین‌المللی انرژی اتمی (IAEA) و سازمان خواروبار و کشاورزی ملل متحد (FAO) در سال ۱۹۶۴، افق‌های جدیدی در زمینه استفاده از انرژی هسته‌ای در افزایش تولید و عملکرد محصولات کشاورزی ایجاد شده است (Mousavi Shelmani *et al.*, 2010). پرتوتابی یکی از مهم‌ترین فناوری‌های بالقوه غیر شیمیایی و مؤثر جهت غیرفعال سازی بیمارگرهای گیاهی می‌باشد. نتایج پژوهش‌های مختلف در گذشته نشان داده است که تابش پرتوهای یونیزه شده می‌تواند جهت حذف نسبی آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و حشرات بدون خطر خاصی برای محیط و سلامت انسان کاربرد داشته باشند (Predmore *et al.*, 2015). در سال‌های اخیر استفاده از مواد غیرزیستی که مکانیزم‌های دفاعی گیاه را قبل از مواجهه با بیمارگرها فعال کرده و فاقد اثر زیست‌محیطی زیان‌آورند مورد توجه قرار گرفته است (Arie *et al.*, 2007). تیمار خارجی گیاهان با اسید سالیسیلیک (SA)، جاسمونات‌ها و برخی مواد دیگر سبب تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، القای ژن‌های مقاومت به پاتوژن‌ها (PR) و در نهایت کاهش خسارت ناشی از چندین عامل بیمارگر روی محصولات مختلف شده است (Loake & Grant, 2007).

یکی از معمول‌ترین روش‌هایی که برای حذف فیزیکی آلودگی‌های میکروبی به کار می‌رود، استفاده از تابش پرتوی گاما می‌باشد. پرتوی گاما نسبت به الکترون‌ها از نفوذ بالاتری در سلول موجودات برخوردار است. ماکرومولکول‌هایی مانند اسیدهای نوکلئیک و به میزان کمتر پروتئین‌های موجود در سلول‌های میکروارگانیسم‌ها در زمان برخورد مستقیم با تابش‌های یونیزه صدمه دیده و از بین می‌روند. تابش‌های یونیزه شده همچنین به صورت غیرمستقیم و از طریق تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی به خصوص گروه‌های هیدروکسیل و پراکسید رادیکال در سلول موجودات می‌توانند موجب تخریب ماکرومولکول‌های مختلف درون سلولی شوند (Smolko and Lombardo, 2005). مطالعات گذشته نشان داده

(پیت، پرلیت و ورمیکولیت به نسبت ۱:۱:۱) کشت گردیدند و در اتاقک رشد (Growth chamber) با دمای ۲۴-۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۶۰ درصد و دوره نور و تاریکی ۸-۱۶ ساعت نگهداری شدند. نمونه برداری از برگ‌های گیاهان حاصل، ۲۰ روز بعد از کشت انجام شد (Shahbazi, 2016).

**تیمار با حرارت غیرمستقیم:** جهت بررسی تأثیر پرتوتابی گاما به تنهایی و نیز همراه با حرارت غیرمستقیم، بذور سالم و آلوده به ویروس که قبلاً توسط دزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گری از پرتوی گاما تیمار گردیده بودند و همچنین بذور آلوده به ویروس و عاری از ویروس که تحت پرتوتابی گاما قرار نگرفته بودند (شاهد)، مطابق دستورالعمل از قبل موجود در معرض حرارت غیرمستقیم قرار گرفتند (Reddick and Steward, 1918; Shahbazi, 2016). برای این منظور حرارت غیرمستقیم از طریق قرار دادن بذور لوبیا در لوله آزمایش و سپس قرار دادن لوله‌های آزمایش در بن‌ماری با حرارت ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه اعمال شد. همچنین بذور سالم و آلوده به ویروس که تحت تیمار حرارت قرار نگرفته بودند نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. سپس بذوری که تحت تیمار حرارت غیرمستقیم قرار گرفته بودند و نیز بذور شاهد بلافاصله در گلدان‌های حاوی خاک سبک (پیت، پرلیت و ورمیکولیت به نسبت ۱:۱:۱) کشت و در اتاقک رشد (Growth chamber) با دمای ۲۴-۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۶۰ درصد و دوره نور و تاریکی ۸-۱۶ ساعت نگهداری شدند. نمونه برداری از برگ‌های گیاهان حاصل، ۲۰ روز بعد از کشت انجام شد.

**تیمار با اسید سالیسیلیک (SA):** جهت بررسی تأثیر پرتوتابی گاما به تنهایی و نیز همراه با اسید سالیسیلیک بر شاخص‌های رشدی، بذور سالم و آلوده به ویروس که قبلاً توسط دزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گری پرتو گاما تیمار گردیده بودند و همچنین بذور آلوده به ویروس و عاری از ویروس که تحت پرتوتابی گاما قرار نگرفته بودند (شاهد)، جهت پیش‌تیمار در تشتک پتری‌های حاوی اسید سالیسیلیک با

BCMV توسط آزمون الایزای مستقیم (DAS-ELISA) و آزمون IC-RT-PCR به تأیید رسیده بود (Salari et al., 2013) استفاده شد. مقدار مشخصی از بذور جهت تفکیک بذور آلوده و عاری از ویروس (شاهد) در گلخانه گروه گیاه‌پزشکی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج کشت شد. نمونه برداری از برگ‌ها در مرحله چهار تا شش برگی انجام و پس از سپری شدن مرحله گلدهی، بذور گیاهان مذکور جمع‌آوری گردید. آزمون الایزای غیرمستقیم (PTA-ELISA) مطابق روش لومل و همکاران و توسط آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی ویروس BCMV تولید شده توسط شرکت Bioreba انجام شد (Lommel et al., 1982). برای آنتی‌بادی ثانویه از GAR (Sigma Co.; Germany) (آنتی‌بادی تولید شده در بز علیه خرگوش) با رقت هزار برابر (۱/۱۰۰۰) استفاده شد. جذب نوری تمامی نمونه‌ها در طیف نوری ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده تشتک الایزا قرائت گردید. حد آلودگی معادل مقدار عددی مربوط به حاصل جمع انحراف از معیار جذب نوری نمونه‌های شاهد سالم با دو برابر متوسط جذب چاهک‌های شاهد منفی در نظر گرفته شد. از برگ نمونه‌های لوبیای سالم که توسط آزمون الایزا، عاری از ویروس تشخیص داده شده بودند به عنوان نمونه شاهد عاری از ویروس استفاده شد.

**تیمار با دزهای پایین پرتوی گاما:** تنظیم رطوبت بذور با توجه به رطوبت اولیه و با استفاده از دسیکاتور انجام شد و رطوبت بذر در زمان پرتودهی براساس دستورالعمل در حدود ۱۲ درصد تعیین گردید (Piri et al., 2011). بذور لوبیای آلوده به ویروس و عاری از ویروس (شاهد) برای پرتوتابی با منبع گاما (گاماسل) به طور جداگانه در کیسه‌های زیپ‌دار قرار داده شدند تا رطوبت آن‌ها حفظ شود. سپس توسط دستگاه گاماسل (Issledovatle Gamma cell PX-30) با چشمه کبالت-۶۰ (Co 60) در دزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گری با نرخ دز ۰/۲۳ گری بر ثانیه پرتوتابی انجام شد. همچنین بذور سالم و آلوده به ویروس که تحت تیمار پرتوتابی قرار نگرفته بودند به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. تمامی بذور بلافاصله در گلدان حاوی خاک سبک

**ج: تعیین وزن خشک:** پس از پایان آزمایش گیاهچه‌ها را از خاک خارج کرده و اندام هوایی نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۷۲ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از خشک شدن قسمت‌های هوایی وزن هر بوته را به دقت ثبت کرده و سپس داده‌های بدست آمده، تجزیه و تحلیل شد (Shahbazi, 2016).

**د: تعیین محتوای کلروفیل *a* و *b*:** برای بررسی میزان محتوای کلروفیل *a* و *b* در برگ، عصاره حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ نانومتر مطابق روش آرنون (Arnon, 1987) با روابط زیر:

$$\text{Chl. } a \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} = 11.64 \times (A_{663}) - 2.16 (A_{645})$$

$$\text{Chl. } b \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} = 20.97 \times (A_{645}) - 3.94 (A_{663})$$

محاسبه شد.

**سنجش الگوی پروتئینی:** جهت ارزیابی اثر تابش پرتوی گاما به تنهایی و همچنین همراه با اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم در محتوای پروتئین کل بافت‌های برگ گیاهچه لوبیاهای سالم و آلوده به BCMV، الگوی الکتروفورزی مربوط به پروتئین کل نمونه‌ها سنجش شد. پروتئین کل بافت با استفاده از بافر استخراج حاوی مواد تخریب‌کننده پروتئین شامل سدیم دودسیل سولفات و مرکاپتواتانل مطابق دستورالعمل (Gonzalez *et al.*, 2010). از نمونه‌های برگی استخراج شد. به منظور اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین کل جهت راندن میزان یکسان از غلظت پروتئین مربوط به نمونه‌های مختلف در ژل الکتروفورز از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976). همچنین برای الکتروفورز پروتئین از ژل پلی‌اکریل آمید SDS-PAGE و روش (Laemmli, 1970) استفاده شد.

**سنجش میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز (Peroxidase):** این آنزیم، از طریق تجزیه ایندول-۳-استیک اسید (IAA)، نقش مهمی در تولید لیگنین و مصرف پراکسید هیدروژن و در نهایت مقاومت گیاه به بسیاری از تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد. فعالیت گویاکول پراکسیداز (Guaiacol peroxidase) در

غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمار شدند. همچنین بذور آلوده به ویروس و عاری از ویروس که تحت پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک قرار نگرفته بودند نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. سپس این بذور در گلدان‌های کوچک کشت شدند و نمونه‌گیری از برگ گیاهچه‌های حاصل، ۲۰ روز بعد از جوانه‌زنی بذور انجام شد. همچنین جهت بررسی تأثیر پرتوتابی گاما به تنهایی و نیز همراه با اسید سالیسیلیک بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و چگالی پروتئینی، ابتدا بذور سالم و آلوده به ویروس که با دزهای مختلف گاما تیمار شده بودند در گلدان‌های کوچک کشت شدند و پس از ظهور برگچه‌های اولیه، اسید سالیسیلیک از طریق اسپری کردن با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بر روی برگچه‌های اولیه تیمار شد. همچنین بذور آلوده به ویروس و سالم که تحت تیمار اسید سالیسیلیک قرار نگرفته بودند نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. نمونه‌برداری از برگ گیاهان حاصل از بذوری که تحت تیمار اسید سالیسیلیک قرار گرفته بودند ۲۰ روز پس از تیمار اسید سالیسیلیک انجام گردید (Radwan *et al.*, 2008).

#### سنجش میزان تغییرات شاخص‌های رشدی

**الف: تعیین درصد جوانه‌زنی بذر:** براساس دستورالعمل استاندارد (Jamil *et al.*, 2006)، ۱۲ عدد از بذور لوبیا بعد از پرتودهی با دزهای پایین پرتوی گاما (۱۰، ۲۰ و ۳۰ گری) در سه تکرار، درون تشتک پتری و روی کاغذ صافی خیس شده حاوی ۱۰ میلی لیتر آب قرار گرفته و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس جهت تنش‌نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت بذور شروع به جوانه‌زنی نموده و بعد از چند روز بذور جوانه زده را درون ورمیکولایت گذاشته تا ریشه‌چه و ساقه‌ی آن‌ها رشد بیشتری داشته باشند. با مشاهده روزانه خروج ریشه‌چه و ساقه‌ی بذور، سرعت رشد و درصد جوانه‌زنی تیمارها با هم مقایسه شدند. بذور لوبیای پرتو ندیده نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

**ب: تعیین طول ساقه:** طول هر گیاهچه از محل اتصال ساقه به خاک تا انتهای گیاهچه براساس دستورالعمل استاندارد (Ma *et al.*, 2015) اندازه‌گیری شد.

مولار بورات (pH 8.7) و ۱ میلی لیتر از محلول ۰/۰۲ مولار (L- Phenylalanine) به عنوان سوپسترا تهیه شده در بافر بورات در دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای مدت یک ساعت انکوبه شد. میزان جذب در ۲۹۰ نانومتر قبل و بعد از انکوباسیون محاسبه و میزان فعالیت کمی و اختصاصی آنزیم PAL با تقسیم عدد جذب در واحد زمان بر پروتئین کل بافت اندازه گیری گردید (Kim and Hwang, 2014).

**آنالیز آماری:** طرح آزمایشی به صورت فاکتوریل و با ۱۲ تیمار انجام شد و هر تیمار دارای ۳ تکرار بود. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶،۰۰ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ( $p \leq 0.05$ ) انجام شد.

#### نتیجه و بحث

علیرغم اینکه در چند سال اخیر در خصوص پتانسیل پرتودهی با اشعه گاما به عنوان روشی موفق در ایجاد مقاومت در گیاهان از طریق ایجاد لاین‌های موتانت مقاوم به بیماری‌ها مطالعاتی انجام شده است (Ali *et al.*, 2015)، اما هیچ‌گونه تحقیقی در مورد امکان القای مقاومت در گیاهان با استفاده از دزهای پائین پرتودهی (کمتر از دزهای جهش‌زا) که منجر به فعال شدن مقاومت القایی سیستمیک نسبت به بیمارگرهای گیاهی و یا منجر به کاهش تکثیر بیمارگر می‌گردد، صورت نگرفته است. در این پژوهش تلاش شد تا تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی مرتبط با افزایش میزان تحمل به آلودگی BCMV در گیاه لوبیا پس از تیمار با دزهای پایین تابش گاما به تنهایی و همچنین همراه با تیمارهای اسید سالیسیلیک و یا حرارت غیرمستقیم بررسی شود. نتایج حاصل از این بررسی می‌تواند نقطه عطفی در جهت مبارزه با بیمارگرهای گیاهی از طریق پرتوتابی گاما باشد. نتایج تحقیقات گذشته نشان داده بود که بر خلاف دزهای بالا، دزهای پایین پرتو گاما (پایین‌تر از ۵۰ گری) به‌طور کلی فاقد اثر منفی در میزان قوه نامیه و درصد جوانه زنی بذور و نیز

دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در حجم ۱ میلی لیتر توسط اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-1201) در طول موج ۴۷۰ نانومتر تا ۴۰ ثانیه پس از اضافه شدن سوپسترا اندازه‌گیری شد. گویاکول، در حضور الکترون‌های ناشی از تجزیه  $H_2O_2$  توسط آنزیم پراکسیداز به تتراکوایاکول (Tetra guaiacol) تبدیل شده و منجر به تولید رنگ نارنجی شد (El-Borollosy *et al.*, 2012). میزان فعالیت اختصاصی آنزیم POX بر مبنای کسر حاصل از تقسیم میزان جذب اختصاصی بر واحد زمان بر میزان ۱ میکروگرم از پروتئین کل بافت برگ بر حسب میکروگرم محاسبه شد. سنجش‌های آنزیمی (هر چهار آنزیم مورد سنجش در این پژوهش) برای هر تیمار در سه تکرار و در مرحله گیاهچه انجام شد.

**سنجش میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز (Polyphenol oxidase):** فعالیت کمی و اختصاصی آنزیم PPO در بافت گیاه با استفاده از سوپسترای pyrogallol اندازه‌گیری شد. در این روش فعالیت آنزیم در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در حجم یک میلی لیتر توسط اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-1201) در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت اختصاصی آنزیم بر مبنای کسر حاصل از تقسیم میزان جذب اختصاصی بر واحد زمان بر میزان ۱ میکروگرم از پروتئین کل بافت برگ بر حسب میکروگرم محاسبه شد. سنجش آنزیمی برای هر تیمار در سه تکرار انجام شد (Doğan *et al.*, 2006).

**سنجش میزان فعالیت اختصاصی آنزیم کاتالاز (Catalase):** برای سنجش فعالیت کمی و اختصاصی آنزیم کاتالاز (CAT) میزان ۱۰۰ میکروگرم از عصاره استخراج شده به ۳ میلی لیتر  $H_2O_2$  به‌عنوان سوپسترا افزوده شد و بعد از ۵ دقیقه استراحت در دمای اتاق میزان کاهش جذب در ۲۴۰ نانومتر هر ۲۰ ثانیه اندازه‌گیری شد (۲۰، ۴۰ و ۶۰ ثانیه) (Díaz-Vivancos *et al.*, 2008).

**سنجش میزان فعالیت اختصاصی آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (Phenylalanine ammonia lyase):** میزان ۲۰۰ میکروگرم از پروتئین کل استخراج شده به همراه ۱ میلی لیتر از بافر ۰/۰۱

فعالیت TMV گردید (Kuhn et al., 1968). هونگ و همکاران نشان دادند تابش پرتوی ۴۰ گری پرتو گاما به توتون‌های آلوده به توباموویروس موزاییک خفیف سبز خیار *Cucumber green mild mosaic virus (CGMMV)* می‌تواند موجب کاهش آلودگی در توتون‌های تیمار شده از طریق افزایش توان دفاعی گیاهی شود (Hong et al., 2017).

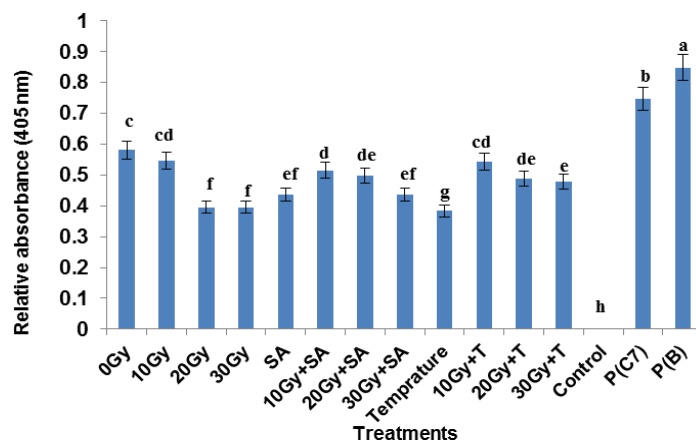
تأثیر دزهای پایین پرتوی گاما به تنهایی و همچنین همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک بر شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های آلوده و عاری از ویروس: براساس جدول شماره ۱، نتایج تأثیر دزهای پایین پرتوی گاما به تنهایی و همچنین همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک روی میزان جوانه‌زنی بذر لوبیا نشان داد که نه تنها هیچ یک از تیمارهای حرارت غیرمستقیم، پرتوی گاما و اسید سالیسیلیک اثر منفی بر درصد جوانه‌زنی لوبیا ندارند بلکه در کلیه تیمارهای آلوده به BCMV افزایش درصد جوانه‌زنی بذور نسبت به نمونه آلوده فاقد تیمار مشاهده گردید و درصد جوانه‌زنی آن‌ها مشابه درصد جوانه‌زنی بذور عاری از ویروس بود. همچنین درصد جوانه‌زنی بذور آلوده به BCMV پس از تیمار با دزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گری تابش گاما بیشتر از بذور عاری از ویروس در دزهای نظیر بود که این مطلب خود به تنهایی گویای تأثیر دزهای مورد بررسی بر کاهش فعالیت و تکثیر ویروس و القای جوانه‌زنی بذور می‌باشد که با نتایج حاصل از تحقیقات پیشین در خصوص تأثیر دزهای پایین پرتو گاما بر روی القای جوانه‌زنی بذور سویا مطابقت دارد (Shahbazi, 2016). در مطالعات قبلی مشخص شده بود که تابش دز ۲۰ گری پرتوی گاما بر روی بذرهای گیاه ذرت با تحریک به تولید آنتی‌اکسیدانت‌ها و همچنین هورمون‌های مختلف و تأثیر در مسیر پیامبری حاصل از آن‌ها و افزایش میزان رونویسی RNA و پروتئین در بذر می‌تواند موجب افزایش نرخ جوانه‌زنی بذور گردد (Marcu et al., 2013). پس از اعمال هر کدام از تیمارهای پرتو گاما، حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک به صورت جداگانه، ۱۰۰ درصد جوانه‌زنی بذور آلوده به ویروس

فاقد قدرت القای جهش در ژنوم لوبیا می‌باشند، لذا محدوده پرتوتابی ۰ تا ۳۰ گری برای انجام تحقیق حاضر انتخاب شد (Shahbazi, 2016).

تأثیر دزهای پایین پرتوی گاما به تنهایی و همچنین همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک در غلظت پروتئین در گیاهچه‌های آلوده به ویروس BCMV: تیمار گیاهچه‌های آلوده لوبیا با دزهای پایین تابش گاما موجب کاهش معنی‌دار میانگین جذب نمونه‌های آلوده در آزمون الایزا شد (شکل ۱). بیشترین تأثیر در دزهای ۲۰ و ۳۰ گری به تنهایی دیده شد که در مقایسه با دز صفر به میزان ۶۵ درصد کاهش میزان میانگین جذب مشاهده شد. تیمار گیاهچه‌ها با اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم به تنهایی و همچنین تیمار با دز ۲۰ گری تابش گاما موجب کاهش معنی‌دار میانگین جذب نمونه‌های آلوده به مفهوم کاهش میزان غلظت BCMV در حد نزدیک به نمونه شاهد عاری از ویروس گردید. میزان جذب نمونه‌های تیمار آلوده در تابش با دز ۲۰ گری به تنهایی بسیار نزدیک به میزان جذب مربوط به نمونه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم به تنهایی در آزمون الایزا بود و میزان جذب نمونه‌های تیمار شده با دز ۳۰ گری تابش گاما همراه با اسید سالیسیلیک بسیار نزدیک به اثر تابش دز ۳۰ گری همراه با حرارت غیرمستقیم بود (شکل ۱). با این حال، میزان جذب الایزا در نمونه‌های تیمار شده با دز ۳۰ گری پرتو گاما همراه با حرارت غیرمستقیم در مقایسه با سایر نمونه‌ها کمی بالاتر بود. نتایج این تحقیق با یافته‌های به‌دست آمده از بررسی کارایی اثر پرتوتابی گاما بر افزایش تحمل گیاهان در برابر عوامل ویروسی در گیاه سیب زمینی که به‌صورت موفقیت‌آمیزی جهت حذف ویروس‌های مهم سیب زمینی به اثبات رسیده بود مطابقت دارد (Emami et al., 2011). همچنین گزارش‌هایی مبنی بر اثر پرتوتابی گاما بر افزایش مقاومت گیاهان در برابر عوامل ویروسی منتشر شده است که نشان می‌دهد پرتوتابی گاما بر سطح برگ‌های گیاه توتون که از قبل با ویروس موزاییک توتون مایه‌زنی شده بودند منجر به کاهش اندازه و تعداد لکه‌های موضعی (Local lesion) حاصل از

آلوده به ویروس نسبت به شاهد در سطح احتمال ۵ درصد گردید. در پژوهشی میزان حساسیت و جوانه زنی چهار رقم زراعی نخود سفید به پرتو گاما در دزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ گری ارزیابی شده و مشاهده گردیده است که درصد جوانه زنی تیمارها با شاهد تفاوتی ندارد اما سرعت جوانه زنی شاهد بیشتر از تیمارهای دیگر بوده، اما درصد جوانه زنی تیمارهای پرتودیده با شاهد در گیاهان آلوده به ویروس تفاوت معنی داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان داده است

مشاهده گردید و در تیمار پرتو گاما همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک در دز ۲۰ گری، ۱۰۰ درصد از بذور آلوده به ویروس جوانه زدند (جدول ۱). تیمارهای اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم در گیاهان آلوده به ویروس تفاوت معنی داری با گیاهان شاهد آلوده به ویروس نداشتند. اما تیمار بذور با پرتو گاما در دز ۲۰ گری در تمام تیمارهای پرتو گاما به صورت جداگانه و نیز همراه با اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم منجر به جوانه زنی ۱۰۰ درصدی بذور



**شکل ۱-** هیستوگرام تأثیر دزهای پایین پرتو گاما به تنهایی و نیز همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک بر غلظت پروتئین های BCMV توسط آزمون الایزای غیرمستقیم (PTA-ELISA). Gy۰: گیاه آلوده به ویروس، عدم تیمار با پرتوی گاما؛ Gy۱۰: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با دز ۱۰ گری پرتو گاما؛ 20Gy: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با دز ۲۰ گری پرتو گاما؛ 30Gy: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با دز ۳۰ گری پرتو گاما؛ SA: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با اسید سالیسیلیک؛ 10Gy+SA: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با دز ۱۰ گری پرتو گاما و اسید سالیسیلیک؛ 20Gy+SA: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با دز ۲۰ گری پرتو گاما و اسید سالیسیلیک؛ 30Gy+SA: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با دز ۳۰ گری پرتو گاما و اسید سالیسیلیک؛ Temperature: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با حرارت غیرمستقیم؛ 10Gy+T: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با دز ۱۰ گری پرتو گاما و حرارت غیرمستقیم؛ 20Gy+T: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با دز ۲۰ گری پرتو گاما و حرارت غیرمستقیم؛ 30Gy+T: گیاه آلوده به ویروس، تیمار شده با دز ۳۰ گری پرتو گاما و حرارت غیرمستقیم؛ Control: شاهد منفی، نمونه عاری از ویروس و عدم تیمار با پرتو گاما؛ P(C7): شاهد مثبت (نمونه ایرانی آلوده به ویروس) و عدم تیمار با پرتو گاما؛ P(B): شاهد مثبت (نمونه متعلق به شرکت Bioreba) و عدم تیمار با پرتو گاما. تیمارهای دارای حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد و تیمارهای دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی دار می باشند.

**Fig. 1.** Histogram for the effect of low doses of gamma irradiation alone or in associated with the indirect temperature and or salicylic acid treatments on BCMV protein concentration obtained by indirect (PTA-ELISA) test, 0Gy: BCMV- infected bean seedling without gamma irradiation; 10Gy: BCMV- infected bean seedling treated with a dose of 10 Gy gamma ray; 20Gy: BCMV- infected bean seedling treated with a dose of 20Gy gamma ray; 30Gy: BCMV- infected seedling treated with a dose of 30Gy gamma ray; Sa: BCMV-infected seedlings treated with just 100 µm of salicylic acid; 10Gy + S: infected seedlings treated with 100 µm of salicylic acid and low dose of 10Gy gamma ray; 20Gy + S: infected plant treated with 20 Gy of gamma ray and 100 µm salicylic acid; 30Gy + S: infected plant treated with 30 Gy of gamma ray and 100 µm salicylic acid; T: BCMV-infect bean treated with just indirect temprature; 10G + T: infected plant treated with 10 Gy of gamma ray and indirect temprature; 20Gy + T: infected plant treated with 20 Gy of ray and indirect temprature; 30Gy + T: infected plant, treated with a dose of 30 Gy of gamma ray and indirect temprature; Control: negative control, virus-free sample without gamma radiation; PC7: positive control (BCMV-infected Iranian bean genotypes other than the Sadri) without gamma radiation; PB: BCMV-positive control material included in the ELISA kit (Bioreba Company). Different letters indicate significant differences between treatments ( $P \leq 0.05$  according to Duncan's new multiple range test).



حرارت غیرمستقیم در گیاهان آلوده تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد (تیمار نشده) آلوده به ویروس نداشت، اما بین گیاهان آلوده به ویروس و عاری از ویروس تفاوت در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. افزایش دز پرتوتابی در تمام گیاهان در سطح احتمال ۵ درصد منجر به افزایش ماده خشک گیاه شد. وزن خشک هم در گیاهان آلوده به ویروس و عاری از ویروس با افزایش دز پرتوتابی از ۱۰ به ۳۰ گرمی افزایش یافت و بیشترین میزان آن در دز ۳۰ گرمی مشاهده گردید (جدول ۱). همچنین نتایج تأثیر دزهای پرتو گاما به صورت جداگانه و همچنین همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک بر محتوای کلروفیل گیاه نشان داد که محتوای کلروفیل  $b$  تفاوت معنی‌داری را در تیمارهای اسید سالیسیلیک و درجه حرارت غیرمستقیم در گیاهان آلوده نسبت به گیاهان شاهد نشان می‌دهد و میزان آن افزایش یافته است. اما کلروفیل  $a$  تفاوتی را نشان نداد. در تمام تیمارها، میزان کلروفیل‌های  $a$  و  $b$  در گیاهان آلوده به ویروس کمتر از کلروفیل  $a$  و  $b$  در گیاهان عاری از ویروس بود (جدول ۱). تحقیقات پیشین نشان داده است که میزان محتوای کلروفیل  $a$  در مرکبات بیشتر از کلروفیل  $b$  در هر دو حالت پرتو دیده (دزهای ۰ تا ۵۰ گرمی) و پرتو ندیده می‌باشد که با نتایج حاضر مطابقت دارد (Ling et al., 2008). در تحقیق وی و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشخص شده است که دزهای پایین پرتو گاما بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و پاسخ‌های زیستی در گیاه آرابیدوپسیس تأثیرگذار است و موجب بهتر شدن آن‌ها می‌شود و اندامک کلروپلاست در مقایسه با سایر اندامک‌های سلول نسبت به پرتو گاما حساس‌تر بوده است، به خصوص غشاءهای تیلاکوئیدها که به شدت متورم شده بودند. پس از تابش گاما، میزان  $H_2O_2$  در تمام بافت‌ها به جز در لپه‌ها نسبت به نمونه شاهد بالاتر بوده است (Wi et al., 2006). در نهایت بهترین و مناسب‌ترین دزهای مؤثر بر خصوصیات مورفولوژیکی در تیمارهای پرتو گاما به صورت جداگانه و نیز همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک، دزهای ۲۰ و ۳۰ گرمی تشخیص داده شدند.

(Naserian et al., 2008). در تحقیقی در گذشته در مورد اثر پرتو گاما بر تغییرات مورفولوژیکی و پاسخ‌های زیستی در گیاه آرابیدوپسیس مشاهده شد که در دزهای پایین با افزایش دز پرتوتابی تفاوتی در درصد جوانه‌زنی بذور وجود نداشته که با نتایج این تحقیق در خصوص گیاهان عاری از ویروس در مقایسه با شاهد مطابقت دارد (Wi et al., 2006).

نتایج تأثیر تابش دزهای پایین پرتو گاما به صورت جداگانه و همچنین همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک بر شاخص طول گیاه نشان داد که نه تنها هیچ یک از تیمارهای حرارت غیرمستقیم، پرتو گاما، و اسید سالیسیلیک اثر منفی بر طول گیاهچه لویا نداشتند، بلکه در تمامی تیمارهای آلوده به ویروس افزایش طول گیاهچه نسبت به شاهد (لویای تیمار نشده) آلوده به ویروس مشاهده شد (جدول ۱). در تمامی تیمارهای آلوده به ویروس با افزایش دز پرتو از ۱۰ به ۳۰ گرمی، طول گیاهچه‌ها نیز افزایش یافت و بیشترین طول گیاهچه‌ها در تیمارهای پرتو گاما به تهایی و نیز همراه با اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم در دز ۳۰ گرمی نسبت به شاهد آلوده به ویروس مشاهده شد. تیمار اسید سالیسیلیک و تیمار حرارت غیرمستقیم در نمونه‌های آلوده به ویروس تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد آلوده به ویروس نداشتند. اما تیمار با پرتو گاما در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که افزایش دز باعث افزایش طول گیاه در تمام تیمارها می‌شود. در مطالعات پیشین به بررسی اثر پرتو گاما بر تغییرات مورفولوژیکی و پاسخ‌های زیستی در گیاه آرابیدوپسیس پرداخته شده و مشاهده کردند که در دزهای پایین گیاهان رشد کمتری نسبت به دزهای بالاتر دارند و با افزایش دز پرتوتابی، طول گیاهچه افزایش می‌یابد که با نتایج ما در هر دو حالت گیاهان آلوده به ویروس و عاری از ویروس مطابقت داشت (Wi et al., 2006).

نتایج تأثیر دزهای پایین پرتو گاما به صورت جداگانه و همچنین همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک بر وزن خشک نشان داد که وزن خشک در تیمار اسید سالیسیلیک و

جدول ۱- تأثیر دزهای پایین پرتو گاما به تنهایی و نیز همراه با حرارت غیرمستقیم و یا اسید سالیسیلیک بر روی شاخص های رشدی در گیاهچه های لوبیای سالم و یا آلوده به BCMV.

**Table 1.** The effect of low doses of gamma irradiation alone or in associated with indirect temperature or salicylic acid on the growth indexes in healthy or BCMV infected bean seedlings.

Treatments	Bean (Seedlings)	Growth factors				
		Plant height (cm)	Dry weight (gram)	Chlorophyll (a)	Chlorophyll (b)	Seed germination (%)
Gamma ray 0 Gy	Healthy	27.60 <sup>a</sup>	4.14 <sup>cb</sup>	7.08 <sup>a</sup>	3.94 <sup>b</sup>	99.58 <sup>a</sup>
	Infected	19.22 <sup>c</sup>	3.12 <sup>d</sup>	6.80 <sup>b</sup>	3.77 <sup>c</sup>	81.25 <sup>d</sup>
Gamma ray 10 Gy	Healthy	21.40 <sup>c</sup>	3.66 <sup>c</sup>	7.03 <sup>b</sup>	4.00 <sup>a</sup>	98.3 <sup>a</sup>
	Infected	16.70 <sup>d</sup>	2.97 <sup>d</sup>	7.01 <sup>b</sup>	3.89 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
Gamma ray 20 Gy	Healthy	24.06 <sup>b</sup>	4.50 <sup>b</sup>	7.10 <sup>ba</sup>	3.94 <sup>ba</sup>	99.66 <sup>a</sup>
	Infected	23.40 <sup>b</sup>	3.39 <sup>c</sup>	7.07 <sup>b</sup>	3.93 <sup>ba</sup>	100 <sup>a</sup>
Gamma ray 30 Gy	Healthy	30.46 <sup>a</sup>	4.92 <sup>a</sup>	7.12 <sup>ba</sup>	3.99 <sup>a</sup>	98.33 <sup>a</sup>
	Infected	26.13 <sup>a</sup>	3.87 <sup>b</sup>	7.10 <sup>ba</sup>	3.94 <sup>a</sup>	99.91 <sup>a</sup>
0 Gy with indirect temperature	Healthy	26.44 <sup>a</sup>	3.92 <sup>b</sup>	7.11 <sup>a</sup>	3.97 <sup>a</sup>	87.16 <sup>c</sup>
	Infected	21.45 <sup>c</sup>	3.27 <sup>c</sup>	6.88 <sup>b</sup>	3.82 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>
10 Gy & indirect temperature	Healthy	24.90 <sup>b</sup>	3.26 <sup>c</sup>	7.10 <sup>a</sup>	3.94 <sup>ab</sup>	90 <sup>b</sup>
	Infected	20.31 <sup>c</sup>	3.29 <sup>b</sup>	7.02 <sup>b</sup>	3.90 <sup>ab</sup>	99.66 <sup>a</sup>
20 Gy & indirect temperature	Healthy	25.40 <sup>ab</sup>	4.35 <sup>b</sup>	7.14 <sup>ba</sup>	3.95 <sup>ab</sup>	99.66 <sup>a</sup>
	Infected	24.80 <sup>b</sup>	3.49 <sup>c</sup>	7.10 <sup>ba</sup>	3.94 <sup>ba</sup>	100 <sup>a</sup>
30 Gy & indirect temperature	Healthy	27.73 <sup>a</sup>	4.97 <sup>a</sup>	7.17 <sup>a</sup>	4.02 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	Infected	28.56 <sup>a</sup>	3.96 <sup>b</sup>	7.17 <sup>a</sup>	3.98 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
0 Gy with salicylic acid	Healthy	28.79 <sup>a</sup>	4.30 <sup>a</sup>	7.28 <sup>a</sup>	4.04 <sup>a</sup>	93.75 <sup>b</sup>
	Infected	20.89 <sup>c</sup>	3.41 <sup>c</sup>	7.21 <sup>a</sup>	4.05 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
10 Gy with salicylic acid	Healthy	33.06 <sup>a</sup>	4.23 <sup>a</sup>	7.24 <sup>a</sup>	4.03 <sup>a</sup>	91.66 <sup>b</sup>
	Infected	21.60 <sup>c</sup>	3.43 <sup>c</sup>	7.16 <sup>a</sup>	4.01 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
20 Gy with salicylic acid	Healthy	34.46 <sup>b</sup>	4.49 <sup>a</sup>	7.46 <sup>b</sup>	4.13 <sup>a</sup>	98.33 <sup>a</sup>
	Infected	28.53 <sup>b</sup>	3.56 <sup>c</sup>	7.36 <sup>b</sup>	4.04 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
30 Gy with salicylic acid	Healthy	35.56 <sup>b</sup>	5.22 <sup>a</sup>	7.39 <sup>c</sup>	4.13 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	Infected	29.10 <sup>a</sup>	4.02 <sup>b</sup>	7.43 <sup>c</sup>	4.02 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها ( $P \leq 0.05$ ) بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن).

Different letters indicate the significant differences between treatments ( $P \leq 0.05$  according to Duncan's new multiple range test).

نمونه های برگگی حاصل از گیاهچه در تیمارهای مختلف، باندهای پروتئینی با وزنهای مولکولی کم در محدوده ۴۵ تا ۶۳ کیلو دالتون دیده شد که در میان سایر باندهای پروتئینی به ویژه در تابش های ۲۰ و ۳۰ گری در گیاه آلوده به ویروس دارای چگالی پروتئینی بالاتری بود و در دز ۱۰ گری و ۳۰ گری در گیاه سالم دارای چگالی پروتئینی بالاتر بود و تابش گاما موجب ایجاد چگالی متفاوت پروتئینی در دزهای مختلف شد (شکل ۲A و ۲D). بررسی اثر دزهای پایین پرتو گاما به تنهایی بیانگر حضور باندهای مختلف با شدت های نوری (غلظت)

تأثیر دزهای پایین پرتوی گاما به تنهایی و نیز همراه با اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم بر چگالی پروتئینی گیاهچه های لوبیای سالم و آلوده به ویروس: نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل چگالی پروتئینی نشان داد که پرتو تابشی گاما بر میزان غلظت و بیان پروتئین کل در گیاهچه های لوبیای سالم و آلوده به ویروس تحت تیمارها مؤثر بوده است (شکل ۲A تا ۲F). با توجه به رانده شدن غلظت یکسان از پروتئین استخراج شده درون تمام چاهک ها، شدت باندهای تشکیل شده در الکتروفورز نمونه ها متفاوت بود. در الگوی پروتئینی مربوط به

متفاوت در وزن‌های مولکولی مختلف و تغییر چگالی پروتئین در دزهای مختلف در مقایسه با دز صفر (تیمار نشده) بود (شکل ۲D). بیشترین شدت باند در محدوده وزنی ۴۵، ۵۴ و ۶۳ کیلو دالتون قرار داشت. در میان دزهای مختلف تابش، بیشترین شدت باند در دز ۳۰ گری مشاهده شد (شکل ۲A و ۲D). میزان شدت باندها در تمام تیمارها بعد از آلودگی به BCMV بیشتر از نمونه‌های سالم بعد از تیمار با دزهای مختلف تابش گاما به صورت جداگانه و نیز همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک بود (شکل ۲A تا ۲F).

تأثیر دزهای پایین پرتو گاما همراه با حرارت غیرمستقیم در برگ گیاهچه‌های لویبای سالم نشان داد که با افزایش دز تابش، شدت باندهای سبک تا ۵۴ کیلودالتون افزایش یافت (شکل ۲B و ۲E) و بالاتر از نمونه شاهد و نمونه‌های تیمار شده با دزهای ۱۰ و ۲۰ گری می‌باشد (شکل ۲B). تابش دزهای پایین پرتو گاما همراه با حرارت غیرمستقیم بر نمونه‌های آلوده لویبای نشان داد که با افزایش دز تابش، شدت برخی از باندهای پروتئینی مانند باند ۵۴ کیلودالتون کاهش یافته است (شکل ۲E).

تأثیر دزهای پایین پرتو گاما همراه با اسید سالیسیلیک در گیاهچه‌های سالم نشان داد که قوی‌ترین باندها در وزن‌های ۴۲، ۵۴ و ۶۳ کیلودالتون و بالاترین شدت و بیشترین چگالی باندهای پروتئینی نیز در دز ۳۰ گری مشاهده شد (شکل ۲C). با افزایش دز تابش، تفاوت معنی‌داری در چگالی باندهای پروتئینی بوجود آمد. دز صفر دارای کمترین شدت باند پروتئینی و دزهای ۲۰ و ۳۰ گری از بیشترین شدت باند پروتئینی برخوردار بود. اما تفاوت معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد سالم فاقد تیمار (شکل ۲A-پرتوی صفر گری) وجود نداشت.

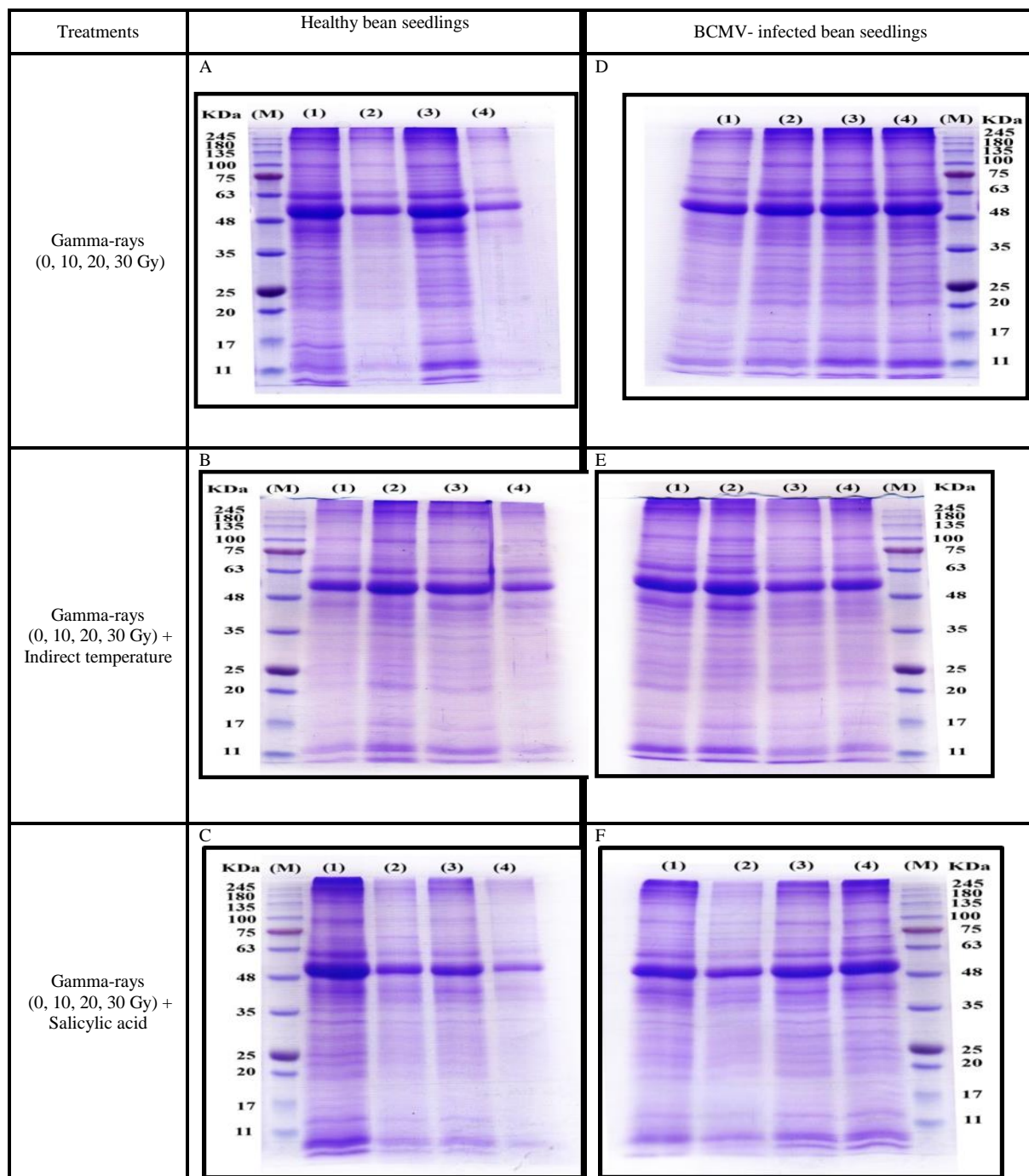
در بذور آلوده به ویروس، تأثیر دزهای پایین پرتو گاما همراه با اسید سالیسیلیک نشان داد که شدت باندهای پروتئینی در دز ۳۰ گری افزایش می‌یابد، اما در دز ۱۰ گری شدت باند پروتئینی کاهش یافت. به طور کلی، در دز ۳۰ گری، بیشترین شدت باندها و بیشترین چگالی باند در نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد.

مطابق با نتایج به دست آمده در این پژوهش، هومرا (Humera, 2006) گزارش کرده است که واکنش گیاهان به تنش اغلب منجر به تغییر در متابولیسم پروتئین‌ها نسبت به شاهد می‌گردد. در دامنه‌ای از شرایط تنش چندین پروتئین سنتز شده و در بافت‌های گیاه تجمع پیدا می‌کنند. چنین پروتئین‌هایی که تحت عنوان پروتئین‌های تنش شناخته می‌شوند، مسئول پاسخ‌های گیاه به شرایط تنش می‌باشند. مهمترین واکنش گیاهان در پاسخ به تنش پرتو گاما، توسعه سیستم‌های دفاعی است. این سیستم با تغییر در الگوی بیان ژن‌ها ایجاد می‌شود و این امر تغییر مسیرهای متابولیک و دفاعی را به همراه دارد. همچنین تعویض الگوی بیان ژن‌ها در اثر پرتو گاما، دگرگونی کیفیت و کمیت پروتئین‌های محلول را به دنبال دارد (Kovacs et al., 2002). در طی تحقیقی تأثیر پرتوتابی در دزهای متوسط (۱-۱۰ کیلوگری) با پرتو گاما بر بذر سویا و تجمع متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی مانند ترکیبات فنلی و تانن و همچنین واکنش‌های بیوشیمیایی مرتبط با آن‌ها مانند پراکسیداسیون لیپیدی، شدت اکسیداسیون پروتئین و میزان پروتئین محلول ارزیابی شده است. با پرتوتابی در دزهای متوسط ترکیبات فنول‌ها و محتویات تانن افزایش یافتند در حالی که شدت اکسیداسیون پروتئین کاهش یافت. اشعه گاما باعث تغییرات ناچیز در پراکسیداسیون لیپید و میزان پروتئین محلول شده در حالی که شدت اکسیداسیون پروتئین به طور قابل توجهی در دز ۱۰ کیلوگری کاهش یافت. به طور کلی پس از استفاده از اشعه گاما ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ثبات پروتئین در بذور سویا افزایش یافته است (Stajner et al., 2007). در تحقیقات اخیر ثابت شده است که تابش دزهای پایین پرتوی گاما در غلات و گیاهان بادنجانیان می‌تواند موجب افزایش میزان محتوای اسید آمینه پرولین شود و پرولین از طریق کاهش رادیکال‌های اکسیژنی و افزایش فعالیت اکسیدانت‌ها می‌تواند موجب افزایش تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی شود (Borzouei et al., 2013).

تأثیر دزهای پایین پرتو گاما همراه با اسید سالیسیلیک در برگ گیاهچه‌های لویبای سالم نشان داد که با افزایش دز تابش، شدت باندهای سبک تا ۵۴ کیلودالتون افزایش یافت (شکل ۲B و ۲E) و بالاتر از نمونه شاهد و نمونه‌های تیمار شده با دزهای ۱۰ و ۲۰ گری می‌باشد (شکل ۲B). تابش دزهای پایین پرتو گاما همراه با حرارت غیرمستقیم بر نمونه‌های آلوده لویبای نشان داد که با افزایش دز تابش، شدت برخی از باندهای پروتئینی مانند باند ۵۴ کیلودالتون کاهش یافته است (شکل ۲E).

تأثیر دزهای پایین پرتو گاما همراه با اسید سالیسیلیک در گیاهچه‌های سالم نشان داد که قوی‌ترین باندها در وزن‌های ۴۲، ۵۴ و ۶۳ کیلودالتون و بالاترین شدت و بیشترین چگالی باندهای پروتئینی نیز در دز ۳۰ گری مشاهده شد (شکل ۲C). با افزایش دز تابش، تفاوت معنی‌داری در چگالی باندهای پروتئینی بوجود آمد. دز صفر دارای کمترین شدت باند پروتئینی و دزهای ۲۰ و ۳۰ گری از بیشترین شدت باند پروتئینی برخوردار بود. اما تفاوت معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد سالم فاقد تیمار (شکل ۲A-پرتوی صفر گری) وجود نداشت.

در بذور آلوده به ویروس، تأثیر دزهای پایین پرتو گاما همراه با اسید سالیسیلیک نشان داد که شدت باندهای پروتئینی در دز ۳۰ گری افزایش می‌یابد، اما در دز ۱۰ گری شدت باند پروتئینی کاهش یافت. به طور کلی، در دز ۳۰ گری، بیشترین شدت باندها و بیشترین چگالی باند در نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد.



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های استخراج شده از برگ گیاهچه‌های لوبیای آلوده و عاری از ویروس. A، B و C: گیاهچه‌های عاری از ویروس؛

۱: ۰، ۲: ۱۰، ۳: ۲۰، ۴: ۳۰ گری؛ D، E و F: گیاهچه‌های آلوده به BCMV: ۱= صفر گری، ۲: ۱۰، ۳: ۲۰، ۴: ۳۰ گری؛

M: مارکر وزن مولکولی ۲۵۰ کیلو دالتون شرکت فرمنتاس آلمان.

**Fig. 2.** Electrophoresis pattern of proteins extracted from the leaves of infected and virus-free bean seedlings, A, B and C: virus free bean seedlings:

1= 30 Gy, 2= 20 Gy, 3= 10 Gy, 4= 0 Gy; D, E and F: BCMV infected bean seedlings: 1= 0 Gy, 2= 10 Gy, 3= 20 Gy, 4= 30 Gy;

M: Molecular weight marker, 250 kDa (Fermantas Inc, Germany).

پرتو گاما دچار تغییر شوند (Turkan et al., 2005; Wi et al., 2007). بررسی الگوی بیان ژن‌های پراکسیداز نیز حاکی از افزایش نسخه برداری از ژن‌های مذکور به محض پرتوتابی با پرتو گاما می‌باشد. این امر علت افزایش تدریجی فعالیت آنزیم به دنبال افزایش دز پرتوتابی را توجیه می‌کند (Rogozhin et al., 2000). همچنین محققین در گذشته گیاهچه‌های پرتقال را در دزهای ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ گری پرتوتابی نموده و تغییرات فیزیولوژیکی آن‌ها را بررسی کردند. مطالعات آن‌ها نشان داد که در دز ۲۰ گری، ۵۰ درصد از گیاهچه‌ها از بین می‌روند. بررسی‌های بیوشیمیایی نشان داد که در دز ۵۰ گری گیاهچه‌ها حاوی بیشترین مقدار پروتئین محلول اند. همچنین فعالیت ویژه پراکسیداز در گیاهچه‌های پرتودیده در دز ۵۰ گری نیز دارای بیشترین فعالیت بودند (Ling et al., 2008). در حال حاضر از تابش‌های با دز پایین گاما برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی استفاده می‌شود و تحقیقات نشان داده است که تابش گاما در دز پایین با افزایش سطح فعالیت اختصاصی آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و کاتالاز این امر را موجب می‌شود (El-Beltagi et al., 2011). نقش آنزیم‌های مذکور در کنار متابولیت‌های ثانویه در افزایش توان دفاعی گیاهان در برابر آلودگی‌های ویروسی به کرات در گذشته تأیید شده است (Hernandez et al., 2015). در مجموع نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که تابش پرتوی گاما در دز ۳۰ گری همراه با اسید سالیسیلیک بر بذور لوبیا رقم صدری علاوه بر کاهش حدود ۵۰ درصدی غلظت BCMV در گیاهچه‌های آلوده موجب افزایش شاخص‌های رشدی و همچنین فعالیت آنزیم‌های تنشی در گیاهچه لوبیا و در نتیجه افزایش میزان تحمل گیاهچه به آلودگی ویروسی می‌شود.

نتایج تحقیق حاکی از تأثیر معنی‌دار دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در سطح احتمال ۵ درصد نسبت به شاهد بود ( $P \leq 0.05$ ). با افزایش دزهای پرتودهی از ۱۰ به ۳۰ گری در گیاهان سالم و از ۱۰ به ۲۰ گری در گیاهان آلوده به ویروس نسبت به شاهد میزان فعالیت

تأثیر دزهای پایین پرتو گاما به صورت جداگانه و همچنین همراه با حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های سالم و آلوده به ویروس: نتایج حاصل از سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز حاکی از تأثیر معنی‌دار دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح احتمال ۵ درصد نسبت به شاهد بود ( $P \leq 0.05$ ). در تمام تیمارها فعالیت اختصاصی آنزیم POX بعد از آلودگی به BCMV کاهش پیدا کرد (جدول ۲). در تیمار تابش گاما به تنهایی با افزایش دزهای پرتودهی از ۱۰ به ۲۰ گری در گیاهچه‌های سالم نسبت به یکدیگر و از دز ۱۰ به ۳۰ گری در گیاهچه‌های آلوده نسبت به یکدیگر میزان فعالیت آنزیم POX افزایش یافت (جدول ۲). نتایج حاصل از اثر دزهای پرتو گاما همراه با تیمارهای اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم نشان داد که پرتودهی در دز ۳۰ گری دارای تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به گیاهان شاهد (نمونه سالم تیمار شده با دز صفر گاما) بود. بیشترین میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز در تیمارهای تابش گاما همراه با اسید سالیسیلیک نسبت به گیاه شاهد فاقد پرتوتابی مشاهده شد که در تابش ۳۰ گری به بیشترین میزان خود رسید (جدول ۲). به طور کلی می‌توان گفت دزهای مختلف پرتوتابی، فعالیت آنزیم مورد بررسی را جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد افزایش داده است که مطابق با گزارشاتی است که نشان می‌دهد پراکسیداز در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش مهمی را در از بین بردن پراکسید هیدروژن در سلول‌ها برعهده دارد (Hodges et al., 1997)، که در نهایت منجر به مقاومت گیاهان در برابر بسیاری از تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شود (Milone et al., 2003). بنابراین اجزای درون سلولی مانند پروتئین‌ها و چربی‌ها را در برابر اکسیداسیون محافظت می‌کند. پراکسیداز جهت یک سری از وظایف درون سلولی مانند لیگنینی شدن، ایجاد بافت چوب پنبه‌ای، طویل شدن سلول‌ها، رشد و تنظیم سنتز دیواره سلولی لازم و ضروری است و کلیه فرایندهای ذکر شده ممکن است در اثر تابش

مانند پراکسیداز و کاتالاز در اثر از بین رفتن گونه‌های فعال اکسیژن به وسیله تنش‌های محیطی و پرتوتابی گاما افزایش می‌یابد (Marwood et al., 1996; Polesskaya et al., 2004; Sgherri et al., 2000). نقش تابش‌های مذکور در افزایش سطح تحمل گیاهان تیمار به آلودگی‌های قارچی و باکتریایی پس از برداشت اثبات شده است (Jeong and Jeong, 2018). آنزیم فنیل آلانین آمونیاپاز (PAL) مسئول سنتز ترکیبات فنلی است و با آمین‌زدائی از اسید آمینه فنیل آلانین آن را به سینامیک اسید تبدیل نموده و با فراهم آوردن زنجیره‌های هیدروکربن حلقه‌ای موجب تولید ترکیبات فنلی ضد بیمارگر در سلول‌ها می‌شود (Bagal et al., 2012). در سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاپاز (PAL) بین تیمارهای پرتوتابی، حرارت غیرمستقیم و اسید سالیسیلیک در دز ۲۰ گری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $P \leq 0.05$ ). میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای پرتودیده بیشتر از تیمار شاهد در هر دو گروه گیاهان لوبیای آلوده به ویروس و سالم بود (جدول ۲). همچنین میزان فعالیت آنزیم در تیمار پرتو گاما همراه با اسید سالیسیلیک بیشتر از تیمار پرتو گاما همراه با حرارت غیرمستقیم بود. در پژوهش‌های قبل تیمار لوبیا چشم بلبلی با اسید سالیسیلیک باعث مقاومت آن‌ها به آلودگی *Rhizoctonia solani* و افزایش بالای فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیاپاز شده است (Chandra et al., 2007). همچنین در پژوهش‌های گذشته نقش اثر القاگرهای مختلف در کنار پرتوتابی در دزهای پایین در القاء مقاومت به آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در گیاهچه گیاهان مختلف زراعی مانند سویا در افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تیمار بررسی شده است و در تمام تحقیق‌ها افزایش فعالیت آنزیم PAL مشخص شده (Chen et al., 2000; Variyar et al., 2006; Nandeeshkumar et al., 2009; El-beltagi, 2004; Umesha, 2006; et al., 2011). با این حال تاکنون تحقیقی در زمینه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه لوبیا و اثر ضد ویروسی آن در برابر ویروس BCMV انجام نشده است.

آنزیم مذکور افزایش یافت (جدول ۲). نتایج حاصل از اثر دزهای پایین پرتو گاما همراه با تیمارهای اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم نشان داد که پرتودهی در دز ۲۰ گری دارای تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نسبت به گیاهان شاهد می‌باشد. فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در دز ۲۰ گری تحت تیمار با اسید سالیسیلیک دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد فاقد پرتوتابی بود. مطابق با نتایج بدست آمده در این پژوهش، گزارش شده است که پرتوتابی در دزهای پایین گاما (۱-۲ کیلوگری) بر روی ریشه برش داده شده چغندر قند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POX)، پلی فنل اکسیداز (PPO)، فنیل آلانین آمونیاپاز (PAL) و افزایش متابولیسم گیاه در پاسخ به استرس اکسیداتیو بوده است (Latorre et al., 2010). تحقیقات نشان داده است که تابش گاما در دزهای پایین باعث افزایش میزان محتوای ترکیبات فنلی بافت‌های میوه در محصولات مختلف زراعی و در نتیجه افزایش سطح فعالیت اختصاصی آنزیم پلی فنل اکسیداز و در نهایت مقاومت گیاهان به بیماری‌های مختلف قارچی و باکتریایی پس از برداشت می‌شود (Jeong and Jeong, 2018).

نتایج این تحقیق حاکی از تأثیر معنی‌دار دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در سطح احتمال ۵ درصد نسبت به شاهد می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ). با افزایش دزهای پرتودهی از ۱۰ به ۳۰ گری در گیاهچه‌های لوبیای سالم و آلوده، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۲). نتایج حاصل از اثر دزهای پایین پرتو گاما همراه با تیمارهای اسید سالیسیلیک و حرارت غیرمستقیم نشان داد که پرتودهی در دز ۲۰ گری اثر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به گیاهان شاهد دارد (جدول ۲). کاتالاز در دز ۲۰ گری تحت تیمار با اسید سالیسیلیک تفاوت معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد فاقد پرتوتابی نشان داد. مطابق با نتایج بدست آمده، شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

استفاده از دزهای پایین پرتوتابی گاما است که ایجاد جهش در ژنوم نمی‌کنند و با مکانیسم القای مقاومت سیستمیک گیاهی قادرند تغییرات قابل توجهی را در روند رشد گیاه ایجاد نمایند. چنین تیمارهایی که با نام عمومی پرایمینگ شناخته می‌شوند در حوزه بیماری‌های گیاهی نیز می‌تواند کاربرد داشته باشند.

با توجه به درصد بالای بذرزادی بیماری حاصل از ویروس موزایک معمولی در لوبیا، در این پژوهش برای اولین بار از استراتژی القای مقاومت در ارقام موجود لوبیا با

در دهه اخیر با توسعه پژوهش‌ها در زمینه استفاده از فناوری هسته‌ای در کشاورزی کشور، پژوهش‌های کاربردی در این خصوص به ویژه پرتوهای یونیزان برای ارایه راهکار جدید جهت حل مشکلات حوزه کشاورزی، توسعه چشمگیری یافته است. در حال حاضر موتاسیون بریدینگ که روش ایجاد جهش‌های برگشت ناپذیر تصادفی در ژنوم گیاهی است به همراه روش‌های اصلاح نژاد کلاسیک از شناخته شده‌ترین روش‌های موجود در تولید ارقام جدید گیاهان زراعی مقاوم به بیماری‌های گیاهی در کشور می‌باشند. اما راهکار دیگر،

جدول ۲- تأثیر دزهای پایین پرتو گاما به تنهایی و نیز همراه با حرارت غیرمستقیم و یا اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

در گیاهچه‌های لوبیای سالم و یا آلوده به BCMV

Table 2. The effect of low doses of gamma irradiation alone or in associated with the indirect temperature or salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes in healthy or BCMV infected bean seedlings

Treatments	Bean seedlings	Antioxidant Enzymes Specific Activity (change in absorbance/min/μg leaf protein)			
		Peroxidase	Polyphenol oxidase	Catalase	Phenylalanine ammonia lyase
Gamma ray 0 Gy	Healthy	3.56 <sup>d</sup>	3.23 <sup>f</sup>	11.57 <sup>f</sup>	0 <sup>e</sup>
	Infected	5.13 <sup>cd</sup>	2.46 <sup>f</sup>	13.15 <sup>fe</sup>	0.02 <sup>d</sup>
Gamma ray 10 Gy	Healthy	6.72 <sup>b</sup>	9.24 <sup>b</sup>	16.45 <sup>d</sup>	0.05 <sup>b</sup>
	Infected	4.93 <sup>d</sup>	3.58 <sup>f</sup>	14.31 <sup>e</sup>	0.03 <sup>cb</sup>
Gamma ray 20 Gy	Healthy	6.85 <sup>b</sup>	9.37 <sup>b</sup>	25.21 <sup>b</sup>	0.06 <sup>b</sup>
	Infected	4.31 <sup>d</sup>	5.75 <sup>e</sup>	17.40 <sup>d</sup>	0.13 <sup>a</sup>
Gamma ray 30 Gy	Healthy	6.41 <sup>b</sup>	10.53 <sup>a</sup>	16.65 <sup>d</sup>	0.03 <sup>cb</sup>
	Infected	5.61 <sup>c</sup>	5.25 <sup>e</sup>	17.42 <sup>d</sup>	0.03 <sup>cb</sup>
0 Gy with indirect temprature	Healthy	6.80 <sup>b</sup>	10.77 <sup>a</sup>	23.27 <sup>b</sup>	0.07 <sup>b</sup>
	Infected	4.36 <sup>d</sup>	5.22 <sup>e</sup>	23.05 <sup>b</sup>	0.02 <sup>d</sup>
10 Gy with indirect temperature	Healthy	7.01 <sup>b</sup>	9.17 <sup>cb</sup>	10.32 <sup>e</sup>	0.03 <sup>cb</sup>
	Infected	4.89 <sup>d</sup>	5.44 <sup>c</sup>	25.90 <sup>b</sup>	0.01 <sup>d</sup>
20 Gy with indirect temperature	Healthy	6.82 <sup>b</sup>	9.88 <sup>b</sup>	20.53 <sup>c</sup>	0.07 <sup>b</sup>
	Infected	4.45 <sup>d</sup>	5.85 <sup>c</sup>	5.53 <sup>h</sup>	0.03 <sup>cb</sup>
30 Gy with indirect temperature	Healthy	6.01 <sup>cb</sup>	8.93 <sup>c</sup>	13.95 <sup>fe</sup>	0.04 <sup>bc</sup>
	Infected	6.28 <sup>cb</sup>	5.74 <sup>c</sup>	12.48 <sup>f</sup>	0.02 <sup>d</sup>
0 Gy with salicylic acid	Healthy	8.54 <sup>a</sup>	9.95 <sup>b</sup>	15.80 <sup>ed</sup>	0.02 <sup>d</sup>
	Infected	6.89 <sup>b</sup>	6.59 <sup>d</sup>	26.60 <sup>a</sup>	0.01 <sup>d</sup>
10 Gy with salicylic acid	Healthy	10.48 <sup>a</sup>	17.02 <sup>a</sup>	22.85 <sup>cb</sup>	0.14 <sup>a</sup>
	Infected	4.07 <sup>d</sup>	8.72 <sup>c</sup>	41.32 <sup>a</sup>	0.05 <sup>b</sup>
20 Gy with salicylic acid	Healthy	8.01 <sup>a</sup>	12.07 <sup>a</sup>	14.12 <sup>c</sup>	0.17 <sup>a</sup>
	Infected	9.06 <sup>a</sup>	6.42 <sup>d</sup>	17.17 <sup>h</sup>	0.01 <sup>d</sup>
30 Gy with salicylic acid	Healthy	8.27 <sup>cd</sup>	9.14 <sup>cb</sup>	17.13 <sup>d</sup>	0.12 <sup>a</sup>
	Infected	9.55 <sup>b</sup>	6.01 <sup>ed</sup>	19.05 <sup>e</sup>	0.01 <sup>d</sup>

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها ( $P \leq 0.05$ ) بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

Different letters indicate the significant differences between treatments ( $P \leq 0.05$  according to Duncan's new multiple range test).

اقتصادی قابل توجهی از مزرعه در صورت وجود درصد قابل توجه از آلودگی بذرزاد و ویروسی در زراعت گیاه لوبیا منجر شود.

#### سپاسگزاری

این مقاله از اعتبارات پروژه "تولید مواد بیولوژیک به منظور کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی خاکزاد، فاز دوم PRC-A3-96002" انجام شده است و نویسندگان از همکاری آقای مهندس هادی فتح‌اللهی در پرتوتایی و دزیابی گیاهچه‌ها و سایر همکارانی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

#### References

- ALİ, H., Z. GHORI, S. SHEIKH, and A. GUL, 2015. Effects of Gamma Radiation on Crop Production. In: Hakeem K. (eds) Crop Production and Global Environmental Issues, Springer, Cham.
- ARIE, T., H. TAKAHASHI, M. KODAMA, and T. TERAOKA, 2007. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*, 24:135-147.
- ANONYMOUS, 2017. Production and yield per hectare of bean crop by province. Agricultural Statistics of the Crop Year 2014-2015. Department of Statistics and Information of Ministry of Agriculture Jihad, 117 pages
- ARNON, A. N. 1987. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23: 112-121.
- BAGAL, U. R., J. H. LEEBENS MACK, W. WALTER LORENZ, and J. F. D. DEAN, 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age. *BMC Genoms*, 13: 1471-2164.
- BORZOUËI, A., M. KAFI, R. SAYAHI, E. RABIEI, and P. S. AMIN, 2013. Biochemical response of two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) to gamma radiation. *Pakistanian Journal of Botany*, 45: 473-477.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dyebinding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- CHAKRAVARTY, B. and S. SEN, 2001. Enhancement of regeneration potential and variability by  $\gamma$ -irradiation in cultured cells of *Scilla indica*. *Biologia Plantarum*, 44: 189-193.
- CHANDRA, A., R. SAXENA, A. DUBEY, and P. SAXENA, 2007. Change in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhance resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 361-367.
- CHEN, C., R. R. BELANGER, N. BENHAMOU, and T. C. PAULITZ, 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56: 13-23.
- DIAZ-VIVANCOS, P., M. J. CLEMENTE-MORENO, M. RUBIO, E. OLMOS, J. A. GARCIA, P. MARTINEZ-GOMEZ, and J. A. HERNANDEZ, 2008. Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to *Plum pox virus*. *Journal of Experimental Botany*, 59(8): 2147-2160.
- استفاده از دزهای پایین پرتوگاما استفاده شد. در مجموع نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از دزهای پایین پرتوتایی (۲۰ و ۳۰ گری) در ادغام با تیمار اسید سالیسیلیک (غلظت ۱۰۰ میکرومولار) قادر است بدون مخاطرات احتمالی زیست محیطی (بدون باقیمانده در گیاه و محیط) بیان پروتئین‌های مربوط به مکانیسم‌های مقاومت را در گیاه به طور عمومی القا نماید و به افزایش قدرت رشد گیاه در شرایط آلودگی بذرزاد منجر شود و جلوی خسارت اقتصادی را بگیرد. همچنین در صورت تلفیق با سایر روش‌های معمول مانند مبارزه با ناقلین بی مهره این روش می‌تواند به برداشت



- DOGAN, S., P. TURAN, and M. DOGAN, 2006. Some kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymbra spicata* L. var. *spicata*. *Process Biochemistry*, 41(12): 2379-2385.
- DORRI, H.R., A. A. GHANBARI, M. R. LAK, and M. BANI JAMALI, 2008. Guide Bean (Plantation, Cultivation, Harvesting). Educational Technology Services Bureau, Iran (In Farsi).
- EL-BELTAGI, H., O. K. AHMED, and W. EL-DESOUKY, 2011. Effect of low dose gamma radiation on oxidative stress and secondary metabolites production of resmary (*Rosmarinum officinalis* L.) callus culture. *Radiation Physics and chemistry*, 80: 968-976.
- EL-BOROLLOS, A. M. and M. M. ORABY, 2012. Induced systemic resistance against *Cucumber mosaic cucumovirus* and promotion of cucumber growth by some plant growth-promoting rhizobacteria. *Annals of Agricultural Science*, 57: 91-97.
- EMAMI, D., J. MEYBODI, and N. MOZAFARI, 2011. Application of electrotherapy for elimination of potato potyviruses, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13: 921-927.
- FAO STAT, 2016. National Agricultural statistics Service, USDA. <http://www.faostat.fao.org>.
- GONZALEZ, I., L. MARTINEZ, D. RAKITINA, M.G. LEWSEY, F.A. ATIENZO, C. LIAVE, N. KALININA, J.P. CARR, P. PALUKAITIS, and T. CANTO, 2010. Cucumber Mosaic Virus 2b Protein Subcellular Targets and Interactions: Their Significance to its RNA Silencing Suppressor Activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23: 294-303.
- HERNANDEZ, J. A., G. GABOR, M. J. Clemente-Moreno, K. ANDRAS, J. CSILLA, and K. LORANT. 2016. Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94: 134-148.
- HODGES, M. D., J. M. DE LONG, C. F. FORNEY, and R. K. PRANGE, 1997. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds, *Planta*, 207: 604-611.
- HONG, J. S., M. A. JEONG, and R. D. JEONG, 2017. Inhibitory effect of gamma irradiation against *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Plant Protection Science*, 53: 201-207.
- HORMOZI-NEJAD, M. H., J. MOZAFARI, and F. RAKHSHANDEHROO, 2010. Elimination of *Bean common mosaic virus* using an electrotherapy technique. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117: 201-205.
- HUMERA, A. 2006. Biochemical and molecular markers of somaclonal variants and induced mutants of potato (*Solanum tuberosum* L.). PhD Thesis, University of the Punjab Lahore, Pakistan.
- JAMIL, M., L. DEOGBAE, J. KWANG YONG, M. ASHRAF, L. SHEONG CHUN, R. EUI SHIK, 2006. Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. *Journal of Central European Agriculture*, 7(2): 273-282.
- JEONG, R. D., E. J. SHIN, E. H. CHU, and H. J. PARK, 2015. Effects of Ionizing Radiation on Postharvest Fungal Pathogens. *The Plant Pathology Journal*, 31: 176-180.
- JEONG, M. A. and R. D. JEONG, 2018. Applications of ionizing radiation for the control of postharvest diseases in fresh produce: recent advances. *Plant Pathology*, 67: 18-29.
- KIM, D.S., B. K. HWANG, 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 65: 2295-2306.
- KOVACS, E. and A. KERESZTES, 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cell. *Micron*, 33: 199-210.
- KUHN, C. W. and H. J. TEAS, 1968. Increased resistance to *tobacco mosaic virus* in gamma irradiated tobacco leaves. *Radiation Botany*, 317-318.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

- LATORRE, M. E., P. NARVAIZ, A. M. ROJAS, and L. N. GERSCHENSON, 2010. Effects of gamma irradiation on bio-chemical and physico-chemical parameters of fresh-cut red Beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) root. *Journal of Food Engineering*, 98: 178-191.
- LING, A. P. K., J. Y. CHIA, S. HUSSEIN, and A. R. HARUN, 2008. Physiological responses of *Citrus sinensis* to gamma irradiation. *World Applied Sciences Journal*, 5: 12-19.
- LOAKE, G., and M. GRANT, 2007. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 466-472.
- LOMMEL, S. A., A. H. MCCAIN, and T. J. MORRIS, 1982. Evaluation of indirect enzyme linked immunoabsorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology*, 72: 1018-1022.
- MA, X., L. SONG, W. YU, Y. HU, Y. LIU, J. WU, Y. YING. 2015. Growth, physiological, and biochemical responses of *Camptotheca acuminata* seedlings to different light environments. *Frontiers in Plant Science*, 6: 321.
- MAZANDARANI, M. T., E. BEYZAIE, H. R. DORRI, A. A. GHANBARI, P. SALEHI, G. TAHERIYOON, R. MOHAMMADKHANI, N. SHAHRAEEN, and A. H. MEHRABAN, 2010. Shokoufa, a new high yielding white bean cultivar for cultivation in temperate and cold areas of Iran. *Seed and Plant Improvement Journal*, 26(1): 141-143.
- MAZANDARANI, M. T., E. BEYZAIE, H. R. DORRI, A. A. GHANBARI, P. SALEHI, G. TAHERIYOON, R. MOHAMMADKHANI, N. SHAHRAEEN, and A. H. MEHRABAN, 2010. Pak, a new high yielding white bean cultivar for cultivation in temperate and cold areas of Iran. *Seed and Plant Improvement Journal*, 26(1): 145-147.
- MARCU, D., V. CRISTEA, and L. DARBAN, 2013. Dose-dependent effects of gamma radiation on lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*) seedlings. *International Journal of Radiation Biology*, 89: 219-223.
- MARWOOD, C. A. and B. M. GREENBERG, 1996. Effect of supplementary gamma irradiation on chlorophyll synthesis and accumulation of photosystems during chloroplast development in *Spirodela oligorrhiza*. *Photochem*, 64: 664- 670.
- MILONE, M. A., C. SGHERRI, H. CLIJSTERS, and F. NAVARI-IZZO, 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 50: 265-274.
- MOUSAVI SHELMANI, M. A., B. NASERIAN KHEABANI, H. AHARI MOSTAFAVI, M. HEIDARIEH, and A. MAJD ABADI, 2010. Nuclear Agriculture. Nuclear Sciences and Technology Research Institute Press, Tehran, Iran.
- NADERPUR, M., GH. MOSAHEBI MOHAMMADI, and M. KOHI, 2000. Pathotype of Vta III, Vib and necrotic strains NL-3, NL- 8, NL-5, and virus BCMNV new report on Iran. The Proceeding of 14<sup>th</sup> Plant Protection Congress, Isfahan, Iran.
- NANDEESHKUMAR, P., B. SAROSH, K. R. KINI, H. PRAKASH, and H. S. SHETTY, 2009. Elicitation of resistance and defense related proteins by  $\beta$ -amino butyric acid in sunflower against downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42: 1020-1032.
- NASERIAN, K., M. AHARI, H. FATHOLLAHI, S. VEDADI, and S. MOSAVI, 2008. Suitable gamma ray dose determination in order to induce genetic variation in kaboli chickpea (*Cicer Arietinum* L). *Journal of Nuclear Science and Technology*, pp. 19-25.
- PEYAMBARI, M., M. KOOHI HABIBI, GH. MOSAHEBI, and K. IZADPANA, 2011. Study of bean common mosaic virus (BCMV) in several provinces and reaction of three bean genotypes to BCMV infection. *Journal of Plant Protection*, 25: 250-257.
- PIRI, I., M. BABAYAN, A. TAVASSOLI, and M. JAVAHERI, 2011. The use of gamma irradiation in agriculture. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (32): 5806-5811.

- POLESSKAYA, O. G., E. I. KASHIRINA, and N. D. ALEKHINA, 2004. Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51: 615-620.
- PREDMORE, A., G. C. SANGLAY, E. DICAPRIO, J. LI, R. M. URIBE, and K. LEE, 2015. *International Journal of Food Microbiology*, 198: 28-36.
- RADWAN, D. E., G. LU, K. A. FAYEZ, and S.Y. MAHMOUD, 2008. Protective action of salicylic acid against *bean yellow mosaic virus* infection in *Vicia faba* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165: 845-857.
- REDDICK, D. and U. B. STEWARD, 1918. Varieties of bean susceptible to mosaic. *Phytopathology*, 8:530-534.
- ROGOZHIN, V. V., T.T. KURILIUK, and N. P. FILIPPOVA, 2000. Change in the reaction of the antioxidant system of wheat sprouts after UV-irradiation of seeds. *Biofizika*, 45: 730-736.
- SALARI, N., M. SEYYED MUSAVI, N. SHAHRAEEN, SH. GHORBANI, and M. MALEKI, 2013. Identification and diagnosis of isolates of *bean common mosaic virus* and *bean common mosaic necrosis virus* by immunocapture RT-PCR. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 3(11): 21-28.
- SGHERRI, C. L. M., M. MAFFEI, and F. NAVARI-IZZO, 2000. Antioxidant enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. *Journal of Plant Physiology*, 157: 273-279.
- SHAHBAZI, S. 2016. Increasing the tolerance of sugar beet and soybean seedlings to *Rhizoctonia solani* contamination by irradiation of seeds with gamma rays in order to reduce seedling death. Project Code: PRN-A3-95-003.
- SMOLKO, E. E. and J. H. LOMBARDO, 2005. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 236: 249-253.
- STAJNER, D., M. MILOSEVIC, and B. M. POPOVIC, 2007. Irradiation effects on phenolic content, lipid and protein oxidation and scavenger ability of Soybean seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 618-627.
- STRAUSBAUGH, C. A., P. N. MIKLAS, S. P. SINGH, J. R. MYERS, and R. L. FORSTER, 2003. Genetic characterization of differential reaction among host group 3 common bean cultivars to NL-3 k strain of *Bean common mosaic necrosis virus*. *Phytopathology*, 93:683-690.
- TURKAN, I., M. BOR, F. OZDEMIR, and H. KOCA, 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought - tolerant *P. acutifolius* gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168: 223-231.
- UMESHA, S. 2006. Note: Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica*, 34: 68-71.
- VARIYAR, P. S., A. LIMAYE, and A. SHARMA, 2004. Radiation-induced enhancement of antioxidant contents of soybean (*Glycine max* Merrill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3385-3388.
- WI, S. G., B. Y. CHUNG, J. S. KIM, J. H. KIM, M. H. BAEK, and J. W. LEE, 2006. Localization of hydrogen peroxide in pumpkin (*Cucurbita ficifolia* bouché) seedlings exposed to high-dose gamma ray. *Journal of Plant Biology*, 49: 1-8.
- WI, S. G., B. Y. CHUNG, and J. S. KIM. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron*, 38: 553-564.
- ZHENG, T., A. M. NAPIER, J. P. PARKES, J. S. O'KEEFE, and P. H. ATKINSON, 2002. Detection of RNA of rabbit haemorrhagic disease virus from New Zealand wild rabbits. *Wildlife Research*, 29: 683 - 688.