



بررسی تیمار سدیم‌نیتروپروپوساید بر بیان برخی از ژن‌های دفاعی و پاسخ‌های فیزیولوژیکی در کدوی آلوده به

ویروس موزائیک خیار

مهرداد صالح‌زاده^۱، سعیده دهقانپور فراشاه^{۲*}، محمدباقر حسنپور اقدم^۳

چکیده

مقدمه

ویروس موزائیک خیار با عامل *Cucumber mosaic virus (CMV)* از بیماری‌های مهم خیار و بسیاری از محصولات دیگر به‌شمار می‌رود که در سراسر جهان از جمله ایران سالانه میزان زیادی خسارت وارد می‌کند. در سال‌های اخیر کاربرد القاء‌کننده‌های دفاعی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. لذا در پژوهش حاضر به منظور بررسی نقش سدیم‌نیتروپروپوساید (SNP) به‌عنوان یک محرک زیستی ترکیبات دفاعی، کدو به‌عنوان یک رقم حساس به ویروس موزائیک خیار انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

گیاهان در مرحله دوبرگی کامل به‌وسیله *CMV* با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مایه‌زنی و سپس ۴۸ ساعت بعد گیاهان آلوده به *CMV* با SNP در سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسپری شدند. در نهایت میزان بیان ژن پروتئین پوششی و رپلیکاز ویروس، الگوی تظاهر ژن‌های دفاعی *PAL*، *GPXI*، *LOXI*، *Pr1* و *Pr3* و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی کدو در سه تکرار از هفته‌ی اول تا سوم مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که در گیاهان تیمار شده با SNP روند تظاهر و بیان برخی از ژن‌های دفاعی مورد بررسی پس از تیمار *CMV* افزایش یافت، به‌طوریکه گیاهان آلوده به ویروس و سپس تیمار شده با SNP به‌صورت وابسته به غلظت اغلب تا هفته‌ی سوم نسبت به گیاهان شاهد (تلقیح‌شده فقط با *CMV*) افزایش بیان نشان دادند و به حداکثر بیان خود رسیدند. علاوه بر این برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی مورد مطالعه در کدوی آلوده به ویروس و تیمار شده با SNP نیز بهبود یافتند. لذا می‌توان کاربرد SNP را به‌خصوص در میزان القاء مقاومت سیستمیک در کدو علیه *CMV* موثر دانست.

واژه‌های کلیدی: القاء‌کننده‌های دفاعی، مقاومت، ویژگی‌های فیزیولوژیکی.

^۱دانشجو دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

^۲استادیار گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران (* نویسنده‌ی مسئول: sdfarashah@pnu.ac.ir)

^۳دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.

مقدمه

باتوجه به اهمیت سبزی‌ها و مصارف متعدد آن‌ها در تغذیه انسان، بررسی خسارت ناشی از ویروس‌ها در سبزیجات و نیز بررسی وضعیت شیوع بیماری‌های ویروسی مربوط به آن‌ها از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. سبزیجات از جمله گیاهان حساس به ویروس‌ها به‌شمار می‌روند که مورد حمله ویروس‌های متنوع گیاهی قرار می‌گیرند. یکی از مهمترین ویروس‌های آلوده‌کننده کدو و بسیاری از گیاهان جالیزی و زراعی در ایران و دنیا ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*) می‌باشد و سالیانه خسارت اقتصادی عمده‌ای روی کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی وارد می‌کند (Salehzadeh, 2018). CMV پراکندگی جهانی داشته و وسیع‌ترین دامنه میزبانی را در بین ویروس‌های گیاهی دارد، به‌طوری‌که طیف وسیعی از گیاهان زراعی، باغی و زینتی را آلوده می‌کند. تعداد گونه‌های میزبان CMV بیش از ۱۳۰۰ گونه گیاهی در بیش از ۱۰۰ خانواده از تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها شامل اکثر سبزیجات، گیاهان زینتی و گیاهان چوبی و نیمه‌چوبی بیان شده است. ویروس موزائیک خیار علائم متنوعی را در میزبان‌های مختلف بروز می‌دهد و منجر به آلودگی سیستمیک در اکثر میزبان‌های گیاهی می‌شود اما ممکن است در تعدادی از محصولات از جمله یونجه بدون علائم باشد. اغلب کدوئیان به CMV حساس هستند (Sofy et al., 2020).

کنترل آفات و بیماری‌ها در کشاورزی اغلب به آفت‌کش‌ها و کودهای شیمیایی متکی است که بر میکروفلور طبیعی ریزوسفر و تعادل اکوسیستم تأثیر منفی می‌گذارند. امروزه، محققان به دنبال جایگزین کردن این مواد شیمیایی با سایر عوامل سازگار با محیط‌زیست برای بهبود تولید محصولات کشاورزی و کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند. نیتریک‌اکسید، رادیکال آزاد گازی است که به سه شکل رادیکال نیتریک‌اکسید (NO)، کاتیون نیتروزونیوم (NO⁺) و آنیون نیتروکسیل (NO⁻) دیده می‌شود (Hayat et al., 2009). مولکول دواتمی NO، دارای قابلیت انتشار بالایی بوده و آب‌دوست می‌باشد. بنابراین، این مولکول نه تنها در قسمت‌های آب‌دوست سلول، نظیر سیتوپلاسم انتشار می‌یابد، بلکه می‌تواند از بخش لیپیدی غشاء سلولی به صورت آزاد نیز نفوذ کند. آنزیم‌های نیتریک‌اکسیدسنتاز، آرژیناز و آرژینین‌دکربوکسلاز سه مسیر اصلی متابولیسم آرژینین را کاتالیز می‌کنند. آنزیم نیتریک‌اکسیدسنتاز، آرژینین را به نیتریک‌اکسید و سیتروپین هیدرولیز می‌نماید درحالی‌که محصولات اصلی مسیرهای وابسته به آرژیناز و آرژینین‌دکربوکسیلاز، ترکیبات پلی‌آمین و پرولین هستند. این مولکول در بخش‌ها و اندامک‌های مختلف سلول‌های گیاهی نظیر سیتوزول، کلروپلاست، پراکسی‌زوم، میتوکندری، غشای سیتوپلاسمی و هسته تولید می‌شود (Mur et al., 2013; Gill et al., 2013). محققان به دنبال استفاده از مواد بیولوژیک به‌عنوان یکی از استراتژی‌های مقاومتی در گیاهان هستند تا با کاربرد این ترکیبات بتوانند مکانیزم‌های دفاعی گیاه را قبل و هنگام مواجهه با عامل بیمارگر فعال کنند (Alcázar et al., 2010). در سال‌های اخیر کاربرد ترکیبات شیمیایی تحت عنوان فعال‌کننده سیستم دفاعی و بهبود ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه به مقدار زیادی مورد توجه قرار گرفته است و در این بین فیتومتابولیت‌ها

در کانون اصلی تحقیقات قرار دارند. در سال‌های اخیر برخی مطالعات در رابطه با نقش NO در سیستم دفاعی گیاه انجام شده است. NO یک فعال‌کننده زیستی تجزیه‌پذیر و مشتق‌شده از فیتومتابولیت‌ها است که امروزه به‌عنوان ماده افزایش‌دهنده قدرت دفاعی گیاهان علیه بیمارگرها و تنش‌های غیرزیستی به‌کار می‌رود (Arasimowicz-Jelonek & Floryszak-Wieczorek, 2016). برهمکنش بین گیاه، ویروس و نیتریک اکسید مورد بررسی دقیق جامع قرار نگرفته است. در این مطالعه، پتانسیل ضدویروسی سدیم نیترو پروساید (SNP)، به‌عنوان یک ترکیب رهاکننده NO در غلظت‌های مختلف روی ویژگی‌های فیزیولوژیکی بوته‌های کدو مورد بررسی قرار گرفته است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بی‌درنگ (Real time PCR) تاثیر این ترکیبات روی تکثیر و مونتاژ CMV و بیان برخی از ژن‌های دفاعی در کدو را نشان خواهد داد. تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده از برهمکنش‌های دفاعی و بیوشیمیایی گیاه، ویروس و SNP اطلاعات مفیدی از تاثیر این تیمار روی گیاهان کدوی آلوده به ویروس در اختیار گذاشته و بررسی میزان بیان ژن‌های دفاعی کدو راهنمای مناسبی برای تولید گیاهان تراژن با ژن‌های دفاعی مطلوب در برابر CMV خواهد بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش، اعمال تیمارها و اندازه‌گیری شدت بیماری

به‌منظور بررسی اثر تیمار NO، ترکیب SNP (شرکت سیگما-آلد ریچ آمریکا تحت لیسانس مرک آلمان) بر بیان ژن‌های دفاعی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی خیار آلوده به CMV در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. ابتدا بستر کشت برای کاشت بذرها کدو آماده و خاک قابل کشت به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس تحت فشار ۱/۵ اتمسفر ضدعفونی شد و به لیوان‌های کاغذی انتقال یافت. سپس بذرها کدو پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و آبکشی، کشت شدند. حدود ۴ هفته پس از کشت، نشاها به گلدان‌های اصلی در جعبه‌های شیشه‌ای جهت ممانعت از ورود حشرات ناقل منتقل شدند. در مرحله‌ی ۲ برگی کامل بوته‌های کدو با ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر CMV خالص‌سازی و با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌صورت مکانیکی توسط پودر کاربوراندوم مایه‌زنی شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت تیمار با SNP در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. جهت بررسی علائم ظاهری بیماری در گیاهان تیمار شده، ۱۵ روز پس از اعمال تیمارها شدت علائم اندازه‌گیری شد. شدت علائم به‌صورت درصدی از برگ‌های بیمار بیان گردید (Sudhakar et al., 2006). در این روش، براساس شدت بیماری و علائم برگ‌های ناشی از آن، کدهایی به‌صورت اعداد ۰-۵ در نظر گرفته شد، به‌طوری‌که عدد ۰ برگ‌های کدوی فاقد علائم ویروسی و اعداد بالاتر بیانگر افزایش شدت علائم ویروس روی برگ را نشان می‌دادند. سپس با فرمول زیر شدت بیماری (DS) محاسبه شد (Sriram et al.,

$$DS = \frac{\text{کد بسیاری هر برگه} \times \text{مجموع تعداد نمونه برگه}}{\text{تعداد نمونه‌های برگه} \times \text{حداکثر کد بسیاری مشاهده شده طی آزمایش}}$$

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های دفاعی و شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نمونه‌برداری از برگ‌های بالایی بوته (تیمارشده) در زمان‌های ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه‌زنی (dpi) انجام گرفت.

استخراج RNA و ساخت cDNA

برای استخراج RNA کل از نمونه‌های برگه، از کیت ترایزول شرکت سیناژن استفاده گردید. کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ (Thermoscintific, 2000) ارزیابی شد. RNA استخراج‌شده با آنزیم DNase I (-RNase free, Fermentase) تیمار و به‌عنوان الگوی واکنش RT-PCR قرار گرفت. پس از یکسان‌سازی غلظت نمونه‌های RNA، cDNA مربوطه هر نمونه با استفاده از کیت سنتز cDNA (دنازیست) با استفاده از آغازگرهای عمومی (جدول-۱) (Random hexamer) طبق دستورالعمل کیت ساخته شد.

اندازه‌گیری بیان ژن

بررسی بیان ژن با استفاده از دستگاه Real time PCR مدل Right cycler 96 Roche انجام شد. هر واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر محلول سایبرگرین، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر رفت (Forward primers) و آغازگر برگشت (Reverse primers)، ۵۰ نانوگرم cDNA الگوی رقیق‌شده و آب عاری از نوکلئاز بود. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول-۱ آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله‌ی واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سلسیوس و سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سلسیوس و یک دقیقه در ۶۰ درجه‌ی سلسیوس) بود. پس از پایان واکنش PCR رسم منحنی ذوب واکنش در دمای ۹۵-۶۰ درجه‌ی سلسیوس با اختلاف ۰/۵ درجه سلسیوس در هر چرخه انجام شد. به‌منظور استاندارد کردن داده‌ها نمونه‌ها با ژن خانه‌داری اکتین نرمال شدند. نرخ بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با آزمون t انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش Real time PCR.
Table 1. sequence of primers used in Real time PCR test.

Gene	Forward primer sequence (5' - 3')	Reverse primer sequence (5' - 3')	Reference
<i>LOX1</i>	AAGGTTTGCCTGTCCCAAGA	TGAGTACTGGATTAAGTCCAGCCAA	(Pu <i>et al.</i> , 2014)
<i>PR1</i>	CGGGACAGACTCACCTCAAG	GGCTTCTCATCCACCCACAA	(Fardhani <i>et al.</i> , 2022)
<i>PR3</i>	TGGTCACTGCAACCCTGACA	AGTGGCCTGGAATCCGACT	(Pu <i>et al.</i> , 2014)
<i>PAL1</i>	ATGGAGGCAACTTCCAAGGA	CCATGGCAATCTCAGCACCT	(Sofy <i>et al.</i> , 2020)
<i>CMV-CP</i>	CCACACGGTAGAATCAATTTTC	GGTCTTATTACGGTAAAGGTTG	(Wei <i>et al.</i> , 2012)
<i>CMV-RDRP</i>	TGTCTCACCTGACTCTGCTGCT	ATTCCAATCGAAGGCCCTCTCC	(Wei <i>et al.</i> , 2012)

اندازه‌گیری کلروفیل a و b

برای اندازه‌گیری کلروفیل a و b از روش لیشتن تالر و ولبورن در سال ۱۹۸۳ استفاده شد (Lichtentaller & Welburn, 1983).

(Welburn, 1983).

سنجش محتوای پروکلین

سنجش پروکلین با استفاده از روش Bates و همکاران در سال ۱۹۷۳ صورت گرفت (Bates *et al.*, 1973).

اندازه‌گیری قندهای محلول کل برگ

برای اندازه‌گیری قندهای محلول کل برگ از روش Irigoyen و همکاران در سال ۱۹۹۲ استفاده شد (Irigoyen *et al.*, 1992).

(Irigoyen *et al.*, 1992).

بررسی فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPX)

در این پژوهش، اثر تیمار SNP روی آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) در بوته‌های کدو ۷۲

ساعت بعد از مایه‌زنی با CMV مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز براساس کاربرد گایاکول به-

عنوان دهنده هیدروژن انجام شد (Chance & Maehly, 1955). میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز با استفاده از فرمول زیر

محاسبه شد:

$$\text{X} = (\Delta A_{470 \text{ nm}} \times 1000 \times 2) / \text{Extinction}$$

در این فرمول $\Delta A_{470 \text{ nm}}$ تغییرات میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر و X ضریب خاموشی (Extinction

coefficient) می‌باشد که برابر ۲۶/۶ است.

تجزیه و تحلیل آماری

ارزیابی آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف (با سه تکرار در هر بار انجام آزمایش) با استفاده از نرم-

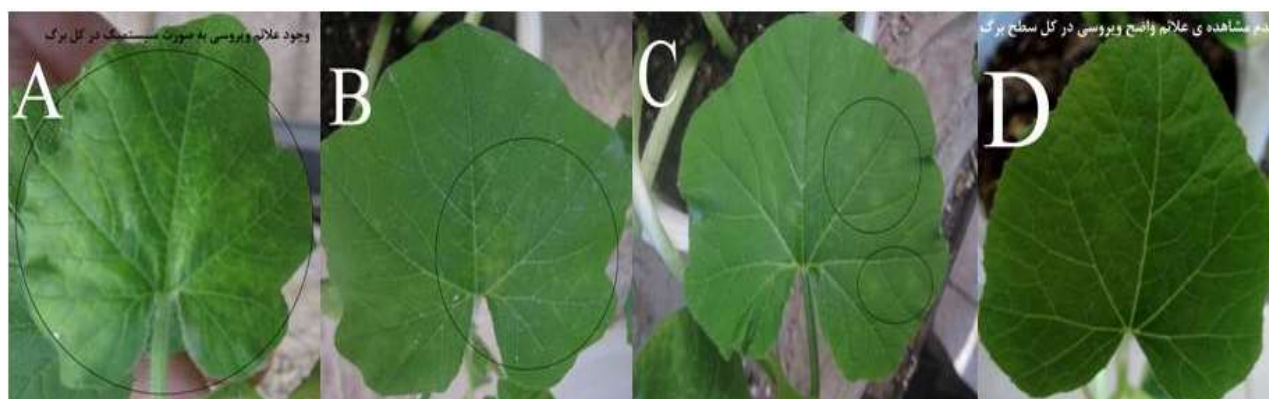
افزار SAS 9.1 و براساس آنالیز ANOVA (Analysis of variance) و آزمون مقایسه‌ای توکی در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد.

نتایج

شدت بیماری

بررسی علائم CMV روی کدو نشان داد که حداکثر شدت بیماری (DS) در تیمار بوته‌های کدوی فقط مایه‌زنی شده

با CMV مشاهده شد (۵۶٫۹۶ درصد). در تیمارهایی که بوته‌های آلوده به CMV با SNP تیمار شدند، میانگین شدت علائم



کاهش چشمگیری داشت به‌طوری‌که در تیمار با ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با SNP میانگین شدت بیماری به ۱۶/۳۲ درصد،

در تیمار با ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، میانگین شدت بیماری ۱۴/۲۱ درصد و در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

میانگین شدت بیماری به ۱۱/۳۲ درصد رسید (شکل ۱ و جدول ۲).

شکل ۱- علائم سیستمیک ویروس موزائیک خیار روی برگ‌های کدو به ترتیب A: گیاه شاهد مایه‌زنی شده فقط با ۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر از CMV خالص‌شده بدون تیمار SNP (نمونه‌ی کنترل مثبت)، B: گیاه مایه‌زنی شده با ۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر از CMV خالص‌شده و تیمار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر SNP بعد از تلقیح ویروس، C: گیاه مایه‌زنی شده با ۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر از CMV خالص‌شده و تیمار ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر SNP بعد از تلقیح ویروس، D: گیاه مایه‌زنی شده با ۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر از CMV خالص‌شده و تیمار ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر SNP بعد از تلقیح ویروس. علائم ویروسی روی تصاویر نشان داده شده است (علائم با افزایش غلظت SNP در تصاویر B و C محدودتر و در تصویر D قابل مشاهده نیست).

Figure 1. Systemic symptoms of cucumber mosaic virus on *Cucurbita pepo* leaves. Respectively A: Control plant inoculated with only 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of purified CMV without SNP treatment (positive control sample), B: Inoculated plant inoculated with 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of purified CMV and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SNP treatment after inoculation of virus C: Plant inoculated with 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of purified CMV and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treatment SNP after virus inoculation, D: Plant inoculated with 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of purified CMV and 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SNP treatment after virus inoculation. Viral symptoms are shown on the figures (symptoms with increasing SNP concentration are more limited in figures B and C and not visible in figure D)

جدول ۲- میانگین درصد شدت بیماری در برگ‌های کدو در تیمارهای مختلف.

Table 2. Average percentage of disease severity in *Cucurbita pepo* leaves in different treatments.

Treatment	Disease severity (%)
Control (distilled water)	0
CMV (50 µg/µL)	56/96±5.12
CMV (50 µg/µL) and SNP (100 µg/ml)	16/32±1.25
CMV (50 µg/µL) and SNP (200 µg/ml)	14/21±1.63
CMV (50 µg/µL) and SNP (300 µg/ml)	11/32±1.14

بررسی بیان پوشش پروتئینی و رپلیکاز ویروس در تیمار خیار با SNP

در این آزمایش، کاهش معنی‌دار وابسته به غلظت در بیان ژن پروتئین پوششی ویروس (CP) در بوته‌های کدوی آلوده به CMV و تیمار شده با غلظت‌های مختلف SNP نسبت به گیاهان فقط مایه‌زنی شده با CMV (به‌عنوان شاهد مثبت) مشاهده شد. بیان ژن پروتئین پوششی ویروس با گذشت زمان کاهش بیشتری داشت به‌طوری‌که بیشترین کاهش در غلظت ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در هفته‌ی سوم در سطح احتمال ۵ درصد اندازه‌گیری شد. همچنین کاهش معنی‌دار وابسته به غلظت و زمان در بیان ژن رپلیکاز ویروس (*RdRp*) در بوته‌های کدوی آلوده به CMV و تیمار شده با غلظت‌های مختلف SNP نسبت به گیاهان فقط مایه‌زنی شده با CMV (به‌عنوان شاهد منفی) مشاهده شد. بیان ژن پروتئین پوششی ویروس با گذشت زمان کاهش بیشتری داشت به‌طوری‌که بیشترین کاهش در غلظت ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در هفته‌ی دوم و سوم در سطح احتمال ۵ درصد اندازه‌گیری شد (جدول ۳ و ۴، شکل ۲).

جدول ۳- مقایسه میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی روی بیان ژن پروتئین پوششی CMV.

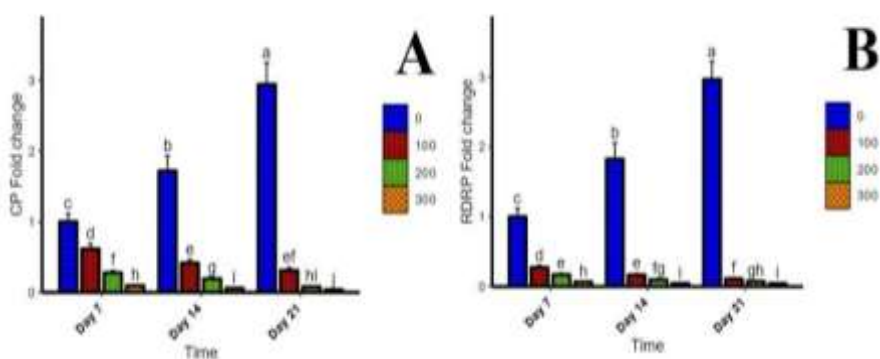
Table 3. Comparison of the average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation on CMV coat protein gene expression.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	2.48908	1.24454	41.07962	0.00000
Concentration (mg/ml)	3	114.07223	38.02408	1255.09296	0.00000
Interaction	6	10.35713	1.72619	56.97774	0.00000
Residuals	24	0.72710	0.03030		

جدول ۴- مقایسه میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی روی بیان ژن رپلیکاز CMV.

Table 4. Comparison of the average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation on CMV replicase gene expression.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	0.94351	0.47175	15.75006	0.00004
Concentration (mg/ml)	3	128.91688	42.97229	1434.68427	0.00000
Interaction	6	8.06603	1.34434	44.88242	0.00000
Residuals	24	0.71886	0.02995		



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی روی بیان ژن پروتئین پوششی (A) و رپلیکاز (B) CMV.

Figure 2. Comparison chart of the average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation on CMV coat protein (CP) (A) and replicase (RDRP) (B) genes expression.

بررسی بیان ژن‌های *Pr1* و *Pr3* مرتبط با پروتئین‌های دفاعی در کدو

آنالیز qPCR نشان داد که میزان بیان ژن *Pr1* در گیاهان تیمار شده با SNP روند افزایشی داشت. گیاهان تیمار شده در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از تیمار با غلظت‌های مختلف SNP افزایش معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نسبت به گیاهان کنترل (تلقیح-شده فقط با CMV) نشان دادند. همچنین آنالیز بیان ژن پس از اعمال آلودگی نیز حاکی از روند افزایشی ملایمی از بیان رونوشت ژن *Pr1* گیاهان کنترل بود که از هفته‌ی دوم به بعد قابل مشاهده بود. ولی روند افزایشی بیان ژن *Pr1* در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف SNP به‌صورت وابسته به غلظت به‌طور معنی‌داری چندین برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود. بیشترین بیان رونوشت ژن *Pr1* در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در هفته‌های دوم و سوم مشاهده شد. نتایج آنالیز بیان رونوشت‌های ژن *Pr3* نشان داد که پس از محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف SNP، سطح تظاهر ژن *Pr3* به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. گیاهان تیمار شده با SNP ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان بیان ژن *Pr3* را در هفته‌های دوم و سوم نسبت به گیاهان شاهد (تلقیح‌شده فقط با CMV) در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند. همچنین بررسی تغییرات الگوی بیان ژن *Pr3* پس از تیمار با ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر SNP نشان داد بیان این ژن در هفته‌ی اول، دوم و سوم نسبت به هم معنادار نشد ولی این افزایش بیان نسبت به گیاهان کنترل معنادار بود. بررسی نتایج الگوی بیان حاکی از بیشترین افزایش سطح بیان معنی‌دار این ژن در هفته‌ی دوم در هر سه غلظت بود (جدول ۵، ۶ و شکل ۳).

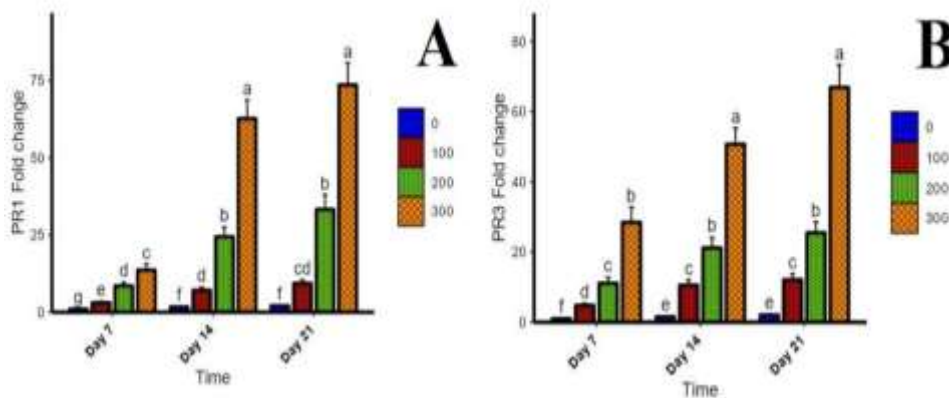
جدول ۵- میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی بیان رونوشت‌های ژن *Pr1*.

Table 6. The average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on the expression of *Pr1* gene transcripts.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	20.99712	10.49856	304.03702	0.00000
Concentration (mg/ml)	3	114.43924	38.14641	1104.71541	0.00000
Interaction	6	2.13955	0.35659	10.32685	0.00001
Residuals	24	0.82873	0.03453		

جدول ۶- میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی بیان رونوشت‌های ژن *Pr3*
Table 7. The average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on the expression of *Pr3* gene transcripts.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	9.30765	4.65383	123.56624	0.00000
Concentration (mg/ml)	3	119.26747	39.75582	1055.57821	0.00000
Interaction	6	0.20213	0.03369	0.89448	0.51467
Residuals	24	0.90390	0.03766		



شکل ۳- نمودار میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی بیان رونوشت‌های ژن‌های *Pr1* (A) و *Pr3* (B).

Figure 6. The chart of the average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on the expression of *Pr1* (A) and *Pr3* (B) gene transcripts.

تعیین فعالیت آنزیم‌های لیپواکسیژناز (*LOXI*)، گایاکول پراکسیداز (*GPX*) و فنیل آمونیا-لیاز (*PAL*)

فعالیت *LOXI* در گیاهان کنترل فقط مایه‌زنی‌شده با CMV پایین‌ترین سطح را در مقایسه با دیگر تیمارها نشان داد. بیشترین فعالیت *LOXI* در سطح احتمال ۵ درصد مربوط به بوته‌های آلوده به CMV و تیمار شده با SNP در هفته‌ی سوم بود. روند افزایشی فعالیت آنزیم *LOXI* در هفته‌های اول، دوم و سوم وابسته به غلظت نسبت به کنترل (تلقیح‌شده فقط با CMV) در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. همچنین فعالیت *GPX* در گیاهان کنترل فقط مایه‌زنی‌شده با CMV پایین‌ترین سطح را در مقایسه با دیگر تیمارها نشان داد. بیشترین فعالیت *GPX* در سطح احتمال ۵ درصد مربوط به بوته‌های آلوده به CMV و تیمار شده با SNP بود. روند افزایشی فعالیت آنزیم های *GPX* در هفته‌های دوم و سوم نسبت به کنترل (تلقیح‌شده فقط با CMV) در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود ولی روند افزایش آنزیم بین هفته‌های دوم و سوم در سطح احتمال ۵ درصد معنادار نبود. فعالیت *PAL* نیز در گیاهان کنترل فقط مایه‌زنی‌شده با CMV پایین‌ترین سطح را در مقایسه با دیگر تیمارها نشان داد ولی با گذشت زمان از هفته‌ی اول تا سوم دارای افزایش معناداری در سطح احتمال ۵ درصد بود. تیمار با

غلظت‌های مختلف SNP منجر به افزایش وابسته به غلظت سطح بیان آنزیم PAL از هفته‌ی اول تا سوم در بوته‌های کدو شد. بیشترین فعالیت PAL در سطح احتمال ۵ درصد مربوط به بوته‌های آلوده به CMV و تیمار شده با SNP در هفته‌ی سوم بود. روند افزایشی فعالیت آنزیم PAL در هفته‌های اول، دوم و سوم نسبت به هم نیز در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود (جدول ۷، ۸ و ۹ و شکل ۴).

جدول ۷- میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز (LOXI).

Table 7. The average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on lipoxygenase (LOXI) enzyme activity.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	45.22375	22.61188	702.48495	0.00000
Concentration (mg/ml)	3	67.10840	22.36947	694.95406	0.00000
Interaction	6	4.89340	0.81557	25.33725	0.00000
Residuals	24	0.77252	0.03219		

جدول ۸- میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی فعالیت آنزیم گایاکول-پراکسیداز (GPX).

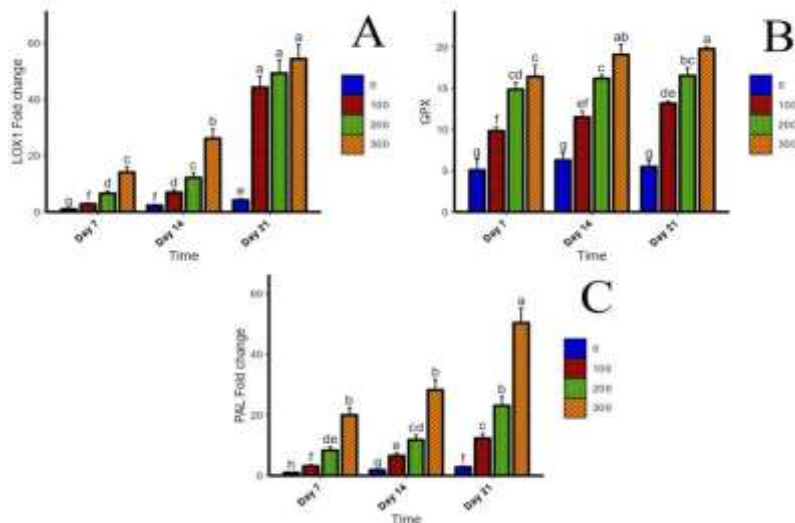
Table 8. The average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on guaiacol peroxidases (GPX) enzyme activity.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	31.9916	15.99581	20.64738	0.00001
Concentration (mg/ml)	3	846.1002	282.03340	364.04847	0.00000
Interaction	6	10.5335	1.75559	2.26611	0.07116
Residuals	24	18.5931	0.77471		

جدول ۹- میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز (PAL).

Table 9. The average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme activity.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	14.69113	7.34556	213.22202	0.00000
Concentration (mg/ml)	3	82.77342	27.59114	800.89682	0.00000
Interaction	6	0.56727	0.09454	2.74438	0.03561
Residuals	24	0.82681	0.03445		



شکل ۴- نمودار مقایسه تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی فعالیت آنزیم‌های لیپو اکسیژناز (LOXI) (A)، گایاکول پراکسیداز (GPX) (B) و فنیل آمونیا-لیاز (PAL) (C).

Figure 7. Comparison chart of the effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on lipooxygenase (LOXI) (A), guaiacol peroxidases (GPX) (B) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (C) enzymes activity.

محتوای کلروفیل a و b

در این آزمون، افزایش معنی‌داری در محتوای کلروفیل a در تیمارهای کدوی آلوده با CMV و تیمار شده با غلظت‌های مختلف SNP در هفته‌ی اول تا سوم نسبت به گیاهان فقط آلوده با CMV به‌عنوان شاهد نشان داده شد. در گیاهان تیمار شده با SNP بیشترین محتوای کلروفیل a در هفته‌ی دوم و سوم در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده گردید. ولی روند افزایش کلروفیل a در هفته‌ی دوم و سوم نسبت به یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد معنادار نبود. همچنین افزایش معنی‌داری در محتوای کلروفیل b در تیمارهای کدوی آلوده با CMV و تیمار شده با غلظت‌های مختلف SNP در هفته‌ی اول تا سوم نسبت به گیاهان فقط آلوده با CMV به‌عنوان شاهد نشان داده شد. در گیاهان تیمار شده با SNP بیشترین محتوای کلروفیل b در هفته‌ی دوم و سوم در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده گردید. ولی روند افزایش کلروفیل b در هفته‌ی دوم و سوم نسبت به یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد معنادار نبود. (جدول ۱۰، ۱۱ و شکل ۵).

جدول ۱۰- مقایسه میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی محتوای کلروفیل a.

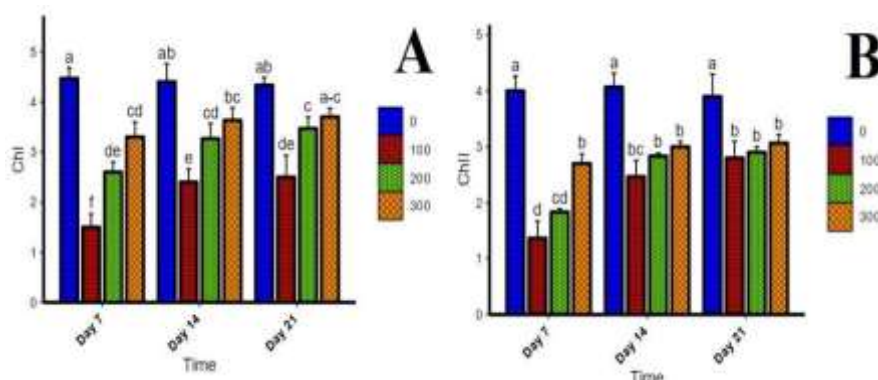
Table 10. Comparison of the average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on chlorophyll a content.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	2.00056	1.00028	13.38662	0.00012
Concentration (mg/ml)	3	23.99861	7.99954	107.057	0.00000
Interaction	6	1.35722	0.22620	3.02726	0.02388
Residuals	24	1.79333	0.07472		

جدول ۱۱- مقایسه میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی محتوای کلروفیل b.

Table 11. Comparison of the average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on chlorophyll b content.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	3.45722	1.72861	32.41146	0.00000
Concentration (mg/ml)	3	16.22667	5.40889	101.41667	0.00000
Interaction	6	2.33167	0.38861	7.28646	0.00016
Residuals	24	1.28000	0.05333		



شکل ۹- نمودار مقایسه محتوای کلروفیل a (A) و b (B) در تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV.

Figure 9. Comparison chart of chlorophyll a (A) and b (B) content of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV.

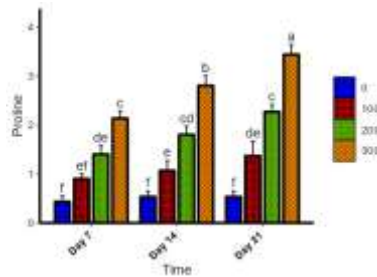
تعیین محتوای پرولین

نتایج حاصل از بررسی تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی روی بوته‌های کدوی آلوده به CMV بر محتوای نسبی پرولین برگ‌های کدو نشان داد که سطح بیان پرولین در گیاهان تیمار شده با SNP، وابسته به غلظت نسبت به گیاهان شاهد (تلقیح شده فقط با CMV) در سطح احتمال ۵ درصد افزایش یافت. بیشترین میزان تجمع پرولین در بوته‌های آلوده به CMV در هفته‌ی سوم بعد از تیمار با SNP مشاهده شد (جدول ۱۲ و شکل ۶).

جدول ۱۲- مقایسه میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی محتوای پرولین.

Table 12. Comparison of the average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on proline content.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	2.80222	1.40111	44.63717	0.00000
Concentration (mg/ml)	3	26.13556	8.71185	277.54572	0.00000
Interaction	6	1.21778	0.20296	6.46608	0.00037
Residuals	24	0.75333	0.03139		



شکل ۶- نمودار مقایسه تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی محتوای پرولین.
Figure 6. Comparison chart of the effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on proline content.

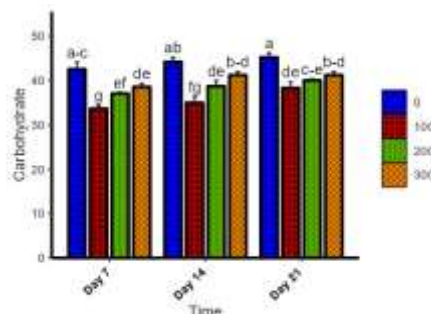
سنجش تجمع قند محلول در گیاه

نتایج نشان داد که مقدار قندهای محلول در برگ کدوی تیمار شده با SNP نسبت به گیاهان فقط تیمار شده با CMV افزایش معناداری در سطح احتمال ۵ درصد داشت. بیشترین تجمع قندهای محلول در تیمار گیاهان آلوده به CMV با SNP در هفته‌ی دوم و سوم بعد از تیمار SNP نسبت به تیمار شاهد (تلقیح‌شده فقط با CMV) در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد. روند افزایش تجمع قندهای محلول در هفته‌های اول، دوم و سوم نسبت به کنترل در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود ولی روند افزایش قندهای محلول در هفته‌ی دوم و سوم نسبت به هم در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معناداری نداشت (جدول ۱۳ و شکل ۷).

جدول ۱۳- میانگین تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی تجمع قندهای محلول.

Table 13. The average effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on the accumulation of soluble carbohydrates.

Parameters	Df	Sum.Sq	Mean.Sq	F.value	P
Time	2	63.72222	31.86111	30.4244	0.00000
Concentration (mg/ml)	3	327.81889	109.27296	104.34553	0.00000
Interaction	6	9.61111	1.60185	1.52962	0.21121
Residuals	24	25.13333	1.04722		



شکل ۷- نمودار مقایسه تاثیر تیمار SNP در هفته‌ی اول، دوم و سوم پس از مایه‌زنی بوته‌های کدوی آلوده به CMV روی تجمع قندهای محلول.
Figure 7. Comparison chart of the effect of SNP treatment in the first, second and third week after inoculation of *Cucurbita pepo* plants infected with CMV on the accumulation of soluble carbohydrates.

نتیجه‌گیری و بحث

کاربرد خارجی SNP با احتمال زیاد بوسیله القای مکانیسم مقاومتی SAR سبب القای بیان ژن‌های دفاعی در بوته‌های کدوی تیمار شده با این فعال‌کننده می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزایش سطح بیان رونوشت‌های ژن‌های دفاعی *Pr1*، *Pr3*، *LOX1* و *GPX* در تیمار با غلظت‌های مختلف SNP افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاه کنترل (تلقیح‌شده فقط با CMV) نشان دادند. همچنین پس از اعمال آلودگی نیز در گیاهان تیمار شده بیان رونوشت‌های ژن‌های دفاعی اغلب تا هفته‌ی دوم و سوم پس از تیمار تفاوت معنی‌داری را نسبت به گیاهان کنترل نشان دادند که این نتایج بیانگر موثر بودن نقش SNP در القای ژن‌های مسیر مقاومت می‌باشد. از سویی میزان بیان ژن‌های دفاعی در گیاهان تیمار شده اغلب با افزایش غلظت SNP از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشتر شد که به نظر می‌رسد یکی از دلایل مشاهده این نتایج اثرات سمیت کمتر SNP در غلظت‌های نسبتاً بالا در کدو باشد. یافته‌های بررسی‌های دیگر نیز نشان داد که تیمار نیتریک‌اکسید به صورت هم‌افزا در گندم افزایش سطح مقاومت پایه و مقاومت القایی ناشی از *Piriformospora indica* در برابر *F. pseudograminearum*، عامل پوسیدگی طوقه و ریشه را از طریق افزایش سطوح پراکسید هیدروژن، فعالیت گیاکول‌پراکسیداز و کاتالاز، رسوب کالوز، محتوای نسبی آب برگ و شاخص پایداری غشا اعمال می‌کند (Dehghanpour Farashah et al., 2019). گزارش‌ها نشان داده است که سطوح رونوشت ژن‌های بیوسنتزی و سیگنال‌دهنده مرتبط با اسید-جاسمونیک (JA) و اسیدسالیسیلیک پس از تیمار گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne incognita* القا شد. تیمار خارجی SNP به‌طور قابل‌توجهی تعداد توده‌های تخم در ریشه گوجه‌فرنگی آلوده به *M. incognita* را کاهش و تاحدی وزن تر گیاه و میزان فتوسنتز را افزایش داد. این ترکیبات همچنین افزایش نشت الکترولیت ترکیبات ریشه و پراکسیداسیون غشا در اثر حمله نماتدهای ریشه‌گرهی را کاهش دادند. علاوه‌براین، JA و SNP باعث افزایش بیان ژن بازدارنده پروتئاز ۲ (*PI2*) پس از آلودگی نماتدهای ریشه‌گرهی شدند (Zhou et al., 2015). همچنین نتایج نشان داد که تولید NO توسط نیتریک‌اکسیدسنتاز (*NOS*) و ارتباط متقابل آن با سایر آنتی‌اکسیدان‌ها به شدت بر تعاملات گوجه‌فرنگی و نماتدهای ریشه‌گرهی تاثیر گذاشته و باعث کاهش آلودگی می‌شود (Leonetti et al., 2011). دخالت NO در پاسخ ایمنی گیاه برای اولین بار در سیب‌زمینی شناسایی شد که یک دهنده NO باعث تجمع فیتوالکسین ریشیتین سیب‌زمینی، یک ترکیب آنتی‌بیوتیک درون‌زا، شد (Noritake et al., 1996). یافته‌ها نشان داد که اس-نیتروزوگلوکوتانین (*GSNO*) یک مرکز ذخیره‌سازی فعال درون‌سلولی NO است و در گیاهان توسط اس-نیتروزوگلوکوتانین ردوکتاز (*GSNOR*) تنظیم می‌شود. آن‌ها گزارش کردند که کاربرد خارجی NO با اس-نیتروزولاسیون پروتئین *GSNOR* و مهار فعالیت آن به افزایش مقاومت میوه‌های هلو در مقابل *Monilinia fructicola* کمک می‌کند (Yu et al., 2020). در مطالعات دیگری نیز مشخص شد که کاربرد خارجی NO روی میوه‌ها پس از برداشت، اثرات بازدارندگی آشکاری بر عوامل بیماری‌گری نظیر *Botrytis cinerea*، *Penicillium expansum* و *Colletotrichum gloeosporioides* داشت

(Lai et al., 2014, Hu et al., 2019, Zheng et al., 2011). بررسی دیگری نشان داد که کاربرد خارجی NO سبب حفظ سطوح کلروفیل در برگ‌های سبب‌زمینی آلوده به *Phytophthora infestans* می‌شود (Lazalt et al., 1997). همچنین بررسی‌ها نشان داده است که RNA پلیمراز ۱ وابسته به RNA گیاه (*RDR1*) یک مولکول مهم در مسیر خاموشی RNA در گیاهان در برابر ویروس‌ها است. بیان *RDR1* می‌تواند توسط آلودگی ویروسی و اسیدسالیسیلیک ایجاد شود اما مکانیسم‌های سیگنال-دهی در طول این فرآیند به‌طور کامل شناخته نشده است. دخالت پراکسید هیدروژن و NO در القای تولید *RDR1* در تعامل سازگار بین توباموویروس موزائیک تنباکو (TMV) در *Nicotiana tabacum*، *N. benthamiana* و *Arabidopsis thaliana* مورد بررسی قرار گرفته است. تلقیح TMV روی برگ‌های پایینی *N. tabacum* باعث تجمع سریع H_2O_2 و NO و به دنبال آن افزایش تجمع رونوشت‌های *RDR1* در برگ‌های فوقانی تلقیح‌نشده، گردید. پیش‌تیمار خارجی H_2O_2 و NO در برگ‌های بالایی منجر به افزایش بیان *RDR1* و ژن‌های مقاومت سیستمیک SAR در برابر TMV شد (Liao et al., 2013). در بررسی‌های دیگر مشخص شده است که تیمار NO به کنف و مایه‌زنی گیاه با بگوموویروس‌های موزائیک زرد رگبرگ مستا (MeYVMV) و بتا-ستلایت همراه با ویروس پیچیدگی مولتان برگ پنبه (CLCuMB)، منجر به افزایش تولید *PAL*، *LOXI* و ژن‌های *Pr* نه تنها در برگ آلوده بلکه در ریشه و اندام‌های هوایی گیاه می‌شود. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بیان ژن‌های مرتبط با براسینو-استروئیدها (BRs) پس از آلودگی ذرت با ویروس لکه کلروتیک ذرت (MCMV) افزایش یافت. تیمارهای خارجی NO باعث تجمع ۲،۴-اپی‌براسینولید (BL) و براسینازول (BRZ) و تغییرات محتوای کلروفیل و قندهای محلول نقش مثبتی در کاهش بروز بیماری MCMV داشت (Sarkar et al., 2010). علاوه بر این، آلودگی ذرت با MCMV زمانی که گیاهان با NO تیمار شدند، به تعویق افتاد که نشان می‌دهد BR حساسیت ذرت را به آلودگی MCMV به شیوه‌ای وابسته به NO کاهش می‌دهد. علاوه بر این، تحقیقات نشان داده است که گیاهان از ابیدوپسیس حساس که در آن‌ها تکثیر CMV زیاد بود، پس از تیمار با جاذب NO یا مهارکننده مصنوعی NO صدمات کمتری را متحمل شدند (Cao et al., 2019). آلودگی برنج با ویروس کوتولگی رگه‌سیاه برنج (RBSDV) به‌طور قابل توجهی باعث تولید NO می‌شود. مطالعات نشان داد که کاربرد ترکیبات آزادکننده NO به‌عنوان مثال، سدیم نیتروپروساید (SNP) و نیتروزگلوتاتینون (GSNO) در گیاهان برنج، بروز بیماری RBSDV را کاهش می‌دهد. پس از آلودگی RBSDV، سطح رونوشت‌های *OsWRKY 45*، *OsPR1b*، *OsICS1*، اسیدسالیسیلیک و پروتئین S-nitrosylation به‌طور قابل توجهی در گیاهان برنج افزایش و حساسیت آن به RBSDV کاهش یافت. اخیراً بررسی‌های مختلف نشان داده است که ملاتونین و NO در تعامل گیاه و ویروس به‌صورت هم‌افزا باعث کاهش آلودگی برنج توسط ویروس نواری برنج (RSV) می‌شوند (Lu et al., 2020).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار خارجی SNP نقش مهمی در پاسخ بوته‌های کدو به آلودگی با CMV و همچنین تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت دارد. به‌طور کلی نتایج حاصل از الگوی بیان ژن و بهبود خصوصیات فیزیولوژیکی در کدو بیانگر موثر بودن نقش SNP در القای مقاومت گیاه به CMV بود. از سویی با در نظر گرفتن مزایای زیست‌محیطی SNP و همچنین هزینه‌های فراوان سموم شیمیایی از نظر اقتصادی و هزینه‌های جبران‌ناپذیر زیست-محیطی آن‌ها، SNP را می‌توان در جهت کاهش خسارت بیماری و کم نمودن آثار سوء مواد شیمیایی و به‌عنوان یک روش امیدبخش و موثر در مدیریت بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمام کسانی که در انجام مراحل مختلف این مقاله یاری رسانده‌اند قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله

رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P. and Tiburcio, A.F. (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231: 1237-1249.
- Arasimowicz-Jelonek, M. and Floryszak-Wieczorek, J. (2016) Nitric oxide in the offensive strategy of fungal and oomycete plant pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 7: 252.
- Bates, L. S., Waldren, R. A. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39: 205-207.
- Cao, N., Zhan, B. and Zhou, X. (2019) Nitric oxide as a downstream signaling molecule in brassinosteroid-mediated virus susceptibility to *maize chlorotic mottle virus* in maize. *Viruses*, 11(4): 368.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. 764-775.
- Dehghanpour-Farashah, S., Taheri, P. and Falahati-Rastegar, M. (2019) Effect of polyamines and nitric oxide in *Piriformospora indica*-induced resistance and basal immunity of wheat against *Fusarium pseudograminearum*. *Biological Control*, 136: 104006.
- Fardhani, D.M., Kharisma, A.D., Kobayashi, T., Arofutallah, N.A., Yamada, M., Tanabata, S., Yokoda, Y., Widiastuti, A. and Sato, T. (2022) Ultraviolet-b irradiation induces resistance against powdery mildew

- in cucumber (*Cucumis sativus* L.) through a different mechanism than that of heat shock-induced resistance. *Agronomy*, 12(12): 3011.
- Gill, S.S., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Macovei, A. and Tuteja, N. (2013) Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 254-261.
- Hayat, S., Mori, M., Pichtel, J. and Ahmad, A. (2009) Nitric oxide in plant physiology. Wiley-Blackwell, India, 210p.
- Hu, M., Zhu, Y., Liu, G., Gao, Z., Li, M., Su, Z. and Zhang, Z. (2019) Inhibition on anthracnose and induction of defense response by nitric oxide in pitaya fruit. *Scientia Horticulturae*, 245: 224-230.
- Irigoyen, J. J., Einerich, D. W. and Sánchez-Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia plantarum*, 84(1): 55-60.
- Lai, T., Chen, Y., Li, B., Qin, G. and Tian, S. (2014) Mechanism of *Penicillium expansum* in response to exogenous nitric oxide based on proteomics analysis. *Journal of Proteomics*, 103: 47-56.
- Lazalt, A.M., Beligni, M.V. and Lamattina, L. (1997) Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 643-651.
- Leonetti, P., Melillo, M.T. and Bleve-Zacheo, T. (2011) Nitric oxide and hydrogen peroxide: two players in the defence response of tomato plants to root-knot nematodes. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 76(3): 371-381.
- Liao, Y.W., Sun, Z.H., Zhou, Y.H., Shi, K., Li, X., Zhang, G.Q., Xia, X.J., Chen, Z.X. and Yu, J.Q. (2013) The role of hydrogen peroxide and nitric oxide in the induction of plant-encoded RNA-dependent RNA polymerase 1 in the basal defense against *Tobacco mosaic virus*. *PLoS One*, 8(9): e76090.
- Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 591-592.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4):402-408.
- Lu, R., Liu, Z., Shao, Y., Su, J., Li, X., Sun, F., Zhang, Y., Li, S., Zhang, Y., Cui, J. and Zhou, Y. (2020) Nitric oxide enhances rice resistance to *rice black-streaked dwarf virus* infection. *Rice*, 13(1): 1-3.
- Mur, L.A., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S.M., Moshkov, I.E., Novikova, G.V., Hall, M.A., Harren, F.J., Hebelstrup, K.H. and Gupta, K.J. (2013) Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants*, 5.
- Noritake, T., Kawakita, K. and Doke, N. (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology*, 37(1): 113-116.
- Pu, X., Xie, B., Li, P., Mao, Z., Ling, J., Shen, H., Zhang, J., Huang, N. and Lin, B. (2014) Analysis of the defence-related mechanism in cucumber seedlings in relation to root colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* CS-20. *FEMS Microbiology Letters*, 355(2):142-151.
- Salehzadeh, M. (2018). Survey on presence of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in single and mixed infections with potyviruses in North-West of Iran. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 7(2): 163-173.
- Sarkar, T.S., Majumdar, U., Roy, A., Maiti, D., Goswamy, A.M., Bhattacharjee, A., Ghosh, S. and Ghosh, S.K. (2010) Production of nitric oxide in host-virus interaction: A case study with a compatible begomovirus-kenaf host-pathosystem. *Plant Signaling and Behavior*, 5(6): 668-676.

- Sofy, A.R., Dawoud, R.A., Sofy, M.R., Mohamed, H.I., Hmed, A.A. and El-DougDoug, N.K. (2020) Improving regulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants and stress-related gene stimulation in Cucumber mosaic cucumovirus-infected cucumber plants treated with glycine betaine, chitosan and combination. *Molecules*, 25(10): 2341.
- Sriram, S., Raguchander, T., Vidhyasekaran, P., Muthukrishnan, S. and Samiyappan R. (1997) Genetic relatedness with special reference to virulence among the isolates of *Rhizoctonia solani* causing sheath blight in rice. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 104: 260 –271.
- Sudhakar, N., Nagendra –Prasad, D., Mohan, N. and Murugesan K. (2006) Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against Cucumber mosaic virus by using ozone. *Journal of Virological Methods*, 139(1): 71 -77.
- Wei, T., Lebas, B.S.M., Shiller, J.B., Quinn, B.D. and Clover, G.R.G. (2012) Detection of five viruses infecting dormant bulbs by TaqMan-based real-time RT-PCR. *Australasian Plant Pathology*, 41(1): 93-98.
- Yu, Z., Cao, J., Zhu, S., Zhang, L., Peng, Y. and Shi, J. (2020) Exogenous nitric oxide enhances disease resistance by nitrosylation and inhibition of S-nitrosoglutathione reductase in peach fruit. *Frontiers in Plant Science*, 11: 543.
- Zheng, Y., Sheng, J., Zhao, R., Zhang, J., Lv, S., Liu, L. and Shen, L. (2011) Preharvest L-arginine treatment induced postharvest disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12): 6543-6549.
- Zhou, J., Jia, F., Shao, S., Zhang, H., Li, G., Xia, X., Zhou, Y., Yu, J. and Shi, K. (2015) Involvement of nitric oxide in the jasmonate-dependent basal defense against root-knot nematode in tomato plants. *Frontiers in Plant Science*, 6: 193.

Sodium nitroprusside treatment affects the expression of some defense genes and physiological parameters in *Cucurbita pepo* infected with *cucumber mosaic virus*

Mehrdad Salehzadeh¹, Saeedeh Dehghanpour Farashah^{2*}, Mohammad Bagher Hassanpouraghdam³

Received: 2023.4.11

Accepted:2023.5.15

Abstract

Introduction: Cucumber mosaic virus is a dominant disease in cucumber and many other crops, which causes a lot of damage worldwide and in Iran. In recent years, the use of defense inducers has received much attention.

Methods: In the present study, we tried to investigate the defensive effects of sodium nitroprusside as a biological stimulus on *Cucurbita pepo* which is considered susceptible to Cucumber mosaic virus. The plants were incubated at the full two-leaf stage by CMV with a concentration of 50 micrograms/ml. After 48 hours, CMV-infected plants were sprayed with SNP in three concentrations of 100, 200 and 300 micrograms/ml. Finally, the level of expression of coat proteins and virus replicase genes, the expression pattern of PAL, GPX1, LOX1, Pr1 and Pr3 genes as well as some morpho-physiological characteristics of *Cucurbita* plants were evaluated in three repetitions during three weeks.

Results and discussion: The results showed that the plants treated with SNP showed an increase in the expression of the studied genes after the infection by CMV. So that, the treated plants showed an increase in the genes expression pattern depending on the concentration of SNP till the third week compared to the control plants. In addition, several physiological characteristics were also improved. In conclusion, the use of SNP can be considered as an effective methodology in the induction of systemic resistance in *Cucurbita pepo* plants against CMV.

Keywords: Defense genes inducers, Resistance, Physiological characteristics.

¹Ph.D Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

²Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.
(*sdfarashah@pnu.ac.ir).

³Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.