

تأثیر پروتئین ضد ویروسی گیاه لاله عباسی (MAP) در آلودگی های ناشی از ویروس موزاییک خیار (CMV) و ویروس Y سیب زمینی (PVY) در گیاه *Nicotiana benthamiana* در شرایط گلخانه

فرشاد رخشنده‌رو[✉]، زهرا پازوکی، سعید رضائی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. [✉] Rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۳

بازنگری: ۱۴۰۰/۸/۱

دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۹

چکیده

در این تحقیق تلاش شد تا با استفاده از پروتئین ضد ویروسی گیاه لاله عباسی (MAP) Mirabilis Antiviral Protein (MAP) در شرایط گلخانه علاوه بر کنترل *Cucumber mosaic virus* (CMV) و *Potato virus Y* (PVY)، مکانیسم کنترل کنندگی آن نیز مورد بررسی قرار گیرد. برای این منظور ابتدا MAP از عصاره‌های برگ و ریشه گیاه لاله عباسی جداسازی شد و سپس گیاهچه‌های *Nicotiana benthamiana* در گلدان‌های ۵۰ گرمی کاشته و در مرحله چهار تا شش برگی بصورت مکانیکی توسط ویروس‌های CMV-Fny (Acc.no. D00356.1) و PVY⁰-UK (Acc.no. KY112748) و *N. benthamiana* مایه‌کوبی شدند. همچنین مایه‌کوبی PVY⁰ با شته به‌طور مجزا انجام شد. دو روز قبل و دو روز بعد از مایه‌کوبی گیاهچه‌های *N. benthamiana*، MAP به صورت مستقیم و به مقدار ۳۰۰ µg به محیط ریزوسفر در گلدان‌ها اضافه شد. آلودگی گیاهچه‌های *N. benthamiana* با هر یک از ویروس‌ها توسط آزمون Quantitative-ELISA و میزان نسخه‌های ژنی PVY⁰ توسط آزمون Real-time RT-PCR تا ۱۴ روز بعد از مایه‌کوبی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون الایزا نشان داد تیمار گیاهچه‌های *N. benthamiana* با MAP باعث کاهش معنی‌دار تیتراژ هر یک از ویروس‌ها تا ۱۴ روز پس از تیمار شده است. نتایج Real-time PCR بیانگر کاهش میزان حضور نسخه‌های ژنوم PVY⁰ تا ۵/۲ برابر در مقایسه با شاهد آلوده بود. همچنین مشخص شد پروتئین MAP به میزان بیشتری باعث کنترل PVY⁰ نسبت به CMV-Fny می‌شود. نتایج آزمون انتقال با ناقل حاکی از آن بود که MAP موجب کاهش انتقال PVY⁰ با شته نمی‌شود. همچنین وزن‌های تر و خشک اندام‌های مختلف و نیز مقدار فنل در گیاهچه‌های *N. benthamiana* تیمار شده با MAP افزایش نشان دادند.

کلمات کلیدی: پروتئین غیرفعال کننده ریبوزوم، فاکتور رشدی، فعالیت ضد ویروسی، *Mirabilis jalapa*، MAP

The effect of mirabilis antiviral protein (MAP) in infections by Cucumber mosaic virus (CMV) and Potato virus Y (PVY) in *Nicotiana benthamiana* plants under greenhouse condition

Farshad Rakhshandehroo[✉], Zahra Pazooki, Saeed Rezaee

Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [✉] Rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir

Received: 10 Aug 2021

Revised: 23 Oct 2021

Accepted: 4 Dec 2021

Abstract

In this study using with the Mirabilis antiviral protein (MAP), it was attempted to explore the MAP controlling effect mechanism as well its antiviral activity against the Cucumber mosaic virus-Fny (CMV) and Potato virus Y strain O (PVY⁰) under the greenhouse condition. Toward this aim, MAP was first isolated from different fractions of the crude extracts mixture of the leaves and roots of the four o'clock plant and then *Nicotiana benthamiana* seedlings were cultivated in 50 g pods and mechanically inoculated with the PVY⁰-UK (Acc.no. KY112748) and CMV-Fny (Acc.no. D00356.1) at 4 to 6 leaf stages. PVY⁰ inoculation was also separately done by the aphid. MAP was administrated directly into the rhizosphere area of the pods at the concentration of 300 µg in two days after and two days before seedling inoculations. Infection with each of the inoculated viruses in MAP treated *benthamiana* plant seedlings were then assessed by DAS-ELISA, 14 days after inoculations. Using with the Real-time RT-PCR, PVY⁰ transcript levels was assessed at this time. Results showed that soil treatments of the *benthamiana* plant seedling with the MAP significantly decreased the titre of the tested viruses up to 14 days after treatments. Results of the Real-time RT-PCR indicated to the significant decrease in PVY⁰ transcript level compared with the infected control plant. It was also revealed that MAP is more effective in controlling PVY⁰ compared to CMV-Fny. Results indicated that MAP has not inhibited the PVY⁰ transmission by the aphid vector. The dry and wet weights and the phenol content were also increased in *benthamiana* plants treated with the MAP.

Keywords: Antiviral Activity, Morphological Factor, MAP, *Mirabilis jalapa*, Ribosome Inactivating Protein

How to cite:

Rakhshandehroo F, Pazooki Z, Rezaee S, 2022. The effect of mirabilis antiviral protein (MAP) in infections by Cucumber mosaic virus (CMV) and Potato virus Y (PVY) in *Nicotiana benthamiana* plants under greenhouse condition. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (3): 51-64.

مقدمه

ویروس‌های گیاهی پارازیت‌های اجباری هستند و جهت بقا و تکثیر از سیستم بیان ژن میزبان برای تولید پروتئین‌های خود استفاده می‌نمایند. تولید پروتئین ویروس‌ها و تکثیر آنها در سلول‌های گیاه میزبان به تدریج موجب کاهش سطح انرژی سلول‌ها و اختلال در متابولیسم و واکنش‌های تنفسی و فتوسنتزی در آنها و در نهایت مرگ میزبان می‌شود. لذا مبارزه با آنها برابر با مبارزه با سیستم ژنتیکی میزبان و بی‌نظمی متابولیکی آن می‌باشد. توجه محققین امروزه به استفاده از ترکیبات گیاهی معطوف شده است که علاوه بر اثرات کنترل کنندگی قابل توجه علیه بیمارگرهای گیاهی برای زیست بوم خطرناک نبوده و در طبیعت نیز ماندگار نمی‌باشند و به سرعت تجزیه شده و به چرخه طبیعی زیستی باز می‌گردند. چنین ترکیباتی با حفظ سلامت گیاهان موجب افزایش توان زیستی آنها شده و سیستم‌های مقاومتی خاص و مسیرهای ژنتیکی و بیوشیمیایی ویژه‌ای را در آنها فعال می‌سازند که موجب کنترل آفات و بیمارگرهای گیاهی مختلف می‌شوند. در این بین محققین تاکنون توانسته‌اند با استفاده از عصاره‌های آبی و الکلی گیاهان عالی و نیز کمپوست و کنجاله‌های زیستی در امر مبارزه ویروس‌های گیاهی تحقیقات کاربردی و موثری را انجام دهند (Waziri et al. 2015). نتایج پژوهش‌های گذشته مشخص ساخته است که ترکیبات مختلفی در عصاره خام گیاهان با ماهیت‌های پروتئینی و غیرپروتئینی وجود دارد که می‌توانند به طور مستقیم با تخریب فیزیکی پیکره‌های ویروسی و یا به طور غیرمستقیم با القاء دفاع سیستمیک در گیاهان موجب محدود شدن تکثیر و توسعه ویروس‌ها در گیاهان شوند (Jassim et al. 2003). به عنوان نمونه در تحقیقی مشخص گردید عصاره برگ گیاه معین التجاری *Clerodendrum aculeatum* (L.) Schltdl. و ریشه گیاه شب رنگی افشان *Clerodendrum aculeatum* (L.) Schltdl. با القاء دفاع سیستمیک در گیاه خربزه درختی (*Carica papaya* L.) می‌توانند موجب کنترل آلودگی حاصل از ویروس لکه حلقوی پاپایا *Papaya ring spot virus* شوند (Singh et al., 2011). همچنین در تحقیقی که به تازگی انجام پذیرفت مشخص گردید عصاره چند گونه ریز جلبک می‌تواند موجب تحریک دفاع سیستمیک در برابر آلودگی ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی *Tomato mosaic virus* در گیاه گوجه‌فرنگی گردد (Elsharkawy et al., 2022).

یکی از مکانیسم‌های دفاعی بکار گرفته شده بوسیله تعدادی از گونه‌های گیاهان عالی، مواد شیمیایی درگیرشونده‌ای هستند

که ماهیت پروتئینی با وزن مولکولی کم داشته و پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم *Ribosome inactivating proteins* (RIPs) نامیده می‌شوند (Walsh et al., 2013). این نوع از پروتئین‌ها توجه زیادی را در تحقیقات زیست‌شناسی و پزشکی به خود جلب کرده‌اند. به دلیل فعالیت منحصر به فرد آنها در سلول‌های گیاهی انسانی و جانوری این مواد می‌توانند به میزان زیاد و در پاسخ به آلودگی‌ها و تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان جمع شوند و با غیرفعال نمودن ریبوزوم‌ها فرایند پروتئین‌سازی را متوقف نمایند (Waziri et al., 2015). *MAP* (Mirabilis antiviral proteins-MAP) از لحاظ ماهیت از نوع RIPs های گروه یک می‌باشد. این پروتئین دارای وزن مولکولی کم (۲۷ کیلودالتون) و متشکل از ۲۸۰ اسید آمینه بوده و در تمام بافت‌های گیاه لاله عباسی *Mirabilis jalapa* L. (four o'clock plant) یافت می‌شود (Habuka et al. 1989). پروتئین *MAP*، پروتئینی محلول، بازی و غنی از اسید آمینه لایزین می‌باشد. این گیاه دارویی از گیاهان دایمی متعلق به خانواده گل کاغذیان (*Nyctaginaceae*) می‌باشد و بومی آمریکا بوده ولی به عنوان گل زینتی در تمام نقاط جهان کاشته می‌شود. در طب سنتی کشورهای هند، چین، مصر و ایران از عصاره این گیاه سال‌های متمادی جهت درمان بیماری‌هایی همچون اسهال خونی، سمیت کبدی (هپاتوتوکسیستی) و ناراحتی‌های عصبی استفاده شده است (Yang et al. 2001; Oladunmoye 2007). نقش پروتئین *MAP* در درمان سرطان نیز اثبات شده است (Jyothi et al. 2013).

پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم (RIPs) خانواده‌ای از آنزیم‌های سمی با ماهیت پروتئینی هستند که در مقادیر بالا توسط بعضی از گیاهان سنتز شده‌اند و به طور گسترده در این گیاهان پخش می‌شوند و زیرواحد *RNA 28S* ریبوزومی را در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها دپورینه نموده و بدین ترتیب با اختلال در کار ریبوزوم‌ها در تولید پروتئین‌ها وقفه ایجاد می‌کنند. (Walsh et al., 2013) پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم با فعالیت N- گلیکوسیدازی شان، پیوند بین آدنین و گوانین درتوالی بسیار حفاظت شده GAGA واقع در حلقه آلفا-سارسین/ریسین (S/R) زیرواحد *28S* آر.ان.ای ریبوزومی را جدا (دپورینه) می‌کنند. و این امر باعث توقف سنتز پروتئین می‌شود. امروزه مشخص شده است که ۵۰ نوع از پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم وجود دارند که صرف نظر از دپوریناسیون آر.ان.ای ریبوزومی، توانایی دپورینه کردن DNA (تک رشته‌ای و دو رشته‌ای و سوپرکویل شده)، RNA (دارای cap)، توالی پلی A و

برای این منظور در فصل خرداد از گیاه لاله عباسی صورتی که به صورت خودرو در شهرستان ورامین رشد یافته بود استفاده شد. MAP با مقدار بالا در ریشه و برگ گیاه *M. jalapa* تجمع پیدا می‌کند (Kubo et al. 1990). برای بررسی بیشترین مقدار حضور MAP در بافت‌های گیاه لاله عباسی جمع‌آوری شده در این پژوهش استخراج به صورت جداگانه از بافت ریشه و یا از ترکیب همزمان بافت ریشه و برگ گیاه لاله عباسی بهاره انجام شد. بافت‌های مختلف گیاه لاله عباسی قبل از استخراج پروتئین در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شدند. استخراج پروتئین MAP مطابق روش (Irvin 1975) انجام پذیرفت. ابتدا میزان ۵۰ گرم از بافت ریشه و یا ترکیب همزمان بافت‌های ریشه و برگ به طور جداگانه در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل توسط دستگاه مخلوط کن به خوبی همگن شد سپس حدود ۶۰ میلی لیتر از عصاره با میزان ۶۰ میلی لیتر از ماده آمونیم سولفات ۴۰ درصد به مخلوط حاصل اضافه و خوب بهم زده شد. مخلوط حاصل برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و با میزان نیروی گریز از مرکز 10000 g سانتریفوژ شد. به روشین میزان ۱۰۰ درصد آمونیم سولفات اضافه شد و مخلوط حاصل با شرایط قبل مجدد سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با ۱۰ میلی لیتر بافر 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 0.2 mM EDTA ترکیب و در کیسه دیالیز وارد شده و درون ۲۰۰ میلی لیتر بافر مذکور در یخچال دیالیز شد. تعویض بافر هر ۱۲ ساعت انجام شد. در نهایت محتوی درون کیسه دیالیز دارای پروتئین استخراج شده درون یک ستون DEAE-cellulose که از قبل با بافر فوق کالیبره شده بود ریخته و سپس شسته شد و بخش‌های پروتئین به صورت مجزا جمع‌آوری گردید. حضور پروتئین MAP استخراج شده از بافت‌های ریشه و برگ لاله عباسی با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ناپیوسته به روش (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور پس از دناتوره شدن پروتئین توسط حرارت و ماده SDS، نمونه‌ها به میزان ۱۴ میکرولیتر بر روی ژل پلی اکریل آمید ناپیوسته ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. الکتروفورز SDS-PAGE مطابق روش استاندارد (Laemmli 1970) انجام شد. بعد از دو تا سه ساعت الکتروفورز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با ولتاژ ۳۵۰ ولت، ژل با رنگ Coomassie brilliant blue R-250 (0.5%, w/v) برای ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد.

mRNA در ویروس‌ها را هم دارند که نشان از فعالیت گسترده علیه ویروس‌های گیاهی، حیوانی و انسانی حتی HIV دارد (Zhu et al. 2018). همچنین فعالیت ضد قارچی، ضد ویروسی و حشره‌کشی پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم در گیاهان در شرایط درون شیشه و در گیاهان ترانسژنیک به اثبات رسیده است (Walsh et al. 2013). پروتئین MAP یک مهار کننده قوی تکثیر ویروس‌های گیاهی و جانوری بوده و در گذشته مشخص شده است که به طور موثری می‌تواند مانع تولید پروتئین در ویروس‌های موزاییک توتون (TMV)، موزاییک گوجه‌فرنگی ToMV، ویروس X سیب‌زمینی (PVX) و ویروس Y سیب زمینی (PVY) شود (Kusumawati et al. 2015). بتازگی مشخص شد اسپری عصاره ریشه *M. jalapa* بر روی برگ گیاه محک لوبیای چشم بلبلی *Vigna unguiculata* می‌تواند باعث کاهش تعداد لکه‌های موضعی نکروز ایجاد شده توسط ویروس *Groundnut bud necrosis* (GBNV) در مقایسه با نمونه شاهد منفی که عصاره را دریافت نکرده‌اند، تحت شرایط گلخانه‌ای شود و همزمان موجب کاهش تیترو ویروس گردد (Sangeetha et al. 2020).

همچنین نقش پروتئین MAP ها در کنترل ویروس‌های جانوری همچون هپاتیت نوع C و نیز HIV در گذشته اثبات شده است (Fan et al. 2009). با وجود آنکه مشخص شده که ترکیبات فنلی موجود در عصاره خام گیاهان از قابلیت القاء دفاع‌های سیستمیک در گیاهان برخوردار است (Murphy 2001) ولی هنوز بسیاری از جنبه‌های مولکولی اثر ضد ویروس آن نامشخص باقی مانده است. در این تحقیق تاثیر ضد ویروسی پروتئین MAP گیاه لاله عباسی از طریق بررسی اثر پروتئین در آلودگی CMV-Fny و PVY⁰ در گیاه *N. benthamiana* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تاثیر پروتئین مذکور در توان انتقال PVY با ناقل شته *Myzus persicae* (Sulzer) نیز مورد بررسی واقع گردید. ویروس‌های مذکور از این جهت انتخاب شدند که در گذشته نقش تاثیر تنش‌های محیطی مانند افزایش دما و CO₂ در بقاء و روش تکثیر آنها در سلول های گیاه *N. benthamiana* به اثبات رسیده بود (Del toro et al. 2015).

مواد و روش‌ها

استخراج پروتئین MAP از گیاه لاله عباسی و تعیین کمیت و کیفیت آن

تیمار گیاهچه‌های *N. benthamiana* با MAP و مایه کوبی با ویروس های PVY و CMV

کاشت، نگهداری و تیمار گیاهچه‌ها در شرایط استاندارد گلخانه ای شامل 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰٪ و دوران متناوب نوری (۱۶ ساعت) و تاریکی (هشت ساعت) انجام شد. گیاهچه‌های *N. benthamiana* در گلدان‌های ۵۰ گرمی کاشته شده و در مرحله چهار تا شش برگی توسط بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۴/۴ به صورت مکانیکی با نسبت یک به یک وزنی/حجمی (بافت برگ/بافر) توسط ویروس های (Acc.no. D00356.1) CMV-Fny و (Acc.no. KY112748) PVY^o-UK تهیه شده از گروه ویروس‌شناسی مرکز تحقیقات علوم زیستی شهر مادرید کشور اسپانیا (CSIC-CIB- Mardid-Spain) مایه‌کوبی شدند. دو روز قبل و دو روز بعد از مایه‌کوبی گیاهچه‌های *N. benthamiana*، عصاره MAP به صورت مستقیم و به مقدار در مجموع $300 \mu\text{g}$ (در $150 \mu\text{g}$ در دو روز قبل و $150 \mu\text{g}$ در دو روز بعد از مایه کوبی با ویروس) به خاک پای گلدان‌ها اضافه شد و گیاهچه‌های بنتامیانا ۱۴ روز پس از آلودگی به هریک از ویروس‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمون در دو تکرار مستقل انجام شد و در هر تکرار تعداد ۱۱ گیاهچه بنتامیانا با CMV-Fny مایه کوبی و هر گیاه بنتامیانا با میزان ۳۰۰ میکروگرم از MAP تیمار شد و همچنین تعداد سه گیاهچه سالم با مقدار ۳۰۰ میکروگرم از MAP تیمار و سه گیاهچه سالم دیگر نیز تنها آب به جای MAP دریافت نمودند. همچنین تعداد سه گیاهچه آلوده به CMV-Fny که با MAP تیمار نشده بود در کنار نمونه‌های به عنوان شاهد قرار داده شد (در مجموع ۲۰ گیاهچه بنتامیانا برای تحقیق بر روی تاثیر MAP در CMV). همزمان تعداد ۱۱ گیاهچه *N. benthamiana* به طور جداگانه با PVY^o و هر گیاهچه با میزان ۳۰۰ میکروگرم از MAP تیمار شد. همچنین تعداد سه گیاهچه سالم با مقدار ۳۰۰ ماکروگرم از MAP و ۳ گیاهچه سالم نیز تنها آب به جای MAP دریافت نمودند. همچنین تعداد سه گیاهچه آلوده به PVY^o که با MAP تیمار نشده بود در کنار نمونه‌های به عنوان شاهد قرار داده شد (در مجموع ۲۰ گیاهچه بنتامیانا برای تحقیق بر روی تاثیر MAP در PVY^o).

تاثیر MAP در توان انتقال PVY^o توسط شته ناقل *Myzus persicae* مطابق روش (Del Toro et al. 2019) انجام پذیرفت برای این منظور پوره‌های سن سوم و چهارم حاصل از کلنی شته‌های خالص *M. persicae* (اهداء شته از گروه ویروس شناسی مرکز تحقیقات علوم زیستی مادرید (CIB-CSIC) به

مدت سه ساعت درون ظروف دربسته مرطوب گرسنه نگاه داشته شدند. آنگاه بر روی سطح فوقانی برگ بنتامیانا آلوده به PVY^o که ۱۴ روز قبل توسط عصاره آلوده به ویروس مایه کوبی مکانیکی شده بود به مدت ۱۵ دقیقه جهت تغذیه گیرندگی قرار داده شدند. سپس با استفاده از قلمو و در زیر بینوکولر تعداد پنج شته تغذیه کرده و آلوده شده به PVY^o بر روی سطح فوقانی برگ‌های سالم جهت تغذیه دهندگی قرار داده شدند و به آنها اجازه داده شد تا ۱۵ دقیقه تغذیه نموده و سپس توسط شته کش APHI-con کشته شدند. گیاهچه‌ها پس از شسته شدن سطح برگ به اتاق‌های رشد جهت ارزیابی-های بعدی منتقل شدند. مایه کوبی PVY^o با شته و یا به صورت مکانیکی در دو تکرار و در هر تکرار با تعداد ۹ گیاهچه *N. benthamiana* انجام پذیرفت. گیاهچه‌های مایه کوبی شده با MAP تیمار شدند. همزمان تعداد ۹ گیاه *N. benthamiana* نیز به عنوان شاهد با بافر فسفات پتاسیم مایه کوبی شدند. بنتامیانا‌های مورد ارزیابی تا زمان بررسی سرولوژیکی در اتاقک-های رشد قرار گرفتند.

ارزیابی های سرولوژیکی میزان پروتئین پوششی ویروسی های CMV و PVY

تعیین تیترو ویروس در گیاهچه‌های *N. benthamiana* مایه کوبی شده به صورت مکانیکی با هر دو ویروس و یا با PVY توسط شته *M. persicae* بعد از ۱۴ روز پس از مایه‌کوبی با استفاده از آزمون الایزای کمی Quantitative -DAS-ELISA مطابق روش (Mondal et al. 2016) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور گیاهان نیکوتیانا بنتامیانا‌هایی که با CMV یا PVY بصورت مکانیکی و یا با PVY توسط شته مایه کوبی شده بودند و توسط بافر فسفات پتاسیم یا مقدار ۳۰۰ میکروگرم MAP تیمار شده بودند توسط بافر فسفات پتاسیم pH ۷/۴ استخراج شدند. بعد از اضافه نمودن بافر سوبسترا دارای ماده پارانیتروفنیل فسفات (Sanofi, French) درون چاهک‌ها با فاصله نیم ساعت برای بروز واکنش رنگ زایی و حضور رنگ زرد با دستگاه الایزا خوان مدل (ELX 800-Biotek) در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانش‌ها انجام پذیرفت. با استفاده از فرمول $n = X + 3SD$ مقایسه میزان جذب نمونه‌ها صورت پذیرفت. در این فرمول X جذب نمونه‌های سالم و غیر آلوده بوده و جذب نمونه‌هایی که معادل یا برابر عدد n بود معادل آلوده در نظر گرفته شد. آزمون‌ها در چهار تکرار جدا انجام شد. برای مقایسه کمی داده‌ها از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی استفاده شد

با One-Tube Venlo, Limburgh, Netherlands) به صورت ۵۰ درجه سلسیوس ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سلسیوس سه دقیقه و ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۹۵ درجه ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه ۲۰ ثانیه و شیب حرارتی نهایی افزایشی برای محاسبه دمای ذوب (melting) از ۶۰ تا ۹۰ درجه سلسیوس با افزایش یک درجه سلسیوس در هر پنج ثانیه. واکنش‌های پی سی آر با سه بار تکرار و دو تکرار برای هر نمونه در هر با تکرار واکنش انجام پذیرفت. بررسی میزان تکثیر ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ و توسط نرم افزار Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen) برای هر نمونه مستقل انجام پذیرفت. آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY, USA) انجام شد.

ارزیابی فاکتورهای مرفولوژیکی گیاه‌های نیکوتیانا بنتامیانا تیمار شده با MAP

جهت بررسی سازوکار تاثیر غیرمستقیم پروتئین MAP در کنترل ویروس‌های گیاهی از طریق تاثیر در توان زیستی گیاه، برخی از فاکتورهای مرفولوژیکی گیاه‌های نیکوتیانا بنتامیانا تیمار شده مانند وزن‌های تر و خشک ساقه، ریشه و برگ در زمان ۱۴ روز پس از تیمار گیاهچه‌های نیکوتیانا بنتامیانا سالم و نیز طول ساقه در زمان‌های ۳، ۷ و ۱۴ روز پس از تیمار در مقایسه با نیکوتیانا بنتامیانا‌های غیر تیمار مطابق با روش (Sadeghian et al. 2013) مورد ارزیابی قرار گرفت. وزن خشک با قراردادن ریشه و ساقه در آون 50°C به مدت سه روز اندازه گیری و یادداشت شد. همچنین به منظور بررسی تاثیر بهترین مقدار کنترل کننده MAP در میزان محتوی پروتئین کل بافت برگ‌ها، غلظت پروتئین کل بافت برگ‌های نیکوتیانا بنتامیانا مورد ارزیابی با استفاده از روش برادفورد تعیین شد. در این روش از سریال رقت پروتئین سرم گوساله گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین تام استفاده شد (Bradford 1976). از این روش جهت تعیین مقدار پروتئین تام موجود در بافت برگ نمونه‌های سالم و آلوده نیکوتیانا بنتامیانا تیمار شده با مقدار ۳۰۰ میکروگرم MAP استفاده شد. ارزیابی‌های شاخص‌های رشدی بنتامیاناها در گلخانه در سه تکرار و به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار آماری SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY, USA) استفاده شد.

و با استفاده از آزمون دانکن میانگین‌ها نرمال شده و با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیزهای آماری و هیستوگرام مربوطه ترسیم گردید.

آزمون Real-time RT-PCR برای بررسی میزان حضور نسخه های ژن PVY

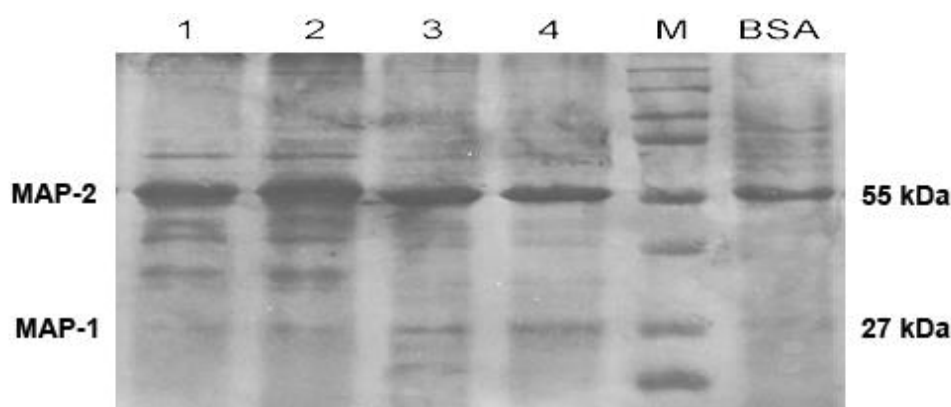
از آنجایی که MAP در کاهش میزان تیترا PVY بر اساس نتایج آزمون الایزا موثرتر از CMV عمل نمود لذا از آزمون پی سی آر کمی برای محاسبه میزان حضور نسخه‌های ژنی PVY مطابق دستورالعمل موجود (Del Toro et al. 2015) در نمونه‌هایی استفاده شده که با بهترین مقدار کنترل کننده MAP ($300\text{ }\mu\text{g}$) تیمار شده بودند. این آزمون در سه تکرار و در زمان های ۷ و ۱۴ روز بعد از مایه‌کوبی ویروس انجام شد. برای این منظور آر.ان.ای کل (total RNA) بافت نمونه‌ها از برگ مایه‌زنی شده به نحوی استخراج شد که در هر استخراج از سه برش گرد با قطر یک سانتی‌متر سطح برگ استفاده شد. استخراج RNA کل با استفاده از معرف TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد و حذف آلودگی DNA از نمونه‌ها توسط کیت Turbo DNA-free kit (Ambion, Austin, TX, USA) انجام شد. آزمون پی سی آر کمی به صورت تک تیوب در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر حاوی واکنش‌گرهای ۵/۷ میکرولیتر ماده Brilliant III Ultra-Fast RT-qPCR Master Mix (Agilent, Santa Clara, CA, USA)، شامل ۲/۵ میلی مولار MgCl_2 ، ۵/۱ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۷۵/۰ میکرولیتر (۲۰ واحد آنزیم در میکرولیتر) آنزیم Reverse transcriptase شرکت (Agilent, USA)، ۱۵/۰ میکرولیتر از ماده Dithiothreitol (Agilent, USA) با مقدار ۱۰۰ میلی مولار، ۳/۰ میکرومولار از هر کدام از آغازگرها با غلظت پنج میکرومولار و سه میکرولیتر از آر.ان.ای استخراج شده با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر انجام شد. برای این آزمون از آغازگرهای (۵' - PVY-Fw و ۳' - PVY-Rv) (CTGTGGGGACAAAGGGAGTA-3' و GGATGCTTGCGGATTTTCATA-3') برای تکثیر بخشی از پروتئین پوششی PVY باندازه حدود ۲۰۰ جفت باز استفاده شد. همچنین از آغازگرهای (۵' - 18SrRNA-Fw و ۳' - GCCCCTTGCTGCGATGATTC-3') و (۵' - GCTGCCTTCCTTGGATGTGG-3') برای تکثیر ژن 18S rRNA گیاه نیکوتیانا بنتامیانا به عنوان کنترل داخلی و جهت نرمال سازی واکنش پی سی آر استفاده شد. واکنش پی سی آر در دستگاه Rotor-Gene Q thermal cycler (Qiagen) انجام شد.

آزمون از آب برای تیمار برخی گیاه های نیکوتیانا بنتامیانا به عنوان گیاه کنترل منفی استفاده شد و مقایسه‌های مربوط به تغییر محتوی فنل در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل منفی انجام شد.

نتایج

پس از استخراج پروتئین MAP نیمه خالص از بافت‌های مختلف گیاه لاله عباسی مشخص شد که غلظت MAP با وزن مولکولی ۲۷ kDa در بافت ریشه بسیار کمتر از آنچیزی است که به طور همزمان از بافت‌های ریشه و برگ نمونه‌های لاله عباسی استخراج شده است (شکل ۱). اگرچه در تمام استخراج‌ها باند اختصاصی ۲۷ کیلودالتونی متعلق به MAP-1 برای نمونه‌های لاله عباسی نمایان شد. در ژل الکتروفورز MAP نیمه خالص استخراج شده از بافت‌های مختلف گیاه لاله عباسی همچنین پروتئین با وزن مولکولی ۵۵ kDa مربوط به ایزوفرم دیگر پروتئین با نام MAP-2 مشاهده شد. بر خلاف MAP-1 غلظت این پروتئین در بافت ریشه بسیار بیشتر از بافت‌های برگ و ریشه گیاه لاله عباسی بود (شکل ۱).

تعیین مقدار فنل کل در نیکوتیانا بنتامیانا‌های تیمار شده با MAP در ادامه بررسی شاخص‌های رشدی، یک شاخص بیوشیمیایی مرتبط با متابولیسم نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور مقدار فنل کل بافت برگ گیاهچه‌های نیکوتیانا بنتامیانا‌های سالم در زمان‌های ۳، ۷ و ۱۴ روز بعد از تیمار با مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم MAP محاسبه گردید. برای این منظور فنل کل بافت نیکوتیانا بنتامیانا‌های تیمار مطابق روش (Hemm et al. 2004) به شرح ذیل استخراج شد: ابتدا میزان ۰/۱ گرم بافت برگ را در یک میلی لیتر متانول ۸۰٪ به خوبی خرد نموده و برای ۱۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد مخلوط را تکان داده شد. سپس میزان یک میلی لیتر از عصاره متانولی فوق به پنج میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین (Folin Ciocalteu) یک نرمال اضافه شد و مخلوط واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد برای سه تا پنج دقیقه نگهداری و میزان آبی شدن رنگ محلول در طول موج ۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر محاسبه شد. این آزمون نیز با سه تکرار و به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. در کنار MAP در این

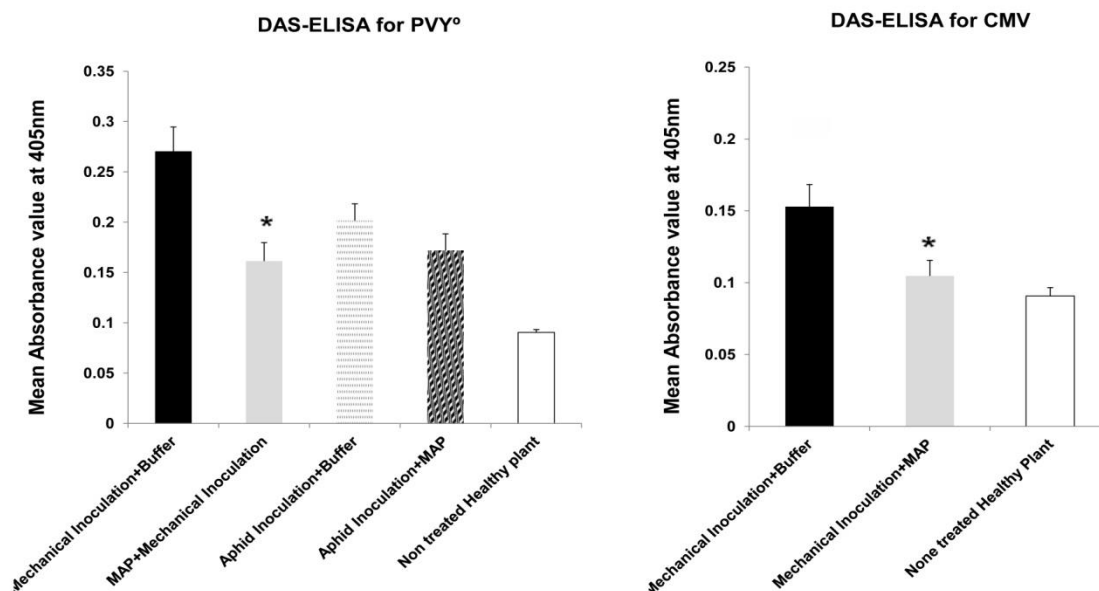


شکل ۱. پروفیل پروتئینی حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE آماده پروتئینی خالص شده از برگ لاله عباسی که با استفاده از کیسه دیالیز (چاهک های ۱ و ۲: MAP استخراج شده از بافت ریشه، چاهک‌های ۳ و ۴: MAP استخراج شده از بافت‌های ریشه و برگ گیاه لاله عباسی) انجام پذیرفت. باند اختصاصی حدود ۲۷ کیلودالتون مخصوص MAP در بین سایر باندهای پروتئینی مشاهده می شود. در کنار نمونه های لاله عباسی از مقدار ۱۰۰ μg پروتئین BSA برای سنجش مقدار MAP استفاده شد. همچنین از مارکر وزن مولکولی (M) شرکت (New England Biolabs Inc, USA) در کنار نمونه ها استفاده شد. میزان MAP با مقایسه شدت نور باند با BSA توسط نرم افزار Image J حدود 100 μg در میلی لیتر عصاره استخراج شده تعیین گردید.

Fig. 1. Protein profile obtained by SDS-PAGE for the protein extract purified from mirabilis leaves performed with dialysis bag (wells 1 to 4 are for different mirabilis plants). MAP specific protein band with a size about 27kDa observed among the other protein bands. BSA with a concentration of 100 μg was used beside the *mirabilis jalapa* plant samples to assess the MAP concentration. Molecular protein marker (New England Biolabs Inc, USA) used beside the other samples. MAP concentration was determined about 100 μg/ml in extracted sap by comparing with the intensity of the BSA band using with the Image J software.

هر یک از ویروس‌ها توسط آزمون الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار تیتراژ هر دو ویروس در انتقال مکانیکی در مقایسه با گیاه شاهد بود (شکل ۲). کاربرد مقدار ۳۰۰ میکروگرم پروتئین توانسته بود موجب کاهش معنی‌دار تیتراژ PVY^0 و CMV-Fny به ترتیب به میزان ۵۸٪ و ۵۰٪ شود (شکل ۲).

همچنین با مقایسه شدت نور باند حاصل از BSA (با مقدار ۱۰۰۰ μg)، غلظت MAP در عصاره استخراج شده، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تشخیص داده شد. به منظور بررسی تاثیر MAP در کاهش تیتراژ ویروس‌های PVY^0 و CMV-Fny و نیز توان انتقال PVY با شته ناقل، گیاهچه‌های *N. benthamiana* مایه‌کوبی شده در ۱۴ روز پس از مایه‌کوبی با

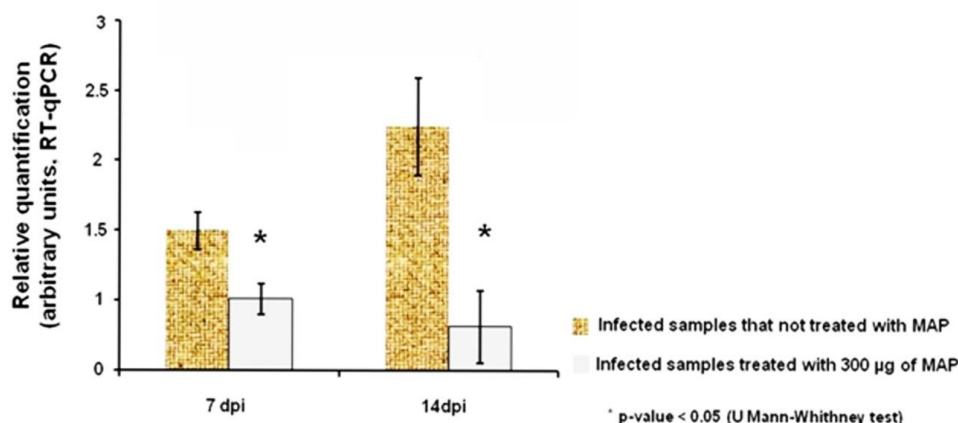


شکل ۲. مقایسه میانگین جذب نوری (در ۴۰۵ طول موج نانومتر) حاصل از آزمون DAS-ELISA برای بررسی اثر پروتئین MAP در کاهش مقدار ویروس‌های PVY^0 و CMV-Fny در گیاهچه‌های *N. benthamiana* تا ۱۴ روز بعد از آلودگی. همزمان، تعدادی از گیاهچه‌های توتون به عنوان شاهد با بافر فسفات پتاسیم آلوده شدند. جهت مایه‌کوبی PVY^0 از مایه‌کوبی مکانیکی و مایه‌کوبی با شته استفاده شد ولی برای CMV-Fny فقط از مایه‌کوبی مکانیکی استفاده شد. پروتئین MAP موجب کاهش معنی‌دار تیتراژ CMV-Fny و PVY^0 تا ۱۴ روز بعد از آلودگی با مایه‌کوبی مکانیکی در مقایسه با نمونه شاهد شد در صورتی که تاثیر معنی‌دار MAP بر تیتراژ PVY^0 بعد از مایه‌کوبی با شته مشاهده نشد. ستاره بر روی هیستوگرام بیانگر سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) می‌باشد.

Fig. 2. Comparison of the mean light absorbance values (at 405 nm wave length) obtained by DAS-ELISA for evaluating the MAP protein antiviral effect in decreasing the CMV-Fny and PVY^0 titre in *N. benthamiana* seedlings up to 14 days after inoculation. Some *N. benthamiana* seedlings were just mechanically inoculated by the buffer as for control. For PVY^0 transmission, mechanical inoculations as well as inoculation with the aphid were done but CMV-Fny, was just mechanically inoculated. MAP protein significantly decreased the CMV-Fny and PVY^0 titre compared to the control plant, upto 14 days after inoculation but did not show any significant effect on the PVY^0 titre after aphid inoculation. Star on the histogram indicated to the significance level ($p < 0.05$).

مقایسه با گیاهچه‌های *N. benthamiana* آلوده شده به PVY^0 و تیمار نشده در زمان‌های ۷ و ۱۴ روز پس از مایه‌زنی با ویروس به طور معنی‌داری کاهش یافته است و تا ۱۴ روز پس از مایه‌کوبی به میزان ۲/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد آلوده کاهش نشان داده است (شکل ۳).

با این وجود تفاوت معنی‌داری در تیتراژ PVY^0 در انتقال با شته وجود نداشت به این مفهوم که MAP موجب القاء سیستم‌های دفاع گیاه برای مقابله در برابر شته ناقل نمی‌شود. نتایج آزمون Real-time RT-PCR نشان داد تعداد نسخه‌های ژنی PVY^0 در نمونه‌های تیمار شده با مقدار ۳۰۰ میکروگرم از MAP در



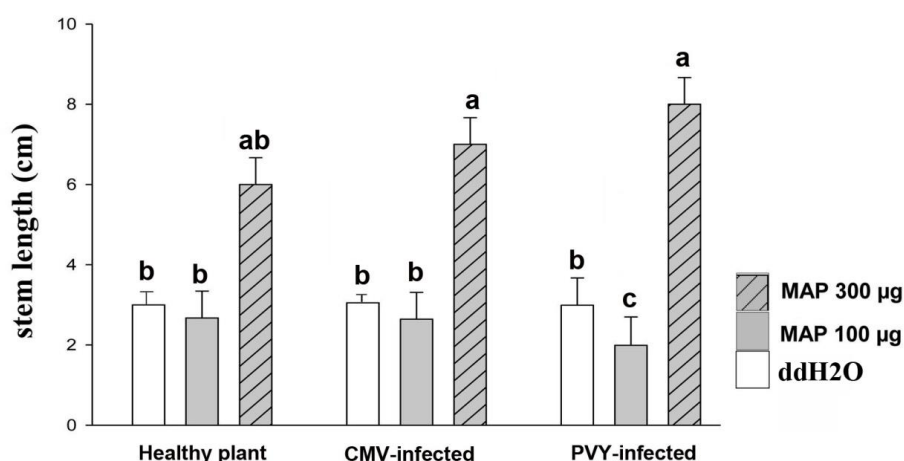
شکل ۳. هیستوگرام مربوط به نتایج quantitative RT-PCR برای بررسی تاثیر غلظت ۳۰۰ میکروگرم از MAP در کاهش میزان حضور نسخه های ژنی از PVY^o در زمان های ۷ و ۱۴ روز پس از مایه کوبی. ستاره بیانگر احتمال اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح $p < 0.05$ می باشد. برای PCR از آغازگر اختصاصی تکثیر کننده بخشی از ژنوم ویروس که مسئول کد نمودن پروتئین پوششی آن بود استفاده شد. تجزیه میانگین ها توسط آزمون U Mann-Whitney در نرم افزار SPSS انجام شده است. نتایج بیانگر کاهش معنی دار سطح نسخه های ژن PVY^o به میزان ۲/۵ برابر تا ۱۴ روز پس از مایه کوبی می باشد.

Fig. 3. Histogram for the quantitative RT-PCR pertaining to the effect of MAP at 300µg concentration on decreasing the PVY^o genomic transcript level at 7 and 14 days post inoculation. Star indicated the significant deference between the treatment at $p < 0.05$ level. A part of PVY^o genome that is responsible for encoding the coat protein was amplified by specific primers in PCR. Mean values were analyzed with the U Mann-Whitney test involved in SPSS software. Results indicated to the significant 2.5 fold decrease in the PVY^o- genomic transcript level up to 14 days post inoculation.

مقدار ۱۰۰ میکروگرم MAP تفاوت معنی داری مشاهده نگردید (شکل ۴).

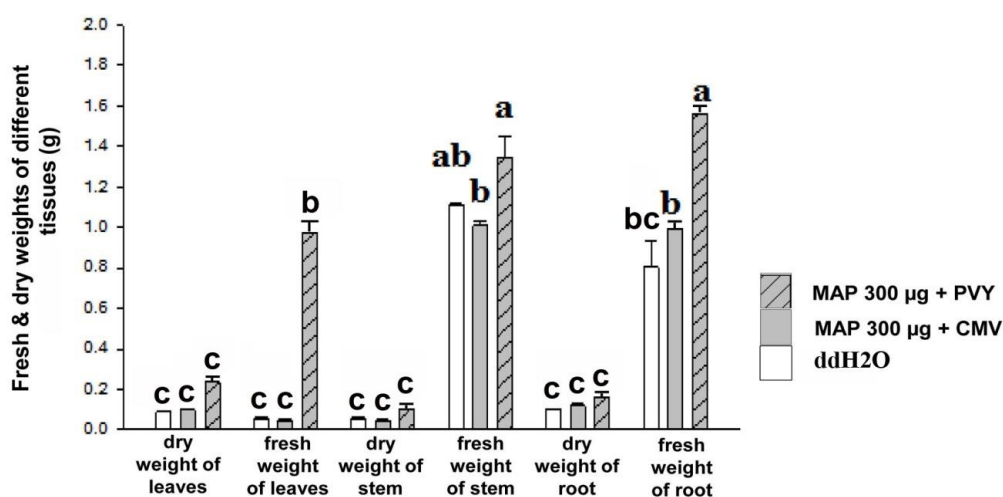
از آنجائی که مقدار ۱۰۰ میکروگرم MAP تاثیر قابل مشاهده ای در شاخص های رشدی گیاه نداشت لذا در بررسی میزان تغییر در وزن های تر و خشک بافت های ریشه، ساقه و برگ از تنها مقدار ۳۰۰ میکروگرم MAP استفاده شد. نتایج نشان داد در زمان آلودگی به PVY وزن های تر و خشک بافت های مختلف گیاهچه های *N. benthamiana* تیمار شده با مقدار ۳۰۰ میکروگرم MAP به طور معنی داری در مقایسه با شاهد تیمار شده با آب افزایش پیدا می کند، به طوری که بیشترین میزان افزایش در وزن های تر بافت های مختلف دیده شد (شکل ۵). وزن تر بافت های برگ، ساقه و ریشه گیاهچه های آلوده به PVY در مقایسه با گیاهچه های تیمار شده با آب به ترتیب به میزان ۵، ۲ و ۰/۵ برابر افزایش نشان دادند (شکل ۵). همچنین وزن خشک نمونه های تیمار شده با MAP و آلوده به PVY در مقایسه با توتون های شاهد که با MAP تیمار نشده بودند افزایش معنی داری را نشان داد. با این وجود در زمان آلودگی به CMV در توتون های تیمار شده با MAP در مقایسه با شاهد تیمار نشده تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل ۵).

جهت بررسی اثر کنترل کنندگی غیرمستقیم MAP، شاخص های رشدی در گیاهچه های *N. benthamiana* تیمار شده با مقدارهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم از MAP (در حجم خاک گلدان های مورد استفاده مطابق دستورالعمل توضیح داده شده در بخش مواد و روش تحقیق) در روز چهاردهم پس از تیمار، گلدان های آلوده با MAP مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. نتایج نشان داد MAP در مقدار ۳۰۰ میکروگرم باعث افزایش معنی دار رشد در گیاهچه های تیمار تا میزان ۲ برابر در مقایسه با نمونه های تیمار شده با آب شد، با این وجود اختلاف معنی داری در میزان افزایش رشد نمونه های تیمار شده با مقدار ۱۰۰ میکروگرم MAP و گیاهچه های تیمار شده با آب در نمونه های سالم مشاهده نشد (شکل ۴). در مقدار ۳۰۰ میکروگرم در گیاهان آلوده به PVY و CMV به ترتیب موجب افزایش معنی دار رشد به میزان ۲/۶ و ۲/۳ برابر نسبت به گیاه سالم تیمار نشده شد. این موضوع به این مفهوم است که گیاه های آلوده به PVY شاخص بهتر رشدی را نسبت به نمونه های آلوده به CMV از خود نشان دادند (شکل ۴). با این وجود در مقایسه گیاهچه های آلوده و تیمار نشده *N. benthamiana* با MAP با گیاهچه های آلوده تیمار شده با



شکل ۴. مقایسه اثر MAP در غلظت‌های مختلف ۱۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در افزایش طول ساقه بر حسب واحد سانتی‌متر در گیاهچه‌های *Nicotiana benthamiana* آلوده شده با CMV-Fny و PVY^o، ۱۴ روز پس از مایه کوبی با ویروس. در کنار نمونه‌های تیمار شده با MAP از گیاهچه‌های *Nicotiana benthamiana* تیمار شده با آب (ddH₂O) به عنوان شاهد برای مقایسه انجام شد. همچنین از نمونه‌های سالم آلوده نشده با ویروس جهت تیمار با MAP استفاده شد. حروف بر روی هیستوگرام بیانگر سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) می‌باشد.

Fig. 4. Comparing the effect of MAP at 100 and 300 µg concentrations on the stem length of the *Nicotiana benthamiana* seedling based on the centimetre unit, 14 days after inoculation with the CMV-Fny and PVY^o viruses. Treatment with the double distilled water (ddH₂O) considered as the control beside the MAP treated samples for comparisons. Letters on the histograms indicate the significant difference level ($P < 0.05$).

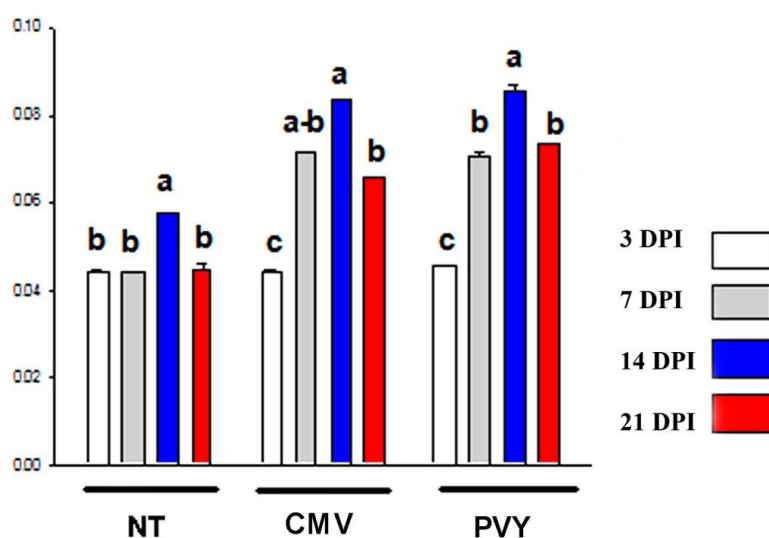


شکل ۵. مقایسه اثر MAP در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میزان وزن‌های تر و خشک بافت‌های مختلف گیاه *Nicotiana benthamiana*، ۱۴ روز پس از مایه کوبی با CMV-Fny و PVY^o، در کنار نمونه‌های تیمار شده با MAP تیمار با آب (ddH₂O) به عنوان شاهد برای مقایسه انجام شد. همچنین از نمونه‌های سالم آلوده نشده با ویروس جهت تیمار با MAP استفاده شد. حروف بر روی هیستوگرام بیانگر سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) می‌باشد.

Fig. 5. Comparing the effect of 300 µg concentration of MAP on the dry and fresh weights quantity of the *Nicotiana benthamiana* seedlings infected with CMV and PVY, 14 days after inoculation. Treatment with the double distilled water (ddH₂O) considered as the control beside the MAP treated samples for comparisons. Letters on the histograms indicated to the significant difference level ($P < 0.05$).

MAP افزایش پیدا می‌کند، با این وجود بیشترین میزان افزایش در نمونه‌های آلوده شده به PVY در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد (شکل ۶). در نمونه‌های تیمار شده با MAP بعد از آلودگی به PVY افزایش معنی‌دار پروتئین کل تا ۱/۵ برابر در مقایسه با نمونه‌های سالم تیمار شده با عصاره مشاهده شد. همچنین مقدار پروتئین کل بافت برگ توتون‌های تیمار شده با MAP آلوده به PVY به طور معنی‌دار بیشتر از گیاهچه‌های *N. benthamiana* تیمار شده با MAP و آلوده به CMV بود (شکل ۶).

میزان پروتئین تام بافت برگ گیاهچه‌های *N. benthamiana* تیمار شده با عصاره در نمونه‌های آلوده به ویروس‌های PVY و CMV در مقایسه با نمونه‌های شاهد تیمار نشده مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در نمونه‌های شاهد و تیمار شده با ویروس، غلظت پروتئین کل بافت برگ تا روز چهاردهم بعد از تیمار نمونه‌های مورد بررسی به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده و سپس تا روز ۲۱ پس از تیمار کاهش پیدا می‌کند (شکل ۶). در گیاهچه‌های *N. benthamiana* آلوده به هر یک از ویروس‌ها مقدار پروتئین کل بافت برگ در مقایسه با نمونه‌های عاری از ویروس تیمار شده با

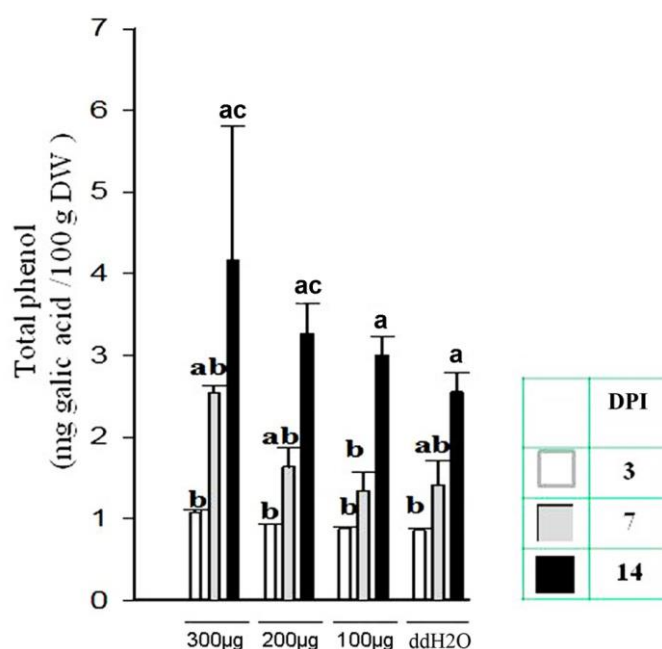


شکل ۶. مقایسه اثر MAP در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میزان غلظت پروتئین کل بافت برگ *Nicotiana benthamiana* در گیاه‌های آلوده شده با CMV-Fny و PVY^o در روزهای ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از مایه کوبی با ویروس (DPI) بر حسب میکروگرم. در کنار نمونه‌های آلوده به ویروس و تیمار شده با MAP تیمار، از گیاهچه‌های *Nicotiana benthamiana* عاری از ویروس و تیمار شده با MAP به عنوان شاهد برای مقایسه استفاده شد. NT: نمونه‌های سالم آلوده نشده با ویروس و تیمار شده با MAP. محاسبه میزان پروتئین کل بافت با استفاده از روش برادفورد انجام شده است. حروف بر روی هیستوگرام بیانگر سطح معنی داری ($P < 0.05$) می باشد.

Fig. 6. Comparing the effect of 300 µg MAP concentration on the total protein concentration (microgram) of the CMV and PVY inoculated *Nicotiana benthamiana* leaves, 3, 7, 14 and 21 days after inoculation with virus (DPI). In addition to the infected benthamiana seedlings and treated with the MAP, healthy benthamiana plants that was just received the water considered as the control in each assay. NT: Virus free healthy tobacco plants treated with the MAP. Total protein concentration was measured by the Bradford method. Letters on the histograms indicate the significant difference level ($P < 0.05$).

مقایسه با نمونه شاهد تیمار نشده با MAP افزایش می‌یابد. با افزایش میزان غلظت MAP از ۱۰۰ به ۳۰۰ میکروگرم میزان فنل کل نیز در گیاهچه‌های *N. Benthamiana* سالم تیمار شده افزایش معنی‌دار در مقایسه با نمونه شاهد سالم تیمار نشده پیدا کرد. میزان فنل کل در روز چهاردهم پس از تیمار با MAP به میزان دو برابر نمونه شاهد بدون تیمار رسید (شکل ۷).

جهت بررسی اثر MAP در متابولیسم و توان زیستی گیاهچه‌های *N. benthamiana* تیمار شده، میزان محتوی فنل کل بافت برگ نمونه‌های سالم (آلوده نشده با ویروس) تیمار شده با مقدارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم از MAP در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تیمار مورد تجزیه آماری قرار گرفت (شکل ۷). نتایج نشان داد مقدار فنل کل بافت برگ از روز سوم پس از تیمار با تمام غلظت‌های MAP در گیاهچه‌های تیمار در



شکل ۷. تیمار گیاهچه‌های *Nicotiana benthamiana* با MAP در غلظت ۳۰۰ میکروگرم موجب افزایش معنی‌دار مقدار فنل کل بافت برگ گیاهچه‌های بنتامیانا تیمار در مقایسه با گیاهچه‌های کنترل (گیاهچه‌های *Nicotiana benthamiana* سالم تیمار شده با آب ddH2O) تا ۱۴ روز پس از تیمار شد. DPI: روزهای پس از تیمار گیاهچه‌ها با MAP. حروف بر روی هیستوگرام بیانگر سطح معنی داری ($P < 0.05$) می‌باشد.

Fig. 7. *Nicotiana benthamiana* tobacco seedlings treated with the 300 µg concentration of the MAP resulted in the significant increase in the total phenol content of the leaves compared to the control (healthy seedlings treated with water ddH2O) *N. benthamiana* plants up to 14 days after the treatment. DPI: Days post inoculation with MAP in treated plants. Letters on the histograms indicate the significant difference level ($P < 0.05$).

بحث

شود (Waziri et al. 2015). Zhe در سال ۲۰۱۸ با اسپری نمودن عصاره آبی استخراج شده از *M. jalapa* باعث ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه توتون *Nicotiana tabacum* برابر تعدادی از عوامل بیماری‌زای ویروسی متعلق به جنس‌های *Tospovirus*، *Tobamovirus* و *Potyvirus* شدند. در مورد اثر غیرمستقیم MAP نتایج تحقیقات گذشته نشان داده بود که MAP از توان تخریب و هضم DNA برخوردار است (Bolognesi et al. 2002; Zullies 2003) و حتی عصاره خام گیاه لاله عباسی می‌تواند به مانند آنزیم نوکلئاز موجب تخریب مولکول‌های اسید نوکلئیک به صورت فیزیکی شود (Bolognesi et al. 2002; Kale et al. 2015). با این وجود مکانیسم عمل آن نامشخص باقی مانده است. در گیاه لاله عباسی تا کنون پنج ایزوفرم از پروتئنی MAP گزارش شده است که هر کدام در بافت‌های مختلف با وزن‌های مولکولی متفاوت حضور دارند و تاثیر مثبت ایزوفرم‌های یک و دو آن با وزن‌های مولکولی به ترتیب ۲۷ و ۳۰ کیلودالتون بر علیه ویروس‌های TMV و PVX اثبات شده است (Kumar et al. 2015). بیشترین میزان

نتایج این بررسی در مجموع نشان داد تیمار خاک گلدان - هایی که گیاهچه‌های *N. benthamiana* در آن کاشته شده‌اند با مقدار ۳۰۰ میکروگرم MAP باعث کاهش معنی‌دار تیترا ویروس‌های PVY^o و CMV-Fny تا ۱۴ روز پس از تیمار گیاهچه‌های بنتامیانا می‌شود. همچنین مشخص شد MAP به میزان بیشتری باعث کنترل PVY^o نسبت به CMV-Fny می‌گردد. MAP موجب کنترل انتقال PVY^o با ناقل نشد و تنها در کنترل آلودگی از طریق مایه‌کوبی مکانیکی موثر بود. در گذشته مشخص شده بود که MAP می‌تواند باعث کاهش آلودگی PVY و PVX در انتقال مکانیکی شود اما توان جلوگیری از انتقال CMV توسط شته ناقل را ندارد (Kubo et al. 1990; Vivanco et al. 1999). ولی با این وجود در خصوص انتقال PVY با شته و مکانیسم عمل MAP در کنترل آن مطالعاتی صورت نگرفته بود. همچنین مطالعات گذشته نشان داده بود که MAP می‌تواند با کاهش جمعیت شته ناقل موجب کنترل ویروس موزائیک شلغم *Turnip mosaic virus* و همچنین سفیدبالک‌ها

گیاهچه‌های تیمار شده با آب در نمونه‌های سالم مشاهده نشد (شکل ۴). در این تحقیق MAP در مقدار ۲۰۰ میکروگرم نیز در نیکوتینا بنتامیاناهای سالم نیز موجب افزایش معنی‌دار مقدار فنل کل بافت برگ شد. این موضوع بدان معنی است که MAP می‌تواند موجب افزایش تدریجی و پایدار متابولیسم در نیکوتینا بنتامیاناهای تیمار شود (شکل ۷). تولید فنل در گیاهان نیازمند فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌هایی است که در اکسیداسیون آن نقش دارند (Hao et al. 1996). افزایش مقدار فنل در گیاه موجب بهتر شدن متابولیسم گیاه می‌شود و سلول‌های برای ساخت رنگدانه‌های دفاعی درون سلول و نیز تولید سلول در بافت‌های مختلف نیاز به تولید و مصرف ترکیبات فنلی ساده دارند (Lopez-Lefebvre et al. 2000). تحقیقات زیادی در گذشته انجام شده است که نشان می‌دهد تجمع فنل‌های مرکب در گیاهان موجب افزایش مقاومت گیاه به آلودگی‌های زیستی از جمله ویروس‌های گیاهی می‌شود (Simons & Ross 1971; Ruiz et al. 1999; Ruiz et al. 2003). نتایج حاصل از این بررسی نیز نشان داد که در اثر تیمار گیاهچه‌های نیکوتینا بنتامیانا با MAP مقدار فنل در بافت‌ها افزایش می‌یابد به این مفهوم که توان زیستی و دفاعی گیاه افزایش می‌یابد. اکسیداسیون ترکیبات فنلی می‌تواند موجب کاهش تیترو ویروس در بافت‌ها شده باشد. همچنین نتایج تحقیقات گذشته نشان داده بود که عصاره برگ گیاه لاله عباسی از توان تحریک دفاع‌های موضعی مانند مرگ برنامه‌ریزی شده (PCD) (Programmed cell death) در سلول‌های جانوری بر علیه عوامل بیماری‌زای ویروسی برخوردار می‌باشد. همچنین عصاره حاصله می‌تواند دفاع‌های سیستمیک را نیز در گیاهان بر علیه ویروس‌های گیاهی القاء نماید (Verma et al. 1979; Verma & Kumar 1980; Ikawati et al. 2003). دفاع‌های موضعی و سیستمیک در گیاهان حاصل افزایش فعالیت‌های متابولیکی آن‌ها می‌باشد. نتایج این بررسی نیز حاکی از افزایش میزان متابولیسم گیاه‌های نیکوتینا بنتامیانا پس از تیمار با MAP بود لذا می‌توان انتظار داشت که MAP از توان تحریک دفاع‌های سیستمیک و موضعی بر علیه ویروس‌های مورد بررسی در این پژوهش برخوردار بوده است. از این طریق توانسته سطح آلودگی هر یک از ویروس‌های مذکور را کاهش دهد. با این وجود نتایج این بررسی نشان داد که MAP موجب کنترل کامل PVY^o و CMV-Fny نمی‌شود، بلکه با افزایش توان متابولیسمی گیاه می‌تواند موجب افزایش سطح تحمل به آلودگی در بنتامیاناهای تیمار شده شود. نتایج این پژوهش می‌

در ریشه و برگ گیاه *M. jalapa* تجمع پیدا می‌کند (Kubo et al. 1990). الگوی پروتئینی حاصل از الکتروفورز MAP استخراج شده از بافت‌های ریشه و برگ گیاهان لاله عباسی در این پژوهش بیانگر حضور پروتئین‌های با وزن مولکولی ۲۷ تا ۳۰ کیلودالتون بود. با این وجود سایر پروتئین‌های با وزن مولکولی بالاتر از ۳۰ کیلودالتون مانند پروتئین ۵۵ کیلودالتون با غلظت بالا در الگوی پروتئینی MAP موجود در نمونه‌های استخراج شده وجود داشت که نمی‌توان اثرات کنترل‌کنندگی آنها را بر علیه ویروس‌های مورد بررسی در این تحقیق را نادیده گرفت و اثبات این امر نیاز به پژوهش‌های تکمیلی بیشتر دارد. در این پژوهش نتایج آزمون Real-time RT-PCR در تحقیق حاضر نیز بیانگر کاهش میزان نسخه‌های ژنی PVY بود. این کاهش هم می‌تواند بواسطه اثر مستقیم نوکلئازی MAP بر روی ژنوم باشد و هم امکان دارد کاهش توان تکثیر ژنوم ویروس به خاطر رقابت MAP با فاکتورهای بسط رونویسی و ترجمه باشد. همانطور که در بخش مقدمه توضیح داده شده MAP از نوع پروتئین‌های مهار کننده ترجمه می‌باشد و می‌تواند جلوی نسخه‌برداری RNA را در سلول‌ها بگیرد (Walsh et al. 2013). در مجموع نتایج آزمون‌های الیزا و پی سی آر بیانگر کاهش تعداد رونوشت‌های ژنومی و نیز پروتئین‌های PVY^o بود که این امر بیانگر عملکرد مناسب MAP در مهار ترجمه و بیان ژنهای ویروس بود. در تحقیقات گذشته‌ای که در خصوص ویژگی ضدویروسی MAP انجام پذیرفته بود، MAP بصورت مستقیم بر روی برگ گیاه‌های آلوده به صورت مستقیم تیمار شده بود (Verma & Kumar 1980). در این تحقیق MAP به خاک پای گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های نیکوتینا بنتامیانا آلوده ریخته شد و نتایج نشان داد که از این طریق نیز تیترو ویروس‌های مورد تحقیق کاهش پیدا می‌کند. نتایج این بررسی نشان داد که فاکتورهای رشدی گیاه نیکوتینا بنتامیانا تیمار شده با MAP افزایش نشان می‌دهد. این موضوع بدین مفهوم است که احتمالاً MAP از توان تحریک متابولیسم گیاه برخوردار است و با افزایش توان زیستی گیاه می‌تواند به صورت غیرمستقیم موجب بالا رفتن سطح تحمل گیاه میزبان آلوده به ویروس شده و از این طریق موجب کنترل آلودگی ویروسی می‌شود. از طرفی نتایج نشان داد MAP در مقدار ۳۰۰ میکروگرم باعث افزایش معنی‌دار محتوی فنل کل در گیاه‌های بنتامیانای تیمار تا میزان ۱/۵ برابر در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با آب می‌شود. با این وجود اختلاف معنی‌داری در میزان افزایش رشد نمونه‌های تیمار شده با مقدار ۱۰۰ میکروگرم MAP و

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از سرکار خانم دکتر اطهر علیشیری دانش آموخته فارغ‌التحصیل گروه گیاه‌پزشکی دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران به جهت مساعدت فراوان ایشان در انجام این تحقیق قدردانی و تشکر می‌نمایند.

تواند برای استفاده از MAP و ترکیبات زیستی ضد ویروسی مشابه در سطح گلخانه‌ها جهت مدیریت مبارزه و کنترل CMV و PVY کاربرد داشته باشد.

Reference

- Bolognesi A, Polito L, Lubelli C, Barbieri L, Parente A, Stirpe F, 2002. Ribosome-inactivating and adenine polynucleotide glycosylase activities in *Mirabilis jalapa* L tissues. *Journal of Biological Chemistry* 277: 13709–13716.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Del Toro FJ, Choi KS, Rakhshandehroo F, Aguilar E, Tenllado F, Canto T, 2019. Ambient conditions of elevated temperature and CO₂ levels are detrimental to the probabilities of transmission by insects of a *Potato virus Y* isolate and to its simulated prevalence in the environment. *Virology* 530: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.001>.
- Del Toro FJ, Aguilar E, Hernández-Walias FJ, Tenllado F, Chung BN, Canto T, 2015. High temperature, high ambient CO₂ affect the interactions between three positive-sense RNA viruses and a compatible host differentially, but not their silencing suppression efficiencies. *PLoSOne*. 10:e0136062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136062>.
- Elsharkawy MM, El-Okkiah S, Elsadany AY, Beider MY, Omara RI, Behiry S, Hassan S, Abdelkhalek A, 2022. Systemic resistance induction of tomato plants against tomato mosaic virus by microalgae. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 32: 37. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00538-2>.
- Fan JM, Zhang Q, Xu J, Zhu S, Ke T, Gao DF, Xu YB, 2009. Inhibition on Hepatitis B virus *in vitro* of recombinant MAP30 from bitter melon. *Molecular Biology Reports* 36: 381–388.
- Habuka P, Murakamig Y, Noma M, Kudo T, Horikoshil K, 1989. Amino Acid Sequence of *Mirabilis* Antiviral Protein, Total Synthesis of Its Gene and Expression in *Escherichia coli*". *The Journal of Biological Chemistry* 264: 6629–6637.
- Hao Z, Charles DJ, Yu L, Simon JE, 1996. Purification and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 43: 735–739.
- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ, Chapple C, 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 38: 765–778.
- Ikwati Z, Elly SW, Puspitasari D, Sisindari S, 2003. Induction of apoptosis by protein fraction isolated from the leaves of *Mirabilis jalapa* L on HeLa and Raji cell-line. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 3: 151–156.
- Irvin JD, 1975. Purification and Partial Characterization of the Antiviral Protein from *Phytolacca americana* Which Inhibits Eukaryotic Protein Synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 169: 522–528.
- Jassim SAA, Naji MA, 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology* 95: 412–427.
- Jyothi B, Mohanalakshmi S, Anitha K, 2013. Protective effect of *Mirabilis jalapa* leaves on anti-tubercular drugs induced hepatotoxicity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 45: 221–224.
- Kale DKC, Mukundan U, Dawada H, 2015. *Mirabilis* antiviral protein studies and its potential applications. *Annals of Phytomedicine* 4: 86–89.
- Kubo S, Ikeda T, Imaizumi S, Takahami Y, Mikami Y, 1990. A potent plant virus inhibitor found in *Mirabilis jalapa* L. *Japanese Journal of Phytopathology* 56:481–487.
- Kumar D, Kale CH, Mukundan U, Dawada H 2015. *Mirabilis* antiviral protein studies and its potential applications, *Annals of Phytomedicine* 4 (1): 86–89.
- Kusumawati DE, Hadiastono T, Aini LQ, 2015. Leaf Extract of *Mirabilis jalapa* L. Induced Defense of Tomato Plant (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Against Cucumber Mosaic Virus (CMV) Infection. *Journal of Tropical Plant Protection* 1: 46–51.

- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lopez-Lefebvre LR, Ruiz JM, Rivero RM, Garcia PC, Sanchez E, Romero L, 2000. Role of calcium chloride in ammonium assimilation in roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Plant Physiology* 156: 672–677.
- Mondal S, Wenninger EJ, Hutchinson PJS, Whitworth JL, Shrestha D, Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA, 2016. Comparison of transmission efficiency of various isolates of *Potato virus Y* among three aphid vectors. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 158: 258–268.
- Murphy A, 2001. Signal transduction in resistance to plant viruses. *European Journal of Plant Pathology* 107: 121–128.
- Oladunmoye MK, 2007. Comparative Evaluation of Antimicrobial Activities of Leaf Extract of *Mirabilis jalapa*. *Trends in Medicinal Research* 2:108–112.
- Ruiz JM, Garcia PC, Rivero RM, Romero L, 1999. Response of phenolic metabolism to the application to the carbendazim plus boron in tobacco leaves. *Plant Physiology* 106: 151–157.
- Ruiz JM, Rivero RM, Lopez-Cantarero I, Romero L, 2003. Role of Ca in the metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Growth Regulation* 41: 173–177.
- Sadeghian F, Hadian J, Hadavi M, Mohamadi A, Ghorbanpour M, Ghafarzadegan R, 2013. Effects of exogenous salicylic acid application on growth, metabolic activities and essential oil composition of *satureja khuzistanica* jamzad. *Journal of Medicinal Plants* 12 (47): 70–82.
- Singh S, Awasthi LP, Singh RK, 2011. Induction of systemic resistance through antiviral agents of plant origin against papaya ring spot disease (*Carica papaya* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 44: 1676–1682.
- Sangeetha B, Krishnamoorthy AS, Renukadevi P, Malathi VG, Amirtham D, Sharmila DJS. 2020. Antiviral potential of *Mirabilis jalapa* root extracts against groundnut bud necrosis virus. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 8 (1): 955–961.
- Simons TJ, Ross AF, 1971. Changes in phenol metabolism associated with induced systemic resistance to tobacco mosaic virus in Samsun NN tobacco. *Phytopathology* 61: 1261–1265.
- Verma H, Awasthi L, Mukerjee K, 1979. Induction of systemic resistance by antiviral plant extracts in non-hypersensitive hosts. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 8: 735–746.
- Verma H, Kumar V, 1980. Prevention of plant virus diseases by *Mirabilis jalapa* leaf extract. *New Botanist* 7: 87–91.
- Vivanco JM, Querci M, Salazar LF, 1999. Antiviral and antiviroid activity of MAP-containing extracts from *Mirabilis jalapa* roots. *Plant Disease* 83: 1116–1121.
- Walsh MJ, Dodd JE, Hautbergue GM, 2013. Ribosome-inactivating proteins potent poisons and molecular tools. *Virulence* 4 : 774–784.
- Waziri HMA, 2015. Plants as Antiviral Agents. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 6: 254–259.
- Yang SW, 2001. Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture, *Mirabilis jalapa*. *Journal of Natural Production* 64: 313–317.
- Zhu F, Zhou YK, Ji ZL, Chen XR. 2018. The plant ribosome-inactivating 682 proteins play important roles in defense against pathogens and insect pest attacks. *Frontiers in Plant Science* 9, 146. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00146>.
- Zullies I, Sudjadi M, Widyaningsih E, Dyah E, Sismindari P, 2003. Induction of apoptosis by protein fraction isolated from the leaves of *Mirabilis jalapa* L. on HeLa and Raji cell-line. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 3: 151–156.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)