بررسی اثر ضد ویروسی عصاره اتانولی گیاهان بید، بومادران و گزنه بر آلودگی ویروس موزاییک خیار در گیاه خیار درشرایط گلخانه‌ای

Study on the antiviral activity of Weeping willow, Yarrow and common Nettle plant ethanolic extracts on *Cucumber mosaic virus* infection in cucumber under greenhouse conditions

تابان صفرزاده خسروشاهی[1*]، فرشاد رخشنده رو[2]، توماس کانتو[3]، غلامرضا صالحی جوزانی[4]

دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۶ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲

چکیده

در این تحقیق اثر کنترل‌کنندگی عصاره اتانولی گیاهان دارویی بید، بومادران و گزنه بر میزان آلودگی ویروس موزاییک خیار (CMV-Fny) در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور گیاهچه‌های خیار به‌صورت مکانیکی توسط ویروس CMV-Fny مایه‌کوبی شدند. عصاره اتانولی گیاهان اشاره شده به‌صورت مستقیم و با غلظت‌های مشخص ۲۰۰ppm، ۸۰۰ppm و ۱۰۰۰ppm به محیط ریزوسفر در گلدان‌ها اضافه شد. آلودگی گیاهچه‌های خیار با CMV-Fny در برگ‌های مایه‌کوبی شده و تازه رشد یافته توسط آزمون‌های الایزا مستقیم (DAS-ELISA) در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ بعد از مایه‌کوبی مورد ارزیابی قرار گرفت. سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز (POX) در گیاهچه‌های نمونه‌هایی که بیشترین میزان کنترل ویروس را در ۱۲ روز بعد از آلودگی نشان داده بودند، انجام پذیرفت و میزان بیان ژن Inhibitor of viral replication (IVR) در آنها به کمک پی‌سی‌آر نیمه کمی (sq-RT-PCR) سنجش شد. نتایج الایزا نشان داد تیمار گیاهچه‌های خیار با عصاره اتانولی هر سه گیاه مورد بررسی، باعث کاهش معنی‌دار تیتر پروتئین CMV در برگ‌های بالغ مایه‌کوبی شده و جوان تازه رشد یافته و همچنین شاخص شدت بیماری‌زایی (DSI) تا ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی در آنها در مقایسه با شاهد منفی کاهش یافته است. بیشترین میزان کاهش تیتر CMV در برگ‌های مایه‌کوبی شده و تازه رشد یافته با کاربرد غلظت ۱۰۰۰ppm عصاره اتانولی و ۲۰۰ppm بومادران در زمان ۱۲ روز پس از مایه‌زنی به‌دست آمد. همچنین میزان بیان ژن IVR و فعالیت اختصاصی POX در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌ها افزایش یافت که می‌تواند بیانگر فعال شدن دفاع سیستمیک در نمونه‌های تیمار شده باشد.

واژگان کلیدی: فعالیت ضد ویروسی، گیاهان دارویی، میزان آلودگی، آنزیم دفاعی، مقاومت سیستمیک

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی مادرید(CIB-CSIC)، مادرید، اسپانیا
۴- استاد، بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRI)، کرج، ایران
نویسنده مسئول مکاتبات: rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir

مقدمه

ویروس‌های گیاهی انگل‌های اجباری هستند و جهت بقاء و تکثیر از سیستم بیان ژن میزبان استفاده نموده و با کسب تدریجی انرژی از میزبان، موجب برهم خوردن نظم متابولیسمی و در نهایت مرگ آن می‌شوند. بنابراین مبارزه با ویروس‌ها با مبارزه با سازوکار ژنتیکی میزبان و در نهایت بی‌نظمی متابولیکی آن برابر بوده و این امر باعث شده تا نتوان آلودگی آنها را در گیاهان با استفاده از سموم کاهش داد. ویروس موزائیک خیار (CMV) عضو شاخص جنس *Cucumovirus* از خانواده Bromoviridae با دامنه میزبانی بیش از ۱۰۰۰ گونه گیاه، یکی از مهم‌ترین ویروس‌های بیمارگر گیاهی است و به‌وسیله بیش از ۸۰ گونه شته به روش ناپایا منتقل می‌شود (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003). ژنوم CMV شامل سه قطعه RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت می‌باشد. بیماری موزائیک خیار باعث خسارت عمده در محصولات زراعی گلخانه‌ای بویژه در کدوئیان می‌شود و از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. CMV از پراکندگی بالایی در کشور برخوردار است و در ایران همه نژادهای مهم شناخته شده آن حضور دارند (Rasoulpour and Izadpanah, 2008; Bananej and Vahdat, 2008; Massumi *et al*., 2009; Bashir *et al.*, 2006).

عصاره و اسانس‌های گیاهی علاوه بر آن‌که اثرات کنترل‌کنندگی قابل توجهی علیه بیمارگرهای گیاهی دارند، برای زیست‌بوم خطرناک نبوده و در طبیعت نیز ماندگار نیستند و به سرعت پوسیده شده و به چرخه طبیعی زیستی باز می‌گردند (Goel *et al*., 2016). تاکنون محققین توانسته‌اند تا با استفاده از عصاره‌های آبی و الکلی گیاهان و نیز کمپوست و کنجاله‌های زیستی در امر مبارزه با ویروس‌های گیاهی تحقیقات کاربردی و مؤثری را انجام دهند. نتایج پژوهش‌های گذشته مشخص ساخته است که ترکیبات مختلفی در عصاره خام گیاهان با ماهیت‌های پروتئینی و غیرپروتئینی وجود دارد که می‌توانند به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم با افزایش سطح توان دفاعی گیاه، موجب محدود شدن توان تکثیر و توسعه ویروس‌ها در گیاهان شوند (Jassim and Naji, 2003). تا به حال در زمینه بیوکنترل ویروس‌های گیاهی تحقیقات مختلفی انجام شده است، از جمله آن‌که از عصاره گیاهان مختلف به‌خصوص گیاهان داروئی به‌صورت عصاره خام آبی یا الکلی جهت کنترل ویروس‌ها در کشت‌های گلخانه‌ای و یا در سیستم‌های کشت بافت استفاده نموده‌اند و در این زمینه دستاوردهای بزرگی به‌دست آمده است (Zhao *et al.*, 2017). 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 و می‌توانند در مدیریت آفات و بیمارگرهای گیاهی به‌کار گرفته شوند.

برای اولین بار Allard (1914) موفق شد تا از عصاره گیاه سرخاب کولی *Phytolacca americana* جهت کنترل ویروس موزاییک توتون (TMV) *Tobacco mosaic virus* استفاده نماید (به نقل از: Silber and Burk, 1965). پس از آن به‌دلیل تأثیر خوب و تولید آسان و ارزان این ترکیبات توجه محققین به این حوزه از تحقیقات جلب شد و در مدت زمان ۲۰ سال، محققین مختلف اثر ضدویروسی گونه‌های مختلف گیاهی متعلق به خانواده های Amaranthaceae ، Nyctaginaceae، Asteraceae، Chenopodiaceae، Asclepiadaceae، Polygonaceae، Simaroubaceae، Acanthaceae، Liliaceae، Cruciferae، Leguminosae sp.، Boraginaceae، Oleaceae، Taxaceae، Ranunculaceae، Juglandaceae، Saxifragaceae، Theaceae، Schisandraceae، Cupressaceae، Labiatae و Caryophyllaceae را گزارش نمودند (Zhao *et al*., 2017). تاکنون ترکیبات متنوع بازدارنده از آلودگی‌های میکروبی در گیاهان مختلف یافت شده است که از جمله آنها می‌توان به پروتئین‌ها ، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و تریترپنوئیدها اشاره نمود (Zhang *et al*., 2009). از جمله پروتئین‌های مؤثر در کنترل آلودگی ویروس‌ها در گیاهان می‌توان به پروتئین‌های Pathogenesis related protein (PR- protein) و Inhibitor of Viral Replication protein(IVR) اشاره نمود که در موضع مورد تهاجم گیاه تولید می‌شوند و موجب مهار اختصاصی ویروس‌ها می‌گردند (Rakhshandehroo *et al*., 2009). پروتئین IVR بسیار به حرارت حساس بوده و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس غیرفعال می‌شود (Akad *et al*., 1999).

از جمله گیاهانی دارویی که امروزه استفاده از عصاره آن برای درمان بیماری‌های ویروسی انسانی و گیاهی مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است، می‌توان به لاله‌عباسی *Mirabilis jalapa* L.، سرخاب کولی یا pokeweed، *Phytolacca americana* از خانواده Phytolaccaceae و گزنه دو پایه *Urtica dioica* که دارای خاصیت درمانی در معالجه بیماری‌های مزمن انسان می‌باشد، اشاره نمود (Khosroshahi *et al*., 2021؛ رخشنده‌رو و همکاران، ۱۳۸۸؛ علیشیری و رخشنده‌رو، ۱۳۹۴). در سال ۱۹۸۹ محققین در کشور چین توانایی ضدویروسی بیش از ۳۰ گونه گیاه دارویی را برعلیه CMV اثبات نمودند (Zhu and Qiu, 1989). با ارزیابی کمی میزان بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های Phenyl alanine ammonia lyase (PAL) و Peroxidase (POX) مرتبط با دفاع‌های سلول با استفاده از تکنیک Real Time RT- PCR مشخص شد، تیمار گیاهچه‌های خیار با ترکیبات طبیعی مانند کیتوزان و گلایسین بتائین می‌تواند موجب بیان ژن‌های مذکور و کاهش میزان آلودگی CMV از طریق القاء دفاع سیستمیک شود (Sofy *et al*., 2020). در تحقیقی، مشابه ویژگی کنترل‌کنندگی اسانس روغنی گیاه آویشن برعلیه CMV اثبات شد (Helal, 2019). همچنین مشخص شده است که عصاره آبی گیاه دکمه طلائی *Tanacetum vulgare* از ویژگی کنترل‌کنندگی ویروس موزائیک خیار در گیاه خیار برخوردار است (Petrov *et al.*, 2016). اثر عصاره آبی انجیر خوراکی *Ficus carica* L. در کاهش تعداد لکه‌های موضعی ایجاد شده در اثر ویروس‌های *Zucchini Yellow Mosaic Virus* و Bean Yellow Mosaic Virus اثبات گردید و مشخص شد که تیمار گیاهچه‌های خیار با عصاره آبی و اتانولی آن می‌تواند منجر به القاء دفاع سیستمیک در گیاه علیه CMV شود (سنجریان و همکاران، ۱۴۰۰؛ Mahmoud *et al*., 2010).

در عصاره بسیاری از گیاهان دارویی، پروتئینی به نام Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) با وزن مولکولی کم با ویژگی اختلال در عملکرد ریبوزوم وجود دارد که از طریق جلوگیری از ترجمه ژنوم ویروس‌های مهاجم موجب مهار آنها می‌شوند. MAP (Mirabilis antiviral proteins-MAP) از لحاظ ماهیت از نوع RIPsهای گروه یک بوده و دارای وزن مولکولی کم ۲۸ کیلودالتون می باشد (Habuka *et al*., 1989). این پروتئین یک مهارکننده قوی تکثیر ویروس‌های گیاهی و جانوری بوده و در گذشته مشخص شده است که به‌طور مؤثری می‌تواند مانع تولید پروتئین ویروس‌های موزاییک توتون (TMV)، موزاییک گوجه‌فرنگی (ToMV)، X سیب‌زمینی (PVX) و Y سیب‌زمینی (PVY) شود (Kusumawati *et al.*, 2015). در تحقیقی که به تازگی انجام پذیرفت، امکان کنترل CMV از طریق بیان پروتئین نوترکیب MAP (پروتئین ضدویروسی گل لاله‌عباسی) در گیاه توتون میسر گردید (Khosroshahi *et al*., 2021). با وجود شناختی که از ترکیبات مهارکننده آلودگی ویروس‌های موجود در گیاهان تاکنون حاصل شده است ولی اثر عصاره‌های گیاهان داروئی موجود در کشور برای کنترل ویروس‌های گیاهی به‌طور جامع بررسی نشده است. در این پژوهش، اثر عصاره الکلی برخی گیاهان داروئی کشور شامل بید *Salix alba*، بومادران *Achillea millefolium* و گزنه دوپایه *Urtica dioica* بر کاهش میزان آلودگی ویروس موزاییک خیار CMV-Fny در گیاه خیار *Cucumis sativus* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره اتانولی گیاهان بید، بومادران و گزنه و مایه‌کوبی گیاهچه‌های خیار با CMV-Fny

برای این مطالعه گیاه گزنه دوپایه کوهی *Urtica dioica* در طول فصل رشد رویشی در فصل بهار (اواخر اردیبهشت تا اوایل خردادماه) از منطقه رودبار قصران، گیاه بومادران *Achillea millefolium* از منطقه تلو در شمال شرق تهران و درخت بید مجنون *Salix babylonica* از سطح پارک‌های شهر تهران، جمع‌آوری شد. از تمام اندام گیاهان گزنه و بومادران شامل ریشه، ساقه و برگ و فقط از پوست درخت بید خشک شده به‌صورت مجزا برای عصاره‌گیری استفاده شد. جهت عصاره‌گیری، بافت گیاهان در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سلسیوس) و در تاریکی به مدت ۱۰ روز کاملاً خشک و سپس توسط دستگاه خردکن پودر شد. تهیه عصاره اتانولی مطابق دستورالعمل موجود

(Leser and Treutter, 2005) انجام شد. برای این منظور ۱۰ گرم از بافت‌های خشک شده برای هر گیاه به‌طور جداگانه در ۲۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۷۰٪ در دستگاه soxhlet برای مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد و آموده به‌دست آمده برای حذف حلال در دستگاه rotary evaporator (Heidolph, Heizbad Hei-VAP, Germany) در فشار کم و دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. عصاره حاصل از کاغذ فیلتر با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده و تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس در شیشه‌های تاریک نگهداری شد. کاشت، نگهداری و تیمار گیاهچه‌های خیار در شرایط استاندارد گلخانه ای شامل دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰٪ و دوران متناوب نوری (۱۶ ساعت) و تاریکی (۸ ساعت) انجام شد. گیاهچه‌های خیار رقم رویال در گلدان‌های ۵۰ گرمی کاشته شده و در مرحله ۲ برگی توسط بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۷/۴ به‌صورت مکانیکی با نسبت ۱ به ۱ وزنی/حجمی (بافت برگ/بافر) توسط ویروس CMV-Fny مایه‌کوبی شدند. دو روز قبل و دو روز بعد از مایه‌کوبی گیاهچه‌های خیار، عصاره‌های گیاهان بید، بومادران و گزنه به‌صورت مستقیم و به غلظت‌های ۲۰۰ppm، ۸۰۰ppm و ۱۰۰۰ ppm در حجم ۲ میلی‌لیتر به خاک پای گلدان‌ها اضافه شدند. هر ۳ روز یک‌بار و تا ۱۲ روز پس از آلودگی گیاهچه‌های خیار، از برگ‌های تازه رشد یافته و همچنین برگ‌های مایه‌کوبی شده به‌صورت جداگانه نمونه‌برداری انجام و برای آزمون الایزا (DAS-ELISA) مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون در ۳ تکرار در زمان‌های متفاوت انجام شد. هم‌زمان از تعداد ۵ گیاهچه خیار به‌عنوان نمونه شاهد منفی (مایه‌کوبی شده با ویروس و تیمار نشده با عصاره) و ۵ گیاه شاهد مثبت (مایه‌کوبی شده با ویروس و تیمار شده با ماده شیمیایی ضدویروس، آسیکلووير در غلظت ppm ۱۰۰۰) استفاده شد.

ارزیابی های سرولوژیکی تیتر CMV-Fny با آزمون DAS-ELISA

جهت تعیین تیتر ویروس در گیاهچه‌های خیار رقم رویال مایه‌کوبی شده با CMV-Fny در زمان‌های ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی از آزمون الایزای مستقیم (DAS-ELISA) و با استفاده از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای (Bioreba, Switzerland) مطابق روش (Mondal *et al.*, 2016) استفاده شد. برای این منظور نمونه‌هایی که با CMV-Fny مایه‌کوبی و توسط عصاره‌ها تیمار شده بودند، با استفاده از بافر فسفات پتاسیم pH ۷/۴ عصاره‌گیری شدند. پس از انجام مراحل مختلف آزمون در نهایت بعد از اضافه کردن سوبسترا (ماده پارانیتروفنیل فسفات) درون چاهک‌های موجود در بشقابک الایزا، جذب حاصل از بروز واکنش رنگ‌زایی با دستگاه الایزا خوان مدل (ELX 800-Biotek) با فاصله نیم ساعت تا زمان ۴ ساعت بعد از اضافه نمودن سوبسترا در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید.

با استفاده از فرمول $n= \bar{X}+ 3SD$ تیتر ویروس تعیین و مقایسه تیتر ویروس در نمونه‌های تیمار صورت پذیرفت. در این فرمول $\bar{X}$ میانگین جذب نمونه‌های سالم و غیرآلوده بوده و جذب نمونه‌هایی که معادل یا برابر عدد n بود، معادل آلوده در نظر گرفته شد. آزمون DAS-ELISA برای سنجش تیتر CMV در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌های مورد آزمون در کنار شاهدها در سه تکرار جداگانه انجام شد.

محاسبه شاخص شدت بیماری Disease Severity Index (DSI)

شاخص شدت بیماری برای گیاهچه‌های خیار رقم رویال مایه‌زنی شده با CMV-Fny و تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰ppm، ۸۰۰ و ۱۰۰ از هر یک از عصاره گیاهان دارویی مورد بررسی اندازه‌گیری شد. علایم بیماری در زمان‌های ۶، ۹ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی تحت نظر قرار گرفت و شدت علایم بر اساس رتبه‌دهی علایم (۰= بدون علایم، ۱= موزائیک خفیف یا پیسک خفیف، ۲= موزائیک سیستمیک مشخص بدون تغییر شکل گیاه، ۳= موزائیک مشخص و تغییر شکل برگ و کوتولگی، ۴= موزائیک مشخص و نکروز کلی تا ٪۵۰ و ۵= نکروز بالای ٪۵۰ و منتهی شونده به مرگ گیاه) در گیاهان مایه‌زنی شده، مورد یادداشت‌برداری قرار گرفت. شاخص بیماری بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید (Zeng *et al.*, 2007).

$$\mathrm{DsI} = \frac{\sum \mathrm{nx} \times \mathrm{gradex} \times 100\%}{n\,total \times highest\ grade}$$

که در آن DSI نشان‌دهنده Severity Disease Index (شاخص شدت بیماری) است، x grade نشان‌دهنده رتبه خاصی است که در بالا به آن اشاره شد، nx تعداد گیاهانی است که در تکرارهای در نظر گرفته شده برای یک تیمار خاص، آن رتبه خاص را نشان می‌دهند، highest grade بالاترین رتبه و n total تعداد کل گیاهان مورد آزمون در هر تیمار معین می باشد.

تعیین نیمه کمی بیان ژن IVR درگیاهچه‌های خیار آلوده به CMV و تیمار شده با عصاره

در این تحقیق میزان بیان ژن مهار کننده تکثیر ویروس Inhibitor of Viral Replication (IVR) به‌عنوان مارکر مقاومت در گیاهچه‌های خیار نسبت به آلودگی CMV مورد سنجش قرار گرفت. برای این منظور total RNA از گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هریک از عصاره‌های مورد آزمون در زمان ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی با CMV-Fny با استفاده از ماده تجارتی RNX-Plus (SinaClon Inc, Iran) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج گردید و از آنها cDNA با استفاده از آنزیم M-MuLV وکیت (Fermentas Inc, Germany) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، سنتز شد. برای استخراج total RNA به میزان ۰/۱ گرم از بافت سطح برگ‌های تازه رشد یافته گیاهچه‌های خیار مایه‌کوبی شده استفاده شد. حذف آلودگی DNA از نمونه‌ها توسط کیت Turbo DNA–free kit (Ambion, Austin, TX, USA) انجام شد. واکنش Semi Quantitative PCR با استفاده از آغازگر تکثیرکننده بخشی از ژن IVR با توالی‌های:

IVR-F: 5'-ATCGTTAACAATCGACCTGAAGCTGCT-3'
IVR-R: 5'-ATGGGATCCTCATAAAAGCTCAGCCTCT-3'

صورت گرفت (Rakhshandehroo *et al*., 2009). به این منظور از واکنش دمائی شامل: ۹۳ درجه سلسیوس ۴ دقیقه (یک چرخه) و سپس چرخه حرارتی شامل ۹۲ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه، ۵۹ درجه ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۵۰ ثانیه (برای به ترتیب ۲۵، ۳۰ و ۳۵ چرخه مجزا) و ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیق مطابق روش Marone و همکاران (2001) استفاده شد. واکنش پی‌سی‌آر کمی به صورت دو تیوب در حجم نهایی ۱۵ ماکرولیتر حاوی واکنش‌گرهای: ۵/۷ ماکرولیتر ماده Brilliant III Ultra-Fast RT-qPCR Master Mix (Agilent, Santa Clara,CA, USA)، ۵/۱ ماکرولیتر آب مقطر استریل، ۰/۷۵ ماکرولیتر آنزیم M-MuLV شرکت (Fermentas Inc, Germany)، ۰/۱۵ ماکرولیتر از ماده Dithiothreitol (Agilent, USA) با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، ۰/۳ ماکرومولار از هر کدام از آغازگرها و ۳ ماکرولیتر از آر.ان.ای استخراج شده با غلظت ۱۰ نانوگرم بر ماکرولیتر انجام شد. همچنین از آغازگرهای B-Tub-Fw (5´-CACTCTCCAGCATTCATCC-3´) و B-Tub-Rv (5´-CTTGCATTGGTACACACAGG-3´) برای تکثیر ژن B-Tub که یک housekeeping gene است به‌عنوان کنترل درونی و جهت نرمال‌سازی واکنش پی‌سی‌آر استفاده شد (Rakhshandehroo *et al*., 2009). واکنش پی‌سی‌آر در دستگاه Rotor-Gene Q thermal cycler (Qiagen. Venlo, Limburgh, Netherlands) انجام پذیرفت. تولیدات حاصل از تکثیر ژن‌ها در تعداد سیکل‌های حرارتی مختلف آزمون PCR در ژل آگارز ۲/۵٪ الکتروفورز شد. برای هر ژن از نمونه‌های کنترل منفی و مثبت استفاده شده و تمام آزمون‌ها با ۴ تکرار زیستی انجام شدند. از cDNA نمونه گیاهچه خیار مایه‌کوبی شده با CMV-Fny و تیمار نشده با عصاره به‌عنوان شاهد منفی و از cDNA نمونه گیاهچه خیار آلوده به CMV-Fny تیمار شده با ماده دارویی آسیکلوویر با غلظت ۱۰۰۰ppm به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

سنجش کمی فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز (POX)

سنجش کمی فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) در روز دوازدهم بعد از مایه‌کوبی با CMV-Fny انجام پذیرفت. برای این منظور از برگ‌های فوقانی جوان و تازه رشد یافته گیاهچه‌های خیار در زمان ۱۲ روز پس از مایه‌زنی با CMV-Fny و تیمار شده با بهترین غلظت کنترل کننده هر یک از عصاره‌های مورد تحقیق استفاده شد. این آزمون مطابق دستورالعمل موجود انجام پذیرفت (Rakhshandehroo *et al*., 2012). برای این منظور ابتدا پروتئین کل بافت برگ از برگ‌های گیاه خیار با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار با pH ۶/۸ حاوی ۱٪ ماده متابی‌سولفیت سدیم استخراج گردید. عصاره فیلتر شده و به‌مدت ۲۵ دقیقه، شتاب ۲۰۰۰۰g و دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتریفیوژ گردید. حجم نهایی در آزمون‌های

طیف سنجی آنزیمی ۱ میلی‌لیتر بود (800µl pyrogallol+50µl plant extract+50µl DDW+100µl H_2O_2). بررسی جذب نمونه‌ها به کمک دستگاه طیف سنج نوری (Shimadzu, Japan) به‌مدت ۴۰ ثانیه و در طول موج ۴۷۰nm صورت گرفت. در این بررسی میزان پروتئین کل در گیاهچه‌های خیار پس از تیمار با بهترین غلظت کنترل‌کننده عصاره اتانولی مربوط به هر یک از گیاهان دارویی مورد آزمون با استفاده از با روش Bradford تعیین شد. از روش برادفورد با استفاده از استاندارد پروتئینی BSA به منظور اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین تام (Bradford. 1976) در زمان ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی با ویروس برای نمونه‌هایی که بیشترین میزان کنترل ویروس پس از تیمار با هر یک از عصاره‌ها در آنها اتفاق افتاده بود، استفاده شد. منحنی استاندارد با استفاده از بررسی میزان جذب ناشی از اتصال رنگ کوماسی بلو به پروتئین BSA محاسبه شد. میزان فعالیت اختصاصی آنزیم POX از تقسیم عدد مربوط به جذب آنزیم بر دقیقه بر میزان پروتئین کل بافت بر حسب میکروگرم پروتئین کل بافت مورد سنجش به‌دست آمد.

آنالیز آماری

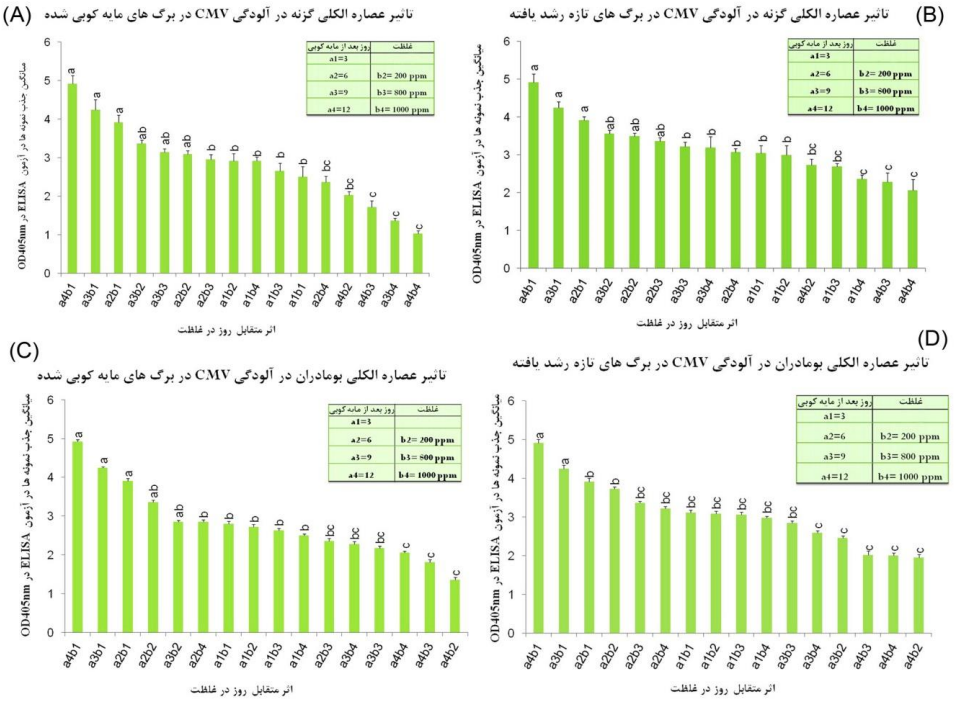
آنالیزهای آماری در این پژوهش بر اساس طرح فاکتوریل درقالب طرح پایه کاملاً تصادفی مربوط به اثر ۴ غلظت عصاره گیاه های داروئی در ۴ روز متفاوت بر روی میزان تیتر پروتئین CMV-Fny در برگ‌های تازه رشد یافته و همچنین برگ‌های مایه‌کوبی شده در نمونه‌های آلوده صورت گرفت. این آزمون با دو فاکتور روز (a) و غلظت گزنه، بید و بومادران (b) بر روی میزان تیتر ویروس انجام گرفت و هر یک از فاکتورها دارای چهار سطح بوده‌اند. فاکتور روز ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز بعد از مایه‌کوبی ویروس و فاکتور غلظت عصاره‌های گزنه، بید و بومادران در سه سطح ۲۰۰ppm، ۸۰۰ppm و ۱۰۰۰ppm بررسی شد. به منظور مقایسه سطوح مختلف هر اثر و میانگین ترکیبات مختلف سطوح اثر متقابل آزمون دانکن مورد استفاده قرار گرفت. از روش آنالیز آماری فوق برای محاسبه میزان فعالیت اختصاصی آنزیم POX در روز دوازدهم پس از تیمار با هر یک از عصاره‌ها در گیاهچه‌های آلوده به CMV استفاده شد.

نتایج

ارزیابی میزان تیتر پروتئین CMV و محاسبه شاخص شدت بیماری

به منظور بررسی تأثیر عصاره‌های بید، بومادران و گزنه در کاهش تیتر CMV-Fny، گیاهچه‌های خیار مایه‌کوبی شده هر سه روز تا ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی با ویروس توسط آزمون الایزا مورد ارزیابی‌های سرولوژیکی قرار گرفتند. نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار تیتر ویروس در نمونه‌های تیمار شده با هر سه عصاره مورد بررسی در مقایسه با گیاه شاهد بود (شکل ۱ و۲). با این وجود از لحاظ توان کنترل‌کنندگی بین نوع و غلظت عصاره‌های مختلف در برگ‌های مایه‌کوبی شده گیاهچه‌های خیار با CMV-Fny و یا برگ‌های جوان تازه رشد یافته در زمان‌های مختلف پس از مایه‌کوبی تفاوت وجود داشت. نتایج حاصل از آزمون الایزا بیانگر آن بود که بیشترین میزان کنترل‌کنندگی ویروس توسط هر یک از عصاره‌ها در برگ‌های بالغ مایه‌کوبی شده در مقایسه با برگ‌های جوان تازه رشد یافته اتفاق افتاده است. همچنین بیشترین میزان کاهش تیتر ویروس پس از تیمار با عصاره‌های گزنه (به میزان ۴ برابر در مقایسه با نمونه شاهد منفی که فقط با آب به جای عصاره تیمار شده بود)، بومادران (به میزان ۳/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد منفی) و بید (به میزان ۳ برابر در مقایسه با نمونه شاهد منفی) در برگ‌های بالغ مایه‌کوبی شده با ویروس مشاهده شد (شکل‌های C و A-۱ و C و A-۲). روند کاهش تیتر ویروس در برگ های جوان تازه رشد یافته بر خلاف آن چیزی بود که در برگ‌های بالغ مایه‌کوبی شده مشاهده شد. بیشترین میزان کاهش تیتر ویروس در برگ‌های جوان تازه رشد یافته با عصاره‌های الکلی گیاه بید (به میزان ۲/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد منفی) مشاهده شد و عصاره الکلی گیاهان بومادران و گزنه هر یک به میزان ۲ برابر در مقایسه با نمونه شاهد منفی موجب کاهش تیتر ویروس شدند (شکل‌های D و B -۱ و D و B -۲). همچنین مشخص شد بر خلاف عصاره اتانولی گزنه که موجب بیشترین میزان کاهش معنی‌دار تیتر ویروس در غلظت‌های زیاد (۱۰۰۰ppm و ۸۰۰ppm) در روز ۱۲ در برگ‌های مایه‌کوبی شده و تازه رشد یافته شده است، عصاره‌های اتانولی بید و بومادران در غلظت ۲۰۰ppm می‌توانند موجب کاهش معنی‌دار تیتر ویروس در روزهای ۹ و ۱۲ پس از مایه‌کوبی ویروس

در برگ‌های بالغ مایه‌کوبی شده و همچنین برگ‌های جوان تازه رشد یافته گیاهچه‌های خیار در مقایسه با نمونه شاهد منفی فاقد تیمار شوند. اگرچه کاربرد غلظت‌های ۱۰۰۰ppm و ۸۰۰ppm عصاره‌های بید و بومادران نیز موجب کاهش معنی‌دار تیتر ویروس در مقایسه با نمونه شاهد منفی در زمان‌های ۹ و ۱۲ پس از مایه‌کوبی نیز گردید.

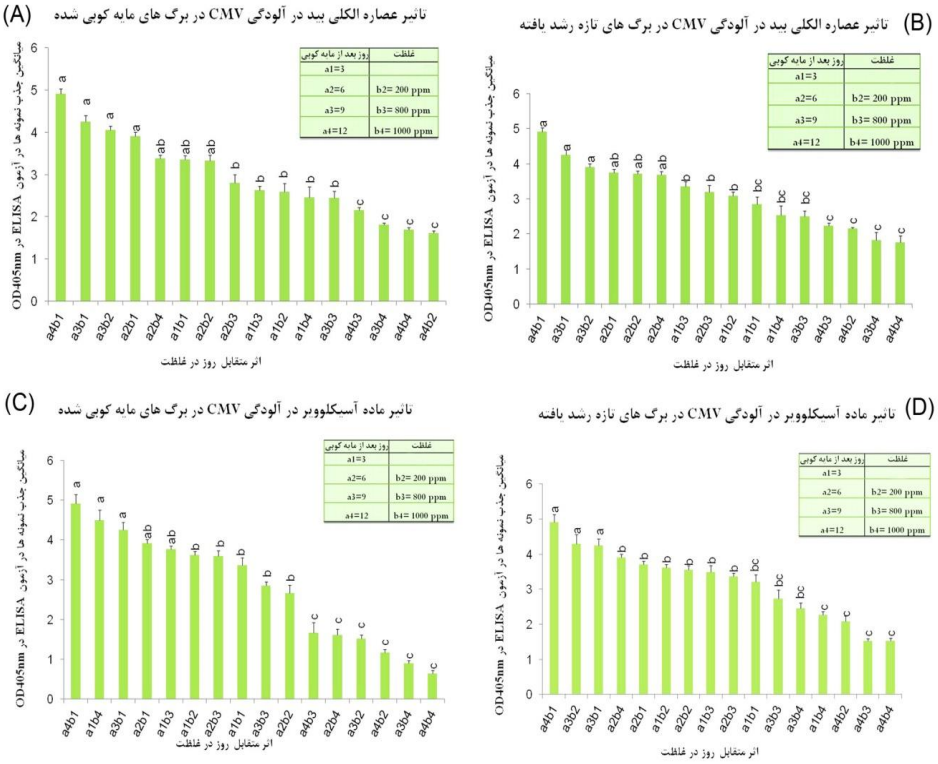


شکل ۱- بررسی آماری نتایج حاصل از آزمون الایزا مربوط به کاهش تیتر CMV-Fny پس از تیمار با عصاره¬های اتانولی گیاهان دارویی گزنه و بومادران در مقایسه با نمونه شاهد منفی (b_1). نتایج بر مبنی تجزیه واریانس میانگین عددی حاصل از جذب سرولوژیک نمونه¬های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره¬ها در آزمون الایزا بیان شده است. نتایج حاصل از تأثیر هر یک از عصاره¬های مورد بررسی در برگ¬های مایه¬کوبی شده با ویروس و همچنین برگ¬های تازه رشد یافته گیاهچه¬های خیار بیانگر کاهش معنی¬دار با اختلاف ۱٪ تیتر CMV-Fny در مقایسه با نمونه شاهد منفی (گیاهچه خیار مایه¬کوبی شده با CMV-Fny که به جای عصاره تنها با آب تیمار شده بود) در زمان¬های ۳ روز (a_1)، ۶ روز (a_2)، ۹ روز (a_3) و ۱۲ روز (a_4) پس از مایه¬کوبی با ویروس بود. برای این بررسی از غلظت¬های مختلف ۲۰۰ppm (b_2)، ۸۰۰ppm (b_3) و ۱۰۰۰ppm (b_4) برای هر یک از عصاره¬های گزنه و بومادران استفاده شد. هیستوگرام¬های A و C مربوط به مقایسه میانگین داده¬های حاصل از الایزا برای نمونه¬های تیمار شده با عصاره و مایه¬کوبی شده با ویروس در برگ¬های مایه¬کوبی شده می¬باشد. هیستوگرام¬های B و D مربوط به مقایسه میانگین داده¬های حاصل از الایزا برای نمونه¬های تیمار شده با عصاره و مایه¬کوبی شده با ویروس در برگ¬های تازه رشد یافته گیاهچه خیار می¬باشد.

Fig. 1. Statistics evaluation of the results obtained by ELISA for the effect of ethanolic nettle weed and yarrow medicinal plant extracts on CMV-titer decreasing compared to the negative control sample (b_1). Results stated as analysis of variance of the average values obtained by serological absorbance represented by ELISA assay for the treated cucumber seedlings. Results obtained for the cucumber samples treated with one of each applied nettle weed and yarrow ethanolic extracts showed a significant decrease (with 1% variation) in the CMV-Fny titer in inoculated leaves as well as the young recently grown leaves of the treated cucumber seedlings compared to the negative control (cucumber seedlings just received water instead of any plant extract) within 3 days (a_1), 6 days (a_2), 9 days (a_3) and 12 days (a_4) after virus inoculation. Different concentrations used in this study were as follow: 200 ppm (b_2), 800 ppm (b_3) and 1000 ppm (b_4), used in this research. Histograms A and C represented the comparisons between the mean values obtained by ELISA for the inoculated leaves of the cucumber seedlings treated with each of the studied plant extracts. Histograms B and D represented the comparisons between the mean values obtained by ELISA for the young newly grown leaves of the cucumber seedlings treated with each of the studied plant extracts.

برای این بررسی از داروی ضدویروسی آسیکلوویر که در پزشکی برای درمان بیماری‌های ویروسی استفاده می‌شود با غلظت‌های ۲۰۰ppm، ۸۰۰ppm و ۱۰۰۰ppm به‌عنوان شاهد مثبت به‌صورت مجزا برای مقایسه توانایی کنترل‌کنندگی عصاره‌های گیاهی، استفاده شد و اثر آن در کاهش تیتر CMV-Fny در برگ‌های مایه‌کوبی شده (شکل C -۲) و نیز برگ‌های هوایی (شکلD -۲) گیاهچه‌های خیار در زمان‌های ۳ تا ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی با ویروس بررسی

شد. تنها غلظت‌های ۱۰۰۰ppm و ۸۰۰ppm آسیکلووِیر موجب کاهش معنی‌دار تیتر ویروس به ترتیب به میزان ۷ و ۶ برابر در برگ‌های مایه‌کوبی شده در زمان‌های ۶ تا ۱۲ روز پس از تیمار در مقایسه با نمونه شاهد منفی شدند (شکل D -۲). در حالی‌که در برگ‌های تازه رشد یافته گیاهچه‌های خیار، کاهش تیتر ویروس از روز سوم پس از تیمار با تمامی غلظت‌های این ماده به ترتیب به میزان ۲ تا ۲/۵ برابر در مقایسه با نمونه شاهد منفی مشاهد شد (شکل D -۲).



شکل ۲- بررسی آماری نتایج حاصل از آزمون الایزا مربوط به کاهش تیتر CMV-Fny پس از تیمار با عصاره‌های اتانولی گیاه بید و همچنین ماده ضدویروسی آسیکلووِیر در مقایسه با نمونه شاهد منفی (b1). نتایج بر مبنی تجزیه واریانس میانگین عددی حاصل از جذب سرولوژیک نمونه‌های خیار تیمار شده با عصاره اتانولی بید و ماده آسیکلووِیر در آزمون الایزا بیان شده است. نتایج حاصل از تأثیر هر یک از عصاره‌های مورد بررسی در برگ‌های مایه‌کوبی شده با ویروس و همچنین برگ‌های تازه رشد یافته گیاهچه‌های خیار بیانگر کاهش معنی‌دار با اختلاف ۱٪ تیتر CMV-Fny در مقایسه با نمونه شاهد منفی (گیاهچه خیار مایه‌کوبی شده با CMV-Fny که به جای عصاره تنها با آب تیمار شده بود) در زمان‌های ۳ روز (a_1)، ۶ روز (a_2)، ۹ روز (a_3) و ۱۲ روز (a_4) پس از مایه‌کوبی با ویروس بود. برای این بررسی از غلظت‌های مختلف ۲۰۰ ppm (b_2)، ۸۰۰ppm (b_3) و ۱۰۰۰ppm (b_4) عصاره بید و آسیکلووِیر استفاده شد. هیستوگرام‌های A و C مربوط به مقایسه میانگین داده‌های حاصل از الایزا برای نمونه‌های تیمار شده با عصاره بید و داروی آسیکلووِیر و مایه‌کوبی شده با ویروس در برگ‌های مایه‌کوبی شده می‌باشد. هیستوگرام‌های B و D مربوط به مقایسه میانگین داده‌های حاصل از الایزا برای نمونه‌های تیمار شده با عصاره بید و داروی آسیکلووِیر و مایه‌کوبی شده با ویروس در برگ‌های تازه رشد یافته گیاهچه خیار می‌باشد.

Fig. 2. Statistics evaluation of the results obtained by ELISA for the effect of willow medicinal plant extract as well as acyclovir antiviral ointment on CMV-titer decreasing compared to the negative control sample (b1). Results stated as analysis of variance of the average values obtained by serological absorbance represented by ELISA assay for the cucumber seedlings treated with the willow extract and acyclovir ointment. Results obtained for the cucumber samples treated with applied ethanolic extract of willow plant and acyclovir ointment showed a significant decrease (with 1% variation) in the CMV-Fny titer in inoculated leaves as well as the young recently grown leaves of the treated cucumber seedlings compared to the negative control (cucumber seedlings just received water instead of any plant extract) within 3 days (a_1), 6 days (a_2), 9 days (a_3) and 12 days (a_4) after virus inoculation. Different concentrations of willow extract and acyclovir were as follow: 200 ppm(b_2), 800 ppm(b_3) and 1000 ppm (b_4), for this research. Histograms A and C represented the comparisons between the mean values obtained by ELISA for the inoculated leaves of the cucumber seedlings treated with each of the studied plant extracts. Histograms B and D represented the comparisons between the mean values obtained by ELISA for the young newly grown leaves of the cucumber seedlings treated with each of the studied plant extracts.

نتایج بررسی شاخص شدت بیماری DSI در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با عصاره اتانولی هر یک از گیاهان دارویی مورد بررسی در این تحقیق بیانگر کاهش معنی‌دار DSI ویروس موزاییک خیار تا روز دوازدهم پس از مایه‌زنی در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با تمام عصاره‌ها در مقایسه با نمونه مربوط به شاهد منفی بود (جدول ۱)، لازم به ذکر است میزان DSI از زمان ۶ روز پس از مایه‌کوبی با ویروس در نمونه‌های تیمار شده با هر یک از عصاره سنجش شد تا علایم قابل ثبت و رتبه‌دهی مطابق با فرمول باشد. با این وجود کاهش معنی‌دار شاخص DSI در تمام نمونه‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌ها در مقایسه با نمونه شاهد از روز ۶ تا ۱۲ پس از مایه‌زنی قابل مشاهده بود (جدول ۱). بیشترین میزان کاهش شاخص بیماری‌زایی در نمونه‌های خیار تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰ppm و ۸۰۰ppm عصاره الکلی بومادران با کاهش میزان علایم به میزان به ترتیب ۸۷/۷٪، ۸۳٪ و غلظت ۱۰۰۰ppm گزنه با کاهش میزان شدت علایم به میزان ۸۴٪ در روز دوازدهم پس از مایه‌زنی با ویروس مشاهده گردید و کمترین میزان DSI مربوط به غلظت ۲۰۰ppm عصاره اتانولی گیاه بید به میزان ۴۵٪ در مقایسه با شاهد آلوده بود (جدول ۱).

جدول ۱- شاخص شدت بیماری‌زایی CMV-Fny در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ (ppm) عصاره اتانولی گیاهان گزنه، بومادران و بید. نتایج برای زمان‌های ۶، ۹ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی (DAI) با ویروس و بر حسب درصد بیان شده است.

Table 1. Disease severity index (DASI) for CMV-Fny in cucumber seedlings. Results are for cucumber seedlings treated with the 200, 800 and 1000 ppm concentrations of ethanolic extracts of weeping willow, yarrow and common nettle plants up to 12 days after inoculation (DAI). Results are indicated on the basis of the percent of infection.

نوع عصاره اتانولی Type of ethanol extract	غلظت‌های مختلف عصاره (ppm) Different concentrations of extract (ppm)	شاخص شدت بیماری DSI در گیاهچه‌های خیار تیمار در روزهای پس از مایه‌زنی با CMV-Fny DSI disease severity index in cucumber seedlings treated in the days after inoculation with CMV-Fny		
		6 DAI	9 DAI	12 DAI
بومادران Yarrow	1000	16±0.06 **	20±0.07 **	13±0.02 **
	800	13±0.02 **	17±0.07 **	11±0.06 **
	200	11±0.01 *	14±0.07 **	8±0.08 **
گزنه Common nettle	1000	16±0.04 **	18±0.06 **	10±0.09 **
	800	18±0.02 **	21±0.09 **	12±0.10 **
	200	21±0.03 **	26±0.06 **	19±0.03 **
بید Weeping willow	1000	19±0.01 *	28±0.06 **	18±0.003 **
	800	20±0.02 **	25±0.07 **	21±0.06 **
	200	24±0.09 **	30±0.02 *	36±0.02 **
گیاهچه خیار آلوده به CMV بدون تیمار با عصاره Cucumber seedling infected with CMV without extract treatment		29±0.04 **	45±0.03 **	65±0.01 **

خطای معیار (Standard Error).

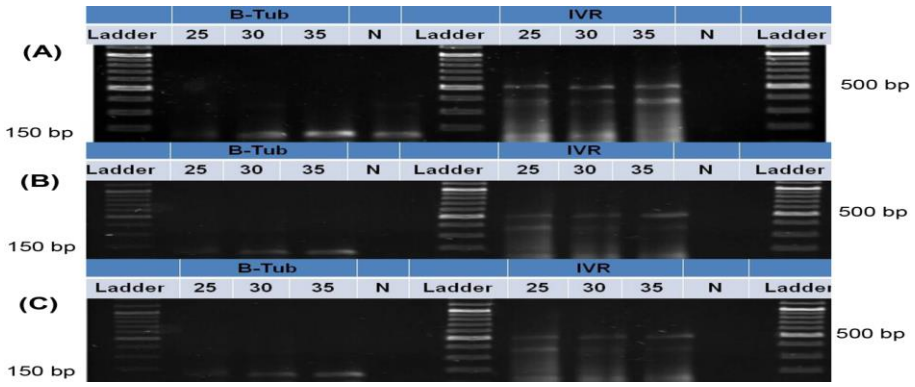
*، ** معنی دار در سطوح بترتیب ۵ و ۱ درصد

*, ** Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

تعیین نیمه کمی بیان ژن IVR درگیاهچه‌های خیار

پس از بهینه‌سازی واکنش PCR و نرمال‌سازی واکنش با استفاده از کنترل درونی، محصولات دلخواه حاصل از تکثیر ژن IVR به‌اندازه ۵۰۰bp و همچنین ۱۵۰bp حاصل از تکثیر ژن B-Tub به‌عنوان کنترل درونی به‌دست آمد (شکل ۳). نتایج آزمون Semi quantitative RT-PCR نشان داد در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ppm در بومادران (A -۳)، و غلظت ۱۰۰۰ppm گزنه (شکل B -۳) و همچنین بید (شکل C -۳) در زمان ۱۲ روز پس از مایه‌زنی با ویروس بیان ژن مهارکننده تکثیر ویروس IVR افزایش می‌یابد. با این وجود داروی ضدویروسی آسیکلوویر به‌عنوان شاهد مثبت که

اثر معنی‌داری در کاهش تیتر CMV در آزمون الایزا نشان داده بود، نتوانست در غلظت‌های مورد استفاده موجب افزایش بیان ژن IVR گردد. همچنین هیچ بیانی از این ژن در نمونه شاهد منفی آلوده به ویروس که عصاره‌های گیاهی دریافت نکرده بود، مشاهده نشد. میزان اشباع شدگی و شدت باند محصول پی‌سی‌آر مربوط به ژن IVR در مقایسه با کنترل درونی برای گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌ها بیانگر بیان بیشتر این ژن در نمونه‌های تیمار شده با عصاره بومادران در مقایسه با سایر عصاره‌ها بود (شکل ۳).



شکل ۳- نتایج آزمون sq-RT-PCR برای بررسی حضور نسخه‌های ژن IVR در گیاهچه‌های خیار آلوده به CMV-Fny و تیمار شده با عصاره‌های اتانولی گیاهان دارویی بومادران (A) گزنه (B) و بید (C)، ۱۲ روز پس از تیمار مایه‌کوبی با ویروس. برای این آزمون از داروی آسیکلوویر در غلظت 1000ppm به‌عنوان شاهد مثبت و از نمونه آلوده به CMV و تیمار شده با آب به‌عنوان نمونه CMV-Control (N) استفاده شد. PCR در چرخه‌های ۲۵، ۳۰ و ۳۵ انجام شد. L: از نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز شرکت فرمنتاس به‌عنوان نردبان وزن مولکولی استفاده شد.

Fig. 3. Results of the sq-RT-PCR for assessing the transcript levels of Inhibitor of viral replication (IVR) gene in CMV-Fny-infected cucumber seedlings treated with the ethanolic extract of the yarrow (A), nettle weed (B) and willow (C) medicinal plants, 12 days after virus inoculation. Acyclovir medicine at the concentration of 1000 ppm was used as positive control and CMV infected cucumber plants treated with the water was used as CMV-control sample (N). PCR was done at the 25, 30 and 35 cycles. 100bp DNA ladder (Fermentas, Inc) used as ladder molecular marker.

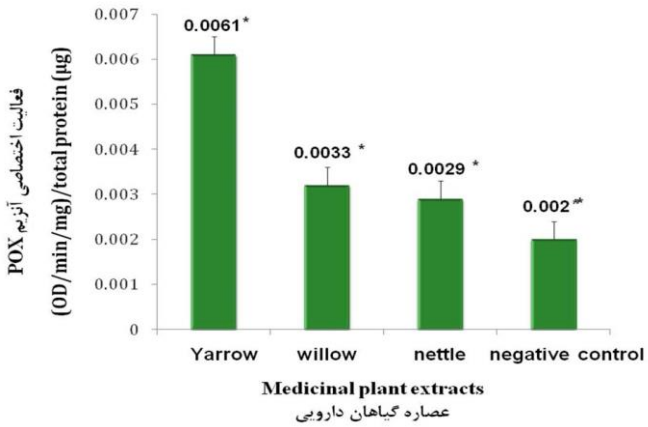
سنجش کمی فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز (POX)

فعالیت اختصاصی آنزیم POX در این پژوهش به‌عنوان شاخصی برای فعال شدن متابولیسم دفاع در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هریک از عصاره‌های مورد بررسی سنجش کمی شد. نتایج به‌دست آمده از بررسی فعالیت اختصاصی آنزیم POX، افزایش معنی‌دار میزان فعالیت این آنزیم تنشی را در برگ‌های جوان تازه رشد یافته در تمام نمونه‌های تیمار شده با عصاره‌های اتانولی گیاهان دارویی مورد استفاده در این پژوهش در مقایسه با نمونه شاهد آلوده به CMV-Fny و فاقد تیمار با عصاره نشان داد (شکل ۴). بیشترین میزان افزایش معنی‌دار فعالیت اختصاصی این آنزیم با سه برابر افزایش فعالیت در نمونه‌های آلوده به CMV-Fny و تیمار شده با عصاره اتانولی گیاه بومادران در مقایسه با نمونه شاهد منفی (بدون تیمار با عصاره) آلوده به CMV-Fny در زمان ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی با ویروس در غلظت ۱۰۰۰ppm در برگ‌های جوان تازه رشد یافته گیاهچه‌های خیار مشاهده شد (شکل ۴). عصاره گیاهان بید و گزنه هریک با میزان دو برابر افزایش فعالیت اختصاصی آنزیم به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار داشتند.

بحث

از ویروس‌های بیماری‌زای گیاهان به‌عنوان سرطان‌های گیاهی یاد می‌کنند که پس از عوامل بیماری‌زای قارچی به‌عنوان دومین عوامل خسارت‌زای محصولات کشاورزی در سراسر جهان محسوب می‌شوند (Zhao *et al.*, 2017). میزان خسارت سالانه جهانی آنها حدود ۶۰ میلیارد دلار در بخش کشاورزی محاسبه شده است که از این میزان چیزی حدود ۲۰ میلیارد دلار آن فقط به خسارت حاصل از آنها به محصولات غذایی و کشاورزی اختصاص دارد

(Jones and Naidu, 2020; Xie *et al.*, 2009). سوئن بیش از چهل‌هزار نوع از متابولیت‌های ثانویه با توانایی کنترل قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها را گزارش نموده است (Swain, 1977). همچنین تأثیر کنترل‌کنندگی پروتئین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، پلی ساکاریدها و فنل‌ها برعلیه ویروس‌ها در گیاهان اثبات شده است (Zhao *et al.*, 2017). تاکنون بیش از ۲۴۰۰ گونه گیاهی را با ویژگی مهارکنندگی فعالیت میکروارگانیسم‌ها را گزارش نمودند (Zhao *et al.*, 2017). این محققین بیشترین توانایی ضدویروسی را در عصاره گونه‌های گیاهی *Forsythia suspensa* Vahl, *Rheum officinalle* Bail و *Isatis tinctoria* L یافتند.



شکل ۴- ارزیابی فعالیت اختصاصی آنزیم POX در برگ های جوان تازه رشد یافته خیار تیمار شده با غلظت ۱۰۰۰ppm عصاره اتانولی گیاهان بومادران، بید و گزنه در زمان ۱۲ روز بعد از آلودگی با CMV-Fny. از گیاهچه‌های خیار آلوده به CMV-Fny و بدون تیمار با عصاره به عنوان کنترل منفی در کنار سایر تیمارها استفاده شد. ستاره بر روی هیستوگرام بیانگر معنی‌داری در سطح‌های ۵٪ (*) و ۱٪ (**) می‌باشد.

Fig. 4. Peroxidase specific activity in upper young leaves of CMV-Fny infected cucumber seedlings treated with the 1000ppm ethanolic extract of yarrow, willow and nettle weed 12 days post inoculation. Non treated CMV-Fny-infected cucumber seedlings were used as negative control. Star on the histograms indicated to the statistically significant differences: (*<0.01, 0.05<**<0.01) with standard deviation of mean values.

نتایج آزمون الایزا در این پژوهش نشان داد عصاره اتانولی هر سه گیاه دارویی مورد تحقیق شامل گزنه، بومادران و بید از توان کاهش تیتر ویروس در برگ‌های بالغ مایه‌کوبی شده با CMV-Fny و همچنین برگ‌های تازه رشد یافته برخوردار می‌باشند. این امر می‌تواند بیانگر تأثیر فیزیکی مستقیم عصاره‌های مورد بررسی بر پیکره‌های ویروس در برگ‌های بالغ مایه‌کوبی شده و هم تأثیر غیرمستقیم آنها از طریق افزایش توان دفاع سیستمیک در برگ‌های تازه رشد یافته و جوان گیاهچه‌های خیار برعلیه CMV-Fny باشد.

گیاهان دارویی منابع غنی از ترکیبات آلی مختلفی مثل پروتئین‌ها (مانند بازدارنده‌های تکثیر ویروس و بازدارنده‌های ریبوزومی)، فنل‌ها (ساده و پیچیده)، پپتیدها و متابولیت‌های ثانویه هستند (Waziri, 2015). نتایج این بررسی در مجموع نشان داد تیمار خاک گلدان‌هایی که گیاهچه‌های خیار در آن کاشته شده‌اند با غلظت ۱۰۰۰ppm بید و گزنه و همچنین ۲۰۰ ppm بومادران باعث کاهش معنی‌دار تیتر پروتئین‌های CMV تا ۱۲ روز پس از تیمار گیاهچه‌های خیار شدند. در این میان بهترین میزان کنترل‌کنندگی توسط عصاره گزنه صورت گرفت. پیش از این نیز اثر کنترل‌کنندگی عصاره اتانولی گیاه گزنه جهت کاهش میزان تیتر عوامل ویروسی دخیل در کمپلکس ویروسی موزائیک رز در محیط کشت بافت رز اثبات شده بود (Rakhshandehroo *et al.*, 2012). پیش از این تأثیر مثبت عصاره‌های الکلی انجیر و زیتون تلخ در کنترل CMV-Fny از طریق افزایش توان دفاعی میزبان خصوصا در غلظت ۱۰۰ppm آنها به‌دست آمده بود (سنجریان و همکاران، ۱۴۰۰). در گذشته نشان داده شد با استفاده از عصاره ی خالص‌سازی شده گیاه لاله‌عباسی *Mirabilis jalapa* با غلظت ۳۰۰µg از پروتئین Mirabilis antiviral protein (MAP) و اضافه نمودن مستقیم آن به ریزوسفر گلدان‌های گیاه

Nicotiana benthamiana مایه‌کوبی شده با ویروس CMV-Fny با القاء مقاومت سیستمیک اکتسابی در گیاه می‌توان موجب کنترل ویروس شد (Khosroshahi *et al*., 2021).

نتایج آزمون پی‌سی‌آر در تحقیق حاضر بیانگر افزایش بیان نسخه‌های ژنی IVR در روز ۱۲ پس از تیمار با عصاره در گیاهچه‌های خیار آلوده به CMV-Fny بود. اگرچه افزایش بیان ژن مذکور پس از تیمار گیاهچه‌های خیار با داروی آسیکلوویر دیده نشد. در حالی‌که این ماده توانست بر مبنی نتایج این پژوهش موجب کاهش تیتر CMV گردد. این امر می‌تواند بیانگر تأثیر عصاره‌های گیاهی در کنترل CMV-Fny از مکانیسم متفاوت از ماده آسیکلوویر باشد. پیش از این بیان ژن IVR در توتون *N. tabacum* cv. *Samsun* nn، تراریخت دارای ژن NN مقاوم به ویروس Y سیب زمینی (PVY) با سازوکار دفاع سیستمیک اکتسابی (SAR) مشاهده شده بود (Rakhshandehroo *et al*., 2009). افزایش بیان ژن IVR در سلول‌های برگ‌های آلوده به TMV گیاه توتون هم در پاسخ فوق حساسیت و هم در بافت‌هایی که مقاومت القایی در آنها ایجاد شده بود، گزارش شده است (Loebenstein, 2009). همچنین مشخص شده است که افزایش بیان ژن IVR می‌تواند تا ۵ روز پس از مایه‌زنی مکانیکی گیاهچه‌های توتون با TMV و هم‌زمان با بروز پاسخ فوق حساسیت و یا تا دو هفته پس از مایه‌زنی با PVY در توتون غیر تراریخت حساس به آلودگی و هم‌زمان با بروز علائم موزاییک سیستمیک افزایش پیدا کند (رخشنده رو و همکاران، ۱۳۹۰).

از ماده آسیکلوویر در این پژوهش به‌عنوان یک داروی شیمیایی کنترل‌کننده ویروس‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی به‌عنوان شاهد مثبت برای مقایسه میزان تأثیر هر یک از عصاره‌های گیاهی مورد بررسی استفاده شد. اثر این ماده در کاهش تیتر ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (PLRV) *Potato leafroll virus* در غلظت‌های بالای ۱۰۰۰ppm در شرایط درون شیشه (In Vtro) ثابت شده است (Singh *et al*., 2015).

در این پژوهش افزایش میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌های مورد تحقیق و آلوده به CMV تا زمان ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی با ویروس مشاهده شد. افزایش فعالیت اختصاصی این آنزیم در گیاهچه‌های توتون آلوده PVY مرتبط با دفاع سیستمیک میزبان گزارش شده است (Rakhshandehroo *et al*., 2012). همچنین در پژوهش‌های پیشین افزایش میزان فعالیت اختصاصی این آنزیم در زمان آلودگی گیاهان مختلف با ویروس‌های گیاهی در زمان بروز دفاع سیستمیک اکتسابی و هم‌زمان با تجمع مواد فنولی و متابولیت‌های ثانویه ضدمیکروبی در بافت‌های مقاوم به آلودگی‌های ویروسی گزارش شده است (Shopova *et al*., 2020). با این وجود، نتایج این بررسی نشان داد که عصاره‌های استفاده شده موجب کنترل کامل CMV نمی‌شوند؛ بلکه با افزایش توان مقاومت گیاه می‌توانند موجب افزایش سطح تحمل به آلودگی CMV در گیاهچه‌های خیار تیمار شوند. پژوهش‌های گذشته نشان داده بود که عصاره‌های الکلی گیاهان دارویی که با اتانول استخراج شده‌اند، از ویژگی‌های ضدمیکروبی مؤثری در برابر آلودگی‌های ویروسی برخوردار هستند (Medini *et al*., 2014). یکی از دلایل آن می‌تواند حلالیت بهتر ترکیبات فنولی در الکل در مقایسه با آب باشد (Medini *et al*., 2014).

با وجود آن‌که نتایج آزمون الایزا بیانگر مؤثرتر بودن عصاره اتانولی گزنه در مقایسه با بومادران در کاهش تیتر CMV در گیاهچه‌های خیار تیمار شده بود؛ اما در مجموع نتایج این پژوهش مشخص ساخت که عصاره گیاه بومادران موجب کاهش شدت بیماری‌زایی و افزایش فاکتورهای مقاومتی در گیاهچه‌های خیار به میزان بیشتری در مقایسه با سایر عصاره‌های مورد بررسی شده است. نتایج پژوهش‌های گذشته اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی گیاه بومادران را برعلیه آلودگی‌های قارچی و باکتریای گیاهان و ویروسی جانوران را اثبات نموده بود (Stan *et al*., 2021). همچنین مشخص شده بود که عصاره اتانولی گیاه بومادران حاوی غلظت بالای ترکیب فنولی Flavanone naringenin می‌باشد که از توانایی ضدمیکروبی بالایی برخوردار است (Stan *et al*., 2021). با این وجود تحقیقی در خصوص تأثیر عصاره اتانولی این گیاه بر علیه ویروس‌های گیاهی صورت نپذیرفته است. تا کنون تحقیقات زیادی در حوزه پزشکی در خصوص اثرات ضدمیکروبی از جمله اثر ضدویروسی عصاره‌های آبی و الکلی گزنه صورت پذیرفته است (Semalty *et al*., 2017). مشخص شده است که لکتین موجود در بافت‌های مختلف این گیاه اثر ضدویروسی دارد (Golshan *et al*., 2015). همچنین یافته‌های پیشین

حاکی از آن است که عصاره گزنه حاوی مقادیر بسیار زیادی از انواع ترکیبات فنولی می‌باشد که می‌تواند موجب تحریک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بدن جانوران شده و از این طریق به کنترل تنش حاصل از آلودگی‌های میکروبی و در نهایت بی‌نظمی متابولیکی حاصل از بیماری در بدن آنها کمک نماید (Semalty *et al.*, 2017). با این وجود پژوهش‌ها در خصوص کارایی عصاره‌های این گیاه در کنترل بیماری‌های ویروسی گیاهان بسیار ناچیز می‌باشد (رخشنده‌رو و همکاران، ۱۳۹۴). همین امر در خصوص عصاره پوست درخت بید نیز صادق است. پوست درخت بید حاوی مقادیر زیادی از انواع ترکیبات فنولی از جمله اسید سالیسیلیک می‌باشد که اثر کنترل‌کنندگی آن در برابر ویروس‌های جانوری به تازگی اثبات شده است (Tienaho *et al*., 2021). القاء شاخص‌های دفاع سیستمیک در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با آن در این تحقیق می‌تواند به دلیل وجود ماده اسید سالیسیلیک در عصاره اتانولی پوست درخت بید باشد که موجب کاهش تیتر CMV-Fny شده است.

با وجود تمامی توانمندی‌هایی که ترکیبات گیاهی برای کنترل عوامل بیماری‌زای ویروسی در گیاهان دارند، اما به دلایل مختلفی از جمله پایدار نبودن آنها در محیط مصرف در کشاورزی، محدود بودن منابع زیستی و نیاز به فن‌آوری اختصاصی جهت مصرف آنها توسط کشاورزان، از آنها در سطح وسیع در بخش کشاورزی نمی‌توان استفاده نمود.

در مجموع نتایج این پژوهش حکایت از مؤثر بودن عصاره‌های اتانولی گیاهان گزنه، بید و بومادران در کاهش شدت بیماری ایجاد شده توسط CMV و افزایش بیان ژن ضدویروسی IVR و آنزیم تنشی POX به‌عنوان فاکتورهای دفاع میزبان خیار برعلیه CMV-Fny داشت. می‌توان انتظار داشت که عصاره‌های به‌کار رفته از توان تحریک دفاع‌های سیستمیک برعلیه CMV در این پژوهش برخوردار بوده‌اند و از این طریق توانسته‌اند سطح آلودگی ویروس مذکور را کاهش دهند. نتایج این پژوهش می‌تواند برای استفاده از این عصاره‌ها در سطح گلخانه‌های کشت خیار جهت مدیریت مبارزه و کنترل CMV کاربرد داشته باشد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس‌گزاری صمیمانه خود را از همکاری‌های آقای دکتر کامبیز لاریجانی عضو هیئت علمی گروه شیمی واحد علوم و تحقیقات تهران و سرکار خانم دکتر مرجان دیانت عضو هیئت علمی گروه باغبانی دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی واحد علوم و تحقیقات تهران ابراز می‌نمایند.

منابع **References**

رخشنده رو، ف. و زمانی زاده، ح. ۱۳۹۰. تحریک اجزا دفاع سیستمیک اکتسابی (SAR) در توتون سامسون دارای ژن مقاومت N توسط ویروس Y سیب‌زمینی (PVY). ژنتیک نوین ۶ (۱): ۱۰۸-۹۷.

سنجریان، م.، رخشنده‌رو، ف. و رضایی، س. ۱۴۰۰. اثر عصاره‌های خام آبی و اتانولی گیاهان انجیر و زیتون تلخ بر بیماری ناشی از ویروس موزائیک خیار در گیاه خیار (*Cucumis sativus*) در شرایط گلخانه. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۰(۲): ۴۷-۶۱.

رخشنده‌رو، ف.، مدرسی، ا و زمانی زاده، ح. ۱۳۸۸. بررسی اثر ضدویروسی اسانس آبی و الکلی گزنه دو پایه (*Urtica dioica*) در حذف عامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک رز در محیط کشت. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران (۳): ۴۱۳- ۴۰۳.

علیشیری، ا. و رخشنده‌رو، ف. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدویروسی عصاره آبی گیاه سرخاب کولی (*Phytolacca americana* L.) در کنترل ویروس وای سیب‌زمینی. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۳۱ (۳): ۴۸۸- ۴۷۹.

Akad, F., Teverovsky, E., David, A., Czosnek, H., Gidoni, D., Gera, A. and Loebenstein, G. 1999. A cDNA from tobacco codes for an inhibitor of virus replication (IVR)-like protein. Plant Molecular Biology 40(6):969-976.

Bananej, K. and Vahdat, A. 2008. Identification, Distribution and Incidence of Viruses in Field-Grown Cucurbit Crops of Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, Firenze University Press. Mediterranean Phytopathological Union 47(3): 247-57.

Bashir, S. 2006. Detection, Differentiation and Phylogenetic Analysis of *Cucumber mosaic virus* Isolates from Cucurbits in the Northwest Region of Iran. Genes 32(3): 277-88

Goel, N., Anukrati, K. and Paul, P.K. 2016. Anti-phytopathogenic and SAR inducing properties of Neem: a review. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences 9: 2544-2555.

Golshan, M.R., Toghyani, M. and Gholamreza, G. 2015. Evaluation of nettle (*Urtica dioica*) and ginger (*Zingiber officinale*) powder on serum antioxidants and immune responses of broiler chicks. Der Pharmacia Lettre 7 (7): 411-415.

Habuka, Y., Murakami, M., Noma, T. and Kudo, Kh. 1989. Amino acid sequence of Mirabilis Antiviral Protein, total synthesis of its gene and expression in *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry 264 (12): 6629-6637

Helal, I.M. 2019. Use of biocides for controlling viral diseases that attack common bean and cucumber plants. Folia Horticulturae 31: 159–170.

Jassim ,S.A.A. and Naji, M.A. 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. Journal of applied microbiology 95(3): 412-427.

Jones, R.C.A. and Naidu, R. 2020. Global dimensions of plant virus diseases: current status and future perspectives. Annual Review of Virology 6: 387-409.

Khosroshahi, S.T., Canto, T., Rakhshandehroo, F. and Jozani, S.GH. 2021. Molecular characterization and transient expression in plants of a *Mirabilis jalapa* antiviral protein (MAP), and its use in functional studies. European Journal of Plant Pathology 162: 415-432.

Kusumawati, D.E., Hadiastono, T. and Aini, L.Q. 2015. Leaf Extract of *Mirabilis jalapa* L. Induced Defense of Tomato Plant (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Against *Cucumber mosaic virus* (CMV) Infection. Journal of Tropical Plant Protection 1: 46-51.

Leser, C. and Treutter, D. 2005. Effects of Nitrogen Supply on Growth, Contents of Phenolic Compounds and Pathogen (Scab) Resistance of Apple Trees. Physiologia Plantarum 123: 49-56.

Loebenstein, G. 2009. Local Lesions and Induced Resistance. Advances in Virus Research 75: 73-117.

Loebenstein, G., David, D.R., Leibman, D., Gal-On, A., Vunsh, R., Czosnek, H. and Elad, Y. 2010. Tomato plants transformed with the Inhibitor-of-Virus-Replication gene are partially resistant to *Botrytis cinerea*. Phytopathology 100(3): 225-229.

Mahmoud, S.Y.M., Gad-Rab, S.M.F., Hussein, N. and Shoreit, A.A.M. 2010. Antiviral Activity of Latex from Ficus nitida Against Plant Viruses. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 5: 198–205.

Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L. and Scambia, G. 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. Biological Procedures Online 3: 19-25.

Massumi, H., Shabanian, M., Hosseini, P.A., Heydarnejad, J. and Rahimian, H. 2009. Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the Southeast and central regions of Iran. Plant Disease 93: 67-72.

Medini, F., Fellah, H., Ksouri, R. and Abdelly, Ch. 2014. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. Journal of Taibah University for Science 8(3): 216-224.

Mondal, S., Wenninger, E.J., Hutchinson, P.J.S., Whitworth, J.L., Shrestha, D., Eigenbrode, S.D. and Bosque-Pérez, N.A. 2016. Comparison of transmission efficiency of various isolates of *Potato virus Y* among three aphid vectors. Entomologia Experimentalis et Applicata 158: 258-268.

Naserinasab, F., Heydari, R., Sanjarian, F. and Rakhshandehroo, F. 2018. Investigation of the defense genes expression of Phenylalanine Ammoniumase and Peroxidase in interaction with Neem extract of and *Meloidogyne javanica* nematodes in tomato. Journal of Cell and Tissue 9: 360-377.

Palukaitis, P. and Garcia- Arenal, F. 2003. Cucumoviruses. Advances in Virus Research 62: 241–323.

Petrov, N., Stoyanova, M. and Valkova, M. 2016. Antiviral activity of plant extract from *Tanacetum vulgare* against *Cucumber Mosaic Virus* and *Potato Virus Y*. Journal of Bioscience and Biotechnolology 5: 189–194.

Rakhshandehroo, F., Shahsavan-Behboodi, B. and Mohammadi, M. 2012. Changes in Peroxidase Activity and Transcript Level of the MYB1 Gene in Transgenic Tobacco Plants Silenced for the RDR1 Gene After Systemic Infection with *Potato virus Y*. Journal of Phytopathology 160: 187-194.

Rakhshandehroo, F., Takeshita, M., Squires, J. and Palukaitis, P. 2009. The Influence of RNA-Dependent RNA Polymerase 1 on *Potato virus Y* Infection and on other antiviral Response Genes. Molecular Plant-Microbe Interactions 22: 1312–1318.

Rasoulpour, R. and Izadpanah, K. 2008. Properties and taxonomic position of hoary cress strain of Cucumber mosaic virus. Journal of Plant Pathology 90(1): 97-102.

Semalty, M., Adhikari, L., Semwa, D., Chauhan, A., Mishra, A., Kotiyal, R. and Semalty, A. 2017. A Comprehensive Review on Phytochemistry and Pharmacological Effects of Stinging Nettle (*Urtica dioica*). Current Traditional Medicine 3: 156-167.

Silber, G. and Burk, L.G. 1965. Infectivity of *tobacco mosaic virus* stored for fifty years in extracted, 'unpreserved' plant juice. Nature 206: 740-741.

Sofy, A.R., Dawoud, R.A., Sofy, M.R., Mohamed, H.I. Ahmed A. Hamed, L. 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: 2341.

Shopova, E., Mihailova, B., Todorova, D. and Sergiev, I. 2020. Systemic Acquired Resistance Induced by Compatible and Incompatible *Tomato Mosaic Viruses* Effectively Controls Bacterial Spot and Speck Diseases in Tomato. Agriculture 10(7): 302-312.

Singh, B. 2015. Effect of Antiviral Chemicals on *In Vitro* Regeneration Response and Production of PLRV-Free Plants of Potato. Journal of Crop Science Biotechnology 18(5): 341-348.

Stan, D., Enciu, A.M., Mateescu, A.L., Ion, A.C., Brezeanu, A.C., Stan, D. and Tanase. C. 2021. Natural compounds with antimicrobial and antiviral effect and nanocarriers used for their transportation. Frontier in Pharmacology 12: 723233.

Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. Annual Review of Plant Physiology 28: 479-501.

Tienaho, J., Reshamwala, D., Sarjala, T., Kilpeläinen, P., Liimatainen, J., Dou, J., Viherä-Aarnio, A., Linnakoski, R., Marjomäki, V. and Jyske, T. 2021. *Salix* spp. Bark Hot Water Extracts Show Antiviral, Antibacterial, and Antioxidant Activities of the Bioactive Properties of 16 Clones. Frontier of Bioengineering and Biotechnology. 9: 797939.

Waziri, H.M.A. 2015. Plants as Antiviral Agents. Journal of Plant Pathology and Microbiology 6: 254-259.

Xie, L.H., Lin, Q.Y. and Wu, Z.J. 2009. Plant Virus: Virology and Molecular Biology. Science Press. Beijing.

Zeng, R., Liao, Q., Feng, J., Li, D. and Chen, J. 2007. Synergy between *Cucumber Mosaic Virus* and *Zucchini Yellow Mosaic Virus* on Cucurbitaceae hosts tested by Real-time Reverse Transcription-Polymerase chain reaction. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 39: 431-437.

Zhang, Y., Moqtaderi, Z., Rattner, B.P., Euskirchen, G., Snyder, M., Kadonaga, J.T., Liu X.Sh. and Struhl, K. 2009. Intrinsic histone-DNA interactions are not the major determinant of nucleosome positions in vivo. Nature Structural & Molecular Biology 16: 847–852.

Zhao, L., Feng, C., Wu, K., Chen, W., Chen, Y., Hao, L. and Wu, Y. 2017. Advances and prospects in biogenic substances against plant virus. Pesticide Biochemistry and Physiology 135: 15-26.

Zhu, Z.F. and Qiu, W.F. 1989. A primary study of the therapeutic effects of some medicinal herb extracts on the pepper mosaic caused by CMV. Acta Phytopathology Singapore 19: 123-128.

Study on the antiviral activity of Weeping willow, Yarrow and common Nettle plant ethanolic extracts on *Cucumber mosaic virus* infection in cucumber under greenhouse conditions

T. Safarzadeh Khosroshahi[1*], F. Rakhshandehroo[2], T. Canto[3] and Gh. R. Salehi Jouzani[4]

Received: 06 May, 2021 Accepted: 24 Aug., 2021

ABSTRACT

In this research the antiviral activity of medicinal plants including Weeping willow, Yarrow and Common Nettle ethanolic extracts against CMV-Fny infection in cucumber plant was explored under the greenhouse conditions. To this end, cucumber seedlings were mechanically inoculated with the CMV-Fny. The extract of the mentioned plants was added directly into the plants' rhizosphere at 200 ppm, 800 ppm and 1000 ppm concentrations. CMV-infection level in inoculated as well as young grown leaves was tested by DAS-ELISA in 3, 6, 9 and 12 days post-inoculation. Peroxidase (POX) enzyme activity was assessed for the cucumber seedlings which showed maximum virus inhibition at 12 days post-inoculation and the expression level of inhibitor of viral replication (IVR) gene was also examined by semi-quantitative RT-PCR (sq-RT-PCR) method for them at this time. ELISA results indicated that at 12 days after virus inoculation, CMV-Fny protein titer in inoculated and young grown leaves as well as disease severity index (DSI) decreased in cucumber seedlings treated with the plant extracts compared to the negative control. The most decreased level of CMV-titer observed 12 days at mature inoculated and young leaves by applying 1000 ppm concentration of nettle and 200 ppm of yarrow extracts. The expression level of IVR gene and POX enzyme specific activity increased in treated cucumber seedlings at 12 days post inoculation, represent a systemic resistance activity against CMV-infection, after extracts treatment.

Keywords: Antiviral activity, medicinal plant, infection level, defense enzyme, systemic resistance

1. PhD student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Professor, Madrid Biology Research Center (CIB-CSIC), Madrid, Spain.
4. Professor, Department of Microbial Biotechnology and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRI), Karaj, Iran

Corresponding author: rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir