پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۰ (۲): ۶۱-۴۷ (۱۴۰۰) - مقاله پژوهشی
Journal of Applied Research in Plant Protection 10(2): 47-61 (2021)-Research Article

DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.12779

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

مریم سنجریان، فرشاد رخشنده رو✉، سعید رضائی

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

دریافت: ۹۹/۵/۱۰ بازنگری: ۹۹/۸/۱۵ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۰

چکیده

زیتون تلخ (*Melia azedarach*) از خانواده Meliaceae و انجیر (*Ficus carica*) از خانواده Moraceae، گیاهان مهم دارویی بومی ایران هستند. در این تحقیق اثر عصاره‌های خام آبی و اتانولی گیاهان زیتون تلخ و انجیر در کاهش شدت بیماری ناشی از ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) در بوته‌های خیار با استفاده از آزمون ساندویچ دوطرفه الایزا (DAS-ELISA) و Semi quantitative-RT-PCR (Sq-RT-PCR) مورد سنجش قرار گرفت. همچنین از آزمون Sq-RT-PCR برای سنجش میزان نسخه برداری ژن *PR-1* استفاده گردید و فعالیت اختصاصی آنزیم فنیل آلانین آمونیوم لیاز (PAL) سنجش شد. نتایج آزمون الایزا نشان داد میزان حضور CMV در گیاهچه‌های خیار، ۱۵روز بعد از تیمار با غلظت‌های ppm ۱۰۰ عصاره اتانولی و ۱۰۰۰ppm عصاره آبی انجیر و زیتون تلخ در مقایسه با شاهد آلوده بدون تیمار به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است. همچنین بیان ژن *PR-1* پس از تیمار نمونه‌ها با عصاره اتانولی انجیر و زیتون تلخ در غلظت ppm ۱۰۰ به طور معنی‌داری افزایش یافته و فعالیت اختصاصی آنزیم PAL در نمونه های تیمارشده با عصاره اتانولی انجیر و زیتون تلخ در غلظت ppm ۱۰۰ تا ۱۵ روز بعد از اضافه شدن عصاره در مقایسه با نمونه‌های آلوده تیمار نشده به طور معنی‌داری افزایش یافت و شدت بیماری ناشی از CMV در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با عصاره اتانولی انجیر و زیتون تلخ در غلظت ppm ۱۰۰ به طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج این بررسی در مجموع بیانگر فعال شدن احتمالی مقاومت سیستمیک اکتسابی در برابر CMV در گیاهچه‌های خیار از طریق سازوکارهای مختلف مولکولی و بیوشیمیایی توسط عصاره‌های الکلی گیاهان انجیر و زیتون تلخ مورد استفاده در این پژوهش می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنزیم PAL، اثر ضد ویروسی، ژن *PR-1*، مقاومت سیستمیک، Sq-RT-PCR

The effect of persian lilac and fig plant crude aquatic and ethanolic extracts on disease caused by *Cucumber mosaic virus* in cucumber (*Cucumis sativus*) plants under greenhouse condition

Maryam Sanjarian, Farshad Rakhshandehroo✉, 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: 31 Jul 2020 Revised: 5 Nov 2020 Accepted: 8 Feb 2021

Abstract

Persian lilac (*Melia azedarach*; Family: Meliaceae) and fig (*Ficus carica*; Family Moraceae) are important medicinal plants native to Iran. In this study, the antiviral effect of the crude ethanolic and aquatic extracts of the persian lilac and fig plants in decreasing disease severity caused by *Cucumber mosaic virus* (CMV) in cucumber plants was assessed using with the double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) and semi quantitative-RT-PCR (Sq-RT-PCR). In addition, the transcription level of PR-1 gene and specific activity of phenylalanine ammonia- lyase (PAL) enzyme were evaluated using Sq-RT-PCR assay. ELISA results showed that the presence level of CMV in cucumber seedlings was significantly decreased up to 15 days after their treating with the 100 ppm of ethanolic and 1000 ppm of aquatic extracts of fig and persian lilac plants in compare to the non-treated control plants. The PR-1 expression level and PAL enzyme specific activity were also significantly increased compared to the non-treated control infected plants in samples treated with the ethanolic extracts of persian lilac and fig plants at the concentration of 100 ppm up to 15 days after treatments. Disease severity was also significantly decreased in cucumber seedlings treated with the 100 ppm concentration of ethanolic extract of the persian lilac and fig plants. Totally, results of this study indicated that the systemic acquired resistance might be activated against CMV by applying ethanolic extracts of persian lilac and fig plant used in this study in treated cucumber seedlings through different molecular and biochemical mechanisms.

Keywords: Antiviral activity, PAL enzyme, *PR-1* gene, Systemic resistance, Sq-RT-PCR

How to cite:
Sanjarian M, Rakhshandehroo F, Rezaee S, 2021. The effect of persian lilac and fig plant crude aquatic and ethanolic extracts on disease caused by *Cucumber mosaic virus* in cucumber (*Cucumis sativus*) plants under greenhouse condition. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (2): 47–61.

مقدمه

کشاورزی ارگانیک نوعی کشاورزی است که در آن از مواد و کودهای شیمیایی، بذرهای ترایخته و تغییر یافته ژنتیکی استفاده نمی‌شود و برای کنترل آفات و بیماری‌ها و نیز تقویت گیاهان از مواد طبیعی مثل مواد موثر مشتق از عصاره‌های گیاهی، عصاره-های خام گیاهی و کودهای دامی استفاده می‌شود (Hernández-Herrera *et al.* 2014). تولید محصولات ارگانیک در دنیا از اهمیت بسیاری برخوردار است و در سال‌های اخیر در ایران هم مورد توجه واقع شده است. ویروس‌های گیاهی گروه مهمی از عوامل بیماری‌زا در گیاهان هستند که خسارت آنها در سطح جهانی سالیانه بالغ بر ۳۰ میلیون دلار (Nicaise 2014; Jones & Naidu 2020) برآورد می‌شود و چون راه‌های کنترل شیمیایی برای این عوامل بیماریزا وجود ندارد، استفاده از مواد طبیعی نظیر عصاره‌های گیاهی برای افزایش مقاومت گیاهان در کنترل آنها اهمیت دارد (Petrov *et al.* 2016). توجه محققین امروزه به استفاده از عصاره‌های گیاهی معطوف شده است. چنین ترکیباتی با حفظ سلامت گیاهان موجب افزایش توان زیستی آنها شده و سیستم‌های مقاومتی و مسیرهای ژنتیکی و بیوشیمیایی اختصاصی را در آنها فعال می‌سازند که این منابع مقاومت می‌تواند در مدیریت آفات و بیمارگرهای گیاهی به کار گرفته شوند. در گذشته سازوکار دخیل در القاء دفاع پایه گیاهان با استفاده از عصاره‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص شده است که عصاره گیاهان دارویی از توان تحریک دفاع‌های سیستمیک گیاهان علیه بیماری‌های ویروسی برخوردار هستند (Goel *et al.* 2016). نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است که استفاده از عصاره خام گیاه بابونه گاوی (*Tanacetum vulgare* L.) می‌تواند موجب تحریک دفاع سیستمیک گیاه گوجه‌فرنگی و مقاومت آن به ویروس‌های موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus* CMV) و سیب زمینی Y (*Potato virus Y* PVY) شود (Petrov *et al.* 2016). پژوهش‌های مختلف بیانگر این حقیقت است که عصاره گیاه چریش (*Azadirachta indica* A. Juss) با فعال نمودن دفاع های سیستمیک در گیاهان و همچنین با افزایش بیان ژن‌های دفاعی متفاوت مانند *PR-1* می تواند موجب افزایش میزان مقاومت آنها در برابر آلودگی‌های مختلف شود (Goel *et al.* 2016). با ارزیابی کمی میزان بیان ژن های دفاعی *PAL* و *POX* با استفاده از Real-Time PCR در سال ۲۰۱۸ مشخص شد تیمار گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی با عصاره میوه گیاه چریش می‌تواند موجب بیان ژن‌های مذکور در گیاهچه گوجه-فرنگی و مقاومت در برابر آلودگی نماتد *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood شود (Naserinasab *et al.* 2018). Vuko و همکاران در سال ۲۰۱۹ اثر اسانس روغنی گیاه گلریز (*Micromeria croatica* (Pers.) Schott) را در کنترل آر.ان.ای وابسته به موزائیک خیار (satRNA-CMV) در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) اثبات نمودند. آزمایش‌های این محققین نشان داد که بیان ژن دخیل در مقاومت Alternative Oxidase (AOX) در گیاهان تیمار شده در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده افزایش پیدا می‌کند و موجب کاهش سطح آلودگی satRNA-CMV می شود (Vuko *et al.* 2019). به تازگی محققین نشان دادند اسانس روغنی گیاه آویشن از توان کنترل کنندگی ویروس موزائیک خیار در گیاه خیار برخوردار است (Helal 2019). همچنین مشخص شد که عصاره گیاه آویشن می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی گیاه موجب افزایش توان دفاعی گیاه خیار در برابر آلودگیCMV شود (Helal 2019).

ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus* (CMV عضو شاخص جنس Cucumovirus از خانواده Bromoviridae می‌باشد و با دامنه میزبانی بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاه یکی از مهمترین ویروس‌های بیمارگر گیاهی محسوب می‌شود (Edwaron & Christie 1991; Paluakitis & Gracia-Arenal 2018). این ویروس با بیش از ۸۰ گونه شته به روش ناپایا منتقل می‌شود (Palukaitis & Garcia-Arenal 2003). ژنوم CMV شامل سه قطعه RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت (RNA1-3) و دو RNA زیرژنومی (RNA4, RNA4A) می‌باشد که چهار پروتئین (1a, 2a, 2b, MP) و پروتئین پوششی را رمزگذاری می-کند. بیماری موزائیک خیار از بیماری‌های مهم کدوئیان و بادنجانیان است و از لحاظ اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. موزائیک در برگ‌ها ، بد شکل شدن و توقف رشد گیاه، سبز مایل به زرد شدن در میوه‌ها و مرگ گیاه علائم عمده ویروس موزائیک خیار بر روی گیاهان می‌باشد. استفاده از ارقام مقاوم و کنترل حشرات ناقل با توجه به مشکل بودن کنترل این ویروس روش-های موثری در مبارزه با این ویروس می‌باشند.

انجیر خوراکی با نام علمی *Ficus carica* L. از خانواده Moraceae می‌باشد که بیشترین سطح زیر کشت آن در حوزه مدیترانه و دریای سرخ است. اثرات ضد ویروسی شیره برگ و میوه انجیر در کاهش تعداد لکه‌های موضعی ایجاد شده در اثر ویروس‌های *Bean yellow mosaic virus* و *Zucchini yellow*

mosaic virus و ایجاد مقاومت در گیاه اثبات شده است (Mahmoud *et al.* 2010). نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داد عصاره برگ گیاه زینتی *F. nitida* L. از توان مهار تکثیر ویروس‌های (TNV) *Tobacco necrosis virus*، *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) و *Broad bean yellow mosaic virus* (BYMV) برخوردار است (Mahmoud *et al.* 2010). درخت زیتون تلخ با نام علمی *Melia azedarach* L. از خانواده سماقیان (Meliaceae) درخت خزان شونده‌ای است که بومی شمال غربی هند، چین و ایران بوده و در جنگل‌های شمالی ایران از آستارا تا گرگان یافت می‌شود (Khan *et al.* 2011).

با وجود آنکه در حوزه سلامت تحقیق‌های زیادی در زمینه بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره گیاه انجیر و زیتون تلخ در گذشته انجام پذیرفته است ولی پژوهشی در مورد کنترل ویروس‌های گیاهی بویژه ویروس موزائیک خیار از طریق استفاده از عصاره گیاهان انجیر خوراکی و زیتون تلخ تا کنون انجام نپذیرفته است. همچنین جنبه‌های مولکولی و بیوشیمیایی دخیل در سازوکار کنترل کنندگی عصاره‌های گیاهی جهت کنترل CMV نامشخص باقی مانده است. در این تحقیق سعی شده است تا اثر عصاره‌های خام آبی و اتانولی برگ گیاهان انجیر و میوه زیتون تلخ در کاهش بیماریزایی ویروس موزائیک خیار در میزبان خیار مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

منبع ویروس، تهیه عصاره و کاشت و تیمار گیاهچه‌های خیار

منبع ویروس: برای این تحقیق از جدایه ایرانی CMV (جدا شده از بوته خیار گلخانه‌ای، منطقه پیشوا شهرستان ورامین، با رس شمار (MW248102)) استفاده گردید (Arafati *et al.* 2013). خالص سازی بیولوژیکی جدایه مذکور با استفاده از مایه‌زنی مکانیکی گیاه سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa* Willd.) توسط بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۷/۸ انجام (Eyvazi *et al.* 2015) و روی گیاه خیار تکثیر شد.

تهیه عصاره های خام آبی و اتانولی: جمع آوری میوه گیاه زیتون تلخ از درختان بومی استان گیلان و برگ انجیر (*Ficus carica* L.) از انجیرکاری‌های دیم شهرستان استهبان استان فارس در طول فصول بهار و تابستان انجام پذیرفت. نمونه‌های برگ انجیر و میوه زیتون تلخ (*Melia azedarach* L.) به منظور تهیه عصاره‌های خام مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها به طور جداگانه در شرایط سایه و به مدت ۱۵ روز خشک شدند. برای استخراج عصاره‌های آبی و الکلی روش Asl-Najjari *et al.* (2015) مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ۱۰ گرم از بافت‌های خشک شده برگ انجیر یا میوه خشک زیتون تلخ به طور جداگانه برای تهیه عصاره‌های آبی و الکلی به ترتیب در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و الکل اتانول ۷۰٪ در دستگاه سوکسله (SOX406, Farazmaco, Iran) برای مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند و آموده بدست آمده برای حذف حلال در دستگاه تبخیر کننده چرخان (Heidolph, Heizbad Hei-VAP, Germany) در فشار کم و دمای ۶۰°C قرار داده شدند و عصاره حاصل از کاغذ فیلتر میلی پور ۰/۴۵ µm عبور داده شد و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰°C- درون شیشه‌های تاریک قرار داده شد.

کاشت و تیمار گیاهچه های خیار: خیار گلخانه‌ای رقم سلطان (تهیه شده از شرکت سیمینیس آمریکا) برای این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت که از تحمل در برابر آلودگی به CMV برخوردار بود. کاشت، نگهداری و تیمار گیاهچه‌ها در شرایط استاندارد گلخانه‌ای شامل ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰٪ و دوران متناوب نوری (۱۶ ساعت) و تاریکی (۸ ساعت) انجام شد. گیاهچه‌های خیار در گلدان‌های ۱۰۰ گرمی کاشته و سپس در مرحله دو تا چهار برگی با غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ و ppm ۱۰۰۰ عصاره آبی و ۱۰۰، ۲۰۰ و ppm ۴۰۰ عصاره الکلی (در حجم نهائی گلدان) به صورت مجزا تیمار گردیدند (جدول ۱). عصاره‌ها به صورت مستقیم به ریزوسفر خاک گلدان‌ها تزریق شدند. مبنای انتخاب غلظت‌ها مطالعات مشابه در زمینه کنترل سایر بیمارگرها با عصاره‌های گیاهی بود (Yang *et al.* 2009, Jing *et al.* 2012). گیاهچه‌های تیمار شده سه روز پس از اضافه شدن عصاره توسط CMV مایه زنی مکانیکی شدند و در زمان‌های سه، ۹ و ۱۵ روز پس از مایه‌زنی، میزان فعالیت اختصاصی آنزیم PAL و میزان آلودگی به CMV در مقایسه با گلدان‌های شاهد سالم و آلوده که تنها با آب تیمار شده بود مورد مقایسه قرار گرفت (Jing *et al.* 2012). برای مایه‌زنی، میزان یک گرم بافت پهنک برگ فوقانی خیار آلوده در مرحله چهار برگی در یک میلی لیتر بافر مایه‌کوبی رقیق و همگن شدند و سپس بر روی برگ‌های فوقانی گیاهچه‌های خیار تیمار شده با عصاره مایه‌کوبی شدند. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار و با تعداد پنج گلدان در هر تکرار انجام شد. تعداد پنج گلدان در هر تکرار به صورت جداگانه با هر یک از عصاره‌ها تیمار شد. سه گیاهچه خیار در هر تکرار با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ppm ۱۰۰۰ (در حجم نهایی گلدان) از ماده ضد ویروسی محلول در آب

آسیکلوویر (Pardarou, Iran)، ترکیب ضد ویروسی و از مشتقات acyclic guanosine که در گذشته به منظور حذف ویروس‌های گیاهی در محیط کشت بافت گیاهان استفاده شده (Sharma *et al.* 2007; Singh 2015; Maisaro *et al.* 2017)، به عنوان شاهد مثبت آلوده به ویروس و تیمار نشده با عصاره جهت مقایسه تاثیر مثبت عصاره‌ها در کنترل CMV تیمار گردیدند (Collins 1983). برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS (Version 22; SPSS Inc., Chicago, USA) استفاده شد.

محاسبه شاخص شدت بیماری Disease Severity Index (DSI):

شاخص شدت بیماری DSI برای گیاهچه‌های خیار مایه‌زنی شده با CMV و تیمار شده با هر یک از عصاره‌ها اندازه گیری شد. علایم بیماری از ۹ تا ۱۵ روز پس از مایه‌زنی تحت نظر قرار گرفت و شدت علایم بر اساس رتبه دهی علایم (۰= بدون علایم، ۱= موزائیک خفیف یا پیسک خفیف، ۲ = موزائیک سیستمیک مشخص بدون تغییر شکل گیاه، ۳ = موزائیک مشخص و تغییرشکل 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 یادداشت برداری قرار گرفت. شاخص بیماری بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید (Zeng *et al.* 2007).

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

در فرمول فوق DSI نشان دهنده Disease Severity Index (شاخص شدت بیماری) است، grade x نشان دهنده 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 می‌باشد.

بررسی میزان نسبی حضور ویروس در گیاهچه های خیار تیمار شده

آزمون الایزا: میزان حضور نسبی CMV در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌ها (جدول ۱) و مایه‌زنی شده به صورت مکانیکی با CMV در روزهای ۳، ۹ و ۱۵ روز پس از مایه-زنی با ویروس با استفاده از آزمون الایزا (DAS-ELISA) مطابق روش Clark و Adams (1977) مورد بررسی قرار گرفت. برای الایزا از آنتی‌بادی‌های پوششی و کانجوگیت تک همسانه‌ای نوترکیب تهیه شده علیه پروتئین حرکتی ویروس موزائیک خیار که قبلا توسط دکتر Tomas Canto از مرکز تحقیقات علوم – اسپانیا (CSIC-CIB, Madrid, Spain) تولید شده بود با رقت 1/200 استفاده گردید (Del Toro *et al.* 2015). همچنین در بافر استخراج از مواد شیمیایی تخریب کننده پروتئین مانند (DTT) Dithiothreitol به میزان ۱٪ و ۰/۱٪ بتامرکاپتواتانول نیز برای همگن شدن بهتر پروتئین‌های بافت آلوده استفاده شد و جهت عصاره گیری بافت ها از میزان یک گرم بافت به سه میلی‌لیتر بافر استخراج استفاده شد. برای روز سوم از نمونه برگ تازه مایه زنی شده و برای روزهای نهم و پانزدهم از برگ‌های فوقانی، جوان و تازه رشد یافته خیار آلوده شده به CMV برای سنجش غلظت نسبی حضور ویروس در آزمون الایزا استفاده شد. بعد از اضافه نمودن بافر زمینه دارای ماده پارانیتروفنیل فسفات (Sanofi, French) درون چاهک‌ها، خوانش بشقابک الایزا توسط دستگاه الایزا خوان مدل ELX 800-Biotek در طول موج ۴۰۵ نانومتر هر نیم ساعت یکبار انجام شد. با استفاده از فرمول $n = \bar{X} + 3SD$ مقایسه میزان جذب نمونه‌ها صورت پذیرفت. در این فرمول $\bar{X}$ میانگین جذب نمونه‌های سالم و غیر آلوده بوده و جذب نمونه-هایی که بزرگتر یا برابر عدد n بود معادل آلوده در نظر گرفته شد. برای سنجش میزان حضور نسبی ویروس از چهار نمونه جداگانه برای هر تیمار و از هر نمونه خیار دو تکرار در هر بار آزمون الایزا استفاده شد. برای مقایسه کمی داده‌ها از طرح آزمایشی کاملا تصادفی و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد (Asl-Najjari *et al.* 2015).

آزمون Semi-quantitative RT-PCR: برای بررسی میزان تکثیر ژن پروتئین حرکتی ویروس موزائیک خیار در بوته‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌ها از آزمون Semi-quantitative RT-PCR مطابق روش Marone *et al.* (2001) و آغازگر اختصاصی برای تکثیر طول کامل چارچوب ژنی پروتئین حرکتی ویروس به اندازه ۸۴۰ جفت باز (Bashir *et al.* 2008) استفاده شد (جدول۲). همچنین جهت بررسی امکان فعال شدن دفاع سیستمیک در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌ها، میزان حضور نسخه‌های mRNA ژن *PR-1* با استفاده از آغازگر اختصاصی و آزمون فوق مطابق جدول ۲ مورد سنجش قرار گرفت. برای این منظور از ژن خانه‌دار 18S rRNA برای

یکسان نمودن نتایج استفاده شد. برای این منظور در روز پانزدهم پس از مایه‌زنی ویروس و همزمان با بروز علایم موزائیک سیستمیک RNA کل بافت گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌های خام با استفاده از ستون‌های کوچک استخراج RNA شرکت Qiagene کشور انگلستان، از برگ‌ها استخراج و با استفاده از غلظت ۱۰۰ pmoles/µL از آغازگر تصادفی شش تائی(Random hexamer primer (dN6 (شرکت بایونیر- کره جنوبی) از آن cDNA ساخته شد. RNAهای استخراج شده با آنزیم DNaseI, RQ1 -RNaseI free جهت حذف آلودگی DNA تیمار گردیدند. ساخت cDNA با استفاده از آنزیم M-MuLV مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Promega, U.S.A, Inc) صورت پذیرفت. نرمال سازی میزان cDNA برای استفاده از غلظت یکسان cDNA انجام پذیرفت. آزمون PCR با استفاده از یک میکرولیتر از cDNA ساخته شده در حجم کل ۲۴ µl از واکنش‌گرهای شامل 2 mM $MgCl_2$, 0.4 mM 4dNTP-Mix,0.4 µM Forward primer, 0.4 µM Reverse primer, 0.6 units Gold Taq Flexi DNA polymerase و 10X Taq Flexi Buffer در دستگاه ترموسایکلر با ۲۵، ۳۰ و ۳۵ چرخه حرارتی شامل دو دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۹۴°C، یک دقیقه در ۹۴ °C، ۵۰ ثانیه در۵۴°C، ۵۰ ثانیه در ۷۲ °C و بسط نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. محصول حاصل از تکثیر ژن‌ها در تعداد سیکل-های 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 چهار تکرار زیستی انجام شدند. شدت باندهای به دست آمده پس از الکتروفورز با استفاده از نرم افزار Image J (http://rsb.info.nih.gov/ij) بر مبنی سطح زیر منحنی هر باند اندازه‌گیری شد. از ژن 18S rRNAبه عنوان کنترل درونی استفاده شد و شدت باندهای بدست آمده مربوط به ژن *PR-1* نسبت به شدت باند 18S rRNA متعادل و مقایسه گردید (Spencer & Christensen 1999). با استفاده از اطلاعات بدست آمده از نرم افزار، نمودار مربوط به میزان بیان ژن *PR-1* برای نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های متفاوت مورد تحقیق رسم گردید. سپس آنالیز آماری با استفاده از آزمون Student's t-test انجام شد.

محاسبه کمی فعایت اختصاصی آنزیم فنیل آلانین آمونیوم لیاز PAL: برای سنجش کمی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیوم در روز سوم از نمونه برگ خیار تازه مایه زنی شده و برای روزهای نهم و پانزدهم از برگ‌های فوقانی جوان و تازه رشد یافته نمونه-های تیمار و مایه زنی شده با CMV استفاده شد. نمونه برداری‌ها در زمان‌های سه، ۹ و ۱۵ روز پس از مایه زنی نمونه‌های مورد بررسی با CMV انجام شد. این آزمون مطابق دستورالعمل موجود انجام پذیرفت (Sung & Kook-Hwang 2014). برای این منظور ابتدا پروتئین کل بافت برگ از برگ‌های گیاه خیار با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۶ حاوی ۲ mM ماده EDTA، ۴ mM dithiothreitol و ۲٪ حجمی ماده PVP استخراج گردید. سپس میزان ۲۰۰ میکرولیتر از پروتئین استخراج شده فوق به همراه دو میلی لیتر از بافر ۰/۰۱ مولار بورات با pH ۷/۸ و یک میلی لیتر از محلول ۰/۰۲ مولار L- Phenylalanine که در همان بافر بورات فوق تهیه شده باشد در دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای مدت یک ساعت انکوبه شد. سپس میزان جذب در ۲۹۰ نانومتر قبل و بعد از انکوباسیون محاسبه گردید. در نهایت به محلول حاصل میزان ۱۵ میلی لیتر اتیل استات اضافه شد. فاز روغنی تشکیل شده جدا و باقی مانده در دمـــای آزمایشگاه قرار داده شد تا تبخیر شود. سپس سینامیک اسید باقی مانده در ۰/۰۵ مولار سود حل شد و غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب در ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی معادل $M^{-1}cm^{-1}$ ۹۵۰۰ بدست آمد. فعالیت این آنزیم بر اساس سرعت تبدیل فنیل آلانین بر ترانس سینامیک اسید تعیین می شود.

ارزیابی میزان پروتئین کل قابل حل در عصاره شامل تهیه منحنی استاندارد با استفاده از پروتئین استاندارد (آلبومن سرم گاوی) مطابق با روش Bradford (1976) و همزمان با سنجش آنزیم PAL انجام گرفت، برای این منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر عصاره هر نمونه با سه میلی‌لیتر معرف برادفورد در یک لوله آزمایش کوچک مخلوط و سپس میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ nm با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و میزان پروتئین هر عصاره با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد. میزان فعالیت اختصاصی آنزیم PAL از تقسیم عدد مربوط به جذب آنزیم بر دقیقه بر میزان پروتئین کل بافت بر حسب میکروگرم پروتئین کل بافت مورد سنجش به دست آمد.

نتایج

نتایج مربوط به بررسی تاثیر عصاره خام گیاهان زیتون تلخ و انجیر بر کاهش میزان حضور ویروس با استفاده از آزمون DAS-ELISA نشان داد که غلظت‌های ۲۰۰ ppm عصاره الکلی زیتون تلخ (کد C-1) و ۱۰۰ ppm الکلی انجیر (کد B-2) به ترتیب با

میانگین جذب نوری ۰/۴۸ و ۰/۵۵ موجب کاهش معنی‌دار حضور ویروس به ترتیب به میزان ۶۲ و ۵۶ درصد در الایزا در مقایسه با نمونه شاهد آلوده بدون تیمار (با میانگین‌های ۱/۲۵ = OD) شدند (شکل ۱). همچنین غلظت‌های ppm ۱۰۰۰ عصاره آبی انجیر (کد A-1) و زیتون تلخ (کد Z-1) با کاهش معنی‌دار میانگین جذب نوری (میانگین‌های OD بترتیب ۰/۵ و۰/۶) در الایزا به ترتیب به میزان ۶۰ و ۵۲ درصد در رتبه‌های بعدی از بیشترین میزان توان کاهش آلودگی CMV در گیاهچه‌های خیار در مقایسه با سایر تیمار در زمان ۱۵ روز پس از آلودگی برخوردار بودند (شکل ۱).

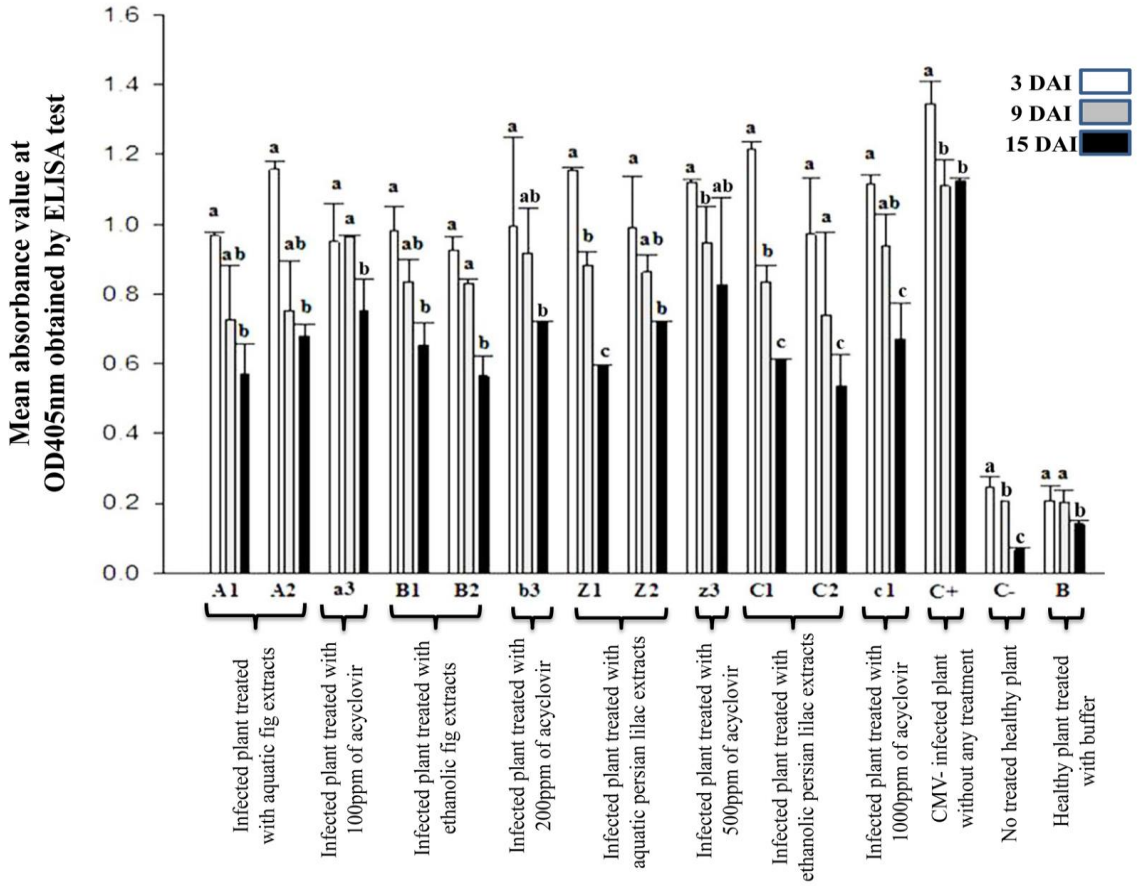
نتایج آزمون sq-RT-PCR نیز حکایت از کاهش معنی‌دار (در سطح ۵٪) میزان حضور نسخه‌های ژنوم CMV در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هریک از عصاره‌های خام آبی و الکلی زیتون تلخ و انجیر در مقایسه با نمونه شاهد آلوده بدون تیمار با عصاره داشت (شکل ۲). همچنین نتایج این آزمون بیانگر آن بود که عصاره‌های خام آبی و الکلی انجیر در مقایسه با عصاره‌های خام آبی و الکلی زیتون تلخ در کاهش معنی‌دار میزان تکثیرCMV موثرتر عمل نموده‌اند (شکل ۲).

نتایج آزمون Sq-RT-PCR نیز حکایت از کاهش معنی‌دار (در سطح ۵٪) میزان حضور نسخه‌های ژنوم CMV در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هریک از عصاره‌های خام آبی و الکلی زیتون تلخ و انجیر در مقایسه با نمونه شاهد آلوده بدون تیمار با عصاره داشت (شکل ۲).

جدول ۱. اطلاعات مربوط به کدها و مشخصات مربوط به هر کد که از آن برای تیمار گیاهچه‌های خیار استفاده شد.

Table 1. Information for the codes and the characteristics for each code that used for cucumber seedling treatments.

Code	Distinct kind and concentration (ppm) of crude extract	Code	Dosage (ppm) of Acyclovir used for CMV-infected samples treatment
A-1	1000 ppm of fig aquatic extract	a3	100
A-2	500 ppm of fig aquatic extract	b3	200
B-1	200 ppm of fig ethanolic extract	z3	500
B-2	100 ppm of fig ethanolic extract	c1	1000
Z-1	1000 ppm of persian lilac aquatic extract		
Z-2	500 ppm of persian lilac aquatic extract		
C-1	200 ppm of persian lilac ethanolic extract		
C-2	100 ppm of persian lilac ethanolic extract		
V or C^+	CMV-infected and none treated plant (positive control)		
C^- or H	None treated and healthy plant (negative control)		
H1	Healthy plant treated with1000 ppm of fig aquatic extract		
H2	Healthy plant treated with 500 ppm of fig aquatic extract		
H3	Healthy plant treated with 200 ppm of fig ethanolic extract		
H4	Healthy plant treated with 100 ppm of fig ethanolic extract		
H5	Healthy plant treated with1000 ppm of persian lilac aquatic extract		
H6	Healthy plant treated with 500 ppm of persian lilac aquatic extract		
H7	Healthy plant treated with 200 ppm of persian lilac ethanolic extract		
H8	Healthy plant treated with 100 ppm of persian lilac ethanolic extract		



شکل ۱. بررسی مقادیر مربوط به میانگین جذب چاهک‌های الایزا برای نمونه‌های گیاهچه خیار تیمار شده با هریک از عصاره‌های آبی و الکلی گیاهان زیتون تلخ و انجیر تا ۱۵ روز پس از مایه زنی با CMV (مشخصات حروف مطابق جدول ۱). از نمونه خیار تیمار شده با آب به عنوان شاهد منفی (C^-) و خیار آلوده به ویروس بدون تیمار (C^+) در کنار سایر تیمارها استفاده شد. حروف بر روی هیستوگرام بیانگر سطح معنی داری $P<0.05$ می باشد.

Figure 1. Evaluating the mean absorbance values of the ELISA wells for the cucumber seedling samples treated with each of the alcoholic and aquatic extracts of the persian lilac and fig plants up to 15 days after CMV inoculation (characteristics of the letters are according to the details in Table 1). Cucumber samples treated with the water used as the negative control (C^-) and non-treated cucumbers infected with the virus (C^+) were used beside the other studied samples. Letters on the histograms indicated to the significance level of ($P<0.05$).

همچنین نتایج این آزمون بیانگر آن بود که عصاره‌های خام آبی و الکلی انجیر در مقایسه با عصاره‌های خام آبی و الکلی زیتون تلخ در کاهش معنی‌دار میزان تکثیرCMV موثرتر عمل نموده اند (شکل ۲). از طرفی نتایج آزمون Sq-RT-PCR نشان داد میزان نسخه برداری ژن *PR-1* به عنوان مارکر مقاومتی در نمونه‌های تیمار شده با عصاره‌های آبی و الکلی انجیر و زیتون تلخ در زمان ۱۵ روز پس از تیمار به طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل‌های ۳A و ۳B). نتایج همچنین بیانگر آن بود که عصاره-های الکلی انجیر و زیتون تلخ در غلظت ۱۰۰ ppm بیان بیشتر و معنی‌دار ژن *PR-1* را در مقایسه با عصاره‌های آبی موجب شده اند (شکل ۳). هیچ رونوشتی از ژن *PR-1* در گیاه‌های سالم و یا آلوده به CMV که با عصاره‌ها تیمار نشدند و همچنین نمونه‌های تیمار شده با داروی آسیکلوویر به عنوان شاهد قابل ردیابی نبود.

نتایج بررسی شاخص شدت بیماری CMV در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هریک از عصاره‌های آبی و الکلی زیتون تلخ و انجیر نشان داد که تا روز نهم پس از مایه زنی، شاخص بیماری به میزان ۷۰ تا ۷۵٪ و در روز پانزدهم ۷۸٪ تا ۸۲٪ در مقایسه با نمونه شاهد تیمار نشده کاهش معنی‌داری پیدا کرده است (جدول

۳). بیشترین میزان کاهش شاخص بیماری‌زایی پس از مایه‌زنی با ویروس در نمونه‌های خیار تیمار شده با غلظت ppm ۱۰۰ عصاره های الکلی زیتون تلخ (۷۸/۵٪) و انجیر (۸۲٪) در روز پانزدهم پس از مایه زنی با ویروس مشاهده گردید و پس از آن تیمار با غلظت ppm ۱۰۰۰ عصاره‌های آبی زیتون تلخ (۶۸٪) و انجیر (۷۱/۵٪) بیشترین تاثیر را در کاهش شاخص بیماری در مقایسه با نمونه کنترل (نمونه آلوده به CMV و تیمار نشده با عصاره) داشت.

غلظت‌های ppm ۲۰۰ عصاره‌های الکلی و ppm ۵۰۰ عصاره های آبی انجیر و زیتون تلخ نیز از نظر کاهش شاخص بیماری در ردیف های بعدی قرار داشتند (جدول ۳). بیشترین میزان کاهش شاخص بیماری‌زایی پس از مایه زنی با ویروس در نمونه‌های خیار تیمار شده با غلظت ppm ۱۰۰ عصاره‌های الکلی انجیر (۹۱/۵٪) و زیتون تلخ (۸۹/۵٪) در روز پانزدهم پس از مایه‌زنی با ویروس مشاهده گردید و پس از آن تیمار با غلظت ppm ۱۰۰۰ عصاره های آبی انجیر (۸۶٪) و زیتون تلخ (۸۴/۵٪) بیشترین تاثیر را در کاهش شاخص بیماری در مقایسه با نمونه کنترل (نمونه آلوده به CMV و تیمار نشده با عصاره) داشت. غلظت‌های ppm ۲۰۰ عصاره الکلی زیتون تلخ (۸۴/۵٪) و ppm ۵۰۰ عصاره‌های آبی انجیر و زیتون تلخ (هر کدام ۸۲/۷٪) نیز از نظر کاهش شاخص بیماری در ردیف های بعدی قرار داشتند (جدول ۳).

جدول ۲. فهرست آغازگرهای مورد استفاده جهت ارزیابی میزان حضور نسخه‌های mRNA مربوط به ژن‌های *pathogenesis-related protein-1* (PR-1)، پروتئین حرکتی ویروس CMV (CMV-MP) و 18S ribosomal RNA (18S rRNA)توسط آزمون semi quantitative RT-PCR.

Table 2. The list of primers used for assessing the mRNA transcript levels of of *pathogenesis-related protein-1* (PR-1), movement protein of CMV (CMV-MP) and 18S ribosomal RNA (18S rRNA) genes by semi quantitative RT-PCR.

Primer name	Primer sequence	Amplicon size (bp)	References
PR-1	**F:** GGATGCCCATAACACAGCTC **R:** GCTAGGTTTTCGCCGTATTG	220	(Rakhshandehroo *et al*. 2009)
CMV-MP	**F:** CATGGCTTTCCAAGGTACCAG **R:** CTAAAGACCGTTAACCACCTGC	840	(Bashir *et al.* 2006)
*18sr RNA	**F:** AACGGCTACCACATCCAAG **R:** TCATTACTCCGATCCCGAA	461	(Rakhshandehroo *et al*. 2009)

بررسی کمی فعالیت اختصاصی آنزیم PAL

فعالیت اختصاصی آنزیم فنیل آلانین آمونیم لیاز (PAL) در این پژوهش به عنوان شاخصی برای فعال شدن دفاع سیستمیک اکتسابی در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هریک از عصاره‌های گیاهی مورد بررسی مورد سنجش کمی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت اختصاصی آنزیم PAL در گیاهچه‌های خیار در تمام حالات مورد بررسی هم در گیاهچه‌های خیار سالم تیمار شده با عصاره و هم در نمونه‌های آلوده به ویروس تیمار شده با هر یک از عصاره‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد به طور معنی‌دار و به میزان ۲ تا ۶ برابر افزایش یافته است. به این مفهوم که عصاره‌های خام گیاهان انجیر و زیتون تلخ از توان تحریک فعالیت اختصاصی آنزیم PAL در گیاهچه‌های خیار برخوردار بوده‌اند.

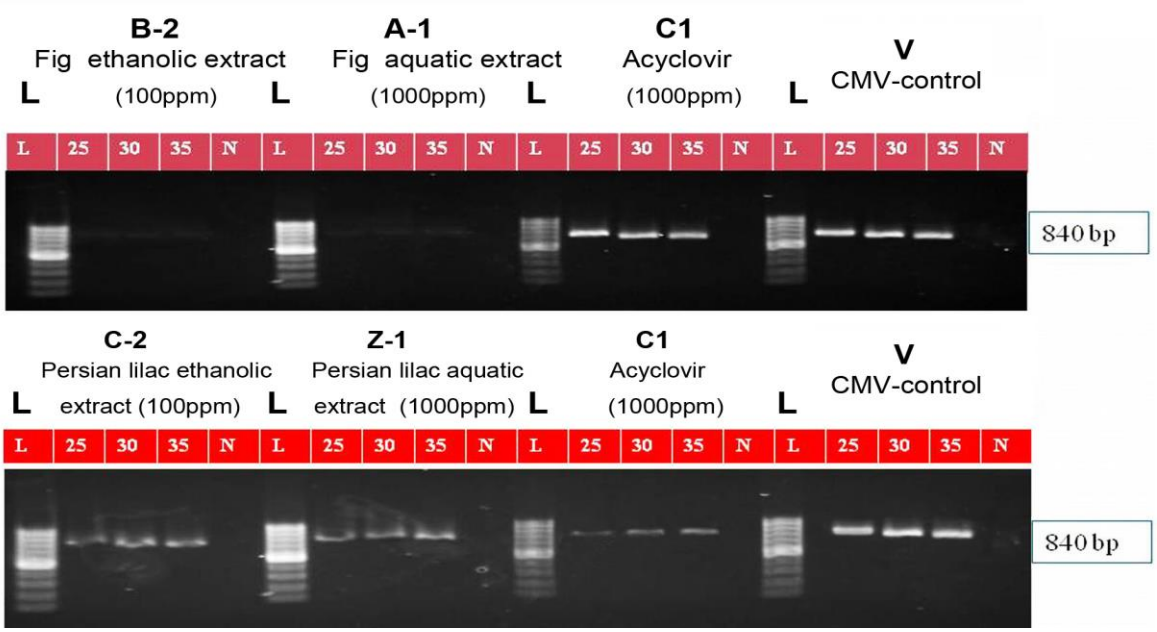
غلظت‌های ۵۰۰ و ppm ۱۰۰۰ عصاره آبی انجیر و همچنین غلظت ppm ۱۰۰ عصاره الکلی انجیر و زیتون تلخ بیشترین میزان توان تحریک فعالیت اختصاصی آنزیم PAL در مقایسه با سایر تیمارها را داشتند (شکل ۴). غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰ ppm عصاره آبی زیتون تلخ و ppm ۲۰۰ عصاره‌های اتانولی انجیر و زیتون تلخ در مرتبه بعدی از توان تحریک فعالیت اختصاصی آنزیم مذکور برخوردار بودند (شکل ۴). غلظت ppm ۲۰۰ عصاره‌های اتانولی انجیر و زیتون تلخ در هر مورد از نمونه‌های تیمار، از کمترین توان تحریک فعالیت اختصاصی PAL برخوردار بودند (شکل ۴).

جدول ۳. شدت بیماریCMV در گیاهچه‌های خیار. نتایج مربوط به گیاهچه‌های خیار تیمار شده با هر یک از عصاره‌های آبی و الکلی انجیر و زیتون تلخ تا ۱۵ روز پس از مایه‌زنی با ویروس می‌باشد. نتایج بر حسب درصد بیان شده است (مشخصات حروف مطابق جدول ۱).

Table 3. Disease severity of CMV in cucumber seedlings. Results are for cucumber seedlings treated with each of the alcoholic and aquatic crude extracts of the Persian lilac and fig plants up to 15 days after virus inoculation. Results are indicated on the basis of the percent of infection (Characteristics of the letters are according to the details in Table 1).

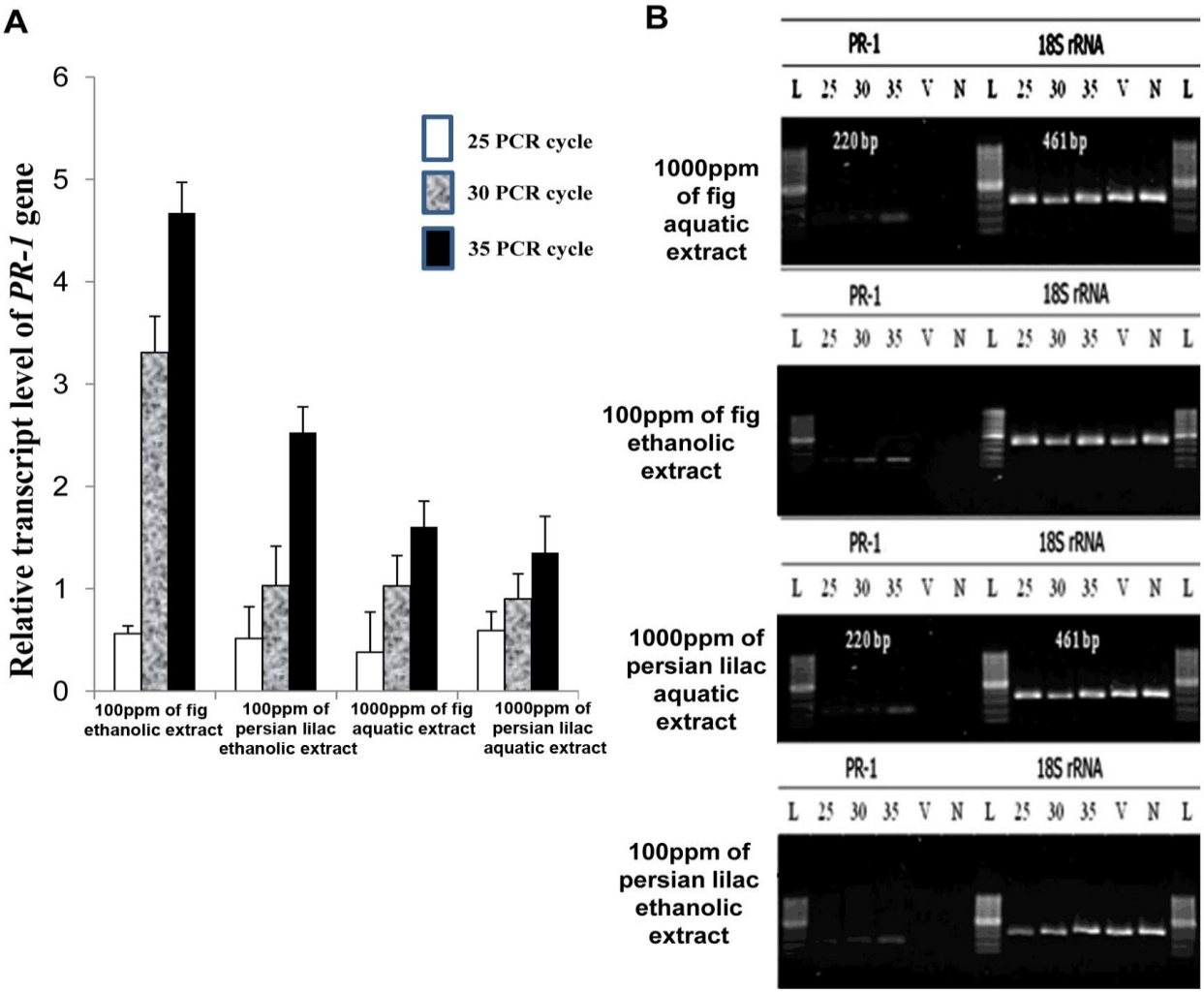
Kind of the extract	Different concentrations of extract (ppm)	Disease severity of CMV in treated cucumber seedlings in days after inoculation with CMV		
		3	9	15
Fig aquatic extract	1000	11 ± 0.01 *	15 ± 0.07 **	8 ± 0.08 **
	500	12 ± 0.06 **	16 + 0.07 **	10 ± 0.02 **
Fig ethanolic extract	200	16 ± 0.04 **	20 ± 0.06 **	15 ± 0.05 **
	100	10 ± 0.03 **	12 ± 0.02 **	5 ± 0.03 **
Persian lilac aquatic extract	1000	13 ±0.01 *	15 ± 0.06 **	9 ± 0.003 **
	500	15 ± 0.09 **	17 ± 0.02 *	10 ± 0.02 **
Persian lilac ethanolic extract	200	10 ± 0.01 **	14 ± 0.04 **	9 ± 0.01 **
	100	8 ± 0.09 **	10 ± 0.11 **	6 ±0.05 **
Cucumber seedling infected with CMV, without extract treatment		28 ± 0.03 **	40± 0.02 **	58 ± 0.01 **

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



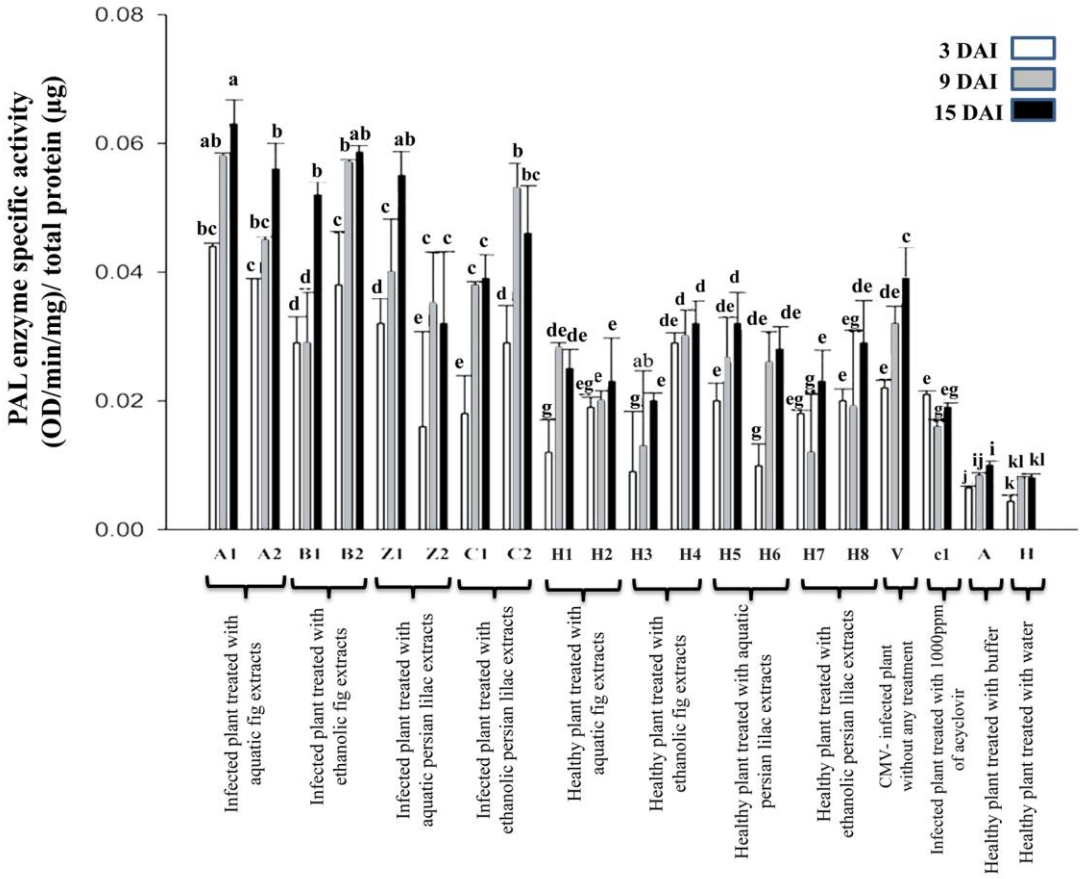
شکل ۲. نتایج آزمون sq-RT-PCR برای بررسی حضور نسخه‌های ژن پروتئین حرکتی CMV در گیاهچه‌های خیار آلوده به ویروس و تیمار شده با هریک از عصاره‌های خام آبی و الکلی زیتون تلخ و انجیر ۱۵ روز پس از تیمار با عصاره. برای این آزمون از داروی آسیکلوویر (c1) در غلظت 1000 ppm به عنوان شاهد مثبت و از نمونه آلوده به CMV و تیمار شده با آب به عنوان نمونه CMV-Control (V) استفاده شد. **L**. از نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (شرکت فرمنتاس) به عنوان نردبان وزن مولکولی استفاده شد. **N**. کنترل منفی که در آن از cDNA مربوط به گیاهچه خیار فاقد آلودگی برای PCR استفاده شد.

Figure 2. Results of the sq-RT-PCR for assessing the transcript levels of CMV movement protein gene in cucumber seedlings treated with each of the alcoholic and aquatic crude extracts of the Persian lilac and fig plants, 15 days after virus inoculations. Acyclovir medicine at the concentration of 1000 ppm was used as positive control (c1) and CMV infected cucumber plants treated with the water was used as CMV-control sample (V). **L**. 100 bp DNA ladder (Fermentas, Inc) used as ladder molecular marker. **N**. negative control in which cDNA from healthy cucumber seedling used for PCR.



شکل ۳. A. میانگین رونوشت‌های mRNA ژن PR-1 نرمال شده با 18S rRNA در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی انجیر و زیتون تلخ در چرخه‌های مختلف PCR. **B.** نتایج آزمون sq-RT-PCR در ژل آگارز ۲٫۵٪ برای بررسی حضور نسخه‌های ژن *PR-1* در گیاهچه‌های خیار آلوده به ویروس و تیمار شده با غلظت‌های ppm ۱۰۰۰ آبی و ppm ۱۰۰ الکلی عصاره‌های خام انجیر و زیتون تلخ در ۱۵ روز پس از تیمار با عصاره. برای این آزمون از ژن 18S rRNA به عنوان کنترل درونی برای یکسان سازی نتایج استفاده شد. **V.** گیاهان تیمار شده با داروی آسیکلوویر، **N.** نمونه کنترل منفی که در آن از cDNA گیاه سالم بدون تیمار برای RT-PCR استفاده شد. **L.** از نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (شرکت فرمنتاس) به عنوان نردبان وزن مولکولی استفاده شد.

Fig 3. A. Mean transcript level of mRNA for the *PR-1* gene, normalized to the 18SrRNA in cucumber seedlings treated with the different concentrations of the aquatic and ethanolic extracts of fig and persian lilac plants. **B.** Sq-RT-PCR result on 2.5% agarose gel for assessing the transcript levels of *PR-1* gene in CMV infected cucumber seedlings treated with the 1000ppm aquatic and 100ppm alcoholic crude extracts of fig and persian lilac plants in 15 days after treatments. 18s rRNA gene used as internal control for normalizing the results. **V.** Plants treated with the acyclovir medicine. **N.** Negative control sample in which cDNA from non-treated healthy cucumber seedling used for PCR. **L:** 100 bp DNA ladder (Fermentas, Inc) used as ladder molecular marker.



شکل ۴. ارزیابی فعالیت اختصاصی آنزیم PAL در نمونه‌های خیار تیمار شده با غلظت‌های ۵۰۰ و ppm ۱۰۰۰ عصاره‌های آبی و ۱۰۰ و ppm۲۰۰ عصاره های الکلی انجیر وزیتون تلخ در زمان های ۳، ۹ و ۱۵ بعد از آلودگی با CMV ,(DAI) . نمونه های A1 تا C2 گیاهچه‌های خیار آلوده به CMV و نمونه های H1 تا H8 گیاهچه های خیار سالم تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره های خام می باشند (مشخصات حروف مطابق جدول ۱). از داروی گیاهی ضد ویروسی آسیکلویر (c1) به عنوان کنترل مثبت و از نمونه خیار تیمار شده با آب به عنوان شاهد منفی (H) و خیار آلوده به ویروس بدون تیمار (V) در کنار سایر تیمارها استفاده شد. حروف بر روی هیستوگرام بیانگر سطح معنی داری ($P<0.05$) می باشد.

Figure 4. Evaluating the PAL specific activity in cucumber samples treated with the 500 and 1000 ppm aquatic extracts and 100 and 200 ppm alcoholic extracts of the fig and Persian lilac plants at specified 3,9 and 15 days after CMV inoculation, (DAI). Sample A1 to C2 are for CMV infected cucumber seedlings and samples H1 to H8 are belong to the healthy cucumber seedlings that treated with the different concentrations of the crude extracts (characteristics of the letters are according to the details in Table 1). Acyclovir antiviral plant ointment (c1) used as positive control and cucumber samples treated with the water used as the negative control (H) and non treated cucumbers infected with the virus (V) were used beside the other studied samples. Letters on the histograms indicated to the significance level of ($P<0.05$).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره‌های خام آبی و اتانولی برگ انجیر و میوه زیتون تلخ، از توان کاهش میزان حضور ویروس و نیز شاخص بیماری ویروس موزاییک خیار در گیاهچه-های خیار در غلظت‌های مشخص برخوردار می‌باشند. با مقایسه نتایج آزمون الایزا با sq-RT-PCR در این تحقیق مشخص گردید که عصاره‌های مذکور می‌توانند موجب کاهش تعداد نسخه‌های ژنومی ویروس شده و نسخه برداری و تکثیر آن را تحت تاثیر قرار داده و به طور معنی داری موجب کاهش بیماری آن در گیاهچه‌های خیار تیمار در مقایسه با شاهدهای بدون تیمار با

عصاره می‌شوند. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که کاهش بیماری در طول زمان‌های ۹ تا ۱۵ روز بعد از آلودگی گیاهچه‌های خیار با ویروس ادامه پیدا می‌کند. با مقایسه داده‌های مربوط به سنجش کمی فعالیت اختصاصی آنزیم PAL می‌توان به این نتیجه کلی رسید که احتمال دارد عصاره‌های مذکور توانسته باشند با تغییر در چرخه‌های بیوشیمیایی مسئول تولید متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی درگیاهچه‌های خیار موجب کاهش آلودگی در زمان دو هفته بعد از آلودگی و همزمان با تکمیل چرخه آلودگی ویروس در میزبان شوند. آنزیم PAL از آنزیم‌های مهم چرخه فنیل پروپانوئید می‌باشد و با حذف آمین از اسید آمینه آروماتیک فنیل آلانین می‌تواند حلقه فنلی آنرا برای تولید متابولیت‌های فنلی ضد میکروبی به کار ببرد.

در مجموع نتایج این پژوهش حکایت از موثرتر بودن عصاره‌های اتانولی گیاهان انجیر و زیتون تلخ در کاهش شدت بیماری CMV و افزایش فاکتورهای مقاومتی در خیارهای تیمار مانند پروتئین PR-1 و آنزیم PAL در مقایسه با عصاره‌های آبی داشت. نتایج تحقیق‌های گذشته نشان داده است که عصاره‌های الکلی گیاهان دارویی که با هگزانول، متانول و یا اتانول استخراج شده‌اند از ویژگی‌های ضد میکروبی موثری در برابر عصاره‌های آبی برخوردار هستند (Medini *et al.* 2014). یکی از دلایل این امر می‌تواند حلالیت بهتر ترکیبات پلی فنلی، فلاونوئیدها و تانن‌های ضد میکروبی در الکل در مقایسه با آب باشد (Medini *et al.* 2014). همچنین مشخص شده است که این ترکیبات می‌توانند موجب القاء پروتئین‌های مرتبط با مقاومت‌های سیستمیک در گیاه خیار شوند (Elsharkawy *et al.* 2013). در مجموع روند رو به رشد و تجمعی پروتئین‌های مرتبط با مقاومت به بیمارگرها (مانند PR-1 و PAL) تا حدود دو هفته پس از تیمار گیاهچه‌های خیار با هر یک از عصاره‌ها می‌تواند بیانگر فعال شدن نوعی دفاع فعال سیستمیک مبتنی بر بیان تنظیم شده ژن‌های دخیل در مقاومت گیاه باشد. نتایج حکایت از آن داشت که فعالیت اختصاصی آنزیم PAL در گیاهچه‌های خیار سالم مایه‌زنی نشده پس از تیمار با عصاره‌های گیاهی نیز افزایش پیدا می‌کند. به این مفهوم که آلودگی ویروسی به تنهایی از توان تحریک فعالیت اختصاصی آنزیم در مقایسه با نمونه شاهد سالم برخوردار می‌باشد (شکل ۴). آنزیم PAL از آنزیم‌های کلیدی چرخه فنیل پروپانوئید در گیاهان عالی می‌باشد و با آمین زدائی از اسید آمینه فنیل آلانین موجب فراهم آمدن زنجیره‌های هیدروکربنی حلقوی برای تولید فنل در سلول گیاهان در شرایط تنش می‌شود (Goodman *et al.* 1986). فنل‌های ساده در ارقام مقاوم گیاهان در برخورد با بیمارگرهای گیاهی تبدیل به فنل‌های مرکب می‌شوند و در پاسخ‌های موضعی و سیستمیک دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها فنل‌های ساده و مرکب توسط آنزیم‌های اکسید کننده درون سلولی اکسید شده و موجب تخریب ساختارهای پروتئینی سلول‌های مورد حمله و نیز دیواره سلولی میکروارگانیسم مهاجم و نیز پوشش پروتئینی ویروس‌ها می‌شوند. افزایش فعالیت آنزیم PAL همواره در تحقیقات به عنوان شاخصی از افزایش توان دفاعی میزبان در نظر گرفته شده است (Goodman *et al.* 1986; Dehghan *et al.* 2014). در راستای این نتیجه گیری نتایج این تحقیق همچنین نشان داد با کاهش میزان نسخه‌های ژنومیCMV، شاخص بیماری آن نیز کاهش می‌یابد که این امر می‌تواند به دلیل افزایش توان دفاعی گیاهان تیمار شده با عصاره‌های گیاهی باشد.

در این تحقیق همچنین مشخص شد که عصاره‌های آبی میوه زیتون تلخ و برگ انجیر نیز از توان کاهش غلظت ویروس و نیز تحریک آنزیم PAL به عنوان فاکتور دفاعی در گیاهچه‌های خیار برخوردار می‌باشند. نقش ترکیبات آلی انجیر که در آب محلول هستند در تحقیقات پیشین هم در کاهش تنش‌های اکسیداتیو سلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و بهبود بیماری‌های جانوران و انسان اثبات شده بود (Yang *et al.* 2009; Ahmad *et al.* 2013). نقش پروتئین‌های مهار کننده فعالیت ریبوزوم‌ها (RIPs) (*Ribosome-inactivating proteins*) در عصاره انجیر که از جمله پروتئین های با وزن مولکولی پایین با توان ضد میکروبی هستند را هم باید در نظر گرفت. پروتئین های RIP ضد قارچی محلول در آب از عصاره خام برگ گیاه انجیر جدا سازی شده است (Yan *et al.*, 2011).

میزان نسخه برداری ژن *PR-1* که به عنوان مارکر شاخص تعیین کننده دفاع مذکور است (Van Loon *et al.* 2006) به صورت نیمه کمی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد عصاره های آبی و اتانولی انجیر و زیتون تلخ در زمان ۱۵ روز بعد از تیمار توانسته اند موجب افزایش بیان ژن مذکور شوند (شکل ۳) و در این زمان میزان آلودگی و شدت بیماری در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با عصاره‌ها کاهش یافته است. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR-proteins) پروتئین‌های با وزن مولکولی کم هستند که در گیاهان عالی در جریان دفاع‌های

سیستمیک و تحت تاثیر هورمون‌های اسید سالیسیلیک، اسید جاسمونیک و اتیلن تولید می‌شوند (Van Loon *et al.* 2006). پروتئین‌های مذکور با تاثیر بر روی دیواره سلولی بر علیه بیمارگرهای قارچی و باکتریایی (Elsharkawy *et al.* 2013) و یا از طریق فعال نمودن فرایند خاموشی ژن بر علیه بیمارگرهای ویروسی در دفاع گیاهان دارای منابع مقاومتی مانند ژن‌های مقاوم موثر می‌باشند (Rakhshandehroo *et al.* 2009). در گذشته نشان داده شده بود که با تولید *PR-1* در گیاهان آرابیدوبسیس تالیانا تیمار شده با قارچ *Trichoderma asperellum* تا دو هفته بعد از تیمار و همزمان با فعال شدن دفاع سیستمیک، گیاهان نسبت به آلودگی ویروس موزائیک خیار مقاوم می شوند (Elsharkawy *et al.* 2013). *PR-1* دارای بیان تنظیم شده Regulated expression در سلول گیاهان عالی هست. این ژن تنها پس از فعال شدن دفاع‌های سیستمیک و پس از فسفر دار شدن فاکتور تنظیم رونویسی WRKY رونویسی در گیاه دارای مقاومت پایه می‌شود لذا در گیاه سالم خیار بیان ندارد (Sels *et al*. 2008; Ali *et al*. 2018).

در خصوص ترکیبات موثر با ویژگی مهارکنندگی ویروس‌های جانوری در عصاره‌های خام گیاهان زیتون تلخ و انجیر تاکنون تحقیقات متفاوتی انجام پذیرفته است. نتایج مطالعات Andrei *et al.* (1994) مشخص ساخت عصاره خام برگ گیاه زیتون تلخ حاوی پپتیدهای حلقوی مانند meliacine با وزن های مولکولی ۳/۲-۱/۲ کیلودالتون می‌باشد که می‌تواند مانع تکثیر ژنوم‌های از نوع RNA و DNA برخی ویروس‌های جانوری *Herpes simplex virus* در شرایط درون شیشه و درون زیوه شود. نتایج پژوهش-های گذشته مشخص ساخت که اثر ضد ویروسی عصاره آبی برگ درخت زیتون تلخ علیه ویروس‌های جانوری مرتبط با ترکیب Meliacarpin با ساختمان مولکولی 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin می باشد (Alche *et al*. 2003).

با این وجود سازوکار مولکولی دخیل در مهار تکثیر ویروس توسط عصاره گیاه زیتون تلخ مشخص نیست. بیشتر گونه‌های گیاهی متعلق به جنس *Ficus* دارای پروتئازهایی از نوع سیستئین پروتئاز به نام Ficin می‌باشند که قادر است محتوی پروتئینی بیمارگرهای درون سلولی پارازیت اجباری مانند ویروس‌ها را در سلول‌های جانوری تخریب نمایند (Jones & Glazzer 1970; Boller 1986). ویژگی ضد ویروسی عصاره خام برگ انجیر در گذشته برای کنترل Potyvirusهای آلوده کننده گیاهان نشان داده شده بود (Mahmod *et al*. 2010). همچنین بر اساس پژوهش‌های گذشته مشخص شده است که عصاره‌های خام آبی و الکلی برگ انجیر غنی از ترکیبات فنلی مانند کومارین‌ها و آنتوسیانین‌ها هستند (Mawa *et al.* 2013) و عصاره خام میوه گیاه زیتون تلخ دارای انواع ترکیبات آلی مانند استروئیدها، ترپنوئیدها و آلکالوئیدها می‌باشد (Vijayanand & Wesley 2014). پیشنهاد می‌شود در آینده نقش ترکیبات موثر موجود در میوه گیاه زیتون تلخ و یا برگ انجیر که از توان القاء واکنش‌های دفاعی و همچنین کنترل ویروس‌های گیاهی برخوردار هستند مورد بررسی قرار گیرد.

در تمام اجزاء این تحقیق نتایج بیانگر تاثیر مثبت عصاره‌های الکلی انجیر و زیتون تلخ در کنترل CMV از طریق افزایش توان دفاعی میزبان خصوصا در غلظت ppm ۱۰۰ می‌باشد همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که تاثیر کنترل کنندگی عصاره‌های آبی و الکلی انجیر و زیتون تلخ می‌تواند احتمالا از طریق تحریک دفاع سیستمیک در گیاه خیار باشد. با این وجود با استناد به نتایج آزمون sqRT-PCR برای CMV می‌توان چنین استنتاج نمود که عصاره‌های آبی و الکلی گیاهان مختلف مورد استفاده در این پژوهش از سازوکارهای مختلفی برای کاهش میزان آلودگی CMV برخوردار می‌باشند. با استناد به نتیجه حاصله از آزمون sqRT-PCR برایCMV وسایر نتایج حاصله می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا عصاره‌های آبی و الکلی زیتون مقاومت سیستمیک اکتسابی در گیاهچه‌های خیار تیمار را علیه CMV توانسته‌اند تحریک نمایند اما کارایی کمتری را در مقایسه با عصاره‌های آبی و الکلی انجیر در حذف ژنوم CMV داشته‌اند. به این مفهوم که احتمالا علاوه بر مسیر مقاومت سیستمیک اکتسابی می‌تواند مسیرهای مولکولی دیگری که اختصاصا ژنوم CMV را تخریب می‌نمایند توسط عصاره‌های آبی و الکلی انجیر در گیاهچه‌های خیار تیمار شده فعال شده باشد که توسط عصاره‌های آبی و الکلی زیتون تلخ فعال نشده‌اند. در مجموع این احتمال می‌تواند مطرح شود که در اثر تیمار خیار با عصاره‌های خام انجیر امکان دارد سازوکارهای مولکولی مانند خاموشی ژن در گیاه خیار بر علیه ماده ژنتیک CMV فعال شده و توانسته است موجب کاهش میزان تکثیر ویروس گردد نقش عصاره خام برگ انجیر در کاهش غلظت و شاخص بیماری‌زایی CMV در این تحقیق برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای اولین بار نقش عصاره خام حاصل از میوه زیتون تلخ در

کاهش بیماری‌زایی و آلودگی یک ویروس گیاهی و تحریک دفاع سیستمیک گیاه خیار مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تاثیر مثبت عصاره‌های خام آبی و الکلی انجیر و زیتون تلخ در کاهش غلظت و توان بیماری‌زایی CMV، نتایج تحقیق حاضر می‌تواند برای کنترل ویروس موزائیک خیار در گلخانه‌های آزمایشگاهی و تجارتی و نیز زمین‌های زراعی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از جناب آقای مهندس شهاب حاج منصور سرپرست آزمایشگاه‌های بخش کشاورزی مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به جهت مساعدت‌های فنی و آزمایشگاهی در انجام این تحقیق قدردانی و تشکر می‌نمایند.

References

Ahmad J, Khan I, Khan S, Iqbal D, 2013. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Ficus Carica* leaves: an in vitro approach. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 4: 2–4.

Alche LE, Ferek GA, Meo M, Coto CE, Maier MS, 2003. An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. *Zeitschrift fur Naturforschung* 58: 215–219.

Ali S, Ganaib BA, Kamilib AN, Bhatc AA, Mira ZA, *et al*., 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research* 212–213: 29–37.

Andrei G, Couto A.S, De Lederkramer RM, Coto CE, 1994. Purification and partial characterization of an antiviral active peptide from *Melia Azedarach* L. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 5(2): 105–110.

Arafati N, Farzadfar Sh, Pourrahim R, 2013. Characterization of coat protein gene of *Cucumber Mosaic Virus* isolates in Iran. *Iranian Journal of Biotechnology* 11: 109–114.

Asl-Najjari AH, Rajabi Z, Vasfi-Marandi M, Dehghan Gh, 2015.The effect of the hexanic extracts of fig (*Ficus carica*) and olive (*Olea europaea*) fruit and nanoparticles of selenium on the immunogenicity of the inactivated avian influenza virus subtype H9N2. *Veterinary Research Forum* 6: 227– 231.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 248–254.

Bashir NS, Nematollahi S, Torabi E, 2008. *Cucumber mosaic virus* subgroup IA frequently occurs in the northwest IRAN. *Acta Virologica* 52: 237–242.

Bashir NS, Kolhar MR, Zarghani SN, 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of cucumber mosaic virus isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. *Virus Genes* 32: 277–288.

Boller TV, 1986. Roles of proteolytic enzymes in interaction of plants with other organisms. In: Dalling, M.J. (Ed.), Plant Proteolytic Enzymes, 1. CRC Press, Boca Raton, FL. Pp: 67–96.

Clark MF, Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475–483.

Collins P, 1983. The spectrum of antiviral activities of acyclovir in vitro and in vivo. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 12: 19–27.

Dehghan S, Sadeghi M, Poppel A, Fischer R, Lakes-Harlan R, *et al*., 2014. Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*. *Bioscience Reports* 34: 273–82.

Del Toro FJ, Aguilar E, Hernández-Walias FJ, Tenllado F, Chung BN, *et al*., 2015. High temperature, high ambient CO_2 affect the interactions between three positive-sense RNA viruses and a compatible host differentially, but not their silencing suppression efficiencies. *PLoS One*, 10:e0136062. DOI:10.1371/journal. pone. 0136062.

Edwaron JR, Christie RG, 1991. CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes. CRC Press, Boca Raton, University of Florida, USA. 293 pp.

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

Elsharkawy MM, Shimizu M, Takahashi H, Ozaki K, Hyakumachi M, 2013. Induction of systemic resistance against cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. *Plant Pathology Journal* 29: 193–200.

Eyvazi A, Dizaji A, Rastgou M, Koohi-Habibi M, 2015. Bioassay and phylogeny of five Iranian isolates of Cucumber mosaic virus from different hosts based on CP gene sequence. *Plant Protection Science* 51: 200–207.

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

Goodman RN, Kiraly Z. Wood KR, 1986. The Biochemistry and Physiology of Plant Disease. USA, University of Missouri Press. Pp. 433–438.

Hernández-Herrera RM, Santacruz-Ruvalcaba F, Ruiz-Lopez MA, Norrie J, Hernández-Carmona G, 2014. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Applied Phycology* 26: 619–628.

Jing B, Ma Z, Feng J, Liang H, Li C, Zhang X, 2012. Evaluation of the antiviral activity of extracts from plants grown in the Qinling region of china against infection by *tobacco mosaic virus* (TMV). *Journal of Phytopathology* 160: 181–186.

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

Jones IK, Glazzer AN, 1970. Comparative studies on four sulfhydryl endopeptidases (Ficins) of *Ficus glabrata* latex. *Journal of Biological Chemistry* 245: 2765–2772.

Mahmoud SYM, Gad-Rab SMF, Hussein N, Shoreit AAM, 2010. Antiviral Activity of Latex from *Ficus nitida* Against Plant Viruses. Global *Journal of Biotechnology and Biochemistry* 5: 198–205.

Marone M, Mozzetti S, Ritis D, Pierelli L, 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.

Maisaro M, Sugiharto B, Dewanti P, 2017. The effect of concentration and exposure time Acyclovir for elimination sugarcane mosaic virus (SCMV) on the apical bud culture of sugarcane PS 881. *Journal ILMU Dasar* 18: 31–38.

Mawa S, Husain K, Jantan I, 2013. *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 3: 1–8. doi: 10.1155/2013/974256.

Medini F, Fellah H, Ksouri R, Abdelly C, 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: 216–224.

Naserinasab F, Heydari R, Sanjarian F, 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 &Tissue* 9: 360–377.

Palukaitis P, García-Arenal F, 2018. Cucumber Mosaic Virus. APS Press; St. Paul, MN, USA.

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

Petrov N, Stoyanova M, 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, Takeshita M, Squires J, 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.

Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC, 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 941–950.

Sharma S, Singh B, Rani G, Zaidi AA, Hallan V, *et al*., 2007. Production of Indian citrus ringspot virus-free plants of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour ×*C. deliciosa* Tenora) employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. *Journal of Central European Agriculture* 8: 1–8

Singh B, 2015. Effect of antiviral chemicals on in vitro regeneration response and production of PLRV-free plants of potato. *Crop Science and Biotechnology* 18: 341–348.

Spencer WE, Christensen MJ, 1999. Multiplex relative RT-PCR method for verification of differential gene expression. *BioTechniques* 27:1044–1052.

Sung KD, Kook-Hwang B, 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signaling of the defence response to microbial pathogens. *Journal* of *Experimental Botany* 65: 2295– 2306.

Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM, 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *TrenDSI in Plant Science* 11:184–191.

Vijayanand S, Wesely EG, 2014.Antimicrobial and antioxidant activity of *Melia azadirachta* and *Murray koenigil*. *International Journal of Research in Pharmacy and Science* 5: 1022–1028.

Vuko E, Rusak G, Dunki´ V, Kremer D, Kosalec I, *et al*., 2019. Inhibition of Satellite RNA Associated Cucumber Mosaic Virus Infection by Essential Oil of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. *Molecules*. 24(7):1342.

Yan W, Zhao M, Ma Y, Pan YH, Yuan WX, 2011. Primary purification of two antifungal proteins from leaves of the fig (*Ficus carica* L.). *Africana Journal of Biotechnology* 10: 375–379.

Yang XM, Yu W, Ou ZP, Ma H, Liu WM, *et al*., 2009.Antioxidant and Immunity Activity of Water Extract and Crude Polysaccharide from *Ficus carica* L. Fruit Plant. *Plant FooDSI for Human Nutrition* 64: 167–173.

Zeng R, Liao Q, Feng J, Li D, 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.

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