

مقاله پژوهشی

اثر آلودگی جدایه Fny ویروس موزاییک خیار بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی سه توده بومی ریحان سبز (*Ocimum basilicum* L.)

مهدی سعادت^۱، مهدی عیاری نوش‌آبادی^۲ و مسعود شمس‌بخش^۳

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۵)

چکیده

ریحان سبز با نام علمی (*Ocimum basilicum* L.) از گیاهان دارویی است که در صنایع غذایی، آرایشی بهداشتی و عطر سازی کاربرد فراوانی دارد. ویروس موزاییک خیار از شایع‌ترین بیمارگرهای گیاهی است که گسترش جهانی دارد. در پژوهش حاضر اثر آلودگی جدایه Fny ویروس موزاییک خیار بر ویژگی‌های فیتوشیمیایی و فیزیولوژیکی سه توده محلی ریحان سبز در شرایط اتافک رشد با دمای 21 ± 2 درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی بررسی شد. گیاهان در مرحله دو برگگی به روش مکانیکی با ویروس مایه‌زنی شدند. مقایسه میانگین صفات مورد بررسی نشان داد که ویروس باعث کاهش معنی‌دار میزان فتوسنتز، کلروفیل *a*، *b* و کلروفیل کل و کربوهیدرات کل در گیاهان آلوده شد، در حالیکه محتوای پروتئین کل، اسیدآمینو پرولین، فنل کل، فلاونوئید و درصد اسانس در گیاهان آلوده افزایش پیدا کرد. بررسی اسانس سه توده محلی ریحان با دستگاه گاز کروماتوگرافی و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی نشان داد که اختلاف معنی‌دار در ترکیبات اسانس بین تیمارهای شاهد و مایه‌زنی شده هر توده محلی بود، ترکیبات کامفور (Camphor)، کارون (Carvone)، استراگول (Estragole)، متیل اوژینول (Methyl Eugenol)، بتا کاریوفیلن (β -caryophyllene)، آلفا بیس آبولن (Alpha bisabolene) و کاریوفیلن اکساید (Caryophyllene oxide) بیش از ۷۰٪ محتوای ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دادند و بین تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در این ترکیبات وجود داشت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که آلودگی ویروسی سبب تغییرات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی در گیاهان آلوده می‌شود. افزایش و/ یا کاهش میزان محتوای برخی ترکیبات شیمیایی و اسانس، وابسته به برهمکنش ویروس و توده محلی ریحان بوده و به نظر می‌رسد هماهنگی با واکنش حساسیت یا مقاومت توده‌های محلی در برابر آلودگی ویروسی باشد.

کلیدواژه: گیاهان دارویی، متابولیت‌ها، اسانس ریحان

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbaksh@modares.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

۲. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

۳. استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

Research Article

Effect of the cucumber mosaic virus-Fny infection on the physiological and phytochemical properties of three green basil (*Ocimum basilicum* L.) landraces

M. Saadati¹, M. Ayyari², and M. Shams-bakhsh^{3*}

(Received: 2.1.2022; Accepted: 26.5.2022)

Abstract

Green basil (*Ocimum basilicum* L.) is a medicinal plant widely used in the food, cosmetics, and perfumery industries. Cucumber mosaic virus is one of the most common plant pathogens worldwide. In the present study, the effect of cucumber mosaic virus (strain Fny) infection on the phytochemical and physiological properties of three green basil landraces under growth chamber conditions (21 ± 2 ° C and 16-hour light/8 hour dark period) was investigated. The plants were mechanically-inoculated in the true two-leaf stage with the virus. Mean comparison of the studied traits showed that the virus significantly reduced photosynthesis, the content of chlorophyll a and b, total chlorophyll, and total carbohydrates in the infected plants. In contrast, the content of total protein, amino acid proline, total phenol, flavonoids, and the percentage of essential oils (w/v) in infected plants was increased. The results of essential oil analysis of three basil landraces by Gas chromatography and Gas chromatography-mass showed a significant difference in essential oil compounds between control and viral treatments of each landrace. The compounds Camphor, Carvone, Estragole, Methyl Eugenol, Beta-caryophyllene Alpha bisabolene, and Caryophyllene oxide make up more than 70% of the essential oil content. Results of the present study indicated that viral infection causes physiological and phytochemical changes in virus-infected plants. Increasing and/or decreasing the phytochemical content and some essential oil compounds depends on the interaction of the virus and the basil landrace and may be in line with the susceptibility or resistance of the landraces to the virus infection.

Keywords: Medicinal plants, Metabolites, Basil essential oil

* Corresponding author's E-mail: shamsbaksh@modares.ac.ir

1. Ph.D. student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. (s.mehdi@modares.ac.ir)
2. Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. (m.ayyari@modares.ac.ir)
3. Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. (shamsbaksh@modares.ac.ir)

مقدمه

باعث آسیب به آن شوند. از جمله آن ویروس‌ها می‌توان ویروس موزاییک یونجه (*Alfalfa mosaic virus (AMV)*، ویروس لکه پژمردگی گوجه فرنگی *Tomato spotted wilt virus*، ویروس پژمردگی باقلا *Broad bean wilt virus*، ویروس موزاییک پپینو *Pepino mosaic virus*، ویروس لکه بافت مردگی حنا *Impatiens necrotic spot virus*، ویروس پیچیدگی برگ فلفل *Chili leaf curl virus*، ویروس پیچیدگی برگ زردی گوجه‌فرنگی *Tomato yellow leaf curl virus*، ویروس شلغم *Turnip curly top virus* و ویروس موزاییک خیار *Cucumber mosaic virus (CMV)* را نام برد (Ammara *et al.* 2015; Grausgruber-Gröger 2012; Holcomb *et al.* 1999; Kamali *et al.* 2016; Poojari & Naidu 2013; Saleh *et al.* 2018; Wintermantel & Natwick 2012). ویروس موزاییک خیار از ریحان در ایران نیز گزارش شده است (Alinizi *et al.* 2019). این ویروس متعلق به جنس *Cucumovirus* و خانواده *Bromoviridae* و بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاهی از ۱۰۰ خانواده گیاهی را آلوده می‌کند (Roossinck 2002). ویروس موزاییک خیار در طبیعت توسط بیش از ۸۰ گونه شته به روش ناپاپا منتقل می‌شود (Jacquemond 2012; Roossinck 2002). اثر ویروس در تغییر متابولیت‌های اولیه و ثانویه گیاهان وابسته به برهمکنش ویروس - میزبان است. بررسی اثر ویروس نهفته رازک (*Hop latent virus*)، ویروس موزاییک رازک (*Hop mosaic virus*) و ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران (*Prunus ringspot necrotic virus*) بر چهار توده محلی رازک نشان داد که کاهش آلفا و بتا اسید وابسته به گونه ویروس و توده محلی رازک است (Pethybridge *et al.* 2002). اثر ویروس ناشناخته‌ای بر اسانس ریحان نشان داد که گیاهان آلوده به ویروس در

ریحان (*Ocimum basilicum L.*) یکی از گیاهان مهم متعلق به تیره نعناعیان (*Lamiaceae*) بوده و به دلیل استفاده گسترده در صنایع مختلف مانند غذایی، دارویی، آرایشی، رایحه درمانی و تولید عطر از اهمیت تجاری بالایی برخوردار است (Makri & Kintzios 2008; Marotti *et al.* 1996). برگ‌های ریحان غنی از اسانس بوده که بیشتر شامل اوژنول (*eugenol*)، متیل اوژنول (*methyl eugenol*)، متیل کایکول (*methyl chavicol*) (استراگول)، کامفور (*camphor*)، ژرانیول (*graniol*)، متیل سینامات (*methyl cinnamate*)، لینالول (*linalool*) و سیترال (*citral*) است (Pushpangadan & Bradu 1995). عوامل زنده و غیرزنده می‌توانند با تحت تاثیر قرار دادن سازوکارهای مختلف در گیاه، میزان و مسیرهای تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه آن را تغییر دهند (Pavarini *et al.* 2012). تولید و ارزش تجاری گیاهان دارویی می‌تواند تحت تاثیر تنش‌های زنده و برهمکنش زیستی با انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها قرار گیرد (Bruni & Sacchetti 2005). ویروس‌های گیاهی بیمارگرهای انگل اجباری هستند که قادرند بیماری‌های شدیدی در گیاهان ایجاد کنند و در نتیجه سبب کاهش شدید بسیاری از محصولات مهم شوند. آلودگی‌های ویروسی فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژی درون سلول گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهند و اغلب سبب ظهور علائمی مانند کوتولگی، چروکیدگی، ابلقی شدن برگ‌ها، پژمردگی، لکه‌های سبز و بافت مردگی، ریزش برگ و میوه و توسعه غیر طبیعی گال می‌شوند (Mishra *et al.* 2020). چندین ویروس گیاهی قادرند به ریحان حمله کرده و

و تریپتوفان افزایش داشته است (Villa-Ruano et al. 2018). روند افزایشی قابل توجهی در محتوی فلاونوئیدها، کدئین و پاپاورین در *Papaver somniferum* L. آلوده به ویروس موزاییک خشخاش (*Papaver mosaic virus*) مشاهده شده است (Zaim et al. 2014).

اثر افزایشی یا کاهش ویروس‌های گیاهی بر میزان و نوع ترکیبات متابولیت‌های گیاهی در میزبان‌های مختلف گزارش شده است، همچنین این اثر وابسته به برهمکنش میزبان و بیمارگر است. با توجه به پراکنش و دامنه میزبانی وسیع ویروس موزاییک خیار و همچنین اهمیت کشت گیاه ریحان، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ویروس موزاییک خیار بر افزایش یا کاهش برخی متابولیت‌های اولیه و ثانویه و همچنین میزان و محتوی اسانس سه توده محلی گیاه ریحان انجام شد.

مواد و روش

بذرهای سه توده محلی ریحان سبز (*Ocimum basilicum* L.) شامل اردستانی، افغانی و مبارکه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در اتاقک رشد با دمای 21 ± 2 درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی انجام شد. فاکتور اول، توده‌های محلی ریحان شامل سه توده محلی مبارکه، اردستانی و افغانی، فاکتور دوم، سطح بیمارگر شامل مایه زنی با ویروس و شاهد مایه‌زنی شده با بافر استخراج فاقد ویروس بود که برای هر سطح ۲۰ تکرار در نظر گرفته شد. متغیرهای اندازه‌گیری شده شامل فتوستت، کلروفیل a، b، کارتنوئید، محتوی کل قند محلول، پروتئین، فنل کل، فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی، درصد و محتوی اسانس بود. این آزمایش دوبار تکرار شد.

مقایسه با گیاهان سالم میزان methyleugenol و p-cresol,2,6-di-tert-butyl به ترتیب بیشتر و کمتر بودند (Nagai et al. 2011). همچنین در بررسی اثر بیماری ویروسی موزاییک ریحان، میزان اسانس در گیاهان آلوده نسبت به گیاهان سالم کاهش یافته ولی ترکیباتی مانند β -Eugenol، caryophyllene و Borneol در گیاهان آلوده افزایش نشان می‌دهند (Saleh et al. 2018). همچنین میزان اسانس استخراج شده از ریحان آلوده به AMV در شرایط مزرعه و آلودگی طبیعی نسبت به گیاهان سالم به میزان ده برابر کاهش داشته است (Bruni et al. 2016). بررسی عصاره متانولی استخراج شده از ریشه گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) آلوده به این ویروس سبب کاهش معنی‌دار در ترکیب‌های D-Germacrene، β -Germacrene-4-ol، caryophyllene به عنوان ترکیبات سسکوئی‌تریپنی و 4، 2، 9، 3، 7-alkamide به عنوان ترکیبات آلکامیدی نسبت به گیاه سالم داشته است در حالی که ترکیب 8-alkamide افزایش دو برابری را در گیاهان آلوده نشان داده است (Hudaib et al. 2002). کاهش معنی‌دار در برخی ترکیبات اصلی اسانس گیاه *Agastache anethiodora* آلوده به ویروس موزاییک خیار نیز گزارش شده است (Bruni et al. 2007). افزایش متابولیت‌های گیاهی در سایر گیاهان آلوده به ویروس موزاییک خیار و همچنین در برهمکنش با سایر ویروس‌های بیمارگر گیاهی گزارش شده است. در گیاه گل‌ساعتی (*Passiflora edulis*) آلوده به این ویروس میزان انواع آنزیم‌های دفاعی، پروتئین، قند، ترکیبات فنلی و ویتامین C نسبت به گیاهان سالم افزایش نشان داده است (Lan et al. 2020). در میوه فلفل آلوده به ویروس پیچیدگی بوته خفیف چغندر قند (*Beet mild curly top virus*) میزان فروکتوز، ایزولوسین، هیستیدین، فنیل آلانین

مایه زنی ویروس

بررسی میزان فتوستتوز و محتوای سبزی‌نگی

در مرحله‌ای که ۵۰ درصد گل‌های بوته باز شدند، شاخص‌های فیزیولوژیک اندازه‌گیری شد. برای به دست آوردن میزان تقریبی کلروفیل برگ از دستگاه کلروفیل متر (Minolta Chlorophyll Meter SPAD - 502) استفاده شد، پس از اندازه‌گیری مقدار تقریبی کلروفیل برگ، از دستگاه فتوستتوزمتر (Li-Cor, Li-3000, USA) برای اندازه‌گیری میزان فتوستتوز برگ استفاده شد.

بررسی محتوای کلروفیل، و فنل

ابتدا ۰/۰۵ گرم از نمونه تیمار ویروسی و شاهد توده‌های محلی ریحان پودر شده با ۵۰۰ میکرولیتر متانول ۹۵ درصد در دمای اتاق مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه در ۱۶۸۷۳ g سانتریفیوژ شد. فاز رویی به یک میکروتیوب جدید منتقل شد. این فرآیند سه بار تکرار شد و فاز رویی به منظور بررسی جذب در سه طول موج ۶۶۵، ۶۵۲ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از میکروپلیت اسپکتروفوتومتر (BioTek, Epoch) بررسی شد (Warren 2008). محتوای کلروفیل (میلی گرم بر گرم وزن تر) بر اساس روش (Lichtenthaler 1987) محاسبه شد.

محتوای فنل کل با استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. به ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی که ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای اتاق نگه‌داری شد، ۲۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰ درصد اضافه و مخلوط شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات (۷۰۰ میلی مولار) به مخلوط به دست آمده اضافه و در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت نگه‌داری شد. پس از آن جذب مخلوط در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (BioTek, Epoch) مقابل بلانک خوانده شد. از گالیک اسید به عنوان استاندارد

جدایه ویروسی به کار گرفته در این پژوهش -CMV-Fny (Palukaitis & García-Arenal 2003)، بود که منبع آن برگ‌های آلوده کدو و از دانشگاه زنجان دریافت شد. ایناکولوم در بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH=۷/۴) تهیه شد و سپس ویروس با مایه زنی مکانیکی به کدو منتقل شد. بافت آلوده به دست آمده از گیاهان کدو برای مایه زنی مکانیکی ریحان در مرحله دو برگگی استفاده شد و گیاهان مایه زنی شده در اتاقک رشد با دمای 21 ± 2 درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. به‌منظور تأیید آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده، آر ان اکل با استفاده از کیت RNX-plus استخراج و از طریق نسخه برداری معکوس با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی (آغازگرهای CMVCP و CMVCP) ۶۵۰ نوکلئوتیدی تکثیر شد (Asghari et al. 2020). از آغازگرهای اختصاصی ژن داخلی 18S rDNA (18S1 و 18S2) برای کنترل داخلی استفاده شد (Du et al. 2006).

نسخه برداری معکوس و تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز به ترتیب با استفاده از کیت‌های تجاری Pars tus و Taq master mix (2x) شرکت Amplicon و طبق دستورالعمل آن‌ها انجام شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز شامل واسرشت سازی اولیه به مدت دو دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و سپس ۳۰ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در آخر گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

از منحنی استاندارد محاسبه شد (Masuko et al. 2005).

محتوای پروتئین کل

به منظور اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل ابتدا ۰/۰۶ گرم از بافت تازه گیاهان آلوده به ویروس و شاهد با ازت مایع خرد شد. سپس به آن یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش (بافر سدیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۰/۰۱ میلی‌مولار EDTA، یک درصد (وزنی/حجمی) PVP و ۰/۰۵ درصد (حجمی/حجمی) TritonX-100) اضافه شد. مخلوط حاصل سپس در ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس به ۵۰ میکرولیتر از رانشین رقیق شده به نسبت ۱ به ۴، ۲۰۰ میکرولیتر کوماسی بریلانت بلو دو نرمال اضافه شد. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری و پس از آن در طول موج ۶۱۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شدند. مقدار پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد (Grntzalis et al. 2015).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش توصیف شده (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Hidayat et al. 2017; Nuengchamng et al. 2009). با کمی تغییرات انجام شد. غلظت‌های مختلف از عصاره متانولی (۵ تا ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) تهیه و ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف به ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۰۲ (وزنی/حجمی) DPPH اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار داده شد. جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانش شد. محلول DPPH و ترولوکس (ToroLox) به ترتیب به عنوان شاهد و استاندارد

برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. همچنین میزان فنل کل بر اساس میزان معادل میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره گزارش شد (Ainsworth & Gillespie 2007; Maleki et al. 2021).

محتوای فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل ابتدا به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره اتانولی نمونه‌ها ۲۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰٪ و ۲۰ میکرولیتر استات سدیم ۱ مولار اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط حاصل به چاهک‌ها اضافه پس از آن جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (BioTek, Epoch) مقابل بلانک خوانده شد. میزان فلاونوئید کل بر اساس میزان معادل میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره گزارش شد (Chang et al. 2002).

محتوای قند محلول کل

برای اندازه‌گیری محتوای قند محلول از عصاره اتانولی ۸۰ درصد تیمارهای شاهد و ویروسی توده‌های محلی ریحان استفاده شد (Andrade et al. 2016). میزان قند محلول با استفاده از روش فنل - سولفوریک اسید پیشنهاد شده تعیین شد. فنل ۵٪ (۳۰ میکرولیتر) و سولفوریک اسید (۱۰۰ درصد، ۱۵۰ میکرولیتر) به ۵۰ میکرولیتر عصاره اتانولی اضافه شد. مخلوط حاصل در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه نگه‌داری شد و بعد از آن در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه سرد شد، پس از آن نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در ۱۶۸۷۳g سانتریفیوژ شدند و جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانش شد. میزان محتوای قند محلول بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر با استفاده

سلسیوس و دمای شناساگر برابر ۲۸۰ درجه سلسیوس بود. گاز حامل هلیوم با درصد خلوص ۹۹/۹۹٪ و سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. دستگاه گاز کروماتوگراف Agilent 6890 متصل به طیف‌سنج جرمی Agilent 5973 Network به همراه ستون VF-5ms به طول ۵۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌لیتر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر نیز برای آنالیزهای کیفی مورد استفاده قرار گرفت. برنامه ریزی حرارتی مشابه دستگاه گاز کروماتوگراف، دمای منبع یون و رابط حرارتی به ترتیب ۲۰۰ و ۲۵۰ درجه سلسیوس، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و گاز حامل هلیوم با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه بود. شناسایی طیف‌ها به کمک محاسبه شاخص بازداری و مطابقت هر ترکیب با منابع از طریق تزریق هیدرکربن‌های نرمال (C₁₀-C₂₆) در شرایط یکسان با تزریق اسانس‌ها بدست آمد. همچنین مقایسه طیف‌های جرمی هر ترکیب با کتابخانه‌های موجود که شامل Adams, Wiley بود نیز انجام شد (Adams, 2007).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای 9.4SAS، ترسیم نمودارها با GraphPad و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD انجام شد.

نتایج

علائم موزاییک در برگ‌های بالایی گیاهان مایه‌زنی شده با ویروس یک هفته تا ده روز بعد از مایه‌زنی مشاهده شد (شکل ۱). سپس به منظور تایید حضور ویروس در گیاه از برگ‌های ریحان دارای علائم عصاره تهیه و روی گیاهان خیار مایه‌زنی انجام شد. همچنین ویروس موزاییک خیار در برگ‌های بالایی گیاهان مایه‌زنی شده ریحان ردیابی و

استفاده شد. درصد بازداری ترکیبات رادیکال آزاد از طریق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{جذب شاهد} / (\text{جذب نمونه} -) = \text{درصد بازداری} \\ 100 \times [\text{جذب شاهد}]$$

بر اساس اطلاعات حاصل، IC₅₀ عصاره (غلظتی از سوپسترا بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر که برای احیای رادیکال DPPH به میزان ۵۰ درصد اولیه نیاز است)، از منحنی درصد مهار در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره به دست آمد. با محاسبه IC₅₀ برای ترولوکس، به عنوان استاندارد و با استفاده از فرمول زیر داده بر اساس فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس بیان شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میکروگرم ترولوکس/گرم وزن تر) = (ترولوکس IC₅₀ / نمونه IC₅₀) * هزار

استخراج اسانس

گیاهان در مرحله گلدهی کامل برداشت شدند. سپس برای حفظ کیفیت اسانس در سایه خشک شدند. اسانس-گیری با ۱۵ گرم بافت خشک شده با استفاده دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت انجام گرفت. پس از به‌دست آوردن درصد اسانس، نمونه‌ها با سولفات سدیم آب‌گیری شدند.

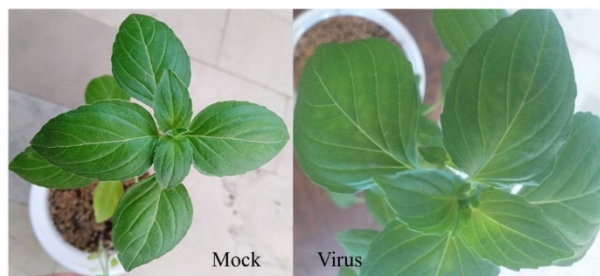
آنالیز GC و GC-MS و تفسیر ترکیب‌ها

دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) Agilent مدل 7890B با ستون HP-5 به طول 30 متر و قطر ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر بود. برنامه‌ریزی حرارتی آن از دمای ۶۰ درجه سلسیوس شروع با سرعت افزایش ۵ درجه سلسیوس بر دقیقه تا دمای ۲۸۰ درجه سلسیوس ادامه پیدا کرد و به مدت ۲ دقیقه در دمای ۲۸۰ درجه سلسیوس باقی ماند. دمای تزریق کننده ۲۵۰ درجه

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که آلودگی به ویروس در تغییرات اغلب صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. در بررسی مقایسه میانگین صفات با اثر متقابل معنی‌دار مشخص شد که آلودگی به ویروس در صفاتی مانند محتوای کل قند محلول و محتوای کلروفیل b کاهش بود، ولی این کاهش در همه توده‌های محلی معنی‌دار نبود. کاهش محتوای کل قند محلول و کلروفیل b در توده محلی افغانی نسبت به شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۳ و ۷). سبزیگی و فتوستتیز در گیاهان آلوده به ویروس در همه توده‌های محلی نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۴). محتوای فنل کل، فعالیت آنتی اکسیدانی و درصد اسانس سه صفت دیگری بودند که اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار شد. این صفات همگی در تیمار ویروسی نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان دادند (شکل ۵ و ۷).

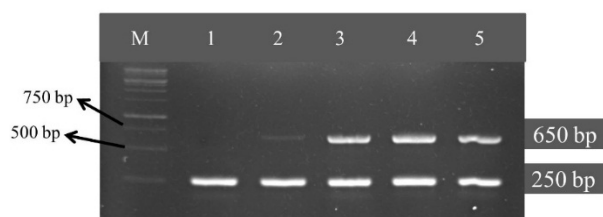
بررسی اثرات ساده در هر سطح از محتوای پروتئین، پرولین، فلاونوئید کل، سبزیگی، کلروفیل a و کلروفیل کل، که اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود، انجام شد (شکل ۳ - ۶). محتوای پروتئین کل و اسید آمینه پرولین به عنوان مهمترین اسید آمینه تحت تاثیر تنش‌های زنده و غیر زنده (Szabados & Savouré, 2010) در تیمارهای ویروسی نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان دادند (شکل ۶).

مقدار فلاونوئید در تیمارهای مایه‌زنی شده با ویروس نسبت به تیمارهای شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۵). علاوه بر این، محتوای فنل کل در اثر متقابل تیمار ویروسی و توده‌های محلی مورد بررسی نیز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. میزان فنل کل در بین توده‌های محلی مورد بررسی اختلاف معنی‌دار داشتند با وجود اینکه توده محلی مبارکه فنل کل بیشتری داشت ولی با توده محلی اردستانی در یک گروه آماری قرار گرفت، توده محلی افغانی کمترین میزان فنل را داشت و در گروه



شکل ۱. علائم موزاییک در ریحان آلوده به ویروس موزاییک خیار ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی.

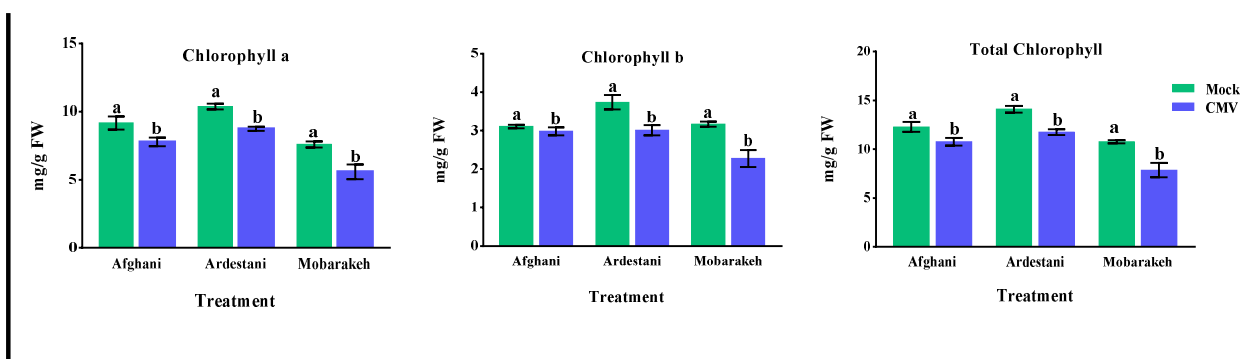
Fig. 1. Symptoms of mosaic in plants infected with cucumber mosaic virus-Fny 20 days after inoculation.



شکل ۲: الکتروفورز قطعات تکثیر شده ۶۵۰ و ۲۵۰ نوکلئوتیدی به ترتیب مربوط به بخشی از ژن رمز کننده پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار با استفاده از آغازگرهای CMVCPF و CMVPCR و کنترل داخلی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن داخلی 18S rDNA (18S1 و 18S2). راهک M: نشانگر اندازه‌دی. ان. ای (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas, Lithuania)، راهک ۱: گیاه مایه زنی شده با بافر فسفات (شاهد منفی)، راهک‌های ۲، ۳ و ۴ به ترتیب توده‌های محلی مبارکه، اردستانی و افغانی مایه زنی شده با ویروس، راهک ۵ خیار آلوده به ویروس موزاییک خیار (شاهد مثبت)

Fig. 2. Electrophoresis of amplified 650 bp and 250 bp fragments corresponded to a part of Coat Protein gene of cucumber mosaic virus-Fny (CMV-Fny) using specific primers (CMV CP-F and CMV CP-R) and a part of 18S rDNA using universal primers (18S1 and 18S2) as an internal control. lane M: molecular marker (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas, Lithuania), lane 1: mock inoculated plant (negative control), lane 2, 3 and 4: basil inoculated landraces Mobarakeh, Ardestani and Afghani, respectively, lane 5: infected cucumber by CMV-Fny (positive control).

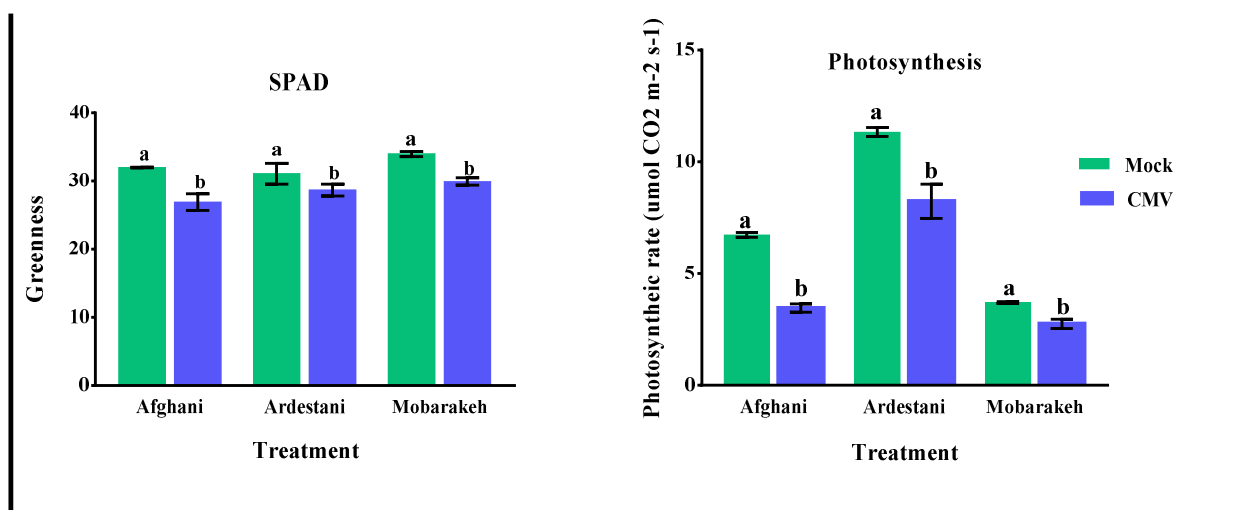
قطعه مورد انتظار از گیاهان تیمار شده با ویروس تکثیر شد (شکل ۲).



شکل ۳. مقایسه میانگین کلروفیل a، b و کل در سه توده محلی ریحان تحت تیمار با ویروس موزاییک خیار و شاهد. * تیمارهای با حروف یکسان تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Fig. 3. Comparison of means chlorophyll a, b and total chlorophyll in the three basil landrace under cucumber mosaic virus and control treatments.

* Means with the same letter are not significantly different at $p=1$.



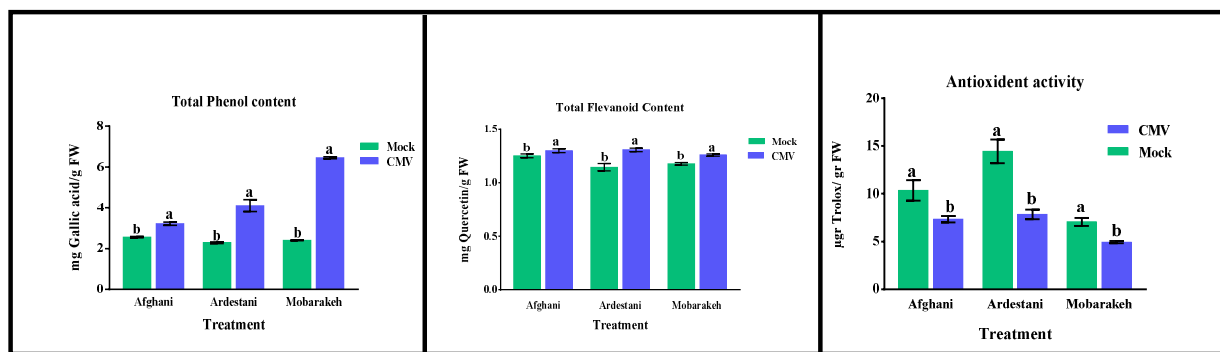
شکل ۴. مقایسه میانگین سبزیگی و فتوسنتز در سه توده محلی ریحان تحت تیمار با ویروس موزاییک خیار و شاهد. * تیمارهای با حروف یکسان تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Fig. 4. Comparison of means greenness and photosynthesis in the three basil landrace under cucumber mosaic virus and control treatments.

* Means with the same letter are not significantly different at $p=1$.

(شکل ۵)، همچنین میزان اسانس در گیاهان آلوده افزایش یافت. افزایش میزان اسانس در توده محلی اردستانی بین تیمار شاهد و ویروس تفاوت آماری معنی دار نداشت و با هم در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۷). شناسایی ترکیبات اسانس به وسیله هیدروکربن‌های

آماری جداگانه ای قرار گرفت. بررسی اثر مایه‌زنی با ویروس بر فعالیت آنتی اکسیدانی و درصد اسانس نشان داد که آلودگی ویروسی باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی توده‌های محلی شد و این افزایش در همه توده‌های محلی مورد بررسی معنی دار بود

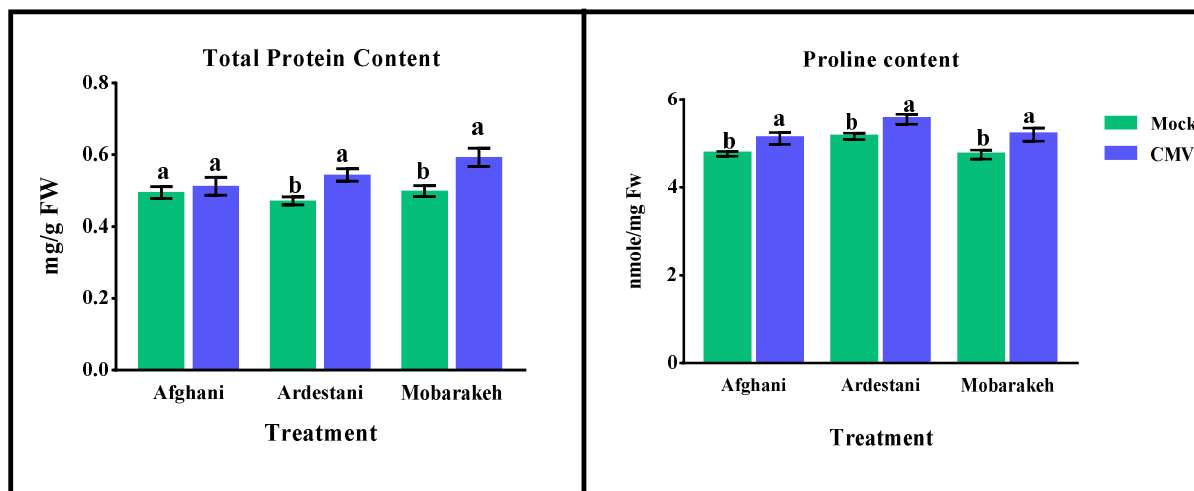


شکل ۵. مقایسه میانگین محتوی فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی در توده‌های محلی شاهد و مایه زنی شده با ویروس موزاییک خیار.

* تیمارهای با حروف یکسان تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Fig. 5. Comparison of means total phenol, flavonoids and antioxidant activity in the mock and inoculated by cucumber mosaic virus.

* Means with the same letter are not significantly different at p=1.



شکل ۶. مقایسه میانگین محتوی پروتئین کل و پرولین در توده‌های محلی ریحان مایه زنی شده با ویروس موزاییک خیار و شاهد آن.

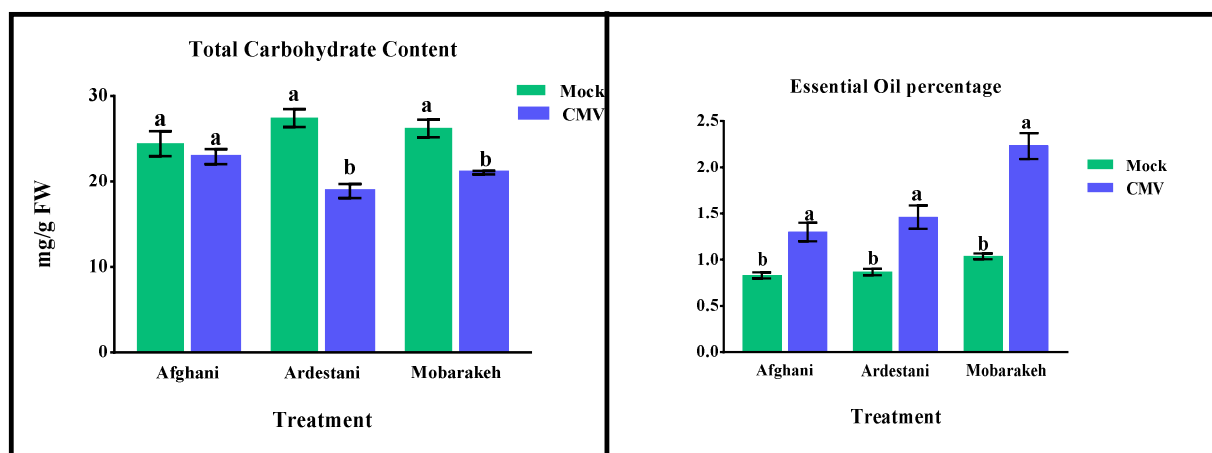
* تیمارهای با حروف یکسان تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Fig. 6. Comparison of means total protein and proline content in basil landrace inoculated by the mock and cucumber mosaic virus.

* Means with the same letter are not significantly different at p=1.

استراگول (Estragole) و متیل اوژینول (Methyl Eugenol) جز ترکیبات فنیل پروپانوئیدها، بتا کاریوفیلن (β -caryophyllene)، آلفا بیس آبولن (Alpha bisabolene) و کاریوفیلن اکساید (Caryophyllene oxide)

نرمال و کتابخانه‌های موجود نشان داد که در همه اسانس‌های مورد بررسی، هفت ترکیب بالاترین میزان را در بین ترکیبات شناسایی شده داشت، از بین آن‌ها کامفور (Camphor)، کارون (Carvone) جز ترکیبات مونوترپنی،



شکل ۷. مقایسه میانگین محتوی کربوهیدرات و درصد اسانس در توده‌های محلی ریحان مایه زنی شده با ویروس موزاییک خیار و شاهد آن.

* تیمارهای با حروف یکسان تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Fig. 7. Comparison of means total carbohydrate content and essential oil percentage in basil landrace inoculated by the mock and cucumber mosaic virus.

* Means with the same letter are not significantly different at $p=1$.

ویروسی نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار آماری نشان دادند.

بحث

گیاهان ریحان مایه‌زنی شده با ویروس موزاییک خیار یک هفته‌ای ده روز بعد از مایه‌زنی علائم موزاییک و تغییر شکل برگ را نشان دادند. کاهش محتوای کلروفیل a و کلروفیل کل در گیاهان مایه‌زنی شده با ویروس نسبت به شاهد با ظهور علائم موزاییک در برگ‌های بالایی قابل انتظار بود. محتوای کلروفیل b در اثر متقابل بین تیمار توده محلی معنی‌دار بود. هر چند این صفت در توده محلی افغانی در تیمار مایه‌زنی با ویروس کاهش نشان داد ولی این کاهش نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نبود، درحالی‌که صفت یادشده در دو توده محلی اردستانی و مبارکه کاهش معنی‌دار آماری با تیمار شاهد داشت. همچنین اثر متقابل

(oxide) جز ترکیبات سسکوئی ترپنوئیدها بودند که در مجموع این ترکیبات بیش از ۷۰ درصد اسانس را به خود اختصاص داده بودند. مقایسه میانگین این ترکیبات در تیمارهای مختلف در جدول ۱ آورده شده است. میزان استراگول در تیمار ویروسی نسبت به تیمار شاهد در توده محلی مبارکه افزایش معنی‌دار داشت. درحالی‌که میزان آن در دو توده محلی دیگر روند کاهشی داشت و این کاهش بین دو تیمار در هر دو توده محلی معنی‌دار بود. سه ترکیب بتا کاریوفیلین، آلفا بیس آبولن و کاریوفیلین اکساید از گروه ترکیبات سسکوئی ترپنی در بین توده‌های محلی مختلف تیمار شده با ویروس روند تغییرات متفاوتی داشت؛ توده محلی مبارکه در تیمار ویروسی نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد، در حالی‌که در توده محلی افغانی فقط ترکیب کاریوفیلین اکساید افزایش معنی‌دار داشت، در حالی‌که در توده محلی اردستانی هر سه ترکیب در تیمار

جدول ۱. ترکیب شیمیایی اسانس توده‌های محلی ریحان در تیمار شاهد و آلوده شده با ویروس موزاییک خیار.

Table 1. Chemical composition of basil landrace essential oil in mock and infected with cucumber mosaic virus

Compounds	Mobarakeh landrace		Afghani landrace		Ardestani landrace	
	Mock	CMV	Mock	CMV	Mock	CMV
Camphor	3.45±1.87 ^a	1.39±0.55 ^a	1.86±0.18 ^b	9.30±3.74 ^a	2.83±0.43 ^a	1.82±0.43 ^a
Estragole	63.23±2.93 ^b	78.65±0.95 ^a	73.40±0.88 ^a	51.67±0.81 ^b	49.18±0.82 ^a	35.28±3.65 ^b
Carvone	0.23±0.07 ^a	3.97±1.96 ^a	5.24±0.91 ^a	2.27±0.74 ^b	2.41±0.23 ^a	1.36±0.11 ^b
Methyl Eugenol	2.72±0.38 ^a	1.94±0.53 ^a	4.62±2.03 ^a	2.34±0.30 ^b	6.04±0.08 ^a	2.69±0.67 ^b
β-caryophyllene	2.52±1.16 ^a	0.25±0.01 ^b	2.064±0.58 ^a	2.35±0.51 ^a	1.83±0.36 ^b	4.78±0.39 ^a
Cis-Alpha. Bisabolene	3.01±1.05 ^a	1.88±0.04 ^b	1.82±0.73 ^a	1.34±0.22 ^a	2.06±0.43 ^b	4.565±0.14 ^a
Caryophyllene oxide	1.46±0.11 ^a	0.11±0.03 ^b	0.806±0.42 ^b	1.22±0.08 ^a	1.2±0.01 ^b	2.03±0.012 ^a

* Means with the same letter are not significantly different at p=1.

مشخص شده است که محتوای کل PR پروتئین‌های گیاهان آلوده با جدایه شدید از ویروس وای سیب زمینی و توتون مایه‌زنی شده با ویروس جغجغه‌ای توتون (Tobacco rattle virus, TRV) نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته است (Sapotsky *et al.* 2005; Shams-bakhsh *et al.* 2007)، احتمال دوم در مورد افزایش پروتئین کل گیاه در تیمارهای ویروسی به دلیل افزایش تکثیر ویروس در گیاه و مطابق آن بیان پروتئین‌های ویروسی می‌باشد. با توجه به اینکه پروتئین کل گیاه در تیمارهای ویروسی اندازه گیری شده و با تیمار شاهد مورد مقایسه قرار می‌گیرد دلیل افزایش در محتوای پروتئین در گیاهان آلوده به ویروس را به وجود پروتئین‌های تولید شده خود ویروس نسبت داده-اند (Radwan *et al.* 2010; Yardimci *et al.* 2007). نتایج واکنش PCR نیمه کمی انجام شده در توده‌های محلی ویروسی نشان داد که در تیمار ویروسی توده محلی مبارکه کمترین میزان غلظت ویروس وجود داشت و به نظر می‌رسد این افزایش پروتئین به دلیل افزایش پروتئین‌های دفاعی گیاه باشد درحالی‌که در دو توده محلی دیگر تجمع بیشتری از ویروس مشاهده شد که ممکن است افزایش پروتئین کل گیاه به سبب تکثیر ویروس و افزایش پروتئین‌های ویروسی در آن‌ها باشد.

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای ظرفیت مهار رادیکال

تیمار مایه‌زنی شده با ویروس و توده محلی در صفت میزان فتوسنتز نیز معنی‌دار بود. این صفت در هر سه توده محلی مورد بررسی در تیمار مایه‌زنی شده با ویروس نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد. کاهش در صفات مورد بررسی در تیمار گیاهان با این ویروس در گیاهان فلفل، لوبیا و چغندر قند نیز گزارش شده است (Astaraki *et al.* 2020).

سنتز پروتئین برای تمایز و رشد طبیعی سلول ضروری است. انواعی از تنش‌های محیطی بر سنتز پروتئین‌های گیاهی تأثیر می‌گذارند (William 1989). گیاهان با تشکیل خانواده‌های جدیدی از پروتئین‌ها به نام پروتئین-های مرتبط با بیماری‌زایی یا Pathogenesis-related (PR) proteins به حمله بیمارگرها پاسخ می‌دهند (van Loon 1985). در این پژوهش محتوای پروتئین کل اندازه گیری شد و مشخص شد در گیاهان آلوده به ویروس نسبت به گیاهان سالم محتوای پروتئین کل افزایش یافت. افزایش در محتوای پروتئین در گیاهان توتون آلوده به ویروس موزاییک توتون نیز گزارش شده است (Fraser 1982). برای افزایش پروتئین گیاهان در برابر بیمارگرها ویروسی دو احتمال وجود دارد؛ احتمال اول به دلیل فعال شدن دفاع گیاه در برابر ویروس و افزایش پروتئین‌های مرتبط با دفاع گیاه می‌باشد. مطابق با این احتمال در بررسی انجام شده

مطالعه دیگری در این گیاه مشخص شد که آلودگی ویروسی (*Telosma mosaic virus*) سبب افزایش پروتئین، کربوهیدرات، فنل و متابولیت‌های ثانویه شده است (Chen *et al.* 2018) در این مطالعه مشخص شد که آنزیم‌های مرتبط با دفاع گیاه افزایش معنی داری داشته است.

ویروس ممکن است سبب تغییراتی در ترکیبات فرار گیاه شود که سبب جلب حشره ناقل شود (Peñaflor *et al.* 2016). این نوع تغییر در ترکیبات فرار گیاهان آلوده به جدایه Fny ویروس موزاییک خیار قبلاً نیز گزارش شده است، به طور مثال گیاه کدو آلوده به این جدایه ویروس بدلیل افزایش مقدار ترکیبات فرار منتشر شده برای شته-های ناقل ویروس جذاب‌تر بوده است (Mauck *et al.* 2010). علاوه بر این در پژوهش دیگری مشخص شده است که آلودگی گیاه توتون به این جدایه ویروس منجر به تغییرات کمی و کیفی در ترکیبات فرار آلی می‌شود (Tungadi *et al.* 2017).

بر خلاف نتایج بررسی حاضر، در مطالعه Bruni *et al.* 2016 مشخص شد که آلودگی ویروس موزاییک یونجه سبب کاهش معنی‌داری در میزان اسانس در گیاهان آلوده به این ویروس شده است. همانگونه که در بالا نیز اشاره شد برهمکنش بیمارگر و گیاه وابسته به گونه ویروس و گیاه است و این تغییرات می‌تواند متأثر از گونه و یا حتی استرین ویروس و گونه ریحان باشد. علاوه بر این در مطالعه انجام شده زمان نمونه‌برداری برای عصاره‌گیری مشخص نیست که می‌تواند در میزان ترکیبات موثر باشد. همچنین مطالعه یاد شده در مزرعه انجام شده و آلودگی ویروسی با ناقل انجام شده که خود می‌تواند به عنوان عامل سوم در برهمکنش انجام شده اثر متفاوتی ایجاد کند و واکنش دفاعی گیاه را تغییر دهد. در مطالعه Saleh *et al.*

های آزاد هستند (Huang *et al.* 2006). در این مطالعه محتوای فنل و فلاونوئید کل در گیاهان آلوده نسبت به گیاهان شاهد افزایش داشت. افزایش ترکیبات فنلی در ریحان آلوده به ویروس موزاییک خیار در مطالعه (Oroujzadeh *et al.* 2016) نیز گزارش شده است. ترکیبات فنلی به عنوان مولکول‌های غنی از فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هستند (Cai *et al.* 2003; Zheng & Wang 2001). خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً به دلیل خواص اکسیداسیون و کاهش آن‌ها است که می‌تواند نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، خنثی کردن اکسیژن منفرد و تجزیه پراکسیدها داشته باشد (Heinonen *et al.* 1998). فلاونوئیدها عمدتاً به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند تا از اتصال و نفوذ ویروس به سلول‌ها جلوگیری کنند و مکانیسم‌های دفاع سلول میزبان را تحریک کنند (Friedman 2007). برای تایید تجمع متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی در این آزمایش، سنجش مهار انجام شد و نتایج حاکی از افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ ریحان در پاسخ به تیمار مایه‌زنی به ویروس موزاییک خیار بود.

در بررسی درصد اسانس توده‌های مورد بررسی مشخص شد که میزان اسانس در گیاهان آلوده نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. افزایش میزان اسانس در مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Thakur *et al.* 2019). میزان تغییرات در اسانس گیاهان می‌تواند به دلیل افزایش متابولیت‌های ثانویه در جهت القای دفاع گیاه در مقابله با ویروس باشد. در گیاه گل ساعتی (*P. edulis*) آلوده به ویروس موزاییک خیار میزان انواع آنزیم‌های دفاعی، پروتئین، قند، ترکیبات فنلی و ویتامین C نسبت به گیاهان سالم افزایش نشان داده است (Lan *et al.* 2020). در

میزبان دارد. گیاه میزبان متابولیت‌های اولیه خود را به منظور بکارگیری مکانیسم‌های دفاعی علیه بیمارگر تنظیم می‌کند. به طور همزمان، بیمارگر ممکن است تولید متابولیت‌های گیاهی را به منظور توسعه آلودگی، همانند سازی و گسترش خود در گیاه تغییر دهد. در برخی برهمکنش‌های میزبان-بیمارگر، فتوسنتز و دیگر فرآیندهای همراه با متابولیت‌های اولیه مانند سنتز یا تجزیه کربوهیدرات‌ها، آمینو اسیدها و لیپیدها کاهش پیدا می‌کند. به نظر می‌رسد که انرژی ذخیره شده از این فعالیت‌ها برای پاسخ‌های دفاعی علیه بیمارگر استفاده می‌شود، به هر حال، سایر مطالعات افزایش متابولیت‌های اولیه را گزارش کرده‌اند و پیشنهاد شده که افزایش متابولیت‌های اولیه مسیره‌های انتقال سیگنال که منجر به پاسخ‌های دفاعی در گیاه می‌شود را فعال می‌کند (Rojas et al. 2014).

تغییرات ایجاد شده در متابولیت‌های توده‌های محلی مورد بررسی که وابسته به برهمکنش بیمارگر-توده محلی بود احتمالاً در جهت القای مقاومت از طرف گیاه علیه ویروس یا ایجاد حساسیت در گیاه میزبان به منظور تکثیر و گسترش ویروس بوده است. به همین منظور بررسی آنزیم‌ها یا مسیره‌های مقاومتی و حتی روابط سه گانه ناقل-میزبان و ویروس می‌تواند درک بهتری از این تغییرات ایجاد شده را آشکار سازد.

تعارض منافع

نویسندگان در انجام این پژوهش هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

2018 مشخص شده است که آلودگی ویروسی سبب کاهش میزان اسانس شده است، در این مطالعه جدایه ویروس موزاییک خیار مشخص نبوده است که می‌تواند در میزان اسانس به دست آمده تاثیر گذار باشد. تغییرات در گروه ترکیبات در هر دو مطالعه یاده شده روند مشابهی داشته است. به گونه‌ای که در مطالعه Bruni et al. 2016 استراگول از گروه ترکیبات فنیل پروپانوییدی کاهش یافته و لی ازنول افزایش ناچیزی را در گیاهان آلوده داشته است. همچنین گروه ترکیبات سسکوئی ترپنوئیدی در هر دو مطالعه در گیاهان آلوده افزایش داشت. در مطالعه Saleh et al. 2018 نیز ترکیبات سسکوئی ترپنوئیدی در گیاهان آلوده افزایش داشته اند.

استراگول علاوه بر اهمیت دارویی (Clarke, 2008) به عنوان یک حشره‌کش طبیعی نیز شناخته شده است (Ling et al. 2009). این ترکیب به جز توده محلی مبارکه در دو توده محلی دیگر کاهش معنی‌دار آماری نسبت به شاهد داشت. در مورد ترکیبات دیگری که می‌تواند در برهمکنش سه گانه ناقل، ویروس و میزبان نقش داشته باشند می‌توان به تغییر در گروه ترکیبات سکوئی ترپن‌ها اشاره داشت. این ترکیبات در توده‌های محلی افغانی و اردستانی آلوده نسبت به گیاهان سالم افزایش معنی‌دار داشتند در حالی که در گیاهان آلوده توده محلی مبارکه نسبت به گیاهان سالم کاهش داشتند، این یافته می‌تواند همسو با افزایش استراگول باشد. تغییر در این گروه ترکیبات و جذب حشرات ناقل در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Bruni et al. 2016; Chang et al. 2021).

آلودگی گیاه با بیمارگرها اثر مستقیمی بر متابولیسم گیاه

منابع

- Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (Vol. 456): Allured publishing corporation Carol Stream.
- Ainsworth E.A. and Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2: 875-877 .
- Alinizi H., Zohreh M., Mehrvar M. and Zaki AGhl, M. 2019. Molecular identification and new host record for in Iran. 3rd International & 11th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran, Tehran. Iran .
- Ammara U.E., Al-Ansari M., Al-Shihi A., Amin I., Mansoor S., Al-Maskari A.Y. and Al-Sadi, A.M. 2015. Association of three begomoviruses and a betasatellite with leaf curl disease of basil in Oman. *Canadian Journal of Plant Pathology* 37: 506-513 .
- Andrade E.R., Ribeiro V. N., Azevedo C. V., Chiorato A.F., Williams T. C. and Carbonell S.A. 2016. Biochemical indicators of drought tolerance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 210: 277-289 .
- Asghari, N., Koolivand, D. and Eini, O. 2020. Differential expression of *HSP90*, *AGO1* and *AGO4* genes in tomato infected by Cucumber mosaic virus. *Crop Biotechnology*, 10: 31-42.
- Astaraki S., Safaie N. and Shams-bakhsh M. 2020. Reaction of sugar beet, pepper and bean plants to co-infection with Cucumber mosaic virus and beet curly top viruses. *Iranian Journal of Plant Pathology* 56: 221-236.
- Bruni R. and Sacchetti G. 2005. Micro-organism-plant interactions as influencers of secondary metabolism in medicinal plants. *Minerva Biotechnologica* 17: 119-125 .
- Bruni R., Bellardi M.G. and Parrella G. 2016. Change in chemical composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil caused by alfalfa mosaic virus. *Journal of Phytopathology* 164: 202-206 .
- Bruni R., Bianchi A. and Bellardi M. G. 2007. Essential oil composition of *Agastache anethiodora* Britton (Lamiaceae) infected by cucumber mosaic virus (CMV). *Flavour and Fragrance Journal* 22: 66-70 .
- Cai Y., Sun M. and Corke H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2288-2294 .
- Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M. and Chern J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 178-182.
- Chang X., Wang F., Fang Q., Chen F., Yao H., Gatehouse A. M. and Ye G. 2021. Virus- induced plant volatiles mediate the olfactory behaviour of its insect vectors. *Plant, Cell & Environment*, 44: 2700-2715.
- Chen S., Yu N., Yang S., Zhong B. and Lan H. 2018. Identification of *Telosma* mosaic virus infection in *Passiflora edulis* and its impact on phytochemical contents. *Virology Journal*, 15: 1-8.
- Clarke, S. 2008. Composition of essential oils and other materials. *Essential Chemistry for Aromatherapy* (Second Edition). Edinburgh: Churchill Livingstone: 123-229.
- Du, Z., Chen, J., Hiruki, C., 2006. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Disease* 90, 185-189.
- Fraser R. 1982. Are 'pathogenesis-related' proteins involved in acquired systemic resistance of tobacco plants to tobacco mosaic virus? *Journal of General Virology* 58: 305-313 .
- Friedman M. 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 116-134 .
- Grausgruber-Gröger S. 2012. First report of *Impatiens necrotic spot virus* on *Ocimum basilicum*, *Eruca sativa* and *Anthriscus cerefolium* in Austria. *New Disease Reports* 26: 12 .
- Grintzalis K., Georgiou C. D. and Schneider Y. J. 2015. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination. *Analytical Biochemistry* 480: 28-30 .
- Heinonen I. M., Meyer A. S. and Frankel E. N. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4107-4112.
- Hidayat M. A., Fitri A. and Kuswandi B. 2017. Scanometry as microplate reader for high throughput method based on DPPH dry reagent for antioxidant assay. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 7: 395-400 .
- Holcomb G., Valverde R., Sim J. and Nuss J. 1999. First report on natural occurrence of tomato spotted wilt tospovirus in basil (*Ocimum basilicum*). *Plant Disease* 83: 966-966 .

- Huang Y. C., Chang Y. H. and Shao Y. Y. 2006. Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chemistry* 98: 529-538 .
- Hudaib M., Fiori J., Bellardi M. G., Rubies-Autonell C. and Cavrini V. 2002. GC-MS analysis of the lipophilic principles of *Echinacea purpurea* and evaluation of cucumber mosaic cucumovirus infection. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 29: 1053-1060.
- Jacquemond M. 2012. Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research* 84: 439-504.
- Kamali M., Heydarnejad J., Massumi H., Kvarnheden A., Kraberger S. and Varsani A. 2016. Molecular diversity of turncurtoviruses in Iran. *Archives of Virology* 161: 551-561 .
- Lan H., Lai B., Zhao P., Dong X., Wei W., Ye Y. and Wu Z. 2020. Cucumber mosaic virus infection modulated the phytochemical contents of *Passiflora edulis*. *Microbial pathogenesis*, 138: 103828.
- Lichtenthaler H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382 .
- Ling Chang C., Kyu Cho I. and Li Q. X. 2009. Insecticidal activity of basil oil, trans-anethole, estragole, and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*. *Journal of Economic Entomology*, 102: 203-209.
- Makri O. and Kintzios S. 2008. *Ocimum* sp.(basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 13: 123-150 .
- Maleki M., Shojaeiyan A. and Mokhtassi-Bidgoli A. 2021. Genotypic variation in biochemical and physiological responses of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) landraces to prolonged drought stress and subsequent rewatering. *Scientia Horticulturae* 287: 110-124 .
- Marotti M., Piccaglia R. and Giovanelli E. 1996. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3926-3929 .
- Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S. I. and Lee Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry* 339: 69-72 .
- Mauck K. E., De Moraes C. M. and Mescher M. C. 2010. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 3600-3605.
- Mishra J., Srivastava R., Trivedi P. K. and Verma P. C. 2020. Effect of virus infection on the secondary metabolite production and phytohormone biosynthesis in plants. *3 Biotech* 10: 1-16 .
- Nagai A., Duarte L.M. and Santos D.Y. 2011. Influence of viral infection on essential oil composition of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Natural Product Communications*. 6: 1189 - 1192 .
- Nuengchamnonng N., Krittasilp K. and Ingkaninan K. 2009. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay. *Food Chemistry* 117: 750-756 .
- Palukaitis P. and García-Arenal F. 2003. Cucumoviruses. *Advances in Virus Research* 62: 241-323.
- Pavarini D. P., Pavarini S. P., Niehues M. and Lopes N. P. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology* 176: 5-16 .
- Peñaflor M. F. G., Mauck K. E., Alves K. J., De Moraes C. M. and Mescher M. C. 2016. Effects of single and mixed infections of Bean pod mottle virus and Soybean mosaic virus on host-plant chemistry and host-vector interactions. *Functional Ecology* 30: 1648-1659.
- Pethybridge S., Wilson, C., Hay, F., Leggett, G. and Sherriff, L. 2002. Effect of viruses on agronomic and brewing characteristics of four hop (*Humulus lupulus*) cultivars in Australia. *Annals of Applied Biology*, 140: 97-105.
- Poojari S. and Naidu R. 2013. First report of Impatiens necrotic spot virus (INSV) infecting basil (*Ocimum basilicum*) in the United States. *Plant Disease* 97: 850-850 .
- Pushpangadan P. and Bradu B. 1995. Basil, medicinal and aromatic plants. *Advances in Horticulture*. Malhotra Publishing House, New Delhi. 11pp. 627-657.
- Orouzadeh, A., Dizadji, A., Farzaneh, M., 2016. The effects of CMV and AMV infection on biochemical and growth parameters of basil (*Ocimum basilicum*). *Proceedings of the 22nd Iranian Plant Protection Congress" on 27 to 30 August 2016, In persian.*
- Radwan D.E. M., Fayez K. A., Mahmoud S.Y. and Lu G. 2010. Modifications of antioxidant activity and protein

- composition of bean leaf due to Bean yellow mosaic virus infection and salicylic acid treatments. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 891-904 .
- Rojas C. M., Senthil-Kumar M., Tzin V. and Mysore K. 2014. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-12 .
- Roossinck M. J. 2002. Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *Journal of virology* 76: 3382-3387.
- Saleh F., Abdel-Kader A. and Eraky A. M. 2018. Studies on sweet basil mosaic virus disease and its control by using some essential oils. *Scientific Journal of Flowers Ornamental Plants* 5: 1-13 .
- Sapotsky M., Romanova S., Polyakova A. and Malinovsky V. 2005. The correlation between severity of disease symptoms and the accumulation of viral antigen and acidic pathogenesis-related proteins in the leaves of thorn-apple plants infected with different isolates of potato virus X. *Journal of Phytopathology* 153: 440-444.
- Shams-bakhsh M., Canto T. and P. Palukatis. 2007. Enhanced resistance and neutralization of defense responses by suppressors of RNA silencing. *Virus Research* 130: 103-109.
- Szabados, L., Savouré, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15, 89-97.
- Thakur M., Bhattacharya S., Khosla P. K. and Puri S. 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 12: 1-12 .
- Tungadi T., Groen S. C., Murphy A. M., Pate A. E., Iqbal J., Bruce T.J., Cunniffe N. J. and Carr J. P. 2017. Cucumber mosaic virus and its 2b protein alter emission of host volatile organic compounds but not aphid vector settling in tobacco. *Virology Journal* 14: 1-9 .
- van Loon L. C. 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 4: 111-116 .
- Villa-Ruano N., Velásquez-Valle R., Zepeda-Vallejo L.G., Pérez-Hernández N., Velázquez-Ponce M., Arcos-Adame V. M. and Becerra-Martínez, E. 2018. ¹H NMR-based metabolomic profiling for identification of metabolites in *Capsicum annuum* cv. *mirasol* infected by beet mild curly top virus (BMCTV). *Food Research International*, 106: 870-877.
- Warren C. 2008. Rapid measurement of chlorophylls with a microplate reader. *Journal of Plant Nutrition* 31: 1321-1332 .
- William A. 1989. The effect of cell cycle regulators on protein profiles in cultured root meristems of *Pesum sativum*. *Environmental and Experimental Botany* 29: 317-322 .
- Wintermantel W and Natwick E. 2012. First report of Alfalfa mosaic virus infecting basil (*Ocimum basilicum*) in California. *Plant Disease* 96: 295-295 .
- Yardimci N., Eryigit H. and Erda I. 2007. Effect of Alfalfa mosaic virus (AMV) on the content of some macro- and micronutrients in alfalfa. *Journal of Culture Collections* 5: 90-93 .
- Zaim M., Lal R. K., Verma R. K. and Pandey R. 2014. Studies on effect of poppy mosaic virus infection on poppy produce and some secondary metabolites. *Acta Horticulturae*. 1036, 151-155.
- Zheng W. and Wang S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5165-5170.