جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۵، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۴۱۳-۴۰۳ (۱۳۸۸)

بررسی اثر ضد ویروسی عصاره آبی و الکلی گزنه دو پایه (*Urtica dioica* L.) در حذف عامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک رُز در محیط کشت

فرشاد رخشنده‌رو[1*]، امیر مدرسی[2] و حمیدرضا زمانی‌زاده[3]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی
پست الکترونیک: rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir
۲- دانشجوی دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه علوم (USM)، جزیره پنانگ، مالزی
۳- دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۷ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۸

چکیده

گزنه دو پایه (*Urtica dioica* L.)، دارای خاصیت درمانی در معالجه بیماریهای مزمن انسان می‌باشد. در این پژوهش اثر ضد ویروسی عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در مهار ویروسهای بیماری‌زای ایجاد کننده موزائیک گل رُز در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۵۳۰ نمونه از گونه‌های مختلف رُز دارای علائم موزائیک و یا بدون علائم از مناطق محتلف تهران و حومه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها توسط آزمونهای سرولوژیک الیزای مستقیم و غیرمستقیم برای عوامل ویروسی موزائیک آرابیس *Arabis mosaic virus* و لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار *Prunus necrotic ringspot virus* مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۲۰ قلمه از نمونه‌های رُز آلوده به هر دو ویروس به محیط کشت MS انتقال داده شدند. سه غلظت (۰/۵، ۲ و ۵ میلی‌گرم اسانس ۱/۰ میلی‌لیتر از محیط کشت) از عصاره‌های آبی و اتانولی تهیه شده از بافت خشک برگ و ریشه گیاه گزنه به محیط‌های کشت حاوی قلمه‌های آلوده اضافه شد. قلمه‌های تیمار شده ۳۰ روز پس از تیمار از لحاظ غلظت آلودگیهای ویروسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که عصاره آبی گزنه در مقایسه با عصاره الکلی از توان بیشتری در مهار عوامل ویروسی موزائیک رُز برخوردار است. عصاره‌های آبی گزنه با غلظتهای ۲ و ۵ و الکلی (اتانول) با غلظتهای ۰/۵mg/ml و ۲mg/ml موجب حذف به‌ترتیب ۹۰٪ آلودگی ویروس ArMV و ۴۲٪ آلودگی PNRSV از قلمه‌های رُز مورد بررسی شدند. نتایج این بررسی نشان می‌دهد عصاره‌های آبی و الکی گزنه دارای اثر منفی در تکثیر عوامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک در رُز می‌باشند و این احتمال وجود دارد که بتوان جهت عاری‌سازی گونه‌های رُز از آلودگیهای ویروسی در محیط‌های کشت از آنها استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی و الکلی گزنه، موزائیک رُز، کشت بافت، Dot-Blot، Das-Elisa.

مقدمه

رُز (*Rosa* L. hybrids) از مهمترین گلهای زینتی با ارزش اقتصادی بالا در جهان محسوب می‌شود. گیاه رُز بیشتر به صورت گلهای شاخه بریده، گیاهان گلدانی و یا آپارتمانی در خانه و باغ مورد استفاده قرار می‌گیرند. گل رُز علاوه بر استفاده‌های تزئینی، کاربردهای صنعتی و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خوراکی نیز دارد. روغن رُز که تحت شرایط تقطیری بدست می‌آید در صنایع تولید عطر و لوازم آرایشی کاربرد دارد (Uncini Manganelli *et al*., 2005). تاکنون از رُز عوامل ویروسی متفاوتی از نقاط مختلف جهان جداسازی شده است که در مقایسه با سایر گیاهان این تعداد کمتر می‌باشد. دلیل آن نیز مقاومت بالای این گیاه نسبت به عوامل بیماری‌زای مختلف بدلیل بالا بودن ترکیبهای فنلی و دیگر مواد اکسید شونده موجود در گیاه می‌باشد (Epstein & Hill, 1995). ویروسهایی که گلهای سرخ را آلوده می‌کنند بیشتر به جنسهای *Ilarvirus* و *Nepovirus* تعلق دارند (Moury *et al*., 2000b). این ویروسها در یک مجموعه تحت عنوان موزائیک رُز بر روی گلهای سرخ ایجاد بیماری می‌نمایند. ویروسهای لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار (*Prunus necrotic ringspot virus*= PNRSV) و موزائیک آرابیس (*Arabis mosaic virus*= ArMV) از گونه‌های موجود در جنسهای فوق از شایعترین عوامل دخیل در ایجاد موزائیک گیاه رُز در جهان محسوب می‌شوند (Moury *et al*., 2000a؛ Johnstone, 1995). عوامل ویروسی در رُز بندرت موجب مرگ و از بین رفتن گیاه می‌شوند ولی در عوض با کاهش توان زیستی، گیاه را نسبت به حمله سایر عوامل بیماری‌زا حساس نموده و همچنین موجب کاهش کیفیت، اسانس و بازارپسندی گلها می‌شوند (Moury *et al*., 2000b). تاکنون هیچ‌گونه ترکیب شیمیایی به‌عنوان یک ویروس‌کش جهت مبارزه با عوامل بیماری‌زای ویروسی در گیاهان شناسایی نشده است. در سالهای اخیر توجه محققان به استفاده از مواد غیر شیمیایی جهت عاری‌سازی مواد تکثیری گیاهان از آلودگیهای ویروسی معطوف شده است. به همین منظور در این تحقیق کوشش بعمل آمد تا از یک ترکیب گیاهی مؤثر جهت عاری‌سازی قلمه‌های رُز از مهمترین بیماری ویروسی آن (موزائیک رُز) استفاده شود. نتایج پژوهشهای گذشته نشان داد که عصاره گیاهان در مهار و کنترل آلودگی ویروسهای جانوری مؤثر می‌باشند (Uncini Manganelli *et al*., 2005؛ Agbafor & Akubugwo, 2007؛ Chrubasik *et al*., 2007). همچنین گزارشها حکایت از آن دارد که عصاره گیاهان در درمان برخی از آلودگیهای ویروسی در گیاهان نیز می‌توانند مؤثر باشند (Vivanco *et al*., 1999). با وجود این، گزارشهای زیادی در این زمینه موجود نیست. گزنه دو پایه (*Urtica dioica*) از جمله گیاهان دارویی می‌باشد که دارای خواص درمانی بوده و صدها سال است که در طب سنتی جهان جهت معالجه بیماریهایی همچون اگزما، ناراحتیهای دستگاههای گوارش و تناسلی، دردهای مفاصل و نیز کم‌خونی از عصاره آن استفاده می‌شود (Cowan, 1999). نتایج پژوهشها نشان داد که عصاره گیاه گزنه دو پایه دارای خاصیت ضد باکتریایی است و به میزان چند برابر بیشتر از باکتری‌کش‌های شیمیایی از توان کنترل باکتریهای گرم منفی و مثبت برخوردار می‌باشد (Obertreis *et al*., 1996؛ Lichius & Muth, 1997). همچنین مشخص شده است که عصاره گیاه گزنه می‌تواند در شرایط مصنوعی موجب مهار تکثیر عوامل ویروسی همچون ایدز و هپاتیت شود (Uncini Manganelli *et al*., 2005؛ Agbafor & Akubugwo, 2007؛ Chrubasik *et al*., 2007). با وجود این، تاکنون هیچ‌گونه تحقیقی در زمینه اثر گیاه گزنه در کنترل عوامل بیماری‌زای ویروسی در گیاهان موجود نیست. با توجه به اینکه گیاه رُز دارای اهمیت اقتصادی فراوانی در جهان است و همچنین عوامل ایجاد کننده موزائیک در رُز در قلمه‌ها و اندامهای تکثیری گیاه به

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

صورت سیستمیک و پنهان انتقال پیدا می‌کنند و در بیشتر مواقع تشخیص سریع و به موقع آنها امکان‌پذیر نیست، بنابراین در این تحقیق کوشش بعمل آمد تا روشی مؤثر و کاربردی جهت تولید پایه‌های رُز عاری از آلودگیهای ویروسی در محیط‌های کشت بافت برای تولیدکنندگان و محققان ارائه شود.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌های رُز و گزنه

در طول فصول بهار، تابستان و پاییز سال ۱۳۸۵، نمونه‌برداریهایی به صورت تصادفی از مناطق مختلف استان تهران انجام شد (جدول ۱). در طی این نمونه‌برداریها در مجموع ۵۳۰ نمونه از برگهای دارای علائم موزائیک و بدون علائم جمع‌آوری شد. همچنین از رُزهایی که نسبت به هر یک از آلودگیهای ویروسی مثبت تشخیص داده می‌شدند، قلمه تهیه شد. قلمه‌ها پس از انتقال به گلخانه از منطقه گره‌های ساقه با اکسین تیمار شده و جهت بررسیهای بیشتر در ماسه شسته شده و در گلدانهای بزرگ ۵۰ سانتی‌متری کاشته شدند. نمونه‌های گزنه دو پایه از مناطق کوهستانی استان گیلان از گزنه‌های کاملاً رشد یافته انتخاب شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۱۸°C و در تاریکی خشک شدند و ریشه و برگ آنها جهت تهیه اسانس مورد استفاده قرار گرفت.

آزمونهای سرولوژیکی

جهت تشخیص و ردیابی ویروسهای مورد بررسی از آزمونهای سرولوژیکی الیزای مستقیم (DAS-ELISA) و غیرمستقیم (Dot-blot Assay-DIBA) استفاده شد. از آزمون الیزای مستقیم (DAS-ELISA) مطابق روش Clark و Adams (۱۹۷۷) و آزمون الیزای غیرمستقیم (DIBA) مطابق روش Banttari و Goodwin (۱۹۸۵) استفاده شد. از این آزمونها برای بررسی حضور سه عامل بیماری‌زای ویروسی شامل: ویروس موزائیک خیار (CMV= *Cucumber mosaic virus*)، ویروس موزائیک آرابیس (ArMV= *Arabis mosaic virus*) و ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار (PNRSV= *Prunus necrotic ringspot virus*) در نمونه‌های مورد بررسی استفاده شد. در این بررسی از آنتی‌بادیهای چندهمسانه‌ای (Polyclonal) موجود در کیت تجارتی تهیه شده از شرکت (Bioreba) سوئیس استفاده شد. به منظور انجام آزمون الیزای مستقیم و غیرمستقیم از نمونه‌های برگی موجود در شاخه‌های انتهایی دارای علائم ویروسی و نیز آنهایی که بدون علائم بودند به‌عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. به دلیل حضور ترکیبهای سلولزی چسبنده به پیکره ویروسها و نیز حضور ترکیبهای اکسیدکننده فنلی قوی در عصاره برگ گیاه رُز از ترکیبهای کاهش‌دهنده میزان اکسیداسیون پیکره‌های ویروسی و نیز ترکیبهای آزادکننده پیکره‌ها (متا بی‌سولفیت سدیم، دی اتیل دی تیو کاربامات و پلی وینیل پایرولیدان) در بافر عصاره‌گیری استفاده شد. نمونه‌هایی که جذب چاهک آنها در طول موج ۴۰۵ نانومتر بیشتر از سه برابر میانگین جذب چاهکهای شاهد منفی بود به‌عنوان نمونه مثبت و آلوده به ویروس در نظر گرفته شد. تمام آزمونهای سرولوژیک با دو بار تکرار انجام شدند. همچنین تعداد ۴۰ نمونه از نمونه‌هایی که در آزمون الیزای مستقیم آلودگی آنها به دو ویروس موزائیک آرابیس و نیز لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار مثبت شده بود، از طریق روش سرولوژیک الیزای

غیرمستقیم (Dot-Blot) جهت تأیید حضور ویروس مورد ارزیابی مجدد قرار گرفتند. برای آزمون الیزای غیرمستقیم از سوبسترای رنگ‌زای نیتروبلوتترازولیوم (NBT) و ۵ـ برومو۴ـ کلرو۳ـ ایندولیل فسفات (BCIP) استفاده شد.

روش تهیه اسانس گزنه

در این بررسی عصاره آبی و الکلی گزنه مطابق روش Alisi و همکاران (۲۰۰۸) با اندکی تغییرات تهیه شد. برای تهیه عصاره آبی و الکلی گزنه، بافت خشک شده برگ و ریشه گزنه همزمان توسط آسیاب برقی پودر شده و بعد به میزان ۲۰۰ گرم از نمونه پودر شده در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل و یا اتانول ۹۶ درصد حل شد. پودر خشک گزنه در آب یا الکل به مدت ۱ ساعت خوب بهم زده شده و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C یخچال قرار داده شد. نمونه‌ها ۲ دفعه از کاغذ صافی واتمن عبور داده شدند. عصاره آبی و الکلی گزنه توسط دستگاه تقطیر روتاری گرفته شد و بعد عصاره آبی و الکلی بدست آمده توسط فیلتر صاف شد و در ظروف مخصوص نگهداری اسانس ریخته شد.

جدول ۱- گل‌کاریهای مختلف مورد نمونه‌برداری در استان تهران

مناطق مورد نمونه‌برداری	مکان مورد نمونه‌برداری	ویروسهای مورد بررسی		
غرب تهران (پارک جنگلی چیتگر)	فضای سبز	ArMV	PNRSV	CMV
شمال‌غرب تهران (دانشگاه آزاد اسلامی علوم و تحقیقات)	فضای سبز	ArMV	PNRSV	CMV
دماوند (آبسرد)	گل‌کاری مزرعه‌ای	ArMV	PNRSV	CMV
مهرشهر (کرج)	گلخانه روباز	ArMV	PNRSV	-
دانشگاه آزاد رجایی‌شهر (کرج)	فضای سبز	ArMV	PNRSV	CMV
گل‌شهر (کرج)	گلخانه روباز	ArMV	PNRSV	CMV
ورامین (شریف‌آباد)	گلخانه سرپوشیده	ArMV	PNRSV	CMV
شهرری	فضای سبز	ArMV	PNRSV	-
شهریار (رزکان)	گلخانه سرپوشیده	ArMV	PNRSV	-

در این جدول علاوه بر مکانهای نمونه‌برداری، نوع ویروسهایی که مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند نیز آمده است.

(-): حضور ویروس CMV در رُزکاریهای برخی از مناطق مورد بررسی، ارزیابی نشد.

کشت بافت قلمه‌های رُز

از ساقه‌های جوان رُزهایی که در آزمون سرولوژیک آلودگی آنها به ویروسهای PNRSV و ArMV اثبات شده بود (تعداد ۲۰ عدد)، قلمه‌هایی به قطر ۱ سانتی‌متر و طول ۸ سانتی‌متر تهیه شد. قلمه‌ها توسط محلول آب ژاول ۴٪ به تعداد ۳ مرتبه و هر بار ۵ دقیقه شستشوی سطحی داده شدند و پس از خشک شدن درون ظروف شیشه‌ای استریل با ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر حاوی ۱۰ml محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) به صورت عمود از ناحیه گره قرار داده شدند. محیط رشد فاقد هر گونه هورمون رشد بود. آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین به

میزان ۲۵۰mg/l به محیط‌های MS اتوکلاو شده جهت جلوگیری از رشد باکتری اضافه شد. یک هفته پس از استقرار قلمه‌ها در محیط کشت، عصاره‌های آبی و الکلی گزنه با ۳ غلظت ۵ mg/ml، ۲ mg/ml و ۰/۵ mg/ml (mg اسانس/ ml محیط کشت) زیر هود استریل به محیط‌ها اضافه شد. محیط‌های کشت حاوی قلمه‌های رُز برای مدت ۳۰ روز پس از اضافه نمودن عصاره در اتاقکهای رشد با دمای ۲۰±۲°C و دوره تناوب نوری، ۱۶ ساعت نور با شدت ۵۲$\mu molm^{-2}\ s^{-1}$ قرار داده شدند. آزمون فوق در ۲ تکرار انجام شد و در هر تکرار میزان غلظت ویروسها در هر قلمه ۳۰ روز پس از تیمار با عصاره با استفاده از آزمون سرولوژیک الیزای مستقیم اندازه‌گیری شد. در هر تکرار از محیط کشت دارای قلمه‌های سالم و آلوده بدون عصاره و با عصاره به‌عنوان شاهد استفاده شد.

نتایج

پراکندگی عوامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک رُز در مناطق مورد بازدید

پس از آزمایش بر روی نمونه‌های رُز مشخص شد که عوامل ویروسی مسئول موزائیک در رُز می‌توانند به صورت پنهان نیز در رُزهای مبتلا حضور داشته باشند. با وجود این، علائم موزائیک، نقش برگ بلوطی، لکه‌های زرد رنگ مجتمع در امتداد رگبرک، نکروز حاشیه برگ، زردی عمومی و کوتوله‌گی ارقام رُز آلوده بارزترین علائم مربوط به حضور عوامل ویروسی PNRSV و ArMV در پایه‌های رُز تشخیص داده شد (شکل ۱). علائم مورد اشاره در اوایل بهار بیشتر مشاهده می‌شوند. چنین علائمی در گذشته مرتبط با حضور این عوامل در درختان میوه هسته‌دار گزارش شده بود (Boulila & Marrakchi, 2001). نتایج نشان داد ارقام دارای گلهای سرخ شامل (Rosa damascena، R. chinensis، R. canina و R. *multiflora*)، به میزان بیشتری در مقایسه با ارقام با گلهای سفید و زرد (*R. canina*، *R. indica* و *R. multiflora*) به ویروس PNRSV آلوده می‌باشند و علائم در آنها بیشتر به صورت بدشکلی برگها و لکه‌های نکروز در سطح پهنک به چشم می‌خورد، در صورتی که ارقام با گلهای سفید از درصد آلودگی بیشتری به ویروس ArMV برخوردار بودند. در بیشتر موارد هر دو عامل ویروسی با هم در یک پایه آلوده حضور داشتند. نتایج این بررسی نشان داد تمام گل‌کاریهای مورد بررسی حداقل به یکی از دو ویروس مورد بررسی آلوده می‌باشند. ویروس PNRSV با ۲۳/۱٪ آلودگی از پراکندگی بیشتری در مقایسه با ویروس ArMV (۱۸/۸٪) در گل‌کاریهای استان تهران برخوردار بود (جدول ۲). همچنین ویروس CMV در هیچ کدام از رُزهای مورد بررسی ردیابی نشد. نتایج بدست آمده توسط آزمون الیزای مستقیم (DAS-ELISA) برای ۵۰ نمونه، به وسیله آزمون الیزای غیرمستقیم مورد تأیید قرار گرفت.

کشت بافت رُز و بررسی اثر مهارکنندگی عصاره آبی و الکلی گزنه

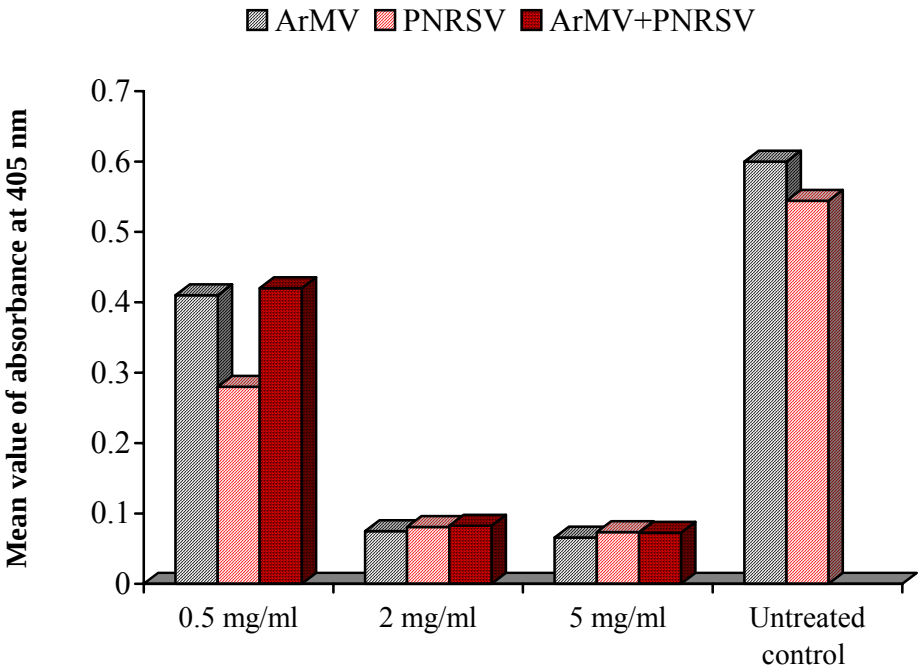
تعداد ۲۰ قلمه از رُزهایی که دارای آلودگی مشترک به هر دو ویروس ArMV و PNRSV بودند برای کشت بافت و ویروس‌زدایی انتخاب شدند. در محیط کشت MS بدون هورمون، ۹۰-۸۵٪ قلمه‌های رُز تا ۳۰ روز پس از انتقال به محیط ریشه‌دار شدند. نتایج این بررسی نشان داد غلظت ویروس ArMV در ۹۰٪ از قلمه‌های رُز با بکارگیری

غلظتهای ۲ یا ۵mg/ml عصاره آبی گزنه یا ۰/۵ و ۲mg/ml عصاره اتانولی گزنه در محیط رشد کاهش می‌یابد (شکل ۲).

شکل ۱- انواع علائم آلودگی بیماری ویروسی موزائیک رُز در گونه‌های مختلف رُز

الف- لکه‌های زرد پراکنده در سطح پهنک که در امتداد رگبرگها مجتمع شده است.

ب- لکه‌های نکروتیک قرمز رنگ ج) رنگ‌بندیهای متفاوت در سطح پهنک برگ



شکل ۲- نتایج آزمون الیزای مستقیم برای بررسی میانگین جذب چاهکهای مربوط به نمونه‌های رُز تیمار شده با عصاره آبی گزنه (۳۰ روز پس از اضافه شدن عصاره به محیط‌های کشت حاوی قلمه رُز)

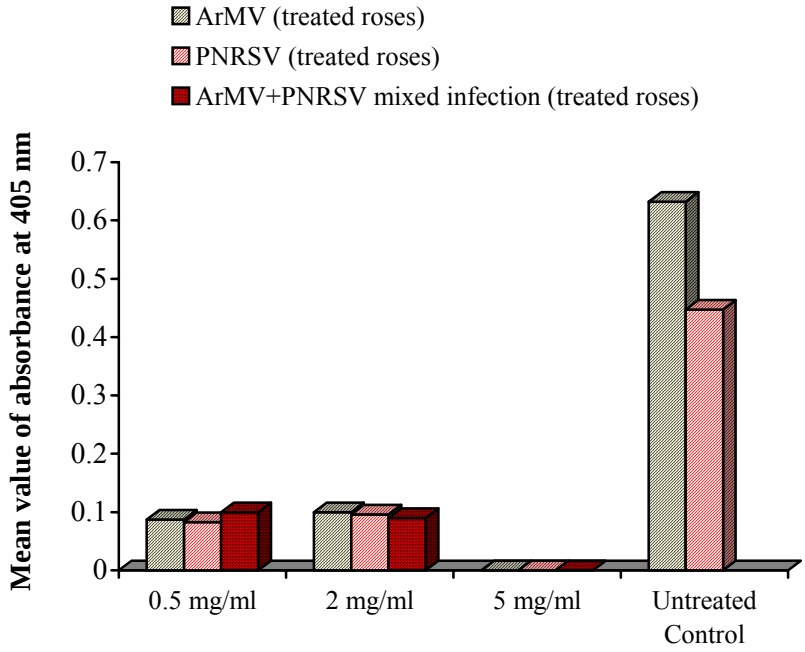
همچنین غلظت ویروس PNRSV در ۴۲٪ از قلمه‌های رُز با بکارگیری غلظتهای ۲ و ۵mg/ml عصاره آبی گزنه یا ۰/۵ و ۲mg/ml عصاره اتانولی گزنه در محیط رشد کاهش می‌یابد (شکل ۳). نتایج این بررسی نشان داد که عصاره آبی گزنه از توان بیشتری در مقایسه با عصاره الکلی در کاهش غلظت عوامل ویروسی موزائیک رُز برخوردار است (شکل ٤). همچنین مشخص شد عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در مهار ویروس ArMV با کارآمدی بیشتری نسبت به ویروس PNRSV عمل می‌کنند. میزان مرگ و میر قلمه‌های رُز حاصل از آلودگیهای ویروسی با افزایش میزان غلظت عصاره آبی تا میزان ۵۲٪ کاهش پیدا کرد و میزان مرگ قلمه‌ها در محیط‌های رشد حاوی عصاره اتانولی تا ۲ برابر بیشتر از محیط‌های دارای عصاره آبی بود. تمامی نتایج بدست آمده توسط آزمون الیزای مستقیم (DAS-ELISA) به وسیله آزمون الیزای غیرمستقیم مورد تأیید قرار گرفت.

جدول ۲- میزان پراکندگی عوامل ویروسی بیماری‌زای رُز در مناطق مورد نمونه‌برداری استان تهران

منطقه	تعداد گیاهان		تعداد گیاهان آلوده	
	بررسی شده	مثبت به آلودگی	ArMV	PNRSV
جنوب‌غرب تهران	۲۳	۱۱	٪۲۶/۶	٪۲۱/۷
شمال‌غرب تهران	۱۳۰	۲٤	٪٤/٦	٪۱۳/۸
دماوند	۱۰	۳	٪۲۰	٪۱۰
شهرری	٤٦	۲۸	٪۲٦	٪۳٤/۷
شهریار	۳۰	۱٦	٪۳۰	٪۲۳/۳
ورامین	۱۱۰	٦۷	٪۲۳/٦	٪۳۷/۲
کرج	۱۷۷	۷۲	٪۲۱/٤	٪۱۹/۲
جمع کل	۵۲٦	۲۲۱	٪۱۸/۸	٪۲۳/۱

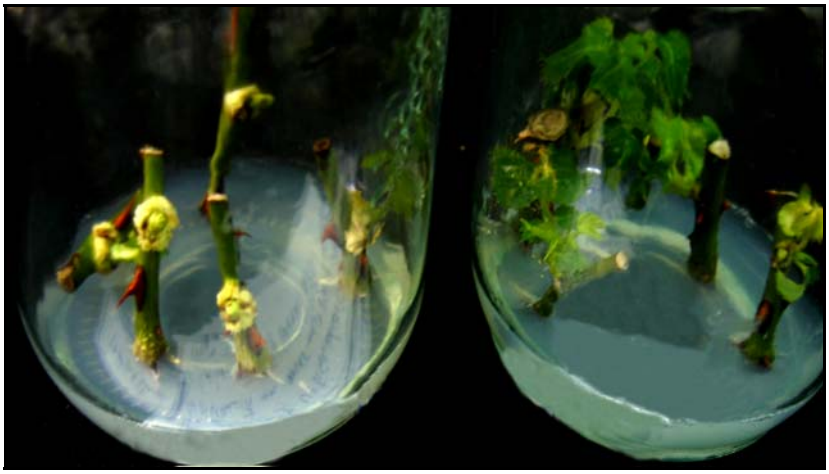
بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشتر رُزکاریهای مناطق مختلف استان تهران به حداقل یکی از عوامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک رُز آلوده هستند. اگرچه در گذشته ویروسهای لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته‌دار (PNRSV) از درختان میوه هسته‌دار در شمال کشور و ویروس موزائیک آرابیس (ArMV) از انگور و گل‌کاریهای کشور گزارش شده بودند (Rakhshandehroo *et al*., 2005؛ Moeini & Izadpanah, 2000)، ولی این اولین گزارش رسمی از وقوع عوامل ویروسی مورد آزمایش در رُزکاریهای ایران می‌باشد. همچنین نتایج این پژوهش مشخص کرد که بیشتر گونه‌های رُز شامل: *Rosa damascena*، *R. chinensis*، *R. canina* و *R. multiflora* با گلهای سرخ به ویروس PNRSV و گونه‌های رُز با گلهای سفید شامل: *R. canina*، *R. indica* و *R. multiflora* به ویروس ArMV آلوده هستند. هنوز مشخص نیست که آیا این مجموعه از عوامل ویروسی با قلمه‌های رُز وارداتی وارد کشور شده‌اند و یا در پایه‌های رُز ایران به صورت بومی وجود داشته‌اند. اثبات این ادعا نیازمند تحقیق بیشتری



شکل ۳- نتایج آزمون الیزای مستقیم برای بررسی میانگین جذب چاهکهای مربوط به نمونه‌های رُز تیمار شده با عصاره اتانولی گزنه (۳۰ روز پس از اضافه شدن عصاره به محیط‌های کشت حاوی قلمه رُز)

می‌باشد. این بررسی همچنین برای اولین بار اهمیت عصاره‌های آبی و الکلی ریشه و برگ گزنه را در حذف عوامل ویروسی مورد بررسی قرار داد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد عصاره‌های آبی و الکلی گزنه می‌توانند در عاری‌سازی قلمه‌های آلوده در محیط‌های کشت مصنوعی بکار روند. نتایج حکایت از آن داشتند که عصاره آبی گزنه با غلظت ۵mg/ml در حذف عوامل ویروسی از قلمه‌های رُز در محیط کشت از بیشترین کارایی برخوردار بودند. نتایج پژوهشهای گذشته نشان داده بود که عصاره آبی گزنه دو پایه منطقه مدیترانه دارای خاصیت ضد اکسیداتیو بالا می‌باشد و از اکسیداسیون فسفولیپید غشاءهای سلول، اسید چرب لینولئیک و قند داکسی ریبوز با دخالت آنزیمهای اکسید کننده دارای گروههای فعال فلزی جلوگیری می‌کند (Matsingou *et al.*, 2001). این احتمال وجود دارد که عصاره‌های آبی و الکلی گزنه دارای اثر بیوشیمیایی مخرب مستقیم بر پیکره عوامل ویروسی بوده و از طرفی جلوی تخریبهای اکسیداتیو ناشی از تنش زیستی به سلول حاصل از آلودگی ویروسی را نیز می‌گیرد و از این طریق علاوه بر مهار آلودگی ویروسی موجب تقویت توان رشد رزهای تیمار شده می‌گردد.



شکل ٤- تأثیر عصاره آبی گزنه در حذف ویروس در محیط رشد دارای قلمه رُز

عصاره آبی گزنه در غلظت ۵mg/ml در محیط رشد موجب حذف عوامل ویروسی ایجاد کننده موزائیک در رُز شده و همچنین موجب رشد بهتر قلمه‌های رُز در محیط کشت MS گردید.

قلمه‌های رُز عاری شده از ویروس ۳۰ روز پس از تیمار با غلظت ۵mg/ml عصاره آبی گزنه (شکل سمت راست)

قلمه‌های تیمار نشده آلوده (شکل سمت چپ)

تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که پلی‌ساکاریدهایی مانند نشاسته و پلی‌پپتیدهایی مانند انواع فاباتین و لکتین‌ها دارای خصوصیات ضد پاتوژنیک به‌خصوص ضد ویروسی می‌باشند و چنین ترکیبهایی در عصاره آبی برخی از گیاهان دارویی موجود می‌باشند (Ziyyat et al., 1997؛ Cowan, 1999). وجود چنین ترکیبهایی در عصاره آبی با بررسیهای اولیه مشخص نمی‌شود و نیازمند تحقیق بیشتری است. با وجود آن که غلظتهای ۰/۵ و ۲mg/ml عصاره اتانولی گزنه موجب کاهش غلظت آلودگیهای ویروسی در قلمه‌های رُز شدند ولی میزان مرگ قلمه‌های عاری از ویروس در محیط‌های حاوی عصاره الکلی گزنه بیشتر از محیط‌های دارای عصاره آبی بود. دلیل آن نیز می‌تواند به علت حضور ترکیبهای فنلی سمی موجود در عصاره الکلی گزنه باشد. نتایج پژوهشهای گذشته نشان داده است که گزنه دارای ترکیبهای فنلی می‌باشد که با اتانول استخراج می‌شوند و برای سلولهای حیوانی سمی می‌باشند (Gulcin et al., 2004). بیشتر ترکیبهای آلی اشباع و یا آروماتیک موجود در گیاهان که خاصیت ضد میکروبی دارند توسط حلالهای آب و الکل از آنها استخراج می‌شوند. در این تحقیق جهت بررسی امکان وجود خاصیت ضد ویروسی عصاره گزنه لازم بود تا در مرحله ابتدای تشخیص اثر ضد میکروارگانیسمی عصاره آبی و الکلی گزنه مورد بررسی قرار گیرد. در ادامه این تحقیق لازم خواهد بود تا ترکیبهای اختصاصی موجود در عصاره گیاه گزنه با استفاده از حلالهای اختصاصی‌تری استخراج شوند و اثر ضد ویروسی هر کدام از آنها برای ویروسهای مختلف مورد بررسی قرار گیرد. از آنجایی که نتایج بدست آمده در این تحقیق برای زمانهای طولانی پس از تیمار قلمه‌ها مورد بررسی قرار نگرفته است، بنابراین توصیه به استفاده از عصاره‌های آبی و الکلی گزنه در تولید قلمه‌های رُز عاری از موزائیک در محیط کشت نیازمند تحقیقات تکمیلی بیشتر می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر فراوان خود را از سرکار خانم مهندس دیبا به دلیل کمک در جمع‌آوری و استخراج نمونه اعلام می‌دارند. همچنین از جناب آقای دکتر مهندس شهاب حاج‌منصور، سرپرست آزمایشگاههای تخصصی مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، به دلیل فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Agbafor, K.N. and Akubugwo, E.L., 2007. Hypocholesterolaemic effect of ethanolic extract of fresh leaves of *Cymbopogon citratus* (lemongrass). African Journal of Biotechnology, 6(5): 596-598.
- Alisi, C.S., Emejulu, A.A., Alisi, P.N.C., Nwaogu, L.A. and Onyema, O.O., 2008. Decreased cardiovascular risk and resistance to hyperlipemia-induced hepatic damage in rats by aqueous extract of *Urtica dioica*. African Journal of Biochemistry Research, 2(4): 102-106.
- Banttari, E.E. and Goodwin, P.H., 1985. Detection of Potato viruses S, X and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-ELISA). Plant Disease, 69(3): 202-205.
- Boulila, M., Marrakchi, M., 2001. Detection and Characterization of Stone fruit virus disease in Tunisia. Phytopathologia Mediterranea, 40 (3): 125-136.
- Chrubasik, J.E., Roufogalis, B.D., Wagner, H. and Chrubasik, S., 2007. A comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. Phytomedicine, 14(7): 568-579.
- Clark, M.F. and Adams, A.N., 1977. Characterization of the microplate methods of enzyme linke dimmunosorbentassay (ELISA) for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34(3): 475-483.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4): 564-582.
- Epstein, A.H. and Hill, J.H., 1995. The biology of rose rosette disease: A mite-associated disease of uncertain aetiology. Journal of Phytopathology, 143(2): 353-360.
- Gulcin, I., Küfrevio, O.K., Oktay, M. and Buyukokuro, M.E., 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). Journal of Ethnopharmacology, 90(2-3): 205-215.
- Johnstone, G.R., Munro, D., Brown, G.S. and Skotland, C.B., 1995. Serological detection, occurrence and spread of ilarviruses in temperate fruit crops, hops and roses in Tasmania. Acta Horticulture, 386(5): 132-135.
- Lichius, J.J. and Muth, C., 1997. The inhibiting effect of *Urtica dioica* root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the mouse. Planta Medica, 63(4): 307-310.
- Matsingou, T.C., Kapsokefalou, M. and Safiloglou, A., 2001. Aqueous infusions of Mediterranean herbs exhibits antioxidant activity towards iron-promoted oxidation of phospholipids, linoleic acid and deoxyribose. Free Radical Research, 35(5): 593-605.
- Moeini, A.A. and Izadpanah, K., 2000. Seroloical identification of PNRSV and PPV in Dasht-e-Moghan. Proceeding of the 14th Iranian plant protection congress, Isfahan, 5-8 September: 338.
- Moury, B., Cardin, L., Onesto, J.P., Candresse, T. and Poupet, A., 2000a. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay testing of shoots grown in vitro and the use of IC/RT-PCR Improved detection of *Prunus necrotic ringspot* virus. Phytopathology, 90(5): 522-529.
- Moury, B., Cardin, L., Onesto, J.P., Candresse, T. and Poupet, A., 2000b. Survey of *Prunus necrotic ringspot* virus in rose and its variability in rose and prunus. Plant Disease, 91(1): 84-91.
- Murashighe, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Plant physiology, 15(3): 473-497.
- Obertreis, B., Giller, K., Teucher, T., Behnke, B. and Schmitz, H., 1996. Anti-inflammatory effect of *Urtica dioica* folia extract in comparison to caffeic malic acid. Arzneimittel Forschung Drug Research, 46(1): 52-56.
- Rakhshandehroo, F., Pourrahim, R., Zamani Zadeh, H.R., Rezaee, S. and Mohammadi, M., 2005. Incidence and distribution of viruses infecting Iranian vineyards. Journal of Phytopathology, 153(1): 480-484.
- Uncini Manganelli, R.E., Zaccaro, L. and Tomei, P.E., 2005. Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. Journal of Ethnopharmacology, 98(3): 323-327.
- Vivanco, J.M., Querci, M. and Salazar, L.F., 1999. Antiviral and antiviroid activity of MAP-containing extracts from *Mirabilis jalapa* roots. Plant Disease, 83(12): 1116-1121.
- Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. and Benjelloun, W., 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oiental morocco. Journal of Ethnopharmacology, 58(1): 45-54.

Study on the antiviral effect of aquatic and alcoholic extracts of *Urtica dioica* L. on rose mosaic viral disease in vitro culture

F. Rakhshandehroo[1*], A. Modarresi[2] and H.R. Zamani Zadeh[3]

1*- Corresponding author, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, E-mail: rakhshandehroo_fa@ srbiau.ac.ir
2- School of Biologocal Sciences, University of Science (UCM), Penang Island, Malaysia
3- Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: December 2008 Revised: April 2009 Accepted: June 2009

Abstract

Stinging nettle has been used for treating several human chronic diseases. This research focused on the use of *Urtica dioica* L. (stinging nettle) aquatic and alcoholic extracts for the production of mosaic virus-free rose plants by explant culture from infected parent material. Toward this aim a survey was conducted to detect the viruses infecting Rosa species in main rose growing plantations of Tehran province and its suburbs. Using Enzyme-Linked Immunosorbent (DAS-ELISA) and Dot-Blot (DIBA) serological methods and polyclonal antibodies, 530 rose samples were tested for the presence of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Arabis mosaic virus*. Transplant medium culture in MS medium was performed for a 20 infected rose transplants which were infected with ArMV and PNRSV viruses. Dried leaves and roots of nettle plants were extracted with water and 95% ethanol. Aquatic and alcoholic (ethanol) *U. dioica* extracts inoculated with three different concentrations (5, 2, 0.5 mg/ml) (extract/ml medium) into MS media. Rose transplants were serologically tested for the presence of viruses 30 days after treating. Results indicated that the aquatic extract of nettle plants at the concentration of 5 and 2 mg/ml and ethanol extract at the concentration of 0.5 and 2 (mg/ml) are effective in eliminating 90% of PNRSV and 42% of ArMV respectively. According to the results of this study *U. dioica* aquatic and alcoholic extracts are able to adversely affect the rose mosaic virus replication. They may be used as an herbal source as viricidal preparations against rose mosaic disease caused by ArMV and PNRSV.

Key words: Aquatic and alcoholic extracts, rose mosaic disease, tissue culture; Dot-Blot, Das-Elisa.