دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۳، صفحه ۴۸۸-۴۷۹ (۱۳۹۴)

بررسی اثر ضدویروسی عصاره آبی گیاه سرخاب (*Phytolacca americana* L.) در کنترل ویروس وای سیب‌زمینی

اطهر علی‌شیری[1*] و فرشاد رخشنده‌رو[2]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
پست الکترونیک: alishiria@gyahoo.com

۲- استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۲ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

چکیده

سرخاب یا علف‌پوک (pokeweed) (*Phytolacca americana* L.) گیاه بومی کشورهای مختلف قاره آمریکا بوده و با وجود احتمال سمّیت گوارشی، از توان کنترل‌کنندگی برخی عوامل بیماری‌زای انسانی و گیاهی برخوردار است. این ویژگی به‌دلیل حضور پروتئین غیرفعال‌کننده ریبوزوم (RIPs) در این گیاه می‌باشد. در این تحقیق، اثر عصاره آبی برگ و ساقه گیاه سرخاب در کنترل ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus* Y-PVY) که از مهمترین ویروس‌های آلوده‌کننده سیب‌زمینی است، در گیاه مدل توتون مورد بررسی قرار گرفت و حضور پروتئین ضدویروسی گیاه سرخاب (PAP) در عصاره با استفاده از SDS-PAGE تأیید شد. نتایج آزمون سرولوژیکی الایزا (DAS-ELISA) حکایت از کاهش میانگین جذب سرولوژیکی چاهک‌های مربوط به نمونه‌های تیمار شده با عصاره آبی سرخاب در مقایسه با چاهک شاهد (نمونه‌های آلوده به ویروس که با عصاره علف پوک تیمار نشده‌اند) در آزمون الایزا داشت. نتایج نشان داد که عصاره آبی گیاه سرخاب در غلظت ۰/۱۴ppm قادر است میزان آلودگی ویروس وای سیب‌زمینی را در گیاهان آلوده کاهش دهد. به‌طوری که بیشترین میزان کنترل‌کنندگی عصاره تا چهار روز بعد از تیمار توتون‌های آلوده به ویروس با عصاره سرخاب مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: گیاه سرخاب (*Phytolacca americana* L.)، عصاره آبی، اثر ضدویروسی، ویروس وای سیب‌زمینی.

مقدمه

گیاه سرخاب یا علف پوک (pokeweed) با نام علمی (*Phytolacca americana*) از خانواده Phytolaccaceae بومی شمال آمریکا (جنوب‌غرب کانادا و ایالت‌های ویرجینیا و فلوریدا) می‌باشد و به فراوانی در سواحل دریای خزر می‌روید. برگ‌های این گیاه متناوب، بیضی شکل، بدون دندانه، فاقد تار و با پهنک کامل بدون گوشوارک با گل‌های سفید و یا سفید مایل به صورتی و میوه‌هایی به رنگ بنفش مایل به سیاه ارغوانی شبیه خوشه انگور می‌باشد (Newall *et al.*, 1996). این گیاه اثرات متعدد درمانی در اختلالات گوارشی، روماتیسم مزمن و ضدمیکروارگانیسمی (ضدمیکروبی و ضدویروسی)، کاهش آلودگی‌های قارچی و تحریک سیستم ایمنی دارد. تمام بخش‌های گیاه سمّی است ولی میوه سمّیت کمتری نسبت به ریشه دارد (Duke,

2001). ساقه‌های جوان گیاه بعد از جوشاندن خوردنی هستند و برگ‌های پخته آن نیز به سالاد مادربزرگ معروف است. ترکیب‌های علف پوک بیشتر در مطالعات آزمایشگاهی استفاده می‌شود. فعالیت ضدویروسی پروتئین موجود در این گیاه (pokeweed antiviral protein-PAP) بر علیه ویروس عامل بیماری ایدز (*Human immunodeficiency virus*-HIV) به اثبات رسیده است (D'Cruz *et al.*, 2004). اخیراً در ایران تأثیرات سمّی این گیاه را از طریق روش پرفیوژن کبدی بر روی موش‌های رت آزمایش کرده‌اند (کرمی و همکاران، ۱۳۸۶؛ Karami *et al.*, 2009). با استفاده از گیاهان تراریختی که در خود پروتئین PAP را تولید می‌نمودند و یا با استفاده از پروتئین نوترکیب خالص شده PAP در گذشته ویژگی ضدویروسی پروتئین مذکور بر علیه ویروس های گیاهی مختلف با ژنوم RNA ازجمله ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*-CMV)، ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus*-TMV)، ویروس موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic virus*-AMV)، ویروس ایکس سیب‌زمینی (*Potato virus X*-PVX)، ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*-PVY)، ویروس موزائیک جنوبی لوبیا (*Southern bean mosaic virus*-SBMV) و ویروس‌های با ژنوم DNA مثل ویروس موزائیک آفریقایی کاساوا (*African cassava mosaic virus*-ACMV) و موزائیک کلم‌گل (*Cauliflower mosaic virus*-CaMV) آزمایش شده و تأثیر ضدویروسی آن ثابت شده‌است (Duggar & Armstrong, 1925؛ Wyatt & Shepherd, 1969؛ Tomlinson *et al.*, 1974؛ Irvin *et al.*, 1980؛ Chen *et al.*, 1991). همچنین بر روی باکتری‌ها و قارچ‌ها نیز تحقیقاتی انجام شده، اما بیشتر این تحقیقات بر روی ویروس‌های انسانی و گیاهی بوده‌است. مکانیسم کنترل‌کنندگی ویروس توسط عصاره این گیاه به دلیل حضور پروتئین ضدویروسی علف پوک (PAP) است که از گروه پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزوم (Ribosome inactivating protein-RIP) محسوب می‌شود. بعضی از RIPها از آلودگی توسط ویروس های گیاهی ممانعت بعمل می‌آورند. پروتئین ضدویروسی علف پوک یک پروتئین ۲۹ کیلودالتونی است که جز تیپ یک پروتئین‌های گروه RIP محسوب می‌شود و از یک زنجیره پلی‌پپتیدی تشکیل شده‌است (Hudak *et al.*, 2000).

ویروس وای سیب‌زمینی یکی از ویروس‌های گیاهی بسیار خسارت‌زا و مهلک می‌باشد که تقریباً از انتشار جهانی برخوردار است. این ویروس از خانواده Potyviridae بوده و دارای ژنوم ssRNA+ است (Ormeno *et al.*, 2006). ویروس PVY باعث خسارت اقتصادی شدید بر روی گیاهان خانواده بادنجانیان (Solanaceae) می‌شود. با وجود آنکه میزبانان اصلی ویروس وای سیب زمینی از این خانواده می‌باشند ولی PVY قادر است بر روی ۱۲۰ گونه گیاهی از خانواده‌های Amaranthaceae، Leguminosae، Chenopodiaceae و Compositae نیز خسارت وارد نماید (Spetz *et al.*, 2003). این ویروس بر روی توتون، گوجه‌فرنگی، فلفل و سیب‌زمینی خسارتهای عمده‌ای را در سراسر جهان وارد کرده است (De Bokx & Huttinga, 1981). در این تحقیق اثر ضدویروسی عصاره آبی علف پوک علیه نژاد ایرانی ویروس وای سیب زمینی که از بادنجانیان استان تهران جداسازی شده بود، بررسی شد. در مطالعات گذشته، از پروتئین استخراج شده PAP برای کنترل این ویروس استفاده شده بود. با توجه به فرایند هزینه‌بر استخراج این پروتئین از گیاه، در این تحقیق و برای اولین بار اثر کنترل‌کنندگی عصاره آبی گیاه سرخاب روی ویروس وای سیب زمینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش می‌تواند سیستم مناسبی را برای مدیریت و کنترل PVY به‌ویژه در محیط‌های آزمایشگاهی-تحقیقاتی و نیز گلخانه‌ای- صنعتی پیشنهاد دهد.

مواد و روشها

بذر گیاهان پوک (اهدا شده توسط مرکز تحقیقات زراعی کانادا، Summerland، British Columbia) پس از ضدعفونی با آب ژاول ۰/۵٪ و خشک شدن، در محیط کشت MS_{30} جوانه‌دار شده و تا رشد کامل و رسیدن به

مرحله گیاهچه درون ظروف استریل حاوی محیط کشت در اتاقک رشد با شدت نور ۸۰۰ لوکس و با نور متناوب و رطوبت نسبی ۵±۷۰ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. سپس گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی به خاک پاستوریزه درون گلدان‌های ۲۵۰ گرمی منتقل شدند. پس از رشد کامل گیاهچه‌ها تا مرحله ۸ تا ۱۰ برگی، برگ و سرشاخه‌های جوان گیاه برای عصاره‌گیری و استخراج پروتئین انتخاب شدند. استخراج پروتئین مطابق با روش Irvin (۱۹۷۵) و البته با کمی تغییر انجام گردید. برای این منظور به‌صورت مجزا از ریشه و برگ گیاهان ۱۲۰ روزه و برگ گیاهان ۶۰ روزه گیاه پوک نمونه‌برداری بعمل آمد. میزان ۳ تا ۴ گرم از بافت های مورد نظر در فریز $-20^{\circ}C$ به مدت یک شبانه‌روز قرار داده شد. این میزان بافت در ۳ تا ۴ سانتی متر مکعب آب مقطر یون زدوده شده خرد گردید و عصاره‌گیری انجام شد. پس از عبور عصاره از کاغذ صافی، عصاره صاف شده درون لوله‌های آزمایش بر روی یخ منتقل شدند. عصاره بدست آمده با آمونیوم سولفات ۴۰٪ بخوبی مخلوط شده و برای ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. سپس رونشین جدا و با آمونیوم سولفات ۱۰۰٪ اشباع مخلوط شده و دوباره به روش قبل سانتریفوژ انجام شد. سپس رسوب با اضافه نمودن محلول بافر A (Tris-HCl: 10mM، EDTA: 0.2mM، β-mercaptoetanol: 0.1mM) با اسیدیته ۷/۵ کاملاً حل شده و محلول واکنش درون کیسه دیالیز با توان تفکیک ۱۰ کیلو دالتون شرکت (Sigma, USA) ریخته و درون محلول بافر A به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد.

حضور پروتئین PAP در مخلوط پروتئین کل استخراج شده از گیاه پوک با استفاده از ژل پلی‌اکریل آماید ناپیوسته به روش (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت. روش بررسی حضور PAP مطابق با روش تحقیق گذشته انجام شد (Hudak *et al*., 2000). برای این منظور پس از واسرشت شدن پروتئین توسط حرارت (۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد) و ماده SDS (۲٪)، نمونه‌ها به میزان ۱۴ ماکرولیتر بر روی ژل پلی‌اکریل آماید ناپیوسته ۱۲٪ ران شدند. الکتروفورز SDS-PAGE بر طبق روش استاندارد (Laemmli, 1970) انجام شد. بعد از ۲ تا ۳ ساعت الکتروفورز در دمای ۴ درجه با ولتاژ ۳۵۰ ولت، ژل در بافر بازسرشتی (renaturing) (Triton X-100) برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به صورت ملایم تکان داده شد و با بافر ظهور (developing buffer) (Tris-HCl: 5mM، NaCl: 20mM، $CaCl_2$: 0.5mM) جایگزین شد. سپس بافر قدیمی با بافر تازه ظهور تعویض شده و حداقل به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. ژل با رنگ coomassie brilliant blue R-250 (0.5%, w/v) برای ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سپس با روش Bradford غلظت پروتئین استخراج شده از کیسه دیالیز تعیین شد.

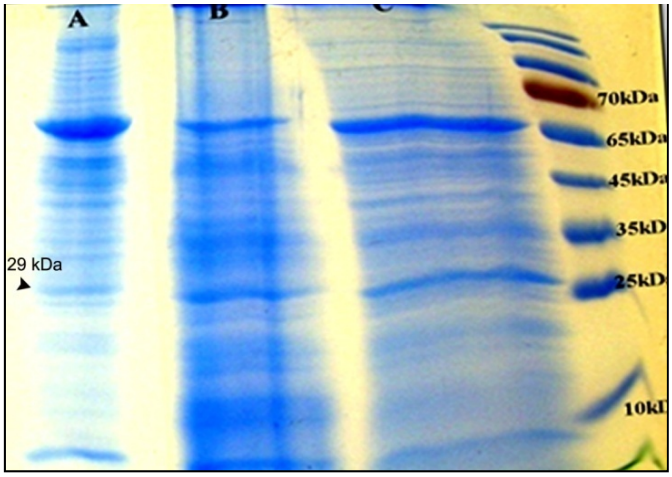
برای بررسی اثر ضدویروسی عصاره پوک از توتون سامسون *Nicotiana tabacum* cv. Samsun nn استفاده شد. برای این منظور بذرهای این توتون پس از ضدعفونی در آب ژاول ۰/۵٪ در محیط کشت MS_{30} رشد داده شد تا از عدم آلودگی گیاهچه های توتون اطمینان حاصل شود. گیاهچه‌های توتون در مرحله چهار برگی با ویروس PVY و توسط بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=۷) به‌صورت مکانیکی مایه‌زنی شدند. از آب مقطر برای مایه‌زنی گیاهچه‌های توتون به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. ۱۰ روز پس از مایه‌زنی و همزمان با بروز علائم موزائیک سیستمیک، گیاهچه های آلوده با عصاره پروتئینی استخراج شده از گیاه پوک تیمار شدند. برای تیمار با عصاره علف پوک، ریشه گیاهچه های توتون سالم و آلوده به PVY بریده شده و در غلظت‌های متفاوتی از عصاره علف پوک شامل ۴٪، ۲٪، ۱/۳٪ و ۱٪ قرار داده شدند. برای بررسی زمان دقیق مهار احتمالی ویروس در نمونه‌های توتون، در زمان‌های ۲، ۴، ۷، ۱۵ و ۲۰ روز پس از تیمار با عصاره پوک، از برگ گیاهان توتون تیمار نمونه گیری شد و توسط آزمون الیزا زمان تأثیر مهارکنندگی عصاره بررسی شد.

به‌منظور بررسی اثر ضدویروسی عصاره گیاه پوک، از آزمون ایمنی‌سنجی الیزای مستقیم به‌صورت ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) مطابق روش (Clark &

Adams, 1977) با کمی تغییر استفاده شد. در این آزمون از آنتی‌بادی های چند همسانه‌ای (تهیه شده از مرکز بین‌المللی تحقیقات سیب‌زمینی پرو–CIP) برای ردیابی PVY استفاده شد. برای انجام این آزمون از نمونه‌های برگی جمع‌آوری شده با نسبت یک به پنج (یک گرم بافت برگ در پنج میلی‌لیتر بافر استخراج) در هاون چینی سرد عصاره‌گیری انجام شد. ابتدا چاهک های موجود در بشقابک الیزا با میزان ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌سرم اختصاصی PVY پوشش‌دار شدند و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت یک شب نگهداری شدند. پس از شستشو در هر یک از چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی مورد بررسی ریخته شد و غیر از چاهک‌های مربوط به نمونه، چاهک‌هایی با عصاره آلوده مربوط به ویروس (کنترل مثبت) و با عصاره نمونه سالم (کنترل منفی) و بافر عصاره گیری (بلانک) پر شدند. در این مرحله بشقابک الیزا به مدت یک شبانه‌روز در یخچال (دمای چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. بعد از گذشت این مدت و پس از شستشوی بشقابک، آنتی‌بادی متصل شده به آنزیم آلکالین فسفاتاز در چاهک‌ها پر شده و برای مدت ۴ ساعت بشقابک‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از شستشو به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر سوبسترا دارای ماده پارانیتروفنیل فسفات (Sanofi, French) درون چاهک‌ها ریخته و بعد بشقابک ها دور از تابش نور نگهداری شدند و هر نیم ساعت یک‌بار برای بروز واکنش رنگ‌زایی و حضور رنگ زرد با دستگاه الیزا خوان مدل (ELX 800-Biotek) در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌هایی که مقدار عددی جذب آنها از ۳ برابر میانگین جذب چاهک های مربوط به شاهد سالم بیشتر بود به‌عنوان نمونه‌های مثبت و آلوده به ویروس در نظر گرفته شدند. سپس این گیاهچه‌ها درون لوله آزمایش گذاشته شد و تا مراحل ۲، ۴، ۷، ۱۵ و ۲۰ روز پس از تیمار با عصاره، برای نمونه‌گیری‌های بعدی نگهداری شدند. برای زنده نگهداشتن گیاه در این مرحله، همزمان با ریشه دادن این گیاهچه ها درون آب، به فاصله هر ۳ روز یک‌بار به این گیاهان محلول غذایی هوگلند (شامل نیترات پتاسیم، نیترات کلسیم، سولفات منیزیوم، فسفات پتاسیم، اسید بوریک، کلرور منگنز، سولفات روی، سولفات مس و کلات آهن) به میزان ۱cc در ۱۰cc آب داده شد و بعد از حدود ۱۰ روز این گیاهچه ها ریشه‌دار شده و به درون گلدان منتقل شدند. نتایج الیزا را قبل از تیمار با عصاره و بعد از تیمار با هم مقایسه و میزان کنترل‌کنندگی عصاره مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون از ۷ تیمار که شامل گیاهان توتون سالم، توتون های مایه‌زنی شده با PVY، توتون‌های آلوده به ویروس که با عصاره علف پوک تیمار شده بودند در زمان‌های ۲، ۴ و ۷ روز بعد از تیمار، توتون‌های سالمی که با عصاره پوک تیمار شده بودند و در نهایت آب مقطر بررسی شدند. آزمون ها در ۴ تکرار جدا انجام شد. طرح آزمایشی مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی بود و با استفاده از آزمون دانکن تیمارها بررسی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نرمال شده و هیستوگرام مربوطه کشیده شد. تیمارها به‌صورتی انتخاب شدند تا بتوان تأثیر گیاه‌سوزی عصاره علف پوک را جدای از تأثیر کنترل‌کنندگی آن نیز بررسی نمود.

نتایج

پس از استخراج پروتئین PAP از برگ و ریشه علف پوک و جداسازی آن از سایر پلی‌پپتیدهای با وزن مولکولی بالا با استفاده از کیسه دیالیز، پروتئینی ۲۹ کیلودالتونی که مربوط به پروتئین مذکور می‌باشد (Hudak *et al*., 2000) در ژل SDS-PAGE نمایان گردید (شکل ۱). نتایج نشان داد که غلظت این پروتئین در برگ های ۱۲۰ روزه علف پوک بیشتر از برگ ۶۰ روزه و ریشه می‌باشد. به این دلیل عصاره گیاهان ۱۲۰ روزه برای ادامه کار انتخاب شدند. همچنین با روش Bradford غلظت پروتئین استخراج شده ۱/۴ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد.



شکل ۱- نتیجه SDS-PAGE عصاره برگ و ریشه علف پوک بعد از رانده شدن در ژل آکریل آماید ۱۲٪

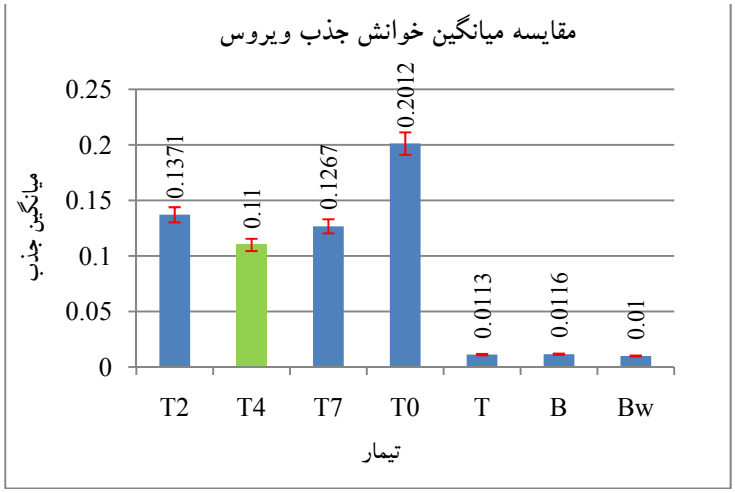
در این ژل، پروفیل مربوط به باندهای پروتئین کل قابل مشاهده است. چاهک A): عصاره نمونه ریشه علف پوک که در پروفایل آن باند ۲۹ کیلودالتونی مربوط به پروتئین PAP دیده می‌شود. چاهک B): نمونه برگ گیاه پوک ۱۲۰ روزه. چاهک C): مربوط به نمونه برگ گیاه پوک ۶۰ روزه می‌باشد.

گیاهچه‌های توتون در مرحله چهار برگی با ویروس PVY مایه‌کوبی شدند و ۱۰ روز بعد علائم آلودگی ظاهر شد (شکل ۳). برای اثبات آلودگی گیاهچه‌های مایه‌کوبی شده، آزمون الیزا انجام شد و نتایج مثبت بود و گیاهچه‌های آلوده برای ادامه کار انتخاب شدند. پس از اثبات آلودگی گیاهچه‌ها، ریشه‌های گیاهان مورد بررسی جدا و در یک لوله آزمایش که حاوی آب و عصاره علف پوک بود، گذاشته شدند. غلظت عصاره آبی علف پوک که خاصیت گیاه‌سوزی نداشته و با توان کنترل‌کنندگی و کاهش غلظت ویروس همراه بود به میزان ۱cc عصاره آبی علف پوک با غلظت ۱/۴ میلی‌گرم در لیتر به ۱۰۰cc آب تعیین گردید. غلظت مذکور در بین سایر غلظت‌های بررسی شده از عصاره بهترین و بیشترین تأثیر کنترل‌کنندگی را داشت. با آزمون‌های استفاده شده در این تحقیق با اطمینان ۹۹٪ می‌توان بیان داشت که بکارگیری عصاره، بر روی میزان جذب ویروس تفاوت معنی‌داری در کنترل ویروس داشته و با مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ مشخص شد که کمترین میزان جذب با میانگین ۰/۱۱ مربوط به تیمار T4 می‌باشد. با استفاده از آزمون سرولوژیک الیزای مستقیم نشان داده شد که غلظت ویروس تا ۴ روز بعد از تیمار توتون‌های آلوده با عصاره علف پوک، حدود ۵۰٪ در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد و این امر به علت اثر مهارکنندگی PAP در عصاره بود (جدول ۱ و شکل ۳). تیمارهای T0، T، B و BW به‌عنوان شاهد آزمون بوده که T0 دارای بیشترین میزان جذب و بقیه دارای کمترین میزان جذب می‌باشند. هیستوگرام مربوطه نیز در شکل ۲ دیده می‌شود.

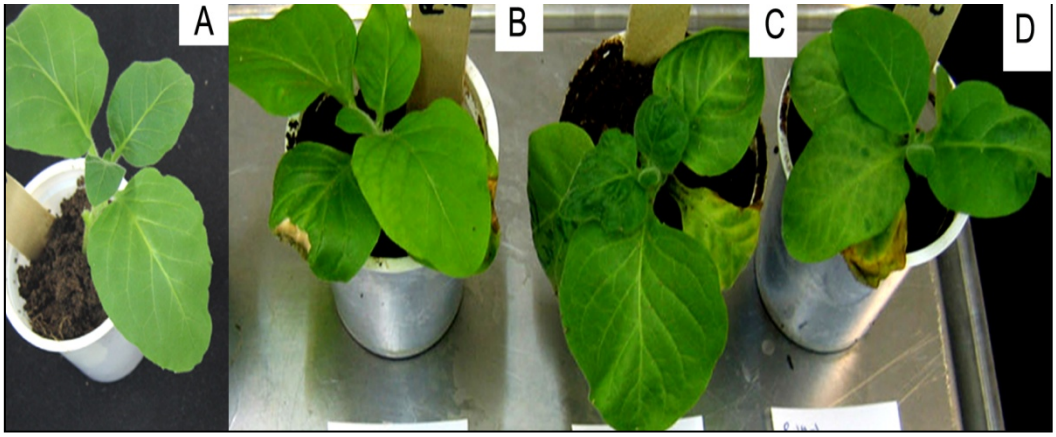
جدول ۱- میانگین جذب چاهک‌های مربوط به تیمارهای مختلف

	تیمار ۱ (T2)	تیمار ۲ (T4)	تیمار ۳ (T7)	تیمار ۴ (T0)	تیمار ۵ (T)	تیمار ۶ (B)	تیمار ۷ (BW)
	۲ روز بعد از تیمار گیاه آلوده به ویروس با عصاره	۴ روز بعد از تیمار گیاه آلوده به ویروس با عصاره	۷ روز بعد از تیمار گیاه آلوده به ویروس با عصاره	گیاه آلوده به ویروس بدون تیمار با عصاره	گیاه سالم که با عصاره تیمار شده	گیاه سالم	آب مقطر
میانگین جذب تکرارها	۰/۱۳۷۱	۰/۱۱۰۰	۰/۱۲۶۷	۰/۲۰۱۲	۰/۰۱۱۳	۰/۰۱۱۶	۰/۰۱۰۷

اعداد داخل جدول بر حسب میانگین میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر در چهار تکرار بوده و تابعی از میزان غلظت ویروس در گیاه است.



شکل ۲- هیستوگرام مربوط به میانگین خوانش جذب ویروس با دستگاه الیزا در تیمارهای مختلف استفاده شده



شکل ۳– اثر عصاره علف پوک در کاهش آلودگی سیستمیک ویروس

A) گیاه توتون سامسون غیر آلوده، تیمار شده با عصاره گیاه پوک، B) گیاه توتون سامسون آلوده به ویروس PVY تیمار شده با عصاره گیاه پوک، ۴ روز پس از تیمار گیاه توتون سامسون آلوده به ویروس، C) PVY گیاه توتون سامسون آلوده به ویروس PVY تیمار شده با آب، D) گیاه توتون سامسون آلوده به ویروس PVY بدون تیمار با عصاره گیاه پوک

بحث

تا قبل از این تحقیق در گیاهان توتون و سیب‌زمینی تراریخت بیان کننده PAP، اثر ضدویروسی این پروتئین را نسبت به آلودگی به چندین ویروس ازجمله TMV، PVX، PVY و PLRV مورد بررسی قرار داده و نشان داده بودند که مقاومت ایجاد شده هم نسبت به ویروس‌هایی است که از طریق مکانیکی منتقل می‌شوند و هم نسبت به ویروس‌هایی است که از طریق شته منتقل می‌شوند (Lodge *et al.*, 1993؛ Choi *et al.*, 1997). اما در این تحقیق اثر عصاره آبی گیاه علف پوک که دارای پروتئین PAP است مورد بررسی قرار گرفت و از گیاه تراریخت و پروتئین نوترکیب خالص شده PAP استفاده نشد. استفاده از عصاره آبی گیاه سرخاب کوهی علاوه‌بر اینکه از لحاظ هزینه بسیار مقرون به صرفه‌تر می‌باشد، بلکه می‌تواند کاربردی‌تر نیز باشد و استفاده از آن به‌مراتب راحت‌تر و آسان‌تر از استخراج PAP به صورت خالص و تولید گیاه تراریخت می‌باشد. همچنین در خیلی از کارهای درمانی و دارویی بر روی انسان و حیوانات از عصاره آبی این گیاه برای درمان استفاده می‌کنند

و خود پروتئین را به صورت خالص مورد استفاده قرار نمی‌دهند (Hernandez-Villegas *et al*., 2011؛ Maness *et al*., 2011). البته استفاده از عصاره آبی گیاه سرخاب کوهی برای کنترل ویروس‌های گیاهی به‌ویژه ویروس وای سیب‌زمینی برای اولین بار در این تحقیق انجام شد.

مبارزه با عوامل ویروسی بیماری‌زا در سیب‌زمینی برای بالا بردن ارزش اقتصادی و نیز ایمن‌سازی تولید همواره از مسائل مهم در بخش تحقیقات گیاهپزشکی بوده است. به دلیل آنکه تاکنون هیچ ترکیب شیمیایی به‌عنوان ویروس‌کش برای کنترل عوامل بیماری‌زای ویروسی در مزرعه وجود نداشته است؛ و استفاده از ترکیب‌های ارگانیک آلی با ویژگی کنترل‌کنندگی علیه ویروس‌ها همواره در زمره برجسته‌ترین تحقیقات در دنیا محسوب می‌شود. با وجود این، در کنار استفاده از ترکیب‌های آلی با خواص بازدارندگی هنوز استفاده از ارقام تراریخت مقاوم به ویروس‌ها در زراعت سیب‌زمینی در اولویت برای روش‌های کنترل قرار دارد و در حال حاضر یکی از مؤثرترین مکانیسم‌های مبارزه با این عوامل ویروسی محسوب می‌شود (Kang *et al*., 2005). حتی با وجود رقم مقاوم به‌دلیل امکان شکست ژنتیکی این امکان وجود دارد تا مقاومت مذکور در رقم مقاوم شکسته شود، از این‌رو با استفاده از سموم ارگانیک و کاهش ماده اولیه آلودگی می‌توان باعث کاهش شکست ژنتیکی و فشار انتخاب حاصل گردید که این امر حداقل می‌تواند موجب بالا بردن میزان دوام مقاومت در مزرعه شود. گیاه پوک به‌دلیل آنکه دارای پروتئینی با ویژگی کنترل‌کنندگی ویروس‌هاست و بخش پروتئین PAP در آن یک ممانعت‌کننده قوی از سنتز پروتئین بوده و متعلق به خانواده پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزوم (RIPs) می‌باشد، از این‌رو در مبارزه با ویروس مورد توجه جهانی قرار گرفته است (Taylor *et al*., 1994؛ Moon *et al*., 1997).

با توجه به این تحقیق و نتایجی که از آن بدست آمد می‌توان گفت که عصاره این گیاه در غلظت‌های زیاد خاصیت گیاه‌سوزی شدیدی داشته و برای استفاده از پروتئین PAP این گیاه به‌عنوان مهارکننده ویروس باید در رقیق‌سازی و کاهش غلظت عصاره دقت لازم را به‌عمل آورد. همچنین از آنجایی که این عصاره باعث ضعیف شدن ویروس و در مقابل آن قوی‌تر شدن گیاه می‌شود، احتمالاً می‌توان گفت که PAP بر روی ژن‌هایی که در مسیرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه فعال هستند تأثیر گذاشته و باعث افزایش بیان آنها می‌شود (Rakhshandehroo *et al*., 2009). یکی از گیاهانی که تحقیقات زیادی بر روی خاصیت ضدمیکروبی آن انجام شده گیاه گزنه دو پایه (*Urtica dioica*) می‌باشد. گزنه ازجمله گیاهان دارویی می‌باشد که دارای خواص درمانی بوده و علاوه‌بر خاصیت ضدباکتریایی (Ibrahim *et al*., 2013) و ضدقارچی آن (Modarresi-Chahardehi *et al*., 2012)، دیده شده که در شرایط مصنوعی موجب مهار تکثیر عوامل ویروسی همانند ایدز و هپاتیت می‌شود (Agbafor & Akubugwo, 2007). اما در تحقیقی که توسط Rakhshandehroo و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد، نشان دادند که عصاره آبی و الکلی ریشه و برگ گزنه در حذف عوامل ویروسی ازجمله *Arabis mosaic virus* و *Prunus necrotic ringspot virus* نقش دارند. این گروه نشان دادند که عصاره آبی و الکلی گزنه می‌تواند در عاری‌سازی قلمه‌های آلوده رز در محیط‌های کشت مصنوعی بکار رود. تحقیقات گذشته نشان داده بود که پلی‌ساکاریدهایی مانند نشاسته و پلی‌پپتیدهایی مانند انواع فاباتین و لکتین‌ها دارای خصوصیات ضدپاتوژنیک به‌خصوص ضدویروسی می‌باشند و چنین ترکیب‌هایی در عصاره آبی برخی از گیاهان دارویی موجود می‌باشد (Cowan, 1999). البته وجود چنین ترکیب‌هایی در عصاره آبی با بررسی‌های اولیه مشخص نمی‌شود و نیازمند تحقیق بیشتری است. نتایج پژوهش‌های گذشته در مورد عصاره آبی گزنه نشان داد که دارای خاصیت ضداکسیداتیو بالا می‌باشد و از اکسیداسیون فسفولیپیدهای غشاهای سلول، اسید چرب لینولئیک و قند داکسی‌ریبوز با دخالت آنزیم‌های اکسیدکننده دارای گروه‌های فعال فلزی جلوگیری می‌کند (Matsingou *et al*., 2001). بنابراین، این احتمال نیز 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 علاوه‌بر مهار آلودگی ویروسی، موجب تقویت توان رشد گیاهان تیمار شده می‌گردد (Rakhshandehroo *et al.*, 2009). البته این احتمال می‌تواند برای گیاه علف پوک نیز مورد توجه قرار گیرد.

از آنجایی که عصاره بدست آمده در این تحقیق به‌طور مؤثری آلودگی ویروسی را مهار نموده است، بنابراین می‌تواند در کنار سایر روشهای درمانی مثل حرارت درمانی و شیمی درمانی در درمان عوامل بیماری‌زای ویروسی گیاهان استفاده شود. با توجه به اینکه در این تحقیق از عصاره آبی گیاه علف پوک استفاده شده و پروتئین PAP به‌طور خالص جداسازی نشد، بنابراین این احتمال وجود دارد که پروتئین‌های دیگری که همراه این پروتئین در عصاره آبی وجود دارند تأثیراتی را روی ویروس و حتی کیفیت مهارکنندگی PAP گذاشته باشند. در گذشته از گیاه تراریخت بیان‌کننده پروتئین PAP و یا پروتئین نوترکیب PAP بیان شده در باکتری برای بررسی اثر کنترل‌کنندگی ویروس‌ها در تولید دارو و در شرایط درون شیشه استفاده شده بود (Irvin *et al.*, 1980؛ Lodge *et al.*, 1993؛ Hudak *et al.*, 2000؛ Mansouri *et al.*, 2012). داروهای تولید شده از این طریق بسیار گران‌قیمت بوده و در ایران موجود نیستند. در این تحقیق برای اولین بار از عصاره آبی گیاه سرخاب برای کنترل ویروس‌های گیاهی استفاده شد که بسیار اقتصادی و کاربردی است. امید است داده‌های این تحقیق بتواند مورد استفاده تولیدکننده‌های گیاهان گلخانه‌ای در جهت کنترل مؤثر ویروس‌های گیاهی در سیستم‌های تولیدی تجاری قرار گیرد. البته در مراحل بعدی این تحقیق که در حال انجام می‌باشد، تولید پروتئین نوترکیب PAP برای تولید ماده مؤثر داروهای کنترل‌کنندگی ویروس انجام خواهد شد.

سپاسگزاری

این پروژه توسط گروه بیماری‌شناسی گیاهی واحد علوم و تحقیقات تهران به‌عنوان پروژه مستقل حمایت شده است. از زحمات مهندس شهاب حاج منصور در این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

- کرمی، م.، شهابی مجد، ن.، سعیدنیا، س. و عمرانی، ن.، ۱۳۸۶. سمّیت کبدی عصاره آبی، متانولی و فراکسیونهای عصاره متانولی گیاه سرخاب به روش پرفیوژن کبدی در موش صحرایی نر. دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۹(۱): ۹-۱.
- Agbafor, K.N. and Akubugwo, E.L., 2007. Hypocholesterolaemic effect of ethanolic extract of fresh leaves of cymbopogon citrates (lemongrass). African Journal of Biotechnology, 6(5): 596-598.
- Chen, Z.C., White, R.F., Antoniw, J.F. and Lin, Q., 1991. Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on the infection of plant viruses. Journal of Plant Pathology, 40(4): 612-620.
- Choi, K.W., Jeon, H.S., Jeong, H.S., Kim, M.K., Lee, K.H., Moon, Y.H. and Na, B.K., 1997. Expression vector for phytolacca antiviral protein and process for preparing transgenic plant transformed therewith. Patenten, US5633155A.
- Clark, M.F. and Adams, A.N., 1977. Characterization of the microplate methods of enzyme linked immunosorbent assay (elisa) for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4): 564-582.
- D'Cruz, O.J., Waurzyniak, B. and Uckun, F.M., 2004. Mucosal toxicity studies of a gel formulation of native pokeweed antiviral protein. Toxicol Pathology, 32(2): 211-212.
- De Bokx, J.A. and Huttinga, H., 1981. Potato virus Y. Descriptions of Plant Viruses, No: 242, http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242.
- Duggar, B.M. and Armstrong, J.K., 1925. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juice of various plants. Annals of the Missouri Botanical Garden, 12: 359-366.
- Duke, J.A., 2001. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press, Boca Raton, 896p.
- Hernandez-Villegas, M.M., Borges-Argaez, R., Rodriguez-Vivas, R.I., Torres-Acosta, J.F., Mendez-Gonzalez, M. and Caceres-Farfan, M., 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus*

exhibits antioxidants activity towards iron-promoted oxidation of phospholipids, linoleic acid and deoxyribose. Free Radical Research, 35(5): 593-605.
- Modarresi-Chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza-Sulaiman, S. and Mousavi, L., 2012. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. Revista de Biologia Tropical, 60(4): 1567-1576.
- Moon, Y.H., Song, S.K., Choi, K.W. and Lee, J.S., 1997. Expression of a cDNA encoding *Phytolacca insularis* antiviral protein confers virus resistance of transgenic potato plants. Journal of Molecules and Cells 7: 807-815.
- Newall, C.A., Anderson, L.A. and Phillipson, J.D., 1996. Herbal Medicine: A Guide for Health-Care Professional. Pharmaceutical Press, London 296p.
- Ormeno, J., Sepulveda, P., Rojas, R. and Araya, J.E., 2006. *Datura* genus weeds as an epidemiological factor of Alfalfa mosaic virus (AMV), Cucumber mosaic virus (CMV), and Potato virus Y (PVY) on solanaceus crops. Agricultura Tecnica (CHILE), 66(4): 333-341.
- Rakhshandehroo, F., Modarresi, A. and Zamani Zadeh, H.R., 2009. Study on the antiviral effect of aquatic and alcoholic extracts of *Urtica dioica* L. on rose mosaic viral disease in vitro culture. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 25(3): 403-413.
- Spetz, C., Taboada, A.M., Drwich, S., Ramsell, J., Salazar, L.F. and Valkonen, J.P.T., 2003. Molecular resolution of a complex of potyviruses infecting solanaceus crops at the centre of origin in Peru. Journal of General Virology, 84: 2565-2578.
- Tomlinson, J.A., Walker, V.M., Flewett, T.H. and Backlay, G.R., 1974. The inhibition of infection by cucumber mosaic virus and influenza virus by extracts from *Phytolacca americana*. Journal of General Virology, 22: 225-232.
- Taylor, S., Massiah, A., Lomonossoff, G., Roberts, L.M., Lord, J.M. and Hartley, M., 1994. Correlation between the activities of five ribosome-inactivating proteins in depurination of tobacco ribo-somes and inhibition of tobacco mosaic virus infection. The Plant Journal, 5(6): 827-835.
- Wyatt, S.D. and Shepherd, R.J., 1969. Isolation and characterization of a virus inhibitor from *Phytolacca americana*. Phytopathology, 59: 1787-1794.

contortus. Veterinary Parasitology, 30(179): 100-106.
- Hudak, K.A., Wang, P. and Tumer, N.E., 2000. A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template. RNA, 6(3): 369-380.
- Ibrahim, D., Chahardehi, A.M. and Sulaiman, S.F., 2013. Effect of botanical extract of *Urtica dioica* on MRSA: structural degeneration study. Journal of Applied Biological Science, 7(3): 39-44.
- Irvin, J.D., 1975. Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. Archives of Biochemistry and Biophysics, 169(2): 522-528.
- Irvin, J.D., Kelly, T. and Robertus, J.D., 1980. Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca americana* which inactivate eukaryotic ribosomes. Archives of Biochemistry and Biophysics, 200: 418-425.
- Kang, B.C., Yeam, I. and Jahn, M., 2005. Genetics of plant virus resistance. Annual Review of Phytopathology, 43: 581-621.
- Karami, M., Saeidnia, S., Shahabi majd, N., Ebrahimzadeh, M.A., Omrani, N. and Salarian, A., 2009. Anti-nociceptive activity of aqueous methanolic extracts of phytolacca americana growing in Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 8(3): 223-226.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Lodge, J.K., Kaniewski, W.K. and Tumer, N.E., 1993. Broad-spactrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90: 7089-7093.
- Maness, L., Goktepe, I., Hardy, B., Yu, J. and Ahmedna, M., 2011. Antiproliferative and apoptotic effects on *Phytolacca americana* extracts and their fractions on breast and colon cancer cells. Research Journal of Medicinal Plant, 6: 17-26.
- Mansouri, S., Kutky, M. and Hudak, K.A., 2012. Pokeweed antiviral protein increases HIV-1 particle infectivity by activating the cellular mitogen activated protein kinase pathway. Plos one, 7(5): e36369.
- Matsingou, T.C., Kapsokefalou, M. and Safiloglou, A., 2001. Aqueous infusions of Mediterranean herbs

Study on the antiviral activity of aqueous pokeweed (*Phytolacca Americana* L.) extracts against *Potato virus Y*

A. Alishiri[1*] and F. Rakhshandehroo[2]

1*- Corresponding author, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, E-mail: alishiria@yahoo.com
2- Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: July 2013 Revised: February 2014 Accepted: February 2014

Abstract

Pokeweed (*Phytolacca Americana* L.) is a plant native to American countries which is widely used across the continent. Despite the probability of having digestive toxicity, this plant has an important role in many therapeutic applications for humans and plants. This plant has a capacity to control some plant and human pathogens due to the presence of ribosome-inactivating proteins (RIPs) in this plant. In this work, the antiviral effect of aqueous pokeweed leaf and stem aqueous extracts against *Potato virus Y*, one of the most important viruses infecting potatoes, was studied in tobacco model plants. The presence of the pokeweed antiviral protein (PAP) in the extract was confirmed by SDS-PAGE analysis. Results of serological assay (DAS-ELISA) showed lower absorbance values for the pokeweed treated samples as compared with non-treated, PVY-infected control plants, indicating lower levels of PVY infections in the treated plants. Results showed that the aqueous extract of pokeweed, at concentration of 0.14 ppm, had an inhibitory effect against PVY infection in tobacco model plants with a maximum controlling effect up to four days post-inoculation.

Keywords: Pokeweed (*Phytolacca americana* L.), aqueous extract, antiviral activity, *Potato virus Y*.