Archive of SID.ir

مقاله تحقیقی

مطالعه تاثیر بازدارندگی عصاره آبی – الکلی و نانوامولسیون اسانس گیاه مرزه خوزستانی در القای لکه موضعی ویروس موزائیک خیار (CMV) روی لوبیا چشم بلبلی

سمیه مصطفایی[۱]، فرشاد رخشنده رو[۲]، حسن رضادوست[۳]، محسن فرزانه[۴]

۱ و ۲- دانشجوی دوره دکتری، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استادیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران.

۴- دانشیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران.

مسئول مکاتبات: فرشاد رخشنده رو، ایمیل: Rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۶ ۹(۱) ۱۳–۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵

چکیده

ویروس‌های گیاهی از عوامل محدودکننده در کشاورزی به‌شمار می‌روند. برای کنترل ویروس‌ها ترکیبات طبیعی و به ویژه متابولیت‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. در این راستا، اثر عصاره آبی– اتانولی (۵۰ درصد آب) و نانوامولسیون اسانس اندام هوایی گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) در چهار غلظت ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ درصد (گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) و طی سه زمان مختلف شامل همزمان و دو ساعت قبل و بعد از مایه زنی برگ بوته‌های گیاه با آموده ویروس (غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر)، جهت کاهش آلودگی ویروس موزاییک خیار در شرایط گلخانه روی میزبان لکه موضعی لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) مورد بررسی قرار گرفت. کمترین تعداد لکه‌ها با کاربرد عصاره آبی– اتانولی با غلظت‌های ۲ و ۴ درصد (۷۸ –۶۶٪ کاهش بیماری) و کاربرد نانوامولسیون اسانس با غلظت ۲ درصد (۵۹٪ کاهش بیماری) و دو ساعت بعد از مایه‌زنی با آموده ویروس حاصل شد. اندازه ذره‌ای نانوامولسیون اسانس پس از ساخت برابر با ۱۱۹/۴ نانومتر بود که پس از ۶۰ روز نگهداری به ۲۳۲/۸ نانومتر رسید که نشان از پایداری فیزیکی مناسب نانوامولسیون می‌باشد. براساس آنالیز کروماتوگرافی گازی همراه با طیف سنجی جرمی (GC–MS)، ترکیبات اصلی اسانس شامل کارواکرول (۹۱/۵ ٪)، پارا–سیمن (۱/۵ درصد)، بتا–کاریوفیلن (۱/۱درصد) و بتا–پینن (۱/۱ درصد) بود. ناموامولسیون کردن اسانس باعث بهبود کارایی آن در مهار ویروس موزاییک خیار روی میزبان لوبیا چشم بلبلی شد. این تحقیق اولین گزارش از اثر ضد ویروسی ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه مرزه خوزستانی در مهار یک ویروس گیاهی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مرزه خوزستانی، عصاره، نانوامولسیون اسانس، مهار ویروس

مقدمه

ویروس‌های گیاهی همواره از جمله عوامل تهدیدکننده تولید محصولات مختلف کشاورزی در سرتاسر جهان محسوب می‌شوند. در میان ویروس‌های گیاهی، ویروس موزاییک خیار (CMV) دارای وسیع‌ترین دامنه‌ی میزبانی شامل بیش از ۱۲۰۰ گونه در بیش از ۱۰۰ خانواده از دو لپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌ها است (Agrios, 2005; Zittre & Gonsalves, 1991) و به لحاظ علایم، طیفی از موزاییک، زردی، کوتولگی و کاهش کمی و کیفی باردهی را در میزبان‌های گیاهی مختلف باعث می‌شود (Zittre & Gonsalves, 1991). این ویروس عموما بصورت سیستمیک در بافت‌های آلوده‌ی گیاهان منتشر می‌شود. تنها اقدامات

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

پیشگیرانه و کارامد مدیریتی برای کاهش CMV شامل استفاده از بذور گواهی شدهٔ عاری از ویروس، حذف مکانیکی و شیمیایی پوشش‌های گیاهی (علف‌های هرز) منبع ویروس و همچنین کنترل شیمیایی حشرات ناقل ویروس می‌باشد. اما با توجه به اثرات مخرب سموم شیمیایی بر محیط‌زیست و سلامت انسان، تلاش‌های بسیاری جهت جایگزین‌کردن آن‌ها از طریق ایجاد ارقام مقاوم و استفاده از ترکیبات ضد ویروسی گیاهی و میکروبی مفید در حال انجام است (Agrios, 2005). درمیان ترکیبات طبیعی، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از پتانسیل قابل توجهی برخوردار هستند. اغلب تحقیقات گیاه‌پزشکی مرتبط با اسانس‌ها و عصاره گیاهان دارویی بر روی حشرات، قارچ‌ها و باکتری‌ها متمرکز می‌باشد و در مورد کاربرد این ترکیبات گیاهی در مدیریت ویروس‌ها، تحقیقات معدودی انجام شده است. طی سال‌های اخیر تحقیقاتی در مورد تاثیر مثبت عصاره‌های برخی گیاهان داروئی شامل بید، مریم گلی و سرخاب کوهی ایران بر آلودگی ویروس موزاییک خیار (CMV)، ویروس موزاییک توتون و یا ویروس وای سیب‌زمینی انجام شده است (Alishiri & Rakhshandehroo, 2015; Ghasemi & Tabein, 2013). همچنین ارزیابی مولکولی و بیوشیمیایی اثر عصاره‌های خام زیتون تلخ، انجیر و گزنه دوپایه کوهی ایران در کنترل ویروس CMV و سازوکار احتمالی دخیل در مقاومت القاء شده در گیاه خیارصورت پذیرفته است (Rakhshandehroo *et al*., 2009). به هر حال تحقیق اندکی در خصوص کارائی و مکانیسم عمل اسانس و عصاره‌های گیاهی در کنترل عوامل ویروسی بیماریزای گیاهی انجام پذیرفته است. با توجه به موارد فوق و مشکلات موجود در زمینه کنترل بیماری‌های ویروسی، استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی به عنوان روشی امیدبخش و دوستدار طبیعت مطرح می‌گردد.

جنس *satureja* با نام فارسی مرزه متعلق به خانواده نعنا، بالغ بر ۳۰ گونه را شامل می‌شود (Omid baigi, 2005). بررسی‌های انجام شده بر روی اثر ضد ویروسی اسانس و ترکیبات ضد فنلی گیاه دارویی مرزه (*Satureja montana* L.SPP. *variegate*) به عنوان یکی از اعضای این خانواده نشان داد اسانس این گیاه اثر قابل توجهی در کنترل دو ویروس موزائیک توتون و موزائیک خیار دارد (Valerija Dunkie *et al*., 2010).

مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad.) که در گویش لُری به آن تختشونی می‌گویند، گیاهی بومی ایران است و انحصاراً در ایران (استان‌های لرستان، خوزستان و ایلام) رویش دارد. کرک‌های موجود درروی برگ‌ها، محل تجمع و بیوسنتز ترکیبات مؤثره این گیاه هستند و مونوترپن ها تقریباً ۹۸ درصد کل اسانس مرزه خوزستانی را تشکیل می دهند (Hadian *et al*., 2011). میزان بالای مونوترپن کارواکرول در اسانس این گیاه سبب افزایش ارزش اقتصادی و دارویی این گیاه شده است، به‌طوری‌که تحقیقات داروشناسی و پزشکی زیادی روی اثرات ضدویروسی، ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی دیابتیک برخی اجزای سازنده اسانس این‌گونه صورت گرفته و نتایج بسیار ارزشمندی از خواص داروشناسی این گیاه به ثبت رسیده است (Dosti *et al*., 2005; Salahvarzi *et al*., 2005; Dadkhah *et al*., 2003; Abbaszadeh *et al*., 2005). با وجود اینکه تحقیقات موجود در مورد خاصیت ضد میکروبی گیاه مرزه تنها معطوف به استفاده از ترکیبات اسانس این گیاه می‌باشد، لیکن محدودیت استفاده از اسانس‌ها به دلیل ناپایداری‌های فیزیکی و شیمیایی و خواص ارگانولپتیک آن‌ها، لزوم فرمولاسیون اسانس را برای کاربردهای بیولوژیکی ایجاب می‌کند (Hyldgaard *et al*., 2012; Moghimi *et al*., 2016). اسانس‌ها علاوه بر اینکه ترکیباتی با فراریت بالا می‌باشند، می‌توانند به آسانی با قرار گرفتن در معرض نور خورشید، رطوبت، دماهای بالا یا اکسیژن هوا تجزیه شوند (Sugumar *et al*., 2013). بنابراین در این تحقیق سعی شده است ضمن پایدار کردن فیزیکی و شیمیایی اسانس از طریق نانوامولسیون کردن، جزییات تاثیر عصاره و نانوامولسیون اسانس مرزه خوزستانی در مهار ویروس موزاییک خیار روی میزبان لوبیا چشم بلبلی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

خالص‌سازی و تکثیرویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

جهت تهیه سوسپانسیون ویروس موزائیک خیار، جدایه‌هایی از ویروس موزاییک خیار که در کلکسیون ویروس‌های گیاهی بخش بیماری شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات نگهداری می‌شود، استفاده شد. جهت خالص سازی بیولوژیکی، جدایه‌ها روی گیاه میزبان تک لکه لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) در مرحلهٔ کوتیلدون و پس– کوتیلدونی (دوبرگی) به روش مکانیکی با استفاده از بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۷ به نسبت ۱۰ : ۱ طی عصاره‌گیری روی یخ، مایه‌زنی با پودر کاربوراندوم ۶۰۰ مش انجام گردید. طی ۴ الی ۷ روز پس از ظهور لکه‌های موضعی نکروزه در گیاه لوبیا چشم بلبلی، تک لکه‌ها بصورت مستقل و جداگانه جهت تکثیر ویروس و بررسی علایم مربوط به جدایه‌ها و تعیین صحت و خلوص جدایه ویروسی، روی گیاه میزبان تکثیری توتون *Nicotiana tabacum* cv. *samsun* در مرحله ۲ الی ۴ برگی مایه‌زنی گردید و در شرایط مناسب در گلخانه (دمای روز ۲۷ درجه و شب ۱۹ درجه سلسیوس، رطوبت بین ۳۰ تا ۴۵ درصد و ۱۴ ساعت طول روشنایی روز) نگهداری شدند. بعد از ظهور علایم در نمونه‌های توتون مایه زنی شده، با آزمون DAS–ELISA و با استفاده از آنتی‌بادی‌های تک‌همسانه‌ای اختصاصی ویروس موزاییک خیار (تهیه شده از DSMZ آلمان) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد گیاهی و مشخصات اقلیمی رویشگاه

اندام هوایی گیاه مرزه خوزستانی در مرحله گلدهی کامل در شهریورماه ۱۳۹۸ از رویشگاه منطقه نصریان ایلام (با ۳۶۰ متر ارتفاع از سطح دریا، عرض جغرافیایی "32°.52′.53 و طول جغرافیایی "48°.15′.707) جمع‌آوری گردید و به پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی انتقال یافت. از نظر ریخت‌شناسی نیز به تایید هرباریوم پژوهشکده رسید. اندام هوایی در دمای اتاق و شرایط سایه خشک شد.

استخراج عصاره گیاهی

جهت تهیه عصاره آبی – الکلی ، ۳۰ گرم از نمونه خشک شده مرزه را به کمک آسیاب پودر کرده و در ۳۰۰ میلی‌لیتر حلال آب –اتانول (۵۰ : ۵۰) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر انکوباتور قرار داده شد. عصاره از فیلترهای کاغذی ۰/۴۵ میکرون به کمک پمپ خلأ عبور داده شد و اتانول باقی‌مانده در عصاره توسط دستگاه تبخیری روتاری در دمای ۴۵ درجه سلسیوس جداسازی شد. در نهایت آب باقیمانده با دستگاه فریز دراير گرفته شده و ماده خشک حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. گیاهان مرزه خوزستانی جمع آوری شده قبل از عصاره گیری توسط ELISA برای تایید عدم آلودگی به CMV مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج اسانس و تهیه نانوامولسیون

استخراج اسانس با روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجرانجام شد. برای اسانس‌گیری تقریبا ۵۰ گرم پودر گیاه مرزه را در بالن ته‌گرد کلونجر ریخته و دو برابر حجم آن آب افزوده و به مدت سه ساعت اسانس گیری انجام شد. اسانس جمع‌آوری‌شده ابتدا به استفاده از سولفات سدیم بدون آب، آبگیری شد و سپس در شیشه‌هایی تیره درون فریزر منفی ۲۰ تا زمان آنالیز نگهداری شد.

فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس مرزه خوزستانی با همکاری آزمایشگاه طراحی فرآیندهای دارویی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی آماده شد. امولسیون حاوی ۵ درصد اسانس، با اضافه نمودن پلی وینیل الکل (Polyvinyl alcohol)، توین ۸۰ و لسیتین به اسانس در دستگاه مخلوط‌کن معمولی و همزدن به مدت ۱۵ دقیقه ساخته شد. جهت ساخت نانو امولسیون، محصول حاصل درون دستگاه پروب شرکت امواج فراصوت، با ژنراتور مدل MTI سوئیس، ۴۰۰ وات، ۲۲۰ ولت، فرکانس ۲۰/۵ کیلوهرتز، دامنهٔ ۳۰ درصد و قطر پروب ۱۹ سانتی‌متر قرار گرفت

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

(Moghimi *et al.*, 2016). در انتها ظروف حاوی امولسیون و نانوامولسیون به خوبی پوشانده شده و در دمای یخچال و دور از نور نگهداری شدند. اندازه ذره‌ای نانوامولسیون تهیه شده به‌وسیله دستگاه DLS; (Dynamic Light Scattering)تعیین شد. همچنین محدوده توزیع ذرات به کمک دستگاه بدست آمد(Moghimi *et al.*, 2016).

آنالیز و شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس

شناسایی و میزان ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی (GC) و دستگاه گازکروماتوگرافی همراه با طیف سنجی جرمی (GC–MS) مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا اسانس استخراج شده از هر سه تکرار مخلوط شد و یک میکرولیتر از آن به دستگاه GC تزریق شد و پس از یافتن برنامه‌ریزی مناسب حرارتی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس و تعیین درصد و زمان بازداری هر ترکیب، از هر گونه گیاهی یک میکرولیتر اسانس به دستگاه GC–MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها تعیین گردید. شناسایی ترکیب‌ها بر اساس شاخص بازداری و مقایسه طیف جرمی آن‌ها با ترکیب‌های پیشنهادی کتابخانه دستگاه انجام گرفت. درصد هر ترکیب با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC با روش نرمال کردن سطح منحنی و بدون محاسبه عامل تصحیح صورت گرفت (Adams, 2007).

بررسی اثر بازدارندگی اسانس و عصاره آبی–الکلی گیاه مرزه روی CMV در میزبان لوبیا چشم بلبلی

کاهش لکه موضعی روی میزبان لکه موضعی: گیاه لوبیا چشم بلبلی (*V. unguiculata*) به‌عنوان میزبان محک لکه موضعی CMV در شرایط گلخانه کشت شد و غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ درصد عصاره و اسانس (در قالب امولسیون و نانو امولسیون) مرزه خوزستانی در سه بازه زمانی شامل اعمال عصاره/اسانس دو ساعت قبل از مایه زنی آموده ویروس، دو ساعت بعد از مایه زنی آموده ویروس و در نهایت اعمال عصاره / اسانس همزمان با مایه‌زنی ویروس (Rasoulpour *et al.*, 2018) برروی برگ‌های کوتیلدونی گیاهچه لوبیا چشم بلبلی تیمار گردید. از آموده ویروس خالص شده رقت ۲mg\ml تهیه شده و در حجم برابر با غلظت عصاره/اسانس در هر تکرار مورد استفاده قرار گرفت. برای هر تیمار ۸ گلدان مورد استفاده قرار گرفت و تعداد لکه های موضعی بعد از ۳ تا ۴ روز بررسی گردید . مخلوط بافر فسفات و ویروس گیاهی به عنوان شاهد به گیاه مایه زنی شدند.

میزان قابلیت اسانس و عصاره گیاه مرزه در حفاظت گیاه در برابر ویروس CMV تخمین زده شد و نرخ بازدارندگی اسانس و عصاره از طریق فرمول زیر محاسبه گردید (Verma *et al.*, 1996)

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(C–T) / C] * 100$$

که C میانگین تعداد لکه‌های موضعی در میزبان لوبیا چشم بلبلی در نمونه‌های شاهد و T میانگین تعداد لکه‌های موضعی در نمونه‌های تیمار شده می باشد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با هشت تکرار انجام شد. برای تجزیه داده‌ها از دو نرم افزار SAS 9.1 و Excel 2013 به تفکیک کارهای مورد نیاز بهره برده شد. برای تجزیه واریانس از نرم افزار SAS و به روش GLM استفاده شد. پس از تجزیه واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مقایسه گردید.

نتایج

ترکیب‌های اصلی در اسانس گونه مرزه خوزستانی شامل کارواکرول (۹۱/۵٪)، پارا–سیمن (۱/۵ درصد)، بتا–کاریوفیلن (۱/۱درصد) و بتا–پینن (۱/۱ درصد) می‌باشد (جدول ۱).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول ۱– نوع و درصد ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس مرزه (*Satureja khuzistanica*)

Table 1. – Constituents of chemical composition of *Satureja khuzistanica* essential oil

	Compounds	RI*	Concentrations (%)
1	α–thujene	925	0.2
2	α–pinene	933	0.6
3	β–pinene	974	1.1
4	myrcene	981	0.2
5	α–terpinene	1010	0.1
6	p–cymene	1014	1.5
7	trans– β–ocimene	1033	0.4
8	γ –terpinene	1051	0.1
9	cis–sabinene hydrate	1058	0.4
10	trans–sabinene hydrate	1079	0.2
11	terpin–4–ol	1160	0.1
12	α–terpineol	1173	0.1
13	carvacrol	1282	91.5
14	β–caryophyllene	1411	1.1
15	α–humulene	1424	0.5
16	β–bisabolene	1500	0.5
17	Spathulenol	1576	0.1
	Total	–	98.7

*RI, retention indices relative to C_6 – C_{24} *n*–alkanes on the DB–1 column

اندازه ذره‌ای نانوامولسیون پس از ساخت برابر با ۱۱۹/۴ نانومتر بود که پس از ۶۰ روز نگهداری به ۲۳۲/۸ نانومتر رسید (شکل ۱ و ۲) که نشان از پایداری فیزیکی نسبتا مناسب نانوامولسیون در طی ۶۰ روز می‌باشد. اندازه ذره‌ای نانوامولسیون معیاری برای میزان پایداری آن است، هرچه اندازه ذره‌ای بزرگ‌تر و محدوده توزیع اندازه ذره‌ای حاصل بیشتر باشد نانوامولسیون ناپایدارتر است، چون ذرات بزرگ‌تر بیشتر به هم پیوسته و تجمع پیدا می‌کنند و باعث ناپایداری نانوامولسیون می‌شوند.

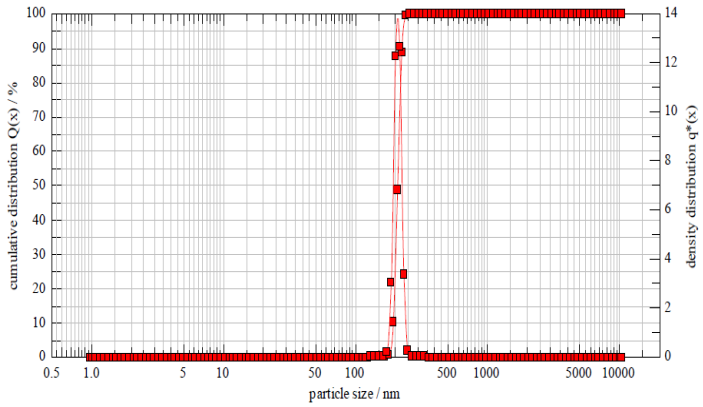
تاثیر بازدارندگی عصاره و نانوامولسیون اسانس مرزه خوزستانی روی CMV در میزبان لوبیا چشم بلبلی

کاربرد اسانس و عصاره مرزه خوزستانی تاثیر معنی‌داری (p <۰/۰۵) در مهار CMV از لحاظ تعداد لکه‌های موضعی ایجاد شده روی برگهای کوتیلدونی لوبیا چشم‌بلبلی نشان داد (شکل ۳ و ۴). همچنین کارایی کاربرد اسانس و عصاره دو ساعت پس از مایه زنی با آموده ویروس، در مقایسه با کاربرد همزمان و یا دو ساعت قبل از مایه زنی با ویروس، در کاهش علایم ناشی از ویروس موثرتر (p<۰/۰۵) بود. با افزایش غلظت کاربرد عصاره گیاه، تاثیر آن در مهار ویروس CMV افزایش معنی‌داری (p <۰/۰۵) یافت به طوری‌که در غلظت ۲ و ۴ در صد، دو ساعت بعد از مایه‌زنی آموده ویروس، بیشترین کاهش در تعداد لکه‌های ناشی از CMV روی برگ لوبیا را منجر شد و در مقایسه با شاهد آلوده، به ترتیب به میزان ۶۶/۹٪ و ۷۸/۲۳٪ کاهش معنی‌دار (p <۰/۰۵) در تعداد لکه ها مشاهده شد. با افزایش

Archive of SID.ir

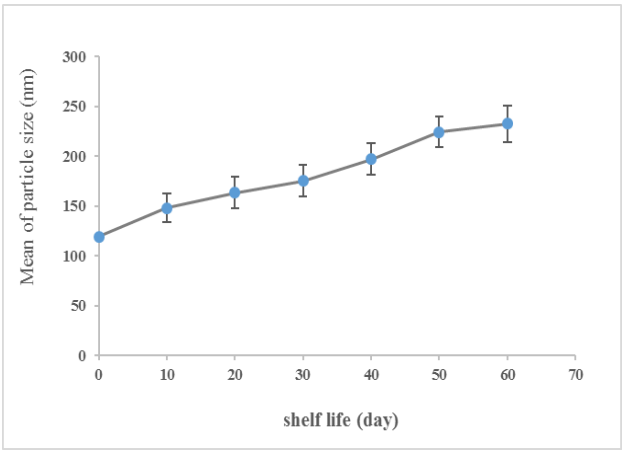
Archive of SID.ir

غلظت کاربرد امولسیون اسانس از ۰/۵ به ۱ درصد، تاثیر ضد ویروسی آن در مهار CMV افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) یافت اما با افزایش غلظت به ۲ در صد، اُفت شدیدی در کاهش تاثیر ضد ویروسی آن روی لوبیا مشاهده شد بطوریکه در غلظت ۴ درصد عملا تاثیر معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در کاهش علایم CMV نداشت. در مورد تیمار با نانوامولسیون اسانس، افزایش غلظت کاربردی تا ۲ در صد باعث کاهش ۵۹/۳٪ علایم ناشی از ویروس CMV روی لوبیا شد اما با افزایش غلظت به ۴ درصد، اَفت شدیدی در کارایی تاثیر آن مشاهده شد به‌طوری‌که تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ با شاهد آلوده نشان نداد و عملا بی‌تاثیر بود (شکل ۴).



شکل ۱– توزیع اندازه ذره‌ای نانوامولسیون اسانس مرزه خوزستانی پس از یک روز انبارمانی در دمای ۱۸ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی

Fig 1. Distribution of particle size of nano–emulsified essential oil of *Satureja khuzistanica* after 1 day storage at 18 ° C in darkness (b)



شکل ۲– پایش پایداری فیزیکی نانوامولسیون اسانس مرزه خوزستانی در طی ۶۰ روز نگهداری در دمای ۱۸ درجه سلسیوس و تاریکی

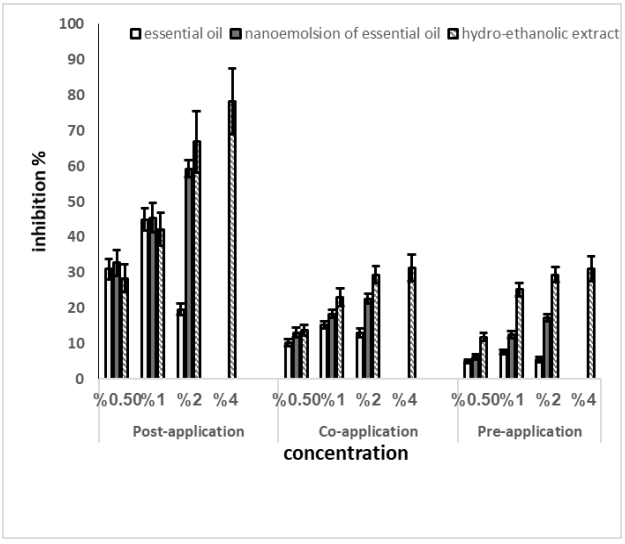
Fig 2. Monitoring the physical stability of savory essential oil nanoemulsion during 60 days of storage at 18 ° C and darkness

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

شکل ۳– آلودگی ناشی از ویروس CMV روی میزبان لکه موضعی *Vigna unguiculata* را نشان می‌دهد. A، بدون تیمار با نانوامولسیون اسانس و عصاره مرزه خوزستانی؛ B، تیمار با عصاره مرزه خوزستانی دو ساعت پس از مایه‌زنی با ویروس؛ C، تیمار با نانوامولسیون اسانس مرزه خوزستانی دو ساعت پس از مایه‌زنی با ویروس

Figure 3. The CMV infection symptoms on the localized spot of *Vigna unguiculata*. A, without treatment with nanoemulsion of savory essential oil and extract; B, treatment with savory extract two hours after CMV inoculation; C, treatment with nanoemulsion of savory essential oil two hours after CMV inoculation



شکل ۴– بررسی تاثیر بازدارندگی غلظت‌های مختلف و زمان کاربرد امولسیون و نانوامولسیون اسانس و عصاره هیدروالکلی مرزه خوزستانی روی ویروس موزاییک خیار (CMV) در لوبیا چشم بلبلی پس از چهارده روز نگهداری در گلخانه (p <۰/۰۵)

Fig 4. Evaluation of the inhibitory effect of different concentrations and application time of emulsion and nanoemulsion of essential oil and hydroalcoholic extract of savory on *cucumber mosaic virus* (CMV) on cowpea after fourteen days in greenhouse (p–value < 0.05).

بحث

تحقیقات انجام‌شده درایران و سایر کشورهای جهان در زمینه فعالیت ضد ویروسی اسانس و عصاره گیاهان دارویی بیشتر معطوف به ویروس‌های انسانی بوده است. در زمینه عوامل بیماریزای گیاهی نیز بیشتر تحقیقات در زمینه اثرات کنترل‌کنندگی اسانس‌ها و عصاره گیاهان دارویی بر روی قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌باشد و این در حالیست که جز مواردی انگشت شمار، مطالعات قابل توجهی در خصوص درجه تاثیر و مکانیسم ضد ویروسی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در زمینه کنترل ویروس‌های گیاهی انجام نشده است.

گیاهان خانواده Lamiaceae یکی از مهمترین منابع موجود برای استخراج ترکیبات طبیعی فعال می‌باشند. بررسی‌های انجام شده بر روی اثر ضد ویروسی اسانس و ترکیبات فنلی گیاه دارویی مرزه (*Satureja montana* L.SPP.Variegate) به‌عنوان یکی از اعضای این خانواده علیه دو ویروس مهم CMV وTMV نشان داد که هنگام

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

استفاده از اسانس این گیاه ، تعداد لکه های موضعی حاصل از تلقیح دو ویروس فوق بر روی گیاه محک *Chenopodium amaranticolor* کاهش پیدا کرد و ترکیبات تیمول کارواکرول موجود در اسانس، در کنترل ویروس موثر بودند (Valerija Dunkie *et al.*, 2010). عصاره خام و اسانس گیاه *Plectranthus tenuiflorus* متعلق به خانواده نعنائیان دارای اثر کنترل کنندگی علیه ویروس *Tobacco necrosis virus*، *Tobacco mosaic virus*، *Tomato spotted wilt virus* می‌باشد (Othman *et al.*, 2004).

در مطالعه حاضر استفاده از عصاره و نانومولسیون اسانس گیاه مرزه خوزستانی متعلق به تیره نعنائیان در چهار غلظت و سه تیمار زمانی دو ساعت قبل، همزمان و دو ساعت بعد از مایه‌زنی با ویروس موزائیک خیار CMV مورد بررسی قرار گرفت که نشان از تاثیر قابل قبول عصاره و نانومولسیون اسانس مرزه خوزستانی در زمانی است که دو ساعت پس از مایه‌زنی با ویروس به کار برده شود. در این تحقیق علاوه بر اسانس، عصاره گیاه مرزه خوزستانی به عنوان ترکیب ضد ویروسی معرفی شد و مواد غالب تشکیل دهنده عصاره و اسانس به عنوان ترکیبات موثر جهت کنترل ویروس شناخته شدند.

در این تحقیق کارواکرول با ۹۱/۵ درصد به‌عنوان ترکیب غالب اسانس مرزه خوزستانی معرفی شد. مشابه آن بررسی (Sefikan *et al.*, 2007) مشخص کرده بود که کارواکرول ترکیب اصلی اسانس مرزه خوزستانی در مراحل قبل از گلدهی و گلدهی کامل است و مقدار آن در مرحله قبل از گل‌دهی (۸۹٪) تقریباً برابر با مرحله گلدهی کامل (۹۱٪) است.

کارواکرول مهمترین ترکیب فعال بیولوژیکی موجود در اسانس مرزه می‌باشد. اسانس‌های محتوی کارواکرول دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قابل توجه می‌باشند. همچنین کارواکرول بازدارنده بیوسنتز پروستاگلاندین است که این بازدارندگی مکانیزم مهمی در تسکین درد و فرایندهای ضد التهابی است (Wagner *et al.*, 1986).

فعالیت‌های بیولوژیکی دیگری از جمله آثار ضد اسپاسم، بازدارندگی "استیل‌کولین‌استراز"، "لیپیدپراکسیداز"، فرونشاننده رادیکال‌های آزاد، محرک ماکروفاژی گلبول‌های سفیدخون در مورد کارواکرول گزارش شده است (Kirimer *et al.*, 1995).

علاوه بر ترکیب‌های موجود در اسانس، ترکیب‌های فعال بیولوژیک در عصاره های مختلف مرزه شناسایی شده‌اند. مهمترین این ترکیب‌ها اسیدهای فنلی آزاد چون مشتقات اسید کافئیک از جمله اسید رزمارینیک می‌باشند. برخی ترکیبات فلاونوئیدی از جمله آپیژنین، لوتئولین، سیناروزید و غیره نیز در غلظت خیلی کم در عصاره‌های این گیاه شناسایی شده است (Kemertelidze *et al.*, 2004). اسید رزمارینیک، از فراوانترین دیمرهای اسید کافئیک است که عامل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی محسوب می‌شود. در واقع اسید رزمارینیک، استراسید کافئیک و ۴,۳–دی هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید می‌باشد. تعدادی از مشتقات این اسید در گیاهان شناسائی شده است که متشکل از ۱ یا ۲ اسید رزمارینیک همراه با دیگر گروه‌های آروماتیک می‌باشند. در گیاهان، اسید رزمارینیک می‌تواند به‌عنوان یک عامل دفاعی در برابر عوامل بیماریزا و جانوران گیاهخوار عمل کند. این ترکیب در سیستم‌های زنده فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی همچون آنتی‌اکسیدان، آنتی‌موتاژن، آنتی‌باکتری و آنتی‌ویروسی و ضدالتهاب و ضدحساسیت را ایفا می‌کند. همچنین در برابر سرطان نقش حفاظتی دارد (Petersen & Simmonds, 2003).

در تحقیق حاضر تاثیر ضد ویروسی نانومولسیون اسانس قوی‌تر از امولسیون اسانس بود. از طرفی خاصیت گیاه سوزی نانومولسیون اسانس ضعیفتر از امولسیون اسانس بود. مزیت اصلی نانومولسیون‌ها بر امولسیون‌های معمولی پایداری بیشتر، فراهمی‌زیستی بالا و کدورت کم آن‌ها است که این موارد باعث شده است که برای استفاده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی– بهداشتی حائز اهمیت باشند. نانومولسیون‌ها به‌عنوان سیستم‌های انتقال مواد چربی‌دوست در صنایع داروسازی، به‌عنوان طعم‌دهنده و مواد آنتی‌باکتریال در صنایع غذایی ، حل کردن آفت‌کش‌های

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

نامحلول در آب در صنایع کشاورزی و به‌عنوان حامل‌های مراقبت از پوست و محصولات شخصی در صنایع آرایشی بهداشتی به‌کار می‌روند (Ghosh *et al*., 2013) این ذرات به صورت گزینشی بدون اینکه اثری روی سلول‌های یوکاریوت موجود در بافت بگذارند با دیواره سلولی باکتری‌ها یا پوشش ویروس‌ها آمیخته می‌شوند و تخریب پاتوژن‌ها را آغاز می‌کنند. از طرف دیگر این مکانیسم غیر تخصصی سبب ایجاد مقاومت در سویه‌ها نیز نمی‌شود (Manoharan *et al*., 2012). با این وجود، بر خلاف میکروامولسیون‌ها، نانوامولسیون‌ها برای ساخته شدن نیاز به صرف انرژی دارند. در واقع این انرژی ای که به سیستم داده می‌شود برای غلبه بر انرژی آزاد سطحی است که برای افزایش سطح مشترک دو فاز و در نتیجه پخش شدن یکی از آن‌ها در دیگری احتیاج است (Delmas *et al*., 2011).

در این مطالعه پایداری و توزیع اندازه ذره‌ای نانوامولسیون اسانس در طی مدت بررسی شش ماهه تقریبا ثابت ماند. وقتی که نانوامولسیون‌ها تشکیل می‌شوند، ممکن است پایداری شان بسته به نوع فرمولاسیون و پارامترهای دیگر موجود در فرایند، از چند ساعت تا چند سال متغیر باشد. در واقع چندین پدیده ناپایداری می‌تواند اتفاق بیفتد که بعضی برگشت‌پذیر و ناشی از به هم چسبیدن ذرات اند ولی بعضی دیگر برگشت‌ناپذیر و ناشی از تغییر سایز ذره‌ای هستند (Delmas *et al*., 2011).

در پایان این مطالعه اولین گزارش از اثر ضد ویروسی ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه مرزه خوزستانی علیه ویروس موزاییک خیار می‌باشد که به احتمال زیاد کارواکرول و ترکیبات فنولی از قبیل سالیسیلیک اسید نقش اصلی را بر عهده دارند. همچنین بهبود پایداری و خاصیت ضدویروسی اسانس آن به کمک نانوامولسیون امکانپذیر است.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و در همکاری با پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است که بدینوسیله نگارندگان مراتب قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

References

Abbaszadeh, M. 2005. Determining the effect of weight loss diet alone and with Satorex on weight control. Thesis of General Medicine, Lorestan University of Medical Sciences.

Adam, R. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Illinois: Allure Publishing Corporation.

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, London.

Ahmadi, Sh., Sefikan, F., Babakhanlo, P., Asgari, F., Khademi, K., Valizadeh, N. & Karimifar, M.A. 2009. Comparison of compounds in (*Satureja bachtiarica* Bunge) essential oil in the pre–flowering and full flowering stages in the habitat and field. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 25: 169–159.

Alishiri, A. & Rakhshandehroo, F. 2015. Study on the antiviral activity of aqueous pokeweed (*Phytolacca americana* L.) extracts against Potato virus Y. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 31: 479–488.

Dadkhah, F. 2003. Anti–inflammatory and analgesic effects of Khuzestani savory. PhD Thesis in General Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences.

Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A.C., Vinet, F., Poulin, P., Cates, M.E. & Bibette, J. 2011. *How to prepare and stabilize very small nanoemulsions.* Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 27: 1683–1692.

Dosti, B. 2005. Investigation of structure, metastructure and tuberous growth of *Khuzestani safflower* and analysis of essential oil compounds during vegetative and reproductive stages of the plant and its antimicrobial properties. PhD Thesis in Biology, Tehran Research Sciences Branch, Islamic Azad University of Tehran.

Dunkie, V., Bazic, N., Vuko, E. & Cukrov, D. 2010. Antiphytoviral Activity of *Satureja montana* L.ssp.*variegata* (Host)P.W. Ball Essentional Oil and Phenol Compounds on CMV and TMV. Molecules, 15: 6713–6721.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Farsam, H., Manlou, M., Radpour, M.R., Salehinia, A.N. & Shafiee, A. 2004. Composition of the essential oils of wild and cultivated Satureja khuzistanica Jamzad from Iran. Flavour and Fragrance Journal, 19: 308–310.

Ghasemi, S. & Tabein, S. 2013. Evaluation of antiviral effects of plant extracts against Tobacco mosaic virus. Plant Protection Journal (Islamic Azad University, Shiraz Branch), 6: 353–363.

Ghosh, V., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N. 2013. Ultrasonic emulsification of food–grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. Ultrasonics Sonochemistry, 20: 338–344.

Hadian, J., Mirjalili, M.H., Kanani, M.R., Salehnia, A. & Ganjipoor, P. 2011. Phytochemical and morphological characterization of Satureja khuzistanica Jamzad populations from Iran. Chemistry & Biodiversity, 8: 1–15.

Hyldgaard, M., Mygind, T. & Meyer, R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Frontiers in Microbiology, 3(25): 12.

Kemertelidze, É.P., Sagareishvili, T.G., Syrov, V.N. & Khushbaktova, Z.A. 2004. Chemical composition and pharmacological activity of garden savory (Satureja hortensis L.) occuring in Georgia. Pharmaceutical Chemistry Journal, 38: 319–322.

Kirimer, N., Baer, K.H.C. & Tiimen, G. 1995. Carvacrol rich plant in Turkey. Chemistry of Natural Compounds, 31: 37–41.

Manoharan, M.J., Bradeeba, K., Rengasamy, P., Palanivel, K.S., Puneet, S.C., Sherlyn, T., Abitha, B. & Tongmin, S. 2012. Development of surfactin based nanoemulsion formulation from selected cooking oils: Evaluation for antimicrobial activity against selected food associated microorganisms. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 43: 172–180.

Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A. & McClements, D.J. 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of Thymus daenensis essential oil against *E. coli*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 194: 410–415.

Omid baigi, R. 2005. Production and Processing of Medicinal Plants. 3rd edition, with complete revision) Astan Quds Razavi Publication, Tehran.

Othman, B.A. & Shoman, S.A. 2004. Antiphytoviral Avtivity of the *Plectranthus tenuiflorus* on Some Important Viruses. International Journal of Agricuiture & Biology, 6: 844–849.

Petersen, M. & Simmonds, M.S.J. 2003. Molecules of interest: Rosmarinic acid. Phytochemistry, 62: 121–125.

Pourhosein alamdari, M., 1391. Nanoemulsion formulation of Satureja khuzistanica essential oil with the aim of treating sinusitis and phytochemical study of *Echinacea purpurea* and its protective effect on PC12 cells. Master Thesis, Research Institute of Medicinal Plants and Raw Materials, Shahid Beheshti University.

Rakhshandehroo, F., Modarresi, A. & 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: 403–413.

Rasoulpour, R., Afsharifar, A. & Izadpanah, K. 2018. Antiviral activity of prickly pear (*Opuntiaficus–indica* (L.) Miller) extract; Opuntin B, a second antiviral protein. Crop protection, 112: 1–9.

Salahvarzi, S. 2005. Investigation of chemical compounds in Khuzestani savory extract. Master Thesis, Sharif University of Technology, Tehran.

Sefikan, F., Sadeghzadeh, L., Teymouri, M., Asgari, F. & Ahmadi, Sh. 2007. Investigation of antimicrobial effects of essential oils of two savory species (*Satureja khuzestanica* Jamzad and *Satureja bachtiarica* Bunge) in two stages of harvest. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 23: 182–174.

Sugumar, S., Nirmala, J., Ghosh, V., Anjali, H., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N. 2013. Bio–based nanoemulsion formulation, characterization and antibacterial activity against food–borne pathogens. Journal of Basic Microbiology, 53: 677–685.

Wagner, H., Wierer, M. & Bauer, R. 1986. Planta Med, 3: 184–187.

Zittre, T.A. & Gonsalves, D. 1991. Differentiation of pseudorecombinants of two *cucumber mosaic virus* starins by biological properties and aphid transmission. Phytopathology, 81: 139–143.

Verma, H.N., Srivastava, S. & Kumar, D.1996. Induction of systemic resistance in plant against viruses by a basic protein from *Clerodendrum aculeatum* leaves. Phytopathology, 85:485–492.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Study of the inhibitory effects of hydro–alcoholic extract and nanoemulsion essential oil of Khuzistani savory on local lesion induction by cucumber mosaic virus (CMV) on cowpea

Somayeh Mostafaee[1], Farshad Rakhshandehroo[2], Hassan Rezadoost[3], Mohsen Farzaneh[4]

1, 2. PhD. student, Assistant professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran.

3. Assitant Professor, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C. Evin, Tehran, Iran.

4. Associate Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C. Evin, Tehran, Iran.

Corresponding author: Farshad Rakhshandehroo, email: Rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir

Received: Jul., 28, 2021 9(1) 13–23 Accepted: Jan., 25, 2022

Abstract

Plant viruses are a limiting factor in agriculture. Natural compounds, especially herbal plant metabolites, have also been considered to control viruses. In this regard, the effect of aqueous–ethanolic extract (50% water) and essential oil nanoemulsion of *Satureja khuzistanica* were investigated to reduce the infection of cucumber mosaic virus on the local lesion test plant of cowpea (*Vigna unguiculata*) in greenhouse conditions. The extract and essential oil nanoemulsion were applied in four concentrations of 0.5, 1, 2 and 4 percent (g/100 mL) and three different times including simultaneously, and two hours before, and after inoculation of plant leaves with virus inoculum (concentration 2 mg/ml). The lowest number of local lesions was obtained by using 2 and 4% of hydro–ethanolic extract (by 66–78% disease reduction) and nanoemulsion of essential oil with a concentration of 2% (by 59% disease reduction), and two hours after inoculation with virus inoculum. The particle size of the nanoemulsion after preparation was 119.4 nm, which reached 232.8 nm after 60 days of storage, which indicates the good physical stability of the nanoemulsion. According to GC–MS analysis, the main constituents of essential oil were carvacrol (91.5%), para–cymene (1.5%), beta–caryophyllene (1.1%) and beta–pinene (1.1%). Nano–emulsion of this essential oil improved its efficiency to inhibit the cucumber mosaic virus on cowpea. This study is the first report of the antiviral effect of phytochemical compounds of Khuzistani savory to inhibit a plant virus.

Keywords: *Satureja khuzistanica*, extract, nanoemulsion of essential oil, plant virus inhibition

Archive of SID.ir