نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران
دوره۴- شماره ۱- پیاپند ۶- بهار و تابستان ۱۴۰۰

شناسایی مولکولی و گزارش میزبان جدید ویروس موزائیک خیار از کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) در استان خراسان رضوی

Molecular Identification and New Host Record for *Cucumber mosaic virus* Infecting *Cynara scolymus* in Khorasan Razavi province

سارا قارونی کاردانی*[۱]، فاطمه آزاد دیسفانی[۱] و منصور صلاتی[۱]

۱. استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. (*نگارنده مسئول)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲ - شناسانهٔ برنمود رقمی:10.22092/mpt.2022.357881.1094

چکیده

قارونی کاردانی، سارا.، آزاد دیسفانی، فاطمه.، صلاتی، منصور.، . شناسایی مولکولی و گزارش میزبان جدید ویروس موزائیک خیار از کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) در استان خراسان رضوی
نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران، دوره ۴ - شماره ۱- پیاپند ۶- بهار و تابستان ۱۴۰۰ صفحه: ۵۶-۴۳

کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) یک محصول چندمنظوره (خوراکی، علوفه‌ای و دارویی) با ارزش اقتصادی بالا در جهان بوده که از گل‌آذین نابالغ آن به عنوان سبزی و سالاد و از برگ‌های آن برای اهداف دارویی استفاده می‌شود. روش مرسوم و متداول تکثیر کنگرفرنگی از طریق غیرجنسی است، به همین علت عوامل بیماری‌زا به‌آسانی از گیاه مادری به دختری منتقل می‌شوند. تاکنون ۲۵ گونه ویروسی از جمله ویروس موزائیک خیار (CMV, *Cucumber mosaic virus*) از کنگرفرنگی گزارش شده است، که به‌صورت تنها یا هم‌زمان با سایر گونه‌های ویروسی موجب آلودگی میزبان می‌شوند. در این بررسی، CMV از نمونه‌های کنگرفرنگی با علائم زردی، کلروز، بندکفشی و بدشکلی برگ‌ها از ایستگاه تحقیقاتی طرق (مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی)، با کمک آزمون مولکولی RT-PCR جداسازی و در ادامه یک جدایه جهت تعیین توالی انتخاب شد. توالی کامل پروتئین پوششی (CP) این جدایه شامل ۶۵۷ نوکلئوتید با رس‌شمار OM959539 در بانک ژن ثبت گردید. نتایج داده ترادف نوکلئوتیدی به‌دست آمده در BLASTn وجود CMV را تایید نمود و نشان داد که جدایه توالی یابی شده در این تحقیق، دارای بیشترین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی (۹۸/۷ درصد) با جدایه‌هایی از ترکیه (LC066503) و ایران (JX112021 , KT279570) می‌باشد. این تحقیق اولین گزارش از شناسایی CMV در میزبان کنگرفرنگی در ایران می‌باشد. لذا جهت حفاظت این محصول در برابر ویروس، استفاده از مواد تکثیری عاری از ویروس و کنترل علف‌های هرز میزبان، در مزرعه ضروری است.

واژه های کلیدی: کنگرفرنگی، ویروس موزائیک خیار، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس، گیاه دارویی.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: s.gharooni@areeo.ac.ir

مقدمه:

کنگرفرنگی یک گیاه علفی، چند ساله، حساس به سرما با طول عمر متوسط چهار سال و متعلق به خانواده *Asteraceae* (*Compositae*) بوده که با نام علمی *Cynara scolymus* L. و نام لاتین Artichoke شناخته می‌شود (Tung *et al*. 2020). خاستگاه اصلی کنگرفرنگی کشورهای حوزه مدیترانه می‌باشد (Ergun *et al*. 2013). این گیاه به عنوان یکی از سبزیجات با بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای پلی‌فنولی شناخته می‌شود و دارای مقدار قابل‌توجهی از فروکتولیگوساکاریدها مانند اینولین (inulin) بوده، که این ترکیبات دارای فواید قابل‌توجه‌ی در جهت ارتقاء سلامت انسان می‌باشند. با این وجود متأسفانه بیش از ۶۰ درصد از حجم کل گیاه دور ریخته می‌شود (Ceccarelli *et al*. 2010; Noriega-Rodríguez *et al*. 2020). همچنین بر اساس مطالعات انجام‌شده، کنگرفرنگی به عنوان یکی از قدیمی‌ترین داروهای گیاهی شناخته‌شده در جهان بوده که عصاره برگ و ترکیبات موجود در گیاه دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌ها می‌باشند و عمدتاً از آن به‌عنوان پایین آورنده کلسترول خون، محرک کبدی و رفع مشکلات کبدی و گوارشی استفاده می‌شود (Englisch *et al*. 2000). بر اساس آخرین گزارش سازمان خواربار جهـانی، سطح زیرکشت کنگرفرنگی در جهان ۱۲۸،۵۶۹ هکتار و مجموع تولید ۱،۵۹۷،۳۵۶ تن اعلام شده است، که بر اساس آن، کشورهای ایتالیا (۳۶۷،۰۸۰ تن)، مصر (۳۰۸،۸۴۴ تن) و اسپانیا (۱۹۶۹۷۰ تن) به ترتیب رتبه‌های اول تا سوم را در بین تولیدکنندگان این محصول به خود اختصاص داده‌اند (FAOSTAT, 2020).

با توجه به فوایدی که کنگرفرنگی برای سلامت انسان‌ها دارد، سطح زیر کشت آن برای رفع نیازهای روز افزون کشاورزان، استخراج ترکیبات دارویی و همچنین صادرات گسترش یافته است، اما متأسفانه از سوی دیگر وجود آلودگی‌های قارچی و ویروسی کنگرفرنگی و کمبود بوته‌های عاری از بیماری، موجب منابع ناکافی این گیاه برای تولیدکنندگان شده است (Tung *et al*. 2020). کنگرفرنگی هم مانند سایر محصولات گیاهی می‌تواند به‌وسیله بسیاری از عوامل بیماری‌زا تحت تأثیر قرار گیرد که نتیجه آن باعث کاهش کیفیت و کمیت محصول بوده و موجب زیان‌های اقتصادی شدیدی به کشاورزان می‌گردد (Ergun *et al*. 2013). در گونه‌های کنگرفرنگی کشت‌شده حدود ۲۵ گونه ویروسی، طبقه‌بندی‌شده در ۱۵ جنس متعلق به ۱۰ خانواده ویروسی، شناسایی شده‌اند که اکثر آن‌ها در بسیاری از کشورهای اروپایی و نواحی مدیترانه‌ای عمدتاً توسط ناقلین حشره‌ای نظیر شته‌ها و مواد تکثیری رویشی آلوده منتقل می‌شوند (Martelli and Gallitelli, 2008; Gallitelli *et al*. 2012; Tung *et al*. 2020).

بر این اساس، گونه‌های ویروسی *Artichoke latent virus (ArLV)*، *Artichoke italian latent virus (AILV)*،*Artichoke mottled crinkle virus (AMCV)*، *Artichoke yellow ringspot*

virus (AYRSV)، *Cucumber mosaic virus (CMV)*، *Tobacco mosaic virus (TMV)* *Tomato spotted wilt virus (TSWV)* به عنوان گونه‌های غالب در مناطق کشت کنگرفرنگی معرفی شده‌اند که به‌صورت تنها یا هم‌زمان با سایر گونه‌های ویروسی موجب آلودگی میزبان می‌شوند (Gallitelli *et al*. 2004; Acquadro *et al*. 2010; Ergun *et al*. 2013). این ویروس‌ها قادرند تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی و علف‌های هرز را آلوده کنند. این امر می‌تواند نقش مهمی در اپیدمیولوژی ویروس‌ها به عنوان منبع بالقوه آلودگی با پتانسیل بالا جهت انتشار ویروس‌ها توسط ناقلین و انتقال مکانیکی ایفا کند (Salleh *et al*. 2017). در بررسی‌های انجام‌شده توسط صالح و همکاران (۲۰۱۷) مشخص شده در مواردی ممکن است کنگرفرنگی‌های آلوده علائم مشخصی را نشان ندهند که ممکن است یا به دلیل نهفته بودن آلودگی یا به دلیل تنوع در شرایط محیطی، عملیات کشاورزی و سن گیاه باشد که بر ظهور علائم بیماری تأثیرگذار است. غالباً در این گیاه در نتیجه وقوع آلودگی‌های ویروسی کلروز، نکروز، پیچیدگی برگ‌ها و کوتولگی قابل مشاهده است، اما در قدم اول این علائم ارزش تشخیصی ندارند زیرا ممکن است توسط عوامل بیماری‌زای دیگر یا در نتیجه وقوع آلودگی‌های هم‌زمان رخ دهد که نیازمند بررسی‌های دقیق مولکولی می‌باشد (Gallitelli *et al*. 2012; Minutillo *et al*. 2012).

ویروس موزائیک خیار (CMV) به عنوان یکی از گونه‌های غالب در مناطق کشت کنگرفرنگی جهان معرفی شده است. این ویروس عضو تیپ جنس *Cucumovirus* از خانواده *Bromoviridae* بوده (ICTV, 2019) که برای اولین بار در سال ۱۹۱۶ از ایالات‌متحده به‌عنوان ویروس بیماری‌زای گیاهی معرفی شد (Doolittle, 1916; Jagger, 1916). ژنوم این ویروس شامل سه قطعه آر.ان.ای کوچک تک رشته‌ای با قطبیت مثبت (RNA1-3) بوده که هر کدام توسط پوشش پروتئینی جداگانه‌ای احاطه می‌شوند (Palukaitis *et al*. 1992). علاوه بر آن، ذرات ویروسی دربرگیرنده مولکول‌های آر.ان.ای زیرژنومی کوچکی با نام‌های RNA4 و 4A به ترتیب با ۱۰۳۱ و ۶۸۹ نوکلئوتیدی نیز هستند (Ding *et al*. 1994). پروتئین پوششی که نقش بیماری‌زایی در گیاه و انتقال با ناقل را دارد از آر.ان.ای زیرژنومی RNA4 ترجمه می‌شود (Weber and Bujarski, 2015).

در میان جدایه‌های مختلف CMV، گوناگونی ژنتیکی بسیار زیادی وجود دارد. این جدایه‌ها بر اساس روابط سرولوژیکی، سنجش هیبریداسیون نوکلئیک اسید، نقشه پپتیدی پروتئین پوششی و تشابه توالی RNA ژنومی به دو زیرگروه I و II تقسیم‌بندی می‌شوند. نتیجه بررسی‌های بیشتر بر روی ژن کد کننده پروتئین پوششی و ناحیه غیرقابل ترجمه در انتهای ´5 (´5 non-translated region- NTR)، RNA3 منجر به تقسیم‌بندی زیر گروه I به دو زیرگروه IA و IB شد. اعضای متعلق به زیرگروه I دارای شباهت نوکلئوتیدی ۹۹–۹۱ درصد بودند. درحالی‌که درصد شباهت نوکلئوتیدی در اعضای زیرگروه II، ۸۴–۷۶

درصد بود. در مجموع جدایه‌های متعلق به زیرگروه I دارای توزیع بسیار بالایی در مقایسه با زیرگروه II بودند و در برخی موارد ۸۰ درصد از کل جدایه‌های شناسایی‌شده متعلق به زیر گروه I می‌باشند و این در حالی است که فراوانی زیر گروه IA بالاتر از IB بود (Gallitelli, 2000; Palukaitis *et al*. 2003; Abtahi *et al*. 2021).

CMV یک ویروس گیاهی مهم از نظر اقتصادی با پراکندگی وسیع در ایران است. که از میزبان‌های مختلفی نظیر موز، لوبیا، شلغم، بادام زمینی، کدو تنبل، گوجه‌فرنگی، نعناع، گلایل، زنبق، زیتون، بادمجان، سویا، نخود و ختمی (Abtahi *et al*. 2021) و سرخارگل (Gharouni-Kardani, 2019) گزارش شده است. تعیین زیرگروه‌های جدایه‌های CMV در مطالعات اپیدمیولوژی ویروس حیاتی بوده و شناسایی جدایه‌های مختلف CMV و مطالعه گوناگونی ژنتیکی گام علمی مهمی در کنترل اولیه بیماری‌های ویروسی از طریق مهندسی ژنتیک محسوب می‌شود (Yu *et al*. 2005). CMV از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت است و بزرگ‌ترین دامنه میزبانی را در بین ویروس‌های گیاهی به خود اختصاص داده است، به‌طوری‌که قادر است بیش از ۱۲۰۰ گونه از ۸۶ خانواده گیاهی دربرگیرنده تک‌لپه‌ای‌ها و دولپه‌ای‌ها را آلوده کند (Edwardson and Christie, 1991; Jacquemond, 2012; Tepfer *et al*. 2016).

وجود چنین سازگاری بالایی با گونه‌های مختلف میزبانی را می‌توان به تنوع بالا جمعیت ویروسی و پایداری ژنوم ویروس در برابر وقوع جهش‌های ژنتیکی توضیح داد (Mauck *et al*. 2014). همچنین نمی‌توان قابلیت بالای این ویروس در آلوده کردن تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی و علف‌های هرز را نادیده گرفت (Salleh *et al*. 2017). علائم ایجادشده توسط CMV بسته به جدایه ویروس متفاوت بوده و می‌تواند شامل کوتولگی، نقوش موزائیکی، رگه‌ای و حلقوی بر روی برگ‌ها و میوه‌ها، بدشکلی، شکستگی رنگ گلبرگ‌ها و نکروز موضعی باشد. به‌طورکلی گیاهان آلوده به این ویروس بسیار ضعیف شده و در بعضی مواقع نابودی کامل میزبان با شدت گرفتن آلودگی نیز قابل مشاهده است (Jacquemond, 2012; Salánki *et al*. 2018). CMV عموماً به‌وسیله ناقلین شته‌ای منتقل می‌شوند، اما سس و فعالیت‌های انسانی (انتقال مکانیکی و پیوند) نیز می‌تواند در انتقال این ویروس نقش داشته باشند (Palukaitis *et al*. 1992). لازم به ذکر است که در بعضی موارد آلودگی گیاه به CMV ممکن است به‌صورت هم‌زمان با سایر گونه‌های ویروسی رخ دهد که نتیجه آن وقوع اثر هم‌افزایی (synergism) و تشدید علائم بیماری می‌باشد (Mascia and Gallitelli, 2016).

در طول بهار و تابستان سال ۱۳۹۹، در بازدید انجام شده از بوته‌های کنگرفرنگی کشت شده در سایت گیاهان دارویی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی علائم مشکوک به آلودگی ویروسی مشاهده شد. هدف از انجام

این تحقیق، شناسایی عامل بیماری و ارائه راه کارهایی جهت مدیریت بیماری در مزارع آلوده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق از میزبان کنگرفرنگی (*C. scolymus*) با علائم زردی و کلروز بر روی برگ‌ها در مراحل ابتدایی رشد و علائم بندکفشی و بدشکلی برگ در مراحل انتهایی رشد از ایستگاه تحقیقاتی طرق، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی در طی دو مرحله در اواسط اردیبهشت ماه و اواسط تابستان سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری گردید. لازم به‌ذکر است که همراه با نمونه‌های مشکوک به آلودگی، نمونه‌های برگی سالم و بدون علائم نیز جهت بررسی احتمال وقوع آلودگی‌های نهفته، جمع‌آوری شدند. در ابتدا آر.ان.ای کل با استفاده از روش CTAB-PVPP (Cetyltrimethylammonium bromide) استخراج (Kargar *et al*. 2017) شد. سپس واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis (پارس‌توس، ایران) و آغازگر معکوس CMVR (5 -TCAGACTGGGAGCACCCC-3) مربوط به ژن کد کننده پروتئین پوششی (Coat protein- CP) (Hu *et al*. 2016) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و در طی دو مرحله و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. در مرحله اول دو میکرولیتر از آغازگر اختصاصی معکوس به غلظت ۱۰ میکرومولار، سه میکرولیتر از RNA الگو و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، در مجموع در حجم ۱۳/۵ میکرولیتر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. در مرحله دوم با افزودن چهار میکرولیتر بافر (PrimeScript buffer (5X، نیم میکرولیتر آنزیم RT (MMuLV transcriptase) و دو میکرولیتر dNTP نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. cDNA حاصل از واکنش RT، در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد. مخلوط مورد استفاده در واکنش PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول آمادهDNA Polymerase Master Mix Red (Ampliqon, Denmark)، سه میکرولیتر از cDNA ساخته شده به عنوان الگو و دو میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس CMVF (5 -ATGGACAAATCTGAATCAACC-3) CMVR(5 -TCAGACTGGGAGCACCCC-3) (هر یک به غلظت ۱۰ میکرومولار) ساخته شده توسط شرکت ماکروژن کره‌جنوبی (Macrogen Inc, South Korea) بود که نهایتاً مخلوط حاصل با افزودن ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله واسرشت سازی، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و درنهایت یک سیکل در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر انجام

شکل ۱: مشاهده علائم زردی (a)، نقوش کلروتیک (Chlorotic mottling) (b)، بندکفشی و باریک شدن برگ‌ها (Shoestring and narrowing of the leaves) (c, d) در گیاه کنگرفرنگی آلوده به CMV، جمع آوری شده از ایستگاه تحقیقاتی طرق استان خراسان رضوی. نمونه کنگرفرنگی سالم (e, f).

شد. محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی دو میکرولیتر از Green viewer (پارس توس، ایران) الکتروفورز شد. جهت اطمینان از نتایج به‌دست‌آمده در آزمون PCR، یک نمونه جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, South Korea) ارسال شد. در نهایت، توالی به‌دست آمده با استفاده از برنامه BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI جهت تائید وجود آلودگی در نمونه کنگرفرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

از آنجایی که وقوع آلودگی‌های مخلوط در کنگرفرنگی متداول است بنابراین تشخیص مبتنی بر علائم تقریباً غیرممکن می‌باشد. اغلب گیاهان هنگامی که توسط یک ویروس آلوده می‌شوند علائم مشخصی را نشان نمی‌دهند، زیرا آلودگی‌ها یا نهفته بوده یا واکنش واریته‌های مختلف، شرایط محیطی، عملیات زراعی و سن گیاه بر بیان علائم تأثیرگذار است. همچنین توزیع ویروس در میزبان ممکن است تحت تأثیر فصل، سن گیاه و انتخاب زمان مناسب نمونه‌برداری قرار گیرد (Repetto et al. 1997).

نمونه‌های جمع‌آوری شده از سایت گیاهان دارویی کشت کنگرفرنگی در ایستگاه تحقیقات طرق که غالباً دارای علائمی نظیر کلروز، ظهور موزائیک زرد رنگ، بدشکلی و بند کفشی شدن برگ‌ها بودند (شکل ۱)، در

آزمون مولکولی RT-PCR (به منظور بررسی احتمالی وجود CMV) با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج نشان‌دهنده تکثیر قطعه‌ی ۶۵۷ جفت بازی مربوط به ژن کدکننده پروتئین پوششی در راهک‌های ۲تا ۵ بود (شکل ۲)، درحالی‌که در راهک نمونه کنگرفرنگی سالم (به عنوان شاهد منفی) هیچ‌گونه باندی مشاهده نشد.

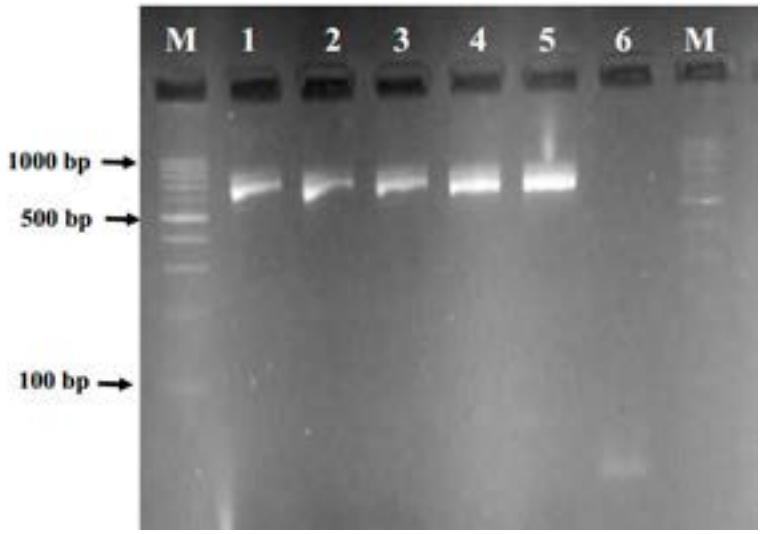
از بین نمونه‌های مثبت ارزیابی شده در بررسی‌های مولکولی، جدایه‌ای با نام (IR-Torogh) جهت تعیین توالی انتخاب شد. توالی به دست آمده در برنامه BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از تایید وجود آلودگی به CMV، در بانک ژن با رس‌شمار OM959539 به ثبت رسید. بر اساس نتایج حاصل از بلاست توالی نوکلئوتیدی جدایه (IR-Torogh)، بیشترین شباهت در سطح نوکلئوتیدی (۹۸/۷۲ درصد) با جدایه‌هایی از ترکیه TUR54 (LC066503) و ایران LOR_F (KT279570) و Ker.Ker.Pep (JX112021)، به‌ترتیب جدا شده از میزبان‌های تربچه، خربزه و فلفل مشاهده شد.

بر اساس مطالعات پیشین، در شرایط طبیعی کنگرفرنگی در مقایسه با ویروس‌های اختصاصی آن نظیر AFLV و ALV دارای حساسیت بسیار کمتری به CMV بوده و در مواردی ممکن است در برخی مطالعات شناسایی نشود، اما در زمانی‌که کنگرفرنگی به CMV آلوده شود علائم بسیار شدید بوده و اغلب باعث نابودی کامل گیاه می‌شود (Ortega *et al*. 2005).

آلودگی‌های ویروسی تقریباً در تمام مناطق کشت کنگرفرنگی مشاهده شده است که نتیجه آن ایجاد خسارت اقتصادی می‌باشد. اعتقاد بر این است که این ویروس‌ها از طریق تجاری‌سازی گیاهچه‌ها و دانه‌ها مانند هیبریدهایی که اخیراً گزارش‌شده‌اند، در مقایسه با ناقلین شناخته‌شده که برخی از آن‌ها مانند نماتدها و تریپس‌ها دارای محدودیت حرکت می‌باشند، منتشر می‌شوند (Gallitelli *et al*. 2012).

نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق با مطالعات پیشین در سایر نقاط دنیا مطابقت داشت (Salleh et al. 2017) که می‌تواند نشان‌دهنده سرآغاز یک تهدید در حال ظهور برای محصول کنگرفرنگی در استان خراسان و سایر نقاط ایران باشد.

ویروس‌های آلوده‌کننده کنگرفرنگی قادرند تعداد زیادی از گونه‌های میزبانی را آلوده کنند. در مقابل گونه‌های زراعی و علف‌های هرز نیز می‌توانند نقش مهمی را در اکولوژی و اپیدمیولوژی این ویروس‌ها به‌عنوان منبع گیاهی آلودگی با پتانسیل بالا جهت انتشار با ناقلین ویروسی و اقدامات نامناسب کشاورزان فراهم کنند (Salleh *et al*. 2017). لازم به ذکر است که با وجود این که کنترل خسارت بیماری ناشی از CMV با کشت گیاهان مقاوم قابل دستیابی است، اما رقم مقاوم تجاری در بسیاری از گونه‌های زراعی معرفی نشده است، همچنین تاکنون گزارشی مبنی بر وجود رقم مقاومی که به همه جدایه‌های CMV



شکل ۲: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمر از گیاه کنگرفرنگی آلوده به ویروس موزائیک خیار با استفاده از جفت آغازگر CMVF/CMVR بر روی ژل آگارز یک درصد. راهک های M: مارکر ۱۰۰ جفت باز (سینا کلون)، راهک ۱: شاهد مثبت، راهک های ۲ تا ۵، نمونه های کنگرفرنگی مبتلا به CMV، راهک ۶ شاهد منفی.

مقـاوم باشد، وجود ندارد. همچنین در کنترل این ویروس، استفاده از حشره‌کـش‌هـا نیز بـرای کنتـرل ناقل موفقیت اندکی داشته است، زیرا CMV به‌صـورت ناپایا منتقل شده و وقتی شته توسط حشره‌کش از بین مـی‌رود که قبلا ویروس را منتقل کرده اسـت (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003). در حال حاضر نتیجه شیوع بالای آلودگی‌های ویروسی در کنگرفرنگی و عدم وجود گیاهچه‌های عاری از بیماری، منبع ناکافی کنگرفرنگی برای تولیدکنندگان است. از آن‌جایی که متداول‌ترین روش تکثیری در کنگرفرنگی روش تکثیر رویشی (غیرجنسی) می‌باشد، عوامل بیماری‌زا به‌راحتی از گیاه مادری به گیاه دختری منتقل می‌شوند (Minutillo *et al.* 2015; Spano *et al.* 2018). همچنین استفاده از مواد تکثیری رویشی کنگرفرنگی با وضعیت بهداشتی نامعلوم منجر به انتقال و تجمع عوامل بیماری‌زایی نظیر قارچ‌های آوندی و ویروس‌ها می‌شود که عموما هیچ‌گونه اقدامات کنترلی کارآمدی برای آن‌ها در دسترس نیست. نتیجه این فرآیند با گذشت زمان، کاهش تولید و کاهش کیفیت محصول می‌باشد (Gallitelli *et al.* 2012). با وجود اینکه در مواردی استفاده از مواد تکثیری آلوده به گونه‌های ویروسی بدون علامت در کنگرفرنگی باعث سهولت انتقال آن‌ها به مناطق کشت جدید میزبان می‌شود، اما ممکن است این بیمارگرها تاثیر زودگذر و ضعیفی بر روی بازارپسندی کنگرفرنگی داشته باشند؛ اما در ارتباط با آلودگی‌های ویروسی کنگرفرنگی مشکل از زمانی آغاز می‌شود که میزبان به‌وسیله مجموعه‌ای از ویروس‌ها که ممکن است شامل حداقل ۲۵ گونه ویروسی متعلق به ۱۵ جنس از ۵ خانواده باشد، آلوده شود؛ که نتیجه آن تاثیر بسیار مخربی بر روی بازده و عملکرد محصول می‌باشد (Virgin,

2014; Mascia and Gallitelli, 2016)؛ بنابراین مطالعه وضعیت ویروس‌های بیمارگر و ایجاد روش‌های تکثیری آزمایشگاهی به‌منظور تولید نهال‌های عاری از بیماری ضروری می‌باشد (Minutillo *et al*. 2015; Spano *et al*. 2018).

بر اساس مطالعات پیشین انجام شده بر روی بیماری‌های ویروسی کنگرفرنگی (Gallitelli *et al*. 2004; Gallitelli *et al*. 2012)، اطلاعات در مورد ویروس‌ها و بیماری‌های ویروسی این میزبان پیشرفت‌های چشمگیری داشته است. بسیاری از ویروس‌ها در سطح مولکولی شناسایی شده‌اند و ابزارهای تشخیصی زیادی توسعه یافته‌اند. با این وجود نقش بسیاری از ویروس‌ها در اتیولوژی بیماری‌های خاص و اینکه آیا این ویروس‌ها بر عملکرد میزبان تاثیرگذارند یا نه و میزان این اثرگذاری تا چه اندازه می‌باشد، هنوز نامعین است. همچنین از آن‌جایی که تمایل بسیاری از ویروس‌ها جهت حرکت و جابه‌جایی از گیاهان چندساله با تکثیر رویشی به گیاهان تکثیر شده با بذر یا محصولاتی که طول ماندگاری آن‌ها در مزرعه بیش از دو سال نیست، این احتمال وجود دارد که اهمیت اقتصادی این آلودگی‌ها در آینده کاهش یابد. در واقع تداوم عفونت‌ها یا نرخ آلودگی‌ها در مزارع تازه تأسیس در درجه اول به دلیل استفاده از جوانه‌ها یا قلمه‌های منشأ گرفته از گیاهان مادری کنترل نشده از نظر بهداشتی که صرفاً تحت یک انتخاب بصری سطحی توسط کشاورزان قرارگرفته‌اند، می‌باشند. در نتیجه به‌نظر می‌رسد در دسترس بودن بذر سالم و گواهی شده می‌تواند پتانسیل آلودگی را کاهش دهد و در درازمدت مفید بوده و بر کاهش خسارت اثرگذار باشد. علاوه بر آن برخی از جنبه‌های مسیر آلودگی نیز باید روشن شود. بدین منظور، قابلیت انتقال ویروس‌های غالب کنگرفرنگی از طریق بذر باید مورد توجه قرار گیرد و پراکندگی منابع طبیعی ماده تلقیحی در محیط‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد. همچنین بهتر است طول دوره نهفتگی در آلودگی‌های منفرد و مخلوط مشخص شود. این گونه اطلاعات برای پیش‌بینی تاثیر پتانسیل تلقیح بر میزان آلودگی مجدد گیاهان ضدعفونی شده ضروری می‌باشد (Gallitelli *et al*. 2004; Gallitelli *et al*. 2012).

بسیاری از ویروس‌های آلوده کننده کنگرفرنگی دارای دامنه میزبانی مشترکی هستند و اغلب در همان میزبان علائم مشابهی را ایجاد می‌کنند. بنابراین کاربرد گیاهان محک علفی جهت شناسایی و تفکیک ویروس‌های آلوده کننده کنگرفرنگی به ندرت ارزش تشخیصی دارد. استفاده از این گیاهان در مورد ویروس‌هایی کاربرد دارد که هیچ ابزار تشخیصی سرولوژیکی و یا مولکولی برای آن‌ها در دسترس نیست (Gallitelli *et al*. 2012).

این مطالعه اولین گزارش از آلودگی کنگرفرنگی به CMV از ایران بوده که می‌تواند به عنوان زیربنایی برای آغاز مطالعات تکمیلی و تدوین استراتژی صحیح مدیریتی ویروس موزائیک خیار در کنگرفرنگی در کشور باشد که بر اساس نتایج به‌دست آمده به دلیل امکان

وقوع آسیب‌های شدید در مناطق کشت این محصول و محدودیت مطالعه بر روی گونه‌های ویروسی کنگرفرنگی، بررسی‌های بیشتر به‌منظور نظارت بر گسترش این بیماری و ارزیابی اپیدمیولوژی آن در کشور توصیه می‌شود. همچنین به‌دلیل بالا بودن احتمال وقوع آلودگی‌های مخلوط در این میزبان، ضرورت بررسی سایر گونه‌های متداول ویروسی کنگرفرنگی و سهم هریک در ایجاد آلودگی و بروز علائم بیماری نیز وجود دارد.

یافته‌های ترویجی

CMV یک ویروس شناخته شده با دامنه میزبانی وسیعی بوده که باعث ایجاد خسارت‌های شدیدی در محصولات مختلف گیاهی اعم از زراعی و باغی می‌شود. دارا بودن دامنه میزبانی گسترده به همراه وقوع مکرر و شیوع بالای آن در مناطق کشت میزبان تأثیر زیادی در تولید محصول دارد؛ اما با این وجود اطلاعات مولکولی بسیار کمی از جمعیت‌های طبیعی CMV آلوده کننده کنگرفرنگی در ایران و در جهان در دسترس می‌باشد.

از آنجایی که علف‌های هرز موجود در مزارع می‌توانند به‌عنوان میزبان ثانویه CMV جهت نگهداری و پایداری ویروس از فصلی به فصل دیگر عمل کنند یا به عبارت دیگر به عنوان زادمایه اولیه و یا مخازن ویروس برای محصولاتی که در همان مزرعه یا در مناطق مجاور رشد می‌کنند، شناخته می‌شوند، لذا مبارزه با علف‌های هرز در کنترل آلودگی‌های ناشی از CMV از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در ارتباط با سبزیجاتی نظیر کنگر فرنگی که از طریق رویشی تکثیر می‌شوند، ویروس‌ها به راحتی قادرند به جوانه‌های گیاه منتقل شده و آن‌ها را آلوده کنند. به همین علت اولین قدم جهت حفاظت از این محصولات در برابر ویروس‌ها، استفاده از بذرها یا قلمه‌های عاری از آلودگی می‌باشد. تولید بذرهای عاری از آلودگی ویروسی در برخی از مناطق با فشار کم ویروس یا تحت شرایط کاملاً حفاظت شده و یا به عنوان مثال با کنترل تعدادی از بذرها با استفاده از روش ELISA که عدم آلودگی آن‌ها تائید شده است، ممکن می‌باشد.

از آن جایی که این ویروس به طریق مکانیکی نیز منتقل می شود، ضدعفونی کردن ابزار، ماشین‌ها و دست‌ها می‌تواند از انتقال مکانیکی آن جلوگیری کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات جناب آقای دکتر مجید دشتی، ریاست محترم بخش تحقیقات جنگل و مرتع مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، که هماهنگی و امکانات لازم برای بازدید و نمونه‌برداری را فراهم نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

References:

Abtahi, F.H., Hatami, M., Salehi-Arjmand, H., Mahdieh, M., and Yazdani, R., 2021. Detection and phylogenetic analysis of new Iranian isolates of *Cucumber mosaic virus* on Achillea species. Journal of Crop Protection, 10(2): 309-311.

Acquadro, A., Papanice, M.A., Lanteri, S., Bottalico, G., Portis, E., Campanale, A., Finetti-Sialer, M.M., Mascia, T., Sumerano, P., and Gallitelli, D., 2010. Production and fingerprinting of virus-free clones in a reflowering globe artichoke. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 100: 329–337.

Adediji, A.O., 2019. Molecular detection of *Cucumber mosaic virus* from Basella alba, Telfairia occidentalis and Talinum fruticosum in Nigeria. Journal of Plant Protection Research, 59(2): 177-184.

Ceccarelli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C., and Giovannetti, M., 2010. Globe artichoke as a functional food. Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism, 3: 197–201.

Ding, S.W., Anderson, B.J., Haase, H.R. and Symons, R.H., 1994. New overlapping gene encoded by the *Cucumber mosaic virus* genome. Virology, 198: 593-601.

Doolittle, S.P., 1916. A new infectious mosaic disease of cucumber. Phytopathology. 6: 145–147.

Edwardson, J.R., and Christie, R.G., 1991. Cucumoviruses. In: CRC handbook of viruses infecting legumes. CRC Press, Boca Raton, USA, pp: 293-319.

Englisch, W., Beckers, C., Unkauf, M., Ruepp, M., and Zinserling, V., 2000. Efficacy of artichoke dry extract in patients with hyperlipoproteinemia. Arzneimittelforschung. 50(03): 260-265.

Ergün, M., Erkan, S., and Paylan, I.C., 2013. *Cucumber mosaic virus* in globe artichoke in Turkey. Canadian Journal of Plant Pathology, 35(4): 514-517.

FAOSTAT. (2019). http://www. fao.org/faostat/en/#data/QCL. Accessed 18

March 2021.

Gallitelli, D., and Saldarelli, P., 1996. Molecular identification of phytopathogenic viruses. In methods in molecular biology, species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid Methods. Humana press, Totowa, USA, 57-79.

Gallitelli, D., Mascia, T., and Martelli, G.P., 2012. Viruses in artichoke. Advances Virus Research, 84: 289–324.

Gallitelli, D., Rana, G.L., Vovlas, C., and Martelli, G.P., 2004. Viruses of globe artichoke: an overview. Journal of Plant Pathology, 86: 267–281.

Gharouni-Kardani, S., Rastegar, M., 2019. Identification and management of *Cucumber mosaic virus* in Purple coneflower (*Echinacea purpurea*) Farms, Technology of Medicinal and Aromatic Plants of Iran, 2(1), pp: 34-46.

Hu, Y., Shi, H.W., Jing, C.C., Li, K., Sun, X.C., Wu, G.T., Zhou, C.Y., Qing, L., 2016. First report of cucumber mosaic virus infecting apple in China. Journal of Plant Pathology, 98: 181.

International Committee on Taxonomy of Viruses. 2017. The Classification and Nomenclature of Viruses. Retrieved 2017, Mar. 21, from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report.

Jacquemond, M., 2012. Chapter 13- *Cucumber mosaic virus*. Advances in Virus Research, 84: 439-504.

Jagger, I.C., 1916. Experiments with the cucumber mosaic disease. Phytopathology, 6: 148–151.

Kargar, M., Zakiaghl, M., Masoumi, M., Mehrvar, M., and Izadpanah, K., 2017.

Kargar M., Zakiaghl M., Masoumi M., Mehrvar M., and Izadpanah K. 2017. Analysis of genetic diversity of Grapevine fanleaf virus isolate from Fars and Kohgiluyeh-Boyer Ahmad provinces. Iranian Journal of Plant Pathology, 52(3): 375-391

Martelli, G.P., and Gallitelli, D., 2008. Viruses of cynara. In Characterization, diagnosis and Management of plant viruses. Industrial crops, studium

press, Texas, USA. pp. 445–479.

Mascia, T., and Gallitelli, D., 2016. Synergies and antagonisms in virus interactions. Plant Science, 252: 176–192.

Mauck, K.E., De Moraes, C.M., and Mescher, M.C., 2014. Evidence of local adaptation in plant virus effects on host-vector interactions, integrative and comparative biology, 54(2): 193–209.

Minutillo, S.A., Marais, A., Mascia, T., Faure, C., Svanella-Dumas, L, Theil, S., Payet, A., Perennec, S., Schoen, L., Gallitelli, D., and Candresse, T., 2015. Complete nucleotide sequence of artichoke latent virus shows it to be a member of the genus *Macluravirus* in the family *Potyviridae*. Phythopatology, 105(8): 1155-1160.

Minutillo, S.A., Mascia, T., and Gallitelli, D., 2012. A DNA probe mix for the multiplex detection of ten artichoke viruses. European Journal of Plant Pathology, 134: 459–465.

Noriega-Rodríguez, D., Soto-Maldonado, C., Torres-Alarcón, C., Pastrana-Castro, L., Weinstein-Oppenheimer, C., and Zúñiga-Hansen, M.E., 2020. Valorization of globe artichoke (*Cynara scolymus*) agro-industrial discards, obtaining an extract with a selective effect on viability of cancer cell lines. Processes, 8(6): 715.

Ortega, A.M., Juárez, M., Jordá, M.C., and Armengol, J., 2005. Viral diseases in artichoke crops in Spain. Acta Horticulturae, 681: 611–617.

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

Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G., Francki, R.I.B., 1992. *Cucumber mosaic virus*. Advances in Virus Research, 41: 281–348.

Repetto, A., Cadinu, M., Leoni, S., Gallitelli, D., Saldarelli, P., Barbarossa, L., and Grieco, F., 1997. Effetto sulla coltura in vitro di apici meristematici sull'ottenimento di piante di carciofo ''Spinoso sardo'' e ''Masedu'' esenti da virus Notiz. Prot. Piante. 7: 189–195.

Roberta, S., Bottalico., G., Corrado, A., Campanale, A., Di Franco, A., and Mascia,T., 2018. A protocol for producing virus-free artichoke genetic

resources for conservation, breeding, and production. Agriculture, 8(3): 36.

Salánki, K., Gellért, A., Nemes, K., Divéki, Z., and Balázs, E., 2018. Molecular modeling for better understanding of *Cucumovirus* Pathology. Advances in Virus Research, 102: 59-88.

Salleh, W., Minutillo, S.A., Spanò, R., Zammouri, S., Gallitelli, D., and Mnari-Hattab, M., 2017. Occurrence of artichoke-infecting viruses in Tunisia. EPPO Bulletin, 47(1): 48-56.

Spanò, R., Bottalico, G., Corrado, A., Campanale, A., Di Franco, A., and Mascia, T., 2018. A Protocol for Producing Virus-Free Artichoke Genetic Resources for Conservation, Breeding, and Production. Agriculture, 8: 36.

Tepfer, M., Girardot, G., Feneant, L., Tamarzizt, H. B., Verdin, E., Moury, B., and Jacquemond, M. 2016. A genetically novel, narrow-host-range isolate of *Cucumber mosaic virus* (CMV) from rosemary. Archives of Virology, 161(7): 2013-2017.

Tung, H.T., Khai1, H.D., Cuong, D.M., Thuc, L.V., Bien, L.T., Long, H.V., Hanh, V.H.T., and et al., 2020. Assessment of fungi and viruses in Artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Da Lat, Lam Dong province. Vietnam Journal of Biotechnology, 18(4): 679-691.

Virgin, H.W., 2014. The virome in mammalian physiology and disease. Cell, 157(1): 142–150.

Weber, P.H., and Bujarski, J.J.,۲۰۱۵ . Multiple functions of capsid proteins in (+) stranded RNA viruses during plant-virus interactions. Virus Research, 196: 140-149.

Yu, C., Wu, J., and Zhou, X., 2005. Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. Journal of Virological Methods, 123(2): 155-161.

Molecular Identification and New Host Record for *Cucumber mosaic virus* Infecting *Cynara scolymus* in Khorasan Razavi province

Sara Gharouni-Kardani[1*], Fatemeh Azad Disfani[1] , Mansour Salati[1]

1. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO), Mashhad, Iran.(*Corresponding author: s.gharooni@areeo.ac.ir) . (Corresponding author*)

Received: February 2022 Accepted: April 2022 - DOI: 10.22092/mpt.2022.357881.1094

Abstract

Gharouni-Kardani, S., Azad Disfani, F., Salati, M., Molecular Identification and New Host Record for *Cucumber mosaic virus* Infecting *Cynara scolymus* in Khorasan Razavi province
Iranian Medicinal Plants Technology, Vol 4, No. 1, 2020-21 7-8: 43-56(in Persian)

Abstract

The artichoke (*Cynara scolymus* L.) is a multi-purpose product (food, forage, and medicinal) with a high economic value in the world, with immature flowers used as vegetables and salads and its leaves used for medicinal purposes. Artichoke plants are mostly propagated vegetatively, and pathogens are easily transferred from mother to daughter plants. To date, approximately 25 viruses, including *Cucumber mosaic virus* (CMV), have been isolated from artichokes, infecting the host either alone or in combination with other viral strains. In this study, CMV was isolated from artichoke samples collected from Torogh Research Station (Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education center) with symptoms of chlorotic mottling, shoe stringing, and leaf narrowing. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out with the help of specific primers (CMVF/R).The results of PCR and sequencing of 657 bp of coat protein genes revealed that these samples were CMV infected. One isolate was chosen and deposited in GenBank under the accession

Email address of the corresponding author: *****

number OM959539. The sequence was compared with reference CMV isolates from GenBank by BLASTn search analysis. According to the findings, the sequence isolated in this study has the highest nucleotide identity percentage (98.7 percent) when compared to isolates from Turkey (LC066503) and Iran (KT279570 and JX112021).This is the first report of CMV infection in globe artichoke in Iran. As a result, it is essential to control host weeds and use virus-free seeds to protect the crop.

Keywords: Artichoke*, Cucumber mosaic virus*, RT-PCR, Medicinal Plants.