گیاه بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* L.) میزبان جدیدی برای ویروس موزاییک خیار در استان مرکزی

فائزه السادات ابطحی[1*] و مهرناز حاتمی[1]
دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاهان دارویی و معطر
*نویسنده مسئول: faeze.abtahi@gmail.com

چکیده

ویروس‌های گیاهی حداقل بیش از یک میزبان دارند و ممکن است فقط در برخی از میزبان‌ها خسارت اقتصادی وارد کنند و در سایر میزبان‌ها از جمله گیاهان دارویی و مرتعی که به‌صورت خودرو در طبیعت رشد می‌کنند به‌صورت نهفته و فاقد علائم باشند. موزائیک و زردی از شایع‌ترین علائم در گیاهان آلوده به ویروس است. بومادران هزار برگ (*Achillea millefolium* L.) متعلق به تیره کاسنی (*Compositae*) است که در مناطق مختلف جهان گسترش یافته‌اند. ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) در همه جای دنیا یافت شده است. به‌منظور بررسی وضعیت آلودگی‌های ویروسی گیاه بومادران تعداد ۴۵ نمونه دارای علائم موزائیک، زردی و بدشکلی در پائیز ۱۳۹۵ از شهرستان شازند جمع‌آوری گردید. نمونه های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون ساندویچ دوطرفه الیزا (DAS-ELISA) جهت بررسی وجود یا عدم وجود آلودگی به ویروس با آنتی‌بادی چند همسانه‌ای CMV، مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده آلودگی هشت نمونه به ویروس موزائیک خیار تأیید شد. جدایه‌های مذکور پس از خالص‌سازی بیولوژیکی روی لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، خیار (*Cucumis sativus*) و گونه‌های مختلف توتون (*Nicotiana* spp.) تکثیر شدند. در لوبیا چشم بلبلی علائم نکروز و پیچیدگی برگ، زردی و تاولی برگ در خیار و پیچیدگی برگ در گونه‌های مختلف توتون آشکار شد. جهت ردیابی دقیق‌تر ویروس در نمونه آلوده از آزمون RT-PCR استفاده شد. برای این منظور total-RNA جدایه انتخاب شده (RNX-plus) استخراج و طی آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی، قطعه‌ای به اندازه ۶۵۰ نوکلئوتید، مربوط به چارچوب ژنی پروتئین پوششی ویروس تکثیر شد. براساس اطلاعات موجود، این اولین گزارش از وقوع CMV از بومادران در ایران است.

کلمات کلیدی:گیاه دارویی ،ویروس، الایزا، RT-PCR.

مقدمه

ویروس‌ها از عوامل آلوده کننده مهم گیاهان می‌باشند که از لحاظ اهمیت اقتصادی و ایجاد خسارت در جایگاه دوم پس از قارچ‌ها قرار دارند (Hull, 2002). اکثر بیماری‌های ویروسی همانند بیماری‌های قارچی با ظهور علائم یا همانند آفات با مشاهده آفت یا خسارت تغذیه آن به‌راحتی قابل مشاهده نیستند، ازاین‌رو غالباً توسط اکثر کشاورزان یا حتی کارشناسان و مدیریت‌های کشاورزی مورد غفلت واقع شده و در نتیجه به دلیل توسعه آلودگی‌های نهان ولی بسیار گسترده موجب خسارت هنگفت و کاهش عملکرد می‌شوند. از طرف دیگر ویروس‌های گیاهی حداقل بیش از یک میزبان دارند و ممکن است فقط در برخی از میزبان‌ها خسارت اقتصادی وارد کنند و در سایر میزبان‌ها به‌صورت نهفته و فاقد علائم در طبیعت تکثیر شوند. از جمله این گیاهان می‌توان به گیاهان دارویی و مرتعی که به‌صورت خودرو در طبیعت رشد می‌کنند اشاره کرد.

گیاه دارویی بومادران (*Achillea* L.) یکی از مهم‌ترین جنس‌های تیره کاسنی (*Compositae*)است (Mozafarian, 2015) که دارای ۱۴۰-۱۱۰ گونه علفی می‌باشد (Azizi *et al.*, 2010) که در مناطق مختلف جهان اعم از اروپا، آسیا و شمال آمریکا گسترش یافته‌اند (Kiumarsi *et al.*, 2009) که برخی از این گونه‌ها بومی هستند و در مناطق خاصی می‌رویند. این گیاه کرک‌دار، با ارتفاع ساقه ۹۰-۲۰ سانتی‌متر، دارای برگ‌ها متناوب، برگ‌های ساقه‌ای کوتاه‌تر از برگ‌های قاعده‌ای بوده و دو یا سه بار منقسم هستند. کلاپرک‌ها در این گیاه به‌صورت متراکم در کنار هم روی گل‌آذین قرار گرفته‌اند. رنگ لیگول‌ها سفید، صورتی و به‌ندرت صورتی پررنگ می‌باشد (Rehus and Neugebauerova, 2011). بومادران در طب سنتی در ترمیم و بهبود زخم‌ها، درمان سنگ کیسه صفرا، بیماری‌های عفونی، گوارشی، مشکلات کبدی و آنفولانزا کاربرد دارد (Kiumarsi *et al.*, 2009؛ Rehus and Neugebauerova, 2011). از دم کرده گیاهان جنس بومادران به دلیل دارا بودن ترکیب‌های فلانوئیدی و فنلی برای محافظت سلول‌های خونی در برابر اکسیداسیون ناشی از رادیکال‌های آزاد استفاده می‌شود (Karaalp *et al.*, 2009).

ویروس موزائیک خیار (CMV) *Cucumber mosaic virus*، عضو تیپ جنس *Cucumovirus* و خانواده *Bromoviridae* می‌باشد که توسط بیش از ۸۰ گونه شته به‌صورت ناپایا منتقل می‌شود (Brunt *et al.*, 1996; Palukaitis and Gracia-Arenal, 2003). با توجه به تعداد زیاد گونه‌های ناقل و انتشار گسترده جغرافیایی، این ویروس از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی آلوده کننده محصولات مختلف زراعی، باغی و سبزیجات محسوب می‌شود. علائم ویروس در میزبان‌ها و شرایط جغرافیایی مختلف متغیر بوده و شامل مواردی همچون موزائیک خفیف تا شدید، بازماندن از رشد، زردی و نکروز، لکه‌های سبزرد، بدشکلی و نخی شدن برگ می‌باشد. ژنوم ویروس از سه قطعه RNA شامل RNA-1، RNA-2 و RNA-3 تشکیل شده و حداقل دارای یک آران‌ای زیر ژنومی (RNA4) نیز می‌باشد که از ناحیه ´3 ´ نسخه‌برداری می‌گردد (Dancewicz *et al.*, 2012; Palukaitis and Gracia-Arenal, 2003). تابه‌حال وجود این ویروس در ایران از گیاهان دارویی مثل نعناع (Forghani *et al.*, 2014)، ختمی دارویی (Koulivand *et al.*, 2012) و زیتون (Khosh Khatii and Jafari, 2011) گزارش شده است. در استان مرکزی تاکنون تحقیق مدونی در خصوص شناسایی ویروس‌های بیماری‌زای گیاهان دارویی صورت نگرفته است، لذا ضروری به نظر می‌رسد که قبل از دست‌یابی به راه کنترل مناسب، شناسایی دقیق عوامل ایجاد کننده بیماری در منطقه انجام پذیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و بررسی خصوصیات بیولوژیکی و بررسی دامنه میزبانی

به‌منظور بررسی وضعیت آلودگی ویروسی گیاه بومادران تعداد ۴۵ نمونه دارای علائم موزائیک، زردی و بدشکلی در پائیز ۱۳۹۴ از شهرستان تنکابن جمع‌آوری گردید. نمونه‌برداری در پاییز سال ۱۳۹۵ از شهرستان شازند بر اساس مشاهده علائم مشکوک به ویروس انجام شد. در طول دوره تحقیق به‌منظور بررسی دامنه میزبانی، نوع علایم و تکثیر ویروس از گیاهان محک مختلفی از خانواده‌های اسفناجیان[۱] تاج خروس[۲] کدوئیان[۳] سیب‌زمینی‌سانان[۴] و حبوبات[۵] استفاده گردید. مایه‌زنی با استفاده از بافر فسفات سدیم ۰/۰۳ مولار (PH =۸/۳) شامل ۰/۲ درصد DIECA (سدیم دی اتیل دی تیو کاربامات) و با استفاده از پودر سیلیکات، در مراحل ۲-۴ برگی صورت گرفت. جهت خالص سازی بیولوژیکی ویروس از لکه‌های موضعی کلروتیک حاصل از مایه‌زنی بافت آلوده به ویروس بر روی گیاه محک سلمه تره *Chenopodium quinoa* استفاده گردید.

[۱] *Chenopodiaceae*
[۲] *Amaranthaceae*
[۳] *Cucurbitaceaea*
[۴] *Solanaceae*
[۵] *Legominosae*

آزمون سرولوژیکی

آزمون الایزا به روش مستقیم با استفاده از آنتی‌سرم چند همسانه‌ای مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز برای ردیابی ویروس با رقت ۱:۱۰۰۰ انجام گرفت. برای این منظور۰/۱ گرم برگ از نمونه‌های مشکوک به ویروس، کنترل منفی و کنترل مثبت در یک میلی‌لیتر بافر استخراج (۲ درصد پلی‌ونیل‌پیرولیدون (PVP2400) در بافر PBST) عصاره‌گیری شد. آنتی‌بادی[۶] به نسبت توصیه شده در بافر پوششی رقیق و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های پلیت الایزا ریخته شد. پلیت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شد. پس از تخلیه چاهک‌ها و شست‌وشو توسط بافر، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه گیاهی به چاهک‌ها اضافه شد. در ۳ چاهک بافر عصاره‌گیری به‌عنوان بلانک ریخته شد. در این مرحله پلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس شستشو مانند مراحل قبل صورت گرفت و آنتی‌بادی چند همسانه‌ای متصل شده به آنزیم آلکالین‌فسفاتاز به نسبت ۱:۱۰۰۰ در بافر کانجوگیت رقیق شده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. در مرحله بعد پلیت به مدت دو الی چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس شستشو مانند مراحل قبل صورت گرفت. در مرحله بعد۱۰ میلی‌گرم پارانیتروفنیل فسفات[۷] به‌عنوان سوبسترای آنزیم آلکالین فسفاتاز در ۱۰ میلی‌لیتر بافر سوبسترا حل شد و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه و به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. نتایج بر اساس شدت جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. با توجه به میزان جذب کنترل منفی (عصاره گیاه سالم)، با استفاده از فرمول X+3SD، آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. در این فرمول X میانگین جذب و SD انحراف معیار استاندارد چاهک‌های سالم است.

واکنش نسخه‌برداری معکوس

آران‌ای کل توسط بافر استخراج RNX Plus (شرکت سیناکلون، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت مربوطه استخراج و غلظت آن با استفاده از دستگاه بیواسپکتوفتومتر (اپندورف، آلمان) محاسبه شد. سنتز cDNA از روی قالب آران‌ای و با استفاده از آغازگر معکوس اختصاصی CMVCPr برای تکثیر قطعه‌ای از ژن پروتئین پوشش ویروس موزائیک خیار انجام گرفت. واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. ابتدا ۱۵ میکروگرم آران‌ای به همراه ۲۰ پیکومول آغازگر پس سو در درون لوله‌های پی‌سی‌آر ریخته شده و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه در ترموسایکلر تیمار شدند. سپس مخلوطی از دو میکرولیتر بافر واکنش با پنج برابر غلظت، یک میلی مولار دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs)، ۲۰ واحد آنزیم بازدارنده ریبونوکلئاز، ۵۰ واحد آنزیم M-MuLV RT و آب تیمار شده با DEPC به هر تیوب اضافه شد، به‌طوری‌که حجم نهایی واکنش ۱۰ میکرولیتر شد. واکنش ساخت cDNA در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، سپس در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و در آخر ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام شد.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز

برای ویروس موزائیک خیار از جفت آغازگرهای CMVCPr و CMVCPf استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از محصول واکنش نسخه‌برداری معکوس به‌عنوان الگو، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، دو میلی مولار کلرید منیزیم (MgCl2) ، دو میکرولیتر بافر واکنش با غلظت ده برابر (شامل ۵۰۰mM از KCl و Tris-HCl (اسیدیته ۸/۴))، ۱/۵ میلی مولار از dNTPs و ۱/۲۵ واحد آنزیم تک پلی‌مراز و در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام شد. ترادف آغازگر مورد استفاده و چرخه دمایی به ترتیب در جدول‌های ۲-۱ و ۲-۲ آمده است.

[۶] IgG

[۷] Para nitro phenyl Phosphate

جدول -**Error! No text of specified style in document.**۱- مشخصات آغازگر مورد استفاده در RT-PCR

آغازگر	ترادف	اندازه قطعه مورد انتظار (bp)	موقعیت نوکلئوتیدی	دمای اتصال (annealing temp.)
CMVCPr CMVCPf	5'-GCTTCTCCGCGAG-3' 5′-GCCGTAAGCTGGATGGAC-3′	۶۵۰	۱۵۶۸-۱۷۷۲	۵۰°C

جدول -**Error! No text of specified style in document.**۲- چرخه گرمایی مورد استفاده در PCR

نوع واکنش		مرحله واکنش	حرارت	زمان
RT		MMLV-RT	۴۲°C	۶۰ دقیقه
PCR	۳۳ چرخه	واسرشت اولیه	۹۵°C	۲ دقیقه
		واسرشت	۹۵°C	۳۰ ثانیه
		اتصال	۵۰°C	۳۰ ثانیه
		بسط	۷۲°C	۷۰ ثانیه
		بسط نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه

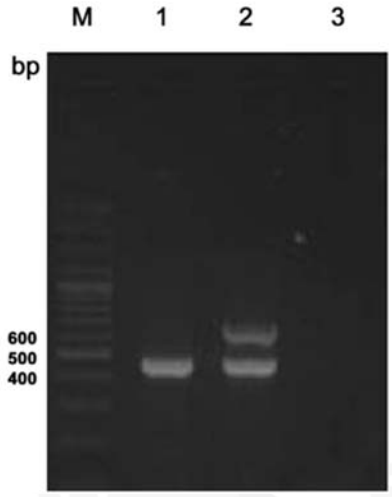
۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۳میکرولیتر loading dye (۱۰ میلی‌مولار برم فنول بلو حاوی ۱۰ در صد سوکروز و گلیسرول) مخلوط و در ژل آگاروز ۱درصد و بافر TBE (۱۰/۸گرم تریس، ۵/۵ گرم بوریک اسید، ۰/۷۳گرم EDTA در یک لیتر آب مقطر، ۸/۳ pH) الکتروفورز و قطعات نوکلئیک اسید بوسیله محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ درصد رنگ آمیزی و بوسیله دستگاه Gel documentation عکس‌برداری شد.

نتایج و بحث

پس از مایه‌زنی مکانیکی در لوبیا چشم بلبلی(*Vigna unguiculata*) نکروز و پیچیدگی؛ سلمه‌تره (*C. quinoa*) سبزردی؛ پیچیدگی برگ و ماتل در گونه‌های مختلف توتون (*Nicotiana* spp) و در خیار(*Cucumis sativus*) تاولی شدن برگ‌ها آشکار شد. در آزمون الایزا هشت نمونه مشکوک به آلودگی مثبت ارزیابی شدند. طی آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی، قطعه‌ای به اندازه ۶۵۰ نوکلئوتید، مربوط به چارچوب ژنی پروتئین پوششی ویروس تکثیر شد (شکل ۱). جدایه‌های مختلف CMV که از نقاط مختلف دنیا گزارش شده‌اند از نظر خصوصیات بیولوژیکی،سرلوژیکی و فیزیکوشیمیایی متفاوت هستند (Palukatis and Gracia-Arenal, 2003). جدایه‌های CMV بر پایه خصوصیات سرلوژی هیبریداسیون اسید نوکلئیک و تشابه اسیدهای آمینه ژن پروتئین پوششی، به دو گروه I و II (IA و IB) تقسیم می‌شوند. میزان شباهت ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی در جدایه‌های دو گروه I و II بین۸۸ تا ۹۶ درصد است و تشابه در گونه‌های دو زیر گروه I و II حدود ۶۹ تا ۷۷ درصد بوده است. این مطلب بیانگر ناهمگونی بالایی در بین جدایه‌های CMV است (Roossink, 2002). جدایه‌های مربوط به زیر گروه IA و IB در تمام دنیا یافت می‌گردند و گروه‌بندی آن‌ها به ناحیه جغرافیایی ارتباطی ندارد. تعیین زیرگروه‌های جدایه‌های CMV در بررسی اپیدمیولوژی ویروس از اهمیت زیادی برخوردار است. همچنین ردیابی جدایه‌های CMV و تشخیص تنوع ژنتیکی آن‌ها، یک مرحله مؤثر در کنترل بیماری‌های ویروسی به‌ویژه از طریق مهندسی ژنتیک می‌باشد (Yu *et al.*, 2005).

در مواردی که یک گیاه به دو یا چند ویروس آلوده باشد، این مسئله موجب اثر تشدیدکنندگی ویروس‌ها بر روی یکدیگر گردیده و در نتیجه علائم ویروسی به نحو چشم‌گیری افزایش می‌یابند لذا شناسایی تمامی عوامل ویروسی آلوده کننده یک گیاه لازم و ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اهمیت CMV ، بررسی خصوصیات مولکولی و تعیین

جایگاه فیلوژنتیکی تعدادی از جدایه‌های این ویروس از گیاه دارویی بومادران در استان مرکزی در آینده پیشنهاد می‌شود.



شکل ۱-الکتروفورز محصولات RT-PCR با آغازگر اختصاصی CMVCPf و CMVCPr و آغازگر 18srDNA برای کنترل داخلی. M: نشانگر دی ان ای 100bp، ۱: نمونه خیار مایه زنی نشده ۲: نمونه خیار مایه زنی شده ۳: شاهد.

منابع

Azizi, M., Chizzola, R. Ghani, A. and Oroojalian, F. 2010. Composition at different development stages of the essential oil of four *Achillea* species grown in Iran. Natural Product Communications,5(2):283- 290.

Brunt, A. A, Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs. A. and Watson, L. 1996.Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Dancewicz, K., Kordan, B., Szumny, A. and Gabrys, B. 2012. Aphid behaviour-modifying activity of essential oils from Lamiaceae and Apiaceae. Aphids and Other Hemipterous Insects. 18:93–100.

Forghani, D., Gholamhosein Mosahebi M. and Habibi-Koohi, M. 2014.Characterization of *Cucumber Mosaic Virus* From Mint in Tehran Province. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research. 2 (4): 985-992.

Hull, R. 2002. Mathew's Plant Virology. Fourth edition. Academic Press. USA.

Karaalp, C., Yurtman, A.N. and Yavasoglu, N.U.K. 2009. Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea* L. flower head extracts. Pharmaceutical Biology, 47(1): 86-91.

Khosh Khatii, N. and Jafari, H. 2011. A survey of olive oil tree to molecular and serological detection of *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) in Tarom region. New Technology in Agriculture (Special issue: Plant Pathology), 4 (2): 31-43.

Kiumarsi, A., Abomahboub, R., Rashedi, S. M. and Parvinzadeh, M. 2009. *Achillea millefolium*, a new source of natural dye for wool dyeing. Progress in Color, Colorants and Coatings, 2(2): 87-93.

Koulivand, D., Sokhandan Bashir, N. and Neamatollahi, S. 2012. Molecular detection and phylogenetic analysis of Cucumber Mosaic Virus isolated from *Althea officinalis*. Research Aplications in Plant Protection, 1 (1): 29-40 (in Persian).

Mozafarian, V. 2015. Recognition of medicinal and aromatic plants of Iran. Frahang Moaser Publication, Tehran, 1444p (In Persian).

Palukaitis, P. and Garcia-Arenal, F. 2003. Cucumoviruses. Advances in Virus Reaearch. 62: 241323.

Rehus, L. and Neugebauerova, J. 2011. The comparison of the content of essential oil and flavonoids in selected species of genus *Achillea millefolium* agg. cultivated in conventional and organic way. Acta Fytotechnica et Zootechnica Special Number, 14: 33-35.

Roossinck, M. J. .2002. Evolutionary history of cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyzes. Journal of Virology 76: 3382–3387.

Yu C., Wu J. and Zhou, X. 2005. Detection and sub grouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. Journal of Virological Methods. 123:155–161.

Yarrow (*Achillea millefolium* L.): a New Host of CMV in Markazi Province

Faezehossadat Abtahi[1*] and Mehrnaz Hatami[1]
[1]Department of Medinal Plants, Faculty of Agriculture and Natural Resourses, Arak University, Arak, Iran.
[*]*Corresponding Author: faeze.abtahi@gmail.com*

Abstract

Plant viruses at least have more than one host and some may cause economic damage, in others such as medicinal plants latent infection may occur. Mosaic and yellowing are the most prevalent symptoms in the infected plants. Yarrow (*Achillea millefolium* L.) belongs to *Compositae* is a medicinal plant, which is almost grown wild throughout the world. *Cucumber Mosaic virus* (CMV) is one the most important, that is distributed worldwide. During autumn of 2016, a total number of 45 samples of yarrow plants with symptoms including mosaic and yellowing were collected from Shazand. By the use of commercial specific polyclonal antibodies (Plant Virology Research Center, Shiraz University, Iran) in DAS-ELISA method, samples were tested for the presence of *Cucumber mosaic virus* (CMV). The Results showed that CMV were detected in 8 samples. These isolates on Cow pea (*Vinga unguiculata*), Cucumber (*Cucumis sativus*) and *Nicotiana* spp. has propagated by mechaniacal inoculation. The symptoms include leaf curl and necrosis in cow pea, chlorosis and crinkled leaves in cucumber and deformation in *Nicotiana* spp. Total RNA was extracted from a CMV-infected bean plant using RNX-plus kit (Cinnagen, Iran) and were used in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using CMV-specific primer pairs to amplify a segment of the coat protein (CP) gene of the virus. A cDNA fragment of the CP gene with 650bp in length was amplified. To our knowledge, this is the first report of CMV on yarrow in Iran.

***Keywords*: Medicinal plant, virus, ELISA, RT-PCR.**