Archive of SID

گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۷ شماره ۴، زمستان ۹۳

شناسایی ویروس های بذربرد مزارع باقلای استان خوزستان

محمدحسن رستگار[۱]، مسعود شمس‌بخش[۲]* و عبدالباسط عزیزی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲*- **نویسنده مسوول:** دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، (shamsbakhsh@modares.ac.ir)

۳- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۷

چکیده

باقلا (*Vicia faba* L.) یکی از حبوبات مهم در بسیاری از کشورها به شمار می‌رود و به‌عنوان منبع پروتئینی برای تغذیه انسان، دام و طیور و نیز در تثبیت نیتروژن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عارضه‌ای مشکوک به بیماری ویروسی با علائم موزائیک، پیچیدگی و بدشکلی برگ و ساقه سال‌های متمادی در مزارع باقلای استان خوزستان مشاهده شد. نتایج بررسی بذربرد بودن عارضه نشان داد که عامل/عوامل عارضه یاد شده بذربرد می‌باشد. از این‌رو هدف از انجام این پژوهش شناسایی ویروس(های) مهم بذربرد مزارع باقلای استان خوزستان می‌باشد. به این منظور پس از نمونه‌برداری، عصاره گیاهان دارای علائم مشکوک به بیماری ویروسی به ۲۲ گونه گیاه آزمون به‌روش مکانیکی مایه‌زنی‌شد، سپس نمونه‌ها با استفاده از آزمون سرولوژیکی الایزا و کاربرد ۱۵ آنتی‌بادی علیه ویروس‌های بذربرد باقلا ارزیابی شدند و درنتیجه آلودگی آن‌ها به ویروس موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*, BCMV)، ویروس نکروز موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic necrosis virus*, BCMNV) و ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) محرز شد. نتایج سرولوژی پس از استخراج آران‌ای کل و انجام واکنش آرتی ـ پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جنس پوتی‌ویروس (NIb2F/NIb3R) و ویروس موزائیک خیار (CMVF/CMVR) تایید و قطعه‌های مورد انتظار به‌ترتیب به‌اندازه‌های ۳۵۰ و ۵۲۰ جفت‌باز تکثیر شد. نتایج این پژوهش نشان‌داد مزارع باقلای استان خوزستان دست‌کم به سه ویروس بذربرد شامل CMV، BCMV و BCMNV آلوده بودند. این اولین گزارش از وقوع آلودگی باقلا به BCMV و BCMNV در ایران می‌باشد.

کلید واژه‌ها: ویروس، باقلا، CMV، BCMV، BCMNV

مقدمه

خوزستان یکی از مهم‌ترین استان های تولیدکننده باقلا (*Vicia faba* L.) در کشور است. ویروس‌ها از عوامل مهم آلوده‌کننده گیاهان هستند که از لحاظ اهمیت اقتصادی و ایجاد خسارت پس از قارچ‌ها در مقام دوم قرار دارند (هال[۱]، ۲۰۰۹). تاکنون بیش از ۱۱۰ گونه از ویروس‌های گیاهی از باقلا گزارش شده است (http://WWW. Plant Viruses Online). از مزارع باقلای ایران ویروس موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) (کایزر و همکاران[۲]، ۱۹۶۸)، ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (کایزر و همکاران، ۱۹۶۸)، ویروس برگ قاشقی باقلا (*Bean leafroll virus*) (کایزر و

1- Hull

2 -Kaiser *et al*.

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران، ۱۹۶۸؛ بهجت‌نیا و ایزدپناه[1]، ۱۹۹۴) ویروس موزائیک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) (کایزر و همکاران، ۱۹۶۸؛ روحانی[2]، ۲۰۰۹)، ویروس پژمردگی باقلا (*Broad bean wilt virus*, BBWV) (اصغری قرا و همکاران[3]، ۲۰۰۸؛ ایزدپناه، ۱۹۸۳)، ویروس موزائیک توته‌ای نخود (*Pea enation mosaic virus*) (فرزادفر و ایزدپناه، ۲۰۰۲[4]؛ ایزدپناه و همکاران، ۱۹۶۹) و ویروس زردی نکروتیک باقلا (*Faba bean necrotic yellows virus*) (منصورپور و همکاران[5]، ۲۰۱۰) گزارش شده است. در این میان ویروس‌های موزائیک خیار، موزائیک زرد لوبیا و برگ قاشقی باقلا از مزارع باقلای استان خوزستان گزارش شده است (فرزادفر و همکاران، ۲۰۰۲). به رغم آنکه ویروس موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*, BCMV) و ویروس نکروز موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic necrosis virus*, BCMNV) از اهمیت ویژه‌ای در بین ویروس-های حبوبات برخوردار هستند و گزارش‌های متعددی از وقوع این دو ویروس و به‌ویژه ویروس موزائیک معمولی لوبیا از مزارع حبوبات جهان و ایران در دست است (باس و همکاران[6]، ۱۹۸۸؛ همپتون[7]، ۱۹۷۵؛ مکوک و همکاران[8]، ۱۹۸۸؛ سایز و همکاران[9]، ۱۹۹۵؛ تاپیو[10]، ۱۹۷۰)، تاکنون گزارشی از وقوع آنها در مزارع باقلای ایران وجود ندارد.

دراثر آلودگی بوته‌های باقلا به ویروس موزائیک زرد لوبیا علائمی همچون کلروز رگبرگ ها همراه با علائم واضح موزائیک سبز یا زرد و معمولا بدون تغییر شکل برگ‌ها در گیاهان آلوده مشاهده می‌شود. لکه های تیره و سبز روشن در برگ، پیچیدگی خفیف تا متوسط در حاشیه ی برگ در اثر آلودگی به موزائیک بذربرد نخود (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV)، علائم پیسک و موزائیک خفیف در اثر آلودگی به ویروس موزائیک معمولی و ویروس نکروز موزائیک معمولی لوبیا، ایجاد لکه های موضعی تیره، نکروز ساقه و مرگ گیاه در اثر آلودگی به ویروس موزائیک یونجه، بروز علائم موزائیک در اثر آلودگی به ویروس موزائیک خیار، شکستگی رگبرگ، نکروز سریع برگهای انتهایی، سبز خشکی، لکه های موزائیک و سبز تیره، لکه موضعی و پژمردگی عمومی در اثر آلودگی به ویروس پژمردگی باقلا، لکه های کلروتیک و موزائیک و ایجاد نقاط نکروتیک روی پوسته بذر در اثر آلودگی به ویروس موزائیک چروکیده لوبیا (*Bean roguse mosaic virus*, BRMV)، از جمله علائم گزارش شده از آلودگی‌های ویروسی باقلا هستند (www.dpv.net).

طی سال‌های متمادی عارضه‌ای مشکوک به بیماری ویروسی با علائم موزائیک، پیچیدگی و بدشکلی برگ و ساقه در مزارع باقلای استان خوزستان مشاهده شد (شمس‌بخش، مشاهدات شخصی). این علایم با علایم گزارش شده برای ویروس‌های شناخته شده باقلا تطابق کامل نداشت. از آن‌جایی که اولین قدم اساسی برای ارائه راهکار مناسب مدیریتی، شناسایی عامل/عوامل بیماری است و وقوع بیماری‌های ویروسی و پراکندگی آن در مناطق مهم کشت می‌تواند خطری برای تولید محصول باشد، همچنین در صورت حضور ناقل در منطقه، گیاهان باقلای آلوده ممکن است به عنوان منبع آلودگی تهدیدی برای سایر محصولات منطقه باشند، این پژوهش با هدف شناسایی ویروس(های) عامل عارضه موزائیک، پیچیدگی و بدشکلی برگ و ساقه باقلا در

1- Behjatnia & Izadpanah
2 - Rohani
3- Asghari-ghara *et al.*
4- Farzadfar & Izadpanah
5- Mansourpour *et al.*
6- Bos *et al.*
7 -Hampton
8 -Makkouk *et al.*
9 -Sáiz *et al.*
10- Tapio

www.SID.ir

Archive of SID

استان خوزستان و تعیین ویژگی‌های بیولوژیک آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در اوایل اسفند ماه سال ۱۳۹۰ از گیاهان دارای علائم مشکوک به آلودگی ویروسی مزارع باقلای مناطق مختلف استان خوزستان شامل اهواز، دزفول، اندیمشک، شوش و شوشتر نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در کیسه پلاستیکی قرار داده شدند و پس از کدگذاری، ثبت تاریخ و محل نمونه‌برداری در ظرف حاوی یخ گذاشته شد و به آزمایشگاه منتقل‌شد. بخشی از هر نمونه گیاهی به یخچال منتقل و بخشی با نیتروژن مایع منجمد شد و در فریزر با دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

بررسی بذربرد بودن عامل بیماری در شرایط مزرعه و گلخانه

برای بررسی بذربرد بودن عامل بیماری حدود ۳۰۰ بذر جمع آوری شده از مناطق آلوده در شرایط گلخانه و مزرعه دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس کشت و پایش شد. علائم بیماری در بوته‌های کشت شده مورد بررسی قرار گرفت و با علائم بیماری در مزارع استان خوزستان مقایسه شدند. همچنین آلودگی تعدادی از گیاهان به ویروس‌ها بطور تصادفی با روش الایزا بررسی شد.

کشت و مایه‌زنی گیاهان آزمون

تعداد ۲۲ گونه گیاهی آزمون از خانواده‌های Amaranthaceae، Chenopodiaceae، Solanaceae، Cucurbitaceae و Fabaceae مورد بررسی قرار گرفتند. گیاهان آزمون در گلدان‌هایی به قطر ۱۲ سانتی‌متر در خاک سترون کشت و در دمای ۳۰-۱۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. خاک به‌کار رفته برای کشت گیاهان به‌صورت مخلوطی از خاک حاصل‌خیز مزرعه، پیت و پرلیت به نسبت ۱:۱:۱ بود. آبیاری گیاهان به‌طور مرتب انجام‌شد و در طول آزمایش، گلخانه از لحاظ وجود ناقلین و بیمارگرها پایش و به فاصله دو هفته یک‌بار سم پاشی با سم ایمیداکلوپراید[1] انجام شد.

مایه‌زنی مکانیکی گیاهان آزمون جهت بررسی ویژگی‌های بیولوژیک و دامنه میزبانی ویروس‌ها بسته به گونه گیاه آزمون در مراحل ۴-۲ برگی با استفاده از بافر فسفات (0.1 MK_2HPo_4, 2-β-mercaptoetanol pH 8.5) انجام شد. تعدادی از گیاهان به‌عنوان شاهد با بافر مایه‌زنی شدند. سپس از تک لکه‌ها عصاره گیری و به لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) مایه زنی شد. گیاهان مایه‌زنی شده به‌صورت روزانه مورد بازدید قرار گرفتند و علائم ایجاد شده روی آن‌ها ثبت شد.

آزمون‌های سرولوژی الایزا

آزمون الایزا به روش غیرمستقیم با استفاده از ۱۴ آنتی‌بادی چند همسانه‌ای شرکت DSMZ آلمان و مرکز تحقیقات بیماری‌های ویروسی غلات، دانشگاه شیراز (جدول ۱) و یک آنتی‌بادی علیه جنس پوتی‌ویروس تهیه شده از DSMZ بر اساس روش کرودر[2] (۲۰۰۱) انجام شد. میزان جذب چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الایزا خوان (ایتالیا، Anthos, 2020) در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری‌شد. برای تعیین حد آلودگی (R) از فرمول $R= X+3SD$ استفاده‌شد که در این فرمول X میانگین جذب چاهک‌های شاهد منفی و SD انحراف معیار جذب چاهک‌های شاهد منفی است.

آزمون آرتی_ پی‌سی‌آر

نمونه‌های گیاهی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی‌شده بودند با استفاده از آزمون آرتی_پی‌سی‌آر مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج آران‌ای کل از نمونه ها با استفاده از کیت استخراج RNX- Plus سیناژن (تهران، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

1- Imidacloprid
2- Crowther

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات آنتی‌بادی‌های استفاده شده در آزمون الایزا

گونه ویروس	جنس ویروس	غلظت	محل تهیه
Broad bean true mosaic virus	*Comovirus*	1:400	DSMZ
Bean pod mottle virus	*Comovirus*	1:500	DSMZ
Broad bean stain virus	*Comovirus*	1:400	DSMZ
Broad bean mottle virus	*Bromovirus*	1:400	DSMZ
Cowpea mottle virus	*Carmovirus*	1:1000	DSMZ
Pea seed-borne mosaic virus	*Potyvirus*	1:500	DSMZ
Pea stem necrosis virus	*Carmovirus*	1:300	DSMZ
Bean yellow mosaic virus	*Potyvirus*	1:1000	DSMZ
Zucchini yellow mosaic virus	*Potyvirus*	1:1000	DSMZ
Alfalfa mosaic virus	*Alfamovirus*	1:350	DSMZ
Soybean mosaic virus	*Potyvirus*	1:500	DSMZ
Bean common mosaic necrosis virus	*Potyvirus*	1:1000	دانشگاه شیراز
Bean common mosaic virus	*Potyvirus*	1:1000	دانشگاه شیراز
Cucumber mosaic virus	*Cucumovirus*	1:500	دانشگاه شیراز

جهت انجام آرتی‌ـ پی‌سی‌آر از آغازگرهای عمومی جنس پوتی‌ویروس و آغازگرهای اختصاصی ویروس موزائیک خیار استفاده شد. آغازگرهای عمومی جنس پوی‌ویروس شامل آغازگر پیش‌سو NIb2F 5´-GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA-3´ و آغازگر پس‌سو NIb3R 3´-TCIACI ACIGTIGAIGGYTGNCC-5´ (ژنگ و همکاران[1]، ۲۰۱۰) قطعه‌ای به طول تقریبا ۳۵۰ جفت باز را در واکنش پی‌سی‌آر تکثیر می‌کنند. برای ویروس موزائیک خیار از آغازگر پیش‌سو CMV-F توالی نوکلئوتیدی 5'- TAA CCT CCC AGT TCT -3' و آغازگر پس‌سو CMV-R با توالی 5'- CCA TCA CCT TAG CTT CCA TGT -3' که قطعه‌ای به طول ۵۱۳ جفت‌باز را تکثیر می‌کند، استفاده شد (گرایکو و همکاران[2]، ۲۰۰۰).

سنتز دی‌ان‌ای مکمل الگو[3]

واکنش سنتز دی‌ان‌ای مکمل (cDNA) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در ترموسایکلر Eppendorf Gradiant, Germany و در دو مرحله انجام شد. مرحله اول جهت از بین بردن ساختارهای ثانویه و اتصال اولیه آغازگرها به الگو انجام شد و مواد واکنش شامل سه میکرولیتر آران‌ای استخراج شده و ۱۱ میکرولیتر آب به همراه ۱۰ پیکومول آغازگر پس‌سو بود. واکنش در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس بافر واکنش آر تی (5x) شامل 250mM Tris-HCl (pH 8.3), 60mM KCl, 40mM $MgCl_2$, 5mM Dithiothreitol, 250mM NaCl به میزان ۴ میکرولیتر، مخلوط نوکلئوتیدها (10 mM) به مقدار یک میکرولیتر، بازدارنده آران‌ایز (40 units/µl) به‌میزان ۰/۵ میکرولیتر و ترانس‌کریپتاز معکوس M-MuLV (200u/µl) ساخت شرکت فرمنتاز لیتوانی به مقدار ۰/۷ میکرولیتر به عنوان مواد واکنش مرحله دوم به میکروتیوب‌ها اضافه شدند.

میکروتیوب‌ها به ترموسایکلر با برنامه دمایی به شرح زیر منتقل شدند. واکنش در دمای ۳۷ درجه

1 -Zheng *et al.*
2- Grieco *et al.*
3- cDNA

www.SID.ir

Archive of SID

سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و سپس در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد و آنگاه برای غیرفعال‌سازی آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1]

واکنش پی‌سی‌آر با استفاده از دی‌ان‌ای مکمل[2] حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس روی آران‌ای‌های استخراج شده از نمونه‌های مشکوک به آلودگی با ویروس موزائیک خیار و پوتی ویروس‌ها انجام شد. واکنش پی‌سی‌آر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت نهایی ۱۰ پیکومول آغازگرهای پیش‌سو و پس‌سو، بافر پی‌سی‌آر ، (50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.4)، کلرید منیزیم ۲ میلی‌مولار، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات ۰/۲ میلی مولار، آنزیم *Taq* Polymerase (سیناژن) یک واحد و cDNA انجام گرفت. سپس لوله‌ها به دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی زمان‌بندی‌شده به شرح زیر منتقل شدند. واسرشته-سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت. سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت ۴۰ ثانیه؛ دمای اتصال آغازگرها به رشته الگو برای جفت‌آغازگر NIb2F/NIb3R ، ۴۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و برای آغازگرهای CMV-F/CMV-R ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. در خاتمه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

الکتروفورز قطعات دی‌ان‌ای حاصل از واکنش آرتی – پی‌سی‌آر

الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز در بافر یک برابر غلظت TAE حاوی ۰/۴۸۴ gr Tris-Base (pH=8)، gr Acetic Acid ۰/۱ و ml EDTA ۱۰ (۰/۱ mM) و در میدان الکتریکی با ولتاژ ۹۵ ولت به مدت ۴۰ دقیقه در دستگاه الکتروفورز افقی (Pharmacia, EPS-500/400) انجام شد. ژل آگارز با محلول اتیدیوم‌بروماید با غلظت نهایی ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه ژل‌داک (Vilber Lourmat T-5×20-2A) عکس‌برداری‌شد. نشانگر یک کیلوباز با شماره #SM1163 محصول شرکت فرمنتاز به‌عنوان نشانگر اندازه دی ان ای استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی بذربرد بودن عامل بیماری

پس از کشت بذور تهیه شده از مناطق آلوده در شرایط گلخانه و مزرعه علائم موزائیک و بدشکلی بوته مشابه علائم مشاهده شده در مزارع باقلای خوزستان ظاهرشد. نتایج الایزا نیز آلودگی بوته‌های دارای علائم را به سه ویروس CMV، BCMV وBCMNV تأیید کردند.

مطالعات گلخانه‌ای

عصاره نمونه‌هایی که بر اساس علائم مشاهده شده در مزرعه مشکوک به آلودگی ویروسی بودند، روی گیاهان آزمون مایه‌زنی‌شدند. بوته‌های خیار (*Cucumis sativus*) مایه‌زنی‌شده علائم پیچیدگی و موزائیک، روشن شدن رگبرگ‌ها و زبر و خشن شدن برگ‌ها (شکل 1-a)، در لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)، پیچیدگی و بدشکلی شدید و ابلقی شدن برگ‌ها[3] (شکل 1-b)، در سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa*)، پیسک (شکل 1-c) و در سلمه‌قرمز (*Chenopodium amaranticolor*) پیسک و لکه‌موضعی[4] (شکل 1-d)، در تاتوره (*Dautura stramonium*) توته‌ای شدن[5] و لکه‌موضعی (شکل 1-e)، در گوجه‌فرنگی (*Solanum*

1- Polymerase Chain Reaction
2- cDNA

3- Calico
4- local lesion
5- enation

www.SID.ir

Archive of SID

lycopersicum) موزائیک همراه با زگیلی شدن برگ‌ها (شکل 1-f) و گیاهان لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) بدشکلی برگ، برجستگی رگبرگ‌ها و موزائیک شدید نشان دادند (شکل 1-g). اغلب گونه‌های توتون (*Nicotiana* sp.) بدون علائم بودند و گاهی علائمی مانند موزائیک خفیف و روشن شدن برگ‌ها را نشان دادند (شکل 1-h). در سویا (*Glycin max*)، علائم موزائیک و نکروز موضعی بروز کرد (شکل 1-i). مایه زنی تک‌لکه‌های سلمه‌تره آلوده به حساس‌ترین میزبان یعنی لوبیا چشم بلبلی سبب بروز علائم موزائیک و بدشکلی شد (شکل 1-j)، در حالیکه مایه زنی با استفاده از لوبیای آلوده موجب بروز علائم بدشکلی شدید شد (شکل۱-k) و مایه زنی با استفاده از سویای آلوده علائم نکروز موضعی شدید را ایجاد کرد (شکل۱-۱).

نتایج آزمون الایزا

حدود ۱۵۰ نمونه گیاهی دارای علایم ویروسی با استفاده از ۱۴ آنتی‌بادی (جدول ۱) و یک آنتی‌بادی علیه جنس پوتی‌ویروس مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج آزمون ردیابی سرولوژیک الایزای جنس پوتی‌ویروس با استفاده از آنتی‌بادی عمومی مثبت ارزیابی شد؛ همچنین نتایج این بررسی نشان داد تعدادی از نمونه‌ها با آنتی بادی علیه سه ویروس CMV، BCMV و BCMNV واکنش مثبت داشتند. درحالیکه هیچکدام از نمونه‌ها با سایر آنتی بادی‌های ذکر شده در جدول یک واکنش نشان نداد. نتایج این بررسی نشان داد تعدادی از نمونه‌های بررسی شده به هر سه ویروس آلوده بودند و تعدادی از نمونه‌ها به دو یا یکی از ویروس‌های یاد شده آلوده بودند.

نتایج واکنش آرتی- پی‌سی‌آر

پس از استخراج آرای کل، واکنش آرتی- پی‌سی‌آر با استفاده از جفت‌آغازگرهای عمومی NIb2F/NIb3Rبا هدف ردیابی جنس *Potyvirus* انجام و قطعه دی‌ان‌ای مورد انتظار به طول ۳۵۰ جفت باز تکثیرشد (شکل ۲).

واکنش آرتی- پی‌سی‌آر با استفاده از جفت آغازگرهای CMVF/CMVR برای ردیابی ویروس موزائیک خیار نیز انجام‌شد و قطعه دی‌ان‌ای مورد انتظار به طول ۵۲۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۳).

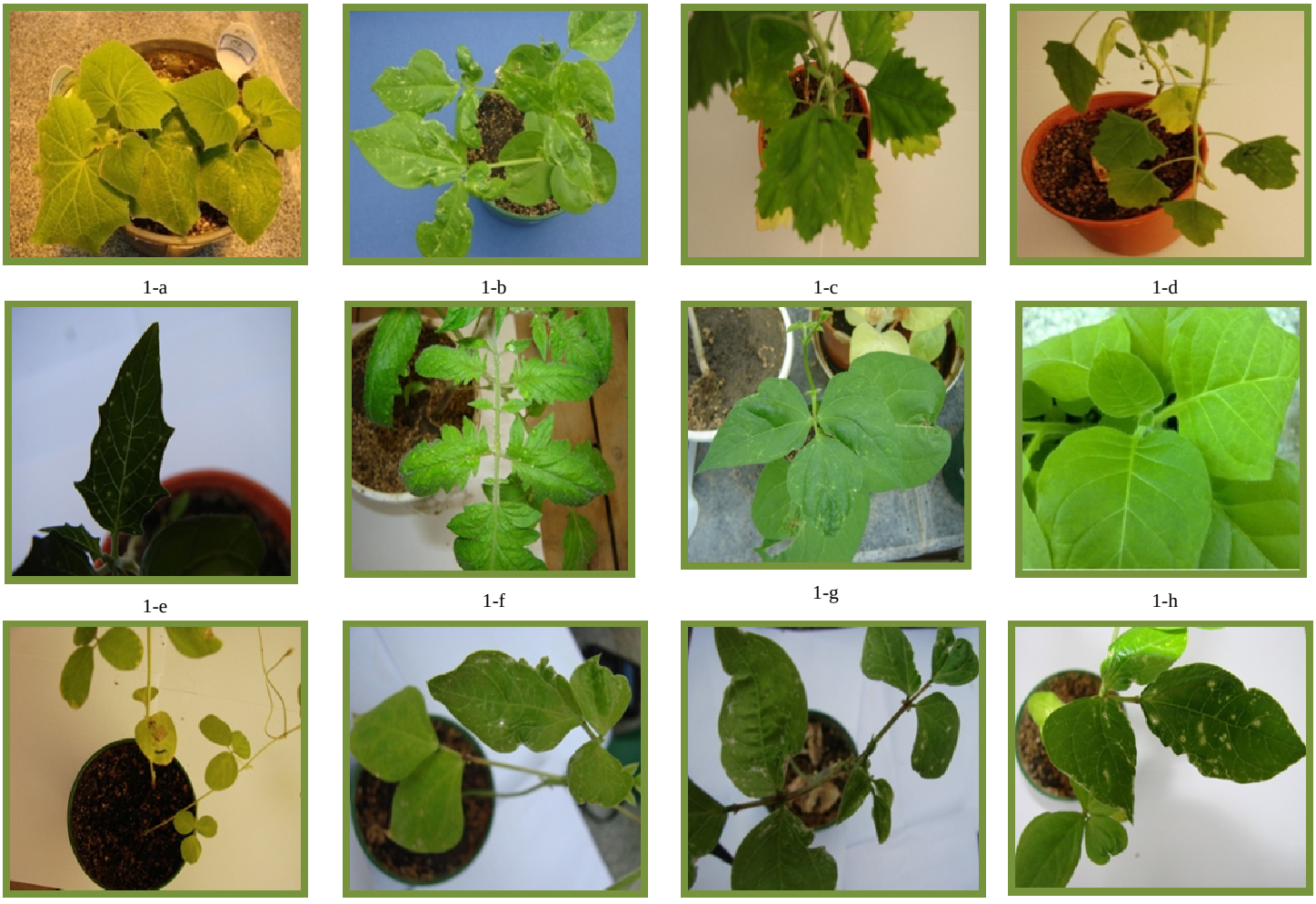
بحث

در این مطالعه به منظور تشخیص عامل عارضه موزائیک و پیچیدگی برگ و ساقه باقلا در استان خوزستان، در اوایل اسفند ماه سال ۱۳۹۰ از گیاهان دارای علائم مشکوک به آلودگی ویروسی در مزارع مختلف استان نمونه‌برداری انجام شد. نتایج بررسی‌های مزرعه‌ای و مایه زنی مکانیکی عامل بیماری در شرایط گلخانه به ۲۲ گونه گیاه آزمون نشان داد که علائم مشاهده شده در مزارع باقلای استان خوزستان و علائم ظاهر شده روی گیاهان آزمون با علائم بیماری‌های ویروسی شناخته شده تطابق نداشت (شکل ۱). آزمون الایزا به روش غیرمستقیم برای ردیابی ۱۵ ویروس انجام شد. در نتیجه ویروس‌های موزائیک خیار (CMV)، موزائیک معمولی لوبیا (BCMV) و نکروز موزائیک معمولی لوبیا (BCMNV) در نمونه‌ها بطور همزمان به هر سه و یا به دو یا یکی از ویروس‌ها ردیابی شد. پس از استخراج آرای کل، واکنش آرتی_ پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن NIb با هدف ردیابی ویروس‌های جنس *Potyvirus* انجام گرفت و قطعه دی‌ان‌ای مورد انتظار به طول ۳۵۰ جفت باز تکثیر شد. واکنش آرتی_ پی‌سی‌آر با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی CMV ردیابی ویروس موزائیک خیار نیز انجام شد و قطعه دی‌ان‌ای مورد انتظار به طول ۵۲۰ جفت باز تکثیر شد. نتایج آزمون‌های الایزا و آرتی_ پی سی‌آر مطالعه حاضر نشان داد که دست کم سه ویروس CMV، BCMV و BCMNV در بروز بیماری موزائیک و پیچیدگی برگ و ساقه باقلا در

www.SID.ir

Archive of SID

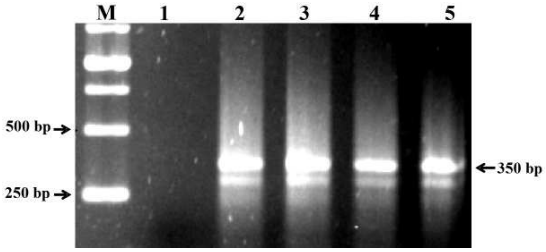
استان خوزستان نقش دارند. بنابراین نتایج نشان داد که مزارع باقلای استان خوزستان به چند ویروس آلوده است. این نکته اهمیت توجه به مدیریت صحیح بیماری را افزایش می‌دهد زیرا بوته‌های باقلای آلوده می‌تواند به عنوان منبع آلودگی عمل کنند و تهدیدی جدی برای سایر محصولات منطقه باشند.



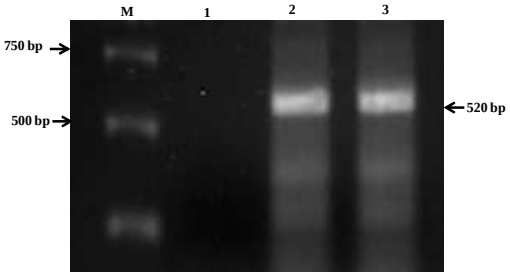
شکل ۱- علائم ایجاد شده در گیاهان آزمون حاصل از مایه‌زنی مکانیکی با عصاره باقلای آلوده: شکل 1-a. علائم پیچیدگی، موزائیک و روشن شدن رگبرگ‌ها در خیار (*Cucumis sativus*)، شکل 1-b. پیچیدگی و بدشکلی شدید و ابلقی شدن برگ‌ها در لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)، شکل 1-c. علائم پیسک در گیاه سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa*)، شکل 1-d. علائم پیسک و لکه موضعی در سلمه‌قرمز (*Chenopodium amaranticolor*) شکل 1-e. توته‌ای شدن (*enation*) و لکه‌موضعی در تاتوره (*Dautura stramonium*)، شکل 1-f. علائم موزائیک همراه با زگیلی‌شدن برگ‌ها در گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، شکل 1-g. بدشکلی برگ، برجستگی رگبرگ‌ها و موزائیک شدید در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، شکل 1-h. موزائیک خفیف و روشن‌شدن برگ در توتون (*Nicotiana tabacum*)، شکل 1-i. علائم موزائیک و نکروز موضعی در سویا (*Glycin max*). علائم مختلف ناشی از انتقال مکانیکی تک‌لکه‌های موضعی به لوبیا چشم‌بلبلی: شکل 1-j. موزائیک و بدشکلی در لوبیا چشم‌بلبلی ناشی از انتقال مکانیکی عصاره تک‌لکه‌های موضعی از سلمه‌تره، شکل 1-k . علائم بدشکلی شدید در لوبیا چشم‌بلبلی ناشی از انتقال مکانیکی عصاره تک‌لکه‌های موضعی از لوبیای آلوده، شکل 1-l. علائم نکروز موضعی شدید شدید در لوبیا چشم‌بلبلی ناشی از انتقال مکانیکی عصاره تک‌لکه‌های موضعی از سویای آلوده.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- ردیابی جنس *Potyvirus*. چاهک‌ها از چپ به راست: (*M*) 1kb DNA-Ladder، (۱) کنترل منفی، (۲) کنترل مثبت، (۳، ٤ و ٥) نمونه‌های باقلا.



شکل ۳- ردیابی ویروس موزائیک خیار، چاهک‌ها از چپ به راست: (M) 1kb DNA-Ladder ، (۱) کنترل منفی، (۲ و ۳) نمونه‌های باقلا.

با کشت بذور جمع‌آوری شده از مناطق آلوده در شرایط گلخانه و مزرعه و مقایسه علائم ظاهر شده با علائم مشاهده شده در مزارع باقلای استان خوزستان و انجام آزمون‌های سرولوژی، بذربرد بودن بیماری نیز تأیید شد. این اولین گزارش از وقوع ویروس موزائیک معمولی لوبیا (BCMV) و نکروز موزائیک معمولی لوبیا (BCMNV) از مزارع باقلا در ایران است.

در این بررسی از روش آرتی ـ پی‌سی‌آر برای ردیابی پوتی‌ویروس‌ها استفاده شد. استفاده از آغازگرهای منطبق بر بخش حفظ شده در پوتی‌ویروس‌ها، امکان تکثیر قطعه‌ای از ژنوم ویروس را فراهم آورد. آرتی‌ـ پی سی آر با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی در ردیابی موفقیت‌آمیز گونه‌های متعلق به جنس های پوتی ویروس (ها و همکاران[1]، ۲۰۰۸؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۱۰)، کلستروویروس (کاراسو و همکاران، ۱۹۹۴[2])، توسپوویروس (چن و همکاران[3]، ۲۰۱۲)، لوتئوویروس (روبرتسون و همکاران، ۱۹۹۱[4]) و کوکوموویروس (چوی و همکاران[5]، ۱۹۹۹) به کار گرفته شده است که با امکان ردیابی چند ویروس با یک جفت آغازگر، علاوه بر صرفه‌جویی در هزینه از سرعت عمل بیشتری در مطالعات اپیدمیولوژی برخوردار است. بررسی‌های انجام‌شده با آزمون آرتی‌ـ پی سی آر نشان داد که روش الایزا قابل اطمینان بوده و برای تشخیص سریع و آسان‌تر بیماری قابل‌توصیه است.

استان خوزستان مهم‌ترین تولید کننده باقلا در کشور است. بنابراین آگاه کردن پژوهشگران، زارعین، مروجین و مسئولین به وقوع و خطر ناشی از آلودگی و پراکنش ویروس‌ها ضروری است. توزیع بذر گواهی‌شده و عاری از ویروس توسط مراکز مسئول در استان جهت تعویض بذر مورد استفاده در مزارع به عنوان روشی مناسب برای مدیریت بیماری توصیه می‌شود. با توجه به بذربرد بودن عارضه، اعمال قرنطینه مناسب برای ممانعت از انتقال بذر آلوده به سایر استان‌ها ضروری است.

1- Ha *et al.*
2- Karasev *et al.*
3- Chen *et al.*
4- Robertson *et al.*
5- Choi *et al.*

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Asghari-Ghara, S., Shahraeen, N., Ghorbani, S.H., and Hosseinnia, S. 2008. Incidence of *Broad bean wilt virus* from Mazandaran province. Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran, p 543 (Abst.).

2. Behjatnia, S.A.A., and Izadpanah, K. 1994. Purification, serology and natural hosts of the *Bean leaf roll virus* in Iran. Plant Disease, 2:107-114.

3. Bos, L., Hampton, R., and Makkouk, K. 1988. Viruses and virus diseases of pea, lentil, faba bean and chickpea. World crops: Cool season food legumes, Springer, pp. 591-615.

4. Chen, T.C., Li, J.T., Lin, Y.P., Yeh, Y.C., Kang, Y.C., Huang, L.H., and Yeh, S.D. 2012. Genomic characterization of Calla lily chlorotic spot virus and design of broad-spectrum primers for detection of tospoviruses. Plant Pathology, 61: 183-194.

5. Choi, S.K., Choi, J.K., Park, W.M., and Ry, K.H. 1999. RT–PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. Journal of Virological Methods, 83(1): 67-73.

6. Crowther, J.R. 2001. The ELISA guidebook. Humana Press, p 421.

7. Farzadfar, S., Golnaraghi, A., and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Saman Company, p 203.

8. Farzadfar, S.H., and Izadpanah, K. 2002. Sours and characterization of Iranian isolate of *Pea enation mosaic virus*. Plant Disease, 37: 9-15.

9. Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V., and Martelli, G. 2000. Molecular detection of olive viruses. EPPO Bulletin, 30(3-4): 469-473.

10. Ha, C., Coombs, S., Revill, P., Harding, R.M., Vu, M., and Dale, J.L. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Archive of Virology, 153(1): 25-36.

11. Hampton, R. 1975. The nature of bean yield reduction by bean yellow and bean common mosaic virus. Phytopathology, 65(12): 1342-1346.

12. Hull, R. 2009. Comparative plant virology (2nd Ed). Academic Press, 376 p.

13. Izadpanah, K. 1983. An annotated list of virus and virus-like diseases of plants in Fars. Shiraz University, Shiraz, Iran, 171 p.

14. Izadpanah, K., Dehlavi, A., and Saffarian, A. 1969. Effect of time of mosaic infection on the yield of broad-beans. Iranian Journal of Plant Pathology, 5(1): 3-4.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Kaiser, W., Danesh, D., Okhovat, M., and Mossahebi, H. 1968. Diseases of pulse crops (edible legumes) in Iran. Plant Disease Report, 52(9): 687-689.

16. Karasev, A.V., Nikolaeva, O.V., Koonin, E.V., Grumpf, D.J., and Garnsey, S.M. 1994. Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. Journal of Geneneral Virology, 75: 1415-1422.

17. Makkouk, K., Bos, L., Azzam, O., Koumari, S., and Rizkallah, A. 1988. Survey of viruses affecting faba bean in six Arab countries. Arab Journal of Plant Protection, 6(1): 53-61.

18. Mansourpour, M., Massah, A., Ahoonmanesh, A., and Lak, M.R. 2010. Detection and determination of certain molecular properties of *Faba bean necrotic yellows virus* in central and western provinces of Iran. Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, p 769 (Abst.).

19. Robertson, N.L., French, R., and Gray, S.M. 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. Journal of General Virology, 72(6): 1473-1477.

20. Rohani, B. 2009. Study of some biological and molecular properties of *Bean yellow mosaic virus* from Faba bean in important fields of Faba bean from Iran. Master of Science Thesis. University of Tehran, Iran, pp:1-6.

21. Saiz, M., De Blas, C., Caraso, G., Fresno, J., Romero, J., and Castro, S. 1995. Incidence and characterization of bean common mosaic virus isolates in Spanish bean fields. Plant Disease, 79(1): 79-81.

22. Tapio, E. 1970. Virus diseases of legumes in Finland and in the Scandinavian countries. Annuales Agriculturae Fenniae, 9: 1-97.

23. Zheng, L., Rodoni, B., Gibbs, M., and Gibbs, A. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant pathology, 59(2): 211-220.

www.SID.ir