بررسی سرولوژیکی و مولکولی ویروس موزائیک معمولی لوبیا در استان زنجان

Serological and Molecular Study of Bean Common Mosaic Virus in Zanjan Province

الهام آهنگر مقتدر[۱]، امید عینی گندمانی[۲]، رحیم احمدوند[۳*] و عباس بهاری[۴]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۱

چکیده

ویروس موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*, BCMV) از مهم‌ترین عوامل بیماریزای لوبیا در سراسر جهان می‌باشد. این تحقیق به‌منظور ردیابی این ویروس از مزارع لوبیای استان زنجان انجام شد. برای این منظور، تعداد ۱۳۰ برگ از نمونه‌های لوبیا با علایم موزائیک، رگبرگ نواری، بد شکلی و قاشقی شدن از مزارع استان زنجان در سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری و توسط آزمون سرولوژیکی الایزا (DAS- ELISA) با استفاده از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای، آلودگی آنها به ویروس تأیید شد. جهت خالص‌سازی بیولوژیک، ویروس روی گیاه محک و سپس روی لوبیای رقم اختر مایه‌زنی و تکثیر شد. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده براساس توالی پروتئین پوششی، قسمتی از ژنوم ویروس تکثیر و توسط شرکت ماکروژن توالی‌یابی گردید. براساس نتایج آزمون الایزا بیش‌ترین میزان آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده مربوط به نمونه‌های مزارع دانشگاه زنجان و کمترین میزان آلودگی در مزارع سوکهریزی و نعلبندان مشاهده شد. نتایج مقایسه توالی بخشی از پروتئین پوششی با توالی سایر ویروس‌ها نشان داد که جدایه غالب این ویروس به جدایه ای از آفریقای جنوبی با رس شمار AF361337 شباهت بالایی (۹۹٪) دارد. همچنین ترسیم درخت فیلوژنتیک مربوط به توالی تعیین شده نشان داد، این جدایه ویروسی با سایر جدایه‌های گزارش شده از ایران در یک خوشه قرار می‌گیرند که بیانگر تنوع پایین این ویروس در یک محدوده خاص جغرافیایی است.

واژه‌های کلیدی: پوتی ویروس، لوبیا، الایزا، استان زنجان، BCMV

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۲. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۳. استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
۴. استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان، زنجان
*: نویسنده مسوول Email: ahmadvandra@gmail.com

مقدمه

حبوبات پس از غلات، مهم‌ترین منبع غذایی بشر را تشکیل داده و در این بین، لوبیا از مهم‌ترین حبوبات جهان محسوب می‌شود. لوبیا یکی از بهترین منابع پروتئین گیاهی و تولید انرژی برای انسان می‌باشد. سطح زیر کشت این محصول در ایران در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ حدود ۱۱۶ هزار هکتار و تولید آن ۲۲۶ هزار تن گزارش شده است. *بی‌نام* (Anonymous, 2014). استان‌های لرستان، مرکزی، چهارمحال و بختیاری، فارس، زنجان، اصفهان و آذربایجان شرقی مناطق مهم کشت این محصول در ایران می‌باشند. *دری* و همکاران (Dorri *et al*., 2008).

عوامل بیماریزای گیاهی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش راندمان و کیفیت این محصول هستند. لوبیا میزبان طبیعی تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی می‌باشد که در بین آنها پوتی ویروس‌ها (*Potyviruses*) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. ویروس موزائیک معمولی لوبیا (BCMV)(*Bean common mosaic virus*) از مهم‌ترین و شایع‌ترین ویروس‌های لوبیا بوده و در کلیه مناطق کشت این گیاه وجود دارد. در بررسی‌های انجام گرفته، ویروس موزائیک معمولی لوبیا از نظر میزان خسارت وارده مهم‌ترین ویروس خسارت‌زا در گیاه لوبیا شناخته شده و میزان کاهش محصول در اثر آلودگی به این ویروس بیش از ۶۸ و در مواردی تا ۸۰ درصد نیز گزارش شده است. *استراسبوگ* و همکاران؛ *ماوریک* و *ساستا وازلیک* (Strausbaugh *et al*., 2003; Mavric and Sustar-Vozlic, 2004).

ویروس موزائیک معمولی لوبیا اولین بار در سال ۱۹۱۷ از آمریکا توسط *دیریجفوت* (Drijfhout, 1991) از لوبیا گزارش شد. در ایران برای اولین بار از مزارع لوبیا در منطقه دماوند شناسایی شد. *نجفی* (Najafi, 1969). بررسی‌های بیشتر نشان داد ویروس موزائیک معمولی لوبیا در اکثر مناطق کشت لوبیا در ایران وجود داشته و از عوامل اصلی کاهش عملکرد محصول در ایران است. *شهرآیین* و همکاران (Shahraeen *et al*., 2001). این ویروس به‌صورت مکانیکی و توسط شته (عمدتاً شته سبز هلو، *Myzus persicae*)، دانه گرده و بذور آلوده منتقل می‌شود.

حدود ۱۰ نژاد از این ویروس در دنیا گزارش شده که بسته به رقم گیاه و نژاد ویروس، علایم متفاوتی در گیاه ایجاد می‌کنند. این علائم شامل موزائیک، رگبرگ نواری، قاشقی شدن برگ‌ها، نکروز رگبرگ و نکروز آوندی در طول ریشه و ساقه (Black root) هستند. BCMV دارای دو سروتیپ A و B بوده که در حال حاضر به‌عنوان دو گونه متفاوت معرفی شده‌اند. سروتیپ A به‌عنوان گونه (BCMNV) *Bean common mosaic necrosis virus* معرفی گردید. BCMNV روی ژنوتیپ‌های حامل ژن مقاومت غالب *I* در دمای بالا و پایین روی ارقام لوبیا ایجاد نکروز سیستمیک کشنده می‌کند. درصورتی‌که سروتیپ دیگر که به‌عنوان گونه BCMV معرفی شده تنها علائم موزائیک ایجاد می‌کند. *سیلبرناگل* و همکاران (Silbernagel *et al*., 2001).

معمولاً برای کنترل بیماری حاصل از BCMV استفاده از بذور عاری از ویروس و همچنین کاربرد ارقام مقاوم توصیه می‌گردد، بنابراین به دلیل بذربرد بودن این ویروس در لوبیا و عدم وجود بذور گواهی شده عاری از ویروس در کشور، انتقال آن از طریق بذر به مناطق مختلف با سهولت صورت گرفته و کنترل آن را عملاً غیرممکن می‌کند. علاوه‌بر این با توجه به انتقال این ویروس توسط شته، امکان استفاده از روش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری از طریق کنترل ناقل دشوار است و به‌کارگیری ارقام مقاوم، مؤثرترین روش برای کاهش خسارت ناشی از ویروس BCMV شناخته شده است.

در استان زنجان تاکنون بررسی جامعی در زمینه پراکنش ویروس موزائیک معمولی لوبیا صورت نگرفته و تنها سالاری و همکاران (Salari *et al*., 2013) وجود این ویروس در این استان را با کمک روش‌های سرولوژیک گزارش کرده است. با توجه به اهمیت کشت لوبیا در استان زنجان و نیز اهمیت بیماری ناشی از ویروس موزائیک معمولی لوبیا، این تحقیق با هدف بررسی جامع‌تر میزان آلودگی برخی از مزارع لوبیا به ویروس موزائیک معمولی لوبیا در استان زنجان با استفاده از روش الایزا و هم‌چنین شناسایی دقیق با تعیین توالی بخشی از ژنوم جدایه غالب در منطقه انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی نمونه‌برداری‌های انجام شده در تابستان ۹۳ مجموعاً ۱۳۰ نمونه برگ از نمونه‌های دارای علائم موزائیک، رگبرگ نواری، بدشکلی و قاشقی شدن از مزارع لوبیای استان زنجان جمع‌آوری شد. از هر مزرعه تعداد ۱۰ نمونه جمع‌آوری و پس از ثبت علائم، نوع رقم‌های کشت شده، محل نمونه‌برداری و عکس‌برداری، در کیسه‌های پلاستیکی جداگانه به‌همراه مشخصات محل، نوع علائم و تاریخ نمونه‌برداری در شرایط خنک روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند، با توجه به هدف تحقیق نمونه‌های دارای علائم ویروس موزائیک معمولی لوبیا شامل موزائیک، رگبرگ نواری، بدشکلی و قاشقی شدن

جمع‌آوری گردید. مناطق نمونه‌برداری، نوع لوبیا و علائم نمونه‌ها در جدول (۱) ارائه شده است.

جدول ۱: مشخصات گیاهان نمونه‌برداری شده همراه با مناطق نمونه‌برداری شده و تعداد نمونه‌ها و علائم آن‌ها

Table 1: The details for collected samples including sampling areas, number of samples, cultivars and symptoms

محل جمع‌آوری Sampling areas	تعداد نمونه Number of samples	نوع محصول Cultivar	علائم Symptoms
خنداب Khandab	10	لوبیا قرمز Red beans	بدشکلی، کلروزه شدن Leaf deformation, chlorotic spot
خنداب Khandab	10	لوبیا قرمز Red beans	موزائیک، کلروزه شدن Mosaic, chlorotic spot
قیدار Gheidar	10	لوبیا سبز Snap bean	موزائیک، رگبرگ نواری، بدشکلی Mosaic, vein stripe, leaf deformation
نعلبندان Nalbandan	10	لوبیا قرمز Red beans	موزائیک، رگبرگ نواری Mosaic, vein stripe
نعلبندان Nalbandan	10	لوبیا سفید White beans	موزائیک، کلروزه شدن، رگبرگ نواری Mosaic, chlorotic spot, vein stripe
دو تپه نسلی Dotappe Nasli	10	لوبیا سفید White beans	بدشکلی، کلروزه شدن Leaf deformation, chlorotic spot
دو تپه نسلی Dotappe nasli	10	لوبیا سبز Snap bean	رگبرگ نواری، کلروزه شدن Vein stripe, chlorotic spot
خیرآباد Kheir abad	10	لوبیا سفید White beans	موزائیک، کلروزه شدن Mosaic, chlorotic spot
خیرآباد Kheir abad	10	لوبیا چیتی Wax bean	موزائیک، رگبرگ نواری Mosaic, vein stripe
پیرسقا Pirsagha	10	لوبیا چیتی Wax bean	موزائیک، کلروزه شدن، بدشکلی Mosaic, chlorotic spot, leaf deformation
صائین قلعه Saean ghale	10	لوبیا سفید White beans	کلروزه شدن، بدشکلی Chlorotic spot, leaf deformation
خرمدره Khoramdare	10	لوبیا سفید White beans	موزائیک، بدشکلی Mosaic, leaf deformation
دانشگاه زنجان Zanjan university	10	لوبیا چیتی Wax bean	موزائیک، کلروزه شدن Mosaic, chlorotic spot

جدول ۲: نام و توالی آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی اختصاصی ویروس موزائیک معمولی لوبیا

Table 2: Name and the sequence of specific oligonucleotide primers for *bean common mosaic virus*

آغازگر Primer	اندازه Size	توالی Sequence (5´-3´)
SHRbcmv F	21	GAATGGCTTTATGGTGTGGTG
SHRbcmv R	21	AATGGTTCTTCCGGCTTACTC

تعیین آلودگی با روش سرولوژیکی

جهت تعیین آلودگی نمونه‌های لوبیا به ویروس BCMV از آزمون DAS-ELISA توسط آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای (تهیه شده از شرکت Bioreba) براساس روش *کلارک* و *آدامز* (Clark and Adams, 1977) استفاده گردید.

پس از کسر میزان جذب چاهک کنترل (Blank)، میانگین جذب نوری شاهدهای منفی در طول موج ۴۰۵ نانومتر را محاسبه کرده و دو برابر آن به‌عنوان حد آلودگی در نظر گرفته شد و نمونه‌هایی که میزان جذب نوری چاهک آن‌ها بالاتر از حد آلودگی بود به‌عنوان نمونه آلوده تلقی شدند.

خالص‌سازی بیولوژیک ویروس

جهت خالص‌سازی بیولوژیک ویروس پس از عصاره‌گیری گیاهان آلوده به ویروس در بافر فسفات پتاسیم یک دهم مولار، عصاره آماده شده با استفاده از پودر کربوراندوم ۶۰۰ mesh به‌صورت مکانیکی به روش *پاسو* و همکاران (Pasev *et al.*, 2013) روی گیاه سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa*) مایه‌زنی

شد و جدایه خالص شده از تک لکه‌های به‌وجود آمده روی گیاه سلمه‌تره روی رقم حساس اختر مایه‌زنی شده و در شرایط گلخانه‌ای تکثیر گردید. علائم موزائیک و قاشقی شدن در برگ های رقم حساس اختر بعد از ۲۰ روز قابل مشاهده بود. جهت اطمینان از وجود ویروس در بوته‌های تکثیری آزمون الایزا مجدداً انجام شد.

تکثیر و تعیین توالی بخشی از ژنوم ویروس BCMV

جهت تأیید وجود ویروس مورد نظر و نیز مقایسه توالی بخشی از ژنوم این ویروس با سایر جدایه‌های گزارش شده، از گیاهانی که در تست الایزا مثبت بودند، سه نمونه برگ آلوده جهت انجام واکنش نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) با آغازگر اختصاصی BCMV استفاده گردید.

استخراج آران‌ای و سنتز دی‌ان‌ای مکمل

از گیاهان آلوده به ویروس، آران‌ای کل توسط بافر استخراج RNX-PLUS (شرکت سیناکلون) و طبق دستورالعمل شرکت مربوطه استخراج و غلظت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل Nano Drop 2000 ساخت شرکت Thermo Scientific آمریکا) محاسبه شد.

برای سنتز cDNA نیز از کیت RT PreMix (تهیه شده از شرکت Gene all کره‌جنوبی) که حاوی مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA بود، استفاده شد. اجزای مخلوط واکنش RT شامل ترانسکریپتاز برگشتی راکت اسکریپت به مقدار ۲۰۰ واحد (Rocket Script Reverse Transcriptase)، بافر واکنش ۵X (Reaction Buffer)، دیتیوتریتول ۰/۲۵ میلی‌مولار (Dithiothreitol, DTT: 0.25 mM)، دی.ان.تی.پی ۲۵۰ میکرومولار برای هر یک (dNTP: 250 µM each)، ممانعت‌کننده از آران‌ایز یک واحد (RNase Inhibitor: 1 U)، آران‌ای ۱۹ میکرولیتر (RNA: 19µl) با یکدیگر ترکیب شده و واکنش RT جهت تولید cDNA ابتدا به‌مدت یک ساعت در ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام گردید.

طراحی آغازگر و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با رونویسی معکوس

به‌منظور ردیابی ویروس و هم‌چنین تعیین توالی بخشی از ژنوم ویروس موزائیک معمولی لوبیا واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با رونویسی معکوس انجام شد. آغازگر اختصاصی BCMV براساس بخشی از توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی ویروس ((Coat Protein (CP)) با استفاده از نرم‌افزار CLC-Genomics طراحی شد که در طی RT-PCR قطعه‌ای به طول ۶۵۵ جفت باز را تکثیر می‌نماید. جفت آغازگر طراحی‌شده (جدول ۲) از شرکت میکروژن کره‌جنوبی تهیه شد.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) (مدل ASTEC PC-320) و هم‌چنین مسترمیکس (Mastermix) آماده (تهیه شده از شرکت سیناژن) و جفت آغازگر (Primer) اختصاصی طراحی شده برای ویروس BCMV استفاده شد. اجزای مخلوط واکنش PCR (دو میکرولیتر از Template cDNA (۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، یک میکرولیتر از آغازگرها (پنج میکرومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از 2x مسترمیکس، ۸/۵ میکرولیتر از H_2O) ترکیب شده و آزمون PCR با واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه و تعداد ۳۵ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، بسط زنجیره در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۵ ثانیه و بسط نهایی زنجیره در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه انجام گردید. محصول نهایی حاصل از RT-PCR در ژل آگارز یک درصد در بافر 1x TBE با استفاده از الکتروفورز تفکیک گردید.

توالی‌یابی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

جهت تعیین توالی قطعه دی‌ان‌ای تکثیر شده، ابتدا محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ژل با راهک بزرگ ران شد و قطعه دی‌ان‌ای هدف با اندازه ۶۵۵ جفت‌باز زیر نور UV از ژل برش داده شده قطعه ژل حاوی دی‌ان‌ای برای خالص‌سازی توالی‌یابی به شرکت ماکروژن (کره‌جنوبی) ارسال شد. این توالی توسط نرم‌افزار Bioedit ویرایش گردید.

برای بررسی نتایج توالی‌یابی از سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) استفاده شد که توالی‌ها در بخش BLAST سایت اشاره شده در قسمت Nucleotide blast قرار داده شدند و توالی‌های مشابه تعیین گردید.

ترسیم درخت فیلوژنتیک

پس تعیین توالی قطعه دی‌ان‌ای تکثیر شده، جهت ترسیم درخت فیلوژنتیک این توالی به همراه چندین توالی گزارش شده از نقاط مختلف جهان و به‌ویژه ایران ابتدا با الگوریتم ClustalW هم‌ردیف شده و سپس با روش Neighbor-joining و با ۱۰۰۰ بوت استرپت با کمک نرم‌افزار MEGA 6 ترسیم شد

(شکل ۳). از ویروس زردی رگبرگ خیار (*Cucumber vein yellowing virus*) به‌عنوان جدایه بیرونی (Out-group) استفاده شد.

نتایج و بحث

ردیابی ویروس موزائیک معمولی لوبیا با کمک آزمون الایزا

از بین ۱۳۰ گیاه لوبیای مشکوک به آلودگی جمع‌آوری شده از مزارع مختلف، میزان آلودگی هر یک از مزارع با استفاده از آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA، تعیین گردید (جدول ۳ و نمودار ۱). نتایج این بررسی نشان داد که مزارع دانشگاه زنجان بیش‌ترین میزان آلودگی (۷۰٪) را نسبت به سایر مزارع مورد بررسی داشت.

جدول ۳: تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده و تعداد نمونه‌های آلوده در هر مزرعه

Table 3: The number of samples collected and the number of infected samples in bean fields

محل جمع‌آوری Sampling areas	نوع محصول Cultivar	تعداد نمونه Number of samples	تعداد نمونه آلوده Infected samples
خنداب Khandab	لوبیا قرمز Red beans	10	5
خنداب Khandab	لوبیا قرمز Red beans	10	4
قیدار Gheidar	لوبیا سبز Snap bean	10	2
نعلبندان Nalbandan	لوبیا قرمز Red beans	10	4
نعلبندان Nalbandan	لوبیا سفید White beans	10	2
دو تپه نسلی Dotappe Nasli	لوبیا سفید White beans	10	1
دو تپه نسلی Dotappe nasli	لوبیا سبز Snap bean	10	4
خیرآباد Kheir abad	لوبیا سفید White beans	10	3
خیرآباد Kheir abad	لوبیا چیتی Wax bean	10	6
پیرسقا Pirsagha	لوبیا چیتی Wax bean	10	6
صائین قلعه Saean ghale	لوبیا سفید White beans	10	1
خرمدره Khoramdare	لوبیا سفید White beans	10	2
دانشگاه زنجان Zanjan university	لوبیا چیتی Wax bean	10	7

جدول ۴: مشخصات توالی‌های استفاده شده در درخت فیلوژنتیک
Table 4: The detail of sequences used in the phylogenetic tree

جدایه Isolate name	رس شمار GenBank Accession number	موقعیت Location/Province*	منبع Reference
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه گلستان BCMV [IR: Golestan]	KF670145.1	ایران Iran	(*مصطفوی*، 2014) (Mostafavi, 2014)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه نیشابور۹ BCMV [IR: Neishabour]	KC969192.1	ایران Iran	(*موسوی* و همکاران، 2014) (Musavi *et al*., 2014)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه نیشابور۴ BCMV [IR: Neishabour4]	KC969189.1	ایران Iran	(*موسوی* و همکاران، 2014) (Musavi *et al*., 2014)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه نیشابور۱ BCMV [IR: Neishabour1]	KC969188.1	ایران Iran	(*موسوی* و همکاران، 2014) (Musavi *et al*., 2014)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه کرج BCMV [IR: Karaj]	KC969186.1	ایران Iran	(*موسوی* و همکاران، 2014) (Musavi *et al*., 2014)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا استرین F-1 BCMV [IR: Fars: F-1]	KC702884.1	ایران Iran	(*سیاحی* و همکاران، 2010) (Sayyahi *et al*., 2010)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه ۹۳/۶۵ BCMV [ZA: 93/65]	AF361337.1	افریقای جنوبی South Africa	(*جوست* و همکاران، 2003) (Jooste *et al*., 2003)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا BCMV [AU: Prec]	DQ054366.1	استرالیا Australia	(سکیب و همکاران، 2005) (Saqib *et al*., 2005)
ویروس زردی رگبرگ خیار Cucumber vein yellowing virus [ES: Jor]	NC006941.1	اسپانیا Spain	(*جانسون* و همکاران، 2005) (Janssen *et al*.,2005)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه RU1-P BCMV [US: RU1-P]	KF919300.1	امریکا USA	(*فنگ* و همکاران، 2014) (Feng *et al*., 2014)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه RU1 BCMV [US: RU1]	GQ219793.1	امریکا USA	(*نادرپور* و همکاران، 2009) (Naderpour *et al*., 2009)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه CD012 BCMV [CN: CD012]	KJ807801.1	چین China	(*ژو* و همکاران، 2014) (Zhou *et al*., 2014)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه MS1 BCMV [Au: MS1]	EU761198.1	استرالیا Australia	(سکیب و همکاران، 2010) (Saqib *et al*., 2010)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا BCMV [AU]	AH015028.1	استرالیا Australia	(سکیب و همکاران، 2005) (Saqib *et al*., 2005)
ویروس موزائیک معمولی لوبیا جدایه CD031 BCMV [CN: CD031]	KM051430.1	چین China	(*ژو* و همکاران، 2014) (Zhou *et al*., 2014)

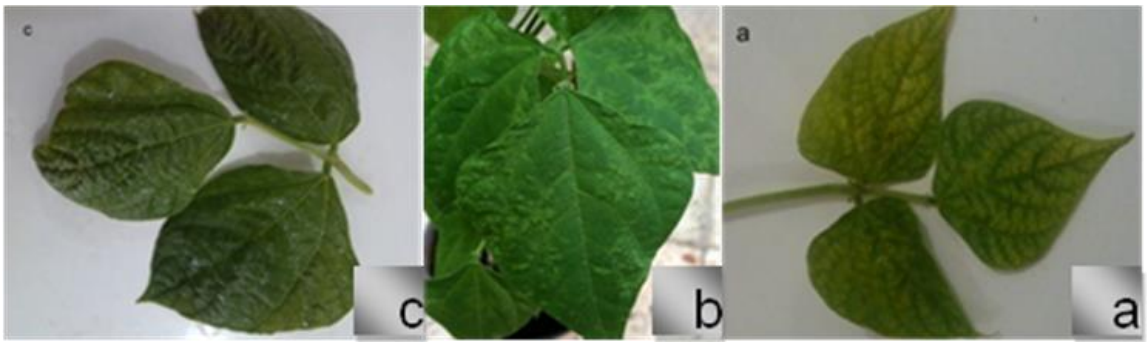
مهم‌ترین عامل بیماریزای ویروسی جمع‌آوری شده از مزارع لوبیا کرج و شیراز نیز ویروس موزائیک معمولی لوبیا بوده است، هرچند عامل ویروسی دیگری از قبیل ویروس موزائیک زرد لوبیا و ویروس زردی لوبیا نیز در مواردی دیده شده است (سالاری و همکاران، ۱۳۹۲). هم‌چنین از مجموع ۱۸۵ نمونه جمع‌آوری شده از مزارع مختلف مناطق مشهد و چناران، تعداد ۳۹ نمونه به ویروس موزائیک معمولی لوبیا آلوده بودند. *برادران* و *جعفرپور* (Baradaran and Jafarpour, 1998).

براساس نتایج حاصل از آزمون الایزا ژنوتیپ‌های قرمز، چیتی و سبز میزان آلودگی بیشتری نسبت به ارقام سفید نشان دادند، به‌طوری‌که درصد آلودگی به BCMV در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، در ژنوتیپ‌های چیتی، قرمز، سفید و سبز به‌ترتیب ۶۳/۳٪، ۴۳/۳٪، ۱۸٪ و ۳۰٪ تعیین گردید. این نتایج با یافته‌های *پیمبری* و همکاران (Peyambari *et al*., 2011) که در آن براساس نتایج حاصل از آزمون الایزا درصد آلودگی به BCMV در ژنوتیپ چیتی ۶۵/۴٪، ژنوتیپ قرمز ۵۸/۱٪ و ژنوتیپ سفید ۳/۶٪ تعیین شده است، مطابقت دارد. بنابراین احتمالاً ارقام لوبیای چیتی و قرمز بیش‌ترین حساسیت را به این ویروس نشان می‌دهند. درحالی‌که رقم سفید کم‌ترین میزان آلودگی و حساسیت را به این بیماری نشان دادند.

گیاهان آلوده به ویروس موزائیک معمولی لوبیا دارای علائم موزائیک، قاشقی شدن، بدشکلی و رگبرگ نواری بودند (شکل

۱). این علائم هم‌چنین توسط *مصاحبی محمدی* (Mosahebi, 1972)؛ *برادران* (Baradaran, 1997)؛ *بهرامی کمانگر* (Bahrami Kamangar, 1998)؛ *نادرپور* (Naderpour, 1999)؛ *هاشمی* (Hashemi, 1999) و *دیریجفوت* (Drijfhout, 1978, 1991) در گیاهان لوبیای آلوده به این ویروس گزارش شده است.

علائم به‌صورت زرد- سبز کمرنگ و سبز تیره در برگ‌ها در مرحله سه برگی پدیدار می‌شود. رنگ پریدگی برگ‌ها اغلب با چروکیدگی، تاولی شدن، بدشکلی و لوله‌ای شدن و پیچیدن برگ به سوی پایین و داخل برگ همراه است. شدت علائم، به نژاد ویروس، رقم و سن گیاه بستگی دارد. گیاهی که در مراحل اول رشد و سن جوان گیاه آلوده شود ممکن است که از رشد باز مانده و بدشکل شود. *کلی* (Kelly, 1997).



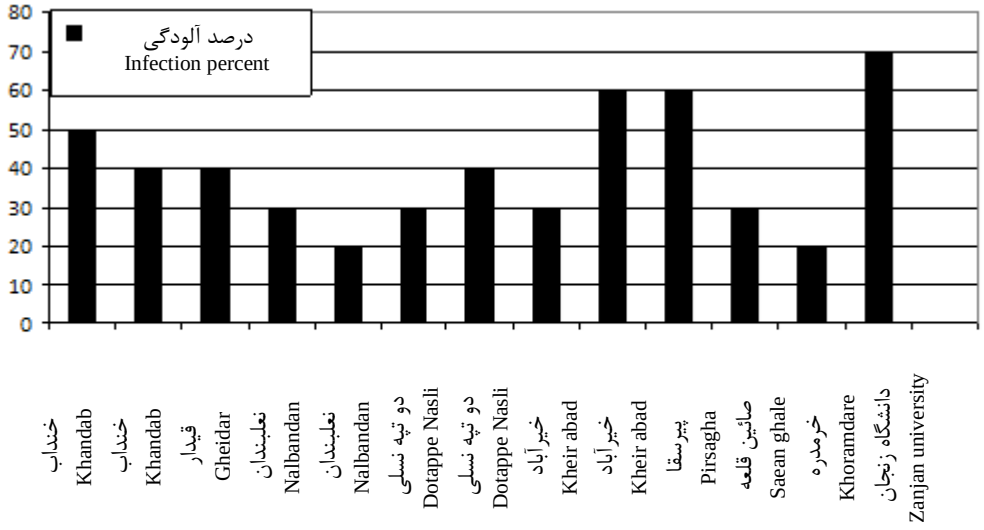
شکل۱: علائم ناشی از آلودگی به ویروس موزائیک معمولی لوبیا a) رگبرگ نواری b) موزائیکی شدن c) بدشکلی برگ
Fig. 1: The symptoms of BCMV infection in common bean a) vein banding, b) mosaic, c) leaf deformation

خالص‌سازی بیولوژیک ویروس

ویروس BCMV در انتقال مکانیکی در شرایط گلخانه‌ای روی *C. quinoa* قابلیت انتقال داشته و علائم مشخصی نشان داد.

پس از خالص‌سازی بیولوژیک ویروس روی گیاه محک، نتایج تست بیماریزایی ایزوله‌های خالص شده روی رقم حساس اختر توسط تست الایزا نشان داد که تمامی ایزوله‌ها توانایی ایجاد علائم و آلودگی سیستمیک در ارقام حساس را دارند.

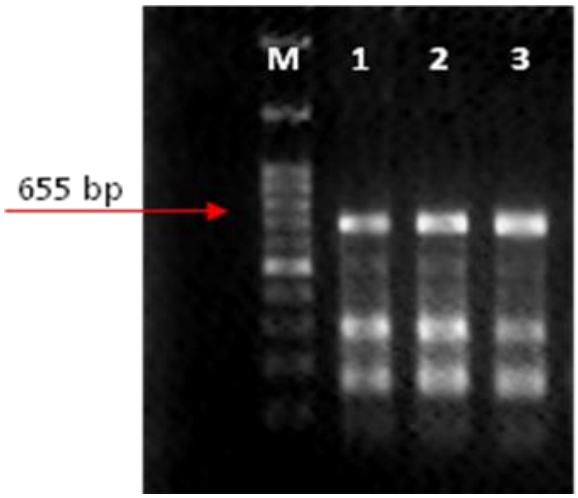
در صورت وجود ویروس BCMV، میزبان‌ها لکه‌های موضعی کلروتیک و نکروتیک نشان می‌دهند. البته وقوع این واکنش در *C. quinoa* بستگی به نژاد ویروس دارد (*دیریجفوت*، 1978). به این صورت که این ویروس در گونه‌های میزبان حساس مانند *C. quinoa* علایمی نظیر، زخم‌های منطقه‌ای با کلروتیک ضعیف که درون حلقه‌های سبز گسترش پیدا می‌کند، را ایجاد می‌کنند (*دیریجفوت*، 1978).



نمودار ۱: درصد آلودگی مزارع مختلف استان زنجان به ویروس موزائیک معمولی لوبیا بر اساس نتایج آزمون الایزا
Chart 1: Disease incidence of *Bean common mosaic virus* in different fields of Zanjan province based on the ELISA test results

تعیین توالی بخشی از ژنوم BCMV

طی این بررسی ویروس موزائیک معمولی لوبیا در تعدادی از نمونه‌های آلوده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از مزارع استان زنجان ردیابی گردید. نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت آغازگر SHRbcmv F و SHRbcmv R تکثیر قطعه‌ای از دی‌ان‌ای با اندازه ۶۵۵ جفت‌باز (شکل ۲) در نمونه‌های تست شده بود که مرتبط با بخشی از پوشش پروتئینی BCMV می‌باشد که آلودگی نمونه‌های الایزا مثبت را به ویروس BCMV تأیید نمود.



شکل۲: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نمونه‌های لوبیا با استفاده از جفت آغازگر SHRbcmv F و SHRbcmv R، راهک‌ها به‌ترتیب مارکر دی‌ان‌ای و سه نمونه لوبیا با نتایج الایزا مثبت می‌باشند

Fig. 2: Electrophoretic pattern of the PCR products forn bean samples using specific primers, SHRbcmv F and SHRbcmv R. Lanes representing DNA ladder and three positive bean samples by ELISA

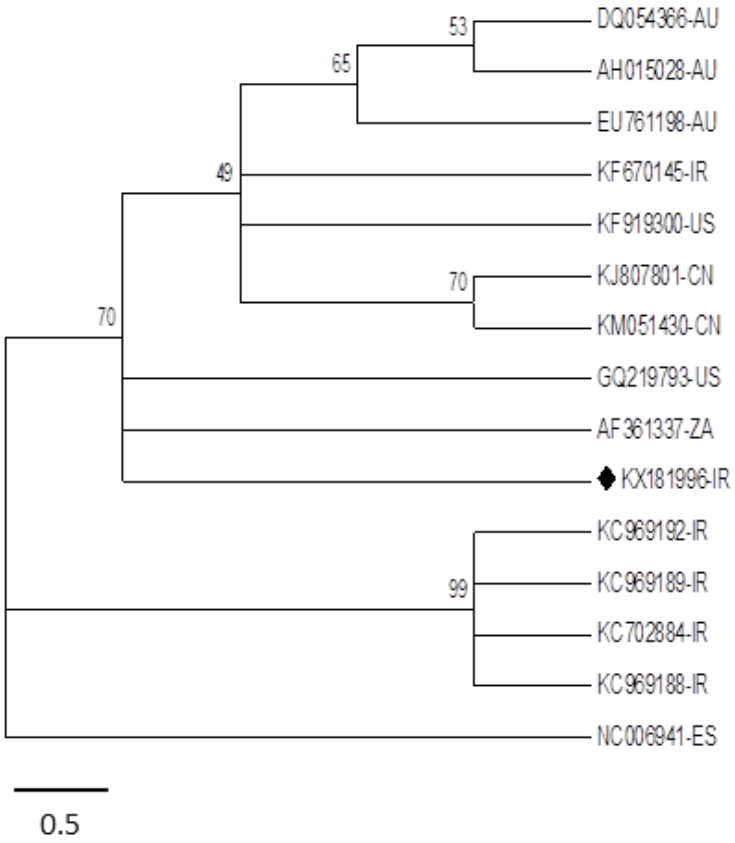
توالی‌یابی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

توالی‌یابی قطعه ۶۵۵ جفت‌بازی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت آغازگرهای SHRbcmv F و SHRbcmv R در نمونه اختر نشان داد که توالی خوانده شده مربوط به ویروس موزائیک معمولی لوبیا می‌باشد. این توالی در بانک ژن با رس شمار KX181996 ثبت گردید.

نتیجه بلاست در NCBI هم‌چنین نشان داد که توالی تعیین شده با ژنوم ویروس موزائیک معمولی لوبیا با جدایه‌ای از لوبیا با رس شمار AF361337 و گزارش شده توسط *جوست* و همکاران (Jooste *et al*., 2003) از آفریقای جنوبی ۹۹ درصد شباهت دارد. هم‌چنین با ژنوم ویروس موزائیک معمولی لوبیا ایزوله گلستان جمع‌آوری شده توسط *مصطفوی نیشابوری* و همکاران (Mostafavi *et al*., 2014) از ایران (KF670145.1) ۹۳ درصد شباهت دارد که بیانگر تنوع ژنومی این ویروس در نقاط مختف دنیا و نیز ایران می‌باشد.

بررسی ارتباط فیلوژنتیک جدایه ویروس موزائیک معمولی لوبیا

ترسیم درخت نشان داد که این جدایه مورد مطالع در این تحقیق (KX181996) با جدایه‌هایی از آفریقای‌جنوبی و آمریکا بیش‌ترین شباهت را دارد و به‌همراه جدایه‌ای از لوبیا در استان گلستان (KF670145) در یک گروه فیلوژنتیکی قرار دارد. سایر جدایه‌های گزارش شده این ویروس از لوبیا در ایران با رس شمار KC702884 از استان فارس و نیز رس شمارهای KC969192، KC969189 و KC969188 از استان خراسان رضوی در یک گروه مجزا قرار گرفتند که بیانگر تنوع بالای این ویروس در ایران است. بررسی تنوع ژنتیکی ویروس BCMV در استان خراسان‌رضوی توسط *موسوی* و همکاران (Musavi, *et al*., 2014) نیز تأییدکننده تنوع بالای این ویروس و قرار گرفتن جدایه های ایرانی در گروه‌های مختلف می‌باشد.



شکل ۳: درخت فیلوژنتیک مربوط به توالی‌های همردیف شده جدایه های ویروس موزائیک معمولی لوبیا از لوبیا در نواحی مختلف جغرافیایی، جدایه KX181996 مربوط به توالی تعیین شده در این تحقیق می‌باشد که با علامت مربع تیره مشخص شده است

Fig. 3: Phylogenetic tree for the aligned sequences of *Bean common mosaic virus* isolates from common bean in various geographic regions. The KX181996 represents the isolated virus in this study as indicted by a dark rectangle

شیوع این ویروس در تمام مزارع مورد مطالعه در استان زنجان و همچنین سایر مناطق لوبیا کاری کشور از جمله منطقه دماوند، *نجفی* (1969)، کرج و شیراز، سالاری و همکاران (۱۳۹۲)، فارس، *بهرامی کمانگر* (1998)، تهران، *نادرپور* (1999)، فارس، *هاشمی* (1999)، مشهد و چناران، *برادران و جعفرپور* (1998) و استان‌های فارس، کهگیلویه و بویر احمد، اصفهان و تهران، *پیمبری* و همکاران (2011) می‌تواند به دلیل بذرزاد بودن این ویروس باشد که نقش مهمی در پراکنش ویروس در مناطق آلوده دارد. از طرف دیگر، استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل یا با حساسیت کمتر مثل ارقام سفید که در این تحقیق میزان آلودگی کمتری نشان دادند یکی از مؤثرترین و کم هزینه‌ترین روش‌های کنترل این بیماری است.

سپاس‌گزاری

تحقیق حاضر به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول و پروژه مصوب مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر با شماره ۹۳۲۰۴-۰۳-۰۳-۲ است که تحت راهنمایی نگارنده دوم و نگارنده سوم در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و دانشگاه زنجان انجام شده است. نگارندگان لازم می‌دانند از مساعدت‌های مسئولان محترم این مؤسسه و نیز دانشگاه زنجان قدردانی نمایند.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.