

شناسایی ویروس های بذربرد مزارع باقلای استان خوزستان

محمدحسن رستگار^۱، مسعود شمس بخش^{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 بیماری شناسی 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 می رود و به عنوان منبع پروتئینی برای تغذیه انسان، دام و طیور و نیز در تثبیت نیتروژن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. عارضه ای مشکوک به بیماری ویروسی با علائم موزائیک، پیچیدگی و بدشکلی برگ و ساقه سال های متعددی در مزارع باقلای استان خوزستان مشاهده شد. نتایج بررسی بذربرد بودن عارضه نشان داد که عامل/عوامل عارضه یاد شده بذربرد می باشد. از این رو هدف از انجام این پژوهش شناسایی ویروس (های) مهم بذربرد مزارع باقلای استان خوزستان می باشد. به این منظور پس از نمونه برداری، عصاره گیاهان دارای علائم مشکوک به بیماری ویروسی به ۲۲ گونه گیاه آزمون به روش مکانیکی مایه زنی شد، سپس نمونه ها با استفاده از آزمون سرولوژیکی الایزا و کاربرد ۱۵ آنتی بادی علیه ویروس های بذربرد باقلا ارزیابی شدند و در نتیجه آلودگی آن ها به ویروس موزائیک معمولی لویا (*Bean common mosaic virus, BCMV*)، ویروس نکروز موزائیک معمولی لویا (*Bean common mosaic virus, BCMV*)، ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus, CMV*) محرز شد. نتایج سرولوژی پس از استخراج آران ای کل و انجام واکنش آر تی - پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جنس پوتی ویروس (*Nib2F/Nib3R*) و ویروس موزائیک خیار (*CMVF/CMVR*) تایید و قطعه های مورد انتظار به ترتیب به اندازه های ۳۵۰ و ۵۲۰ جفت باز تکثیر شد. نتایج این پژوهش نشان داد مزارع باقلای استان خوزستان دست کم به سه ویروس بذربرد شامل *CMV*، *BCMV* و *BCMNV* آلوده بودند. این اولین گزارش از وقوع آلودگی باقلا به *BCMV* و *BCMNV* در ایران می باشد.

کلید واژه ها: ویروس، باقلا، *CMV*، *BCMV*، *BCMNV*

مقدمه

خوزستان یکی از مهم ترین استان های تولیدکننده باقلا (*Vicia faba* L.) در کشور است. ویروس ها از عوامل مهم آلوده کننده گیاهان هستند که از لحاظ اهمیت اقتصادی و ایجاد خسارت پس از قارچ ها در مقام دوم قرار دارند (هال^۱، ۲۰۰۹). تاکنون بیش از ۱۱۰ گونه از ویروس های گیاهی از باقلا گزارش شده است

از (<http://WWW.PlantVirusesOnline>).

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

علائم واضح موزائیک سبز یا زرد و معمولا بدون تغییر شکل برگ ها در گیاهان آلوده مشاهده می شود. 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 برگ های 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 آلودگی های ویروسی باقلا هستند (www.dpv.net).

طی سال های متمادی عارضه ای مشکوک به بیماری ویروسی با علائم موزائیک، پیچیدگی و بدشکلی برگ و ساقه در مزارع باقلای استان خوزستان مشاهده شد (شمس بخش، مشاهدات شخصی). این علائم با علایم گزارش شده برای ویروس های شناخته شده باقلا تطابق کامل نداشت. از آنجایی که اولین قدم اساسی برای ارائه راهکار مناسب مدیریتی، شناسایی عامل/عوامل بیماری است و وقوع بیماری های ویروسی و پراکندگی آن در مناطق مهم کشت می تواند 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

همکاران، ۱۹۶۸؛ بهجت نیا و ایزدپناه^۱، ۱۹۹۴) ویروس موزائیک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) (کایزر و همکاران، ۱۹۶۸؛ روحانی^۲، ۲۰۰۹)، ویروس پژمردگی باقلا (*bean wilt virus*, BBWV) (اصغری قرا و همکاران^۳، ۲۰۰۸؛ ایزدپناه، ۱۹۸۳)، ویروس موزائیک توت ای نخود (*Pea enation mosaic virus*) (فرزادفر و ایزدپناه، ۲۰۰۲؛ ایزدپناه و همکاران، ۱۹۶۹) و ویروس زردی نکروتیک باقلا (*Faba bean necrotic yellows virus*) (منصورپور و همکاران^۴، ۲۰۱۰) گزارش شده است. در این میان ویروس های 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 ویژه ای در بین ویروس های حبوبات برخوردار هستند و گزارش های متعددی از وقوع این دو ویروس و به ویژه ویروس موزائیک معمولی لوبیا از مزارع حبوبات جهان و ایران در دست است (باس و همکاران^۵، ۱۹۸۸؛ همپتون^۶، ۱۹۷۵؛ مکوک و همکاران^۷، ۱۹۸۸؛ سائز و همکاران^۸، ۱۹۹۵؛ تاپیو^۹، ۱۹۷۰)، تاکنون گزارشی از وقوع آنها در مزارع باقلای ایران وجود ندارد.

دراثر آلودگی بوته های باقلا به ویروس موزائیک زرد لوبیا علائمی همچون کلروز رگبرگ ها همراه با

- 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

استان خوزستان و تعیین ویژگی‌های بیولوژیک آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

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 نمونه برداری شد. نمونه‌ها در کیسه پلاستیکی قرار داده شدند و پس از کدگذاری، ثبت تاریخ و محل نمونه برداری در ظرف حاوی یخ گذاشته شد و به آزمایشگاه منتقل شد. بخشی از هر نمونه گیاهی به یخچال منتقل و بخشی با نیتروژن مایع منجمد شد و در فریزر با دمای -70°C درجه سلسیوس نگهداری شد.

بررسی بذربودن عامل بیماری در شرایط مزرعه و گلخانه

برای بررسی بذربودن 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 مایه زنی گیاهان آزمون

تعداد ۲۲ گونه گیاهی آزمون از خانواده‌های *Amaranthaceae*، *Chenopodiaceae*، *Solanaceae* و *Cucurbitaceae*، *Fabaceae* مورد بررسی قرار گرفتند. گیاهان آزمون در گلدان‌هایی به قطر ۱۲ سانتی‌متر در خاک سترون کشت و در دمای $18-30^{\circ}\text{C}$ درجه سلسیوس نگهداری شدند. خاک به کار رفته برای کشت گیاهان به صورت مخلوطی از خاک حاصل خیز مزرعه، پیت و پرلیت به نسبت ۱:۱:۱ بود. آبیاری گیاهان به طور مرتب انجام شد و در طول آزمایش، گلخانه از لحاظ وجود ناقلین و بیمارگرها

پایش و به فاصله دو هفته یکبار سم پاشی با سم ایمیداکلوپراید^۱ انجام شد.

مایه زنی مکانیکی گیاهان آزمون جهت بررسی ویژگی‌های بیولوژیک و دامنه میزبانی ویروس‌ها بسته به گونه گیاه آزمون در مراحل ۲-۴ برگی با استفاده از بافر فسفات (0.1 MK₂HPO₄, 2-β-mercaptoetanol، pH 8.5) انجام شد. تعدادی از گیاهان به عنوان شاهد با بافر مایه زنی شدند. سپس از تک لکه‌ها عصاره گیری و به لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) مایه زنی شد. گیاهان مایه زنی شده به صورت 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 پوتی ویروس تهیه شده از DSMZ بر اساس روش کرودر^۲ (۲۰۰۱) انجام شد. میزان جذب چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الایزا خوان (ایتالیا، Anthos, 2020) در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. برای تعیین حد آلودگی (R) از فرمول $R = X + 3SD$ استفاده شد که در این فرمول X میانگین جذب چاهک‌های شاهد منفی و SD انحراف معیار جذب چاهک‌های شاهد منفی است.

آزمون آر تی-بی سی آر

نمونه‌های گیاهی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شده بودند با استفاده از آزمون آر تی-بی سی آر مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج آران‌ای کل از نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج RNX- Plus سیناژن (تهران، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

1- Imidacloprid

2- Crowther

جدول ۱- مشخصات آنتی بادی های استفاده شده در آزمون الایزا

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

جهت انجام آرتی- پی سی آر از آغازگرهای عمومی جنس پوتی ویروس و آغازگرهای اختصاصی ویروس موزائیک خیار استفاده شد. آغازگرهای عمومی جنس پوی ویروس شامل آغازگر پیش سو - 5' Nib2F GTITGYGTIGAYGAYTTTAAAYAA-3' و آغازگر پس سو 3'-TCIACI Nib3R ACIGTIGAIGGYTGNCC-5' (ژنگ و همکاران^۱، ۲۰۱۰) قطعه ای به طول تقریباً ۳۵۰ جفت باز را در واکنش پی سی آر تکثیر می کنند. برای ویروس موزائیک خیار از آغازگر پیش سو - CMV-F با توالی نوکلئوتیدی 5'- TAA CCT CCC AGT TCT 3'- CAC CGT و آغازگر پس سو CMV-R با توالی 5'- CCA TCA CCT TAG CTT CCA 3'- TGT که قطعه ای به طول ۵۱۳ جفت باز را تکثیر می کند، استفاده شد (گرایکو و همکاران^۲، ۲۰۰۰).

سنتز دی ان ای مکمل الگو^۳

واکنش سنتز دی ان ای مکمل (cDNA) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در ترموسایکلر Eppendorf Gradient, 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 آر ان ای استخراج شده و ۱۱ میکرولیتر آب به همراه ۱۰ پیکومول آغازگر پس سو 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 MgCl₂, 5mM Dithiothreitol, 250mM NaCl به میزان ۴ میکرولیتر، مخلوط نوکلئوتیدها (10 mM) به مقدار یک میکرولیتر، بازدارنده آر ان ای (40 units/μl) به میزان ۰/۵ میکرولیتر و ترانس کریپتاز معکوس M-MuLV (200u/μl) ساخت شرکت فرمنتاز لیتوانی به مقدار ۰/۷ میکرولیتر به عنوان مواد واکنش مرحله دوم به میکروتیوب ها اضافه شدند.

میکروتیوب ها 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

۰/۱ و ۱۰ ml EDTA (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 اتیدیوم بروماید با غلظت نهایی ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه ژل داک (Vilber Lourmat T-2A-5×20) عکس برداری شد. نشانگر یک کیلوباز با شماره #SM1163 محصول شرکت فرمنتاز به عنوان نشانگر اندازه دی ان ای استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی بذربودن 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 ظاهر شد. نتایج الایزا نیز آلودگی بوته های دارای علائم را به سه ویروس CMV، BCMV و BCMNV تأیید کردند.

مطالعات گلخانه ای

عصاره نمونه هایی که بر اساس علائم مشاهده شده در مزرعه مشکوک به آلودگی ویروسی بودند، روی گیاهان آزمون مایه زنی شدند. بوته های خیار (*Cucumis sativus*) مایه زنی شده علائم پیچیدگی و موزائیک، روشن شدن رگبرگ ها و زبر و خشن شدن برگ ها (شکل 1-a)، در لویا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)، پیچیدگی و بدشکلی شدید و ابلقی شدن برگ ها^۳ (شکل 1-b)، در سلمه تره^۳ (شکل 1-c) و در سلمه قرمز (*Chenopodium amaranticolor*)، پیسک^۴ (شکل 1-d)، در تاتوره (*Datura stramonium*) توت های شدن^۵ و لکه موضعی (شکل 1-e)، در گوجه فرنگی (*Solanum*

سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و سپس در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد و آنگاه برای غیرفعال سازی آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز^۱

واکنش پی سی آر با استفاده از دی ان ای مکمل^۲ حاصل از واکنش نسخه برداری معکوس روی آر ان ای های استخراج شده از نمونه های مشکوک به آلودگی با ویروس موزائیک خیار و پوتی ویروس ها انجام شد. واکنش پی سی آر در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر و غلظت نهایی ۱۰ پیکومول آغازگرهای پیش سو و پس سو، بافر پی سی آر، (50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.4)، کلرید منیزیم ۲ میلی مولار، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات ۰/۲ میلی مولار، آنزیم Taq Polymerase (سیناژن) یک واحد و cDNA انجام گرفت. سپس لوله ها به دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی زمان بندی شده به شرح زیر منتقل شدند. واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت. سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به مدت ۴۰ ثانیه؛ دمای اتصال آغازگرها به رشته الگو برای جفت آغازگر Nib2F/Nib3R، ۴۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و برای آغازگرهای CMV-CMV-R ۵۲ F/CMV-R 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 دی ان ای حاصل از واکنش

آرتی - پی سی آر

الکتروفورز محصول پی سی آر با استفاده از ژل ۱/۵ درصد آگارز در بافر یک برابر غلظت TAE حاوی gr Acetic Acid، (pH=8) ۰/۴۸۴ gr Tris-Base

3- Calico
4- local lesion
5- enation

1- Polymerase Chain Reaction
2- cDNA

انجام و قطعه دی‌ان‌ای مورد انتظار به طول ۳۵۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۲).

واکنش آر‌تی-پی‌سی‌آر با استفاده از جفت آغازگرهای CMVF/CMVR برای ردیابی ویروس موزائیک خیار نیز انجام شد 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 آران‌ای 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-پی‌سی‌آر مطالعه حاضر نشان داد که دست کم سه ویروس CMV، BCMV و BCMNV در بروز بیماری موزائیک و پیچیدگی برگ و ساقه باقلا در

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

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 آنتی‌بادی علیه سه ویروس CMV، BCMV و BCMNV واکنش مثبت داشتند. درحالی‌که هیچکدام از نمونه‌ها با سایر آنتی‌بادی‌های 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 آران‌ای کل، واکنش آر‌تی-پی‌سی‌آر با استفاده از جفت‌آغازگرهای عمومی Nib2F/Nib3R با هدف ردیابی جنس *Potyvirus*

عنوان منبع آلودگی عمل کنند و تهدیدی جدی برای سایر محصولات منطقه باشند.

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 می دهد زیرا بوته های باقلای آلوده می تواند به



1-a



1-b



1-c



1-d



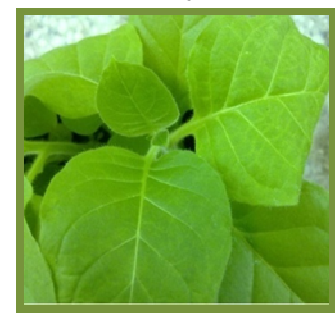
1-e



1-f



1-g



1-h



1-i



1-j



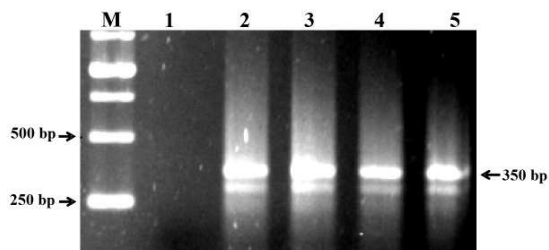
1-k



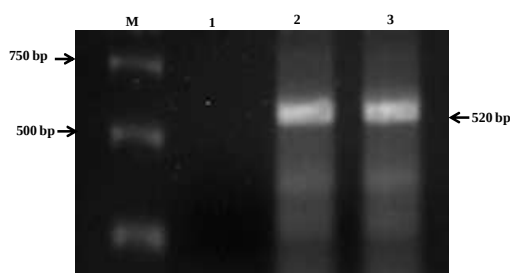
1-l

شکل ۱- علائم ایجاد شده در گیاهان آزمون حاصل از مایه زنی مکانیکی با عصاره باقلای آلوده: شکل 1-a. علائم پیچیدگی، موزائیک و روشن شدن رگبرگ ها در خیار (*Cucumis sativus*)، شکل 1-b. پیچیدگی و بدشکلی شدید و ابلقی شدن برگ ها در لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)، شکل 1-c. علائم پیسک در گیاه سلمه تره (*Chenopodium quinoa*)، شکل 1-d. علائم پیسک و لکه موضعی در سلمه قرمز (*Chenopodium amaranticolor*)، شکل 1-e. توت های شدن (*enation*) و لکه موضعی در تاتوره (*Datura stramonium*)، شکل 1-f. علائم موزائیک همراه با زگیلی شدن برگ ها در گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، بدشکلی برگ، برجستگی رگبرگ ها و موزائیک شدید در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، شکل 1-h. موزائیک خفیف و روشن شدن برگ در توتون (*Nicotiana tabacum*)، شکل 1-i. علائم موزائیک و نکروز موضعی در سویا (*Glycin max*)، علائم مختلف ناشی از انتقال مکانیکی عصاره تک لکه های موضعی به لوبیا چشم بلبلی: شکل 1-j. موزائیک و بدشکلی در لوبیا چشم بلبلی ناشی از انتقال مکانیکی عصاره تک لکه های موضعی از سلمه تره، شکل 1-k. علائم بدشکلی شدید در لوبیا چشم بلبلی ناشی از انتقال مکانیکی عصاره تک لکه های موضعی از لوبیای آلوده، شکل 1-l. علائم نکروز موضعی شدید در لوبیا چشم بلبلی ناشی از انتقال مکانیکی عصاره تک لکه های موضعی از سویای آلوده.

رستگار و همکاران: شناسایی ویروس های بذربرد مزارع...



شکل ۲- ردیابی جنس *Potyvirus*. چاهک‌ها از چپ به راست: 1kb DNA-Ladder (M)، (۱) کنترل منفی، (۲) کنترل مثبت، (۳)، (۴ و ۵) نمونه‌های باقلا.



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

۲۰۱۲)، لوتئوویروس (روبرتسون و همکاران، ۱۹۹۱)^۴ و کوکوموویروس (چوی و همکاران^۵، 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 آر تی- پی سی آر نشان داد که روش الایزا قابل اطمینان بوده و برای تشخیص سریع و آسان‌تر بیماری قابل توصیه 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.

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 آر تی - پی سی آر برای ردیابی پوتی ویروس‌ها استفاده شد. استفاده از آغازگرهای منطبق بر بخش حفظ شده در پوتی ویروس‌ها، امکان تکثیر قطعه‌ای از ژنوم ویروس را فراهم آورد. آر تی- پی سی آر با استفاده از یک جفت آغازگر عمومی در ردیابی موفقیت‌آمیز گونه‌های متعلق به جنس های پوتی ویروس (ها و همکاران^۱، ۲۰۰۸؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۱۰)، کلستروویروس (کاراسو و همکاران، ۱۹۹۴)^۲، توسپوویروس (چن و همکاران^۳،

1- Ha *et al.*

2- Karasev *et al.*

3- Chen *et al.*

4- Robertson *et al.*

5- Choi *et al.*

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.

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. *Annales 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.