ردیابی و شناسایی ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*) از مزارع باقلای استان کرمان

Occurance and Detection of *Bean Yellow Mosaic Virus* In Faba Bean Fields of Kerman Province

زهره داودی[۱*]، ثمین حسینی[۲] و احمد حسینی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۶

چکیده

باقلا با نام علمی *Vicia faba* L. یکی از حبوبات عمده در ایران است. ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*) در بسیاری از کشورها از مزارع باقلا جداسازی شده است. برای ردیابی و شناسایی آن در مزارع باقلای شهرستان جیرفت، استان کرمان، در سال زراعی ۱۳۹۰، ۲۴۰ نمونه‌ی برگی دارای علایم موزاییک خفیف تا شدید، کوچکی و بدشکلی برگ‌ها و هم‌چنین تعدادی نمونه فاقد علایم ویروسی و ۱۵ نمونه علف هرز جمع‌آوری گردید. ابتدا نمونه‌ها با استفاده از آزمون‌های سرولوژیکی DAS-ELISA و TPIA و آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای BYMV مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۵۰ نمونه از نمونه‌های مورد بررسی به ویروس BYMV آلوده بودند. در بین علف‌های هرز جمع‌آوری شده، دو بوته‌ی سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa*) در مزارع شهرستان جیرفت آلوده به BYMV بودند. در شرایط گلخانه‌ای یک جدایه‌ی انتخابی ویروس (J2) بر روی برخی از گیاهان خانواده‌های اسفناج، بقولات، تاج‌خروس، سیب‌زمینی و شب‌بو لکه موضعی و علایم سیستمیک ایجاد کرد. یک قطعه‌ی ۱۷۰۰ جفت بازی شامل نواحی NIb، CP و 3´-UTR جدایه‌ی J2 با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی تیره *Potyviridae* در آزمون IC-RT-PCR تکثیرشد. نتیجه‌ی بررسی ترادف نوکلئوتیدی ناحیه‌ی NIb نشان داد که جدایه‌ی مورد بررسی همراه با یک جدایه‌ی ژاپنی جدا شده از روی باقلا در یک گروه قرار می‌گیرند. در این تحقیق برای اولین‌بار ویروس BYMV از مزارع باقلای استان کرمان جداسازی شد.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزاییک زرد لوبیا، الیزا، NIb و IC-RT-PCR

---

۱. دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، رفسنجان

۲. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، رفسنجان

۳. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، رفسنجان

*: نویسنده مسوول Email: z.davoodi20@yahoo.com

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با عنوان «مقایسه ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک زرد لوبیا (BYMV) جدا شده از مزارع باقلا در استان‌های کرمان و خوزستان»، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر(عج) رفسنجان می‌باشد.

مقدمه

باقلا (*Vicia faba* L.) یکی از حبوبات عمده در بسیاری از کشورها ازجمله ایران می‌باشد. این محصول در نقاط مختلف ایران به‌خصوص نواحی شمالی، جنوب و جنوب‌غربی به‌عنوان محصول عمده، کشت و کار می‌گردد. بیماری‌های ویروسی، به عنوان یک مشکل جدی برای گیاه باقلا در سراسر جهان گزارش شده‌اند *هول*؛ *ال- تالوی* و همکاران (Hull, 2002; El-Tahlawy *et al*., 2005). تعداد زیادی ویروس خسارت‌زا از گیاه باقلا گزارش و جداسازی شده است، در میان ویروس‌های گزارش شده، ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین ویروس‌ها است (Bos, 1969). این ویروس برای اولین‌بار از ایالات متحده آمریکا در سال ۱۹۰۰ از مزارع نخود و در سال ۱۹۲۵ از روی لوبیای فرانسوی (*Phaseolus vulgaris* L.) گزارش شده است *دولیتل و جونز* (Doolittle and Jones, 1925).

در ایران اولین گزارش BYMV از روی گیاهانی مانند نخودایرانی، نخودفرنگی، عدس، لوبیا و باقلا توسط *کایزر* و همکاران (Kaiser *et al*., 1968) صورت گرفته است. ویروس یاد شده از استان‌های تهران، فارس، خوزستان، گیلان، مازندران، کرمانشاه، اصفهان و لرستان از روی باقلا جداسازی و گزارش شده است *فرزادفر* و همکاران (Farzadfar *et al*., 2002). *روحانی* (۱۳۸۷) ویژگی‌های یک جدایه‌ی ویروس موزاییک زرد لوبیا را در سال ۸۵ بررسی کرده است.

BYMV در تیره‌ی پوتی‌ویریده و جنس پوتی‌ویروس قرار دارد. پیکره‌های ویروس میله‌ای خمش‌پذیر به‌طول ۷۵۰ نانومتر و عرض ۱۵-۱۲ نانومتر می‌باشند *هول* (2002). این ویروس دارای ژنوم یک قسمتی و RNA تک‌رشته‌ای مثبت به اندازه ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید می‌باشد و توسط شته‌های خانواده‌ی Aphididae انتقال می‌یابد. تحقیقات نشان می‌دهد که شته‌های سبز هلو و سیاه باقلا نقش مهمی در انتقال BYMV دارند *نوح* (Nooh, 1985).

ویروس موزاییک زرد لوبیا دامنه میزبانی وسیعی دارد و به آسانی می‌تواند در محصولات چندساله‌ی خانواده بقولات (Leguminosae) مانند شبدر و یونجه یا علف‌های هرز مانند ماشک، زمستان‌گذرانی کند. این ویروس معمولاً بر روی گیاهان گلایول ایجاد آلودگی می‌کند. کنترل BYMV به‌دلیل دامنه‌ی میزبانی وسیع و انتقال با شته به‌صورت ناپایا، مشکل است *فریزون* و همکاران (Frison *et al*., 1990). *جونز* (Jones, 2001) فهرستی از روش‌های کنترل مؤثر را ذکر کرده است، ازجمله می‌توان به ایجاد فاصله بین ردیف‌های کشت، استفاده از موانع غیرمیزبانی، کاشت متناوب باقلا با سایر محصولات غیرمیزبان و استفاده از ارقام مقاوم اشاره کرد.

با توجه به عدم گزارش BYMV از روی باقلا در استان کرمان و عدم بررسی جامع در مورد وقوع و ویژگی‌های این ویروس، شهرستان جیرفت در استان کرمان به‌عنوان قطب کشاورزی برای بررسی در این تحقیق انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری از مزارع باقلای شهرستان جیرفت

در فصل زراعی ۹۰، ۲۴۰ نمونه برگی باقلا و ۱۵ نمونه علف هرز از مزارع باقلای شهرستان جیرفت که سطح زیرکشت بالایی را در استان کرمان دارد، جمع‌آوری شد. گیاهان دارای علایم ویروسی و تعدادی گیاه فاقد علایم ویروسی جمع‌آوری و به‌صورت جداگانه با ثبت نام محل و تاریخ نمونه‌برداری در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص قرار داده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند. علایم مشاهده شده در بوته‌های آلوده به ویروس در مزرعه به‌صورت موزاییک، کوچک شدن، پیچیدگی و بدشکلی برگ‌ها بود.

- آزمون DAS-ELISA

برای ردیابی و شناسایی ویروس BYMV در بین بوته‌های باقلا و علف‌های هرز موجود در مزارع باقلای شهرستان جیرفت از آزمون داس الیزا با بهره‌گیری از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای BYMV (AS-0471) تهیه شده از موسسه DSMZ آلمان بر طبق دستورالعمل *کلارک* و *آدامز* (Clark and Adams, 1977) استفاده شد. نتایج پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه با دستگاه الیزاخوان (BioTek ELX-808, USA) با طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند. نمونه‌هایی که میزان جذب نوری‌شان بیشتر از دو برابر میانگین جذب نوری نمونه‌های منفی بود به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شدند.

- آزمون TPIA

این روش یک روش ساده برای تشخیص ویروس‌های گیاهی است که اولین مرحله‌ی آن حتی در مزرعه قابل اجرا می‌باشد. این روش بر طبق دستورالعمل *لین* و همکاران (Lin *et al*., 1990) انجام شد.

- تکثیر جدایه‌های ویروسی و خالص‌سازی بیولوژیکی

یک جدایه از BYMV با نام J2 انتخاب و برای خالص‌سازی بیولوژیکی بر روی برگ‌های گیاه سلمه‌تره مایه‌زنی شد. بعد از ظهور لکه‌ها، با توجه به نوع علایم، با تیغ اسکالپل جداگانه

بریده شده و در یک قطره بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵مولار له گردید، سپس افشره حاصل روی برگ‌های باقلا در مرحله ۵-۴ برگی مایه‌زنی شد. گیاهان باقلا با آزمون داس الیزا مورد بررسی قرار گرفتند و یک گیاه که آلوده به BYMV بود به‌عنوان منبع ویروس در گلخانه نگهداری شد.

- تعیین دامنه میزبانی

برای تعیین دامنه میزبانی و تکثیر جدایه J2، بر روی ۱۴ گونه گیاهی متعلق به پنج خانواده (اسفناج، بقولات، تاج‌خروس، سیب‌زمینی و شب‌بو)، مایه‌زنی مکانیکی شد. نمونه‌های آلوده به نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵مولار با اسیدیته ۷، عصاره‌گیری شده و با کمک پودر کاربراندوم به برگ‌های گیاهان محک، مایه‌زنی شدند و سپس در شرایط گلخانه با دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

- آزمون IC-RT-PCR (Immunocapture RT-PCR)

در این نوع RT-PCR به جای استخراج RNA ویروس، از عصاره گیاهی استفاده شد. این روش بر طبق دستورالعمل *نولاسکو* و همکاران (Nolasco *et al*., 1993) انجام شد و سپس واکنش RT-PCR صورت گرفت.

برای انجام آزمون RT-PCR اقدام به ساخت رشته cDNA گردید. برای این منظور از یک جفت آغازگر عمومی تیره‌ی *Potyviridae* که بر اساس ترادف حفاظت شده GNNSGQP در ناحیه‌ی NIb پلی‌پروتئین پوتی‌ویروس‌ها طراحی گردیده است، استفاده شد. این جفت آغازگر قسمت انتهایی ژنوم شامل NIb، CP و 3´-UTR را تکثیر می‌کند *جونز* (2001).

برای ساخت cDNA ابتدا یک میکرولیتر آغازگر (10 Pmol/µl) در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر در میکروتیوپ‌ها به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه PCR (Bio-Rad, C1000^{TM} Thermal Cycler) قرار داده شدند و سپس بلافاصله بر روی یخ گذاشته شدند. سپس در مرحله دوم ساخت cDNA، چهار میکرولیتر بافر 5XMuMLV، یک میکرولیتر آنزیم MuMLV-RT، نیم میکرولیتر RNase inhibiror enzyme و ۲/۵ میکرولیتر dNTPs (10 mmol/µl) (ساخت شرکت Vivantis) به میکروتیوپ‌ها اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در دستگاه PCR قرار گرفتند، سپس cDNA با واکنش PCR تکثیر شد.

مواد مورد استفاده برای انجام PCR عبارت بودند از: ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR buffer، نیم میکرولیتر $MgCl_2$ (50 mmol/µl)، نیم میکرولیتر dNTPs (10 mmol/µl)، نیم میکرولیتر آغازگر Sprimer و M4T (10 Pmol/µl)، نیم میکرولیتر آنزیم *Taq* (5 unit/µl) (ساخت شرکت Vivantis) و ۲/۵ میکرولیتر cDNA در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر.

برنامه‌ی PCR متشکل از یک چرخه ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت یک دقیقه به‌منظور واسرشت‌سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، اتصال به‌مدت یک دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، سنتز در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت دو دقیقه و به‌علاوه یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت پنج دقیقه برای امتداد نهایی رشته‌ها بود.

ناحیه‌ی تکثیر شده‌ی جدایه‌ی J2 برای تعیین توالی به شرکت BIONEER کره‌جنوبی (www.bioneer.co.kr) فرستاده شد. توالی نوکلئوتیدی ناحیه‌ی تکثیر شده ابتدا با برنامه‌ی Chromas, version 2.13 بازبینی شد و سپس با نرم‌افزار بلاست مورد بررسی قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی ناحیه‌ی NIb جدایه‌های مورد بررسی با توالی نوکلئوتیدی نه جدایه‌ی BYMV موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 ترسیم شد. بازسازی درخت فیلوژنتیکی بر اساس روش Neighbor-joining (NJ) انجام شد *سایتو و نی* (Saitu and Nei, 1987).

نتایج و بحث

در بین ویروس‌های گزارش شده از باقلا، BYMV به‌دلیل تحت تأثیر قرار دادن کیفیت و کمیت محصول باقلا، اهمیت زیادی دارد *رادوان* و همکاران (Radwan *et al*., 2008). جهت ردیابی این ویروس در شهرستان جیرفت از دو روش داس الیزا و TPIA استفاده شد. تعداد گیاهان آلوده به BYMV در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه جیرفت ۱۵۰ نمونه و درصد آلودگی آن‌ها ۶۲/۵٪ بود.

پژوهش‌های *ید* (Eid, 1983) نشان‌دهنده‌ی اهمیت علف‌های هرز در انتشار BYMV به گیاهان موجود در مزارع کشور مصر بود. در این پژوهش نیز به‌منظور یافتن میزبان واسط ویروس در مزارع باقلا به‌عنوان منبع بقا ویروس، از علف‌های هرز موجود در مزرعه نمونه‌برداری انجام شد. نتایج بررسی نشان‌دهنده‌ی آلودگی دو بوته‌ی سلمه‌تره (*C. quinoa*) در شهرستان جیرفت بود، این نتایج بیانگر این احتمال است که علف‌های هرز می‌توانند منبعی برای تابستان‌گذرانی و بقای ویروس در شرایط نامناسب رشدی باقلا و در نتیجه گسترش این ویروس در سال‌های بعد باشند.

برای تکثیر و خالص‌سازی بیولوژیکی جدایه انتخابی J2، از گیاه باقلا استفاده شد. جدایه‌ی J2 بعد از سه روز ابتدا علایم لکه موضعی سبزرد بر روی گیاه سلمه‌تره ایجاد کرد. لکه‌ها به

گیاهان سالم باقلا منتقل شدند و پس از گذشت ۱۵ روز در گیاه علایم موزاییک نشان دادند. این گیاهان به‌عنوان منبع ویروس مورد استفاده قرار گرفتند.

علایم ایجادشده توسط این جدایه بر روی گیاه باقلا به حدی شدید بود که میزان گلدهی و تشکیل غلاف در بوته‌های باقلا به‌شدت کاهش یافت. این علایم با علایم ایجاد شده توسط جدایه‌ی SV205-85 گزارش شده توسط *الخالف* و همکاران (Al-Khalf *et al*., 2008) در کشور سوریه مطابقت دارد.

در بررسی انتقال مکانیکی مشاهده شد که BYMV به‌راحتی به‌صورت مکانیکی انتقال می‌یابد که این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط *دافالا* و *حسین* (Dafallah and Hussein, 1994) و *شاوان* (Shahwan, 2007) مطابقت داشت.

برای تعیین دامنه میزبانی، جدایه J2 بر روی ۱۴ گونه از پنج خانواده‌ی گیاهی مایه‌زنی شد. زمان ظهور علایم لکه موضعی بر روی این گیاهان در جدایه انتخابی حدود سه روز تا یک هفته و علایم سیستمیک دو هفته تا یک ماه بعد از مایه‌زنی بود. برای اطمینان از وجود ویروس در میزبان‌های مختلف از روش داس الیزا استفاده شد (شکل ۱ و جدول ۱). نتایج نشان داد که جدایه‌ی J2 دامنه‌ی میزبانی وسیعی دارد و گیاهانی از خانواده‌های اسفناج، بقولات، تاج‌خروس، سیب‌زمینی و شب‌بو را آلوده کرد. برخی از پژوهش‌های انجام شده بر روی جدایه‌های دیگر BYMV چنین دامنه‌ی میزبانی وسیعی را نشان نمی‌دهند *شاوان* (2007).

در آزمون IC-RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر عمومی تیره‌ی *Potyviridae* و مارکر ساخت شرکت کیاژن (Gel pilo, 1 Kb plus ladder) به اندازه 1kb، یک قطعه‌ی ۱۷۰۰ جفت بازی مربوط به نواحی قسمت انتهایی NIb، CP و 3´-UTR تکثیر شد و با نتایج کار *چن* و همکاران (Chen *et al*., 2001) مطابقت داشت (شکل ۲). نتایج حاصل از مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی نواحی تکثیر شده با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن با استفاده از برنامه‌ی بلاست نشان داد که جدایه‌ی J2 بیشترین شباهت را با جدایه‌های BYMV دارد.

جدول ۱: گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه J2 و واکنش آن‌ها

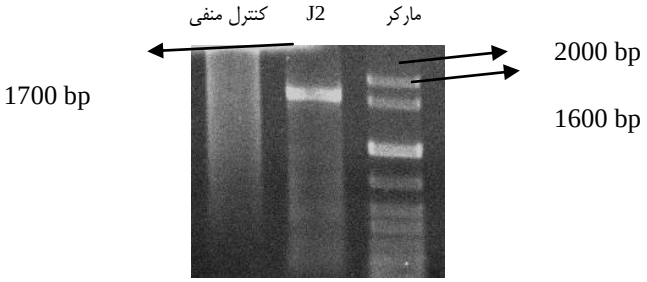
Table 1: Inoculated plants with J2 isolate and their reactions

خانواده Family	گونه Species	علایم (لکه موضعی/ سیستمیک) Symptoms*(Local lesion/systemic)
اسفناجChenopodiaceae	*Chenopodium quinoa* Willdسلمه‌تره	CLL
	C. murale L. سلمه‌تره	CLL
بقولاتFabaceae	*Phaseolus vulgaris* L.لوبیا چیتی	NLL/M/W
(Leguminosae)	*Vigna unguiculata* L.لوبیا چشم‌بلبلی	CLL/M
	Pisum sativum L.نخودفرنگی	NLL/M
	Cicer arietinum L.نخود	NLL/M
	Vicia faba L.باقلا	CLL/M/Mf/D/Lf
	Medicago sativa L.یونجه	-/M
سیب‌زمینیSolanaceae	*Datura metel* L.داتوره	-
	Nicotiana rustica L.توتون	M
تاج‌خروسAmaranthaceae	*Gomphrena globosa* L.گل تکمه‌ای	-
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus* L.تربچه	CLL
	Brassica rapa L.شلغم	-/M
	Brassica oleracea L. کلم	L

*CLL: لکه موضعی سبزرد، Lf: پیچیدگی برگ، D: کوتولگی، M: موزاییک، Mf: بدشکل شدن، NLL: لکه موضعی نکروزه

*CLL: Chlorotic local lesions, D: Dwarf, M: Mosaic, Lc: Leaf curl, Mf: Malformation, NLL: Necrotic local lesion

شکل ۱: الف. علایم لکه موضعی بر روی *C. quinoa* و ب. علایم موزاییک بر روی باقلای مایه‌زنی شده با جدایه‌ی J2
Fig. 1: A. Local lesions on *C. quinoa* and B. Systemic symptoms on *V. faba* inoculated with J2 isolate

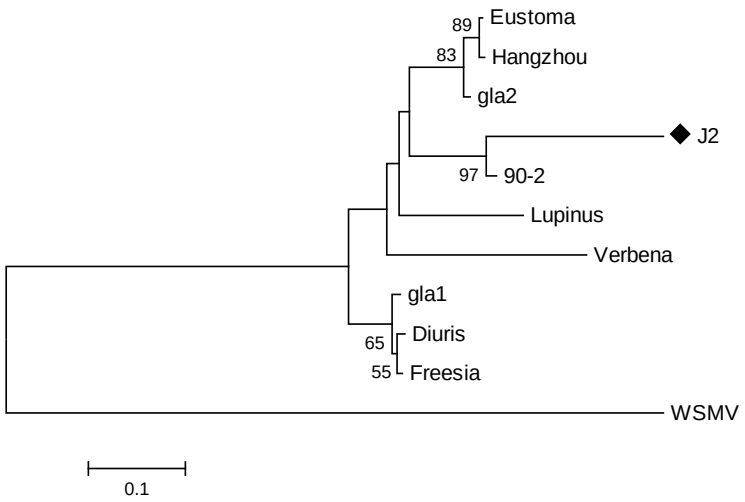


شکل ۲: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگر عمومی *Potyviridae*
Fig. 2: Polymerase chain reaction using *Potyviridae* universal primer

در این پژوهش برای مقایسه‌ی جدایه مورد بررسی با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن، از ناحیه NIb استفاده شد. زیرا با توجه به پژوهش‌های *آتریا* و همکاران (Atreya *et al*., 1992) این ناحیه که پروتئین پلیمرازی توالی RNA پلیمرازی وابسته به RNA یا RdRp را ترجمه می‌کند برای تفکیک پوتی‌ویروس‌ها مناسب است. درصد یکسانی توالی نوکلئوتیدی NIb، جدایه‌های برداشت شده از بانک ژن با توالی نوکلئوتیدی جدایه‌ی J2، ۷۳ تا ۸۹ درصد بودکه با جدایه‌ی ۹۰/۲ (جدایه‌ی ژاپنی باقلا) بیشترین میزان شباهت را داشت. در درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس روش Neighbor-joining (NJ) با استفاده از نرم افزار MEGA 4.0، جدایه‌ی BYMV مورد بررسی در این پژوهش (J2) به همراه جدایه‌ی ژاپنی ۹۰/۲ در یک گروه قرار گرفته‌اند. این دو جدایه هر دو از روی باقلا جدا شده‌اند (شکل ۳).

اعداد نزدیک شاخه‌ها نشان‌دهنده‌ی درصد bootstrap هستند (۱۰۰۰ تکرار). در این مقایسه ویروس موزاییک رگه‌ای گندم (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) با رس شمار GU724847 به‌عنوان out group در نظر گرفته شده است. جدایه‌های برداشت شده از بانک ژن به همراه رس شمار آن‌ها عبارتند از: Eustoma, AM884180 (تایوان)، Hangzhou, AJ311371 (چین)، gla2, AY192568 (آمریکا)، 90-2, AB439731 (ژاپن)، Lipnus, EU144223 (آمریکا)، Verbena, AY520092 (آمریکا)، gla1, AJ844916 (هند)، Diuris, JX173278 (استرالیا) و Freesia, FJ618532 (نیوزلند)

براساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مشخص شد که BYMV یکی از ویروس‌های مهم آلوده‌کننده‌ی محصولات باقلا در شهرستان جیرفت می‌باشد. در پژوهش‌های پیشین روحانی BYMV را در مزارع باقلای استان‌های خوزستان، گلستان، تهران و اصفهان در سال ۱۳۸۵ گزارش کرده بودند اما این پژوهش اولین گزارش مبنی بر حضور BYMV در مزارع باقلای استان کرمان است.



شکل ۳: تحلیل فیلوژنتیکی ترادف نوکلئوتیدی ناحیه‌ی NIb با استفاده از روش Neighbor-joining

Fig. 3: Phylogenetic analysis of the NIb nucleotide sequence using Neighbor-joining method

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۷-۱۸ متن انگلیسی مراجعه شود.