نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰، ص. ۲۵۷-۲۵۰

Journal of Plant Protection
Vol. 25, No. 3, Fall 2011, P. 250-257

بررسی ویروس موزائیک معمولی لوبیا (BCMV) در چند استان کشور و واکنش سه ژنوتیپ لوبیا به آن

مهتاب پیمبری[1*] - مینا کوهی حبیبی[2] - غلامحسین مصاحبی[3] - کرامت اله ایزدپناه[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۳/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۳

چکیده

طی دو فصل زراعی ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ تعداد ۲۶۰ نمونه برگ لوبیا با علائم موزائیک، رگبرگ نواری و قاشقی شدن برگ ها از مزارع استان‌های فارس، کهگیلویه و بویر احمد، اصفهان و تهران جمع آوری گردید. با انجام آزمون سرولوژیکی ELISA با استفاده از آنتی سرم BCMV آلودگی ۱۱۰ نمونه به این ویروس تائید گردید. واکنش سه ژنوتیپ ks-21478 (لوبیا چیتی)، ks-31170 (لوبیا قرمز) و ks-41235 (لوبیا سفید) نسبت به BCMV با مایه زنی آنها با جدایه BCMV فارس مورد بررسی قرار گرفت. ۱۵-۱۰ روز پس از مایه زنی، بوته ها با استفاده از آزمون ELISA مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده بیانگر ۶۵/۴٪ آلودگی در ژنوتیپ چیتی، ۵۸/۱٪ آلودگی در ژنوتیپ قرمز و ۳/۶٪ آلودگی در ژنوتیپ سفید بود. از ژنوتیپ‌های لوبیا قرمز و چیتی مایه زنی شده، تعداد ۲۵ گیاه و از ژنوتیپ لوبیا سفید تعداد ۳۵ گیاه انتخاب شده در آزمون RT-PCR و IC-RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BCMV، مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج بیانگر تکثیر قطعه ای به طول ۸۹۰ جفت باز، در گیاهان الیزا مثبت ژنوتیپ‌های قرمز و چیتی و تعداد محدودی از گیاهان الیزا منفی بود. نتیجه آزمون RT-PCR و IC-RT-PCR در ۲۵ بوته از ژنوتیپ لوبیا سفید که فاقد علائم بوده و نتایج آزمون الیزا در مورد آنها منفی بود، نیز مثبت ارزیابی گردید. بذور بوته‌های لوبیایی که در شرایط گلخانه آلوده شده بودند جمع آوری و در شرایط گلخانه مجدداً کشت شدند. بوته‌های حاصل از کاشت بذور ژنوتیپ‌های چیتی، قرمز و سفید در مرحله دو برگی جهت تعیین میزان بذرزاد شدن BCMV با استفاده از آزمون‌های DAS-ELISA و IC-RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. میزان انتقال با بذر در ژنوتیپ‌های چیتی (ks-21478) قرمز(ks-31170) و سفید (ks-41235) به ترتیب ۷۸/۳، ۷۹/۸ و ۵۴/۹ درصد برآورد گردید.

واژه های کلیدی: BCMV ، ژنوتیپ های لوبیا، بذرزادی، IC-RT-PCR

مقدمه [1]

حبوبات پس از غلات، مهمترین منبع غذایی بشر بوده و از این بین، لوبیا یکی از مهمترین حبوبات جهان محسوب می شود. لوبیا با نامهای انگلیسی Common Bean ,Dry Bean ,Bean و نام علمی *Phaseolus vulgaris* L. از خانواده *Fabaceae* (*Leguminosae*) و زیر تیره *Papilionoidae* بوده و دارای ۵ گونه زراعی و حدود ۵۰ گونه وحشی می باشد. گونه *P. vulgaris* شامل واریته های لوبیا سبز و لوبیا خشک (چیتی، سفید، قرمز و کرم) می باشد، که لوبیاهای مورد کشت در ایران نیز از واریته‌های مختلف این گونه هستند (۴). بیشترین سطح زیر کشت لوبیا در ایران مربوط به واریته نوع چیتی است (۱). واریته های مختلف لوبیا، میزبان طبیعی تعداد زیادی از ویروس های بیمارگر گیاهی بوده و در بین آنها، ویروس موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*, BCMV) متعلق به گروه پوتی ویروس ها (*Potyvirus*)، یکی از شایع ترین و مخربترین انواع آنها است. این ویروس در طبیعت دامنه میزبانی وسیعی نداشته و عمدتاً گونه های جنس *Phaseolus*، به ویژه گونه *P. vulgaris* را آلوده می نماید. BCMV در طبیعت توسط بذر و شته‌های ناقل نظیر؛ *Aphis craccivora, Aphis fabae, Myzus persicae, Acyrthosiphon pisum* به صورت ناپایا و در آزمایشگاه از طریق مایه زنی مکانیکی منتقل می گردد (۱۰). این ویروس معمولاً روی ارقام لوبیا علائم موزائیک ایجاد می نماید. اما برخی از استرین های آن روی ارقام حساس و در درجه حرارت‌های بالا، نکروز سیستمیک کشنده (Lethal systemic

۱، ۲ و ۳- به ترتیب کارشناس ارشد، استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: peyambari@ut.ac.ir)
۴- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

(necrosis) ایجاد می نمایند (۱۵). طبق مطالعات انجام گرفته نوع علایم ایجاد شده توسط این ویروس روی ارقام لوبیا به تعامل بین ژنهای مقاومت میزبان گیاهی و ژنهای بیماری زای ویروس ($P_0, P_1, P_1^2, P_2, P_2^2$) بستگی دارد (۱۰). مقاومت به BCMV در ارقام مختلف لوبیا توسط چندین ژن تعیین می گردد (۹ و ۱۰)، این گروه از ژنها به دو دسته؛ ژنهای استرین اختصاصی و ژنهای استرین غیراختصاصی قابل تفکیک هستند. ژن‌های استرین غیر اختصاصی غالب و مغلوب به ترتیب ژن I و ژن bc-u می باشند. تمامی ژن‌های استرین اختصاصی (bc-1, bc-1^2, bc-2, bc-2^2, bc-3) مغلوب هستند (۱۲).

در غیاب ژن I، حضور ژن bc-u جهت بیان تمام ژنهای مقاومت استرین اختصاصی مغلوب ضروری است. ژن استرین غیر اختصاصی غالب I به عنوان ژن ممانعت کننده تمام سویه های شناخته شده این ویروس شناسایی شده است. ژن غالب I، روی رنگ پوسته بذور ارقام لوبیا اثر گذاشته و باعث تیره گی رنگ آنها می شود (۱۲). ژن غالب I در بافت‌های گیاهی، تکثیر ویروس را از طریق تولید فیتوالکسین فازئولین (که از طریق مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید تولید می شود) کنترل می کند. چنین واکنش فوق حساسیتی به صورت نکروز انتهایی سیستمیک در هر دو حالت مقاومت و حساسیت دیده می شود. مرگ انتهایی گیاه و حرکت فازئولین از طریق سیستم آوندی به طرف قسمتهای پایین گیاه موجب تغییر رنگ بافت آوندی و در نتیجه موجب مرگ گیاه می شود. این واکنش سیاهی ریشه (black-root) نام دارد.

یک ارتباط ژن برای ژن بین ژن های مقاومت استرین اختصاصی (bc-1-, bc-1^2 , bc-2, bc-2^2) با ژنهای بیماری زایی ویروس با کدهای مشابه (P_1, P_1^2, P_2, P_2^2) یافت شده است. بر اساس این تئوری هر ژن مقاومت میزبان که برای یک سویه ویروس اختصاصی محسوب می شود، اگر سویه ویروس آلوده کننده حاوی ژن‌های بیماری زایی مناسب باشد، می تواند مغلوب شود.

تاکنون برای ژن مقاومت bc-3 هیچ ژن بیماری زایی مشابهی شناخته نشده است و ژنوتیپ‌های لوبیا که دارای این ژن مقاومت هستند، در برابر تمام سویه های شناخته شده BCMNV و BCMVمقاوم می باشند. سویه های دارای ژن بیماری زایی P_0 می‌توانند تنها ژنوتیپ هایی از لوبیا را آلوده کنند که ژن مقاومت نداشته باشند (۹ و ۱۰).

معمولاً برای کنترل بیماری حاصل از BCMV استفاده از بذور عاری از ویروس و هچنین کاربرد ارقام مقاوم توصیه می گردد. در ایران تاکنون مطالعات متعددی در زمینه تشخیص این ویروس و بررسی ویژگی‌های BCMV انجام گرفته (۲، ۳، ۵، ۶ و ۷) اما براساس بررسی‌های انجام گرفته تاکنون مطالعاتی در زمینه آگاهی از فراوانی ویروس در مزارع مختلف و واکنش ارقام مختلف لوبیا نسبت به آن اطلاعاتی منتشر نشده است. در این تحقیق نقش BCMV در ایجاد موزائیک لوبیا در چند استان کشور و واکنش سه ژنوتیپ لوبیا نسبت به آن مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

نمونه برداری و ارزیابی نمونه های جمع آوری شده

در طی سالهای ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ نمونه برداری از مزارع لوبیای مناطق مختلف استان های فارس، کهگیلویه و بویر احمد، تهران و اصفهان صورت گرفت. نمونه‌های گیاهی آلوده در مزارع لوبیا مورد بازدید بر اساس علایم ذکر شده در منابع شامل موزائیک شدید و یا خفیف، قاشقی شدن برگها، رگبرگ نواری، و پیچیدگی برگ انتخاب شدند. در نهایت تعداد ۲۶۰ نمونه گیاهی دارای علائم مذکور از مناطق مختلف جمع آوری و در آزمایشگاه با استفاده از آنتی سرم چند همسانه ای BCMV (DSMZ, Germany) در آزمون ELISA مورد بررسی قرار گرفتند (۸ و ۱۱).

مایه زنی ژنوتیپ‌های مورد بررسی لوبیا در شرایط گلخانه

برای آگاهی از درصد بذرزادی ویروس، پس از انجام آزمون ELISA، یکی از جدایه‌های BCMV از استان فارس که نسبت به سایر جدایه ها میزان جذب بالاتری در این آزمون داشت پس از خالص سازی بیولوژیکی روی گیاه لوبیا رقم Bountiful، به گیاهان *Chenopodium quinoa*، *C. amaranticolor* و لوبیا (ارقام Bountiful وRed kidney) مایه زنی شد و در شرایط گلخانه تکثیر گردید. از این جدایه جهت انجام آزمون‌های بعدی به منظور بررسی خاصیت بذرزادی ویروس استفاده شد. عصاره بوته‌های تلقیح شده و آلوده رقم Bountiful لوبیا با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار (pH 7) تهیه شد و روی ۵۵ بوته از هر سه ژنوتیپ لوبیا ks-21478 (چیتی)، ks-31170 (قرمز) و ks-41235 (سفید) تهیه شده از ایستگاه تحقیقاتی خمین، استان مرکزی، به روش مکانیکی مایه زنی گردید. پنج بوته نیز از هر ژنوتیپ لوبیا به عنوان شاهد منفی با استفاده از بافر مذکور مایه زنی گردیدند.

بررسی میزان آلودگی ژنوتیپ های لوبیا

مدت ۱۵-۱۰ روز پس از مایه زنی، ژنوتیپ های تلقیح شده لوبیا با استفاده از آزمون‌های ELISA و IC-RT-PCR از نظر میزان آلودگی به BCMV مورد بررسی قرار گرفتند (۱۴). پلیت‌های ELISA با استفاده از دستگاه ELISA-reader بررسی و

نمونه‌هایی از گیاهان تلقیح شده به عنوان آلوده در نظر گرفته شدند که میزان عددی جذب نوری آنها در طول موج ۴۰۵ نانومتر، مساوی و یا بیشتر از دو برابر جذب نمونه‌های شاهد منفی اندازه گیری شده بودند.

همچنین به منظور شناسایی دقیق تر ویروس در نمونه‌های آلوده از گیاهان تلقیح شده لوبیا، یک جفت آغازگر اختصاصی BCMV بر اساس بخش N-ترمینال توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی ویروس (CP) و بخشی از توالی نوکلئوتیدی NIb با استفاده از نرم افزار Vector NTI طراحی شد که در طی RT-PCR و یا IC-RT-PCR قطعه ای به طول ۸۹۰ جفت باز را تکثیر می نماید. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در واکنش RT-PCR و IC-RT-PCR شامل؛ Dnl3 (GAATTGAAAGCGTACTATCTAATACAG) و Unl3 (CAGCTTGAATTTGATTCTGATGATGAGGTG) بودند. واکنش های RT-PCR در دستگاه ترموسایکلر Palm Cycler مدل GP001 ساخت کمپانی Corbett Research استرالیا انجام گرفت. اجزای مخلوط واکنش RT (4µl RT-buffer، 5x 7µl H2O، 1µl of 100mM DTT، 1µl of 10mM dNTPs، 0.5µl of 40u/µl RNase inhibitor enzyme، 1µl of 0.5µl of 200u/µl MMLV-RT enzyme، 5µl RNA، 100pM reverse primer; DBCMV) با یکدیگر ترکیب شده و واکنش RT جهت تولید cDNA به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد انجام گردید. RNA مورد نیاز جهت انجام واکنش با استفاده از کیت RNeasy شرکت کیاژن از بافت گیاهی استخراج گردید. جهت انجام IC-RT-PCR نیز از آنتی‌بادی چند همسانه ای BCMV (DSMZ, Germany) استفاده شد. سپس اجزای مخلوط واکنش PCR (2.5µl PCR-buffer 10x، 14.6µl H_2O، 1µl of 50mM $MgCl_2$، 0.5µl of 10mM dNTPs، 0.6µl of 100pM forward primer; UBCMV، 0.5µl of 100pM reverse primer; DBCMV، 5µl cDNA، 0.3µl of 5u/µl *Taq* polymerase) ترکیب شده و آزمون PCR با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه و تعداد ۳۵ چرخه آزمون PCR با واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۴۸ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، بسط زنجیره در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، و بسط نهایی زنجیره در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید.

محصول نهایی حاصل از RT-PCR در ژل آگاروز ۱٪ در بافر 1x TBE با استفاده از الکتروفورز تفکیک گردید و اندازه تقریبی قطعه تکثیر شده با استفاده از نشانگر DNA یک کیلو جفت بازی (1kbp) تعیین شد.

همچنین جهت اطمینان از عدم آلودگی نمونه‌های تلقیح شده ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا به BCMNV، آزمون IC-RT-PCR با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی این ویروس، طراحی شده توسط Xu & Hampton (1996) که قطعه ای به طول ۹۲۲ جفت باز را تکثیر می نماید و آنتی سرم چند همسانه ای این ویروس (DSMZ, Germany) انجام گردید. واکنش RT جهت تولید cDNA به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و آزمون PCR با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، و تعداد ۳۵ چرخه آزمون PCR با واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۴۳ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، بسط زنجیره در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و بسط نهایی زنجیره در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید.

کاشت بذور حاصل از ژنوتیپهای لوبیا چیتی، قرمز و سفید مایه زنی شده با BCMV جهت تعیین درصد بذرزادی

ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان لوبیای مایه زنی شده با BCMV، جهت تعیین میزان بذرزادی این ویروس در این ژنوتیپ ها، تا مرحله بذردهی در گلخانه نگهداری شدند. با استفاده از سیستم خنک کننده و دستگاه گرمادهی موجود، سعی گردید در طول تابستان و زمستان دمای گلخانه همواره بین ^{o}C ۳۰ –۲۵ حفظ شود. همچنین شدت نور، با استفاده از حصیرهای موجود بر روی سقف شیشه ای گلخانه تنظیم گردید. جهت کنترل شته، کنه و مگس سفید سمپاشی با سموم مناسب صورت گرفت.

تمامی بذور حاصل از این گیاهان (لوبیا چیتی؛ ۸۳ بذر، لوبیا قرمز؛ ۱۱۴ بذر و لوبیا سفید؛ ۱۶۲ بذر) جمع آوری و با شرایط ذکر شده در فوق در گلخانه کاشته شدند. در مرحله دو برگی گیاهچه ها، بوته ها از لحاظ علایم ظاهری بررسی شدند و همچنین با استفاده از آزمون‌های DAS-ELISA و IC-RT-PCR جهت آلودگی به ویروس مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ارزیابی نمونه های گیاهی جمع آوری شده و علائم ناشی از مایه زنی ویروس روی گیاهان محک

از بین ۲۶۰ نمونه گیاه لوبیای مشکوک به آلودگی جمع آوری شده از مزارع مختلف استان‌های مذکور با استفاده از آزمون

سرولوژیکی ELISA، آلودگی تعداد ۱۱۰ نمونه گیاهی بـه BCMV تائید گردید (جدول ۱). براساس تعداد نمونه‌های گیـاه لوبیـای آلـوده، درصد آلودگی مزارع نمونه برداری شده به BCMV در اسـتان‌هـای فارس، کهگیلویه و بویر احمد، تهران و اصفهان بـه ترتیـب ۴۷/۲۱٪، ۲۷/۲۷٪، ۵۰٪ و ۱۲٪ تعیین گردید. جدایه BCMV متعلق به استان فارس روی گیاهان محـک *C. quinoa* و *C. amaranticolor* علائم ظاهری قابل تشخیص ایجاد نکرد. اما جدایه ویـروس انتخـاب شده، روی دو رقـم لوبیـا (Bountiful & Red kidney)، علائـم ظاهری نظیر موزائیک، پیچیـدگی و باریـک شـدن برگهـا و رگبـرگ نواری را ایجاد نمود.

بررسی علائم و میزان آلودگی ژنوتیپ هـای لوبیـای مایـه زنی شده با BCMV

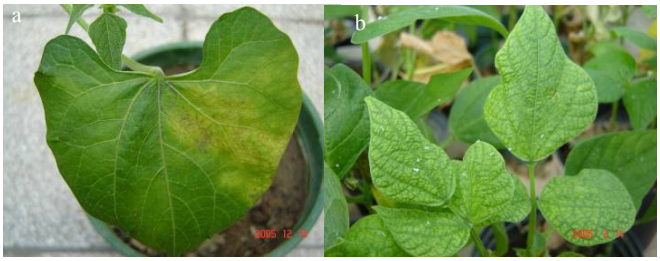
جدایه منتخب BCMV از اسـتان فـارس در دماهـای کمتـر از ۳۰°C روی ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی و قرمز علائمـی نظیـر موزائیـک، قاشقی شدن برگ و رگبرگ نواری ایجاد نمود (شکل ۱ و ۲). اما ایـن جدایه از ویروس در دمای ۳۰° C و دماهای بـالاتر از آن در برگهـای مایه زنی شده ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی و قرمـز ایجـاد نکـروز رگبـرگ نمود (شکل ۳). هیچیک از ۵۵ بوته متعلق به ژنوتیپ لوبیا سفید مایـه زنی شده با جدایه BCMV از استان فارس، علایم قابل مشاهده ای را نشان ندادند. همچنین بوته هایی از گیاهان لوبیا متعلق به هـر سـه ژنوتیپ، که به عنوان شاهد با استفاده از بافر فسفات مایـه زنـی شـده بودند، فاقد علائم ظاهری قابل تشخیص بودند. براساس نتایج حاصل از آزمون الیزا درصد آلودگی به BCMV در ژنوتیپ چیتـی ۶۵/۴ ٪ ، ژنوتیپ قرمز ۵۸/۱ ٪ ، و ژنوتیپ سـفید ۳/۶ ٪ بـه BCMV تعیـین گردید (جدول ۲).

به علت فقدان علائم قابل مشـاهده در بوتـه‌هـای ژنوتیـپ لوبیـا سفید و عدم ردیابی ویروس توسط آزمون ELISA در این بوتـه هـا، جهت اطمینان از حضور و یا عدم حضور ویروس در آنهـا و همچنـین اطمینان از نتایج الیزا در بوته‌های ژنوتیـپ‌های لوبیـا قرمـز و چیتـی، تعـداد ۳۵ بوتـه از ژنوتیـپ لوبیـا سـفید و ۲۵ بوتـه از هـر کـدام از ژنوتیپ‌های لوبیا قرمز و چیتـی جهـت بررسـی توسـط آزمـون RT-PCR و یـا IC-RT-PCR انتخـاب شـدند. در مـورد لوبیـا قرمـز و چیتی، نیمی از گیاهان الیزا مثبت و نیمی دیگر الیزا منفی بودند و یک بوته نیز از گیاهان شاهد انتخاب گردید. اما در مورد لوبیا سـفید چـون تنها دو بوته الیزا مثبت بودند، بنابراین ۳۲ بوته دیگـر از بـین گیاهـان الیزا منفی و یک بوته نیز از گیاهان شـاهد انتخـاب گردیدنـد. آزمـون IC-RT-PCR بـا اسـتفاده از آغـازگر اختصاصـی BCMV انجـام گردید، که نتایج آن حاکی از وجود این ویروس در تمـامی بوتـه‌هـای ژنوتیپ‌های لوبیا قرمز و چیتی الیزا مثبت بود و در تعدادی از گیاهـان الیزا منفی نیز باند مورد نظر تکثیر گردید.

جدول ۱- مناطق نمونه برداری شده، تعداد کل نمونه‌های گیاهی جمع آوری شده و تعداد نمونه‌های آلوده بهBCMV

مناطق نمونه برداری (استان)	تعداد نمونه‌های گیاهی جمع آوری شده	تعداد نمونه‌های آلوده بهBCMV	درصد آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده
فارس	۱۹۷	۹۳	٪۴۷/۲۱
اصفهان	۲۵	۳	٪۱۲
کهگیلویه و بویراحمد	۲۲	۶	٪۲۷/۲۷
تهران	۱۶	۸	٪۵۰
مجموع	۲۶۰	۱۱۰	

شکل ۱- علائم آلـــودگی به BCMV در ژنوتیپ ks-21478 (لوبیا چیتی) در دماهای کمتر از ۳۰ ° C
a) قاشقی شدن برگ ، b) موزائیک، c) رگبرگ نواری



شکل ۲- علائم آلودگی به BCMV در ژنوتیپ ks-31170 (لوبیا قرمز) در دماهای کمتر از ۳۰ °C
a) لکه های کلروتیک ، b) موزائیک و پیچیدگی برگ.

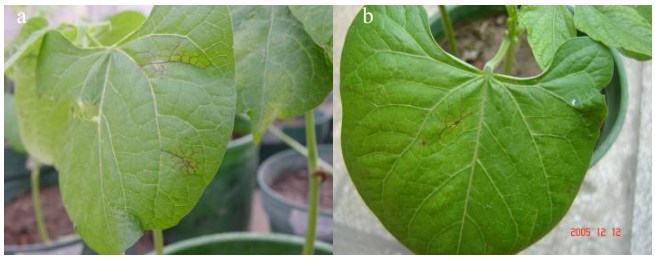
جدول ۲- تعداد بوته‌های آلوده سه ژنوتیپ مورد بررسی لوبیا به BCMV براساس آزمون الیزا

رقم لوبیا	تعداد بوته‌های کاشته شده از هر ژنوتیپ لوبیا	تعداد بوته‌های مایه زنی شده با BCMV	تعداد بوته‌های شاهد	تعداد بوته‌های آلوده براساس آزمون ELISA	درصد آلودگی
چیتی	۶۰	۵۵	۵	۳۶	۶۵/۴
قرمز	۶۰	۵۵	۵	۳۲	۵۸/۱
سفید	۶۰	۵۵	۵	۲	۳/۶

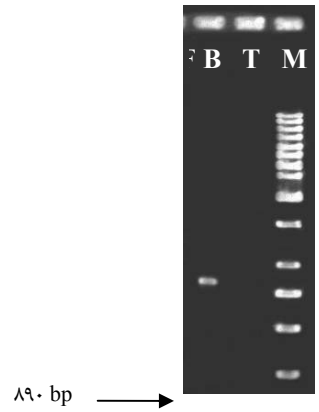
اما در بیش از نیمی از بوته‌های لوبیا سفید (۲۵ بوته) مورد آزمایش حتی در بوته هایی که آزمون الیزا موفق به شناسایی آنها نگردیده بود، این آزمون وجود ویروس را مشخص نمود و باند مورد نظر تشکیل گردید. در هیچ کدام از گیاهان شاهد ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این آزمون باندی مشاهده نشد. ارزیابی محصول آزمون IC-RT-PCR از طریق الکتروفورز افقی در ژل آگاروز ۱٪ و تشکیل باند مورد انتظار، نشان دهنده تکثیر قطعه ای از ژنوم ویروس به طول ۸۹۰ جفت باز بود. آغازگرهای اختصاصی BCMNV در طی آزمون IC-RT-PCR قادر به تکثیر هیچ قطعه ای متعلق به ژنوم ویروس نبود، که نشان دهنده عدم آلودگی بوته‌های مورد آزمایش ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا به این ویروس می باشد (شکل ۴).

بررسی انتقال ویروس در ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی، قرمز و سفید از طریق بذر

بوته‌های لوبیا چیتی، قرمز و سفید حاصل از بذور بوته‌های آلوده به BCMV در مرحله دو برگی از لحاظ علائم ظاهری و همچنین با استفاده از آزمون های ELISA و IC-RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. بوته‌های لوبیا چیتی حاصل از بذور بوته‌های آلوده به BCMV، علایمی نظیر موزائیک، قاشقی شدن برگها، رگبرگ نواری و گاهی نکروز موضعی (شکل ۵) را از خود نشان دادند. علایم آلودگی در بوته‌های لوبیا قرمز حاصل از بذور بوته‌های آلوده به BCMV به صورت موزائیک و رگبرگ نواری مشاهده گردید (شکل ۵). بوته‌های لوبیا سفید حاصل از کشت بذور بوته‌های آلوده به BCMV، فاقد هر نوع علایم ظاهری قابل مشاهده ای بودند (شکل ۶). بررسی بذور آلوده نشان داد که ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی با ۷۸/۳ ٪ بذرزادی، بیشترین میزان و لوبیا سفید با ۵۴/۹ ٪ بذرزادی، کمترین میزان بذرزادی را نسبت به ویروس BCMV دارا می باشند (جدول ۳).



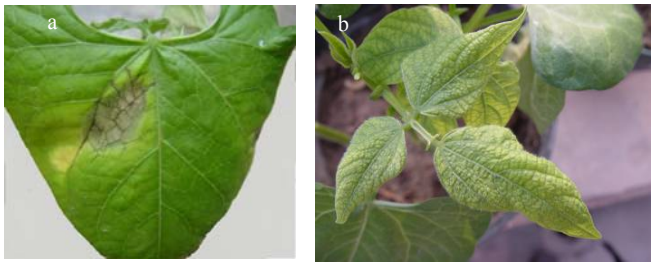
شکل ۳- علائم آلودگی به BCMV در ژنوتیپ های ks-31170 (لوبیا قرمز) و ks-21478 (لوبیا چیتی) در دماهای بیشتر از ۳۰ °C
a) نکروز رگبرگ در لوبیا چیتی، b) نکروز رگبرگ در لوبیا قرمز



شکل ٤- نتایج آزمون IC-RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی BCMV
(B) BCMV ، (T) BCMNV ، (M) مارکر

جدول ۳- آلودگی بذری سه ژنوتیپ لوبیا به جدایه BCMV از استان فارس

رقم لوبیا	تعداد بذورکاشته شده / تعداد بوته حاصل / تعداد بوته دارای علائم بیماری	تعداد بوته‌های آزمایش شده با روش ELISA / تعداد بوته‌های دارای آلودگی به ویروس	تعداد بوته‌های آزمایش شده با روش IC-RT-PCR / تعداد بوته‌های دارای آلودگی به ویروس
چیتی	۸۳/۶۵/۵۷	۶۵/۴۶	۳۲/۲۵
قرمز	۱۱۴/۹۱/۷۵	۹۱/۶۸	۳۴/۲۷
سفید	۱۶۲/۸۹/۰	۸۹/۳۲	۴۲/۲۳



شکل ٥- a) نکروز موضعی در لوبیا چیتی حاصل از بذور آلوده به BCMV در دمای بالاتر از ۳۰ °C
b) موزائیک در لوبیا قرمز آلوده به BCMV

شکل ٦- بوته‌های لوبیا سفید حاصل از بذور آلوده به BCMV ، بدون علائم قابل مشاهده

بحث

با توجه به تحقیقاتی که تاکنون در نقاط مختلف دنیا صورت گرفته است، مشخص گردیده است که ویروس BCMV مهمترین و شایع ترین ویروس لوبیا بوده و بذرزاد نیز می باشد (۱۲). لذا بررسی میزان شیوع و تعیین درصد بذرزاد شدن آن جهت ایجاد روشهای مناسب برای مدیریت بیماری حاصل از این ویروس در مزارع لوبیا از اهمیت به سزایی برخوردار است.

نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های گیاهی آلوده جمع آوری شده از چهار استان مختلف ایران نشان داد که BCMV عامل اصلی ایجاد کننده علائم موزائیک لوبیا در این استان ها می باشد. این نتایج با یافته‌های بهرامی کمانگر (۳) و هاشمی (۷) مطابقت دارد. همچنین نتایج تحقیقات بیانگر میزان آلودگی بیشتر در مزارع لوبیای استان فارس بود. پس از این استان، از نظر درصد آلودگی به ترتیب استان‌های کهگیلویه و بویراحمد، تهران و اصفهان قرار داشتند. از آنجا که استان فارس یکی از مهمترین مناطق کشت لوبیا می باشد (۱) بررسی گسترده در این استان و تعیین جدایه غالب BCMV در مزارع لوبیای این استان و تلاش جهت دستیابی به ارقام متحمل در برابر این جدایه ها اهمیت ویژه ای دارد.

در این تحقیق، علایم ناشی از تلقیح ویروس در گیاهان لوبیای میزبان، مشابه علایم حاصل از این ویروس بود که توسط مصاحبی (۵)، برادران (۲)، بهرامی کمانگر (۳)، نادرپور (۶)، هاشمی (۷) و دریجفوت (۹ و ۱۰) گزارش شده است. با این تفاوت که در مطالعه حاضر جدایه منتخب این ویروس روی گیاهان محک *C. quinoa* و *C. amaranticolor* علایم ظاهری قابل مشاهده ای ایجاد ننمود.

نتایج حاصل از آزمون الیزا نیز طبق انتظار بیانگر حضور این ویروس در غلظت‌های قابل ردیابی توسط این آزمون در ژنوتیپ‌های قرمز و چیتی لوبیا بود. اما لوبیا سفید موردی استثنایی بود که در آن ویروس توسط آزمون الیزا قابل ردیابی نبود و نیاز به انجام آزمایشات تکمیلی بیشتری داشت. در بررسی ژنوتیپ لوبیا سفید با استفاده از آزمون IC-RT-PCR به کمک جفت آغازگر اختصاصیBCMV، قطعه ای به طول ۸۹۰ جفت باز از ژنوم ویروس تکثیر گردید که مطابق با اندازه قطعه مورد انتظار بود. بنابراین آلودگی این ژنوتیپ لوبیا نیز با استفاده از این آزمون اثبات گردید.

نتایج به دست آمده نشان دادند که، ژنوتیپ ks-41235 (لوبیا سفید) تحت شرایط گلخانه ای نسبت به BCMV متحمل و عموماً فاقد علائم ظاهری قابل مشاهده بود و نسبت به ژنوتیپ‌های لوبیا چیتی و قرمز تعداد بذور بیشتری را تولید نمود و این بذور در مقایسه با بذور تولید شده توسط ژنوتیپ‌های چیتی و قرمز لوبیا دارای قدرت جوانه زنی بالاتری بوده و این بذور گیاهچه‌های بیشتری را نیز تولید نمودند. با توجه به تعداد بذور سالم و آلوده حاصل از گیاهان تلقیح شده با ویروس، درصد بذرزاد شدن BCMV نیز در این ژنوتیپ لوبیا کمتر از سایرین بود. در تحقیقی که توسط میکلاس و همکاران (Miklas *et al.*, 1997) انجام گرفته است نیز سه جرم پلاسم مقاوم از لوبیای سفید در برابر BCMV و BCMNV شناسایی شده اند. در حالی که ژنوتیپ‌های لوبیا قرمز و چیتی نسبت به ویروس حساس بوده و میزان تولید بذر در آنها در اثر آلودگی به ویروس کاهش یافته و همچنین قدرت جوانه زنی بذور نیز نسبت به گیاهان شاهد کمتر بود.

لذا با توجه به اینکه ژنوتیپ لوبیا سفید علی رغم آلودگی به ویروس علایم قابل مشاهده ای را بروز نداده و نیز کاهش کیفی و کمی محصول (بذور حاصل از گیاهان آلوده) در آن قابل توجه نمی باشد بنابراین بررسی جنبه‌های مختلف آلودگی این ژنوتیپ به ویروس موزائیک معمولی لوبیا (BCMV) می تواند حائز اهمیت باشد. همچنین واکنش چنین ژنوتیپی در برابر سایر جدایه‌های منتخب ویروس که شیوع و پرآزاری نسبتا زیادی در مناطق مورد مطالعه دارند نیز می تواند در تعیین قابلیت چنین ژنوتیپ‌های متحملی موثر باشد. به طوریکه نتایج چنین آزمونهایی در نهایت در معرفی ژنوتیپ‌های متحمل قابل اعتماد که قابل کاربرد در مناطق دارای آلودگی زیاد گیاهان لوبیا به این ویروس باشند اهمیت به سزایی خواهند داشت.

منابع

۱- آمارنامه کشاورزی. ۱۳۸۳. اداره کل آمار و اطلاعات وزارت کشاورزی. تهران.

۲- برادران غ. ۱۳۷۶. بررسی ویروس موزائیک معمولی لوبیا (BCMV) و تعیین پراکنش آن در منطقه مشهد و چناران. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه مشهد، ۹۷ صفحه.

۳- بهرامی کمانگر س. ۱۳۷۷. شناسایی و فراوانی نسبی ویروس‌های مولد موزائیک لوبیا در استان فارس. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه شیراز، ۲۲۴ صفحه.

۴- درّی ح.، لک م.، بنی جمالی س.م.، دادیور م.، قنبری ع.، خودشناس م. و اسدی ب. ۱۳۸۲. لوبیا (از کاشت تا برداشت). نشریه آموزشی ترویج، ۷۷ صفحه.

۵- مصاحبی محمدی غ.۱۳۵۱. مطالعه ویروس موزائیک معمولی لوبیا و بررسی خواص ایزوله‌های مختلف این ویروس در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران، ۱۸۵ صفحه.

۶- نادرپور م. ۱۳۷۸. شناسایی پاتوتیپ ها و استرین‌های ویروس *Bean common mosaic virus* در استان تهران. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران، ۱۱۲ صفحه.

۷- هاشمی م. ۱۳۷۸. مقایسه خصوصیات سرولوژیکی، بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی پوتی ویروسهای مولد موزائیک معمولی لوبیا، زرد لوبیا و موزائیک بذرزاد لوبیا چشم بلبلی در فارس. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه شیراز، ۱۳۵ صفحه.

8-Clark M.F. and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplatemethod of enzyme-linked immunosorbant assay for the detection of plantviruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.

9-Drijfhout E. 1978. Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* L. and bean common mosaic virus with implications for strain identification and breeding for resistance. Agricultural Research Report 872, Pudoc, Wageningen.

10-Drijfhout E. 1991. Bean common mosaic. Compendium of Bean Diseases. APS Press, pp 37-39.

11-Koening R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. Journal of General Virology, 55: 53-62.

12-Mavric I. and Sustar-Vozlic J. 2004. Virus diseases and resistance to Bean common mosaic and Bean common mosaic necrosis potyvirus in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Acta agriculturae slovenica, 83: 181-190.

13-Miklas P. N., Beaver J. S., Steadman J. R., Silbernagel M. J. and Freytag G. F. 1997. Registration of three bean common mosaic virus-resistant navy bean germplasms. Crop Science, 37: 1025.

14-Nolasco G., Blas C., Torres V. and Ponz F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. Journal of Virological Methodes, 45: 201-218.

15-Silbernagel M.J., Mink G.I., Zhao R-L. and Zheng G-Y. 2001. Phenotypic recombination between bean common mosaic and bean common mosaic necrosis potyviruses *in vivo*. Archives of Virology, 146: 1007-1020.