



وقوع ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV) در باقلا کاری‌های استان زنجان

علی برادر*، احمد حسینی، ثمین حسینی و سمیه عبدانی بابکی

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران

*eng.baradar@gmail.com

چکیده

در پژوهش حاضر، براساس نمونه‌برداری‌های انجام شده در فصل زراعی ۹۷ و ۹۸، ۱۰۰ نمونه‌ی برگ‌ی از مزارع باقلای استان زنجان جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای علائم موزائیک سبز خفیف تا شدید، سبزدی، کوچکی و بدشکلی برگ‌ی بودند. در مرحله اول، نمونه‌ها با استفاده از آزمون‌های سرولوژیکی DAS-ELISA و آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای BYMV مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های دارای واکنش مثبت با آنتی‌بادی اختصاصی، از طریق روش‌های مولکولی رونوشت‌برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی نوای HC-Pro و CP از ویروس BYMV مورد بررسی تکمیلی قرار گرفتند. نوای تکثیر یافته در واکنش PCR، بر روی ژل آگارز یک درصد ارزیابی شدند. نتایج حاصل، نشان‌دهنده‌ی تکثیر قطعات DNA به طول مورد نظر (۱۱۰۰ و ۷۵۰ جفت باز) در نمونه‌های جمع‌آوری شده بود. تعیین توالی نمونه‌های مزبور و بررسی توالی‌های به دست آمده با استفاده از ابزار جستجوی BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI، نشان‌دهنده‌ی مطابقت ۹۸-۹۲ درصدی آن با توالی‌های ثبت شده در Genbank در مورد جدایه‌های BYMV از مناطق مختلف جهان بود. این اولین گزارش از حضور ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV) در مزارع باقلا کاری استان زنجان می‌باشد.

مقدمه

باقلا با نام علمی *Vicia faba* L.، یکی از حبوبات عمده در بسیاری از کشورهای دنیا از جمله؛ ایران می‌باشد. این گیاه در نقاط مختلف ایران به‌خصوص نوای شمالی، جنوب و جنوب‌غربی به عنوان محصول عمده، کشت و کار می‌گردد. با این حال، محدودیت‌های زیادی از جمله: خشکسالی، بازدهی کم ارقام محلی، آفات و بیماری‌ها، تولید این محصول را تهدید می‌کند. در بین تمام محدودیت‌ها، ویروس‌های خسارت‌زننده به باقلا به‌عنوان مخرب‌ترین عامل در نظر گرفته شده‌اند که به دلیل تشخیص دشوار و نبود روش کنترلی مناسب، به عنوان یک مشکل جدی برای گیاه باقلا در سراسر جهان گزارش شده‌اند (Sillero *et al.*, 2010).

آلودگی‌های ویروسی باعث ضرر و زیان قابل توجه اقتصادی و کاهش ۳۰ درصدی عملکرد در ارقام حساس می‌شوند. بیماری‌های ویروسی نه‌تنها باعث آسیب مستقیم به میزبان می‌شوند، بلکه گیاه را نسبت به حمله‌ی بیمارگرهای ثانویه، مستعد می‌کنند (Khalil and Erskine, 2001). در میان ویروس‌های گزارش شده از باقلا، "ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV)" یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین بیماری‌های ویروسی است که دامنه‌ی وسیعی از گیاهان را آلوده می‌کند و توسط چندین گونه شته به‌صورت ناپایا انتقال می‌یابد. گرچه خسارت آلودگی با BYMV باعث نابودی گیاه نمی‌شود، اما میزان عملکرد گیاه را کاهش می‌دهد (Sidaros *et al.*, 2006).

مواد و روش‌ها

ردیابی و شناسایی ویروس موزائیک زرد لوبیا در مزارع باقلا

در فصول زراعی ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ برگ‌های گیاهان دارای علائم ویروسی از مزارع باقلای نوای مختلف استان زنجان به صورت جداگانه با ثبت نام محل و تاریخ نمونه‌برداری در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص قرار داده شد و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تشخیص BYMV در بین نمونه‌ها، از آزمون DAS-ELISA با بهره‌گیری از آنتی‌بادی پلی‌کلونال BYMV تهیه شده از مؤسسه Bioreba طبق دستورالعمل کلارک و آدامز (۱۹۷۷) استفاده شد. نتایج پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه با دستگاه الیزاخوان Epoch (BioTech) با طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید و از هر منطقه یک نمونه آلوده به ویروس برای بررسی‌های بیشتر انتخاب گردید.

استخراج آر.ان.ای کل گیاه، تکثیر و توالی‌یابی نوای CP و HC-Pro جدایه‌های انتخابی

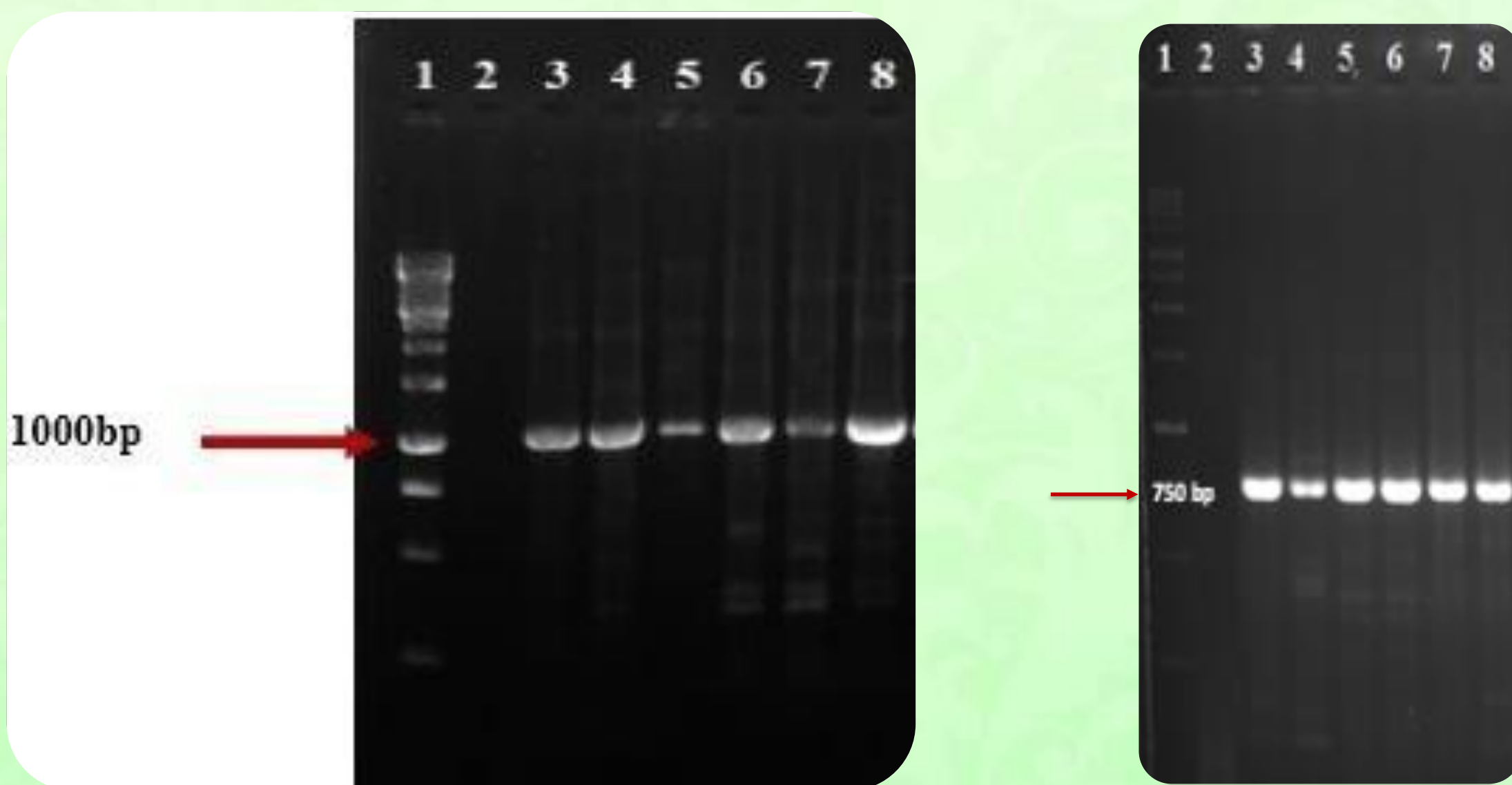
آر.ان.ای. کل نمونه‌های انتخابی آلوده به BYMV، با استفاده از کیت Top Plant and Fungi RNA Purification kit (شرکت توپاز ژن- ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج گردید. برای تکثیر نوای CP و HC-Pro، از جفت آغازگر اختصاصی ناحیه پروتئین پوششی ویروس موزائیک زرد لوبیا با نام BYMVCPrev (GTCTGTTCCAACATTGCCAT) و BYMVCpfor (CGKTTTCARTCWGATCAAGA) که با نرم‌افزار Vector NTI Advance™ (Invitrogen) 11 طراحی شده بودند و همچنین جفت آغازگر اختصاصی ناحیه HC-Pro با نام‌های

نتایج و بحث

در پژوهش حاضر؛ در راستای مقایسه نوای CP و HC-Pro، از نوای مختلف استان زنجان، فرآیند نمونه‌برداری انجام شد. بر اساس آزمون الایزا از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، به طور میانگین ۸۰-۶۰ درصد به ویروس موزائیک زرد لوبیا آلوده بودند. از میان نمونه‌های برگ‌ی آلوده به ویروس، جدایه‌هایی که بالاترین میزان جذب در آزمون الایزا را داشتند، انتخاب گردیدند. واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نوای CP و HC-Pro از آر.ان.ای. کل استخراج شده، منجر به تکثیر قطعاتی به ترتیب به طول ۷۵۰ و ۱۱۰۰ جفت باز شد. نتایج حاصل از تکثیر نوای CP و HC-Pro روی ژل آگارز یک درصد در تصویر شماره یک مشاهده می‌شود. شاهد منفی در این آزمایش، شامل تمامی موارد مورد استفاده در واکنش پی‌سی‌آر، منهای نمونه استخراج شده از بافت برگ‌ی بود که به‌جای آن از آب دوبار تقطیر استریل استفاده شد. تعیین توالی نمونه‌های مزبور و بررسی توالی‌های به دست آمده با استفاده از ابزار جستجوی BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI، نشان‌دهنده‌ی مطابقت ۹۸-۹۲ درصدی آن با توالی‌های ثبت شده در Genbank در مورد جدایه‌های BYMV از مناطق مختلف جهان بود. این اولین گزارش از حضور ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV) در مزارع باقلا کاری استان زنجان می‌باشد.

ب

الف



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی نتایج حاصل از آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس BYMV در ژل آگارز یک درصد رنگ آمیزی شده به وسیله Red-safe: الف) ناحیه CP: راهک ۱: نشانگر دی.ان.ای یک کیلو بازی، راهک ۲: کنترل منفی، راهک ۳-۸: نمونه باقلای جدا شده از مناطق مختلف استان زنجان. ب) ناحیه HC-Pro: راهک ۱: نشانگر دی.ان.ای یک کیلو بازی، راهک ۲: کنترل منفی، راهک ۳-۸: نمونه باقلای جدا شده از مناطق مختلف استان زنجان.

منابع

- Clark, M.F., Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- Nakazono-Nagaoka, E., Sato, C., Kosaka, Y., Natsuaki, T. 2004. Evaluation of cross-protection with an attenuated isolate of Bean yellow mosaic virus by differential detection of virus isolates using RT-PCR. *Journal of General Plant Pathology*. 70: 359-362.
- Sidaros, S.A., El-Kewey, S.A., Khattab, E.A.H. and El-Sharkawy, M.M. 2006. Purification, serology and prevalence of Broad bean stain virus (BBSV) and Cowpea aphid borne mosaic potyvirus (CABMV), *Egyptian Journal of Virology*. 3: 71-88.
- Khalil, S.A., Erskine, W. 2001. Combating disease problems of grain legumes in Egypt. *Grain Legumes*. 32: 24-26.
- Sillero, J.C., Villegas-Fernandez, A.M., Thomas, J., Rojas-Molina, M.M., Emeran, A.A., Fernandez-Aparicio, M., Rubiales, D. 2010. Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research*. 115: 297-307.