فصلنامه گیاه‌پزشکی
(دانشگاه آزاد اسلامی شیراز)
جلد ۶، شماره ۲، سال ۱۳۹۳ (۱۴۸-۱۳۳)

واکنش ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا چشم بلبلی (*Vigna sinensis*) به ویروس موزاییک معمولی لوبیا (BCMV) در شرایط گلخانه

سمانه جوانمردی[۱]، ساسان قاسمی[۱*]، نوح شهرآیین[۲]
۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، شیراز، ایران
۲- موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران، ایران

چکیده

ویروس موزاییک معمولی لوبیا (*Bean Common Mosaic Virus*) دارای گسترش جهانی وسیعی بوده، باعث کاهش عملکرد و همچنین نقصان در کیفیت محصول می‌گردد. بکارگیری ژنوتیپ‌های متحمل و مقاوم از راهکارهای اصلی مدیریت این بیماری می‌باشد. بیست ژنوتیپ لوبیا چشم بلبلی در دو آزمایش مجزا با اعمال متغیرهای آلودگی و عدم آلودگی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفتند. آلودگی در مرحله دو برگی به صورت مکانیکی و ارزیابی ظاهری ۲۱ روز بعد از آلودگی انجام شد. جهت تعیین میزان آلودگی ژنوتیپ‌ها از آزمون الایزا استفاده گردید. آلودگی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی به وسیله آزمون RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BCMV، نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیانگر تکثیر قطعه‌ای به طول ۳۷۳ جفت باز، در گیاهان آلوده بود. ژنوتیپ‌های مورد بررسی از ۶/۶۶ تا ۸۰ درصد آلودگی به BCMV را نشان دادند. با توجه به علائم ایجاد شده در اثر مایه‌زنی مکانیکی با BCMV به ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا چشم بلبلی نمره دهی (۴-۰) برای به دست آوردن شدت آلودگی صورت پذیرفت. با توجه به نتایج به دست آمده ژنوتیپ‌ها به گروه‌های خیلی حساس، حساس، نیمه مقاوم و مقاوم تقسیم‌بندی شدند.

واژه‌های کلیدی: لوبیا چشم بلبلی، ویروس موزاییک معمولی لوبیا، ژنوتیپ

---

[*] مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ssghasemi@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۰۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۳۰

مقدمه

منشأ لوبیا چشم بلبلی (*Vigna sinensis*) آفریقا بوده و سپس به هند و چین و قسمت‌های مرکزی و شمالی آمریکا منتقل شده است (Jahansoz *et al.*, 2003). بیست ویروس این گیاه را در مزرعه مورد حمله قرار می‌دهند (Thottapilly & Rossel, 1985) . مهم‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری ویروسی این گیاه، ویروس موزاییک معمولی لوبیا *Bean Common Mosaic Virus* (BCMV), می‌باشد (Alegbego & Kashina, 2001). این ویروس در اوایل قرن بیستم از اغلب نواحی تولید کننده لوبیا گزارش گردید (Strausbaugh *et al.*, 2003).

گزارش‌های موجود این ویروس را به عنوان مهم‌ترین عامل بیماری‌زای ویروسی لوبیا در ایران معرفی می‌نماید (Mosahebi Mohammadi, 1972) علائم موزاییک ناشی از ویروس در گیاه لوبیا، اولین بار توسط Iwanofski (1864) از روسیه گزارش شد (Mosahebi Mohammadi, 1972). تا سال ۱۹۲۲ ویروس موزاییک معمولی لوبیا و ویروس موزاییک معمولی نکروز لوبیا به عنوان سروتیپ‌های A وB از یک گونه در نظر گرفته می‌شدند (Flores-Estevez *et al.*, 2003). بعداً معلوم شد که سروتیپ A، همان (BCMNV) و سروتیپ B همان BCMV می‌باشد (Mink *et al.*, 1994).

شناسایی ویروس موزاییک معمولی لوبیا و ویروس موزاییک معمولی نکروز لوبیا از طریق روش‌های سرولوژیکی و مولکولی امکان‌پذیر است. این در حالی است که تمام نژادها علائم مشابهی را در ژنوتیپ‌های فاقد ژن‌های مقاومت ایجاد می‌کنند (Flores-Estevez *et al.*, 2003). گزارش‌های متعدد میزان خسارت BCMV را بسته به رقم و زمان آلودگی بین ۶ تا ۹۸ درصد نشان می‌دهد (Dasgupta *et al.*, 2003, Ittah, 2006). وجود این ویروس در ایران برای اولین بار توسط Manoochehri (1963) از مزارع لوبیا در دماوند گزارش شده و میزان آلودگی را تا ۱۰۰ درصد نیز اعلام نمود (Mosahebi Mohammadi, 1972). این ویروس در تمام مناطق ایران انتشار دارد (Mosahebi Mohammadi, 1972). در بررسی‌های Peyambari *et al.*,(2006)، در چهار استان کشور، BCMV را به عنوان عامل اصلی ایجاد کننده علائم موزاییک لوبیا معرفی نموده است. نتایج بیانگر میزان آلودگی شدید در مزارع لوبیای استان فارس بوده است. آلودگی‌های استان‌های کهکیلویه و بویراحمد، تهران و اصفهان به ترتیب در مقام‌های بعدی قرار گرفتند.

تحقیقات متعددی در خصوص این ویروس و اثر آن بر خانواده حبوبات از جمله انواع لوبیا انجام شده است،گزارشی از واکنش رقم‌ها و ژنوتیپ‌های متحمل و مقاوم لوبیا چشم بلبلی نسبت به این ویروس در دست نیست. از آنجا که بهترین روش جهت مقابله با بیماری‌های ویروسی روش‌های مبتنی بر اصل پیشگیری است، تلاش برای یافتن رقم‌های مقاوم و استفاده از این رقم‌ها در مزارع لوبیا بسیار مؤثر واقع شود.

در این تحقیق عکس‌العمل ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی نسبت به ویروس موزاییک معمولی لوبیا بررسی گردیده است، همچنین شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم این گیاه که به کاهش مصرف سموم شیمیایی و کاهش هزینه‌ها در جهت مدیریت کنترل ویروس منتهی خواهد شد، مدنظر قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

۱- *تهیه ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی*

بیست ژنوتیپ مورد مطالعه در این تحقیق از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (کرج) تهیه گردید. از هر ژنوتیپ ده بذر در قالب یک طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در گلدان‌های ۱۶ سانتیمتری شامل خاک برگ، ماسه بادی و خاک معمولی (۱:۱:۱) کشت شده که پس از تنک کردن به پنج بوته در هر گلدان رسید و در شرایط گلخانه با دمای ۳۲-۱۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای هر ژنوتیپ یک گلدان شاهد که حاوی بذرهای همان ژنوتیپ بود در نظر گرفته شد که با آب مقطر مایه‌زنی مکانیکی شدند.

کد ژنوتیپ‌های لوبیای مورد استفاده در این بررسی در جدول یک نشان داده شده است.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی استفاده شده در این تحقیق

Table 1- Cowpea genotypes investigated in this research

Row	Genotypes Code	Row	Genotypes Code
1	TN-38-7244	11	TN-38-7265
2	TN-38-7245	12	TN-38-7266
3	TN-38-7248	13	TN-38-7278
4	TN-38-7251	14	TN-38-7280
5	TN-38-7254	15	TN-38-7289
6	TN-38-7256	16	TN-38-7305
7	TN-38-7257	17	TN-38-7306
8	TN-38-7258	18	TN-38-7308
9	TN-38-7259	19	TN-38-7309
10	TN-38-7262	20	TN-38-7310

۲- *مایه‌زنی و تکثیر ویروس بر روی گیاهان حساس*

برای اطمینان از حصول آلودگی صددرصد نمونه‌ها به BCMV و همچنین آلوده نبودن نمونه‌ها به CMV، به دلیل دامنه میزبانی وسیع این ویروس، آزمایش‌های سرولوژیکی و مولکولی که شامل آزمون الایزا و PCR بود انجام پذیرفت. با توجه به نتایج به دست آمده بافتی که به عنوان منبع ویروس در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت تنها به BCMV آلوده بود و هیچ‌گونه آلودگی به CMV نشان نداد. همچنین قابل ذکر است که این آزمون‌ها بعد از انجام مایه‌زنی بر روی گیاهان حساس و تکثیر اینوکولوم اولیه صورت گرفت که از بین نمونه‌های مایه‌زنی شده نمونه‌هایی که بیشترین آلودگی (عمدتاً علائم موزاییک) را نشان دادند برای

مایه‌زنی بر روی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی انتخاب و جدا گردید. در این آزمایش گیاه مادری عاری از ویروس بوده پس بذور نیز عاری از بیماری ویروسی بوده‌اند.

۳- زادمایه ویروس و تکثیر آن

زادمایه منبع ویروس موزاییک معمولی لوبیای مورد استفاده در این تحقیق از بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) تهیه گردید (اهدایی دکتر شهر آیین). این زادمایه با روش مایه‌زنی مکانیکی روی لوبیاچیتی و چشم بلبلی تکثیر گردید.

۴- مایه زنی

واکنش ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی، با انجام مایه‌زنی مکانیکی بوته‌ها در مرحله دو برگی با استفاده از عصاره برگ‌های لوبیای آلوده به BCMV بررسی شد. برای اطمینان، مایه‌زنی مجدد به فاصله یک هفته انجام شد. بوته‌های شاهد پس از کاربوراندوم پاشی با استفاده از آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند. علائم ایجاد شده روی گیاهان تیمار، دو تا سه هفته پس از مایه-زنی بررسی و یادداشت‌برداری شد.

۵- آزمون الایزا

سه هفته پس از اولین مایه‌زنی از هر یک از تیمارها نمونه‌های برگی تهیه و آلودگی آن‌ها با استفاده از آنتی سرم اختصاصی تهیه شده علیه BCMV و به روش PTA-ELISA (Mowat & Davson, 1987) تعیین شد.

نمونه‌هایی که میزان جذب در آن‌ها از میانگین جذب شاهد به علاوه سه برابر انحراف معیار آن‌ها بیشتر بود به عنوان نمونه‌های مثبت و آن‌هایی که کمتر از این میزان جذب نور داشتند به عنوان نمونه‌های منفی ارزیابی شدند (Clark & Adames, 1977).

۶- شدت آلودگی

از هفته دوم پس از اولین مایه‌زنی هر پنج روز یک‌بار به مدت ۴۵ روز از تک‌تک بوته‌ها، شدت آلودگی و علائم مربوطه یادداشت‌برداری شد و سپس از کل بوته‌ها میانگین گرفته شد. به این منظور از روش نمره دهی (۰-۴) توصیفی (Hormozinejad *et al.*, 2008 Schoonhoven & Corrales, 1994) استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲- روش نمره دهی ۰-۴ برای ارزیابی واکنش لوبیا چشم بلبلی به موزاییک معمولی لوبیا

Table 2. Scoring method of 0-4 to reaction assessment of cowpea to BCMV

Index	Index description	Reaction assessment
0	Symptomless	Immune
1	Mild Mottling	Partial Resistant
2	Mild Mosaic	Semi-Resistant
3	Mosaic	Susceptible
4	Stunling, Necrosis	High Susceptible

۷- درصد آلودگی

جهت تعیین درصد آلودگی ظاهری از رابطه زیر استفاده گردید:

$$\text{درصد آلودگی هر ژنوتیپ} = \frac{\text{تعداد بوته‌های آلوده}}{\text{تعداد کل بوته‌ها}} \times 100$$

تعداد کل بوته‌های مایه‌زنی شده هر ژنوتیپ (با توجه به تکرارها) ۱۵ بوته بود. معیار آلودگی هر بوته وجود علائم ظاهری گفته شده در مرحله قبل بود که عمدتاً شامل علائم موزاییک بود.

۸- آزمون RT-PCR

۸-۱- استخراج آر.ان.ای ویروس

آر.ان.ای ویروس با توجه به دنباله پلی A در انتهای ´۳ آن (Dinant *et al.*, 1991 ; Allison *et al.*,1986) با استفاده از mRNA Capture Kit (Roche) استخراج گردید. بدین منظور ۰/۲ گرم بافت گیاه در سه حجم بافر فسفات، pH=۷، عصاره‌گیری و پس از تیمار با کلروفورم (۳۰٪ حجمی) به مدت ۱۰دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه میان‌گریز شد و از رونشین حاصل برای به دام اندازی آر/ ان/ ای ویروس استفاده شد.

۸-۲- به دام اندازی آر/ ان/ ای ویروس

در کیت مذکور لوله‌های اپندورف ۰/۲ میلی‌لیتری با Streptavidin پوشش داده شده‌اند. هر گونه آر.ان.ای با دارا بودن دنباله پلی A به مولکول‌های biotin-labeled oligo dT متصل می‌شود. این اتصال از طریق بیوتین به استرپتاویدین انجام شده و آر/ ان/ ای به دام می‌افتد. از این آر/ ان/ ای در واکنش ترانویسی معکوس استفاده شد.

۸-۳- آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از ترکیبات لازم طبق جدول ۳ به حجم ۲۵

میکرولیتر و آغازگرهای (5 GAG(A)TCTGTGCAT -MV-serotype-B-cp5-Upstream (C)CTA(G) CAA(G)TC-3) و BCMV-serotype-B-cp3-Dstream (5-CCTTCACAG ATTGTACCAC-3) استفاده شد (Abdallah 1995). این آزمون با استفاده از آغازگر reverse و آنزیم RT بر اساس شرکت سازنده (فرمنتاس) انجام گرفت. سفارش پرایمرها از شرکت MWG آلمان است.

برنامه PCR متشکل از یک چرخه دمایی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه به منظور واسرشت سازی اولیه و تعداد ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه بود و بسط زنجیره در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه بود. بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه Thermocycler شرکت اپندورف و یا مدل icycler شرکت BIO RAD انجام شد. محصول واکنش در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شده، با جفت باند مورد انتظار برای هر واکنش ارزیابی شد.

جدول ۳- مواد لازم در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Table 3. Ingredients used in PCR

Component	Valume (µl)
dNTPs (each 10 mM)	0.5
Primer-forward (10 mM)	1
Primer-reverse (10 mM)	1
Taq buffer (10 x)	2.5
$Mgcl_2$ (50 mM)	0.75
DEPC water	14
cDNA	5
Taq DNA Polymerase (5 u/ml)	0.25

نتایج

۱- *علائم شناسی*

بیشتر ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی به این ویروس آلوده شد، علائم اختصاصی را در مراحل آخر آلودگی (طی ۴۵ روز) از خود نشان دادند. این علائم از هفته سوم پس از مایه‌زنی اول قابل مشاهده بودند.

علائم اختصاصی بیماری شامل: لکه‌های سبز روشن و تیره در برگ، تورم رگبرگ، لکه‌های نکروتیک خفیف، قاشقی شدن برگ به پایین مشاهده شد. همچنین تاولی شدن برگ‌ها در ژنوتیپ‌های ۱، ۶، ۷، ۸، ۱۵، ۱۸ و ۱۹ دیده شد. علائم دیگری مانند کوتولگی، کوچک شدن برگ‌ها و لکه‌های نکروتیک و زرد شدن برگ‌ها نیز در برخی از ژنوتیپ‌ها مشاهده شدند. در

گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر علائمی مشاهده نشد به جز در ژنوتیپ‌های ۳ ، ۸ و ۱۷ که علائم بسیار خفیف نکروز نشان دادند که می‌تواند ناشی از صدمات مکانیکی حاصل از مایه‌زنی باشد. لکه نکروتیک خفیف و علائم موزاییکی در اکثر ژنوتیپ‌ها وجود داشت. به طور کلی ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۱۳، ۱۴، ۱۷و ۱۸ علائم شدیدتری را در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها نشان دادند.

۲- *آزمون الایزا*

نتایج به دست آمده از آزمون سرولوژیکی الایزا نشان‌گر آلودگی ژنوتیپ‌های مایه‌زنی شده به BCMV بود.

اما گیاهان شاهد و لوبیاچیتی که مایه‌زنی نشده بودند، علائم ظاهری قابل تشخیص ایجاد نکردند که این موضوع در آزمون الایزا به اثبات رسید.

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون الایزا به صورت میانگین و با استفاده از فرمول زیر، تمام ژنوتیپ‌ها با کنترل منفی مقایسه گردیدند.

نحوه امتیاز دهی بدین صورت انجام شد:

A: آلودگی کم؛ مقادیر ۰/۳۵ –۰/۲۵

B: آلودگی متوسط؛ ۰/۴۵ –۰/۳۶

C: آلودگی شدید؛ ۰/۵۵ –۰/۴۶

D: آلودگی بسیار شدید؛ ۰/۶۵- ۰/۵۶.

با توجه به جدول ۵ مشاهده می‌شود که آلودگی در اغلب ژنوتیپ‌ها وجود داشت. البته در برخی از تکرارها علامت منفی نشان از عدم وجود علائم ویروس بود.

کمترین OD مربوط به ژنوتیپ‌های ۸ و ۱۱ با میانگین ۰/۳۹ و بیشترین OD مربوط به ژنوتیپ‌های ۴ و ۵ با میانگین ۰/۵۸ بود.

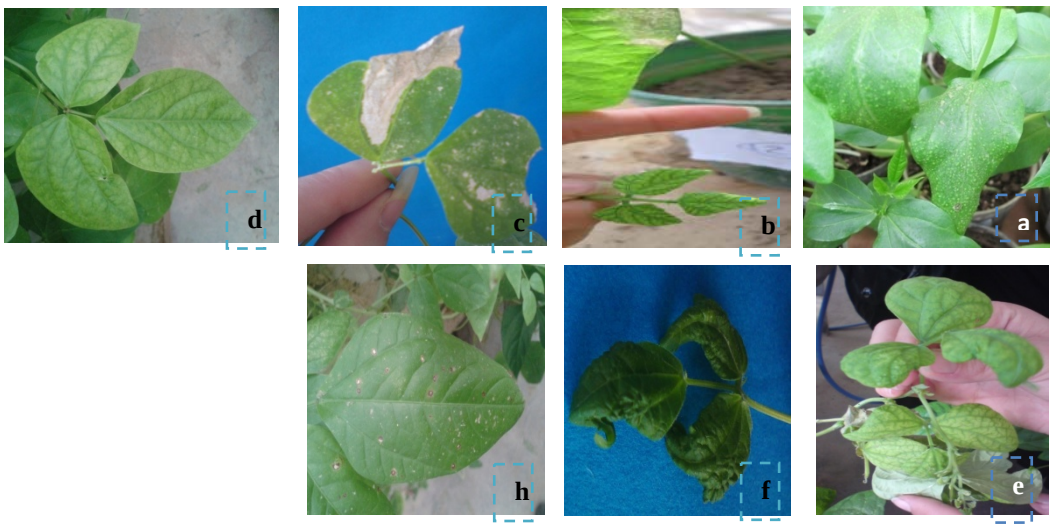
۳- *شدت آلودگی*

با توجه به روش نمره دهی (۰-۴)، شدت آلودگی برای هر ژنوتیپ با توجه به تکرارها و همچنین لوبیاچیتی به عنوان شاهد بسیار حساس به BCMV نمره دهی گردید که نتایج آن در جدول ۶ آمده است.

جدول ۴- علائم ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی به ویروس BCMV

Table 4. Symptoms of cowpea genotyps infected with BCMV

Genotype	Symptoms
TN-38-7244	Leaf blistering , Mosaic, Light necrotic local lesion
TN-38-7245	Light necrotic local lesion in some plant, Leaf roll
TN-38-7248	Small leaves, Stunting, Necrosis, Dead of some plant
TN-38-7251	Mosaic, Tape veins, Yellowing, Necrotic local lesion
TN-38-7254	Necrosis in some leaf
TN-38-7256	Light necrotic local lesion, Mosaic, Light leaf roll
TN-38-7257	Light necrotic local lesion, Mosaic
TN-38-7258	Mosaic, Leaf roll, Light necrotic local lesion
TN-38-7259	Light necrotic local lesion
TN-38-7262	Leaf blistering, Light necrotic local lesion, Mosaic, Tape veins
TN-38-7265	Mosaic, Light necrotic local lesion, Small leaves
TN-38-7266	Light necrotic local lesion
TN-38-7278	Small leaves in some plant, Mosaic, Leaf yellowing
TN-38-7280	Tape veins, Mosaic, Light necrotic local lesion, Leaf blistering
TN-38-7289	Leaf roll, Mosaic, Light necrotic local lesion, Leaf malformation
TN-38-7305	Mosaic, Light necrotic local lesion
TN-38-7306	Leaf blistering, Light necrotic local lesion
TN-38-7308	Leaf blistering, Stunting, Severe mosaic, Leaf roll, Leaf yellowing
TN-38-7309	Leaf blistering, Light necrotic local lesion
TN-38-7310	Leaf blistering, Light necrotic local lesion, Leaf yellowing



شکل ۱- علائم آلودگی به ویروس BCMV **a**- تاولی شدن برگ‌ها، **b**- رگبرگ نواری و کوچک شدن برگ‌ها، **c**- نکروز شدید **d**- تورم رگبرگ، **e**- قاشقی شدن برگ‌ها، **f**- بدشکلی و پیچیدگی برگ‌ها، **h**- لکه‌های نکروتیک

Figure 1. BCMV symptoms **a**- Leaf blistering , **b**- Tape veins and small leaves, **c**- Severe necrosis, **d**- Tape veins **e**- Leaf roll, **f**- Leaf malformation , **h**- Necrotic local lesion

جدول ۵- امتیاز دهی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی در آلودگی به BCMV و محاسبه خطای معیار

Table 5- Scoring of cowpea genotypes in infected with BCMV and calculate the standard error

Genotype	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	± SE $\bar{\square}$ The standard error	Rating
TN-38-7244	0/39	0/52	0/53	0/48±0/04	C
TN-38-7245	0/55	0/56	0/63	0/58±0/01	D
TN-38-7248	0/65	0/55	0/49	0/56±0/04	D
TN-38-7251	0/45	0/52	0/37	0/44±0/04	B
TN-38-7254	0/24	0/56	0/58	0/46±0/05	C
TN-38-7256	0/52	0/53	0/45	0/50±0/04	C
TN-38-7257	0/57	0/57	0/58	0/57±0/01	D
TN-38-7258	0/36	0/54	0/48	0/46±0/04	C
TN-38-7259	0/45	0/49	0/26	0/40±0/05	B
TN-38-7262	0/57	0/53	0/42	0/50±0/03	C
TN-38-7265	0/65	0/57	0/53	0/58±0/02	D
TN-38-7266	0/42	0/56	0/46	0/48±0/02	C
TN-38-7278	0/49	0/57	0/61	0/55±0/02	C
TN-38-7280	0/59	0/53	0/51	0/54±0/02	C
TN-38-7289	0/55	0/62	0/54	0/57±0/06	D
TN-38-7305	0/43	0/36	0/39	0/39±0/02	B
TN-38-7306	0/46	0/53	0/41	0/46±0/02	C
TN-38-7308	0/60	0/50	0/63	0/57±0/01	D
TN-38-7309	0/50	0/47	0/49	0/48±0/02	C
TN-38-7310	0/43	0/41	0/33	0/39±0/02	B
The negative control (Chiti Beans)	0/29	0/29	-	0/29±0/01	A
Positive control $\bar{\square}$ ± SE	0/57	0/52	0/55	0/54±0/01	C
Negative control in formulas $\bar{\square}$ ± SE	0/32	0/25	0/24	0/27±0/02	A

جدول ۶- شدت آلودگی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی نسبت به BCMV

Table 6. Infection severity of cowpea genotyps against BCMV

Genotype	Score (0-4)	Reaction
TN-38-7244	2	Semi-Resistant
TN-38-7245	1	Partial Resistant
TN-38-7248	4	High Susceptible
TN-38-7251	3	Susceptible
TN-38-7254	1	Partial Resistant
TN-38-7256	1	Partial Resistant
TN-38-7257	1	Partial Resistant
TN-38-7258	1	Partial Resistant
TN-38-7259	1	Partial Resistant
TN-38-7262	1	Partial Resistant
TN-38-7265	2	Semi-Resistant
TN-38-7266	1	Partial Resistant
TN-38-7278	2	Semi-Resistant
TN-38-7280	1	Partial Resistant
TN-38-7289	4	High Susceptible
TN-38-7305	1	Partial Resistant
TN-38-7306	1	Partial Resistant
TN-38-7308	4	High Susceptible
TN-38-7309	1	Partial Resistant
TN-38-7310	3	Susceptible
Chiti beans	0	Immune

۴- درصد آلودگی

درصد آلودگی برای هر ژنوتیپ محاسبه و در جدول ۷ مشاهده می‌شود.

جدول ۷- دسته‌بندی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی بر اساس درصد آلودگی به BCMV

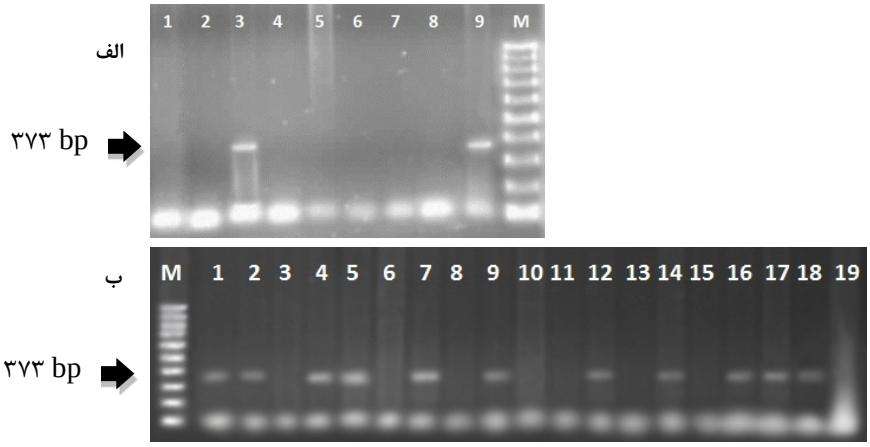
Table 7. Cowpea genotypes classification according to the percentage of infection to BCMV

	I 0-33% Low infection = A	II 34-66% Medium infection = B	III 67-100% Severe infection = C
Genotype	7 11 12 14 15 16 17 19	1 2 3 4 5 6 9 10 13 18 20	8

۵- نتایج RT-PCR

هدف از انجام PCR مقایسه دقت بین این آزمون و آزمون الایزا بود. بدین منظور با استفاده از آغازگرهای اختصاصی توالی مورد نظر شناسایی شد. نتایج حاصل از این آزمون برای نمونه‌های آلوده به BCMV قطعه مورد انتظار با اندازه تقریبی ۳۷۳ جفت باز را به دست داد که در نمونه‌هایی که در آزمون الایزا مثبت نبوده‌اند هیچ باندی مشاهده نگردید. در الکتروفورز محصول PCR به دست آمده از گیاه عاری از ویروس (شاهدها) هیچ قطعه‌ای مشاهده نگردید.

قابل ذکر است که در الکتروفورز از مارکر مولکولی ۱۰۰bp (شرکت فرمنتاس- لیتوانی) استفاده شد.



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول پی سی آر BCMV الف) شماره‌های ۱ تا ۹ به ترتیب نمایانگر ژنوتیپ‌های۲، ۵ و ۶ است با تکرارهایی از هر کدام و M مارکر ملکولی ۱۰۰ bp می‌باشد. ب) شماره‌های ۱ تا ۵ به ترتیب نمایانگر ژنوتیپ‌های۱ تا ۵ و شماره‌های ۶ تا ۱۹ نمایانگر ژنوتیپ‌های۷ تا ۲۰ و M مارکر ملکولی ۱۰۰ bp می‌باشد.

Figure 2. Electrophoretic pattern of PCR virus yield BCMV A) The numbers 1 through 9 represent the genotypes of 2, 5 and 6 with repeat of which one and M = molecular marker 100 bp. B) The numbers 1 through 5 represent the genotypes of 1 through 5 and the numbers 6 through 19 represent the genotypes of 7 through 20 and M = molecular marker 100 bp.

بحث

با توجه به تحقیقاتی که تاکنون در نقاط مختلف دنیا صورت گرفته است مشخص گردیده است که BCMV مهم‌ترین و شایع‌ترین ویروس لوبیا بوده و بذرزاد نیز می‌باشد (Mavric & Susta-Vozlic, 2004). لذا بررسی ژنوتیپ‌های مقاوم و تعیین درصد و شدت آلودگی و همچنین شناسایی علائم این ویروس روی میزبان‌های آن، جهت ایجاد روش‌های مناسب برای مدیریت بیماری و کاهش خسارات حاصل از این ویروس در مزارع لوبیا چشم بلبلی از اهمیت به سزایی برخوردار است.

۱- *نتایج علائم ویروس موزاییک معمولی لوبیا*

علائم ناشی از مایه‌زنی ویروس روی گیاهان لوبیا چشم بلبلی در این تحقیق، مشابه علائم حاصل از این ویروس بود که توسط Bahrami Kamangar (1998)، Osahebi (1972)، Baradaran (1997)، Naderpour (1999)، Hashemi (1999)، Drijfhout (1978,1991) و Peyambari (2006) گزارش شده است.

تفاوت در علائم در ژنوتیپ‌های مختلف، ناشی از نوع ژنوتیپ است و مشاهده علائم تاولی شدن برگ‌ها که در سایر منابع ذکر نگردیده بود می‌تواند ناشی از نوع میزبان، ژنوتیپ خاص لوبیا چشم بلبلی و یا نوع ویروس مایه‌زنی شده باشد.

۲- *نتایج آزمون الایزا*

آلودگی گیاهان شاهد در بعضی از ژنوتیپ‌ها می‌تواند به دلیل بذر زاد بودن BCMV باشد. با توجه به فرمول آزمون الایزا تمام ژنوتیپ‌ها درجاتی از آلودگی را از خود نشان دادند که این مطلب می‌تواند نشان‌گر حساسیت آزمون الایزا و نفوذ ویروس در گیاه لوبیا چشم بلبلی باشد. بر این اساس ژنوتیپ‌ها از امتیاز A: آلودگی کم، B : آلودگی متوسط، C: آلودگی شدید و D: آلودگی بسیار شدید برخوردار شدند.

۳- *شدت آلودگی*

با توجه به روش نمره دهی (۰–۴) که نشان‌گر شدت آلودگی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی مایه‌زنی شده به BCMV بود نمره دهی صورت پذیرفت. با توجه به نتایج تحقیق حاضر بیشتر ژنوتیپ‌ها در گروه نیمه مقاوم جای گرفتند. Hormozi Nejad *et al.*, (2008)، Ariyarathne *et al.*, (1999)، گروه‌بندی را روی لوبیا در برابر BCMV انجام دادند. همچنین Schoonhovenran & Pastor – Corrales (1994) از این روش نمره دهی برای مطالعه ژرم پلاسم لوبیا در اثر بیماری‌های ویروسی استفاده کردند.

۴- درصد آلودگی

ژنوتیپ‌های مورد بررسی از ۶/۶۶ درصد تا ۸۰ درصد آلودگی نشان دادند. ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی در ۳ گروه دسته‌بندی گردیدند. بر اساس این دسته‌بندی بیشتر ژنوتیپ‌ها ۳۴ درصد تا ۶۶ درصد آلودگی را از خود نشان دادند و در درجه بعد صفر درصد تا ۳۳ درصد آلودگی را نشان دادند.

Peyambari *et al*. (2006)، درصد آلودگی را در ژنوتیپ‌های لوبیاچیتی، لوبیا سفید و لوبیا قرمز به دست آوردند. Dasgupta *et al*. (2003)، Ittah (2006) و Castillo-Urquiza *et al*., (2006) نشان دادند که میزان خسارت BCMV بسته به نوع رقم و زمان آلودگی بین ۶ تا ۹۸ درصد متغیر بوده است.

۵- نتایج RT-PCR

در بررسی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی با استفاده از آزمون RT-PCR به کمک جفت آغازگر اختصاصی BCMV قطعه‌ای به طول ۳۷۳ جفت باز از ژنوم ویروس تکثیر گردید که مطابق با اندازه مورد انتظار بود. به غیر از آغازگرهای به کار برده شده از آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش Peyambari *et al*. (2006) استفاده شد اما نتیجه‌ای حاصل نگردید، که می‌تواند ناشی از موارد زیر باشد:

الف) عدم کارایی لازم جفت آغازگرهای مورد استفاده

ب) عدم شناسایی ژنوم ویروس توسط آغازگرها به دلیل طراحی آغازگرها برای استرین‌های خاص BCMV

قابل ذکر است که برای آزمون PCR از بافت خشک، بافت تازه و بافت فریز شده گیاهان لوبیا چشم بلبلی آلوده به BCMV استفاده شد که نتایج نشان داد بافت فریز شده کارایی بهتری نسبت به سایر بافت‌ها داشت. نتایج این تحقیق با یافته‌های Asghari ghara (2008) و Abdallah (1995) مطابقت دارد.

۶- گروه‌بندی واکنش ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی به BCMV

بر اساس تحقیق حاضر و جدول ۸ ژنوتیپ‌های بیست گانه لوبیا چشم بلبلی در ۴ گروه تقسیم‌بندی گردیدند. با توجه به تحقیق حاضر ژنوتیپ‌های ۸، ۱۳، ۱۷و ۱۸ در گروه خیلی حساس و ژنوتیپ‌های۴ و ۱۶ در گروه حساس و ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۳، ۵ و ۹ در گروه نیمه مقاوم و ژنوتیپ‌های ۶، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۹و ۲۰ در گروه مقاوم دسته‌بندی گردیدند. عدم همخوانی کافی بین آزمون الایزا و آزمون PCR در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌تواند به دلیل تفاوت شناسایی روش‌های مذکور باشد. همچنین بسیاری از بافت‌های گیاهی موانعی جهت شناسایی PCR را دارا هستند (Luis *et al*., 1994) که می‌توانند منجر به شکست در

شناسایی ویروس شوند، مخصوصاً بافت‌هایی که به طور مستقیم و بدون خالص‌سازی DNA آزمایش می‌شوند (Asghari ghara, 2008). در تحقیقی که توسط Miklas *et al*. (1997) انجام گرفته است سه ژرم پلاسم مقاوم از لوبیای سفید در برابر BCMV شناسایی شده‌اند در حالی که ژنوتیپ‌های لوبیا قرمز و چیتی نسبت به ویروس حساس بوده است. Peyambari *et al*. (2006) نشان دادند که ژنوتیپ Ks-۴۱۲۳۵ (لوبیا سفید) تحت شرایط گلخانه‌ای نسبت به BCMV متحمل و عموماً فاقد علائم ظاهری قابل تشخیص بود.

Kamelmanesh *et al*. (2012)، طبق پژوهشی ۲۵ ژنوتیپ لوبیا از انواع مختلف قرمز، چیتی و سفید را مورد مطالعه قرار داد و ژنوتیپ‌های لوبیا را در برابر BCMV گروه‌بندی نمودند.

جدول۸- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی نسبت به BCMV

Table 8. Grouping cowpea genotypes against BCMV

Genotype	ELISA	severity	The percentage of infection	Reaction
TN-38-7244	C	II	2	Semi-Resistant
TN-38-7245	D	II	1	Semi-Resistant
TN-38-7248	D	I	4	High Susceptible
TN-38-7251	B	I	3	Susceptible
TN-38-7254	C	III	1	Immune
TN-38-7256	C	II	1	Immune
TN-38-7257	D	II	1	Semi-Resistant
TN-38-7258	C	I	1	Immune
TN-38-7259	B	II	1	Semi-Resistant
TN-38-7262	C	I	1	Immune
TN-38-7265	D	II	2	Susceptible
TN-38-7266	C	I	1	Immune
TN-38-7278	C	II	2	Semi-Resistant
TN-38-7280	C	II	1	Immune
TN-38-7289	D	II	4	High Susceptible
TN-38-7305	B	I	1	Immune
TN-38-7306	C	I	1	Immune
TN-38-7308	D	II	4	High Susceptible
TN-38-7309	C	I	1	Immune
TN-38-7310	B	III	3	High Susceptible

منابع

Abdallah, R. 1995. *An Immunocapture/Reverse Transcription/ Polymerase Chain Reaction technique detection and molecular caharacterization of Bean common mosaic virus in mixed infections*. PhD. Thesis, Wsahington state University. Department of Plant Pathology.

Alegbego, M.D. & Kashina, B.D. 2001. Status of legume viruses in Nigeria. *Journal of Sustainable Agriculture*, 18: 55-69.

Allison, R., Johnston, R.E. & Dougherty, W.G. 1986. The Nucleotide Sequence of the Coding Region of Tobacco Etch Virus Genomic RNA: Evidence for The Synthesis of A Single Polyprotein. *Virology*, 15: 154 (1): 9-20.

Ariyarathne, H. M., Coyne, D.P., Jung, G., Skroch, P.W, Vidarer, A. K. Steadman, J. R. Miklas, P. N. & Bassett, M.J. 1999. Molecular mapping of disease resistance genesfor halo blight, common bacterial blight, and *Bean commone mosaic virus* in a segregating population of common bean. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 124(6): 654-662.

Asghari Ghara, S., 2008. Strains determine of *Bean Common Mosaic Virus* and B*ean Necrotic Mosaic Virus* in Mazandaran Province. Microbiology M.Sc thesis.

Bahrami Kamangar, S. 1998. *Identification and relative abundance bean mosaic-producing viruses Fars Province*. M.Sc. Thesis, Shiraz University.

Baradaran, Gh. 1997. *Evaluation of bean common mosaic virus (BCMV) and determine its distribution in Chenaran and Mashhad. M.Sc. Thesis.* Mashhad University.

Castillo-Urquiza, G. P., Maia, F. G., Cavalho, M. G., Pinto, C. M., & Zerbini, F. M. 2006. Characterization of A *Bean Rugose Mosaic Virus*(BRMV) Isolate From Mias Gerais, and Yield Loss Estimate in Beans Upon Single Infection and Double Infection with BCMV. *Fitopatologia Brasileira*, 31(5):455-461.

Dasgupta, I. Malathi, V. G., & Mukherjee, S. K. 2003. Genetic Engineering for Virus Resistance. *Current Science*, 84: 341-353.

Dinant, S. Lot, H. Albouy, J., Kuziak, C., & Meyer, M. 1991. Astier Manifacier S. *Archives Virology :*116(1-4): 235-52.

Drijfhout, E. 1978. Genetic Interaction Between *Phaseolus Vulgaris* and *Bean Common Mosaic Virus* Resistance With Imolicetion for Srain Identification and Breeding for Resistance.*Centre. Agric. Publ. Doc., Wageningen, The Netherlends.*

Drijfhout, E. 1991. *Bean Common Mosaic Virus, pp. 37-39,* In: Compendium of Bean Diseases EDT. *by Hall, R., APS Press.*

Flores- Estevez, N., Acosta-Gallegos, J.A., & Silva-Rosales, L. 2003. *Bean common mosaic virus* and *Bean common mosaic necrosis virus* in mexico. *Plant Disease,* 87: 21-25.

Hashemi, M. 1999. *Comparison of serological, biological and physicochemical characteristics of Bean common mosaic generator Poty viruses, Bean yellow mosaic and cowpea seed borne in Fars*. M.Sc. Thesis, Shiraz University.

Hormozi Nejad, M.Shiraz, M.Mozafari, j.Dorri, H.R.Shams Bakhsh, M.Rakhshandeh Ro,F. 2008. Preliminary study of *Bean common mosaic virus* BCMV infection and *Tomato yellow leaf curl virus* TYLCV in most areas. *The proceedings of 18th Iranian Plant Protection Congress,3-6- September-Hamadan, Iran,* P. 342.

Ittah, M.A. 2006. Relationship between yield and some yield components in cowpea varieties infected with two cowpea *potyviruses*. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 12(1): 11-17.

Jahansoz, M. R. Naghavi, M. R. & Taleyi, A. 2003. Determine the relationships between different attributes in cowpea varieties. *Journal - Research of Agricultural Sciences*. 1: 143-149.

Kamelmanesh, M. M., Namayandeh, A., Dorri, H. R. & Bi Hamta, M.R., 2012. Effect of *Bean common mosaic virus* on seed yield, yield components and phenological phases of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) under field conditions. *Journal of Plant Breeding and Seed*, 28: 39-52.

Klark, M.F. & Adams. A. N. 1977. Charateristics of The Microplate Method of Enzyme – Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.

Luis, J. Liste, I. & Caeiro, B. 1994. Improved Conditions For Genotype Diagnosis of Astr of The Htpo Locus. *Advances in Forensic Haemagenetics*, 5: 336-368.

Mavric, I., Susta-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.

Miklas, P. N. Beaver, J. S. Steadman, J.R. Silbernagel, M.J. & Freytag, G. F. 1997. Registration of Three *Bean Common Mosaic Virus* Resistant Navy Bean Germplasms. *Crop Science*, 37: 1025.

Mink, G. I., Vetten, H.J., Ward, C. W., Berger, P. H., Morales, F. S., Myers, J.M., Silbernagel, M. J., & Barnett, P. W. 1994. Taxonomy and classification of legume-infecting *potyviruses*. *Archive of virology*, 139-235.

Mosahebi Mohammadi, GH. 1972. *Study of Bean common mosaic virus and characterization of different strains of the virus in Iran*. MS Thesis, Tehran University.

Mowat, W.P. & Dawson, M. 1987. Detection of Plant Viruses by ELISA Using Crude Sap Extracts Unfrationaded Antisera. *Journal of Virological Methods*, 15: 233- 247.

Nader Pur,M. Mosahebi Mohammadi, Gh. & Kohi, M. 2000. Pathotype of Vta III, Vib and necrotic strains NL-3, NL- 8, NL-5, and virus BCMNV new report on Iran. *The Proceeding of 14th Plant Protection Congress, Isfahan, Iran - September 2000.*

Peyambari, M. Kohi Habibi, M. Mosahebi, Gh. H. & Izedpanah, K. 2006. Evaluation of *bean common mosaic virus* (BCMV) in several provinces and bean three genotypes reaction to it. *Journal of Plant Protection*, 25(-3): 250- 257.

Schoonhovenran, A. & Pastor – Corrales, M. A. 1994. Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm. General Evaluation Scale for Vival Disease. *CIAT Publication Series*, 16-19.

Strausbaugh, C.A., Myers, J.R., Forster, R.L., & Mc clean, P.E. 2003.A quantitative method to screen common Bean plants for resistance to *Bean common mosaic necrosis virus. Phytophatology*, 93: 1430-1436.

Thottappilly, G. and Rossel, H.W. 1985. World – wide occurrence and distribution of virus diseases. *Cowpea Research Production*: 155-171.