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 ولی‌عصر(عج) رفسنجان، ایران
eng.baradar@gmail.com

چکیده

محدودیت‌های زیادی از جمله: خشکسالی، بازده‌ی کم ارقام محلی، آفات و بیماری‌ها، تولید باقلا 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. در میان ویروس‌های گزارش شده از روی باقلا، ویروس موزاییک زرد لوبیا (BYMV) یکی از معروف‌ترین بیماری‌های ویروسی است که دامنه‌ی وسیعی از گیاهان را آلوده می‌کند. این ویروس متعلق به خانواده‌ی *Potyviridae* و از جنس *Potyvirus* می‌باشد. 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 علایم موزاییک سبز خفیف تا شدید، سبزردی، کوچکی و بدشکلی برگی بودند. در مرحله اول، نمونه‌ها با استفاده از آزمون‌های سرولوژیکی DAS-ELISA و آنتی‌بادی چندهمسانه‌ایی 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 نواحی HC-Pro و CP از ویروس BYMV مورد بررسی تکمیلی قرار گرفتند. نواحی 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 موزاییک زرد لوبیا (BYMV) در مزارع باقلا کاری استان زنجان می‌باشد.

واژگان کلیدی: ویروس موزائیک زرد لوبیا، باقلا، الایزا، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و زنجان

مقدمه

حبوبات (Leguminosae)، به علت دارا بودن ویژگی‌های تغذیه‌ای و زراعی قابل ملاحظه، جایگاه خاصی در نظام‌های کشاورزی جهان دارند. این گیاهان پس از غلات، مهم‌ترین منبع غذایی بشر را تشکیل می‌دهند. حبوبات، منبع اصلی پروتئین در کشورهای درحال توسعه هستند و لذا نقش ویژه‌ای در تولید غذا در این کشورها دارند (Kumari and Van Leur, 2011). وسعت زمین‌های زیر کشت حبوبات در دنیا، ۸۰ میلیون هکتار، با تولید کل ۷۳ میلیون تن و متوسط عملکرد ۹۰۰ کیلوگرم در هکتار است. این مقادیر برای ایران به ترتیب یک و نیم میلیون هکتار، یک میلیون تن و ۸۹۷ کیلوگرم در هکتار است (FAO, 2013). باقلا با نام علمی .*Vicia faba* L، یکی از حبوبات عمده در بسیاری از کشورها مانند چین، مصر، اتیوپی، سودان، انگلستان، استرالیا و هم‌چنین ایران می‌باشد. باقلا در نقاط مختلف ایران به‌خصوص نواحی 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 پاتوژن‌های ثانویه، مستعد می‌کنند (Khalil and Erskine, 2001). تعداد زیادی ویروس خسارت‌زا از گیاه باقلا گزارش و جداسازی شده‌اند. 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).

روش بررسی

ردیابی و شناسایی ویروس موزاییک زرد لوبیا در مزارع باقلا

در فصول زراعی ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ برگ‌های گیاهان دارای علایم ویروسی از مزارع باقلای نواحی 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[1] (۱۹۷۷) استفاده شد. نتایج پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه با دستگاه الیزاخوان[2] Epoch (BioTech) با طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید و از هر منطقه یک نمونه آلو ده به ویروس برای بررسی‌های بیشتر انتخاب گردید.

استخراج آر.ان.ای کل گیاه، تکثیر و توالی‌یابی نواحی 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 نواحی CP و HC-Pro ، از جفت آغازگر اختصاصی ناحیه پروتئین پوششی ویروس موزاییک زرد لوبیا با نام BYMVCPfor (CGKTTTCARTCWGATCAAGA) و BYMVCPrev (GTCTGTTCCAACATTGCCAT) که با نرم‌افزار Vector NTI Advance™ 11(Invitrogen) طراحی شده بودند و همچنین جفت آغازگر اختصاصی ناحیه HC-Pro با نام‌های 1370For (CTM CARATGGAGAAY CCYGC) و 2340R (CCAAAGTTCCAATCACCACC) (Nakazono-Nagaoka *et al*., 2004) در آزمون نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR) استفاده گردید. واکنش RT-PCR برای تولید رشته دی.ان.ای. مکمل (cDNA) در دو مرحله در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گردید. ابتدا میکروتیوب‌های حاوی چهار میکرولیتر Reverse transcriptase buffer 10X ، یک میکرولیتر dNTPs (10 mmol/ul)، یک میکرولیتر آغازگر BYMVCPrev و 2340R (10pmol/ul)، هشت میکرولیتر آب مقطر استریل و پنج میکرولیتر از آر.ان.ای. کل استخراج شده به مدت پنج دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, T-100) و سپس روی یخ قرار داده شد. در مرحله بعد آنزیم‌های MuMLV Reverse transcriptase (200u/µl) و RNase inhibitor (40U/ul) هرکدام به میزان ۰/۵ میکرولیتر به میکروتیوب اضافه گردیدند و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۵/۵ میکرولیتر آب استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (1.5 mM MgCl2) ساخت شرکت ویراژن، یک میکرولیتر آغازگر (10 mmol/ul) و پنج میکرولیتر cDNA در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. برنامه گرمایی واکنش PCR به صورت واسرشت سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای ۵۳ درجه سلسیوس و بسط یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس تنظیم شد. درنهایت بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت.

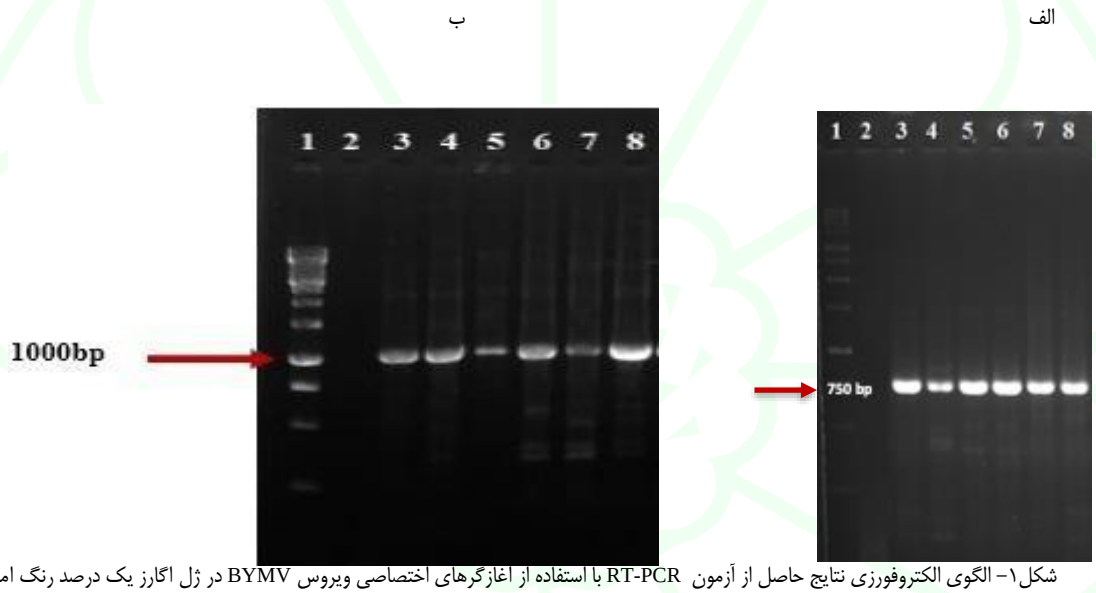
فرآیند خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Promega, USA) انجام گردید. کیفیت قطعات تکثیر شده حاصل از واکنش، روی ژل آگارز یک درصد در بافر TBE (Tris-Borate-EDTA) مورد بررسی قرار گرفت. پس از حصول اطمینان از خالص بودن قطعات تکثیری به طول حدود ۱۱۰۰ و ۷۵۰ جفت‌باز (به ترتیب برای HC-Pro و CP)، نواحی مورد نظر تکثیر شده از جدایه‌های مختلف، برای تعیین توالی به شرکت Eurofins در کشور لوکزامبورگ ارسال گردیدند.

نتیجه و بحث

تکثیر نواحی CP و HC-Pro با روش پی‌سی‌آر

[1] Clark and Adams
[2] ELISA reader

در پژوهش حاضر؛ در راستای مقایسه نواحی CP و HC-Pro، از نواحی مختلف استان زنجان، فرآیند نمونه‌برداری انجام شد. بر اساس آزمون الایزا از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، به طور میانگین ۸۰-۶۰ درصد به ویروس موزاییک 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 نواحی CP و HC-Pro از آر.ان.ای. کل استخراج شده، منجر به تکثیر قطعاتی به ترتیب به طول ۷۵۰ و ۱۱۰۰جفت باز شد. نتایج حاصل از تکثیر نواحی 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 موزاییک زرد لوبیا (BYMV) در مزارع باقلا کاری استان زنجان می‌باشد.



شکل۱- الگوی الکتروفورزی نتایج حاصل از آزمون RT-PCR با استفاده از اغازگرهای اختصاصی ویروس BYMV در ژل اگارز یک درصد رنگ امیزی شده به‌وسیله Red-safe: الف) ناحیه CP : راهک ۱: نشانگر دی.ان.ا یک کیلو بازی، راهک ۲: کنترل منفی، راهک ۸-۳ : نمونه باقلای جدا شده از مناطق مختلف استان زنجان. ب) ناحیه HC-Pro: راهک ۱: نشانگر دی.ان.ا یک کیلو بازی، راهک ۲: کنترل منفی، راهک ۸-۳ : 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.

Kumari, S.G., Van Leur, J.A.G. 2011. Viral diseases infecting faba bean (*Vicia faba* L.). Grain Legumes. 56: 24-26.

Khalil, S.A., Erskine, W. 2001. Combating disease problems of grain legumes in Egypt. Grain Legumes. 32: 24-26.

Sillero, J.C., Villegas-Fermandez, A.M., Thomas, J., Rojas-Molina, M.M., Emeran, A.A., Fermandez-Aparicio, M., Rubialez, D. 2010. Faba bean breeding for disease resistance. Field Crops Research. 115: 297-307.
FAO, N. 2013. Food outlook global market analysis. Food and Agriculture Organization Rome, Italy.

Incidence of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) in faba bean farms of Zanjan Province

Many constraints, including drought, low yields of local cultivars, pests and diseases, threaten faba bean production. Among all the limitations, faba bean-infecting viruses are considered to be the most destructive agents, which have been reported as a serious problem for the faba bean plant worldwide due to difficult detection and lack of proper control methods. Amongst the viruses reported from faba bean, *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) is one of the most common which infects a wide range of plants. In this research, 100 leaf samples form faba bean farms in Zanjan province were collected during 2018-2019 growing season. The collected samples showed severe mosaic and leaf malformation. In the first step, the samples were analyzed by DAS-ELISA test using polyclonal antibody. Samples with positive reaction were subjected to complementary study through reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers for HC-Pro and CP regions of BYMV genome. The amplified regions in the PCR reaction were evaluated on 1% agarose gel, which resulted in the amplification of DNA fragments with an expected length of 1100 and 750 bp in the collected samples. Analysis of the obtained sequences using the BLAST software in NCBI and it comparison with available sequences in GenBank showed similarity 92-98% with the previously reported sequences of BYMV from other parts of the world. This is the first report of the incidence of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) from faba bean farms of Zanjan Province.

Keywords: Bean yellow mosaic virus, Faba bean, ELISA, RT-PCR, Zanjan