بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

دانشکده‌ی کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد

رشته‌ی مهندسی کشاورزی- بیماری‌شناسی گیاهی

مقایسه ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک زرد لوبیا (BYMV) جدا شده از مزارع باقلا در استان‌های کرمان و خوزستان

استاد راهنما

دکتر ثمین حسینی

استادان مشاور

دکتر احمد حسینی

مهندس پریسا سلیمانی

نگارنده

زهره داودی

اسفند ۱۳۹۱

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

دانشکده‌ی کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد رشته‌ی

مهندسی کشاورزی – بیماری‌شناسی گیاهی

مقایسه ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک زرد لوبیا (BYMV) جدا شده از مزارع باقلا در استان‌های کرمان و خوزستان

زهره داودی

در تاریخ ۹۱/۱۲/۲۳ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر ثمین حسینی	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۲- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر احمد حسینی	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۳- استاد مشاور پایان‌نامه	مهندس پریسا سلیمانی	با مرتبه‌ی علمی مربی
۴- استاد داور داخل گروه	دکتر پژمان خدایگان	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۵- استاد داور داخل گروه	دکتر روح الله صابری	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۶ – نماینده‌ی تحصیلات تکمیلی	دکتر پروانه ایرانمنش	با مرتبه‌ی علمی استادیار

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

تمامی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از پژوهش موضوع این پایان‌نامه، متعلق به دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان است.

سپاسگزاری

سپاس خدای راکه اول است و پیش از او اولی نبوده و آخر است و پس از او آخری نباشد. به قدرت و توانایی خود آفریدگان را آفرید و آنان را به اراده و خواست خویش به وجود آورد بی این که از روی مثال و نمونه ای باشد، سپس آنان را در راه اراده و خواست خویشتن روان گردانید و در راه محبت و دوستی به خود برانگیخت.

پس از حمد خدای متعال که توفیق اتمام مرحله ای دیگر از تحصیل علم را به من عطا فرمود، بر خود واجب میدانم سپاسگزار استاد عالیقدرم سرکار خانم ثمین حسینی که مشوق راهم و تکیه گاهم در دل نگرانی های مسیر، استاد صبر و تلاشم که سختی های راهم را با شیرینی آزمودن و آموختن همراه نمود، باشم.

از استادان مشاور، جناب آقای دکتر احمد حسینی، به پاس مشاورت ها و زحمات بی دریغش و سرکار خانم مهندس پریسا سلیمانی به پاس کمک در ارسال نمونه سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر پژمان خدایگان و دکتر روح الله صابری که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از استادان گروه گیاهپزشکی که در طول دوره تحصیل همواره در کنارشان به کسب علم پرداخته ام، تشکر می نمایم.

از دوستان خوبم به خاطر کمک های خالصانه و بی دریغشان بسیار سپاسگزارم و هم چنین آنان که تجربه روزهای سخت در کنارشان برایم با خاطرات خوش همراه شد.

زهره داودی

"تقدیم به آنان که دلیل راهم بودند"

پدر بزرگوار و مادر مهربانم

داستان های بلند هزار و یک شب دوستی، که حدیث صبر و سریان شیره جانشان در بند بند وجودم افتخارم است.

و تقدیم به همه کسانی که دوستشان دارم.

چکیده

باقلا (*Vicia faba* L.) یکی از حبوبات مهم در ایران و بسیاری از کشورهاست. 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 از خانواده‌ی *Potyviridae* و جنس *Potyvirus* است. در این پژوهش، طی نمونه‌برداری‌های انجام شده در سال زراعی ۸۹ و ۹۰، ۵۴۴ نمونه‌ی برگی از مزارع باقلای استان‌های خوزستان و کرمان (به‌ترتیب شهرستان‌های دزفول و جیرفت) و ۳۸ نمونه علف هرز جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای علایم موزاییک سبز خفیف تا شدید، کوچکی و بدشکلی برگ‌ها و تعدادی فاقد علایم ویروسی بودند. ابتدا نمونه‌ها با استفاده از آزمون‌های سرولوژیکی DAS-ELISA و TPIA و آنتی‌بادی چندهمسانه‌ایی BYMV و BCMV مورد بررسی قرار گرفتند. میزان آلودگی ویروس BYMV در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان دزفول ۳۴/۲۱٪ و از شهرستان جیرفت ۶۲/۵٪ بود. ویروس BCMV تنها در ۲/۳٪ و ۱/۶۷٪ از نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان‌های دزفول و جیرفت شناسایی شد. در بین علف‌های هرز جمع‌آوری شده، دو بوته‌ی سلمه‌تره *Chenopodium quinoa* در مزارع شهرستان جیرفت و یک نمونه سلمه‌تره *C. album* در مزارع باقلای دزفول آلوده به BYMV بودند. در این پژوهش، برخی از ویژگی‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی جدایه‌های انتخابی دو استان مورد بررسی قرار گرفتند. دامنه‌ی میزبانی، شدت علایم ایجاد شده و میزان انتقال با شته‌ی جالیز (*Aphis gossypii*) در دو جدایه‌ی انتخابی D1 (جدایه‌ی دزفول) و J2 (جدایه‌ی جیرفت) متفاوت بود. برای تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس از آزمون SDS-PAGE استفاده شد. اندازه‌ی پروتئین پوششی هر دو جدایه‌ی D1 و J2، ۳۳ کیلودالتون برآورد شد. با آزمون‌های RT-PCR و IC-RT-PCR یک قطعه‌ی ۱۷۰۰ جفت بازی از نواحی NIb، CP و 3´-UTR با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی خانواده *Potyviridae* تکثیر شد. نتیجه بررسی ترادف نوکلئوتیدی ناحیه‌ی NIb نشان داد که دو جدایه همراه با یک جدایه‌ی ژاپنی جدا شده از روی باقلا در یک گروه قرار می‌گیرند. در این پژوهش برای اولین‌بار، ویروس BYMV از مزارع باقلای استان کرمان و BCMV از مزارع باقلای ایران گزارش شد.

واژگان کلیدی: باقلا، ویروس موزاییک زرد لوبیا، الیزا، RT-PCR، IC-RT-PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: پیشینه پژوهش ۵

۲-۱- ویروس‌های خسارت‌زننده به باقلا ۵

۲-۲- ویروس موزاییک زرد لوبیا (BYMV) ۷

۲-۳- جایگاه تاکسونومیکی ویروس BYMV ۹

۲-۴- دامنه‌ی میزبانی و علایم ویروس BYMV ۱۲

۲-۵- ویژگی‌های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی ویروس BYMV ۱۴

۲-۶- ساختار ژنوم ویروس BYMV ۱۵

۲-۶-۱- اندامک‌های ویژه‌ی سیتوپلاسمی ۱۶

۲-۶-۱-۱- اندامک ویژه‌ی سیتوپلاسمی فرفره‌ای (CI) ۱۶

۲-۶-۱-۲- اندامک ویژه‌ی سیتوپلاسمی بی‌شکل (HC-Pro) ۱۶

۲-۶-۲- اندامک ویژه‌ی هسته‌ای (NI) ۱۷

۲-۶-۲-۱- پروتئین اندامک هسته‌ای کوچک (NIa) ۱۷

۲-۶-۲-۲- پروتئین اندامک هسته‌ای بزرگ (NIb) ۱۷

۲-۶-۳- پروتئازها ۱۷

۲-۶-۴- پروتئین‌های حرکتی ۱۸

۲-۶-۵- پلیمرازها ۱۸

۲-۶-۶- پروتئین مسئول بازدارندگی خاموشی ژن ۱۸

۲-۶-۷- پروتئین‌های مسئول انتقال ۱۹

۲-۶-۸- پروتئین پوششی (CP) ۱۹

۲-۶-۹- پروتئین‌های 6K ۱۹

۲-۷- استرین‌های ویروس BYMV ۲۰

۲-۸- روش‌های انتقال ویروس BYMV ۲۱

۲-۹- خالص‌سازی ویروس BYMV ۲۲

۲-۱۰- روش‌های شناسایی ویروس BYMV ۲۲

۲-۱۱- اثر عوامل محیطی بر روی گسترش ویروس BYMV ۲۳

۲-۱۲- مدیریت ویروس BYMV ۲۵

۲-۱۲-۱- روش‌های کنترل بیولوژیک ۲۵

۲-۱۲-۲- استفاده از بذور عاری از بیماری ویروسی ۲۵
۲-۱۲-۳- مبارزه با حشرات ناقل ویروس BYMV ۲۶
۲-۱۲-۴- استفاده از ارقام مقاوم ۲۶
۲-۱۲-۵- استفاده از ترکیب‌های ویروس‌کش ۲۶
۲-۱۲-۶- حذف میزبان‌های حدواسط ۲۶

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۲۷
۳-۱- نمونه‌برداری از مزارع باقلا و علف‌های هرز شهرستان‌های دزفول و جیرفت ۲۷
۳-۲- تشخیص ویروس‌های BYMV و BCMV و تعیین پراکندگی آن‌ها در شهرستان‌های دزفول و جیرفت ۲۹
۳-۲-۱- آزمون DAS-ELISA ۲۹
۳-۲-۲- آزمون TPIA ۳۰
۳-۳- تکثیر جدایه‌های ویروسی و خالص‌سازی بیولوژیکی ۳۱
۳-۴- خالص‌سازی نسبی ویروس ۳۱
۳-۵- تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی (CP) ویروس با استفاده از SDS-PAGE ۳۲
۳-۶- مقایسه ویژگی‌های بیولوژیکی جدایه‌ها ۳۴
۳-۶-۱- مقایسه‌ی دامنه میزبانی ۳۴
۳-۶-۲- ارزیابی واکنش ۱۳ رقم لوبیا نسبت به جدایه‌های دزفول و جیرفت ۳۶
۳-۶-۳- مقایسه‌ی انتقال جدایه‌ها با شته‌ی *Aphis gossypii* ۳۶
۳-۶-۴- ریکاوری گیاهان آلوده به ویروس BYMV ۳۷
۳-۷- مقایسه‌ی ویژگی‌های مولکولی جدایه‌ها ۳۷
۳-۷-۱- استخراج RNAی کل از جدایه‌های BYMV ۳۷
۳-۷-۱-۱- استخراج RNAی کل با استفاده از RNX-Plus ۳۷
۳-۷-۱-۲- استخراج RNAی کل با استفاده از RNeasy Plant Mini Kit ۳۸
۳-۷-۲- آزمون RT-PCR ۳۸
۳-۷-۳- آزمون IC-RT-PCR (Immonocapture RT-PCR) ۴۱
۳-۷-۴- الکتروفورز افقی ۴۱
۳-۷-۵- تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن NIb تکثیر شده و مقایسه این نواحی در جدایه‌ها ۴۲

فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۴
۴-۱- نتایج ۴۴
۴-۱-۱- تعیین پراکندگی ویروس‌های BYMV و BCMV در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع باقلا و علف‌های هرز شهرستان‌های دزفول و جیرفت ۴۴
۴-۱-۲- تکثیر و نگهداری جدایه‌های انتخابی BYMV در گلخانه ۴۷

۴-۱-۳- خالص‌سازی نسبی جدایه‌های انتخابی ویروس BYMV ۴۷
۴-۱-۴- تعیین وزن مولکولی CP با استفاده از SDS-PAGE ۴۷
۴-۱-۵- بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی جدایه‌های BYMV ۴۹
۴-۱-۵-۱- مقایسه‌ی دامنه‌ی میزبانی جدایه‌های BYMV ۴۹
۴-۱-۵-۲- ارزیابی واکنش ۱۳ رقم لوبیا نسبت به جدایه‌های دزفول و جیرفت ۵۳
۴-۱-۵-۳- مقایسه‌ی انتقال جدایه‌ها با شته‌ی *Aphis gossypii* ۵۵
۴-۱-۵-۴- ریکاوری گیاهان آلوده به ویروس BYMV ۵۶
۴-۱-۶- مقایسه‌ی ویژگی‌های مولکولی جدایه‌ها ۵۷
۴-۱-۶-۱- استخراج RNAی کل از گیاهان آلوده به جدایه‌های BYMV ۵۷
۴-۱-۶-۲- آزمون‌های RT-PCR و IC-RT-PCR ۵۹
۴-۱-۶-۳- تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن‌های تکثیر شده ۶۰
۴-۲- بحث ۶۷

فصل پنجم: نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها ۷۲
نتیجه‌گیری کلی ۷۲
پیشنهادها ۷۴
پیوست ۷۵
منابع ۷۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- ساختار ژنوم پوتی‌ویروس‌ها ۱۵
شکل ۳-۱- نقشه‌ی ایران ۲۸
شکل ۳-۲- بوته‌های باقلای آلوده به ویروس BYMV در مزرعه‌ی شهرستان دزفول ۲۸
شکل ۴-۱- آزمون DAS-ELISA ۴۵
شکل ۴-۲- آزمون TPIA ۴۶
شکل ۴-۳- پراکنش BYMV و BCMV در مزارع باقلای شهرستان‌های جیرفت و دزفول ۴۶
شکل ۴-۴- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گیاهی آلوده به جدایه‌های D1، J2 و گیاه سالم باقلا در SDS-PAGE ۴۸
شکل ۴-۵- منحنی خط رگرسیون وزن پروتئین پوششی ۴۸
شکل ۴-۶- علایم ناشی از مایه‌زنی جدایه‌ی D1 بر روی تعدادی از گیاهان محک ۵۱
شکل ۴-۷- علایم ناشی از مایه‌زنی جدایه‌ی J2 بر روی تعدادی از گیاهان محک ۵۲
شکل ۴-۸- علایم ناشی از مایه‌زنی جدایه‌ی D1 بر روی ارقام لوبیا ۵۴
شکل ۴-۹- علایم ناشی از مایه‌زنی جدایه‌ی J2 بر روی ارقام لوبیا ۵۴
شکل ۴-۱۰- علایم سیستمیک ناشی از انتقال ۵۵
شکل ۴-۱۱- ریکاوری گیاهان باقلای آلوده به ویروس BYMV ۵۶
شکل ۴-۱۲- الگوی الکتروفورزی RNAی کل استخراج شده با روش RNX-Plus برای جدایه‌های D1 و J2 ۵۸
شکل ۴-۱۳- الگوی الکتروفورزی استخراج RNAی کل با روش RNeasy Plant Mini Kit برای جدایه‌های D1 و J2 ۵۸
شکل ۴-۱۴- الگوی الکتروفورزی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی BYMV ۵۹
شکل ۴-۱۵- الگوی الکتروفورزی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای عمومی *Potyviridae* ۵۹
شکل ۴-۱۶- نتایج حاصل از مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی نواحی تعیین توالی شده با استفاده از نرم افزار بلاست ۶۰
شکل ۴-۱۷- قسمتی از هم‌ردیف‌سازی چندگانه‌ی توالی نوکلئوتیدی ناحیه‌ی NIb جدایه‌های D1 و J2 با توالی‌های NIb موجود در بانک ژن ۶۳
شکل ۴-۱۸- تحلیل فیلوژنتیکی ترادف نوکلئوتیدی ناحیه‌ی NIb با استفاده از روش Neighbor-joining ۶۵

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- ویروس‌های اقتصادی مهم گزارش شده از روی باقلا ۶
جدول ۳-۱- مقادیر ژل جدا کننده‌ی ۱۵٪ برای حجم ۳۰ میلی‌لیتر ۳۳
جدول ۳-۲- مقادیر ژل متراکم کننده‌ی ۴٪ برای حجم ۱۵ میلی‌لیتر ۳۴
جدول ۳-۳- میزبان‌های محک برای بررسی دامنه‌ی میزبانی جدایه‌های BYMV ۳۵
جدول ۳-۴- مواد لازم برای ساخت cDNA در مرحله‌ی اول ۳۹
جدول ۳-۵- مواد لازم برای ساخت cDNA در مرحله‌ی دوم ۴۰
جدول ۳-۶- مواد لازم برای ساخت PCR ۴۰
جدول ۳-۷- برنامه‌ی حرارتی PCR برای جفت آغازگر اول ۴۰
جدول ۳-۸- برنامه‌ی حرارتی PCR برای جفت آغازگر دوم ۴۱
جدول ۳-۹- جدایه‌های برداشت شده از بانک ژن ۴۳
جدول ۴-۱- پراکنش BYMV و BCMV در مزارع باقلای شهرستان‌های دزفول و جیرفت ۴۶
جدول ۴-۲- گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های D1 و J2 و واکنش آن‌ها ۵۰
جدول ۴-۳- ارقام لوبیای مایه‌زنی شده با جدایه های D1 و J2 و واکنش آن‌ها ۵۳
جدول ۴-۴- درصد یکسانی توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه‌ی NIb جدایه‌های D1 و J2 باقلا با
جدایه‌های برداشت شده از بانک ژن ۶۴

فصل اول

مقدمه

باقلا با نام علمی *Vicia faba* L. گیاهی از خانواده‌ی Fabaceae است که در زبان انگلیسی نام‌های متعددی مانند Broad bean، Windsor (باقلای انگلیسی)، Horse bean (باقلای دانه متوسط)، Tick bean (باقلای دانه ریز) و Fava به این گیاه اطلاق می‌گردد. باقلا از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی بوده و سابقه‌ی کشت و کار طولانی دارد.

امروزه باقلا یکی از حبوبات عمده در بسیاری از کشورها مانند چین، مصر، اتیوپی، سودان، انگلستان، استرالیا و هم‌چنین ایران می‌باشد. کشور چین با ۵۳ درصد سهم کل تولید جهانی، در مقام اول قرار دارد. تولید باقلا در جهان بالغ بر ۳۶ میلیون تن با عملکردی بین دو و نیم تا شش تن در هکتار است. سطح زیرکشت باقلا در ایران حدود ۳۰ هزار هکتار با متوسط عملکرد پنج تن (باقلای سبز) در هکتار می‌باشد. باقلا در نقاط مختلف ایران به‌خصوص نواحی شمالی، جنوب و جنوب‌غربی به‌عنوان محصول عمده، کشت و کار می‌گردد.

باقلا گیاهی یک‌ساله، دارای ریشه‌ی مستقیم و عمیق، ساقه‌ی راست و نسبتا ضخیم، چهارگوش و توخالی، به ارتفاع ۳۰ تا ۱۸۰ سانتی‌متر است. به‌طور معمول از پایین ساقه‌ی اصلی نزدیک سطح خاک، حدود یک تا هفت ساقه‌ی فرعی به‌وجود آمده و فرم بوته‌ایی پیدا می‌کند.

بر روی ساقه‌ی باقلا برگ‌های مرکب، متناوب، بزرگ و عاری از پیچک تشکیل می‌شود. هر برگ شامل دو تا شش برگچه‌ی بیضی شکل به‌طول پنج تا ده سانتی‌متر است.

تیپ رشدی باقلا معین بوده و گل‌آذین آن کوتاه به‌صورت خوشه‌ی مرکب و به‌هم فشرده بر روی دم-گل کوتاه در محور ساقه‌ها به‌وجود می‌آید. هر خوشه شامل یک تا شش گل به رنگ‌های سفید یا ارغوانی است.

میوه یا غلاف باقلا گوشتی و سبز رنگ به‌طول ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر است و در هر غلاف یک تا هشت دانه وجود دارد. ارقام بذر درشت باقلا، در هر گره زایشی یک یا دو غلاف و ارقام بذر ریز، دو تا پنج غلاف در هر گره تولید می‌کنند. به‌عبارتی، در انواع درشت حدود ۱۵ غلاف در هر بوته و در انواع ریز ۶۰ غلاف به‌وجود می‌آید. شکل، اندازه و رنگ دانه‌ها نسبت به ارقام مختلف، متفاوت است. وزن صد دانه‌ی باقلا از ۳۵ تا ۲۰۰ گرم متغیر می‌باشد و قوه‌ی نامیه آن در شرایط مناسب انبارداری سه سال به‌طول می‌انجامد. باقلا به دو منظور، یکی در تغذیه انسان به‌صورت تازه و پخته یا کنسروی و دیگری در تغذیه دام‌ها و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد (کوچکی و بنایان‌اول، ۱۳۷۶).

باقلا را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد: یکی سازگار با رژیم‌های اقلیمی با زمستان ملایم، بهار کوتاه و تابستانی گرم و طولانی و دوم گروهی که سازگار به زمستان سرد، بهار طولانی و تابستان کوتاه و نسبتا خنک هستند. گروه اول موسوم به باقلای مدیترانه‌ای و گروه دوم موسوم به باقلای اروپایی هستند. داخل گروه باقلای اروپایی، دو تیپ مشخص قابل ذکر است: بهاره و زمستانه که تیپ زمستانه سرسخت‌تر است. تیپ بهاره شباهت نزدیکی به گروه مدیترانه‌ای دارد. احتمالا تیپ زمستانه نشات گرفته از تیپ بهاره است که خود آن نیز در سیر روند اهلی شدن از گروه‌های مدیترانه‌ای از طریق انتخاب برای دوره‌ی رشد طولانی‌تر و متحمل به شرایط زمستان به‌دست آمده است (پارسا و باقری، ۱۳۸۷).

باقلا در تمام خاک‌ها قادر به رشد بوده ولی طالب خاک‌های نسبتا سنگین و حاصل‌خیز مانند رسی یا رسی‌لومی می‌باشد. در خاک‌های سبک شنی با حاصل‌خیزی مناسب و مقدار کافی آهک، برای نگهداری رطوبت خاک، نیز محصول مناسبی تولید می‌کند. عوامل دما، نور، خشکی، شوری و زیادی رطوبت خاک بر ریزش گل‌ها، اختلال در گرده‌افشانی، تشکیل غلاف‌ها و عملکرد باقلا تاثیرات مهمی دارد (کوچکی و بنایان‌اول، ۱۳۷۶).

برخلاف اهمیت محصول باقلا، به‌طور مداوم توسط محدودیت‌های تولید مانند خشکسالی، بازده‌ی کم ارقام محلی، آفات و بیماری‌ها تهدید می‌شود (Hawtin and Hebblethwaite, 1983; Tivoli *et al*., 1988; Abdalla and Darwish, 2002). با این‌حال، باقلا مانند سایر حبوبات، از طریق تثبیت نیتروژن اتمسفر در

همزیستی با باکتری خاک *Rhizobium leguminosearum* منجر به کشاورزی پایدار می‌شود. این توانایی منحصر به فرد، وابستگی کشاورزان را در استفاده از کودهای شیمیایی برای حفاظت آب و خاک کاهش می‌دهد (Jensen *et al*., 2010). هم‌چنین، گیاه باقلا تحت شرایط خاص زیست محیطی می‌تواند حاصل-خیزی خاک را بهبود داده و میزان خسارت علف‌های هرز، بیماری‌ها و آفات را هنگام کاشت متناوب با سایر محصولات زراعی کاهش دهد (Mwanamwenge *et al*., 1998).

در میان تمام محدودیت‌ها، بیماری‌های خسارت‌زننده به باقلا به‌عنوان مخرب‌ترین عامل در نظر گرفته شده‌اند و باعث ضرر و زیان قابل توجهی (بیش از ۵۰ درصد) در عملکرد محصول می‌شوند (El-Hosary *et al*., 1998; Bouhassan *et al*., 2004; Awaad *et al*., 2005; El-Bramawy and Abdul Wahid, 2005; El-Bramawy and Shaban, 2010).

از جمله‌ی این بیماری‌ها، بیماری‌های ویروسی، به‌عنوان یک مشکل جدی برای گیاه باقلا در سراسر جهان گزارش شده‌اند (Jones, 1997; El-Tahlawy *et al*., 2005). به‌دلیل عدم اطمینان از شیوع ویروس‌ها و نبود روش کنترلی مناسب، کشاورزان ویروس‌ها را نسبت به قارچ‌ها خطر بزرگ‌تری می‌دانند (Sillero *et al*., 2010). آلودگی توسط ویروس‌های خاص باعث ضرر و زیان قابل توجه اقتصادی و کاهش عملکرد حدود ۳۰ درصد در ارقام حساس باقلا می‌شود (Khalil and Erskine, 2001). اهمیت بیماری‌های ویروسی به این دلیل است که نه تنها باعث آسیب مستقیم به میزبان می‌شوند بلکه گیاه را نسبت به حمله‌ی پاتوژن‌های ثانویه، مستعد می‌کنند (Beute, 1970; Mahgoub *et al*., 1997).

تعداد زیادی ویروس خسارت‌زا از گیاه باقلا گزارش و جداسازی شده است، از جمله: ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus;* BYMV)، ویروس زرد نکروتیک باقلا (*Faba bean necrotic yellow virus;* FBNYB)، ویروس پیسک باقلا (*Broad bean mottle virus;* BBMV)، ویروس پیچیدگی برگ لوبیا (*Bean leaf roll virus;* BLRV) و ویروس موزاییک توته‌ای نخودفرنگی (*Pea enation mosaic virus;* PEMV) (Saxena, 1991; Bond *et al*., 1994; van Leur *et al*., 2006).

در میان ویروس‌های گزارش شده از روی باقلا، BYMV یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین بیماری‌های ویروسی است (Bos, 1969) که دامنه‌ی وسیعی از گیاهان را آلوده می‌کند و توسط چندین گونه شته به‌صورت ناپایا انتقال می‌یابد. خسارت آلودگی با BYMV، باعث نابودی گیاه نمی‌شود، اما با وجود القای علایم خفیف، باعث کاهش عملکرد گیاه می‌شود (Cheng *et al*., 2002; Sidaros *et al*., 2006).

در ایران ویروس BYMV از مزارع باقلای استان‌های تهران، فارس، خوزستان، گیلان، مازندران، کرمانشاه، اصفهان و لرستان گزارش شده است (Farzadfar *et al*., 2002).

با توجه به اهمیت کشت باقلا در مناطق جنوب و جنوب‌شرق ایران، در این مناطق بررسی جامعی در مورد وقوع، تعیین پراکنش و بررسی ویژگی‌های جدایه‌های این ویروس انجام نشده است، در نتیجه برای دستیابی به اهداف زیر، این پژوهش انجام شد:

۱- ردیابی ویروس BYMV از مزارع باقلا در استان‌های کرمان و خوزستان با استفاده از آزمون‌های DAS-ELISA و TPIA و آنتی‌بادی اختصاصی BYMV و انتخاب یک جدایه از هر استان

۲- تکثیر جدایه‌های انتخابی هر استان روی گیاهان تکثیری مناسب در شرایط گلخانه‌ای و مقایسه‌ی دامنه‌ی میزبانی، نوع و شدت علایم ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف بر روی گیاهان محک و هم‌چنین بررسی چگونگی انتقال جدایه‌ها با ناقل

۳- تکثیر ناحیه‌ی NIb جدایه‌های BYMV با استفاده از روش‌های مولکولی RT-PCR و IC-RT-PCR و تعیین توالی این ناحیه

۴- مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های بررسی شده در دو استان با هم و با سایر جدایه‌های BYMV موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزارهای موجود

فصل دوم

پیشینه پژوهش

۲-۱- ویروس‌های خسارت‌زننده به باقلا

ویروس‌های بیماری‌زای باقلا، یکی از عوامل مهم محدود کننده‌ی این محصول هستند و باعث ضعف و تغییر شکل بوته‌ها، مرگ و میر گیاه و یا عقیم ماندن گل‌ها شده و در نتیجه عملکرد محصول را کاهش می‌دهند.

تعداد زیادی ویروس خسارت‌زا از گیاه باقلا گزارش و جداسازی شده‌اند (Kumari and Van Leur, 2011) که در جدول ۲-۱ به برخی از ویژگی‌های ویروس‌های مهم گزارش شده از روی باقلا اشاره شده است.

جدول ۲-۱- ویروس‌های اقتصادی مهم گزارش شده از روی باقلا (Kumari and Van Leur, 2011)

گونه‌های ویروس	ژنوم	مخفف نام ویروس	جنس	خانواده	روش انتقال
ویروس‌های ایجاد کننده‌ی علایم زردی، کوتولگی و نکروزه شدن					
Beet western yellows virus	ssRNA	BWYV	*Polerovirus*	*Luteoviridae*	Aphids-P
Bean leaf roll virus	ssRNA	BLRV	*Luteovirus*	*Luteoviridae*	Aphids-P
Chickpea chlorotic dwarf virus	ssDNA	CpCDV	*Mastrevirus*	*Geminiviridae*	Leafhoppers-P
Chickpea chlorotic stunt virus	ssRNA	CpCSV	*Polerovirus*	*Luteoviridae*	Aphids-P
Faba bean necrotic yellows virus	ssDNA	FBNYV	*Nanovirus*	*Nanoviridae*	Aphids-P
Milk vetch dwarf virus	ssDNA	MDV	*Nanovirus*	*Nanoviridae*	Aphids-P
Soybean dwarf virus	ssRNA	SbDV	*Luteovirus*	*Luteoviridae*	Aphids-P
Subterranean clover stunt virus	ssDNA	SCSV	*Nanovirus*	*Nanoviridae*	Aphids-P
ویروس‌های ایجاد کننده‌ی علایم موزاییک و پیسک					
Alfalfa mosaic virus	ssRNA	AMV	*Alfamovirus*	*Bromoviridae*	Aphids-NP
Bean yellow mosaic virus	ssRNA	BYMV	*Potyvirus*	*Potyviridae*	Aphids-NP
Broad bean mottle virus	ssRNA	BBMV	*Bromovirus*	*Bromoviridae*	Aphids-NP
Broad bean stain virus	ssRNA	BBSV	*Comovirus*	*Comoviridae*	Aphids-NP
Broad bean true mosaic virus	ssRNA	BBTMV	*Comovirus*	*Comoviridae*	Aphids-NP
Broad bean wilt virus	ssRNA	BBWV	*Fabavirus*	*Comoviridae*	Aphids-NP
Cucumber mosaic virus	ssRNA	CMV	*Cucumovirus*	*Bromoviridae*	Aphids-NP
Pea early browning virus	ssRNA	PEBV	*Tobravirus*	-	Nematodes-NP
Pea enation mosaic virus -1	ssRNA	PEMV-1	*Enamovirus*	*Luteoviridae*	Aphids-P
Pea seed-borne mosaic virus	ssRNA	PSbMV	*Potyvirus*	*Potyviridae*	Aphids-NP

NP: انتقال ویروس به‌صورت ناپایا و P: انتقال ویروس به‌صورت پایا

ویروس BYMV یکی از مهم‌ترین ویروس‌های رایج در حبوبات می‌باشد که گسترش جهانی وسیعی دارد و سالانه باعث خسارت قابل توجهی به کمیت و کیفیت محصول می‌شود (Bos, 1969). در ادامه به بررسی ویژگی‌های این و یروس پرداخته می‌شود.

۲-۲- ویروس موزاییک زرد لوبیا (BYMV)

این ویروس برای اولین‌بار از ایالت متحده آمریکا در سال ۱۹۰۰ از مزارع نخود و در سال ۱۹۲۵ از روی لوبیای فرانسوی (*Phaseolus vulgaris*) گزارش شده است (Doolittle and Jones, 1925).

ویروس BYMV از اولین ویروس‌های شناسایی شده از روی گلایول است. اسمیت و بریرلی[1] (۱۹۴۴) ویروس را با استفاده از شته، از گلایول‌های دارای علایم به گلایول‌های سالم منتقل کردند ولی آن‌ها قادر به شناسایی نوع ویروس در آن زمان نبودند (Smith and Brierley, 1944). تا این‌که مک‌ورتر[2] و همکاران (۱۹۴۷) توانستند ویروس BYMV را برای اولین‌بار از روی این گیاه گزارش کنند (McWhorter *et al*., 1947). علایم BYMV بر روی گلایول به‌صورت لکه‌های سبزرد، موزاییک سبز روشن یا تیره بر روی برگ‌ها و شکستگی رنگ گل‌ها دیده می‌شود.

هامپتون[3] (۱۹۷۵) در شرایط مزرعه اثر BYMV و ویروس موزاییک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*; BCMV) را بر عملکرد دانه‌ی یک رقم لوبیای مکزیکی مطالعه کرد. نتایج این آزمایش مشخص کرد که BYMV باعث کاهش ۳۳ درصدی تعداد غلاف در بوته و ۴۱ درصدی عملکرد دانه می‌شود، میزان کاهش تعداد غلاف در بوته و عملکرد دانه در اثر آلودگی با BCMV در این پژوهش به‌ترتیب ۵۰ تا ۶۴ درصد و ۵۳ تا ۶۸ درصد گزارش شد.

فورتاس[4] و همکاران (۱۹۹۱) ویروس BYMV را از گیاه باقلای آلوده در مزارع کشورهای سودان، سوریه و هلند جداسازی کردند. ساسایا[5] و همکاران (۱۹۹۷) این ویروس را از روی گیاهان مختلف در ژاپن شناسایی کردند.

[1] Smith and Brierley
[2] McWhorter
[3] Hampton
[4] Fortass
[5] Sasaya