چکیده:

تعیین برخی خصوصیات سرولوژیکی و مولکولی جدایه‌های ویروس معمولی لوبیا (BCMV) در استان خراسان رضوی

در بین عوامل ویروسی متعددی که باعث بروز علایم موزاییک و ایجاد خسارت در گیاه لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.) میشوند، دو ویروس موزاییک معمولی لوبیا BCMV و ویروس موزاییک نکروتیک لوبیا BCMNV اهمیت ویژه ای دارند .در این تحقیق به منظور ردیابی ویروس BCMV و تعیین برخی خصوصیات سرولوژیک و مولکولی آن، در فصل زراعی ۹۱-۱۳۹۰ نمونه هایی با علایم موزاییک ، رگبرگ روشنی ، برگشتگی ، نکروتیک برگ و ساقه لوبیا از سطح شهرستان نیشابور و از مناطق محمود آباد، اسلام آباد، فتح آباد، کاریزک و جوری جمع آوری گردید. برای ردیابی این ویروس در ابتدا نمونه ها با روشهای سرولوژیک DAS-ELISA و لکه گذاری بافتی (Tissue-blot) با آنتی سرم های چند همسانه ای اختصاصی مورد سنجش و ردیابی قرار گرفتند. . با استفاده ار بافر فسفات ۱٪ (pH=7.4)، تعدادی از نمونه های آلوده بر روی گیاهان محک لوبیا مایه زنی مکانیکی گردید و برای مطالعات بعدی در شرایط گلخانه تکثیر گردید سپس جهت تأیید و بررسی دقیق تر ، نمونه های انتخابی آلوده در الایزا با آزمون RT-PCR و IC-RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند cDNA بدست آمده در دستگاه ترموسایکلر تکثیر گردید. محصول حاصل در ژل آگاروز ۱٪ به اندازه تقریبی ۳۷۳ جفت باز از سکانس منطقه ای از ژن پروتئین پوششی ویروس مورد نظر برای ویروس موزاییک معمولی لوبیا مشاهده گردید. و بر این اساس ویروس BCMV ازگیاهان لوبیای آلوده از سطح شهرستان نیشابور و از مناطق محمود آباد، اسلام آباد، فتح آباد، کاریزک و جوری شناسایی و تفکیک گردید. در این تحقیق نشان داده شده که تکنیک IC-RT-PCR برای شناسایی و تشخیص این ویروس از حساسیت بالایی نسبت به روش الایزا برخوردار است. با مطالعه درختچه تبارزایی دو گروه A وB و با مقایسه(تعیین توالی) ۱۲ جدایه ایرانی با ۱۸ جدایه خارجی مشخص گردید که در این بین جدایه‌های ایرانی با تشکیل ۳ زیر گروه بیشترین قرابت را با جدایه‌های مکزیکو با درصد تشابه ۹۹/۳ درصد دارا بودند، که این نتایج نشان دهنده تنوع در میان جدایه‌های ایرانی ویروس می‌باشد. از نقطه نظر مدیریت کنترل بیماری این نتایج در بررسی و انتخاب ارقام مقاوم لوبیای مقاوم یا متحمل به ویروس و نژادهای وابسته حائز اهمیت ویژه‌ای می‌باشد.

فصل اول :

مقدمه و مروری بر پیشینه پژوهش

۱-۱ تاریخچه :

حبوبات دومین منبع مهم غذایی بشر، پس از غلات می‌باشند که مقدار زیادی پروتئین، کربوهیدرات، و مواد معدنی مثل آهن، کلسیم، پتاسیم، منیزیم، ویتامین‌ها خصوصی ویتامین‌های گروه B را دارند ، که با داشتن حدود ۲۵٪ پروتئین ، به عنوان یکی از منابع مهم پروتئین‌های گیاهی، به ویژه در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌آیند. علاوه بر این وجود باکتری‌های تثبیت کننده ازت اتمسفری در ریشه حبوبات در حاصلخیزی خاک موثر است (کایزر و همکاران ،. ۱۳۵۱ ؛کوچکی ،. ۱۳۷۳) .

گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) از خانواده بقولات (*Leguminosae*) می‌باشد. این محصول در اکثر نقاط دنیا کشت می‌شود (Hall.,1991). لوبیا در ایران نیز به عنوان یکی از حبوبات مهم ، مورد نظر بوده و حدود هفتصد و نود هزار هکتار معادل ۶/۲ درصد از اراضی محصولات سالانه برداشت شده در سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸ به حبوبات اختصاص یافته است. از این مقدار نخود حدود ۶۴/۳ درصد، عدس ۲۰/۵ درصد و لوبیا ۱۱/۵ درصد از سطح برداشت را به خود اختصاص داده است. از کل سطح برداشت حبوبات ۱۶/۱ درصد به صورت آبی و ۸۳/۹ درصد بقیه به صورت دیم بوده است. بیشترین سطح برداشت حبوبات در کشور متعلق به استان لرستان با ۱۶/۴ درصد و کمترین سطح مربوط به استان بوشهر با کمتر از ۰/۰۱ درصد بوده است. از حدود هفتصد و شانزده هزار تن تولید حبوبات در سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸ ، ۴۷/۵ درصد از اراضی آبی و ۵۲/۵ درصد از اراضی دیم به دست آمده است (آمارنامه کشاورزی ،. ۸۹-۱۳۸۸).

خاستگاه اولیه لوبیا، احتمالاً قسمت‌های گرمسیری آمریکای جنوبی در مکزیک و غرب گواتمالا می‌باشد . با توجه به تنوع ژنتیکی و پراکندگی وسیع لوبیا در آمریکای مرکزی ممکن است تمام این منطقه خاستگاه این گیاه باشد (مصاحبی ،.۱۳۵۱).

سطح زیر کشت جهانی انواع لوبیا در حدود بیست و چهار میلیون هکتار است . طبق آمار سازمان خوار و بار جهانی (FAO) کشور برزیل بزرگ‌ترین تولید کننده لوبیا در جهان است.(FAO STAT ,2008). کشور هندوستان با ۹ میلیون هکتار سطح زیر کشت از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان در آسیاست . کشور برزیل با تولید سالانه ۳۳۳۰۴۳۵ تن لوبیا اولین کشور تولید کننده این محصول و ایران با ۲۵۴۱۱۱ تن، بیستمین کشور جهان در تولید لوبیا محسوب می‌گردد (FAO., 2**008**). عمده تولید کنندگان حبوبات در کشور استان‌های لرستان ، کرمانشاه ، آذربایجان شرقی، خوزستان

می‌باشند که کمتر از نیمی(۴۶/۴ درصد) از کل تولید حبوبات را تشکیل می‌دهند. همچنین در استان خراسان رضوی ۸۸۳ هکتار از اراضی زیر کشت آبی و۵۰ هکتار زیر کشت دیم هستند (آمارنامه کشاورزی ،. ۸۹-۱۳۸۸).

جدول ۱-۱ بزرگ‌ترین کشورهای تولید کننده لوبیا در سال ۲۰۰۸ (FAO., 2008)

برزیل	۳۳۳۰۴۳۵
هند	۳۰۰۰۰۰۰
چین	۱۹۵۷۰۰۰
میانمار	۱۷۶۵۰۰۰
مکزیک	۱۳۹۰۰۰۰
ایالات متحده	۱۱۵۰۸۰۸
کنیا	۵۳۵۰۰۰
اوگاندا	۴۳۵۰۰۰
آرژانتین (Argentina)	۳۲۸۲۴۹
اندونزی	۳۲۰۰۰۰
جهان	۱۹۲۸۹۲۳۱

این گیاه مهم و ارزشمند همیشه مورد حمله عوامل بیماری‌زای متعددی از جمله قارچ ، باکتری و ویروس قرار می‌گیرد (Howard and Galvez ., 1988). تنش‌های ناشی از عوامل بیولوژیک مانند بیماری‌ها به خصوص در کشورهای در حال توسعه اهمیت دارد (Puttaraju *et al.*,2004). که هر کدام از آن‌ها نقش مهمی در کاهش محصول این گیاه دارند. از جمله مهم‌ترین این عوامل ویروس‌ها می‌باشند و همه ساله در اثر عدم مدیریت صحیح کنترل عوامل بیماری زا مقدار قابل توجهی از عملکرد آن کاسته می‌شود. تعدادی از ویروس‌های لوبیا بذر زاد هستند که این پدیده به علت پراکنش جغرافیایی نامحدود این گیاه حائز اهمیت است. اولین قدم برای کنترل آن‌ها، کنترل بذر و کشت بذر عاری از آلودگی می‌باشد، که مرجع گواهی و استانداردسازی سلامت بذور گیاهی، موسسه‌های تحقیقاتی اصلاح و گواهی بذر و نهال در ایران است .

ویروس‌های بذر زاد از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت زیادی هستند. وقتی یک گیاه با یک ویروس بذر زاد آلوده می‌شود آن گیاه در تمام نسل‌های بعدی نیز آلوده خواهد بود و این آلودگی به

طور طبیعی منجر به کاهش محصول می‌شود. حدود ۹۰ ٪ کل گیاهان زراعی در جهان با بذر تکثیر می‌شوند ، بنابراین کاهش محصول ناشی از بیمار گرهای بذر زاد از جمله ویروس‌ها دارای اهمیت ویژه ای است. خسارت اقتصادی ناشی از ویروس‌های بذر زاد به صورت خسارت مستقیم در کاهش محصول یا کیفیت آن و نیز به صورت غیرمستقیم مانند هزینه کنترل و مدیریت بیماری است. حتی مقدار ناچیزی از بذور آلوده به ویروس می‌تواند در صورت حضور ناقل کافی در مزرعه موجب انتشار اولیه ویروس در مزرعه شود که گاهی منجر به آلودگی ۱۰۰٪ محصول می‌شود(Puttaraju *et al*.,2004).

در بررسی‌های انجام گرفته ویروس موزاییک معمولی لوبیا BCMV از نظر میزان خسارت وارده مهم‌ترین ویروس خسارت زا در گیاه لوبیا شناخته شده و میزان کاهش محصول در اثر آلودگی به این ویروس بیش از ۶۸٪ گزارش شده است (کایزر و همکاران ،.۱۳۵۱؛ Singh, 2001؛ Strausbaugh *et al*., 2003؛ Mavaric and Susta-Vozlic, 2004).

درصد بذر زادی این ویروس در ارقام مختلف متفاوت است و بسته به ژنوتیپ گیاه ، نژاد ویروس و سن گیاه در زمان آلودگی بین ۸۳-۰ درصد متغیر است (Morales & Bos ., 1988 ؛Dasgupta *et al*., 2003؛ Ittah, 2006؛ Castillo-Urquisa *et al*., 2006).

علائم موزائیک در گیاه لوبیا، اولین بار در سال ۱۸۶۴ توسط Iwanoski از روسیه گزارش شد. در سال ۱۹۰۸ Clinton نوعی زردی روی لوبیا مشاهده کرد که علت آن احتمالاً ویروس موزائیک معمولی لوبیا بوده است. اولین بار این ویروس توسط Steware and Reddick در سال ۱۹۱۷ و Pierce در سال ۱۹۳۴ از مزارع لوبیا در نیویورک جمع آوری گردیده است. این بیماری به وسیله Archibald and Gussow در سال ۱۹۲۱ از کانادا، Olivie در سال ۱۹۳۴ از برمودا، Porter در سال۱۹۲۶ از چین، Grainyer، در سال ۱۹۲۹ از انگلیس و Chamberlin در سال ۱۹۳۳ از زلاندنو گزارش شد. در ایران برای اولین بار در سال ۱۹۴۲ توسط منوچهری وجود این ویروس از مزارع لوبیا در دماوند گزارش شده و آلودگی مزارع تا ۱۰۰٪ نیز گزارش شده است (مصاحبی.، ۱۳۵۱).

۱-۲ عوامل محدود کننده و بیماری‌های مهم لوبیا

عوامل بیماری‌زای متعددی تولید لوبیا را در ایران و جهان تحت تأثیر قرار می‌دهند و موجب کاهش تولید این محصول می‌شوند. عوامل ویروسی، قارچی و باکتریایی از عوامل محدود کننده مهم این محصول بشمار می‌آیند.

جدول ۱-۲ تعدادی از بیماری‌های قارچی و باکتریایی مهم لوبیا در جهان

بیماری‌های قارچی مهم لوبیا	آنتراکنوز *Colletotrichum lindemuthianum*
	لکه برگی آلترناریایی *Alternaria alternate*
	سفیدک پودری *Erysiphe polygoni*
	زنگ لوبیا *Uromyces phaseoli*
	پوسیدگی‌های ریشه فوزاریومی و رایزوکتونیایی
بیماری‌های باکتریایی مهم لوبیا	بلایت معمولی باکتریایی (*Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*)
	هالو بلایت(*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)
	لکه قهوه ای باکتریایی(*pseudomonas syringae* pv. *syringae*)

ویروس‌های لوبیا به دلیل انتشار گسترده در سراسر دنیا و نیز انتقال بذری در اغلب آن‌ها از اهمیت ویژه ای برخوردارند و به همین دلیل در تمام مناطق لوبیا کاری دنیا از عوامل اصلی محدود کننده کشت این محصول به شمار می‌روند. ویروس موزاییک معمولی لوبیا با بیشترین میزان بذر زادی مهم‌ترین ویروس لوبیا محسوب می‌شود (Hall., 1991؛ Singh, 2001 ؛ Strausbaugh *et al*., 2003؛ Mavaric and Susta-Vozlic, 2004).

جدول ۱-۳ عوامل ویروسی آلوده کننده لوبیا (compendium of Bean diseases-APS-1991)

	Virus	Group
Aphid transmitted	*Alfalfa mosaic*-AMV*	Alfalfa mosaic virus
	Bean common mosaic-BCMV**	Potyvirus
	Bean common mosaic necrosis virus-BCMNV**	Potyvirus
	Bean loaf roll-BLRV*	Luteovirus
	Bean yellow mosaic-BYMV**	Potyvirus
	Blackeye cowpea mosaic-BLCMV	Potyvirus
	Broad bean wilt-BBWV*	Ungrouped
	Clover yellow vein-CIYVV	Potyvirus
	Cowpea aphid –borne mosaic-CABMV	Potyvirus
	Cucumber mosaic-CMV*	Cucumovirus
	Pea mosaic PMV	Potyvirus
	Peanut mottle-PeMoV	Potyvirus
	Soybean mosaic-SMV*	Potyvirus
	Watermelon mosaic 2-WMV	Potyvirus
Beetle-transmitted	*Bean curly dwarf mosaic* -BCDV	Ungrouped
	Bean pod mottle-BPMV*	Comovirus
	Bean mild mosaic-BMMV	Ungrouped
	Bean rugose mosaic-BRMV	Comovirus
	Bean yellow stipple-BYSV(CCMV)	Bromovirus
	Bean southern mosaic-SBMV	Sobemovirus
Leafhoppert ransmitted	*Bean summer death*-BCT	Ungrouped
	Bean curly top-BCT*	Geminivirus
Nematode transmitted	*Tobacco ring spot*-TRSV	Nepovirus
	Tomato ring spot-ToRSV	Nepovirus
Whitefly transmitted	*Bean golden mosaic*-BGMV	Geminivirus
	Euphorbia mosaic-EuMV	Geminivirus
	Rhynchosia mosaic-RMV	Unknown
Unknown vector	*Tobbaco mosaic*-TMV*	Tobamovirus
	Tobacco necrosis-TNV	Necrovirus
	Tobacco streak-TSV	Ilarvirus

*ویروس‌های مهم و خسارتزا در ایران بر روی گیاه لوبیا ** ویروس‌های بذر زاد بر روی گیاه لوبیا

ویروس‌ها نیز باعث کاهش و از دست رفتن محصول در بیشتر حبوبات می‌شوند. برای مثال BCMV و BCMNV وابسته نزدیک به آن، پراکنده‌ترین و بیشترین ویروس‌های لوبیای معمولی

هستند که باعث کاهش قالب توجهی در محصول می‌شوند. به علاوه در دو دهه اخیر، ویروس موزاییک طلایی لوبیا (BGMV) به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های محدود کننده در محصول لوبیا در منطقه مرکزی آمریکا در نظر گرفته می‌شود. کاهش محصول بین ۱۰۰-۱۰ درصد بوده است (Reddy, *et al*., 2004) .

۱-۳ بیماری‌های ویروسی لوبیا

حبوبات به طور کلی با بیش از ۱۴۰ ویروس گیاهی مختلف آلوده می‌شوند و جنس *P. vulgaris* در میان حبوبات دارای بیشترین آلودگی ویروسی است (Edwardson and Christie., 1991). در حال حاضر تنها حدود ۲۰ ویروس گیاهی مختلف در کل دنیا به عنوان پاتوژن‌های طبیعی و مهم لوبیای معمولی نام برده می‌شود و تنها تعداد انگشت شماری از آن‌ها تولید لوبیا را در مناطق زیر کشت این محصول در دنیا تحت تأثیر قرار می‌دهد (Hall., 1991). این موضوع اشاره بر این دارد که ارقام لوبیای معمولی موجود دارای طیف وسیعی از مقاومت ژنتیکی به بسیاری از ویروس‌های گیاهی هستند که در مناطق زیر کشت لوبیا یافت می‌شوند.

گسترش بیماری‌های ویروسی و شدت آن‌ها در لوبیا اغلب به دلیل بذر زاد بودن آن‌ها و انتقال نا پایا توسط تعداد زیادی از گونه های شته چشمگیر بوده و یکی از مشکلات کشت این محصول در نواحی گرم و خشک می‌باشد(Hall., 1991).

ویروس‌های زیر از جمله عوامل ویروسی شایع و مهم گزارش شده در اکثر مناطق ایران از گیاه لوبیا می‌باشند :

• ویروس موزاییک معمولی لوبیا (BCMV) *Bean common mosaic virus*: گزارش شده از اکثر استان‌های کشور، کرج، شیراز، زنجان، مشهد، چناران، اصفهان، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی

• ویروس نکروتیک معمولی لوبیا (BCMNV) *Bean common necrosis mosaic virus* : گزارش شده از اکثر استان‌های کشور

• ویروس موزاییک جنوبی لوبیا (SBMV) *Southern bean mosaic virus* گزارش شده از منطقه شمال غربی ایران

• ویروس موزاییک زرد لوبیا (BYMV) *Bean yellow mosaic virus* : گزارش شده از تهران، دزفول، فارس، خوزستان، کرج، شیراز، اصفهان

• ویروس لک دانهٔ باقلا (BBSV) *Broad bean stain virus* : گزارش شده از آذربایجان شرقی، کرمانشاه، کردستان، قزوین

• ویروس غلاف پیسکی لوبیا (BPMV) *Bean pod mottle virus* : گزارش شده از آذربایجان شرقی

• ویروس موزاییک خیار (CMV) *Cucumber mosaic virus*: گزارش شده از اکثر استان‌های کشور، تهران، کرج، ورامین، گرمسار، اصفهان، دزفول، رشت، سنندج، خوی، زنجان

• ویروس برگ قاشقی لوبیا (BLRV) *Bean leaf roll virus* : گزارش شده از اکثر استان‌های کشور، تهران، فارس، کرج، شیراز، مشهد، دزفول

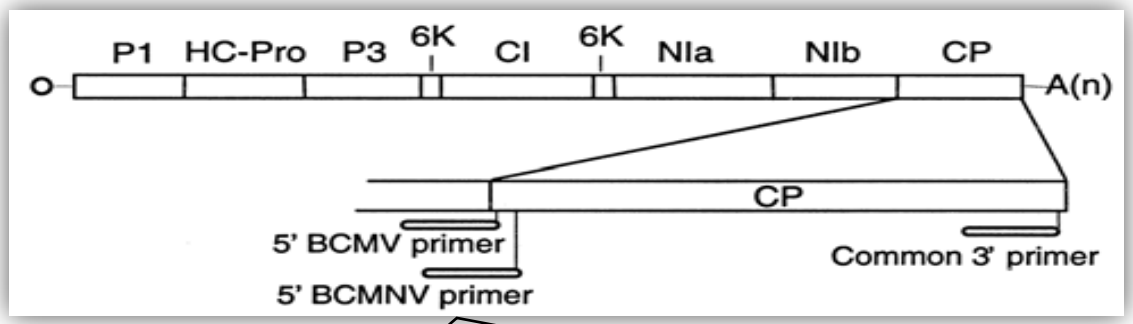
۱-۴ خصوصیات عمومی پوتی ویروس‌ها:

پوتی ویریده بزرگ‌ترین خانواده در میان ویروس‌های گیاهی RNA دار تک رشته ای مثبت است. طبق آخرین گزارش کمیته بین‌المللی رده بندی ویروس‌ها (ICTV) در سال ۲۰۰۵ میلادی اعضای این خانواده بر اساس نوع ناقل و خصوصیات ژنومیشان در ۶ جنس دسته بندی شده‌اند. که بزرگ‌ترین آن‌ها جنس *Potyvirus* است.(Berger, *et al.*,2005) .

جدول ۱-۴ رده بندی ویروس‌های خانواده پوتی ویریده

خانواده *Potyvirideae*		
Potyvirus	دارای ژنوم ۱ بخشی	بزرگترین جنس خانواده،انتقال توسط شته و گاهی بذر
Bymovirus	ژنوم ۲ بخشی	انتقال توسط قارچ ها
Ipomovirus	ژنوم ۱ بخشی	انتقال توسط سفید بالک ها
Macluravirus	ژنوم ۱ بخشی	انتقال با شته
Rymovirus	ژنوم ۱ بخشی	انتقال با کنه *Abacarus hystrix*
Tritimovirus	ژنوم ۱ بخشی	انتقال با کنه *Acaria tulipae*

ژنوم پوتی ویروس‌ها از یک رشته RNA تک لای مثبت (+ss RNA) به طول تقریباً ۱۰kb ساخته شده که توسط ۲۰۰۰ زیر واحد پروتئین پوششی احاطه می‌گردد. در انتهای ′۵ دارای پروتئین متصل شونده به ژنوم (Vpg) و در انتهای ′۳ دارای توالی poly A هستند.



شکل ۱-۱ ساختار ژنوم پوتی ویروس‌ها و موقعیت ژن‌ها بر روی آن‌ها

۱-۵ تشخیص و ردیابی ویروس موزائیک معمولی لوبیا

۱-۵-۱ روش‌های بیولوژیکی

این روش‌ها مبتنی بر علائم شناسی و دامنه میزبانی ویروس می‌باشند. دامنه میزبانی ویروس موزائیک معمولی لوبیا در طبیعت بسیار محدود است و اغلب فقط در گونه های جنس لوبیا *Phaseolus* و در برخی منابع در حبوبات وحشی مثل *Rhynchosia minima* یافت می‌شوند (Drijfhout, *et al*., 1978؛ Morales and Bos., 1988).

لوبیا علاوه بر ویروس BCMV می‌تواند میزبان ویروس‌های دیگری نیز باشد و در اصطلاح، آلودگی مرکب در میزبان صورت گیرد. BCMV معمولاً همراه با ویروس‌های CMV، BYMV و BCMNV در بافت گیاه میزبان یافت می‌شود و برای تشخیص دقیق این ویروس در گام اول می‌توان با مایه کوبی عصاره بافت آلوده بر روی میزبان‌های محک این ویروس مثل *Chenopodium quinoa* و *C.amaranticolor*، *Red kidney*، *Bountiful* و *Phaseolus lathyroides* وجود یا عدم وجود ویروس را مشخص کرد. در صورت وجود ویروس

BCMV ، میزبان‌ها به ترتیب لکه های موضعی کلروتیک و نکروتیک نشان می‌دهند. البته وقوع این واکنش در *C. quinoa* بستگی به نژاد ویروس دارد (Burns, 2009 ; Drijfhout, 1978).

جدول ۱-۵ وقوع آلودگی مضاعف در لوبیای منطقه شمال غربی ایران در سال ۲۰۰۴ (Dizadji , *et al*.,2011)

Mix infection with	BCMV + CMV	BYMV + CMV	BCMNV + CMV	BCMNV + BYMV	BCMV + BYMV	BYMV + AMV	BLRV + AMV	BCMNV + BYMV + CMV
No. of co-infected samples (incidence percent, %)	4 (1.5)	6 (2.35)	10 (3.95)	21 (8.3)	10 (3.95)	3 (1.1)	4 (1.5)	1 (0.004)

Drijfhout در سال ۱۹۷۸ بیماری زایی ۲۲ نژاد شناخته شده این ویروس را بر روی یک سری ارقام افتراقی لوبیای معمولی بررسی نمود و با توجه به برهم کنش‌های متفاوت بین ارقام مختلف و نژادهای گوناگون ، یک سری از ارقام افتراقی را جهت تشخیص استرین‌های مختلف این ویروس معرفی کرده است. بر اساس حضور یا عدم حضور ژن غالب مقاومت *I* در گیاه و نوع ژن بیماری زایی استرین ویروس ، هر رقم، واکنش خاصی نسبت به استرین‌های مختلف این ویروس نشان می‌دهد. که بر اساس آن می‌توان گروه بیماری زایی و استرین ویروس را شناسایی نمود (Drijfhout., 1978). گونه های میزبانی حساس مانند *Chenopodium quinoa* علایمی نظیر، زخم‌های منطقه ای با کلروتیک ضعیف که درون حلقه‌های سبز گسترش پیدا می‌کند، را ایجاد می‌کند. *Macroptilium lathyroides* که ایجاد زخم‌های منطقه‌ای نکروتیک و نکروز سیستمیک می‌کند. *Phaseolus vulgaris* در اثر آلودگی برگ‌های تغییر شکل یافته ایجاد می‌کند. *Pisum sativum* و *Vicia faba* که فاقد علایم هستند. خانواده های در برگیرنده گونه های حساس شامل *Amaranthaceae*، *Chenopodiaceae* ، *Leguminosae* و *Solanaceae* می‌باشد.

پس از تشخیص بیولوژیکی ویروس، جهت خلوص بیولوژیکی آن می‌توان یک تک لکه کلروتیک از میزبان محک (یا یک لکه سبز روشن روی برگ میزبان تکثیری) را با تیغ استریل جدا کرده و عصاره آن را روی میزبان تکثیری دیگر که علائم موزائیک سیستمیک تولید می‌کند مایه زنی کرد و با تکرار این عمل دو تا سه مرتبه دیگر به طور بیولوژیکی به خلوص نسبی می‌رسیم. بافر مایه زنی که در منابع مختلف به آن اشاره شده، بافر فسفات پتاسیم با مولاریته بین ۰/۱-۰/۰۱ و pH بین ۷/۵-۷ است که برای این کار مناسب تشخیص داده شده است.

روش تشخیص بیولوژیک می‌تواند در کنار روش‌های سرولوژیک و مولکولی ، برای تشخیص دقیق‌تر و شناسایی استرین‌های مختلف ویروس بکار رود.

۲-۵-۱ روش‌های سرولوژیکی (Shukla *et al.*,1992 ; Shukla and ward, 1989; Shukla *et al.*,1998)

روش‌های سرولوژیکی از سال‌های گذشته تا کنون برای تشخیص و طبقه بندی پوتی ویروس‌ها به کار می‌رفته است و این روش‌ها در کنار روش‌های دیگر کماکان جایگاه و کاربرد خود را حفظ کرده‌اند. اگرچه ارتباط سرولوژیکی بین اعضای مختلف پوتی ویروس‌ها دارای پیچیدگی خاصی هستند و روابط آنتی ژنی در بین اعضای آن از الگوی ساده ای پیروی نمی‌کند و حتی در مواردی خصوصیات سرولوژیکی این ویروس‌ها با خواص بیولوژیکی آن‌ها هم خوانی ندارد (Shukla and ward, 1989؛ Urcuqui-Inchima, *et al.*, 2001).

برای شناخت و آگاهی از روابط سرولوژیکی پوتی ویروس‌ها باید ساختار پوشش پروتئینی آن‌ها را مورد بررسی قرار داد. پروتئین پوششی پوتی ویروس‌ها را می‌توان به سه ناحیه تقسیم کرد: نواحی تغییر پذیر پایانه های N وC که در سطح پیکره بوده و به تیمار خفیف با تریپسین حساسند و ناحیه محافظت شده میانی . اپی‌توپ‌های اختصاصی در ناحیه پایانه N پوشش پروتئینی قرار گرفته‌اند که این ناحیه در سویه های یک ویروس مشابهت بالایی دارد، در حالی که در ویروس‌های مختلف از نظر طول و ترادف تفاوت زیادی را نشان می‌دهد(Urcuqui-Inchima, *et al.*, 2001).

طبق تحقیقات انجام شده، بیشترین تشابه در ناحیه مرکزی پوشش پروتئینی است و همین امر باعث ایجاد واکنش‌های تقاطعی در بین پوتی ویروس‌های متفاوت شده و روابط سرولوژیکی بین اعضای مختلف را پیچیده نموده است. تهیه آنتی بادی علیه ناحیه مرکزی پوشش پروتئینی و در

نتیجه آن بروز واکنش‌های تقاطعی، مسئول بسیاری از داده های متناقض در روابط سرولوژیکی این خانواده می‌باشد. مهم‌ترین دلیل زیاد بودن چنین آنتی بادی‌هایی، تجزیه شدن نواحی پایانه های N و C در اثر آنزیم‌های گیاهی یا میکروبی دیگر موجود در آموده خالص شده ویروسی و همچنین در طول نگهداری آن می‌باشد. با وجود اینکه اپی‌توپ‌های اختصاصی ویروس در پایانه -N می‌باشند اما آنتی بادی‌های تهیه شده فقط علیه اپی‌توپ‌های غیر اختصاصی ناحیه مرکزی است. بنابراین آنتی بادی‌های تهیه شده برای شناسایی این ویروس‌ها بایستی علیه اپی‌توپ‌های ناحیه N ترمینال پوشش پروتئینی ساخته شوند و آنتی بادی‌های تهیه شده علیه ناحیه میانی پوشش پروتئینی به علت شباهت ترادف پپتیدی (peptide) در این ناحیه ، قادر به شناسایی اغلب اعضای پوتی ویروس‌ها خواهند بود (Shukla, *et al*., 1988).

۳-۵-۱ روش‌های مولکولی مبتنی بر اسید نوکلئیک (Ali *et al*., 1998; Frenkel *et al*., 1992; Tracy *et al*., 1992 ; Hsu *et al*., 2005)

امروزه به جای خصوصیات مرفولوژیکی و بیولوژیکی از خصوصیات مولکولی جهت گروه بندی پوتی ویروس‌ها استفاده می‌شود. این گروه بندی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژنوم و خصوصیات پروتئین پوششی صورت می‌پذیرد. ترادف نوکلئوتیدی ژنوم پوتی ویروس‌ها نشان داده است که برخی قسمت‌های ژنوم همولوژی بیشتری نسبت به سایر قسمت‌ها دارند. ترادف نوکلئوتیدی و هیبریداسیون اسید نوکلئیک جهت شناسایی پوتی ویروس‌ها و تفکیک ویروس‌ها از سویه‌ها به کار می‌رود. Frenkel و همکاران نشان داده‌اند که ترادف نوکلئوتیدی ناحیه غیر کد کننده پایانه ′۳ ژنوم پوتی ویروس‌ها می‌تواند نقش اساسی جهت شناسایی و طبقه بندی آن‌ها داشته باشد. این ناحیه در پوتی ویروس‌های مختلف از نظر طول و ترادف متفاوت است، اما بر عکس در سویه های ویروس شباهت زیادی را نشان می‌دهد (Shukla and Ward, 1989؛ Frenkel, *et al*., 1989).

شباهت و ترادف اسید آمینه ای پوشش پروتئینی نیز می‌تواند تا حد بالایی قرابت تاکسونومیکی بین پوتی ویروس‌ها را بیان کند. پروتئین پوششی پوتی ویروس‌های مختلف تفاوت زیادی در اندازه (۳۳۰-۲۶۳ آمینواسید) نشان می‌دهند که به علت تفاوت در طول N ترمینال آن‌ها می‌باشد. ناحیه N ترمینال ویروس‌های مختلف تفاوت عمده ای در طول و ترادف دارد و از بیش از ۴۰ اسیدآمینه تشکیل شده و بیشترین تنوع در بین اعضای این خانواده مربوط به همین ناحیه از پوشش پروتئینی می‌باشد، در حالی که ناحیه پایانه C پوشش‌های پروتئینی متفاوت، همولوژی بالایی

را نشان می‌دهند (۶۵٪) و از نظر طول فقط در یک یا دو اسید آمینه با هم فرق دارند (Jordan and Hammond, 1991؛ Shukla, *et al*., 1988).

در مقابل، سویه های یک ویروس، عموماً پوشش پروتئینی با طول یکسان و N ترمینال با همولوژی بالا دارند. آنالیزها نشان می‌دهند که اعضای مختلف پوتی ویروس‌ها دارای مشابهت در ترادف آمینو اسیدی بین ۷۱-۳۸٪ و نژادهای یک ویروس دارای مشابهت در توالی اسید آمینه بین ۹۹-۹۰٪ می‌باشند (Shukla and Ward, 1989).

۱-۳-۵-۱ Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Xu وHampton در سال ۱۹۹۶ تشخیص مولکولی ویروس‌های BCMV وBCMNV را مورد مطالعه قرار دادند. این محققین بر اساس توالی ناحیه انتهای ′۳ ژن کد کننده پروتئین پوششی اقدام به طراحی پرایمر نمودند و با استفاده از آن و از طریق تکنیک RT-PCR ، این روش را برای شناسایی مولکولی ویروس‌های مذکور بهینه سازی نمودند (Xu and Hampton, 1996).

۱-۶ طبقه بندی نژادهای ویروس BCMV

نژاد یا استرین به یک گروه از جدایه‌ها با خصوصیات بیولوژیک یکسان گفته می‌شود (Mink-Silbernagal, 1992). نژادهای جدید ویروس از طریق تغییرات اندک در توالی ژنومی در حین تکثیر ژنوم و به علت عدم وجود مکانیسم‌های تصحیحی روی می‌دهد. شناسایی و توصیف نژادها بر اساس خواص بیولوژیکی(رابطه بین ویروس و گیاهان میزبان) و ساختاری (پیکره ویروس و محتویات آن) آن‌ها صورت می‌گیرد. نژاد های BCMV بر اساس روابط سرولوژیک ، خصوصیات ژنتیکی و مطالعات سیتوپاتولوژی، به دو سروتیپ A وB به شرح زیر تقسیم می‌شوند (Vetten *et al*.,1992؛ Femi *et al*.,1988؛ Ha *et al*.,2008.).

جدول ۱-۶ طبقه بندی نژاد های ویروس BCMV. (Mink, *et al*., 1994)

نژادهای BCMV	مولد موزاییک(سروتیپ B)	NL1 ، NL2، NL4، NL6، NL7، US2(NY15) US4، US5(Fla)
	مولد نکروز(سروتیپ A)	NL3، NL5، NL8

استرین های سروتیپ A را که قادرند در ارقام لوبیای دارای ژن غالب مقاومت I ، در هر شرایط دمایی تولید نکروز سیستمیک کنند، نژادهای مولد نکروز مستقل از حرارت نام نهادند که در حال حاضر به جنس ویروس موزائیک معمولی نکروتیک لوبیا (BCMNV) تعلق دارند. نژادهای سروتیپ B مربوط به جنس BCMV هستند، که این‌ها یا در ارقام دارای ژن I قادر به ایجاد نکروز نیستند و یا فقط در درجه حرارت‌های بالای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (بعضی از نژادهای آن) تولید نکروز می‌کنند و نژادهای نکروز وابسته به حرارت نام گرفته‌اند (Mink, *et al*., 1994) .

تفاوت‌های عمده این دو سروتیپ شامل موارد زیر است:

۱- سروتیپ A باعث ایجاد نکروز در گیاهان دارای ژن غالب I در دماهای مختلف می‌شود ولی سروتیپ B فقط در دماهای بالا باعث ایجاد نکروز در این گیاهان می‌شود.

۲- وزن مولکولی CP در سروتیپ A حدود ۳۲ KD ولی در سروتیپ B در حدود ۳۴-۳۵ KD است.

۳- طول طبیعی پیکره‌های سروتیپ A کوتاه تر (۸۱۰-۸۱۸ nm) از ایزوله‌های سروتیپ B است.(۸۴۷-۸۸۶ nm)

۴- مقایسه انتهای ′۳ ژنوم این دو ویروس نشان می‌دهد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در NT ناحیه CP دیده می‌شود در حالی که بخش مرکزی و CT ناحیه CP در هر دو ویروس حفاظت شده است.

۵- تمام جدایه‌های هر دو ویروس در سیتوپلاسم اندامک درون سلولی فرفره‌ای شکل ایجاد می‌کنند. تنها BCMNV یک نوع خاص از شبکه آندوپلاسمی منشعب(proliferated) را ایجاد می‌کند.

McKern و همکارانش در سال ۱۹۹۲ با استفاده از تکنیک HPLC اثبات کردند که سروتیپ های A وB متعلق به دو ویروس جدا از هم هستند (McKern, *et al.*, 1992). همچنین Khan و همکاران با بررسی ترادف نوکلئوتیدی نواحی کد کننده پروتئین پوششی این دو سروتیپ نشان دادند که پروتئین پوششی در این دو از نظر اندازه و ترادف نوکلئوتیدی متفاوت است که این خود نشان دهنده این است که این دو سروتیپ هر کدام متعلق به یک گونه جدا هستند(Khan, *et al.*, 1993).

تفکیک این دو ویروس که بسیار به هم شبیه هستند ، با استفاده از روش‌های مختلفی مانند، ارقام افتراقی ، روش‌های سرولوژیکی ،استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال و روش‌های مولکولی بر اساس تفاوت ژنوم ویروس‌ها امکان پذیر می‌باشد. Vetten با روش‌های SDS-PAGE و Western blot توانست از خصوصیت کوتاه تر بودن طول پیکره های سروتیپ A نسبت به سروتیپ B و تولید دو باند مجزا بر روی کاغذ نیتروسلولز ، دو ویروس را از هم تفکیک کند (Vetten, *et al.*, 1992).

Spence در سال ۱۹۹۳ پراکندگی استرین‌های مختلف ویروس BCMV را در آفریقا بررسی نمود. بر اساس نتایج Spence استرین‌های BCMNV در مناطق مختلف آفریقا ، روی لوبیا و حبوبات وحشی غالب هستند (Spence and Walkey, 1993). با اینکه منشأ *p.vulgaris* از آمریکای لاتین است و ویروس BCMV در آنجا پیدا شده است، ولی وجود BCMNV در آمریکا شایع نیست و بیشتر در مناطق آفریقا شیوع دارد و به نظر می‌رسد که از آنجا منشأ گرفته باشد (Silbernagel, 2001).

۱-۷ ژنوم و بیماری زایی BCMV

بر اساس حضور ژن‌های بیماری زایی نژادهای مختلف ویروس (*P0, P1 , $P1^2$, P2, $P2^2$*) و با توجه به واکنش ارقام مختلف لوبیا ، استرین‌های BCMV و BCMNV به ۷ گروه بیماری زایی و ۱۰ نژاد تقسیم شده‌اند. گروه های بیماری زایی IV ، V و VI هر کدام دارای ۲ نژاد ویروس می‌باشند (Drijfhout, *et al.*, 1978). این گروه‌ها از لحاظ تعداد ژن‌های بیماری زایی با هم تفاوت دارند. گروه های بیماری‌زای I وII وIII تنها دارای یک ژن بیماری زایی هستند که به ترتیب شامل *P0* ، *P1* یا *P2* می‌شود. گروه های IV وV هر کدام دارای دو ژن بیماری زا هستند ، *P1* ، $P1^2$ و *P1* ، *P2* . بیشترین تعداد ژن‌های بیماری زا در گروه های VI و VII وجود دارند. آن‌ها هر دو شامل *P1* و$P1^2$ در ترکیب با *P2* در گروه شش و $P2^2$ در گروه هفت هستند(جدول ۲-۳). تمام نژاد های BCMV که در سال ۱۹۷۸ توسط Drijfhout مورد مطالعه قرار گرفتند . متعلق به

گروه های بیماری‌زای ۵،۴،۲،۱ و۷ بودند و همه استرین‌های BCMNV در گروه های ۳ و ۶ طبقه بندی می‌شدند.

جدول ۱-۷) گروه های بیماری زایی ویروس BCMV ، نژادها و ژن‌های بیماری زایی در هر گروه (Drijfhout, *et al*., 1978)

BCMV Pathogenicity Group	Virus strain	Pathogenicity Genes
I	US1	P0
II	NL7	P1
III	NL8	P2
IV	US5 , NL6	$P1 / P1^2$
V	US2 , NL2	P1 / P2
VI	NL3 , NL5	$P1 / P1^2 /P2$
VII	NL4	$P1 / P1^2 / P2^2$

گروه‌های بیماری‌زایی بر طبق توانایی ایزوله‌های ویروسی برای آلوده کردن سیستمیک دسته ارقام افتراقی لوبیا که دارای ترکیب معین ژن‌های مقاومت غالب و مغلوب هستند تعیین می‌شوند..

۱-۸ علائم بیماری

علائم آلودگی لوبیا به این بیماری با توجه به ارقام مختلف لوبیا، زمان آلودگی و شرایط محیطی بسیار متفاوت است. به طور کلی دو نوع علائم در لوبیا می‌تواند ایجاد شود که بسته به ژنوتیپ گیاه و نژاد ویروس به دو دسته علائم موزاییکی و پوسیدگی ریشه (black root) تقسیم می‌شود (Hall, 1991 ; Morales and Bos, 1988) . نژادهایی که باعث ایجاد علائم نکروز آوندی و خشکیدگی ساقه می‌شوند وابسته و یا حساس به درجه حرارت نیستند و در هر دمایی بر روی بعضی از ارقام مقاوم که دارای ژن غالب مقاومت I باشند، علائم پوسیدگی ریشه و نکروز شدید آوندی را ایجاد می‌کنند که اغلب با مرگ گیاه همراه است (لازم به ذکر است که این نژادها در ارقامی که فاقد ژن I هستند تولید علائم موزاییکی می‌کنند). نژادهایی که فقط علائم موزاییکی را ایجاد می‌کنند وابسته به درجه حرارت هستند، یعنی در درجه حرارت‌های پایین‌تر از $30\ ^\circ C$ بر روی همه ارقام لوبیا تولید علائم موزاییکی و در درجه حرارت‌های بالاتر از آن ، بر روی ارقام دارای ژن I علائم نکروز ایجاد می‌کنند (Drijfhout, *et al*., 1992). در نتیجه وقوع هر یک از این علائم

به نژاد ویروس (نوع ژن بیماری زایی) و رقم گیاه (حضور یا عدم حضور ژن غالب مقاومت I) بستگی دارد. ژنی که در ارقام مقاوم باعث مقاومت گیاه در برابر ویروس و تولید نکروز می‌شود ، ژن غالب مقاومت I است. این ژن تکثیر ویروس را در دماهای رشد نرمال محدود می‌کند و در دماهای بالاتر موجب توسعه علائم پوسیدگی ریشه و نکروز آوندی می‌شود (Drijfhout, 1978; Morales and bos, 1988).

این علائم به صورت زرد-سبز کمرنگ و سبز تیره در برگ‌ها در مرحله سه برگی پدیدار می‌شود. (رگبرگ‌ها اغلب سبز تیره هستند در حالی که مناطق بین رگبرگ‌ها سبز زرد کمرنگ می‌شوند). رنگ پریدگی برگ‌ها اغلب با چروکیدگی، تاولی شدن، بد شکلی و لوله ای شدن و پیچیدن برگ به سوی پایین و داخل برگ همراه است (مراجعه به عکس‌های ۳-۱ ، ۳-۲ و ۳-۳). شدت و قدرت علائم ، به نژاد ویروس، رقم و سن گیاه بستگی دارد. گیاهی که در مراحل اول رشد و سن جوان گیاه آلوده شود ممکن است که از رشد باز بماند و بد شکل شود

(Ravinder *et al*., 1985; Kelly, 1997; Bashir *et al*. 2000).

۱-۸-۲ علائم موزاییک نکروتیک معمولی لوبیا

علائم نکروز تنها زمانی بروز می‌کند که ویروس، گیاهی را که دارای ژن غالب مقاومت I باشد را آلوده کند. این علائم به صورت لکه های قرمز- قهوه ای کوچک بر روی برگ‌های اولیه یا برگ‌های مرحله سه برگی به مدت کوتاهی پس از ورود ویروس به برگ توسط ناقل شته ظاهر می‌شوند. رگبرگ‌های اطراف این لکه‌ها قهوه ای تیره می‌شوند و سپس نکروز رگبرگی از طریق بافت‌های آوندی گیاه انتشار می‌یابد که در ابتدا باعث پژمردگی و سپس مرگ (نکروز) برگ‌های جوان و مریستم می‌شود و سرانجام کل گیاه می‌میرد (مراجعه به عکس ۳-۴). برش‌های عرضی ساقه و غلاف، رگه های قهوه ای تیره در بافت آوندی را نشان می‌دهد. این علائم به black root rot یا پوسیدگی سیاه ریشه موسوم می‌باشند.(مراجعه به عکس ۳-۵) (Saiz, *et al*., 1994; Kelly, 1997).

در ارقامی که فاقد ژن I هستند ، این ویروس علائم موزاییک معمولی را ایجاد می‌کند که مشابه با علائمی هستند که توسط ویروس موزاییک معمولی لوبیا (BCMV) تولید می‌شوند. بنابراین برای افتراق بیولوژیکی این دو ویروس باید واکنش آن‌ها را روی ارقام دارای ژن I مطالعه کرد.

ویروس‌های دیگری نیز می‌توانند در لوبیا علائم نکروزیس ایجاد کنند، بنابراین ظهور این علائم به تنهایی برای تشخیص ویروس موزاییک نکروز معمولی لوبیا کافی نیست و لازم است که آزمون‌های دیگری نیز انجام شود.

۱-۹ ارتباط سرولوژیکی ویروس BCMV با پوتی ویروس‌های دیگر

نژادهای سروتیپ‌های A وB علاوه بر این که از لحاظ سرولوژیکی بسیار به هم نزدیک هستند با ویروس‌های جنس‌های دیگر نیز بسیار شباهت و قرابت دارند. نژاد های سروتیپ A در حال حاضر در گونه دیگری طبقه بندی می‌شوند و تحقیقات انجام شده با به‌کارگیری تکنیک‌های مختلف علاوه بر اثبات این موضوع نشان می‌دهند که نژاد های سروتیپ B با ۱۷ ویروس دیگر از خانواده پوتی ویریده ارتباط سرولوژیکی دارند و با بعضی از آن‌ها در حدی مشابهند که آن‌ها را استرین‌های یک ویروس می‌دانند. ویروس‌های *Azuki bean mosaic Potyvirus* ، *Blackey cowpea mosaic Potyvirus*، *Cowpea aphidborne mosaic Potyvirus* ، *Cowpea vein-banding mosaic Potyvirus*، *Peanut blotch Potyvirus* ، *Peanut stripe Potyvirus* امروزه جزء استرین‌های سروتیپ B ویروس موزاییک معمولی لوبیا طبقه بندی می‌شوند. این دانشمندان بر اساس اطلاعات توالی ژنوم این ویروس‌ها و همچنین خواص سرولوژی و بیولوژیکی این فرضیه را اثبات کرده‌اند و همه آن‌ها را استرین‌های یک ویروس به حساب می‌آورند

(Berger, *et al*., 2005 ; Khan, *et al*., 1993 ; McKern, *et al*., 1992).

۱-۱۰ انتقال ویروس BCMV

۱-۱۰-۱ انتقال بذر

یک ویروس برای اینکه بتواند درون بذر جای بگیرد و توسط آن انتقال پیدا کند باید به طریقی خود را به درون بذر برساند که این فرآیند در ویروس‌های مختلف متفاوت است. انتقال از طریق بذر به توانایی ویروس در حرکت به درون بافت‌های زایشی و قابلیت تکثیر در آن بافت‌ها و نهایتاً تحمل در برابر تغییر شرایط فیزیولوژیکی ناشی از بلوغ بذر بستگی دارد(Albrechtsen, 2006).

BCMV قدرت آلودگی جنین بذر را دارد و بنابراین در گیاهان لوبیای حساس از طریق بذر انتقال پیدا می‌کند و این یک عامل همه گیری اصلی است که در انتشار این ویروس نقش اساسی دارد.

پنج ویروس به عنوان ویروس‌های بذر زاد لوبیا گزارش شده‌اند. لیست ویروس‌های بذر زاد و درصد بذر زادی آن‌ها در جدول ۱-۸ آمده است.

جدول ۱-۸) میزان بذر زادی ویروس‌های آلوده کننده لوبیا در میزبان لوبیا (Morales and Bos, 1988)

ویروس	میزان بذر زادی(٪)
*Bean common mosaic potyvirus (*BCMV)	۰-۸۳
Cucumbe mosaic cucumovirus (CMV)	۰-۷
Southern bean mosaic sobemovirus (SBMV)	۱-۳۰
Tobacco streak ilarvirus (TSV)	۰-۲۷
Tomato aspermy cucumovirus (TAV)	۰-۱۹

از میان ویروس‌های بذر زاد لوبیا ویروس موزاییک معمولی لوبیا به علت درصد بالای بذر زادی از اهمیت بیشتری برخوردار است. انتقال بذری به طور نامنظم و غیر مشخص صورت می‌گیرد و بستگی به سن گیاه در هنگام آلودگی ، رقم گیاه و نژاد ویروس دارد. میزان بذر زادی این ویروس تا ۸۳٪ گزارش شده است (Morales and Bos, 1988). زمان آلوده شدن گیاه مادری در آلوده شدن بذر نقش مهمی دارد. هر چه آلودگی زودتر اتفاق بیفتد باعث آلودگی بذرهای بیشتری می‌شود.

انتقال بذری ویروس‌ها سه پیامد عمده به همراه دارد: