مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره یازدهم، تابستان ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

شناسایی و تشخیص ویروس موزاییک معمولی لوبیا و موزاییک نکروتیک معمولی لوبیا با استفاده از روش Immunocapture RT-PCR

نگیسا سالاری[۱*]،مریم سید موسوی[۲*]، نوح شهر آئین[۳] ، شیرین قربانی [۴]، مژده ملکی[۵]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی ورامین ،
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا- تهران،
[۳] دانشیار، بخش تحقیقات ویروس شناسی گیاهی- مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور- تهران،
[۴] استادیار، گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا- تهران،
[۵] استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی ورامین

چکیده :

سابقه و هدف: در بین عوامل ویروسی متعددی که باعث بروز علایم موزاییک و ایجاد خسارت در گیاه لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.) می شوند، دو ویروس موزاییک معمولی لوبیا BCMV و ویروس موزاییک نکروتیک لوبیا BCMNV اهمیت ویژه ای دارند. به منظور ردیابی این دو ویروس و تعیین برخی خصوصیات سرولوژیک و مولکولی آن ها در یک فصل زراعی نمونه هایی با علایم موزاییک، رگبرگ روشنی، برگشتگی، نکروتیک برگ و ساقه لوبیا جمع آوری گردید.

مواد و روش ها: به منظور ردیابی این دو ویروسی در ابتدا نمونه ها با روش های سرولوژیک DAS-ELISA و لکه گذاری بافتی (Tissue-blot) با آنتی سرم های چند همسانه ای اختصاصی مورد سنجش و ردیابی قرار گرفتند. سپس جهت تأیید و بررسی دقیق تر، نمونه های انتخابی آلوده در الایزا با آزمون IC-RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند

یافته ها: cDNA بدست آمده در دستگاه ترموسایکلر تکثیر گردید. محصول حاصل در ژل آگارز، الکتروفورز شد..باند حاصل به اندازه تقریبی ۳۷۳ جفت باز و ۶۸۳ جفت باز از سکانس منطقه ای ژن پروتئین پوششی ویروس مورد نظر به ترتیب برای ویروس موزاییک معمولی و ویروس موزاییک نکروتیک معمولی لوبیا مشاهده گردید. با بکارگیری تکنیک IC-RT-PCR و بر اساس مقایسه سایز باند های ایجاد شده در این روش، دو ویروس مذکور ازگیاهان لوبیای آلوده مناطق اراک ، نیشابور ، زنجان وکرج شناسایی و تفکیک گردید.

نتیجه گیری: ویروس موزاییک معمولی و موزاییک نکروتیک معمولی لوبیا بطور گسترده ای در اغلب مناطق کشت و کار لوبیا در ایران پراکنده هستند و در بعضی اوقات نیز به طور مشترک و توأما گیاه لوبیا را آلوده می سازند. نشان داده شده که تکنیک IC-RT-PCR برای شناسایی و تشخیص این دو ویروس از حساسیت بالایی نسبت به روش الایزا بر خوردار است. در این تکنیک بکارگیری همزمان و مخلوطی از آنتی سرم اختصاصی ویروس و پرایمر های مربوطه با عث شناسایی و تفکیک همزمان دو ویروس در صورت آلودگی توام خواهد شد .

کلمات کلیدی: BCMV ، BCMNV ، DAS-ELISA ، لکه گذاری بافتی، RT-PCRIC-

مقدمه

یکی از مهم ترین عوامل محدود کننده افزایش تولید حبوبات در نقاط مختلف کشور، عوامل بیمارگر ویروسی می باشند. ویروس موزاییک معمولی لوبیا و ویروس موزاییک معمولی نکروتیک لوبیا و نژادهای وابسته به آن ها از مهم ترین و شایع ترین بیماری های ویروسی لوبیا هستند و تقریبا در تمام مناطق کشت لوبیا وجود دارند. در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۴۲ توسط منوچهری وجود این ویروس از مزارع لوبیا در دماوند گزارش شد. این ویروس از طریق فعالیت حشرات ناقل (شته ها) در سطح مزرعه پراکنده شده و باعث گسترش بیماری خواهد شد. به عنوان مثال خسارت به محصولی مانند لوبیا در اثر BCMV

آدرس نویسنده مسئول : گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی ورامین

Email : yahoo.com@negisa.salari
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۳/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-25]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.2.4]

در ایران و سایر نقاط دنیا بین ۹۰ تا ۱۰۰٪ گزارش شده است. تا سال های اخیر و بر اساس بروز علایم ایجاد شده بر روی برخی از ارقام لوبیا، ویروس موزاییک معمولی لوبیا به دو استرین A,B شناسایی می گردیدکه در نهایت بنابر مطالعات صورت گرفته و بر اساس خصوصیات مولکولی، ویروس موزاییک معمولی نکروتیک لوبیا (و یا استرین- A) تفکیک و به عنوان یک گونه مجزا شناخته شده از جنس Potyvirus معرفی گردید (۲۳). در ایران و بر اساس یک سری مطالعات بیولوژیکی و سرولوژیک بروز و شیوع نژادهای وابسته از برخی از مناطق کاشت توسط تعدادی از محققین گزارش شده است (۶،۵)،(۲)،(۷). نادر پور موفق به شناسایی پاتوتیپ ها و استرین های ویروس BCMV در استان تهران شد (۶،۵). برادران و همکاران به تعیین پراکنش ویروس BCMV در منطقه مشهد و چناران پرداختند (۲). شهرآیین و همکاران نیز با استفاده از روش های سرولوژی و الکترون میکروسکوپی موفق به شناسایی برخی از عوامل بیماری زای لوبیا در مناطق کرج، ساوه، قزوین، همدان، نهاوند، بروجرد، ورامین، شهریار، قم، کاشان، زنجان، اصفهان، خراسان و شهرستان های سواحل دریای خزر شدند (۷). در این مطالعه، علاوه بر بکارگیری روش های سرولوژیکی با استفاده از روش های مولکولی، دو پوتی ویروس مذکور در تعدادی از نمونه های جمع آوری شده و آلوده لوبیا مورد ردیابی و شناسایی قرار گرفتند. راه اندازی و توسعه یک سیستم دقیق ردیابی و شناسایی و آگاهی دقیق از خصوصیات و تنوع این بیمارگر و نژادهای وابسته در یک منطقه در مدیریت کنترل بیماری در جهت کاهش خسارت ضروری به نظر می رسد. بر اساس این آگاهی می توان نسبت به انتخاب و کاشت ارقام مقاوم به ویروس اقدام نمود.

مواد وروش ها

به منظور ردیابی وتشخیص ویروس موزاییک معمولی لوبیا و ویروس نکروتیک معمولی لوبیا، نمونه های انتخابی از مناطق کاشت لوبیا در اراک، نیشابور، محلات، تویسرکان، زرقان، کرج ، زنجان با علایمی از قبیل موزاییک (mosaic)، نکروز (necrosis)، چین خوردگی (Rugosity) و بدشکلی برگ (leaf deformation) جمع آوری شدند. این نمونه ها ابتدا بوسیله آزمون DAS-ELISA[1] با آنتی سرم چند همسانه ای اختصاصی خریداری شده از منابع خارجی (شرکت DSMZ آلمان) برای ردیابی سرولوژیک ویروس های فوق مورد بررسی قرار گرفت. الایزای مستقیم، مطابق روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷).(۱۱) به صورت زیر انجام گرفت(۱۱). جهت پوشش دادن چاهک ها از ایمونوگلوبولین نوع G (IgG) استفاده شد. ابتدا IgG رقیق شد،(بر اساس دستور العمل شرکت سازنده)، برای این منظور از بافر کربنات (Coating Buffer) استفاده شد. پس از تهیه رقت مورد نظر در بافر پوششی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول در داخل هر یک از چاهک های پلیت الایزا ریخته شد. سپس، پلیت یک شب داخل یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد گذاشته یا در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳ الی ۴ ساعت گذاشته شد. سپس چاهک های پلیت با بافر شستشو ۳ بار و هر بار به مدت ۳ دقیقه شستشو شدند. این کار باعث شسته شدن پروتئین های نچسبیده به چاهک ها و معلق شدن آن ها در بافر شد. برای پوشاندن فضاهای خالی هر چاهک که با IgG پوشش داده نشده و برای از بین بردن زمینه زردی را ایجاد شده در پلیت ها، که در پلیت ایجاد شد بعد از مرحله Coating، از بافر blocking که حاوی شیر خشک بدون چربی (Skim milk) و یا آلبومین سرم گاوی (bovine serum albumin) استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از بافر درون هر چاهک ریخته شده و پلیت به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد. در این مرحله دوباره پلیت شستشو داده شد. سپس عصاره گیاهی به چاهک ها اضافه شد. به این منظور ،نمونه برگ را پس از وزن کردن درون کیسه های پلاستیکی قرار داده شد و بافر عصاره گیری سرد به نسبت ۱:۵ (۱ گرم از بافت برگ به ۵ cc بافر) به درون کیسه ها ریخته شد و عصاره گیاه استخراج گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره از درون هر تیوپ کشیده شده و طبق نقشه از قبل تهیه شده پلیت به درون چاهک ها ریخته شد. به غیر از نمونه های مورد بررسی، دو چاهک با عصاره نمونه سالم (شاهد منفی) و دو چاهک با عصاره آلوده (شاهد مثبت) و دو چاهک نیز فقط با بافر عصاره گیری به عنوان Blank (خانه خالی) پر شدند. در پلیت گذاشته شد و به مدت یک شب در یخچال در دمای ۴

1 -Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.2.4]

درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس پلیت، دوباره شستشو داده شد. افزودن آنتی بادی IgG کونژوگه متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (IgG-AP) قبل از استفاده به مقدار توصیه شده در بافر کونژوگه رقیق شده و سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی رقیق شده درون هر چاهک اضافه شد. پس از پر کردن همه چاهک ها، در پلیت گذاشته شد و در انکوباتور به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. پلیت در این مرحله شستشو داده شد. سپس سوبسترا به پلیت اضافه گردید. برای این منظور پودر سوبسترا (phosphate Paranitro-phenyl) با نسبت mg/ ۱ ml درون بافر سوبسترا حل گردید و از آن محلول، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پس از پر کردن چاهک های اطراف با آب مقطر، پلیت در یک محفظه تاریک در دمای اتاق قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان ۲-۱ ساعت، جذب هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA – Reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. برای تعیین حد آلودگی، میانگین جذب نور چاهک های شاهد منفی محاسبه شد. برای انجام این آزمون گیاه توتون به عنوان نمونه سالم یا شاهد منفی به کار گرفته شد. بر اساس این روش جذب هر چاهکی که از ۳ برابر این میانگین بیشتر باشد به عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته می شود. همچنین روش سرولوژیک Tissue blot نیز طبق روش توصیف شده توسط LIN ، انجام گرفت (۱۹). این روش یکی از ساده ترین آزمون های سرولوژیکی جهت شناسایی ویروس های گیاهی می باشد. نحوه انجام کار به شرح زیر است :تقسیم غشاء نیتروسلولز به مربع هایی با ابعاد ۱×۱ سانتی متر (باید از تماس دست با غشاء اجتناب نمود). نمونه های بافت برگی لوله شده و با استفاده از اسکالپل به صورت عرضی بریده و مقطع آن ها برای چند لحظه روی کاغذ نیترو سلولز (درون مربع ها) قرار داده شد تا اثر بافت در محل باقی بماند. (برای برش هر نمونه باید اسکالپل با الکل و شعله استریل گردد) در تعدادی از خانه ها نمونه های مثبت و منفی قرار داده شدند. غشاء در ۱۰ میلی لیتر بافر PBS-T به مدت ۵ دقیقه و برای ۳ بار شستشو داده شد، زیرا این غشاء بسیار به پروتئین حساس است و باید عاری از پروتئین های اضافی و غیرضروری گردد. سپس غشاء در بافر Blocking به مدت ۶۰ دقیقه به منظور از بین بردن زمینه زردی در غشا قرار داده. تکرار شستشوی غشاء در این مرحله ضروری است. سپس حل کردن آنتی سرم مربوطه در ۱۵ میلی لیتر ۱x PBS به نسبت ۱:۵۰۰ و قرار دادن غشاء به مدت یک ساعت در آن صورت گرفت. تکرار مرحله شستشو صورت پذیرفت. حل کردن IgG-AP در ۱۵ میلی لیتر بافر کونژوگه نسبت ۱:۲۰۰۰ و قرار دادن غشاء در آن به مدت ۱ ساعت انجام شد و به دنبال آن انجام گرفت. سپس تکرار مرحله شستشو. افزودن ۵ میلی لیتر از محلول ماده زمینه NBT/BCIP [1] بر روی غشاء افزوده شد و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه.پس از ظهور رنگ بنفش، غشاء جهت توقف واکنش، درون آب مقطر قرار داده شد و سپس با استفاده از کاغذ صافی خشک گردید و زیر میکروسکوپ بیناکولر مشاهده شد. در زیر میکروسکوپ نمونه های آلوده به رنگ ارغوانی و نمونه های غیرآلوده به رنگ سبز دیده شدند. به منظور انجام واکنش IC-RT-PCR [2] ابتدا آنتی سرم اختصاصی ویروس های مورد نظر در بافر پوششی به نسبت ۱:۲۵۰ رقیق و در لوله های ۰/۵ میلی لیتری ریخته شد. این لوله ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. سپس محتویات لوله ها تخلیه و لوله ها با بافر (PBS-T) شستشو داده شدند. در مرحله بعد، برگ گیاهان آلوده با استفاده از بافر عصاره گیری به نسبت ۱:۱۰ (وزنی به حجمی) عصاره گیری شدند و ۲۰۰ میکرولیتر از این عصاره ها به لوله ها اضافه گردید. لوله ها به مدت یک شب در یخچال نگهداری شدند. سپس مطابق مرحله قبل شسته و خشک شدند. پس از این مرحله مواد لازم برای ساخت cDNA به آن ها اضافه شد. به منظور واکنش RT-PCR ، RNA ویروسی با استفاده از کیت AccuZol™ (محصول شرکت Bioneer) و بر اساس پروتکل شرکت استخراج شد. روش کار به صورت زیر است: ابتدا بافت را وزن کرده و در هاون تحت تاثیر نیتروژن مایع قرار داده تا کاملا بافت خرد شود. به ازای هر ۱۰ تا ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی، ۱ میلی لیتر AccuZol™ اضافه شد. سپس نمونه کاملا با این محلول مخلوط شده تا اینکه هموژنیزه شوند. به ازای هر یک میلی لیتر از AccuZol™، ۴۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه گردید. سانتریفیوژ در دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در

1 - Nitro blue terazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

2 - Immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.2.4]

دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. در طی انجام سانتریفیوژ، ۲ فاز شکل گرفت. مایع رویی به رنگ سبز و دیگری فاز محلول بی رنگ که RNA در این فاز قرار می گیرد. فاز محلول به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری جدیدی وارد شد و هم حجم محلول، ایزوپروپانول اضافه گردید. مخلوط در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد سانتریفیوژ در دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. رسوب ایجاد شده همان اسید نوکلئیک است که باید از مایع رویی جدا شود. ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ به منظور خالص سازی RNA اضافه گردید. سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس محلول رویی جدا گردید. پس از خشک شدن رسوب، ۳۰-۲۰ میکرولیتر آب فاقد RNase اضافه شد. سپس از RNA استخراج شده به میزان ۷ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر oligo dt (۲۰ pmol)، و ۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر را با هم مخلوط کرده و به مدت ۱۵ min در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده و بعد از آن به محلول فوق ۱ میکرولیتر آنزیم Mmulv به همراه ۴ میکرولیتر بافر مربوط به آنزیم (شرکت Fermantase و Roche آلمان)، ۱ میکرولیتر dNTp mix و۰/۵ میکرولیتر RNase inhibitor اضافه شد. سپس طبق برنامه دمایی ترموسایکل در دما های ۲۵°c ۱۰min , ۴۲°c ۶۰ min, ۷۰°c ۱۰ min قرار داده تا CDNA سنتز شود. (۸). به منظور واکنش زنجیره ای PCR دو جفت پرایمر اختصاصی برای منطقه ای از ژن پروتئین پوششی به کار گرفته شد. این پرایمرها در سال ۱۳۸۸ در پایان نامه دوره کارشناسی ارشد و با سفارش به شرکت Fermentas طراحی شدند.(۱). توالی پرایمرها در جداول ۱و۲ ارائه شده است.

جدول۱- ترادف و موقعیت آغازگر BCMV

نام پرایمر	محل پرایمر	توالی پرایمر
BspQ(Upstream)	8918-8938	5′GAGATCTGTGCATCCTAGCAAGTC 3′
B353(Downstream)	9272-9291	5′CCTTCACAGCATTGTACCAC 3′

جدول ۲ - ترادف و موقعیت آغازگرBCMNV

نام پرایمر	محل پرایمر	توالی پرایمر
AspQ(Upstream)	8582-8801	5′ GAATCCGTGTCAACACAA TC 3′
Asp3(Downstream)	9246-9285	5′CGAATGCATAGCGAGCCAAG 3′

یافته ها

نتایج آزمون ELISA برای دو ویروس BCMV وBCMNV در جدول ۳ و۴ ارائه داده شده است.

جدول ۳ - نتایج آزمون ELISA برای BCMV

مناطق نمونه برداری	زنجان	نیشابور	تویسرکان	خمین	کرج	آستانه	
کد آنتی بادی IgG) (0159	+	+	-	-	+	-	-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.2.4]

جدول ۴- نتایج آزمون ELISA برای BCMNV

مناطق نمونه برداری	اراک	لاهیجان	گلپایگان- حسن آباد	کرج	اقلید	خمین	محلات
کد آنتی بادی IgG) (0239	+	+	-	-	+	-	-

نتایج آزمون blot Tissue برای دو ویروس BCMV وBCMNV در جداول ۵ و۶ ارائه شده است.

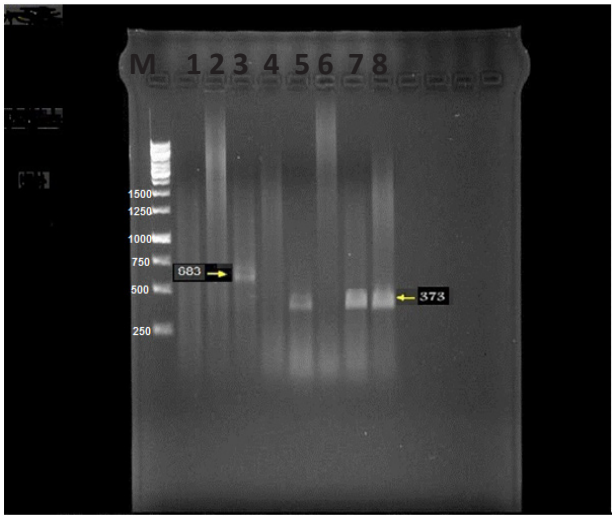
جدول ۵- نتایج آزمون Tissue blot برای ویروس BCMV

مناطق نمونه برداری	زرقان	لرستان	نیشابور	شاهرود	محلات	خمین
آنتی سرم NL8	+	-	+	-	-	-

جدول ۶- نتایج آزمون Tissue blot برای ویروس BCMNV

مناطق نمونه برداری	اراک	لرستان	نیشابور	آستانه	چیتی گیلان	ترکیه
Necrotic Strain Antisera	+	–	+	+	–	–

پس از انجام تست های سرولوژیک ELISA و Tissue blot، برخی از نمونه های مثبت به طور انتخابی برای انجام آزمون IC-RT-PCR انتخاب شدند. در آزمون PCR با استفاده از جفت پرایمرهای آغازگر اختصاصی مربوط به ناحیه ای از ژن پروتئین پوششی نشان داد که نمونه ی اراک آلوده بهBCMNV (شکل۱، lane-۳) بودند که باندی معادل ۶۸۳ bp را نشان دادند. و نمونه کرج، نیشابور و زنجان آلوده به BCMV (۸و۷و۵-lane) باندی معادل ۳۷۳ bp را نشان دادند. برای سایر نمونه های تست شده باندی مشاهده نشد.



شکل ۱- lanes نمایانگر قطعه ترکیبی ۶۸۳ bp و ۳۷۳ bp حاصل از الکتروفورز محصول PCR . به ترتیب M- مارکر مولکولی۲۵۰ (bp شرکت فرمانتس لیتوانی)،۳ نمونه مثبت اراک برای BCMNV، ردیف ها ۵ و۷ و ۸ به ترتیب نمونه های مثبت زنجان، نیشابور، کرج برای BCMV، ۱ نمونه لاهیجان، ۲ نمونه آستانه، ۴ نمونه اقلید با پرایمر BCMNV تست شد که منفی بودند. نمونه ۶ زرقان، که با پرایمر BCMV تست شد و منفی بود.

بحث

روش IC-RT-PCR برای تشخیص ویروس در نمونه های گیاهی آلوده، حساستر از روش ELISA می باشد. این روش، دارای پتانسیل جهت تشخیص طیف وسیعی از ویروس های گیاهی می باشد و همچنین در تکثیر توالی ژنومی خاص در مطالعات بیولوژیک مولکولی بکار برده می شود. IC-RT-PCR قادر به شناسایی کمتر از pg ۰/۱ ویروس در بافت گیاهی لوبیای آلوده به BCMV و BCMNV می باشد، که نشان دهنده حساسیت بالای این روش است. آنتی سرم مورد استفاده در این روش در آن واحد می تواند هر دو سروتیپ A: BCMNV وB:BCMV را به دام بیندازد در حالی که جفت پرایمرها برای هر یک از سروتیپ ها اختصاصی هستند. تشخیص آنتی ژن یکی از سروتیپ ها با استفاده از روش ELISA در نمونه هایی که IC-RT-PCR هر دو سروتیپ را تشخیص داده است نشان می دهد که ممکن است Transcapsidation رخ داده باشد در Transcapsidation که genomic masking هم نامیده شد، کپسید پروتئینی یک ویروس کمکی است(۱۶). در این نوع آلودگی همکاری کپسید پروتئینی از یک ویروس با ذرات نوکلئیک اسید از ویروس دیگر نیز گزارش شده است (۱۷). IC-RT-PCR برای تشخیص ترکیبی از ویروس ها، از ELISA حساس تر است. وقتی که دو ویروس وابسته و نزدیک به هم به صورت ترکیب در می آیند، ذرات پروتئین پوششی در طی گرایش می توانند ترکیب شوند که نتیجه اش اختلاط فنوتیپی است. در اختلاط فنوتیپی زیر واحد های کپسید پروتئینی برای هر دو ویروس می باشد (۱۴). Transcapsidation و اختلاط فنوتیپی ممکن است از لحاظ اپیدمیولوژیک دارای اهمیت باشد و همچنین ممکن است بر روی علائم، مطالعات دامنه میزبانی و اختصاصیت ناقل نیز تاثیر داشته باشد (۱۶،۱۰). IC-RT-PCR

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-25]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.2.4]

و ELISA نتایج مختلفی را جهت تشخیص ویروس از نمونه های گیاهی مشابه آشکار می سازد که نشان دهنده احتمال حضور قطعات هیبرید است. این یافته نشان می دهد که اگر فقط یک روش در شناسایی BCMV و BCMNV در نمونه های آلوده به کار برده شود ممکن است اطلاعات ناقصی بدست بیاید. اگر گیاهی دارای علائم موزائیک، کلروز و نکروز حلقوی بود اما در انجام تست های آزمایشگاهی آلودگی نشان نداد ممکن است که مقاومت میزبان نسبت به ویروس اتفاق افتاده باشد یا علائم توسط ویروس دیگری از خانواده Potyvirus رخ داده باشد. ممکن است که جواب ELISA مثبت باشد ولی نتیجه IC-RT-PCR منفی بشود. که این یا به علت این است که ویروس موفق به چسبیدن به دیواره میکروتیوپ نشده است و یا ویروس به دام افتاده اما ذرات نوکلئوتیدی آن به طور مناسبی در معرض قرار نگرفته اند که در نتیجه باعث شد cDNA به میزان کمی ساخته شود و یا اصلا ساخته نشود. همچنین پراکندگی اتفاقی ویروس در گیاهان آلوده ممکن است باعث افزایش شانس شکست و یا شناسایی ویروس در هر دو تکنیک شود.(۲۰). بسیاری از بافت های گیاهی بازدارنده های PCR هستند که ممکن است مانعی برای شناسایی ویروس باشد. بخصوص وقتی بافت بطور مستقیم و بدون خالص سازی DNA مورد آزمایش قرار بگیرد (۱۵). نتایج مثبت کاذب بوسیله IC-RT-PCR و ELISA ممکن نتیجه آلودگی بافت گیاهی، محیط کار و یا وسایل مورد استفاده باشد. در حال حاضر یکی از محدودیت های اصلی استفاده از IC-RT-PCR برای تشخیص روتین BCMV و BCMNV هزینه وسایل و تجهیزات مورد نیاز و همچنینی نیاز به متخصص برای انجام این روش نسبت به سایر روش ها می باشد. اگر بر این محدودیت ها غلبه شود این روش می تواند حساسیت، اختصاصیت، راحتی و سرعت تشخیص را افزایش دهد. به این ترتیب روش IC-RT-PCR نسبت به روش RT-PCR آسان تر و کم هزینه تر و دقیق تر است. در روش معمولی RT-PCR ابتدا بایستی RNA ویروس جداسازی شود و چون RNA پایداری کمتری نسبت به DNA دارد به راحتی توسط RNase از بین می رود. اگر نتیجه ELISA مثبت باشد ولی IC-RT-PCR منفی شود نتیجه این است که پوتی ویروس دیگری غیر از BCMV و BCMNV از جمله :

Peanut stripe virus و Blackey cowpea mosaic virus و Soybean mosaic virus و azuki bean mosaic virus. حضور دارند این ویروس ها وابسته و نزدیک به BCMV و BCMNV هستند که با هم گروه بندی می شوند ولی ممکن است که تفاوت در سطح نوکلئیک اسید در آن ها مانع از اتصال پرایمر شود.(۲۱). ترکیب اختصاصیت ایجاد شده به وسیله آنتی بادی با اختصاصیت بدست آمده از پرایمر های PCR ، روش IC-RT-PCR را تقویت می کند. این روش دارای پتانسیل و کاربرد وسیعی در تشخیص دیگر ویروس ها می باشد وقتی که آنتی بادی و پرایمر اختصاصی در دسترس باشد. از این روش برای تشخیص ویروس BCMV در رقم لوبیای Lablab (*Lablab purpureus* L. Sweet) در هندوستان استفاده شده است. (۲۲). در ایران تا به حال این روش برای شناسایی ویروس های BCMV و BCMNV گزارش نشده است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان صمیمانه از راهنمایی های ارزنده استاد محترم، سرکار خانم دکتر سارا غروی کمال قدردانی را به جا می آورند. همچنین این مقاله بخشی از یک طرح تحقیقاتی مصوب در بخش تحقیقات ویروس شناسی گیاهی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور می باشد که به این وسیله از همکاری آن ها تشکر و قدردانی به عمل می آید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.2.4]

منابع

(۱) اصغری قرا س، شهرآیین ن. ۱۳۸۸، گزارش ویروس BCMV و BCMNV از روی لوبیا در استان مازندران . دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهرا.

(۲) برادران غ، جعفرپور ب، بررسی وجود ویروسهای موزائیک معمولی لوبیا و موزائیک خیار در مزارع لوبیا در منطقه مشهد و چناران. سیزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران–کرج، ۱-۵ شهریورماه ۱۳۷۷؛ ۱۶۳-۱۵۷.

(۳) نجفی غ. نژاد ویروس موزایک معمولی لوبیا در ایران و مطالعاتی در باره آن. مجله بیماری های گیاهی. ۱۳۴۸؛ شماره ۴: ۱۳۴-۱۲۴.

(۴) واتر ک، دانش د، اخوت م، مصاحبی غ ح. بررسی بیماریهای بقولات در ایران. مجله بیماری های گیاهی. ۱۳۴۶؛ شماره ۳: ۱۱۶-۱۰۱.

(۵) نـادر پور م، مصاحبی غ ح، محمدی م، کـوهـی م، پاتونیپ های Vta، Vib و III و نژادهای نکروتیک NL-۳ ، NL-۵، NL-۸ و ویروس (BCMNV) گزارش جدید برای ایران. کنگره گیاه پزشکی ایران- اصفهان، شهریور۱۳۷۹؛ ۲۸۳ -۲۸۰.

(۶) نادرپور م، مصاحبی غ ح، محمدی م، کوهی م، تشخیص نوع سروتیپ ویروس (BCMV) با استفاده از روشهای فیزیکوشیمیائی . کنگره گیاه پزشکی ایران-اصفهان، شهریور ۱۳۷۹؛ ۲۸۷-۲۸۴.

(۷) شهرآیین ن، حسنی مهربان ا، مستعد م، قطبی ت ، گزارش وقوع ویروس موزائیک معمولی نکروتیک لوبیا (BCMNV) در مزارع لوبیا چیتی استان های اراک و لرستان. کنگره گیاه پزشکی ایران-کرمانشاه، شهریور ۱۳۸۱؛ ۲۸۷-۲۸۲.

(8) Abdalla R. 1995, AnImmunocapture/Reverse Transcription/Polymerase Chain Reaction Technique for Detection and Molecular Characterization of *Bean Common Mosaic Virus* in Mixed Infections,Thesis of Doctor of Philosophy. Department of Plant Pathology Washington State University.

(9) Bashir A, Ahmad Z, Murata N. Seed-Borne Viruses , Detection, Identification and Control, Pakistan, Printed by Agha Jee Printer, 2000; 156 PP.

(10) Bourdin D, Lecog H. Evidence That Heteroencapsidation between Two Potyviruses is Involved in Aphid Transmission of a Non-Aphid-Transmissible Isolate from Mixed Infections. J Phytopathology, 1991; 81: 1459-1464.

(11) Clark M F, Adams A.N.Charateristies of The Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for The Detection of Plant Viruses. J Gen Virol, 1977; 34:475-483.

(12) Fang G W, Allison R.F, Zambolin E.M, Maxwell R.L, Gilbertson R.L. The Complete Nucleotide Sequence and Genome Organization of *Bean Common Mosaic Virus*(NL3 strain). Adv Virus Res, 1995; 39:13-23.

(13) Femi Lana I, Lohuis H, Bos L, Dijkstra J. Relationships Among Strain of *Bean Common Mosaic Virus* and Blackeye*Cowpea Mosaic Virus*-Members of The Potyvirus Group. Ann ApplBiol, 1988; 113:493-505.

(14) Ha C, Revill P, Harding R.M, VU M, Dale J L. Identification and Sequence Analysis of Potyviruses Infecting Crops in Vietnam. Arch Virol, 2008; 153:45-60.

(15) Henson J M, French R. The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease Diagnosis.Annu Rev Phytopathol, 1993; 31:81 -109.

(16) Hu J S ,Rochow W F , Palukaitis P, Dietert R. Phenotypic Mixing: Mechanism of Dependent Transmission for Two Related Isolates of Barly Yellow Dwarf Virus. J Phytopathology, 1988; 78: 1326-1330.

(17) Kassanis B. The Transmission of Potato Aucuba Mosaic Virus by Aphids from Plants also Infected by Potato Virus A or Y. J Virol, 1961; 13: 93-97.

(18) Levy L, Lee I M, Hadidi A. Simple and Rapid Preparation of Infected Plant Tissue Extracts for PCR Amplification

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.2.4]

of Virus, Viroid and MLO Nucleic Acids. J Virol Meth, 1994; 49:295-304.

(19) LIN N S, HSU Y H, HSU H T. Immunological Detection of Plant Viruses and a Mycoplasma-Like Organism by Direct Tissue Blotting on Nitrocellulose Membranes. J Phytopathology, 1990; 80: 824-827.

(20) Matthews R E F. Plant Virology, Third Edition, Academic Press , Inc, 1991, 835pp.

(21) Shukla D D, Ward C.W, Brunt A A, ThePotyviridae, CAB International, 1994, 516pp.

(22)Udayashankar A C , Chandra Nayaka S, Niranjana S. R. First Report of *Bean Common Mosaic Virus* Infecting *Lablab Purpureus* in India. J Plant Disease, 2011; 95: 881-892

(23) Vetten H J, Lesemann D E, Maiss E. Serotype A and B Strain of Bean Common Mosaic Virus Are Two Distinct Potyvirus. Arch Virol, 1992; Suppl 5: 415-431.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-25]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.2.4]