"مجله علوم زراعی ایران"
جلد پانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲

ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) به بیماری ویروس موزائیک نکروز لوبیا (BCMNV) در شرایط گلخانه‌ای

Evaluation of reaction of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes to bean common mosaic necrosis virus (BCMNV) disease in greenhouse conditions

معصومه فرزانفر[۱]، محمد رضا بی همتا[۲]، مینا کوهی حبیبی[۳]، حمید رضا درّی[۴] و مصطفی صالحی فر[۵]

چکیده

فرزانفر، م.، م. ر. بی همتا، م. کوهی حبیبی، ح. ر. درّی و م. صالحی فر. ۱۳۹۲. ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) به بیماری ویروس موزائیک نکروز لوبیا (BCMNV) در شرایط گلخانه‌ای. **مجله علوم زراعی ایران. ۱۵(۱): ۴۵- ۳۵.**

این تحقیق به منظور تعیین واکنش ژنوتیپ‌های لوبیا نسبت به بیماری ویروس موزائیک نکروز لوبیا (BCMNV) انجام شد. بیست و پنج ژنوتیپ لوبیا تهیه شده از ایستگاه ملی تحقیقات لوبیای خمین در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در گلخانه ویروس‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران در سال ۱۳۸۸ کشت و در مرحله دو برگی توسط این ویروس آلوده سازی شدند. ارزیابی گیاهان پس از ۲۱ روز با آزمون DAS-ELISA و IC-RT-PCR و بصورت مشاهده‌ای انجام شد. صفات اندازه گیری شده در این تحقیق شامل میزان آلودگی برگ (آلودگی واقعی)، موزائیکی شدن برگ، نکروز سیستمیک، رگبرگ نواری، لکه‌های کلروتیک و بدشکلی برگ بودند. صفات کیفی (بجز میزان آلودگی برگ) بصورت مشاهده‌ای و با استفاده از روش رتبه بندی (Visual symptoms) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های لوبیا از نظر میزان آلودگی برگ و علائمی از قبیل موزائیکی شدن برگ، نکروز سیستمیک و بدشکلی برگ، تفاوت معنی‌داری داشتند. ژنوتیپ‌های Ks-21189، صدری و درخشان بعنوان حساس‌ترین و ژنوتیپ‌های COS16، گلی و پاک نیز بعنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها شناسایی شدند. نکروز سیستمیک که از مهم‌ترین علائم این ویروس است، همبستگی مثبت و معنی‌داری با میزان آلودگی برگ ($r=۰/۶۳۸^{**}$) نشان داد. نتایج تجزیه کلاستر نیز نشان داد که ژنوتیپ‌های Ks-21189 و COS16 به ترتیب بعنوان حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ژنوتیپ، در دو گروه مجزا قرارگرفتند. نتایج آزمون کای اسکوئر نیز نشان داد که مقاومت ژنوتیپ‌های سفید نسبت به چیتی و قرمز بیشتر بود. نتایج آزمون IC-RT-PCR نیز حضور ویروس BCMNV را در ژنوتیپ Ks-21189 نشان داد.

واژه‌های کلیدی: BCMNV، ELISA، IC-RT-PCR ، مقاومت، لوبیا و ویروس.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۳ این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. عضو انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران (مکاتبه کننده)
(پست الکترونیک: agri2000@yhaoo.com)
۲- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳- استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
٤- عضو هیأت علمی ایستگاه تحقیقات لوبیای خمین
۵- دانشجوی دکتری زراعت دانشگاه گیلان

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

مقدمه

حبوبات پس از غلات، مهم‌ترین منبع غذایی بشر را تشکیل داده و لوبیا از مهم‌ترین حبوبات جهان محسوب می‌شود. لوبیا یکی از منابع مهم پروتئین و تولید انرژی برای انسان می‌باشد. انواع لوبیا حاوی ۲۰ تا ۲۵ درصد پروتئین هستند که می‌توانند جایگزین مناسبی برای پروتئین حیوانی باشد. لوبیا میزبان طبیعی تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی می‌باشد که در بین آن‌ها پوتی ویروس‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. پوتی ویروس‌ها دارای پیکره رشته‌ای، انعطاف پذیر، فاقد پوشش به طول ۹۰۰ – ۶۸۰ نانومتر و عرض ۱۵ – ۱۱ نانومتر هستند. ضریب رسوب گذاری آن‌ها ۱۵۰S و وزن مولکولی ژنوم آنها ۳×۱۰^{۶} دالتون است. این ویروس‌ها در سیتوپلاسم سلول میزبان، اندامک‌های ویژه درون سلولی فرفره مانند یا طومار مانند تولید می‌کنند که از ویژگی‌های مهم تاکسونومیکی آنها است (Revers *et al*., 1999).

نتایج آزمایش‌های انجام گرفته در ایران نشان داده است که ویروس موزائیک معمولی لوبیا (BCMV) و ویروس موزائیک معمولی نکروز لوبیا (BCMNV) از نظر میزان خسارات وارده، مهم‌ترین ویروس‌های خسارت زا در لوبیا هستند. میزان کاهش محصول در اثر آلودگی با این ویروس‌ها در سال‌های اخیر بیشتر از ۸۰ درصد گزارش شده است (Peyambari *et al.,* 2011). بیماری BCMV ابتدا در سال ۱۹۱۷ توسط استوارت و ردیک (Stewart and Reddick, 1917) از آمریکا روی لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) گزارش گردید. این ویروس پراکنش جهانی دارد (Klein *et al*., 1988; Omunyin *et al*., 1995; Saiz *et al*., 1995) و خسارات اقتصادی سنگینی از طریق کاهش عملکرد (بیش از ۸۰ درصد) و کاهش کیفیت محصول ایجاد می‌نماید (Drijfhout, 1991).

BCMV در گذشته شامل دو سروتیپ A و B بوده است که امروزه این دو به عنوان ویروس‌های مجزا شناخته می‌شوند (McKern *et al*., 1992a). مک کرن و همکاران (McKern *et al*., 1992 a, b) با استفاده از روش HPLC اثبات کردند که این دو سروتیپ دو ویروس جدا از هم هستند. ترادف نوکلئوتیدی نواحی کد کننده CP (Coat Protein) این دو سروتیپ نیز نشان داد که CP در این دو از نظر اندازه و ترادف نوکلئوتیدی متفاوت است. این موضوع تایید می‌کند که سروتیپ‌های A و B هر کدام متعلق به یک گونه جدا هستند (Khan *et al*., 1993). در بیماری BCMV، سروتیپ A به عنوان ویروس موزائیک معمولی نکروز لوبیا Bean common mosaic necrosis virus (BCMNV) شناخته می‌شود. BCMV معمولاً روی ارقام لوبیا ایجاد علائم موزائیکی می‌نماید. در حالیکه جدایه‌های BCMNV روی ژنوتیپ‌هایی از لوبیا که ژن مقاومت غالب *I* را دارند در دماهای بالا و پایین ایجاد نکروز سیستمیک کشنده می‌کنند (Silbernagel *et al*., 2001). تمام سویه‌های شناخته شده BCMV و BCMNV در ژنوتیپ‌هایی از لوبیا که فاقد ژن‌های مقاومت هستند، علائم مشابهی ایجاد می‌نمایند. علائم ویروس روی ارقام لوبیا شدید است و به صورت لکه‌های موزائیکی سبز تیره و روشن، پیچیدگی برگ، بد شکلی برگ‌ها و غلاف‌ها، چین خوردگی برگ‌های پایینی و یا لکه‌های زرد است. در اغلب موارد کاهش رشد نیز دیده می‌شود. در برخی از ارقام نکروز رگبرگی شدید رخ می‌دهد و ممکن است گیاهان آلوده بمیرند، این پدیده به عنوان سیاهی ریشه (Black- root) شناخته می‌شود. نوع علایم ایجاد شده به تعامل بین ژن‌های مقاومت میزبان و ژن‌های بیماری‌زایی ویروس بستگی دارد (Drijfhout, 1991).

تا کنون منابع متعددی برای مقاومت به BCMV شناخته شده است. در اوایل دهه ۱۹۳۰ ژنوتیپ لوبیای سفید Corbbitt refoji به عنوان ژنوتیپ مقاوم که حاوی ژن *I* بود، شناسایی شد. گوپتا و چاولا (Gupta and Chawla, 1990) از میان ۶۸ ژنوتیپ

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

لوبیای مورد آزمایش، ۱۱ ژنوتیپ بسیار مقاوم و ۴ ژنوتیپ مقاوم را شناسایی کردند. دانجو و همکاران (Dhanju *et al*., 1995) با ارزیابی ۴۴ ژنوتیپ، ۲ ژنوتیپ بسیار مقاوم و ۴ ژنوتیپ مقاوم را در شرایط گلخانه و مزرعه شناسایی کردند. رامانجولو و همکاران (Ramanjulu *et al*., 2004)، ۷۰ ژنوتیپ و لاین لوبیای معمولی را در شرایط گلخانه و مزرعه بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد که ۱۴ ژنوتیپ در هر دو شرایط آلودگی نداشته و به‌عنوان ارقام و لاین‌های مقاوم معرفی شدند. هر دو ویروس BCMV و BCMNV ممکن است در یک ناحیه و یا حتی در یک گیاه مشاهده شود. بنابراین امکان نوترکیبی بین آن‌ها وجود دارد که این موضوع می‌تواند منجر به ایجاد نژادها یا حتی پاتوتیپ‌های جدید شود (Vallejoes *et al*., 2006).

با توجه به اینکه ویروس‌ها یکی از عوامل عمده کاهش عملکرد در لوبیا هستند، این موضوع برای به نژادگران بسیار با اهمیت است که با بکارگیری هر روش اصلاحی و ابزارهای موجود، مقاومت به BCMV و BCMNV را بهبود دهند، عملکرد وکیفیت لوبیا نیز افزایش یابد (Mavaric and Susta, 2004). نظر به اهمیت دستیابی به ارقام مقاوم یا متحمل که آسیب پذیری کمتری داشته و میزان کاهش محصول در آن‌ها کمتر باشد، این تحقیق با هدف بررسی واکنش مقاومت یا تحمل ارقام لوبیا نسبت به ویروس موزائیک نکروز لوبیا (BCMNV) انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش بذور ۲۵ ژنوتیپ اصلاحی لوبیا از ایستگاه ملی تحقیقات لوبیای خمین تهیه شد (جدول ۱). ژنوتیپ‌های لوبیا (۹ ژنوتیپ لوبیا چیتی، ۸ ژنوتیپ لوبیا قرمز و ۸ ژنوتیپ لوبیا سفید) به منظور تعیین حساسیت و مقاومت به ویروس BCMNV، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و با سه تکرار در گلدان‌های پلاستیکی در سال ۱۳۸۸ در محل گلخانه ویروس شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران کشت شدند.

به منظور تهیه منبع ویروس از مزارع لوبیای مناطق مختلف شهرستان کرج نمونه برداری صورت گرفت. نمونه‌ها بر اساس علائم ذکر شده در منابع شامل موزائیک شدید و خفیف، قاشقی شدن برگ‌ها، رگبرگ نواری، پیچیدگی برگ و نکروز رگبرگ انتخاب شدند. اسامی ژنوتیپ‌ها و کدهای مورد استفاده در ایستگاه ملی تحقیقات لوبیای خمین در جدول یک ارائه شده است.

نمونه‌های گیاهی دارای علائم مذکور در آزمایشگاه با استفاده از آنتی سرم چند همسانه‌ای BCMNV (DSMZ, Germany) در آزمون ELISA مورد بررسی قرار گرفتند (Koening, 1981; Clark and Adams., 1977). به منظور خالص‌سازی بیولوژیک و تکثیر ویروس، نمونه‌های آلوده به BCMNV روی گیاهان محک (ژنوتیپ *Bountiful*) مایه‌زنی و تکثیر شدند. بذور ژنوتیپ‌های لوبیا در گلدان‌های پلاستیکی کوچک (در هر گلدان ۴ بذر) و در خاکی شامل ماسه، خاک رس، کود دامی پوسیده و پرلیت کشت شدند. مایه زنی در مرحله دو برگی (تقریباً ۱۰ روز پس از کاشت) صورت گرفت. نمونه‌های آلوده در ۱۰ حجم بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=7) درون کیسه‌های نایلونی عصاره‌گیری شدند. عصاره گیاه آلوده به ویروس به آرامی روی برگ‌هایی که پودر کاربراندوم ۳۰۰ مش بر روی آن‌ها پاشیده شده بود، مایه زنی شد. این عمل تنها یکبار و در یک جهت انجام گرفت تا بافت برگ صدمه نبیند. پس از چند دقیقه به سطح برگ‌های مایه زنی شده، آب پاشیده شد و مشخصات نمونه مایه زنی شد. پنج بوته از هر ژنوتیپ لوبیا نیز به عنوان شاهد منفی با استفاده از بافر مذکور مایه زنی شدند. گیاهان پس از مایه‌زنی به اتاقک‌های رشد انتقال داده شدند. گیاهان در اتاقک رشد در نور

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های لوبیا مورد استفاده در آزمایش

Table1. Common bean genotypes used in the experiment

Genotype No. شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ Genotype name	کد ژنوتیپ Genotype code	Genotype No. شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ Genotype name	کد ژنوتیپ Genotype code	Genotype No. شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ Genotype name	کد ژنوتیپ Genotype code	Genotype No. شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ Genotype name	کد ژنوتیپ Genotype code	Genotype No. شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ Genotype name	کد ژنوتیپ Genotype code
1	-	Ks21489	6	Sadri	Ks21481	11	Goli	Ks31167	16	Naz	Ks31165	21	Daneshkadeh	-
2	-	Ks21154	7	Cardinal	Ks21469	12	Sayad	Ks31166	17	AND1007	Ks31163	22	Dehghan	-
3	-	Ks21191	8	Cos16	Ks21478	13	Derakhshan	Ks31168	18	-	Ks41101	23	Dorsa	Ks41105
4	-	Ks21189	9	Taylor	Ks21488	14	D81083	Ks31164	19	-	Ks41102	24	-	Ks41107
5	G01437	Ks21485	10	Akhtar	Ks31170	15	-	Ks31169	20	Shokofa	Ks41134	25	Pak	Ks41128

جدول۲- ضرایب همبستگی اسپیرمن بین صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های لوبیا

Table 2. Spearman´s correlation coefficients between common bean genotypes for the measured traits

صفات گیاهی Plant characteristics		الایزا ELISA	موزائیکی Mosaic	نکروز سیستمیک Necrosis	رگبرگ نواری Strip vein	لکه های کلروتیک Colorotic spot	بد شکلی برگ Leaf shape
ELISA	الایزا	1					
Mosaic	موزائیکی	0.476*	1				
Necrosis	نکروز سیستمیک	0.638**	0.336	1			
Strip vein	رگبرگ نواری	0.041	-0.183	0.122	1		
Colorotic spot	لکه های کلروتیک	0.263	-0.0116	0.581**	0.151	1	
Leaf shape	بد شکلی برگ	0.242	0.455*	0.451*	0.318	0.239	1

* and **: Significant at 5 and 1% probability levels, respectively

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

۳۵۰ میکرومول در مترمربع در ثانیه، دمای ۲۴ درجه سانتیگراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی و رطوبت ۸۵ درصد قرار داده شدند. ژنوتیپ‌های تلقیح شده لوبیا ۲۱ روز پس از مایه زنی با استفاده از آزمون‌های DAS-ELISA (الایزای مستقیم) و IC-RT-PCR از نظر میزان آلودگی به BCMNV مورد بررسی قرار گرفتند (Nolasco *et al*., 1993). پلیت‌های ELISA با استفاده از دستگاه ELISA-reader ارزیابی و نمونه‌هایی که مقدار عددی جذب نوری آن‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر بیش از میانگین شاهد بعلاوه ۳ برابر انحراف معیار (نمونه‌های شاهد) بود، به‌عنوان نمونه‌های مثبت و نمونه‌هایی که کمتر از این میزان جذب نور داشتند، به‌عنوان نمونه‌های منفی ثبت شدند (Clark and Adams, 1977). میزان جذب نور در آزمون الایزا دامنه پیوسته‌ای از اعداد در فاصله ۰/۰۰۱ تا ۲/۸۵۰ را تشکیل داده جهت اطمینان از عدم آلودگی نمونه‌های تلقیح شده ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا به BCMNV که در آزمون ELISA نتایج منفی نشان دادند، آزمون IC-RT-PCR، با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی BCMNV(NL3) طراحی شده توسط ژو و هامپتون (Xu and Hampton., 1996) که قطعه‌ای به طول ۹۲۲ جفت باز را تکثیر می‌نماید (در برگیرنده قسمتی از NIb و بخشی از CP) و آنتی سرم چند همسانه‌ای این ویروس (DSMZ, Germany) BCMNV انجام گرفت. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در واکنش IC-RT-PCR شامل؛ Dnl3 (GAATTGAAAGCGTACTATCTAATACAG) و Unl3 (CAGCTTGAATTTGATTCTGATGATGAGGTG) بودند. واکنش‌های RT- PCR در دستگاه ترموسایکلر (Palm cycler, GP001, Corbett research, Australia) انجام گرفت. محصول نهایی در ژل آگارز یک درصد در بافر 1x TBE، با استفاده از الکتروفورز تفکیک گردید و اندازه تقریبی قطعه تکثیر شده با استفاده از نشانگر DNA یک کیلو جفت بازی (1kbp) تعیین شد. سایر صفات کیفی (کلیه صفات بجز میزان آلودگی برگ) مورد مطالعه بصورت مشاهده‌ای و با مقایسه با شاهد، رتبه‌بندی گردیدند. همه گیاهان ۲۱ روز پس از تلقیح با استفاده از یک روش فنوتیپی رتبه بندی کمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. علائم ثبت شده عبارت بودند از موزائیکی شدن برگ، نکروز سیستمیک، رگبرگ نواری، لکه‌های کلروتیک و بدشکلی برگ. روش رتبه بندی V(Visual symptoms) وVV (Visual symptoms vigor) and بر اساس یک مقیاس از صفر تا ۱۰ (صفر : بوته مرده و ۱۰ : گیاه سالم)، میزان علائم و قدرت رویش گیاه صورت گرفت (Strausbaugh *et al*., 2003). در این آزمایش از روش رتبه بندی V استفاده شده و برای سهولت و کوچک نمودن اعداد، بوته‌های سالم رتبه ۱، بوته های مرده رتبه ۳ و بوته‌هایی که ۵۰ درصد برگ‌های آن علائم مورد نظر را نشان دادند (رتبه ۵ در روش V)، رتبه ۲ را دریافت نمودند. تجزیه داده‌ها نیز با استفاده از نرم افزارهای SAS ویرایش 9.1 و Minitab صورت گرفت. تجزیه صفات رتبه‌ای توسط آزمون ناپارامتری فریدمن انجام شد. مقایسه میانگین‌برای صفت میزان آلودگی به روش دانکن صورت گرفت. ضرایب همبستگی نیز به روش اسپیرمن برای صفات رتبه‌ای مورد مطالعه محاسبه شد.

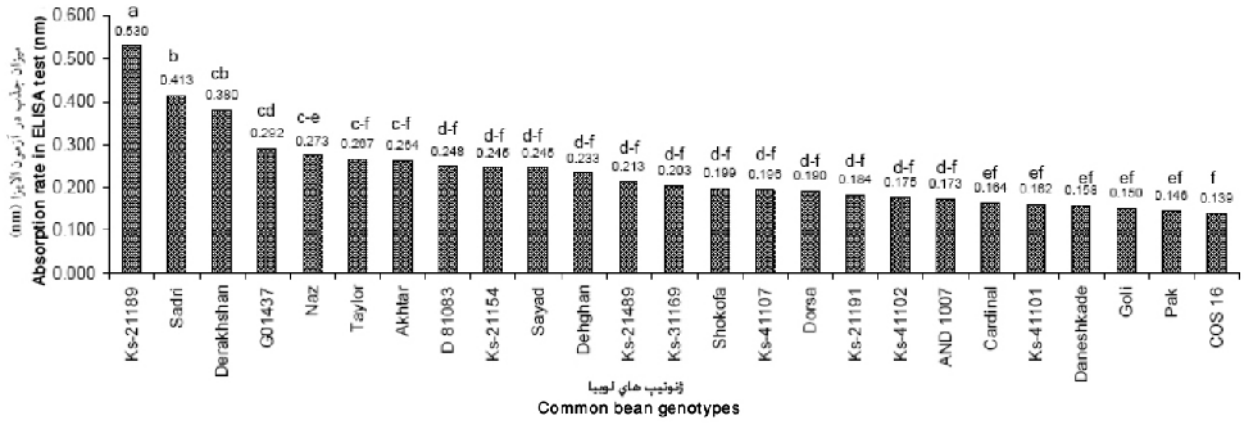
نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی داری از نظر میزان آلودگی در آزمون الایزا با سطح احتمال یک درصد وجود داشت، به‌عبارت دیگر بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ مقاومت و حساسیت به ویروس BCMNV تفاوت وجود داشت. به نظر می‌رسد که اختلاف بین ژنوتیپ‌ها بدلیل شوک وارد شده بوسیله ویروس بوده که واکنش‌های متفاوت ژنوتیپ‌ها را در شرایط آلودگی به همراه داشته است. این موضوع در نتایج سایر تحقیقات نیز گزارش شده

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

است (Puttarajo *et al*., 2004; Castillo-Urquiza *et al*., 2006; Ittah, 2006; Prasad *et al*., 2007). بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها از ۲۵ ژنوتیپ مورد مطالعه، ۳ ژنوتیپ حساس (Ks-21189، صدری و درخشان) و ۳ ژنوتیپ مقاوم (COS16، گلی و پاک) شناسایی شدند. ژنوتیپ Ks-21189 دارای بیشترین میزان آلودگی بود. بعبارت دیگر از بیشترین میزان حساسیت به ویروس BCMNV برخوردار بود، ژنوتیپ COS16 دارای کمترین میزان حساسیت به این ویروس بود (شکل۱) که این موضوع با نتایج کامل منش (Kamelmanesh *et al.,* 2009) مطابقت داشت.

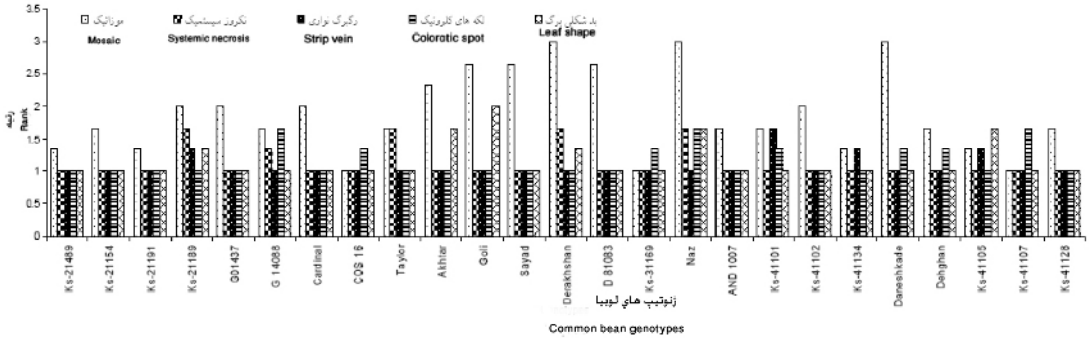


شکل ۱- میانگین ژنوتیپ‌های لوبیا از نظر میزان آلودگی BCMNV

Fig. 1. Means of common bean genotypes in terms of BCMNV infection rate

نتایج آزمون ناپارامتری نشان داد که مقدار کای اسکوئر برای صفات بدشکلی برگ، موزائیکی و نکروز سیستمیک معنی دار بوده و بعبارت دیگر از نظر این سه صفت، ژنوتیپ‌ها دارای اختلاف معنی داری با هم بودند.

نتایج نشان داد که ژنوتیپ های درخشان، ناز و دانشکده دارای بیشترین و ژنوتیپ‌های cos16، Ks-31169 و Ks-41107 دارای کمترین مقدار علائم موزائیکی بودند. برای صفت نکروز سیستمیک نیز ژنوتیپ‌های ناز، تیلور، درخشان و



شکل ۲- میانگین رتبه‌های فنوتیپی کسب شده توسط ژنوتیپ‌های لوبیا

Fig. 2. Phenotypic rank average of common bean genotypes

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

Ks-21189 دارای بیشترین مقدار علائم نکروز سیستمیک بودند. بیشترین میزان بدشکلی برگ نیز متعلق به ژنوتیپ گلی بود (شکل ۲).

محاسبه ضرایب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که میزان آلودگی در آزمون الایزا با موزائیکی شدن برگ و نکروز سیستمیک دارای همبستگی مثبت بود، به عبارت دیگر وجود ویروس BCMNV در گیاه که منجر به آلودگی بالا می‌شود، با افزایش علائم نکروز سیستمیک و موزائیکی برگ همراه است. این نتیجه با ویژگی اختصاصی این ویروس که ایجاد نکروز سیستمیک است، مطابقت دارد (Silbernagel *et al*., 2001). علائم موزائیکی با بدشکلی برگ، علائم نکروز سیستمیک با لکه‌های کلروتیک و بدشکلی برگ نیز دارای همبستگی مثبت و معنی دار بود (جدول۲). همبستگی‌های مثبت مشاهده شده بیانگر آن است که مشاهده هر یک از علائم روی گیاه مانع از بروز سایر علائم نمی‌شود و بروز هر یک از علائم باعث کاهش دیگری نمی‌شود. نتایج آزمون کای اسکوئر برای بررسی ارتباط آماری بین رنگ ژنوتیپ‌های مورد استفاده و مقاومت یا حساسیت به این ویروس نشان داد که ژنوتیپ‌های سفید نسبت به چیتی و قرمز مقاوم‌تر بوده و ژنوتیپ‌های چیتی حساس‌تر از قرمز بودند (جدول ۳).

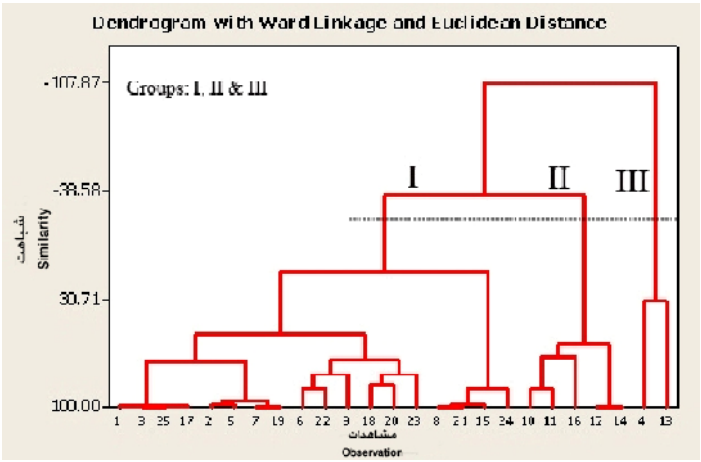
مقدار کای اسکوئر محاسبه شده برای ارتباط بین رنگ لوبیا و مقاومت به ویروس BCMNV، بزرگتر از کای اسکوئر جدول با دو درجه آزادی (χ^2 = ۵/۹۹) بود، بنابراین نتایج حاصل معنی‌دار بوده و دلایل کافی برای رد فرض H_0 (بین مقاومت به ویروس BCMNV و

جدول۳- جدول توافقی (۲×۳) کای اسکوئر برای تعیین ارتباط مقاومت به ویروس BCMNV و رنگ لوبیا

Table 3. Chi-square contingency table (3×2) for relationship of resistance to BCMNV with bean color

حساسیت یا مقاومت Resistance or sensitivity	چیتی Pinto	قرمز Red	سفید White	کل Total
مقاومت به BCMNV Resistance to BCMNV	(4.68) 2	(4.16) 3	(4.16) 8	13
حساسیت به BCMNV Sensitive to BCMNV	(4.32) 7	(3.84) 5	(3.84) 0	13
کل Total	9	8	8	25

مقادیر مورد انتظار داخل پرانتز می باشند Expected value exist in the parenthesis (χ^2 =11.253)



شکل۳- گروه بندی ژنوتیپ‌های لوبیا با استفاده از روش حداقل واریانس وارد

Fig. 3. Grouping of common bean genotypes using Ward´s minimum variance method

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

رنگ لوبیا ارتباطی وجود ندارد) بدست آمد. درنتیجه می‌توان استنباط نمود که بین رنگ لوبیا و مقاومت به ویروس BCMNV ارتباط وجود داشته و مستقل از هم نمی‌باشند. پیمبری (Peyambari *et al.,* 2011) و کامل منش (Kamelmanesh *et al.,* 2009) نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند.

نتایج تجزیه کلاستر برای صفات رتبه‌ای ژنوتیپ‌های لوبیا را در سه گروه قرار داد. ژنوتیپ Ks-21189 که بعنوان حساس‌ترین ژنوتیپ شناسایی شده بود در گروه III و ژنوتیپ COS16 که بعنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ معرفی شده بود، در گروه I قرار گرفت (شکل ۳).

در آزمون IC-RT-PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی BCMNV(NL3) قطعه‌ای به طول **۹۲۲** جفت باز تکثیر شد که دقیقاً با قطعه بدست آمده توسط ژو و هامپتون (Xu and Hampton., 1996) مطابقت داشت. نتایج IC-RT-PCR حضور ویروس BCMNV را در ژنوتیپ Ks-21189 و مقاومت ژنوتیپ COS16 را نسبت به این ویروس تایید کرد (شکل ۴).

نتایج کلی ارزیابی ژنوتیپ‌های لوبیای مورد استفاده در این آزمایش نشان داد که رنگ لوبیا ارتباط معنی‌داری با مقاومت به ویروس BCMNV داشته و ژنوتیپ‌های سفید نسبت به ژنوتیپ‌های قرمز و چیتی مقاومت بیشتری نشان دادند. از بین ژنوتیپ‌های لوبیا با رنگ قرمز، ژنوتیپ‌های D81083 و گلی مقاومت و ژنوتیپ‌های صیاد و درخشان حساسیت بیشتری نشان

شکل۴- نتایج آزمون IC-RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی BCMNV(NL3)
M: مارکر، ۱: درخشان، ۲ : Ks-21189، ۳ : Ks-41128 ، ۴ : گلی، ۵ :COS16

Fig. 4. IC-RT-PCR test results with specific primer of BCMNV (NL3)
M: Marker, 1: Derakhshan, 2: Ks-21189, 3: Ks-41128, 4: Goli, 5: COS16

دادند. از بین ژنوتیپ‌های چیتی، ژنوتیپ‌های G14088 ، Ks-21189 و COS16 بیشترین مقاومت و ژنوتیپ تایلور بیشترین میزان حساسیت را داشت. همه ژنوتیپ‌های لوبیا سفید نیز علی‌رغم حضور ویروس، مقاومت‌های متفاوتی نشان دادند که این موضوع می‌تواند به پیوستگی ژن‌های مقاومت و رنگ بذر مربوط باشد (Peyambari *et al.,* 2011).

بین مقاومت یا حساسیت به ویروس BCMNV و بروز علائم فنوتیپی در لوبیا ارتباط معنی‌داری وجود داشت، بطوری‌که ظهور علائم نکروز سیستمیک بر روی رگبرگ‌ها می‌تواند بیانگر حضور ویروس در گیاه باشد و نه برعکس، به عبارت دیگر حضور ویروس در گیاه لزوماً علائم نکروز را نشان نمی‌دهد. با مشاهده سایر علائم نیز نمی‌توان با

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]
[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

قطعیت وجود BCMNV را بیان کرد، چون برخی از علائم بین ویروس‌های خانواده پوتی ویریده و بخصوص BCMV مشترک هستند. نتایج این تحقیق نشان داد که از بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ژنوتیپ COS16 دارای بیشترین تحمل نسبت به BCMNV که این موضوع با نتایج بدست آمده در ایستگاه ملی تحقیقات لوبیای خمین مطابقت دارد.

سپاسگزاری

از قطب علمی حبوبات کشور و دانشگاه تهران به جهت حمایت از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده **References**

Castilo-urquiza, G. P., F. G. Maia, M. G. Cavalho, C. M. Pinto and F. M. Zerbini. 2006. Characterization of *Bean Rugose Mosaic Virus* (BRMV) isolate of Minas Gerais, and yield loss estimate in beans upon single infection and double infection with BCMV. Fitopatologia Brasileira, 31(5): 455-461.

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the micro plate method of enzyme-linked immunosorbant assay for the detection of plant viruses. J. Genral Virol. 34: 475-483.

Dhanju, K. S., S. C. Chowla and A. K. Handa. 1995. Screening of French bean germplasm under field and glasshouse condition against bean common mosaic virus. Legume Res. 18: 53-55.

Drijfhout, E., 1991. Bean Common Mosaic. Compendium of Bean Diseases. APS Press, pp 37-39.

Gupta, Y. and S. S. Chawla. 1990. Screening of French bean germplasm for resistance to bean common mosaic virus. Indian Phytopathol. 43: 434-436.

Ittah, M. A. 2006. Relationship between yield and some yield components in cowpea genotypes infected with two cowpea *potyviruses*. Global J. Pure App. Sci. 12(1):11-17.

Kamelmanesh, M. M., H. R. Dorri, S. Ghasemi, M. R. Bihamta and F. Darvish. 2009. Gene action for resistance to Bean common mosaic virus (BCMV) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Iran. J. Agric. Res. 6(2): 363-370. (In Persian with English abstract).

Khan J.A., D. Lohuis, R. Goldbach and J. Dijkstra. 1993. Sequence data to settle the taxonomic position of bean common mosaic virus and blackeye cowpea mosaic virus isolates. J. General Virol. 74: 2243-2249.

Klein, R. E., S. D. Wyatt and W. J. Kaiser. 1988. Incidence of bean common mosaic virus in USDA *Phaseolus* germplasm collection. Plant Dis. 72: 301-302.

Koening, R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. J. General Virol. 55: 53-62.

Mavaric, I. and J. Susta-Vozlic. 2004. Virus diseases and resistance to bean common mosaic and bean common mosaic necrosis potyvirus in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Acta Agric. Slovenica, 83: 181-190.

McKern, N. M., G. I. Mink, O. W. Barnett, A. Mishra, L. A. Whittaker, M. J. Silbernagel, C. W. Ward and D. D. Shukla. 1992a. Isolates of bean common mosaic virus comprising two distinct potyviruses. Phytopathology, 82: 923-929.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

McKern, N. M., C. W. Ward and D. D. Shukla. 1992b. Strains of bean common mosaic virus consist of at least two distinct potyviruses. Arch. Virol. [Suppl.5]: 407-414.

Nolasco G., Blas C., Torres V. and Ponz F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. J. Virol. Methods. 45: 201-218.

Omunyin, M. E., E. M. Gathuru and D. M. Mukunya. 1995. Pathogenicity groups of bean common mosaic virus isolates in Kenya. Plant Dis. 79: 985-989.

Peyambari, M., M. Kohi habibi., G. Mosahebi And K. Izatpanah. 2011. Consideration of BCMV in some provinces of Iran and three genotypes response to BCMV. J. Plant Protec. 25(3): 250-257.

Prasad, S. M., M. K. Barnwal, R. B. Sharma and N. Prasad. 2007. Influence of different dates of sowing on incidence of virus disease of French bean. Indian J. Virol. 18(1): 44-46.

Puttarajo, H. R., H. S. Prakash and H. S. Shetty. 2004. Seed infection by blackeye cowpea mosaic *potyviruse* and yield loss in different cowpea genotypes. J. Mycol. Plant Pathol. 34(1):41-46.

Ramanjulu, V., D. R. Reddy, G. P. Babu and K. Gopal. 2004. Identification of sources of resistance to bean common mosaic virus in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Dis. Res. (Ludhiana), 19(2): 134-139.

Revers, F., O. Le Gall, T. Candresse and A. J. Maule. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant: potyvirus interactions. Mol. Plant–Microbe Interact. 12: 367-376.

Saiz, M., C. de Blas, G. Carazo, J. Fresno, J. Romero and S. Castro. 1995. Incidence and characterization of bean common mosaic virus isolates in Spanish bean fields. Plant Dis. 79: 79-81.

Silbernagel, M. J., G. I. Mink, R. L. Zhao and G. Y. Zheng. 2001. Phenotypic recombination between bean common mosaic and bean common mosaic necrosis potyviruses *in vivo*. Arch. Virol. 146: 1007-1020.

Stewart, V. B. and D. Reddick.1917. Bean mosaic. Phytopathology, 7: 61-72.

Strausbaugh, C. A., J. R. Myers, R. L. Forster and P. E. McClean. 2003. A quantitative method to screen for resistance to bean common mosaic. Phytopathol. 93(11):1430-1436..

Vallejos, C. E., A. M. Gustavo, J. Valerie, R. P. Tommy, S. S. Ney and A. M. Sally. 2006. Genetic and molecular characterization of the I locus of *Phaseolus vulgaris*. Genetics, 172: 1229-1242.

Xu L. and R. O. Hampton.1996. Molecular detection of bean common mosaic and bean common mosaic necrosis potyviruses and pathogroups. Arch. Virol. 141: 1961-1977.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

Evaluation of reaction of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes to bean common mosaic necrosis virus (BCMNV) disease in greenhouse conditions

Farzanfar, M.[1], M. R. Bihamta[2], M. Koohi Habibi[3], H. R. Dory[4] and M. Salehi Far[5]

ABSTRACT

Farzanfar. M., M. R. Bihamta, M. Koohi Habibi, H. R. Dory and M. Salehi Far. 2013. Evaluation of reaction of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes to bean common mosaic necrosis virus (BCMNV) disease in greenhouse conditions**. Iranian Journal of Crop Sciences. 15(1): 35-45. (In Persian).**

This experiment was conducted to determine common bean genotypes reaction to Bean Common Mosaic Necrosis Virus (BCMNV). Twenty five common bean genotypes were obtained from National Bean Research Station of Khomein. These genotypes were planted using randomized complete block design with three replications, and inoculated with inoculums of virus in greenhouse conditions in 2009. The reactions of plants were examined twenty one days after planting using ELISA test and IC-RT-PCR and visual methods. Measured traits in this research included: leaf infection (actual infection), mosaic leaf, systemic necrosis, vein strip, chlorotic spot and leaf shape. Quality traits (except leaf infection) were assessed by visual ranking method (visual symptom). Results indicated that genotypes were significantly different in leaf infection (actual infection), leaf mosaic, systemic necrosis and leaf shape. Results also showed that Ks-21189, Ks-21481 and Derakhshan were susceptible and COS16, Goli and Ks-41128 were resistant genotypes. Systemic necrosis had positive and highly significant correlation ($r=0.638^{**}$) with leaf infection. Results of cluster analysis also indicated that Ks-21189 and COS16 as sensitive and resistance genotypes, respectively. Chi-square test indicated that white genotypes were more resistant than pinto and red genotypes. IC-RT-PCR results indicated that BCMNV virus was present in Ks-21189 genotype.

Key words: Common bean, BCMNV, ELISA, IC-RT-PCR, Resistance and Virus.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-08-25]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1392.15.1.4.2]

Received: May, 2012 **Accepted: January, 2013**

1- Former MSc. Student, Agricultural and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran (Corresponding author) (Email: agri2000@yhaoo.com)
2- Professor, Agricultural and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Assistant Prof., Agricultural and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran
4- Faculty member, National Bean Research Station, Khomein, Iran
5- PhD. Student, The University of Guilan, Rasht, Iran