ردیابی همزمان سه ویروس موزائیک معمولی، موزائیک معمولی بافت مرده‌ی لوبیا و موزائیک خیار با استفاده از Multiplex-RT-PCR*

نیلوفر رجبی[۱]، شاهین نوری‌نژاد زرقانی[۱]**، مسعود شمس‌بخش[۲] و عبدالباسط عزیزی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۲۹)

چکیده

ویروس موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*, BCMV)، ویروس موزائیک معمولی بافت مرده‌ی لوبیا (*Bean common mosaic necrosis virus*, BCMNV) و ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) از ویروس‌های بذربرد لوبیا می‌باشند که به طور جدی باعث افت کمی و کیفی این محصول می‌شوند. بدلیل وجود گزارش‌های متعدد از آلودگی مخلوط لوبیا با این سه ویروس، معرفی روشی دقیق، سریع و حساس برای ردیابی همزمان CMV، BCMV و BCMNV در گیاه لوبیا می‌تواند نقش مهمی را در جلوگیری از انتشار ویروس و گسترش خسارت آنها و نیز غربال گیاهان سالم داشته باشد. در پژوهش حاضر برای ردیابی همزمان BCMV، BCMNV، CMV و نیز ژن 18S rRNA بعنوان کنترل داخلی، روش Multiplex RT-PCR استفاده شد. برای این منظور ابتدا لوبیای آلوده به این سه ویروس توسط DAC-ELISA ردیابی شد. آرانآ کل استخراج و سپس cDNA با استفاده از آغازگرهای تصادفی شش نوکلئوتیدی ساخته شد. واکنش پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای هر ویروس و کنترل داخلی بصورت جداگانه و یا در ترکیب با یکدیگر بطور موفقیت آمیز قادر به تکثیر قطعات در حدود ۴۷۰ جفت بازی برای BCMV، حدود ۵۰۰ جفت بازی برای کنترل داخلی، حدود ۷۰۴ جفت بازی برای BCMNV و حدود ۸۷۰ جفت بازی برای CMV گردیدند. این روش قابلیت ردیابی این سه ویروس را در ۱۰۰ نانوگرم از آرانای کل دارد.

کلیدواژه: ردیابی ویروس، لوبیا، BCMV، BCMNV، CMV، ویروس بذربرد

---

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sh_nourinejhad@ut.ac.ir

۱. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه حشره شناسی و بیماری‌های گیاهی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران.

۲. به ترتیب دانشیار و دانش آموخته دکتری گروه بیماری شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

Simultaneously detection of three bean viruses, *Bean common mosaic virus, Bean common mosaic necrosis virus* and *Cucumber mosaic virus* by Multiplex-RT-PCR*

N. Rajabi[1], S. Nourinejhad Zarghani[1], M. Shams-Bakhsh[2] and A. Azizi[2]**

(Received: 1.9.2014; Accepted: 20.9.2015)

Abstract

Bean common mosaic virus (BCMV), *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) are seed-borne viruses in beans causing severe damage and reduction of yield and quality of this crop. Since there are lots of reports on the occurrence of mixed infection of BCMV, BCMNV and CMV, thus setting up an accurate, reliable and rapid method for detecting of these viruses in bean crops could play an important role in prevention of their spread and damages and also screening of healthy plants. For this purpose, in the present study, we tried to set up a multiplex RT-PCR for simultaneous detection of BCMV, BCMNV and CMV as well as an internal control gene, 18S rRNA. To do this end, the infection of bean plants to above mentioned viruses was confirmed by DAC-ELISA. Following total RNA extraction, cDNA was synthesized using random hexamer primers. cDNA fragments were successfully amplified using specific primers in expected sizes as almost 470 bp for BCMV, 500bp for internal control, 704 bp for BCMNV and 870 bp for CMV, respectively. The results of this study showed that this method is capable of detecting BCMV, BCMNV and CMV in 100 ng of total RNA.

Keywords: RT-PCR, Beans, Seed-borne viruses, 18S rRNA

---

* Part of M.Sc. Thesis of The First Author Submitted to Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran

** Corresponding author's E-mail: sh_nourinejhad@ut.ac.ir

1. Former M.Sc. Student and Assis. Prof. of Department of Entomology and Plant Pathology, College of Abouraihan, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
2. Former Ph.D. Student and Associated Prof. of Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

مقدمه

ویروس موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*, BCMV) و ویروس موزائیک معمولی بافت مرده ی لوبیا (*Bean common mosaic necrosis virus*, BCMNV) متعلق به جنس *Potyvirus* و ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) از جنس *Cucumovirus* شایع‌ترین و مخربترین ویروس‌های لوبیا هستند (Kaiser & Mossahebi 1974). به دلیل وقوع همزمان این سه ویروس در یک گیاه (آلودگی مخلوط) وجود یک روش حساس و اختصاصی برای ردیابی همزمان این ویروس‌ها ضروری به نظر می‌رسد. اکثر روش‌های متداول برای تشخیص ویروس‌ها، قادر به ردیابی تنها یک ویروس هستند ولی با روش Multiplex-RT-PCR (Osiowy 1998) می‌توان چندین ویروس را بطورهمزمان ردیابی نمود. این روش تاکنون برای ردیابی ویروس‌های سیب زمینی (Nie & Singh 2001)، چغندرقند (Hauser *et al.* 2000)، هسته‌داران (Saade *et al.* 2000)، زیتون (Bertolini *et al.* 2001)، سیب (Menzel *et al.* 2003)، توت فرنگی (Thompson *et al.* 2003)، برنج (Periasamy *et al.* 2006) و مرکبات (Roy *et al.* 2005) استفاده شده است. این تحقیق اولین گزارش از ردیابی همزمان سه ویروس بذربرد یاد شده لوبیا توسط روش Multiplex-RT-PCR می‌باشد.

روش بررسی

تعداد ۲۰۰ بذر لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) رقم سان-ری در گلخانه کاشته و آلودگی گیاهان رشدیافته به BCMV، BCMNV و CMV با استفاده از آزمون direct antigen coating (DAC)-ELISA و آنتی بادی‌های اختصاصی BCMNV، BCMNV (مرکز تحقیقات بیماریهای ویروسی غلات، دانشگاه شیراز) و CMV (شرکت بیوربا- سوئیس) بررسی شد (Clark & Adams 1977). برای طراحی آغازگرهای اختصاصی BCMV و BCMNV توالی‌های موجود در GenBank با استفاده از نرم‌افزار Clustal W همردیف‌سازی (Larkin *et al.* 2007) و نواحی حفاظت شده آنها مورد استفاده قرار گرفت بطوریکه اندازه محصولات RT-PCR متفاوت از همدیگر و برای هر ویروس و نیز کنترل داخلی اختصاصی باشد. برای ردیابی پوتی ویروس‌ها، CMV و کنترل داخلی از آغازگرهای توصیه شده توسط سایر محققان استفاده شد (جدول ۱). آرانای کل توسط بافر استخراج RNX Plus (شرکت سیناکلون، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت مربوطه استخراج و غلظت آن با استفاده از دستگاه بیواسپکتوفتومتر (اپندورف، آلمان) محاسبه شد. برای ساخت cDNA ۲۰۰-۵۰ نانوگرم آرانای کل، کیت RT شرکت ویوانتیس (مالزی) و آغازگرهای شش نوکلئوتیدی تصادفی و برای انجام PCR کیت شرکت سیناکلون (ایران) بر اساس روش پیشنهادی شرکت‌های سازنده استفاده شدند. ابتدا واکنش‌ها به منظور ردیابی پوتی ویروس‌ها، CMV و تکثیر ژن کنترل داخلی، BCMV و BCMNV با آغازگرهای طراحی شده یا برگرفته شده از منابع بررسی شدند. در واکنش‌های Multiplex-RT-PCR جفت آغازگرهای اختصاصی مربوط به هر سه ویروس و نیز کنترل داخلی بطور همزمان در یک واکنش و در مرحله پی سی‌آر وارد مخلوط گردیدند. بهینه‌سازی واکنش Multiplex شامل تغییراتی در غلظت $MgCl_2$، آغازگرها، دی‌انا مکمل و آنزیم *Taq* DNA polymerase، مدت زمان ساخت و دمای اتصال آغازگرها بود. در نهایت پس از بهینه‌سازی روش Multiplex-RT-PCR، این روش در

جدول۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Characteristics of the primers were used in this study

منبع References	رس شمار جدایه Accession no. of isolate	جایگاه اتصال به ژنوم ویروس position on the virus genome	توالی (۵' به ۳') Sequence (5'=>3')	نام آغازگر Primer name	Tm °C
This study	HG792064	9261-9278	GTTTGAAATGTGGTACAA	BCMV-s*	48
		9711-9731	GTATTYTCGCTGGTTGTTGC	BCM-N-V-as*	56
This study	HG792063	8611-8626	AGAAGAAGAGAAAGAC	BCMNV-s	45
		9296-9315	GTATTYTCGCTGGTTGTTGC	BCM-N-V-as	56
Rizos *et al.* 1992	M21464	1149-1161	GCTTCTCCGCGAG	CMVCPf	47
Rizos *et al.* 1992		1998-2015	GCCGTAAGCTGGATGGAC	CMVCPr	57
Montazeri Hedesh *et al.* 2011	X14337	246-264	AACGGCTACCACATCCAAGG	18S rRNAf	59
		833-815	TCATTACTCCGATCCCGAAG	18S rRNAr	55
Zheng *et al.* 2010	NC_004047	7619-7642	GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA	NIb2F	49
		7945-7968	TCIACIACIGTIGAIGGYTGNCC	NIb3R	57

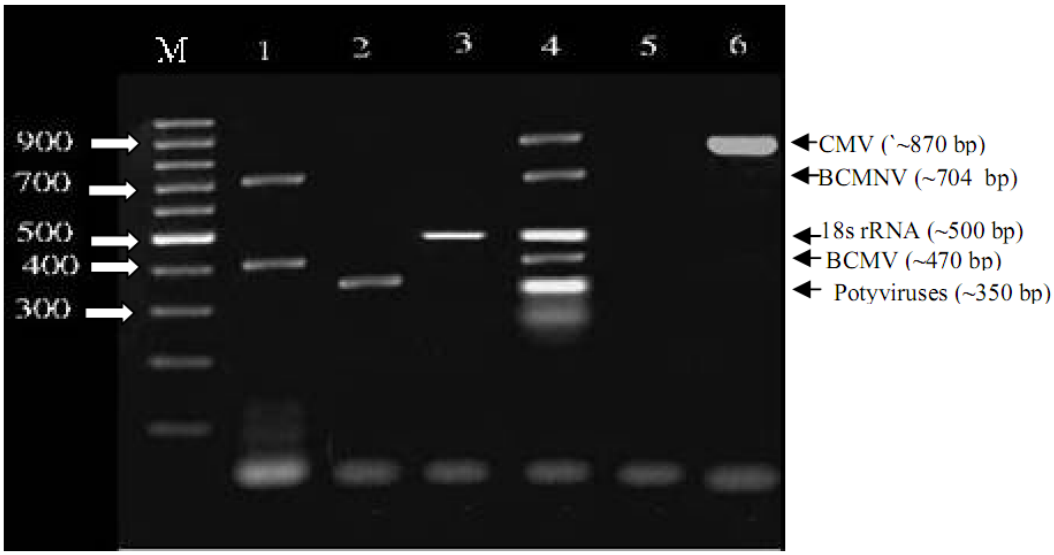
* محصول آرتی-پی سی آر با این جفت آغازگر میتواند از ۴۴۱ تا ۴۹۰ جفت‌باز باشد، ولی در اغلب جدایه‌ها حدود ۴۷۰ جفت‌باز است.

*The RT-PCR with these primers could varies in size in the range of 441-490 bp, but 470 bp is more common.

نمونه‌هایی که آلودگی مخلوط به BCMV، BCMNV و CMV (نمونه‌برداری شده از مزارع لوبیای استان زنجان) داشتند نیز بررسی شد. به منظور بررسی نتایج حاصل از واکنش RT-PCR از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد.

نتیجه و بحث

آزمون الیزا نشان داد که از ۲۰۰ بذر کاشته شده ۱۴۵ گیاه حداقل به یکی از ویروس‌های BCMV، BCMNV و CMV آلوده بودند و بدین ترتیب منبع سه ویروس یاد شده برای ادامه کار فراهم شد. عصاره گیاهان آلوده به یک یا دو ویروس یاد شده با هم مخلوط و به یک گیاه مایه‌زنی شد تا نمونه‌ی گیاهی آلوده به هر سه ویروس تهیه شود. آغازگرهای اختصاصی پوتی ویروس‌ها (NIb2F و NIb3F) سبب تکثیر قطعه‌ی ۳۵۰ جفت بازی مورد انتظار از گیاهان آلوده به BCMV و BCMNV شد (شکل۱) و در نتیجه صحت آلودگی نمونه‌ها به پوتی‌ویروس‌ها و انجام صحیح مراحل استخراج ارانای و انجام RT-PCR حاصل شد. جفت آغازگرهای BCMV-s\BCM-N-V-as و BCMNV\BCM-N-V-as نیز به ترتیب منجر به تکثیر قطعات مورد انتظار ۴۷۰ و ۷۰۴ جفت بازی شدند (شکل ۱ راهک ۱). بهترین ترکیب اجزای واکنش پی‌سی‌آر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲۵ تا ۱۰۰ نانوگرم cDNA، ۲۰۰ میکرومول مخلوط dNTPs، ۳ میلی مول کلرید منیزیم، ۰/۴ پیکومول از هر آغازگر به استثنای کنترل داخلی که از غلظت ۰/۲ پیکومول استفاده شد، یک واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (سیناژن، ایران) و ۱۱/۸ میکرولیتر آب بود. بهترین الگوی دمایی بدست آمده شامل یک چرخه ۹۴°C به مدت ۱۲۰ ثانیه بعنوان واسرشت سازی اولیه، ۳۵ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشت سازی، ۴۸/۵°C به مدت ۵۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها و ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه برای گسترش و یک مرحله از ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه برای گسترش نهایی بود. از تغییرات دیگری که برای بررسی و نیز دقت واکنش



شکل ۱. الکتروفورز محصولات RT-PCR برای ردیابی همزمان و انفرادی ویروس‌های BCMV، BCMNV و CMV. راهک ۱: محصول واکنش Duplex-RT-PCR با استفاده از جفت آغازگرهای BCMV-s\BCM-N-V-as و BCMNV-s\BCM-N-V-as به ترتیب برای ردیابی BCMV و BCMNV، راهک ۲: محصول واکنش Uniplex-RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر عمومی جنس پوتی ویروس برای ردیابی جنس پوتی ویروس. راهک ۳: محصول واکنش Uniplex-RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی، راهک ۴: محصول واکنش Multiplex- RT-PCR با استفاده از جفت آغازگرهای (CMVCPf\CMVCPr؛ BCMNV-s\BCM-N-V-as، BCMV-s/BCM-N-V-as؛ NIb2F/NIb3R و 18SrRNAf/18SrRNAr) برای ردیابی همزمان سه ویروس به همراه جنس عمومی پوتی ویروس و کنترل داخلی. راهک ۵: نمونه‌ی الیزا منفی برای CMV، BCMV و BCMNV که به عنوان کنترل منفی برای واکنش multiplex-RT-PCR استفاده شد. در این واکنش آغازگرهای کنترل داخلی مورد استفاده قرار نگرفت. راهک ۶: محصول واکنش Uniplex-RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر CMVCPf/CMVCPr برای ردیابی CMV. نشانگر وزنی GeneRuler^{TM} 100bp DNA ladder (Fermentas). قطعات مورد انتظار در جدول شماره ۱ آورده شده اند. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد TAE تفکیک شد و ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.

Fig 1. Electrophoresis of uniplex-RT-PCR and optimized Multiplex RT-PCR products for detection of BCMV, BCMNV and CMV. Lane 1: duplex-RT-PCR products obtained by using specific primer pairs BCMV-s/BCM-N-V-as and BCMNV-s/BCM-N-V-as to detect BCMV and BCMNV, respectively; lane 2: uniplex-RT-PCR products of the genus *Potyvirus* by using potyvirus universal primer pair (NIb2F/NIb3F); lane 3: uniplex-RT-PCR products by the use of 18S rRNA primers as an internal control; lane 4: Multiplex-RT-PCR products using the specific primer pairs (CMVCPf/CMVCPr, BCMNV-s/BCM-N-V-as, BCMV-s/BCM-N-V-as, NIb2F/NIb3R and 18S rRNAf/18S rRNAr) for simultaneous detection of CMV, BCMNV, BCMV, 18s rRNA and potyvirus genus; lane 5: negative control (i.e. a bean leaf which negatively reacted in ELISA tests for CMV, BCMV and BCMNV. In Multiplex- or uniplex-RT-PCRs on the extracted total RNA of this plant we did not used internal control); lane 6: uniplex RT-PCR products of CMV detection using (CMVCPf/CMVCPr) primer. M: molecular marker: GeneRuler^{TM} 100bp DNA ladder (Fermentas). All the RT-PCR products are separated in 1.2% agarose gel in TAE buffer and the gel was stained with ethidium bromide.

مورد توجه قرار گرفت استفاده از غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ نانوگرم از آرای کل استخراج شده برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفتند و معلوم شد Multiplex-RT-PCR ارائه شده در این پژوهش می‌تواند ویروس‌های مورد نظر را در غلظت ۱۰۰ نانوگرم از آرای کل ردیابی کند.

در تحقیق حاضر، BCMV، BCMNV و CMV توسط آغازگرهای اختصاصی در Multiplex-RT-PCR و بطور همزمان ردیابی شدند و نتایج به دست آمده با نتایج واکنش انفرادی (Uniplex RT-PCR) مطابقت داشت (شکل ۱). این تحقیق اولین گزارش از ردیابی همزمان ویروس‌های مهم لوبیا BCMV، BCMNV و CMV با استفاده از پنج آغازگر و تنظیم آنها در یک واکنش Multiplex-RT-PCR می‌باشد. تاکنون گزارش‌های موفقیت آمیز انگشت شماری مبتنی بر ردیابی همزمان دو یا سه ویروس در میزبان‌های گیاهی بکار رفته است (Singh *et al.* 1996, Jacobi *et al.* 1998, Grieco & Gallitelli, 1999, Russo *et al.* 1999, James 1999, Saade *et al.* 2000, Sharman *et al.* 2000) برای تفکیک پاسخ منفی کاذب از ژن 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. با توجه به امکان صرفه‌جویی در وقت و هزینه در روش Multiplex-RT-PCR بدلیل ردیابی همزمان چند ویروس و نیز حساسیت و اختصاصیت بالاتر نسبت به روش‌های مبتنی بر آنتی بادی، در حال حاضر استفاده از این روش رو به افزایش است (Johnson, 2000). در آینده‌ای نزدیک روش Multiplex-RT-PCR برای ردیابی هم‌زمان سایر بیمارگر-های گیاهی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروئیدها به مانند ویروس‌های گیاهی استفاده خواهد شد (Nie & Singh 2001). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که روش Multiplex-RT-PCR همراه با استفاده از کنترل داخلی 18S rRNA روشی حساس، دقیق، سریع و قابل اعتماد در ردیابی هم‌زمان ویروس‌های مهم و بذرزاد لوبیا با خسارت‌زایی شدید در مزارع لوبیا می‌باشد و این روش برای اولین بار در ایران و دنیا برای ویروس‌های مهم و خسارت‌زای لوبیا بهینه شد.

منابع

Bertolini E., Olmos A., Carmen Martínez M., Gorris M. T. and Cambra M. 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. Journal of Virological Methods 96: 33-41.

Clark M. F. and Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant viruses. Journal of Virological Methods 34: 475-83.

Grieco F. and Gallitelli D. 1999. Multiplex reverse transcriptase chain reaction applied to virus detection in globe artichoke. Journal of Phytopathology 147: 183–185.

Hauser S., Weber C., Vetter G., Stevens M., Beuve M. and Lemaire O. 2000. Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods 89: 11-21.

Jacobi V., Bachand G. D., Hamelin R. C. and Castello J. D. 1998. Development of a Multiplex Immunocapture RT- PCR assay for detection and differentiation of *Tomato and Tobacco mosaic Tobamoviruses*. Journal of Virological Methods 74: 167– 178.

James D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a Multiplex PCR assay. Journal of Virological Methods 83: 1–9.

Johnson J. R. 2000. Development of polymerase chain reaction based assays for bacterial gene detection. Journal of Virological Methods 41: 201–209.

Kaiser W. J. and Mossahebi G. H. 1974. Natural infection of mugbean by *Bean common mosaic virus*. Journal of Phytopathology 64:1209-1214.

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., Mcgettigan P. A., Mcwilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J. and Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Journal of Bioinformatics 23:2947-2948.

Menzel W., Zahn V. and Maiss, E. 2003. Multiplex RT-PCR and ELISA compared with bioassay for the

detection of four apple viruses. Journal of Virological Methods 110: 153-157.

Montazeri Hedesh R, Shams-Bakhsh M, Mozafari J. 2011. Evaluation of common bean lines for their reaction to *Tomato yellow leaf curl virus*-Ir2. Crop Protection 30:163–7.

Nie X. and Singh R. P. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. Journal of Virological Methods 91:37-49.

Osiowy C. 1998. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. Journal of Clinical Microbiology 36: 3149–3154.

Periasamy M., Niazi F. and Malathi V. 2006. Multiplex RT-PCR, a novel technique for the simultaneous detection of the DNA and RNA viruses causing rice tungro disease. Journal of Virological Methods 134: 230-236.

Rizos H., Gunn L.V., Pares, R.D. and Gillings, M.R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 73: 2099-2103.

Roy A., Fayad A., Barthe G. and Brlansky R. H. 2005. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. Journal of Virological Methods 129: 47-55.

Russo P., Miller L., Singh R. P. and Slack S. A. 1999. Comparison of PLRV and PVY detection in potato seed samples tested by Florida winter field inspection and RT-PCR. American Journal of Potato Research 76: 313–316.

Saade M., Aparicio F., Sanchez-navarro J. A., Herranz M. C., Myrta A., Diterlizzi B. and Palla V. 2000. Simultaneous detection of the three characterized *Ilariviruses* affecting stone fruit trees by non-isotopic molecular hybridization and multiplex RT-PCR. Journal of Phytopathology 90:1330–1336.

Sharman M., Thomas J. and Dietzgen R.G. 2000. Development of a Multiplex Immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. Journal of Virological Methods 89:75–88.

Singh R. P., Kurz J. and Boiteau G. 1996. Detection of stylet-borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 59:189–196.

Thompson J. R., Wetzel S., Klerbs M. M., Vaskova, D., Schoen C. D., Spak, J. and Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. Journal of Virological Methods 111:85 – 93.

Zheng L., Rodoni B., Gibbs M. and Gibbs, A. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant Pathology 59: 211-220.