تعیین آلودگی گیاهان زینتی به چند بیماری مهم ویروسی در استان خراسان شمالی با الایزا

جواد محمودی صفا*[۱]، سعید نصرالله نژاد[۲]، محمد رضایی[۳] و فروه سادات مصطفوی نیشابوری[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۳- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، مدیریت حفظ نباتات خراسان شمالی.
۴- دانشجوی دکتری بیمار شناسی گیاهی، دانشگاه زابل.
*مسئول مکاتبه Javad.simsafa@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۲۸

چکیده

در سال‌های اخیر علائم بیماری‌های ویروسی مانند موزائیک، رنگ پریدگی و لکه‌های حلقوی در گیاهان زینتی استان خراسان شمالی شیوع پیدا کرده است. به منظور ردیابی بیماری‌های مهم ویروسی در گیاهان زینتی استان، در مجموع ٤٠٠ نمونه گیاه زینتی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. تمامی نمونه‌ها با آزمون سرولوژیکی-DAS ELISA با استفاده از آنتی بادی‌های چند همسانه‌ای ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)، ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی *Tomato ring spot virus* (ToRSV)، ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه‌فرنگی *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) ، ویروس موزائیک گوجه‌فرنگی *Tomato* mosaic *virus* (ToMV)، ویروس موزائیک خیار *Cucumber mosaic virus* (CMV) و ویروس موزائیک یونجه *Alfalfa mosaic virus* (AMV) مورد سنجش قرار گرفتند. نمونه‌هایی که در آزمون الایزا مثبت تشخیص داده شدند، به منظور مشاهده علائم روی گیاهان محک مایه‌زنی گردیدند. در مایه‌زنی مکانیکی تمام گیاهان محک علائم مشخص بیماری را نشان دادند. نتایج آزمون الایزا مشخص نمود که از مجموع ٤٠٠ نمونه گیاه زینتی، ۲۱۱ نمونه آلوده به ویروس بودند و از مجموع ١٦ گونه گیاه زینتی شامل: گل جعفری، گل جعفری درشت، رعنا زیبا، گل همیشه بهار، داوودی، آهار، مارگریت، نیلوفر، سیب زمینی شیرین، گل رز، شمعدانی، تاج خروس زینتی، اطلسی، زرشک زینتی، اسطوخودوس و گل مرواریدی تعداد نه گونه آلوده و هفت گونه فاقد آلودگی به بیماری‌های ویروسی می‌باشند. از بین این شش ویروس آلوده کننده گیاهان زینتی TBSV بیشترین و ToRSV کمترین میزان آلودگی را در استان داشت و آلودگی به ویروس AMV در هیچ یک از نمونه‌های گیاهان زینتی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آزمون سرولوژیکی، بیماری‌های ویروسی، گیاهان زینتی، مایه‌زنی مکانیکی، DAS-ELISA.

مقدمه

سطح زیر کشت گیاهان زینتی در جهان ٥٦٠ هزار هکتار و مساحت گلخانه‌های پرورش این گیاهان ۱۲۰ هزار هکتار است (محمودی صفا و همکاران ۲۰۱٦). اتحادیه‌ی اروپا یکی از مناطق جهان است که بیشترین تراکم تولید گیاهان زینتی در واحد هکتار را داشته و ۱۰ درصد از کل سطح زیر کشت گیاهان زینتی و ٤٤ درصد از تولید محصولات زینتی دنیا را در اختیار دارد (بی‌نام ۲۰۱۲ و عباسی فر ۱۳۸۲). در سال‌های اخیر، صنعت گل و گیاهان زینتی در ایران توسعه پیدا کرده و ۰/۱ درصد از کل بازار کسب و کار جهان را به خود اختصاص داده است (قطبی و شهرآیین ۲۰۱۲). ایران کشوری چهار فصل و برخوردار از تنوع آب و هوایی است و استعداد بالقوه برای تولید انواع گل و گیاهان زینتی را دارد. بخش وسیعی از خاک ایران در

Archive of SID

www.SID.ir

شمال، مرکز و جنوب غربی کشور مستعد پرورش انواع گل‌ها و گیاهان زینتی است (بی نام ۱۳۹۲ ب). کل سطح زیر کشت گیاهان زینتی در ایران شامل مساحت گلخانه‌ها و فضای بسته معادل ۵۷۳٤ هکتار بوده و از اهمیت اقتصادی برخوردار است (بی‌نام ۱۳۹۳).

تاکنون حداقل ۱۲۵ ویروس مختلف آلوده کننده شناخته شده که باعث ایجاد بیماری در گیاهان زینتی می‌شوند. شناسایی ویروس و ناقل آن برای توسعه عملی روش‌های پیشگیری از بیماری و به حداقل رساندن مصرف آفت‌کش‌ها مفید است (هسو و مارون ۲۰۰۳). ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) در جنس *Tospovirus* و خانواده *Bunyaviridae* قرار دارد (مارگاریا و همکاران ۲۰۱۵). این ویروس باعث ایجاد بیماری در بیش از ۸۰۰ گونه‌ی گیاهی در ۷۰ تیره از گیاهان تک لپه‌ای و دو لپه‌ای می‌شود (ناسکیمنتو و همکاران ۲۰۰٦) و در طبیعت به وسیله تریپس‌ها (Thrips) به روش گردشی-تکثیری[1] انتقال می‌یابد (مارگاریا و همکاران ۲۰۱٤). TSWV از جمله توسپوویروس‌های اصلی در سطح جهان می‌باشد که آلودگی گیاهان زینتی به آن گزارش شده است (لوئبنستین و همکاران ۱۹۹۵). در ایران آلودگی گیاهان زینتی به این ویروس از نقاط مختلف کشور گزارش شده است (ایازپور ۱۳۹۳). این ویروس در ایران برای اولین بار از روی گیاهان زینتی شقایق نعمان، پروانش، سینره و لادن گزارش شد (معینی و همکاران ۱۳۷۷). آسیب‌های ناشی از توسپوویروس‌ها در مطالعات متعددی گزارش شده است، در چندین گلخانه بازدید شده در استان شیراز، شدت آلودگی تا ۱۰۰ درصد توسط توسپوویروس‌ها TSWV و ویروس نکروز نقطه‌ای گل حنا *Impatiens necrotic spot virus* گزارش شده است (رسول‌پور و ایزدپناه ۲۰۰۷).

ویروس لکه حلقوی گوجه‌فرنگی *Tomato ring spot virus* (ToRSV) در جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* قرار دارد (والکر و همکاران ۲۰۱۵). دامنه‌ی میزبانی طبیعی این ویروس بسیار وسیع می‌باشد و ۲۸۵ گونه از ۱۸۹ جنس و ۵۵ تیره گیاهی از تک لپه‌ای‌ها و دو لپه‌ای‌ها را آلوده می‌سازد و مهمترین نشانه برگی ایجاد شده توسط این ویروس علائم لکه حلقوی است (بی نام ۲۰۰۵). این ویروس از طریق مکانیکی، بذر، پیوند، دانه‌ی گرده، اندام‌های رویشی تکثیری و گونه‌های مختلفی از نماتد جنس *Xiphinema* منتقل می‌شود (پینکرتون و همکاران ۲۰۰۸). ویروس ToRSV از جمله نپوویروس‌های اصلی آلوده کننده گیاهان زینتی بوده (کارد و همکاران ۲۰۰۷) و در ایران برای اولین بار از روی گیاه زینتی گلایول گزارش گردید (کامران و ایزد پناه ۱۳۵۹). این ویروس تاکنون از مناطق مختلف ایران از روی انواع گیاهان زینتی مثل ختمی، داوودی، نسترن، شمعدانی و شفلرا گزارش شده است (ایازپور ۱۳۹۳).

ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه‌فرنگی *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) یک ویروس بسیار شایع بوده و متعلق به جنس *Tombusvirus* و خانواده *Tombusviridae* است (آواتیف و همکاران ۲۰۱۵). ویروس TBSV باعث بیماری‌های مهم اقتصادی در محصولات مختلف می‌شود (لویس و همکاران ۱۹۹٦). این ویروس از ویروس‌های مهم و خسارت‌زا است که گوجه‌فرنگی و انواع محصولات زراعی دیگر را در ایران آلوده می کند و برای اولین بار در استان خراسان شمالی از مزارع گوجه‌فرنگی گزارش شده است (ذبیحی ۱۳۹۱). اولین گزارش آلودگی گیاهان زینتی کشور به ویروس TBSV مربوط به گیاه شمعدانی است (فرزاد فر و همکاران ۱۳۷۹).

ویروس موزائیک خیار *Cucumber mosaic virus* (CMV) یکی از بیمارگرهای مهم است که به جنس *Cucumovirus* و خانواده *Bromoviridae* تعلق دارد (اسما و همکاران ۲۰۱۵) و از جمله مهم‌ترین ویروس های آلوده کننده گیاهان زینتی در سراسر جهان می-

[1] Propagative-circulative

Archive of SID

www.SID.ir

باشد (لوئبنستین و همکاران ۱۹۹۵). این ویروس تاکنون از نقاط مختلف کشور روی گیاهان زینتی گزارش شده است (ایازپور ۱۳۹۳). در ایران CMV اولین بار از روی گیاهان زینتی آلاله، مریم گلی آتشین، گل میمونی، گل جعفری، گل قاصد، بنفشه سه رنگ و آهار گزارش شد (کایزر و همکاران ۱۹۷۱).

ویروس موزائیک گوجه‌فرنگی *Tomato mosaic virus* (ToMV) به جنس *Tobamovirus* و خانواده *Virgaviridae* تعلق دارد (آقامحمدی و همکاران ۲۰۱۳). این ویروس از سراسر جهان گزارش شده و ممکن است باعث خسارات قابل توجهی به محصولات مختلف به ویژه سبزی‌ها شود (هولینگ و هوتینگا ۱۹۷۶ و الکساندر و همکاران ۲۰۰۰). این ویروس در ایران بیشتر از روی گیاهان صیفی گزارش شده است ولی از روی گیاهان زینتی تاکنون گزارش نشده است (ایازپور ۱۳۹۳).

ویروس موزائیک یونجه *Alfalfa mosaic virus* (AMV) متعلق به جنس *Alfamovirus* و خانواده *Bromoviridae* بوده و در محصولات مختلف به ویژه بقولات آلودگی ایجاد می‌کند (ایازپور ۱۳۹۳). در ایران AMV برای اولین بار از روی گیاهان زینتی گلرنگ، خرفه و تاج‌ریزی سیاه گزارش شد (کایزر و همکاران ۱۹۷۱).

در استان خراسان‌شمالی با توجه به میزان بالای تولید گوجه‌فرنگی، خیار و یونجه (بی‌نام ۱۳۹۲ الف) به عنوان میزبان‌های طبیعی ویروس‌های ToRSV، TSWV، TBSV، ToMV، CMV و AMV و وجود گزارش‌هایی از آلودگی این محصولات به ویروس‌های فوق در استان توسط ذبیحی (۱۳۹۱)، سبک‌خیز و همکاران (۱۳۸۳)، محمدی حاجی‌آبادی و همکاران (۲۰۰۹)، زین‌الدینی (۱۳۸۱) و معینی (۲۰۱۰) و از همه مهم‌تر مشاهده علائم شبه ویروسی در گیاهان زینتی استان خراسان شمالی احتمال آلودگی گیاهان زینتی استان به این ویروس‌ها وجود داشت بنابراین در این تحقیق کوشش به عمل آمد تا علاوه بر شناسایی و ردیابی ویروس‌های مهم آلوده کننده گیاهان زینتی مختلف، درصد آلودگی گیاهان زینتی در پارک‌ها، بوستان‌ها و معابر برخی شهرهای استان خراسان شمالی به این ویروس‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در اوایل پاییز سال ۱۳۹۳ از پارک‌ها، بوستان‌ها و معابر دو شهرستان بجنورد و شیروان در استان خراسان شمالی، در مجموع ۴۰۰ نمونه گیاه زینتی (۲۰۰ نمونه از هر شهرستان) جمع‌آوری شد. کلیه‌ی نمونه‌های مربوط به گونه‌های مختلف گیاهی بر اساس نشانه‌های مشکوک به علائم ویروسی در زمان نمونه-برداری جمع‌آوری شدند. نام، تعداد و محل جمع‌آوری این نمونه‌ها در ادامه آمده است. این نمونه‌ها به ۹ خانواده و ۱۶ گونه گیاهی تعلق داشته و شامل برگ و ساقه‌های جوان گیاهان زینتی با انواع مختلف علائم شبه ویروسی از جمله رنگ پریدگی، بافت مردگی و لکه‌های حلقوی یا بدون علائم آشکار بودند و در شرایط خنک به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

شناسایی و ردیابی

به منظور ردیابی ویروس‌های ToRSV، TSWV، TBSV، ToMV، CMV و AMV از آزمون الایزا به روش ساندویچ دو طرفه آنتی بادی Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) مطابق روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷)، استفاده شد. در این آزمون برای ردیابی ویروس‌ها از آنتی بادی‌های چند همسانه‌ای موجود از کیت‌های تجاری شرکت بایوربا[1] (سوئیس) استفاده گردید. انجام آزمون الایزا جهت ردیابی ویروس‌ها طبق دستورالعمل شرکت تولیدکننده آنتی‌بادی به شرح زیر صورت گرفت: ایمنوگلوبولین

[1] Bioreba

Archive of SID

www.SID.ir

(IgG ویروس) با بافر پوششی به نسبت مورد نظر (۱:۱۰۰۰ برای ویروس‌های TSWV، ToRSV، CMV و ۱:۲۰۰ برای ویروس‌های TBSV، ToMV، AMV) مخلوط و در هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از آن ریخته شد. در ادامه، عصاره‌گیری از نمونه‌های برگی جمع-آوری شده با نسبت یک به پنج (یک گرم بافت برگ در پنج میلی‌لیتر بافر استخراج) در هاون چینی سرد انجام شد. پس از افزودن عصاره‌ی برگ به پلیت الایزا، آنتی بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (IgG -AP) با بافر کانجوگیت به همان نسبتی که قبلاً در مورد IgG ویروس ذکر شد، رقیق و به چاهک اضافه گردید. جهت تغییر رنگ چاهک‌ها از سوبسترای پارا نیترو فنیل فسفات (PNPP) استفاده شد. در این روش، سه مرحله شستشوی پلیت با بافر PBS-Tween انجام گردید. برای تهیه این بافر شستشو، ابتدا هشت گرم NaCl، ۰/۲ گرم KH_2PO_4، ۱/۱۵ گرم Na_2HPO_4، ۰/۲ گرم KCl و ۰/۵ گرم Tween 20 در هزار میلی لیتر آب حل شده و سپس pH آن روی ۷/٤ تنظیم شد. در این آزمون واکنش رنگ‌زایی نمونه‌های مثبت و حضور رنگ زرد با دستگاه الایزا خوان[1] مدل ELX 800- Biotek در طول موج ٤۰۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از فرمول $R= x + 3\ SD$ که در آن x میانگین جذب نمونه منفی، SD انحراف معیار چاهک‌ها و R سطح آستانه آلودگی می‌باشد، محاسبات صورت گرفته و نمونه‌های مثبت و آلوده به ویروس مشخص شدند.

مایه‌زنی بر روی گیاهان آزمون

به منظور مشاهده‌ی علائم و اثبات بیماری‌زایی این ویروس‌ها، نمونه‌های آلوده به ویروس که در آزمون الایزا مشخص شدند، به گیاهان محک مایه‌زنی شدند، مشخصات و مرحله مایه‌زنی این گیاهان در جدول ۱ آمده است. کاشت این گیاهان به صورت مستقیم بود به این شکل که ابتدا بذور گیاهان محک در گلدان‌های متوسط پلاستیکی در خاک متشکل از دو قسمت شن، دو قسمت خاک برگ و یک قسمت کود حیوانی کاشته شده و سپس در گلخانه تحت شرایط دما، رطوبت نسبی و نور مناسب نگهداری شدند. برای تلقیح گیاهان محک، بافر تلقیح مورد استفاده شامل بافر فسفات پتاسیم (شامل K_2HPO_4 و KH_2PO_4) ۰/۰۱ مولار با pH=۷، محتوی ۲- مرکاپتواتانول ۰/۱۵ درصد تهیه شد. نمونه‌های آلوده به ویروس که در هاون‌های چینی قرار داده شده بودند با دو میلی‌لیتر بافر تلقیح سرد عصاره‌گیری شدند، سپس بر روی برگ‌ها ساینده کربوراندوم[2] پاشیده شد تا نفوذ ویروس را تسریع کند و عصاره‌ها به طور جداگانه با استفاده از انگشت سبابه بر روی برگ مایه‌زنی گردیدند (به موازات رگبرگ‌ها به خصوص رگبرگ مرکزی). سه دقیقه بعد از مایه‌زنی، برگ‌ها برای حذف کربوراندوم اضافه شستشو داده شدند. مایه‌زنی در ساعات خنک روز در قبل از ظهر و یا در هنگام غروب صورت گرفت .گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط دمایی ۳۰-۲۵ درجه-ی سانتی‌گراد و نور غیر مستقیم در گلخانه نگهداری شدند و به منظور جلوگیری از حضور حشرات ناقل ویروس، در اطراف محیط نگهداری گلدان‌ها از توری استفاده شد. این گلدان‌ها مرتب آبیاری شده و برای ثبت چگونگی پیشرفت کار، هر روز از گیاهان بازدید بعمل آمد. تمام این گیاهان محک پس از ظهور علائم مجدداً با آزمون DAS-ELISA آزمایش شدند.

[1] Elisa Reader

[2] Carborundum

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- گیاهان محک مایه‌زنی شده با ویروس و مرحله مایه-زنی آن‌ها.

گیاه محک	نام علمی	مرحله مایه‌زنی
توتون	*Nicotiana glutinosa*	۴-۲ برگی
تاتوره	*Datura stramonium*	۴-۲ برگی
لوبیا چشم بلبلی	*Vigna unguiculata*	۴-۲ برگی
گوجه فرنگی	*Solanum lycopersicum*	۶-۲ برگی
خیار	*Cucumis sativus*	۴-۲ برگی

نتایج و بحث

نتایج حاصل از مشاهده‌ی ۴۰۰ نمونه گیاه زینتی جمع آوری شده، شیوع نسبتاً بالای علائم شبه ویروسی را در گیاهان زینتی استان خراسان شمالی نشان داد (شکل ۱). در این مطالعه ۴۰۰ نمونه از ۱۶ گونه گیاه زینتی در برابر شش بیماری ویروسی آلوده کننده گیاهان زینتی که اغلب از نظر اقتصادی مهم و دارای پراکنش جهانی بودند، آزمایش شدند. اکثر گیاهانی که در این تحقیق مورد آزمایش قرار گرفتند، به عنوان گیاهان زینتی باغچه‌ای یا فضای باز شناخته می‌شوند. نتایج آزمایش‌های سرولوژیکی و بیولوژیکی به غیر از ویروس AMV، حضور سایر ویروس‌های ToRSV، CMV، ToMV، TSWV و TBSV را در گیاهان زینتی مورد آزمایش مشخص کرد. در این پژوهش ۲/۲۵ درصد از گیاهان زینتی بررسی شده به بیش از یک ویروس آلوده بودند. آلودگی مخلوط به ویروس‌های TBSV و TSWV در داوودی، ویروس-های CMV و TSWV در آهار، ویروس‌های ToMV و TBSV در مارگریت و ویروس‌های ToMV ، TBSV و CMV در سیب‌زمینی شیرین مشاهده شد.

شکل ۱- علائم شبه ویروسی در برخی از گیاهان زینتی جمع آوری شده از استان خراسان شمالی.
الف. پیسک و بدشکلی در برگ گل همیشه بهار. ب و ج. لکه‌های بافت مرده در برگ گل همیشه بهار. د. موزائیک شدید در برگ گل همیشه بهار. ه. لکه‌های رنگ پریده در برگ گل رز. و. تغییر رنگ در برگ زرشک زینتی.

نتایج همچنین نشان داد که از مجموع ۴۰۰ نمونه گیاه زینتی آزمایش شده با آزمون سرولوژیکی الایزا ۲۱۱ نمونه (۵۲/۷۵٪) آلوده به ویروس و ۱۸۹ نمونه (۴۷/۲۵٪) فاقد آلودگی به شش ویروس فوق بودند. در بررسی‌های صورت گرفته از مجموع ۱۶ گونه گیاه زینتی مطالعه شده، ۹ گونه آلودگی و هفت گونه عدم آلودگی به بیماری‌های ویروسی را نشان دادند (جدول ۲). در بین ویروس‌های بررسی شده، ویروس TBSV بیشترین سطح آلودگی را در هر دو شهرستان بجنورد و شیروان داشت (شکل ۲). بر اساس نتایج این

www.SID.ir

پـژوهش، ویـروس‌هـای TBSV بـا ٤٠ نمونـه آلـوده (۲۰٪)، CMV با ۲۵ نمونه آلوده (۱۲/۵٪) و ToMV با ۱۹ نمونـه آلـوده (۹/۵٪) در شهرسـتان بجنـورد و همچنـین ویـروس‌هـای TBSV بـا ۳٤ نمونـه آلـوده (۱۷٪)، TSWV با ۲۸ نمونه آلوده (۱٤٪) و ToRSV بـا ۲۳ نمونـه آلـوده (۱۱/۵٪) در شهرسـتان شـیروان بـه عنوان شـایع‌تـرین ویـروس‌هـای آلـوده کننـده گیاهـان زینتی در این دو منطقه معرفی شدند (شکل‌های ۳ و ٤).

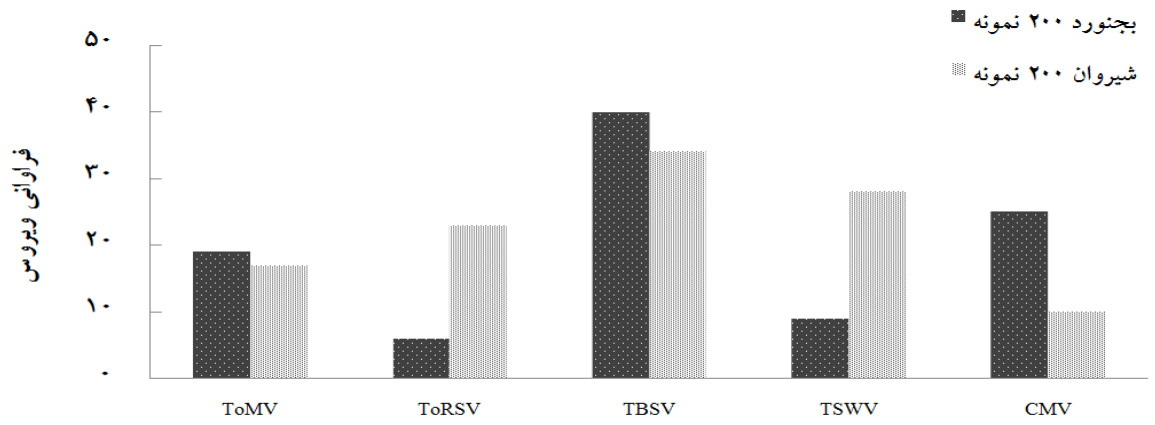
جدول۲- پراکنش ویروس‌های آلوده کننده گیاهان زینتی در استان خراسان شمالی.

گیاه زینتی	نام علمی گیاه	خراسان شمالی	بجنورد	شیروان	ToMV	ToRSV	TBSV	TSWV	CMV	AMV
گل جعفری	*Tagetes signata*	۲۰	۲۰	–	–	–	–	–	–	–
گل جعفری درشت	*Tagetes patula*	۲۰	۲۰	–	–	–	۱۰B*	–	–	–
رعنا زیبا	*Gaillardia pulchella*	٤٠	۲۰	۲۰	۸B + ۵S*	–	–	–	–	–
گل همیشه بهار	*Calendula officinalis*	۲۰	۲۰	–	–	–	–	–	۱۰ B	–
داوودی	*Chrysantheum indicum*	٤٠	۲۰	۲۰	–	–	۱۵B +۱۹ S	۹ S + ۵B	–	–
آهار	*Zinnia elegans*	۲۰	–	۲۰	–	–	–	۷ S	۷ S	–
مارگریت	*Leucanthemum superbum*	۲۰	–	۲۰	٦ S	–	۱۰ S	–	–	–
نیلوفر	*Ipomoea tricolor*	۲۰	۲۰	–	–	–	–	–	–	–
سیب زمینی شیرین	*Ipomoea batatas*	٤٠	۲۰	۲۰	۱۱B + ٦S	۱۰S + ٦B	۱۵ B + ۵S	–	۱۵ B + ۳S	–
گل رز	*Rosa hybrid*	٤٠	۲۰	۲۰	–	–	–	۱۲ S + ٤B	–	–
شمعدانی	*Pelargonium hortum*	۲۰	۲۰	–	–	–	–	–	–	–
تاج خروس زینتی	*Amaranthus caudatus*	۲۰	۲۰	–	–	–	–	–	–	–
اطلسی	*Petunia hybrid*	۲۰	–	۲۰	–	–	–	–	–	–
زرشک زینتی	*Berberis thunbergii*	۲۰	–	۲۰	–	–	–	–	–	–
اسطوخودوس	*Lavandula angustifolia*	۲۰	–	۲۰	–	–	–	–	–	–
گل مرواریدی	*Symphoricarpus racemosus*	۲۰	–	۲۰	–	۱۳ S	–	–	–	–
تعداد کل نمونه‌ها		٤۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۳٦	۲۹	۷٤	۳۷	۳۵	۰

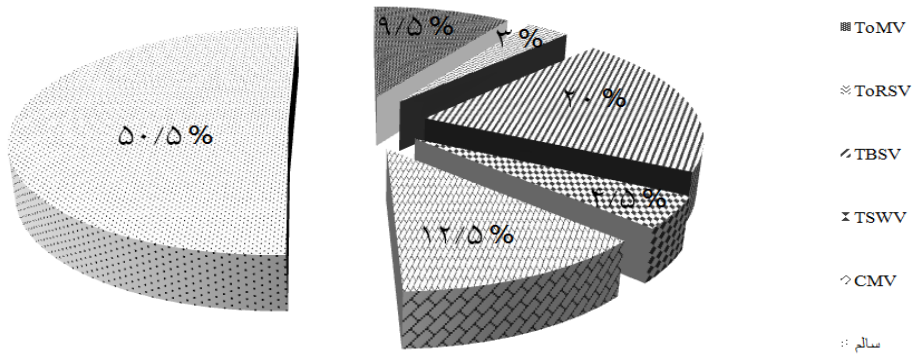
*** B:** بجنورد **S:** شیروان

Archive of SID

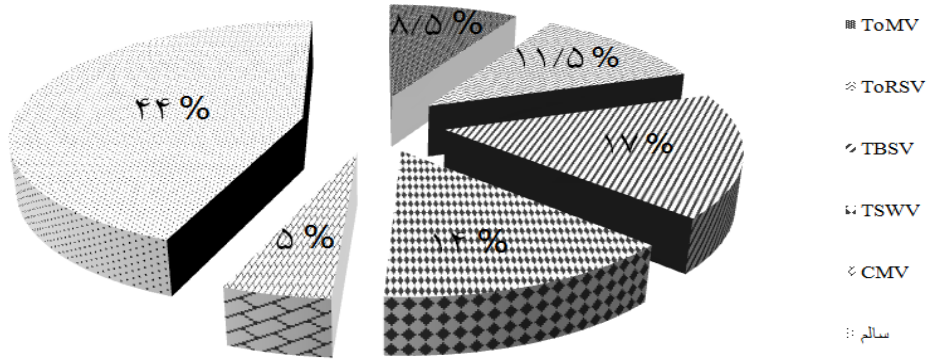
www.SID.ir



شکل ۲- فراوانی (تعداد نمونه) ویروس های آلوده کننده گیاهان زینتی در شهرستان های بجنورد و شیروان.



شکل ۳- درصد آلودگی به ویروس های مهم آلوده کننده گیاهان زینتی در شهرستان بجنورد.



شکل ۴- درصد آلودگی به ویروس های مهم آلوده کننده گیاهان زینتی در شهرستان شیروان.

در مایه‌زنی مکانیکی ویروس‌ها، تمام گیاهان محک اشاره شده علائم مشخص بیماری را نشان دادند (شکل ۵). علاوه بر این، مشاهده شد که در اغلب موارد شدت علائم روی این گیاهان در شرایط گرم‌تر بیشتر می‌شود. آلودگی تمام گیاهان محک مایه‌زنی شده با ویروس مجدداً با استفاده از آزمون الایزا تایید شد.

www.SID.ir

شکل ۵- علائم آلودگی در گیاهان محک مایه‌زنی شده با ویروس‌های مورد بررسی در این پژوهش.
الف. لوبیا چشم‌بلبلی مایه‌زنی شده با ویروس TSWV با علائم زخم‌های موضعی نکروتیک و رگبرگ زردی سیستمیک. ب. تاتوره مایه‌زنی شده با ویروس TSWV با علائم کلروز سیستمیک. ج. خیار مایه‌زنی شده با ویروس ToRSV با علائم سفید شدن رگبرگ و ایجاد لکه‌های نکروز. د. توتون مایه‌زنی شده با ویروس ToRSV با علائم پیسک و رگبرگ روشنی موضعی. ه. خیار مایه‌زنی شده با ویروس TBSV با علائم ابلقی سیستمیک. و. توتون مایه‌زنی شده با ویروس TBSV با علائم پیسک و رگبرگ روشنی موضعی. ز. گوجه فرنگی مایه‌زنی شده با ویروسToMV با علائم موزائیک و تغییر شکل برگ. ح. خیار مایه‌زنی شده با ویروس ToMV با علائم رگبرگ روشنی و نکروز. ط. توتون مایه‌زنی شده با ویروس CMV با علائم موزائیک سیستمیک، بدشکلی برگ و لکه‌های نکروتیک.

از بین این شش ویروس آلوده کننده گیاهان زینتی،TBSV بیشترین و ToRSV کمترین میزان آلودگی را در استان داشت و آلودگی به ویروس AMV در هیچ یک از نمونه‌های گیاهان زینتی مشاهده نشد (جدول ۲). اگر چه TSWV بیشترین درصد آلودگی را در گیاهان زینتی استان‌های شمالی ایران دارد (قطبی و شهرآیین ۲۰۱۲) با این وجود، نتایج این پژوهش نشان داد که در استان خراسان شمالی TBSV به عنوان شایع‌ترین ویروس آلوده‌کننده گیاهان زینتی در بین ویروس‌های بررسی شده محسوب می‌شود. این اولین گزارش از آلودگی وسیع گیاهان زینتی استان و همچنین ایران به ویروس TBSV است. با توجه به مناسب بودن شرایط محیطی استان برای فعالیت قارچ *Olpidium bornovans* به عنوان ناقل قارچی ویروسTBSV، عدم استفاده کافی از گیاهچه‌های عاری از ویروس و گواهی شده، نداشتن امکانات پیشرفته آزمایشگاهی در محل پست‌های قرنطینه‌ای و همچنین وجود گزارش از آلودگی مزارع گوجه‌فرنگی استان به ویروس TBSV، شیوع بالای TBSV می‌تواند قابل توجیه باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

در این تحقیق ویروس TSWV از روی گیاهان زینتی داوودی، آهار و رز گزارش شد که با نتایج معینی و ایزدپناه (۱۳۷۹)، قطبی و شهرآیین (۲۰۱۲)، مرشدی و همکاران (۲۰۱۳) و شوشتری (۱۳۸۹) مطابقت داشته و نامبردگان نیز آلودگی به ویروس TSWV را حداقل در یکی از این سه گیاه زینتی گزارش کرده‌اند. در این تحقیق ویروس CMV از روی گیاهان زینتی گل همیشه بهار، آهار و سیب‌زمینی شیرین گزارش شد که از این بین گل همیشه بهار و سیب-زمینی شیرین به عنوان میزبان های جدید زینتی برای این ویروس معرفی شدند. آلودگی گیاه زینتی آهار به ویروس CMV با نتایج کایزر و همکاران (۱۹۷۱)، رحیمیان و ایزد پناه (۱۹۷۸)، ایزدپناه (۱۳٦۱) و بهار و همکاران (۱۳٦۲) مطابقت داشته و نامبردگان نیز آلودگی به ویروس CMV را در آهار گزارش کرده‌اند. در این تحقیق برای اولین بار گیاهان زینتی سیب زمینی شیرین و گل مرواریدی به عنوان میزبان‌های جدید زینتی برای ویروس ToRSV و گیاهان زینتی گل جعفری، داوودی، مارگریت و سیب زمینی شیرین به عنوان میزبان‌های جدید زینتی برای ویروس TBSV معرفی شدند. ویروس ToMV از جمله مهم‌ترین ویروس‌های آلوده کننده محصولات زراعی در ایران بوده و توسط ذبیحی (۱۳۹۱) از مزارع گوجه فرنگی استان خراسان شمالی گزارش شد. با این وجود گزارش جامعی از آلودگی گل‌های زینتی در استان و حتی ایران به این ویروس وجود ندارد و این اولین گزارش از آلودگی گیاهان زینتی به ویروس ToMV در کشور است. بر اساس گزارش‌های سایر محققین، آلودگی ویروسی گیاهان زینتی در کشور بیشتر مربوط به ویروس‌های TSWV، ToRSV و CMV بوده و تاکنون از مناطق مختلف به ویژه شمال کشور گزارش شده‌اند (ایازپور ۱۳۹۳).

از گیاهان علائم‌دار بررسی شده، ٤٧/٢٥ درصد به آنتی بادی‌های مربوط به هر یک از این شش ویروس واکنش نشان ندادند. عدم وجود واکنش مثبت ممکن است به دلیل آلودگی به دیگر ویروس‌های رایج در گیاهان زینتی مانند TMV، TuMV، BYMV یا ویروس‌های نهفته باشد (قطبی و شهرآیین ۲۰۱۲). خسارت‌های ناشی از آلودگی‌های ویروسی در گیاهان زینتی بسته به ترکیب ویروس و میزبان می‌تواند از ۱۰ تا ۱۰۰ درصد باشد (لوئبنستین و همکاران ۱۹۹۵). مهم‌ترین راهکار مقابله با بیماری‌های ویروسی بر مبنای پیشگیری از اشاعه بیماری استوار است، با توجه به این که روش تکثیر اغلب گیاهان زینتی از طریق رویشی است در این راستا ایجاد گیاهچه‌ها، پیازها و قطعات رویشی مطمئن و عاری از ویروس یکی از راه‌های موثر در جلوگیری از شیوع بیماری‌های ویروسی در گیاهان زینتی است. بنابراین لزوم راه-اندازی و توسعه‌ی سیستم تولید گیاهچه‌های عاری از ویروس در داخل کشور از سوی تولیدکنندگان به عنوان یک نیاز همیشگی مطرح است.

سپاس‌گزاری

از مدیریت حفظ نباتات خراسان شمالی به خاطر حمایت مالی بخش‌هایی از این پژوهش قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از خانم مهندس مرضیه ذبیحی بابت کمک‌های بی‌دریغشان نهایت تشکر را دارم.

منابع

ایازپور ک، ۱۳۹۳. فهرست الفبایی ویروس‌های گیاهی و ویروئیدهای ایران. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم.

Archive of SID

www.SID.ir

ایزدپناه ک، ۱۳٦۱. لیست مشروح بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی گیاهان در فارس. انتشارات دانشگاه شیراز.

بهار م، دانش د و فیلسوف ف، ۱۳٦۲. شیوع و شناسایی ویروس‌های آلوده کننده خیار در اصفهان. هفتمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۱٦-۱۲ شهریور ماه، کرج.

بی نام، ۱۳۹۳. آمار نامه کشاورزی ایران. اداره کل آمار و اطلاعات وزارت کشاورزی.

بی نام، ۱۳۹۲ الف. آمار نامه کشاورزی ایران. اداره کل آمار و اطلاعات وزارت کشاورزی.

بی نام، ۱۳۹۲ ب. آمار گل و گیاهان زینتی. پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی ایران. تاریخ دسترسی: ۱۵ فروردین ۱۳۹۳. www.niop.ir

ذبیحی م، ۱۳۹۱. شناسایی ویروس‌های گوجه‌فرنگی در مزارع استان خراسان‌شمالی و بررسی بیولوژیکی و مولکولی ویروس غالب در منطقه. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

زین‌الدینی ا، ۱۳۸۱. بررسی و تعیین پراکنش ویروس موزاییک یونجه در مناطق شمالی و مرکزی استان خراسان. پایان نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

سبک خیز م ع، جعفر پور ب، فلاحتی‌رستگار م، نصیری م ر و فارسی م، ۱۳۸۳. شناسایی و تعیین پراکنش ویروس موزاییک خیار در مزارع شمال استان خراسان. نشریه علوم و صنایع کشاورزی، دوره هجدهم، شماره ۱. صفحه‌های ۱٦۹تا ۱۷۳.

شوشتری س، ۱۳۸۹. بررسی ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی (TSWV) با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و مولکولی در سطح استان خراسان رضوی. پایان نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

عباسی‌فر ا، ۱۳۸۲. خبرهای ویژه گیاهان زینتی. دومین سمینار علمی- کاربردی گل و گیاهان زینتی ایران، ۲٤-۲۳ مهر ماه، محلات.

فرزادفر س، پوررحیم ر، گل نراقی ع.ر و شهرآیین ن، ۱۳۷۹. ردیابی نژاد پیچیدگی برگ شمعدانی ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه فرنگی در شمعدانی‌های منطقه ورامین. چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۱۷-۱٤ شهریور ماه، اصفهان.

کامران ر و ایزدپناه ک، ۱۳۵۹. جداسازی و شناسایی ویروس های BYMV و ToRSV از روی گلایول در شیراز. نشریه بیماری‌های گیاهی، دوره هفدهم، شماره ٤. صفحه های ۱ تا ۷.

معینی ا و ایزدپناه ک، ۱۳۷۹. میزبان‌های جدید ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی در تهران. نشریه بیماری‌های گیاهی، دوره سی و ششم، شماره ۱. صفحه های ۱۰٤ تا ۱۰۵.

معینی ا، سهندپور ا و ایزدپناه ک، ۱۳۷۷. شناسایی ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی در گیاهان زینتی و گوجه فرنگی در شیراز. سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۵-۱ شهریور ماه، کرج.

Archive of SID

www.SID.ir

Aghamohammadi V, Rakhshandehroo F, Shams-bakhsh M and Palukaitis P, 2013. Distribution and genetic diversity of Tomato mosaic virus isolates in Iran. Journal of Plant Pathology 95: 339-347.

Alexandre MAV, Soares RM, Rivas EB, Duarte LML, Chagas CM, Saunal H, Van Regenmortel MHV and Richtzehain LJ, 2000. Characterization of a strain of Tobacco mosaic virus from Petunia. Journal of Phytopathology 148: 601-607.

Anonymous, 2005. Tomato ringspot nepovirus. EPPO Bulletin 35: 313–318.

Anonymous, 2012. Market in live plants and floriculture productsstatistics and reports. European Commission, Agriculture and Rural Developments. http://ec.europa.eu/cgi bin/etal.pl

Asma A, Zahoor A, Farzana B, Ubairah and Neelam R, 2015. Varietal reaction of Cucumber against Cucumber mosaic virus. American Journal of Plant Sciences 6: 833-838.

Awatif SA, Faiza AF and Radwa MF, 2015. Physiological responses to infection by Tomato bushy stunt virus in different host plants. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 8: 438-448.

Card SD, Pearson MN and Clover GRG, 2007. Plant pathogens transmitted by pollen. Australasian Plant Pathology 36:455-461.

Clark MF and Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked Immunosrobent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34:475- 483.

Ghotbi T and Shahraeen N, 2012. Incidence and distribution of viruses infecting propagated ornamentals in Northern Iran. International Research Journal of Microbiology 3 : 373-381.

Hollings M and Huttinga H, 1976. Tomato mosaic virus. CMIAAB Descriptions of Plant Viruses No 156.

Hsu HT and Maroon-Lango C, 2003. Management of viral diseases in floral and nursery crops: Advances in Plant Disease Management. United States Department of Agriculture: ARS Press. 413-429 pp.

Kaiser WJ, Mosahebi G and Okhovat M, 1971. Alternative hosts of viruses affecting food legumes in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 7: 85.

Loebenstein G, Lawson RH and Brunt AA, 1995. Virus and virus-like disease of bulb and flower crops. Wiley & Sons publisher 543 pp.

Luis-Arteaga M, Rodriguez-Cerezo E, Fraile A, Saez E and Garcia-Arenal F, 1996. Different Tomato bushy stunt virus strains that cause disease outbreaks in solanaceous crops in Spain. Phytopathology 86: 535-542.

Mahmoodi Safa J, Nasrolahnejad S and Mostafavi Neishaburi F, 2016. Detection and identification of Tomato Ring Spot Virus in ornamental plants in North Khorasan Province. Journal of Ornamental Plants 6: 141-150.

Margaria P, Bosco L, Vallino M, Ciuffo M, Mautino GC, Tavella L and Turina M, 2014. The NSs protein of Tomato spotted wilt virus is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*. Journal Virology 88: 5788-5802.

Margaria P, Ciuffo M, Rosa C and Turina M, 2015. Evidence of a Tomato spotted wilt virus resistance-breaking strain originated through natural reassortment between two evolutionary-distinct isolates. Virus Research 196:157–161.

Mohammadi Hajiabadi A, Jafarpour B, Falahat Rastegar M and Babak Abdollahi Mandoulakani B, 2009. Detection of Tomato spotted wilt virus in North-East of Iran. Journal of Food, Agriculture and Environment 7: 471 – 474.

Moini AA, 2010. Identification of Tomato ringspot virus (ToRSV) on apple in Iran. Australian Plant Disease Note 5: 105–106.

Archive of SID

www.SID.ir

Morshedi Sh, Maleki M and Ghotbi T, 2013. Biological and serological detection of TSWV on three commercial cultivars in *Chrysanthemum morifolium* in Markazi Province of Iran. Annals of Biological Research 4: 112-119.

Nascimento LC, Pensuk V, Costa NP, Deom CM and Sherwood J, 2006. Evalution of peanut genotypes for resistance to Tomato Spotted Wilt Virus by mechanical and thrips inoculation . Pesq. Agropec . bras , Brasilia 41: 937-942.

Pinkerton JN, Kraus J, Martin RR and Schreiner RP, 2008. Epidemiology of *Xiphinema americanum* and Tomato Ringspot Virus on red raspberry, Rubus idaeus. Plant Disease 92: 364-371.

Rahimian H and Izadpanah K, 1978. Identity and prevalence of mosaic inducing Cucurbit Viruses in Shiraz, Iran. Phytopathologische Zeitschrift 92: 305-312.

Rasoulpour R and Izadpanah K, 2007. Characterization of Cineraria strain of Tomato yellow ring virus from Iran. Australasian Plant Pathology 36: 286-294.

Walker MC, Chisholm J, Wei T, Ghoshal B, Saeed H, Rott M and Sanfaçon H, 2015. Complete genome sequence of three tomato ringspot virus isolates: evidence for reassortment and recombination. Archives of Virology 160: 543-547.

Archive of SID

www.SID.ir

Infection Determine of Ornamental Plants to Some Important Viral Diseases in North Khorasan Province by ELISA

J Mahmoodisafa*[1], S Nasrolahnejad[2], M Rezai[3]and FS Mostafavi Neishaburi[4]

[1]MSc Student, Dept. of Plant Pathology,Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Associate Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[3]Former MSc Student, Dept. of Plant Pathology, North Khorasan Province
[4]PhD Student in Plant Pathology, Zabol University.
*Corresponding author: Javad.simsafa@yahoo.com

Received:17 Jul 2015 Accepted:18 Oct 2015

Abstract

In recent years, the symptoms of viral diseases such as Mosaic, Paleness and Ring spots have spread on ornamental plants of North Khorasan province. In order to detect important viral diseases in ornamental plants of North Khorasan Province, a total of 400 samples of ornamental plants were collected and transported to the laboratory. All of the samples were evaluated by DAS-ELISA serological test with polyclonal antibodies to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato ring spot virus* (ToRSV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Alfalfa mosaic virus* (AMV). The positive Samples in ELISA test were inoculated on indicator plants for observation of the symptoms. All the indicator plants distinctive symptoms of diseases in the mechanical inoculation. The results of the ELISA test showed that 211 samples of total 400 ornamental plant samples, were infected with different viruses. Also the results indicated that among 16 ornamental species including *Tagetes signata*, *Tagetes patula*, *Gaillardia pulchella*, *Calendula officinalis*, *Chrysantheum indicum*, *Zinnia elegans*, *Leucanthemum superbum*, *Ipomoea tricolor*, *Ipomoea batatas*, *Rosa hybrid*, *Pelargonium hortum*, *Amaranthus caudatus*, *Petunia hybrid*, *Berberis thunbergii*, *Lavandula angustifolia*, and *Symphoricarpus racemosus*; 9 species infected and 7 species were virus free. Of the six viruses of infecting ornamental plants, TBSV and ToRSV had the highest and lowest infection frequency (incidence) in this province respectively, and infection with AMV was not observed in any of the tested samples.

Keywords: DAS-ELISA, Mechanical inoculation, Ornamental plants, Serological test, Viral diseases.

Archive of SID

www.SID.ir