

خالص سازی و تعیین غلظت دو ویروس عامل موزائیک روی چغندر قند در منطقه کرج

محمود اخوت^۱، صادق جلالی^۲، غلامحسین مصاحبی^۳ و شیرین قربانی^۴

۱، ۲ و ۳- استاد، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

۴ - عضو هیأت علمی گروه زیست شناسی دانشگاه الزهرا، تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۷/۱۳

خلاصه

طی بررسی های انجام شده و نتایج کاربرد آنتی سرم های مختلف، وجود دو ویروس موزائیک چغندر قند (BMV) و موزائیک خیار (CMV) را به عنوان عامل بیماری موزائیک چغندر قند در منطقه کرج مشخص کرد. طیف جذبی هر دو ویروس بررسی گردید، که به ترتیب ۲۴۰-۲۶۰ و ۲۲۰-۲۶۰ نانومتر تعیین شد و غلظت آنها برابر با ۰/۳۵ و ۰/۹۸ میلی گرم در میلی لیتر آماده خالص شده نهائی بود. در آزمون رسوب در قطرات کوچک تیتراستی سرم های تهیه شده بر علیه ویروس موزائیک چغندر قند برابر ۲۵۶ و برای ویروس موزائیک خیار معادل ۵۱۲ تعیین گردید. تحقیقات انجام شده پیرامون پراکندگی ویروس های جدا شده از چغندر قند در کرج و اطراف آن نشان داد که میزان پراکندگی (BMV) در تمام مناطق مورد بررسی به مراتب بیشتر از CMV می باشد. بدلیل انتشار و پراکندگی وسیع ویروس موزائیک چغندر قند، تأثیر آن در شرایط گلخانه روی میزان تولید بذر، قوه نامیه و امکان بذرزاد بودن مورد مطالعه قرار گرفت و ملاحظه شد که میزان بذر تولیدی کاهش قابل توجه داشته ولی تأثیری در قوه نامیه و بذرزاد بودن نداشت.

واژه های کلیدی: چغندر قند، ویروس موزائیک چغندر قند، ویروس موزائیک خیار، خالص سازی،

تعیین غلظت

مقدمه

محصول و اقدام در جهت جلوگیری از آنها اهمیت بسزایی

دارد. چغندر (*Beta vulgaris* L.) یکی از مهمترین گیاهان

زراعی بوده که دارای چهار کولتیوار (رقم) مهم می باشد.

برای بهره گیری از امکانات و عوامل مؤثر در تولید

محصولات کشاورزی، شناسایی عوامل مؤثر در کاهش

- مکانیه کننده: محمود اخوت

زیروس در گلخانه بوده است که انتشار آن در طبیعت نیز می‌تواند مؤثر باشد. از هندوستان شارما و همکاران (۱۵) گزارش کرده‌اند که نژادی از ویروس موزائیک خیار (CMV) توانسته است با بذر خربزه رقم‌های PS, HM به ترتیب به میزان ۱۰ و ۲۸ درصد انتقال یابد. این ویروس توسط گونه‌های سس (*Cuscuta spp.*) و بذر گیاهان مختلف نیز منتقل شده اما هیچگونه آلودگی به ویروس از بذر چغندر قند های آلوده مشاهده نشده است و انتقال آن نیز مکانیکی و توسط گونه‌های مختلف شته‌ها به طریقه ناپایا صورت می‌گیرد (۷).

هدف از این تحقیق چگونگی خالص سازی و تعیین غلظت ویروس‌های عامل موزائیک چغندر قند، مورد نظر می‌باشد. در این بررسی از دو گروه ویروس زیر از چغندر قندهای آلوده به موزائیک که از مناطق مختلف کرج به دست آمده و با توجه به دامنه میزبانی، خواص فیزیکی، آزمایش‌های سرولوژیکی و مشاهدات میکروسکوپ الکترونی شناسائی شده بود استفاده گردید (۳).

مواد و روشها

۱ - خالص سازی ویروس های عامل موزائیک چغندر قند در این مورد دو گروه ویروس بشرح زیر خالص سازی شد گروه ۱، ویروس موزائیک چغندر قند (Beet Mosaic Virus, BMV)، برای خالص سازی این ویروس از جدایه کمال آباد کرج از چغندر قند بهره‌گیری بعمل آمد که روی ارقام سلمک (*Chenopodium spp.*) ایجاد لکه موضعی کرده و خالص سازی بیولوژیک شده بود. برای این کار از روش خالص سازی فوجی ساوا و همکاران (۱۰) که جهت خالص سازی این ویروس (آموده) بکار رفته است استفاده شد.

از بین ارقام مزبور چغندر رقم *B.v. cv. altissima* از نظر اقتصادی اهمیت بیشتری داشته و علاوه بر نقش تغذیه در خوراک دام و انسان، از جنبه ایجاد اشتغال در صنایع گوناگون نیز حایز اهمیت فراوان است. مقدار قند ریشه‌های چغندر قند بین ۲۰-۱۴ درصد در ارقام مختلف می‌باشد که از لحاظ اقتصادی و سوددهی در خور توجه است (۱۸). میانگین عملکرد محصول چغندر قند در دنیا ۳۷۲۲۱ کیلوگرم در هکتار گزارش شده که میزان آن در ایران ۲۴۸۵۰ کیلوگرم بر اوورد شده است. عملکرد در فرانسه ۷۶۰۴۶ و در استرالیا به ۵۹۰۷۵ کیلوگرم می‌رسد (FAO, 1998). عوامل بیماریزای مختلف و از جمله ویروسها باعث کاهش محصول و میزان قند در چغندر می‌شوند. بر اساس تحقیقات انجام شده در سراسر دنیا تا کنون ۱۶ ویروس مختلف می‌تواند در طبیعت، چغندر قند را آلوده نماید، برخی ویروسها علائم موزائیک روی این گیاه ایجاد می‌کنند که از آن جمله می‌توان به ویروسهایی از جنس های *Geminiviruses, Cucumoviruses, Potyviruses* اشاره کرد (۵).

خسارت ناشی از برخی ویروسها به تنهایی یا توأم بسیار سنگین بوده و می‌تواند موجب کاهش شدید محصول گردد (۱۲). وجود این بیماریها روی چغندر قند در ایران از مناطق مختلف گزارش شده و اهمیت آنها مورد توجه قرار گرفته است (۱ و ۲). مطالعات نشان داده که ویروس موزائیک چغندر قند (BMV) به طریقه مکانیکی با عصاره حاوی ویروس از روی چغندر قند به راحتی قابل انتقال است (۱۴). طبق نتایج بنت (۷) این ویروس توسط بذر و گیاه سس انتقال نمی‌یابد ولی در طبیعت توسط بیش از ۲۸ گونه شته بطریقه ناپایا منتقل می‌شود. بر اساس گزارش سمرز و نیوتن (۱۶). شته مومی گندم (*Diuraphis noxia*) قادر به انتقال این

۰/۰۱ مولار با $\text{pH}=7$ رقیق و پس از گذشت یک شب و انجام یک ساترینفوژ افتراقی رسوب نهایی در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با $\text{pH}=7$ رقیق و پس از گذشت یک شب و انجام یک ساترینفوژ افتراقی در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با $\text{pH}=7$ حل شده و به عنوان نمونه خالص ویروس (آموده) جمع آوری شد.

گروه ۲- برای خالص سازی این ویروس از جدایه کمال آباد کرج از چغندر قندهای آلوده به ویروس موزائیک خیار (Cucumber Mosaic Virus, CMV) که روی باقلای رقم الجزایری لکه‌های موضعی ایجاد کرده و خالص سازی بیولوژیک شده بود استفاده گردید. به این منظور از روش تاملینسون و همکاران (۱۷) که برای خالص سازی ویروس موزائیک خیار بکار رفته است با سه میزبان کدو (*Cucumis pepo* L.)، گل تکمه‌ای (*Gomphrena globosa* L.) و *Nicotiana tabacum* L. cv. white burley به طور مجزا استفاده شد. برای این کار ۱۵۰ گیاه کدو رقم هیبرید مسمایی در مرحله ۲ برگگی، ۱۰۰ بوته گل تکمه‌ای در مرحله ۶ برگگی و ۱۰۰ گیاه توتون در مرحله ۴ برگگی به ترتیب مایه زنی شدند. بعد از ۱۲ روز برگهای آلوده کدو و توتون و پس از ۱۸ روز برگهای گل تکمه‌ای برداشت و با بافر فسفات ۰/۵ مولار حاوی ۰/۰۰۱ مولار EDTA و ۰/۱ درصد اسنید تیوگلیکولیک با $\text{pH}=7/5$ (بازای یک میلی لیتر برای هر گرم برگ) در هاون چینی استریل عصاره‌گیری و با پارچه ململ صاف گردید و هم حجم عصاره به آن دی اتیل اتر اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه به هم زده و سپس ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰g. ساترینفوژ فاز مایع موجود در ته هر لوله با پی پت جمع آوری و در یک بشر به مدت ۱ ساعت در حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا اتر موجود در آن تبخیر

به این ترتیب که تعداد ۱۰۰ گلدان حاوی بوته‌های سالم چغندر رقم سیکلا (*Beta vulgaris* L. cv. cicla) در مرحله ۳ برگگی با جدایه کمال آباد مایه زنی شد. ۱۵ روز بعد از مایه زنی برگهای دارای علائم موزائیک، برداشت و پس از حذف رگبرگهای اصلی، توزین و درهاون چینی استریل در حرارت ۶ درجه سانتی گراد با بافر بُرات ۰/۵ مولار حاوی ۰/۰۵ مولار EDTA و ۰/۱ درصد اسید تیوگلیکولیک با $\text{pH}=8$ به نسبت یک گرم برگ و ۱/۵ میلی لیتر بافر عصاره‌گیری شد.

عصاره حاصل توسط پارچه ململ صاف گردید و به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر عصاره ۱ میلی لیتر تریتون ۱۰۰-X اضافه شد و به مدت یک ساعت در حرارت ۶ درجه سانتی گراد به هم زده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵۰۰g. ساترینفوژ (مدل Beckman با روتور Spinco شماره 30) گردید. به فاز مایع پلی اتیلن گلیکول (با وزن مولکولی ۶۰۰۰ و ۴ گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر عصاره) اضافه و به مدت ۲ ساعت در حرارت ۶ درجه سانتی گراد به هم زده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵۰۰g. ساترینفوژ گردید، رسوب حاصل در بافر بُرات ۰/۰۵ مولار حاوی ۰/۰۰۲ مولار EDTA با $\text{pH}=8$ رقیق و یک شب در یخچال نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵۰۰g. ساترینفوژ و فاز مایع جمع آوری شد.

محلول ۳۰ درصد ساکارز در بافر بُرات ۰/۰۵ مولار تهیه و به آن ۴ درصد پلی اتیلن گلیکول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دست به شدت به هم زده شد. در هر لوله ساترینفوژ ۱۴ میلی لیتر از این محلول ریخته و ۱۸ میلی لیتر از آموده ویروس به آرامی روی محلول در هر لوله قرار گرفت و به مدت ۱۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰g. ساترینفوژ شد. رسوب حاصل در هر لوله با یک میلی لیتر بافر فسفات

سپس سرم خون جدا و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰g (برای حذف گلبول‌های باقیمانده) سانتریفوژ و به میزان ۱/۵۰۰۰ سدیم آزاید اضافه و در شیشه‌های استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰). برای انجام تست‌های سرولوژیک نشئت متقابل در آگار در مورد این ویروس از محیط ذیل شامل: ۰/۸ گرم آگار یا ۰/۶ گرم (آگارز)، ۰/۸۵ گرم نمک طعام، ۰/۰۵ گرم سدیم آزاید و ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با $\text{pH}=7/2$ استفاده شد و برای شکستن پیکره‌ها، عصاره حاوی ویروس را با حجم برابر از سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۰/۱ درصد مخلوط و به مدت ۳-۴ دقیقه در آب در حال جوش حرارت داده و پس از سرد شدن در حفرات ایجاد شده در ژل ریخته شد. بدین ترتیب شروع تشکیل خط رسوب بعد از ۸ ساعت مشاهده گردید.

برای تهیه آنتی سرم بر علیه ویروس موزائیک خیار ابتدا به فاصله یک هفته دو تزریق ۱ میلی‌لیتری آماده و ماده FCA در عضله پای خرگوش و دو هفته پس از آن تزریق ۱ میلی‌لیتری از همان نمونه در رگ کناری لاله گوش انجام شد و یک هفته بعد از آخرین تزریق، خون‌گیری از لاله گوش دیگر انجام گرفت (۱۷) و مانند روش ذکر شده قبلی آنتی‌سرم تهیه گردید. سرم نرمال از خرگوش‌ها قبل از تزریق ویروس با خون‌گیری از رگ کناری لاله گوش به میزان ۱۰ میلی‌لیتر تهیه شد که در آزمایشات سرولوژی به عنوان شاهد در کنار آنتی سرم استفاده گردید. مناسب‌ترین محیط برای تست‌های سرولوژیک نشئت متقابل در آگار همان محیط پیشنهادی تاملینسون و همکاران (۱۷) بود که شامل ۰/۶ گرم آگارز ۰/۸۵ گرم نمک طعام ۰/۲ گرم سدیم آزاید و ۱۰۰ میلی‌لیتر K_2HPO_4 ۰/۰۵ مولار حاوی ۰/۰۵ مولار EDTA با $\text{pH}=7/8$ بود. در تمام آزمایش‌ها پس از برگردن

گردد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفوژ شد و رسوب موجود در هر لوله با یک میلی‌لیتر بافر دی‌سدیم تترائترات با $\text{pH}=9$ حاوی ۰/۰۰۵ مولار EDTA حل شد و به مدت ۲۰ ساعت در ۱۰۰C درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰g سانتریفوژ و فاز مایع به عنوان نمونه خالص ویروس (آموده) جمع‌آوری گردید.

۲- اسپکتروفتومتری و تعیین غلظت ویروس‌های جدا شده

میزان خلوص آموده‌های ویروس با تعیین میزان جذب نور ماورای بنفش در طول موج‌های ۲۲۰-۳۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu-vu-۱۶۰) اندازه‌گیری و منحنی آنها توسط چاپگر دستگاه رسم گردید. برای تعیین غلظت ویروس (C) (برحسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر) میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر (OD) با استفاده از فرمول $C=OD/E$ محاسبه شد.

مقدار E (ضریب Extinction) برای ویروس موزائیک چغندر قند برابر با ۲/۶ (۱۰) و برای ویروس موزائیک خیار برابر با ۵ (۹) می‌باشد.

۳- تهیه آنتی سرم

جهت تهیه آنتی سرم بر علیه ویروس موزائیک چغندر قند یک تزریق ۱ میلی‌لیتر آموده در رگ کناری لاله گوش خرگوش و پس از یک هفته سه تزریق ۰/۵ میلی‌لیتری از آن و با حجم مساوی از Freund's complete adjuvant به فاصله یک هفته در عضله پای خرگوش صورت گرفت. سه هفته بعد از آخرین تزریق، عمل خون‌گیری از رگ کناری لاله گوش به میزان کم انجام شد و پس از سرولوژی به روش نشئت متقابل در آگار و مشاهده رسوب، خون‌گیری اصلی به میزان ۲۵ میلی‌لیتر از رگ کناری لاله گوش اجرا گردید. ظرف محتوی خون به مدت ۴ ساعت در حرارت اتاق و یک شب در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و

شاهد با یکدیگر مخلوط شدند. پتری درون کیسه پلاستیکی قرار داده شد و در حرارت اتاق ۲۵°C نگهداری و نتایج بعد از ۲ و تا ۱۲ ساعت توسط بینوکلر مشاهده و ثبت گردید.

۵- تعیین ویروس غالب در منطقه

برای تعیین ویروس غالب در مناطق چغندرکاری اطراف کرج در سالهای ۷۱-۱۳۷۰ از مزارع چغندرکاری مناطق مختلف نمونه برداری شد (جدول ۱).

۷- بررسی تأثیر جدایه مورد مطالعه از گروه یک (ویروس سوزائیک چغندرقد) روی چغندرقد

با توجه به مطالعات انجام شده مشخص شد که ویروس سوزائیک چغندرقد (BMV) در منطقه کرج نسبت به ویروس سوزائیک خیار (CMV) از پراکندگی بیشتری برخوردار بود لذا بررسی های زیر روی BMV انجام گرفت (جدول ۲).

۱-۷ - تأثیر بر میزان تولید بذر

جهت بررسی اثر ویروس سوزائیک چغندرقد روی میزان

حفرات با آنتی سرم ر عصاره حاوی ویروس، پتری حامس محیط را همراه با یک کاغذ مرطوب درون کیسه پلاستیکی قرار داده و در انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شد.

۴- عیار سنجی (Titration) آنتی سرم های تهیه شده

روش بال (Ball, 1990)

ابتدا یک الگوی ۸×۸ خانه در کف یک پتری پلاستیکی استریل رسم گردید و دوردیف ۷ تایی لوله آزمایش به قطر ۰/۵ میلی متر (یک ردیف برای آنتی سرم و یک ردیف برای آماده ویروس) تهیه شد. از طریق رقیق سازی متوالی غلظت های مختلفی به نسبت $\frac{1}{3}$ تا $\frac{1}{128}$ برای آماده ویروس تهیه گردید. برای رقیق سازی آنتی سرم به نسبت $\frac{1}{33}$ تا $\frac{1}{2/48}$ آماده شد (جلالی ۱۳۷۲). توسط میکرو پی پت قطره های ۸ میکرو لیتری از آنتی ژن و آنتی سرم در درون هر مربع ایجاد شده در کف پتری قرار داده شد و از پایین ترین رقت آنتی سرم و آنتی ژن با یک میله شیشه ای استریل مخلوط شدند. مربع های ردیف هشتم حاوی آنتی ژن و بافر و مربع های ستون هشتم حاوی آنتی سرم و بافر به عنوان

جدول ۱- نمونه برداری از مزارع چغندرکاری اطراف کرج

نام محل	تعداد مزارع بازدید شده	تعداد نمونه *
- کمال آباد	۸	۱۷۵
- هشتگرد	۴	۶۲
- شهریار	۵	۹۱
- مشکین آباد	۳	۴۲
- ساوجبلاغ	۶	۵۷
جمع	۲۶	۴۲۷

*نمونه های فوق با استفاده از روشهای معمول در ویروس شناسی گیاهی بررسی و عوامل آنها مورد شناسایی قرار گرفتند. نمونه ها

در کیسه های فریزر و در کنار یخ داخل یخدان به آزمایشگاه منتقل شد.

۳-۷ - بررسی تأثیر ویروس موزائیک چغندر قند بر روی محصول ریشه

برای این منظور آزمایش گلخانه‌ای به صورت طرح کامل تصادفی جهت مطالعه تأثیر ویروس در کاهش محصول ریشه سه رقم مختلف چغندر قند (pp22, pp8, Ic1) دریافت شده از مؤسسه اصلاح و تهیه بذر و نهال کرج) انجام گرفت. آزمایش در ۴ تکرار با ۴ گلدان به قطر دهانه ۳۰ سانتی متر حاوی یک بوته انجام شد، بوته‌ها در مرحله ۶ برگگی با عصاره حاوی ویروس و پودر کاربورات دوم، و بوته‌های شاهد با عصاره گیاه سالم و پودر کاربورات دوم مایه زنی شدند. در طول رشد بوته‌های سالم شاهد و بوته‌های آلوده هر دو هفته یکبار با سم شسته کش سم پاشی گردید. بوته‌ها بعد از ۴ ماه برداشت و ریشه‌ها بعد از شستشو، توزین و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

۱- خالص سازی و اسپکتروفتومتری نمونه‌های خالص ویروس

۱-۱- تعیین غلظت ویروس موزائیک چغندر قند

پس از خالص سازی ویروس موزائیک چغندر قند بر اساس روش فوجی ساوا و همکاران (۱۰) بررسی طیف جذبی (Absorption spectrum) آماده خالص شده این ویروس در طول موجهای ۳۲۰-۲۲۰ نانومتر نشان داد که حداکثر میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر و حداقل جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر می‌باشد. غلظت ویروس در آماده نهایی برابر با ۰/۳۵ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید.

۱-۲- تعیین غلظت ویروس موزائیک خیار

خالص سازی ویروس موزائیک خیار با استفاده از روش تاملینسون و همکاران (۱۷) انجام شد فاز مایع شیرینی رنگ در بررسی طیف جذبی دارای حداکثر جذب در طول موج

تولید بذر، آزمایشی با ۵۰ گلدان، هر گلدان به قطر دهانه ۳۰ سانتی متر حاوی یک بوته چغندر قند رقم ۲۷۳۳ انتخاب شد. ۲۵ عدد از بوته‌ها بطور تصادفی انتخاب، و در مرحله ۶ برگگی مایه زنی شدند و ۲۵ بوته دیگر با عصاره گیاه سالم همراه با پودر کاربورات نام بعنوان شاهد مایه زنی گردیدند و در شرایط گلخانه گذاشته شد. ۳۰ روز بعد از مایه زنی گیاهان را به اتاقک رشد برده و در حرارت 1 ± 6 درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ روز نگهداری شدند تا سرمای لازم را جهت به ساقه رفتن و تسریع در تولید بذر به منظور طی دوره Vernalizing دریافت کنند. سپس بوته‌ها در گلخانه و در حرارت 4 ± 23 قرار گرفتند، بعد از به ساقه رفتن بوته‌ها و تولید بذر، از گیاهان سالم و آلوده بطور مجزا بذریگیری شد و پس از خشک شدن، آنها توزین و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با این روش گیاهانی که برای تولید بذر نیاز به طی دو سال و زمستان گذرانی دارند به زمان کمتری کاهش می‌یابند.

۲-۷ - تأثیر ویروس موزائیک چغندر قند بر قوه نامیه بدور حاصل از

گیاهان آلوده

تعداد ۴۰۰ عدد بذر بدست آمده از گیاهان آلوده و ۴۰۰ بذر مربوط به گیاهان سالم بعد از ضد عفونی سطحی بر روی کاغذ صافی استریل و مرطوب در درون پتری (۵۰ بذر در هر پتری) گذاشته شده و در حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و پس از چند روز با مشاهده بذر جوانه زده در پتری ها، تعداد بذر جوانه زده محاسبه و نتایج مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی امکان انتقال ویروس توسط بذر از برگهای اولیه بذر جوانه زده، مربوط به گیاهان آلوده عصاره گیری و با مایه زنی روی سلمک *Chenopodium quinoa* L. بعنوان گیاه محک و نشست دوطرفه در آگار مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۲- پراکنندگی ویروس‌های جدا شده در مزارع چغندرکاری کرج

نام محل	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه آلوده به (BMV)	تعداد نمونه آلوده به CMV
۱- کمال آباد	۱۷۵	۱۶۷	۸
۲- هشتگرد	۶۲	۶۲	-
۳- شهریار	۹۱	۸۶	۵
۴- مشکین آباد	۴۲	۴۲	-
۵- ساوجبلاغ	۵۷	۵۷	-
جمع	۴۲۷	۴۱۴	۱۳

چغندر قند آلوده فقط ۱۳ نمونه به ویروس موزائیک خیار آلودگی نشان داد.

۴- تأثیر ویروس موزائیک چغندر قند روی تولید بذر و قوه نامیه

بدلیل انتشار و پراکنندگی وسیع ویروس موزائیک چغندر قند در مزارع چغندر کاری کرج، تأثیر این ویروس روی میزان تولید بذر، قوه نامیه و امکان بذر زاد بودن آن مورد مطالعه قرار گرفت. با مایه زنی عصاره حاوی ویروس موزائیک چغندر قند بر روی برگ بوته‌های چغندر قند رقم ۲۷۳۳ مشاهده شد که گیاهان شاهد سالم در قیاس با بوته‌های آلوده رشد بهتری داشتند. بوته‌ها پس از ۵۰ روز سرمادهی در دمای 1 ± 6 درجه سانتی گراد بطور یکنواخت به ساقه رفتند و تولید گل و سپس بذر نمودند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تأثیر ویروس موزائیک چغندر قند در کاهش میزان بذر قابل توجه است بطوریکه میانگین تولید بذر برای هر بوته سالم برابر با $8/97$ گرم و برای هر بوته آلوده معادل $5/11$ گرم برآورد شد.

با قرار دادن ۴۰۰ عدد بذر ضد عفونی شده حاصل از گیاهان آلوده و همین تعداد از بذور مربوط به گیاهان سالم در

۲۶۰ نانومتر و حداقل جذب در ۲۲۰ نانومتر بود. غلظت ویروس در آماده نهایی برابر با $0/98$ میلی گرم در میلی لیتر تعیین گردید.

۲- تعیین تیتراژ آنتی سرمهای تهیه شده

با استفاده از آزمون رسوب در قطرات کوچک بر اساس روش بال (۶) تیتراژ آنتی سرمهای تهیه شده بر علیه دو ویروس CMV, BMV مورد سنجش قرار گرفت، در این آزمایش وجود حالت ابری در هر یک از قطرات بعنوان واکنش مثبت تعیین گردید. بر اساس نتایج به دست آمده تیتراژ آنتی سرمهای تهیه شده بر علیه ویروس موزائیک چغندر قند برابر با ۲۵۶ و برای ویروس موزائیک خیار معادل ۵۱۲ بود.

۳- تعیین ویروس غالب در منطقه

بررسی‌های انجام شده پیرامون پراکنندگی ویروس‌های جدا شده در کرج و اطراف آن طبق جدول شماره ۲ نشان می‌دهد که میزان پراکنندگی ویروس موزائیک چغندر قند در تمام مناطق مورد بررسی به تعداد ۴۱۴ عدد بود که به مراتب بیشتر از ویروس موزائیک خیار است. از ۴۲۷ نمونه

Porth, et al., 1987 در خالص سازی نژاد BMV-V از گیاه توتون *Nicotiana benthamiana* غلظت آن را ۰/۱ میلی گرم در هر میلی لیتر نمونه خالص ذکر نموده‌اند.

خالص سازی ویروس موزائیک خیار بر اساس روش تاملینسون و همکاران (Tomlinson et al., 1973) انجام شد و نتایج به دست آمده از اسپکتروفتومتری آماده‌های مختلف نشان داد که استفاده از توتون ایت بـارلی *N. tabacum cv. white burley* به دلیل غلظت بالا و خلوص بیشتر مناسب‌تر از کدو می‌باشد. با این روش آنتی سرم تهیه شده تیتراژی برابر ۵۱۲ و غلظت ۰/۹۸ میلی گرم در میلی لیتر داشت. ویروس موزائیک خیار دارای پیکره‌های چند وجهی (Polyhedral) به قطر تقریبی ۲۹ نانومتر با تقارن ۲۰ وجهی و ۲ نوع پیکره از گروه Cucumovirus با ضریب ته نشینی یکسان است. (Lot&Kaper, Froncki et al., 1976). 1979 در زمینه خالص سازی این ویروسها روشهایی را بکار برده‌اند، آنها برای خالص سازی بیشتر از ستون سوکروز استفاده کرده‌اند.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبار پژوهشی دانشگاه تهران در دانشکده کشاورزی کرج انجام شده است که بدین وسیله مراتب تشکر خود را از معاونت های پژوهشی دانشکده و دانشگاه اعلان می‌دارد.

شرایط مرطوب، هیچگونه تأثیر معنی داری در قوه نامیه و رشد جوانه‌های مربوط به بذور گیاهان آلوده در قیاس با گیاهان سالم مشاهده نشد. در آزمایشهای سلولژیکی عصاره این جوانه‌ها در مقابل آنتی سرم مربوط به ویروس موزائیک چغندر قند واکنش مثبتی مشاهده نشد که بیانگر عدم بذر زاد بودن این ویروس در گیاه چغندر قند است.

بحث

خالص سازی و تهیه آنتی سرم بر علیه ویروس‌های جدا شده

خالص سازی ویروسهای متعلق به گروه پوتی ویروس (Potyvirus) به دلیل غلظت پایین ویروس در بافت میزبان و خاصیت تجمع‌گرایی (Aggregation) پیکره آنها در عصاره‌گیری گیاهی به سختی انجام می‌گیرد. در این تحقیق پیکره‌های BMV رشته‌ای انعطاف‌پذیر بود، قربانی و نوروزی در ۱۳۷۰ با مطالعه عصاره خام برگهای آلوده توسط میکروسکوپ الکترونی طول آنها را ۷۴۰ نانومتر گزارش داده‌اند. در این تحقیق پس از تکثیر ویروس موزائیک چغندر قند در چغندر برگ *Beta vulgaris cv. cicla* بر اساس روش فوجی ساوا (Fujisawa et al., 1983) با تغییرات جزئی خالص سازی آن انجام گرفت و آنتی سرم آماده آن با تیتراژ ۲۵۶ و غلظت ۰/۳۵ میلی گرم در میلی لیتر تهیه گردید. فوجی ساوا و همکاران در ۱۹۸۳ بعد از خالص سازی این ویروس طول آنها را ۹۰۰-۱۰۰ نانومتر و ۴۵/۵ درصد پیکره‌های آن را ۷۵۰-۷۰۰ نانومتر دانسته‌اند. نامبردگان غلظت ویروس خالص شده را ۰/۷-۰/۵ میلی گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم برگ ذکر کرده‌اند.

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. اسکندری، ف. آل آقان. ا.، حجارود، ق. و م. ع. رضائیان، ۱۳۴۸. بیماریهای چغندر قند در ایران. نشریه طرح بررسی بیماریهای مهم نباتات. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ۵۶ صفحه.
۲. ایزدپناه، ک. ۱۳۶۱. لیست مشروح بیماریهای ویروسی و شبه ویروسی گیاهان در فارس. دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز. ۱۷۱ صفحه.
۳. جلالی، ص. ۱۳۷۲. ویروسهای عامل موزائیک چغندر قند در منطقه کرج. پایان نامه فوق لیسانس در رشته بیماری شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۰۶ صفحه.
۴. قربانی، ش. و ر. نوروزی. ۱۳۷۰. مطالعه سیتولوژیک برگهای چغندر قند آلوده به ویروس موزائیک چغندر قند در ایران. دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه شهید باهنر. کرمان. صفحه ۱۲۴.
5. Agrios, 1997. Plant pathology. Plant diseases caused by viruses. Academic press, 479-556.
6. Ball, E. M. 1990. Agar double diffusion plate (Ouchterlony) Viruses, in serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. APS press. 389 pp.
7. Bennett, C. W. 1944. Studies of dodder transmission of plant viruses. Phyto. 34: 905-932.
8. FAO, 1998. Centre of documents and statistics, Ministry of Agriculture, Tehran, Iran.
9. Francki, R. I. B. Mossop, D. W. and Hatta, T. 1979. Cucumber mosaic virus. No. 213. CMI/AAB. Description of plant viruses.
10. Fujisawa, I., Tsuchizaki, T. and Izuka, N. 1983. Purification and serology of beet mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. JPN. 49:22-31.
11. Lot, H. and Kaper, J. M. 1976. Physical and Chemical differentiation of three strains of cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. Virology 74: 209-222.
12. Mukhopadhyah, A. N. 1987. Handbook on diseases of sugar beet. Vol. 2, CRC press, 177 pp.
13. Porth, A., Lesemann, D. E. and Vetten, H. J. 1987. Characterization of potyvirus isolates from west African yams. J. Phytop. 120: 166-183.
14. Russel, G. E. 1971. Beet mosaic virus. No. 53, CMI/AAB Description of plant viruses.
15. Sharma, O. P., Khatri, H. L., Bansel, R. O. and Komal, H.S. 1982. A new strain of cucumber mosaic virus causing mosaic disease of Muskmelon. Phytop. Z. 109: 332-340.
16. Summer, C. G. and Newton, A. S. 1990. Transmission of beet yellows and beet mosaic virus by non

colonizing aphid vectors. *Journal of Economic Entomology*. 83: 2448-2451.

17. Tomlinson, J. A., Carter, A. L., Faithfull, E. M. and Webb, M. J. 1973. Purification and serology of the W strain of cucumber mosaic virus, *Ann. App. Biol.* 74: 181-189.
18. Whitney, E. D. and J. E. Duffus, 1986. *Compendium of beet diseases and insects*. APS press, 79 pp.

**Purification and Concentration Determination of 2 Viruses Causing
Mosaic in Sugar Beet in Karaj Region, Iran.**

**M. OKHOVVAT¹, S. JALALI², GH. H. MOSSAHEBI³
AND SH. GHORBANI⁴**

**1, 2, 3- Professor, Former Graduate Student, Assistant Professor, Faculty of
Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. 4- Associate Professor,
Biology Department, University of Alzahra, Tehran, Iran.**

Accepted Oct. 4, 2000

SUMMARY

Investigations on sugar beet mosaic, through different antisera methods used, showed that sugar beet mosaic virus (BMV) and cucumber mosaic virus (CMV) caused the disease in sugar beet in Karaj region. The viruses were purified using differential centrifugation. The virus yields in the final preparations were 0.35 mg/ml. for BMV and 0.98 mg/ml. for CMV , absorption spectrum of them were 260-240 and 260-220 nanometers respectively. Antisera against the above mentioned viruses were prepared in rabbit then titrated. Titration for BMV and CMV were 256 and 512 respectively in microprecipitin tests. Research in distribution of the isolated viruses showed that BMV (414 from 427 samples) was more widely spread than CMV (13 from 427 samples) in all areas. Because of wider distribution and spread of BMV than the other, its effect on seed production, ability to germinate and seed bearing potential were studied. The results indicated considerable reduction in seed production, but no effect on germination or seed bearing ability.

Key words: Sugarbeet, Beet mosaic virus, Cucumber mosaic virus, Purification, Concentrate.