Archive of SID

بررسی پراکنش ویروس کرلی‌تاپ چغندرقند و شناسایی سایرمیزبان‌های زراعی آن در استان اصفهان

Investigation on dissemination of beet curly top virus and identification of other cultivated hosts in Esfahan province

صادق جلالی[1]

چکیـده:

برای تعیین دقیق ماهیت بیماری و شناسائی کانون‌های اصلی آلودگی و سایر میزبان‌های ویروس پیچیـدگی بـرگ چغندرقنـد (Beet curly top virus) در مـزارع چغندرقنـد اسـتان اصـفهان شـامل شهرستان‌های مبارکه، مهیار، سمیرم، اردستان و مناطق برخوار و رودشت نسبت به جمع‌آوری بوته‌هـای دارای علائم بیماری کرلی‌تاپ اقدام گردید. برای انتقال عامل بیماری به بوته‌های پرورش یافته در گلخانه از روش مایه‌زنی استفاده شد که ۲۵/۲۶ درصد بوته‌های مایه‌زنی شده آلودگی به ویروس را نشان داد. در این تحقیق مشخص گردید که مناطق مهیار، مبارکه و برخوار به ترتیـب بـا ۷۰، ۶۶/۵ و ۳۱/۲ درصـد از کانون‌های اصلی آلودگی به بیماری می‌باشند و در سایر نقاط آلودگی بین یک تا سه درصد برآورد گردید. با نمونه‌برداری‌های متوالی از مزارع چغندرقند انتخابی در طول فصل زراعی مشخص گردید که حداکثر آلـودگی در ماه‌های اردیبهشت و خرداد اتفاق می‌افتد.

از سـایر گیـاهان زراعـی مـورد مـطالـعـه گیـاه کنـجـد (*Sesamum indicum*) , لوبیـا (*Phaseolus vulgaris*) و خیار (*Cucumis sativus*) آلودگی طبیعی به ویروس کرلـی‌تـاپ را نـشان دادند که آلودگی طبیعی در کنجد برای اولین بار از ایران گزارش می‌گردد همچنین گیاه منـداب(*Eruca sativa*) در منطقه به عنوان میزبان زمستانه ویروس و زنجرک‌های ناقل شناخته شد.

واژه‌های کلیدی : ویروس کرلی‌تاپ، چغندرقند، استان اصفهان، کانون آلودگی، میزبان، پراکنش، شناسائی

۱- پژوهنده بخش تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویروس پیچیدگی برگ چغندرقند (Beet curly top virus) یکی از مهم‌ترین عوامل بیماریزای ویروسی در چغندرقند می‌باشد این بیماری اولین بار در سال ۱۸۸۸ در نواحی غربی آمریکا مشاهده شد و در دهه ۱۹۲۰ در آن نواحی به شدت گسترش یافت به طوری که موجب توقف کاشت چغندرقند گردید و صنایع قندسازی را به ورشکستگی کشانید.

از زمان مشاهده بیماری مطالعات گسترده‌ای برای پیدا نمودن ارتباط بین عامل بیماری و زنجرک‌های چغندرقند انجام گرفت. بال (Ball, 1905) اولین ارتباط بین عامل بیماری و تغذیه زنجرک چغندرقند (*Circulifer tenellus* Baker) را گزارش نمود.

تا سال ۱۹۵۵ تصور این بود که بیماری محدود به نواحی غربی آمریکا است تا اینکه در همان سال بیماری از مزارع چغندرقند در منطقه (Eskisehir) ترکیه گزارش شد و مشخص گردید که بیماری در غرب ترکیه گسترش داشته و میزان آلودگی آن ۳۲ درصد برآورد شد .در سال ۱۹۶۷ برای اولین بار بیماری کرلی تاپ در مزارع چغندرقند مرودشت و زرقان فارس مشاهده و گزارش شده است. با مشاهده و گسترش بیماری مزبور در ایران نمونه‌هایی از زنجرک مزارع چغندرقند در فارس جمع‌آوری و برای شناسائی به آمریکا فرستاده شد که در بین آنها دو گونه زنجرک بنامهای (*Circulifer tenellus* (Baker. و (*C.opacippennis* (Leth. به عنوان ناقلین این ویروس شناخته شدند. گیبسون (Gibson, 1970) گزارش نمود. که درصد آلودگی مزارع در ممسنی فارس بیش از ۹۰ درصد می‌باشد.

گسترش و میزان آلودگی به بیماری کرلی تاپ در ایران بررسی گردید به طوری که در مزارع چغندرکاری منطقه فسا میزان آلودگی تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است. عامل بیماری ویروسی است از گروه ویروس‌های دوقلو (Geminiviridae) با پیکره‌های چندوجهی (Polyhedral) به قطر ۲۰ نانومتر که به صورت منفرد یا جفت جفت بوده و ژنوم آن از نوع DNA تک رشته‌ای و حلقوی شکل است. انتقال مکانیکی ویروس به سختی انجام می‌گیرد اما مامفورد (Mumford, 1972) توانسته است با تزریق عصاره گیاه آلوده به طوقه بوته‌های چغندرقند ۴۰ روزه، ۳۸ درصد بوته‌های مایه‌زنی شده را آلوده نماید، هر چند که یک ایزوله مصری ویروس را با بافر اختصاصی توانسته‌اند به طور مکانیکی بر روی برگ چغندرقند انتقال دهند.

این ویروس در طبیعت توسط دو گونه زنجرک C.*opacippennis* (Leth.) و (*C.tenellus* Baker) منتقل می‌شود. اما در ایالات متحده تنها ناقل ویروس گونه *C.tenellus* و در ترکیه گونه *C.opacippennis*

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد. مدت زمان لازم جهت اخذ ویروس توسط ناقل حدود دو تا چهار ساعت است، راندمان انتقال با افزایش زمان نیز افزایش می‌یابد (از ۴۴ درصد در مدت دو ساعت به ۷۶ درصد در مدت چهار ساعت) و حداقل زمان لازم جهت انتقال ویروس به بوته‌های سالم[1] یک دقیقه بوده است، مدت زمان لازم برای انتقال مجدد ویروس (دوره کمون[2]) توسط ناقل به گیاه سالم در حدود چهار ساعت می‌باشد. شناسایی کانون‌های اصلی آلودگی و سایر میزبان‌های ویروس که موجب شیوع این بیماری در منطقه شده، از اهداف اصلی این تحقیق بوده است.

مواد و روش‌ها

الف - شناسائی ماهیت بیماری و انتقال آن

به منظور شناسائی دقیق ماهیت بیماری از مزارع مختلف چغندرقند در مناطق برخوار، رودشت و شهرستان‌های مبارکه، مهیار ، اردستان و سمیرم بازدید و در هر منطقه مزارعی انتخاب گردید. از هر مزرعه چند بوته که آلوده به بیماری بودند و علائمی مانند پیچیدگی و وجود نقاط برجسته در روی رگبرگ‌ها در پشت برگ را نشان می‌داد با ریشه از خاک بیرون آورده و مجدداً در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متری همراه با خاک ضدعفونی شده کشت و به عنوان جدایه آن منطقه در گلخانه نگهداری شد.

برای انتقال عامل بیماری از بوته‌های آلوده به بوته‌های سالم از روش مامفورد (Mumford) استفاده گردید. به همین منظور ابتدا بذرهای چغندرقند رقم(IC1) با هیپوکلریدسدیم ضدعفونی و پس از شستشوی مجدد با آب در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک ضدعفونی شده کشت شد. پس از سبز شدن بوته‌ها، از هر گلدان یک بوته انتخاب و بوته‌های اضافی حذف گردید. عمل مایه‌زنی عصاره گیاهان آلوده به بوته‌های ۴۸ روزه چغندرقند پرورش یافته در گلخانه انجام گرفت . جهت تهیه پرپاراسیون ویروس ابتدا از برگ‌های جوان بوته‌های آلوده چغندرقند همراه با بافر فسفات ۰/۰۲ مولار حاوی ۰/۰۱ مولار Na_2SO_3 در هاون چینی استریل عصاره‌گیری و عصاره حاصل از پارچه ململ چهار لایه عبور داده و صاف گردید. برای غلظت بیشتر ویروس ابتدا عصاره صاف شده رابه مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و فاز مایع (Supernatant) را جمع‌آوری نموده و در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد درون فریزر قرار داده شد. در زمان مایه‌زنی ابتدا عصاره فریز شده را در دمای اتاق ذوب و به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و فاز مایع به عنوان ماده تلقیح (Inoculum) جمع‌آوری گردید. جهت تلقیح عصاره حاوی ویروس به گیاهان سالم چغندرقند ابتدا سه برگ از هر بوته توسط اسکالپل از محل تاج بوته قطع سپس

www.SID.ir

1.Inoculative feeding
2. Latent period

Archive of SID

توسط سرنگ یک بار مصرف مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره مزبور درون محل قطع شده تزریق شد .

ب - شناسائی کانون‌های اصلی آلودگی و تعیین درصد آلودگی در هر منطقه

برای شناسائی کانون‌های اصلی آلودگی در استان و همچنین تعیین درصد آلودگی به بیماری، در هر منطقه چغندرکاری حداقل دو مزرعه چغندرقند انتخاب و در هر مزرعه چهار قطعه به عنوان چهار تکرار به طور تصادفی انتخاب گردید و کل بوته‌های موجود در هر قطعه پس از وجین و تنک شدن (چهار تا شش برگی) شمارش و بدنبال آن در طول فصل زراعی‌هر ۲۰-۱۵ روز یکبار تعداد بوته‌هایی که آلودگی به ویروس را نشان می‌دادند شمارش گردید، و تا زمان ۲۲-۲۰ برگی بوته‌ها ادامه داشت. علاوه بر علائم ظاهری در بوته‌های آلوده، در هر مرحله چند بوته آلوده به طور تصادفی انتخاب و در آزمایش سرولوژیک نشت متقابل در آگار در مقابل آنتی سرم مربوط به ویروس آزمایش گردید.

ج - شناسائی سایر میزبان‌های زراعی ویروس کرلی تاپ

به منظور شناسایی سایر میزبان‌های ویروس، از گیاهان زراعی مانند خیار ، لوبیا، کنجد و پنبه که به طور معمول در مناطق چغندرکاری در طول فصل‌های بهار و تابستان کشت می شود بررسی بعمل آمد. بوته‌هایی که علائم مشکوک به بیماری کرلی‌تاپ را نشان می‌دادند جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافته در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در فریزر موجود در بخش نگهداری و توسط آزمون سرلوژی نشت متقابل در آگار در مقابل آنتی سرم مربوط به ویروس اهدایی دکتر وقار از کشور پاکستان آزمایش گردید.

د - شناسایی میزبان‌های زمستانه ویروس

برای شناسایی میزبان‌هایی که موجب بقای ویروس در فصل زمستان می‌باشند از مزارع چغندرقند برداشت شده علف‌های هرز شامل: کاردی (*Plantago lanceolata*)، شیرتیغک (*Sonchus* sp.)و منداب (*Eruca sativa*) جمع‌آوری و در آزمایشگاه در مقابل آنتی‌سرم ویروس کرلی‌تاپ توسط آزمون نشت متقابل در آگار آزمایش شدند همچنین از بوته‌های چغندرقند جامانده در زمین در اوایل بهار نمونه‌برداری و آلودگی ویروس در آنها بررسی شد.

نتایج

الف - ماهیت بیماری و انتقال آن

در بوته‌های چغندرقند (رقم IC1) پرورش یافته در گلخانه که توسط روش شرح داده شده با عصاره گیاه آلوده مایه‌زنی شدند پس از ۱۶ روز اولین علائم آلودگی به بیماری در ۲۵/۲۶ درصد بوته‌های مایه‌زنی شده ظاهر گردید. این علائم شامل پیچیدگی

www.SID.ir

Archive of SID

برگ‌های جوان، زردی رگبرگ‌ها و نهایتاً ظهور برجستگی‌های سوزن مانند (Enation) در پشت برگ‌ها بود (شکل ۱)، ریشه بوته‌های آلوده شده پس از ۶۰ روز از زمان آلودگی دارای دوایر متحدالمرکز نکروزه در برش عرضی بودند (شکل ۲) عصاره گیاهان آلوده در مقابل آنتی‌سرم مربوط به ویروس کرلی‌تاپ نیز واکنش مثبت نشان داد (شکل ۳) .

ب - شناسائی کانون‌های اصلی آلودگی و تعیین درصد آلودگی

با توجه به داده‌های به دست آمده از آماربرداری‌های منظم مزارع چغندرقند انتخابی، مناطق: مهیار، مبارکه و برخوار (کمشچه) به ترتیب با ۷۰، ۶۶/۴ و ۳۱/۲ درصد آلودگی بوته‌ها به عنوان کانون‌های اصلی آلودگی در استان شناخته شدند، درصد آلودگی در سایر مناطق مورد بازدید مانند اردستان، سمیرم و رودشت بین یک تا سه درصد برآورد گردید (جدول ۱).

ج - شناسائی سایر میزبان‌های زراعی

از گیاهان زراعی مورد مطالعه سه گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) ، کنجد (*Sesamum indicum*) و خیار (*Cucumis sativus*)، آلودگی طبیعی به ویروس پیچیدگی برگ چغندرقند را نشان دادند علائم آلودگی در لوبیا شامل کوتولگی شدید بوته، زردی برگ‌ها و وجود برجستگی‌های سوزن مانند در پشت برگ و صمغزدگی از ناحیه دمبرگ‌ها بود.

علائم آلودگی در کنجد عبارت بود از کوتولگی شدید بوته‌ها، زردی تمام برگ‌ها ، عدم گل‌دهی و برگشتگی برگ‌ها به طرف پائین (Epinasty) و صمغ زدگی از ناحیه دمبرگ در محل اتصال به ساقه (شکل ۴). علائم آلودگی در بوته‌های خیار شامل کوتولگی شدید بوته ، کوتاه شدن فاصله بین برگ‌ها، چرمی شدن برگ‌ها و عدم گلدهی بوته‌ها بود. (شکل ۵)

د - شناسائی میزبان‌های زمستانه

از علف‌های هرز جمع‌آوری شده از مزارع چغندرقند در طول فصل زمستان تنها درگیاه منداب *(Eruca sativa)* که هم به عنوان گیاه زمستانه کشت می‌شود و هم به صورت خودرو در مزارع منطقه مشاهده می‌گردد آلودگی طبیعی به ویروس کرلی‌تاپ را نشان داد، این گیاه میزبان مناسبی برای زمستان گذرانی زنجرک‌های ناقل ویروس نیز می‌باشد. علائم آلودگی در بوته‌های بیمار شامل کوتولگی همراه با زردی برگ بود (شکل۶). همچنین بوته‌های چغندرقند باقی مانده در زمین از منابع اصلی بقای ویروس در زمستان بوده به طوری که اکثر این بوته‌ها آلودگی به ویروس را نشان دادند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

با توجه به نتایج حاصل از آزمون سرولوژیک نشت متقابل در آگار و نیز انتقال بیماری به بوته‌های چغندرقند پرورش یافته در گلخانه به طور مکانیکی، وجود بیماری پیچیدگی برگ چغندرقند (Beet curly top virus) در مناطق مورد مطالعه به اثبات رسید. در این بررسی علاوه بر چغندرقند، گیاه کنجد که به طور معمول در این مناطق کشت می‌گردد به عنوان یک میزبان حساس به ویروس برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. خسارت بیماری در این محصول چشمگیر بوده و لازم است جهت کنترل بیماری در این گیاه مطالعات بیشتری انجام گیرد.

نقش گیاه منداب که در مناطق مورد مطالعه خصوصاً مهیار و مبارکه و برخوار کشت آن به عنوان علوفه رایج است و هم به صورت پراکنده در اطراف مزارع و جویهای آب می‌روید در بقای ویروس و ناقلین آن در زمستان و گسترش بیماری در اوایل فصل اهمیت زیادی دارد. همچنین بوته‌های چغندرقند باقی مانده در زمین نیز در بقای ویروس در زمستان اهمیت دارند به طوری که در بعضی از مناطقی که بوته‌های چغندرقند در زمین باقی مانده‌اند در اوایل بهار رشد نموده و اولین منابع آلوده به ویروس می‌باشند. یکی از دلایل دیگر شیوع بیشتر بیماری در مناطق مذکور کشت زود هنگام و عدم آبیاری منظم (به دلیل آبیاری غلات) می‌باشد که به همین دلیل رشد بوته‌ها کند و همپوشانی آنها به تاخیر افتاده و همین امر موجب می‌گردد تا زنجرک‌های آفتاب دوست ناقل به بوته‌های منفرد بیشتری دسترسی داشته باشند، در صورتی که در مناطقی مانند رودشت و سمیرم که تاریخ کاشت چغندر پس از اتمام آبیاری غلات (اوایل خرداد) است، بوته‌ها به دلیل آبیاری منظم رشد سریعتری داشته و همپوشانی به سرعت اتفاق افتاده و آلودگی محدود به حاشیه مزارع می‌گردد.

جدول ۱- میانگین روند آلودگی در بوته‌های چغندرقند به ویروس کرلی‌تاپ از مرحله چهار تا ۲۲ برگی در مناطق مختلف استان اصفهان

Table 1 Mean infection rating of sugar beet from 4 to 22 leaves stage to (BCTV) in various regions of Esfahan province

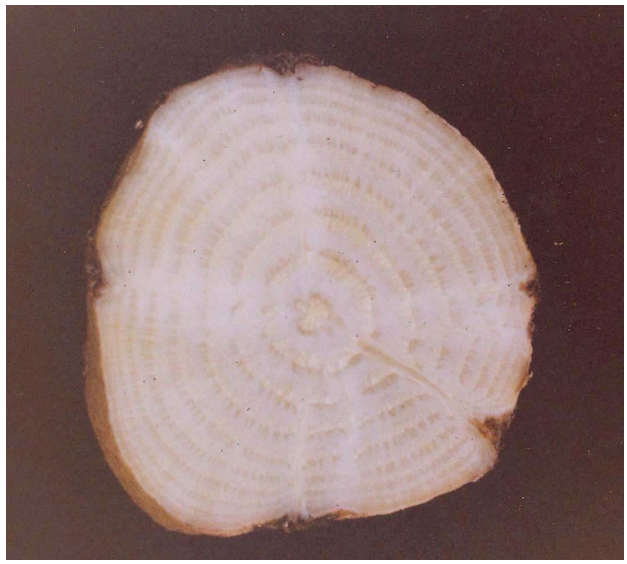
محل Area	تعداد کل گیاهان Total Plants	تعداد گیاهان آلوده در مراحل مختلف از نظر تعداد برگ No.of infected plants in various leaf stages							درصد آلودگی % infection
		4 - 6	6 - 8	8 - 10	10 –12	12 14	16 18	20 -22	
مهیار Mahyar	523	4	14	33	159	230	333	366	70.0
مبارکه Mobarakeh	548	6	18	39	201	255	341	364	66.4
برخوار Borkhar	624	1	5	9	53	87	131	195	31.2
رودشت Ruddasht	486	0	2	5	5	5	6	8	1.6
سمیرم Semirom	671	0	0	0	1	3	6	6	0.9
اردستان Ardestan	566	2	7	11	11	13	16	19	3.3

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- وجود نقاط برجسته در روی رگبرگ‌ها و چروکیدگی برگ چغندرقند در اثر آلودگی به ویروس کرلی تاپ

Fig.1 Sugar beet leaf showing crinkling and enation on veins induced by infected by curly top virus

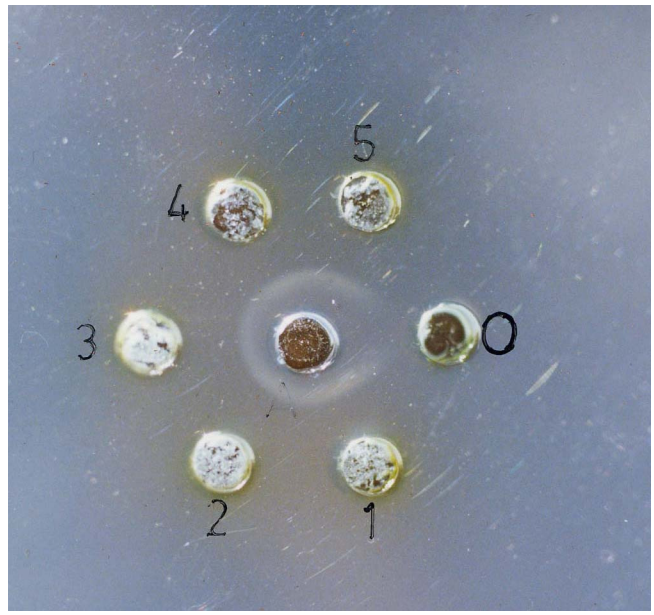


شکل ۲- حلقه‌های قهوه‌ای آوندها در مقطع عرضی ریشه چغندرقند آلوده به ویروس کرلی‌تاپ

Fig. 2 Vascular necrosis rings in cross section of sugar beet diseased root

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- آزمون سرولوژیک نشت متقابل در آگار بین جدایه‌های انتخابی ویروس و آنتی سرم مربوط به ویروس کرلی‌تاپ
(0 = عصاره برگ سالم چغندرقند)

Fig.3 Agar-gel double diffusion test between selected virus isolates against beet curly top antiserum (0=Healthy sugar beet extract).

شکل ۴- آلودگی طبیعی بوته‌های کنجد به ویروس کرلی تاپ با علائم کوتولگی شدید ، زردی برگها و کمانی شدن برگها در امتداد رگبرگ اصلی (بوته سمت راست شاهد سالم)

Fig.4 Naturally sesam plants infected by CTV show sever dwarf, yellowing and rolling leaves in midribe (right, healthy plant).

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۵- آلودگی طبیعی بوته خیار به ویروس کرلی تاپ با علائم کوتولگی شدید ، کوتاه شدن فاصله بین دمبرگها و چروکیدگی سطح برگها

Fig.5 Naturally infected cucumber by CTV, shows Dwarfing, short internodes and rugose leaves

شکل ۶- آلودگی طبیعی بوته‌های منداب *Eruca sativa* به ویـروس کرلی‌تاپ با علائم زردی برگها و کوتولگی شدید بوته

Fig.6 Naturally infected wild rockets (*Eruca sativa*) by CTV, show leaves yellowing and sever dwarfing

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده References

خیـــری، م. ۱۳۷۰ . تحلیلـــی بر وضعیت بیماری کرلی‌تاپ چغندرقند در ارتباط بـا زنجـرک هـای ناقـل ویروس در ایران . دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران ، دانشگاه شـهید بـاهنر کرمـان ، صـفحه‌هـای ۲۰۷-۲۱۲

خیری، م و علیمرادی، ا. ۱۳۴۷ . زنجرک‌های چغندرقند ایران و نقش آنها در انتقال بیمـاری ویـروس کرلـی تاپ، بنگاه اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، ۵۰ صفحه

منصف، ع. ۱۳۷۰ . نقش زنجرک های Neoaliturus در انتقال بیماری ویروسی کـرلی‌تاپ چغندرقند در استان فارس، مجله آفات و بیماریهای گیاهی ایران ، جلد ۵۹ ، صفحه‌های ۵۳-۴۵

Abdel-Salam AM (1990) Mechanical transmission of two Egyptian isolates of beet curly top and tomato yellow leaf curl viruses. Bull.fac. of Agric, Univ of Cairo, Vol41, No 3, 825-841

Abdel-Salam AM, Amin AH (1990) An Egyptian isolate of beet curly top virus: New differential hosts, physical properties, transmission, and serologic studies. Bull.fac. of Agric., Univ. of cairo, Vol 41, No.3, 843-858

Ball ED (1917) The beet leafhopper and the curly leaf disease that it transmits. Utah Agr.Exp. Sta., Bull. 155, 56 pp

Bennett CW(1979) The curly top disease of sugarbeet and other plants. Monog.No 7, the APS Press, 81pp

Bennett CW(1957) Epidemiology of leafhopper transmitted curly top virus. Ann.Rev of phytopathology. Vol.5

Bennett CW, Tanrisever A(1957) Sugarbeet curly top disease in Turkey. Plant Dis. Rep. 41:721-725

Creamer R, Luque-Williams M, Howo M(1996) Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. Plant Dis. 80:533-535

Duffus JE, Irvin OS(1977) Relation of age of plants and resistance to a sever isolate of the beet curly top virus. Phytopathology . 67:151-154

www.SID.ir

Archive of SID

Frischmuth S, Frischmut T, Latham JR , Stanley J(1993) Transcriptional analysis of the virionsense genes of Geminivirus beet curly top virus. Virology, 197:312-319

Fulton RW(1955) Curly top of tobacco in Wisconsin. Plant Dis. Rep. 39:799-800

Gibson KE(1971) The incidence of curly top virus and its leafhopper vector in sugarbeets in Iran . J.Eco. Entomology 53:632-639

Gibson KE (1967) Possible incidence of curly top in Iran, A new record. Plant Dis Rep 51:976-977

Gidding NJ(1942) Age of plants as a factor in resistance to curly top of sugar beet. Am.Soc Sugarbeet Technol 3:452-459

Mumford DL(1972) A new method of mechanically transmitting curly top virus. Phytopathology 62: 1217-1218

Thomas PE, Mink GI(1979) Description of Plant viruses. CMI/AAB. Beet curly top virus No.210

www.SID.ir