

# ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های چغندر قند به بیماری کرلی تاپ در شرایط مزرعه

## Evaluation of sugar beet genotypes resistance to curly top disease in the field condition

مهیار شیخ الاسلامی آل آقا<sup>۱\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۳

### چکیده

پیچیدگی بوته چغندر قند در ویروس *Beet curly top virus (BCTV)* ایجاد می‌شود. با توجه به اهمیت ارقام مقاوم در مدیریت این ویروس، در سال ۱۳۹۱ تعداد ۵۴ ژنوتیپ چغندر قند همراه با شاهد حساس در برابر بیماری در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط مزرعه‌ای با آلودگی طبیعی در ایستگاه تحقیقاتی ماهیدشت در استان کرمانشاه ارزیابی شدند. اندازه‌گیری شدت آلودگی در مزرعه در شهریور ماه انجام و پس از تعیین شاخص بیماری، مقایسه ژنوتیپ‌های مختلف با یکدیگر و با شاهد انجام شد. از آزمون‌های لکه‌گذاری بافتی (TBIA) و واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به منظور ردیابی آزمایشگاهی BCTV در ژنوتیپ‌های مورد بررسی استفاده گردید. نتایج تجزیه آماری داده‌های مزرعه نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر مقاومت به بیماری کرلی تاپ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. نتایج آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی آلودگی ۴۵ ژنوتیپ از مجموع ۵۵ ژنوتیپ مورد بررسی را تایید نمود. در مجموع ۱۰ ژنوتیپ شامل S1-89023، S1-89035، S1-89032، S189006، S189018، O.T.607-21-88، O.T.607-34-88، 31374 O.T. و S1-89026 و O.T.13687- 6-88 که کمترین میزان آلودگی را در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند به عنوان مقاوم در نظر گرفته شدند.

واژه‌های کلیدی: زنجیرک، انتقال، بیماری زا، ژنوتیپ، کرمانشاه

۱ - استادیار بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران  
\* - نویسنده مسئول m1sheikh@yahoo.com

## مقدمه

بیماری ویروسی و پیچیدگی بوته چغندرقد یا کرلی‌تاپ که توسط ویروس *Beet curly top virus* (BCTV) ایجاد می‌شود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقد است که در دهه ۱۹۲۰ در آمریکا موجب توقف کشت چغندرقد و ورشکستگی صنایع قند شد (Bennett 1971). بررسی‌های انجام شده در آمریکا نشان داده است که در یک مدل ارزیابی ۱۰ درجه‌ای شدت آلودگی به بیماری، به ازای یک واحد افزایش در شدت آلودگی، میزان محصول ۵/۷۶ تا ۶/۶۳ تن در هکتار کاهش یافته است (Strausbaugh et al. 2007).

بررسی‌های انجام گرفته توسط گیسون (Gibson 1971)، میزان آلودگی مزارع چغندرقد در ممسنی استان فارس را تا ۹۰ درصد نشان داده است. همچنین منصف و خیری (Monsef and Kheyri 1992) میزان آلودگی به این ویروس را در فسا تا ۱۰۰ درصد تخمین زده‌اند. بررسی پراکنش گونه‌(های) *Beet curly top virus* (BCTV) در ۱۰ استان مهم کشت چغندرقد از جمله کرمانشاه نشان دهنده میانگین شیوع ۱۸ درصدی ویروس کرلی‌تاپ در نمونه‌های تصادفی جمع‌آوری شده بوده است. شیوع بیماری ناشی از این ویروس در استان فارس با ۴۴/۷ درصد بیشترین و پس از آن به ترتیب استان‌های خراسان (۲۶/۳)، اصفهان (۱۹/۸)، کرمانشاه (۱۵/۶)، سمنان (۱۵/۴)، آذربایجان غربی (۱۲/۱)، قزوین (۱۱/۸)، زنجان (۹/۷)، خوزستان (۷/۸) و همدان (۶/۴) درصد قرار گرفتند. این نتایج نشان می‌دهد که ویروس BCTV در اکثر مناطق کشت چغندرقد کشور حضور داشته و یکی از مهم‌ترین ویروس‌های با ناقل هوازاد در چغندرقد می‌باشد (Farzadfar et al. 2006).

در یک بررسی در زمینه ارزیابی لاین‌های چغندرقد در فسا مشخص گردید که لاین‌های F-20489Dillon و F-

F-20511Chinook، F-20311-9825، 20488HM-2980 و F-20634-H2301، F-20510Bronco، F-20512Ranger و H5505 کمترین درصد آلودگی به بیماری ویروسی کرلی تاپ داشتند و عملکرد ریشه آن‌ها نسبت به ارقام حساس بیشتر بوده است (Ashrafmansooi et al. 2003). در بررسی‌هایی که در سال‌های قبل به منظور تعیین منابع مقاومت به این بیماری انجام شد، معلوم گردید که رگه‌های ۱۶۴۰۲، ۱۶۴۰۳، ۱۶۴۰۴ و ۱۶۴۰۳ نسبت به این بیماری متحمل هستند (Farsinejad et al. 1991). تحقیقات اشرف منصوری و همکاران (Ashrafmansoori et al. 2010) بر روی ۱۶ هیبرید چغندرقد در شرایط مزرعه انجام شد نشان داد که بین هیبریدها از نظر درصد بوته‌های آلوده و شاخص آلودگی در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. از بین هیبریدها دو هیبرید ۲۸۹۱۴ و ۲۸۹۵۷ کمترین درصد بوته‌های آلوده و کمترین شاخص آلودگی را داشتند و در بین ارقام کمترین درصد بوته آلوده و شاخص آلودگی مربوط به ارقام H2301، BRANCO، CHINOOK بود. بر اساس تحقیقات فتاحی و همکاران (Fattahi et al. 2012) که بر روی ۱۸ ژنوتیپ چغندرقد با استفاده از روش مایه‌زنی توسط همسانه عفونت زای جدایه ایرانی ویروس *Beet Severe Curly top Virus* (BSCTV) با دو روش آگرواینوکولیشن و انتقال با زنجکر ناقل *Circulifer haematoceps* صورت گرفت ژنوتیپ‌های مورد آزمایش به سه گروه، متحمل شامل BR1، FIMMA، HM1990، 7233، H5505، حساس شامل PP22، PP8، Dorotea، IC، Flores، Hilma، Polyrow و خیلی حساس رسول، افشاری، هیبرید بالک شیراز، زرقان، ریزفورت شامل Brigita طبقه‌بندی شدند.

با توجه به اهمیت ارقام مقاوم چغندرقد در مدیریت و کاهش خسارت ناشی از بیماری پیچیدگی بوته چغندرقد، در این

ردیابی آزمایشگاهی ویروس در ژنوتیپ‌ها با استفاده از آزمون سرولوژیکی لکه گذاری بافتی (Tissue Blot Immuno Assay- TBIA) (Lin et al. 1990). همچنین از روش مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) نیز استفاده شد.

## نتایج

بر اساس نتایج تجزیه آماری داده‌های شاخص بیماری (DI)، بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر شدت بیماری اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD) بین ژنوتیپ‌ها مشخص گردید (جدول ۲).

از ۵۵ ژنوتیپ مورد بررسی در آزمون TBIA تعداد ۳۶ ژنوتیپ دارای واکنش مثبت، سه ژنوتیپ S1-89026، O.T.607-34-88 و O.T.13687-6-88 دارای واکنش مشکوک به آلودگی ( $\pm$ ) و تعداد ۱۶ ژنوتیپ دارای واکنش منفی بودند.

آزمون PCR روی نمونه‌هایی انجام گرفت که بر اساس مشاهدات چشمی و نیز آزمون سرولوژیکی واکنش مثبت مشخصی نداشتند. همچنین دو نمونه ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۳۴ که علایم چشمی مشخصی نداشته ولی در آزمون سرولوژیکی TBIA واکنش مثبت داشتند، نیز در آزمون مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. در نتیجه این آزمون با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مورد نظر یک قطعه دی.ان.ای به طول تقریبی ۷۴۰ جفت‌باز در نمونه شاهد مثبت تکثیر گردید ولی در نمونه مربوط به شاهد سالم چنین قطعه‌ای تکثیر نشد. دو نمونه ۲۳ و ۳۴ که در آزمون TBIA دارای واکنش مثبت بودند، در آزمون PCR نیز واکنش مثبت نشان داده و قطعه دی.ان.ای ۷۴۰ جفت‌باز در آنها تکثیر گردید. نمونه‌های شش ژنوتیپ شامل S1-89025، S1-89038، S1-89045، S1-89019، S1-89032 و O.T.13687-32-88 که در آزمون سرولوژیکی TBIA فاقد واکنش مثبت بودند، در

تحقیق واکنش ۵۵ ژنوتیپ چغندر قند در برابر آلودگی به ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند به همراه شاهد حساس در شرایط آلودگی طبیعی در مزرعه مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۹۱، اجرای آزمایش در مزرعه تحقیقاتی ایستگاه ماهیدشت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه انجام شد. بر اساس آزمایش‌های مقدماتی، این مزرعه دارای سابقه بروز آلودگی طبیعی بیماری کرلی‌تاپ در طول سنوات گذشته بوده است. در این آزمایش تعداد ۵۴ ژنوتیپ در کنار شاهد حساس (رقم اکباتان)، تهیه شده از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند) مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۲). برای تعیین شدت آلودگی از روش (Mumford 1974) استفاده گردید که در آن ۱۰ سطح ارزیابی وجود دارد.

برای مقایسه ژنوتیپ‌ها از فرمول:

$$DI = \frac{\text{سطح بیماری} \times \text{تعداد گیاهان در آن سطح}}{\text{مجموعه گیاهان در کرت مورد ارزیابی}}$$

استفاده شد. در هر کرت شاخص بیماری (Disease Index-DI) از ۱۰ بوته محاسبه و سپس شاخص بیماری ژنوتیپ‌های مختلف با یکدیگر و با شاهد مقایسه شد (جلالی ۱۳۸۳). برای ارزیابی آلودگی در رقم شاهد در هر ردیف یک کرت شاهد به صورت تصادفی انتخاب و شدت آلودگی محاسبه شد. تجزیه داده‌ها با نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD و دانکن انجام گردید. به منظور ردیابی آزمایشگاهی BCTV و تایید نتایج حاصل از ارزیابی چشمی بوته‌ها، از هر ژنوتیپ در اوایل مهرماه نمونه‌های تصادفی برگی شامل ۱۰ نمونه به ازای هر ژنوتیپ جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت.

داده بودند، به کمک آزمون PCR آلودگی به BCTV در آنها ردیابی نشد. در نمونه‌های مربوط به سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی به روش PCR، واکنش منفی بود.

آزمون PCR واکنش مثبت نشان داده و قطعه دی.ان.ای ۷۴۰ جفت‌بازی در آنها تکثیر شد (جدول ۲). همچنین در مورد ژنوتیپ‌های S1-89026، O.T.607-34-88 و O.T.13687-6-88 که در آزمون سرولوژیکی TBIA واکنش غیرواضح و مشکوک نشان

جدول ۲ واکنش ژنوتیپ‌های مختلف از نظر آلودگی به بیماری کرلی‌تاپ در شرایط مزرعه، آزمون‌های سرولوژیکی A تا TB و PCR

RT-PCR	TBIA	کلاس دسته‌بندی	میانگین ضریب شدت آلودگی	کد ژنوتیپ	شماره ژنوتیپ
ND	+	a	۲/۶۱	SBSI005K	۵۳
ND	+	ab	۲/۳۳	S1-89058	۳۷
ND	+	abc	۲/۲۶	S1-89005	۴۲
ND	+	abcd	۲/۱۳	28954	۵۱
ND	+	abcde	۲/۱	S1-89025	۲۵
-	-	abcde	۲/۱	شاهد (رقم اکباتار)	۵۵
ND	+	abcdef	۲/۰۷	SBSI006K	۵۴
ND	+	abcdefg	۱/۹۹	28905	۴۹
ND	+	abcdefg	۱/۹۳	O.T.607-34-90	۱۱
ND	+	abcdefg	۱/۹۲	S1-89061	۳۹
ND	+	abcdefg	۱/۹۲	S1-89034	۲۸
ND	+	abcdefgh	۱/۹۱	S1-89022	۲۲
ND	+	abcdefgh	۱/۹	S1-89059	۳۸
ND	+	abcdefgh	۱/۹	SBSI004K	۵۲
ND	+	abcdefgh	۱/۸۹	S1-89038	۳۱
+	-	abcdefgh	۱/۸۴	SBSI005	۴۵
ND	+	abcdefgh	۱/۸۳	S1-89010	۱۷
ND	+	abcdefgh	۱/۸۳	O.T.607-52-88	۷
ND	+	abcdefgh	۱/۸۱	SBSI006	۴۶
-	-	bcdefgh	۱/۷۹	S1-89050	۳۵
ND	+	bcdefgh	۱/۷۸	S1-89015	۱۸
-	-	bcdefghi	۱/۷۲	SBSI004	۴۴
+	-	bcdefghi	۱/۷۱	S1-89005	۱۲
ND	+	bcdefghi	۱/۷۱	S1-89009	۱۶
+	+	bcdefghi	۱/۷۱	S1-89006	۱۳
ND	+	bcdefghi	۱/۶۹	S1-89007	۱۴
ND	+	bcdefghij	۱/۶۹	S1-89047	۳۴
ND	+	bcdefghij	۱/۶۷	31375	۴۱
ND	+	bcdefghij	۱/۶۶	S1-89057	۳۶
-	-	bcdefghij	۱/۶۶	S1-89020	۲۱
ND	+	bcdefghij	۱/۶۲	O.T.607-16-90	۹
ND	+	bcdefghij	۱/۵۷	O.T.607-25-90	۱۰
+	-	bcdefghij	۱/۵۵	O.T.13687-32-88	۳
-	-	bcdefghij	۱/۵۵	O.T.13687-22-88	۲
ND	+	bcdefghij	۱/۵۵	O.T.607-46-88	۶
ND	+	bcdefghij	۱/۵۲	S1-89039	۳۲
ND	+	cdefghij	۱/۴۷	S1-89045	۳۳
+	-	cdefghij	۱/۴۷	S1-89019	۲۰
ND	+	cdefghij	۱/۴۵	21177-71	۴۷
ND	+	cdefghij	۱/۴۵	O.T.607-54-88	۸
-	-	cdefghij	۱/۴۳	S1-89036	۳۰
+	-	defghij	۱/۴۲	S1-89008	۱۵
+	-	defghij	۱/۴۲	28906	۵۰
-	-	defghij	۱/۴	S1-89024	۲۴

ND	+	defghij	۱/۳۷	28904	۴۸
ND	+	defghijk	۱/۳۱	S1-89023	۲۳
+	+	defghijk	۱/۳۰	S1-89035	۲۹
ND	+	efghijk	۱/۲۷	S1-89032	۲۷
ND	+	fghijk	۱/۲۵	S1-89006	۴۳
-	-	ghijk	۱/۲۲	31374	۴۰
ND	±	ghijk	۱/۱۹	O.T.607-21-88	۴
-	-	hijk	۱/۰۸	S1-89026	۲۶
ND	±	ijk	-/۸۹	O.T.607-34-88	۵
ND	±	jk	-/۸۷	S1-89018	۱۹
-	-	k	-/۵۴	O.T.13687-6-88	۱

ND: Not Detected; LSD: 0.58

## بحث

آزمایشگاهی در تخمین درصد آلودگی‌های مزرعه‌ای اطلاعات دقیق‌تری ارائه می‌نماید. به عبارت دیگر غربال ارقام در مزارع برای آلودگی‌های ویروسی نمی‌تواند تنها بر اساس مشاهدات چشمی باشد (Makkouk et al. 2003).

در آخر بر اساس نتایج این تحقیق ۱۰ ژنوتیپ 89023، S1-89035، S1-89032، S189006، S189018، O.T.607-21-88، O.T.607-34-88، 31374، S1-89026، O.T.13687-6-88 و S1-89026، O.T.13687-6-88 که کمترین میزان آلودگی را در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند و همچنین بر اساس آزمون مقایسه میانگین‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک بودند به عنوان مقاوم در نظر گرفته شده و برای آزمایش‌های اصلاحی بعدی پیشنهاد می‌شوند. اگرچه آلودگی ویروسی در سه ژنوتیپ 31374، S1-89026 و O.T.13687-6-88 با استفاده از روش سرولوژیکی و PCR معمول ردیابی نگردید، این احتمال وجود دارد به دلیل پایین بودن زیاد غلظت ویروس در این ژنوتیپ‌ها، روش‌های معمول سرولوژیکی و PCR قادر به ردیابی ویروس در این ژنوتیپ‌ها نبوده باشد. از اینرو جهت قضاوت دقیق‌تر در مورد وضعیت آلودگی این سه ژنوتیپ و حضور ویروس در بافت‌های آنها نیاز به بررسی‌های تکمیلی بیشتر با استفاده از روش‌های حساس‌تر مانند Real Time PCR می‌باشد.

اصلاح ارقام چغندر قند مقاوم به بیماری کرلی تاپ، اصلی‌ترین و اقتصادی‌ترین روش برای مقابله با این بیماری در مزارع چغندر قند می‌باشد (Wintermantel and Kaffka 2006). بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های سرولوژیکی، مولکولی و مزرعه‌ای، استفاده از سیستم ارزیابی مزرعه‌ای متکی بر سنجش شدت علائم بیماری (Mumford 1974) تا حدودی برای آگاهی از حساسیت و مقاومت ژنوتیپ‌ها قابل اعتماد می‌باشد، اما نتایج آزمون‌های مولکولی جهت بررسی وجود آلودگی در گیاه از اطمینان بیشتری برخوردار است. در این تحقیق در شرایطی که برگ‌های برداشت شده از بعضی ژنوتیپ‌های مورد بررسی علائم شاخص آلودگی را نداشتند و در بعضی موارد در تست سرولوژیکی هم منفی بودند اما در آزمایش مولکولی به عنوان مثبت و حاوی ویروس ارزیابی شدند. از اینرو در صورتی که ملاک ارزیابی مقاومت به BCTV، تنها بر اساس نوع و شدت علائم بیماری در گیاه استوار باشد، ارقامی که علائم بیماری را نشان داده ولی در برابر تکثیر ویروس مقاومت نموده یا علی‌رغم تکثیر ویروس، بیماری را تحمل نموده و دچار کاهش اقتصادی محصول نمی‌شوند (ارقام متحمل)، مورد قضاوت صحیح قرار نخواهند گرفت. این نتایج و نیز تحقیقات قبلی نظیر Loebenstein et al. 2001; Makkouk et al. 2003; (Farzadfar et al. 2006) نشان داده است که بررسی‌های

**Reference:****منابع مورد استفاده:**

- Ashrafmansoori GhR, Darabi S, Vahedi S, Joukar L. Evaluation of resistance of sugar beet hybrids to curly top virus under field conditions. J of sugar beet. 2010; 26(2)105-116. (In Persian, abstract in English)
- Bennett CW. The curly top disease of sugar beet and other plants. Monograph No. 7. 1971. The APS Press, St. Paul, MN. 81 pp.
- Farsinejad K, Monsef A, Arjmand N. Evaluation of the resistance of sugar beet lines to curly top. Iranian J of plant pathology. 1991; 27(1-4): 127-137(In Persian, abstract in English)
- Farzadfar Sh, Pourrahim R, Golnaraghi AR, Ahoonmanesh A. Distribution and incidence of some aphid and leafhopper transmitted viruses infecting sugar beet in Iran. Plant Dis. 2006; 90: 252-258.
- Fattahi Z, Behjatnia SAA, Afsharifar AR, Hamzeh Zarghani H, Izadpanah K. Screening of sugar beet cultivars for resistance to Iranian isolate of *Beet Severe Curly top Virus* using an infectious clone of the virus. 2012, 48 (1):37-38. (In Persian, abstract in English)
- Gibson KE. The incidence of curly top virus and its leafhopper vector in sugar beet in Iran. J. of Eco. Entomol. 1971; 53: 632-639.
- Lin NS, Hsu YH, Hsu HT. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopathol. 1990; 80: 824-828.
- Loebenstein G, Berger PH, Brunt A, Lawson RH. Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. 2001; P: 460.
- Makkouk KM, Kumari SG, Shahraeen N, Fazlali Y, Farzadfar Sh, Ghotbi T, Mansouri AR. Identification and seasonal variation of viral diseases of chickpea and lentil in Iran. J. of Plant Dis. and Protection. 2003; 110: 157-169.
- Monsef A, Kheyri M. The role of sugar beet leafhopper in curly top virus disease in Fars province. Applied Entomol. and Phytopathol. 1992; 59: 19.
- Mumford DL. Procedure for inducing curly top epidemics in field plots. Jou. of American Society of Sugar beet Technologist. 1974; 17: 354-357 .
- Strausbaugh CA , Gillen AM, Camp S, Shock CC, Eldredge EP, Gallian JJ. Relationship of beet curly top foliar ratings to sugar beet yield. Plant Dis. 2007; 91: 1459- 1463.
- Wintermantel W, Kaffka SR. Sugar beet performance with curly top is related to virus accumulation and age at infection. Plant Dis. 2006; 90: 657-662.