مجله ترویجی گیاهان دانه روغنی
جلد اول، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۸، ص۶۲-۵۴
http://jop.areeo.ac.ir

ردیابی ویروس رگه‌ای توتون در مزارع آفتابگردان استان‌های گلستان و مازندران

سمیرا شاملی[۱]

محقق بیماری شناسی گیاهی (Ph.D)، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،گرگان، ایران.

چکیده

ویروس رگه‌ای توتون یکی از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی با پراکنش و دامنه میزبانی وسیع بوده که می‌تواند سبب خسارت ۱۰۰-۴۰ درصدی محصول در مزارع آفتابگردان شود. در این پژوهش طی سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ تعداد ۱۵۳ نمونه از مزارع آفتابگردان استان‌های گلستان و مازندران با علایم زردی، موزاییک، تغییر شکل و پیچش برگ‌ها، و کوتولگی بوته‌ها جمع‌آوری گردید. برای بررسی آلودگی بوته‌ها از آزمون الایزای مستقیم با آنتی سرم چند همسانه‌ای TSV و برای تایید آلودگی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگر اختصاصی ویروس TSV استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان دهنده آلودگی ۱۲ درصدی بوته‌های جمع‌آوری شده از مناطق نمونه‌برداری بود، همچنین استان مازندران آلودگی بالاتری نسبت به استان گلستان داشت. به منظور بررسی دامنه میزبانی، سویه ویروس جدا شده از آفتابگردان بر روی ۱۲ گونه گیاهی متعلق به چهارخانواده‌ی اسفناجیان، بادمجانیان، گل‌ستاره‌ای‌ها و حبوبات مایه‌زنی مکانیکی شد و علایم در میزبان‌های مختلف ثبت گردید. با توجه به نقش مهم ویروس‌های گیاهی در کاهش عملکرد محصولات، لزوم کنترل آنها اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. با توجه به حضور ویروس رگه‌ای توتون در استان‌های شمالی کشور و اثرات مخرب این ویروس بر محصولات مختلف، لزوم مدیریت اصولی و صحیح مزارع از قبیل استفاده از بذور عاری از آلودگی، مدیریت ناقلین، تنظیم تاریخ کشت، مدیریت علف‌های هرز مزارع و عدم کاشت گیاهان میزبان ویروس در مجاورت مزارع آفتابگردان، می‌تواند گامی موثر و مفید جهت کاهش آلودگی ویروس در مزارع آفتابگردان باشد.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، ویروس رگه‌ای توتون، ردیابی

---

[۱] نویسنده مسوول: shameli61@gmail.com

مقدمه

آفتابگردان (*Helianthus annus* .L) گیاهی از خانوادهی Asteraceae و یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی است که به دلیل مقاوم بودن در برابر خشکی، سازگاری با شرایط مختلف اقلیمی و خاکی و بالابودن کیفیت روغن، سالانه در سطح وسیعی از کشور کشت می‌شود (سید شریفی، ۲۰۱۰).

ویروس‌ها از عوامل ایجادکننده تنش زیستی در گیاهان می‌باشند که با گرفتن انرژی لازم ازگیاه میزبان جهت تکثیر ماده ژنتیکی خود موجب کاهش انرژی و صدمه به گیاهان می‌شوند. صدمه و خسارات ناشی از آلودگی ویروس در سطوح کمی و کیفی به محصولات زراعی وارد شده و موجب کاهش ارزش اقتصادی آنها می‌شود. خسارت حاصل از بیماری‌های ویروسی بسته به زمان و شدت بیماری بسیار متفاوت می‌باشد. ردیابی و تشخیص عوامل ویروسی خسارت‌زا در محصولات زراعی و بررسی جمعیت و میزان پراکندگی آنها در محصولات زراعی و غیرزراعی اولین قدم در جهت انتخاب استراتژی مناسب کنترل آنها می‌باشد. آفتابگردان نیز همانند سایر گیاهان زراعی در برابر برخی از آلودگی‌های ویروسی حساس است و آلودگی‌های ویروسی می‌توانند به‌طورقابل ملاحظه‌ای کیفیت و کمیت محصول را کاهش دهند (شارمن و همکاران، ۲۰۰۸). آیلارویروس‌ها، ویروس‌هایی چندوجهی، کم ثبات و مولد لکه حلقوی هستند که هر کجا که میزبان آنها وجود داشته باشد یافت می‌شوند و انتشار آنها با نهال، پیوندک و بذر آلوده است. همچنین می‌توانند از راه اندام‌های تکثیری و رویشی گیاه و از راه دانه گرده نیز انتقال یابند. آیلارویروس‌ها کم‌ثبات هستند و به دشواری می‌توان آنها را جداسازی و تعیین ویژگی نمود. مبنای تقسیم‌بندی گونه‌های آیلارویروس، وابستگی سرولوژیکی، دامنه میزبانی، شباهت توالی ژنوم و پراکنش جغرافیایی می‌باشد. نشانه‌های آیلارویروس‌ها روی برگ و شکوفه به صورت نقش و نگارهای خطی، لکه حلقوی و موزاییک گاه همراه با بدشکلی‌های برگ است. بسیاری از آیلارویروس‌ها در رشد بهاری میزبان تولید نشانه‌های شوک شدید می‌کنند که ممکن است بخشی از برگ‌ها، شکوفه‌ها و شاخه‌های جوان بر اثر ویروس از بین رود. ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco Streak Virus*) به عنوان یکی از آیلارویروس‌های مخرب در آفتابگردان، دارای دامنه میزبانی در بیش از ۱۴۰ گونه گیاهی است و تاثیر زیانبار فراوانی بر محصولات کشاورزی وارد می‌کند. ویروس رگه‌ای توتون دارای گسترش جهانی است و شمال آمریکا، کانادا و استرالیا از مهم‌ترین مناطق پراکنش ویروس می‌باشند (جونز ، ۲۰۰۵). ویروس بر روی میزبان‌های مختلف مانند توتون، پنبه، گوجه فرنگی، سویا، بادام زمینی، آفتابگردان، توت فرنگی و کوکب علایم متفاوتی ایجاد می‌کند (شارمن و همکاران، ۲۰۰۸). علایم ایجاد شده توسط TSV در آفتابگردان به صورت سیاه شدن ساقه و دمبرگ، کوتولگی و نکروز شدن برگ‌ها، کاهش رشد، بدشکلی برگ، ایجاد لکه‌های زردرنگ روی برگ و در نهایت مرگ گیاه می‌باشد. (مک دانیل و همکاران، ۱۹۹۲). علی‌رغم اهمیت آفتابگردان و خسارت بیماری‌های ویروسی در این محصول، تاکنون تحقیق مدونی در خصوص ویروس‌های مخرب در آفتابگردان در استان گلستان صورت نگرفته است. با توجه به نقش تاثیرگذار بیماری‌های ویروسی در کاهش کمیت و کیفیت محصول آفتابگردان، در این

پژوهش ردیابی ویروس رگه‌ای توتون در آفتابگردان و دامنه میزبانی آن به‌عنوان یکی از ویروس‌های مخرب در مزارع آفتابگردان استان‌های گلستان و مازندران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع جهت ردیابی TSV و بررسی درصد آلودگی

نمونه‌برداری از مزارع آفتابگردان استان‌های گلستان و مازندران طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۵ به صورت هدفدار انجام و نمونه‌های برگی بر حسب علائمی مثل زردی و کوتولگی، تغییرشکل، نکروز و کلروزو پیچش برگ انتخاب و جمع‌آوری گردید (شکل۱). مزارع موجود در منطقه طوری انتخاب گردیدند که با فواصل مناسب از هم بتوانند کل منطقه را پوشش داده و نمونه‌های جمع‌آوری شده بیانگر وضعیت آلودگی به ویروس رگه‌ای توتون در این دو استان باشد. فاصله بین مزارع با توجه به سطح کاشت در هر منطقه بین ۱۰ تا ۱۵ کیلومتر در نظر گرفته شد. هر نمونه از بوته‌ی جداگانه جمع‌آوری گردید و کلیه اطلاعات مربوط به تاریخ جمع‌آوری، محل نمونه‌برداری، و نوع علایم ثبت گردید. نمونه‌ها بلافاصله در کیسه‌های مجزا و در شرایط خنک (در مجاورت یخ) جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل گردید و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

شکل ۱- بوته‌های جمع‌آوری شده از مزارع آفتابگردان دارای علایم مشکوک به آلودگی ویروسی

آزمون الایزا و آزمون نسخه‌برداری معکوس

تعداد ۱۵۳ نمونه با روش الایزای مستقیم (DAS-ELISA) و با استفاده از آنتی سرم چند همسانه‌ای ویروس TSV بر پایه روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) و طبق پروتکل شرکت تولیدکننده آنتی‌بادی (شرکت بایوربا، سوئیس) مورد آزمون قرار گرفت. جهت تایید حضور ویروس، استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNase Plant Mini Kit (کیاژن، آلمان) انجام شد و سپس DNA مکمل ساخته شد. cDNA ساخته شده به عنوان الگو در واکنش پی‌سی‌آر مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین دامنه‌ی میزبانی

به منظور بررسی دامنه میزبانی، سویه ویروس جدا شده از آفتابگردان بر روی ۱۲ گونه گیاهی متعلق به چهارخانواده اسفناجیان(سلمک)، بادمجانیان (داتوره، گوجه‌فرنگی، گونه‌های توتون)، گل‌ستاره‌ای‌ها (کاهو) و حبوبات (باقلا، لوبیا، لوبیا چشم بلبلی، ماش) مایه‌زنی مکانیکی شد. جهت مایه‌زنی ویروس یک گرم از برگ‌های جوان آفتابگردان آلوده بر روی یخ و با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH= ۷/۲ با نسبت ۱:۵ عصاره‌گیری و سپس مایه‌زنی گردید. گیاهان پس از مایه‌زنی در گلخانه با ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگه‌داری، و مورد بازدید روزانه قرار گرفتند و علائم یادداشت‌برداری شد.

نتایج و بحث

نتایج نمونه‌برداری از مزارع جهت ردیابی TSV

آزمون الایزای مستقیم برای ردیابیTSV نشان داد که ویروس در تعدادی از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع آفتابگردان وجود دارد. نتایج حاصل از آزمون‌های سرولوژیکی، آلودگی بالاتر استان مازندران (۱۴درصد) نسبت به گلستان را (۱۱درصد) نشان داد. با مقایسه میزان آلودگی دو ساله در استان‌های مورد بررسی آلودگی بالاتر سال اول در هر دو استان مشاهده گردید. به‌نحوی که میزان آلودگی گلستان در سال اول (۱۳۹۵) ۱۱/۸درصد و در سال دوم (۱۳۹۶) ۱۰ درصد تعیین گردید. این شاخص برای استان مازندران در سال اول بررسی ۱۵ درصد و در سال دوم ۱۳ درصد تعیین شد. از آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی TSV جهت اثبات آلودگی استفاده شد. با استفاده از آغازگر اختصاصی ویروس قطعه‌ای به طول ۶۷۲ جفت باز (برای بوته‌های دارای نتیجه مثبت در آزمون الایزا) در واکنش RT-PCR به دست آمد. تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده و نمونه‌های آلوده به تفکیک استان در جدول۱ قید شده است.

جدول ۱- نتایج درصد آلودگی نمونه‌ها در استان‌های گلستان و مازندران طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۵.

سال	۱۳۹۵		۱۳۹۶		درصد آلودگی کل
استان	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های آلوده	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های آلوده	
گلستان	۶۸	۸	۵۰	۵	۱۱
مازندران	۲۰	۳	۱۵	۲	۱۴
تعدادکل نمونه‌ها	۸۸	۱۱	۶۵	۷	۱۲

با توجه به افزایش متوسط دما در تابستان سال ۹۶ نسبت به سال ۹۵، و نظر به این‌که شرایط آب و هوایی گرم می‌تواند مانعی برای فعالیت بهینه ویروس‌های گیاهی و ناقلین آنها باشد، کاهش درصد آلودگی در سال دوم نسبت به سال اول دور ازتصور نبود.

محققین میزان‌گسترش ویروس رگه‌ای توتون را در توتون کاری‌های سه استان‌گیلان، مازندران و گلستان بیش از ۷۹ درصد (خاطری و همکاران،۲۰۰۶)، در مزارع آفتابگردان استان‌های آذربایجان‌غربی، تهران، اصفهان، قم، مرکزی و همدان بین ۸ تا ۵۶ درصد (معتمدی و همکاران،۲۰۱۳)، و مزارع گوجه‌فرنگی پنج استان جنوبی کشور را فاقد آلودگی بهTSV اعلام کردند (معصومی و همکاران،۲۰۰۹). احتمالاً فراهم بودن میزبان‌های متعدد و مساعد بودن شرایط محیطی برای فعالیت ناقلین در شمال کشور از دلایل پراکنش بیشتر TSV در مناطق شمالی کشور می‌باشد. اما در حالت کلی میزان آلودگی بهTSV در مزارع ایران کمتر از میزان آلودگی در کشورهایی مانند برزیل، آمریکا یا هند می‌باشد به نحوی که خسارت ۴۰ درصدی مزارع سویا و خسارت ۶۳ درصدی محصول پنبه در برخی مزارع هندوستان در اثرآلودگی بهTSV گزارش شده است (آران کومار و همکاران، ۲۰۰۸؛ راگیشواری و همکاران، ۲۰۱۷). همچنین وقوع TSV در برخی از مناطق آمریکا تا ۱۰۰درصد گزارش شده است (ایری‌زاری و همکاران، ۲۰۱۶).

نتایج بررسی علایم مایه‌زنی ویروس بر روی میزبان‌های مختلف

مایه‌زنی ویروس در گیاه سلمک باعث ایجاد لکه‌های کلروتیک موضعی و در داتوره لکه های نکروتیک موضعی گردید. در *Nicotiana benthamiana* و *Nicotiana rustica* علایم یه صورت لکه‌های کلروتیک و نکروتیک موضعی بود که در *Nicotiana benthamiana* علایم سیستمیک نیز مشاهده گردید. در گیاه باقلا علایم پیچیدگی برگ‌ها و لکه‌های نکروتیک قابل مشاهده بود. در لوبیا و لوبیا چشم بلبلی لکه‌های موضعی نکروتیک و در ماش و کاهو چروکیدگی و بدشکلی برگ‌ها مشاهده شد (جدول ۲ و شکل۲). نتایج دامنه میزبانی این پژوهش با نتایج نصرالله‌نژاد و شاملی(۱۳۹۴) و حسینی و همکاران(۱۳۸۹) مشابه بود.

شکل ۲- علائم آلودگی به TSV در گیاهان محک مایه زنی شده. a: لکه های نکروتیک در داتوره، b: بد شکلی و چروکیدگی برگ در ماش، c : لکه های نکروتیک موضعی در سلمک.

جدول ۲- علایم ایجاد شده در گیاهان محک ناشی از مایه‌زنی TSV.

خانواده	نام فارسی گونه گیاهی	نام علمی گونه گیاهی	علایم
Chenopodiacae	سلمک	*Chenopodium quinoa L.*	لکه های موضعی کلروتیک
Solanaceae	داتوره	*Datura stramonium L.*	لکه های موضعی نکروتیک
	گوجه فرنگی	*Solanum lycopersicum M*	-
	توتون	*Nicotiana benthamiana L.*	لکه های موضعی کلروتیک
	توتون	*Nicotiana rustica L.*	لکه های موضعی نکروتیک
	توتون	*Nicotiana tabacum cv. Xanthi L.*	آلودگی سیستمیک
	توتون	*Nicotiana tabacum cv.Samsun L.*	آلودگی سیستمیک
Asteraceae	کاهو	*Lactuca sativa L.*	چروکیدگی و پیچش برگ
Fabaceae	باقلا	*Vicia faba L.*	چروکیدگی و پیچش برگ
	لوبیا	*Phaseolus vulgaris L.*	لکه های موضعی نکروتیک
	لوبیا چشم بلبلی	*Vigna unguiculata L.*	لکه های موضعی نکروتیک
	ماش	*Vigna radiata L.*	چروکیدگی و پیچش برگ

نتیجه گیری نهایی

شناسایی دقیق ویروس‌های گیاهی اولین گام در مدیریت بیماری‌های ویروسی می‌باشد. آلودگی‌های ویروسی در گیاهان بدون علامت و یا با علامت مشخص ایجاد شده و عواملی از قبیل درجه تحمل گیاه، قابلیت سازگاری ویروس با میزبان، حضور ناقل و عوامل محیطی از عوامل موثر در پراکنش ویروس‌ها می‌باشند. براساس نتایج به دست آمده، حضور ویروس رگه‌ای توتون در مزارع آفتابگردان استان‌های گلستان و مازندران تاییدگردید. میزان آلودگی در هر دو استان مورد بررسی در سال ۹۵ بیشتر و میزان درصد آلودگی در نمونه‌های استان مازندران بیشتر از استان گلستان بود. همچنین دامنه میزبانی سویه‌ی ویروس جدا شده از آفتابگردان بر روی ۱۲ گونه گیاهی مایه‌زنی مکانیکی شد و علایم ایجاد شده بر روی گونه‌های مختلف ثبت گردید.

توصیه ترویجی

با توجه به حضور ویروس رگه‌ای توتون در محصولات مختلف زراعی در استان‌های شمالی کشور و نظر به اثرات مخرب این ویروس بر محصولات، لزوم مدیریت اصولی و صحیح مزارع از قبیل استفاده از بذور عاری از آلودگی، مدیریت ناقلین، تنظیم تاریخ کشت، مدیریت علف‌های هرز مزارع و عدم کاشت گیاهان میزبان ویروس در مجاورت مزارع آفتابگردان، می‌تواند گامی موثر و مفید جهت کاهش آلودگی ویروس در مزارع آفتابگردان باشد.

منابع

حسینی،س.ث.، وینترا.، مصاحبی، غ.ح.،کوهی حبیبی،م. و هابیلی،ن. ۱۳۸۹. مقایسه خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه ویروس رگه‌ای توتون جداشده از مزارع آفتابگردان ایران با جدایه‌های هندی و سودانی.دانش گیاهپزشکی ایران.۴۱(۱) : ۴۱-۴۹

سید شریفی،ر .۱۳۸۸. گیاهان صنعتی، دانشگاه محقق اردبیلی ، انتشارات عمیدی تبریز، چاپ دوم

معتمدی،م.،کوهی‌حبیبی،م. و مصاحبی، غ.ح . ۱۳۹۲. بررسی پاره‌ای از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی ویروس رگه‌ای توتون جدا شده از آفتابگردان. حفاظت گیاهان، ۲۷(۲) : ۱۶۸- ۱۵۹

نصرالله نژاد،س. و شاملی، س. ۱۳۹۴. ردیابی سرولوژیکی و تعیین دامنه میزبانی ویروس مخطط توتون در استان گلستان، پژوهش های تولید گیاهی در ایران، ۲۲ (۱): ۷۱- ۵۹

Arun Kumar, N., Lakshminarasu, M., Zehr, U. B., and Ravi, K. S., 2008. Molecular characterization of Tobacco Streak Virus causing soybean necrosis in India. Indian Journal of Biotechnology, 7:214-217.

Clark, M. F. and S. A. N. Adams, 1977. Characteristics of micro plate's method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.

Jones,D. R., 2005. Plant viruses transmitted by thrips. European Journal of Plant Pathology. 113 (2):119–157.

Irizarry, M. D., C. L. Groves, M. G. Elmore, C. A. Bradley, R. Dasgupta, T. L. German, D. J. Jardine, E. S. Saalau Rojas, D. L. Smith, A. U. Tenuta, S. A. Whitham and D. S. Muller, 2016. Re-emergence of *Tobacco Streak Virus* infecting soybean in the United States and Canada. Plant Health Progress, 17:92-94.

Kaiser, W. J., S. D. Wyatt and G. R. Pesho, 1982. Natural hosts and vectors of *Tobacco Streak Virus* in Eastern Washington. Phytopathology, 72:1508-1512.

Khateri, H., N. Moarrefzadeh, M. Koohi Habibi, G. Mosahebi, A. Hosseini and N. Hamzeh, 2006. High incidence of *Tobacco Streak Virus* in the tobacco fields of Iran. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 71:1213-6.

Massumi, H., Shaabanian, M., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, J., and Rahimian, H., 2009. Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. Plant Disease, 93:67-72.

McDaniel, L. L., Raid, R. N., Elliott, C. L., Tsai, J. H., and Nagata, R. T., 1992. Purification and serological characterization of a *Tobacco Streak Virus* isolate infecting field-grown escarole and lettuce. Plant Disease, 76:966-971.

Rageshwari, S., P. Renukadevi, V. G. Malathi, P. Amalabalu and S. Nakkeeran, 2017. DAC-ELISA and RT-PCR based confirmation of systemic and latent infection by *Tobacco Streak Virus* in cotton and parthenium. Journal of Plant Pathology, 99: 1–7.

Sharman, M., Thomas, J. E., and Persley, D. M., 2008. First report of *Tobacco Streak Virus* in sunflower (*Helianthus annuus*), cotton (*Gossypium hirsutum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and mung bean (*Vigna radiata*) in Australia. Plant Disease, 3: 27-29.