ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های چغندرقند به بیماری کرلی‌تاپ در شرایط مزرعه

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

مهیارشیخ الاسلامی آل آقا[1*]

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۳
DOI:10.22092/jsb.2017.109677

چکیده

پیچیدگی بوته چغندرقند در ویروس *Beet curly top virus* (BCTV) ایجاد می‌شود. با توجه به اهمیت ارقام مقاوم در مدیریت این ویروس، در سال ۱۳۹۱ تعداد ٥٤ ژنوتیپ چغندرقند 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 پلیمراز 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 ٤٥ ژنوتیپ از مجموع ٥٥ 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، S1-89026 و O.T.13687-6-88 که کمترین میزان آلودگی را در مقایسه با سایر ژنوتیپ ها داشتند به عنوان مقاوم در نظر گرفته شدند.

واژه های کلیدی: زنجرک، انتقال، بیماری زا، ژنوتیپ، کرمانشاه

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

مقدمه

بیماری ویروسی ویروس پیچیدگی بوته چغندرقند یا کرلی‌تاپ که توسط ویروس *Beet curly top virus* (BCTV) ایجاد می‌شود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقند است که در دهه ۱۹۲۰ در آمریکا موجب توقف کشت چغندرقند 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 گیبسون (Gibson 1971)، میزان آلودگی مزارع چغندرقند 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) ویروس پیچیدگی برگ چغندرقند (*Beet curly top virus*-BCTV) در ۱۰ استان مهم کشت چغندرقند از جمله کرمانشاه نشان دهنده میانگین شیوع ۱۸ درصدی ویروس کرلی‌تاپ در نمونه‌های تصادفی جمع‌آوری‌شده 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)، آذربایجان‌غربی (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 چغندرقند کشور حضور داشته و یکی از مهم‌ترین ویروس‌های با ناقل هوازاد در چغندرقند می‌باشد (Farzadfar *et al*. 2006).

در یک بررسی در زمینه ارزیابی لاین‌های چغندرقند در فسا مشخص گردید که لاین‌های F-20489Dillon، F-20488HM-2980، F-20311-9825، F-20511Chinook، F-20512Ranger، F-20510Bronco، F-20634-H2301 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 ۱۶۳۹۶، ۱۶۴۰۲، ۱۶۴۰۳ و ۱۶۴۰۴ نسبت به این بیماری متحمل هستند (Farsinejad *et al*. 1991). تحقیقات اشرف منصوری و همکاران (Ashrafmansoori *et al*. 2010) بر روی ۱۶ هیبرید چغندرقند 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 چغندرقند با استفاده از روش مایه‌زنی توسط همسانه عفونت زای جدایه ایرانی ویروس *Beet Severe Curly top Virus*(BSCTV) با دو روش آگروباینوکولیشن و انتقال با زنجرک 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 چغندرقند در مدیریت و کاهش خسارت ناشی از بیماری پیچیدگی بوته چغندرقند، در این

تحقیق واکنش ۵۵ ژنوتیپ چغندرقند در برابر آلودگی به ویروس پیچیدگی بوته چغندرقند 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 چغندرقند) مورد ارزیابی قرارگرفتند (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:

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

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 داده ها 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.

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 مراز (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 معنی دار(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 (±) 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 سرولوژیکیTBIA 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 جفت بازی 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

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

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

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

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	±	jjk	۰/۸۹	O.T.607-34-88	۵
ND	±	jk	۰/۸۷	S1-89018	۱۹
–	–	k	۰/۵۴	O.T.13687-6-88	۱

ND: Not Detected; LSD: 0.58

بحث

اصلاح ارقام چغندرقند مقاوم به بیماری کرلی تاپ، اصلی‌ترین و اقتصادی‌ترین روش برای مقابله با این بیماری در مزارع چغندرقند 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 برخودار است. در این تحقیق در شرایطی که برگ‌های برداشت شده از بعضی ژنوتیپ‌های مورد بررسی علایم 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 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، 31374، S1-89026 و O.T.13687-6-88 که کمترین میزان آلودگی را در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند و همچنین بر اساس آزمون مقایسه میانگین ها دارای حداقل یک حرف مشترک بودند به عنوان مقاوم در نظر گرفته شده و برای آزمایش‌های اصلاحی بعدی پیشنهاد می شوند. اگرچه آلودگی ویروسی در سه ژنوتیپ 31374، S1-89026 وO.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 سرولوژیک 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.

منابع مورد استفاده: Reference:

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 suger 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.