واکنش ارقام تجاری و لاین‌های کلزا به جدایه ویروس موزاییک شلغم*

مجید جعفری[۱]، مسعود شمس‌بخش[۲]** و احمد معینی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۷)

چکیده

ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus*, TuMV) یکی از شایع‌ترین ویروس‌های مزارع کلزا در ایران محسوب می‌شود. بهترین روش برای کنترل خسارت این ویروس استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. در پژوهش حاضر واکنش ۱۱ رقم تجاری و دو لاین کلزا به جدایه هلندی TuMV در شرایط گلخانه بررسی شد. بوته‌ها در مرحله ۳-۵ برگی و به روش انتقال مکانیکی با عصاره گیاه توتون آلوده به TuMV مایه زنی و واکنش آن‌ها بر اساس شاخص شدت علایم و میزان جذب الایزا (OD_{405})، چهار هفته و میانگین وزن‌های خشک و تر گیاهان هفت هفته پس از مایه‌زنی تعیین شد. این پژوهش با استفاده ازآزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، در سه تکرار و هر تکرار شامل چهار واحد آزمایشی برای گیاهان شاهد و آلوده انجام شد. آلودگی ویروسی گیاهان با استفاده از آزمون RT-PCR تایید شد. بر اساس شاخص‌های مورد بررسی، اختلاف ارقام معنی‌دار بود، بطوریکه در سطح پنج درصد، لاین کرج۳ به عنوان رقم متحمل، ژنوتیپ‌های RGS003 و کرج۱ حساس، ژنوتیپ کرج۲ بسیار حساس و سایر ژنوتیپ‌ها نیمه حساس شناخته شدند. نتایج نشان داد نرخ آلودگی برای همه ژنوتیپ‌ها یکسان بود. به رغم اینکه اختلاف میانگین جذب نوری الایزا بین گیاهان سالم و آلوده معنی دار بود، به استثنای رقم ساری گل، شاخص میزان جذب الایزا بین گیاهان آلوده رقم‌ها و لاین‌های بررسی شده، اختلاف معنی‌دار نداشت. بین ارقام کلزا، فقط وزن تر و خشک لاین کرج۲ به طور معنی‌داری در اثر آلودگی به ویروس کاهش نشان داد. در این پژوهش برای اولین بار نمره‌دهی (صفر تا هشت) برای شدت علایم گیاهان کلزا به TuMV معرفی شد.

کلیدواژه: مقاومت، مایه زنی، الایزا، ***Brassica napus***، ایران

---

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲. دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۳. دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

Reaction of commercial canola varieties and lines against *Turnip mosaic virus* (TuMV) isolate

M. Jafari[1], M. Shams-bakhsh[2*], and A. Moieni[3]

(Received: 17.8.2015; Accepted: 27.1.2016)

Abstract

Turnip mosaic virus (TuMV) is one of the most prevalent viruses of canola fields in Iran. Use of resistant varieties is the best recommended manner to control losses caused by TuMV. In this research, the reaction of 11 commercial varieties and two lines of canola *(Brassica napus* L.) was investigated against a Netherland TuMV isolate under greenhouse condition. The seedlings were inoculated using TuMV-infected tobacco (*Nicotiana benthamiana*) sap at 3-5 leaf stage and their reaction was evaluated based on symptom severity index and ELISA OD_{405} values at four and the mean values of fresh and dry weights of plants at seven weeks after inoculation. This study was performed in a factorial experiment and randomized complete block design with three replications and each repeat involved four experimental units for each group of inoculated and uninoculated plants. Virus-infection was confirmed by RT-PCR. In accordance with evaluated parameters, reaction of varieties to the virus was significantly different. At probability level of 5%, Karaj3 was tolerant while Karaj2 was the most susceptible, RGS003 and Karaj1 were susceptible and the rest of canola varieties/lines were moderately susceptible to TuMV. Difference of OD_{405} values in ELISA was meaningless among inoculated plants of canola varieties/lines. Among canola varieties/lines, only fresh and dry weights of Karaj2 line was reduced significantly in virus-infected plants. The scoring system (0 to 8) for the symptoms severity of TuMV in canola was introduced for the first time in this research.

Keywords: Resistant, Inoculation, ELISA, *Brassica napus*, Iran

* Corresponding author's E-mail: shamsbakhsh@modares.ac.ir

1. Ph.D. student of Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor of Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Associate Professor of Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

مقدمه

مهمترین گیاه دانه روغنی ایران از نظر سطح زیر کشت کلزا (*Brassica napus* L.) می‌باشد. سطح زیر کشت کلزا در سال زراعی ۱۳۹۲-۱۳۹۱ حدود ۹۳/۶ هزار هکتار و میزان تولید آن برابر با ۱۷۵ هزار تن برآورد شده‌است (Anonymous 2014). ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus*, TuMV) گونه‌ی متعلق به جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* است که گیاهان تیره شب‌بو (Brassicaceae) را آلوده می‌کند (Walsh & Jenner 2002) و بیشترین دامنه میزبانی را در بین گونه های جنس *Potyvirus* دارد (Shukla *et al.* 1994).

ویروس موزاییک شلغم از مزارع گیاه دانه روغنی کلزا در ایران به طور گسترده گزارش شده‌است (Farzadfar *et al.* 2005, Ghorbani *et al.* 2007, Shahraeen *et al.* 2003, Shahraeen 2012, Zahedi Tabarestani *et al.* 2010, Sabokkhiz *et al.* 2012). ویروس موزاییک شلغم در ایران علاوه برکلزا از گیاهان *Matthiola sp.*، *Cheianthus cheiri*، *Chrysanthemum* sp.، *Impatiens balsamina*، *Petunia hybrida*، *Zinnia elegans* نیز گزارش شده است (Bahar *et al.* 1985, Farzadfar *et al.* 2009) همچنین در ایران TuMV از علف های هرز *Rapistrum rugosum, Sisymberium loeselii, S. irio* و *Hirschfeldia incana* متعلق به گیاهان تیره شب‌بو نیز گزارش شده‌است (Farzadfar *et al.* 2009). میزان آلودگی کلزا به TuMV نسبت به سایر ویروس‌های آلوده کننده مزارع کلزا در استان گلستان بیشتر گزارش شده‌است (Zahedi Tabarestani *et al.* 2010). همچنین بررسی نمونه های کلزای دارای علایم بیماری‌های ویروسی با استفاده از آزمون الایزا در استان خراسان رضوی نشان دهنده آلودگی بالای ۲۶ درصدی به ویروس موزاییک شلغم می‌باشد (Sabokkhiz *et al.* 2012).

کنترل TuMV به دلیل دامنه میزبانی وسیع و انتقال آن توسط شته به روش ناپایا دشوار می‌باشد (Walsh & Jenner 2002). کنترل شیمیایی بیماری علاوه بر خطرات ناشی از آلودگی محیط‌زیست غیرمؤثر نیز می‌باشد بنابراین مقاومت طبیعی گیاهی روش کنترل مناسبی برای این ویروس می باشد (Hughes *et al.* 2002). مقاومت در *B. rapa* علیه دامنه وسیعی از جدایه‌های TuMV شناسایی شده است (Suh *et al.* 1995, Hughes *et al.* 2002, Walsh & Jenner 2002).

در یک بررسی ۱۲ پاتوتیپ ویروس، بر اساس رابطه متقابل ۱۲۴ جدایه TuMV با چهار لاین کلزا به نام‌های Rape S6، Rape R4، Swede 165 و Swede S1 معرفی شد. در این بررسی مشاهده چهار نوع فنوتیپ O (بدون آلودگی یعنی گیاهان مصون می باشند، نتایج الایزای منفی در برگ مایه زنی شده و برگ های مایه زنی نشده)، + (بروز علایم بیماری و آلودگی سیستمیک، الایزای مثبت در برگ مایه زنی شده و مایه زنی نشده)، R (آلودگی لکه موضعی نکروتیک، بدون آلودگی سیستمیک با نتایج الایزای مثبت در برگ مایه زنی شده و منفی برای برگ های مایه زنی نشده) و R_N+ (علایم موضعی نکروتیک به همراه علایم سیستمیک نکروتیک، شناسایی ویروس توسط آزمون الایزا در برگ های مایه زنی شده و مایه زنی نشده) در معرفی نوع پاتوتیپ مورد استفاده قرار گرفته است (Jenner & Walsh 1996). ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های استرالیایی کلزا حاکی از وجود چهار نوع فنوتیپ R، R_N، R_N+ و + می‌باشد (Coutts *et al.* 2007). فنوتیپ‌های مختلف مقاومت به TuMV در پنج گونه گیاهی از تیره شب‌بو شامل گونه های *Brassica junica*، *Camelina sativa*، *B. oleracea*، *B. rapa* و *Rhaphanus sativus* ارزیابی شده و در مجموع ۱۰ نوع فنوتیپ در اثر مایه زنی

این گیاهان به ویروس معرفی شده است (Nyalugew *et al.* 2015).

در ایران از وضعیت واکنش ارقام تجاری کلزا در برابر TuMV اطلاعاتی دقیقی در دست نیست. ازاین‌رو هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی واکنش ارقام تجاری و لاین‌های کلزای موجود در ایران در برابر TuMV و همچنین معرفی یک روش نمره‌دهی مناسب که بتواند ارتباط علایم و شدت بیماری را در ارقام و لاین‌های کلزا به TuMV نشان دهد.

روش بررسی

ژنوتیپ‌های کلزا و منبع ویروس

در این تحقیق ۱۱ رقم و دو لاین کلزای تجاری شامل ارقام بهاره و پاییزه مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه ارقام و لاین‌های مورد بررسی به استثنای رقم هیبرید هایولا ۴۰۱ از نوع آزاد گرده افشان بودند. بذور کلیه ارقام از مرکز تحقیقات دانه‌های روغنی کشور تهیه گردید. نام ومشخصات ارقام مورد استفاده در این پژوهش در جدول یک آمده است.

جدایه ویروس مورد استفاده از دکتر Ko Verhoeven از سازمان گیاه پزشکی بین المللی واگنینگن کشور هلند دریافت گردید. این جدایه از گیاه *Brassica chinensis* جداسازی شده است. بخش عمده‌ای از توالی ژن رمز کننده پروتئین پوششی این جدایه توالی‌یابی و در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره رس KU535893 ثبت شد. ابتدا برای فعال سازی ویروس، برگ‌های دریافتی آلوده به TuMV در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷/۴ عصاره گیری شد و به همراه پودر کاربوراندوم به برگ‌های توتون *Nicotiana benthamiana* مایه‌زنی شد. علایم سیستمیک در توتون حدود ۱۰-۷ روز پس از مایه زنی ظاهر و آلودگی ویروسی تأیید شد.

مایه زنی گیاهان با TuMV

رشد و جوانه زنی بذر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام و خاک گلدان‌ها از ترکیب مساوی پیت، پرلیت و خاک آماده شد. گیاهان کشت شده در شرایط گلخانه در مرحله ۵-۳ برگی با عصاره برگ‌های توتون آلوده به TuMV مایه‌زنی شدند. گیاهان شاهد هر رقم نیز به عنوان کنترل منفی با بافر فسفات و پودر کاربوراندم تیمار شدند. برگ‌های آلوده به ویروس موزاییک شلغم در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷/۴ حاوی پودر کاربوراندوم مایه‌زنی شدند. گیاهان در شرایط گلخانه در دمای ۱۸ درجه سلسیوس تا پایان نمونه‌برداری نگهداری شدند.

ارزیابی آلودگی به ویروس با روش نسخه‌برداری معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RT-PCR)

برای تأیید آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده به TuMV، گیاهان مایه‌زنی شده به ویروس با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به طریق نسخه‌برداری معکوس با استفاده از جفت آغازگرهای معرفی شده توسط سانچز و همکاران (Sanchez *et al.* 2003) تکثیر کننده قطعه ۹۸۶ جفت‌بازی، شامل بخشی از طول ژن پروتئین پوششی، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نسخه‌برداری معکوس و تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به ترتیب با استفاده از کیت‌های تجاری RT master mix (2×) شرکت HyperScript™ و *Taq* master mix (2×) شرکت Amplicon و طبق دستور العمل آن‌ها انجام شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و

جدول ۱: نام و مشخصات ارقام کلزای تجاری ایران ارزیابی شده در این تحقیق

Table 1: Name and characteristics of commercial canola varieties in Iran evaluated in this study

نام رقم یا لاین Name of Varieties or lines	تیپ Type	مناطق کشت Farming area	مبدأ Source
Hayola 401	بهاره Spring	مناطق گرم و مرطوب Warm and humid zones	استرالیا Australia
Zafar	بهاره Spring	مناطق گرم و مرطوب Warm and humid zones	ایران Iran[
Sary gol	بهاره Spring	مناطق گرم و مرطوب Warm and humid zones	ایران Iran
Karaj 1	زمستانه Winter	مناطق سرد و معتدل Cool and temperate zones	ایران Iran
Karaj 2	زمستانه Winter	مناطق سرد و معتدل سرد Cool and temperate zones	ایران Iran
Karaj 3	زمستانه Winter	مناطق سرد و معتدل سرد Cool and temperate zones	ایران Iran
RGS003	بهاره Spring	استان های گرم و مرطوب Warm and humid zones	آلمان Germany
Opera	زمستانه Winter	مناطق سرد و معتدل سرد Cool and temperate zones	سوئد Sweden
Talayeh	زمستانه Winter	مناطق سرد و معتدل سرد Cool and temperate zones	آلمان Germany
Licord	زمستانه Winter	مناطق سرد و معتدل سرد Cool and temperate zones	آلمان Germany
Okapi	زمستانه Winter	مناطق سرد و معتدل سرد Cool and temperate zones	فرانسه France
SLM046	زمستانه Winter	مناطق سرد و معتدل سرد Cool and temperate zones	آلمان Germany
Zarfam	زمستانه Winter	مناطق سرد و معتدل سرد Cool and temperate zones	ایران Iran

سپس ۳۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، دمای ۵۵/۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه انجام و در آخر گسترش نهایی در دمای ۷۲ سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد.

تعیین و ثبت شاخص شدت علایم

پس از مایه‌زنی ویروس، نوع و شدت علایم بیماری در برگ‌های مایه‌زنی شده و برگ‌های فوقانی به طور روزانه از زمان مایه‌زنی تا چهار هفته پس از آن بررسی و یادداشت برداری شد.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک گیاهان

برای بررسی اثر آلودگی ویروس بر وزن تر و خشک، اندام هوایی گیاهان ۵۰ روز پس از مایه‌زنی جمع‌آوری و وزن تر و خشک آنها اندازه گیری شد. به منظور اندازه-گیری وزن خشک گیاهان، نمونه ها به مدت دو روز در دمای ۷۰ درجه سلسیوس در آون نگهداری و سپس وزن خشک اندام هوایی آنها اندازه‌گیری شد.

ارزیابی میزان آلودگی ویروس بر اساس نتایج آزمون الایزا

چهار هفته پس از مایه‌زنی ویروس، کلیه گیاهان با آزمون الایزای غیر مستقیم با استفاده از روش توصیف شده توسط *کانورس و مارتین* (Converse & Martin 1990) انجام شد. با آنتی بادی تهیه شده از شرکت DSMZ آلمان با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر PBST (حاوی دو درصد PVP و ۰/۲ درصد Bovine serum albumin) به عنوان آنتی‌بادی اولیه و Anti-rabbit IgG (Fc) AP conjugate شرکت پرومگا (آمریکا) با رقت ۱:۷۵۰۰در بافر یادشده به عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده‌شد. برای این منظور از برگ‌های میانی گیاهان در موقعیت یکسان برای استخراج عصاره با بافر عصاره‌گیری (PBST حاوی دو درصد PVP) به نسبت یک میلی لیتر بافر برای ۰/۱ گرم بافت برگ استفاده شد.

طرح آزمایشی و تحلیل داده ها

این پژوهش با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار بطوریکه در هر تکرار چهار گلدان با دو گلدان گیاه آلوده و دو گلدان از گیاه سالم انجام شد. آزمایش ارزیابی ارقام دو بار تکرار شد. تحلیل آماری مقایسه میانگین نتایج الایزا، وزن تر، وزن خشک و شاخص علایم با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 انجام شد و جهت مقایسه میانگین ها از آزمون کمترین اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج الایزا

نتایج الایزا نشان داد که تمام گیاهان شاهد ارقام تجاری و لاین‌های کلزای ایران از نظر آماری در یک گروه مستقل از گیاهان مایه‌زنی شده به TuMV قرار گرفتند، این نتیجه تایید کننده آلودگی سیستمیک گیاهان مایه‌زنی شده بود. از طرف دیگر، به استثنای رقم ساری‌گل بین گیاهان آلوده ارقام مختلف اختلاف معنی داری دیده نشد (جدول۲).

نتایج نسخه‌برداری معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز (RT-PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به طریق نسخه‌برداری معکوس با آغازگرهای اختصاصی TuMV منجر به تکثیر قطعه حدود یک کیلوجفت‌بازی مورد انتظار شد که تاییدکننده آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده با TuMV بود (شکل ۱).

تعیین شاخص‌های آلودگی و تحلیل نتایج آن‌ها

در این تحقیق با بررسی پیشرفت بیماری، شاخص‌های علایم از درجه صفر تا هشت تعیین شد (جدول۳)، بطوریکه بیشترین شدت بیماری مربوط به شاخص هشت و کمترین آن شاخص صفر بود. کلیه شاخص‌ها از مقایسه تفاوت علایم بین گیاه شاهد مایه‌زنی شده با بافر فسفات و گیاه مایه‌زنی شده با عصاره گیاهی آلوده به ویروس در بافر فسفات برای هر رقم معرفی شدند (شکل ۲).

روند توسعه علایم بیماری از زمان مایه‌زنی ویروس تا ۵۰ روز بعد بررسی و تغییرات ایجاد شده در مقایسه با

جدول ۲: میانگین شاخص شدت علائم، جذب نوری در طول موج ٤٠٥ نانومتر، چهار هفته پس از مایه زنی، وزن های تر و خشک گیاهان هفت هفته پس از مایه زنی با TuMV

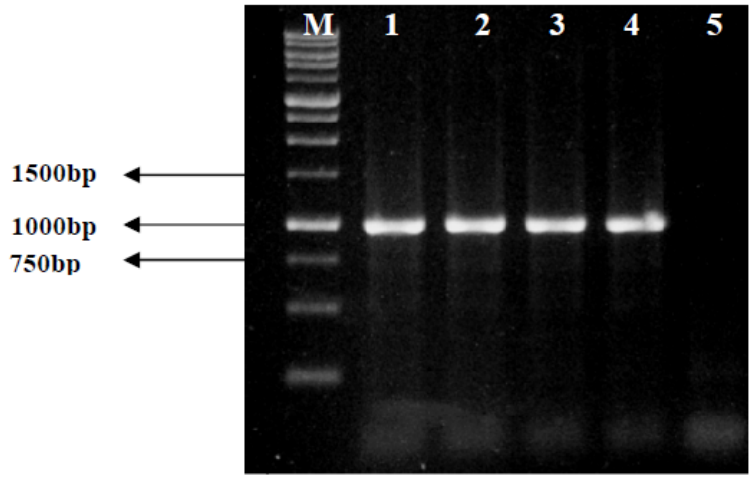
Table 2: Mean of severity index, absorbance at 405 nm wave length four weeks after inoculation, fresh and dried weights seven weeks post inoculation with TuMV

رقم یا لاین	میانگین شاخص شدت علائم		میانگین جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر		میانگین وزن تر گیاهان (گرم)		میانگین درصد کاهش وزن تر	میانگین وزن خشک گیاهان (گرم)		میانگین درصد کاهش وزن خشک
	(I)	(NI)	(I)	(NI)	(I)	(NI)		(I)	(NI)	
Karaj2	7.66^{a}	0^{h}	2.44^{a}	1.31^{c}	4.43^{cd}	10.51^{a}	57	0.60^{cde}	1.63^{ab}	63
RGS003	6.83^{b}	0^{h}	2.38^{ab}	1.27^{c}	5.99^{abcd}	9.21^{abc}	34	0.83^{abcde}	1.36^{abc}	38
Karaj1	6.58^{b}	0^{h}	2.46^{a}	1.28^{c}	5.38^{abcd}	7.70^{abcd}	30	0.64^{cde}	1.00^{abcde}	36
SLM046	5.41^{c}	0^{h}	2.29^{ab}	1.16^{c}	5.66^{abcd}	6.80^{abcd}	16	0.70^{cde}	0.93^{abcde}	24
Sary gol	5.25^{c}	0^{h}	1.92^{b}	1.28^{c}	6.06^{abcd}	8.11^{abcd}	25	0.84^{abcde}	1.01^{abcde}	16
Zafar	5.08^{cd}	0^{h}	2.10^{ab}	1.31^{c}	6.88^{abcd}	7.50^{abcd}	8	0.93^{abcde}	1.05^{abcde}	11
Opera	5.00^{cde}	0^{h}	2.42^{a}	1.27^{c}	4.06^{cd}	5.00^{bcd}	18	0.70^{cde}	0.83^{abcde}	15
Hayola 401	4.91^{cde}	0^{h}	2.37^{ab}	1.32^{c}	5.20^{abcd}	5.66^{abcd}	8	0.63^{cde}	0.76^{bcde}	17
Licord	4.58^{def}	0^{h}	2.38^{ab}	1.17^{c}	8.00^{abcd}	9.98^{ab}	19	1.36^{abcde}	1.70^{a}	20
Zarfam	4.5^{def}	0^{h}	2.09^{ab}	1.26^{c}	4.94^{bcd}	6.56^{abcd}	24	0.8^{bcde}	1.04^{abcde}	23
Talayeh	4.41^{ef}	0^{h}	2.48^{a}	1.31^{c}	6.75^{abcd}	7.75^{abcd}	12	0.80^{abcde}	0.93^{abcde}	13
Okapi	4.25^{f}	0^{h}	2.34^{ab}	1.26^{c}	2.93^{d}	4.29^{cd}	31	0.36^{e}	0.46^{ed}	21
Karaj3	2.58^{g}	0^{h}	2.33^{ab}	1.29^{c}	7.03^{abcd}	8.55^{abc}	17	1.09^{abcd}	1.30^{abc}	16

I: گیاه مایه زنی شده با عصاره گیاه آلوده به TuMV در بافر فسفات ، NI: گیاه مایه زنی شده با بافر فسفات

میانگین‌هایی که با حروف مشابه علامت گذاری شده‌اند بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ در یک گروه قرار دارند.

Means light absorption values indicated by the same letters represent not significant differences at $P \leq 0.05$ calculated using the least significant difference test and put in one group.



شکل ۱ : نقش الکتروفورزی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ژل آگارز یک درصد با استفاده از آر.ان.ای استخراج شده از چهار نمونه گیاهی الایزا مثبت با آغازگرهای تکثیر کننده بخشی از ژن پروتئین پوششی TuMV، M: نشانگر انـدازه دی.ان.ای (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas) ۱:کرج۱، ۲: کرج۲، ۳: کرج۳، ٤: هایولا ٤۰۱ و ٥: گیاه سالم

Fig1: Agarose gel electrophoresis pattern of RT-PCR products obtained from total RNA extracts of four ELISA positive plants using the specific primers for coat protein gene of TuMV. Lanes M: molecular marker (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas) 1: Karaj1, 2: Karaj2, 3: Karaj3, Hyola 401 and 5: Healthy plant

شاهد هر رقم ثبت گردید. جدول دو تحلیل نتایج شـاخص بیماری را نشان می‌دهد. نتایج تحلیل با نـرم افـزار SAS و در سطح احتمال پـنج درصـد نشـان داد کـه لایـن کـرج۲ بیشترین شاخص شدت علایم را بـه خـود اختصـاص داد بطوریکه از نظر آماری اختلاف معنـی‌داری بـا سـایر ارقـام داشت و پس از آن رقم RGS003 و لاین کـرج۱ بیشـترین شـاخص شـدت علایـم را نشـان دادنـد و بـا سـایر ارقـام اختلاف معنی‌داری داشتند. کمترین شاخص شـدت علایـم نیز به رقم کرج۳ تعلق گرفت (جدول ۲ و شکل ۳).

تحلیل وزن تر و خشک گیاهان

نتایج تحلیل آماری وزن تر و خشک گیاهـان نشـان داد که گیاهان لاین کرج۲ مایه‌زنی شده با ویـروس در مقایسـه با گیاهان شاهد ایـن لایـن از نظـر آمـاری دارای اخـتلاف معنی بودند و این لاین بیشترین کاهش وزن تر و خشک را در برابر آلودگی ویروس نشان داد (جدول۲).

بحث

ارقام تجاری و لاین‌های بهاره و پاییزه کلزای ایران به مایـه زنی با TuMV واکنش‌های متفاوتی از نظر سرعت ظهور و نوع علایم بیماری ماننـد پیسـک، موزاییـک، جزایـر سـبز، زردی و کاهش رشد گیاه نشان دادند (شکل ۲). بر اسـاس نتایج حاصل از آزمایش اولیه و دو تکرار آزمایش اصلی در شرایط کنترل شده گلخانه شاخص علایم برای ارقام کلزای آلوده به TuMV برای اولین بار معرفی گردید. پیسک تنهـا در رقم کرج۳ مشاهده شد که به همراه تـأخیر ۲۰ روزه در بروز علایم سیستمیک ویروس و بدون بروز علایم سـبزرد در برگ‌های مایه‌زنی‌شده مشاهده شد. علایم زردی به طور غالب در رقم RGS003 و به میزان کمتـری در لایـن‌هـای کرج۱ و کرج۲ نیز قابل مشاهده بود.

در این پژوهش هشت شاخص علایم (صفر تا هشـت) برای گیاهان مایه‌زنی شده به TuMV معرفی شـد (جـدول ۳). در شاخص یک در برگ‌های گیاهان مایه‌زنی شـده بـه

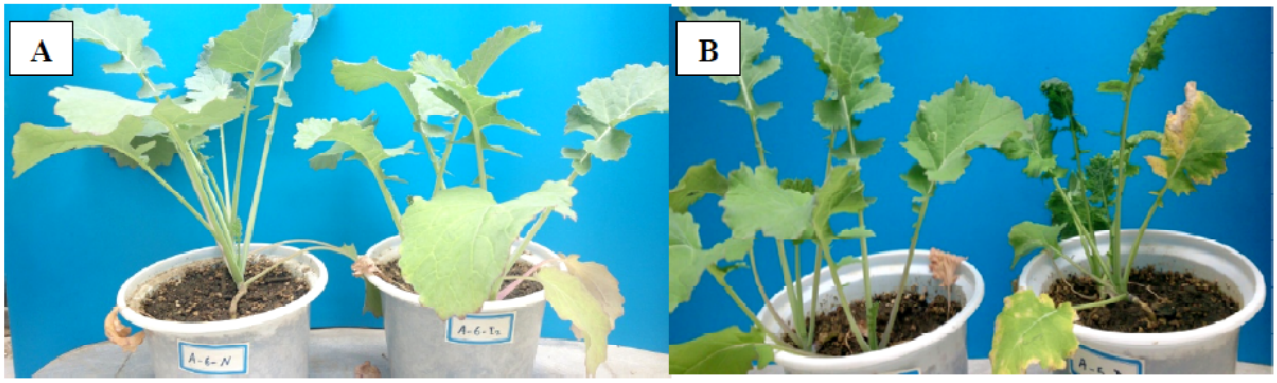
جدول۳: شاخص علایم آلودگی کلزا به TuMV

Table 3: TuMV symptom score in canola

شاخص علایم Symptom score	شرح علایم Symptoms Description
0	بدون علایم (Symptomless)
1	پیسک در برگ‌های بالایی (Mottling on top leaves)
2	موزاییک در برگ‌های بالایی (Mosaic on top leaves)
3	موزاییک عمومی (Systemic mosaic)
4	موزاییک شدید و روشن شدن رگبرگ در برگ‌های بالایی (Severe mosaic and vein clearing on top leaves)
5	شبه لکه حلقوی (Ring spot-like)
6	جزایر سبز (Green islands)
7	کاهش رشد (Growth reduction)
8	کاهش رشد و زردی (Growth reduction and yellowing)

شکل۲: علایم ظاهر شده در اثر مایه‌زنی مکانیکی TuMV در ارقام تجاری و لاین‌های کلزا، A: لکه سبزرد موضعی در برگ مایه‌زنی شده B: پیسک C: جزایر سبز D: موزاییک شدید و رگ‌روشنی E: شبه لکه حلقوی F: زردی گیاه

Fig2: Symptoms induced by mechanical inoculation with TuMV in commercial canola varieties, A: chlorotic local lesion on inoculated leave, B: mottling, C: green islands, D: severe mosaic and vein clearing, E: ring spot-like F: yellowing



شکل۳: علایم بیماری در گیاهان متحمل و بسیار حساس مایه زنی شده با TuMV در مقایسه با گیاه سالم A: رقم متحمل کـرج۳. گیـاه سالم (چپ) و آلوده با علایم خفیف (راست). B: لاین بسیار حساس کرج۲. گیاه سالم (چپ) و آلوده (راست).

Fig 3: The disease symptoms of tolerant and the most susceptible plants inoculated with TuMV in comparison with healthy plant. A: Tolerant variety of Karaj3. Healthy (left) and inoculated (right) plants. B: The most susceptible line of Karaj2. Healthy (left) and inoculated (right) plants.

ویروس علایم لکه سبزرد مشاهده نشد و علایم سیستمیک بیماری به صـورت پیسـک نیـز بـا تـأخیر بـروز کـرد. در شاخص دو به دنبال پیسک علایم موزاییک نیز تشکیل شد. در شاخص‌های سه و چهار به ترتیـب علایـم موزاییـک و موزاییک شدید به صورت مسـتقیم و بـدون پیسـک ظـاهر شدند. با توسعه و افزایش شدت بیماری علایـم شـبه لکـه حلقوی برای شاخص پنج معرفی شد. همچنین در شاخص شش منطقه آلوده در برگ‌های جدید توسعه بیشـتری پیـدا کرد به‌طوریکه از اطراف برگ بـه سـمت داخـل گسـترش یافته تا جاییکه در شاخص شش جزایر سـبز تشـکیل شـد. در شاخص هفت کاهش رشد گیاه نیز بر علایـم یـاد شـده اضافه شد و در نهایت در شاخص هشت گیاه‌های مایه‌زنی شده با ویروس زرد شدند.

جنـر و *والـش* (Jenner & Walsh 1996) چهـار نـوع فنوتیپ برای واکنش کلزا بـهTuMV شـامل O، +، R و $+_N$ معرفی کرده‌اند. در بررسی دیگر سه نوع فنوتیـپ مقاومـت (R، RN و N+) و یـک فنوتیـپ حساسـیت (+) در کلـزا گـزارش گردیـده‌اسـت (Coutts *et al.* 2007). همچنـین هـوگس و همکـاران (Hughes *et al.* 2002) چهـار نـوع فنوتیپ (یک فنوتیپ حساسیت و سه نوع فنوتیپ متفـاوت مقاومت) را در اثر مایه زنی TuMV با ارقـام کلـزا معرفـی کرده‌اند. بر خلاف گزارش‌های یاد شـده در ایـن پـژوهش تمام ارقـام تجـاری کلـزای ایـران فنوتیـپ حساسـیت بـه TuMV نشان دادند و به جز یک رقم متحمل در هیچ کدام از ارقام تجاری ایران فنوتیپ‌های مقاومـت مشـاهده نشـد. ارقام تجاری کلزای بررسی شده در این پـژوهش فنوتیـپ-های متفاوتی از واکنش حساسـیت بـه TuMV داشـتند در حالیکه تنها یک فنوتیپ حساسـیت توسـط جنـر و *والـش* (Jenner & Walsh 1996) معرفی شده‌است. بنابراین نیـاز به معرفی یک سامانه نمره‌دهی که بتواند میزان حساسیت و تحمل ارقام را بر اساس شدت علایم تعیین کنـد ضـروری بود. به نظر می‌رسد شاخص شدت علایم معرفـی شـده در این پژوهش بتواند فقدان چنین سامانه‌ای را جبران کند.

بر اساس تعریف ارایه شده توسط *هال* (Hull 2014) در اثر مایه‌زنی ویروس، امکان بروز یکـی از دو نـوع واکـنش کلی ایمنی (غیرمیزبانی) و یا آلودگی (میزبانی) وجود دارد. بر این اساس واکنش آلودگی به سه گروه تقسیم مـی‌شـود؛ گروه اول فوق حساسـیت شـدید: در ایـن واکـنش تکثیـر

ویروس به سلول‌های آلوده اولیه محدود می‌شود، گروه دوم فوق حساسیت: آلودگی به سلول‌های اطراف آلودگی اولیه محدود می‌شود که معمولا به صورت مناطق بافت مرده موضعی قابل مشاهده است و گروه سوم واکنش پذیرنده: تکثیر ویروس و حرکت سیستمیک آن در گیاه انجام می‌گیرد. واکنش پذیرندگی نیز به واکنش حساس و متحمل تقسیم می‌شود. گیاهان حساس علایم شدید بیماری را نشان می‌دهند اما در گیاهان متحمل علایم خفیفی از بیماری مشاهده می‌شود و یا ممکن است در این گیاهان علایمی مشاهده نشود. نتایج پژوهش حاضر واکنش تمام ارقام و لاین‌های مورد مطالعه را در گروه واکنش پذیرنده قرار داد. همچنین براساس شاخص‌های علایم معرفی شده در این تحقیق ارقام تجاری کلزای ایران به TuMV به چهار گروه متحمل (رقم کرج۳)، نیمه حساس (هایولای ۴۰۱، اپرا، طلایه، اکاپی، زرفام، ظفر، ساری گل، لیکورد و SLM046)، حساس (کرج ۱ و RGS003) و بسیار حساس (کرج۲) گروه بندی شدند.

میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر در آزمون الایزا بین گیاهان شاهد و آلوده برای هر رقم اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد نشان داد که بیانگر تأیید آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده به TuMV بود. مقایسه بین گیاهان آلوده ارقام مختلف با یکدیگر نشان داد که تمام ارقام آلوده به استثنای رقم ساری‌گل در یک گروه قرار گرفتند. تاکنون رابطه بین میزان غلظت ویروس در بافت گیاه آلوده و شدت علایم بیماری برای TuMV بررسی نشده است. مقایسه نتایج تحلیل آماری میانگین جذب الایزا با میانگین شاخص‌های علایم نشان داد که هرچند جذب نوری در گیاهان آلوده رقم ساری‌گل در مقایسه با گیاهان آلوده سایر ارقام پایین‌تر است اما همبستگی معنی-داری بین دو عامل جذب نوری و شاخص علایم وجود نداشت. نتایج این پژوهش نشان داد میزان غلظت ویروس در بافت گیاه تأثیر معنی‌داری از نظر آماری بر ایجاد شاخص‌های علایم بیماری نداشتند. اگرچه آزمون الایزا برای اندازه‌گیری میزان غلظت ویروس در بررسی واکنش گیاه به بیمارگر ویروسی بطور عمومی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما نتایج الایزا همیشه رابطه مستقیمی با علایم بیماری ندارد و بنابراین به منظور تعیین اثر ویروس در گیاه نیاز به روش کمی دقیق‌تر و قابل اطمینان‌تری است. این یافته‌ها مطابق با یافته‌های *استراسبق* و همکاران (Strausbaugh *et al.* 2003) می‌باشد.

مقایسه میانگین وزن خشک و تر بین گیاهان سالم و آلوده به TuMV در سطح احتمال پنج درصد نشان داد که بجز لاین کرج۲ در سایر ارقام آلوده به ویروس تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. گیاهان آلوده لاین کرج۲ شاخص-های شدت علایم بالا (شاخص ۶ به بالا) را به خود اختصاص دادند. مقایسه میانگین وزن خشک و تر گیاهان سالم و آلوده رقم کرج۳ (کمترین شاخص علایم) نشان داد هر چند که علایم بیماری با ۲۰ روز تأخیر و به صورت خفیف ظاهر شد ولی اختلاف معنی‌دار میانگین وزن خشک و تر گیاهان سالم و آلوده نبود.

تعیین خسارت TuMV در محصولات مختلف انجام و کاهش تعداد و وزن سر بوته کلم *B.* var. *capitata* *oleracea*به میزان ۵۰ درصد در کنیا (Spence *et al.*, 2007)، کاهش خسارت ایجاد شده در ریشه به میزان ۴۰ درصد در گیاه *Cochlearia arnoracia* (Horseradish) در لهستان (Gorecka & Lehmann 2001)، کاهش ۳۰ درصدی در *B. napus* var. *napobrassica* در کانادا (Shattuck & Stobbs 1987) و کاهش عملکرد بذر بیش از ۷۰ درصد در کلزا *B. napus* در بریتانیا (Hardwick *et al.* 1994) گزارش شده است. خسارت ایجاد شده توسط

TuMV در کلزا می‌تواند به صورت کاهش تعداد و اندازه غلاف‌های بذری، همچنین تعداد و اندازه بذرها ایجاد شود (Walsh & Tomlinson 1985). همچنین خسارت ایجاد شده توسط TuMV در گیاه میزبان می‌تواند به صورت کاهش کیفیت محصول نیز ایجاد شود (Hunter *et al.* 2002). در این مطالعه تأثیر آلودگی به TuMV بر وزن تر و خشک گیاه کلزا بررسی شد و نتایج نشان داد که وزن تر و خشک تا ۵۰ روز پس از مایه‌زنی به غیر از ژنوتیپ کرج۲ تغییر معنی‌داری نکرد.

از آنجاییکه رقم تجاری با واکنش مقاومت به TuMV در ایران یافت نشد، بنابراین تلاش برای بهبود و اصلاح ژنتیکی این ارقام به روش‌های مختلف مانند انتقال ژن مقاومت و یا انتقال سازه مناسب القاکننده خاموشی آر ان ای ویروسی پیشنهاد می‌شود. به منظور افزایش اعتبار شاخص علایم معرفی شده در این پژوهش پیشنهاد می‌شود که همبستگی شاخص علایم با سایر اجزای عملکردی مانند تعداد و اندازه غلاف‌ها، تعداد و وزن هزار دانه بذور و کیفیت روغن مورد بررسی قرار گیرد. به سبب آنکه پژوهش‌های انجام شده برای معرفی فنوتیپ‌های مقاوم به کلزا (Jenner & Walsh 1996) و یا سایر میزبان‌های تیره شب‌بو (Nyalugwe *et al.* 2015) در برابر TuMV محدود به شرایط کنترل شده گلخانه و بررسی علایم حداکثر ۴ هفته پس از مایه‌زنی ویروس بوده‌است، پیشنهاد می‌شود اعتبار شاخص علایم در شرایط مزرعه و تا پایان طول فصل رشد گیاه نیز مورد بررسی قرار گیرد.

این پژوهش اولین گزارش از ارزیابی ارقام تجاری و لاین‌های کلزای موجود در ایران نسبت به TuMV و همچنین معرفی یک سامانه نمره‌دهی برای ارزیابی ارقام و لاین‌های متحمل و حساس کلزا به این ویروس می‌باشد.

منابع

Anonymous. 2014. Agricultural statistics year book. Ministry of Jahad-e-Agriculture of Iran, Tehran. 156p.

Bahar M., Danesh D. and Dehghan M. 1985. *Turnip mosaic virus* in stock plant. Iranian Journal of Plant Pathology 21(1-4), 33-39.

Converse R. H. and Martin R. R. 1990. ELISA methods for plant viruses. In: R., Hampton, E., Ball and S. De Boer (Eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A laboratory manual. APS Press. 389 pp.

Coutts B. A., Walsh J. A., and Jones R. A. C. 2007. Evaluation of resistance to *Turnip mosaic virus* in Australian *Brassica napus* genotypes. Australian Journal of Agricultural Research 58: 67-74.

Farzadfar S., Ohshima K., Pourrahim R., Golnaraghi A. R., Jalali S. and Ahoonmanesh A. 2005. Occurrence of *Turnip mosaic virus* on ornamental crops in Iran. Plant Pathology 54:261.

Farzadfar S., Tomitaka Y., Ikematsu M., Golnaraghi A. R., Pourrahim R. and Ohshima K. 2009. Molecular characterisation of *Turnip mosaic virus* isolates from Brassicaceae weeds. European Journal of Plant Pathology 124:45–55

Ghorbani S., Shahraeen N., Dehghanyar H., Sahandi A. and Pourrahim R. 2007. Serological identification and purification of *Turnip mosaic virus*. (TuMV) in the oil seed rape. Iranian Journal of Biology 20:61-71.

Gorecka K., and Lehmann P. 2001. Infectious diseases of horseradish (*Cochlearia amoracia* L.) in Poland. Plant Breeding and Seed Science 45:55-64.

Hardwick N. V., Davies J. M. L. and Wright D. M. 1994. The incidence of three virus diseases of winter oilseed rape in England and Wales in the 1991/92 and 1992/93 growing seasons. Plant Pathology 43:1045-1049.

Hughes S. L., Green S. K., Lydiate D. J., and Walsh J. A. 2002. Resistance to *Turnip mosaic virus* in *Brassica rapa* and *B. napus* and the analysis of genetic inheritance in selected lines. Plant Pathology 51:567-573.

Hull R. 2014. Plant virology. 5th ed., Academic Press, USA, 1104 p.

Hunter P. J., Jones J. E. and Walsh J. A. 2002. Involvement of *Beet western yellows virus*, *Cauliflower mosaic virus* and *Turnip mosaic virus* in internal disorders of stored white cabbage. Phytopathology 92:816–826.

Jenner C. E., and Walsh J. A. 1996. Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. Plant Pathology 45:848-856.

Nyalugwe E. P., Barbetti M. J. and Jones R. A. C. 2015. Studies on resistance phenotypes to *Turnip mosaic virus* in five species of Brassicaceae, and identification of a virus resistance gene in *Brassica juncea*. European Journal of Plant Pathology 141:647-666.

Sabokkhiz M. A., Jafarpour B., Shahriari A. and Tarighi S. 2012. Identification of *Turnip mosaic virus* isolated from canola in northeast area of Iran. African Journal of Biotechnology 11(80):14553-14560.

Sanchez F., Wang X., Jenner C. E., Walsh J. A., and Ponz F. 2003. Strains of *Turnip mosaic potyvirus* as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. Virus Research. 94:33- 43.

Shahraeen N. 2012. An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran**.** International Research Journal of Microbiology 3:1, 24-28.

Shahraeen N., Farzadfar S. and Lesemann D. E. 2003. Incidence of viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) in Iran. Journal of Phytopathology 151:614-616

Shattuck V. I. and Stobbs L. W. 1987. Evaluation of rutabaga cultivars for turnip mosaic virus resistance and the inheritance of resistance. Horticultural Science 22:935–937.

Shukla D. D., Ward C. W. and Brunt A. A. 1994. The *Potyviridae*. CAB Int, Wallingford.

Spence N. J., Phiri N. A., Hughes S. L., Mwaniki A., Simons S., Odour G., Chacha D., Kuria A., Ndirangu S., Kibata G. N. and Marris G. C. 2007. Economic impact of *Turnip mosaic virus*, *Cauliflower mosaic virus* and *Beet mosaic virus* in three Kenyan vegetables. Plant Pathology 56:317-323.

Strausbaugh C. A., Myers, J. R., Forster R. L., and McClean P. E. 2003. A quantitative method to screen common bean plants for resistance to *Bean common mosaic necrosis virus*. Phytopathology 93:1430–6.

Suh S. K., Green S. K. and Park H. G. 1995. Genetics of resistance to five strains of *Turnip mosaic virus* in Chinese cabbage. Euphytica 81:71–77

Walsh J. A. and Tomlinson J. A. 1985. Viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. oleifera). Annals of Applied Biology. 107:485–495.

Walsh J. A and Jenner C. E. 2002. *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. Molecular Plant Pathology 3:289–300.

Zahedi Tabarestani A., Shams-Bakhsh M. and Safaei N. 2010. Distribution of three important aphid borne canola viruses in Golestan province. Iranian Journal of Plant Protection Science 41:251-259.