فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹۲
صص ۲۴-۱۹

ارزیابی مقاومت به سویه معمولی ویروس Y سیب زمینی (PVY^O) در چهار رقم سیب‌زمینی در شرایط گلخانه

فاطمه زینتی فخرآباد*[۱]، سعید نصرالله نژاد[۲]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۶

چکیده

ویروس وای سیب زمینی گونه تیپ جنس *Potyvirus* از خانواده Potyviridae، یکی از عوامل مهم کاهش عملکرد سیب‌زمینی است که مقدار خسارت آن به عوامل متعددی از جمله رقم سیب زمینی، زمان وقوع آلودگی و سویه ویروس بستگی دارد. در حال حاضر آلودگی به این ویروس در بسیاری از مزارع توتون و سیب زمینی استان گلستان مشاهده می‌شود. استفاده از ارقام مقاوم موثرترین، اقتصادی‌ترین و کم خطرترین روش مبارزه و کاهش خسارت بیماری‌های ویروسی می‌باشد. این پژوهش با هدف تعیین عکس‌العمل چهار رقم سیب زمینی رایج در مزارع استان گلستان شامل بورن، بانبا، مارلا و ساتینا در مقابل آلودگی به PVY^O و شناسایی منابع احتمالی مقاومت در مقابل این ویروس انجام گرفت. در مرحله هشت برگی بوته‌های هر رقم به روش مکانیکی با عصاره حاوی سویه PVY^O ویروس مایه زنی شد. بوته‌ها پس از مایه زنی در گلخانه نگهداری شدند و ارزیابی علائم تا چهار هفته انجام گرفت. براساس درجه علائم ثبت شده در ارزیابی‌ها، تجزیه آماری صورت گرفت. هم‌چنین این رقم‌ها با آزمون داس الایزا نیز بررسی شدند. علائم آلودگی به ویروس وای سیب زمینی در تمامی رقم‌ها ایجاد شد، ولی از نظر شاخص درجه علائم تفاوت‌هایی وجود داشت. رقم ساتینا تنها رقمی بود که در آزمایش از نظر شاخص درجه علائم نسبت به میانگین کل ارقام، بالاترین شاخص و بیش‌ترین حساسیت را نشان داد، اما براساس نتایج داس الایزا بالاترین غلظت ویروس در رقم بورن مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: مقاومت، ارقام سیب زمینی، PVY^O، DAS-ELISA

[۱]- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
[۲]- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
*- نویسنده مسئول مقاله: zinati_fateme@yahoo.com

مقدمه

گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) از گیاهان بومی نیم کره غربی و از کوه‌های آند در بولیوی یا پرو منشاء گرفته است (Khajehpour, 1994). سیب زمینی در حدود دو قرن پیش وارد ایران شده و هم اکنون در مناطق گوناگون کشور کشت می‌شود. بر اساس آمارنامه کشاورزی ۸۵-۱۳۸٤ سطح زیر کشت این محصول در استان گلستان در سال زراعی ۸٤، ٦٤٤۸۰۰۰ هکتار با تولید ۱۰۹۱۸۵ هزار تن و عملکرد ۱٦۹۳۳ کیلوگرم در هکتار بوده است (Anonymous, 2005). به دلیل این که سیب‌زمینی به‌صورت غیر جنسی تکثیر می‌شود، آلودگی‌های ویروسی از نسلی به نسل دیگر منتقل شده و طی چند سال کشت متوالی درصد آلودگی افزایش یافته و عملکرد به شدت کاهش می‌یابد که به این حالت اضمحلال یا دژنراسیون بذر گفته می‌شود. تاکنون بیش از ۲۵ نوع بیماری ویروسی از سیب زمینی گزارش شده که برخی از آنها اهمیت اقتصادی داشته و در هر منطقه تعدادی از آنها خسارت بالایی به این محصول وارد می‌کنند. خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی بسته به نوع ویروس، رقم سیب زمینی و شرایط محیطی از ۱۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است (De Bokx and Van der Want, 1987). ویروس *Potato virus Y* (PVY) گونه تیپ جنس *Potyvirus* از خانواده Potyviridae دارای پیکره‌های رشته‌ای بوده و از مهم‌ترین ویروس‌های بیمارگر سیب زمینی است که گسترش جهانی دارد. مقدار خسارت آن بسته به سویه ویروس، تا ۸۰ درصد در آلودگی‌های اولیه و در آلودگی‌های ثانویه تا ۷۰-۱۵ درصد گزارش شده است (Vance, 1991). PVY به روش مایه‌زنی مکانیکی عصاره آلوده، پیوند و به‌وسیله حداقل ۲۵ گونه شته به‌صورت ناپایا منتقل می‌شود. شته سبز هلو مهم‌ترین ناقل آن است. مهم ترین سویه‌های ویروس فوق شامل سویه معمولی PVY^O ، سویه نکروز رگبرگ PVY^N و سویه رگه‌ای PVY^C است (De Bokx and Van der Want, 1987). در مورد بیماری‌های ویروسی گیاهان، برخلاف بسیاری از بیماری‌های دیگر، امکان مبارزه شیمیایی با عامل بیماری وجود ندارد و استفاده از ارقام مقاوم، اقتصادی‌ترین و کم‌خطرترین روش مبارزه و کاهش خسارت می‌باشد. پژوهش‌ها نشان داده است که ارقام سیب زمینی از نظر واکنش در مقابل این ویروس با یکدیگر تفاوت دارند و بر همین اساس برخی ارقام به عنوان مقاوم یا متحمل معرفی شده‌اند (Dusi *et al*., 2001; Takacs *et al*., 1999). انجام برنامه‌های اصلاحی با هدف بهره‌گیری از منابع مقاومت و ایجاد ارقام تجاری مقاوم، مستلزم اطلاع از منابع احتمالی مقاومت بویژه در رقم‌های موجود در استان می‌باشد. اولین گزارش از وجود PVY در استان گلستان مربوط به توتون کاری‌های منطقه قرق و فاضل آباد این استان است (Abedi, 1998). *زینتی فخرآباد و نصرالله نژاد* (۲۰۱۱) پراکنش این ویروس را در مزارع سیب زمینی استان گلستان به روش سرولوژیک الایزا مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد حدود ٦۰٪ نمونه‌ها آلوده به ویروس فوق بوده است. دراستان گلستان هنوز گزارشی در مورد ارزیابی مقاومت ارقام گوناگون سیب زمینی نسبت به ویروس PVY وجود ندارد. این پژوهش با توجه به اهمیت ویروس یاد شده در استان گلستان و برای بررسی واکنش چهار رقم مهم سیب زمینی در استان نسبت به این ویروس بعمل آمد. این ارقام که شامل رقم‌های بورن، بانبا، مارلا و ساتینا هستند، جزء ارقام زودرس تا نیمه دیررس می‌باشند که دارای قدرت انبارداری خوب، بازارپسندی و عملکرد بالا هستند.

مواد و روش‌ها

غده‌های سیب زمینی ارقام بورن، بانبا، مارلا و ساتینا در مهر ماه سال ۱۳۸۸ از مزرعه تهیه بذر شرکت شاهکوه در استان گلستان تهیه شد. با استفاده از آنتی بادی اختصاصی PVY (موسسه تحقیقات سلولی مولکولی DSMZ آلمان) در آزمون الایزا (DAS-ELISA) آلودگی هریک از رقم‌ها نسبت به PVY بررسی شد. غده‌هایی که نسبت به ویروس مذکور آلودگی نداشتند، به مدت یک ماه بمنظور گذراندن دوره خواب در ژرمیناتور قرار گرفتند. سپس غده‌ها بعد از ضد عفونی با سم قارچ کش

کاربندازیم، در گلدان‌های سفالی درون گلخانه کشت گردیدند. برای شناسایی بوته‌های آلوده به ویروس PVY در تمامی مراحل آزمایش از آزمون الایزا (DAS-ELISA) استفاده شد (Clark and Adams, 1977). به منظور تفسیر نتایج آزمون الایزا، میانگین جذب (در طول موج ٤٠٥ نانومتر) شاهدهای منفی را محاسبه کرده و حاصل جمع میانگین جذب شاهدهای منفی و سه برابر انحراف معیار جذب شاهدهای منفی ($\overline{X}$+3SD) به عنوان عدد مرز آلودگی در نظر گرفته شد. گیاهچه‌هایی که مقدار جذب نوری چاهک آنها بالاتر از این عدد بود به عنوان آلوده تلقی شدند. برای تهیه زادمایه ویروس، از یک جدایه ویروس وای سیب‌زمینی که از گیاه توتون به دست آمده و در آزمون‌های صورت گرفته خلوص آن مشخص شده بود استفاده شد. این جدایه به آنتی بادی مونوکلونال سویه PVY^O (موسسه تحقیقات سلولی مولکولی DSMZ آلمان) پاسخ مثبت و در مقابل آنتی بادی‌های مونوکلونال سویه‌های PVY^C و PVY^N (موسسه تحقیقات سلولی مولکولی DSMZ آلمان) پاسخ منفی نشان داده بود. از بوته‌های آلوده توتون به ویروس PVY با استفاده از بافر فسفات نمکی (PBS) با pH=٧/٤ به نسبت حجمی/وزنی ۱:۱ عصاره گیری و با استفاده از پودر کربوراندوم روی گیاه توتون رقم سامسون[1] مایه‌زنی شدند. حدود سه هفته بعد که علائم توسعه یافت، هریک از گیاهچه‌های توتون با استفاده از آزمون DAS-ELISA نسبت به ویروس مذکور آزمایش شدند و آلودگی آنها به اثبات رسید. در این پژوهش آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار در شرایط گلخانه با دمای ۲۵-۱٦ درجه سانتیگراد انجام شد. بدین ترتیب که در هر تکرار سه غده بذری از هر کلون در داخل گلدان‌های سفالی حاوی خاک، ماسه و پیت موس به نسبت‌های ۲:۱:۱ کاشته شد. سپس در مرحله هشت برگی، بوته‌ها به‌صورت مکانیکی به PVY^O مایه زنی شدند. بوته‌ها پس از مایه زنی در گلخانه نگهداری شدند. برای تهیه زادمایه، عصاره برگ‌های گیاه توتون آلوده به ویروس فوق که قبلا ذکر شد، در هاون چینی با افزودن بافر فسفات به نسبت وزنی/حجمی ۱:۱ تهیه شد. برگ‌های کلون‌های آزمایشی با پودر کربوراندوم ٦۰۰ مش گرد پاشی شد و با مالش دادن ۳-۲ برگچه از هر گیاه با پارچه ململ آغشته به سوسپانسیون، مایه‌زنی انجام شد. برای اطمینان از آلودگی، ٤٨ ساعت بعد مایه‌زنی دوباره تکرار شد. در آزمایش فوق یک تیمار به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد که در آن به جای عصاره ویروس از بافر فسفات برای مایه‌زنی استفاده شد. ارزیابی بوته‌ها تا چهار هفته انجام گرفته و علائم بر اساس شاخص: گیاه سالم (۰)، موزاییک خفیف (۱)، موزاییک (۳)، موزاییک شدید (۵)، یک تا دو برگ دارای رگبرگ‌های نکروتیک (۷)، سه تا پنج برگ دارای رگبرگ‌های نکروتیک (۹) و نکروز ساقه (۱۱) ثبت شدند (Verrier *et al*., 2001). هم‌چنین حدود چهار هفته بعد از مایه‌زنی، با استفاده از آزمون DAS-ELISA مقدار جذب هر یک از گیاهچه‌ها یاداشت شد. داده‌های حاصل از آزمون الایزا در آزمایش فوق با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD انجام شد.

نتایج و بحث

گیاهچه‌هایی که مقدار جذب نوری چاهک آنها بالاتر از حد آلودگی ($\overline{X}$+3SD) بود به عنوان آلوده (حساس) تلقی شدند. بر اساس نتایج بدست آمده جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، اختلاف معنی داری بین تیمارهای مورد آزمون در سطح ۱٪ مشاهده شد. نتایج نشان داد که میانگین OD رقم بورن (۱/۲۵۱) با سایر تیمارها اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ داشته است. ارقام بانبا، ساتینا، و مارلا از نظر آماری در یک سطح قرار گرفتند، هرچند رقم بانبا با میانگین OD (۰/۱۲۵) کمترین

[1]- *Nicotiana tabacum* cv. Samsun

مقدار غلظت ویروس را نشان داد. بر اساس داده‌های بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که رقم بورن با بیش‌ترین مقدار غلظت ویروس جزء ارقام حساس به ویروس PVY^O بشمار می‌آید و سایر ارقام نسبت به این ویروس مقاوم هستند (جدول۲).

جدول۱- تجزیه واریانس واکنش (OD) کلون‌های سیب زمینی نسبت به ویروس PVY^O

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تیمار	۳	٤/٦٩٠	۱/٥٦۳	۱۹۸/۸٦۸ *
خطا	۱٦	۰/۱۲٦	۰/۰۰۸	
کل	۱۹	٤/۸۱٥		

* در سطح احتمال ۱٪ معنی دار می باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین مقدار جذب نوری در طول موج ٤۰٥ نانومتر هریک از ارقام سیب زمینی در آزمون الایزا نسبت به ویروس PVY^O

واکنش	جذب	کلون
negative	۰/۰۹	Control
S	۱/۲٥۱ a	Bo
R	۰/۱۳۳ b	Sa
R	۰/۱٤۲ b	M
R	۰/۱۲٥ b	B

S: حساس، R: مقاوم، Bo: بورن، Sa: ساتینا، M: مارلا و B: بانبا.

میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ هستند.

هم‌چنین به‌منظور شناسایی علایم ناشی از آلودگی هر کلون به PVY^O در هر رقم، طبق روش وریر و همکاران (Verrier *et al*, 2001)، مشخص شد رقم بورن (موزائیک خفیف تا شدید)، ساتینا (موزائیک و نکروز رگبرگی)، مارلا (موزائیک) و بانبا (فاقد علائم و موزائیک خفیف) علائم گوناگونی ایجاد می‌کنند (جدول۳). اگرچه شدت علائم در رقم ساتینا بیش‌تر از رقم بورن بود، لیکن نتایج آزمون سرولوژیک الایزا نشان داد میانگین جذب (OD) در رقم بورن آلوده به PVY^O بیش‌تر بود. می‌توان دلیل این امر را تفاوت در خصوصیات گیاه‌شناختی ارقام گوناگون سیب زمینی و نیز خصوصیات ژنتیکی آنها دانست که سبب ایجاد شدت علائم گوناگون گردیده که با مقدار غلظت متفاوت ویروس در ارتباط است. هم-چنین مشخص شده است که سه نوع مقاومت به پوتی ویروس‌ها وجود دارد که شامل مقاومت بسیار بالا (ER)[1]، فوق حساسیت (HR)[2] و مقاومت نسبت به انتقال ویروس‌ها است (Cockerham, 1970; Valkonen, 1994, 1997). مقاومت ER نسبت به PVY در سیب زمینی به‌وسیله ژن *Ry* کنترل می‌شود. مقاومت نوع HR نسبت به پوتی ویروس‌ها به‌وسیله ژن‌های غالب کنترل می‌شود و حالت اختصاصی نسبت به سویه داشته و به‌صورت واکنش نکروتیک موضعی در ارقام آلوده مشاهده می‌شود. مقاومت فوق حساسیت نسبت به ویروس PVY به‌وسیله ژن *Nc* کنترل می‌شود. این امر می‌تواند یکی از عوامل تنوع علائم بیماری در ارقام گوناگون سیب زمینی باشد.

[1]- Extreme Resistance
[2]- Hypersensitive Resistance

جدول۳- درجه علائم PVY^O روی کدون ارقام گوناگون سیب زمینی در شرایط گلخانه طبق روش *وریر و همکاران* (۲۰۰۱)

نام کدون رقم	Bo1	Bo2	Bo3	Bo4	Sa1	Sa2	Sa3	Sa4	M1	M2	M3	M4	B1	B2	B3	B4
میانگین درجه علائم*	۳	۳	۱	۵	۳	۷	۷	۳	۳	۳	۳	۱	۱	۱	۰	۱

*: اعداد صفر تا هفت به ترتیب نشانگر گیاه فاقد علائم تا گیاه دارای شدیدترین علائم هستند

تاکاکس و همکاران (Takacs *et al*, 1999) مقاومت هشت گونه وحشی سیب زمینی را نسبت به نژاد PVY^C در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی کردند. آنها گونه‌های مورد بررسی را با ویروس به‌صورت مکانیکی تلقیح کرده و سه هفته بعد با انجام داس‌الایزا و مایه زنی روی گیاه محک آلودگی آنها را بررسی کرده و گونه‌هایی که در آزمون الایزا منفی بودند را به عنوان مقاوم تلقی کردند که تا حدودی مطابق با روش مورد استفاده در این پژوهش می‌باشد. در یک بررسی که واکنش شش واریته سیب‌زمینی شامل چهار واریته هلندی Patrones، Multa، Diamant و Cardinal و دو واریته هندی Kufri sindhuri و Kufri lalima نسبت به ویروس وای سیب‌زمینی در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. درصد آلودگی به PVY در واریته‌های Kufri sindhuri، Multa، Cardinal، Kufri lalima، Patrones و Diamant به ترتیب ۱۱/۹، ۲۵، ۲۵/۷، ۲۸/۷، ۳۸/۸ و ۳/۹ درصد برآورد گردید (Ali and Khan, 1992). دنیلز (Daniels, 2000) ۵۰ کلون و رقم سیب‌زمینی را در مزرعه از نظر مقاومت به ویروس وای سیب‌زمینی آزمایش نمود. پس از کاشت کلون‌های سیب‌زمینی در دو فصل پی در پی در سال‌های ۱۹۹۶ و ۱۹۹۷، ویروس وای سیب‌زمینی با روش سرولوژیک داس‌الایزا ارزیابی شد. بر طبق نتایج پژوهش مذکور، ارقام و کلون‌های Cristal و CRI 1149 به ویروس مقاوم بودند و Astrid، Baraka، Baronesa، Catucha 2، Macaca، Traperia، AC-917-7-8، Monte bonito و Santo amor مقاومت متوسطی را نشان دادند. رقم‌های Bintje، Alegra، Cerrito و Monalisa حساس و رقم Achat فوق‌حساس بودند. بر اساس نتایج این آزمایش، علائم آلودگی به ویروس وای سیب زمینی در تمامی رقم‌ها ایجاد شد ولی از نظر شاخص درجه علائم تفاوت‌هایی وجود داشت. رقم ساتینا تنها رقمی بود که در آزمایش از نظر شاخص درجه علائم نسبت به میانگین کل ارقام، بالاترین شاخص و بیش‌ترین حساسیت را نشان داد، اما براساس نتایج داس الایزا بالاترین غلظت ویروس در رقم بورن مشاهده گردید.

References

1. Abedi H. 1998. Appearance of PVY in tobacco fields of Iran (Regions of Mazandaran and Gorgaan). Information Bulletin. CORESTA, Brighton Congress. 146 p.
2. Ali MS and Khan AL. 1992. Reaction of potato varieties to potato leaf roll virus (PLRV) and *Potato Virus Y* (PVY). Paper presented at: International Botanical Conference on Plant Science and Man, Problems and Prospects; 10-12 January; Dhaka, Bangladesh Botanical Society. pp. 55–58.
3. Anonymous. 2005. Agricultural Statistics of Iran. Tehran, Iran: Ministry of Agriculture Publishing (in Farsi).
4. Clark MF and Adams AN. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosrobent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475–483.
5. Cockerham G. 1970. Genetical studies on resistance to Potato PVX and Y. Heredity 25: 309–348.
6. Daniels J. 2000. Evaluation of Potato genotypes for resistance to *Potato virus Y*. Horticultura-Brasileira 18: 145–147.
7. De Bokx JA and van der Want, JPH. 1987. Viruses of Potatos and Seed Potato Production, Second ed. Wageningen Netherlands: Springer. 259 p.
8. Dusi AN, Carvalho C, Torres AC and Avila AC. 2001. Resistance levels to two strains of *Potato virus Y* (PVY) in transgenic Potatoes cv. Achat. Horticultura-Brasileira 19: 348–350.
9. Khajehpour M. 1994. Producing of Industrial Plants. Isfahan, Iran: Industrial University of Isfahan Publishing. 251 p. (in Farsi).
10. Takacs AP, Horvath J, Kaziczi G and Pribek D. 1999. *Solanum* species as new resistance sources of C strain of Potato Y Potyvirus. Paper presented at: 51st International Symposium on Crop Protection, Part II – Mededeligen. 19 May; Gent, Belgium.
11. Valkonen JPT. 1994. Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.). Plant Breeding 112: 1–16.
12. Valkonen JPT. 1997. Novel resistance to potyviruses in tuber bearing potato species, and temperature sensitive expression of hypersensitive resistance to potato virus Y. Annals of Applied Biology 130: 91–104.
13. Vance VB. 1991. Replication of *Potato virus X* is altered in co infections with *Potato virus Y* Virology 182: 486–494.
14. Verrier JL, Marchand V, Cailleteau B and Delon R. 2001. Chemical change and cigarette smoke mutagenicity increase associated with CMV and PVY infection in burley tobacco. Paper presented at: CORESTA Joint Meeting of the Agronomy and Phytopathology Groups. 12-15 May; Cape Town, South Africa.
15. Zinati Fakhrabad F and Nasrollahnejad S. 2011. First report of occurrence of *Potato virus Y* (PVY) in potato fields of Golestan province. Paper presented at: National Conference on Management in Agriculture. Islamic Azad University, Jahrom Branch. 17 August; Jahrom, Iran.