مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۱، سال ۱۳۸۰ (۵۱-۴۱)

خالص سازی و تعیین غلظت دو ویروس عامل موزائیک روی چغندرقند در منطقه کرج

محمود اخوت[۱]، صادق جلالی[۲]، غلامحسین مصاحبی[۳] و شیرین قربانی[۴]
۱، ۲ و ۳- استاد، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
۴ - عضو هیأت علمی گروه زیست شناسی دانشگاه الزهرا، تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۷/۱۳

خلاصه

طی بررسی های انجام شده و نتایج کاربرد آنتی سرم‌های مختلف، وجود دو ویروس موزائیک چغندرقند (BMV) و موزائیک خیار (CMV) را به عنوان عامل بیماری موزائیک چغندرقند در منطقه کرج مشخص کرد. طیف جذبی هر دو ویروس بررسی گردید، که به ترتیب ۲۶۰-۲۴۰ و ۲۶۰-۲۲۰ نانومتر تعیین شد و غلظت آنها برابر با ۰/۳۵ و ۰/۹۸ میلی گرم در میلی لیتر آموده خالص شده نهائی بود. در آزمون رسوب در قطرات کوچک تیترآنتی‌سرم‌های تهیه شده بر علیه ویروس موزائیک چغندرقند برابر ۲۵۶ و برای ویروس موزائیک خیار معادل ۵۱۲ تعیین گردید. تحقیقات انجام شده پیرامون پراکندگی ویروسهای جدا شده از چغندرقند در کرج و اطراف آن نشان داد که میزان پراکندگی (BMV) در تمام مناطق مورد بررسی به مراتب بیشتر از CMV می‌باشد. بدلیل انتشار و پراکندگی وسیع ویروس موزائیک چغندرقند، تأثیر آن در شرایط گلخانه روی میزان تولید بذر، قوه نامیه و امکان بذرزاد بودن مورد مطالعه قرار گرفت و ملاحظه شد که میزان بذر تولیدی کاهش قابل توجه داشته ولی تأثیری در قوه نامیه و بذرزاد بودن نداشت.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، ویروس موزائیک چغندرقند، ویروس موزائیک خیار، خالص سازی، تعیین غلظت

مقدمه

برای بهره‌گیری از امکانات و عوامل مؤثر در تولید محصولات کشاورزی، شناسایی عوامل مؤثر در کاهش محصول و اقدام در جهت جلوگیری از آنها اهمیت بسزایی دارد. چغندر (*Beta vulgaris* L.) یکی از مهمترین گیاهان زراعی بوده که دارای چهار کولتیوار (رقم) مهم می باشد.

- مکاتبه کننده : محمود اخوت

از بین ارقام مزبور چغندرقم *B.v.* cv. altissima از نظر اقتصادی اهمیت بیشتری داشته و علاوه بر نقش تغذیه در خوراک دام و انسان، از جنبه ایجاد اشتغال در صنایع گوناگون نیز حایز اهیمت فراوان است. مقدار قند ریشه‌های چغندرقند بین ۲۰-۱۴ درصد در ارقام مختلف می‌باشد که از لحاظ اقتصادی و سوددهی در خور توجه است(۱۸).

میانگین عملکرد محصول چغندرقند در دنیا ۳۷۲۲۱ کیلوگرم در هکتار گزارش شده که میزان ان در ایران ۲۴۸۵۰ کیلوگرم بر اورد شده است. عملکرد در فرانسه ۷۶۰۴۶ و در استرالیا به ۵۹۰۷۵ کیلوگرم می‌رسد (FAO, 1998). عوامل بیماریزای مختلف و از جمله ویروسها باعث کاهش محصول و میزان قند در چغندر می‌شوند. بر اساس تحقیقات انجام شده در سراسر دنیا تا کنون ۱۶ ویروس مختلف می‌تواند در طبیعت، چغندرقند را آلوده نماید، برخی ویروسها علائم موزائیک روی این گیاه ایجاد می‌کنند که از آن جمله می‌توان به ویروسهایی از جنس های Geminiviruses, Cucumoviruses, Potyviruses اشاره کرد (۵).

خسارت ناشی از برخی ویروسها به تنهایی یا توأم بسیار سنگین بوده و می‌تواند موجب کاهش شدید محصول گردد (۱۲). وجود این بیماریها روی چغندرقند در ایران از مناطق مختلف گزارش شده و اهمیت آنهامورد توجه قرار گرفته است (۱ و۲). مطالعات نشان داده که ویروس موزائیک چغندر قند (BMV) به طریقه مکانیکی با عصاره حاوی ویروس از روی چغندرقند به راحتی قابل انتقال است (۱۴). طبق نتایج بنت (۷) این ویروس توسط بذر وگیاه سس انتقال نمی‌یابد ولی در طبیعت توسط بیش از ۲۸ گونه شته بطریقه ناپایا منتقل می‌شود. بر اساس گزارش سمرز و نیوتن (۱۶). شته مومی گندم (*Diuraphis noxia*) قادر به انتقال این ویروس در گلخانه بوده است که انتشار آن در طبیعت نیز می‌تواند مؤثر باشد. از هندوستان شارما و همکاران (۱۵) گزارش کرده‌اند که نژادی از ویروس موزائیک خیار (CMV) توانسته است با بذر خربزه رقم‌های PS,HM به ترتیب به میزان ۱۰ و ۲۸ درصد انتقال یابد. این ویروس توسط گونه‌های سس (*Cuscuta* spp.) و بذر گیاهان مختلف نیز منتقل شده اما هیچگونه آلودگی به ویروس از بذر چغندرقندهای آلوده مشاهده نشده است و انتقال آن نیز مکانیکی و توسط گونه‌های مختلف شته‌ها به طریقه ناپایا صورت می‌گیرد(۷).

هدف از این تحقیق چگونگی خالص سازی و تعیین غلظت ویروسهای عامل موزائیک چغندرقند، مورد نظر می‌باشد. در این بررسی از دو گروه ویروس زیر از چغندرقندهای آلوده به موزائیک که از مناطق مختلف کرج به دست آمده و با توجه به دامنه میزبانی، خواص فیزیکی، آزمایش‌های سرولوژیکی و مشاهدات میکروسکوپ الکترونی شناسائی شده بود استفاده گردید (۳).

مواد و روشها

۱ - خالص سازی ویروس های عامل موزائیک چغندر قند

در این مورد دو گروه ویروس بشرح زیر خالص سازی شد گروه ۱، ویروس موزائیک چغندرقند (Beet Mosaic Virus, BMV)، برای خالص سازی این ویروس از جدایه کمال آباد کرج از چغندرقند بهره‌گیری بعمل آمد که روی ارقام سلمک (*Chenopodium* spp.) ایجاد لکه موضعی کرده و خالص سازی بیولوژیک شده بود. برای این کار از روش خالص سازی فوجی ساوا و همکاران(۱۰) که جهت خالص سازی این ویروس (آموده) بکار رفته است استفاده شد.

به این ترتیب که تعداد ۱۰۰ گلدان حاوی بوته‌های سالم چغندر رقم سیکلا (*Beta vulgaris* L.cv.cicla) درمرحله ۴ برگی با جدایه کمال آباد مایه زنی شد. ۱۵ روز بعد از مایه زنی برگهای دارای علائم موزائیک، برداشت و پس از حذف رگبرگهای اصلی، توزین و درهاون چینی استریل در حرارت ۶ درجه سانتی گراد با بافر بُرات ۰/۵ مولار حاوی ۰/۰۵ مولار EDTA و ۰/۱ درصد اسید تیوگلیکولیک با pH=8 به نسبت یک گرم برگ و ۱/۵ میلی لیتر بافر عصاره‌گیری شد.

عصاره حاصل توسط پارچه ململ صاف گردید و به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر عصاره ۱ میلی لیتر تریتون X-۱۰۰ اضافه شد و به مدت یک ساعت در حرارت ۶ درجه سانتی گراد به هم زده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵۰۰g. سانتریفوژ (مدل Beckman با روتور Spinco شماره 30 گردید. به فاز مایع پلی اتیلن گلیکول (با وزن مولکولی ۶۰۰۰ و ۴ گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر عصاره) اضافه و به مدت ۲ ساعت در حرارت ۶ درجه سانتی گراد به هم زده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵۰۰g. سانتریفوژ گردید، رسوب حاصل در بافر بُرات ۰/۰۵ مولار حاوی ۰/۰۰۲ مولار EDTA با pH=۸ رقیق و یک شب در یخچال نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵۰۰g. سانتریفوژ و فاز مایع جمع آوری شد.

محلول ۳۰ درصد ساکارز در بافر بُرات ۰/۰۵ مولار تهیه و به آن ۴ درصد پلی اتیلن گلیکول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دست به شدت به هم زده شد. در هر لوله سانتریفوژ ۱۴ میلی لیتر از این محلول ریخته و ۱۸ میلی لیتر از آموده ویروس به آرامی روی محلول در هر لوله قرار گرفت و به مدت ۱۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفوژ شد.

رسوب حاصل در هر لوله با یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷ رقیق و پس ازگذشت یک شب و انجام یک سانتریفوژ افتراقی رسوب نهایی در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷ رقیق و پس از گذشت یک شب وانجام یک سانتریفوژ افتراقی در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷ حل شده و به عنوان نمونه خالص ویروس (آموده) جمع آوری شد.

گروه ۲- برای خالص سازی این ویروس از جدایه کمال آباد کرج از چغندرقندهای آلوده به ویروس موزائیک خیار (Cucumber Mosaic Virus, CMV) که روی باقلای رقم الجزایری لکه‌های موضعی ایجاد کرده و خالص سازی بیولوژیک شده بود استفاده گردید. به این منظور از روش تاملینسون و همکاران (۱۷) که برای خالص سازی ویروس موزائیک خیار بکار رفته است با سه میزبان کدو (*Cucumis pepo* L.)، گل تکمه‌ای (*Gomphrena globosa* L.) و توتون *Nicotiana tabacum* L. cv. white burley به طور مجزا استفاده شد. برای این کار ۱۵۰ گیاه کدو رقم هیبرید مسمایی در مرحله ۲ برگی، ۱۰۰ بوته گل تکمه‌ای در مرحله ۶ برگی و ۱۰۰ گیاه توتون در مرحله ۴ برگی به ترتیب مایه زنی شدند. بعد از ۱۲ روز برگهای آلوده کدو و توتون و پس از ۱۸ روز برگهای گل تکمه ای برداشت و با بافر فسفات ۰/۵ مولار حاوی ۰/۰۰۱ مولار EDTA و ۰/۱ درصد اسید تیوگلیکولیک با pH=۷/۵ (بازای یک میلی لیتر برای هر گرم برگ) در هاون چینی استریل عصاره‌گیری و با پارچه ململ صاف گردید و هم حجم عصاره به آن دی اتیل اتر اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه به هم زده و سپس ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰g. سانتریفوژ فاز مایع موجود در ته هر لوله با پی پت جمع آوری و در یک بشر به مدت ۱ساعت در حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا اتر موجود در آن تبخیر

گردد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در .g۸۰۰۰ سانتریفوژ شد و رسوب موجود در هر لوله با یک میلی لیتر بافردی سدیم تترا بُرات با pH=۹ حاوی ۰/۰۰۵ مولار EDTA حل شد و به مدت ۲۰ ساعت در 1^{oc} درجه سانتی گراد نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در .g۵۰۰۰ سانتریفوژ و فاز مایع به عنوان نمونه خالص ویروس (آموده) جمع آوری گردید.

۲- اسپکتروفتومتری و تعیین غلظت ویروس‌های جدا شده

میزان خلوص آموده‌های ویروس با تعیین میزان جذب نور ماورای بنفش در طول موج‌های ۳۰۰-۲۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu-vu-۱۶۰) اندازه‌گیری و منحنی آنهاتوسط چاپگر دستگاه رسم گردید. برای تعیین غلظت ویروس (C) (برحسب میلی گرم در میلی لیتر) میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر (OD) با استفاده از فرمول C=OD/E محاسبه شد.

مقدار E (ضریب Extinction) برای ویروس موزائیک چغندرقند برابر با ۲/۶ (۱۰) و برای ویروس موزائیک خیار برابر با ۵ (۹) می‌باشد.

۳- تهیه آنتی سرم

جهت تهیه آنتی سرم بر علیه ویروس موزائیک چغندرقند یک تزریق ۱ میلی لیتر آموده در رگ کناری لاله گوش خرگوش و پس از یک هفته سه تزریق ۰/۵ میلی لیتری از آن و با حجم مساوی از Freund's complete adjuvant به فاصله یک هفته در عضله پای خرگوش صورت گرفت. سه هفته بعد از آخرین تزریق، عمل خون‌گیری از رگ کناری لاله گوش به میزان کم انجام شد و پس از سرولوژی به روش نشت متقابل در آگار و مشاهده رسوب، خون‌گیری اصلی به میزان ۲۵ میلی لیتر از رگ کناری لاله گوش اجرا گردید. ظرف محتوی خون به مدت ۴ ساعت در حرارت اتاق و یک شب در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس سرم خون جدا و به مدت ۱۰ دقیقه در .g۵۰۰۰ (برای حذف گلبول‌های باقیمانده) سانتریفوژ و به میزان ۱/۵۰۰۰ سدیم آزاید اضافه و در شیشه‌های استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۰). برای انجام تست‌های سرولوژیک نشت متقابل در آگار در مورد این ویروس از محیط ذیل شامل: ۰/۸ گرم آگار یا ۰/۶ گرم (آگارز)، ۰/۸۵ گرم نمک طعام، ۰/۰۵ گرم سدیم آزاید و ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/۲ استفاده شد و برای شکستن پیکره‌ها، عصاره حاوی ویروس را با حجم برابر از سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۰/۱ درصد مخلوط و به مدت ۴-۳ دقیقه در آب در حال جوش حرارت داده و پس از سرد شدن در حفرات ایجاد شده در ژل ریخته شد. بدین‌ترتیب شروع تشکیل خط رسوب بعد از ۸ ساعت مشاهده گردید.

برای تهیه آنتی سرم بر علیه ویروس موزائیک خیار ابتدا به فاصله یک هفته دو تزریق ۱ میلی لیتری آموده و ماده FCA در عضله پای خرگوش و دو هفته پس ازآن تزریق ۱ میلی لیتری از همان نمونه در رگ کناری لاله گوش انجام شد و یک هفته بعد از آخرین تزریق، خون‌گیری از لاله گوش دیگر انجام گرفت (۱۷) و مانند روش ذکر شده قبلی آنتی‌سرم تهیه گردید. سرم نرمال از خرگوش‌ها قبل از تزریق ویروس با خون‌گیری از رگ کناری لاله گوش به میزان ۱۰ میلی لیتر تهیه شد که در آزمایشات سرولوژی به عنوان شاهد در کنار آنتی سرم استفاده گردید. مناسب‌ترین محیط برای تست‌های سرولوژیک نشت متقابل در آگار همان محیط پیشنهادی تاملینسون و همکاران (۱۷) بود که شامل ۰/۶ گرم آگارز ۰/۸۵ گرم نمک طعام ۰/۲ گرم سدیم آزاید و ۱۰۰ میلی لیتر K^2HPO^4 ۰/۰۵ مولار حاوی ۰/۰۰۵ مولار EDTA با pH=۷/۸ بود. در تمام آزمایش ها پس از پرکردن

حفرات با آنتی سرم ر عصاره حاوی ویروس، پتری حامل محیط را همراه با یک کاغذ مرطوب درون کیسه پلاستیکی قرار داده و در انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری می‌شد.

۴- عیار سنجی (Titration) آنتی سرم‌های تهیه شده

روش بال (Ball, 1990)

ابتدا یک الگوی ۸×۸ خانه در کف یک پتری پلاستیکی استریل رسم گردید و دو ردیف ۷ تایی لوله آزمایش به قطر ۰/۵ میلی متر (یک ردیف برای آنتی سرم و یک ردیف برای آموده ویروس) تهیه شد. از طریق رقیق سازی متوالی غلظت‌های مختلفی به نسبت $\frac{1}{2}$ تا $\frac{1}{128}$ برای آموده ویروس تهیه گردید. برای رقیق سازی آنتی سرم به نسبت $\frac{1}{32}$ تا $\frac{1}{2/48}$ آماده شد (جلالی ۱۳۷۲). توسط میکرو پی پت قطره‌های ۸ میکرولیتری از آنتی ژن و انتی سرم در درون هر مربع ایجاد شده در کف پتری قرار داده شد و از پایین ترین رقت آنی سرم و آنتی ژن با یک میله شیشه‌ای استریل مخلوط شدند. مربع‌های ردیف هشتم حاوی آنتی ژن و بافر و مربع‌های ستون هشتم حاوی آنتی سرم و بافر به عنوان شاهد با یکدیگر مخلوط شدند. پتری درون کیسه پلاستیکی قرار داده شد و در حرارت اتاق ۲۵°c نگهداری و نتایج بعد از ۲ و تا ۱۲ ساعت توسط بینوکلر مشاهده و ثبت گردید.

۵- تعیین ویروس غالب در منطقه

برای تعیین ویروس غالب در مناطق چغندرکاری اطراف کرج در سالهای ۷۱-۱۳۷۰ از مزارع چغندرکاری مناطق مختلف نمونه برداری شد (جدول ۱).

۷- بررسی تأثیر جدایه مورد مطالعه از گروه یک (ویروس موزائیک چغندرقند) روی چغندرقند

با توجه به مطالعات انجام شده مشخص شد که ویروس موزائیک چغندرقند (BMV) در منطقه کرج نسبت به ویروس موزائیک خیار (CMV) از پراکندگی بیشتری برخوردار بود لذا بررسی‌های زیر روی BMV انجام گرفت (جدول ۲).

۱-۷ - تأثیر بر میزان تولید بذر

جهت بررسی اثر ویروس موزائیک چغندرقند روی میزان

جدول ۱- نمونه برداری از مزارع چغندرکاری اطراف کرج

نام محل	تعداد مزارع بازدید شده	تعداد نمونه *
-کمال آباد	۸	۱۷۵
- هشتگرد	۴	۶۲
- شهریار	۵	۹۱
- مشگین آباد	۳	۴۲
- ساوجبلاغ	۶	۵۷
جمع	۲۶	۴۲۷

*نمونه‌های فوق با استفاده از روشهای معمول در ویروس‌شناسی گیاهی بررسی و عوامل آنهامورد شناسایی قرار گرفتند. نمونه‌ها در کیسه‌های فریزر و در کنار یخ داخل یخدان به آزمایشگاه منتقل شد.

تولید بذر، آزمایشی با ۵۰ گلدان، هر گلدان به قطر دهانه ۳۰ سانتی متر حاوی یک بوته چغندرقند رقم ۲۷۳۳ انتخاب‌شد. ۲۵ عدد از بوته‌ها بطور تصادفی انتخاب، و در مرحله ۶ برگی مایه زنی شدند و ۲۵ بوته دیگر با عصاره گیاه سالم همراه با پودر کاربوراندام بعنوان شاهد مایه زنی گردیدند ودر شرایط گلخانه گذاشته شد. ۳۰ روز بعد از مایه زنی گیاهان را به اتاقک رشدبرده و در حرارت ۱±۶ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ روز نگهداری شدند تا سرمای لازم را جهت به ساقه رفتن و تسریع در تولید بذر به منظور طی دوره Vernalizing دریافت کنند. سپس بوته‌ها در گلخانه و در حرارت ۴±۲۳ قرار گرفتند، بعد از به ساقه رفتن بوته‌ها و تولید بذر، از گیاهان سالم و آلوده بطور مجزا بذرگیری شد و پس از خشک شدن، آنها توزین و نتایج موردتجزیه و تحلیل قرار گرفت. با این روش گیاهانی که برای تولید بذر نیاز به‌طی دو سال و زمستان گذرانی دارند به زمان کمتری کاهش می‌یابند.

۲-۷ - تأثیر ویروس موزائیک چغندرقند بر قوه نامیه بذور حاصل از گیاهان آلوده

تعداد ۴۰۰ عدد بذر بدست آمده از گیاهان آلوده و ۴۰۰ بذر مربوط به گیاهان سالم بعد از ضدعفونی سطحی بر روی کاغذ صافی استریل و مرطوب در درون پتری (۵۰ بذر در هر پتری) گذاشته شده و در حرارت ۲۵ درجه سانتی گرادنگهداری شدند و پس از چند روز با مشاهده بذور جوانه زده در پتری ها، تعداد بذر جوانه زده محاسبه و نتایج مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی امکان انتقال ویروس‌توسط بذر از برگهای اولیه بذور جوانه زده، مربوط به گیاهان آلوده عصاره‌گیری و با مایه زنی روی سلمک *Chenopodium quinoa* L. بعنوان گیاه محک و نشت دوطرفه در آگار مورد بررسی قرار گرفتند.

۳-۷ - بررسی تأثیر ویروس موزائیک چغندرقند بر روی محصول ریشه

برای این منظور آزمایش گلخانه‌ای به صورت طرح کامل تصادفی جهت مطالعه تأثیر ویروس در کاهش محصول ریشه سه رقم مختلف چغندرقند (pp22, pp8,Ic1 دریافت شده از مؤسسه اصلاح و تهیه بذر و نهال کرج) انجام گرفت. آزمایش در ۴ تکرار با ۴ گلدان به قطر دهانه ۳۰ سانتی متر حاوی یک بوته انجام شد، بوته‌ها در مرحله ۶ برگی با عصاره حاوی ویروس و پودر کاربوراندوم، و بوته‌های شاهد با عصاره گیاه سالم و پودر کاربوراندوم مایه زنی شدند. در طول رشد بوته‌های سالم شاهد و بوته‌های آلوده هر دو هفته یکبار با سم شته کش سم پاشی گردید. بوته‌ها بعد از ۴ ماه برداشت و ریشه‌ها بعد از شستشو، توزین و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

۱ - خالص سازی و اسپکتروفتومتری نمونه‌های خالص ویروس

۱-۱ - تعیین غلظت ویروس موزائیک چغندرقند

پس از خالص سازی ویروس موزائیک چغندرقند بر اساس روش فوجی ساوا و همکاران (۱۰) بررسی طیف جذبی (Absorption spectrum) آموده خالص شده این ویروس در طول موجهای ۳۲۰-۲۲۰ نانومتر نشان داد که حداکثر میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر و حداقل جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر می‌باشد. غلظت ویروس در آموده نهایی برابر با ۰/۳۵ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید .

۲-۱ - تعیین غلظت ویروس موزائیک خیار

خالص سازی ویروس موزائیک خیار با استفاده از روش تاملینسون و همکاران (۱۷) انجام شد فاز مایع شیری رنگ در بررسی طیف جذبی دارای حداکثر جذب در طول موج

جدول ۲- پراکندگی ویروس‌های جدا شده در مزارع چغندرکاری کرج

نام محل	تعداد کل نمونه	تعداد نمونه آلوده به (BMV)	تعداد نمونه آلوده به CMV
۱-کمال آباد	۱۷۵	۱۶۷	۸
۲- هشتگرد	۶۲	۶۲	-
۳- شهریار	۹۱	۸۶	۵
۴- مشگین آباد	۴۲	۴۲	-
۵- ساوجبلاغ	۵۷	۵۷	-
جمع	۴۲۷	۴۱۴	۱۳

۲۶۰ نانومتر و حداقل جذب در ۲۲۰ نانومتر بود. غلظت ویروس در آموده نهایی برابر با ۰/۹۸ میلی گرم در میلی لیتر تعیین گردید .

۲- تعیین تیتر آنتی سرمهای تهیه شده

با استفاده از آزمون رسوب در قطرات کوچک بر اساس روش بال (۶) تیتر آنتی سرمهای تهیه شده بر علیه دو ویروس CMV,BMV مورد سنجش قرار گرفت، در این آزمایش وجود حالت ابری در هر یک از قطرات بعنوان واکنش مثبت تعیین گردید.

بر اساس نتایج به دست آمده تیتر آنتی سرم‌های تهیه شده بر علیه ویروس موزائیک چغندرقند برابر با ۲۵۶ و برای ویروس موزائیک خیار معادل ۵۱۲ بود.

۳- تعیین ویروس غالب در منطقه

بررسی‌های انجام شده پیرامون پراکندگی ویروس‌های جدا شده درکرج و اطراف آن طبق جدول شماره ۲ نشان می‌دهد که میزان پراکندگی ویروس موزائیک چغندرقند در تمام مناطق مورد بررسی به تعداد ۴۱۴ عدد بود که به مراتب بیشتر از ویروس موزائیک خیار است. از ۴۲۷ نمونه چغندرقند آلوده فقط ۱۳ نمونه به ویروس موزائیک خیار آلودگی نشان داد.

۴- تأثیر ویروس موزائیک چغندرقند روی تولید بذر و قوه نامیه

بدلیل انتشار و پراکندگی وسیع ویروس موزائیک چغندرقند در مزارع چغندرکاری کرج، تأثیر این ویروس روی میزان تولید بذر، قوه نامیه و امکان بذر زاد بودن آن مورد مطالعه قرار گرفت. با مایه زنی عصاره حاوی ویروس موزائیک چغندرقند بر روی برگ بوته‌های چغندرقند رقم ۲۷۳۳ مشاهده شد که گیاهان شاهد سالم در قیاس با بوته‌های آلوده رشد بهتری داشتند. بوته‌ها پس از ۵۰ روز سرمادهی در دمای ۱±۶ درجه سانتی گراد بطور یکنواخت به ساقه رفتند و تولید گل و سپس بذر نمودند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تأثیر ویروس موزائیک چغندرقند در کاهش میزان بذر قابل توجه است بطوریکه میانگین تولید بذر برای هر بوته سالم برابر با ۸/۹۷ گرم و برای هر بوته آلوده معادل ۵/۱۱ گرم برآورد شد.

با قرار دادن ۴۰۰ عدد بذر ضد عفونی شده حاصل از گیاهان آلوده و همین تعداد از بذور مربوط به گیاهان سالم در

شرایط مرطوب، هیچگونه تأثیر معنی داری در قوه نامیه و رشد جوانه‌های مربوط به بذور گیاهان آلوده در قیاس با گیاهان سالم مشاهده نشد. در آزمایشهای سرولوژیکی عصاره این جوانه‌ها در مقابل آنتی سرم مربوط به ویروس موزائیک چغندرقند واکنش مثبتی مشاهده نشد که بیانگر عدم بذر زاد بودن این ویروس در گیاه چغندرقند است.

بحث

خالص سازی وتهیه آنتی سرم بر علیه ویروس‌های جدا شده

خالص سازی ویروسهای متعلق به گروه پوتی ویروس (Potyvirus) به دلیل غلظت پایین ویروس در بافت میزبان و خاصیت تجمع گرایی (Aggregation) پیکره آنهادر عصاره‌گیری گیاهی به سختی انجام می‌گیرد. در این تحقیق پیکره‌های BMV رشته‌ای انعطاف‌پذیر بود، قربانی و نوروزی در ۱۳۷۰ با مطالعه عصاره خام برگهای آلوده توسط میکروسکوپ الکترونی طول آنهارا ۷۴۰ نانومتر گزارش داده‌اند. در این تحقیق پس از تکثیر ویروس موزائیک چغندرقند در چغندر برگی *Beta vulgaris* cv. cicla بر اساس روش فوجی ساوا (Fujisawa *et al.*, 1983) با تغییرات جزیی خالص سازی آن انجام گرفت و آنتی سرم آموده آن با تیتر ۲۵۶ و غلظت ۰/۳۵ میلی گرم در میلی لیتر تهیه گردید. فوجی ساوا و همکاران در ۱۹۸۳ بعد از خالص سازی این ویروس طول آنها را ۹۰۰-۱۰۰ نانومتر و ۴۵/۵ درصد پیکره‌های آن را ۷۵۰-۷۰۰ نانومتر دانسته‌اند. نامبردگان غلظت ویروس خالص شده را ۰/۷-۰/۵ میلی گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم برگ ذکر کرده‌اند. Porth, *et al.*, 1987 در خالص سازی نژاد BMV-V از گیاه توتون *Nicotiana benthamiana* غلظت آن را ۰/۱ میلی گرم در هر میلی لیتر نمونه خالص ذکر نموده‌اند.

خالص سازی ویروس موزائیک خیار بر اساس روش تاملینسون و همکاران (Tomlinson *et al.*,1973) انجام شد ونتاج به دست آمده از اسپکتروفتومتری آموده‌های مختلف نشان داد که استفاده از توتون وایت بارلی *N. tabacum* cv. white burley به دلیل غلظت بالا و خلوص بیشتر مناسب‌تر از کدو می‌باشد. با این روش آنتی سرم تهیه شده تیتراژی برابر ۵۱۲ و غلظت ۰/۹۸ میلی گرم در میلی لیتر داشت. ویروس موزائیک خیار دارای پیکره‌های چند وجهی (Polyhedral) به قطر تقریبی ۲۹ نانومتر با تقارن ۲۰ وجهی و ۲ نوع پیکره از گروه Cucumovirus با ضریب ته نشینی یکسان است. (Lot&Kaper, Froncki *et al.*, 1976) 1979. در زمینه خالص سازی این ویروسها روشهایی را بکار برده‌اند، آنهابرای خالص سازی بیشتر از ستون سوکروز استفاده کرده‌اند.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبار پژوهشی دانشگاه تهران در دانشکده کشاورزی کرج انجام شده است که بدین وسیله مراتب تشکر خود را از معاونت های پژوهشی دانشکده و دانشگاه اعلان می‌دارد.

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. اسکندری، ف. آل آقا ن. ا.، حجارود، ق. و م.ع. رضائیان، ۱۳۴۸. بیماریهای چغندر قند در ایران. نشریه طرح بررسی بیماریهای مهم نباتات. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ۵۶ صفحه.

۲. ایزدپناه، ک. ۱۳۶۱. لیست مشروح بیماریهای ویروسی و شبه ویروسی گیاهان در فارس. دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز. ۱۷۱ صفحه.

۳. جلالی، ص. ۱۳۷۲. ویروسهای عامل موزائیک چغندر قند درمنطقه کرج. پایان نامه فوق لیسانس در رشته بیماری شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۰۶ صفحه.

۴. قربانی، ش. و ر. نوروزی. ۱۳۷۰. مطالعه سیتولوژیک برگهای چغندر قند آلوده به ویروس موزائیک چغندر قند در ایران. دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه شهید باهنر. کرمان. صفحه ۱۲۴.

5. Agrios, 1997. Plant pathology. Plant diseases caused by viruses. Academic press, 479-556.

6. Ball, E. M. 1990. Agar double diffusion plate (Ouchterlony) Viruses, in serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. APS press. 389 pp.

7. Bennett, C. W. 1944. Studies of dodder transmission of plant viruses. Phyto. 34: 905-932.

8. FAO, 1998. Centre of documents and statistics, Ministry of Agriculture, Tehran, Iran.

9. Francki, R. I. B. Mossop, D. W. and Hatta, T. 1979. Cucumber mosaic virus. No. 213. CMI/AAB. Description of plant viruses.

10. Fujisawa, I., Tsuchizaki, T. and Izuka, N. 1983. Purification and serology of beet mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. JPN. 49:22-31.

11. Lot, H. and Kaper, J. M. 1976. Physical and Chemical differentiation of three strains of cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. Virology 74: 209-222.

12. Mukhopadhyah, A. N. 1987. Handbook on diseases of sugar beet. Vol. 2, CRC press, 177 pp.

13. Porth, A., Lesemann, D. E. and Vetten, H. J. 1987. Characterization of potyvirus isolates from west African yams. J. Phytop. 120: 166-183.

14. Russel, G. E. 1971. Beet mosaic virus. No. 53, CMI/AAB Description of plant viruses.

15. Sharma, O. P., Khatri, H. L., Bansel, R. O. and Komal, H.S. 1982. A new strain of cucumber mosaic virus causing mosaic disease of Muskmelon. Phytop. Z. 109: 332-340.

16. Summer, C. G. and Newton, A. S. 1990. Transmission of beet yellows and beet mosaic virus by non

colonizing aphid vectors. Journal of Economic Entomology. 83: 2448-2451.

17. Tomlinson, J. A., Carter, A. L., Faithfull, E. M. and Webb, M. J. 1973. Purification and serology ot the W strain of cucumber mosaic virus, Ann. App. Biol. 74: 181-189.

18. Whitney, E. D. and J. E. Duffus, 1986. Compendium of beet diseases and insects. APS press, 79 pp.

Purification and Concentration Determination of 2 Viruses Causing Mosaic in Sugar Beet in Karaj Region, Iran.

M. OKHOVVAT[1], S. JALALI[2], GH. H. MOSSAHEBI[3] AND SH. GHORBANI[4]

1, 2, 3- Professor, Former Graduate Student, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. 4- Associate Professor, Biology Department, University of Alzahra, Tehran, Iran.

Accepted Oct. 4, 2000

SUMMARY

Investigations on sugar beet mosaic, through different antisera methods used, showed that sugar beet mosaic virus (BMV) and cucumber mosaic virus (CMV) caused the disease in sugar beet in Karaj region. The viruses were purified using differential centrifugation. The virus yields in the final preparations were 0.35 mg/ml. for BMV and 0.98 mg/ml. for CMV , absorption spectrum of them were 260-240 and 260-220 nanometers respectively. Antisera against the above mentioned viruses were prepared in rabbit then titrated. Titration for BMV and CMV were 256 and 512 respectively in microprecipitin tests. Research in distribution of the isolated viruses showed that BMV (414 from 427 samples) was more widely spread than CMV (13 from 427 samples) in all areas. Because of wider distribution and spread of BMV than the other, its effect on seed production, ability to germinate and seed bearing potential were studied. The results indicated considerable reduction in seed production, but no effect on germination or seed bearing ability.

Key words: Sugarbeet, Beet mosaic virus, Cucumber mosiac virus, Purification, Concentrate.