مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۱، شماره ۴، سال ۱۳۷۹ (۸۱۲-۸۰۷)

بررسی علائم ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی

افشین اسماعیلی فر، جواد زاد، غلامحسین مصاحبی، مجتبی محمدی و محمود اخوت
دانشجوی سابق ، استاد ، استادیاران و استادگروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۴/۸

خلاصه

در تابستان ۱۳۷۵ تعداد فراوانی نمونه از مزارع گوجه فرنگی مناطق ورامین، کرج، ملارد، شهریار، هشتگرد، قزوین جمع آوری گردید. در آزمون انتقال ویروس، اطلسی و انواع توتونها بعنوان گیاهان محک مایه کوبی شدند. بعد از گذشت دو تا چهار روز از مایه کوبی بر روی برگهای اطلسی، لکه‌های نکروتیک موضعی برنگ قهوه‌ای مشاهده شد. در توتونها، هفت الی ده روز بعد از مایه کوبی لکه‌های نکروتیک موضعی ظاهر شده و بدنبال آن تا دو هفته بعد از مایه کوبی علائم سیستمیک شامل لکه‌های حلقوی و متحدالمرکز روی برگها، نکروز ساقه و پژمردگی گیاه مشاهده گردید، متعاقب آن اضمحلال کامل گیاه اتفاق افتاد. در پرپاراسیونهای میکروسکوپ الکترونی تهیه شده با آنتی سرم ویروس، پیکره‌های گرد و کروی شکل ویروس به ضخامت ۱۲۰-۷۰ نانومتر مشاهده شد. با توجه به نتایج بدست آمده آلودگی به "ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی" در مزارع گوجه فرنگی ورامین وجود دارد.

واژه‌های کلیدی : ویروس پژمردگی لکه ای، گوجه فرنگی، تاسپو ویروس، TSWV

مقدمه

بیماری پژمردگی لکه‌ای اولین بار در سال ۱۹۱۵ در مزارع گوجه فرنگی استرالیا دیده شد (۴) و ویروسی بودن بیماری در سال ۱۹۳۰ تایید گردید. تا به امروز ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی در نقاط زیادی از دنیا مخصوصاً مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دیده شده و ممکن است که انتشار جهانی داشته باشد (۱۰). این ویروس عضو تیپ جنس توسپوویروس در خانواده بانیاویریده از ویروسهای جانوری بوده و دارای خصوصیات بارز بیولوژیکی می‌باشد که برای تشخیص آن بسیار مفید هستند. این ویروس به شیوه مکانیکی بوسیله مالش گیاهان محک با عصاره آماده شده با روش له کردن گیاهان آلوده در بافرهای مایه کوبی مناسب منتقل می‌شود و بر روی آنها ایجاد علائم مشخص می‌کند (۵).

ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی، مرفولوژی منحصر بفردی دارد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از پرپاراسیونهای ویروس، وجود پیکره‌های گرد و کروی را نشان می‌دهد. در اغلب پرپاراسیونها ضخامت پیکره‌ها از ۱۲۰-۷۰ نانومتر تغییر می‌کند. پیکره‌ها یک غلاف دو لایه لیپیدی با برجستگیهای گلیکو پروتئینی دارند، که اصطلاحاً به این غلاف انولوپ می‌گویند. پیکره‌های گرد، کروی و غلافدار ویروس امکان تشخیص آن را بوسیله میکروسکوپ الکترونی فراهم می‌آورد. نشاندار کردن پولک با آنتی بادیهای اختصاصی ویروس به تایید تشخیص پیکره‌های ویروس در عصاره کمک می‌کند (۳، ۵، ۷، ۸، ۹ و ۱۰).

اولین گزارش علمی در مورد وجود این ویروس در ایران توسط بنانج و همکاران (۱۳۷۵) ارائه گردیده است.

در تحقیقات حاضر وجود و گسترش ویروس در استان تهران با بررسی علائم بر روی گیاهان محک و تهیه پرپاراسیونهای میکروسکوپ الکترونی مطالعه گردید.

مواد و روشها

تهیه و کاشت گیاهان محک در گلخانه

بذر گیاهان محک در گلدان حاوی خاک برگ مناسب و پاستوریزه کشت داده شده و بوسیله لایه نازکی از کمپوست نرم پوشانده گردید. آبیاری بصورت پاشیدن ملایم آب از بالا صورت گرفت. گیاهچه‌ها پس از رشد به گلدان منتقل شدند، به محض این که گیاهچه‌ها به اندازه کافی بزرگ شدند برای مایه کوبی نشا شده و مورد استفاده قرار گرفتند (۲). دمای گلخانه در تابستان ۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد و در زمستان ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد بود.

آزمون انتقال ویروس روی گیاهان محک:

برای انجام این آزمایش گیاهان اطلسی و انواع توتونها به عنوان محک مورد استفاده قرار گرفتند (۵). برای مایه کوبی روی گیاهان محک، دو برگ روی هر گیاه انتخاب شد. برگهای نمونه‌های آلوده مورد نظر درون هاون چینی حاوی ۱-۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات قرار داده شدند. برگها درون هاون له شده و با فشردن به کنار هاون عصاره آن خارج شد. روی برگهای مورد نظر گیاهان محک جهت مایه کوبی مقداری پودر کاربوراندوم بعنوان ماده خراش دهنده پاشیده شد. سپس انگشت سبابه را به عصاره آغشته و در حالیکه دست دیگر زیر برگ قرار داشت، انگشت روی برگ مورد نظر به آرامی و بدون درنگ از ناحیه دمبرگ به طرف نوک برگ کشیده شد. بلافاصله بعد از مایه کوبی سطح برگهای مایه کوبی شده بوسیله آب فشان شسته شد. گیاهان مایه کوبی شده برای رشد در گلخانه قرار گرفت (۲). گیاهان محک برای افزایش حساسیت نسبت به ویروس قبل از مایه کوبی دو روز در تاریکی نگهداری شدند (۱۰).

روش تلفیقی سرولوژی - الکترون میکروسکوپی:

در این روش پیکره‌های ویروس با ملکولهای آنتی بادی پوشانده شد(٦):

۱- پولکهای میکروسکوپ الکترونی با محلول ۰/۵ درصد فرموار در اتیلن دی کلراید آغشته و در هوای آزاد خشک شدند.

۲- یک قطره از محلول ۰/۵ درصد فرموار در اتیلن دی کلراید روی آب در یک پتری پلاستیکی قرار داده شد. پولکها با پنس برداشته شده از طرف تیره روی سطح پارافیلم قرار گرفتند. سپس پارافیلم بهمراه پولکها روی سطح پتری حاوی محلول فرموار شناور گردید. پس از مدتی پارافیلم بهمراه پولکها از پتری خارج شده و خشک شد. یک لایه کربن روی پولکهای پوشش‌دار، با استفاده از دستگاه پوشش دهنده کربن در خلاء، قرار گرفت. پوشش گذاری کربن تا زمانی که یک سایه قبل رویت از گوشه روی کاغذ صافی زیر پارافیلم مشاهده شود، ادامه یافت.

۳- (هر پولک روی یک قطره ۲۰ میکرولیتری) پولکها روی قطرات کوچکی از آنتی سرم پلی کلونال "ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی" (تهیه شده در انستیتو پاستور فرانسه) در پتری‌های پلاستیکی به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت . سپس پولکها جهت حذف آنتی سرم‌های اضافی بوسیله بافر تریس شسته شدند.

۴- پولکهای پوشیده شده با آنتی سرم روی قطراتی از عصاره گیاهی آلوده گوجه فرنگی در پتری پلاستیکی به مدت ۴-۱ ساعت قرار گرفتند. چون ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی در محیط غیر زنده ناپایدار است، لذا پتری حاوی پولکها در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد، بعد از آن پولکها با آب مقطر شسته شدند.

۵- پولکهای شسته شده، سپس در قطرات ۲٪ اورانیل استات حدود ۱۰ دقیقه شناور شدند. بعد از شستشو با آب مقطر پولکها به کمک میکروسکوپ الکترونی (مدل زایس) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

در اثر مایه کوبی روی گیاهان محک علائم مختلفی به شرح زیر مشاهده شد:

اطلسی

روی برگهای اطلسی با گل بنفش، لکه‌های کوچک

نکروتیک موضعی به رنگ قهوه‌ای ۴-۲ روز بعد از مایه کوبی مشاهده شد (شکل ۱).

توتون

یک هفته تا ده روز بعد از مایه کوبی، لکه‌های نکروتیک موضعی ظاهر شده، به دنبال آن تا دو هفته بعد از مایه کوبی، علائم سیستمیک شامل لکه‌های حلقوی و متحدالمرکز روی برگها، نکروز ساقه و پژمردگی گیاه، مشاهده شدند، بعد از آن اضمحلال کامل گیاه اتفاق افتاد (شکل ۲ و ۳).

روش تلفیقی سرولوژی - الکترون میکروسکوپی:

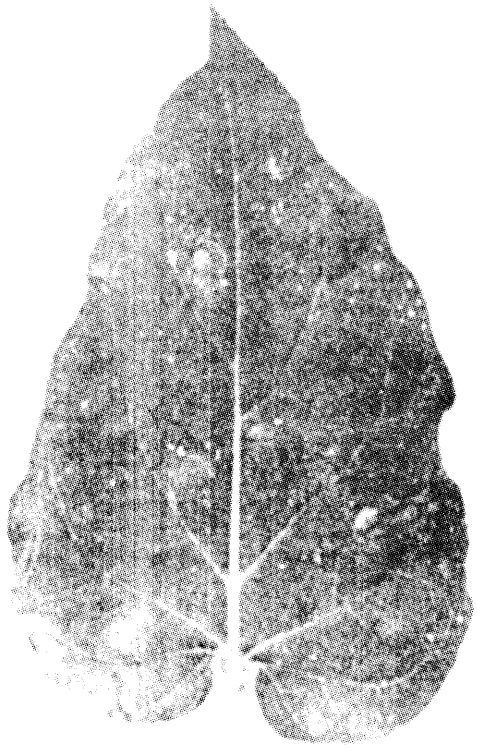
در پرپاراسیونهای میکروسکوپ الکترونی که از نمونه‌های آلوده، تهیه شده بودند، پیکره‌های گرد و کروی ویروس به ضخامت ۱۲۰-۷۰ ننومتر مشاهده شدند (شکل ۴).

بحث

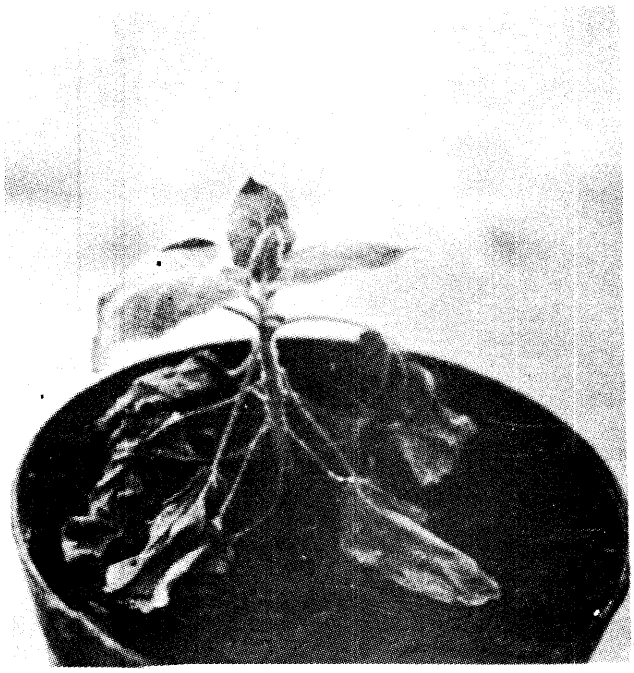
سلمن و همکاران (۱۹۶۱)، آیی (۷)، پیترز و همکاران (۱۰)، جرمن و همکاران (۵)، در مایه کوبی مکانیکی این ویروس بر روی اطلسی و گونه‌های مختلف توتون علائم لکه‌های نکروتیک موضعی بر رنگ قهوه‌ای در اطلسی و لکه‌های حلقوی بهمراه علائم‌سیستمیک را در توتونها مشاهده کردند. نتایج بدست آمده در واکنش گیاهان محک نسبت به ویروس در این تحقیق با یافته‌های محققین فوق مطابقت دارد.

بلاک و همکاران (۳)، کیتاجیما و همکاران (۸)، میلن و همکاران (۹)، آیی (۷)، پیترز و همکاران (۱۰)، جرمن و همکاران (۵)، در بررسیهای الکترون میکروسکوپی، پیکره‌های گرد و کروی ویروس را به ضخامت ۱۲۰-۷۰ ننومتر، با یک غلاف دو لایه لیپیدی حاوی برجستگیهای گلیکو پروتئینی، مشاهده نمودند. نتایج بدست آمده از روش تلفیقی سرولوژی - الکترون میکروسکوپی با مشاهدات فوق مطابقت دارد. این روش جهت بررسی اندازه و شکل ظاهری این ویروس مناسب است، اما به منظور بررسی جزئیات بیشتر پیکره ویروس یا باید از ویروس خالص شده و یا از بافت گیاهی آلوده به ویروس پرپاراسیون تهیه کرده و در میکروسکوپ الکترونی مشاهده نمود. با توجه به نتایج بدست آمده، آلودگی به ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی در مزارع گوجه فرنگی ورامین وجود دارد.

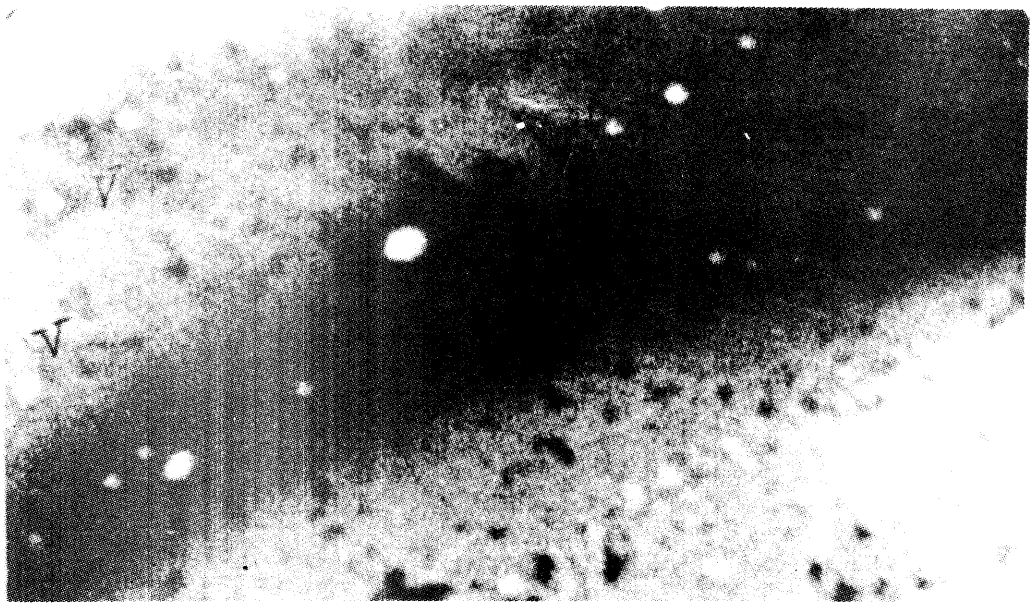
۱ - سطح برگ اطلسی، لکه های کوچک نکروتیک موضعی برنگ قهوه ای (عکس تهیه شده با بینوکولر با بزرگنمایی ۱۰X)



شکل ۲ - لکه های حلقوی و متحد المرکز در برگ *Nicotiana glutinosa*



شکل ۳ - پژمردگی و اضمحلال در *Nicotiana glutinosa*



شکل ۴ - پیکره های گردو کروی ویروس (V) در پرپاراسیون میکروسکوپ الکترونی، تهیه شده بروش (SSEM) که تا ۴۰/۰۰۰ بار بزرگتر شده اند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از دکتر دیک پیترز عضو گروه ویروس شناسی دانشگاه واگنینگن هلند، دکتر والتر کایزر عضو گروه بیماریهای گیاهی دانشگاه ایالتی واشینگتن آمریکا، دکتر دلون ریاست موسسه تحقیقاتی توتون سیتا فرانسه، بخاطر ارسال مقالات علمی، آنتی سرم، اطلسی و توتونها و راهنمائیهای علمی ایشان قدردانی می‌شود.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. بنانج، ک.، آهون منش.، ن.، شهر آئین. و د.ا.ی. لزمن (۱۳۷۵). جداسازی و تعیین خصوصیات ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی از مزارع گوجه فرنگی ورامین. بیماریهای گیاهی، شماره (۳۲):۴۵-۴۴.

۲. جعفرپور، ب. (مترجم). اس.ای.هیل (مولف). ۱۳۷۰. روشهای تشخیص ویروسهای گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، شماره ۱۱۸، ۲۰۷ صفحه.

3. Blak.L.M., Brake & A.E. Walter. 1963. Purification and electron microscopy of TSWV. Virology, Vol.20: 120-130.

4. Brittebank,c.c. 1919. Tomato diseases. J.Agric. Victoria,Vol. 17: 231 -235.

5. German,T.L.,D.E.Ullman & J.W.Moyer. 1992. Tospoviruses : diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. Annu. Rev. Phytopathol. Vol. 30: 315 - 348.

6. Hampton, R.,E.Ball & S.De Boer. 1990. Serological methods for detection and identification of veral and bacterial plant pathogens. First ed. APS Press.USA. pp389.

7. Ie, T.S. 1971. Electron microsopy of developmental stages of TSWV in plant cells. Virology, Vol. 43: 468-470.

8. Kitajima, E.W. 1965. Electron microscopy of Brazilian TSWV within the host cell. Virology, Vol. 26: 89-99.

9. Miline, R.G. 1970. An electron microscopy study of TSWV in sections of infected cells and in negative stain preparations. J.Gen.Virology, Vol. 6: 267-276.

10. Peters,D.,A.C.De Avila, E.W.Resende,R.deo, P.Haan & R.W.Goldbach. 1991. An overview of TSWV.Proc. USDA Workshop, USDA, ARS-87. PP: 1-14.

Tomato Sported Wilt Virus (TSWV) Sympton Development on Indication Plant and its Detection by Electron Microscopy in Tehran Province

A. ESMAEILIFAR, J. ZAD, GH. MOSAHEBI, M. MOHAMMDI AND M. OKHOVAT

Former Graduate Student, Professor, Assistant Professor and Professor Faculty of Agriculture University of Tehran Karaj, Iran.

Accepted June 28, 2000

SUMMARY

To detect the presence of TSWV in Tehran province, tomato plant samples suspected of TSWV infection were collected from various regions in the province. Tomato leaf sap was extracted and mechanically transmitted through several plant spesies including: Petunia hybrida, *Nicotiana glutinosa, N. tabacum* cv. Samsun UN, *N. clevelandii,* and *N.bentamiana.* These plants showed characteristic symptons such as lesions, concentric zones, stem necrosis, wilting and collapse at different times after inoculation. Spherical particles of TSWV were observed with serologically specific electron microscopy (SSEM) method. The result showed that TSWV infection is prevalent in Varamin region.

Key words: Tomato Spoted wilt virus, Tomato, Tospovirus