نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و دوم، شماره یکم، ۱۳۹٤
http://jopp.gau.ac.ir

ردیابی سرولوژیکی و تعیین دامنه میزبانی ویروس مخطط توتون در استان گلستان

سعید نصراله‌نژاد[۱] و *سمیرا شاملی[۲]

[۱]دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[۲]محقق بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان،
تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/٤/۳۱

چکیده

استان گلستان یکی از مهم‌ترین مناطق کشت توتون در کشور می‌باشد. ویروس مخطط توتون *Tobacco Streak Ilarvirus* یکی از ویروس‌های مخرب بوده که دارای دامنه میزبانی وسیع و گسترش جهانی است. به‌منظور بررسی سرولوژیکی ویروس مخطط توتون در ۱۳ منطقه استان گلستان، تعداد ۵۰۰ نمونه مشکوک گیاهی متعلق به ۸ خانواده اسفناج، تاج‌خروس، نخود، سیب‌زمینی، پنیرک، گندمیان، کدو و گل ستاره‌ای با علایم بدشکلی برگ، کوتولگی، موزاییک، زردی، نکروز و سوختگی جوانه‌های انتهایی جمع‌آوری شد و با روش الایزای مستقیم (DAS-ELISA) و استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی این ویروس مورد آزمون قرار گرفت. از بین ۵۰۰ بوته مورد آزمایش، در ۷۸ مورد نتیجه آزمون الایزا مثبت بود. نتیجه آزمون الایزا در گیاهان بادام زمینی، کوکب، توتون، ماش، لوبیا، سویا، فلفل و سیب‌زمینی مثبت و در سایر گیاهان مورد بررسی، منفی بود. تعدادی از نمونه‌های الایزا مثبت انتخاب شد و پس از عصاره‌گیری در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷)، حاوی ۰/۱۵ درصد مرکاپتواتانول بر روی گیاهان محک توتون، سلمه تره و گوجه فرنگی مایه‌زنی گردید. وجود TSV در گیاهان محک با آزمون الایزا تایید گردید. مایه‌زنی مکانیکی جدایه‌های مختلف از روی هشت میزبان فوق‌الذکر روی توتون سامسون و گوجه فرنگی علائم یکسانی ایجاد نمود.

واژه‌های کلیدی: توتون، TSV، الایزا، ردیابی، استان گلستان

*نویسنده مسئول: shameli61@yahoo.com

مقدمه

ویروس مخطط توتون (*Tobacco streak Ilarvirus*) با نام اختصاری TSV از خانواده Bromoviridae اولین بار توسط جانسون (۱۹۳٦) از گیاه توتون از آمریکا گزارش شد. این ویروس دارای دامنه‌ی میزبانی وسیعی است و در بیش از ۸۰ جنس از ۹ خانواده‌ی گیاهی ایجاد بیماری می‌کند (ادواردسون و کریستای، ۱۹۹۱؛ برانت و همکاران، ۱۹۹٦). ویروس TSV به طریقه‌ی مکانیکی، با عصاره‌ی گیاهی و از طریق بذر قابل انتقال است. انتقال ویروس از طریق تریپس و دانه‌ی گرده نیز گزارش شده است (کایزر و همکاران، ۱۹۸۲؛ گریبر و همکاران، ۱۹۹۱).TSV از سه قطعه RNA تک رشته‌ای تشکیل شده است که RNA_1 و RNA_2 مسئول همانندسازی ویروس و RNA_3 مسئول حرکت ویروس می‌باشد. آلوده کردن میزبان به‌وسیله‌ی RNA زیر ژنومی که مسئول سنتز پوشش پروتئینی نیز می‌باشد، انجام می‌گیرد (آلمیدا و همکاران، ۲۰۰۵).

ویروس مخطط توتون دارای گسترش جهانی است اما شمال آمریکا، کانادا و استرالیا از مهم‌ترین مناطق پراکنش ویروس می‌باشند. TSV باعث آلودگی محصولات مهمی مانند توتون، پنبه، گوجه فرنگی، سویا، بادام زمینی، آفتابگردان، توت فرنگی و کوکب می‌شود (آلمیدا و همکاران، ۲۰۰۵؛ خاطری و همکاران، ۲۰۰٦؛ شرمن و همکاران، ۲۰۰۸؛ حسینی و همکاران، ۲۰۱۲). ویروس مخطط توتون دراسترالیا از تمشک سیاه، تمشک قرمز، شاتوت، بادام زمینی، فلفل، یونجه، آفتابگردان، پنبه و تعداد زیادی از گونه‌های علف‌های هرز گزارش شده است (کوک و همکاران، ۱۹۹۹؛ شرمن و همکاران، ۲۰۰۸). گونه‌های ترشک و کاسنی، خردل زراعی، کنگر ابلق، تربچه وحشی و کاهو در آمریکا (کوپرتینو و همکاران، ۱۹۸٤؛ مک‌دانیل و همکاران، ۱۹۹۲)، کنف (باسکارا ردی و همکاران، ۲۰۱۲)، پنبه و آفتابگردان در هند (راوی و همکاران، ۲۰۰۱؛ پراسادا راو و همکاران، ۲۰۰۰ و ۲۰۰۳؛ بات و همکاران، ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ الف، ب؛ کومار و همکاران، ۲۰۰٦)، و پنبه در پاکستان (احمد و همکاران، ۲۰۰۳) به‌عنوان میزبان ویروس معرفی شده‌اند. ویروس قادر به آلوده کردن گیاهان زینتی مانند شقایق پیچ و گل حنا نیز می‌باشد (بلاردی و همکاران، ۱۹۸۵).

علایم ویروس مخطط توتون روی میزبان‌های مختلف متفاوت گزارش شده است. کایزرو همکاران (۱۹۹۱) TSV را از ۲۳ میزبان مختلف در اروپای غربی، و سالازار و همکاران (۱۹۸۲) TSV را از روی چندین گیاه از خانواده نخود گزارش کرده‌اند. کوک و همکاران (۱۹۹۹)، درآفریقا گیاه بادام زمینی را

به‌عنوان میزبان بسیار حساس به این ویروس، و بات و همکاران (۲۰۰۲)، TSV را به‌عنوان تهدیدی جدی در مزارع آفتابگردان آمریکای مرکزی اعلام کردند.

ویروس مخطط توتون در ایران، نخستین بار در سال ۱۹۹۵ از مزارع سویا در استان گلستان گزارش شد (رحیمیان و همکاران، ۱۹۹۵). گلنراقی و همکاران (۲۰۰٤)، میزان آلودگی به ویروس مخطط توتون در سویا را در استان‌های گلستان، لرستان، مازندران، خوزستان و اردبیل ٤/۱ درصد گزارش کردند. قطبی (۲۰۰۵)، میزان آلودگی به ویروس مخطط توتون را در گلخانه‌های پرورش انواع گونه‌های زینتی در استان‌های تهران و مرکزی را با یک نسبت مساوی (هر کدام با ۹/۷۱ درصد آلودگی) اعلام نمود. ابطحی و کوهی (۲۰۰۸)، تعداد ۳۰۰ نمونه کاهوی مشکوک به TSV را در استان تهران با آزمون الایزای مستقیم مورد سنجش قرار دادند. پنج جدایه T_1،T_2،T_3،T_4 و T_5 در مناطق مختلف استان تهران شناسایی گردید. خاطری و همکاران (۲۰۰٦)، میزان شیوع TSV را در سه استان گیلان، مازندران و گلستان روی توتون بررسی کردند. بر اساس نتایج به‌دست آمده بیش از ۷۹ درصد نمونه‌های جمع‌آوری شده به TSV آلوده بودند. همچنین در تحقیق دیگری که توسط خاطری و همکاران (۲۰۰۸) روی ویروس‌های توتون در استان‌های آذربایجان غربی و گیلان صورت گرفت، میزان آلودگی بالا به این ویروس در این دو استان مشاهده گردید.

معصومی و همکاران (۲۰۰۹)، میزان آلودگی گوجه فرنگی به ١٤ ویروس گیاهی را در ٥ استان کرمان، هرمزگان، سیستان و بلوچستان، یزد و بوشهر با روش الایزای مستقیم و آنتی بادی اختصاصی پلی‌کلونال بررسی نمودند. در هیچ کدام از ۱۹۱۰ نمونه مورد بررسی،TSV جداسازی و شناسایی نگردید. حسینی فرهنگی و همکاران (۲۰۱۰)، خصوصیات زیست‌شناسی و مولکولی جدایه ویروس رگه‌ای توتون جداشده از مزارع آفتابگردان ایران را با جدایه‌های هندی و سودانی بررسی کردند. حسینی و همکاران (۲۰۱۲)، وقوع و پراکنش TSV را در گیاه آفتابگردان طی سال‌های ۲۰۰٦ تا ۲۰۰۸ در استان‌های کرمان، گلستان، اصفهان، مازندران، قم، آذربایجان غربی، مرکزی، همدان و تهران با الایزای مستقیم و آنتی‌بادی اختصاصی پلی‌کلونال و بر روی ۱۲۷۲ نمونه بررسی کردند. معتمدی و همکاران (۲۰۱۳)، خصوصیات زیست‌شناسی و مولکولی ویروس رگه‌ای توتون را در مزارع آفتابگردان استان‌های آذربایجان غربی، اصفهان، تهران، قم، همدان و مرکزی بررسی نمودند. نتایج بدست آمده نشانگر میزان بالای آلودگی مزارع آفتابگردان به ویروس رگه‌ای توتون بود.

استان گلستان به‌دلیل تنوع محصولات کشاورزی یکی از مهم‌ترین مناطق کشاورزی کشور می‌باشد. با توجه به اهمیت اقتصادی TSV در توتون و عدم شناسایی میزبان‌های جدید این ویروس در استان گلستان، تحقیق حاضر جهت تشخیص سرولوژیکی و بررسی دامنه میزبانی ویروس در استان انجام گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و شناسایی ویروس: به‌منظور ردیابی و شناسایی ویروس مخطط توتون در استان گلستان طی ماه‌های فروردین، خرداد، مرداد، مهر و آذر سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ از مزارع و باغات شهرستان‌های گرگان، علی آباد، گنبد، مینودشت، کلاله، خان‌ببین، رامیان، آزادشهر، فاضل‌آباد، کردکوی، آق‌قلا، بندرترکمن و بندرگز نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌برداری از گیاهان بادام زمینی، کوکب، توتون، ماش، لوبیا، سویا، فلفل، سیب زمینی، تاج‌خروس، آفتابگردان، سلمه تره، خیار، ذرت، باقلا، نخودفرنگی، پنبه، تاج‌ریزی، گوجه فرنگی و بادمجان که دارای علائم مشکوک به ویروس فوق مانند بدشکلی برگ، زردی رگبرگ، نکروز و کلروز، انواع موزاییک، کوتولگی، کوچک ماندن برگ‌ها، لکه حلقوی و لکه غربالی بودند، صورت گرفت. تعداد ۵۰۰ نمونه جهت انجام آزمون سرولوژیکی الایزا به آزمایشگاه منتقل گردید و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تعیین آلودگی ویروس از روش الایزای مستقیم بر پایه روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) و طبق پروتکول شرکت تولیدکننده آنتی‌سرم (Bioreba) استفاده شد. رقت آنتی‌سرم و کانجوگیت مورد استفاده جهت آزمون الایزا در این تحقیق، ۱:۱۰۰۰ در نظر گرفته شد. انجام آزمون الایزا جهت ردیابی ویروس طبق پروتکل شرکت تولیدکننده آنتی‌سرم به‌شرح زیر صورت گرفت:

ایمنوگلوبولین (IgG-TSV) با بافر پوششی به نسبت ۱:۱۰۰۰ (۱µl/ml) مخلوط و در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از آن ریخته شد. پس از افزودن عصاره‌ی برگ به پلیت الایزا، آنتی‌بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (IgG-AP) با بافر کانجوگیت به نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق و به چاهک اضافه گردید. جهت تغییر رنگ چاهک‌ها از سوبسترای نیتروفنیل فسفات (PNPP) استفاده شد. در این روش، سه مرحله شستشوی پلیت با بافر PBS-Tween انجام گردید. چگالی نوری چاهک‌ها بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الایزا خوان مدل ۸۰۰ EL و در طول موج ٤۰۵ یک بار پس از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون و باردوم پس از ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون اندازه‌گیری شد و با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (شاهد منفی)، آستانه جذب گیاهان آلوده با استفاده از فرمول X+3SD تعیین شد. در

این فرمول، X میانگین جذب و SD انحراف معیار چاهک‌های سالم است. در مواردی سه برابر میانگین جذب گیاه سالم به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بدین‌ترتیب، نمونه‌های بیمار مشخص و درصد آلودگی تعیین گردید.

تعیین دامنه میزبانی ویروس: به‌منظور بررسی دامنه میزبانی ویروس مخطط توتون از ۲۰ گیاه متعلق به ۸ خانواده اسفناج (Chenopodiacae)، تاج‌خروس (Amaranthaceae)، نخود (Fabaceae)، سیب‌زمینی (Solanaceae)، پنیر (Malvaceae)، گندمیان (Poaceae)، کدو (Cucurbitaceae) و گل ستاره‌ای (Asteraceae) نمونه‌برداری شد و وجود ویروس TSV با روش الایزا بررسی گردید (جدول ۱). پس از تعیین نمونه‌های آلوده، عصاره گیاهان آلوده با استفاده از بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH =۷)، حاوی ۰/۱۵ درصد مرکاپتواتانول به‌دست آمد و روی گیاهان محک توتون، سلمه تره و گوجه فرنگی مکانیکی گردید. بوته‌ها هر سه روز یک بار مورد بررسی قرار گرفت و علایم ایجاد شده ثبت گردید.

نتایج و بحث

از تعداد ۵۰۰ نمونه مورد آزمایش که همگی علایم آلودگی به بیماری‌های ویروسی را نشان می‌دادند، تنها در ۷۸ مورد نتیجه آزمون الایزا مثبت بود. نتیجه آزمون الایزا در بادام زمینی، کوکب، توتون، ماش، لوبیا، سویا، فلفل و سیب زمینی مثبت و در سایر میزبان‌ها (تاج‌خروس، آفتابگردان، سلمه تره، خیار، ذرت، گوجه فرنگی، باقلا، نخودفرنگی، پنبه، تاجریزی و بادمجان) منفی بود.

با توجه به این که بوته‌های نمونه‌برداری شده همگی علایم آلودگی به بیماری‌های ویروسی را نشان می‌دادند، مشخص گردید که شناسایی دقیق ویروس مورد نظر تنها با آزمون‌های آزمایشگاهی مانند الایزا امکان‌پذیر است. آلمیدا و همکاران (۲۰۰۵)، شرمن و همکاران (۲۰۰۸) و پراسادا راو و همکاران (۲۰۰۳) نیز دامنه میزبانی وسیعی را برای TSV بیان کرده بودند.

نتایج تحقیق اختلاف معنی‌داری بین میزان آلودگی در مناطق مختلف نمونه‌برداری نشان داد. بیشترین آلودگی مربوط به شهرستان‌های علی‌آباد، گرگان و مینودشت بود. تفاوت درصد آلودگی در مناطق مختلف استان، پراکندگی غیر یکنواخت ویروس TSV را نشان می‌دهد. سطح کشت بیشتر توتون و سویا در شهرستان‌های گرگان، علی‌آباد و مینودشت، انتقال ۹۰ درصدی TSV با بذر سویا و احتمالاً فعالیت بیشتر حشرات ناقل، می‌تواند آلودگی بیشتر نمونه‌های جمع‌آوری شده از این سه شهرستان را توجیه کند.

خاطری و همکاران (۲۰۰٦)، میزان شیوع TSV را در مزارع توتون سه استان گیلان، مازندران و گلستان، ۷۹ درصد و میزان آلودگی را به‌ترتیب ۸٦/٦، ۸۲/۳ و ۷۱/۸ درصد اعلام کردند. حسینی و همکاران (۲۰۱۲)، نیز وقوع و پراکنش TSV را درگیاه آفتابگردان طی سال‌های ۲۰۰٦ تا ۲۰۰۸ در استان‌های کرمان، گلستان، اصفهان، مازندران، قم، آذربایجان غربی، مرکزی، همدان و تهران ۲۰/۹ درصد اعلام نمودند که استان تهران شاهد روند افزایشی در طی دوره ۳ ساله بررسی بود. همچنین معتمدی و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیق دیگری، آلودگی بالا و متفاوت مزارع آفتابگردان را در ٦ استان کشور اعلام نمودند. استان آذربایجان غربی با ٥٦/۳٦ درصد، همدان با ۳۱/۳۰ درصد، تهران با۲۲/ ۲٦ درصد، قم با ۱٤/٥٤ درصد، اصفهان با ۸/۸ و مرکزی بدون آلودگی به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلودگی به TSV را دارا بودند. احتمالاً عواملی نظیر شرایط آب و هوایی، جمعیت ناقلین، رقم کاشته شده و گیاهان کاشته شده در مزارع مجاور در شیوع TSV موثرند. شرایط دمایی در پراکنش تریپس‌ها بسیار موثر می‌باشد و احتمالاً در مناطقی که جمعیت تریپس‌ها بالاست این ویروس شیوع بیشتری دارد (معتمدی و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج تحقیق، تنوع علائم ویروس مخطط توتون در میزبان‌های مختلف را نشان داد. در فلفل، نکروز بافت میوه و در ماش غربالی‌شدن پهنک برگ همراه با نکروز بوته مشاهده گردید. علایم در لوبیا به‌صورت لکه‌های کلروتیک و نکروتیک موضعی و در توتون به صورت لکه‌های موضعی و نکروز برگ توتون بود. علایم ویروس در گیاه سویا به‌صورت قطور شدن ساقه و نکروز بوته‌ها مشاهده شد (شکل ۱).

شکل ۱- لکه‌های موضعی و سیستمیک ناشی از مایه زنی TSV روی تعدادی از گیاهان میزبان. A) نکروز میوه فلفل آلوده به TSV، B) سوختگی و نکروز برگ و غلاف‌های ماش، C) لکه‌های نکروتیک لوبیا، D) لکه‌های موضعی و نکروز برگ توتون، E) قطور شدن ساقه و نکروز سویا.

در سایر میزبان‌ها با وجود آلودگی و نتیجه مثبت آزمون الایزا، علائم ظاهری مشخص روی قسمت‌های هوائی گیاه ایجاد نشد. تنوع علایم در گیاهان مختلف، پیشتر توسط محققین مختلف گزارش شده بود (برانت و همکاران، ۱۹۹٦؛ کوستا و کاروالو، ۱۹٦۱؛ راوی و همکاران، ۲۰۰۱). حسینی فرهنگی و همکاران (۲۰۱۰)، علایم ویروس TSV را درآفتابگردان به‌صورت موزائییک شدید و پژمردگی بوته‌ها، در سلمه تره لکه‌های موضعی کلروتیک، در بادام زمینی علایم نکروزه سیستمیک، در باقلا لکه‌های موضعی و پیچیدگی برگ‌ها، در سیب زمینی لکه‌های موضعی خفیف و در لوبیا لکه‌های موضعی کلروتیک اعلام کردند. مایه‌زنی مکانیکی ویروس در روی گیاهان محک توتون، سلمه تره و گوجه فرنگی سبب بروز لکه‌های موضعی در توتون، لکه‌های کلروتیک در سلمه تره و نکروز ساقه و برگ گوجه فرنگی گردید (شکل ۲).

شکل ۲- لکه‌های موضعی و سیستمیک ناشی از مایه زنی TSV بر روی گیاهان محک. A) لکه‌های موضعی روی برگ توتون، B) لکه‌های کلروتیک در برگ سلمه تره، C) نکروز ساقه و برگ گوجه فرنگی

حسینی فرهنگی و همکاران (۲۰۱۰)، نیز علایم ویروس TSV را در گیاه سلمه‌تره به‌صورت لکه‌های موضعی کلروتیک، سیستمیک شدید به‌صورت موزاییک و پژمردگی اعلام کردند. همچنین علایم TSV در توتون و گوجه فرنگی به‌صورت لکه‌های نکروتیک موضعی و علایم سیستمیک که باعث مرگ بوته می‌شد، اعلام شد. معتمدی و همکاران (۲۰۱۳)، نیز علایم ویروس TSV را در گیاه محک سلمه به‌صورت لکه‌های کلروتیک سیستمیک برگ‌ها، درسلمه قرمز لکه‌های موضعی کلروتیک سطح برگ‌ها، در باقلا لکه‌های کلروتیک، پیچیدگی برگ‌ها و زردی و پژمردگی بوته، در آفتابگردان به‌صورت قاشقی شدن برگ‌ها به سمت پایین و تورم رگبرگی، در گل تکمه‌ای بدشکلی برگ و جمع شدن لبه برگ‌ها در قسمت بالای برگ، در لوبیا لکه‌های کلروتیک و در توتون بدون علایم گزارش کردند.

جدول۱- محل و میزبان‌های نمونه‌برداری شده جهت ردیابی ویروس مخطط توتون

ردیف	خانواده	نام علمی میزبان	نام فارسی میزبان	گرگان	علی آباد	کردکوی	بندرگز	بندر ترکمن	آق قلا	مینودشت	گنبد	رامیان	خان ببین	آزادشهر	فاضل آباد	کلاله
۱	Amaranthaceae	*Amaranthus retroflexus*	تاج‌خروس	*	*									*		
۲	Asteraceae	*Dahlia pinnata,*	کوکب	*			*			*						
۳	Asteraceae	*Helianthus annuus*	آفتابگردان	*						*	*	*				
٤	Chenopodiacae	*Chenopodium album*	سلمه تره	*				*	*	*						
٥	Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	خیار		*		*	*			*					
٦	Poaceae	*Zea mays*	ذرت	*			*			*						
۷	Fabaceae	*Vigna unguiculata*	لوبیا چشم بلبلی	*	*									*		
۸	Fabaceae	*Arachis hypogaea*	بادام زمینی			*				*	*					*
۹	Fabaceae	*Phaseolus aureus*	ماش	*	*	*							*			
۱۰	Fabaceae	*Phaseolus vulgaris*	لوبیا	*	*	*							*			
۱۱	Fabaceae	*Vicia faba*	باقلا	*	*				*						*	
۱۲	Fabaceae	*Pisum sativum*	نخود فرنگی				*				*	*	*			
۱۳	Fabaceae	*Glycine max*	سویا	*		*		*		*						
۱٤	Malvaceae	*Gossypium hirsutum*	پنبه	*		*	*					*			*	
۱٥	Solanaceae	*Nicotiana tabacum*	توتون	*	*		*			*		*		*	*	
۱٦	Solanaceae	*Solanum tuberosum*	سیب زمینی	*	*		*			*	*			*	*	*
۱۷	Solanaceae	*Capsicum annuum*	فلفل زینتی		*	*								*		
۱۸	Solanaceae	*Solanum nigrum*	تاج‌ریزی	*		*	*	*		*	*			*	*	*
۱۹	Solanaceae	*Solanum melongena*	بادمجان	*			*			*				*		
۲۰	Solanaceae	*Lycopersicum esculentum*	گوجه فرنگی	*	*						*				*	*

در این تحقیق، وقوع و پراکنش ویروس مخطط توتون در ۲۰ گیاه متعلق به ۸ خانواده گیاهی در استان گلستان مورد بررسی قرار گرفت و ۸ گیاه بادام زمینی، لوبیا، سویا و ماش از خانواده‌ی نخود، کوکب از خانواده گل ستاره‌ای‌ها و توتون، فلفل و سیب‌زمینی از خانواده سیب‌زمینی به‌عنوان میزبان ویروس تعیین گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده، در مناطق مختلف استان بیشترین آلودگی درخانواده‌های سیب‌زمینی و نخود و در گیاهان توتون، سویا و بادام زمینی مشاهده شد. آلودگی سویا، توتون و آفتابگردان در استان گلستان قبلاً گزارش شده بود (رحیمیان و همکاران، ۱۹۹۵؛ گلنراقی و همکاران، ۲۰۰٤؛ خاطری و همکاران، ۲۰۰٦؛ حسینی و همکاران، ۲۰۱۲).

بر اساس نتایج بدست آمده، گیاهان بادام زمینی، لوبیا، ماش، کوکب، سیب‌زمینی و فلفل به‌عنوان میزبان‌های جدید TSV در استان گلستان معرفی می‌شوند. نتایج این تحقیق نشان داد، علایم بیماری در گیاهانی که به‌وسیله TSV آلوده می‌شوند، می‌تواند از کوتولگی، تغییر شکل گیاه، ایجاد نواحی کلروز و نکروز تا زردی بوته متغیر باشد. همچنان‌که در تحقیقی که توسط قطبی (۲۰۰۵) بر روی چندین گیاه زینتی درگلخانه‌های تهران انجام گردید، علایم آلودگی به TSV در گیاه زینتی شیپوری به‌صورت لکه‌های ریز نکروزه، در جعفری و مارگریت موزائیک و تغییر شکل برگ‌ها، در داودی لکه‌های نکروزه، موزائیک و در مواردی کلروز برگی، در گلایول و تاج خروس نکروز و کلروز رگبرگی، در ختمی و شمعدانی موزائیک و لکه‌های نکروز، در پامچال موزائیک، پیچیدگی و بدشکلی برگ‌ها، در اطلسی و همیشه بهار موزائیک، بدشکلی و کوتولگی، و درآفتابگردان لکه‌های وسیع نکروزه و کلروزه شدید برگی مشاهده گردید.

پیشنهادات

با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات گذشته و با توجه به حضور ویروس در میزبان‌های مهم زراعی مانند لوبیا، ماش، فلفل و سویا، به‌کارگیری روش تناوب صحیح با گیاهان غیر میزبان مفید می‌باشد.

با توجه به انتقال ویروس توسط آفات مکنده، مدیریت مزرعه از جهت مبارزه با حشرات ناقل، به‌خصوص در اوایل فصل یعنی قبل از گلدهی بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد. تحقیقات لیستر و همکاران (۱۹۷۰) و کایزر و همکاران (۱۹۹۱) نیز نشان داد که مبارزه با ناقلین ویروس و اجرای صحیح تناوب زراعی به‌راحتی از میزان خسارت این ویروس در مزارع آلوده می‌کاهد.

نظر به این که ویروس در جنین و پوشش بذر قادر به زمستان‌گذرانی می‌باشد، می‌توان برای کنترل یا پیشگیری بیماری، تا حد ممکن از بذرهای عاری از آلودگی استفاده نمود.

منابع

1. Abtahi, F.S., and Koohi Habibi, M. 2008. Host range and some characterization of *Tobacco Streak Virus* isolated from lettuce in Iran. Afri. J. Biotech. 7: 4260-4264.
2. Ahmed, W., Butt, T.B., Ihsan, J., and Rehman, A. 2003. Natural occurrence of *Tobacco Streak Virus* in cotton in Pakistan and screening for its resistant sources. Pak. J. Bot. 35: 401-408.
3. Almeida, A.M.R., Sakai, J., Hanada, K., Oliveira, T.G., Belintani, P., Kitajima, E.W., Souto, E.R., Novaes, T.G., and Nora, P.S. 2005. Biological and molecular characterization of an isolate of *Tobacco Streak Virus* obtained from soybeans in Brazil. Fitopatol. Brasileira. 30:366-373.
4. Bellardi, M.G., Credi, R., and Gelli, C. 1985. Phytopathologia Mediterranea. 24: 255-259.
5. Bhaskara Reddy, B.V., Sivaprasad, Y., Naresh Kumar, C.V.M., Sujitha, A., Raja Reddy, K., and Sai Gopal, D.V.R. 2012. First report of *Tobacco Streak Virus* infecting Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) in India. Indian J. Virol. 23:80–82.
6. Bhat, A.I., Kumar, A., Jain, R.K., Chander Rao, S., and Ramiah, M. 2001. Development of serological based assays for the diagnosis of sunflower necrosis disease. Ann. Plant Protect. Sci. 9:292-296.
7. Bhat, A.I., Jain, R.K., and Ramiah, M. 2002a. Detection of *Tobacco Streak Virus* from sunflower and other crops by reverse transcription polymerase chain reaction. Indian Phytopathol. 55: 216-218.
8. Bhat, A.I., Jain, R.K., Chaudhary, V., Krishna Reddy, M., Ramiah, M., Chattannavar, S.N., and Varma, A. 2002b. Sequence conservation in the coat protein gene of *Tobacco Streak Virus* isolates causing necrosis in cotton, mungbean, sunflower and sunn-hemp in India. Indian J. Biotech.1: 350- 356.
9. Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J. and Watson, L. 1996. Viruses of Plants, CAB International, Wallingford, UK, 1484 pp.
10. Clark, M.F., and Adams, S.A.N. 1977. Characteristics of micro plates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. J. General Virol. 34: 475-483.
11. Cook, G., Miranda, H.R., Roossinck, M.J., and Pietersen, G. 1999. *Tobacco streak Ilarvirus* detected on groundnut in South Africa. Afri. Plant Protec. 5:13-19.
12. Costa, A.S., and Carvalho, A.M.B. 1961. Studies on Brazilian *Tobacco Streak Virus*. Phytopathol. Zeitsch 42: 113-138.

13. Cupertino, F.P., Grogan, R.G., Petersen, L.J., and Kimble, K.A. 1984. *Tobacco Streak Virus* infection of tomato and some natural weed hosts in California. Plant Disease. 68:331-333.
14. Edwardson, J.R., and Christie, R.G. 1991. Handbook of Viruses Infecting Legumes, CRC Press, 504 p.
15. Ghotbi, T. 2006. First report on incidence of *Tobacco Streak Virus* on ornamental plants in Iran. Iran. J. Plant Pathol. 42:159-160.(In Persian)
16. Golnaraghi, A.R., Shahraeen, N., Pourrahim, R., Farzadfar, Sh., and Ghasemi, A. 2004. Occurrence and relative incidence of viruses infecting soybeans in Iran. Plant Disease.10: 1069 – 1074.
17. Greber, R.S., Klose, M.J., and Teakle, D.S. 1991. High incidence of *Tobacco Streak Virus* in tobacco and its transmission by *Microcephalothrips abdominalis* and pollen from *Ageratum houstonianum*. Plant. Disease. 75:450-452.
18. Hosseini, S., Koohi Habibi, M., Mosahebi, G., Motamedi, M., and Winter, S. 2012. First report on the occurrence of *Tobacco Streak Virus* in sunflower in Iran. J. Plant Pathol. 94: 585-589.
19. Hoseini Farhangi, S., Winter, S., Mosahebi, G., Koohi Habibi, M., and Habili, N. 2010. A comparison of biological and molecular characterization of Sudanese-Faba Bean, Indian and Iranian-Sunflower *Tobacco Streak Virus* isolates. Iran. J. Plant Protec. Sci. 1:41-49
20. Kaiser, W.J., Wyatt, S.D., and Pesho, G.R. 1982. Natural hosts and vectors of *Tobacco Streak Virus* in Eastern Washington. Phytopathol. 72:1508-1512.
21. Kaiser, W.J., Wyatt, S.D., and Klein, R.E. 1991. Epidemiology and seed transmission of two *Tobacco Streak Virus* pathotypes associated with seed increases of legume germ plasma in eastern Washington. Plant Disease. 75: 258-264.
22. Khateri, H., Moarrefzadeh, N., Mosahebi, G., and Koohi-Habibi, M. 2008. Virus diseases in the tobacco fields of Guilan and Western Azerbaijan Provinces of Iran. Commun. Agri. Appl. Biol. Sci.73:307-10.
23. Khateri, H., Moarrefzadeh, N., Koohi-Habibi, M., Mosahebi, G., Hosseini, A., and Hamzeh, N. 2006. High incidence of *Tobacco Streak Virus* in the tobacco fields of Iran. Commun. Agri. Appl. Biol. Sci. 71:1213-6.
24. Kumar, A.N., Lakshmi-Narasu, M., Zehr, U.B., and Ravi, K.S. 2006. Natural occurrence and distribution of *Tobacco Streak Virus* in South India. Indian J. Plant Protec. 34: 54-58.
25. Lister, R.M., and Bancroft, J.B. 1970. Alteration of *Tobacco Streak Virus* component ratio is altered by host and extraction procedure. Phytopathol. 60: 689-694.
26. Massumi, H., Shaabanian, M., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, J., and Rahimian, H. 2009. Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. Plant Disease. 93:67-72.

27. Mc Daniel, L.L., Raid, R.N., Elliott, C.L., Tsai, J.H., and Nagata, R.T. 1992. Purification and serological characterization of a *Tobacco Streak Virus* isolate infecting field-grown escarole and lettuce. Plant Disease. 76:966-971.
28. Motamedi, M., Koohi Habibi, M and Mosahebi, G. 2013. Biological and molecular properties of *Tobacco Streak Virus* isolated from sunflower. J. Plant Protec. 2: 159-168
29. Prasada Rao, R.D.V.J., Reddy, A.S., Chander Rao, S., Varaprasad, K.S., Thirumala Devi, K., Nagaraju Muniyappa, V., and Reddy, D.V.R. 2000. *Tobacco Streak Ilarvirus* as causal agent of sunflower necrosis disease in India. J. Oilseeds Res. 17:400-401.
30. Prasada Rao, R.D.V.J., Reddy, A.S., Reddy, S.V., Thirumala Devi, K., Chander Rao, S., Manoj Kumar, V., Subramaniam, K., Yellamanda Reddy, T., Nigam, S.N., and Reddy, D.V.R. 2003. The host range of *Tobacco Streak Virus* in India and transmission by trips. Ann. Appl. Biol. 142: 365-368
31. Rahimian, H., Hamdollah-Zadeh, A., and Montazeri, M. 1995. Viruses associated with soybean pod set failure syndrome in Iran. J. Plant Pathol. 32: 70-71.
32. Ravi, K.S., Buttegereitt, A.S., Kitkaru, A.S., Deshmukh, S., Lesemann, D.E., and Winter, S. 2001. Sunflower necrosis disease from India is caused by an Ilarvirus related to *Tobacco Streak Virus*. Plant Pathol. 50: 800.
33. Salazar, L.F., Abad, J.A., and Hookr, W.J. 1982. Host range and properties of a strain of *Tobacco Streak Virus* from potatoes. Phytopathol. 72:1550-1554.
34. Sharman, M., Thomas, J.E., and Persley, D.M. 2008. First report of *Tobacco Streak Virus* in sunflower (*Helianthus annuus*), cotton (*Gossypium hirsutum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and mung bean (*Vigna radiata*) in Australia. Plant Disease. 3: 27-29.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. Plant Prod. Res. Vol. 22 (1), 2015
http://jopp.gau.ac.ir

Serological detection and host rang of *Tobacco Streak Ilarvirus* in Golestan province

S. Nasrollanejad[1] and *S. Shameli[2]
[1]Associate Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Dept. of Plant Protection Research, Agricultural and Natural Resources Research Center of Golestan province, Gorgan
Accepted: 11-1-2014 ; Received: 2-7-2014

Abstract

Golestan province is one of the main tobacco growing regions in the country. *Tobacco Streak Virus* (TSV) is a destructive pathogen on tobacco that has a wide host range and occurs worldwide. In order to serological detection of TSV at 13 region of Golestan province, 500 infected samples belong to 8 families; Chenopodiacae, Amaranthaceae, Fabaceae, Solanaceae, Malvaceae, Poaceae, Cucurbitaceae and Asteraceae with leaf distortion, stunting, mosaic, yellowing, necrosis and terminal bud blight symptoms, were collected and tested by the DAS-ELISA method using specific polyclonal antibody. The results showed 78 positive reactions out of 500 samples in ELISA tests. The infection of peanut, dahlia, tobacco, mung bean, common bean, soybean, pepper and potato was positive to TSV, and negative for other plants in ELISA test. Some of ELISA positive samples were selected and their extracts in phosphate buffer 0.1M, pH 7.4 containing mercaptoethanol was mechanically inoculated on indicator plants, tobacco, fat-hen and tomato. TSV infection was confirmed by ELISA on indicator plants. The mechanical inoculation of different isolates of 8 mentioned hosts on tobacco and tomato, caused similar symptoms.

Keywords: Tobacco, TSV, ELISA, Detection, Golestan province

*Corresponding author; shameli61@yahoo.com