گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۹ شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

واکنش ارقام کلزا به یک جدایه ویروس موزاییک کلم‌گل و آلودگی همزمان جدایه‌های ویروس موزاییک شلغم و موزاییک کلم‌گل در شرایط گلخانه

آیسان قاسم زاده[1]، مسعود شمس بخش[2*]

۱- دانشجوی دکتری رشته بیماری شناسی گیاهی، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران

۲- * **نویسنده مسوول**: دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران (shamsbakhsh@modares.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۰۱

چکیده

گسترش سطح زیرکشت کلزا (*Brassica napus* L.) در جهان نشانگر اهمیت این گیاه می‌باشد. از ۱۲ ویروس گزارش شده از کلزا، ویروس موزاییک کلم‌گل (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) و ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus, TuMV*) دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند. استفاده از ارقام مقاوم یکی از راه‌کارهای مناسب برای کنترل خسارت بیماری‌های ویروسی محسوب می‌شود و از طرفی تاکنون ارزیابی ارقام تجاری کلزا در ایران در برابر ویروس موزاییک کلم‌گل انجام نشده‌است. از اینرو در تحقیق حاضر واکنش ۱۳ رقم تجاری کلزا به CaMV در شرایط گلخانه ارزیابی شد. شاخص شدت علایم در گیاهان مایه‌زنی شده و میزان جذب در آزمون الایزا نشان داد که رقم کرج۳ در برابر این ویروس متحمل بود. به‌علاوه با توجه به گزارش آلودگی همزمان مزارع کلزا به TuMV و CaMV، واکنش ارقام کلزا در برابر آلودگی مخلوط دو ویروس نیز در شرایط گلخانه بررسی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که هر چند ارقام کلزای تجاری رایج در ایران به هر دو ویروس حساس می‌باشند ولی حساسیت رقم کرج۳ نسبت به سایر ارقام کمتر بود.

کلید واژه‌ها: مقاومت، الایزا، Brassica napus

مقدمه

سطح زیرکشت گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) رو به افزایش است، به‌طوری‌که سطح زیر کشت این محصول در ایران حدود ۹۳/۶ هزار هکتار و میزان محصول ۱۷۵ هزار تن در سال برآورد شده‌است (Anonymous, 2014). کلزا نیز مانند سایر محصولات زراعی در معرض حمله آفات و بیماری‌های متعددی قراردارد (Walsh and Tomlinson, 1985). در میان بیمارگرهای گیاهی ۱۲ ویروس قادر به ایجاد بیماری در کلزا می‌باشند که از میان آنها سه ویروس موزاییک کلم‌گل *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)، ویروس موزاییک شلغم *Turnip mosaic virus* (TuMV) و ویروس زردی غربی چغندر قند *Beet western yellows virus* (BWYV) از نظر اقتصادی از اهمیت بیشتری برخورداند (Coutts and Jones, 2000; Farzadfar and Pourrahim, 2014; Shahraeen, 2012; Tabarestani et al., 2010).

ویروس موزاییک کلم‌گل (CaMV) با داشتن ژنوم دی‌ان‌ای دولا با اندازه حدود ۸۰۰۰ جفت باز گونه تیپ جنس *Caulimovirus* می‌باشد (Hull and Shepherd, 1977). علایم CaMV در اعضای تیره شب‌بو (Brassicaceae) شامل کلروز، موزاییک و کوتولگی می‌باشد که این علایم در آلودگی مخلوط با

TuMV مشهودتر است (Walsh and Tomlinson, 1985; Melcher, 1989). حدود ۲۷ گونه شته به‌روش نیمه‌پایا CaMV را از یک گیاه آلوده به گیاه سالم انتقال می‌دهند (Shepherd, 1981). در میان آن‌ها دو گونه *Myzus persicae* (Sulzer) و *Brevicoryne brassicae* Linnaeus مهم‌ترین ناقل‌های شناخته‌شده این ویروس می‌باشند (Walsh and Tomlinson, 1985). اکثر جدایه‌های این ویروس تنها قادر به آلودگی اعضای تیره شب‌بو می‌باشند و تعداد معدودی از جدایه‌های آن در گونه‌های مختلف جنس توتون ایجاد آلودگی می‌کنند (Schoelz and Shepherd, 1988). آلودگی به CaMV مانع رشد و نمو گیاه می‌شود و بازدهی دانه‌های روغنی به‌دست آمده تا ۵۰ درصد کاهش می‌یابد (Sutic et al., 1999). گزارش‌های متعددی از ردیابی CaMV از مناطق مختلف ایران در دست می‌باشد که نشانگر شیوع این ویروس در کشور است (Sohi et al., 2013).

یکی از راه‌کارهای کاهش خسارت CaMV کنترل شته‌های ناقل آن است اما طی این سال‌ها حشرات در مقابل سموم مقاومت نشان داده‌اند (Edwards et al., 2008). از طرف دیگر تمام جدایه‌های این ویروس با شته‌ها انتقال نمی‌یابند. یافتن ارقام کلزای مقاوم به این ویروس یا ژن‌های مقاومت در اعضای تیره شب‌بو راه کار مناسب دیگری است که در مسیر کنترل این ویروس مؤثر می‌باشد.

طی تحقیقات متعدد، واکنش گیاهان تیره شب‌بو در برابر CaMV در شرایط گلخانه و مزرعه بررسی شده است. نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که واکنش اعضای مختلف تیره شب‌بو در برابر این ویروس با یکدیگر متفاوت می‌باشد و تنها در برخی از اعضای این خانواده ارقام متحمل به CaMV یافت شده است (Pink et al., 1986; Pink and Walkey, 1988; Saunders et al., 1990; Provvidenti, 1980; Walkey and Neely, 1980; Walsh and Tomlinson, 1985).

همچنین در برخی از ارقام آرابیدوپسیس مقاومت به برخی جدایه‌های این ویروس مشاهده شده است و این مقاومت در واکنش به جدایه‌های دیگر CaMV شکسته شده است (Agama et al., 2002؛ Callaway et al., 1996؛ Cecchini et al., 1998؛ Hapiak et al., 2008؛ Tang and Leisner, 1997).

با توجه به اینکه تا کنون واکنش ارقام تجاری کلزا در ایران به CaMV مورد ارزیابی قرار نگرفته‌است، در تحقیق حاضر واکنش ۱۳ رقم تجاری کلزا که در ایران کشت می‌شوند در برابر CaMV در شرایط گلخانه بررسی شد. همچنین با توجه به اینکه در گزارش‌های متعدد، حضور همزمان CaMV و TuMV در گیاه تایید شده است (Farzadfar and Pourrahim, 2014؛ Shahraeen, 2012؛ Tabarestani et al., 2010). واکنش ارقام تجاری کلزا در برابر آلودگی همزمان CaMV و TuMV نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

ارقام کلزا و منبع ویروس

سیزده رقم تجاری کلزا که از نظر سطح زیر کشت و سازگاری با شرایط آب و هوایی ایران اهمیت دارند از مرکز تحقیقات دانه‌های روغنی کشور دریافت شد. ارقام کلزا از لحاظ زمان کشت متفاوت و شامل تیپ‌های بهاره، زمستانه بودند (جدول ۱).

منبع ویروس استفاده شده در این تحقیق شامل همسانه عفونت‌زای جدایه CM1841 ویروس CaMV بنام pCa122 (Anderson et al., 1991) با رس‌شمار V00140 و جدایه TuMV با رس‌شمار Ku535893 بود. به‌منظور استفاده از همسانه عفونت‌زای CaMV ابتدا همسانه pCa122 به سویه DH5α *Escherichia coli* منتقل شد. از باکتری‌های ترانسفرم‌شده پلاسمید استخراج شد (Sambrook et al., 1989). سپس پلاسمید به‌دست آمده به برگ‌های گیاه شلغم در مرحله سه‌برگی مایه‌زنی شد. بعد از ۱۴ روز علایم لکه موضعی در برگ

جدول۱- نام و مشخصات ارقام کلزای ارزیابی شده در این تحقیق

Table1- Name and characteristics of canola varieties evaluated in this study

Name of Varieties	Farming area	Type	Source
Hayola 401	Warm-humid zones	Spring	Australia
Zafar	Warm-humid zones	Spring	Iran
Eureka (Sary Gol)	Warm-humid zones	Spring	Iran
Karaj1	Cool and temperate zones	Winter	Iran
Karaj2	Cool and temperate zones	Winter	Iran
Karaj3	Cool and temperate zones	Winter	Iran
RGS003	Warm-humid zones	Spring	Germany
Opera	Cool and temperate zones	Winter	Sweden
Talayeh	Cool and temperate zones	Winter	Germany
Licord	Cool and temperate zones	Winter	Germany
Okapi	Cool and temperate zones	Winter	France
SLM046	Cool and temperate zones	Winter	Germany
Zarfam	Cool and temperate zones	Winter	Iran

مایه‌زنی‌شده مشاهده‌شد و به‌تدریج علایم سیستمیک در برگ‌های بالایی گسترش یافت (Lebeurier et al., 1980). برای تایید ویروس فعال شده در برگ‌های شلغم، دی‌ان‌ای کل از برگ‌های بالایی مایه‌زنی‌نشده گیاه استخراج‌شد (Dellaporta et al., 1983). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۱۵ µl شامل ۷/۵µl مخلوط ۲x آماده پی‌سی‌آر (Ampliqon)، ۰/۵ µl از غلظت ۱۰ pmol جفت آغازگرهای CaMV-p6-forward (5´-GAGAACATAGAAAAACTCCTCAT-3´) و CaMV-p6-reverse (5´-GGATGAAGTTCAACCTATCTG-3´)، ۰/۵µl از دی‌ان‌ای استخراج شده با غلظت ۵۰ ng/µl در دستگاه ترموسایکلر مطابق با برنامه ۹۴ ^{o}C به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل ۹۴ ^{o}C به‌مدت ۱ دقیقه، ۵۵ ^{o}C به‌مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ ^{o}C به‌مدت ۱ دقیقه و برای بسط نهایی ۷۲ ^{o}C درجه به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد (Shams-bakhsh et al., 2007).

آلوده سازی گیاه کلزا

به‌منظور ارزیابی ارقام تجاری کلزا در برابر CaMV آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در شرایط گلخانه اجرا شد. در این آزمایش سه بلوک هر کدام حاوی ۱۳ رقم تجاری کلزا در شش تکرار در نظر گرفته شد. در آزمایشی دیگر به‌منظور ارزیابی ارقام کلزا در برابر آلودگی مخلوط CaMV و TuMV آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام‌شد. در این آزمایش ۱۳ رقم تجاری کلزا در ۹ تکرار بررسی شدند. گیاهان پس از کشت در گلدان حاوی نسبت مساوی خاک، پیت و پرلیت، در مرحله سه‌برگی با ویروس مایه‌زنی شدند. به‌منظور اجرای آزمایش اول، مایه‌زنی با عصاره برگ گیاه شلغم آلوده به CaMV در بافر فسفات پتاسیم (pH ۷/۲) انجام گرفت و از شش تکرار موجود در هر بلوک ۴ تکرار با ویروس مایه‌زنی شدند و ۲ تکرار باقی تنها با بافر فسفات پتاسیم مایه‌زنی شدند. در آزمایش دوم عصاره گیاه شلغم آلوده به CaMV و شلغم آلوده به TuMV همزمان در بافر فسفات پتاسیم (pH ۷/۲) به گیاهان مایه‌زنی شدند. گیاهان پس از مایه‌زنی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی هشت ساعت تاریکی قرار-گرفتند. علایم مشاهده شده تا ۳۵ روز پس از مایه‌زنی ثبت شدند. هر کدام از آزمایش‌ها دست‌کم دوبار تکرار شد.

تعیین شاخص شدت علایم

شاخص شدت علایم در گیاه کلزا به CaMV براساس سامانه نمره‌دهی Walsh and Tomilnson (1985) انجام‌شد. نمره صفر، بدون علایم؛ نمره یک، پیسک ضعیف در برگ‌های میانی، شبکه زردی و رگبرگ روشنی ضعیف در برگ‌های بالایی؛ نمره دو، پیسک متوسط در برگ‌های میانی، شبکه زردی و رگبرگ روشنی متوسط در برگ‌های بالایی؛ نمره سه، پیسک شدید در برگ‌های میانی، شبکه زردی شدید و رگبرگ روشنی متوسط در برگ‌های بالایی؛ نمره چهار، پیسک شدید در برگ‌های میانی، شبکه زردی و رگبرگ روشنی شدید در برگ‌های بالایی. همچنین برای نمره‌دهی علایم حاصل از آلودگی مخلوط TuMV و CaMV در بررسی دو ویروس در گیاه کلزا از نمره‌دهی Jafari et al. (2016) استفاده شد.

ارزیابی آلودگی ویروس با آزمون الایزا

به‌منظور مقایسه کمّی میزان ویروس در میان ارقام کلزا از آزمون الایزای مستقیم و از روش ساندویچ دوطرفه استفاده‌شد. آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در این آزمون از شرکت DSMZ آلمان تهیه شد و آنتی‌بادی پوششی و آنتی‌بادی متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز به نسبت ۱:۵۰۰ رقیق شدند. بافرهای مورد استفاده مطابق با دستورالعمل DSMZ تهیه شدند. نمونه‌برداری از برگ‌های بالایی کلزا انجام شد و میزان جذب ویروس در طول موج ۴۰۵ nm با دستگاه الایزاخوان ۲۰۲۰ Anthos ساخت کشور سوئیس اندازه‌گیری شد. آنالیز نتایج حاصل از میزان جذب نوری در قالب طرح بلوک-های کامل تصادفی انجام گرفت بدین صورت که میزان جذب گیاهان حاصل از هر کدام از بلوک‌های آزمایش گلخانه در یک پلیت الایزا اجرا شدند.

آنالیز داده ها

آنالیزهای آماری مورد نیاز در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام‌شد و به‌منظور مقایسه میانگین داده‌های بدست آمده از آزمون دانکن در سطح احتمال ٪ ۵ استفاده‌شد. همچنین به‌منظور بررسی همبستگی میان شاخص شدت علایم و میزان جذب ویروس در گیاه از آزمون همبستگی پیرسون در نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

نتایج و بحث

در مطالعه حاضر واکنش ۱۳ ژنوتیپ تجاری کلزا در شرایط گلخانه و با دو تکرار آزمایشی در برابر CaMV جدایه CM1841 بررسی‌شد. جدایه CM1841 از نظر تیپ بیولوژیکی در گروه پیسک ملایم/ علایم مخفی طبقه‌بندی می‌شود. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنی جدایه‌های ایرانی CaMV نشان داده-است که اغلب جدایه‌های ایرانی در گروه بیوتیپ با علایم ملایم قرار دارند (Farzadfar et al., 2014). بنابراین در این پژوهش از جدایه‌ای استفاده شد که متعلق به گروه یک درخت فیلوژنی بود.

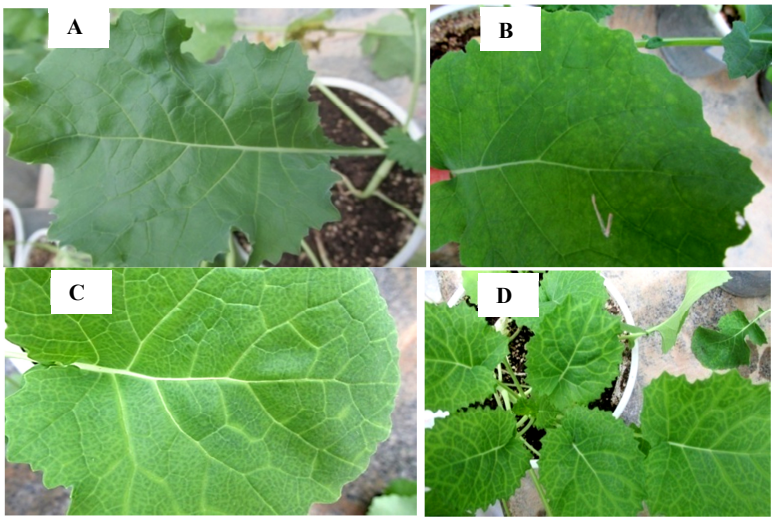
اولین ارزیابی در اردیبهشت و دومین ارزیابی در آبان ماه سال ۱۳۹۴ انجام شد. نمرات ثبت‌شده از علایم CaMV در ارقام کلزا براساس نمرات تعریف شده در مطالعه قبلی با کمی تغییرات انجام گرفت (Walsh and Tomlinson, 1985). زیرا در مطالعه قبلی علایم ثبت شده ناشی از جدایه NVRS ویروس CaMV بود که موجب ایجاد کوتولگی در گیاه کلزا می‌شود در حالیکه جدایه CM1841 چنین علایمی را در گیاه کلزا نشان نمی‌دهد. نتایج بررسی علایم نشان داد که ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، علایم لکه موضعی در برگ مایه‌زنی شده ۱۳ رقم کلزا مشاهده شد. علایم پیسک (mottling) در برگ‌های میانی تمام ارقام مشاهده شد اما این علایم در ارقام هایولا ۴۰۱، ساری-گل، کرج۱، کرج۲، RGS003 و زرفام با شدت بیشتری نمایان شد. در همه ارقام علایم شبکه‌زردی مشاهده‌شد اما این علایم در ارقام هایولا ۴۰۱، ساری-گل، کرج۱ و RGS003 زودتر و با شدت بیشتری نسبت به سایر ارقام ثبت‌شد. حدود ۲۵ روز پس از مایه-زنی، علایم روشن‌شدن رگبرگ‌ها مشاهده شد که این علایم نیز در ارقام هایولا ۴۰۱، ساری‌گل، کرج۱،

کرج۲، RGS003 و ظفر زودتر و با شدت بیش‌تری ظاهرشد. علایم بیماری در هیچ‌کدام از گیاهان شاهد که با بافر مایه‌زنی شدند مشاهده نشد (شکل ۱). مطابق با اطلاعات ارایه شده در جدول ۲ که نتایج حاصل از آزمون دانکن را نشان می‌دهد، ۱۳ رقم بررسی شده بر اساس نمرات ثبت شده ۳۵ روز پس از مایه‌زنی به هفت گروه طبقه‌بندی شدند. در این طبقه‌بندی رقم هایولا۴۰۱ بیشترین میانگین علایم و رقم کرج۳ کمترین درجه میانگین علایم را نشان دادند. در این مطالعه تمام ارقام نمرات یک تا چهار علایم CaMV را نشان دادند که در این میان رقم هایولا ۴۰۱ بیش ترین تعداد درجه سه یا چهار را در تکرارهای خود داشت و ارقام کرج۳، اوپرا، طلایه، اوکاپی و SLM046 درجه سه یا چهار را در میان تکرارهای خود نشان ندادند. در مجموع می‌توان گفت که بررسی علایم نشان‌داد که هایولا ۴۰۱ و کرج۱ حساس‌ترین ارقام و کرج۳ و SLM046 متحمل به CaMV بودند.

نتایج آزمون الایزا از برگ‌های بالایی گیاهان کلزا ۳۵ روز پس از مایه‌زنی نشان داد که ارقام کلزا به ۱۰ گروه طبقه‌بندی شدند (جدول ۲). در این گروه‌بندی رقم لیکورد با میانگین جذب نوری ۲/۹۴ و رقم SLM046 با میانگین جذب نوری ۱/۹۶ به‌ترتیب بیش‌ترین و کمترین میزان جذب نوری را داشتند (جدول ۲). همچنین گیاهان سالم هر رقم که با بافر فسفات پتاسیم تیمار شده‌بودند، میانگین جذب پایین‌تری در مقایسه با گیاهان آلوده همان رقم نشان‌دادند که با توجه به نتایج آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند (جدول ۳). با مقایسه اختلاف جذب نوری که در میان گیاهان شاهد و آلوده به ویروس در هریک از ارقام کلزا مشاهده شد، ارقام هایولا۴۰۱، لیکورد و زرفام بیشترین اختلاف را نشان دادند درحالیکه ارقام SLM046، اوکاپی و کرج۱ کمترین اختلاف را داشتند (جدول۲).

نتایج آزمون همبستگی (آزمون پیرسون) نشان داد که ضریب همبستگی برای دو فاکتور شاخص شدت علایم و جذب نوری ۰/۷۳۹ بود (جدول۴). بنابراین می‌توان گفت که دو فاکتور مورد آزمایش در این تحقیق تابعی از یکدیگر بودند. اختلاف میان دو فاکتور بررسی‌شده در ارقام کلزا نشانگر میزان حساسیت و تحمل در آنهاست. در رقم کرج۱ میانگین شاخص شدت علایم بالا بود درحالیکه میانگین جذب نوری این رقم را در گروه پایین‌تری قرار داد. همچنین ارقام کرج-۳ و لیکورد میانگین شدت علایم پایینی را نشان دادند و در گروه‌بندی آزمون دانکن در گروه‌های پایین قرار-گرفتند اما میانگین جذب نوری بالا آنها را درگروه‌های بالاتر جای‌داد (جدول ۲). بنابراین می‌توان رقم کرج۱ را بعنوان یک رقم حساس محسوب کرد زیرا با مقدار کم ویروس علایم شدیدتری را نشان داد درحالیکه ارقام کرج۳ و لیکورد را ارقام متحمل محسوب کرد زیرا به‌رغم اینکه مقدار زیادی از ویروس در این گیاهان حضور داشت اما علایم خفیف‌تری را نشان-دادند (Cooper and Jones, 1983). از آنجایی-که در این پژوهش بررسی واکنش ارقام تحت شرایط گلخانه انجام شده است، برای اعتباردهی و تایید نتایج به‌دست‌آمده، تکرار آزمایش‌ها در سطح مزرعه و با استفاده از آلودگی طبیعی ضروری است.

در تحقیقات قبلی مشخص شده است که خسارت اصلی این ویروس به دانه‌های روغنی این گیاه می‌باشد و خسارت آن حدود ۲۰ تا ۵۰ درصد برآورد شده‌است (Walsh et al., 1989; Sutic et al., 1999). فاکتور مهم دیگر برای بررسی و مقایسه ارقام در اثر آلودگی به ویروس، بررسی وزن دانه‌های روغنی بدست آمده می‌باشد که بررسی این فاکتور نیز نیازمند اجرای آزمایش در شرایط مزرعه می‌باشد. بنابراین انجام بررسی واکنش ارقامی که در این پژوهش متحمل شناخته شده‌اند در شرایط مزرعه ضروری می‌باشد.



شکل ۱- علایم ناشی از مایه‌زنی گیاهان به ویروس موزاییک کلم‌گل (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV). A : بدون علایم ، B: پیسک ، C: رگبرگ روشنی و D: موزائیک و رگبرگ روشنی.

Figure. 1- Symptoms induced by inoculation with *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) in canola varieties, A: without symptoms, B: mottling, C: vein clearing and D: mosaic and vein clearing.

جدول ۲- میانگین شاخص شدت علایم و جذب ویروس در طول موج ٤٠٥ نانومتر در آزمون الایزا ویروس موزاییک کلم‌گل (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)

Table2- Mean of symptoms severity index and absorbance at 405 nm wave length in ELISA of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)

Cultivar	No. of plants with score 3 and 4	Mean of severity index (I)	(M)	Mean of absorbance (I)	(M)
Hayola 401	8	3.00^{a}	0^{g}	2.83^{ab}	1.23^{j}
Zafar	4	2.08^{cde}	0^{g}	2.6^{abcde}	1.42^{ij}
Sary gol	6	2.50^{bc}	0^{g}	2.54^{bcdef}	1.33^{ij}
Karaj1	6	2.83^{ab}	0^{g}	2.17^{fg}	1.45^{ij}
Karaj2	4	2.08^{cde}	0^{g}	2.68^{abcd}	1.31^{ij}
Karaj3	0	1.42^{f}	0^{g}	2.55^{bcdef}	1.18^{j}
RGS003	4	2.50^{bc}	0^{g}	2.43^{cdef}	1.36^{ij}
Opera	0	1.83^{def}	0^{g}	2.28^{efg}	1.31^{ij}
Talayeh	0	1.92^{def}	0^{g}	2.51^{bcdef}	1.57^{ij}
Licord	2	2.00^{cde}	0^{g}	2.94^{a}	1.36^{ij}
Okapi	0	1.75^{def}	0^{g}	2.29^{defg}	1.71^{hi}
SLM046	0	1.58^{ef}	0^{g}	1.96^{gh}	1.42^{ij}
Zarfam	2	2.17^{cd}	0^{g}	2.79^{abc}	1.24^{j}

I: گیاه مایه زنی شده با CaMV

M: گیاه تیمار شده با بافر فسفات

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نیستند.

I: Inoculated by CaMV,
M: Mock inoculation
Means values indicated by the same letters represent not significant differences at $P \leq 0.05$ calculated using the Duncan test.

جدول ۳- میانگین مربعات و سطح احتمال آزمون ANOVA در آلودگی ارقام کلزا با ویروس موزاییک کلم‌گل و تاثیر آن روی علایم و تجمع ویروس

Table3- Square means and significance level of ANOVA test in inoculated canola cultivars by *Cauliflower mosaic virus* and its effect on symptoms and virus accumulation

Source	Degree of freedom	Mean of severity index	Virus absorbance
Virus	1	1156.049**	638.545**
Genotype	12	4.309**	2.415**
Virus×Genotype	12	4.309**	5.157**
Error	275		
Total	312		

ns اختلاف معنی‌دار نیست

** و * اختلاف معنی‌دار به ترتیب در سطح احتمال ۰/۰۵و ۰/۰۱

Ns: not significant
*, **: Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

جدول ٤- نتایج آزمون همبستگی (پیرسون) شاخص شدت علایم و جذب ویروس در ارقام کلزا در واکنش به ویروس موزاییک کلم‌گل (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)

Table 4- Results of Pearson correlation test for symptoms severity index and virus absorbance in canola cultivars reacted to *Cauliflower mosaic virus*.

Cultivar	Correlation coefficient
Hayola 401	0.909**
Zafar	0.875**
Sary gol	0.672**
Karaj1	0.644**
Karaj2	0.896**
Karaj3	0.919**
RGS003	0.892**
Opera	0.896**
Talayeh	0.775**
Licord	0.638**
Okapi	0.533**
SLM046	0.533**
Zarfam	0.810**
Total	0.739**

در مطالعات قبلی واکنش ارقام کلزا در شرایط کنترل شده و مزرعه در برابر جدایه‌ای از ویروس CaMV انجام شده است. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تمام ارقام کلزا در برابر ویروس واکنش داشتند با این تفاوت که در برخی ارقام این واکنش با شدت بیشتری نسبت به سایر ارقام مشاهده‌شد (Walsh and Tomlinson, 1985; Walsh, 1989). در تحقیق حاضر نیز که واکنش ۱۳ رقم تجاری کلزا در برابر جدایه‌ی CM1841 ویروس CaMV بررسی شد نشان داد که تمام ارقام طی آلودگی با CaMV علایم ویروسی را نشان دادند. همچنین شدت علایم در برخی ارقام بیشتر از سایر ارقام بود که با نتایج تحقیقات Walsh et al. (1989) مطابقت دارد. با توجه به اینکه تاکنون مقاومت پایدار در ژنوتیپ این گیاه در برابر CaMV مشاهده نشده است،

پیشنهاد می‌شود از روش‌های مهندسی ژنتیک با استفاده از مقاومت برگرفته از بیمارگر برای تولید کلزای مقاوم به این ویروس استفاده شود.

با توجه به اینکه در گزارش‌های متعدد حضور همزمان CaMV و TuMV از گیاهان کلزا در ایران گزارش شده است (Farzadfar and Pourrahim, 2014؛ Tabarestani et al., 2010 ؛Shahraeen, 2012) و همچنین به خسارت‌های ناشی از این دو ویروس در کلزا نیز اشاره شده است (Walsh and Tomlinson, 1985; ،Coutts and Walsh et al., 1989; Jones, 2000;)، بنابراین واکنش این ارقام در برابر آلودگی مخلوط CaMV و TuMV نیز مورد مطالعه قرارگرفت. طی این آزمایش ارقام کلزا با عصاره برگ-های گیاهان شلغم آلوده به هر یک از دو ویروس مایه‌زنی شدند. در زمان ظهور علایم، علامت لکه موضعی که معمولا در برگ‌های مایه‌زنی شده مشاهده می‌شود، مشاهده نشد. در حالیکه علایم لکه‌موضعی در گیاهان آلوده به CaMV پس از ۱۴ روز از زمان مایه‌زنی در تمام ارقام مشاهده شد. همچنین علایم لکه‌موضعی پس از هفت روز در برگ‌های مایه‌زنی شده با TuMV نیز گزارش شده‌است (Jafari et al., 2016). پس از هفت روز علایم سیستمیک شد و در برگ‌های مایه‌زنی‌نشده گیاهان نیز مشاهده شد. این علایم شامل موزاییک ناشی از TuMV و علایم شبکه‌زردی ناشی از CaMV بود که بتدریج هر کدام از این علایم گسترش پیدا کردند و سایر علایم ناشی از هر یک از ویروس‌ها مشاهده‌شد. در حالیکه علایم CaMV حدود ۱۴ روز پس از مایه‌زنی ظاهر شد، علایم TuMV هفت روز پس از مایه‌زنی قابل مشاهده‌بود. بتدریج علایم ناشی از TuMV در برگ‌ها گسترش پیداکرد و علایم موزاییک و زردی سطح برگ-های گیاه کلزا را فراگرفت. در نتیجه علایم ناشی از CaMV که در برگ‌های کلزا با شدت کمتری نسبت به TuMV قابل مشاهده است به‌سختی قابل ردیابی بود. در نهایت پس از ۳۵ روز از مایه‌زنی که علایم TuMV به مرحله بهبودی (recovery) رسید، علایم CaMV همچنان قابل مشاهده بود. همچنین در طول یادداشت-برداری علایم در گیاهان کلزای آلوده به دو ویروس، علایم متفاوتی که از آلودگی مخلوط گیاهان کلزا بوجود بیاید مشاهده نشد. نتایج مقایسه میانگین در آزمون دانکن برای شاخص شدت علایم CaMV در آلودگی مخلوط دو ویروس با نتایج مقایسه میانگین شاخص شدت علایم CaMV در آلودگی اختصاصی با این ویروس مشابه بود. هر چند ظهور علایم ناشی از CaMV در برخی ارقام از قبیل ظفر، ساری‌گل، هایولا ۴۰۱ و زرفام سریع‌تر اتفاق افتاد. نتایج مقایسه میانگین برای شاخص شدت علایم TuMV در آلودگی مخلوط دو ویروس نشان داد که گروه‌بندی ارقام در مقایسه با نتایج بررسی واکنش ارقام کلزا به TuMV تفاوت دارد (Jafari et al., 2016). در آلودگی مخلوط میانگین شاخص علایم TuMV در رقم ساری‌گل با میانگین ۶/۸۳ (جدول ۵) و در آلودگی ارقام کلزا به TuMV تکی رقم کلزا۲ با میانگین ۷/۶۶ بیش‌ترین میانگین را داشت در حالیکه در هر دو بررسی رقم کرج۳ کمترین شاخص علایم را به خود اختصاص داد. سایر ارقام در این دو آزمایش با ترتیب‌های متفاوت از یکدیگر گروه‌بندی شدند (جدول ۵، Jafari et al., 2016). به‌رغم اینکه در بررسی ارقام کلزا به TuMV رقم کرج۲ علایم کوتولگی و در نتیجه بیش‌ترین درجه میانگین را نشان داده است، در تحقیق حاضر علایم کوتولگی در یادداشت برداری‌ها برای این رقم ثبت نشد. می‌توان علت این موضوع را به شرایط گلخانه و به‌ویژه دما نسبت داد. دمای بهینه برای فعالیت TuMV حدود ۱۸ درجه سلسیوس می‌باشد، بررسی واکنش ارقام به TuMV در دمای بهینه ویروس انجام شده است در حالی‌که بررسی آلودگی مخلوط دو ویروس در دمای ۲۲ درجه سلسیوس انجام شد. برهمکنش میزان تجمع CaMV و TuMV و شدت بیماری‌زایی آنها در گیاه آرابیدوپسیس نشان داده است که هیچ گونه رابطه‌ی هم‌افزایی میان این دو ویروس وجود ندارد(Martín and Elena, 2009).

جدول ۵- میانگین شاخص شدت علایم در آلودگی مخلوط ویروس‌های موزاییک کلم‌گل (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) و موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus*, TuMV)

Table 5- Mean of symptoms severity index in mixed infection by *Cauliflower mosaic virus* and *Turnip mosaic virus.*

Cultivar	TuMV	CaMV
Hayola 401	5.17^{f}	3.20^{a}
Zafar	6.33^{bc}	2.12^{cde}
Sary gol	6.83^{a}	2.70^{ab}
Karaj1	5.83^{de}	2.77^{ab}
Karaj2	6.50^{ab}	2.15^{cde}
Karaj3	2.50^{g}	1.30^{f}
RGS003	6.00^{cd}	2.40^{bc}
Opera	6.00^{cd}	1.88^{def}
Talayeh	6.00^{cd}	1.90^{def}
Licord	5.83^{de}	2.00^{cde}
Okapi	5.50^{ef}	1.63^{ef}
SLM046	5.83^{de}	1.60^{ef}
Zarfam	5.67^{de}	2.20^{cd}

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نیستند.

Means values indicated by the same letters represent not significant differences at $P \leq 0.05$ calculated using the Duncan test.

نتایج تحقیق حاضر نیز که روی گیاه کلزا انجام گرفت نتایج مشابه روی گیاه آرابیدوپسیس را تایید می‌کند.

نتایج این پژوهش حاکی از حساسیت رقم‌های کلزای کشت‌شده در ایران نسبت به CaMV و آلودگی همزمان CaMV و TuMV می باشد و از طرفی در اغلب مناطق کشت کلزا در ایران، این گیاه به هردو ویروس آلوده می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که کشت رقم‌های جدیدی که از لحاظ خصوصیات زراعی مناسب و به ویروس‌ها نیز مقاومت نسبی دارند ترویج شود و یا با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک تراریخت‌سازی رقم‌های مناسب زراعی و سازگار با شرایط آب و هوایی ایران در برنامه قرارگیرد.

REFERENCES

Agama, K., Beach, S., Schoelz, J., and Leisner, S. M. 2002. The 5' third of *Cauliflower mosaic virus* Gene VI conditions resistance breakage in Arabidopsis ecotype Tsu-0. Phytopathology, 92(2): 190-196.

Anderson, E. J., Qiu, S. G., and Schoelz, J. E. 1991. Genetic analysis of determinants of disease severity and virus concentration in *Cauliflower mosaic virus*. Virology, 181(2): 647-655.

Anonymous. 2014. Agricultural statistics year book. Ministry of Jihad-e-Agriculture of Iran, Tehran, Iran.

Callaway, A., Liu, W., Andrianov, V., Stenzler, L., Zhao, J., Wettlaufer, S., and Howell, S. H. 1996. Characterization of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) resistance in virus-resistant ecotypes of Arabidopsis. Molecular Plant-Microbe Interactions, 9(9): 810-818.

Cecchini, E., Al-Kaff, N. S., Bannister, A., Giannakou, M. E., McCallum, D. G., Maule, A. J., and Covey, S. N. 1998. Pathogenic interactions between variants of *Cauliflower mosaic virus* and *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 49(321): 731-737.

Cooper, J. I., and Jones, A. T. 1983. Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. Phytopathology, 73(2): 127-128.

Coutts, B. A., and Jones, R. A. C. 2000. Viruses infecting canola (*Bassica napus*) in south-west Australia: incidence, distribution, spread, and infection reservoir in wild radish (*Raphanus raphinistrum*). Crop and Pasture Science, 51(7): 925-936.

Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1(4): 19-21.

Edwards, O. R., Franzmann, B., Thackray, D., and Micic, S. 2008. Insecticide resistance and implications for future aphid management in Australian grains and pastures: a review. Animal Production Science, 48(12): 1523-1530.

Farzadfar, S., and Pourrahim, R. 2014. A Distinct Subpopulation of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) in South Iran. Journal of Phytopathology, 162(11-12): 833-838.

Farzadfar, S., Pourrahim, R. and Ebrahimi, H. 2014. A phylogeographical study of the *Cauliflower mosaic virus* population in mid-Eurasia Iran using complete genome analysis. Archives of Virology, 159: 1329-1340.

Hapiak, M., Li, Y., Agama, K., Swade, S., Okenka, G., Falk, J., and Leisner, S. M. 2008. *Cauliflower mosaic virus* gene VI product N-terminus contains regions involved in resistance-breakage, self-association and interactions with movement protein. Virus Research, 138(1): 119-129.

Hull, R., and Shepherd, R. J. 1977. The structure of *Cauliflower mosaic virus* genome. Virology, 79(1): 216-230.

Jafari, M., Shams-bakhsh, M. and Moeini, A. 2016. Reaction of commercial canola varieties and lines against Turnip mosaic virus (TuMV) isolate. Iranian Journal of Plant Pathology, 52 (2): 147- 159.

Lebeurier, G., Hirth, L., Hohn, T., and Hohn, B. 1980. Infectivities of native and cloned DNA of *Cauliflower mosaic virus*. Gene, 12(1): 139-146.

Martín, S., and Elena, S. F. 2009. Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. Journal of General Virology, 90(11): 2815-2820.

Melcher, U. 1989. Symptoms of *Cauliflower mosaic virus* infection in *Arabidopsis thaliana* and turnip. Botanical Gazette, 150(2): 139-147.

Pink, D. A. C., and Walkey, D. G. A. (1988). The reaction of summer- and autumn-maturing cauliflowers to infection by Cauliflower mosaic and turnip mosaic viruses. Journal of Horticultural Science, 63(1), 95-102.

Pink, D. A. C., Sutherland, R. A. and Walkey, D. G. A. 1986. Genetic analysis of resistance in Brussels sprout to *Cauliflower mosaic* and *turnip mosaic viruses*. Annals of Applied Biology, 109: 199-208.

Provvidenti, R. 1980. Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to *Turnip mosaic virus* and *Cauliflower mosaic virus*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 105(4): 571-573.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, 2:14-9. New York: Cold spring harbor laboratory press.

Saunders, K., Lucy, A. P. and Covey, S. N. 1990. Susceptibility of Brassica species to *Cauliflower mosaic virus* infection is related to a specific stage in the virus multiplication cycle. Journal of General Virology, 71: 1641-1647.

Schoelz, J. E., and Shepherd, R. J. 1988. Host range control of *Cauliflower mosaic virus*. Virology, 162(1): 30-37.

Shahraeen, N. 2012. An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran. International Research Journal of Microbiology, 3: 024-028.

Shams-Bakhsh, M., Canto, T., and Palukaitis, P. 2007. Enhanced resistance and neutralization of defense responses by suppressors of RNA silencing. Virus Research, 130(1): 103-109.

Shepherd, R. J. 1981. Cauliflower mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses, No. 243. 6 pp.

Sohi, M. G., Shahraeen, N., and Rakhshandehroo, F. 2013. Biological and phylogenetic study of *Cauliflower mosaic virus* on canola in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 49(1): 29-30.

Sutic, D. D., Ford, R. E., and Tosic, M. T. 1999. Handbook of plant virus diseases. CRC Press.

Tabarestani, A. Z., 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(2): 251-259.

Tang, W. and Leisner, S. M. 1997. *Cauliflower mosaic virus* isolate NY8153 breaks resistance in Arabidopsis ecotype En-2. Phytopathology, 87: 792-798.

Walkey, D. G. A., and Neely, H. A. 1980. Resistance in white cabbage to necrosis caused by turnip and cauliflower mosaic viruses and pepper-spot. The Journal of Agricultural Science, 95(03): 703-713.

Walsh, J. A. 1989. Genetic control of immunity to *Turnip mosaic virus* in winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. oleifera) and the effect of foreign isolates of the virus. Annals of Applied Biology, 115: 89-99.

Walsh, J. A., and Tomlinson, J. A. 1985. Viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus ssp. oleifera*). Annals of Applied Biology, 107(3): 485-495.

Walsh, J. A., Perrin, R. M., Miller, A., and Laycock, D. S. 1989. Studies on *Beet western yellows virus* in winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) and the effect of insecticidal treatment on its spread. Crop Protection, 8(2): 137-143.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 39(3) Fall 2016

Reaction of canola cultivars to *Cauliflower mosaic virus* and co-infection of *Turnip mosaic virus* and *Cauliflower mosaic virus* under greenhouse condition

A. Ghasemzadeh[1] and M. Shams-bakhsh[2*]

1. Ph.D. Student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. [*]**Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (shamsbakhsh@modares.ac.ir)

Received: 17 April 2016 Accepted: 22 October 2016

Abstract

The expanding cultivation of canola (*Brassica napus* L.) in the world indicates the importance of this plant. Out of 12 reported viruses in canola, *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) and *Turnip mosaic virus* (TuMV) are of particular importance. Use of resistant cultivars would be the best approach to control losses caused by viral diseases. So far, the reaction of commercial canola cultivars in Iran to CaMV has not been assessed. In this study, 13 commercial varieties of canola were evaluated against a CaMV isolate under greenhouse conditions. Analysis of symptom severity index and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of inoculated plants showed that Karaj3 cultivar was tolerant to this virus. In addition, due to co-infection of canola fields with CaMV and TuMV, the reaction of commercial canola cultivars to mixed infections with both viruses was evaluated. The obtained results showed that commercial canola cultivars in Iran were susceptible to both CaMV and TuMV. However, Karaj3 cultivar was considered to be moderately susceptible to CaMV and TuMV co-infection compared to other tested cultivars.

Key words: Brassica napus, ELISA, Resistance