

آفات و بیماریهای گیاهی

جلد ۶۸، شماره ۱ و ۲، بهمن ۱۳۷۹

آسیب‌شناسی و بررسی تاثیر ویروس NbNPV روی سنین مختلف لاروی پروانه برگ‌خوار چغندر قند (کارادرینا) *Spodoptera exigua* Hb. (Lep., Noctuidae)

Histopathology and study of the MbNPV effect on different larval instars of Beet
armyworm, *Spodoptera exigua* Hb. (Lep., Noctuidae)

شهاب منظری، محمد حسن صفر علیزاده، عزیز خرازی پاکدل، علی‌اصغر پورمیرزا
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه،
دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

چکیده

ویروس MbNPV از قدرت بیماریزایی بالایی در لاروهای پروانه برگ‌خوار چغندر قند برخوردار است و می‌تواند عامل مهمی در کنترل آن به شمار آید. در آلودگی سطحی دسته‌های تخم این پروانه، تمام لاروهای به دست آمده از تفریح تخم‌ها در روز سوم از بین رفتند. میزان LC 50 برای لاروهای سن دوم تغذیه کرده از غذای مصنوعی آلوده به دزهای مختلف ویروس، ۱۲/۵۸ پلی‌هدر بر میلی‌متر مربع ماده غذایی و زمانی لازم برای ایجاد تلفات ۵۰٪ (LT 50) با دز ۶۳/۱۰ پلی‌هدر بر میلی‌متر مربع ماده غذایی برای همین سن لاروی، ۶/۱۲ روز محاسبه گردید. تلفات ایجاد شده با دز اخیر برای لاروهای سن اول تقریباً ده برابر لاروهای سن پنجم بود.

در برش‌های عرضی تهیه شده از بدن لاروهای سن چهارم به فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی، در مقایسه با شاهد تغییرات هستیوپاتولوژیک مشخص در میکروسکوپ نوری مشاهده نگردید. بزرگ شدن هسته سلول‌های اپیدرم و بافت چربی، همچنین ایجاد تغییرات محسوس در حالت ظاهری شبکه کروماتین (تشکیل استرومای و پروژنیک) عمدتاً از روز سوم پس از آلودگی قابل رؤیت بود. همزمان با پیشرفت بیماری، اشغال کامل هسته سلول‌ها با کریستالهای چند وجهی ویروس و به دنبال آن پارگی دیواره هسته و سلول اتفاق افتاد.

واژه‌های کلیدی: کارادرینا، ویروس NbNPV، آسیب‌شناسی

چغندر قند یکی از گیاهان مهم زراعی ایران می‌باشد به طوریکه سالیانه چندین هزار هکتار از اراضی کشور زیر کشت این گیاه قرار می‌گیرد. در فهرست آفات چغندر قند ایران بیش از ۱۶۹ گونه نام برده شده (Khayri, 1989) که پروانه برگ‌خوار چغندر قند، (*Spodoptera exigua* Hb. (Lep., Noctuidae) یکی از مهمترین و مضرترین آن‌هاست و از حدود سال ۱۳۱۰ که کشت این گیاه در کشور ما رواج یافته، بارها مورد هجوم و صدمات سنگین این آفت قرار گرفته است. این مطالعه در راستای اهمیت روز افزون کنترل ویروژنیک آفات نباتی به ویژه در پروانه‌های برگ‌خوار انجام گرفت. اشاره به مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف اهمیت چنین بررسی‌هایی را نشان می‌دهد.

مطالعات (David (1975)، Tinsley (1977,1979) و Maramorosch & Sherman (1985) آسیب‌شناسی بافت‌های مختلف لارو پروانه‌ها که آلوده به NPV (nuclear polyhedrosis virus) بوده‌اند نشان داده است که تأثیر بر سلول‌های روده لاروها در مقایسه با سایر بافت‌ها کمتر جلب توجه می‌کند به طوریکه با میکروسکپ نوری تغییرات بافتی مشخصی به چشم نمی‌خورد. ناحیه سلول‌های آلوده کاملاً محدود و متمرکز بوده و به این جهت به راحتی مشخص نمی‌شود. پس از ورود نوکلئوکسپیداها (nucleocapsid) به درون هسته سلول‌های استوانه‌ای روده میانی، تغییراتی در شیره هسته (nucleoplasm) ظاهر می‌گردد. ساختمانهای حفره مانند، اجسام کروی غیر قابل نفوذ به الکترون و شیره هسته دانه دانه شده به همراه نوکلئوکسپیدهای تازه تشکیل شده در هسته‌های آلوده دیده می‌شوند، اما شبکه توری مشخصی از ویروپلاسم (Viroplasm) وجود ندارد و در صورت حضور به روشنی ویروپلاسم بافت‌های هموسل (haemocoel) نیست. تفاوت مهم تکثیر ویروس در سلول‌های استوانه‌ای روده میانی و در سلول‌های سایر بافت‌های لاروی آن است که در سلول‌های استوانه‌ای روده میانی، پیکره‌های ویروسی (Virions) توسط پروتئین چندوجهی احاطه نمی‌شود. Volkman در سال ۱۹۸۶ اظهار داشته است که پیکره‌های ویروسی تازه تولید شده، از غشاء پایه به داخل هموسل نفوذ نموده و انتشار سیستمیک و آلودگی بافت‌های دیگر را میسر می‌سازند. Engelhard و همکاران در سال ۱۹۹۴ اظهار می‌دارند که عبور پیکره‌های ویروسی از basal lamina از طریق سیستم تراشه‌ای صورت می‌گیرد.

در بافت‌های هموسل، رشد غیر عادی هسته‌ها (nuclear hypertrophy) و تشکیل استرومای ویروژنیک (virogenic stroma)، دیده می‌شود و تجمع پیکره‌های ویروسی میله‌ای شکل از ماده

رشته‌های استرومائی قابل مشاهده است. به نظر می‌رسد که رشته‌های کروماتین تمامی اجزاء نوکلئوکسپید، از جمله DNA را تولید می‌کنند. ساخته شدن پروتئین کریستال چند وجهی (polyhedrin) در ریپوزومها اتفاق می‌افتد و با کاهش مونومرهای پروتئین محدود می‌گردد (Maramorsch & Sherman, 1985).

روش بررسی

لاروهای پروانه کارادرینا از مزارع چغندر قند اطراف شهرستان میاندوآب جمع‌آوری گردیده و در شرایط کنترل شده آزمایشگاه با دمای 1 ± 27 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 5 ± 60 درصد و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی روی محیط غذایی پیشنهادی توسط Shorey & Hale در سال ۱۹۶۵، پرورش داده شدند. در این فرمول غذایی فرمالدئید ۴۰٪ به دلیل اثر تخریبی روی ویروس چند وجهی هسته‌ای کنار گذاشته شد (Ignoffo & Garcia, 1968). تغذیه پروانه‌ها با محلول ۱۰٪ ساکارز در آب صورت گرفته و کاغذ واتمن شماره ۹۱ برای بستر تخم ریزی پروانه‌ها بکار رفت. برای تهیه سوسپانسیون مادر ویروس، روش Daoust & Roome (1974) مورد استفاده قرار گرفت. ویروس MbNPV (*Mamestra brassicae nuclear polyhedrosis virus*) با نام تجارتي Mamestrin، ماده اولیه آلوده سازی لاروها بود که ویروسهای حاصل از دومین گذر (passage) از بدن لاروها به عنوان سوسپانسیون مادر انتخاب و غلظت آن بوسیله لام گلبول شمار (haemocytometer)، $10^8 \times 2/16$ پلی هدر/سانتی متر مکعب، تعیین گردید. به منظور بررسی تأثیر دزهای مختلف ویروس بر روی لاروهای کارادرینا و محاسبه LC_{50} از لاروهای سن دوم این پروانه استفاده شد. برای اینکار تعداد نسبتاً زیادی قوطی‌های پلاستیکی شفاف فیلم عکاسی به ارتفاع ۴۶ میلی‌متر بکار رفت. سطح ماده غذایی موجود در داخل قوطی‌ها ۶۸۰ میلی‌متر مربع و ارتفاع آن ۸ میلی‌متر بود. تیمارها شامل ۶ دز لگاریتمی از ویروس به مقادیر ۱/۵۸، ۳/۹۸، ۱۰/۰۰، ۲۵/۱۲، ۶۳/۱۰، ۱۵۸/۴۹ پلی هدر/میلی متر مربع سطح ماده غذایی بود. غلظت‌های مختلف سوسپانسیون ویروسی طوری تهیه شدند که چنانچه ۰/۱ سانتی متر مکعب از آنها روی سطح ماده غذایی پخش شود، تعداد پلی هدر مورد نظر روی هر میلی‌متر مربع از آن قرار گیرد. این کار به کمک میکروپلیکاتور انجام شد و با یک پیپت پاستور که نوک آن به شکل دلخواه فرم داده شده بود، سوسپانسیون‌های ویروسی به طور یکنواخت و بدون ایجاد خراش و شکستگی بر روی سطوح ماده غذایی، پخش گردید. پس از خشک شدن سطوح ماده غذایی ویروس پاشی شده، یک لارو سن

دوم توسط قلم موی مرطوب داخل هر یک از قوطی‌ها منتقل شد. برای رعایت تجانس فیزیولوژیک، لاروها از دسته تخم‌هاییکه تعداد تخم زیادی داشته و تاریخ تفریح آنها همزمان بود انتخاب گردید. نمونه‌گیری از مرگ و میر لاروها هر ۲۴ ساعت انجام شد و برای اطمینان بیشتر، فروتی‌های تهیه و رنگ‌آمیزی شده با آبی متیلن از همولنف لاروهای مرده، مورد بررسی‌های میکروسکوپی قرار گرفت.

مطالعات آسیب‌شناسی بافت‌ها بر روی لاروهای سن چهارم انجام شد. این لاروها با غذای مصنوعی آلوده به دز ۱۰۰۰ پلی‌هدر/ میلی‌متر مربع سطح ماده غذایی، تغذیه شدند. در هر ۲۴ ساعت، ۲-۳ لارو جدا و بلافاصله در داخل محلول تثبیت‌کننده (fixative) بوئن آبی قرار گرفتند و پس از ده روز برشهای ۵، ۷، ۸ و ۱۰ میکرونی از آنها تهیه و با استفاده از روش Vago & Amargier (1963) رنگ‌آمیزی شدند.

نتیجه و بحث

الف - آسیب‌شناسی بافت‌ها:

در برشهای عرضی لاروهائیکه به فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی، با میکروسکپ نوری بررسی شدند، تغییرات مشخصی از نظر بافت‌شناسی مشاهده نگردید و اختلاف محسوسی بین اندازه هسته و حالت ظاهری شبکه کروماتین سلول‌های بافت چربی و سایر بافت‌های لاروهای آلوده و شاهد دیده نشد. رشد غیر عادی هسته سلول آلوده اولین علامت آلودگی است و با تغییراتی در شیره هسته سلول‌ها همراه است که در بررسی حاضر عمدتاً از سومین روز پس از آلودگی اتفاق افتاد. این تغییرات شامل انقباض شبکه کروماتین بود که به صورت لکه تیره رنگی در داخل هسته قرار داشت و به تدریج از اندازه آن کاسته شد تا اینکه کل هسته توسط کریستال‌های چند وجهی ویروس اشغال گردید. در این مرحله پلی‌هدرهای تازه تشکیل شده در اطراف این توده تیره رنگ دیده شد. مراحل تکامل ساختمانی کریستالهای چند وجهی ویروسی، علاوه بر تغییرات در اندازه‌ها، با درگرگونی‌هایی در رنگ‌پذیری نیز همراه بود، به طوریکه با روش رنگ‌آمیزی یاد شده، پلی‌هدرهای کوچک و تازه تشکیل شده، رنگ بنفش و پلی‌هدرهای بزرگ و متکامل رنگ قرمز به خود گرفتند. افزایش غیر عادی حجم هسته‌ها، در آلودگی شدید ویروسی به حدی بود که تقریباً کل حجم سلول را به خود اختصاص داد و در نهایت پارگی جدار هسته و سلول اتفاق افتاد. در روزهای چهارم و پنجم با پیشرفت بیماری، آلودگی در تمامی سلول‌های بافت چربی و اپیدرم مشاهده شد

(شکل های ۱ و ۲).

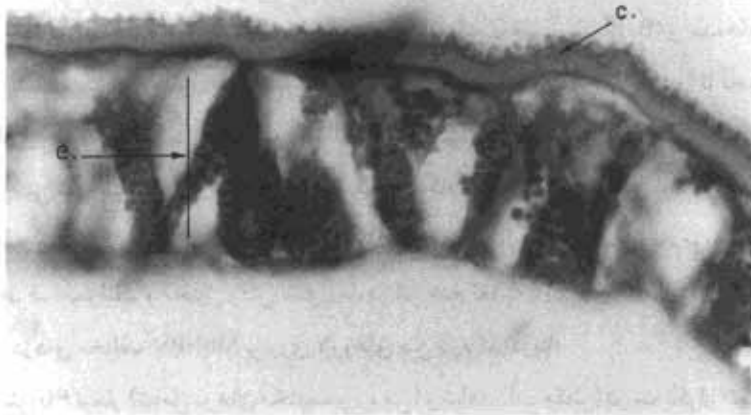
بافت های دیگری که علاوه بر بافت های فوق مورد حمله واقع شدند عبارت بودند از سلول های پوششی جدار تراشه (شکل ۳)، سلول های خونی، غلاف طناب عصبی (شکل ۴) و غده های تولید کننده ابریشم (شکل ۵). سلول های استوانه ای دستگاه گوارش، حالت عادی خود را تا لحظه های آخر بیماری حفظ کردند و داخل هسته آنها اثری از کریستالهای ویروسی دیده نشد (شکل ۶). در مقاطع عرضی تهیه شده از لاروهای در حال مرگ، دستگاه گوارش جمع شده و نسبت به لاروهای شاهد سطح کمتری از مقطع عرضی بدن را اشغال کرد که این حالت به احتمال زیاد مربوط به فشار وارده از طرف همولنف و تحلیل رفتن سلول ها، در اثر عدم تغذیه لاروهای بیمار بود.

ب- تاثیر دزهای مختلف MbNPV بر روی لاروهای سن دوم کارادرینا:

آزمایش با ۶ تیمار (شامل دزهای مختلف ویروس) و شاهد (آب مقطر) در سه تکرار انجام شد و هر تکرار شامل ۱۲ عدد لارو بود. آزمایش های مربوط به هر تکرار با فاصله زمانی یک ماه از هم انجام گردید. مرگ و میر ایجاد شده در لاروهای سن دوم در اثر تغذیه از غلظت های مختلف ویروس در جدول ۱ نشان داده شده است. اطلاعات حاصل از تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که مرگ و میر لاروها نسبت به غلظت های لگاریتمی سوسپانسیون های ویروس بکار گرفته شده، روند یکنواختی داشته است. براساس روش Finney و دستور پروبیت (Probit)، فرمول خط رگرسیون، $Y = 3/71679 + 1/16657 \times X$ و میزان LC_{50} ، $12/58$ پلی هدر / میلی متر مربع ماده غذایی، محاسبه گردید. در مورد دز $63/10$ پلی هدر / میلی متر مربع ماده غذایی، که منجر به مرگ و میر لاروهای سن دوم به میزان $76/46$ درصد گردید، مدت زمان لازم برای ایجاد 50 درصد تلفات (LT_{50}) به روش قبلی محاسبه شد. فرمول خط رگرسیون، $Y = -0/45103 + 6/92560 \times X$ و میزان LT_{50} ، $6/12$ روز بدست آمد. مقادیر تلفات روزانه با دز اخیر در جدول ۲ نشان داده شده است.

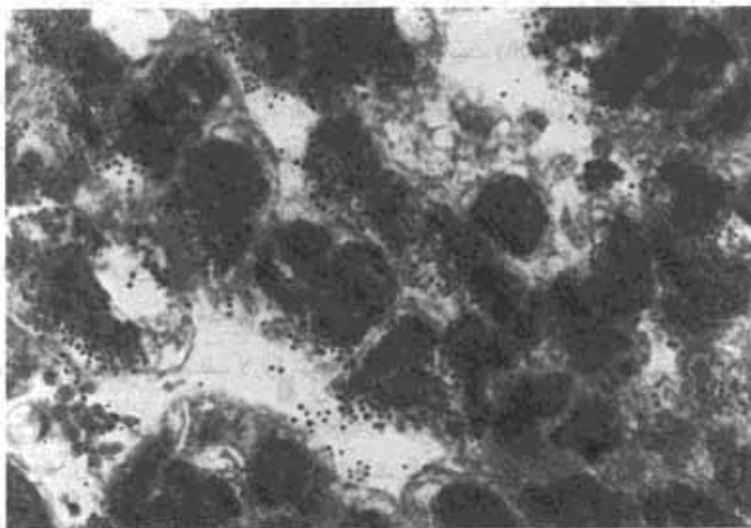
ج - تعیین حساسیت سنین مختلف لاروی میزبان نسبت به MbNPV:

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با تعداد نمونه های مساوی با ۳ تیمار (سنین لاروی ۱، ۳ و ۵) در ۶ تکرار و هر تکرار با ۶ لارو انجام شد. سطوح غذایی داخل قوطی ها با دز $63/10$ پلی هدر / میلی متر مربع ماده غذایی، آلوده گردید. جدول ۳ میزان مرگ و میر سنین مختلف لاروی را نشان می دهد. نتیجه حاصل از تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که در هر دو سطح آماری 5% و 1% بین میانگین تلفات سنین مختلف لاروی اختلاف معنی داری وجود دارد. مقایسه میانگین های تلفات با آزمون دانکن حاکی از آن بود که در سطح آماری 5% بین میانگین مرگ و میر هر سه سن



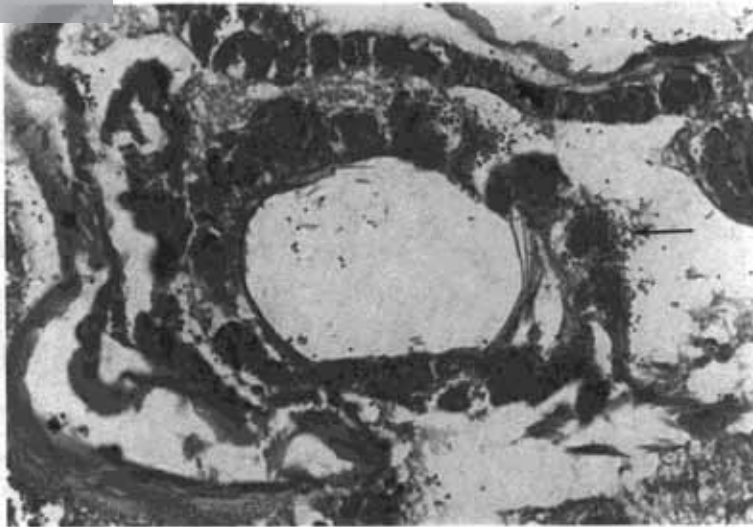
شکل ۱- اشغال کامل هسته سلول‌های اپیدرم لاروکارادرینا با ویروس MbNPV سه روز پس از آلودگی. درشت‌نمایی ۱۲۰۰ برابر.

Fig. 1. Complete nuclear occupation of epidermal cells of *Caradrina* larva by MbNPV, three days after infection. 1200x. "Original". c.= cuticle e.= epidermis



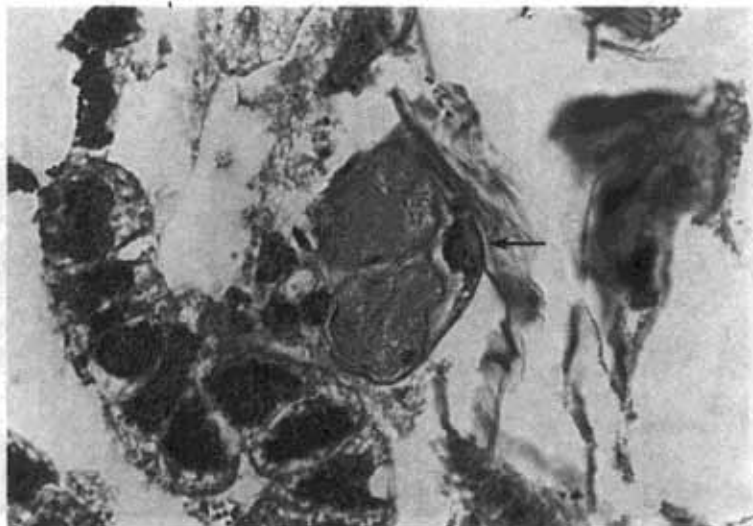
شکل ۲- ترکیبگی هسته و غشاء سلول‌های بافت چربی لاروکارادرینا، پنج روز پس از آلودگی با ویروس MbNPV و رها شدن پلی‌هدرها. درشت‌نمایی ۴۸۰ برابر

Fig. 2. Rupture of nucleus and cell membrane of adipose tissue and release of polyhedra, five days after infection by MbNPV. 480x. "Original".



شکل ۳- انهدام سلول‌های پوششی جدار تراشه لارو کارادرینا، پنج روز پس از آلودگی با ویروس MbNPV. درشت نمایی ۳۶۰ برابر.

Fig. 3. Destruction of tracheal epidermal cells five days after infection by MbNPV. 360x. "Original".



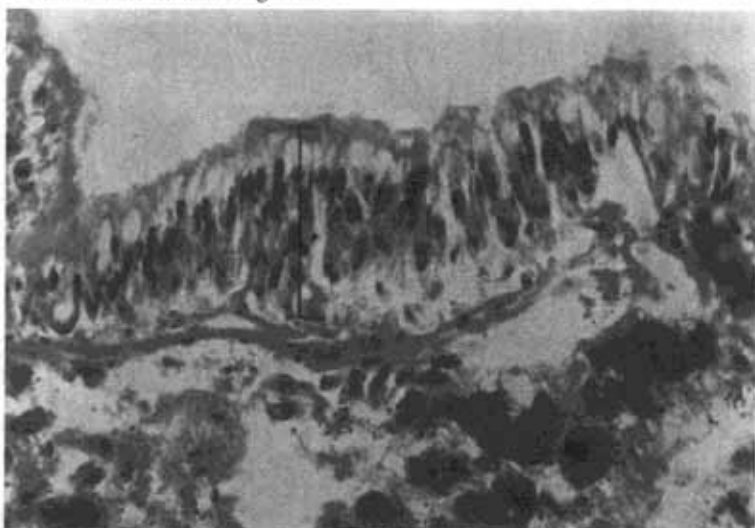
شکل ۴- آلودگی غلاف طناب عصبی لارو کارادرینا با ویروس MbNPV، در روز پنجم، درشت نمایی ۲۴۰ برابر.

Fig. 4. Infection of nerve sheath of Caradrina larva by MbNPV, five days post inoculation 240x. "Original".



شکل ۵- آلودگی غده تولیدکننده ابریشم لارو کارادرینا با ویروس MbNPV، در روز سوم. درشت نمایی ۴۸۰ برابر.

Fig. 5. Infection of silk gland of Caradrina larva by MbNPV, three days post inoculation 480x. "Original".



شکل ۶- سلول‌های استوانه‌ای دستگاه گوارش لارو کارادرینا، پنج روز پس از آلودگی با ویروس MbNPV درشت نمایی ۳۶۰ برابر.

Fig. 6. Columnar cells of alimentary canal of Caradrina larva, five days after infection by MbNPV. 360x. "Original".

جدول ۱- مرگ و میر لاروهای سن دوم تغذیه کرده از غلظت‌های مختلف MbNPV

Table 1. Mortality of the second instar larvae fed on different doses of MbNPV

شماره Control	دوز (پی/متر مربع) Dose (PIB/mm ²)	تکرار Replication	تعداد لارو No. of larvae			کل Total	میزان مرگ و میر Mortality	درصد مرگ و میر Mortality (%)	اصلاح شده Corrected Mortality (%)
			تکرار Replication	تکرار Replication	تکرار Replication				
0	0	12	0	1	1	36	2	5.55	0
1.58	1.58	12	2	3	2	36	17	19.44	14.71
3.98	3.98	12	6	3	4	36	13	36.11	32.36
10.00	10.00	12	6	4	7	36	17	47.22	44.12
25.12	25.12	12	7	9	6	36	22	61.11	58.82
63.10	63.10	12	8	11	9	36	28	77.77	76.46
158.49	158.49	12	11	12	11	36	34	94.44	94.11

لاروی مذکور اختلاف معنی داری وجود دارد و هر کدام از آنها در کلاس جداگانه‌ای فرار گرفت. در سطح آماری ۱٪، بین میانگین‌های مرگ و میر سنین لاروی ۱ و ۳ اختلاف معنی داری دیده نشد، میانگین تلفات هر یک از آنها با میانگین تلفات لارو سن ۵ دارای اختلاف معنی داری بود. شفیره‌های بدست آمده از این آزمایش از نظر جنسیت تفکیک و پس اندازه‌گیری وزن با شفیره‌های شاهد مقایسه شدند. بین میانگین‌های وزن شفیره‌های نر و ماده آلوده و شفیره‌های نر و ماده شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (شکل ۷).

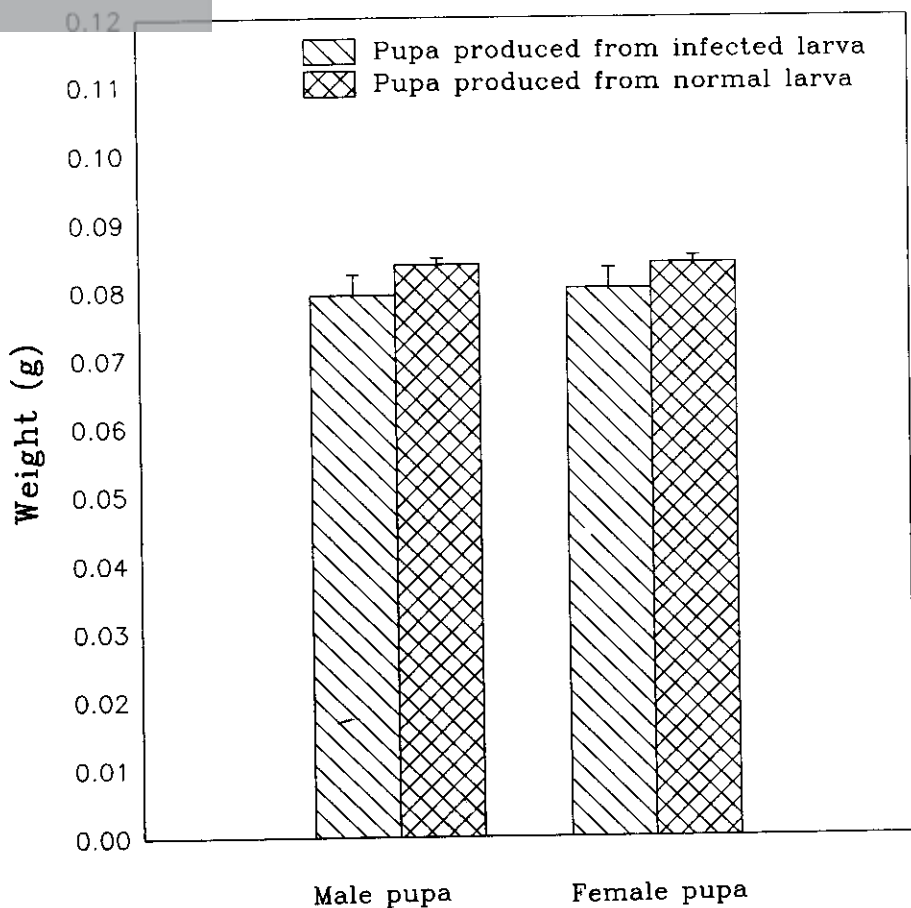
جدول ۳- مرگ و میر لاروهای سنین مختلف تغذیه کرده از MbNPV با دز ۶۳/۱۰ پلی هدر / میلی متر مربع سطح ماده غذایی

Table 3. Mortality of different instar larvae fed on 63.10 PIB/mm²

سن لاروی Instar	تعداد لارو		میزان مرگ و میر						میانگین درصد مرگ و میر (اشتباه معیار ± میانگین) mean of mortality (%) (Mean ± SE)	
	No. of larvae		Mortality							
	تکرار Replication	کل Total	تکرار Replication					کل Total		
				1	2	3	4			5
1	6	36	6	6	6	6	6	6	36	100±0.00
3	6	36	4	5	5	3	5	3	25	69.44±6.69
5	6	36	2	1	0	0	1	0	4	11.11±5.56

د- اثر آلودگی سطحی دسته‌های تخم روی لاروها:

۱۴ دسته تخم که هر یک محتوی ۱۵ عدد تخم بودند انتخاب و به دو گروه ۷ تائی تقسیم شدند. در مورد گروه اول که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، ۱/۵ سی سی آب مقطر و برای گروه دوم، ۱/۵ سی سی سوسپانسیون ویروسی به غلظت ۱۰^۵ × پلی هدر / سانتی متر مکعب، روی هر یک از دسته‌های تخم پاشیده شد. موارد عدم تفریخ تخم‌ها و تلفات روزانه پس از تفریخ هر دو گروه یادداشت گردید. بین میانگین‌های درصد تخم‌های تفریخ نشده و همچنین میانگین‌های مربوط به درصد‌های تلفات یک و دو روز پس از تفریخ گروه‌های تیمار و شاهد، اختلاف معنی داری مشاهده نشد، در صورتیکه در مورد میانگین‌های درصد تلفات سومین روز پس از تفریخ، اختلاف معنی دار

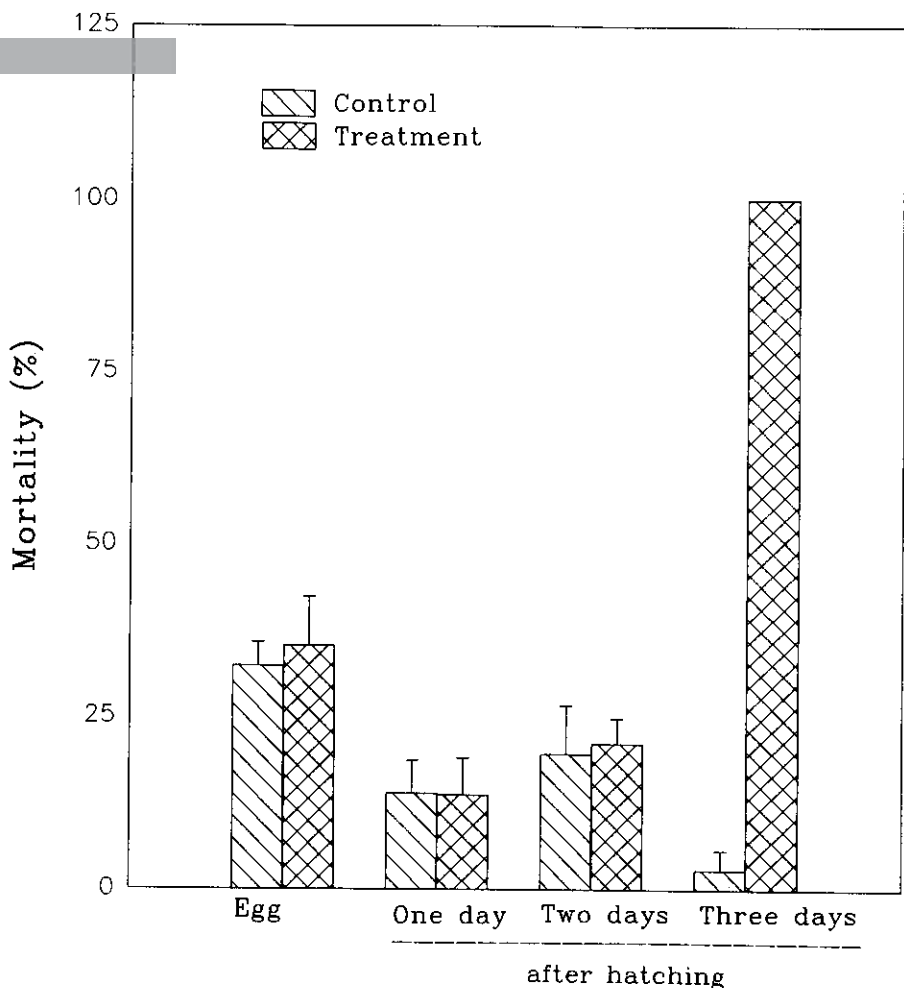


شکل ۷- میانگین وزن شفیره حاصل از لارو آلوده به ویروس MbNPV و لارو طبیعی.

Fig. 7. Mean weight of pupae issued from larvae infected by MbNPV and normal ones.

بود و کلیه لاروهای گروه تیمار تلف شدند (شکل ۸).

نتایج بدست آمده حاکی از بالا بودن قدرت بیماری‌زایی ویروس MbNPV در لاروهای کارادرینا است. اطلاعات حاصل از آلودگی سطحی دسته‌های تخم و آزمایش‌های مربوط به سنین مختلف لاروی، بیانگر کاهش حساسیت با بالا رفتن سن لاروی است، بطوریکه میانگین درصد تلفات لارو سن اول حدود ۱۰ برابر لارو سن پنجم بود.



شکل ۸- میانگین درصد تلفات تخم‌های آلوده (تیمار) با ویروس MbNPV و غیر آلوده (شاهد و لاروهای حاصل از آنها).

Fig. 8. Mean mortality percent of infected and non-infected (control) eggs and larvae issued from them.

نشانی نگارندگان: مهندس شهاب منظری، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، بخش تحقیقات رده بندی حشرات، صندوق پستی ۱۴۵۴ تهران ۱۹۳۹۵. دکتر محمد حسن صفر علیزاده، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی. دکتر خرازی پاکدل، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، کرج. دکتر علی اصغر پور میرزا، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی.