

کارآیی انتقال ویروس برگ قاشقی سیبزمینی (PLRV) در تعدادی از ژنوتیپ های مهم اسکاتلندي (*Myzus persicae*) شته سبز هلو

جعفر نیکان^{۱*}، برايان فینتون^۲ و هیو بارکر^۳

چکیده

ظهور شته های مقاوم به حشره کش ها خطری بالقوه در گسترش ویروس هائی است که توسط آن ها منتقل می-گردد. در این پژوهش کارایی انتقال PLRV در پنج ژنوتیپ اسکاتلندي *Myzus persicae* که برخی از آن ها مقاومت بالائی در برابر حشره کش ها دارند، ارزیابی گردید. آزمایش های انتقال ویروس با استفاده از برگ های برشده گیاه آلووده به PLRV و گیاهچه های *Physalis floridana* آلووده با ترتیب برای کسب و تلقیح ویروس انجام شد. دوره های کسب و تلقیح هر یک سه روز و در شرایط نوری ۱۶ ساعت و دمای ۱۸ °C انجام شد. هر گیاهچه با یک شته حامل ویروس و ۲۴ گیاهچه توسط هر ژنوتیپ تلقیح گردید. سه هفته بعد تعداد گیاهان آلووده به PLRV در گیاهچه های تلقیح شده بر مبنای علایم یا نتایج آزمون الیزا مشخص گردید. این آزمایش ها پنج بار تکرار شد. علت اختلاف در انتقال PLRV توسط ژنوتیپ های مختلف نیز با مقایسه کارایی انتقال PLRV با ویروس نزدیک به آن BMYV توسط ژنوتیپ های A و J بررسی گردید. بین ژنوتیپ ها از نظر کارایی انتقال PLRV اختلاف معنی دار مشاهده گردید. ژنوتیپ های A، B و C دارای بیشترین کارایی انتقال بودند. دو ژنوتیپ A و B که از مقاوم ترین ژنوتیپ ها به حشره کش ها نیز هستند به عنوان خطری بالقوه در گسترش PLRV معرفی می شوند. همچنین ژنوتیپ های A و J ویروس BMYV را با کارایی یکسان منتقل کردند. در صورتی که ژنوتیپ A ویروس PLRV را با کارایی بالاتری انتقال داد.

واژه های کلیدی: برگ قاشقی، سیبزمینی، کارایی انتقال، ژنوتیپ، PLRV

۱. بخش تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان

۲ و ۳. به ترتیب دانشیار و استاد موسسه تحقیقات محصولات کشاورزی اسکاتلندي، اینور گوری، داندی، اسکاتلندي، بریتانيا

*: نویسنده مسؤول

مقدمه

نگاری جداکننده های بین ژنی دی ان ای (ribosomal DNA intergenic spacer, rDNA IGS fingerprinting) هلو را در اسکالتند مطالعه کرده و ۸۰ ژنوتیپ متفاوت در بین آن ها پیدا کردند. نامبردگان گزارش نمودند که٪۳۰ نمونه ها از یک ژنوتیپ بودند (ژنوتیپ J)، ۲۹ ژنوتیپ بیش از یکبار ولی ۴۹ ژنوتیپ تنها یکبار یافت شدند. تفاوت در کارایی انتقال ویروس در کلون های شته ها توسط جرک و همکاران (۱۹۸۰) مطالعه شده است. نامبردگان گزارش کردند که ۳۶ کلون شته نخود فرنگی (Acyrthosiphon pisum) ویروس موزاییک زرد (Bean yellow mosaic virus, BYMV) را با کارایی های متفاوتی انتقال دادند. انتقال های موفق از٪۳ تا٪۳۷ در بین کلون ها متفاوت بود. همچنین مشخص گردید که کارایی انتقال PLRV به وسیله شته های ناقل نه تنها به گونه شته بلکه به کلون های مختلف و سن آن ها بستگی دارد (رابرت و ماری، ۱۹۷۰؛ رابت، ۱۹۷۱؛ آپرتی و ناگائیچ، ۱۹۷۱؛ وودفورد و همکاران، ۲۰۰۲). سینگ و همکاران (۱۹۸۲) نشان دادند که کارایی انتقال نژادهای مختلف PLRV به وسیله کلون های مختلف شته پنبه (Aphis gossypii) و شته سبز هلو از یک گیاه سیبزمینی به گیاه دیگر بین٪۵ تا٪۸۵ نوسان دارد. بوردین و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از ۱۵ کلون (Mp. persicae) و دو کلون Myzus nicotianae (Mn) انتقال PLRV را که تحت عنوان Highly aphid transmissible (HAT) و Poorly aphid transmissible (PAT) نامیده می شدند را مورد ارزیابی قرار دادند. آن ها برای انتقال از بوته های آلووه به PLRV و عاری از ویروس گیاه عروشك پشت پرده (Physalis floridana) به ترتیب به عنوان منبع کسب و تلقیح ویروس استفاده کردند. به منظور تلقیح روی هر گیاهچه (یک برگی) سه شته حامل ویروس قرار داده شد. همچنین نامبردگان دریافتند که از نظر انتقال جدایه HAT ویروس، تفاوتی بین کلون های مختلف شته وجود ندارد. در حالی که میزان انتقال جدایه PAT ویروس به وسیله کلون های

ویروس برگ قاشقی سیب زمینی (Potato leafroll virus, PLRV) یکی از مهم ترین بیمارگرهای ویروسی سیبزمینی در دنیاست (بارکر، ۲۰۰۱). این ویروس در طبیعت توسط پیوند، اندام های رویشی تکثیری مانند غده های سیبزمینی و شته ها منتقل می گردد (هریسون، ۱۹۸۴). از ۱۲ گونه شته که به عنوان ناقل PLRV گزارش شده اند (کندی و همکاران، ۱۹۶۲). شته سبز هلو (Myzus persicae Sulzer) کارایی بیشتری از دیگر گونه ها در انتقال PLRV در آزمایشگاه دارد (رابرت و ماری، ۱۹۷۰؛ رابت، ۱۹۷۱؛ رابت و لامیر، ۱۹۹۹؛ وودفورد و همکاران، ۲۰۰۲). توسط M. persicae به روش گردشی غیر تکثیری انتقال می یابد (اسکندری و همکاران، ۱۹۷۹). برای انتقال ویروس توسط ناقل، ذرات PLRV به هنگام تغذیه شته از بافت های آبکش به همراه شیره گیاهی به درون دستگاه گوارشی ناقل مکیده می شوند. ذرات ویروس از موانعی که در مسیر دستگاه گوارشی ناقل قرار دارند عبور کرده وارد حفره عمومی بدن می شوند. ذرات سپس به همراه همولنف در داخل بدن ناقل گردش نموده پس از عبور از غده فرعی بزاویه وارد کanal بزاویه می شوند و نهایتاً توسط بزاویه میزبان جدید منتقل می گردند (گیلدو، ۱۹۹۹). ریزترزیق (Microinjection) ذرات خالص (Microinjection) به داخل همولنف شته ناقل ثابت نموده است که غشا روده مانع بوده که عبور ذرات ویروس را از روده به داخل حفره عمومی شته سبز هلو تنظیم می کند (روزه-جووان و همکاران، ۲۰۰۱). مانع اصلی تنظیم کننده انتقال ویروس های که به طریقه پایا منتقل می شوند غده فرعی بزاویه شته ناقل می باشد (گیلدو و روشو، ۱۹۸۰؛ گیلدو، ۱۹۸۲؛ گیلدو و گری، ۱۹۹۳؛ پیفر و همکاران، ۱۹۹۷). ژنوتیپ های M. persicae در توانائی سازش بر روی میزبان (ون امدن و همکاران، ۱۹۶۹؛ وبر، ۱۹۸۶)، مقاومت در برابر حشره کش ها (دوونشاير و همکاران، ۱۹۸۶)، قابلیت انتقال ویروس ها (رابرت، ۱۹۷۱؛ بوردین و همکاران، ۱۹۹۸؛ وودفورد و همکاران، ۱۹۹۹) متفاوت اند. فینتون و همکاران (۱۹۹۸) با روش انگشت

ناشی از غلظت ویروس در داخل برگ‌هایی که به عنوان منبع کسب ویروس مورد استفاده قرار گرفته بودند، وودفورد و همکاران (۱۹۹۹) اجازه دادند که کلون‌های LCSA و Mp1S به مدت ۲۴ ساعت از محلول سوکروز حاوی $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ یا $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ از جدایه‌های PLRV-V یا PLRV-C تغذیه نمایند. تمایز بین جدایه‌های HAT و PAT تنها زمانی بروز کرد که ویروس در غلظت $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ مورد استفاده قرار گرفت. در این غلظت کلون S Mp1S جدایه PLRV-C را انتقال داد ولی جدایه V PLRV-V را منتقل ننمود در حالی که کلون LCSA هر دو جدایه را با کارائی مساوی منتقل ننمود. نامبرگان در تأیید نتایج بوردین و همکاران (۱۹۹۸) بیان نمودند که توانایی انتقال PLRV به وسیله شته‌های ناقل نه تنها به ساختار پوشش پروتئینی ویروس بلکه به عوامل بیولوژیکی که توسط شته ناقل در جریان انتقال دخالت داده می‌شود نیز بستگی دارد. در بین عوامل بیولوژیکی شرکت کننده در جریان انتقال، رفتارهای تغذیه‌ای به عنوان عاملی مهم در میزان انتقال PLRV توسط کلون‌های مختلف شته پیشنهاد شده است (وودفورد و همکاران، ۱۹۹۹).

در این مقاله نتایج مطالعات انجام شده بر روی کارایی انتقال PLRV در پنج ژنوتیپ مهم اسکاتلندي M. persicae گزارش می‌شود. هدف از این مطالعه آن بود که مشخص شود ظهور ژنوتیپ‌های مقاوم به حشره-کش‌ها در بین جمعیت‌های M. persicae M. persicae تا چه حد خطر گسترش PLRV را افزایش می‌دهند.

مواد و روش‌ها

شته‌ها و جدایه‌های ویروس

ژنوتیپ‌های شته مورد بررسی عبارت بودند از ژنوتیپ‌های اسکاتلندي A, B, C, I, J و Sbz هلو (M. persicae) (برایان فینتون، نتایج چاپ نشده) و ژنوتیپ ۱۰ از گونه M. antirrhinii (وودفورد و همکاران، ۱۹۹۹). برای این بررسی‌ها ژنوتیپ‌های C, J و I به دلیل آن که به ترتیب ۲۲٪، ۲۰٪ و ۲٪ از جمعیت M. persicae را در اسکاتلندي تشکیل می‌دادند انتخاب شدند و ژنوتیپ‌های A و B به این دلیل مورد بررسی

مختلف بین ۷۰٪ تا ۷۰٪ متغیر بود. میزان پائین انتقال جدایه PAT توسط برخی کلون‌های شته مورد بررسی نتیجه ظرفیت ذاتی پائین کلون‌ها در انتقال ویروس نیست بلکه احتمالاً مربوط به خصوصیات ساختمانی ذرات ویروس بوده است زیرا همه کلون‌ها جدایه HAT ویروس را با کارایی تقریباً یکسان انتقال دادند. دامنه تغییرات انتقال جدایه PAT (صفر درصد تا ۷۰٪) توسط کلون‌های مختلف نشان دهنده آن است که خصوصیات ساختمانی ذرات ویروس تنها عاملی نیست که در کارایی انتقال جدایه‌های ویروس توسط شته ناقل تعیین کننده می‌باشد. نتایج به دست آمده پیشنهاد کننده فرضیه‌ای است که جریان انتقال ویروس و اختصاصی بودن آن به رابطه نزدیک بین کلون شته و جدایه ویروس بستگی دارد. وودفورد و همکاران (۱۹۹۹) با استفاده از یک جدایه HAT ویروس برگ قالشقی سیب‌زمینی (PLRV-C) و یک جدایه PAT این ویروس (PLRV-V) و کلون‌های متفاوت شته‌های M. nicotianae M. persicae و M. persicae Myzus antirrhinii توانستند اختلاف در توانایی انتقال ویروس را در بین گونه‌ها و کلون‌های مختلف شته‌های مورد آزمایش نشان دهنند. این پژوهش گران از برگ‌های بریده آلوده به PLRV و گیاهچه‌های عاری از ویروس عروسک پشت پرده به ترتیب به عنوان منبع کسب و تلقیح ویروس استفاده کردند. دوره‌های کسب و تلقیح ویروس نیز به ترتیب یک و سه تا پنج روز بود. در این بررسی هر گیاهچه (دو تا سه برگی) توسط شهه حامل ویروس تلقیح شد و از نظر انتقال ویروس بین کلون‌های مورد بررسی در تکرارهای مشاهده گردید. یک کلون قرمز تفاوت‌های ثابتی مشاهده گردید. یک کلون قرمز نگاری دی‌ان‌ای از M. persicae قبل تمایز نبود) و همه کلون‌های M. antirrhinii M. antirrhinii جدایه PLRV-C را به میزان ۴۰٪ یا بیشتر منتقل کردند، در حالی که فقط یکی از کلون‌های M. persicae به نام Mp4 قادر انتقال ویروس در این سطح را داشت و Mp1S (یکی دیگر از کلون‌های این گونه) به طور شگفت انگیزی ناقل بسیار ضعیفی بود. به منظور حذف منابع احتمالی تغییرات

سالم توسط هر ژنوتیپ شته تلچیح گردید و پس از اتمام دوره تلچیح شته‌ها بهوسیله تدخین نیکوتین کشته شدند. سه هفته بعد از آزمایش تعداد گیاهان آلوده در گیاهچه‌های تلچیح شده بر مبنای عالیم (شکل ۱) یا نتایج آزمون الایزا تعیین گردید. ارزیابی آماری داده‌های مربوط به آزمایش‌های انتقال PLRV (درصد انتقال) با استفاده از مدل خطی عمومی توزیع دو جمله‌ای و رابطه لگاریتمی (logit link function) (مک کولاگ و نلدر، ۱۹۸۹) انجام شد.



شکل ۱. علائم آلودگی در گیاه عروسک پشت پرده آلوده به PLRV شامل کوتولگی شدید و کلروز بین رگ‌رگی می‌باشد. گیاه آلوده (تصویر سمت راست) در مقایسه با گیاه سالم (سمت چپ)

مقایسه کارایی انتقال PLRV و BMYV توسط ژنوتیپ‌های A و J

هدف از انجام این آزمایش آن بود که مشخص شود آیا صرفاً تفاوت در رفتارهای تغذیه‌ای ژنوتیپ‌های PLRV موردن بررسی باعث اختلاف در کارایی انتقال PLRV توسط این ژنوتیپ‌ها است (عاملی که وودفورد و همکاران، ۱۹۹۹ پیشنهاد کردند) یا عوامل دیگری در این خصوص دخالت دارند. برای این منظور نزدیک به PLRV است انتخاب و آزمایش‌های طراحی شد تا مشخص شود که آیا ژنوتیپ‌های A و J با همان کارایی که PLRV را انتقال می‌دهند BMYV را نیز منتقل می‌کنند؟ دلیل انتخاب ژنوتیپ‌های A و J در این آزمایش‌ها آن بود که این دو ژنوتیپ به ترتیب کارآمدترین وضعیف‌ترین ناقلین PLRV در آزمایش‌های قبلی

قرار گرفتند که مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌های *M. persicae* در برابر حشره کش‌ها در اسکاتلندر می‌باشند (برايان فینتون، نتایج چاپ نشده). به علاوه آن که در یک آزمایش زیست سنجی ژنوتیپ A در مقابل حشره کش لامبدا سیه‌هالوترين (Lambda-cyhalothrin) بسیار مقاوم بود و پس از آن ژنوتیپ B نیز مقاومت بالائی داشت (بلنداندام و همکاران، ۲۰۰۴). در طول انجام آزمایش‌ها کش‌های شته‌ها بر روی برگ‌های بریده کلزا (*Brassica napus*) در داخل قفس‌های بسته مجرزا نگهداری شدند. برای این کار و به منظور به دست آوردن یک کشت یکنواخت و همسن، تعدادی شته بالغ بی‌بال از هر ژنوتیپ به روی برگ‌های کلزا منتقل شده و پس از ۲۴ ساعت وقتی که تعدادی پوره به وجود آمد شته‌های مادر را حذف کرده و به پوره‌ها اجازه داده شد رشد کنند.

ویروس برگ قاشقی سیبزمنی مورد استفاده در آزمایش‌های انتقال ویروس جدایه PLRV-C (وود فورد و همکاران، ۱۹۹۹) و جدایه BMYV و آنتی‌بادی‌های تک سانه‌ای و چند سانه‌ای موردن استفاده علیه ویروس مذکور اهدایی دکتر مارک استیونس از ایستگاه تحقیقاتی برومز برن Station, Higham, Bury St. Edmunds, Suffolk, UK بودند.

مطالعه کارایی انتقال PLRV توسط ژنوتیپ‌های مورد بررسی

آزمایش‌های انتقال ویروس با قراردادن شته‌های تغذیه شده با گیاهان آلوده به PLRV، بر روی گیاهان سالم انجام شد. در این آزمایش‌ها از برگ‌های بریده گیاه عروسک پشت پرده (*Physalis floridana*) آلوده به PLRV و گیاهچه‌های ۳-۲ برگی عاری از ویروس همین گیاه به ترتیب به عنوان منبع کسب ویروس و تلچیح آن استفاده شد. زمان‌های کسب (Acquisition access period, AAP) و تلچیح (Inoculation access period, IAP) هر یک ۱۸°C سه روز بود که در شرایط نوری ۱۶ ساعت و دمای انجام گردید. عمل تلچیح با تلچیح با روشی که شته حامل ویروس در روی هر گیاهچه سالم انجام شد. ۲۴ گیاهچه

SCR3 (ماسالسکی و هریسون، ۱۹۸۷) بود که به نسبت یک میکروگرم در میلی لیتر بافر نمکی فسفات (PBS) ۰.۲٪ شیر بی چربی و ۰.۲٪ تؤین به کار رفت. آنتی-بادی کونجوگیت شده، آنتی-بادی ضد موش از شرکت سیگما (Sigma) بود که به نسبت یک به ۲۰۰۰ در بافر نمکی فسفات (PBS) حاوی ۰.۲٪ شیر بی چربی و ۰.۲٪ تؤین مورد استفاده واقع گردید. سوبسترای مورد استفاده نیز ۴-نیترو فنیل فسفات از شرکت روچ (Roche) بود که به نسبت یک میلی گرم در میلی-لیتر بافر سوبسترا استفاده شد. عصاره نیز به نسبت یک گرم بافت برگی در ۱۰ میلی لیتر بافر عصاره گیری تهیه شد. قرائت نهائی پلیت‌ها نیز در طول موج ۴۰۵ نانومتر (A₄₀₅) صورت گرفت. چاهک‌هایی که میزان جذب نوری بیشتر از دو برابر چاهک شاهد سالم داشتند به عنوان آلوده در نظر گرفته شدند.

نتایج

نتایج آزمایش‌های انتقال PLRV توسط ژنوتیپ‌های مختلف شته‌های مورد بررسی
تجزیه آماری میزان (درصد) انتقال PLRV توسط ژنوتیپ‌ها در آزمایش‌های مختلف نشان داد که از این نظر بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۱).

در بین ژنوتیپ‌های مختلف شته‌های مورد بررسی ۴۰۱۰ از گونه *M. antirrhinii* از نظر آماری میزان انتقال بالاتری از ژنوتیپ‌های C، I و J از گونه *M. persicae* داشت. میزان انتقال توسط ژنوتیپ‌های A یا B گونه *M. persicae* به طور معنی‌داری بیش از میزان انتقال توسط ژنوتیپ‌های I و J بود. هم‌چنین ژنوتیپ C ویروس را به طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ J منتقل نمود (جدول ۲).

جدول ۱: تجزیه آماری انتقال PLRV توسط ژنوتیپ‌های شته مورد بررسی

درجه آزادی	f	p < .001: اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. ns: اختلاف معنی‌دار وجود ندارد.
۴	۱/۳۲ ns	
۵	۶/۱۴*	

انتقال ویروس بودند. دو سری آزمایش مجزا با استفاده از میزبان‌های گیاهی مختلف ترتیب داده شد. در آزمایش‌های سری اول هر یک از دو ویروس از میزبان‌های مرجح خود کسب و به گیاهچه‌های عاری از ویروس همان میزبان‌ها تلقیح شدند. ویروس برگ قاشقی سیب-زمینی از گیاهان آلوده عروسک پشت پرده کسب و به گیاهچه‌های عاری از ویروس این گیاه منتقل شد. برای BMYV گیاهان آلوده کیسه کشیس (*Capsella bursa-pastoris*) ویروس و گیاهچه‌های عاری از ویروس این گیاه برای تلقیح ویروس انتخاب شدند. در آزمایش‌های سری دوم PLRV از گیاه آلوده عروسک پشت پرده و BMYV از گیاه آلوده کیسه کشیس کسب شد ولی هر دو ویروس به گیاهچه‌های عاری از ویروس توتون (Nicotiana benthamiana) مایه زنی شدند. در هر دو سری آزمایش زمان‌های کسب و تلقیح ویروس هر یک به مدت سه روز در شرایط نوری ۱۶ ساعت و دمای ۱۸ °C انجام شد. در این آزمایش‌ها با قرار دادن یک شته حامل ویروس در روی هر گیاهچه عمل تلقیح ویروس انجام شد و ۲۴ گیاهچه توسط هر ژنوتیپ تلقیح گردید. پس از اتمام دوره تلقیح شته‌ها به وسیله تدخین نیکوتین کشته شدند. سه هفته بعد تعداد گیاهان آلوده در گیاهچه‌های تلقیح شده بر مبنای نتایج آزمون الایزا تعیین گردید.

آزمون الایزا

(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) برای آزمون الایزا از روش ساندویچ سه طرفه الایزا (Triple antibody sandwich- ELISA, TAS-ELISA) (تورانس، ۱۹۹۲) استفاده شد. آنتی ویروس چند سانه‌ای مورد استفاده PLRV-G (تاما و هریسون، ۱۹۸۰) بود که به نسبت یک میکروگرم در میلی لیتر بافر پوششی مصرف شد. آنتی ویروس تک سانه‌ای مورد استفاده

کارآیی انتقال ویروس برگ قاشقی سیبزمنی (PLRV) در تعدادی از ژنوتیپ های...

جدول ۲: میزان انتقال PLRV توسط ژنوتیپ های مهم اسکاتلندي *M. persicae* در آزمایش های

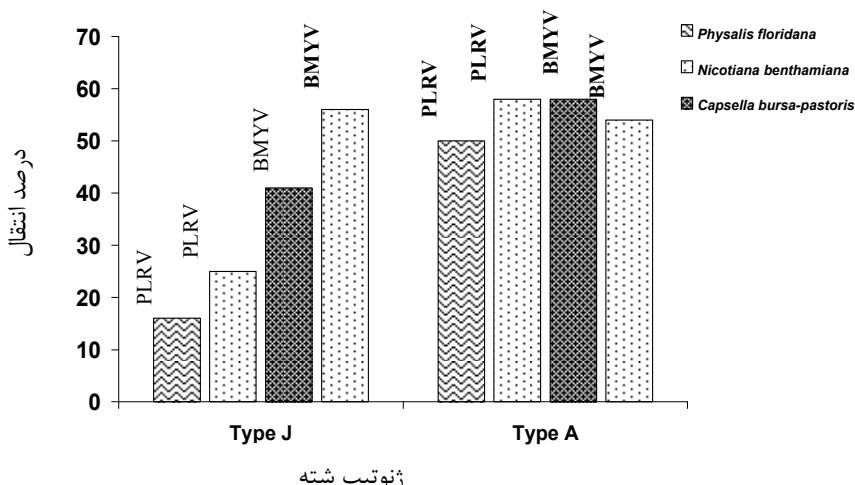
ژنوتیپ شته	انتقال ویروس					میانگین درصد انتقال	
	درصد انتقال در هر آزمایش*						
	۱	۲	۳	۴	۵		
Ma4010	NT [†]	NT	۸۷/۵	۶۶/۶	NT	۷۷ a	
A	۷۹/۱	۸۳/۳	۵۴/۱	۵۸/۳	۵۰	۶۵ ab	
B	۵۸/۳	۵۴/۱	۳۳/۳	۷۸/۵	۳۴/۷	۵۱/۸ ab	
C	۳۰	۳۵	۷۰/۸	۵۴/۱	۶۵	۵۰/۹ bc	
I	۲۹/۱	۴۱/۶	۵۰	۵	۱۵	۲۸/۱ cd	
J	۴/۱	۸/۳	۳۷/۵	۱۶/۶	۳۳/۳	۲۰ d	

* درصدهایی که با حروف مختلف مشخص شده‌اند از نظر آماری متفاوت می‌باشند. [†] تست نشده ($p = 0.002$)

انتقال ویروس BMYV اختلاف چشمگیری بین دو ژنوتیپ مذکور وجود ندارد. در حالی که ژنوتیپ A ویروس PLRV را با کارایی بسیار بالاتری نسبت به ژنوتیپ J منتقل نمود (شکل ۲). این در حالی است که در زمان استفاده از *N. benthamiana* به عنوان میزبان BMYV مشترک دو ویروس، میزان انتقال ویروس BMYV توسط ژنوتیپ های J و A به ترتیب ۵۶٪ و ۵۴٪ بود. هم‌چنین میزان انتقال PLRV توسط ژنوتیپ های J و A به ترتیب ۲۵٪ و ۵۸٪ بود. همین روند وقتی که از گیاه کیسه کشیش به عنوان منبع کسب و تلقیح ویروس برای PLRV و از گیاه عروسک پشت پرده برای BMYV استفاده شد، نیز مشاهده گردید (شکل ۲).

در بین ژنوتیپ های *M. persicae* ضعیت‌ترین و کارآمدترین ژنوتیپ ها در انتقال PLRV به ترتیب ژنوتیپ های J و A بودند. میانگین انتقال برای ژنوتیپ-های J و A به ترتیب ۲۰٪ و ۶۵٪ بود (جدول ۲). به‌هرحال میزان انتقال ویروس توسط ژنوتیپ A و ژنوتیپ-های B یا C اختلاف معنی دار نداشت. همچنان بین میزان انتقال ویروس توسط ژنوتیپ های I و J نیز اختلاف معنی دار دیده نشد.

نتایج میزان کارایی انتقال ویروس های PLRV و BMYV
نتایج آزمایش های انتقال PLRV و BMYV
توسط ژنوتیپ های A و J بیان گر آن است که در میزان



شکل ۲: مقایسه میزان انتقال ویروس های PLRV و BMYV توسط ژنوتیپ های اسکاتلندي A و J گونه *Myzus persicae*

بحث

J) ژنوتیپ‌ها (جدول ۲) به ترتیب مقاومترین و حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها در مقابل حشره‌کش‌ها می‌باشدند (بلنداندام و همکاران، ۲۰۰۴؛ برایان فینتون، نتایج چاپ‌نشده). در طی فصل رشد در نتیجه کاربرد مکرر حشره‌کش‌ها، جمعیت ژنوتیپ‌های مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس افزایش می‌یابد. این بدان معناست که وجود ژنوتیپی A که هم مقاوم به حشره‌کش هاست و هم در انتقال PLRV بسیار کارآمد است می‌تواند باعث گسترش این ویروس در مزارع سیب‌زمینی گردد.

اگر چه در پایان فصل زراعی، به خصوص در نواحی تولید بذر، جمعیت ژنوتیپ‌های مقاوم به حشره‌کش نسبت به ژنوتیپ‌های حساس افزایش می‌یابد ولی این غلبه جمعیت ادامه پیدا نمی‌کند. این امر به احتمال زیاد به دلیل آن است که در زمستان ژنوتیپ‌های مقاوم به حشره‌کش‌ها نسبت به ژنوتیپ‌های حساس متholm تلفات بیشتری می‌شوند. فوستر و همکاران (۱۹۹۶) طی آزمایش‌های مزرعه‌ای رابطه‌ای منفی بین توانائی بقا شته‌ها در برابر سرمای زمستان و میزان مقاومت ناشی از افزایش سطح آنزیم E4 گزارش نموده اند. به هر حال تغییرات آب و هوای مانند افزایش میانگین جهانی دما ممکن است اثرات انتخابی بقا زمستانه در جمعیت M. persicae را تغییر دهد. بنابر این در درازمدت تغییر آب و هوای ممکن است مشکلات ناشی از پیدایش ژنوتیپ‌های مقاوم به حشره‌کش‌ها را تشدید نماید. این امر ضرورت دیدبانی مداوم ژنوتیپ‌های موجود در جمعیت‌های M. persicae را در رابطه با واکنش آن‌ها نسبت به حشره‌کش‌ها و توانائی آن‌ها در انتقال ویروس‌های گیاهی مشخص می‌کند.

کارایی ضعیف ژنوتیپ J (میانگین انتقال٪/۲۰) در انتقال جدایه HAT (PLRV-C) در این آزمایش‌ها (نتایج مشابهی توسط وود فورد و همکاران، ۱۹۹۹) یافت HAT گردید. بیان‌گر آن است که تمایز بین جدایه‌های HAT (مانند C و PAT) و PLRV-C صادق نیست. زیرا جدایه HAT که توسط ژنوتیپ J با کارایی ضعیف منتقل گردید، بهوسیله ژنوتیپ A به طور موثری (میانگین انتقال٪/۶۵) انتقال یافت. تمایز بین جدایه‌های HAT و PAT ویروس PLRV با توجه به

مقاومت شته‌ها در برابر حشره کش‌ها خطر گسترش ویروس‌های را که منتقل می‌کنند افزایش می‌دهد. در این پژوهش کارایی انتقال PLRV در پنج ژنوتیپ اسکاتلندي Myzus persicae که برخی از آن‌ها مقاومت بالائی در برابر حشره کش‌ها دارند، بررسی گردید.

ارزیابی آماری میزان انتقال PLRV توسط ژنوتیپ‌های شته‌های مورد بررسی نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از این نظر اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۱). چنین تفاوت‌هایی بین کلون‌های مختلف شته توسط بوردین و همکاران (۱۹۹۸) و وودفورد و همکاران (۱۹۹۹) نیز گزارش شده است. نتایج این آزمایش‌ها با یافته‌های وودفورد و همکاران (۱۹۹۹) که ژنوتیپ J (با نام قبلی Mp1S) را ناقلی ضعیف برای PLRV یافته‌ند هم‌خوانی دارد. کلون ۴۰۱۰ گونه M. antirrhinii با میانگین انتقال ٪/۷۷ در این آزمایش‌ها کارآمدترین ژنوتیپ بود که با یافته‌های وودفورد و همکاران (۱۹۹۹) مبنی بر این که کلون‌های گونه M. antirrhini ناقلینی کارآمد هستند مطابقت دارد. وودفورد و همکاران (۱۹۹۹) برای تلقیح هر گیاهچه با PLRV از سه عدد شته استفاده کردند در حالی که در این آزمایش‌ها برای تلقیح ویروس به هر گیاهچه از یک شته استفاده شد. مدت زمان کسب ویروس در آزمایش‌های وودفورد و همکاران (۱۹۹۹) کوتاه‌تر (۲۴ ساعت) بود، زیرا آن‌ها معتقد بودند تفاوت کارایی در انتقال PLRV توسط کلون‌های مختلف زمانی مشهودتر است که شته‌ها مدت زمان کمتری از منبع کسب ویروس تغذیه نمایند. به جای تلقیح هر گیاهچه با سه شته که به مدت ۲۴ ساعت روی منبع ویروس تغذیه کرده‌اند، در این آزمایش‌ها از یک شته که به مدت ۷۲ ساعت از منبع ویروس تغذیه کرده بود استفاده گردید. چنین به‌نظر می‌رسد که استفاده از تعداد شته کمتر به اندازه استفاده از زمان تلقیح کوتاه‌تر که توسط وودفورد و همکاران (۱۹۹۹) به منظور تلقیح به کار رفته است در نشان دادن تفاوت کارایی انتقال PLRV در بین ژنوتیپ‌ها موثر بوده است. کارآمدترین (ژنوتیپ) وضعیفترین (ژنوتیپ

همکاران (۱۹۹۹) پیشنهاد شده است، انتظار این است که ژنوتیپ های A و J با همان کارایی که PLRV را منتقل کردند ویروس BMYV را نیز انتقال دهند. بهر حال نتایج آزمایش ها در این بررسی بیان گر آن است که ژنوتیپ های A و J ویروس BMYV را با کارایی مشابه انتقال می دهند در حالی که ژنوتیپ A ویروس PLRV را با کارایی بسیار بالاتری نسبت به ژنوتیپ J انتقال داد. این نتایج نشان می دهد که اختلاف در رفتارهای تغذیه ای تنها عامل ایجاد تفاوت در کارایی انتقال PLRV توسط ژنوتیپ های مختلف نیست. تماماً و همکاران (۱۹۸۴) نشان دادند که کارایی ضعیف انتقال یک جدایه بریتانیائی ویروس PLRV-15 (PLRV-15) به وسیله *M. persicae* نمی تواند به سادگی به غلظت ناکافی ویروس درگیاه منبع، میزان جذب ناکافی ویروس توسط شته ناقل و یا بی ثباتی ویروس در داخل بدن ناقل ربط داده شود. نامبردگان پیشنهاد کردند که کارایی ضعیف انتقال این جدایه نشان دهنده خواص ذاتی ذرات ویروس می باشد. ضمناً عامل های دیگر مانند میزان بر-هم کنش بین پروتئین های ویروس و گیرنده های بدن شته ناقل که در جریان انتقال لوتووویروس ها (Luteoviruses) دخالت دارند (گیلدو، ۱۹۸۷؛ وان دن هیوول و همکاران، ۱۹۹۴) در میزان کارایی انتقال آن ها توسط ژنوتیپ های مختلف نقش دارند. در مجموع نتایج آزمایش ها در این پژوهش نشان دهنده آن است که ژنوتیپ شته ناقل می تواند انتقال لوتووویروس ها را تحت تاثیر قرار دهد. غشا روده (روزه جوان و همکاران، ۲۰۰۱)، غشا پایه و پلاسمالامای غده فرعی برازی (پیفرو همکاران، ۱۹۹۷) به عنوان مکان های در بدن شته ناقل که می توانند در این مورد دخیل باشند پیشنهاد می گردند.

در آزمایش های مقایسه کارایی انتقال دو ویروس PLRV و BMYV توسط ژنوتیپ های A و J و گیاه *N. benthamiana* گیاه آزمایشی مشترک برای هر دو ویروس به کار رفت، در حالی که منبع کسب برای دو ویروس مورد مقایسه متفاوت بود به نحوی که PLRV از *P. floridana* و BMYV از *C. bursa-pastoris* کسب گردید. این امر به نوبه خود

نتایج آزمایش های صورت گرفت که در آن ها از کلون شته استاندارد SCRI¹ (کلون Mp1S که اکنون ژنوتیپ J نامیده می شود) استفاده گردید (ماسالسکی و هریسون، ۱۹۸۷). اکنون شواهدی وجود دارد که اصطلاحات PAT و HAT ('highly' aphid transmissible) و ('poorly' aphid transmissible) بین جدایه های PLRV همیشه صادق نیست زیرا یک جدایه ویروس ممکن است با یک ژنوتیپ خاص شته با کارایی بالائی انتقال یابد ولی با یک ژنوتیپ دیگری دارای کارایی انتقال پائین باشد. این تناقضات نشان دهنده آن است که با ایستی به دنبال جایگزین های مناسب تری برای این اصطلاحات بود. به عنوان مثال تمایز بین جدایه های ویروس (از نظر HAT یا بودن) در هر منطقه می تواند بر مبنای میانگین کارایی انتقالشان توسط ژنوتیپ های غالب شته ناقل در آن منطقه صورت گیرد تا تنها بر مبنای انتقال توسط یک ژنوتیپ خاص. همچنین با توجه به این که جمعیت *M. persicae* در هر منطقه جغرافیائی ترکیبی از ژنوتیپ های مختلف با نسبت های متفاوت است، اختصاص یک ضریب تصحیح برای هر ژنوتیپ که نشان دهنده فراوانی آن ژنوتیپ در منطقه PLRV است، هنگامی که بررسی انتقال و گسترش توسط شته های ناقل آن مدنظر باشد می تواند مفید باشد. این کار منجر به داده های خواهد شد که با آن چه که در طبیعت اتفاق می افتد هم خوانی بیشتری دارد. به علاوه معرفی یک گروه بندی جدید با دامنه انتقال محدود تر می تواند به تمایز جدایه های ویروس از نظر میزان انتقالشان با شته ناقل بیشتر کمک کند. به عنوان مثال جدایه هایی از ویروس با کارایی انتقال تا ۲۰٪ جدایه PAT، جدایه های با کارایی انتقال بین ۴۰-۲۱٪ MAT (moderately aphid transmissible) و جدایه های با کارایی انتقال بیشتر از ۴۱٪ HAT تلقی گردند.

اگر اختلاف در کارایی انتقال PLRV توسط ژنوتیپ های مختلف شته تنها نتیجه تفاوت در رفتارهای تغذیه ای آن ها باشد (عاملی که توسط وودفورد و

1. Scottish Crop Research Institute

سوی دیگر حامل هر سه نوع مکانیسم شناخته شده مقاومت در برابر حشره‌کش‌ها می‌باشند به نحوی که در یک آزمایش زیست سنجی، ژنوتیپ A در برابر حشره‌کش لامیدا سیهالوتربین کاملاً این بوده و پس از آن ژنوتیپ B بسیار مقاوم بود (بلنداندام و همکاران، ۲۰۰۴). توجه به نکات فوق مبین این مطلب است که وجود ژنوتیپ-هایی با خصوصیات مذکور (قدرت تکثیر زیاد، مقاومت بالا در برابر حشره‌کش‌ها و کارایی زیاد در انتقال PLRV) چنانچه به صورت ژنوتیپ غالب درآیند. خطری بالقوه در گسترش این ویروس محسوب می‌شوند. این امر به نوبه خود تاکیدی است بر ضرورت دیده‌بانی ژنوتیپ‌های شته سبز هلو از نظر مقاومت به حشره‌کش‌ها و کارایی انتقال ویروس. چنین ناقلین کارایی برای PLRV ممکن است ویروس‌های دیگر را نیز با کارایی بالا انتقال دهند.

سپاسگزاری

نگارنده‌گان از سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی وزارت جهاد کشاورزی جمهوری اسلامی ایران که اعتبار لازم برای این پژوهش را تامین نموده و از موسسه تحقیقات محصولات (Scottish Crop Research Institute) که امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم آورد تقدیر می‌نمایند.

می‌تواند کسب و انتقال این ویروس‌ها را تحت تاثیر قرار داده باشد. پیدا کردن یک گیاه میزان مشترک که بتواند به عنوان منبع کسب و تلقیح برای هر دو ویروس به کار رود می‌تواند اختلافات ناشی از کاربرد گیاهان متفاوت به عنوان منبع کسب ویروس را کاهش دهد. به علاوه مقایسه کارایی انتقال PLRV با یک ویروس نزدیک‌تر به آن مانند ویروس زردی غربی چغندر قند *Beet western yellows virus* (BWYV) (۱۹۹۶) اساس نتایج پژوهش‌های اسمیت و همکاران قرابت بیشتری با PLRV دارد، منجر به نتایج قبل اطمینان‌تری در خصوص عوامل دخیل در انتقال این گونه ویروس‌ها توسط شته‌های ناقل خواهد شد. نامبرگان گزارش کردند که BWYV نسبت به BMYV قرابت بیشتری با PLRV دارد زیرا ۳۸٪ از آنتی‌بادی‌های تک سانه‌ای تولید شده علیه BWYV با PLRV نیز واکنش نشان دادند در حالیکه ۴٪ از چنین آنتی‌بادی‌هایی که علیه BMYV تولید شدند با PLRV واکنش دادند. به نظر می‌رسد تعیین دقیق عوامل موثر در انتقال این گونه ویروس‌ها توسط شته‌های ناقل، تحقیقات بیشتری را می‌طلبد.

در یک بررسی که بر روی شاخص‌های زیستی دخیل در افزایش جمعیت ژنوتیپ‌های مورد بررسی صورت گرفت، ژنوتیپ‌های A و B جزو مولدترین ژنوتیپ‌های *M. persicae* در اسکاتلندر تعیین گردیدند (نگارنده‌گان، نتایج چاپ نشده). ژنوتیپ‌های A و B از

منابع

- Barker, H. 2001. Potato leafroll virus. p804. In: Malloy, O. C. and Murry, T. D. (eds), Encyclopedia of plant pathology. Vol 2, Eds.
- Bolandandam, J., Barker, H., and Fenton, B. 2004. Differences in potato leafroll transmitting ability of individual genotypes of Scottish *Myzus persicae* with different susceptibilities to Lambda-cyhalothrin insecticide. Proceedings of the 15th International Plant Protection Congress, Beijing, China, May 11-16, p201.
- Bourdin, D., Rouzé-Jouan, J., Tanguy, S., and Robert, Y. 1998. Variation among clones of *Myzus persicae* and *Myzus nicotiana* in the transmission of a poorly and a highly aphid-transmissible isolate of potato leafroll luteovirus (PLRV). *Plant Pathology* 47: 794-800.
- Devonshire, A. L., Moores, G. D., and French-Constanat R. H. 1986. Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross reaction of the antiserum with *Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 76: 97-107.
- Eskandari, F., Sylvester, E. S., and Richardson, J. 1979. Evidence of lack of propagation of potato leafroll virus in its aphid vector, *Myzus persicae*. *Phytopathology* 69: 45-47.
- Fenton, B., Woodford, J. A. T., and Malloch, G. M. 1998. Analysis of clonal diversity of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in Scotland, UK and evidence for the existence of a predominant clone. *Molecular Ecology* 7: 1475-1487.
- Foster, S. P., Harrington, R., Devonshire, A. L., Denholm, I., Devine, G. J., and Kenward, N. G. 1996. Comparative survival of insecticide-susceptible and resistant peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), in low temperature field trials. *Bulletin of Entomological Research* 86: 17-27.
- Gildow, F. E. 1982. Coat-vesicle transport of luteoviruses through salivary glands of *Myzus persicae*. *Phytopathology* 72: 1289-1296.
- Gildow, F. E. 1987. Virus-membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by aphids. In Current Topics in Vector research, pp. 93-120. Ed. K F Harris. New York, USA: Springer Verlag.
- Gildow, F. E. 1999. Luteovirus transmission mechanisms regulating vector specificity. In The Luteoviridae, pp. 88-111. Eds Smith, H G and Barker, H. Wallingford, Oxon, UK: CABI publications
- Gildow, F. E., and Gray, S. M. 1993. The aphid salivary gland basal lamina is a selective barrier associated with vector-specific transmission of Barley yellow dwarf luteovirus. *Phytopathology* 83: 1293-1302.
- Gildow, F. E., and Rochow, W. F. 1980. Role of accessory glands in aphid transmission of Barley yellow dwarf virus. *Virology* 104: 97-108.
- Harrison, B. D. 1984. Potato leafroll virus. Description of plant viruses, no 291. Surrey, UK: The commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists.
- Jurík, M., Mucha, V., and Valenta, V. 1980. Interspecies variability in transmission efficiency of stylet-borne viruses by the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Acta Virologica* 24: 351-357.
- Kennedy, J. S., Day, M. F., and Eastop, V. F. 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. pp. 34-35. London: Commonwealth Institute of Entomology.
- Massalski, P. R., and Harrison, B. D. 1987. Properties of monoclonal antibodies to potato leafroll luteovirus and their use to distinguish virus isolates differing in aphid transmissibility. *Journal of General Virology* 68: 1813-1821.
- McCullagh, P., and Nelder, J. A. 1989. Generalised linear models. Second edition, London: Chapman & Hall 511p.
- Peiffer, M. L., Gildow, F. E., and Gray, S. M. 1997. Two distinct mechanisms regulate transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. *Journal of General Virology* 78: 495-503.
- Robert, Y. 1971. Epidémiologie de l' enroulement de la pomme de terre: capacité vectrice de stades et de formes des pucerons *Aulacorthum solani* Kltb. *Macrosiphum euphorbiae* Thomas. et *Myzus persicae* Sulz. *Potato Research* 14: 130-139.

- Robert, Y, and Lemaire, O. 1999. Epidemiology and control strategies: Epidemiology of potato leafroll disease. In The Luteoviridae, pp. 195-225. Eds H G Smith and H Barker. Wallingford, Oxon, UK: CABI Publications.
- Robert, Y., and Maury, Y. 1970. Capacités vectrices comparées de plusieurs souches de *Myzus persicae* Sulz., *Aulacorthum solani* Kltb. et *Macrosiphum euphorbiae* Thomas. Dans l' étude de la transmission de l' enroulement de la pomme de terre. Potato Research 13: 199-209.
- Rouzé-Jouan, J., Terradot, L., Pasquer, F., Tanguy, S., and Ducray-Bourdin, D. G. 2001. The passage of Potato leafroll virus through *Myzus persicae* gut membrane regulates transmission efficiency. Journal of General Virology 82: 17-23.
- Singh, M. N., Khurana, S. M. P., Nagaich, B. B., and Agrawal, H. O. 1982. Strains of potato leafroll virus and their transmission by aphid clones. Journal of The Indian Potato Association 9: 121-127.
- Smith, H. G., Barker, I., Brewer, G., Stevens, M. and Hallsworth, P. B. 1996. Production and evaluation of monoclonal antibodies for the detection of beet mild yellowing luteovirus and related strains. European Journal of Plant Pathology 102: 163-169.
- Tamada, T., and Harrison, B. D. 1980. Factors affecting the detection of potato leafroll virus in potato foliage by enzyme-linked immunosorbent assay. Annals of Applied Biology 95: 209-219.
- Tamada, T., Harrison, B. D., and Roberts, I. M. 1984. Variation among British isolates of potato leafroll virus. Annals of Applied Biology 104: 107-116.
- Torrance, L. 1992. Serological methods to detect plant viruses: production and use of monoclonal antibodies. In Techniques for the rapid detection of plant pathogens, pp. 7-37. Eds J M Duncan and L Torrance. Oxford, UK: Blackwell publications.
- Upreti, C. G., and Nagaich, B. B. 1971. Variations in the ability of *Myzus persicae* Sulz. to transmit potato viruses. Phytopathologische Zeitschrift 71: 163-168.
- Van den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M.,and Van der Willk, F. 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of Potato leafroll virus by *Myzus persicae*. Journal of General Virology 75: 2559-2565.
- Van Emden, H. F., Eastop, V. F., Hughes, R. D., and Way, M. J. 1969. The ecology of *M. persicae*. Entomology 14: 197-120.
- Weber, G.1968. Ecological genetics of host plant exploitation in the green peach aphid, *M. persicae*. Entomologia Experimentalis et Applicata 40: 161-168.
- Woodford, J. A. T., Fenton, B., and Barker, H. 2002. Managing aphid-transmitted viruses in Scottish seed potato crops. Proceedings of Crop Protection in Northern Britain, Dundee, UK, February 2002. pp. 231-236.
- Woodford, J. A. T., Fenton, B., and Mayo, M. A. 1999. Variation among aphid vectors of Potato leafroll virus. Annual Report of the Scottish Crop Research Institute for 1998/1999. pp. 146-149. Dundee, Scottish Crop Research Institute.

The Potato leafroll virus transmission Efficiency of Some Major Genotypes of Scottish *Myzus persicae*

Nikan^{1*}, J. Fenton², B. And Barker³, H.

Abstract

In this study the PLRV transmission efficiency of five major genotypes of Scottish *M. persicae*) were analysed. The genotypes denoted as types A, B, C, J, and I. In virus transmission experiments detached leaves of PLRV-infected *Physalis floridana* and virus-free seedlings (2-3 leaf) of the same plant were used as virus source and test plant, respectively. Both acquisition and inoculation access periods were 3 days at 18°C with a 16 h photoperiod. One viruliferous aphid per seedling was used for inoculation and 24 seedlings for each genotype were inoculated. Three weeks after inoculation and based on symptoms or ELISA tests, the numbers of infected plants in each set of inoculated seedlings were determined. The transmission experiment was repeated five times. To reveal the factors underlying the differences in PLRV-transmitting abilities of the genotypes, transmission efficiency of PLRV and closely related virus, *Beet mild yellowing virus* (BMYV), by genotypes A and J were compared. Significant differences in PLRV transmission efficiency of the genotypes were observed. Genotypes A, B and C transmitted PLRV to more test plants. The comparison of the PLRV and the BMYV transmission efficiency showed that genotypes A and J transmitted BMYV almost with the same efficiency whereas genotype A transmitted PLRV more efficiently than did genotype J. These results suggest that such differences are likely to be caused by small variations within the aphid's receptors that recognise PLRV particles and assist their circulation and stability within the aphid's body. It has been shown that the genotypes A and B also carry all three known insecticide-resistance mechanisms and therefore can potentially increase the spread of PLRV.

Keywords: PLRV, *Myzus persicae*, Transmission, Genotype

1. Assistant Professor, Plant Pests and Diseases Research Dept. Hamedan Agricultural and Natural Resources Research Centre, Hamedan

2 And 3. Associate Professor and Professor, Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, Scotland, UK

*. Corresponding Author