آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۸، شماره ۱ و ۲، بهمن ۱۳۷۹

آسیب‌شناسی و بررسی تاثیر ویروس NbNPV روی سنین مختلف لاروی پروانهٔ 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 بیماریزائی بالائی 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 تفریخ 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 پلی هدر بر میلی متر مربع سطح مادهٔ غذائی و زمان لازم برای ایجاد تلفات ۵۰٪ (LT 50) با دز ۶۳/۱۰ پلی‌هدر بر میلی‌متر مربع سطح مادهٔ غذائی 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 هسیتوپاتولوژیک مشخص در میکروسکوپ نوری مشاهده نگردید. بزرگ شدن هستهٔ سلول‌های اپیدرم و بافت چربی، همچنین ایجاد تغییرات محسوس در حالت ظاهری شبکهٔ کروماتین (تشکیل استرومای ویروژنیک) عمدتاً از روز سوم پس از آلودگی قابل رؤیت بود. همزمان با پیشرفت بیماری، اشغال کامل هستهٔ سلول‌ها با کریستالهای چند وجهی ویروس و به دنبال آن پارگی دیوارهٔ هسته و سلول اتفاق افتاد.

واژه‌های کلیدی: کارادرینا، ویروس NbNPV، آسیب‌شناسی

مقدمه

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 آن‌هااست 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 ویرولژیک آفات نباتی به ویژه در پروانه‌های برگ‌خوار انجام گرفت. اشاره به مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف اهمیت چنین بررسی‌هائی 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 رودهٔ 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 نوکلئوکپسیدها (nucleocapsid) به درون هستهٔ سلول‌های استوانه‌ای رودهٔ میانی، تغییراتی در شیرهٔ هسته (nucleoplasm) ظاهر می‌گردد. ساختمانهای حفره مانند، اجسام کروی غیر قابل نفوذ به الکترون و شیره هستهٔ دانه دانه شده به همراه نوکلئوکپسیدهای تازه تشکیل شده در هسته‌های آلوده دیده می‌شوند، اما شبکهٔ 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 رودهٔ میانی و در سلول‌های سایر بافت‌های لاروی آن است که در سلول‌های استوانه‌ای رودهٔ میانی، پیکره‌های ویروسی (Virions) توسط پروتئین چند وجهی 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 مادهٔ

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

روش بررسی

لاروهای پروانهٔ کارادرینا از مزارع چغندر قند اطراف شهرستان میاندوآب جمع‌آوری گردیده و در شرایط کنترل شدهٔ آزمایشگاه با دمای ۱ ± ۲۷ درجهٔ سانتی گراد، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی روی محیط غذائی پیشنهادی توسط Shorey & Hale در سال ۱۹۶۵، پرورش داده شدند. در این فرمول غذائی فرمالدئید ۴۰٪ به دلیل اثر تخریبی روی ویروس چند وجهی هسته‌ای کنار گذاشته شد (Ignoffo & Garcia, 1968). تغذیهٔ پروانه‌ها با محلول ۱۰٪ ساکارز در آب صورت گرفته و کاغذ واتمن شمارهٔ ۹۱ برای بستر تخم ریزی پروانه‌ها بکار رفت.

برای تهیهٔ سوسپانسیون مادر ویروس، روش Daoust & Roome (1974) مورد استفاده قرار گرفت. ویروس MbNPV (*Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus) با نام تجارتی Mamestrin، مادهٔ اولیهٔ آلوده سازی لاروها بود که ویروسهای حاصل از دومین گذر (passage) از بدن لاروها به عنوان سوسپانسیون مادر انتخاب و غلظت آن بوسیلهٔ لام گلبول شمار (haemocytometer)، $۲/۱۶ \times ۱۰^{۸}$ پلی هدر/سانتی‌متر مکعب، تعیین گردید. به منظور بررسی تأثیر دزهای مختلف ویروس بر روی لاروهای کارادرینا و محاسبهٔ 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 مادهٔ غذائی 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 مادهٔ غذائی بود. علظت‌های مختلف سوسپانسیون ویروسی طوری تهیه شدند که چنانچه ۰/۱ سانتی‌متر مکعب از آنها روی سطح مادهٔ غذائی پخش شود، تعداد پلی هدر مورد نظر روی هر میلی‌متر مربع از آن قرار گیرد. این کار به کمک میکرواپلیکاتور 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 مادهٔ غذائی، پخش گردید. پس از خشک شدن سطوح مادهٔ غذائی 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 تخم‌هائیکه تعداد تخم زیادی داشته و تاریخ تفریخ 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 میکروسکپی قرار گرفت.

مطالعات آسیب‌شناسی بافت‌ها بر روی لاروهای سن چهارم انجام شد. این لاروها با غذای مصنوعی آلوده به دز ۱۰۰۰ پلی هدر/میلی متر مربع سطح مادهٔ غذائی، تغذیه شدند. در هر ۲۴ ساعت، ۳-۲ لارو جدا و بلافاصله در داخل محلول تثبیت کننده (fixative) بوئن آبی قرار گرفتند و پس از ده روز برشهای ۵، ۷، ۸و 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 اندازهٔ هسته و حالت ظاهری شبکهٔ کروماتین سلول‌های بافت چربی و سایر بافت‌های لاروهای آلوده و شاهد دیده نشد. رشد غیر عادی هستهٔ سلول آلوده اولین علامت آلودگی است و با تغییراتی در شیرهٔ هستهٔ سلول‌ها همراه است که در بررسی حاضر عمدتاً از سومین روز پس از آلودگی اتفاق افتاد. این تغییرات شامل انقباض شبکهٔ کروماتین بود که به صورت لکهٔ تیره رنگی در داخل هسته قرار داشت و به تدریج از اندازهٔ آن کاسته شد تا اینکه کل هسته توسط کریستال‌های چند وجهی ویروس اشغال گردید. در این مرحله پلی هدرهای تازه تشکیل شده در اطراف این تودهٔ تیره رنگ دیده شد. مراحل تکامل ساختمانی کریستالهای چند وجهی ویروسی، علاوه بر تغییرات در اندازه‌ها، با درگرگونی‌هایی در رنگ پذیری نیز همراه بود، به طوریکه با روش رنگ‌آمیزی یاد شده، پلی هدرهای کوچک و تازه تشکیل شده، رنگ بنفش و پلی هدرهای 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