دانشکده علوم کشاورزی
گروه گیاهپزشکی
(بیماری‌شناسی گیاهی)

عنوان:

ردیابی و تعیین پراکنش ویروس‌های AMV، BYMV و CMV در مزارع یونجه استان سمنان

از:
علی قباخلو

استادان راهنما:
دکتر سید علی الهی نیا
دکتر رضا پور رحیم

استاد مشاور:
دکتر احمد روحی بخش

بهمن ۱۳۹۱

تقدیم به:

پدرم به استواری کوه

مادرم به زلالی چشمه

همسرم به صمیمیت باران

سپاس و ستایش خدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درخشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود.

از استاتید راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر سید علی الهی نیا و جناب آقای دکتر رضا پوررحیم که با رهنمودهای علمی مرا مورد لطف خویش قرار داده و همواره راهنمای من بودند کمال تشکر را دارم.

از مشاور عزیزم جناب آقای دکتر احمد روحی بخش به خاطر ارائه نظرات و راهنمایی‌های ارزشمندشان تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از سرکار خانم دکتر شیرین فرزادفر، عضو هیئت علمی بخش ویروس شناسی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، به واسطه زحمت‌های بی دریغشان صمیمانه سپاسگزارم.

از اساتید محترم آقایان دکتر سید اکبر خداپرست و سرکار خانم دکتر صدیقه موسی نژاد که زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را برعهده داشتند، سپاسگزارم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی سرکار خانم دکتر مریم نوابیان که مسئولیت جلسه دفاع از پایان نامه را برعهده داشتند تشکر می‌نمایم.

از کلیه اساتید محترم گروه گیاهپزشکی که افتخار دانشجویی ایشان را داشتم سپاسگزارم.

از همسر عزیزم به خاطر محبت‌ها و دلگرمی‌هایش در پیشرفت این پایان نامه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

در پایان برای همه این عزیزان از خداوند متعال سلامت، سعادت و موفقیت روزافزون آرزومندم.

علی قباخلو

بهمن ۱۳۹۱

چکیده فارسی

ردیابی و تعیین پراکنش ویروس‌های AMV، BYMV و CMV در مزارع یونجه استان سمنان

علی قباخلو

یونجه یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای کشور و نیز استان سمنان می‌باشد. عوامل ویروسی متعددی موجب کاهش تولید این محصول می‌شوند که از آن جمله می‌توان به ویروس‌های موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic virus*-AMV)، موزائیک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*-BCMV)، موزائیک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*-BYMV) و موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*-CMV) اشاره نمود. در این تحقیق، تعداد ۳۱ مزرعه یونجه در پنج شهرستان ایوانکی، گرمسار، سمنان، دامغان و شاهرود از استان سمنان مورد بازدید قرار گرفته و مجموعاً ۳۹۲ نمونه علائم‌دار و ۶۶۳ نمونه تصادفی جمع‌آوری گردید. این نمونه‌ها از نظر آلودگی به چهار ویروس مهم یونجه شامل AMV، BCMV، BYMV و CMV به روش آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA و به کمک آنتی‌بادی اختصاصی (شرکت بیوربا - سوئیس) مورد ارزیابی قرار گرفتند. مهم‌ترین علائم همراه با نمونه‌های علائم‌دار دارای واکنش مثبت در آزمون الایزا، شامل موزائیک و پیسک (۲۵/۴ درصد)، پیچیدگی و بدشکلی‌های برگی (۳۱/۳ درصد)، زردی و سبزردی (۱۸/۷ درصد) و کاهش رشد یا کوتولگی (۲۴/۶درصد) بود. بر اساس نتایج آزمون الایزا در بین ۶۶۳ نمونه تصادفی، فراوانی آلودگی‌های ویروسی مورد بررسی به ترتیب عبارت از AMV (۴۶/۴ درصد)، BCMV (۸/۱ درصد)، CMV (۴/۲ درصد) و BYMV (۲/۱ درصد) تعیین شد. همچنین درصد آلودگی به ویروس‌های مورد بررسی در بین ۳۹۲ نمونه علائم‌دار نشان داد که AMV با ۶۹/۶ درصد بیشترین میزان آلودگی را دارا بود و پس از آن BCMV (۱۶ درصد)، CMV (۸/۹ درصد) و BYMV (۵/۸ درصد) قرار گرفتند. در این بررسی تعدادی از نمونه‌های علائم‌داری که با هیچ یک از آنتی‌بادیهای فوق واکنش مثبت نداشتند از نظر آلودگی به ویروس کوتولگی سویا (*Soybean dwarf virus*-SbDV) و ویروس کم رشدی بادام زمینی (*Peanut stunt virus*-PSV) مورد آزمون سرولوژیک بروش لکه‌گذاری بافتی (TBIA) قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون، ۱۷ نمونه با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس PSV و تعداد ۳۰ نمونه با آنتی‌بادی اختصاصی SbDV واکنش مثبت داشتند. به منظور تایید نتایج حاصل از آزمون الایزا از آزمون بیولوژیکی و مایه‌زنی جدایه‌های ویروسی روی گیاهان محک و نیز ردیابی مولکولی (RT-PCR) به کمک آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه ژن پروتئین پوششی هر یک از ویروس‌های مورد نظر انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای AMV، BCMV، BYMV، CMV، PSV و SbDV منجر به تکثیر قطعات دی.ان.ای بطول مورد انتظار به ترتیب برابر با ۸۶۰، ۱۰۰۰، ۹۰۰، ۸۵۰، ۹۰۰ و ۶۰۰ جفت‌باز گردید. همچنین تهیه نقشه تحدید آنزیمی (RFLP) با استفاده از دو آنزیم برشی *Rsa*I و *Sma*I موید آلودگی نمونه‌های یونجه به لوتئوویروس SbDV بود. در نتیجه این واکنش قطعه ژنومی ۶۰۰ جفت بازی تکثیر یافته در مورد جدایه SbDV توسط آنزیم *RsaI* برش خورده و منجر به تولید دو قطعه بطول ۲۰۰ و ۴۰۰ جفت‌بازی گردید ولی با آنزیم برشی *SmaI* برشی ایجاد نگردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که دو ویروس AMV و BCMV از شایع‌ترین ویروس‌های آلوده کننده یونجه در مزارع یونجه استان سمنان می‌باشند. همچنین این اولین گزارش از آلودگی به ویروس‌های AMV، BYMV، CMV، PSV و SbDV در مزارع یونجه استان سمنان و نیز اولین گزارش از ردیابی مولکولی آلودگی ویروس BCMV از مزارع یونجه کشور می‌باشد.

کلمات کلیدی: یونجه، سمنان، ویروس موزائیک یونجه، ویروس موزائیک خیار، ویروس موزائیک معمولی لوبیا، ویروس موزائیک زرد لوبیا، ویروس کم رشدی بادام زمینی، ویروس کوتولگی سویا.

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	خ
چکیده انگلیسی	د
مقدمه	۱
فصل اول: کلیات، و بررسی منابع	**۴**
۱-۱- سطح زیر کشت نباتات علوفه‌ای کشور	۵
۱-۲- تاریخچه گیاه یونجه	۵
۱-۳- خصوصیات گیاهشناسی یونجه	۶
۱-۴- بیماری‌های ویروسی انواع یونجه	۷
۱-۴-۱- ویروس توته‌ایی یونجه (LEV)	۹
۱-۴-۲- ویروس موزائیک یونجه (AMV)	۱۱
۱-۴-۳- ویروس موزائیک معمولی لوبیا (BCMV)	۱۶
۱-۴-۴- ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV)	۱۷
۱-۴-۵- ویروس پیچیدگی برگ لوبیا (BLRV)	۲۰
۱-۴-۶- ویروس زردی غربی چغندر قند (BWYV)	۲۲
۱-۴-۷- ویروس موزائیک خیار (CMV)	۲۲
۱-۴-۸- ویروس زردی نکروتیک باقلا (FBNYV)	۲۹
۱-۴-۹- ویروس رگه‌ای نخود فرنگی (PeSV)	۲۹
۱-۴-۱۰- ویروس کم رشدی بادام زمینی (PSV)	۳۰
۱-۴-۱۱- ویروس موزائیک رگبرگ شبدر قرمز (RCVMV)	۳۱
۱-۴-۱۲- ویروس کوتولگی سویا (SbDV)	۳۱
۱-۴-۱۳- ویروس لکه حلقوی توتون (TRSV)	۳۲
۱-۴-۱۴- ویروس حلقه سیاه گوجه فرنگی (TBRV)	۳۳
۱-۴-۱۵- ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV)	۳۴
فصل دوم: مواد و روش‌ها	**۳۵**
۲-۱ جمع آوری نمونه از مزارع یونجه	۳۶
۲-۲- آزمون سرولوژیکی الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- ELISA)	۴۰
۲-۲-۱- تهیه بافرها	۴۰
۲-۲-۲- آماده سازی نمونه‌ها	۴۲
۲-۲-۳- ارزیابی نتایج آزمون الایزا	۴۳
۲-۳- آزمون سرولوژیکی لکه‌گذاری بافتی (Tissue Blot Immuno Assay- ELISA)	۴۳
۲-۴ بررسی دامنه میزبانی	۴۴
۲-۵- خالص سازی ویروس‌ها	۴۶
۲-۵-۱- خالص سازی AMV	۴۶
۲-۵-۱-۱- آماده سازی بافرها	۴۶

۲-۵-۱-۲- مراحل خالص سازی ۴۶
۲-۵-۲- خالص سازی CMV و PSV ۴۷
۲-۵-۲-۱- آماده سازی بافرها ۴۷
۲-۵-۲-۲- مراحل خالص سازی ۴۸
۲-۵-۲-۳- بافرهای جایگزین برای PSV ۴۸
۲-۵-۳- خالص سازی BYMV و BCMV ۴۹
۲-۵-۳-۱- آماده سازی بافرها ۴۹
۲-۵-۳-۲- مراحل خالص سازی ۴۹
۲-۶- بررسی خصوصیات مولکولی ۵۰
۲-۶-۱- استخراج آر.ان.ای (RNA extraction) ۵۱
۲-۶-۱-۱- استخراج آر.ان.ای با استفاده از کیت کیاژن ۵۱
۲-۶-۱-۲- استفاده از محلول تجاری RNXplus ۵۲
۲-۶-۲- آزمون RT-PCR ۵۳
۲-۶-۲-۱- آزمون RT-PCR جدایه‌های AMV ۵۳
۲-۶-۲-۲- واکنش RT-PCR جدایه‌های BCMV ۵۴
۲-۶-۲-۳- آزمون RT-PCR جدایه‌های BYMV ۵۵
۲-۶-۲-۴- آزمون RT-PCR جدایه‌های CMV و PSV ۵۵
۲-۶-۲-۵- آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SbDV ۵۶
۲-۶-۲-۵-۱- آزمون RFLP جهت تایید ردیابی SbDV ۵۷
۲-۷- تعیین توالی و بررسی خصوصیات مولکولی ویروس موزائیک یونجه ۵۸
۲-۷-۱- آنالیز تبارزیی ۵۸
فصل سوم: نتایج و بحث **۶۱**
۳-۱- نمونه‌برداری و بررسی علائم ۶۲
۳-۲- نتایج آزمون الایزا ۶۲
۳-۳- بررسی خصوصیات بیولوژیکی ۶۶
۳-۴- بررسی خصوصیات مولکولی ۷۶
۳-۵- نتایج رونوشت برداری برگردان-واکنش زنجیرهای پلیمراز (RT-PCR) ۷۶
۳-۵-۱- جدایه‌های AMV ۷۶
۳-۵-۲- جدایه‌های BCMV ۷۷
۳-۵-۳- جدایه‌های BYMV ۷۷
۳-۵-۴- جدایه‌های CMV ۷۹
۳-۵-۵- جدایه‌های PSV ۷۹
۳-۵-۶- جدایه‌های SbDV ۷۹
۳-۶- آنالیز تبارزایی ویروس موزائیک یونجه ۸۳

۳-۷- بحث ۸۶
۳-۸- نتیجه گیری کلی ۹۲
۳-۹- پیشنهادات ۹۳
منابع ۹۴

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- طبقه بندی گیاه یونجه ۶
جدول ۱-۲- ویروس‌هایی آلوده کننده یونجه ۹
جدول ۱-۳- نام، میزبان، کشور و منبع استرین‌های ویروس موزائیک یونجه ۱۵
جدول ۱-۴- نرخ بذر زاد شدن AMV در گیاهان مختلف ۱۶
جدول ۱-۵- نرخ بذر زاد شدن BYMV در گیاهان مختلف ۲۰
جدول ۱-۶- نام، میزبان، کشور و منبع استرین‌های ویروس موزائیک خیار ۲۷
جدول ۱-۷- نرخ بذر زاد شدن CMV در گیاهان مختلف ۲۸
جدول ۲-۱- شهرستان، مناطق و تعداد نمونه علائم دار و تصادفی جمع آوری شده یونجه در استان سمنان ۳۸
جدول۲-۲- گیاهان میزبانی که برای مایه‌زنی ویروس‌های AMV، BYMV، BCMV، CMV و PSV مورد استفاده قرار گرفتند ۴۵
جدول۲-۳- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵۱
جدول۲-۴- فهرست توالی‌های ژن پروتئین پوششی AMV موجود در بانک ژن که در این تحقیق مورد مقایسه قرار گرفته‌اند ۵۹
جدول ۳-۱- عوامل ویروسی و درصد فراوانی آنها در نمونه‌های تصادفی ۶۴
جدول ۳-۲- عوامل ویروسی و درصد فراوانی آنها در نمونه‌های علائم دار ۶۵
جدول ۳-۳- واکنش گیاهان محک مایه‌زنی شده با ۸ جدایه AMV جداسازی شده از نمونه‌های یونجه مناطق مختلف ۶۶
جدول ۳-۴- واکنش گیاهان محک مایه‌زنی شده با ۷ جدایه CMV جداسازی شده از نمونه‌های یونجه مناطق مختلف ۶۹
جدول ۳-۵- واکنش گیاهان محک مایه‌زنی شده با ۵ جدایه BYMV جداسازی شده از نمونه‌های یونجه مناطق مختلف ۷۱
جدول ۳-۶- واکنش گیاهان محک مایه‌زنی شده با ۵ جدایه BCMV جداسازی شده از نمونه‌های یونجه مناطق مختلف ۷۲
جدول ۳-۷- واکنش گیاهان محک مایه‌زنی شده با ۶ جدایه PSV جداسازی شده از نمونه‌های یونجه مناطق مختلف ۷۴

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- تصویر شماتیک پیکره و ژنوم نوکلئوربدویروس‌ها و پروتئین‌های حاصل از بیان آن ۱۰
شکل ۱-۲- پیکره های باسیلی شکل ویروس موزائیک یونجه و ژنوم سه بخشی خطی ویروس ۱۲
شکل ۱-۳- پیکره رشته‌ای خمش پذیر در پوتی ویروس‌ها همراه با تصویر سازمان ژنومی ۱۹
شکل ۱-۴- ژنوم لوتئوویروس‌ها و پروتئین‌های حاصل از بیان آن ۲۱
شکل ۱-۵- ژنوم پولروویروس‌ها و پروتئین‌های حاصل از بیان آن ۲۲
شکل ۱-۶- ژنوم سه بخشی اعضای جنس کوکوموویروس که در پیکره‌های ایزومتریک مجزا جای می‌گیرد ۲۴
شکل ۱-۷- ژنوم چند بخشی اعضای جنس نانوویروس که در پیکره‌های ایزومتریک مجزا جای می‌گیرند ۲۹
شکل ۱-۸- ژنوم اعضای جنس کارلاویروس و پروتئین‌های حاصل از بیان آن ۳۰
شکل ۲-۱- تنوع علائم برگی در یونجه‌های آلوده ۳۷
شکل ۲-۲- نقشه استان سمنان ۳۷
شکل ۲-۳- زردی در یونجه ۳۹
شکل ۲-۴- علائم موزائیک شدید در بوته یونجه ۳۹
شکل ۲-۵- بدشکلی شدید، کوتولگی و بازماندن از رشد در بوته یونجه ۴۰
شکل ۳-۱- وضعیت آلودگی ویروسی در نمونه‌های تصادفی استان سمنان ۶۴
شکل ۳-۲- وضعیت آلودگی ویروسی مخلوط در نمونه‌های تصادفی استان سمنان ۶۴
شکل ۳-۳- وضعیت آلودگی ویروسی در نمونه‌های علائم دار استان سمنان ۶۵
شکل ۳-۴- وضعیت آلودگی ویروسی مخلوط در نمونه‌های تصادفی استان سمنان ۶۵
شکل ۳-۵- علائم ناشی از مایه زنی ویروس موزائیک یونجه روی گیاهان محک در شرایط گلخانه ۶۷
شکل ۳-۶- علائم ناشی از مایه زنی ویروس موزائیک یونجه روی گیاهان محک در شرایط گلخانه ۶۸
شکل ۳-۷- علائم ناشی از ویروس موزائیک خیار (CMV) روی گیاهان محک در شرایط گلخانه. ۶۹
شکل ۳-۸- علائم ناشی از ویروس موزائیک خیار (CMV) روی گیاهان محک در شرایط گلخانه ۷۰
شکل ۳-۹- علائم ناشی از ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV) ۷۱
شکل ۳-۱۰- علائم ناشی از ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV) ۷۲
شکل ۳-۱۱- علائم ناشی از مایه زنی ویروس موزائیک معمولی لوبیا (BCMV) روی گیاهان محک در شرایط گلخانه ۷۳
شکل ۳-۱۲- علائم ناشی از مایه زنی ویروس کم رشدی بادام زمینی (PSV) روی گیاهان محک در شرایط گلخانه ۷۵
شکل ۳-۱۳- کیفیت آر.ان.ای استخراج شده توسط ۱-کیت کیاژن (۵ ستون سمت راست) و ۲-محلول RNXplus (سه ستون سمت چپ) ۷۶
شکل ۳-۱۴- ستون اول مربوط به نشانگر یک کیلو بازی (فرمنتاس-لیتوانی) و ۹ ستون بعدی مربوط به تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی به‌ترتیب جدایه‌های D7، D9، G16، G57، Sh12، Sh26، Se23، I8 و I33 ویروس موزائیک یونجه به‌دست آمده از مزارع یونجه استان سمنان می‌باشد ۷۷
شکل ۳-۱۵- ستون ۱: نشانگر یک کیلو بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون ۲: شاهد منفی (فاقد الگو)، ستون ۳: شاهد مثبت (جدایه لوبیا)، ستون ۴: شاهد منفی (گیاه سالم)، ستون‌های ۵ تا ۹: جدایه‌های G85، I18، Se49، D31 و Sh8 ویروس BCMV به‌دست آمده از مزارع یونجه استان سمنان می‌باشد ۷۸

شکل ۳-۱۶- ستون ۱: نشانگر یک کیلو بازی (فرمنتاس-لیتوانی) و ستون ۲ تا ۷: تکثیر قطعه ۹۰۰ جفت‌بازی از ناحیه ژن پروتئین پوششی در جدایه‌های I27، G20، D41، Se71 و Sh45 ویروس BYMV در مزارع یونجه استان سمنان ۷۸
شکل ۳-۱۷- ستون ۱: نشانگر یک کیلو بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون‌های ۲، ۳: شاهد مثبت به‌ترتیب جدایه CMV گوجه-فرنگی و خیار، ستون‌های ۴ و ۵: شاهد منفی به‌ترتیب شاهد سالم و شاهد فاقد الگو، ستون‌های ۶ تا ۱۱: جدایه‌های G60، I19، I37، D21، Se44 و Sh35 ویروس CMV به‌دست آمده از مزارع یونجه استان سمنان که منجر به تکثیر قطعه دی.ان.ای با اندازه مورد انتظار حدود ۸۵۰ جفت باز شده‌اند ۸۰
شکل ۳-۱۸- ستون ۱: نشانگر یک کیلو بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون‌های ۲ و ۸: شاهد منفی به‌ترتیب بافت سالم و واکنش فاقد الگو (آر.ان.ای)، ستون‌های ۳ تا ۷: تکثیر قطعه دی.ان.ای بااندازه مورد انتظار حدود ۹۰۰ جفت باز مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی پنج جدایه I59، D21، G63، Sh92 و Se71 ویروس PSV به‌دست آمده از مزارع استان سمنان ۸۰
شکل ۳-۱۹- ستون ۱: نشانگر مولکولی (M) ۱۰۰ جفت‌بازی (فرمنتاس-لیتوانی)، ستون ۲ و ۳: شاهد منفی به‌ترتیب بافت سالم و واکنش فاقد الگو، ستون‌های ۴ تا ۸: جدایه‌های D74، G48، G67، I51 و Sh23 ویروس SbDV به‌دست آمده از مزارع یونجه استان سمنان می‌باشد ۸۱
شکل ۳-۲۰- نقشه تحدید آنزیمی محصول PCR بطول ۶۰۰ جفت‌بازی مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی جدایه G67 ویروس SbDV با بکارگیری دو آنزیم برشی *Sma*I و *Rsa*I. ستون SmaI: تیمار محصول PCR با آنزیم *Sma*I که واکنشی بدنبال نداشته‌است؛ ستون RsaI: تیمار محصول PCR با آنزیم *Rsa*I که طی برش در یک محل منجر به تولید دو قطعه ۴۰۰ و ۲۰۰ جفت بازی شده‌است؛ ستون M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (فرمنتاس، لیتوانی)؛ ستون C: محصول PCR بدون تیمار با آنزیم برشی ۸۲
شکل ۳-۲۱- درخت تبارزایی رسم شده به روش NJ بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی شش جدایه ایرانی AMV بدست آمده در این تحقیق و ۵۷ جدایه این ویروس از دیگر مناطق جهان ۸۴
شکل ۳-۲۲- درخت تبارزایی NJ مربوط به توالی نوکلئوتیدی ژن CP شش جدایه ایرانی بدست آمده در این تحقیق و دو جدایه نماینده از هر یک از زیرگروه‌های I و II ویروس موزائیک یونجه ۸۵
شکل ۳-۲۳- درخت تبارزایی NJ مربوط به توالی اسیدآمینه‌ای CP شش جدایه ایرانی بدست آمده در این تحقیق و دو جدایه نماینده از هر یک از زیرگروه‌های I و II ویروس موزائیک یونجه ۸۵

مقدمه

خانواده لگومینوز (نیامداران، بقولات، حبوبات) یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی می‌باشد که به سبب دارا بودن میزان بالای پروتئین خام و ویتامین‌ها اهمیت ویژه‌ای در تکمیل زنجیره غذایی اکوسیستم‌ها دارا می‌باشد. اعضای این خانواده به خصوص یونجه در بین گیاهان علوفه‌ای دارای جایگاه کلیدی و برجسته‌ای بوده و در سیستم‌های کشاورزی پایدار با آب و هوای معتدله سازگاری بالایی نشان می‌دهد. نقش گیاهان علوفه‌ای درتعلیف دام و در نتیجه تامین نیاز غذایی انسان به فراورده‌های دامی، از اهمیت غیر قابل انکاری برخوردار است. با این وجود متاسفانه در کشور ما به تولید و مدیریت گیاهان علوفه‌ای، در مقایسه با سایر محصولات زراعی، کم‌تر توجه شده است و به این ترتیب عدم توجه لازم به افزایش کمی و کیفی علوفه، موجب کمبود گوشت و مواد لبنی و پایین آمدن کیفیت آن‌ها شده است. این گروه از گیاهان دارای اهمیت بسیار فراوانی می‌باشند که از جمله آن‌ها می‌توان به افزایش نیتروژن اراضی طبیعی به ویژه در سیستم‌های چرای آزاد دام‌ها، ارزش غذایی زیاد و اثر مفید آن‌ها بر ساختار خاک اشاره کرد. لگوم‌ها از نظر ارزش غذایی و نیز ارزش خوراکی نسبت به گراس‌ها دارای ارزش بیشتری هستند. فیبر کمتر و تراکم بالای پروتئین و مواد معدنی موجود در آن‌ها منجر به تسهیل فرایندهای هضم و جذب می‌شود. این مزایا باعث افزایش مصرف علوفه‌ای آن‌ها شده است. در ایران محصولات علوفه‌ای بخصوص یونجه از مهمترین محصولات علوفه‌ای خانواده لگومینوزه در اغلب مناطق به ویژه در استان سمنان می‌باشد. سطح کشت این محصول در کل کشور ۵۹۸۰۰۰ هکتار و مقدار تولید آن ۵/۷ میلیون تن در سال می‌باشد. سطح کشت یونجه در استان سمنان ۵۶۰۰ هکتار و مقدار تولید آن ۴۶۰۰۰ تن در سال می‌باشد. عمده ارقام مورد کشت در این استان شامل رقم یزدی و بمی می‌باشند. کشت یونجه در ایران را عوامل محدود کننده‌ی زیادی از جمله عوامل بیماری‌زا تهدید می‌کند. از مهمترین دلایل پایین بودن نسبی عملکرد یونجه، شیوع بیماریهای ویروسی در این محصول می‌باشد. با توجه به این که یونجه گیاهی چند ساله می‌باشد، لذا گسترش و خسارت ویروس در این محصول هر ساله با فعالیت ناقلین افزایش می یابد. از طرفی این گیاه به صورت منبعی دائمی جهت بقا و پراکندگی ویروس‌ها به دیگر لگوم ها و محصولات با ارزش زراعی عمل نموده وخسارت را دو چندان می نماید. بیش از ۳۱ ویروس از جنس‌های مختلف قادر به آلوده ساختن یونجه می‌باشند که بیانگر حساسیت بالای این محصول به عوامل بیمارگر ویروسی می‌باشد.

شناسایی دقیق عامل بیماری، اولین گام جهت مبارزه با آن می‌باشد. تعیین گسترش و خسارت، شناسایی ناقلین بالقوه، شناسایی سایر میزبان‌های زراعی و غیر زراعی عوامل ویروسی در مزارع گیاهان علوفه‌ای از جمله یونجه برای تعیین روش‌های مناسب کنترل و کاهش خسارت به محصول و پیشگیری از انتقال بیماری و بروز اپیدمی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. استفاده از ارقام مقاوم، مبارزه با ناقلین، از بین بردن میزبان‌های پایا و همچنین در مورد ویروس‌های بذرزاد، استفاده از بذور سالم و عاری از ویروس، جهت مقابله با این بیماری‌ها توصیه می‌گردد. از جمله ویروس‌های شایع و مهم بیمارگر در یونجه می-توان به ویروس موزاییک یونجه (*Alfalfa Mosaic Virus*-AMV)، ویروس موزاییک معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus*-BCMV)، ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*-BYMV) و ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*-CMV) اشاره نمود. ویروس AMV به تنهایی قادر به ایجادخسارت اقتصادی بالای در ارقام مختلف یونجه می‌باشد.

تاکنون هیچ تحقیق مدونی در زمینه ردیابی و تعیین فراوانی ویروس‌های بیمارگر در مزارع یونجه کشور بویژه استان سمنان به عمل نیامده است. با توجه به مشاهده علائم مشکوک به بیماری‌های ویروسی در مزارع یونجه استان سمنان و از طرفی نیاز برنامه‌های مدیریت این گونه بیماری‌ها به شناسایی و تعیین فراوانی هر یک از عوامل مهم بیمارگر، در این تحقیق وضعیت

آلودگی مزارع یونجه به چهار ویروس مهم AMV، BCMV، BYMV و CMV در مناطق مهم کشت این محصول در استان سمنان مورد بررسی قرار گرفت. این ویروس‌ها به دلیل امکان انتشار از طریق بذر و شته‌ها اهمیت اقتصادی و اپیدمیولوژیکی زیادی دارند و سبب خسارت و کاهش عملکرد محصول می‌گردند. اطلاعات بدست آمده در این تحقیق در خصوص فراوانی و پراکنش بیماری‌های ویروسی مهم یونجه در استان سمنان، در اتخاذ تدابیر لازم جهت مدیریت این بیماری‌ها به ویژه در انتخاب نوع ارقام یونجه متحمل و نیز انتخاب مناطق مناسب‌تر جهت احداث مزارع بذری یونجه اهمیت کاربردی مهمی دارند. تهیه بذور سالم و استفاده از آنها در احداث مزارع یونجه علوفه‌ای از گام‌های مهم در جهت مدیریت و کاهش خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی و افزایش عملکرد این محصول می‌باشد.

کلیات، و بررسی منابع

۱-۱- سطح زیر کشت نباتات علوفه‌ای کشور

حدود یک میلیون هکتار معادل ۷/۵ درصد از سطح برداشت محصولات سالانه کشور در سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸ متعلق به نباتات علوفه ای بوده که از این مقدار ۸۷/۹ درصد به صورت آبی و۱۲/۱ درصد به صورت دیم کشت شده است. از کل سطح نباتات علوفه‌ای ۶۲/۶ درصد به یونجه و ۷/۳ درصد به شبدر اختصاص داشته و سهم سایر علوفه ۳۰/۱ درصد بوده است. در سال زراعی فوق کل تولید نباتات علوفه‌ای حدود ۱۷/۹ میلیون تن بوده است. از این مقدار تولید علوفه ۹۰/۶ درصد از اراضی آبی و ۹/۴ درصد بقیه از اراضی دیم بدست آمده است. سطح کشت یونجه در استان سمنان ۵۶۰۰ هکتار و مقدار تولید آن ۴۶۰۰۰ تن در سال می‌باشد [بی نام، ۱۳۸۹].

۱-۲- تاریخچه گیاه یونجه

کشت یونجه سابقه بسیار طولانی دارد که قدمت آن به ابتدای تاریخ تمدن بشری می‌رسد و مدت‌ها پیش از آن که در تاریخ ثبت گردد، مورد کشت قرار می‌گرفته است. اکنون نیز به صورت وحشی از چین تا اسپانیا و از سوئد تا افریقای شمالی یافت می‌گردد و به علاوه با شرایط جنوب آفریقا، استرالیا، نیوزیلند و شمال و جنوب آفریقا سازگاری دارد [Small, 2011]. ارزش یافتن گیاهان علوفه‌ای به ظاهر، همزمان با اهلی کردن حیوانات وحشی بوده است. تاریخ کشت یونجه به دوره مادها و هخامنشی‌ها می‌رسد. در مورد چگونگی وارد شدن یونجه به یونان چنین گزارش شده است که در نتیجه شکست خشایار شاه در سال ۴۷۹ پیش از میلاد و عقب نشینی ارتش ماد از خاک یونان، یونانی‌ها برای اولین بار بقایای یونجه‌زارهایی را که مهاجمان در پشت سنگرهایشان جهت تغذیه اسب‌های ارابه کش و حیوانات اهلی کاشته بودند، مشاهده کردند و این گیاه را به مناسبت این که به مادها تعلق داشت مدیک[1] نامیدند. بعد این واژه در ادبیات به مدیکا و در مجموعه لغات و اصطلاحات علمی گیاه-شناسی به مدیکاگو[2] تبدیل و بکار برده شده است. یونجه در سلسله مادها جزو علوفه اسب محسوب می‌شد و به همین جهت ریشه گیاه‌شناسی آن هربا مدیکا[3] است که به معنی علف مادها آمده است [کریمی، ۱۳۶۸]. عده‌ای منبع یونجه را بین‌النهرین می‌دانند و معتقدند که این گیاه از آنجا به عربستان و بعد به منطقه مدیترانه منتقل شده است. یونجه توسط اسپانیایی‌ها به دنیای جدید برده شده است [کوچکی، ۱۳۶۴]. بر اساس تقسیم بندی وایلوف، مبدأ اصلی یونجه در خاور نزدیک مانند آسیای صغیر، قفقاز، ایران و مناطق کوهستانی ترکمنستان می‌باشد. مرکز جغرافیایی یونجه را اغلب ایران (نواحی مجاور شمال غرب)

[1] . Medic
[2] . Medicago
[3] . Herba media

می‌دانند. آنچه در مورد تاریخچه یونجه باید دانست، اهمیت غذایی آن است که زودتر از هر گیاه علوفه‌ای دیگر باعث اهلی کردن آن گردید [کریمی، ۱۳۶۹]. یونجه‌های یکساله نیز برای اولین بار در ایران کشت شدند و حدود ۴۰۰ سال قبل از میلاد بذر آن به وسیله کاروان‌های تجارتی به اروپا برده شد [حیدری شریف آباد و ترک نژاد، ۱۳۷۹].

۱-۳- خصوصیات گیاه‌شناسی یونجه

بر اساس رده‌بندی عالم گیاهان، یونجه از شاخه پیدا زادان (Phanerogames)، زیر شاخه نهاندانگان (Angiospermes)، رده دولپه‌ایها (Dicotyledones)، زیر رده جدا گلبرگ‌ها (Doalypetals)، راسته گل سرخیان (Rosales)، تیره بقولات (Fabaceae)، زیر تیره پروانه آساها (Papilionaceae)، طایفه سه برگچه‌ایها (Trifoleae) می‌باشد. تاکنون ۸۷ گونه یونجه شناسایی شده است که یک سوم آن‌ها چند ساله و دو سوم آن‌ها یک ساله می‌باشند [حیدری شریف آباد و ترک نژاد، ۱۳۷۹].

جدول ۱-۱- طبقه بندی گیاه یونجه

شاخه	پیدا زادان	Phanerogames	Division
زیرشاخه	نهاندانگان	Angiospermae	Sub Dvision
رده	دولپه‌ایها	Dicotyledons	Class
زیررده	جدا گلبرگ‌ها	Dialypetales	Subclass
راسته	گل سرخ	Rosales	Order
تیره	بقولات	Fabaceae	Family
زیر تیره	پروانه آسا	Papillionaceae	Sub Family
طایفه	سه برگچه‌ایها	Trifoleae	Tribe
جنس	یونجه	Medicago	Genus

تعداد گونه‌های یونجه در ایران بر اساس نمونه‌های موجود در هرباریوم‌ها ۱۶ گونه می‌باشد [حیدری شریف آباد و ترک نژاد، ۱۳۷۹]. یونجه با نام علمی *Medicago sativa* L. گیاهی است علفی و چند ساله که ارتفاع آن تا یک متر می‌رسد. برگ‌های آن دارای سه برگچه می‌باشد. برگچه‌ها دندانه دار، سبز رنگ و بیضی شکل است. گل‌های یونجه به رنگ بنفش تیره یا آبی روشن است. میوه به شکل حلزونی مرکب از چندین حلقه بوده و دانه داخل میوه، شبیه لوبیا ولی کوچک‌تر از آن می‌باشد [Small, 2011]. از یونجه به عنوان ملکه و شاه علوفه‌ها نام برده می‌شود. یونجه معمولاً به عنوان گیاهی چند ساله کشت شده و به ندرت به صورت یکساله کشت می‌شود. میزان پروتئین خام یونجه ۲۲-۱۵ درصد می‌باشد به طوری که بیش از ۲ تن پروتئین در هکتار در سال تولید می‌نماید که دو برابر میزان پروتئین موجود در سویا می‌باشد [Small, 2011].

یونجه تازه در بسیاری از کشورها مانند چین، روسیه و آمریکا به مقدار زیادی به جای اسفناج مصرف می‌شود. در حال حاضر بزرگ‌ترین تولید کننده یونجه در جهان آمریکا می‌باشد و حدود یک سوم سطح زیر کشت این محصول را در دنیا دارد [حیدری شریف آباد و ترک نژاد، ۱۳۷۹]. میانگین محصول با توجه به آب و هوای هر منطقه بین ۱۲-۴ تن علوفه خشک در سال می-باشد. یونجه همانند دیگر بقولات در گره‌های موجود در ریشه خود با باکتری‌های تثبیت کننده ازت رابطه همزیستی برقرار می-کند و قادر به تثبیت بیولوژیکی ازت خاک بوده، بر حاصلخیزی خاک می‌افزاید و برای جلوگیری از فرسایش خاک نیز بسیار مناسب است. عمر این گیاه بین ۲۰-۴ سال می‌باشد اما معمولاً عمر مفید آن ۷ سال است [کریمی، ۱۳۶۹]. برخی از ارقام یونجه که دارای سطح کشت وسیع‌تری در کشور هستند عبارتند از: همدانی، یزدی، بمی، بغدادی، رنجر، کدی، سیمرجنسک، نیک شهری، مائوپا و درختی. کشت یونجه در همه جای ایران میسر است زیرا خاک قلیایی و هوا گرم است. لیکن در مناطق کرانه خزر به دلیل رطوبت بیش از اندازه خاک و اسیدی بودن آن رشد و نمو مطلوبی نخواهد داشت [کریمی، ۱۳۶۹].

۱-۴- بیماری‌های ویروسی انواع یونجه

آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز از جمله عوامل محدود کننده زراعت یونجه می‌باشند. بخش عمده‌ای از بیماری-های یونجه را آلودگی‌های ویروسی شامل می‌شوند. جنس یونجه مورد حمله دست کم ۳۱ ویروس از ۱۳ جنس مختلف ویروسی قرار می‌گیرد [Stuteville and Erwin, 1990; van Leur and Kumari, 2011]. بسیاری از این ویروس‌ها در داخل مزارع و بین مزارع یونجه توسط گونه‌های مختلف حشرات منتشر می‌شوند. ناقلین غالب، گونه‌های شته می‌باشند که موجب انتشار مزرعه‌ای ویروس موزائیک یونجه (*Alfalfa mosaic virus*-AMV)، ویروس توته‌ای یونجه (*Lucerne enation virus*-LEV)، دو کوکوموویروس (*cucumovirus*)، دو لوتئوویروس (*Luteovirus*)، ویروس موزائیک توته‌ای نخودفرنگی (*Pea enation mosaic virus*-PEMV) و پنج پوتی ویروس (*Potyvirus*) دیگر می‌شوند [Stuteville and Erwin, 1990; Brunt *et al*., 1996]. چندین گونه از سوسک‌ها ناقل جنس‌های بروموویروس (*Bromovirus*)، کوموویروس (*Comovirus*) و سوبموویروس (*Sobemovirus*) می‌باشند. اعضای جنس رابدویروس (*Rhabdovirus*) توسط گونه‌های مختلف حشرات منتقل می‌شوند، اما ویروس توته‌ای یونجه توسط شته منتقل می‌شود. ناقلین طبیعی پوتکس ویروس‌ها (*Potexvirus*) هنوز به طور کامل شناسایی نشدند، ولی به احتمال زیاد ناقلین، سوسک‌ها، ملخ‌ها و دیگر حشرات با قطعات دهانی سایینده می‌باشند. به نظر می‌رسد ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus*-TRV) با تریپس منتقل می‌شود. دیانتوویروس‌ها (*Dianthovirus*) نیز به طور مستقیم توسط خاک منتقل می‌شوند و تاکنون برای آن‌ها ناقلی شناسایی نشده است. گونه‌های خاصی از نماتودها

اعضای جنس نپوویروس (*Nepovirus*) و توبراویروس (*Tobravirus*) را منتقل می‌نمایند [Stuteville and Erwin, 1990; Brunt *et al*., 1996]. احتمالاً ویروس‌های بیشتری نسبت به آنچه تاکنون گزارش شده‌اند قادر به آلوده کردن یونجه می‌باشند. برخی ویروس‌های آلوده کننده یونجه را به سختی می‌توان در شرایط گلخانه به یونجه منتقل نمود که تاکنون منجر به گمانه زنی‌های نادرست بسیاری در مورد مقاومت برخی کلون‌های یونجه شده است [Stuteville and Erwin, 1990].

خسارت ویروس‌ها بر توان و عملکرد گیاه یونجه تحت تأثیر برهمکنش بین سه عامل استرین ویروسی، ژنوتیپ میزبان و فاکتورهای محیطی می‌باشد. با وجود حساسیت گیاهان یونجه به بسیاری از ویروس‌ها، این محصول به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به آلودگی‌های ویروسی و حتی نسبت به آلودگی همزمان به چند ویروس مختلف، متحمل می‌باشد. اطلاعات زیادی پیرامون ویروس‌های معمول یونجه جمع آوری شده است، نه فقط به سبب تأثیر آن‌ها بر یونجه، بلکه به علت خسارت شدید ناشی از این ویروس‌ها بر حبوبات زراعی مهم (لوبیا، نخود، عدس و غیره..) است که در نتیجه انتشار توسط ناقلین به خارج مزارع یونجه می‌باشد. برای مثال ویروس‌های زیر توسط شته نخود (*Acyrtosiphon pisum*) از یونجه به مزارع نخود فرنگی (*Pisum sativum* L.) منتقل می‌شوند: ویروس موزائیک توته‌ای نخود فرنگی، ویروس پیچیدگی برگ لوبیا (*Bean leaf roll virus*-BLRV)، ویروس موزائیک یونجه و ویروس رگه‌ای نخود (*Pea streak virus*-PeSV) [Stuteville and Erwin, 1990].

استرین‌های ویروس موزائیک یونجه بیشترین خسارت و کاهش عملکرد علوفه ناشی از ویروس‌ها را در گیاه یونجه در سطح جهانی دارا می‌باشند [Stuteville and Erwin, 1990].

پژوهش‌ها نشان داده است که ویروس موزائیک رگبرگ شبدر قرمز (*Red clover vein mosaic virus*-RCVMV) ممکن است بسیار مخرب‌تر از آنچه تاکنون گمان می‌رفته باشد. خسارت ناشی از ویروس رگه‌ای ناپایدار یونجه (*Lucerne transient streak virus*-LTSV) همچنین نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. ویروس توته‌ای یونجه مختص کشورهای حاشیه مدیترانه و عربستان بوده و در آنجا بسیار خسارت زا می‌باشد [Stuteville and Erwin, 1990]. یونجه به ویروس زردی غربی چغندر (*Beet western yellows virus*-BWYV) و ویروس کوتولگی سویا (*Soybean dwarf virus*-SbDV) حساس بوده و می‌تواند میزبان نگه‌دارنده مناسبی برای این ویروس‌ها باشد. جونز [Jones, 2004] و حاج قاسم و همکاران [Haj Kassem *et al*., 2001] دو ویروس مورد نظر را به ترتیب در غرب استرالیا و سوریه گزارش نمودند. همچنین ویروس پژمردگی خالدار گوجه فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*-TSWV) توسط جنسر و همکاران [Jenser *et al*., 2001] در تریپس‌های جمع‌آوری شده از مزارع یونجه ردیابی شده است. در جدول ۱-۲ فهرست ویروس‌های آلوده کننده یونجه آورده شده است.

جدول ۱-۲- ویروس‌هایی آلوده کننده یونجه [Stuteville and Erwin, 1990; Van Leur&Kumari, 2011]

ویروس	جنس	خانواده	مورفولوژی پیکره و ماهیت ژنوم
Alfalfa cryptic virus 1	*Alphacryptovirus*	*Partitiviridae*	dsRNA-2 linear segments, icosahedral
Alfalfa mosaic virus	*Alfamovirus*	*Bromoviridae*	+ssRNA- 3 linear segments, icosahedral,bacilliform
Bean leaf Roll virus	*Luteovirus*	*Luteoviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, icosahedral
Bean yellow mosaic virus	*Potyvirus*	*Potyviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, filamentous
Beet mosaic virus	*Potyvirus*	*Potyviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, filamentous
Beet western yellows virus	*Polerovirus*	*Luteoviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, icosahedral
Broad bean mottle virus	*Bromovirus*	*Bromoviridae*	+ssRNA- 3 linear segments, icosahedral
Broad bean stain virus	*Comovirus*	*Secoviridae*	+ssRNA- 2 linear segments, icosahedral
Clover yellow mosaic virus	*Potexvirus*	*Alphaflexiviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, filamentous
Clover yellow vein virus	*Potyvirus*	*Potyviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, filamentous
Cowpea aphid-borne mosaic virus	*Potyvirus*	*Potyviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, filamentous
Cucumber mosaic virus	*Cucumovirus*	*Bromoviridae*	+ssRNA- 3 linear segments, icosahedral
Faba bean necrotic yellows virus	*Nanovirus*	*Nanoviridae*	+ssDNA- 8 circular segments, icosahedral
Lucerne Australian latent virus	*Nepovirus*	*Secoviridae*	+ssRNA- 2 linear segments, icosahedral
Lucerne Australian symptomless virus	*Nepovirus*	*Secoviridae*	+ssRNA- 2 linear segments, icosahedral
Lucerne enation virus	*Unassigned*	*Rhabdoviridae*	-ssRNA - 1 linear segment, bacilliform
Lucerne transient Streak virus	*sobemovirus*	*Unassigned*	+ssRNA- 1 linear segment, icosahedral
Pea early browning virus	*Tobravirus*	*Virgaviridae*	+ssRNA- 2 linear segments,rod-shaped
Pea enation mosaic virus	*Enamovirus*	*Luteoviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, icosahedral
Pea streak virus	*carlavirus*	*Betaflexiviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, filamentous
Peanut stunt virus	*Cucumovirus*	*Bromoviridae*	+ssRNA- 3 linear segments, icosahedral
Red clover necrotic mosaic virus	*Dianthovirus*	*Tombusviridae*	+ssRNA- 2 linear segments, icosahedral
Red clover mottle virus	*Comovirus*	*Secoviridae*	+ssRNA- 2 linear segments, icosahedral
Red clover vein mosaic virus	*carlavirus*	*Betaflexiviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, filamentous
Soybean dwarf virus	*Luteovirus*	*Luteoviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, icosahedral
Sweet clover necrotic virus	*Dianthovirus*	*Tombusviridae*	+ssRNA- 2 linear segments, icosahedral
Tobacco ringspot virus	*Nepovirus*	*Secoviridae*	+ssRNA- 2 linear segments, icosahedral
Tobacco streak virus	*Ilarvirus*	*Bromoviridae*	+ssRNA- 3 linear segments, icosahedral
Tomato black ring virus	*Nepovirus*	*Secoviridae*	+ssRNA- 2 linear segments, icosahedral
Tomato ringspot virus	*Nepovirus*	*Secoviridae*	+ssRNA- 2 linear segments, icosahedral
Watermelon mosaic virus	*Potyvirus*	*Potyviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, filamentous
White clover mosaic virus	*Potexvirus*	*Alphaflexiviridae*	+ssRNA- 1 linear segment, filamentous

۱-۴-۱- ویروس توته‌ایی یونجه (LEV)

بیماری توته‌ایی یونجه، از بیماری‌های ویروسی مهم در جنوب فرانسه، اسپانیا، تمام کشورهای حاشیه مدیترانه و همچنین عربستان سعودی می‌باشد. این ویروس اولین بار توسط الیوت و همکاران [Alliot and Signoret, 1972] از جنوب فرانسه گزارش شد. در اثر رشد نابجای اپیدرم موجود در پشت برگ گیاهان آلوده، رشته‌ها و برجستگی‌هایی به طول چند میلی متر