شناسایی و پراکندگی ویروس‌های آلوده کننده خیار گلخانه‌ای در منطقه جیرفت و بررسی برخی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی ویروس موزائیک زرد کدو *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)

مهدی شعبانیان[۱]، حسین معصومی[۱]، اکبر حسینی‌پور[۱]، جهانگیر حیدرنژاد[۱] و ذبیح‌اله اعظمی[۲]

چکیده

در طی نمونه برداری از گلخانه‌های خیار منطقه جیرفت در سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۳، ۱۲۹۴ نمونه دارای علائمی از قبیل موزائیک، بدشکلی و تاولی شدن برگ و میوه جمع آوری گردید. با استفاده از آزمون‌های الایزا و ایمنی سنجی نقطه‌ای Dot immunobinding assay (DIBA) ویروس‌های موزائیک زرد کدو *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)، موزائیک هندوانه ۲ *Watermelon mosaic virus-2* (WMV-2)، موزائیک خیار *Cucumber mosaic virus* (CMV) و پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) شناسایی و تعیین پراکنش شدند. این بررسی نشان داد که خیار گلخانه‌ای به ویروس‌های فوق آلوده است و ZYMV شایع‌ترین ویروس بر روی خیار گلخانه‌ای می‌باشد. انتقال ویروس‌های شته زاد توسط چهار گونه شته شامل *Aphis fabae*، *A. craccivora*، *A.gossypii* و *Myzus persicae* مورد بررسی گرفت. ویروس موزاییک زرد کدو دارای بالاترین درصد انتقال بین ویروس‌های فوق بود و *A. craccivora* با راندمان بالای ۶۰ درصد با شته‌های فوق منتقل شد. WMV-2 تنها توسط شته *A. gossypii* منتقل نگردید. آلودگی نمونه‌های آلوده به ZYMV در روش RT-PCR با یک جفت آغازگر که قطعه‌ای به طول ۴۵۸ جفت باز از ژن پروتئین پوششی را تکثیر می‌کرد، تأیید شد. آزمون TAS-ELISA با استفاده از آنتی سرم‌های مونوکلونال کانادایی نشان داد که جدایه جیرفت به شاخه یک یا دو از گروه A متعلق می‌باشد. در آموده نسبتاً خالص ویروس پیکره‌های رشته‌ای انعطاف پذیر با طول تقریبی ۷۹۰ نانومتر با میکروسکپ الکترونی مشاهده شد. وزن مولکولی پروتئین پوششی این ویروس با روش الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید ۳۶/۲ کیلو دالتون تعیین و در آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی سرم تهیه شده بر علیه ویروس به عنوان شناساگر پروتئین پوششی ویروس تأیید گردید. این اولین گزارش از حضور ویروس‌های فوق روی خیار گلخانه‌ای در منطقه جیرفت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: خیار، ویروس، گلخانه، جیرفت، الایزا، RT-PCR

مقدمه

منطقه جیرفت از جمله مناطق بسیار مهم کشاورزی ایران است، سطح زیر کشت صیفی‌جات به صورت زیر پوشش پلاستیک در این منطقه به بیش از ۶۰ هزار هکتار می‌رسد و از این میزان

۱. به ترتیب مربی و استادیاران گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. مربی زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی جیرفت، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]

متجاوز از ۲۵ هزار هکتار به کشت خیار اختصاص دارد. یکی از گیاهان بسیار مهم محصولات جالیزی خیار است که به یقین بیش از سایر این گونه گیاهان مصرف می‌شود (۶). از بین بیماری‌های مختلف کدوئیان، بیماری‌های ویروسی هر ساله موجب بروز خسارت فراوان به این محصولات در سراسر دنیا می‌شوند. اگر آلودگی در مراحل اولیه رشد گیاه صورت گیرد در آن صورت میزان خسارت خیلی شدید خواهد بود ولی آلودگی‌های بعدی تأثیر کمتری روی محصول دارند (۱۹). شدت پراکنش بیماری‌های ویروسی متغیر و به رابطه بین بیمارگر، میزبان، ناقل، شرایط محیطی و موقعیت جغرافیایی محلی که بیماری اتفاق می‌افتد بستگی دارد. بیش از ۴۱ ویروس و چهار ویروئید به‌طور طبیعی و یا آزمایشگاهی یک یا چند گونه از کدوئیان را آلوده می‌نمایند. در بین کدوئیان، خیار به بسیاری از ویروس‌ها حساس بوده و واکنش شدیدتری از خود نشان می‌دهد (۱۹).

مطالعات متعددی در ایران روی بیماری‌های ویروسی در مزارع جالیزی صورت گرفته است. بر اساس این تحقیقات ویروس‌های WMV-2، CMV، *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)، ZYMV، *Squash mosaic virus* (SqMV)، *Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)*، *Watermelon chlorotic stunt virus* (WCSV) و *Ourmia melon virus* (OuMV) از مناطق مختلف ایران گزارش شده‌اند (۲،۳، ۶، ۵، ۱۶ و۲۴). تا کنون هیچ‌گونه گزارشی درزمینه شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌های کدوئیان در گلخانه‌ها وجود ندارد.

با توجه به اهمیت خسارت بیماری‌های ویروسی در گلخانه‌های جیرفت، شناسایی ویروس‌های آلوده کننده خیار و نحوه انتقال ویروس‌های شته زاد مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین به دلیل اهمیت ویروس موزائیک زرد کدو در منطقه، برخی از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی آن تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و شناسایی ویروس‌ها

جهت شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌های آلوده کننده خیار در گلخانه‌های خیار جیرفت، ۱۲۹۴ نمونه از اسفند ماه ۱۳۸۰ تا خرداد ماه۱۳۸۳ از مناطق باقرآباد، وکیل آباد، علی آباد، جهاد آباد، بند سراجی و رودبار جمع آوری گردید. از هر گلخانه با توجه به وسعت آن از بوته‌های آلوده که دارای علائمی از قبیل موزائیک، بدشکلی، تاولی شدن ،کوتولگی و رگبرگ نواری بودند، به طور تصادفی نمونه برداری انجام و هر گیاه آلوده به عنوان یک نمونه داخل یک پاکت گذاشته و در روی آن تاریخ، محل نمونه برداری و نوع رقم کشت شده درج گردید. این نمونه‌ها در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در طولانی مدت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. جهت شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌ها از آزمون‌های الایزا و ایمنی سنجی نقطه‌ای استفاده گردید.

الف) آزمون الایزا(Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA

برای شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌های TSWV، SqMV، CMV، *Cucumber necrosis virus* (CuNV)، *Papaya ring spot virus*-W (PRSV-W)، ZYMV و WMV2 درنمونه‌های جمع آوری شده، از آزمون DAS-ELISA و آنتی سرم‌های چند همسانه‌ای این ویروس‌ها تهیه شده از موسسه تحقیقاتی DSMZ آلمان استفاده گردید. جهت تشخیص ویروس موزائیک خیار CMV از آنتی سرم اهدایی دکتر فیل جونز (IACR-Rothamsted, Harpenden, Hearts, UK) و به روش الایزای غیر مستقیم (Indirect ELISA) استفاده شد.

ب) آزمون Triple antibody sandwich ELISA (TAS-ELISA)

برای تعیین نژادهای ویروس ZYMV از سه آنتی بادی تک همسانه‌ای 1-705، 2-705 و 4-705، اختصاصی نژادهای کانادایی اهدایی دکتر استفان وینتر از مؤسسه تحقیقاتی DSMZ آلمان، استفاده گردید. آزمون‌های الایزا طبق روش کلارک و آدامز (۱۱) انجام شد. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الایزا خوان مدلEL800 (Biotek Instrument) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) با استفاده از فرمول $\bar{X}+3\ SD$ ، آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. در این

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]

فرمول $\bar{x}$ میانگین جذب و SD انحراف معیار استاندارد چاهک‌های سالم است. بر این اساس نمونه‌های بیمار مشخص و درصد آلودگی نقاط مختلف تعیین گردید.

ج) آزمون ایمنی سنجی نقطه‌ای (Dot immunobinding assay (DIBA

این آزمون براساس روش ارائه شده توسط هیبی (۱۴) انجام شد. جهت رنگ آمیزی از قرص‌های ۱۰ میلی‌گرمی حاوی دو ماده NBT و BCIP ساخت شرکت Sigma استفاده گردید و ظهور لکه‌های بنفش رنگ در این روش نشان دهنده آلوده بودن نمونه‌ها به ویروس مورد نظر می‌باشد.

جداسازی، خالص‌سازی بیولوژیکی و تکثیر ویروس‌ها

پس از تشخیص ویروس‌های ZYMV، WMV-2، CMV و TSWV از طریق آزمون‌های سرولوژیکی، جهت جدا سازی این ویروس‌ها از یکدیگر از گیاهان محک و دامنه میزبانی آنها استفاده گردید. جهت خالص سازی بیولوژیکی ویروس‌های ZYMV، WMV-2 و CMV از گیاهان سلمه تره *Chenopodium quinoa* Wild. و *C. amaranticolor* Coste et Reyn و گل تکمه‌ای (*Gomphrena globosa* L.) استفاده شد. خالص سازی بیولوژیکی TSWV با استفاده از گیاه تاتوره (*Datura stramonium* L.) انجام گرفت. پس از ظهور لکه‌ها، با توجه به نوع علائم، لکه‌های مذکور جدا و در یک قطره بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار با pH= ۷ له و روی برگ‌های کدو مسمایی (*Cucurbita pepo* L.var Khoi) در مرحله دو برگی مایه زنی گردیدند. در مورد ویروس TSWV به بافر فوق Na_2SO_3 به میزان ۰/۰۱مولار اضافه و روی برگ‌های توتون (*Nicotiana rustica* L.) در مرحله ۴ برگی مایه زنی گردید.

دامنه میزبانی

برای تعیین دامنه میزبانی و مشاهده علائم ویروس‌های مورد نظر تکثیر و بدین منظور از میزبان‌های متعددی شامل ۲۵ گونه و رقم موجود در ۶ خانواده گیاهی *Ranunculaceae*، *Amaranthaceae*، *Cucurbitaceae*، *Solanaceae*، *Leguminosae* و *Chenopodiaceae* استفاده گردید. عصاره نمونه‌های آلوده به نسبت۱:۱۰ (w/v) در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار با pH= ۷ تهیه و با کمک پودر کاربوراندوم به برگ‌های گیاهان محک مایه زنی گردید. این گیاهان در گلخانه در دمای ۲۵ –۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و نهایتاً هر یک از این گیاهان پس از ۸ تا ۱۴ روز بعد از مایه زنی، با آزمون الایزا مورد بررسی قرار گرفتند.

انتقال ویروس‌ها توسط گونه‌های مختلف شته

برای بررسی درصد انتقال ویروس‌ها توسط شته‌ها از چهار گونه شته استفاده گردید. به این ترتیب که ابتدا نمونه‌هایی از شته‌های موجود در گلخانه‌ها جمع آوری و سپس شناسایی شدند. از نمونه‌های شناسایی شده کلنی‌های سالم و عاری از ویروس تهیه و در روی گیاهان تکثیری پرورش داده شدند. در این میان شته جالیز (*Aphis gossypii*) بر روی کدو، شته سیاه باقلا (*A. fabae*) بر روی باقلا، شته سبز هلو (*Myzus persicae*) بر روی کلم و شلغم و شته سیاه یونجه (*A. craccivora*) بر روی یونجه تکثیر گردیدند. در آزمایش‌های انتقال از یک رقم کدو به‌نام *Cucurbita pepo* L.cv. Peto Seed استفاده گردید. به ازای هر شته و هر ویروس در هر آزمون ۱۰ گیاهچه سالم مایه زنی گردیدند. این آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی و در قالب آزمون فاکتوریل با سه تکرار انجام شدند و تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از برنامه SPSS.12 انجام گرفت. آزمایش‌های انتقال طبق روش کاستل و همکاران، (۱۰)، انجام گرفت.

الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) و وسترن بلات (Western blotting)

جهت تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی (CP) ویروس ZYMV با استفاده از الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) بر مبنای روش اصلاح شده لملی (۱۷) و به صورت عمودی وبا دو ژل بالا و پائین، به ترتیب با غلظت ۴ و ۱۲ درصد انجام شد. مقدار یک گرم از بافت آلوده با ۲میلی‌لیتر از بافر تهیه پروتئین (۰/۵ میلی لیتر Tris-HCL یک مولار ۸

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]

PH=، ۰/۶ میلی لیتر KCL یک مولار، ۶ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول و ۱۰ میلی لیتر آب مقطر) درهاون چینی تمیز روی یخ عصاره گیری شد وعصاره حاصل به میکروتیوب منتقل گردید. میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰۰ دور سانتریفوژ گردید و ۱۰۰ میکرو لیتر از مایع رویی به لوله جدیدی انتقال یافت. عصاره گیاه کدوی سالم و عاری از ویروس به عنوان شاهد به ترتیب فوق آماده گردید.۳۰ میکرولیتر از بافر SDS (4X) (۶/۲۵ درصد Tris-HCL یک مولار PH= ۶/۸، دو درصد SDS، یک درصد گلیسرول، ۴/۵ درصد بتامرکاپتواتانول و یک درصد برم فنل بلو) به هر لوله اضافه گردید و تمام نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه درآ ب در حال جوش قرار داده شدند. برای تهیه مارکر مقدار ۴ میکرولیتر از مارکر به ۶ میکرولیتر بافر SDS اضافه شد و همراه نمونه‌های آلوده و شاهد منفی به مدت ۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار گرفت و بلافاصله بر روی یخ منتقل شد. مارکر ازپروتئین‌هایی در دامنه ۴/ ۱۴ تا ۹۴ کیلودالتون تشکیل شده بود (Amersham Pharmacia Biotech). پس از ریختن ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه پروتئین در چاهک‌های ژل، عمل الکتروفورز انجام شد. پس از رنگ آمیزی با محلول کومازی بلو و رنگبری، از آن عکس تهیه شد. با توجه به وزن مولکولی پروتئین‌های مارکر و میزان حرکت آنها در ژل خط رگرسیون بر رون کاغذ شطرنجی رسم و سپس با توجه به میزان حرکت پروتئین مربوط به ویروس، وزن آن محاسبه گردید. هم‌چنین جهت تشخیص اختصاصی پروتئین پوششی ویروس ZYMV از آزمون وسترن بلات طبق روش ارائه شده توسط سمبروک و همکاران (۲۵) استفاده شد.

بررسی پیکره‌های ویروس ZYMV با میکروسکپ الکترونی

جهت مشاهده پیکره‌های ویروس ZYMV از میکروسکپ الکترونی فیلیپس مدل CM10 استفاده گردید و آماده سازی پولک‌ها به روش (Fixing method) و به این طریق انجام شد. ابتدا یک قطره از آموده نسبتاً خالص ویروس روی پارافیلم گذاشته و پولک‌های مسی به مدت ۱۵ دقیقه از طرف فرموار دار روی آن قرار گرفت. سپس پولک‌ها توسط ۲۰ قطره آب مقطر دو بار تقطیر شستشو و با کاغذ صافی خشک شدند. سپس یک قطره اورانیل استات (UA) دو درصد روی پارافیلم گذاشته و پولک‌های مسی جهت رنگ آمیزی به مدت ۱۰ دقیقه درآن قرار داده و پس از خشک کردن با میکروسکپ بررسی شدند (۱).

استخراج RNAکل گیاه با استفاده از فنول و کلروفرم

یک سانتی‌متر مربع از برگ گیاه آلوده با ازت مایع خرد کرده ۳۰۰ میکرولیتر بافر عصاره‌گیری (گلایسین M ۰/۱، کلرور سدیم ۰/۱M، ۰/۰۱ M EDTA، SDS و مرکاپتواتانول ۱٪، ۹ =pH) اضافه شد، سپس هم حجم بافر، فنل اضافه گردید وبه آرامی به هم زده شد. در مرحله بعد نصف حجم فنل، کلروفرم اضافه گردید وبه آرامی به هم زده و به نسبت ۱:۲۵ حجم آن ایزوآمیل الکل اضافه گردید وبه آرامی به هم زده شد. لوله به مدت ۵ دقیقه در فریزر نگه‌داری و سپس به مدت سه دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور و در دمای۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. پس از حذف رسوب به محلول رویی ۲/۵ برابر اتانول و ۱/۱۰ حجم استات سدیم ۰/۳ مولار اضافه گردید و یک شب در فریزر نگه‌داری شد. آن‌گاه به مدت ۱۵ دقیقه با شرایط قبل سانتریفوژ شد و مایع رویی حذف گردید. به‌دنبال آن لوله‌ها با اتانول ۷۰ درصد شستشو شدند. لوله‌های حاوی اتانول به مدت ۱۰ دقیقه با شرایط قبلی سانتریفوژ شدند و مایع رویی حذف گردید. سرانجام لوله‌ها در روی کاغذ صافی خشک و به هر لوله ۳۰-۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و به آرامی با میکرو پیپت به هم زده شد(۲۸).

استخراج RNA کل با استفاده از RNeasy Plant Mini Kit Qiagen

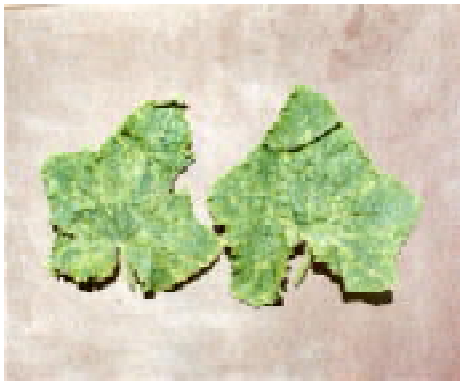
در این حالت طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده RNA (Roche–Diagnostic GmbH, Germany) کل گیاه استخراج گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز - نسخه برداری معکوس (RT-PCR)

برای انجام آزمون ابتدا RNA کل گیاه آلوده به ویروس ZYMV

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]



شکل ۱و۲. علائم ناشی از آلودگی توسط ZYMV بر روی برگ ومیوه خیار در گلخانه‌ها

استخراج و به عنوان الگوی هدف مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا دو میکرولیتر از این RNA اسخراج شده به مدت ۳۰ دقیقه جهت ساخت cDNA با استفاده از ۲۰۰ واحد آنزیم Avian myeloblastosis virus (AMV) و آغازگر معکوس به‌نام R-DAG با توالی (5'-GCGTGGCAATGACAT-3') واقع در موقعیت ۸۷۴۹–۸۷۳۵ ژنوم به شماره L31350 در یک واکنش ۲۰ میکرولیتری در دمای ۴۲ درجه قرار گرفت. آزمون PCR در حجم ۵۰ میکرولیتری شامل پنج میکرولیتر ازcDNA، آغازگرها هر یک به غلظت یک میکرو مولار، ۲۰۰ میکرو مولار از هر یک از چهار داکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۱/۵ میلی‌مولار از $MgCl_2$ با ۵ واحد پلی مراز *Taq* (Fermentas) انجام گرفت. جهت انجام PCR از آغازگرهای R-DAG و F-DAG با توالی (5'-ATTTGCGCTGCGATG-3') واقع در موقعیت ۸۳۰۵–۸۲۹۱ ژنوم به شماره L31350 استفاده گردید. لازم به ذکر است این آغازگرها قطعه‌ای مربوط بهN ترمینال Coat protein (CP) و C ترمینال(Nuclear inclusion body (NIB ژنوم ZYMV را تکثیر می‌کنند. واسرشته سازی اولیه نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. واکنش PCR در ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و بسط ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. در نهایت نمونه‌ها برای مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت(۱۲).

Immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR)

در این روش از عصاره گیاهی استفاده شد. ابتدا در یک لوله نیم میلی‌لیتری، ۲۰۰ میکرولیتر IgG ویروس ZYMV که در بافر پوششی به نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق شده بود، ریخته و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لوله با بافر PBS-T شستشو داده شد و پس از خشک کردن ۲۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی آلوده به آن اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مجددا لوله با بافر PBS-T شستشو و خشک گردید. به دنبال آن مواد لازم برای ساخت cDNA به آن اضافه و سپس سیکل‌های RT-PCR مانند قبل انجام گرفتند (۲۱).

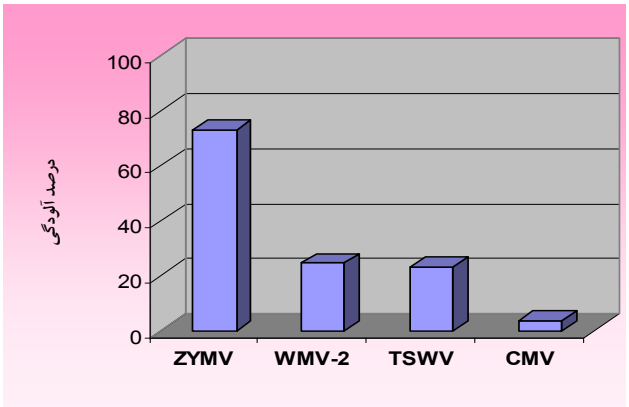
نتایج

ویروس‌های آلوده کننده خیار در گلخانه‌های جیرفت

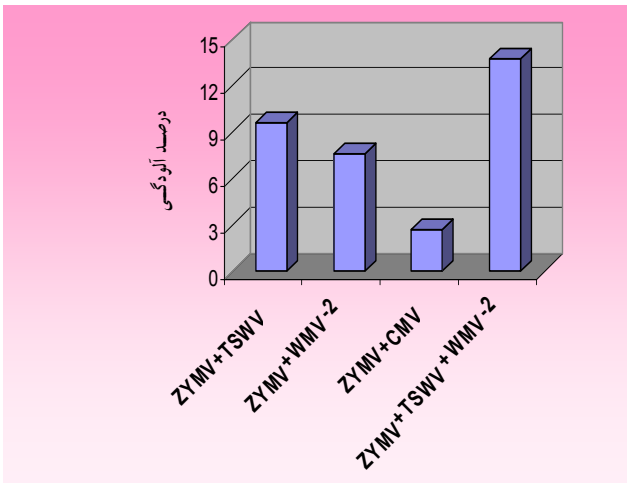
علائم مشاهده شده در بوته‌های آلوده به ویروس در گلخانه‌ها بسیار متنوع بود. عمده ترین علائمی که مشاهده گردید شامل موزائیک همراه با تاولی شدن برگ‌ها به صورت خفیف یا شدید بود (شکل۱). از علائم دیگر می‌توان به بد شکلی برگ‌ها، زردی، تیره شدن قسمتی از برگ، کوتولگی بوته و رگبرگ نواری اشاره کرد. علائم آلودگی در روی میوه‌ها به صورت تاولی شدن، بد شکلی و تغییر رنگ میوه مشاهده شد و به طور کلی در این گیاهان کاهش شدید کیفیت و کمیت محصول مشاهده گردید (شکل۲). شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌های

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]



شکل۳. نمودار درصد آلودگی بوته‌های خیار به ویروس‌های مختلف در منطقه جیرفت



شکل۴. نمودار درصد آلودگی‌های توام بوته های خیار به ویروس‌های مختلف در منطقه جیرفت تعیین دامنه میزبانی ویروس‌های خیار مورد بررسی

آلوده کننده خیار گلخانه‌ای در طی سال‌های ۸۳-۱۳۸۰ با استفاده از ELISA و DIBA انجام گردید.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که ویروس‌های آلوده کننده خیار گلخانه‌ای شامل ZYMV، CMV ، WMV-2 وTSWV بوده که بیشترین آلودگی مربوط به ZYMV و حدود ۷۳ درصد بود. میزان آلودگی به ویروس‌های WMV-2، TSWV و CMV به‌ترتیب ۲۴/۵، ۲۳/۳ و ۳/۸ درصد بود (شکل۳). علاوه بر این، برخی از نمونه‌ها دارای آلودگی‌های دوتایی و سه تایی بودند. آلودگی توام ZYMV+TSWV، ZYMV+WMV-2 و ZYMV+CMV به ترتیب ۹/۶، ۷/۶ و ۲/۶ درصد بود. ۱۳/۷ درصد از نمونه‌ها به سه ویروس ZYMV+TSWV+WMV-2 آلوده بودند (شکل۴). علائم ویروسی در گلخانه‌های خیار عمدتا در اواسط فصل رویشی ظاهر می‌شد که این علائم در اواخر فصل برداشت به اوج خود می‌رسید. در بین ارقام مختلف خیار که در منطقه کشت می‌شد، رقم سینا با بیش از ۸۰ درصد آلودگی دارای حساسیت بیشتری نسبت به سایر ارقام کشت شده داشت.

تعیین دامنه میزبانی ویروس‌های خیار مورد بررسی

نتایج حاصل از بررسی دامنه میزبانی ویروس‌های شناسایی شده

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]

جدول ۱. بررسی دامنه میزبانی ویروس‌های خیار بر روی گیاهان محک.

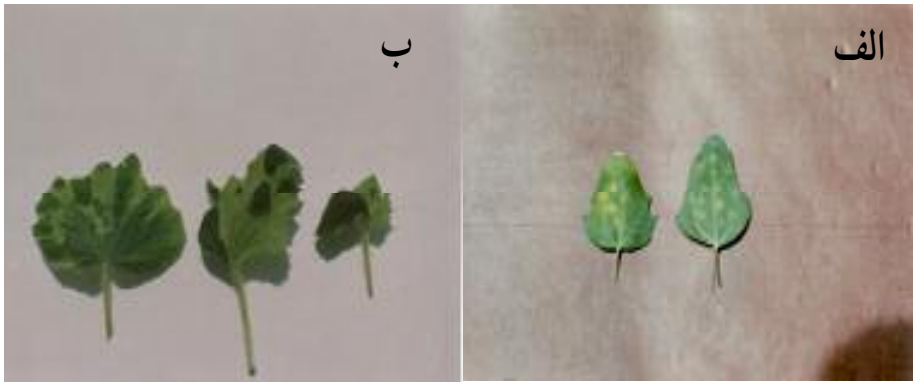
نام علمی/خانواده	ZYMV	WMV2	CMV	TSWV
Cucurbitaceae				
Cucurbita pepo cv. Peto Seed	ss,mo,b	vb, mo	cll,mo,y	no
C. pepo cv. Khoi	mo,b	vc,mo	cll,mo,y	no
C. pepo cv. Maragheh	ss,mo,vb	vc,mo	cll,mo,y	no
Cucumis melo cv. Asgrown	mo, vc	mo	y,w	no
C. melo cv. Melon Seed	b,vc	mo	y,w	no
C. melo cv.Felexusus	mo,vc	mo	w,y,b	no
C. sativus cv. Peto Seed	mo	mo	m,y	no
Chenopodiaceae				
Chenopodium amaranticolor	cll	nll	cll	no
C. quinoa	cll	nll	cll	no
C. mural	no	no	no	no
Solanaceae				
Datura stramonium	no	no	nll,mo	Cll,mo
D. maxima	no	no	y,mo	no
D. metel	no	vb	mo	no
Lycopersicon esculentum cv.Global	no	no	mo,ss	no
Nicotiana rustica	no	no	mo	mo,y
N. clevelandii	no	no	mo,ss	mo
N. glutinosa	no	no	mo,ss	mo
N. tabacum cv. Samsun	no	no	mo	no
N. benthamiana	no	no	mo	no
Amaranthaceae				
Gomphrena globosa	no	no		no
Legominosae				
Phaseolus vulgaris cv. Red Kidney	no	no	no	no
Phaseolus vulgaris cv. Bounifull	no	no	no	no
pisum sativum	no	no	no	no
Rannunculaceae				
Rannunculus sardous	no	no	no	no

ماتلینگ=mo ، موزائیک=m ، تاولی شدن=b ، زردی=y ، رگبرگ نواری=vb ، رگبرگ روشنی=vc ،پژمردگی=w ،بند کفشی=ss ، لکه موضعی کلروز=cll ، لکه موضعی نکروز=nll ، فاقد علائم=no

در جدول ۱ آمده است. در این میان، ویروس‌های ZYMV و CMV روی دو گونه سلمه تره (*Chenopodium quinoa* و *C. amaranticolor*) لکه‌های موضعی کلروتیک ایجاد نمودند اما ویروس WMV-2 لکه‌های موضعی نکروتیک تولید کرد. ویروس‌های ZYMV و WMV-2 بر روی گیاهان خانواده کدوئیان و ویروس CMV علاوه بر کدوئیان روی ارقام مختلف توتون به صورت سیستمیک در آمدند (شکل۵). از گیاه *Ranunculus sardus* به عنوان میزبان افتراقی ZYMV از سایر ویروس‌ها استفاده گردید و تنها این ویروس بر روی آن تکثیر شد. TSWV روی تاتوره (*Datura stramonium*) ابتدا تولید

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]



شکل ۵) الف) لکه موضعی برگ سلمه تره، ب) بدشکلی و ماتلینگ برگ کدو در اثر ZYMV

شکل ۶) الف) لکه موضعی برگ تاتوره، ب) زردی و موزاییک برگ توتون در اثر TSWV

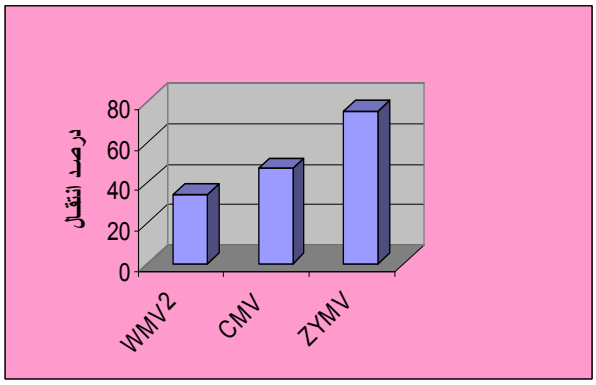
لکه‌های موضعی کلروتیک نمود و سپس به حالت سیستمیک در آمد. علاوه بر این بر روی گونه‌هایی از توتون مانند *Nicotiana rustica* و *N. glotinosa* نیز به حالت سیستمیک درآمد (شکل۶).

تعیین میزان انتقال شته‌ای ویروس‌های شناسایی شده

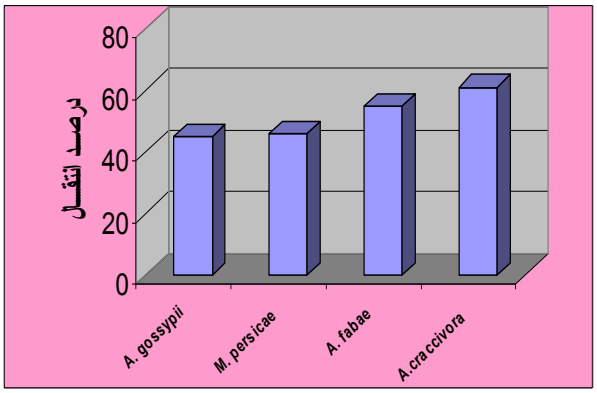
ویروس‌های ZYMV، WMV2 و CMV توسط شته *M. persicae* به ترتیب ۷۶/۷، ۱۶/۷ و ۴۶/۷ درصد و شته *A. gossypii* ویروس‌های ZYMV، WMV2 و CMV را به ترتیب به میزان ۷۳/۳، ۰ و ۶۳/۳ درصد منتقل نمودند. شته *A. fabae* ویروس CMV را به میزان ۳۶/۷ و ویروس‌های ZYMV و WMV2 را به میزان ۷۳/۳ درصد نیز۳ انتقال داد. هم‌چنین شته *A. craccivora* ZYMV، WMV2 و CMV را به ترتیب ۷۶/۷، ۴۶/۷ و ۴۳/۳ منتقل نمود. مقایسه میانگین داده‌ها که با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفته، نشان داد که سه ویروس شته زاد از نظر میزان انتقال با شته‌ها در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند. در این بین ویروس ZYMV دارای بالاترین میزان انتقال حدود ۷۵ درصد و ویروس‌های CMV و WMV-2 به ترتیب به میزان ۴۷/۵ و ۳۴/۱ درصد می‌باشند (شکل ۷). مقایسه میانگین داده‌ها نشان دهنده آن است که دو شته *A. fabae* و *A. craccivora* در یک گروه قرار گرفته و با هم تفاوت معنی‌داری ندارند. در بین چهار شته این دو شته دارای بیشترین میزان انتقال بوده و شته *A. carccivora* دارای بالاترین درصد انتقال به میزان ۶۱ درصد می‌باشد. دو شته دیگر *A. gossypii* و *M. persicae* در گروه دوم قرار گرفتند و دارای کمترین میزان انتقال بوده، به طوری که میزان انتقال شته *A. gossypii* حدود ۴۵/۵ درصد می‌باشد. این دو گروه در سطح احتمال یک درصد دارای

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

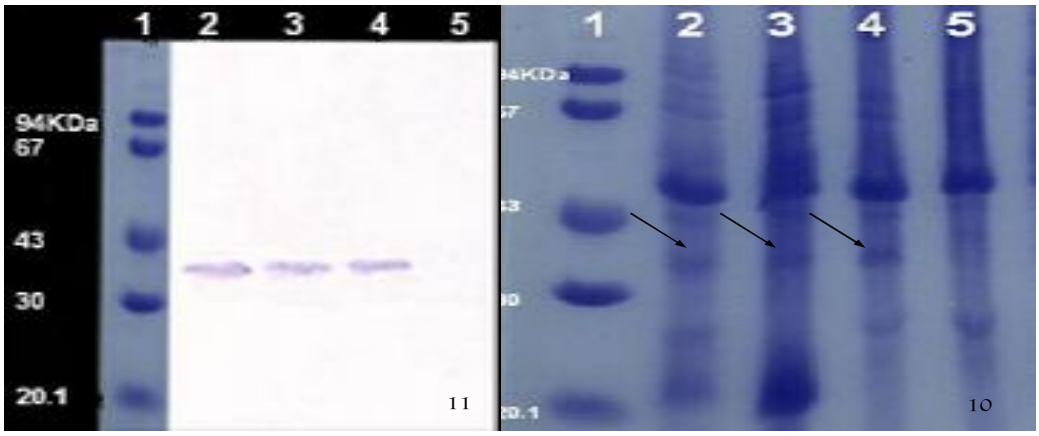
[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]



شکل ۷ . نمودار میانگین درصد انتقال
سه ویروس شته زاد



شکل ۸ . نمودار میانگین درصد انتقال
سه ویروس شته زاد توسط چهار گونه شته



شکل۹. نتایج الکتروفورز عصاره خام گیاهان آلوده به ZYMV در ژل پلی آکریل آمید و وسترن بلات :
شماره ۱ مارکر پروتئینی ، شماره‌های ۲ ، ۳ و ۴گیاهان آلوده و شماره ۵ گیاه سالم

تفاوت معنی‌داری از نظر انتقال سه ویروس مختلف می‌باشند (شکل۸).

تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس ZYMV با استفاده از روش SDS-PAGE و وسترن بلات

وزن مولکولی پروتئین پوششی ZYMV با استفاده از مارکرهای پروتئینی اندازه گیری و اندازه آن حدود ۳۶/۲ کیلو دالتون محاسبه گردید (شکل۹). در روش وسترن بلات پس از رنگ آمیزی، باندهای مخصوص ویروس به صورت خطوط بنفش رنگی روی کاغذ نیتروسلولزی مشاهده گردید (شکل۹).

بررسی پیکره‌های ویروس ZYMV با TEM

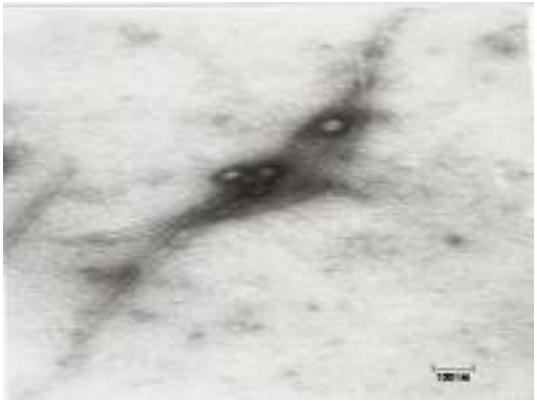
در بررسی پیکره‌های ویروس با میکروسکپ الکترونی پیکره‌های ویروس به صورت رشته‌های انعطاف پذیر که دارای اندازه متوسط ۷۹۰ نانومتر بودند، مشاهده شدند (شکل۱۰).

تعیین نژاد جدایه‌های ZYMV با استفاده از روش TAS-ELISA

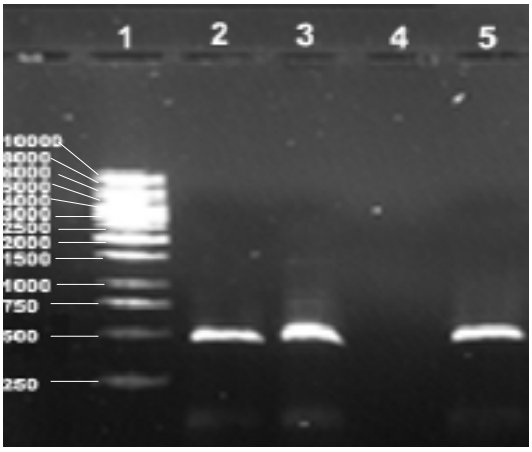
در آزمون TAS-ELISA همه جدایه‌های جدا شده با سه آنتی سرم تک همسانه‌ای ۱- ۷۰۵، ۲- ۷۰۵ و ۴- ۷۰۵ تهیه شده علیه نژادهای کانادایی واکنش نشان دادند.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]



شکل ۱۰. الکترون میکروسکپی ویروس ZYMV با بزرگنمایی ۳۹۰۰۰



شکل ۱۱. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، شماره‌های ۲و ۳ نمونه‌های آلوده، شماره ۱ مارکر(GeneRulerTM 1Kb) و شماره ۴ و ۵ به ترتیب شاهد منفی و مثبت

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR و IC-RT-PCR)

با استفاده از آغازگرهای R-DAG و F-DAG قطعه‌ای در حدود ۴۵۸ bp مربوط به توالی قسمتی از پروتئین پوششی و NIB از نمونه‌های دارای علائم ZYMV تکثیر گردید. این باند در آموده حاصل از گیاه سالم تشکیل نشد و اختلافی نیز در بین باندهای نمونه‌های آلوده مشاهده نگردید (شکل۱۱).

بحث

شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌های آلوده کننده خیار در گلخانه‌های خیار درختی جیرفت در سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۳ نشان داد که ویروس موزاییک زرد کدو (ZYMV) بالاترین میزان آلودگی (۷۳/۱ درصد) را به خود اختصاص داده و کمترین درصد آلودگی مربوط به ویروس موزاییک خیار (CMV) به میزان ۳/۸ می‌باشد. آلودگی‌های توام نیز به میزان زیادی مشاهده شد و شدت علائم در گیاهان دارای آلودگی توام بیشتر از نمونه‌هایی بود که تنها به یک ویروس آلوده بودند. طبق تحقیقات گذشته ویروس‌های WCSV، CMV، SqMV، ZYMV، CGMMV، PRSV-W، WMV-2، TRSV، CYSDV وOMV ،از مناطق مختلف ایران گزارش شده است(۲ ،۳، ۵، ۶، ۱۶ و۲۴). اما همه این گزارشات از گیاهان جالیزی و در شرایط مزرعه بوده است و تا کنون هیچ گونه گزارش مکتوبی در مورد ویروس‌های آلوده کننده کدوئیان به‌خصوص خیار گلخانه‌ای در شرایط گلخانه ارائه نشده است. این اولین گزارش از آلودگی خیار گلخانه‌ای در منطقه جیرفت به ویروس‌هایZYMV ، WMV-2، TSWV و CMV می‌باشد. اکثر علائم مشاهده شده بر روی بوته‌های خیار در گلخانه‌های خیار منطقه جیرفت در طی سال‌های ۸۲-۸۰ با علائم گزارش شده از سایر مناطق جهان مطابقت داشت. میزان آلودگی در گلخانه‌ها گاهی بسیار بالا بود و حدود ۸۰ درصد از بوته‌ها دارای علائم ویروسی بوده و میزان محصول به شدت کاهش یافته بود به طوری که در بسیاری از موارد کاشت این محصول غیر اقتصادی به نظر می‌رسید. در این مناطق مهم‌ترین رقم کشت شده رقم سینا ۱۸۲ بود که با توجه به مقاومت این رقم به سرما و نیز عملکرد بالا، بیشتر از سایر ارقام مورد توجه کشاورزان است. از ارقام دیگر می‌توان به پردیس۳۰۲، Danito، نسیم و ایساتیس اشاره کرد که بر طبق نتایج به‌دست آمده رقم سینا در بین ارقام مذکور نسبت به بیماری‌های ویروسی از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد.

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که ویروس‌های آلوده کننده خیار گلخانه‌ای در منطقه جیرفت با ویروس‌های گزارش شده از سایر کشورها بر روی کدوئیان به‌خصوص خیار در مواردی اختلاف فاحشی دارند. بر اساس مطالعات انجام شده در اسپانیا ویروس‌های غالب کدوئیان شامل CMV و

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]

WMV-2 بوده‌اند در حالی که ZYMV و PRSV-W کمترین میزان آلودگی را داشته‌اند(۲۰). در مالزی ویروس غالب ویروس موزائیک زرد کدو (ZYMV) می‌باشد که در کدو و خیار ایجاد ابلقی و موزائیک می‌کند. اخیرا نیز ویروس موزائیک خیار (CMV)، ویروس موزائیک هندوانه تیپ۲(WMV-2) ، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی (TSWV) و ویروس موزائیک کدو (SqMV) بر روی محصولات جالیزی کشور مالزی شناسائی شده است (۲۶). در فنلاند ویروس CMV ویروس غالب بر روی کدوئیان بوده است. در سوئد و ژاپن ویروس CGMMV به‌عنوان ویروس غالب در مزارع خیار شناسایی شده و این در حالی است که در کشورهای دیگر این ویروس به ندرت بر روی کدوئیان مشاهده شده است. در دیگر کشورهای اروپائی از جمله فرانسه و ایتالیا نیز ویروس‌های عمده CMV، WMV-2، ZYMV و PRSV-Wگزارش شده‌اند که در این بین ZYMV یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین عوامل بیماریزا در کدو و طالبی بوده است (۱۹). در ایالات متحده آمریکا نیز این چهار ویروس از جمله ویروس‌های مشکل ساز بر روی کدوئیان می‌باشند. در دره مرکزی کالیفرنیا WMV-2 ویروس عمده است و بعد از این ویروس ویروس‌های CMV، ZYMV بیشترین خسارت را بر کدوئیان در مزرعه ایجاد می‌کنند (۱۳).

در جزایر هاوایی ویروس‌های ZYMV، PRSV-W و CMV بر روی گونه‌های تجاری کدوئیان از جمله خیار، هندوانه و کدوی تابستانه ردیابی شدند که در بین آنها ZYMV بیشترین درصد آلودگی و CMV کمترین میزان را در بین نمونه‌های آزمایش شده باعث شده بودند. WMV-2 تنها ویروسی است که در این منطقه دیده نشده است (۲۷). در لبنان نیز بیماری‌های ویروسی از عوامل اصلی ایجاد خسارت بر روی تولید محصولات کدوئیان شناخته شده و مهم‌ترین ویروس آلوده کننده کدوئیان در مزارع این کشور ZYMV و *Cucurbit aphid-borne yellows polerovirus* (CABYV) بوده و وجود WMV-2 وPRSV-W و CMV در محصولات این کشور نیز تائید گردیده است (۷). در اردن نیز ویروس ZYMV به‌عنوان مخرب‌ترین ویروس روی کدوئیان گزارش شده است (۹).

با نگاهی به نتایج به‌دست آمده از سایر تحقیقات می‌توان چنین استنباط نمود که در حال حاضر ZYMV مهم‌ترین ویروس مخرب کدوئیان در سطح جهان می‌باشد و بعد از آن می‌توان به ویروس‌های CMV و WMV-2 اشاره کرد، که بررسی اخیر نیز موید این موضوع می‌باشد. اما ویروس دیگری که در گلخانه‌های خیار درختی جیرفت از اهمیت خاصی برخوردار است و در کدوئیان سایر کشورها غیر از مالزی گزارش نشده است، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی می‌باشد و در این مورد ذکر این نکته ضروری است که این ویروس توسط تریپس منتقل می‌شود و از آنجایی‌که در شرایط گلخانه‌ای رشد و تکثیر این ناقل بهترصورت می‌گیرد، لذا وجود این ویروس در گلخانه‌ها به‌خصوص در شرایط خاص آب و هوایی منطقه جیرفت امری طبیعی است. همان‌طوری که در کشور مالزی نیز این ویروس از جمله ویروس‌های مهم بر روی کدوئیان گزارش شده است (۲۶).

در بررسی انتقال ویروس‌های شته زاد توسط شته‌های رایج موجود در گلخانه‌ها مشخص گردید که ویروس‌های ZYMV، WMV-2 و CMV هر سه به آسانی توسط شته منتقل می‌شوند که در این بین ویروس ZYMV دارای درصد انتقال بالاتری نسبت به دو ویروس دیگر است. نتایج حاصل از بررسی انتقال ویروس‌ها توسط شته‌ها این نکته را مشخص نمود که علت اصلی گسترش فراوان و بالا بودن درصد آلودگی بوته‌های خیار به ویروس ZYMV بالا بودن درصد انتقال این ویروس توسط شته‌ها ست. از این‌رو اغلب گلخانه‌ها به ویروس ZYMV آلودگی نشان می‌دادند در حالی که سایر ویروس‌ها تنها در بعضی گلخانه‌ها وجود داشتند.

تشابه نزدیک دو شته *M. Persicae* و *A. gossypii* در توانایی انتقال نسبتاً بالای ویروس ZYMV با گزارش‌های قبلی مطابقت دارد(۸ و۱۰). بر اساس این بررسی و نیز گزارش‌های

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]

موجود، شته‌های *A. craccivora*, *M. Persicae* و *A.Faba* از ناقلین موثر در انتقال دو ویروس ZYMV و WMV-2 هستند. این موضوع درمورد شته *A. gossypii* نیز صادق است اما بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، این شته قادر به انتقال ویروس WMV-2 نبود که بررسی‌های بیشتری در این خصوص نیاز است. شته‌های *A. gossypii, M. persicae* و *A.faba* ویروس CMV را به ترتیب ۴۶/۷، ۶۳/۳ و ۳۶/۷ در صد انتقال دادند که در مقایسه با نتایج حاصل از این تحقیق به جز در مورد *A. gossypii* در صدانتقال این ویروس پایین‌تر می‌باشد. این موضوع می‌تواند مربوط به گیاه آزمونی باشد که شته حامل ویروس از آن تغذیه نموده است (۱۵).

در این تحقیق جدایه‌های ZYMV به دست آمده از منطقه جیرفت با آنتی بادی‌های مونوکلونال اختصاصی نژادهای کانادایی در آزمون (TAS-ELISA) بررسی گردیدند. نژادهای کانادایی در شاخه ۲ گروه A قرار دارند. شاخه ۱ و ۲ این گروه از نظرسرولوژیکی قابل تشخیص نیستند. از آنجایی‌که جدایه‌های مورد بررسی با آنتی سرم‌ها واکنش مثبت نشان دادند، بنابراین از نظر رده بندی در شاخه ۱ یا ۲ گروه A قرار می‌گیرند (۱۲). اعضای این دو شاخه، با توجه به ایجاد علائم بر روی ارقام مختلف کدوئیان و میزبان‌های محک تفکیک می‌شوند. در این بررسی جدایه‌های جمع آوری شده از منطقه جیرفت از نظر ایجاد علائم تا حدودی شبیه نژادهای گزارش شده از سایر مناطق دنیا بودند. به طوری که اکثر نژادها در گیاهان خانواده *Cucurbitaceae* به صورت سیستمیک ظاهر شدند و تنها یک ایزوله سبب ایجاد علائم سیستمیک به همراه ظهور لکه‌های موضعی کلروتیک روی برگ‌ها شد. این علائم قبلا توسط پروویدنتی و همکاران (۲۳) گزارش شده است. یکی از جدایه‌های ZYMV روی برگ‌های کدو مسمایی تولید علائم بند کفشی شدید نمود، این علائم توسط ونگ و همکاران (۲۹) از سنگاپور گزارش گردیده است. لذا احتمالا جدایه‌های بررسی شده منطقه جیرفت در شاخه ۱ یا ۲ گروه A قرار گرفته و جهت تعیین دقیق‌تر جایگاه این نژادها، توالی نوکلئوتیدی آن بررسی و از نظر دامنه میزبانی تحقیق جامع‌تری به عمل آید.

وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس ZYMV حدود ۳۶/۲ کیلو دالتون تعیین گردید که با نتایج پریتو و همکاران (۲۲) مطابقت دارد. این باند پروتئینی ۳۶/۲ کیلو دالتونی به‌وسیله آنتی بادی ZYMV در آزمون وسترن بلات تشخیص داده شد. بررسی پیکره‌های ویروس با میکروسکپ الکترونی نشان دهنده وجود پیکره‌های رشته‌ای به طول تقریبی ۷۹۰ نانومتر بود که با تحقیقات لسمن و همکاران (۱۸) مطابقت داشت.

آزمون IC-RT-PCR نسبت به RT-PCR با استفاده از RNA کل استخراج شده از بافت آلوده نتیجه بهتری داشت. به نحوی که آزمون RT-PCR با استفاده از RNA کل استخراج شده به روش فنل-کلروفرم در مقایسه با روش IC-RT-PCR راندمان کمتری داشت که ممکن است به دلیل اثر منفی و بازدارنده فنل روی DNA باشد. در بین روش‌های استخراج Total RNA، استخراج توسط کیت بهترین نتیجه را در آزمون PCR داشت. با استفاده از روش Gradient PCR بهترین دما در مرحله اتصال (Annealing step) ۴۴ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید، اگر چه استفاده از دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد که توسط Desbiez وهمکاران بیان گردیده تیز نتایج خوبی را در بر داشت(۱۲).

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه که بخشی از بودجه تحقیقاتی این طرح را تامین نمودند تشکر و قدردانی می‌شود، هم‌چنین از دکتر مینا کوهی حبیبی به دلیل در اختیار گذاشتن یکسری از امکانات آزمایشگاهی، دکتر رسولیان جهت تشخیص نمونه‌های مختلف شته‌ها، دکتر استفان وینتر از موسسه تحقیقاتی DSMZ آلمان به خاطر ارسال آنتی بادی مونو کلونال و دکتر فیل جونز از موسسه تحقیقاتی IACR-Rothemsted انگلیس به دلیل ارسال آنتی سرم CMV کمال تشکر را می‌نماید.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]

منابع مورد استفاده

۱. جعفرپور، ب. (مترجم). ۱۳۷۰. *روش‌های تشخیص ویروس‌های گیاهی*. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۲. دلخوش، ح.، ح. رحیمیان، و ج. حیاتی. ۱۳۷۹. شناسایی عامل مولد عارضه تاولی شدن میوه کدو مسمایی در استان مازندران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۳. صفرنژاد، م. و ک. ایزدپناه. ۱۳۷۹ . خالص سازی و سرولوژی ویروس‌های مولد موزاییک کدوئیان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۴. طباطبائی، م. ۱۳۶۵. *گیاهشناسی کاربردی برای کشاورزی و منابع طبیعی*. انتشارت واحد فوق برنامه بخش فرهنگی دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی. ۱۱۸۴ صفحه.

۵. قربانی، ش. ۱۳۶۷. جداسازی ویروس موزائیک زرد کدو در استان تهران. بیماری‌های گیاهی ۲۴: ۲۴–۳۵.

۶. کشاورز، ط. و ک. ایزدپناه. ۱۳۸۳. گزارش وجود ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV) در ایران. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه تبریز.

7. Abou-Jawadah, Y., H. Sobh, S. EL-Zammar, A. Fayyad and H. Lecoq. 2000. Incidence and management of virus disease of cucurbits in Lebanon. Crop Protec. 19: 217-224.
8. Adlerz, W.C. 1987. Cucurbit potyviruses transmission by alate aphids (Homoptera: Aphididae) trapped alive. J. Econ. Entomol. 80:87-92.
9. Al-Musa, A. M. 1989. Severe mosaic caused by *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits from Jordan. Plant Pathol. 38: 541-546.
10. Castle, S. J., T. M. Perring, C. A. Farrar and A. N. Kishaba. 1992. Field and Laboratory transmission of *Watermelon mosaic virus*-2 and *Zucchini yellow mosaic virus* by various aphid species. Phytopathol. 82:235-240.
11. Clark, M. F. and S. A. N. Adams. 1977. Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
12. Desbiez, C., C. Wipf- Scheibel and H. Lecoq. 2002. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of *Zucchini yellow mosaic virus* with special reference to Caribbean Island. Virus Res. 85: 5-16.
13. Grafton-Cardwell, E. E., T. M. Perring, R. F. Smith, J. Valencia and C. A. Farrar. 1996. Occurrence of mosaic viruses in melons in the central valley of California. Plant Dis. 80: 1092-1097.
14. Hibi, T. and Y. Saito. 1985. A dot immunobinding assay for the detection of *Tobacco mosaic virus* in infected tissue. J. Gen. Virol. 66: 1191-1194.
15. Hobbs, H. A., D. M. Eastburn, C.J. D'Arey, J. D. Kindhart, J. B. Masiunas, D. J. Voegtlin, R. A. Wwinzierl and N. K. McCoppin. 2000. Solanaceous weeds as possible source of Cucumber mosaic virus in southern Illions for aphid transmission to pepper. Plant Dis. 84:1221-1224.
16. Izadpanah, K. 1987. *Squash Mosaic Virus* as the cause of Melon vein-banding mosaic in Iran. J. Phytopathol. 120: 276-282.
17. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bactriophage. Nature 227: 680-689.
18. Lesemann, D.E., K. M. Makkouk and R. Koening. 1983. Natural infection of cucumbers by *Zucchini yellow masaic virus* in Lebanon. Phytopathol. 108: 304-323.
19. Lovisolo, O. 1980. Virus and viroid disease of cucurbits. Acta Horticulture 88: 33-81.
20. Luis-Arteaga, M., J. M. Alvarez, J. L. Alonso-Prados, J. J. Bernal, F. Garcia-Arenal, A. Lavina, A. Batlle and E. Moriones. 1998. Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. Plant Dis. 82: 979-982.
21. Nilasco, G., C. D. Blas, V. Torres and F. Ponz. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a micro titer plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. J. Vir. Methods 45: 201-218.
22. Prieto, H., A., Bruna, P. Hinrichsen and C. Munoz. 2001. Isolation and molecular characterization of Chilean isolate of *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Dis. 85: 644-648.
23. Provvidenti, R., H. M. Munger and M. O. Paulus. 1984. Epidemics of *Zucchini yellow mosaic virus* in Egypt in the spring of 1983. Cucurbit Genetic Crop RPT 7: 78-79.
24. Rahimian, H. and K. Izadpanah. 1987. Identity and prevalence of mosaic inducing cucurbit viruses in Shiraz, Iran. Phytopathol. 92:305-312.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]

25. Sambrook, J., E. F. Fristch. and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
26. Sidek, Z. and N. Sako. 1996. Isolation of five viruses naturally infecting cucurbit plants in Malaysia. J. Bioscience 7: 114-121.
27. Ullman, D. E., J. J. Cho. and G. L. German. 1991. Occurrence and distribution of cucurbit viruses in Hawaiian Islands. Plant Dis. 75: 367-370.
28. Wadsworth, G. J., M. G. Redibaugh and J. G. Scandalios. 1998. A procedure for the small- scale isolation of plant RNA suitable for blot analysis. Annu. Biochem. 172: 279-283.
29. Wong, S. M., C. G. Chng, C. Y. Chng and P. L. Chong. 1994. Characterization of an isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* from cucumber in Singapore. J. Phytopathol. 141: 335-368.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.1.30.2]