مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیستم، شماره اول، ۱۳۹۲
http://jopp.gau.ac.ir

بررسی خصوصیات زیستی، انتقال و میزان گسترش ویروس موزاییک هندوانه (WMV) در مزارع کدوییان در تعدادی از استان‌های کشور

مریم شریفی[۱] و *حسین معصومی[۲]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان،
[۲]دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۲۳

چکیده

ویروس موزاییک هندوانه (WMV) یکی از مهمترین ویروس‌های کدوییان در بسیاری از نقاط دنیا می‌باشد. به‌منظور بررسی پراکندگی، دامنه میزبانی، علائم‌شناسی و میزان کارایی انتقال WMV توسط شته، از مزارع کدوییان شامل گرمک، خربزه، خیار، کدو، طالبی و هندوانه واقع در پنج استان کشور نمونه برداری به‌عمل آمد. آلودگی نمونه‌ها با آزمون DAS-ELISA با استفاده از آنتی سرم WMV مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین و کمترین میزان آلودگی نسبت به‌این ویروس به‌ترتیب مربوط به استان‌های آذربایجان غربی و کرمان، به‌میزان ٤٤/٩ و ٩/٥ درصد می‌باشد. در بین کدوییان مختلف نیز بیشترین و کمترین میزان آلودگی به‌ترتیب در ارقام مختلف گرمک و هندوانه به‌میزان ٧٠/٦ و ٥/٩ درصد محاسبه گردید. از بین جدایه‌های به‌دست آمده، بر اساس دامنه میزبانی و مناطق نمونه‌برداری، ۱۹ جدایه متفاوت جهت مطالعات تکمیلی انتخاب و بر روی گیاهان آزمون از خانواده‌های مختلف مایه‌زنی گردیدند. نتایج به‌دست آمده بیانگر آن است که در بین جدایه‌های مختلف این ویروس تفاوت‌هایی از نظر ایجاد علائم بر روی گیاهان آزمایشی وجود دارد. در این مطالعه اقدام به تهیه آنتی سرم بر علیه پیکره‌های کامل WMV گردید. عیار آنتی سرم تهیه شده

*مسئول مکاتبه: masoomi@mail.uk.ac.ir

با استفاده از آزمون الایزای غیر مستقیم ۱/۵۰۰ تعیین گردید. در مطالعات مربوط به انتقال ویروس توسط شته مشخص گردید که میزان کارایی انتقال ویروس توسط شته *Myzus persicae* براساس نوع جدایه مورد بررسی بین ۲۰ تا ٦۰ درصد متغیر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کدوییان، ویروس موزاییک هندوانه، میزان آلودگی، انتقال ویروس

مقدمه

ویروس موزاییک هندوانه (WMV) متعلق به خانواده پوتی‌ویریده (*Potyviridae*) و جنس پوتی‌ویروس (*Potyvirus*) می‌باشد. پیکره این ویروس رشته‌ای، یک قسمتی و قابل انعطاف به‌طول ۷٦۰ نانومتر و عرض ١٦ نانومتر، که ۵ درصد پیکره را RNA و ۹۵ درصد آن را پروتیین تشکیل می‌دهد. ژنوم این ویروس قادر به همانندسازی چندین نوع پروتیین می‌باشد. این ویروس دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و در سایر خانواده‌های گیاهی نیز ایجاد بیماری می‌کند. علائم ناشی از این ویروس شامل موزاییک، ابلقی، کوتولگی، بد شکلی و شکستگی رنگ برگ‌ها در گیاهان آلوده می‌باشد. WMV به‌طور مکانیکی و همچنین توسط گونه‌های مختلف شته‌ها با رابطه ناپایا منتقل می‌گردد (مورینو و همکاران، ٢٠٠٤).

این ویروس اولین بار توسط Web و Scot در سال ١٩٦۵ از گیاه خیار از مناطق مختلف آمریکا جدا گردید و طی سال‌های بعد بروز آن در کشورهای دیگر نیز گزارش شد (شوکلا و همکاران، ١٩٩٤). پژوهش‌ها در اسپانیا نشان داده است که در مزارع طالبی بیشترین میزان آلودگی (از نظرتعداد مناطق آلوده و نیز درصد آلودگی) مربوط به WMV و CMV می‌باشد (ونگ و همکاران، ۲۰۰۲؛ لویس و همکاران، ۱۹۹۸). در یونان نیز میزان آلودگی نسبت به WMV، ٦۷ درصد گزارش گردیده و این خسارت بیشتر بر روی گیاه خیار بوده است (پاپایانیس و همکاران، ۲۰۰۵).

اولین پژوهش در ایران در مورد WMV توسط ابراهیم نسبت (۱۹۷۲) انتشار یافته است. نامبرده بر اساس آزمون گیاهان تشخیصی، ویروس مزبور را جداسازی و شناسایی نموده است. سپس در همان سال ویدمن و مصطفوی ۱۹۷۲ وجود WMV بر روی گیاهان طالبی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران را با بررسی پیکره‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی و با استفاده از گیاهان محک به اثبات رسانده بودند. ضمناً نامبردگان، انتقال ویروس توسط چند گونه شته از قبیل شته سبز هلو (*Myzus*

persicae، شته پنبه (*Aphis gossypi*) و شته سیب‌زمینی (*Macrosiphum euphorbias*) را مطالعه نموده‌اند. با بررسی علف‌های هرز مزارع جالیز در اطراف مشهد مشخص گردید که گیاهان *Reseda luteal* و *Fumaria asepala* (شاه تره) به‌عنوان میزبان‌های ثانویه این ویروس می‌باشند (امیری و ابراهیم نسبت، ۱۹۷۷). بهار و همکاران (۱۹۸۳) ویروس‌های موزاییک خیار و موزاییک هندوانه را در کشت‌های بهاره خیار بین ۵ تا ۲۵ درصد و در طالبی، کدو و هندوانه در حدود ٦۰ درصد و در خیار و خربزه پاییزه بین ٤ تا ۱۰۰ درصد آلودگی گزارش نموده‌اند. همچنین میزان آلودگی کدوییان توسط WMV در گلخانه‌های ایران در استان‌های فارس، اصفهان، هرمزگان، گلستان، مازندران، یزد، گیلان، تهران، کرمان، خراسان به‌ترتیب ۷۵/۲، ٥٤/٥، ۳٤/۷، ۳۱/٦، ۳۰/۸، ۲۸/٤، ۲۷/۸، ۲۰/٤، ۱٦ و ۱٤ درصد برآورد گردید (سمیعی، ۲۰۰٤).

در این بررسی سعی گردید وضعیت WMV از نظر میزان گسترش و پراکندگی آن در تعدادی از استان‌های کشور، دامنه میزبانی ویروس بر روی میزبان‌های طبیعی، بررسی و واکنش جدایه‌های مختلف بر روی گیاهان مورد آزمایش و مقایسه جدایه‌ها از نظر انتقال توسط شته سبز هلو مورد بررسی قرار گیرند، این در حالی است که مطالعات مولکولی در مورد این جدایه‌ها انجام و گزارش (شریفی و معصومی، ۲۰۰۸) گردیده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع کدوییان و شناسایی ویروس‌های آن‌ها: جهت شناسایی و تعیین پراکنش WMV از میزبان‌های اصلی ویروس واقع در مزارع گرمک، کدو، هندوانه، طالبی، خیار و خربزه از استان‌های کرمان، یزد، اصفهان، هرمزگان و آذربایجان غربی نمونه‌برداری انجام گردید. ارقام کدو نمونه‌برداری شده شامل کدوی آجیلی، مسمایی، حلوایی و تنبل، ارقام خربزه شامل، خربزه رقم Ps، گرمساری و مشهدی بود. ارقام خیار شامل، خیار رقم Ps و چنبر، ارقام هندوانه شامل، هندوانه رقم آرژانتینی، خطی رقم Ps، هلندی رقم Dp، هلندی رقم Baker، هلندی رقم رویال، هلندی رقم نیاگارا، رقم آرژانتینی، رقم Sugar baby و هندوانه سفید، رقم طالبی شاه‌آبادی بوده‌اند.

جهت شناسایی و تعیین پراکنش WMV از آزمون DAS-ELISA طبق روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) استفاده گردید. آنتی‌سرم‌های مورد استفاده جهت ویروس WMV از شرکت Bioreba کشور سوئد (Braunschweig, Germany) تهیه گردید. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از

دستگاه الایزا مدل EL800[1] و در طول موج ٤٠٥ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه بـه میـزان جذب عصاره برگ سالم (شاهد منفی) و با استفاده از فرمول $\bar{x}$ 3 SD + آستانه جذب گیاهـان آلـوده تعیین گردید. در این فرمول ($\bar{x}$ + 3 SD) $\bar{x}$ میانگین جذب و SD انحراف معیار استاندارد چاهـک-های نمونه سالم است. بر این اساس نمونه‌های آلوده مشخص و درصد آلودگی ارقام مختلـف گوجـه فرنگی تعیین گردید. از بین کل نمونه‌های آلوده بـه WMV، ۱۹جدایـه (جـدول ۱) بـر اسـاس دامنـه میزبانی و مناطق نمونه‌برداری، جهت مطالعات تکمیلی جدا و انتخاب گردیدند.

تعیین دامنه میزبانی WMV: برای تعیین دامنه میزبانی و مشاهده علائم و نیز تکثیر ویروس از میزبان-های مختلفـی از خـانواده‌هـای متعلـق بـه *Cucurbitace, Chenopodiaceae, Leguminosae* و *Solonaceae* استفاده گردید (جدول ۲). بذور گیاهان مختلف در گلدان‌های کوچک سفالی در خاک متشکل از دو قسمت شن، دو قسمت خاک برگ و یک قسمت کود حیـوانی کاشـته و در گلخانـه بـا شرایط حرارتی ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ٦٠-٧٠ درصد و نور مناسب نگهداری شدند. نمونه‌های آلوده به نسبت ۱:۱۰ (w:v) در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار با pH= ۷ عصاره‌گیری شده و با کمک پودر کاربوراندوم به برگ‌های گیاهان آزمون مایه زنی مکانیکی انجام شـد. ایـن گیاهـان در گلخانه در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و در نهایت هر یک از این گیاهان ۸-١٤ روز پس از مایه زنی و مشاهده علائم توسط آزمون الیزا مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی میزان انتقال WMV توسط شته: جهت بررسی درصد انتقال ویـروس توسـط ناقـل از شـته *Myzus persicae* استفاده گردید. نمونه‌های شـته *M. persicae* پـس از شناسـایی جهـت ازدیـاد و تشکیل پرگنـه‌هـا بـر روی گیاهـان کلـم (*Brassica oleifera* L.) و شـلغم (*B. napus* L.) تکثیـر گردیدند.

به‌منظور انتقال ویروس توسط شـته از کـدو رقـم *Cucurbita pepo* L.cv. Peto Seed اسـتفاده گردید. به‌ازای هر جدایه ویروس در هر آزمایش ۳۰ گیاهچه سالم استفاده شد. ابتدا شته‌هـا در داخـل پتری پلاستیکی دارای کاغذ صافی مرطوب به‌مدت یـک سـاعت در حالـت گرسـنگی (Starvation period) نگه‌داری شدند. سپس توسط قلم موی ظریف و مرطوب روی گیاه آلوده قرار گرفته و پس از ۲ تا ۵ دقیقه تغذیه گیرش (Acquisition access period) به‌ازای هر گیاهچه سالم در مرحله دولپه‌ای ۵

1- Biotek Instrument

شته روی لپه‌های آن قرار داده شدند. پس از گذشت یک شب از تغذیه شته‌ها بر روی گیاهان سالم با محلول پاشی توسط حشره‌کش کنفیدور حذف گردیده و آن‌گاه گیاهان در شرایط گل‌خانه‌ای با دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بوته‌های کدو در صورت بروز علائم ویروسی و همچنین بوته-های فاقد علائم با استفاده از روش الیزا مورد بررسی قرار گرفتند (کاستل و همکاران، ۱۹۹۲).

خالص‌سازی WMV: خالص‌سازی نسبی (Partial purification) با استفاده از روش هاشمی و ایزدپناه (۲۰۰۲) به‌این صورت انجام گرفت که تعدادی از گیاهان کدوی مسمایی رقم خوی در مرحله دو برگی توسط WMV مایه‌زنی شدند. پس از ظهور علائم، برگ‌ها از گیاه آلوده جدا و پس از حذف دمبرگ و رگبرگ‌ها ابتدا بافت‌های آلوده به نسبت (w:v ۱:٦) حجم بافر فسفات ۰/۵ مولار دارای ۰/۰۰۵ مولار EDTA و ۰/۱۵ درصد تیوگلیکولیک اسید و نیم حجم از مقادیر مساوی کلروفرم و تتراکلریدکربن همگن‌سازی شدند. عصاره به‌دست آمده در ۷۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و پس از حذف رسوب مایع رویی با PEG-٦٠٠٠، ٦ درصد کلرید سدیم ۰/۲ مولار مخلوط و به‌مدت ۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با استفاده از هم زن مخلوط گردیدند. به دنبال آن محلول یاد شده به‌مدت ۳۵ دقیقه در ۱۳۵۰۰ دور سانتریفوژ و پس از حذف مایع رویی رسوب به‌دست آمده در ۱/۲۰ حجم اولیه از بافر فسفات حل گردید و به‌مدت ٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با استفاده از هم زن مخلوط گردید. پس ازآن سانتریفوژ در ۷۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام و رسوب ایجاد شده حذف و مایع رویی نگه‌داری و در نهایت جذب ویروس در طول موج ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. غلظت ویروس با استفاده از فرمول $C = \frac{A260 \times Dilution}{EC}$ محاسبه گردید. در این فرمول ضریب خاموشی یا Extinction Coefficient(EC) جهت WMV برابر با ۲/۵ در نظر گرفته شده است.

تهیه آنتی‌سرم: جهت تهیه آنتی‌سرم از دو خرگوش سفید نیوزیلندی استفاده گردید که از یکی از آن‌ها جهت انجام عمل خون‌گیری و تهیه سرم نرمال و از دیگری جهت تزریق ویروس استفاده شد. برای تهیه آنتی‌سرم از عصاره نسبتاً خالص ویروس استفاده گردید. یک میلی‌لیتر از عصاره نسبتاً خالص ویروس WMV با حجم مساوی از روغن Freund's adjuvant مخلوط و جهت تزریق مورد استفاده قرار گرفت. اولین تزریق به‌صورت عضلانی و با روغن Freund's complete adjuvant صورت گرفت و تزریق‌های بعدی به فاصله یک هفته از یک‌دیگر به‌صورت زیر جلدی صورت گرفت. یک

هفته بعد از آخرین تزریق اولین خونگیری از قلب خرگوش صورت گرفت و به فاصله یک هفته خون‌گیری‌های بعدی انجام شد.

نتایج

شناسایی ویروس موزاییک هندوانه (WMV) در کدوییان در برخی از مناطق ایران: گیاهانی که از خانواده کدوییان نمونه‌برداری شده‌اند، شامل گرمک، خربزه، خیار، کدو، طالبی، هندوانه ابوجهل و هندوانه بودند که در بین آن‌ها به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلودگی مربوط به گرمک و هندوانه به میزان ۷۰/٦ و ۵/۹ درصد محاسبه گردید.

میزان آلودگی به‌این ویروس در استان‌های آذربایجان غربی، اصفهان، هرمزگان، یزد و کرمان، به‌ترتیب ٤٤/۹، ۳۹/۸، ۲۰/۹، ۱۹/٦ و ۹/٦ درصد برآورد شد، که بیشترین میزان آلودگی مربوط به استان آذربایجان غربی و کمترین آن در استان کرمان مشاهده شد (جدول ۳).

علائم گیاهان نمونه‌برداری شده از مزارع شامل: موزاییک، بد شکلی و تاولی شدن سطح برگ‌ها و میوه‌ها و رگبرگ نواری بوده است. این علائم ویروسی در مزارع در اواسط فصل رویشی ظاهر می‌شد، که این علائم در اواخر فصل برداشت به اوج خود می‌رسید. در بین مزارع کدوییان گرمک و خربزه بیشترین میزان آلودگی و هندوانه کمترین میزان را به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۱، A تا D).

تعیین دامنه میزبانی ویروس WMV: جهت بررسی دامنه میزبانی ۱۹ جدایه‌های موردنظر بر روی گیاهان متعلق به ٤ خانواده مایه‌زنی گردید که نتایج آن در جدول ۲ بیان شده است. علائم ویروس بر روی کدوی مسمایی به‌این صورت بود که ابتدا نقاط بسیار ریز سبز (سبز تیره) در روی برگ‌ها ظاهر گردید و بعد از گذشت چند روز این علائم به‌صورت موزاییک، ابلقی، رگبرگ روشنی و رگبرگ نواری مشاهده شد (شکل ۲، A تا C). بررسی علائم بر روی ارقام مختلف توتون شامل *Nicotiana clevelandii, N.glutinosa, N.debneyii, N.bentamiana* و *N.tabacum var samsun N* انجام و مشخص گردید که تمامی جدایه‌های WMV تنها بر روی *N .bentamiana* قادر به ایجاد علائمی به‌صورت موزاییک خفیف بوده و در هیچ کدام از دیگر ارقام توتون آلودگی مشاهده نگردید. جدایه‌های این ویروس پس از مایه‌زنی بر روی *Chenopodium qunioa* تولید لکه‌های موضعی کلروتیک بارزی بر روی گیاه ایجاد نموده (شکل ۲، D) و همچنین بر روی سطح برگ‌های *Ch. Amaranticolar* ابتدا

لکه‌های کلروتیک و سپس (بعد از ۳۰-۲۰ روز) بافت مردگی با حاشیه قرمز رنگ ایجاد می‌نمایند. همچنین آلودگی جدایه‌های این ویروس در این دو گیاه به‌صورت سیستمیک مشاهده نگردید.

تعیین میزان انتقال ویروس WMV توسط شته *M. persicae*: پس از انتقال WMV توسط شته *M. persicae* علایم آلودگی بر روی کدو رقم *C. pepo* L.cv. Peto Seed بعد از گذشت حدود ۱۰ روز ظاهر گردید (شکل۲، E).

به‌منظور اطمینان از نتایج این آزمایش برگ‌های دارای علائم با آزمون الیزا نیز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج درصد انتقال جدایه‌های ویروس WMV در جدول ٤ بیان گردیده است. بر این اساس از بین جدایه‌های مورد بررسی تعداد ۹ جدایه در صد انتقال آن‌ها به‌میزان ۵۰درصد می‌باشد و در مورد بقیه جدایه‌ها این میزان بین ۲۰ تا ٦۰ درصد متغیر است.

خالص‌سازی ویروس و تهیه آنتی‌سرم WMV: غلظت و میزان جذب ویروس در روش خالص‌سازی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Pharmacia ساخت کشور فرانسه در طول موج‌های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش نسبت جذب ویروس در ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر، ۱/۱۵٦ تعیین گردید، بازده عمل خالص‌سازی به‌این روش ۷/۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در برگ آلوده گیاه کدو مسمایی برآورد گردید. پس از تزریق‌های لازم به خرگوش سفید نیوزلندی، آنتی‌سرم به‌دست آمده با عصاره گیاهی سالم از طریق آزمون الیزای غیر مستقیم (Indirect ELISA) تعیین تیتر گردید و تیتر آن ۱/۵۰۰ معین گردید.

بحث

در این بررسی آلودگی توأم در مورد ویروس WMV به‌همراه دیگر ویروس‌ها از جمله CMV و ZYMV مشاهده گردید، که در این موارد شدت علائم در گیاهان دارای آلودگی توأم بیشتر از نمونه‌هایی بود که تنها به یک ویروس آلوده بودند. در این بررسی مشخص گردید که بیشترین میزان آلودگی به‌این ویروس مربوط به استان آذربایجان غربی با ٤٤/۹ درصد و بعد از آن استان‌های اصفهان، هرمزگان، یزد، کرمان به‌ترتیب با آلودگی ۳۹/۸، ۲۰/۹، ۱۹/٦، ۹/۵ درصد بوده است. طبق بررسی‌هایی که سمیعی (۲۰۰٤) از برخی از گل‌خانه‌های ایران انجام داده‌اند، درصد آلودگی در استان‌های اصفهان، هرمزگان، یزد و کرمان به‌ترتیب، ۵٤/۵، ۷/ ۳٤، ۲۸/٤ و ۱٦ درصد برآورد گردیده است. همچنین علاوه بر این‌که بررسی نامبردگان محدود به کدوییان موجود در گل‌خانه‌های ایران بوده است اما نتایج

به‌دست آمده بیانگر آن است که نسبت آلودگی به ویروس WMV در همه استان‌ها در مزارع نسبت به گل‌خانه‌ها مقداری کاهش یافته است. از این نظر شاید بتوان دلایل متفاوت بودن انتشار ویروس WMV در استان‌های ذکر شده را با مرطوب بودن شرایط محیطی جهت گیاهان گل‌خانه‌ای، کاهش فاصله بین گیاهان، درجه حرارت بالا در گل‌خانه‌ها، تماس بیشتر دست با محصولات و سهولت انتقال مکانیکی و انتقال توسط شته مرتبط دانست. آگاهی دادن کشاورزان در مورد موارد ذکر شده، حذف به موقع گیاهان آلوده و کشت گیاهان تله در برابر شته‌ها سبب جلوگیری از انتشار این ویروس گردیده و درصد انتشار آن را کاهش می‌دهد (روجر، ۲۰۰۲).

میزان آلودگی در کدوییان نمونه‌برداری شده نسبت به WMV به‌ترتیب در گرمک، خربزه، خیار، کدو، طالبی و هندوانه ۷۰/٦، ۳۵/۵، ۲۸/۸، ۲۵/٤، ۱۱/۱ و ۵/۹ درصد محاسبه گردید. این نتایج بیانگر آن است که در بین کدوییان انواع ارقام گرمک مورد بررسی شامل سمسوری، شاه پسندی، گالیا و آناناسی بالاترین میزان آلودگی را به خود اختصاص داده‌اند. پس از گرمک نیز در ارقام خربزه شامل رقم Ps، گرمساری و مشهدی بیشترین درصد آلودگی نسبت به WMV مشاهده گردید. در کشور اسپانیا این ویروس شدیداً به کدوییان مخصوصاً خربزه خسارت وارد می‌نماید. گزارشاتی وجود دارد که WMV سبب افزایش خسارت به‌میزان ۱۰۰ درصد در بعضی مزارع خربزه گردیده است (مورینو و همکاران، ۲۰۰٤). در ایران نیز به‌دلیل این‌که سومین کشور تولید کننده کدوییان بعد از چین و امریکا می‌باشد (فائو، ۲۰۱۰)، خسارت به‌این محصول دارای اهمیت می‌باشد. بررسی‌هایی انجام شده در منطقه جورجیانای آمریکا بر روی ویروس‌های کدوییان بیانگر آن است که کدو و هندوانه بیشترین میزان آلودگی را نسبت به‌این ویروس نشان داده‌اند (دمشکی و سوئل، ۱۹۷۰)، همچنین در چین نیز WMV باعث کاهش محصول هندوانه گردیده و خسارت قابل توجهی به این محصول وارد نموده است (زئو و همکاران، ۲۰۰٤). در حالی‌که در این پژوهش مشخص گردید که هندوانه کمترین میزان آلودگی را نسبت به WMV به خود اختصاص داده است.

در بررسی انتقال ویروس توسط شته *M. persicae* مشخص گردید که ویروس WMV به راحتی توسط این گونه از شته منتقل می‌گردد. میزان انتقال این ویروس بین ۲۰ تا ٦۰ درصد بر حسب نوع جدایه‌های آن‌ها مورد بررسی متفاوت می‌باشد. در بررسی مولکولی بر روی این جدایه‌ها (شریفی و معصومی، ۲۰۰۸) به‌دلیل این‌که همگی آن‌ها دارای اسیدآمینه سه‌تایی DAG در توالی پروتیین پوششی خود بوده‌اند بنابراین موضوع انتقال ویروس توسط شته *M. persicae* به اثبات رسیده است. بر اساس

گزارشات موجود در تمامی موارد، انتقال این ویروس توسط شته (به‌جز یک جدایه گزارش شده از اروپا) امکان‌پذیر است (پارسیفیل و همکاران، ۱۹۸٤). همچنین نتایج به‌دست آمده از بررسی انتقال این ویروس توسط شته *M. persicae* بیانگر آن است که یکی از علل گسترش وسیع این ویروس و بالا بودن آلودگی بوته‌های کدوییان احتمالاً به‌علت درصد انتقال بالای آن توسط شته‌ها به‌خصوص شته *M. persicae* می‌باشد (فلاسینسکی و کاسیدی، ۱۹۹۸).

جهت تعیین دامنه میزبانی این ویروس از چندین گیاه مربوط به چهار خانواده (جدول ۲) استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده از مایه‌زنی جدایه‌ها نشان داد که هیچ‌کدام از جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش بر روی *Pisum sativum* (نخود فرنگی) تکثیر نشدند. براساس بررسی‌های انجام شده بر روی نژادهای WMV مشخص گردیده که بعضی از واریته‌های نخود فرنگی دارای ژن مقاوم نسبت به این ویروس می‌باشند (پروویدنتی و اسکرودر، ۱۹۷۰). بر این اساس، به‌دلیل عدم آلودگی ارقام مختلف نخود فرنگی در این بررسی شاید به‌دلیل وجود ژن مقاوم باشد که البته این موضوع نیاز به بررسی بیشتری دارد. همچنین با مایه‌زنی جدایه‌های این ویروس بر روی سطح برگ‌های گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و هندوانه (ارقام چالستون و گریمسون) هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نگردید، این نیز ممکن است به‌دلیل مقاومت در نوع ارقام هندوانه یا لوبیای موردنظر باشد.

در خالص‌سازی ویروس نسبت جذب ویروس در ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر ۱/۱٥٦ بود که به بیشتر جذب تعیین شده ویروس که ۱/۳۲ بود، بسیار نزدیک می‌باشد (پارسیفیل و همکاران، ۱۹۸٤).

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان نمود که WMV در مزارع کدوییان استان‌های بررسی شده از اهمیت بالایی برخوردار است. این در حالی است که از نظر گسترش آن بر روی تعدادی از میزبان‌های ثانویه نیز در بررسی‌های انجام شده (شریفی و معصومی، ۲۰۰۸) مشخص گردیده که در بین گونه‌های مختلف علف‌های هرز موجود در مزارع کدوییان این ویروس تنها در گیاهان پیربهارک هرز (*Conyza bonariensis* L.) و گل جالیز (*Orobanche* sp.) به‌صورت محدودی ردیابی گردیده است. به‌علاوه این که میزان گسترش آن در هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* L.) به‌عنوان یک گیاه خودرو موجود در حاشیه مزارع کدوییان واقع در مناطق کویری از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (شریفی و معصومی، ۲۰۰۸). براین اساس شاید بتوان مهم‌ترین روش‌های گسترش این ویروس در مزارع کدوییان را از طریق ناقلین و انتقال از طریق مکانیکی بیان نمود که در روش‌های

کنترل می‌بایست موردنظر قرار گیرند. در ضمن ارقام بومی مختلفی از کدوییان در ایران وجـود دارنـد که وضعیت مقاومت آن‌ها نسبت به WMV مشخص نشده است.

جدول ۱- نام جدایه‌های ایرانی ویروس موزاییک هندوانه تیپ (WMV) به‌همراه مناطق جمع‌آوری جدایه‌ها و میزبان‌های آن‌ها.

نام گیاه	منطقه جمع‌آوری جدایه	نام جدایه
هندوانه ابوجهل	جیرفت- کرمان	KER.JI.1[a]
گرمک	کرمان- دانشگاه کرمان	KER.KE.1
خربزه	یزد- صدوق منطقه شمسی	YAZ.SH.1
خیار	یزد- محسن‌آباد	YAZ.MO.1
کدو	اصفهان- شهرستان اصفهانک منطقه حیدرآباد	ESF.ES.1
خربزه	اصفهان- شهرستان اصفهانک منطقه حیدرآباد	ESF.ES.2
کدو	یزد- محسن‌آباد	YAZ.MO.2
کدو	یزد- صدوق منطقه شمسی	YAZ.SH.2
خربزه	اصفهان- شهرستان گز منطقه جعفرآباد	ESF.GA.1
کدو	اصفهان- شهرستان گز منطقه محمودآباد	ESF.GA.2
خیار	اصفهان شهرستان اصفهانک منطقه حیدرآباد	ESF.ES.3
طالبی شاه آبادی	هرمزگان- حاجی‌آباد	HOR.HA.1
خیار	اصفهان- شهرستان گز منطقه محمودآباد	ESF.GA.3
کدو حلوایی	اصفهان- شهرستان زرین شهر	ESF.ZA.1
خربزه	اصفهان- شهرستان زرین شهر	ESF.ZA.2
کدو آجیلی	آذربایجان غربی- شهرستان نقده	URO.NA.1
خربزه رقم کشاورزی	آذربایجان غربی- شهرستان اشنویه	URO.OS.1
خیار	اصفهان- شهرستان زرین شهر	ESF.ZA.3
کدو	یزد- شهرستان تفت منطقه محمدآباد نصرآباد	YAZ.TA.1

[a]: مبنای نام‌گذاری جدایه‌های ایرانی به‌ترتیب بر اساس استان نمونه‌برداری شده، منطقه نمونه‌برداری شده و شماره موردنظر مربوط به شماره جدایه می‌باشد. به‌عنوان مثال KER.JI.1: نمونه شماره یک جمع‌آوری شده از منطقه جیرفت در استان کرمان.

جدول ۲- نتایج تعیین دامنه میزبانی جدایه‌های ویروس موزائیک هندوانه. اسامی جدایه‌ها در جدول ۱ بیان گردیده است.

نام علمی/خانواده	جدایه های ویروس /علائم								
	ESF.ES.1	ESF.ES.2	ESF.ES.3	ESF.GA.1	ESF.GA.2	ESF.GA.3	ESF.ZA.1	ESF.ZA.2	ESF.ZA.3
Cucurbitaceae									
Cucurbit pepo	MM,MO	SM,MO,LD,VC	SM,MO,LD,VC	MM	VC	MM	MM	SM,MO,LD,VC	MM,MO,LD
Cucurbit melo	MM,MO	SM,MO,LD,VC	SM,MO,LD,VC	MM	VC	MM	MM	SM,MO,LD,VC	MM,MO,LD
Citrulus lantanus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Solanaceae									
Nicotiana clevelendi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N. tabacum cv. Samsun	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N. glutinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N. debneyi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N. bentamiana	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM
Datura metel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fabaceae									
Pisum sativum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phaseolus vulgaris	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chenopodiaceae									
Chenopodium amaranticolor	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL
Ch. quinoa	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL

ادامه جدول ۲-

نام علمی/خانواده	جدایه های ویروس /علائم									
	HOR.HA.1	KER.JI.1	KER.KE.1	URO.OS.1	URO.NA.1	YAZ.MO.1	YAZ.MO.2	YAZ.SH.1	YAZ.SH.2	YAZ.TA.1
Cucurbitaceae										
Cucurbit pepo	MM	MM	MM,MO	MM	SM	SM,MO, VB	MO,VB	MO	MM	VB
*Cucurbit mel*o	-	MM	MM,MO	MM	SM	SM,MO,LD,VB	MO,VB	MO	MM	VB
Citrulus lantanus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Solanaceae										
Nicotiana clevelendi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N. tabacum cv. Samsun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N. glutinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N. debneyi	-	MM	-	-	-	-	-	-	-	-
N. bentamiana	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM
Datura metel	-	VB,MO	-	-	-	-	-	-	-	-
Fabaceae										
Pisum sativum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phaseolus vulgaris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chenopodiaceae										
Chenopodium amaranticolor	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL
Ch. quinoa	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL	CLL

SM: موزائیک شدید، MM: موزائیک خفیف، Mo: موزائیک ، VB رگبرگ نواری، Vc: روشن شدن رگبرگ ها، CLL لکه موضعی کلروتیک، LD: بدشکلی در برگ، و -: فاقد علائم

LD: Leaf distortion MM: Mild mosaic VC: Vein clearing MO:Mosaic SM: Sever mosaic VB: Vein banding
CLL: Chlorotic Local lesion -: Without any symptoms

جدول۳- نتایج شناسایی و میزان آلودگی ویروس موزاییک هندوانه در میزبان های مختلف واقع در استان‌های مختلف ایران.

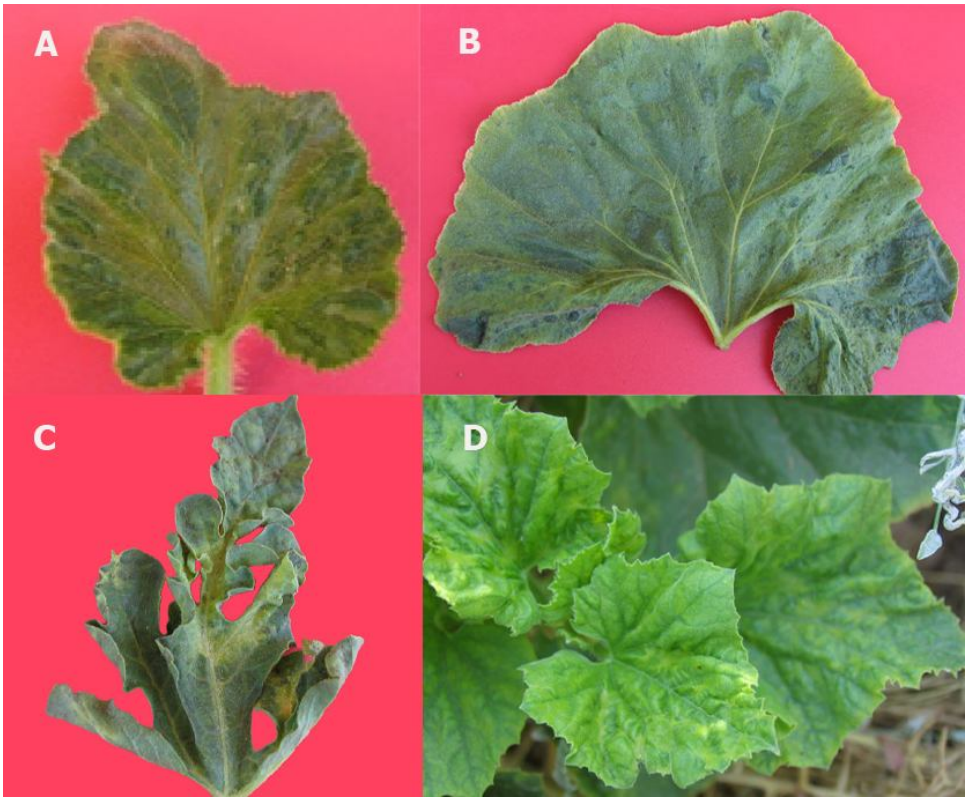
نوع میزبان	استان نمونه برداری شده	میزان آلودگی
کدو	اصفهان	۲۰/٤۹[a]
خربزه	"	۲٤/۳۸
هندوانه	"	۰/۲۸
خیار	"	۱/۱۲
کدو	"	۲۹/۵۹
خربزه	"	۱۹/۳۹
هندوانه	آذربایجان غربی	۱/۱۲
خیار	"	۱۳/۲٦
کدو	"	۳/۱۰۳
گرمک	"	۱۲/۱۷
طالبی	کرمان	۰/٦
هندوانه	"	۰/۱۸
هندوانه ابوجهل	"	۱/۱۰
خیار	"	۱/۲٤
طالبی شاه آبادی	هرمزگان	۱/۳٦
کدو	"	٤/۱٦
کدو	یزد	۳۳/۱۲۷
خربزه	"	۱۲/۷۳
هندوانه	"	۲۲/۵۷
خیار	"	٤/۸
جمع کل		۱۹۰/۷۵۷
درصد کل		۲٤/۸۳

[a]: تعداد نمونه‌های آلوده / تعداد کل نمونه‌ها

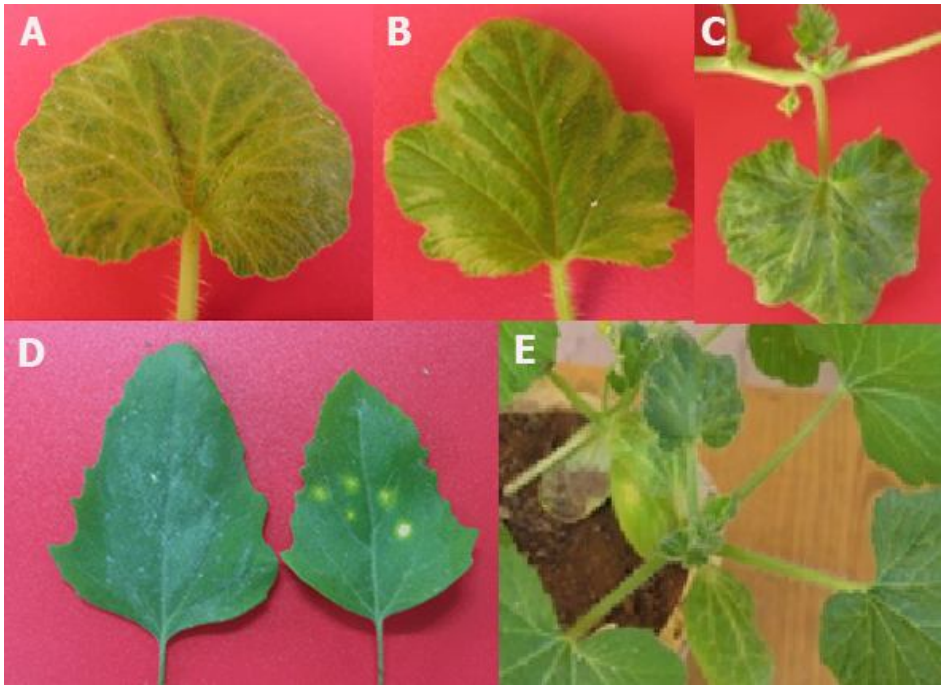
جدول٤ -نتایج آزمون انتقال ویروس موزاییک هندوانه توسط شته ***Myzus persica***

ردیف	نام جدایه	میزان آلودگی
١	KER.JI.1	١٠/٢٠ [a]
٢	KER.KE.1	١٠/٢٠
٣	YAZ.SH.1	٤/٢٠
٤	YAZ.MO.1	١٠/٢٠
٥	ESF.ES.1	٤/٢٠
٦	ESF.ES.2	٦/٢٠
٧	YAZ.MO.2	٩/٢٠
٨	YAZ.SH.2	٦/٢٠
٩	ESF.GA.1	١٠/٢٠
١٠	ESF.GA.2	١٠/٢٠
١١	ESF.ES.3	٨/٢٠
١٢	HOR.HA.1	١٠/٢٠
١٣	ESF.GA.3	١٠/٢٠
١٤	ESF.ZA.1	٨/٢٠
١٥	ESF.ZA.2	١٢/٢٠
١٦	URO.NA.1	٦/٢٠
١٧	URO.OS.1	٨/٢٠
١٨	ESF.ZA.3	١٠/٢٠
١٩	YAZ.TA.1	١٠/٢٠

[a]: تعداد نمونه‌های آلوده / تعداد کل نمونه‌ها



شکل ۱- علائم آلودگی نسبت به ویروس موزاییک هندوانه در کدوییان. **A** - علائم ابلقی و تاولی شدن سطح برگ در کدوی آلوده به ویروس جمع‌آوری از مزارع اصفهان. **B**- موزاییک، تاولی و بدشکلی در کدوی آلوده به **WMV** جمع‌آوری از مزارع یزد. **C**- علائم بدشکلی و موزاییک در هندوانه آلوده به**WMV** جمع‌آوری از شده مزارع هندوانه در کرمان. **D**- علائم نواری شدن و تاولی شدن سطح برگ در گرمک آلوده به ویروس، جمع‌آوری شده از مزارع کرمان.



شکل ۲- علائم آلودگی بر روی گیاهان مایه زنی شده توسط WMV. A- کدوی مایه‌زنی شده با جدایه YAZ.TA.1 علائم رگبرگ روشنی. B- کدوی مایه‌زنی با جدایه ESF.GA.2 علائم رگبرگ نواری. C- علائم ابلقی روی کدوی مایه‌زنی شده باجدایهYAZ.MO.1. D- سمت راست گیاه *Chenopodium qunioa* سالم سمت چپ گیاه آلوده به ویروس WMV با لکه‌های موضعی کلروتیک در سطح برگ آلوده و E- رگبرگ نواری و ابلقی درگلدان آلوده شده توسط شته *Myzus persicae*، (جدایه YAZ.MO.2).

منابع

1.Amiri, J. and Ebrahim-Nesbat, F. 1977. *Reseda luteal* L. and *Fumaria asepala Bioss* the natural hosts of *Watermelon mosaic virus* in Mashhad areas, Iran. Iran J. Plant Pathol. 13 (3-4)51(in Persian).

2.Bahar, M., Danesh, D. and Filsouf, F. 1983. Prevalence and identity of cucurbit infecting virus in Isfahan. Proc. 7th Plant Prot. Congr. Iran, Karaj, P, 76 (Abst.).

3.Castle, S.J., Perring, T.M., Farrar, C.A., and Kishaba, A.N. 1992. Field and laboratory transmission of watermelon mosaic virus 2 and zucchini yellow mosaic virus by various aphid species. Phytopathol. 82:235-240.

4.Clark, M. F., and Adams, S. A. N. 1977. Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. J Gen Virol. 34: 475-483.

5.Demeski, W., and Sowell, G. 1970. Suseptibility of cucurbita pepo and citrullus lanatus introduction to *Watermelon mosaic virus*-2. Plant Dis. 54:880-881.

6.Ebrahim-Nesbat, F. 1972. A report on isolation of Watermelon mosaic virus in Iran. Iran J. Plant Pathol. 8 : 10-11.
7.F.A.O. 2010. The F.A.O. Sat, core production data. Available at http://faostat.fao.org
8.Flasinski, S., and Cassidy, G. 1998. Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. Arch. Virol. 143:2159-2172.
9.Hashemi, M. and Izadpanah, K. 2002. Rapid purification of pulse legume potyviruses without using ultracentrifuge .Proc. 15th Iran. Plant Protec. Cong., Kermanshahe,Iran.
10.Luis-Arteaga, M., Alvarez, J. M., Alonso-Prados, J.L., Bernal, J.J., Garcia-Arenal, F., Lavina, A., Batlle, A., and Moriones, E. 1998. Occurrence, distribution, and relative incidence of mosaic viruses infecting field-grown melon in Spain. Plant Dis. 82: 979-982.
11.Moreno, I.M., Malpica, J.M., Diaz-Pendon, J.A., Moriones, E., Fraile, A., and Garcia-Arenal, F. 2004.variability and genomic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. Virol.318:451-460
12.Papayiannis, L.C., Ionnou, N., Boubourakas, N. I., Dovas, I. C., Katis, N. I., and Falk., B.W. 2005. Incidence of viruses infecting cucurbits in Cyperus. J. Phytopathol. 153:530-535.
13.Prvvidenti, R., and Shroeder, WT. 1970. A common gene for resistance to *Bean yellow mosaic virus* and *Watermelon mosaic virus 2* in *Pisum sativum.* Phytopathol. 61:846-848.
14.Purcifull, D., Heibert, E., and Edwarson, J. 1984. *Watermelon mosaic virus*-2. *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses* No. 63.
15.Roger, H. 2002. Matthew's Plant Virology. John Innes Center, Norwish. Academic Press.
16.Samei, A. 2004. Identification, distribution, and incidence rate of some viruses infecting cucurbits in glasshouses in Iran. MS.c thesis, Shahid Bahonar, Kerman Univ. Press, 158 P.(in Persian).
17.Sharifi, M., and Massumi, H. 2008. Analysis of the biological and molecular variability of Watermelon mosaic virus (WMV) isolate from Iran. Virus Genes 37:304-313.
18.Shukla, D., Ward, W., and Brunt, A. 1994. The Potyviridae. C.A.B. International, Wallilngford, UK.
19.Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., and Gal-On, A. 2002. Characterization of Synergy Between *cucumber mosaic virus* and potyviruses in Cucurbit Hosts. Plant Dis. 92: 51-57.
20.Weidemann, H. L. and Mostafawy, M. 1972. Watermelon mosaic virus type 2 in Iran and its transmission by different aphid species. Iran J. Plant Pathol. 8: 20.
21.Xu, Y., Kang, Z., Shi, Z., Shen, H., and Wehner, T. 2004. Inheritance of resistance to *Zucchini yellow mosaic virus* and *Watermelon mosaic virus*. J. Hered. 95:498-502

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 20 (1), 2013
http://jopp.gau.ac.ir

Biological properties and distribution of *Watermelon mosaic virus* (WMV) in cucurbits growing areas of several Iranian provinces

M. Sharifi[1] and [*]H. Massumi[2]
[1]M.Sc Student, Dept. of Plant Pathology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran,
[2]Associate Prof., Dept. of Plant Pathology, Shahid Bahonar University of Kerman

Abstract

Watermelon mosaic virus (WMV) is one of the important plant viruses of cucurbits worldwide. In order to investigate relative incidence, experimental host range, symptomatology and transmission efficacy of aphid vector of WMV, cucurbits species (squash, cantaloupe, watermelon, and cucumber) grown in agricultural regions in five provinces (Esfahan, West Azarbayjan, Kerman, Hormozgan and Yazd) were surveyed. Collected samples were analyzed by double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA). The symptoms of WMV infected samples were mosaic, malformation, blistering and vein banding. The highest and lowest virus infections were 44.9 and 9.5% in West Azarbayjane and Keramn provinces, respectively. The maximum (70.6 %) and minimum (5.9%) rates of infection were observed in cantaloupe and watermelon, respectively. According to host range and region, 19 positive infected samples were selected for further studies. Depending on virus isolates, inoculation of selected isolates on test plants produced different symptoms. The antiserum prepared against whole WMV particles had a titer of 1/500 in indirect ELISA test. The rate of virus transmission by *Myzus persica* according to WMV isolates was between 20 to 60%. The results of this study indicated that WMV is a destructive virus in cucurbit plants in Iran and different cucurbit plants showed diverse susceptibility against WMV infection.

***Keywords*:** Cucurbits*; Watermelon mosaic virus;* Rate of infection*;* Virus transmission

[*]Corresponding Author; Email: masoomi@mail.uk.ac.ir