ارزیابی واکنش برخی توده‌های بومی خربزه ایران به ویروس کوتولگی زرد کدوئیان *

EVALUATION OF REACTION OF SOME IRANIAN MELON ACCESSIONS TO CUCURBIT YELLOW STUNTING DISORDER VIRUS

طیبه کشاورز[۱]، مسعود شمس بخش[۱**] و کرامت ایزدپناه[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۳)

چکیده

ویروس کوتولگی زرد کدوئیان(CYSDV) عضو جنس *Crinivirus* از تیره *Closteroviridae*، یکی از ویروس‌های خسارت زا در تیره کدوئیان می‌باشد. بکارگیری واریته‌های مقاوم بهترین راه مدیریت خسارت ناشی از این ویروس است. در تحقیق حاضر واکنش ۲۵ توده بومی خربزه و طالبی(*Cucumis melo*) جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران تحت شرایط مایه‌زنی کنترل شده به جدایه بوشهر CYSDV ارزیابی شدند. مایه‌زنی بوته‌ها در مرحله سه برگی توسط سفید بالک *Bemisia tabaci* حامل ویروس انجام و واکنش نمونه‌های فوق بر اساس میانگین شدت شاخص بیماری ۸ هفته پس از مایه‌زنی، زمان ظهور علایم (درصد آلودگی ۲۰ روز پس از مایه زنی) و میانگین جذب در آزمون الیزا ۸ هفته پس از مایه زنی مورد ارزیابی قرار گرفت. تنها دو نمونه چروک زرد و تیل زرد تاخیر در ظهور علایم، شاخص شدت بیماری پایین و میزان جذب پایین در آزمون الیزا نشان دادند و بر این اساس مقاوم به ویروس و متحمل به بیماری قلمداد شدند. نمونه‌های زرد خارجی، زرد مشبک درشت و زرد طلایی به دلیل غلظت پایین ویروس در آزمون الیزا و نمونه‌های سیرجان، خاکستری خط دار و کاشفی به دلیل تأخیر در ظهور علایم در گروه نمونه‌های مقاوم به ویروس قرار گرفتند در حالی که نمونه‌های یزدی، زرد طلایی ،سیرجان، زرد معطر و سفید که شاخص شدت بیماری پایین داشتند و علایم خفیف‌تری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان دادند در گروه متحمل به بیماری قرار گرفتند. سایر نمونه‌های بررسی شده حساسیت بالایی به ویروس نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: مقاومت، شدت بیماری، الیزا

---

*: بخشی از رساله دکتری نگارنده اول ارائه شده به گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shamsbakhsh@modares.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲ استاد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مقدمه

ویروس‌های قابل انتقال با سفید بالک (*Bemisia tabaci*) باعث خسارت اقتصادی شدیدی به گیاهان تیره کدو (*Cucurbitaceae*) شامل خیار (*Cucumis sativus*)، خربزه (*C. melo*)، و کدو (*Cucurbita spp.*) می‌شوند. یکی از این ویروس‌ها، ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*, CYSDV) عضو جنس *Crinivirus* از تیره *Closteroviridae* می‌باشد (Martelli *et al.* 2002). این ویروس اولین بار در سال ۱۹۹۰ از امارات متحده عربی (Hassan & Duffus 1991) و سپس در سال ۱۹۹۶ از اسپانیا گزارش شد (Ce'lix *et al.* 1996). دیگر مناطق انتشار این ویروس، شامل آمریکای شمالی (Kao *et al.* 2000)، مصر و برخی نقاط دیگر آفریقا (Wisler *et al.* 1998)، لبنان (Abou-Jawdah *et al.* 2000)، عربستان سعودی و اسرائیل (Wisler *et al.* 1998)، اردن و ترکیه (Wisler *et al.* 1998, Rubio *et al.* 1999)، مراکش (Desbiez *et al.* 2000)، پرتغال (Louro *et al.* 2000) و ایران (Keshavarz & Izadpanah 2005) می‌باشد.

ناقل CYSDV بیوتیپ B و Q سفید بالک (*B. tabaci*) می‌باشد (Berdiales *et al.* 1999). این ویروس بیشترین مدت بقا در میان کلسترو ویروس‌ها را دارد (Wisler *et al.* 1998). دامنه میزبانی طبیعی CYSDV محدود به تیره کدو می‌باشد. در اثر آلودگی گیاهان تیره کدو به ویروس تعداد، وزن و اندازه میوه شدیداً کاهش یافته و کیفیت و کمیت آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد به طوری‌که کاهش محصول به میزان ۳۰ تا ۴۰ درصد گزارش شده است (Lopez-Sese & Gomez-Guillamon 2000).

در مراحل اولیه آلودگی، برگ‌های گیاهان لکه‌های زرد نشان می‌دهند که به مرور زمان به هم پیوسته وموجب زردی کل برگ به جز رگبرگ‌ها می‌شود (Ce'lix *et al.* 1996, Abou–Jawdah *et al.* 2000). زردی و کوتولگی روی خربزه و خیار گزارش شده است (Kao *et al.* 2000, Abou–Jawdah *et al.* 2000). علایم CYSDV روی خربزه در ایران عبارت است از ظهور نقاط زرد در متن سبز برگ که به تدریج گسترش می‌یابند و در مراحل میانی، رنگ برگ زرد می‌شود اما نقاط کوچک سبز رنگ در متن آن پراکنده باقی‌می‌ماند. سرانجام تمامی برگ زرد شده و تنها رگبرگ و نوار حاشیه‌ای آن سبز باقی می ماند. در کدو کوتولگی کاملاً مشهود است (Keshavarz & Izadpanah 2005).

روش‌های عمده مدیریت ویروس‌های گیاهی، کنترل ناقل، اقدامات زراعی و استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد (Wisler *et al.* 1998 & Louro *et al.* 2000). در مطالعه *آگیلار و همکاران* (۲۰۰۶) از میان ۱۰۰ توده ژنتیکی خیار ۲۴ توده تحت شرایط طبیعی مقاومت یا مقاومت نسبی به CYSDV داشتند در حالی که تحت شرایط کنترل شده (گلخانه‌ای) تنها دو نمونه مقاومت نشان دادند. هم‌چنین از میان ۱۲۴ توده ژنتیکی خیار تحت شرایط کنترل شده و مایه‌زنی سنگین هفت نمونه تاخیر در ظهور علایم، درصد پایین آلودگی و علایم خفیف تر نسبت به ارقام حساس نشان داده‌اند. اگر چه هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی به CYSDV مقاوم نبودند ولی دربرگ‌های میانی ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس کاهش غلظت ویروس دیده شده است (Eid *et al.* 2006). در مطالعاتی که روی واکنش توده های خربزه در اسپانیا انجام گرفت از بین ۴۴ نمونه مورد بررسی مقاومت ژرم پلاسم TGR-1551 به CYSDV گزارش شد

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

(Lopez-Sese & Gomez-Guillamon 2000). مطالعه *مارکو و همکاران* در سال ۲۰۰۳ با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) و هیبریداسیون مولکولی نشان داد که مکانیسم مقاومت به CYSDV جلوگیری از حرکت ویروس در سیستم آوندی گیاهان و یا جلوگیری از تجمع ویروس می‌باشد(Marco *et al*. 2003). با توجه به اهمیت ویروس کوتولگی زرد کدوئیان در ایران (Keshavarz and Izadpanah 2005)، در این پژوهش واکنش ۲۵ توده بومی خربزه جمع‌آوری شده از نقاط مهم کشت این محصول در ایران به CYSDV به منظور یافتن ژرم پلاسم مقاوم بررسی شد.

روش بررسی

انتخاب توده‌های بومی

تعداد ۲۵ توده بومی خربزه و طالبی از بانک ژن گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. در مطالعه *فابریکی اورنگ و همکاران* (۱۳۸۸) تنوع ژنتیکی۵۲ توده بومی خربزه، یک توده بومی طالبی سمسوری و یک توده بومی خربزه گرمک (دو رگه) جمع‌آوری شده از ۱۱ استان کشور با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR مورد مطالعه قرار گرفتند. در مجموع ۱۱ آغازگر که دارای توالی های ساده تکراری (ریزماهواره ای) بودند برای تکثیر قطعاتی از DNAی ژنومی گیاه استفاده شده است. در نتیجه توده‌های یاد شده در ۲۵ گروه، گروه‌بندی شدند. در مطالعه حاضر از هر گروه یک نمونه انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. نام محلی و محل جمع‌آوری ۲۵ توده انتخاب شده در جدول ۱ آمده است. از توده محلی حساس (طالبی سمسوری ورامین) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

منبع ویروس

جدایه CYSDV از گیاه خیارچنبر (*C. melo* Var. flexousus) آلوده با علایمی مانند وجود نقاط زرد در متن سبز برگ‌های بالایی و وجود نقاط سبز در متن زرد برگ های میانی و زردی شدید برگ‌های پایینی از روستای سمل واقع در استان بوشهر جمع‌آوری و به منظور خالص سازی بیولوژیک با استفاده از بیوتیپ B سفیدبالک عاری از ویروس روی خربزه در شرایط گلخانه منتقل و نگهداری شد. پس از تکثیر بخش پروتئین پوششی ژنوم آن در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و تعیین توالی آن، در بانک ژن ثبت و برای آزمایش‌های مربوط به ارزیابی مقاومت ارقام از آن استفاده شد. عدم آلودگی گیاه خیارچنبر به ویروس *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) قابل انتقال با سفید بالک *B. tabaci* ، تأیید شد.

تهیه کلنی سفید بالک عاری از ویروس

جهت تهیه کلنی سفید بالک عاری از ویروس ، برگ‌های حاوی تخم بیوتیپ B سفید بالک از مزارع استان بوشهر جمع‌آوری و روی یخ به گلخانه منتقل شد. سپس برگ‌های حاوی تخم از ناحیه دمبرگ در آب قرارگرفت و تا تفریخ کامل تخم در شرایط دمایی ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پوره‌ها روی پنبه (گیاه غیر میزبان ویروس) پرورش داده شدند و پس از بلوغ و تخم گذاری، سفیدبالک‌های بالغ حذف گردیدند. از نتاج به عنوان سفید بالک عاری از ویروس در آزمایش‌های انتقال استفاده شد. کلنی غیر آلوده بر روی گیاهان پنبه در دمای ۲۲ تا ۳۲ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۸۵% و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شد (Celix *et al*. 1996).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول ۱. نام محلی، محل جمع آوری و شماره توده های خربزه و طالبی ایرانی مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Local name, collection place and code number of melon and longmelon accessions used in this study

شماره نمونه Sample code	محل جمع آوری Collection place	نام محلی Local name	شماره نمونه Sample code	محل جمع آوری Collection place	نام محلی Local name
M15	--	Annanaci shirin	M4	Yazd	Yazdi
M31	Khorasan (Jimabad)	Chorrok zard	M5	-	Khatdar
M34	Khorasan (Khohe sorkh)	Locki 3	M7	Kerman	Sirjan
M8	Eyvanekey	Eyvanekey	M9	Khorasan (Khohe sorkh)	Locki 1
M38	Mashhad	Samsuri	M17	Isfahan	Doe ragueh
M12	Mashhad	Khatoni	M19	Nahavand	Mir panji
M40	Mashhad	Zard moshabbak	M21	Zanjan	Zanjan
M41	-	Zard khareji	M22	Mashhad	Zard moattar
M42	Yazd	Yazdi to ghermez	M25	Ilam	Gorgueh-e-deim
M16	Yazd	Yazdi bozorg	M27	Khorasan (Khohe sorkh)	Zard talaee
M46	Kerman	Soghan	M47	Khorasan (Khaf)	Sefied
M23	Mashhad	Till zard	M48	Torbat-e-heydariyeh	Kashefi
			M52	Isfahan	Ebram-e gorgab

مایه‌زنی گیاهان با ویروس

گیاهان مورد نظر در مرحله سه برگی(ظهور اولین برگ حقیقی) در شرایط گلخانه مایه‌زنی شدند. برای این منظور، سفید بالک‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت روی گیاه آلوده و سپس مدت ۴۸ ساعت روی گیاهان سالم مورد آزمایش قرار داده شدند. سپس گیاهان مایه‌زنی شده با سم کونفیدور(Imidacloprid, Confidor) سم پاشی و سفیدبالک‌ها حذف گردیدند. تعداد بوته مایه زنی شده از ۵ تا ۱۵ بوته برای هر نمونه متغیر بود و میانگین تعداد سفید بالک برای هر بوته از حداقل ۱۵ عدد در رقم گرگه دیم تا حداکثر ۴۶ عدد در رقم لاکی۱ متغیر بود. علایم بیماری در شرایط کنترل شده مورد ارزیابی قرار گرفت. از گیاه تغذیه شده توسط سفید بالک عاری از ویروس به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تعیین شاخص شدت بیماری

برای تعیین میزان مقاومت، به علایم ظاهر شده براساس پیشنهاد *اید* و همکاران (۲۰۰۶) با اندکی تغییرات نمره داده شد.

مقیاس صفر: گیاهان بدون علایم ، ۱:موزاییک خفیف بدون وجود زردی ،۲: ۳ تا ۴ برگ آلوده (یک برگ دارای علایم زردی)، ۳: ۵ تا ۶ برگ آلوده (۲ برگ داری

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

علایم زردی)، ۴: گیاهان بیشتر از ۶ برگ آلوده (۳ برگ یا بیشتر دارای علایم زردی).(شکل ۱).

آزمایش مربوط به آنالیز شاخص آلودگی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و ۲۶ تیمار(۲۵ توده مورد بررسی و نمونه حساس) انجام گرفت.

تعیین تراکم جمعیت سفید بالک

برای نشان دادن میزان تراکم جمعیت سفید بالک از هر نمونه به طور تصادفی ۵ گیاه انتخاب و در مرحله ۳ برگی تعداد سفید بالک موجود بر هر گیاه شمارش و میانگین تعیین شد. آزمایش مربوط به تعیین تراکم جمعیت سفید بالک در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و ۲۵ تیمار انجام گرفت.

ارزیابی آلودگی به ویروس بر اساس آزمون الیزا

تمامی گیاهان مورد آزمایش با استفاده از آزمون الیزای غیر مستقیم به روش ارائه شده توسط *کانورس و مارتین* (Converse & Martin 1990) جهت بررسی وجود آلودگی به CYSDV با آنتی بادی تهیه شده علیه این ویروس (Keshavarz 2003) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور از برگ‌های میانی گیاهان در موقعیت یکسان در کلیه تکرارها استفاده شد. رقت آنتی بادی مورد استفاده ۱:۳۰۰۰ ورقت آنتی‌بادی ضد خرگوش متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز ۱:۵۰۰۰ بود. از میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر به عنوان شاخص جهت ارزیابی غلظت ویروس و شدت آلودگی استفاده شد. آنالیز مربوط به نتایج آزمون الیزا در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با داده های از دست رفته با ۵ بلوک و ۲۷ تیمار(۲۵ توده مورد بررسی، نمونه حساس و شاهد سالم) انجام گرفت.

ارزیابی آلودگی به ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به طریق ترانویسی معکوس-(RT-PCR)

تعدادی از گیاهانی که در آزمون الیزا جذب مثبت داشتند جهت تأیید نتایج الیزا با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به طریق نسخه‌برداری معکوس با استفاده از جفت آغازگر CYS-CP-5 (5'-ATGGCGAGTTCGAGTGAGAA-3′) و CYS-CP-3(5'-TCAATTACCACAGCCACCTG-3′) تکثیر کننده قطعه ۷۵۰ نوکلئوتیدی شامل طول کامل پروتئین پوششی(Liveratos 1998) نیز مورد ارزیابی قرارگرفتند.

آنالیز داده‌ها

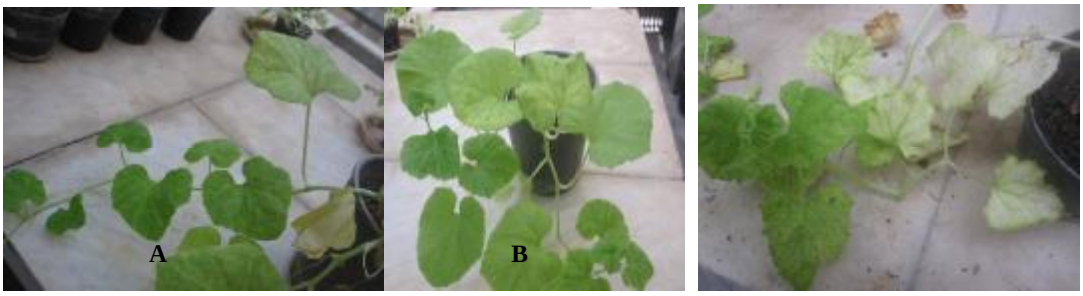
آنالیزهای آماری مورد نیاز در این پژوهش با استفاده از نرم افزار SAS انجام و برای مقایسه میانگین از آزمون کمترین اختلاف معنی دار(LSD) در سطح احتمال ۵% درصد استفاده شد.

نتایج

بروز اولین علایم بیماری ۱۰ روز پس از مایه زنی در کلیه نمونه‌ها بجز M19 (میر پنجی)، M15 (آناناسی شیرین)، M21(زنجان)، M8 (ایوانکی)، M12 (خاتونی)، M38 (سمسوری)، M4 (یزدی)، M27 (زرد طلایی) و M42(یزدی تو قرمز) دیده شد (جدول ۲).

بیست روز پس از مایه زنی درصد گیاهان دارای علایم در نمونه‌های M8 (ایوانکی)، M4 (یزدی)، M19 (میر پنجی)، M52 (ابرامه گرگاب)، M34 (لاکی ۳)، M21 (زنجان) و M16 (یزدی بزرگ) به ۱۰۰ درصد رسید. در حالیکه درصد گیاهان دارای علایم در نمونه‌های M5 (خاکستری خط دار)، M7 (سیرجان)، M23 (تیل زرد) و

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل ۱. گیاهان آلوده به ویروس کوتولگی زرد کدوئیان که شاخص شدت بیماری (۲) A، (۳) B و(۴) C را نشان می‌دهند.

Fig.1.*Cucurbit yellow stunting disorder virus* infected plants show A(2), B(3) and C(4) disease severity index.

جدول ۲. درصد گیاهان دارای علایم ویروس کوتولگی زرد کدوئیان(CYSDV) در توده‌های بومی خربزه و طالبی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی

Table 2. percentage of plants with symptoms 10, 15 and 20 days after inoculation (DAI) with CYSDV

نمونه Accesion	۱۰ روز پس از مایه زنی 10 DAI	۱۵ روز پس از مایه زنی 15 DAI	۲۰ روز پس از مایه زنی 20 DAI
M15	0,00	25,00	87,50
M31	7,14	21,43	35,71
M4	0,00	85,71	100,00
M27	0,00	33,33	55,56
M25	40,00	73,33	81,82
M5	7,14	28,57	28,57
M9	7,14	14,29	72,73
M12	0,00	50,00	62,50
M48	14,29	28,57	28,57
M8	0,00	50,00	100,00
M19	0,00	75,00	100,00
M52	9,09	45,45	100,00
M17	12,50	56,25	68,75
M40	45,45	63,64	100,00
M47	16,67	50,00	50,00
M41	10,00	70,00	70,00
M34	30,77	69,23	100,00
M22	12,50	37,50	87,50
M46	20,00	50,00	90,00
M38	0,00	53,33	66,67
M21	0,00	100,00	100,00
M23	15,38	30,77	38,46
M16	16,67	66,67	100,00
M7	9,09	18,18	33,33
M42	0,00	28,57	42,86

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

M31 (چروک زرد) M48 کاشفی پایین‌ترین مقدار و کمتر از ۴۰ درصد بود. جدول ۲ درصد گیاهان آلوده ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی را نشان می‌دهد.

تعیین شاخص شدت بیماری (Disease severity index)

آنالیز نتایج شدت علایم بیماری نشان داد که بیشترین شدت علایم مربوط به نمونه M21 (زنجان) و پس از آن نمونه‌های M38 (سمسوری)، M52 (ابرامه گرگاب)، M34 (لاکی ۳)، M17 (دورگه خربزه گرمک) و M16 (یزدی بزرگ) بیشترین شدت علایم را نشان دادند.

نمونه‌های M4 (یزدی)، M27 (زرد طلایی)، M7 (سیرجان)، M22 (زرد معطر)، M47 (سفید)، M31 (چروک زرد) و M23 (تیل زرد) کمترین شدت علایم را نشان دادند جدول ۳ مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری را نشان می‌دهد.

ارزیابی غلظت نسبی ویروس بر اساس میزان جذب آزمون الیزا

میزان جذب چاهک هر پلیت در طول موج ۴۰۵ نانومتر نشان داد که نمونه M4 (یزدی) بیشترین میزان جذب و پس از آن M17 (دورگه خربزه گرمک)، M21 (زنجان)، M16 (یزدی بزرگ)، M38 (سمسوری)، و M8 (ایوانکی)، میزان جذب بالایی نشان دادند. درحالی‌که که میزان جذب ویروس به ترتیب در نمونه‌های M41 (زرد خارجی)، M23 (تیل زرد)، M40 (زرد مشبک درشت)، M31 (چروک زرد) و M27 (زرد طلایی) و M22 (زرد معطر) پایین ترین مقدار بود. جدول ۴ مقایسه میانگین بر اساس میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر را نشان می‌دهد.

بررسی تراکم جمعیت سفید بالک

آنالیز مقایسه میانگین تعداد حشرات در حال تغذیه در مرحله سه برگی نشان داد که بین نمونه‌های بررسی شده تفاوت معنی داری وجود نداشت. به طور متوسط میانگین جمعیت ۳۰ عدد حشره در هر بوته بود و میانگین تعداد حشرات شمارش شده از حداقل ۱۵ عدد در هر بوته در رقم گرکه دیم تا حداکثر۴۶ عدد در رقم لاکی۱ مشاهده شد.

ارزیابی آلودگی به ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به طریق نسخه برداری معکوس

پس از استخراج آر ان ای ویروس با استفاده از کیت Tripure (Rosch, Germany) و انجام RT-PCR از تعدادی از گیاهانی که در آزمون الیزا جذب مثبت داشتند قطعه‌ای به طول ۷۵۰ جفت باز تکثیر شد. شکل ۲ نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در ژل ۱ درصد را نشان می‌دهد.

بحث

ویروس کوتولگی زرد کدوئیان موجب خسارت اقتصادی شدید در کدوئیان منطقه خاور میانه شده و به‌دلیل گسترش سریع آن یکی از ویروس‌های مهم کدوئیان محسوب می‌شود (Lecoq *et al*. 1998). این ویروس یکی از ویروس‌های مهم کدوئیان در ایران محسوب می‌شود. در این تحقیق واکنش ۲۵ توده بومی خربزه و طالبی به عنوان نماینده ۵۴ توده گروه‌بندی شده با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR (Fabriki *et al*. 2009) تحت شرایط کنترل شده جهت بررسی مقاومت به این ویروس مورد ارزیابی قرار گرفتند. توده‌های مورد بررسی بر اساس

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول ۳. شاخص شدت بیماری در توده‌های خربزه ۸ هفته پس از مایه‌زنی با ویروس کوتولگی زرد کدوئیان

Table 3. Disease severity indexes (DSIs) of melon accessions inoculated with CYSDV at 6 weeks post inoculation

Accession (توده)	Average DSI (میانگین شاخص شدت بیماری)	No. of plants with DSI > 3 (تعداد گیاهان با DSI > 3)
M21	4[a]	5
M38	3. 8 [ab]	5
M52	3.8[ab]	5
M34	3[bc]	3
M17	3[bc]	4
M16	2.6[cd]	3
M19	2.4[cde]	1
M46	2.4[cde]	2
M15	2.4[cde]	2
M8	2[def]	1
M40	2[def]	1
M9	2[def]	1
M25	2[def]	1
M41	1.8[ef]	1
M42	1.8[ef]	1
M12	1.8[ef]	1
M48	1.6[ef]	0
M5	1.6[ef]	0
M23	1.4[f]	0
M31	1.4[f]	0
M47	1.4[f]	0
M22	1.4[f]	0
M7	1.4[f]	0
M27	1.4[f]	0
M4	1.2[f]	0

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نامگذاری شده اند بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی دار در سطح ۵% در یک گروه قرار می‌گیرند.

Means followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$ using the least significant difference test.

میانگین شدت شاخص بیماری ۸ هفته پس از مایه‌زنی، زمان ظهور علایم (درصد آلودگی ۲۰ روز پس از مایه زنی) و میانگین جذب در آزمون الیزا ۸ هفته پس از مایه‌زنی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی‌های مربوط به زمان ظهور علایم نشان داد که علایم در نمونه‌هایی چون M7 (سیرجان)، M23 (تیل زرد)، M31 (چروک زرد)، M5 (خاکستری خط دار) و M48 (کاشفی) با تأخیر ظاهر شد (جدول ۲). هم‌چنین بررسی شاخص شدت بیماری نشان داد که نمونه‌های M4 (یزدی)،M27 (زرد طلایی)، M7 (سیرجان)، M22 (زرد معطر)، M47 (سفید)، M31

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول ۴. میانگین جذب ویروس در آزمون الیزای غیر مستقیم ویروس کوتولگی زرد کدوئیان (CYSDV)در برگ‌های میانی۲۵ نمونه ژنتیکی خربزه ۸ هفته پس از مایه‌زنی

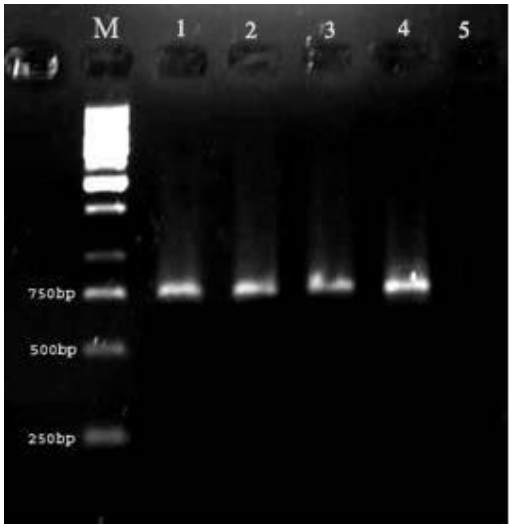
Table 4. Mean absorbance of CYSDV in extracts of middle leaves of 25 selected melon accessions at 8 weeks post inoculation

Accession (نمونه ژنتیکی)	*Mean A*405 readings (میانگین جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر)
M4[a]	2.4191
M17[b]	1.4812
M21[b]	1.4197
M16[bc]	1.3192
Positive control[bcd]	1.1822
M38[bcd]	1.1162
M8[bcd]	1.0446
M42[cde]	0.8558
M7[cdef]	0.8004
M19[cdef]	0.7973
M34[defgh]	0.7158
M46[defgh]	0.6457
M15[efghi]	0.4727
M52[efghi]	0.4623
M9[efghi]	0.3693
M25[efghi]	0.3435
M48[fghi]	0.3300
M5[fghi]	0.3011
M12[fghi]	0.2821
M47[fghi]	0.2466
M22[ghi]	0.2015
M27[ghi]	0.1893
M31[ghi]	0.1764
M40[ghi]	0.1629
M23[ih]	0.1350
M41[ih]	0.1005
Negative control[i]	0.0354

میانگین‌هایی که با حروف مشابه علامت گذاری شده اند بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی دار در سطح ۵% در یک گروه قرار می‌گیرند.

Means followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$ using the least significant difference test.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل۲. نقش الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در ژل آگاروز ۱ درصد با استفاده از آر ان ای استخراج شده از ۴ نمونه گیاهی الیزا مثبت و آغازگر تکثیر کننده ژن پروتئین پوششی.(M: نشانگر اندازه دی ان ای ،۱: M38 (سمسوری)،۲: M21 (زنجان)،۳: M34 (لاکی۳)، ۴:M8 (ایوانکی) و۵: گیاه سالم)

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis pattern of RT-PCR products obtained from total RNA extracts of 4 ELISA positive plants with CYSDV-specific primers (Liveratos *et al.* 1998). Lanes M-: molecular marker (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas), 1: M38, 2: M21, 3: M34, 4: M8, 5: Healthy plant.

(چروک زرد) و M23 (تیل زرد) علایم خفیف‌تری را نسبت به سایر نمونه‌های بررسی شده بروز دادند (جدول۳) در حالی که میزان جذب بررسی شده توسط آزمون الیزای غیر مستقیم نشان داد که نمونه‌های M41 (زرد خارجی)، M23 (تیل زرد)، M40 (زرد مشبک درشت)، M31 (چروک زرد)، M27 (زرد طلایی) ، M22 و (زرد معطر) M47 (سفید) به ترتیب کمترین میزان جذب را داشتند (جدول۴). بر اساس تعریف کوپر و جونز (۱۹۸۳) نمونه‌های M41 (زرد خارجی)، M23 (تیل زرد)، M40 (زرد مشبک درشت)، M31 (چروک زرد)، M27 (زرد طلایی) و M22 (زرد معطر) به دلیل غلظت پایین ویروس در آزمون الیزا و نمونه‌های M7 (سیرجان)، M23 (تیل زرد)، M31 (چروک زرد)، M48 (کاشفی) و M5 (خاکستری خط دار)(جدول ۲) به دلیل تاخیر در ظهور علایم در گروه نمونه‌های ژنتیکی مقاوم به ویروس قرار گرفتند در حالی که نمونه‌های M4 (یزدی)،M27 (زرد طلایی)، M7 (سیرجان)، M22 (زرد معطر)، M47 (سفید)، M31 (چروک زرد) و M23 (تیل زرد) که شاخص شدت بیماری پایین دارند در گروه متحمل به بیماری قرار می‌گیرند.

در بین نمونه‌ها، نمونه M4 (یزدی) از نظر شاخص شدت بیماری‌زایی پایین‌ترین میزان ولی از نظر میزان جذب در آزمون الیزا بیشترین میزان را نشان داد و این نشان می‌دهد با وجود غلظت بسیار بالای ویروس علایم خفیفی در گیاه بروز می‌کند و از این رو این نمونه براساس تعریف کوپر و جونز (۱۹۸۲) متحمل ارزیابی شد.

نمونه M7 (سیرجان) با وجود تأخیر در ظهور علایم و پایین بودن شاخص شدت بیماری بر اساس میزان جذب در آزمون الیزای غیر مستقیم در گروه با جذب نسبتاً بالا قرار می‌گیرد و این نشان می‌دهد که با وجود غلظت نسبتاً

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

بالای ویروس در این نمونه شدت علایم بسیار پایین است و این نمونه با توجه به این‌که علایم در آن با تاخیر ظاهر شد در گروه مقاوم به ویروس و به دلیل پایین بودن شاخص بیماری در گروه متحمل به بیماری قرار گرفت. نمونه M23 (تیل زرد) و M31 (چروک زرد) با تاخیر در ظهور علایم، پایین بودن شاخص شدت بیماری و پایین بودن میزان جذب الیزا دو نمونه مقاوم به ویروس و متحمل به بیماری محسوب می‌شوند . بقیه نمونه‌ها در گروه حساس قرار گرفتند.

آنالیز نتایج میزان جمعیت سفید بالک نشان داد که تفاوت معنی‌داری از این نظر میان نمونه‌های مختلف وجود نداشت. از این رو به نظر می‌رسد تفاوت اصلی بین نمونه‌های در واکنش به ویروس مورد مطالعه مربوط به واکنش گیاه باشد. نتایج مشابهی توسط *آگیلار* و همکاران (۲۰۰۶) و *اید* و همکاران (۲۰۰۶) به دست آمده است.

در بررسی واکنش ۱۲۴ توده خیار به CYSDV توسط *ایدس* و همکاران(۲۰۰۶) هیچ یک از نمونه‌های مقاومت نشان ندادند و تنها هفت نمونه تأخیر در ظهور علایم، درصد پایین آلودگی و شدت علایم پایین نسبت به سایر نمونه‌ها داشته‌اند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. هم‌چنین در مطالعه انجام گرفته در اسپانیا از بین ۳۰۰ توده ژنتیکی خیار تحت شرایط کنترل شده تنها ۲ نمونه تاخیر در ظهور علایم و کاهش تجمع ویروس کوتولگی زرد کدوئیان در گیاه نشان داده‌اند (Aguilar *et al*. 2006). از طرف دیگر در بررسی ۴۴ توده ژنتیکی *C. melo* تنها یک نمونه مقاوم به CYSDV گزارش شد (Lopez-Sese & Gomez-Guillamon 2000). مجموع این مطالعات نشان می‌دهد که منبع مقاومت به CYSDV کم می‌باشد و اکثر توده‌های ژنتیکی که کشت و کار آنها در دنیا رایج است، به این ویروس حساس می‌باشند. بنابراین ناگزیر از به‌کار گیری توده‌های نسبتا مقاوم و متحمل در برنامه‌های کنترل ویروس می‌باشیم. با توجه به این‌که ارزیابی مقاومت توده‌ها در شرایط کنترل شده و تحت شرایط مایه‌زنی سنگین انجام گرفت و با توجه به این‌که چنین شرایطی به ندرت در مراحل اولیه آلودگی در مزارع رخ می‌دهد، ممکن است شدت و درصد آلودگی به ویروس در شرایط طبیعی پایین‌تر باشد. از این‌رو لازم است مقاومت یا تحمل نمونه‌هایی که در این تحقیق مقاومت یا تحمل نشان دادند در شرایط مزرعه و آلودگی طبیعی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. هم‌چنین بررسی میزان کاهش عملکرد محصول ناشی از آلودگی به ویروس در شرایط مزرعه پیشنهاد می‌شود. در مطالعه *فابریکی اورنگ* و همکاران (۱۳۸۸) تنوع ژنتیکی ۵۴ توده بومی خربزه و طالبی جمع‌آوری شده از ۱۱ استان کشور با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR مورد مطالعه قرار گرفت و توده‌های مذکور گروه‌بندی شدند. در این مطالعه از هر گروه یک نمونه انتخاب ونهایتا ۲۵ توده ژنتیکی انتخاب و واکنش آنها به ویروس کوتولگی زرد کدوئیان مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این‌که در این بررسی تنها واکنش توده‌های *C. melo* (طالبی- خربزه) به ویروس کوتولگی زرد کدوئیان مورد بررسی قرار گرفت بررسی مقاومت سایر اعضای تیره کدو نیز ضروری به نظر می‌رسد. هم‌چنین با توجه به منابع نادر مقاومت به این ویروس در گیاهان زراعی رایج بررسی مقاومت برگرفته از ویروس به عنوان یکی دیگر از روش‌های کنترل ویروس پیشنهاد می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (69-71) متن انگلیسی مراجعه شود.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com