

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های خیار به ویروس کوتولگی زرد کدویان

اندیشه بنی‌مصطفی^۱، طیبه کشاورز^{۲*} و مزده ملکی^۳

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا، ورامین، ایران
- ۲- *نویسنده مسوول: استادیار بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران (ta_keshavarz@yahoo.com)
- ۳- استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا، ورامین، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۰۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۱۶

چکیده

بیماری‌های زردی ناشی از ویروس‌های قابل انتقال با سفیدبالک در مزارع کشت کدویان و گلخانه اهمیت زیادی داشته و به کدویان مناطق وسیعی از جهان خسارت زیادی وارد می‌کنند. بکارگیری واریته‌های مقاوم بهترین راه مدیریت خسارت ناشی از این ویروس‌ها است. به منظور یافتن منابع مقاومت به ویروس کوتولگی زرد کدویان (*Cucurbit yellow stunting disorder virus, CYSDV*) واکنش ۵۱ ژرم پلاسما خیار (*Cucumis sativus*) تحت شرایط گلخانه به جدایه بوشهر CYSDV ارزیابی شد. مایه‌زنی گیاهان مورد بررسی در مرحله ظهور اولین برگ حقیقی توسط سفیدبالک *Bemisia tabaci* حامل ویروس انجام و ارزیابی ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس میانگین شاخص شدت بیماری ۱۰ هفته پس از مایه‌زنی، زمان ظهور علائم و میانگین جذب در آزمون الیزا هشت هفته پس از مایه‌زنی صورت گرفت. علائم آلودگی به ویروس کوتولگی زرد کدویان بر روی اغلب ژنوتیپ‌های مورد بررسی ظاهر شد. با این حال شدت علائم، میزان جذب در آزمون الیزا و زمان ظهور اولین علائم در ژنوتیپ‌های مختلف اختلاف معنی‌داری داشت. دو ژنوتیپ TN-94-229 و TN-94-206 به دلیل تأخیر در ظهور علائم، غلظت پایین ویروس در آزمون الیزا و همچنین پایین بودن شاخص شدت بیماری نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی، دارای مقاومت نسبی به ویروس کوتولگی زرد کدویان بودند.

کلید واژه‌ها: ویروس کوتولگی زرد کدویان، ژنوتیپ‌های خیار، مقاومت

مقدمه

(Kao et al., 2000)، آفریقا (Wisler et al., 1998)، لبنان (Abou-Jawdah et al., 2000)، عربستان سعودی و اسرائیل (Wisler et al., 1998)، اردن و ترکیه (Rubio et al., 1999؛ Wisler et al., 1998)، مراکش (Desbiez et al., 2000)، پرتغال (Louro et al., 2000)، فرانسه (Desbiez et al., 2003)، ایران (Keshavarz and Izadpanah, 2005)، تونس (Yakoubi et al., 2007)، کالیفرنیا و آریزونا (Kuo et al., 2007)، مکزیک (Brown et al., 2007) و چین (Liu et al., 2010) اشاره کرد. در ایران این

ویروس کوتولگی زرد کدویان (CYSDV) از تیره *Closteroviridae* و متعلق به جنس *Crinivirus* اولین بار در سال ۱۹۹۱ از امارات متحده عربی توسط Hassan and Duffus (1991) شناسایی شد. در سال ۱۹۹۶ توسط Ce'lix et al. (1996) از اسپانیا گزارش شد و تحت نام *Cucurbit yellow stunting disorder virus* نامگذاری گردید و اکنون تهدید جدی برای کدویان سرتاسر جهان محسوب می‌شود. از مناطق انتشار این ویروس می‌توان به تکزاس و مکزیکو

شرایط کنترل شده و مایه‌زنی سنگین، هفت نمونه تأخیر در ظهور علائم، درصد پایین آلودگی و علائم خفیف‌تر نسبت به ارقام حساس نشان دادند. اگرچه هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی به CYSDV ایمن نبودند ولی غلظت ویروس در برگ‌های میانی ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است (Eid et al., 2006). با توجه به اهمیت این ویروس در مزارع خیار کشور، در این تحقیق واکنش ژنوتیپ‌های بومی خیار به یک جدایه ایرانی ویروس کوتولگی زرد کدویان جهت یافتن ژرم پلاسما مقاوم یا متحمل بررسی شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب ژرم پلاسما و منبع ویروس

تعداد ۵۱ ژنوتیپ^۱ تهیه شده از بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران (موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱، ۲ و ۳). جدایه CYSDV مورد استفاده در این تحقیق از گیاه خربزه (*Cucumis melo*) آلوده از برازجان واقع در استان بوشهر جمع‌آوری و به منظور خالص‌سازی بیولوژیک (نسبی) با استفاده از سفیدبالک (*B. tabaci*) عاری از ویروس روی گیاهچه‌های سالم خربزه در شرایط گلخانه منتقل و نگهداری شد. آلودگی به CYSDV و عدم آلودگی به دیگر ویروس قابل انتقال با سفیدبالک (*B. tabaci* chlorotic yellows virus)، با استفاده از روش RT-PCR (Keshavarz et al., 2014) تأیید شد.

مایه‌زنی گیاهان با استفاده از سفیدبالک

جهت مایه‌زنی ژرم پلاسماهای مورد نظر، کلنی سفیدبالک (*B. tabaci*) عاری از ویروس ابتدا به مدت ۲۴ ساعت روی گیاه آلوده و سپس مدت ۷۲ ساعت روی گیاهان سالم مورد آزمایش در سن ظهور اولین برگ حقیقی رهاسازی شدند. پس از طی شدن مدت زمان مذکور، گیاهان برای از بین بردن سفیدبالک‌ها با سم کونفیدور سم پاشی شدند. از گیاه تغذیه شده توسط

ویروس اولین بار در سال ۱۳۸۴ از کدویان استان بوشهر گزارش شد (Keshavarz and Izadpanah, 2005) و در مطالعات بعدی آلودگی کدویان مناطق جنوبی و مرکزی ایران به این ویروس مشخص شد (Keshavarz et al., 2013a). ویروس کوتولگی زرد کدویان (CYSDV) به صورت نیمه پایا و غیرگردشی توسط سفیدبالک *B. tabaci* منتقل می‌شود (Ce'lix et al., 1996). این ویروس نه تنها قادر به آلوده کردن اعضاء تیره کدو است بلکه گیاهانی چون یونجه (*Medicago sativa*)، کاهو (*Lactuca sativa*)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، Wright's ground alkali mallow (*Silo hederacea*)، buffalo gourd و cherry (*Physalis wrightii*) نیز میزبان این ویروس هستند (Wintermantel et al., 2009). شیوع CYSDV در سال ۲۰۰۶ در ایالت آریزونا آمریکا منجر به خسارت ۱۴ میلیون دلاری در مزارع خربزه شده است. این ویروس منجر به خسارت ۳۰ درصدی به تولید طالبی در آریزونا شده است (McCreight and Wintramental, 2011). بکارگیری ارقام مقاوم بهترین راه کنترل CYSDV می‌باشد. در اسپانیا در مطالعات مربوط به ارزیابی مقاومت ارقام توده‌های خربزه به CYSDV، واریته TGR-1551 و خربزه شاخدار (*Cucumis metuliferus*) به عنوان واریته‌های مقاوم به این ویروس معرفی شده است (Lopez-Sese and Gome Guillamon, 2000). در مطالعه صورت گرفته بر روی ۱۹ واریته خربزه در کالیفرنیا، واریته PI313970 مقاومت بالایی به CYSDV نشان داد، هر چند این کولتیوار به CYSDV ایمن نبود چرا که در گیاهان فاقد علائم ویروس قابل ردیابی بود (McCreight and Wintramental, 2011). در بررسی واکنش ۳۰۰ واریته خیار شامل خیارهای وحشی، بومی و واریته‌های تجاری تحت شرایط آلودگی طبیعی به منظور تشخیص منابع مقاومت به CYSDV تنها دو واریته تأخیر در تجمع ویروس نشان دادند (Aguilar et al., 2006). در مطالعه دیگر، از میان ۱۲۴ توده ژنتیکی خیار تحت

آغازگر معکوس و ۲ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدها در دمای 65°C به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و به آن مخلوط واکنش RT (شامل ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم رونوشت‌برداری برگردان (MMuLV 100u/μ) (سیناکلون)، ۰/۵ میکرولیتر از ترکیب (RNase inhibitor 40u/μ)، (Fermentas لیتوانی) اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای 42°C قرار داده شد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10XPCR (سیناکلون)، ۰/۷۵ میکرولیتر از محلول MgCl_2 (با غلظت ۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP Mix با غلظت ۱۰ میلی‌مولار (سیناکلون)، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase ($5\text{u}/\mu$ سیناکلون)، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای CYSDV-F و CYSDV-R (غلظت ۲۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر از محصول cDNA و ۱۶/۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گردید. برنامه حرارتی این واکنش شامل ۱ مرحله 95°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه هر یک مشتمل بر 30°C ثانیه در دمای 95°C درجه، 30°C ثانیه در دمای 55°C درجه و 30°C ثانیه در دمای 72°C درجه سانتی‌گراد بود که در پایان واکنش محصول به مدت ۱۰ دقیقه در 72°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر loading dye (۱۰ میلی‌مولار برم فنول بلو حاوی ۱۰ درصد سوکروز و گلیسرول) مخلوط و در ژل آگاروز ۱ درصد و در بافر TBE (۸/۱۰ گرم تریس، ۵/۵ گرم بوریک اسید، ۰/۷۳ گرم EDTA در یک لیتر آب مقطر، pH ۸/۳) الکتروفورز و قطعات نوکلئیک اسید بوسیله محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی و به وسیله دستگاه UV-illuminator مدل Imaco ساخت هلند عکسبرداری شد.

آنالیز داده‌ها

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

سفیدبالک عاری از ویروس به عنوان کنترل منفی استفاده شد. گیاهان در شرایط گلخانه‌ای دمای $28-32^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد، رطوبت بالا و نور طبیعی نگهداری شدند. برای ارزیابی واکنش گیاهان به ویروس مورد مطالعه و تعیین شاخص شدت بیماری، از روش پیشنهادی Eid et al. (2006) با اندکی تغییر استفاده شد. شاخص صفر: گیاهان بدون علائم، شاخص ۱: وجود نقاط زرد در متن سبز برگ (موزاییک خفیف)، شاخص ۲: علائم تیپیک CYSDV (شامل نقاط زرد در متن سبز برگ‌های میانی و وجود نقاط سبز در متن زرد برگ‌های پایینی)، شاخص ۳: علائم تیپیک CYSDV به همراه زردی خفیف و شاخص ۴: علائم تیپیک CYSDV به همراه زردی شدید. برای بررسی ترجیح میزبانی سفیدبالک، حشرات بالغ در حال تغذیه در روز اول، دوم و سوم بعد از رهاسازی سفیدبالک‌ها بر روی ژرم پلاسماهای مورد بررسی شمارش شدند.

ارزیابی آلودگی به ویروس بر اساس آزمون الیزا و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به روش نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

میزان آلودگی گیاهان مورد آزمایش با استفاده از آزمون الیزای غیرمستقیم به روش Converse and Martin (1990) و آنتی‌بادی تهیه شده علیه جدایه ایرانی CYSDV (Keshavarz, 2003) ارزیابی شد. به منظور تأیید نتایج الیزا، بر اساس میزان جذب ژنوتیپ‌ها در آزمون الیزا تعداد ۴ ژنوتیپ با میزان جذب بالا، متوسط و پایین در طول موج ۴۰۵ نانومتر انتخاب شد (شکل ۲). آر آن ای کل^۱ با استفاده از Tripure Isolation, Roche Reagent kit طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده استخراج شد.

برای تکثیر بخشی از انتهای RNA1^۳ ویروس کوتولگی زرد کدو بیان از جفت آغازگر (-CYSDV-f/CYSDV-r)، (Marco et al., 2003) استفاده شد. برای ساخت cDNA مقدار ۵ میکرولیتر از آر آن ای استخراج شده از بافت آلوده با ۲۰ پیکومول در میکرولیتر

1- Total RNA

نتایج

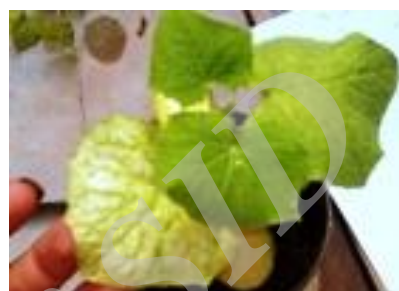
TN-94-221, TN-94-171, TN-94-232, TN-94-162

و TN-94-229 با تأخیر ظاهر شد. علائم شاخص بیماری شامل ظهور نقاط سبز در برگ و به دنبال آن زردی پهنک برگ بجز رگبرگ (شکل ۱) در اغلب ژنوتیپ‌ها ظاهر شد. جدول ۱، درصد گیاهان دارای علائم در ژنوتیپ‌های خیار را ۱۰ روز، دو و سه هفته بعد از مایه‌زنی نشان می‌دهد.

علائم اولیه بیماری در اغلب ژنوتیپ‌های مورد بررسی به سرعت ظاهر شد به طوری که سریعترین زمان بروز علائم در روز دهم پس از مایه‌زنی و در سه ژنوتیپ TN-94-178, TN-94-231 و TN-94-186 صورت گرفت. با این حال علائم بیماری در تعدادی از ژنوتیپ‌ها شامل TN-94-211, TN-94-251, TN-94-206



A.



B.

شکل ۱- علائم گیاهان آلوده به ویروس کوتولگی زرد کدویان. A: نقاط سبز در برگ، B: زردی پهنک برگ بجز رگبرگ‌ها
Figure 1. Cucurbit yellow stunting disorder virus infected plants show. A: green spot B: Yellowing of leaf except veins

جدول ۱- درصد گیاهان دارای علائم آلودگی به ویروس کوتولگی زرد کدویان (CYSDV) در ژنوتیپ‌های خیار ۱۰ روز، دو و سه هفته پس از مایه‌زنی

Table 1. Percentage of plants with symptoms of CYSDV 10, 14 and 21 days after inoculation (DAI)

Accession	10 DAI	14 DAI	21 DAI	Accession	10 DAI	14 DAI	21 DAI
TN-94-152	0	25	50	TN-94-226	0	37.5	62.5
TN-94-222	0	33	66	TN-94-178	37.5	50	100
TN-94-261	0	16	50	TN-94-249	0	25	50
TN-94-224	0	22	44	TN-94-164	0	50	87.5
TN-94-229	0	0	25	TN-94-201	0	16	66
TN-94-218	0	25	50	TN-94-250	0	28.5	57.1
TN-94-244	0	28.5	57.1	TN-94-204	14	42.8	85.7
TN-94-206	0	0	20	TN-94-264	0	28.5	71.4
TN-94-192	0	33	66	TN-94-215	0	16	50
TN-94-251	0	0	25	TN-94-148	0	0	33
TN-94-189	0	57.1	85.7	TN-94-183	0	33	66
TN-94-133	0	25	62.5	TN-94-154	0	40	80
TN-94-95	0	33	66	TN-94-197	0	42.8	71.4
TN-94-209	0	0	42.8	TN-94-252	0	14	42.8
TN-94-151	14	42.8	85.7	TN-94-211	0	0	20
TN-94-232	0	0	25	TN-94-231	40	60	100
TN-94-186	50	75	100	TN-94-262	0	28.5	71.4
TN-94-171	0	33	33	TN-94-139	0	0	50
TN-94-168	0	0	40	TN-94-172	25	37.5	87.5
TN-94-180	25	50	87.5	TN-94-134	25	50	87.5
TN-94-200	0	28.5	57.1	TN-94-175	28.5	57.1	85
TN-94-221	0	0	20	TN-94-238	25	50	87.5
TN-94-162	0	0	25	TN-94-169	0	33	66
TN-94-245	0	42.8	57.1	TN-94-141	25	50	87.5
TN-94-166	0	28.5	57.1	TN-94-193	0	16	66
TN-94-276	0	20	80				

TN-94-264 بود در حالی که پایین ترین میزان جذب مربوط به ژنوتیپ‌های TN-94-201، TN-94-229، TN-94-206 و TN-94-211 بود (جدول ۳).
آنالیز مقایسه میانگین تعداد حشرات در حال تغذیه نشان داد که بین نمونه‌های بررسی شده تفاوت معنی داری وجود نداشت.
به منظور تأیید نتایج الیزا تعداد ۴ ژنوتیپ با میزان جذب بالا، متوسط و پایین در طول موج ۴۰۵ نانومتر انتخاب (شکل ۲، جدول ۳) و با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج آر ان ای ویروس و انجام RT-PCR از تعدادی از نمونه‌ها قطعه‌ای دی ان ای به طول مورد انتظار ۵۶۰ جفت باز مربوط به بخشی از ناحیه کدکننده انتهای ۳' RNA1 تکثیر شد (شکل ۲).

در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی، هیچ کدام پس از مایه‌زنی فاقد علائم نبودند با اینحال آنالیز نتایج نمره‌های اختصاص داده شده به شدت بیماری نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی اختلاف معنی داری وجود داشت و ژنوتیپ‌های TN-94-148، TN-94-206، TN-94-262 و TN-94-229 کمترین شدت بیماری و ژنوتیپ‌های TN-94-178، TN-94-151، TN-94-186 و TN-94-193 بیشترین شدت بیماری را نشان دادند (جدول ۲).
نتایج الیزای غیرمستقیم و آنالیز میزان جذب اندازه‌گیری شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر نشان داد که اختلاف معنی داری بین میزان جذب در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی وجود داشت. به طوری که بیشترین میزان جذب مربوط به توده‌های شماره TN-94-148 و

جدول ۲- شاخص شدت بیماری در ژنوتیپ‌های خیار ۱۰ هفته پس از مایه‌زنی با ویروس کوتولگی زرد کدوبیان

Table 2. Disease severity indexes (DSIs) of cucumber accessions inoculated with CYSDV at 10 weeks post inoculation

Accession	Average DSI	Accession	Average DSI
Positive	3.7 ^a	TN-94-200	1.8 ^{defg}
TN-94-151	3.5 ^{ab}	TN-94-166	1.8 ^{defg}
TN-94-178	3.5 ^{ab}	TN-94-168	1.8 ^{defg}
TN-94-186	2.7 ^{bc}	TN-94-189	1.8 ^{defg}
TN-94-193	2.7 ^{bc}	TN-94-162	1.8 ^{defg}
TN-94-249	2.6 ^{cd}	TN-94-244	1.6 ^{efg}
TN-94-222	2.6 ^{cd}	TN-94-245	1.6 ^{efg}
TN-94-169	2.6 ^{cd}	TN-94-251	1.6 ^{efg}
TN-94-231	2.6 ^{cd}	TN-94-218	1.6 ^{efg}
TN-94-264	2.4 ^{cde}	TN-94-171	1.6 ^{efg}
TN-94-261	2.4 ^{cde}	TN-94-152	1.4 ^{fg}
TN-94-252	2.4 ^{cde}	TN-94-197	1.4 ^{fg}
TN-94-175	2.4 ^{cde}	TN-94-201	1.4 ^{fg}
TN-94-250	2.4 ^{cde}	TN-94-209	1.4 ^{fg}
TN-94-141	2.4 ^{cde}	TN-94-232	1.4 ^{fg}
TN-94-164	2 ^{cdef}	TN-94-211	1.4 ^{fg}
TN-94-180	2 ^{cdef}	TN-94-133	1.4 ^{fg}
TN-94-95	2 ^{cdef}	TN-94-276	1.4 ^{fg}
TN-94-134	2 ^{cdef}	TN-94-221	1.4 ^{fg}
TN-94-192	2 ^{cdef}	TN-94-215	1.3 ^{fg}
TN-94-172	2 ^{cdef}	TN-94-224	1.3 ^{fg}
TN-94-183	2 ^{cdef}	TN-94-262	1.2 ^g
TN-94-226	1.8 ^{defg}	TN-94-139	1.2 ^g
TN-94-154	1.8 ^{defg}	TN-94-206	1.2 ^g
TN-94-238	1.8 ^{defg}	TN-94-229	1.2 ^g
TN-94-204	1.8 ^{defg}	TN-94-148	1.1 ^g

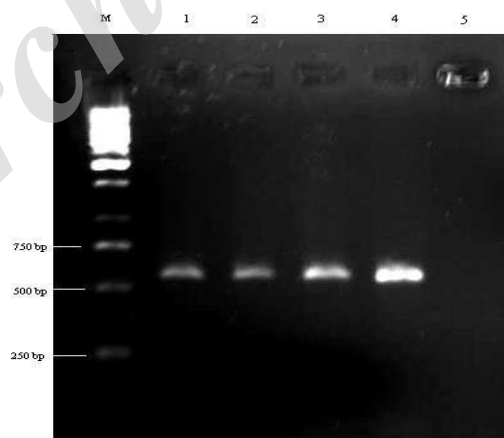
Means followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$ using the least significant difference test

جدول ۳- میانگین جذب ویروس در آزمون الیزای غیرمستقیم ویروس کوتولگی زرد کدویان (CYSDV) در ژنوتیپ‌های خیار ۸ هفته پس از مابزه‌زنی

Table 3. Mean absorbance of CYSDV in cucumber accessions at 8 weeks post inoculation

Accession	Mean A405 readings	Accession	Mean A405 readings
Positive control	1.8191 ^a	TN-94-245	0.3417 ^{ijklmno}
TN-94-148	1.6812 ^b	TN-94-186	0.3393 ^{ijklmno}
TN-94-264	1.1197 ^c	TN-94-209	0.3323 ^{ijklmno}
TN-94-172	0.8623 ^d	TN-94-252	0.3235 ^{ijklmnop}
TN-94-262	0.8293 ^{ed}	TN-94-95	0.3300 ^{klmnopq}
TN-94-200	0.7435 ^{ed}	TN-94-192	0.3011 ^{lmnopqr}
TN-94-175	0.7300 ^e	TN-94-133	0.2666 ^{nopqr}
TN-94-171	0.6011 ^f	TN-94-261	0.2615 ^{nopqr}
TN-94-250	0.4687 ^g	TN-94-139	0.2521 ^{opqr}
TN-94-178	0.4583 ^{gh}	TN-94-244	0.2466 ^{opqr}
TN-94-204	0.4541 ^{gh}	TN-94-134	0.2375 ^{opqrs}
TN-94-169	0.4435 ^{ghi}	TN-94-166	0.2321 ^{pqrst}
TN-94-193	0.4300 ^{ghij}	TN-94-224	0.2316 ^{pqrst}
TN-94-154	0.4291 ^{ghij}	TN-94-221	0.2285 ^{pqrstu}
TN-94-189	0.4127 ^{ghijk}	TN-94-232	0.2221 ^{qrstu}
TN-94-151	0.4023 ^{ghijkl}	TN-94-168	0.2206 ^{rstu}
TN-94-231	0.3993 ^{ghijkl}	TN-94-180	0.2196 ^{rstu}
TN-94-218	0.3855 ^{ghijkl}	TN-94-226	0.2165 ^{rstuv}
TN-94-162	0.3820 ^{ghijkl}	TN-94-238	0.2124 ^{rstuv}
TN-94-183	0.3781 ^{ghijkl}	TN-94-141	0.2013 ^{stuv}
TN-94-164	0.3727 ^{ghijklm}	TN-94-215	0.1600 ^{tuvw}
TN-94-276	0.3693 ^{ghijklm}	TN-94-201	0.1211 ^{uvw}
TN-94-251	0.3633 ^{ghijklmn}	TN-94-211	0.1161 ^{uvw}
TN-94-152	0.3585 ^{hijklmno}	TN-94-206	0.1126 ^{vw}
TN-94-249	0.3480 ^{ijklmno}	TN-94-229	0.1015 ^{vw}
TN-94-197	0.3441 ^{ijklmno}	Negative control	0.0354 ^w
TN-94-222	0.2721 ^{mnopqr}		

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



شکل ۲- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ژل آگاروز ۱ درصد با استفاده از آر آن ای استخراج شده از برخی نمونه‌ها و آغازگر تکثیر کننده انتهای ۳' RNA1. M: نشانگر اندازه دی آن ای (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas)، ۱: نمونه TN-94-261، ۲: نمونه TN-94-186، ۳: نمونه TN-94-175، ۴: نمونه TN-94-148 و ۵: گیاه سالم)

Figure 2. Agarose gel electrophoresis pattern of RT-PCR products obtained from total RNA extracts of 4 ELISA positive plants with CYSDV-specific primers. Lanes M-: molecular marker (GenRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas), 1: TN-94-261, 2: TN-94-186, 3: TN-94-175, 4: TN-94-148, 5: Healthy plant

بحث

ظهور علائم و میانگین جذب در آزمون الیزا هشت هفته پس از مایه‌زنی نشان داد از بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی هیچ کدام به ویروس مورد بررسی ایمن نبودند با این حال دو ژنوتیپ TN-94-229 و TN-94-206 به دلیل تأخیر در ظهور علائم، غلظت پایین ویروس در آزمون الیزا و همچنین پایین بودن شاخص شدت بیماری نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی، از حساسیت کمتری نسبت به ویروس مورد مطالعه برخوردار بودند. نتایج مشابهی توسط سایرین به دست آمده است (Eid et al., 2006؛ Aguilar et al. 2006؛ Keshavarz et al., 2013b). در بررسی صورت گرفته توسط Eid et al. (2006) بر روی واکنش ۱۲۴ توده خیار به CYSDV، هفت ژنوتیپ تأخیر در ظهور علائم، درصد پایین آلودگی و شدت علائم پایین نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها داشته‌اند. در بررسی‌های انجام گرفته بر روی ۳۰۰ ژرم پلاسما خیار در اسپانیا نیز تنها دو توده تأخیر در ظهور علائم و کاهش تجمع ویروس کوتولگی زرد کدویان در گیاه نشان داده‌اند (Aguilar et al. 2006). همچنین مطالعه صورت گرفته توسط Keshavarz et al. (2013b) بر روی توده‌های بومی خربزه منتج به نتایج مشابهی گردیده است به طوری که دو ژنوتیپ چروک زرد و تیل زرد تأخیر در ظهور علائم، غلظت پایین ویروس و شاخص شدت بیماری پایین تری نسبت به سایر توده‌ها داشتند. در مطالعات صورت گرفته بر روی ارزیابی مقاومت ارقام و توده‌های خیار و خربزه به ویروس کوتولگی زرد کدویان تنها ژنوتیپ TGR-1551 خربزه در اسپانیا به این ویروس مقاومت نشان داده (Lopez-Sese and Gomez-Guillamon, 2000) که ارزیابی مقاومت این رقم در تکراس نشان‌دهنده عدم وجود مقاومت این رقم به جدایه CYSDV از تکراس بود و در تکراس رقم PI 313970 به عنوان رقمی مقاوم ارایه شده است (McCright and Wintramental, 2011). مجموع این مطالعات نشان می‌دهد که منابع مقاومت به CYSDV کم می‌باشد و ارقام رایج مورد

در مطالعات قبلی واکنش ارقام و ژرم پلاسما‌های خیار در شرایط کنترل شده و مزرعه در مناطق مختلف جهان به منظور یافتن رقم یا ژرم پلاسما مقاوم و یافتن منابع مقاومت در ارقام وحشی صورت گرفته است (Eid et al., 2006؛ Aguilar et al. 2006). تحقیق حاضر نیز واکنش ۵۱ ژرم پلاسما خیار تحت شرایط کنترل شده در برابر جدایه بوشهر CYSDV بررسی شد. نتایج نشان داد جدایه بوشهر CYSDV قادر به آلوده‌سازی تمامی ژرم پلاسما‌های بررسی شده بود با این حال شدت علائم، میزان جذب در آزمون الیزا و زمان ظهور اولین علائم در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود که بر این اساس، توده‌های مختلف گروه‌بندی شدند. در بررسی صورت گرفته مشخص شد تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف از نظر ترجیح میزبانی سفیدبالک وجود نداشت بنابراین رابطه‌ای میان میزان جمعیت سفیدبالک و شدت بیماری و درصد آلودگی مشاهده نشد. نتایج مشابهی توسط Aguilar et al. (2006) و Eid et al. (2006) به دست آمده است.

آنالیز نتایج مربوط به شدت علائم نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین توده‌های مختلف بود و نمونه‌های TN-94-148، TN-94-229، TN-94-262، TN-94-206 و علائم خفیف‌تری نسبت به سایر نمونه‌های بررسی شده بروز دادند (جدول ۲). همچنین آنالیز نتایج زمان ظهور علائم اولیه نشان داد که علائم در ژنوتیپ‌های TN-94-206، TN-94-251، TN-94-211، TN-94-162، TN-94-232، TN-94-221، TN-94-171 و TN-94-229 نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها با تأخیر ظاهر شد (جدول ۱). نتایج آزمون الیزای غیرمستقیم نشان داد که نمونه‌های TN-94-229، TN-94-206، TN-94-211 و TN-94-201 به ترتیب کمترین میزان جذب را داشتند که نشان‌دهنده غلظت کم ویروس در آن‌ها است (جدول ۳). ارزیابی ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس میانگین شدت شاخص بیماری ۱۰ هفته پس از مایه‌زنی، زمان

به CYSDV، استفاده از این ژنوتیپ‌ها در مزارع کشور توصیه می‌شود.

سپاس‌گزاری

از بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران به جهت در اختیار گذاشتن بذور توده‌های بومی خیار تشکر و قدردانی می‌شود.

استفاده در دنیا، به این ویروس حساس می‌باشند (Keshavarz et al., 2013b). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های رایج در ایران به ویروس کوتولگی زرد کدو بیان ایمن نمی‌باشند و ناگزیر از بکارگیری ارقام و یا ژنوتیپ‌هایی هستیم که واکنش خفیف‌تر و در نتیجه عملکرد بیشتری دارند. با توجه به پایین بودن میزان نسبی بیماری در دو ژنوتیپ TN-94-229 و TN-94-206

REFERENCES

- Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., Fayad, A., Lecoq, H., Delecolle, B., and Trad-Ferre, J. 2000. *Cucurbit yellow stunting disorder virus*-a new threat to cucurbits in Lebanon. *Journal of Plant Pathology*, 82: 55-60.
- Aguilar, J.M., Abad, J., and Aranda, M.A. 2006. Resistance to *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in cucumber. *Plant Disease*, 90: 583-586.
- Brown, J.K., Guerrero, J.C., Matheron, M., Olsen, M., and Idris, A.M. 2007. Widespread outbreak of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in melon, squash, and watermelon crops in the Sonoran Desert of Arizona and Sonora, Mexico. *Plant Disease*, 91(6): 773.
- Ce'lix, A., Lopez-Sese, A., Almarza, N., Gomez-Guillamon, M.L., and Rodriguez-Cerezo, E. 1996. Characterization of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, a *Bemisia tabaci* -transmitted *closterovirus*. *Phytopathology*, 86: 1370-1376.
- Converse, R.H., and Martin, R.R. 1990. ELISA methods for plant viruses. In: R., Hampton, E., Ball, S., De Boer. (eds). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens, a laboratory manual*. APS Press. pp: 179-196.
- Desbiez, C., Lecoq, H., Aboulama, S., and Peterschmitt, M. 2000. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in Morocco. *Plant Disease*, 84(5): 596.
- Desbiez, C., Lecoq, H., Girard, M., and Cotillon, A. C. 2003. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in commercial cucumber greenhouses in France. *Plant Disease*, 87(5): 600
- Eid, S., Abou-Jawdah, Y., El- Mohtar, C., and Sobh, H. 2006. Tolerance in cucumber to *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Plant Disease*, 90: 645-649.
- Hassan, A., and Duffus, J.E. 1991. A review of a yellowing and stunting disorder in the United Arab Emirates. *Emirates Journal of Agricultural Science*, 2: 1-16.
- Kao, J., Jia, L., Tian, T., Rubio, L., and Falk, B.W. 2000. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (genus *Crinivirus*) in North America. *Plant Disease*, 84(1): 101.
- Keshavarz, T. 2003. Etiology of cucurbit yellows in Bushehr Province. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

- Keshavarz, T., and Izadpanah, K. 2005. Etiology of cucurbit yellows in Boushehr province, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 41: 107-121
- Keshevarz, T., Shams-Bakhsh, M., Izadpanah, K., and Nassaj Hossini, S.M. 2013a. Geographic distribution and phylogenetic analysis of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in Iran. *Acta Virologica*, 57: 415-420.
- Keshevarz, T., Shams-Bakhsh, M., and Izadpanah, K. 2013b. Evaluation of reaction of some Iranian melon accessions to *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 49(2): 69-71. (In Farsi with English abstract).
- Keshavarz, T., Shams-Bakhsh, M., Izadpanah, K., and Malboobi, M.A. 2014. Occurrence and genome analysis of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in Iran. *Journal of Phytopathology*, 162: 523-526.
- Kuo, Y.W., Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., and Wintermantel, W.M. 2007. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* in California and Arizona, in association with *Cucurbit leaf crumple virus* and *Squash leaf curl virus*. *Plant Disease*, 91(3): 330.
- Liu, L.Z., Chen, Y.Y., and Zhu, W.M. 2010. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* on melon in China. *Plant Disease*, 94(4): 485.
- Lopez-sese, A.J., and Gomez-Guillamon, M.L. 2000. Resistance to *Cucurbit yellowing stunting disorder virus* (CYSDV) in *Cucumis melo* L. *Horticulture Science*, 35: 110-113.
- Louro, D., Vicente, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P., and Nolasco, G. 2000. *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (Genus *Crinivirus*) associated with yellowing disease of cucurbit crops in Portugal. *Plant Disease*, 84(10): 1156.
- Marco, C.F., Aguilar, J.M., Abad, J., Gomez-Guillamon, M.L., and Aranda, M.A. 2003. Melon resistance to *Cucurbit yellow stunting disorder virus* is characterized by reduced virus accumulation. *Phytopathology*, 93: 844-852.
- McCreight, J.D., and Wintermantel, W.M. 2011. Genetic Resistance in Melon PI 313970 to *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *HortScience*, 46: 1582-1587.
- Rubio, L., Soong, J., Kao, J., and Falk, B.W. 1999. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: *Lettuce infectious yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Beet pseudo yellows virus*. *Phytopathology*, 89: 707-711.
- Wintermantel, W.M., Hladky, L.L., Cortez, A.A., and Natwick, E.T. 2009. A new expanded host range of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* includes three agricultural crops. *Plant Disease*, 93: 685-690.
- Wisler, G.C., Duffus, J.E., Liu, H.Y., and Li, R.H. 1998. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Disease*, 82: 270-280.
- Yakoubi, S., Desbiez, C., Fakhfakh, H., Wipf-Scheibel, C., Marrakchi, M., and Lecoq, H. 2007. Occurrence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, 89(3): 417-420.

Evaluating resistance to cucurbit yellow stunting disorder virus in cucumber accessions

A. Banimostafa¹, T. Keshavarz^{2*} and M. Maleki³

1. M.Sc. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Virology, Plant Protection Institute, Tehran, Iran (ta_keshavarz@yahoo.com)
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Received: 6 May 2017

Accepted: 16 October 2017

Abstract

Yellowing diseases of field and greenhouse-grown cucurbits caused by whitefly-transmitted viruses are increasingly becoming important and cause economic losses in many cucurbits growing areas of the world. Using resistant cultivar is the best approach for plant virus control. To identify potential sources of resistance to an Iranian CYSDV isolate, (Bushehr isolate), fifty one accessions of *Cucumis sativus*, were evaluated under greenhouse conditions. Cucumber plants were inoculated at first true leaf-stage with viruliferous *Bemisia tabaci*. Three parameters were used to evaluate the reaction of cucumber accessions to CYSDV, including mean of disease severity index (10 weeks after the inoculation), time of symptoms development and virus accumulation in plant (mean ELISA value 8 weeks after inoculation). Although most accessions showed typical yellowing symptoms induced by CYSDV, the severity of symptoms, virus accumulation (absorption in ELISA) and the time of symptoms development were significantly different between cucumber accessions. Two accessions namely TN-94-229 and TN-94-206 showed delay in symptom development, low disease severity index and low concentration of the virus. They were therefore considered relatively resistant to the CYSDV.

Keywords: *Cucurbit yellow stunting disorder virus, Cucumber accession, Resistance*