Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دهم ـ شماره چهارم ـ زمستان ۱۳۸۲
www.magiran.com/jasnr

شناسایی، تعیین پراکنش و خالص‌سازی ویروس‌های موزاییک هندوانه تیپ ۱ و ۲ در مناطق عمده کشت کدو در استان خراسان

پریسا طاهری، بهروز جعفرپور و ماهرخ فلاحتی رستگار

تاریخ دریافت:۸۰/۹/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۲/۵/۱۲

چکیده

در بهار و تابستان سال ۱۳۸۰ نمونه‌برداریهای متوالی از بوته‌های کدوی دارای علایم موزائیک، بدشکلی، شکستگی رنگ برگ و میوه و تاولی شدن میوه در مراحل مختلف رشد بوته‌های کدو در استان خراسان به‌منظور شناسایی ویروس موزاییک هندوانه تیپ۱ و ویروس موزاییک هندوانه تیپ ۲ به‌عمل آمد. برای شناسایی عامل این ویروسها از روش سرولوژیکی DAS-ELISA استفاده شد و نهایتاً در گیاهان بیمار با علایم مذکور، ویروس موزائیک هندوانه تیپ۱ (WMV-1) و ویروس‌موزائیک هندوانه تیپ۲ (WMV-2) تشخیص داده شد. برای تعیین پراکنش ویروس مذکور، نمونه‌برداری به‌طور تصادفی در مزارع کدو انجام شد و در این‌مورد نیز از روش سرولوژیکی DAS-ELISA استفاده گردید و از ۵۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۹۸ نمونه آلوده به WMV-1 و ۱۳٤ نمونه دارای آلودگی به WMV-2 بودند. تعدادی از نمونه‌ها دارای آلودگی مشترک به ویروسهای WMV-1 و WMV-2بودند که این مورد نشان می‌دهد ویروسهای مذکور یکدیگر را حفاظت تقاطعی نمی‌نمایند. در بررسی دامنه میزبانی‌این ویروسها، WMV-2 نسبت به WMV-1 دارای دامنه میزبانی وسیعتری بود. همچنین در این پژوهش، خالص‌سازی WMV-2 انجام شد و جهت تأیید خالص‌سازی از روشهای اسپکتروفتومتری و الکتروفورز پروتئین پوششی استفاده شد و نهایتاً وزن مولکولی‌پروتئین پوششی WMV-2 برابر با ۳٤۰٤۷ دالتون تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزاییک هندوانه تیپ ۱، ویروس موزاییک هندوانه تیپ ۲، کدوییان، کدو مسمایی، خراسان

مقدمه

جنس کدو *Cucurbita spp. L.* از خانواده کدوئیان[1] شامل ۲۵ گونه می‌باشد که مبدأ آن‌مناطق حارّه و بومی نواحی گرم و خشک می‌باشد (مظفریان ۱۳۷۷، علوی ۱۳٦۵). از میان بیماریهای مختلف کدو، بیماریهای ویروسی هر ساله موجب ایجاد خسارتهای شدیدی در این محصول در سراسر دنیا می‌شوند. شدت و درصد این بیماریها ممکن است متغیر باشد و بستگی‌دارد به رابطه و همبستگی بین پاتوژنها، میزبانها، ناقلین و شرایط محیطی و

1 - *Cucurbitaceae*

www.SID.ir

Archive of SID

موقعیت جغرافیایی مکانی که در آنجا بیماری اتفاق می‌افتد(زیتر[1]، ۱۹۹۶؛ برونت[2]، ۱۹۹۷).

پوتی ویروس‌ها گروه اصلی ویروسهای آلوده‌کننده کدو و سایر گیاهان خانواده کدوییان به‌شمار می‌روند که از جمله این ویروسها می‌توان به ویروس موزاییک هندوانه تیپ۱ Watermelon mosaic (WMV-1) virus-1 و ویروس موزاییک هندوانه تیپ۲ Watermelon mosaic virus-2 (WMV-2) اشاره نمود که این ویروسها دارای انتشار جهانی می‌باشند و از جمله مهمترین و مهلک‌ترین پوتی ویروسهای کدو محسوب می‌شوند (سیدک[3]، ۱۹۹۹).

اولین‌بار WMV-1 توسط وب[4] در سال ۱۹٦۵ از روی هندوانه *(Citrulus lanatus)* گزارش گردید. ویروس موزاییک هندوانه که اخیراً به‌عنوان ویروس موزاییک هندوانه تیپ۲ نامگذاری شده توسط وب و همکاران در سال ۱۹٦۵ از روی هندوانه گزارش شد (وب، ۱۹٦۵). در ایران نیز این ویروسها اولین‌بار در سال ۱۳٤۸ توسط دانش از جالیز کاری‌های استان تهران گزارش شد (قربانی، ۱۳۷٦؛ علوی، ۱۳٦۵). در سال ۱۳۵۱ شناسایی ویروس موزاییک هندوانه (WMV)از طریق تعیین دامنه میزبانی توسط ابراهیم نسب انجام گردید (علوی، ۱۳٦۵). ویروس WMV-2 بر اساس انتقال با شته ،دامنه میزبانی، سرولوژی و الکترون میکروسکوپی توسط رحیمیان و ایزدپناه در سال ۱۹۷۸ از مزارع کدوییان شیراز گزارش شد. آلودگی محصولات جالیزی در استان بوشهر به ویروس WMV-2 با انجام آزمون سرولوژیکی الایزا در سال ۱۳۷۹ توسط صفر نژاد و ایزدپناه به اثبات رسید و نتایج این تحقیق حاکی از آن است که در ابتدای فصل بهار، WMV-2 مهمترین عامل ایجاد کننده موزاییک در کدوییان می‌باشد (صفرنژاد، ۱۳۷۹).

ویروسهای WMV-1 و WMV-2 از خانواده پوتی‌ویریده و جنس پوتی ویروس می‌باشند. در پوتی ویروسها ذرات ویروس میله‌ای شکل و حاوی RNA تک رشته‌ای هستند. این ویروسها به راحتی از طریق عصاره منتقل شده و معمولاً دارای دامنه میزبانی نسبتاً وسیعی می‌باشند و به‌وسیله شته با رابطه ناپایا منتقل می‌شوند. هر یک از این ویروسها دارای نژادهای مختلفی هستند که این نژادها براساس‌ارتباطات سرولوژیکی، میزان استحصال ویروس در عمل خالص سازی، میزان قابلیت‌انتقال توسط شته و نوع علایم ایجاد شده برروی میزبانان گروه‌بندی شده‌اند(آندرسن[5]، ۱۹۵۷؛ لی‌سا[6]، ۱۹۸٤؛ لی‌لاک[7]، ۸۵،۱۹۸٤؛ پورسی‌فول[8]، ۱۹۸٤؛ وب ٦۵، ۱۹٦٤).

علایم ناشی از WMV-1 و WMV-2 بر روی کدو و سایر کدوییان شامل موزاییک، ابلقی و بدشکلی برگها و در برخی موارد شکستگی رنگ برگ می‌باشد. WMV-1 گیاهان خانواده‌های Cucurbitaceae، Chenopodiaceae و Leguminosae را مورد تهاجم قرارمی‌دهد (میر حیدر، ۱۳۷۷). دامنه میزبانی WMV-2 نسبت به WMV-1 وسیعتر می‌باشد و علاوه بر خانواده‌های فوق گیاهان مربوطبه خانواده‌های Malvaceae، Ameranthace، Solanaceae، Umbelliferae، Asteraceae، Labiatae، Ranunculaceae، Aizoaceae و Scrophulariaceae نیز به این ویروس حساس هستند (لی‌لاک، ۱۹۸۵؛ وان رجنمرتل[9]، ۱۹۷۱). در چند سال اخیر، مزارع کدوی استان خراسان به‌طور گسترده‌ای در اثر عارضه‌ای که به‌نظر ناشی از این پوتی ویروسها می‌رسید، خسارت دیده و شدت بیماری در برخی مزارع به صددرصد نزدیک می‌شد. علایم عمده بیماری شامل موزاییک، کوتولگی بوته،

1- Zitter
2- Brunt
3- Sidek
4- Webb

5- Anderson
6- Lisa
7- Lecoq
8- Purcifull
9- Van Regenmortel

www.SID.ir

Archive of SID

بدشکلی و شکستگی رنگ برگ و تاولی شدن میوه می‌باشد که موجب کاهش کیفیت و کمیت محصول می‌گردد. هدف از این پژوهش، شناسایی و تعیین پراکنش ویروسهای موزاییک هندوانه تیپ ۱ و ۲ و خالص‌سازی ویروس موزاییک هندوانه تیپ ۲ در استان خراسان بوده است.

مواد و روشها

منبع ویروس‌های WMV-1 و WMV-2 مورد مطالعه: ویروس موزاییک هندوانه تیپ۱ (WMV-1) مورد بررسی از یک بوته کدومسمایی آلوده در منطقه کنویست مشهد با علایم موزاییک و بدشکلی برگها در اردیبهشت‌ماه ۱۳۸۰ جدا گردید. جدایه ویروس موزاییک هندوانه تیپ ۲ (WMV-2) مورد بررسی‌از یک بوته کدو مسمایی آلوده در مزرعه‌ای واقع در حومه نیشابور با علایم موزاییک و بدشکلی برگها در خردادماه ۱۳۸۰ به‌دست آمد. آلودگی هر یک از این بوته‌ها به WMV-1 و WMV-2 با انجام آزمون سرولوژیکی-DAS ELISA اثبات شد. سپس هر یک از این ویروسها با سه بار متوالی مایه‌زنی مکانیکی و جداسازی تک لکه‌ها در گیاه سلمه‌تره *(Chenopodium amaranticolor)* از نظر بیولوژیک خالص گردید و در کلیه آزمایشهای گلخانه‌ای و سرولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت. برای تکثیر و نگهداری این ویروسها در گلخانه از گیاه کدو مسمایی *Cucurbita pepo* CV.Zucchini استفاده شد. در طول بررسی جدا شده‌های دیگری نیز از بوته‌های کدو تخمی، کدو مسمایی، طالبی، خربزه و هندوانه آلوده در مزارع مشهد، نیشابور، سبزوار، سرخس، تربت‌حیدریه و فریمان جمع‌آوری شد و در بررسی‌های گلخانه‌ای و سرولوژیک مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی و تعیین پراکنش WMV-1و WMV-2: در بهار و تابستان سال ۱۳۸۰، به‌منظور شناسایی و تعیین پراکنش WMV-1 و WMV-2 در مناطق اصلی کشت کدو در استان خراسان، نمونه‌برداری‌های متوالی از مزارع کدو مسمایی و کدو تخمی در مراحل مختلف رشد بوته‌های کدو به‌عمل‌آمد. همچنین به‌منظور شناسایی این پوتی ویروسها در سایر گیاهان خانواده کدوییان، از برخی مزارع خربزه، طالبی و هندوانه در استان خراسان نمونه‌برداری شد.

به‌منظور شناسایی WMV-1و WMV-2 از برگهای بوته‌های کدو مسمایی و کدو تخمی‌دار یا علائمی نظیر کوتولگی بوته، موزاییک، زردی، شکستگی رنگ برگ، بدشکلی و نخی‌شدن برگ در ابتدای دوره رشد رویشی کدو (قبل از مرحله گل‌دهی و میوه‌دهی) در مناطق عمده کشت کدو در استان خراسان نمونه‌برداری به‌عمل آمد. نمونه‌برداری‌های بعدی در مرحله بلوغ گیاه (پس از گلدهی) از برگ و میوه گیاهان دارای علایم موزاییک، زردی، بدشکلی و شکستگی رنگ برگ، کوتولگی بوته و تاولی‌شدن میوه انجام گرفت.

در بازدید از مناطق عمده کشت کدو مسمایی در استان خراسان، از مزارع اطراف مشهد شامل مناطق خواجه‌ربیع، خین عرب، کنویست و همچنین از مزارع اطراف نیشابور، فریمان، سبزوار، تربت‌حیدریه و سرخس نمونه‌برداری شد (جدول ۱). نمونه‌گیری در هر مزرعه با نقطه شروع تصادفی، در امتداد اقطار و در حاشیه مزرعه به‌منظور تعیین پراکنش هر یک از پوتی ویروسهای مورد بررسی صورت گرفت و در مجموع ۵۰۰ نمونه جمع‌آوری شد. نمونه جمع‌آوری شده از هر گیاه، در پاکت پلاستیکی قرار داده شد و پس از ثبت مشخصات نمونه در شرایط خنک (در مجاورت یخ) به آزمایشگاه انتقال یافت و تا زمان انجام آزمون الایزا در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مناطق نمونه‌برداری به‌منظور تعیین پراکنش WMV-1 و WMV-2 در مزارع کدو مسمایی استان خراسان.

ردیف	مناطق نمونه برداری	تعداد مزارع نمونه برداری شده	تعداد بوته نمونه برداری شده
۱	مزرعه نمونه آستان قدس	۲	۱۶
۲	خواجه ربیع	٤	۸۲
۳	خین عرب	٤	٤۸
٤	کنویست	۳	٦٤
٥	نیشابور	۷	۱۰٦
٦	فریمان	٤	٤۹
۷	سرخس	۳	۷۱
۸	سبزوار	۳	۳٦
۹	تربت حیدریه	۲	۲۸
	جمع کل	**۳۲**	**٥۰۰**

به‌منظور شناسایی و تعیین پراکنش هر یک از این ویروسها از آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA مطابق روشکلارک و آدامز استفاده شد (کلارک[1]، ۱۹۹۷) و درصد آلودگی هریک از مناطق نمونه‌برداری شده به هر یک از پوتی ویروسهای مورد بررسی تعیین گردید.همچنین درصد آلودگی مرکب به این پوتی ویروسها در هر منطقه تعیین شد.

دامنه میزبانی: جهت بررسی دامنه میزبانی، جدایه هر یک از ویروسهای WMV-1 و WMV-2 به‌تعدادی از گیاهان محک مایه‌زنی گردید. بوته‌های مایه‌زنی شده هر روز مورد بررسی قرار گرفتند و زمان ظهور علائم و نوع علایم حاصله ثبت گردید. در نهایت آلودگی هریک از این گیاهان که پس از گذشت ١٤-٨ روز از مایه‌زنی، هیچگونه علایمی نشان نمی‌دادند، با مایه‌زنی برگشتی به گیاهچه‌های سلمه‌تره *Chenopodium amaranticolor* در مرحله ٦ برگی مورد بررسی قرار گرفت.

خالص سازی فیزیکوشیمیایی: برای خالص‌سازی فیزیکوشیمیایی WMV-2 از روش شرح داده شده توسط پورسیفول‌و هایبرت در سال ۱۹۷۹ استفاده شد. در این روش به‌منظور جداسازی ذرات گیاهی‌از بوتانل نرمال استفاده شد. همچنین در این روش از پلی اتیلن گلیکول(PEG6000) و سانتریفوژ در محلول اشباع کلرورسدیم استفاده گردید. به‌منظور تأیید عمل خالص‌سازی از روشهای اسپکتروفتومتری و الکتروفورز پروتئین پوششی‌استفاده شد. میزان خلوص نمونه خالص شده WMV-2 با تعیین میزان جذب نور ماوراءبنفش در فاصله طول موجهای ۳٤۰-۲۲۰ نانومتر تعیین گردید. همچنین نسبت A260/A280 و غلظت ویروس در آموده خالص شده WMV-2 تعیین گردید و بازده عمل خالص‌سازی محاسبه شد. به‌منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی WMV-2 از آزموده خالص این ویروس استفاده گردید و الکتروفورز در ژل‌پلی‌اکریل‌آمید ۱۰درصد (SDS-PAGE) بر مبنای روش ناپیوسته اصلاح شده لملی انجام شد (لملی[2]، ۱۹۷۰). پس از قرار دادن ٥۰ میکرولیتر از هر نمونه پروتئین در چاهکهای ژل، الکتروفورز با شدت جریان ١٦ میلی‌آمپر به مدت ۳/٥ ساعت انجام گرفت.

1- Clark

2- Laemmli

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

شناسایی و تعیین پراکنش WMV-1 و WMV-2: با انجام آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA، اقدام به شناسایی هر یک از ویروسهای WMV-1 و WMV-2 در مزارع مختلف نمونه‌برداری شده گردید. همچنین تعیین پراکنش هر یک از پوتی ویروسهای مذکور در مناطق عمده کشت کدو مسمایی استان خراسان بااستفاده از این آزمون انجام گرفت. بیشترین درصد آلودگی مربوط به ویروس موزاییک هندوانه تیپ ۲ در مزارع کدو مسمایی جومه شهرستان نیشابور بود. درصد آلودگی مرکب نمونه‌های جمع‌آوری شده نیز تعیین گردید (جدول ۲).

جدول ۲ـ درصد آلودگی به هر یک از پوتی ویروسهای مورد بررسی و درصد آلودگی مرکب به این ویروسها در هر یک از مناطق نمونه‌برداری شده.

ردیف	مناطق نمونه‌برداری	درصد آلودگی به		
		WMV-1	WMV-2	WMV-۱+ WMV-۲
۱	مزرعه نمونه آستان قدس	-	-	-
۲	خواجه ربیع	۱۷/۰۷	٤۱/٤٦	٤/۸۷
۳	خین عرب	۲۲/۹۱	۲۰/۸۳	٦/۲٥
٤	کنویست	۲٥	۲٦/٥٦	۱/٥٦
٥	نیشابور	۳٥/۸٤	٤٤/۳۳	۱۳/۲۰
٦	فریمان	۱۰/۲۰	۱٤/۲۸	۱٤/۲۸
۷	سرخس	۱۱/۲٦	۱۲/٦۷	٤/۲۲
۸	سبزوار	۱۱/۱۱	۱٦/٦٦	۲/۷۷
۹	تربت حیدریه	۷/۱٤	۱٤/۲۸	۳/٥۷
کل		۱۹/٦	۲٦/۸	٦/۸

دامنه میزبانی: لیست گیاهان محک و مایه زنی شده و نتایج حاصل از مایه زنی WMV-۱ و WMV-۲ بر روی هر یک از این گیاهان در جدول ۳ خلاصه شده است. ظهور علائم در برگهای مایه زنی نشده پس از ۱٤ روز به‌عنوان آلودگی سیستمیک در نظر گرفته شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- بررسی دامنه میزبانی WMV-1 و WMV-2

	نام علمی گیاه	نام فارسی	خانواده	WMV-۱		WMV-۲	
				سیستمیک	موضعی	سیستمیک	موضعی
۱	*Cucurbita pepo* L .CV.Zucchini	کدو مسمایی	*Cucurbitaceae*	S/M	CLL	S/M	CLL
۲	*Cucurbita okeechobeensis*	کدو	*Cucurbitaceae*	-	-	S/M	CLL
۳	*Cucumis melo* L.CV.Varamin	طالبی محمدی ورامین	*Cucurbitaceae*	S/M	CLL	S/M	CLL
٤	*C.melo* L.CV.Khaghani	خربزه خاقانی	*Cucurbitaceae*	S/M	CLL	S/M	CLL
٥	*Citrulus lanatus*(Thunb)Mansfeld CV.Crimson sweet	هندوانه	Cucurbitaceae	S/M	CLL	S/M	CLL
٦	*Cucumis sativus* L.CV.Dominus	خیار	*Cucurbitaceae*	S/M	CLL	S/M	CLL
۷	*Luffa acutangula* Roxb	لیف	*Cucurbitaceae*	S/MO	CLL	S	L
۸	*Chenopodium album* L	سلمه تره	*Chenopodiaceae*	0	CLL	0	CLL
۹	*C.amaranticolor* Coste &Reyn	سلمه تره	*Chenopodiaceae*	0	CLL	0	CLL
۱۰	*C.quinoa* Willd	سلمه تره	*Chenopodiaceae*	0	CLL	0	CLL
۱۱	*Spinacia oleracea* L.CV.Keshtzar	لسفناج	*Chenopodiaceae*	-	-	0	CLL
۱۲	*Gomphrena globosa* L	گل تکمه ای	*Amaranthaceae*	-	-	0	NLL
۱۳	*Nicotiana tabacum* L.CV.Trabosan	توتون	*Solanaceae*	-	-	-	-
۱٤	*N.clevelandii* Gray	توتون	*Solanaceae*	-	-	0	
۱٥	*N.glutinosa*	توتون	*Solanaceae*	-	-	0	L
۱٦	*N.benthamiana*	توتون	*Solanaceae*	-	-	S/M	CLL
۱۷	*N.tabacum* L.CV.Turkish	توتون	*Solanaceae*	-	-	0	L
۱۸	*N.rustica*	تنباکو	*Solanaceae*	-	-	0	L
۱۹	*Datura stramonium* L	تاتوره	*Solanaceae*	-	-	0	L
۲۰	*Phaseolus vulgaris* L.CV.Daneshkadeh	لوبیا سفید	*Leguminosae*	-	-	0	L
۲۱	*P.vulgaris* L.CV.Khorram	لوبیا چیتی	*Leguminosae*	0	L	0	L
۲۲	*P.vulgaris* L.CV.Goli.	لوبیا قرمز	*Leguminosae*	0	L	0	L
۲۳	Vicia faba L	باقلا	*Leguminosae*	-	-	0	CLL
۲٤	*Vigna unguiculata*	لوبیا چشم بلبلی	*Leguminosae*	-	-	0	L

شرح نمادهای جدول ۳: S= آلودگی سیستمیک M= موزاییک (Mosaic) L= آلودگی نهفته MO= ابلقی (Mottle)

-= فاقد علایم(فاقدآلودگی) CLL= لکه‌های موضعی کلروزه (Chloratic local lesion)

0= آلودگی غیر سیستمیک NLL= لکه‌های موضعی نکروزه (Necrotic local lesion)

خالص سازی فیزیکوشیمیایی: نتیجه مایه‌زنی مکانیکی نمونه خالص شده WMV-2 بر روی گیاهچه‌های کدومسمایی (*Cucurbita pepo* L.CV.Zucchini) و سلمه‌تره (*Chenopodium amaranticolor*) بیانگرحفظ قدرت عفونت‌زایی این ویروس تا آخرین مرحله خالص‌سازی فیزیکوشیمیایی بود، زیرا پس از گذشت ۷-٦ روز از مایه‌زنی ویروس خالص‌شده به گیاهچه‌های کدو مسمایی، علایم‌موزاییک و بدشکلی و شکستگی رنگ برگها در این گیاه مشاهده گردید و پس از ۱۰-۷ روزلکه‌های موضعی کلروزه به تعداد زیادی در سطح برگهای بوته‌های سلمه‌تره مایه‌زنی شده ظاهر شد. بر روی گیاهان کدو مسمایی و سلمه‌تره شاهد که تنها با بافر مایه‌زنی شده بودند، هیچگونه علایمی مشاهده نشد.

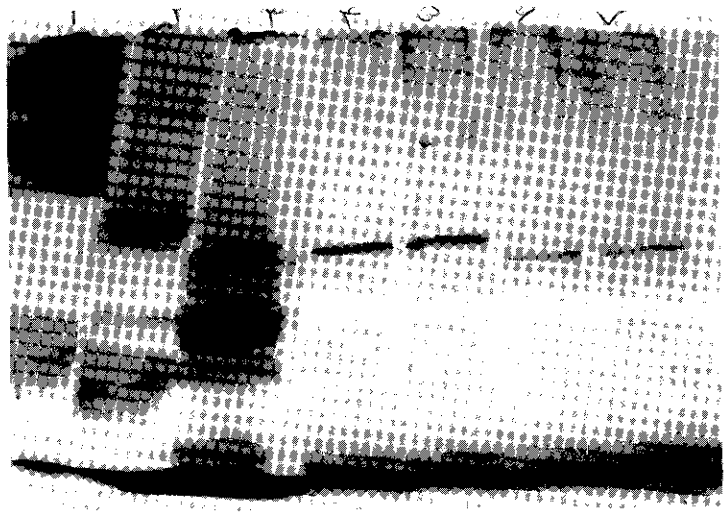
اسپکتروفتومتری و تعیین غلظت ویروس: با استفاده از فرمول C=[A260] × [Dilution] / EC، غلظت WMV-2 در آموده خالص ۳/۰۸ mg / ml و

www.SID.ir

Archive of SID

A260 / A280 = ۱,۲۲ تعیین گردید. بازده عمل خالص‌سازی در روش بکار برده شده برابر با ۱۰/۲۷۳میلی‌گرم بر کیلوگرم برگ‌آلوده کدو مسمایی برآورد گردید.

الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس: برای تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس موزاییک هندوانه تیپ ۲ (WMV-2) خالص‌شده، از مارکرهای بووین سرم آلبومین، اوآلبومین ولایزوزایم استفاده شد. براساس میزان‌مهاجرت باندهای پروتئینی ژل پلی اکریل آمید و لگاریتم وزن مولکولی مارکرها، منحنی‌استاندارد ترسیم شد و با اندازه‌گیری میزان مهاجرت باندهای پروتئینی ویروسها و وزن‌مولکولی پروتئین پوششی این ویروس تعیین گردید.



شکل ۱- باندهای پروتئینی مارکرهای بووین سرم آلبومین (BSA)، اوآلبومین ولایزوزایم، در مقابل باندهای مربوطبه پروتئین پوششی WMV-2 (۱- بووین سرم آلبومین، ۲- اوآلبومین، ۳- لایزوزایم، ٤ و ٥- جدا یه های ZYMV، ٦ و ۷ –جدایه های WMV-2) براین اساس، وزن مولکولی پروتئین پوششی WMV-2خالص برابر با ۳٤۰٤۷دالتون تعیین گردید.

بحث

در شناسایی و تعیین پراکنش ویروسهای WMV-1 و WMV-2 با توجه به جدول ۲، بیشترین‌درصد آلودگی مربوط به WMV-2 در مزارع کدو مسمایی حومه شهرستان نیشابور و کمترین‌درصد آلودگی مربوط به WMV-1 در مزارع کدو مسمایی حومه شهرستان تربت حیدریه بوده‌است. بیشترین درصد آلودگی مرکب به ویروسهای مذکور نیز در مزارع کدو مسمایی‌شهرستان فریمان مشاهده شده است. وجود آلودگی مرکب در برخی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده نشان می‌دهد که این ویروسها یکدیگر را حفاظت تقاطعی نمی‌نمایند. جدایه‌های مختلف هر یک از ویروسهای WMV-1 و WMV-2 جمع‌آوری شده از نقاط مختلف استان خراسان ازنظر دامنه میزبانی و علایم ایجاد شده بر روی گیاهان میزبان تفاوت چندانی با یکدیگر نداشتند. باتوجه به جدول ۳، مشاهده شد که WMV-2 دارای دامنه میزبانی وسیعتری نسبت به WMV-1می‌باشد و علایم ناشی از WMV-2 برروی گونه‌های مختلف گیاهان میزان، نسبت به WMV-1 حالت فراگیرتری دارد.

کارآیی خالص سازی WMV-2 برابر با ۱۰/۲۷۳میلی‌گرم به ازاء هر هزار گرم بافت آلوده بود که با مقادیر تعیین شده توسط محققان در ایران (شیراز) و آمریکا (۱۰-٤۰ میلی‌گرم به ازاء هر هزارگرم بافت آلوده)مطابقت دارد (صفر نژاد ۱۳۷۹، پورسی‌فول، ۱۹۷۹).

www.SID.ir

Archive of SID

با انجام الکتروفورز، وزن مولکولی پروتئین پوششی WMV-2 خالص شده برابر با ۳٤۰٤دالتون تعیین گردید که با مقدار وزن مولکولی پروتئین پوششی تعیین شده برای این ویروس توسط محققان مختلف در ایران (شیراز) و آمریکا (به‌ترتیب برابر با ۳٤۲۰۰ و ۳٤۰۰۰ دالتون)مطابقت دارد(صفر نژاد ۱۳۷۹، پورسی‌فول، ۱۹۷۹). بنابراین با انجام الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی، صحت عمل خالص سازیWMV-2 تایید می‌گردد. به‌طور کلی تصور می‌شود که استفاده از ارقام نسبتاً مقاوم و رعایت عملیات زراعی مناسب از جمله مبارزه با علفهای هرز، کنترل حشرات ناقل، شخم عمیق به منظور از بین بردن بقایای گیاهی، رعایت تناوب و عدم چرای چهار پایان بعد از برداشت در کاهش آلودگی می‌توانند موثر باشند.

منابع

۱. جعفرپور، ب. ۱۳۷۰. روشهای تشخیص ویروسهای گیاهی. انتشارات دانشگاه‌فردوسی مشهد. ۲۰۷ ص.

۲. صفرنژاد،م.ر. وک.ایزدپناه. ۱۳۷۹. خالص سازی و سرولوژی ویروسهای مولد موزائیک کدوییان.خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. صفحه۱۱۱.

۳. علوی، ا. ۱۳٦٥. مقاله نامه بیماریهای گیاهی. جلد۱-۲۰ (۱۳٦۳-۱۳٤۲).صفحه۳۷.

٤. قربانی، ش. ۱۳۷٦. جداسازی ویروس موزائیک زرد کدو در استان تهران. مجله بیماریهای گیاهی، شماره۱-٤، جلد۲٤. صفحه۲٥-۳٤.

٥. مظفریان، و.۱۳۷۳. رده‌بندی گیاهی، کتاب دوم: دو لپه‌ای‌ها. چاپخانه سپهر تهران. ٦۱۰ ص.

٦. میرحیدر، ح. ۱۳۷۷. معارف گیاهی. چاپخانه دفتر نشر فرهنگ اسلامی. ۳۸۰ ص.

7.Anderson, C. W. 1954. Two watermelon moasaic virus strain from central Florida. Phytopath 44:198-202.

8.Brunt, A. A., K., Crabtree, M. J., Dallwitz, and A.J. Gibbs. 1997. Viruses of plants, Descriptions and lists from the wide database. CAB international. 1450p.

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

10.Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophag proteins T4. Nature 227:680-685.

11.Lecoq, H., and M., Pitrat. 1984. Strains of zucchini yellow mosaic virus in muskmelon (*Cucumis melo* L.) Phytopath. 111:165-173.

12.Lecoq, H., and M., Pitrat. 1985. Specificity of the helper-componentmediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. Phytopath 75:890-893.

13.Lisa, V, and H.Lecoq, 1984. Zucchini Yellow mosaic virus. Descripton of plant viruses, No. 282. Commonwealth Myco Instit. Kew, Surrey, England.

14.Purcifull, D. E., and E., Hiebert. 1979. Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. Phytopath. 69:112-116.

15.Purcifull, D. E., E., Hiebert, and J. Edwardson. 1984. Watermelon mosaic virus 2. Description of plant viruses. No. 293(No. 63, rev.) commonwealth Mycrological Institute and Association of Applied Biologists. Kew, Surrey, England.

16.Sidek, Z. 1999. Viruses of cucurbits: The strategies. Sustainable crop protection practices in the next Millennium: MCB-MAPPS plant Protection Conference 99 proceeding. P. 68-71.

17.Van Regenmortel, M. H. V. 1971. Watermelon mosaic virus. No. 63: In: Description of plant viruses. CMI. Kew, Surrey, England.

18.Webb. R. E., and H. A. Scott. 1964. Relations of 10 isolates of watermelon mosaic virus. (Abst). Phytopath. 54:749.

19.Webb, R. E., and H. A. Scott. 1965. Isolation and identification of watermelon mosaic virus 1 and 2. Phytopath. 55:895-900.

20.Zitter, T. A., D. L., Hopkins, and C.E. Thomas. 1996. Compendium of cucurbit disease. APS press. 87p.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 10(4), Winter 2004
www.magiran.com/jasnr

Identification, determining distribution and purification of Watermelon mosaic virus-1 and Watermelon mosaic virus-2 in Zucchini squash fields of Khorasan province

M P.Taheri, B.Jafarpour and M.F.Rastegar
Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Abstract

Among different diseases of zucchini squash, virus diseases cause severe damage in this crop every year. Viruses in the potyvirus genus (Potyviridae family) are the major viruses infecting zucchini squash. In the spring and summer of 2001, successive sampling accomplished from zucchini plants with symptoms such as mosaic, malformation and color breadking of leaf and fruit blistering at the different stages of growth in Khorasan province (in the main growing areas of zucchini squash). Detection of viruses was based on ELISA tests. Identified potyviruses were watermelon mosaic virus-1 (WMV-1) and watermelon mosaic virus-2 (WMV-2). For determining distribution of these viruses, samples were collected randomly in the fields and were tested by DAS-ELISA. The infected samples with WMV-1 and WMV-2 were 98 and 134 out of 500 collected samples respectively. Some of the samples show infection with these two viruses simultaneously, this shows that viruses do not crossprotect each other. Host range of WMV-2 was larger than WMV-1. Watermelon mosaic virus-2 (WMV-2) was purified. The purification was confirmed by spectrophotometry and coat protein electrophoresis. The molecular weight of WMV-2 coat protein was 34047 dalton.

Keywords: WMV-1; WMV-2; *Cucurbitaceae*; Zucchini squash; Korasan

www.SID.ir