ارزیابی واکنش ارقام خیار گلخانه‌ای در برابر مایه کوبی با همسانه عفونت‌زای ویروس پالامپور پیچیدگی گوجه‌فرنگی

مریم صبوری[1]، جهانگیر حیدرنژاد*[2]

1- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
2- دانشیار بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (Tomato leaf curl Palampur virus, ToLCPMV) یک بگوموویروس مخرب با ژنوم دو بخشی می باشد که اخیرا از کشورهای هند و ایران گزارش شده است. در حال حاضر این ویروس به عنوان عامل اصلی خسارت در گوجه فرنگی و انواع کدوئیان (غیر از هندوانه) به خصوص گلخانه‌های خیار در مناطق مرکزی و جنوبی ایران معرفی شده است. در تحقیق حاضر از سازه عفونت زای ToLCPMV، جهت ارزیابی واکنش ارقام مختلف خیار گلخانه‌ای در برابر ویروس فوق استفاده گردید. بدین منظور 16 رقم که در مقایسه با سایر ارقام در بیشتر گلخانه‌های مناطق یزد و جیرفت کاشته می‌شدند، انتخاب شده و با سازه‌ی عفونت‌زا مایه کوبی شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که در بین تمامی ارقام مورد مطالعه، رقم کیان ضمن داشتن کمترین میزان آلودگی (از نظر تعداد گیاهان آلوده شده)، دارای روند کندتری از نظر پیشرفت آلودگی نیز بود؛ بطوریکه آلودگی به ToLCPMV در این رقم، باعث کاهش یا توقف رشد گیاه نشد و با گذشت زمان، شدت علائم آلودگی ویروسی نیز کاهش یافت. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، رقم کیان بطور نسبی و در مقایسه با سایر ارقام خیار گلخانه‌ای، در مقابل ToLCPMV دارای حساسیت کمتری است. با این وجود، برای یافتن و یا تولید منابع مطمئن‌تر مقاومت به ویروس فوق، نیاز به مطالعات بیشتری است.

واژه های کلیدی، *همسانه عفونت زا، مقاومت، ارقام خیار گلخانه ای*

* نویسنده مسئول: جهانگیر حیدرنژاد تلفن: 03413202681 Email: jheydarnejad@mail.uk.ac.ir

مقدمه

جمینی‌ویروس‌ها خانواده بزرگ و متنوعی از ویروس‌های گیاهی هستند که در سراسر جهان گیاهان تک لپه و دو لپه را مورد حمله قرار می-دهند (Stanley *et al.*, 2005). این ویروس‌ها در طول سه دهه‌ی اخیر خسارت های قابل توجهی را به محصولات مختلف زراعی وارد کرده‌اند. بسیاری از اعضای این خانواده به دلیل انتقال با حشرات و هم‌چنین انتقال مواد گیاهی، تهدید مهمی برای گیاهان زراعی محسوب می‌شوند؛ بویژه با پیدایش بیوتیپ جدیدی از مگس سفید، توسعه و تکامل جمینی‌ویروس‌ها در کشورهای گرمسیری و نیمه-گرمسیری به طور چشم‌گیری افزایش یافته است (Jeske, 2009). اعضای این خانواده از لحاظ پیکره و ماهیت ژنوم از سایر ویروس‌های گیاهی متمایز هستند؛ به طوریکه پیکره‌های آنها به صورت دوقلوی بهم چسبیده، با اندازه‌ی تقریبی 30-18 نانومتر بوده و ژنوم آنها نیز به صورت یک یا دو مولکول دی‌ان‌ای تک رشته‌ای حلقوی با طول kbp 3-2/5 می‌باشد (Stanley *et al.*, 2005).

اساس طبقه‌بندی جنس‌ها در اعضای خانواده-ی *Geminiviridae* میزان تشابه ترادف ژنوم، نوع ناقل و دامنه میزبانی است. بر این اساس ویروس-های موجود در این خانواده به چهار جنس شامل مسترویروس (*Mastrevirus*)، کرتوویروس (*Curtovirus*)، توپوکوویروس (*Topocuvirus*) و بگوموویروس (*Begomovirus*) تفکیک می‌شوند. مجموعه ویروس های عامل پیچیدگی برگ (زرد) گوجه فرنگی از اعضای جنس بگوموویروس بوده و از مهم‌ترین، گسترده‌ترین و مخرب‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای گوجه‌فرنگی در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری به شمار می‌آیند (Rojas *et al.*, 2005). اولین بار بیماری ناشی از این ویروس ها از ایران در سال 1996 از مزارع گوجه‌فرنگی استان‌های جنوبی شامل سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، فارس و خوزستان گزاش شده است (Hajimorad *et al.*, 1996). در مطالعات بعدی این بیماری تقریبا در اکثر نواحی ایران گزارش گردید (Fazeli *et al.*, 2009; Bananej *et al.*, 2009). علیرغم اینکه بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی تقریباً در تمام نقاط ایران وجود دارد، بر اساس مشاهدات انجام شده بیشترین آلودگی به مربوط به استان‌های مرکزی وجنوبی ایران می باشد (Heydarnejad *et al.*, 2009). ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه-فرنگی (Tomato leaf curl Palampur virus, ToLCPMV) یک بگوموویروس جدید با ژنوم دو بخشی می باشد که اولین بار در سال 2008 روی گوجه فرنگی با علائم زردی و پیچیدگی برگ از نواحی نیمه گرمسیری هند گزارش شد (Kumar *et al.*, 2009). این ویروس در ایران اولین بار در سال 2005 از استان‌های هرمزگان و کرمان مشاهده و سپس در سال 2008 از این مناطق گزارش گردید (Fazeli *et al.*, 2009). مقایسه ترادف

قطعات DNA-A و DNA-B جدایه ایرانی ویروس فوق با جدایه هندی بترتیب نشان داد که این دو قطعه در این دو جدایه بترتیب 99 و 89 درصد شباهت دارند (Heydarnejad *et al.*, 2009). مطالعات بعدی نشان داد که این ویروس در ایران بخصوص در نواحی مرکزی و جنوبی دارای گسترش زیادی است و از این نواحی به سمت سایر مناطق از جمله مناطق شمال شرقی در حال پیشروی است. یکی دیگر از ویژگی های این ویروس مخرب، دامنه میزبانی وسیع آن است. بعنوان مثال تاکنون آلودگی گوجه فرنگی، انواع کدوئیان (غیر از هندوانه)، لوبیا و برخی از علف های هرز به این ویروس اثبات گردیده است (Heydarnejad *et al.*, 2012). خیار گلخانه ای یکی از محصولات بسیار حساس در مقابل این ویروس است. در یک مطالعه میزان آلودگی ناشی از این ویروس در برخی از مزارع و گلخانه‌های خیار در شهرستان جیرفت 100 درصد تخمین زده شد (Heydarnejad *et al.*, 2009).

برای کنترل بیماری پیچیدگی برگ گوجه فرنگی از روش های مختلفی شامل کنترل شیمیائی ناقل (Hilje *et al.*, 2001)، اعمال زراعی (Hilje *et al.*, 2001; Pico *et al.*, 1996) ارقام مقاوم (Lapidot, 2007) و تولید گیاهان تراریخت (Polston and Hiebert, 2007) استفاده می شود. مبارزه شیمیائی با ناقل، علاوه بر آلودگی های زیست محیطی، غالبا باعث مقاوم شدن *B. tabaci* در مقابل سموم گردیده است (Horowitz *et al.*, 2007; Antignus, 2007). از طرف دیگر، کاربرد اعمال زراعی، علیرغم برخی از مزیت های آن، روش قاطعی برای کنترل این بیماری نیست (Anfoka, 2007). تولید گیاهان تراریخت نیز در کوتاه مدت عملی نیست و نیاز به امکانات پیچیده ای دارد (Antignus, 2007; Polston and Hiebert, 2007). استفاده از منابع موجود مقاومت، در کوتاه مدت یک روش سریع به منظور کاهش خسارت این بیماری است. در تحقیق حاضر، باتوجه به خسارت شدید ToLCPMV در گلخانه-های خیار، واکنش 16 رقم تجارتی خیار گلخانه ای که در مناطق مرکزی و جنوبی ایران کشت می-گردند در مقابل همسانه عفونت زای ToLCPMV مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

منبع اولیه ویروس

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی همانند بسیاری از اعضای موجود در جنس بگوموویروس دارای ژنوم دوبخشی بنام‌های DNA-A و DNA-B بوده که طول آنها به ترتیب 2756 و 2720 نوکلئوتید می‌باشد. در این مطالعه منبع اولیه‌ی ویروس، برای قطعه‌ی A، جدایه T69P و برای قطعه‌ی B، جدایه T55P نام داشت که در

سال 2008 از گلخانه‌های خیار جیرفت جمع‌آوری شده بودند. مشخصات ترادف نوکلئوتیدی قطعات فوق در بانک جهانی ژن ToLCPMV-[IR:Jir:T69P:Cuc:08]_JQ825226 برای قطعه‌ی ژنومی A و ToLCPMV-[IR:Jir1:T55P:Cuc:08]_FJ660423 برای قطعه-ی ژنومی B می باشد. ساخت همسانه عفونت زا با قرار دادن دو طول کامل ژنوم برای هر قطعه بطور جداگانه در درون ناقل دوگانه pGreen صورت گرفت و سازه ساخته شده ابتدا به *Escherichia coli* و سپس به آگروباکتریوم نژاد C58 منتقل گردید (Sabouri and Heydarnejad, 2013).

ارقام خیار گلخانه‌ای و شرایط کاشت

مشخصات ارقام خیار گلخانه ای مورد استفاده در این تحقیق در جدول 1 بیان شده است. برای کاشت بذور، خاک مزرعه و خاک برگ به نسبت مساوی باهم مخلوط شده و مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله نخست از هر رقم 35 عدد بذر (سه بذر در هر گلدان) کشت گردید و تا دو ماه بعد از عمل مایه کوبی در شرایط گلخانه در دمای تقریبی 25°C دوازده ساعت نور و دوازده ساعت روشنائی نگهداری شدند. در مرحله دوم از میان ارقام مختلف، چهار رقم که دارای کمترین تعداد گیاهان آلوده شده بودند، انتخاب و از هر رقم 55 عدد بذر با همان شرایط قبلی کشت گردید. بعد از مایه کوبی ارقام انتخابی در مرحله دوم، این گیاهان نیز تا دو ماه به منظور ایجاد علائم و روند توسعه بیماری در شرایط گلخانه تحت نظر قرار گرفتند.

آماده‌سازی عصاره مایه‌کوبی

چهار تا پنج روز قبل از مایه‌کوبی، نمونه های آگروباکتریوم حاوی سازه‌ی عفونت‌زا (حاوی قطعات ژنومی A و B)، بر روی محیط کشت مایع محتوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین و کانامایسین با غلظت های مشابه 50µg/ml کشت شده و برای رشد به مدت یک شب درون شیکر انکوباتور، در دمای 28°C با 200 دور در دقیقه قرار داده شدند. با گذشت حدود 20 ساعت از زمان کشت و رشد مناسب، باکتری به صورت نسبتا انبوه روی محیط کشت جامد محتوی آنتی‌بیوتیک، کشت شده و در دمای 25-28°C به مدت سه روز نگهداری شد تا باکتری به رشد مناسب بر روی محیط کشت جامد برسد. برای تهیه سوسپانسیون جهت عمل مایه‌زنی از روش ارائه شده توسط Grimsley *et al.* (1986) استفاده شد. باکتری های حاوی قطعات ژنومی A و B توسط کاردک استریل بطور جداگانه از روی محیط کشت جامد جمع‌آوری و درون یک میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل داخل یک لوله قرار داده شد و با وارونه کردن لوله، باکتری کاملا در آب حل گردید به نحوی که یک سوسپانسیون شیری رنگ بدست آمد.

مایه‌کوبی گیاهان توسط همسانه‌ی عفونت‌زا

مایه‌کوبی گیاهان توسط سلول های آگروباکتریوم حاوی سازه عفونت زا (قطعات ژنومی A و B) در مرحله سه برگی (2-1 روز بعد از بیرون آمدن برگ سوم) و بر اساس روش Grimsley *et al.* (1986) انجام گرفت. مایه‌کوبی در دمای تقریبی 25°C با استفاده از سرنگ یک میلی‌لیتری انسولین بصورت دو بار تزریق با سوسپانسیون باکتری انجام شد. تزریق اول در ناحیه‌ی مرکزی ساقه دقیقا در قسمت طوقه، و دومین تزریق در محل انشعاب برگ‌ها، قسمت اتصال برگ‌ها به ساقه صورت گرفت. تعیین آلودگی یا عدم آلودگی گیاهان ابتدا با بررسی علائم و سپس با استفاده از آزمون **واکنش زنجیره ای پلیمراز** صورت گرفت. در طول این مدت برای مبارزه با مگس سفید و جلوگیری از انتقال ویروس توسط ناقل، گیاهان هر سی روز یک بار با مخلوط سم استامی‌پرید (کریشی هند) 20% اس پی و روغن دی-جی مورد سم‌پاشی قرار گرفتند. برای پاک-سازی محیط گلخانه از کنه نیز که باعث بروز علائم برگی و در نهایت خشک شدن گیاه می‌گردد، دو بار سم‌پاشی با فاصله‌ی سی روز با سم فن‌پروپاترین 10% انجام شد؛ و بعد از دو روز، از روغن دی-جی نیز برای از بین بردن تخم‌های آن استفاده شد.

آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز

به منظور تشخیص قطعی آلودگی و عدم آلودگی گیاهان مایه کوبی شده، از آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده شد. بدین منظور ابتدا استخراج دی-اِن‌اِی کل از بافت‌های گیاهی به روش موسوم به CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) و بر اساس روش ارائه شده توسط Zhang *et al.* (1998) انجام گرفت. آزمون **واکنش زنجیره ای پلیمراز** با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-F1217-A (TCT GAG GGC GTA AGC CCG TCC)/ToLCPMV-R1709-A (GAT TAA AGG CGG CAT TCC CAC) که قادر به تکثیر قطعه‌ای به طول 500 جفت باز از بخش A ژنوم ویروس هستند؛ و نیز از آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-1079-F (TTG GGT CAC GTT CCG CGA CGA AGA)/ToLCPMV-2054-R (TAC GCG CTC ACA AAC GAT GCT GCA)که قادرند قطعه‌ای به اندازه 1050 جفت باز از بخش B ژنوم ویروس را تکثیر کنند، استفاده شد. هر واکنش زنجیره ای پلیمراز در یک حجم 12 میکرولیتری شامل دو میکروگرم DNA، یک میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس، 1/5 میکرومولار $MgCl_2$، 200 میکرومولار dNTPs، 1/2 میکرولیتر بافر پCR با غلظت 10 برابر و 2/5 واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (Fermentas) انجام شد. مراحل مختلف این آزمون بترتیب عبارت بود از واسرشته‌سازی اولیه رشته DNA در دمای 94°C

بمدت سه دقیقه و یک برنامه 35 چرخه ای شامل پنجاه ثانیه واسرشته سازی در دمای 94°C، سی ثانیه اتصال آغازگرها در دمای 55°C، سه دقیقه تکثیر قطعات در دمای 72°C و ده دقیقه تکمیل نهائی واکنش ها در دمای 72°C. محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز در ژل آگارز 1% الکتروفورز شدند و رنگ آمیزی ژل نیز با محلول اتیدیوم بروماید با غلظت 50µg/ml انجام شد. بعد از مراحل تشخیص، تعداد بوته های آلوده برای هر رقم و در مواردی میزان رشد ظاهری گیاهان آلوده بعنوان شاخصی برای مقایسه مقاومت ارقام خیار گلخانه ای استفاده گردید.

نتایج و بحث

ده روز پس از مایه‌کوبی ارقام مختلف خیار گلخانه ای، بروز علائم در برخی از ارقام شروع شد و روند پیشرفت آلودگی در رقم‌های مختلف تا دو ماه بصورت روزانه ثبت گردید. به منظور اطمینان از آلودگی گیاهان، بعد از استخراج DNA، آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز روی تعدادی از گیاهان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-F1217A/ToLCPMV-R1709A و نیز ToLCPMV-F1079B/ToLCPMV-R2054B انجام شد و بترتیب نوارهای مورد انتظار یعنی نوارهای 500 (مربوط به قطعه A) و 1050 جفت بازی (مربوط به قطعه B) درون ژل آگارز مشاهده گردید (شکل 1). علائم اولیه با بروز لکه‌های ستاره‌ای شکل زردرنگ و کوچک در متن برگ آغاز و با گذشت زمان علائم تشدید گردید. نتیجه-ی بدست آمده نشان داد که تمامی ارقام خیار به ToLCPMV آلوده می‌شوند و هیچ یک از رقم‌ها در برابر این ویروس مصون نیستند. اما نکته‌ی قابل توجه در نتیجه‌ی به دست آمده این بود که میزان و شدت آلودگی در برخی از ارقام با هم تفاوت داشتند؛ به این صورت که برخی از آنها آلودگی 100% را نشان داده و شدت آلودگی در برخی موارد منجر به خشک شدن گیاه شد، اما در برخی از ارقام تعداد بوته‌های آلوده کمتر بوده و علیرغم وجود آلودگی به رشد خود ادامه دادند (جدول 1). هرچند علائم کلی و عمومی شامل لکه های سبززرد ستاره ای شکل در متن برگ، موزائیک خفیف در سطح برگ، کلروز حاشیه برگ، سبز روشن شدن حاشیه رگبرگ، زردی در متن برگ و کمی لوله شدن برگها به سمت پایین بود، اما علائم در تعدادی از ارقام تاحدی متفاوت بودند؛ بطوریکه تعدادی از ارقام فاقد برخی علائم بوده و تعدادی نیز علائم را با شدت بیشتری نشان دادند.

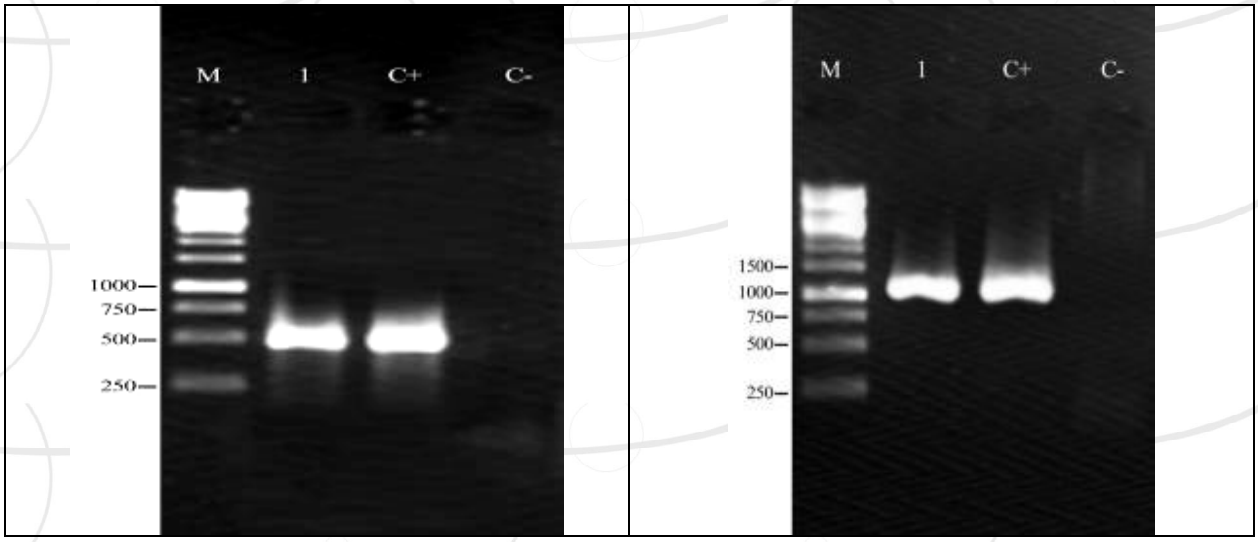
جدول 1- ارزیابی واکنش ارقام خیار گلخانه‌ای مایه‌کوبی شده با همسانه‌ی عفونت زای ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی در مرحله‌ی اول.

Table 1- Evaluation of the reaction of greenhouse cucumber cultivars inoculated by the infectious clone of Tomato leaf curl Palampur virus in the first stage.

نام واریته	تعداد بوته‌های مایه کوبی شده	بوته های آلوده شده	درصد آلودگی
Cultivar name	No. of inoculated plants	No. of infected plants	Percentage of infection
Extreme hybrid	34	32	94
Mirsoltan hybrid	34	18	53
544	34	33	97
4518	34	31	91
6177	35	29	83
Shahin	35	33	94
Salar	35	14	41
Adrian 451	35	32	91
Adrian 450	34	28	82
Homa	33	21	64
Zohal	29	22	76
Gowhar	34	25	73
Kian	34	15	44
Ranim	34	34	100
Viola	33	31	94
Negin	31	30	97

در ارقام 544، 4518، شاهین و نگین علائم ایجاد شده شبیه کمبود بسیار شدید عناصر غذایی بود ضمن اینکه تاولی شدن نیز در این ارقام شدت زیادی داشت. بارزترین حالت در رقم هیبرید اکستروم علائمی مشابه کمبود شدید مواد غذایی بوده، درحالی‌که در رقمی چون کیان هیچ کدام از علائم مشابه کمبود و تاولی شدن دیده نشد و تنها علائم ایجاد شده شامل موزائیک سطح برگ‌ها و

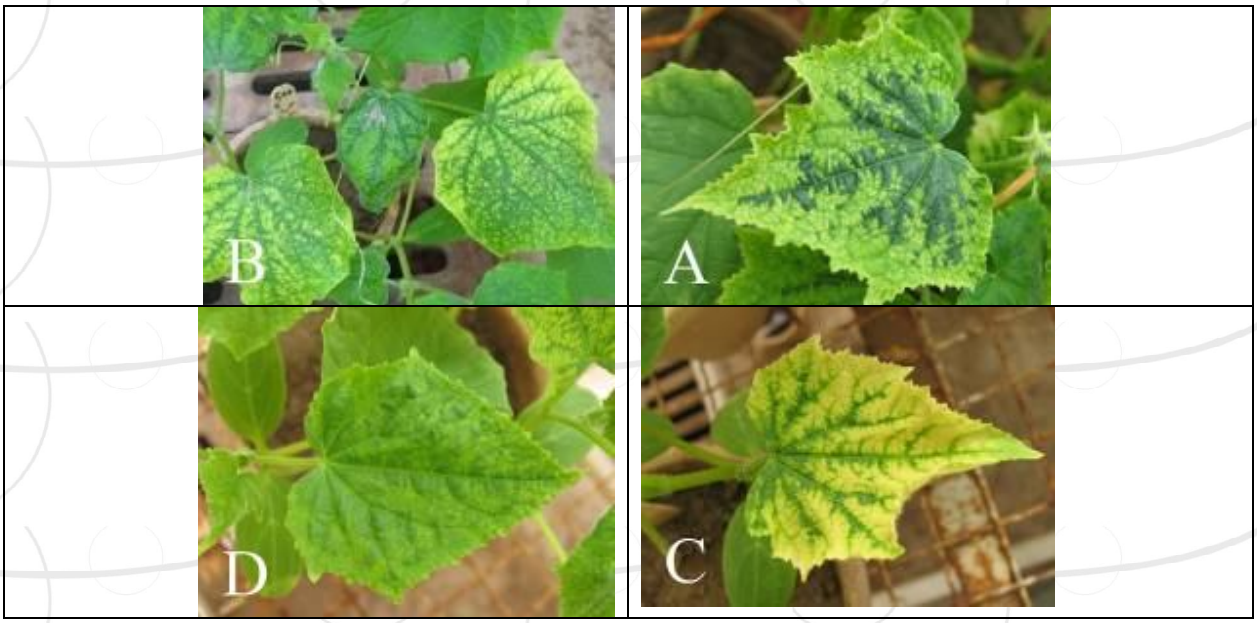
بروز لکه‌های ستاره‌ای شکل در متن برگ بود. رشد گیاه در تعدادی از ارقام با پیشرفت آلودگی ویروسی متوقف شد و تعدادی نیز علیرغم آلودگی به رشد خود ادامه دادند (شکل 2).



شکل 1- نوار های 1050 (سمت راست) و 500 (سمت چپ) جفت بازی حاصل از الکتروفورز محصولات PCR تکثیر شده بترتیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-F1217A/ToLCPMV-R1709A و ToLCPMV-F1079B/ToLCPMV-R2054B در ژل آگارز 1%. (C+) شاهد مثبت، (C-) شاهد منفی، (M) نشانگر مولکولی، (1) نمونه آلوده شده با سازه عفونت زا.

Figure 1- Electrophoretic patterns of PCR products showing 1050 bp (right) and 500 bp (left) fragments replicated by specific primer pairs ToLCPMV-F1217A/ToLCPMV-R1709A and ToLCPMV-F1079B/ToLCPMV-R2054B, respectively, in 1% agarose gel. C+, positive control; C-, negative control; M, molecular marker.

در نهایت چهار رقم هما، هیبرید میرسلطان، کیان و سالار که در مقایسه با سایر رقم‌ها، تعداد بوته های آلوده شده کمتر بود، برای بررسی مجدد و تکرار آزمایش مجدداً کاشته شده و مایه‌کوبی شدند. روند بررسی علائم و آلودگی مشابه قبل انجام شد. با بررسی ارقام مذکور در کشت مجدد، مشخص شد که میزان و پیشرفت آلودگی روندی مشابه قبل دارد (جدول 2). تنها تفاوت موجود در مقایسه‌ی نتایج، ایجاد اختلاف در میزان آلودگی دو رقم کیان و سالار می‌باشد؛ بطوریکه در نتیجه‌ی حاصل از کشت اول، میزان آلودگی در این دو رقم نزدیک به هم بود، اما در نتیجه‌ی نهایی رقم سالار در تعداد بوته‌های آلوده شده، از رقم کیان بیشتر بود و در نتیجه رقم کیان در مقایسه با سایر ارقام کاشته شده در روند این تحقیق، کمترین میزان آلودگی را در هر دو مرحله آزمایش نشان داد.



شکل 2- علائم متفاوت در ارقام مختلف خیارگلخانه ای، پس از مایه‌کوبی با همسانه‌ی عفونت‌زای ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی. رقم نگین (A)، رقم 544 (B)، رقم هیبرید اکستروم (C و D).

Figure 2- Different symptoms of greenhouse cucumber cultivars after inoculation by infectious clone of Tomato leaf curl Palampur virus. Negin cultivar (A), 544 cultivar (B), Hybrid extreme cultivar (C and D).

جدول 2- ارزیابی واکنش چهار رقم خیار گلخانه‌ای مایه‌کوبی شده با همسانه‌ی عفونت زای ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی در مرحله‌ی دوم.

Table 2- Evaluation of the reaction of greenhouse cucumber cultivars inoculated by the infectious clone of Tomato leaf curl Palampur virus in the second stage.

درصد آلودگی Percentage of infection	بوته های آلوده شده No. of infected plants	تعداد بوته‌های مایه کوبی شده No. of inoculated plants	نام واریته Cultivar name
76	40	52	Homa
72	37	51	Mirsoltan hybrid
68	34	50	Salar
39	21	53	Kian

مدیریت کنترل بیماری پیچیدگی برگ گوجه فرنگی که توسط بگوموویروس ها ایجاد می گردد، بسیار مشکل بوده و مستلزم صرف هزینه های زیادی است. کم هزینه ترین و عملی ترین روش مبارزه تولید ارقام مقاوم است. برای ایجاد ارقام مقاوم، یا از منابع اولیه مقاومت که در سایر ارقام و بخصوص در گیاهان وحشی وجود دارند، استفاده می گردد (Ji *et al.*, 2007; Lapidot, 2007) و یا گیاهان تراریخته تولید می شود (Polston and Hiebert, 2007). همسانه‌ی عفونت‌زای ساخته شده علاوه بر اثبات بیماری‌زایی ویروس، می‌تواند به عنوان منبعی از ویروس جهت مطالعات مختلف از قبیل یافتن ارقام مقاوم و یا تعیین وظایف ژن های ویروسی مورد استفاده قرار گیرد. برای شناسائی ارقام یا افراد مقاوم در هر کدام از دو روش فوق، از مایه کوبی افراد با استفاده از جمعیت ناقل (مگس سفید) در شرایط مزرعه و یا گلخانه استفاده می-شود. روش دوم که در این تحقیق نیز مورد بررسی قرار گرفته است، کاربرد سازه عفونت زا در شرایط کنترل شده و در محیط گلخانه به منظور ارزیابی واکنش افراد و یا ارقام مختلف است. وارد کردن سازه عفونت زا به داخل گیاه نیز با روش های مختلفی نظیر مالش دادن سطح برگ همراه با سازه و یا تزریق به گیاه انجام می شود. روش آخر که در مطالعه حاضر نیز مورد استفاده قرار گرفت، علاوه بر سهولت، دارای کارائی بالائی در آلوده کردن گیاهان و ارزیابی واکنش آنهاست. راندمان آلوده کردن گیاه در ارقام حساس با استفاده از این روش به 100٪ نیز می رسد. با این وجود راندمان آلوده شدن ارقام مقاوم با استفاده از این روش پائین تر است (Lapidot, 2007).

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی یکی از مخرب ترین بگوموویروس هائی است که در چند سال گذشته باعث ایجاد خسارت های سنگینی در مزارع و گلخانه های مناطق مرکزی و جنوبی ایران شده است (Heydarnejad *et al.*, 2009). نتایج حاصل از این تحقق نشان داد که عکس العمل ارقام مختلف خیار مورد مطالعه، هم به لحاظ تعداد بوته های آلوده شده و هم به لحاظ شدت آلودگی در برابر این ویروس یکسان نیست. رقم کیان ضمن داشتن کمترین میزان آلودگی (از نظر تعداد گیاهان آلوده شده) در مقایسه با سایر ارقام، دارای روندی متفاوت در پیشرفت آلودگی بود؛ بطوریکه آلودگی به ToLCPMV در این رقم، باعث کاهش یا توقف رشد گیاه نشد و با گذشت زمان، شدت علائم آلودگی ویروسی نیز کاهش یافت. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، رقم کیان بطور نسبی و در مقایسه با سایر ارقام خیار گلخانه‌ای، در مقابل ToLCPMV متحمل تشخیص داده شد. با این وجود، برای یافتن و یا تولید منابع مطمئن‌تر مقاومت به ویروس فوق، نیاز به مطالعات بیشتری است.

منابع

Anfoka Gh (2007). Gene silencing of Tomato yellow leaf curl virus. In: Czosnek H (Ed.), Tomato yellow leaf curl virus disease, management, molecular biology, breeding for resistance. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 391-405.

Antignus Y (2007). The management of Tomato yellow leaf curl virus in greenhouses and the open field, a strategy of manipulation. In: Czosnek H (Ed.), Tomato yellow leaf curl virus disease, management, molecular biology, breeding for resistance. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 263–278.

Bananej K, Vahdat A, Hosseini-Salekdeh G (2009). Begomoviruses associated with yellow leaf curl disease of tomato in Iran. Journal of Phytopathology 157: 243–247.

Fazeli R, Heydarnejad J, Massumi H, Shabanian M (2009). Genetic diversity and distribution of tomato-infecting begomoviruses in Iran. Virus Genes 38: 311-319.

Grimsley N, Hohn B, Hohn T, Walden R (1986). Agroinfection, an alternative route for viral-infection of plants by using the Ti plasmid. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 3282-3286

Hajimorad M, Kheyr-Pour A, Alavi V, Ahoon manesh A, Bahar M, Rezaian MA, Gronenborn B (1996). Identification of whitefly transmitted tomato yellow leaf curl geminivirus from Iran and a survey of its distribution with molecular probes. Plant Pathology 45: 418-425.

Heydarnejad J, Hesari M, Massumi H, Varsani A (2013). Incidence and natural hosts of Tomato leaf curl Palampur virus in Iran. Australasian Plant Pathology 42: 195-203. .

Heydarnejad J, Mozaffari A, Massumi H, Fazeli R, Gray AJA, Meredith S., Lakay F, Sheferd DN, Martin DP, Varsani A (2009). Complete sequences of tomato leaf curl Palampur virus isolates infecting cucurbit in Iran. Archives of Virology 154: 1015-1018.

Hilje L, Costa HS, Stansly PhA (2001). Cultural practices for managing *Bemisia tabaci* and associated viral diseases. Crop Protection 20: 801-812.

Horowitz R, Denholm I, Morin Sh (2007). Resistance to insecticides in the TYLCV vector, *Bemisia tabaci*. In: Czosnek H (Ed.), Tomato yellow leaf curl virus disease, management, molecular biology, breeding for resistance. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 305–325.

Jeske H (2009). Geminiviruses. In: Villiers EM, Hausen HZ (Eds.), TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogenes. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 185-226.

Ji Y, Scott JW, Hanson P, Graham E, Maxwell DP (2007). Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses. In: Czosnek H (Ed.), Tomato yellow leaf curl virus disease, management, molecular biology, breeding for resistance. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 343–362.

Kumar Y, Hallan V, Zaidi AA (2009). Molecular characterization of a distinc bipartite begomovirus species infecting tomato in India. Virus Genes 37: 425-431.

Lapidot M (2007). Screening for TYLCV-resistant plants using whitefly-mediated inoculation. In: Czosnek H (Ed.), Tomato yellow leaf curl virus disease, management, molecular biology, breeding for resistance. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 329–342.

Pico B, Diez MJ, Nues F (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus*-a review. Scientia Horticulturae 67: 151-196.

Polston J, Hiebert E (2007). Transgenic approaches for the control of tomato yellow leaf curl virus. In: Czosnek H (Ed.), Tomato yellow leaf curl virus disease, management, molecular biology, breeding for resistance. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 373–390.

Rojas MR., Hagen C, Lucas, WJ, Gilbertson RL (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. Annual Review of Phytopathology 43: 361–394.

Sabouri M, Heydarnejad J (2013). Construction of infectious clone and demonstration infectivity of the bipartite genome of tomato leaf curl Palampur virus. Iranian Journal of Plant Pathology (submitted).

Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison, BD, Rybicki EP, Stenger DC, (2005). Geminiviridae. In: Fauquet, CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.), Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV, 301-326. Elsevier/Academic Press, London.

Zhang YP, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. Journal of Virological Methods 71: 45-50.

Evaluation of the reaction of greenhouse cucumber cultivars inoculated by the infectious clone of Tomato leaf curl Palampur virus

Sabouri M.[1], Heydarnejad J.[*2]

1- Former MSc. student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2- Associated Professor of Plant Virology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Tomato leaf curl Palampur virus (ToLCPMV) is a destructive bipartite begomovirus which have recently been reported from India and Iran. Currently, ToLCPMV is known as the main factor causing yield loss in tomato and different cucurbits (other than watermelon) especially in greenhouse cucumbers in central and northern Iran. In this study, the reaction of sixteen cucumber cultivars was evaluated against inoculation by a ToLCPMV infectious clone under greenhouse conditions. Results showed that among all tested cultivars, Kian showed a minimum infection. Furthermore, this cultivar showed lower disease progress in compare to other cultivars and relatively recovered from disease. According to this study, in compare to other greenhouse cucumber cultivars, Kian is relatively resistance. However, more studies are needed to found or produce more reliable source of resistance.

Keywords: *Tomato leaf curl Palampur virus, Infectious clone, Resistance, Greenhouse cucumber cultivars.*

[*] Corresponding Author: Heydarnejad J. Tel: 03413202681 Email: jheydarnejad@mail.uk.ac.ir

صبوری و حیدرنژاد، **1392**