مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

شناسائی میزبان های وحشی ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه در جنوب و جنوب شرق ایران

مریم اسماعیلی[1]، جهانگیرحیدرنژاد[*2]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

[2] استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

تاریخ دریافت: 1391/08/29، تاریخ پذیرش: 1392/01/31

چکیده

ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه (*Watermelon chlorotic stunt virus*, WmCSV) یکی از مخرب ترین ویروس های هندوانه در جنوب و جنوب شرقی ایران است. به منظور شناسائی علف هرزهای میزبان این ویروس، از مزارع بشدت آلوده هندوانه واقع در میناب (استان هرمزگان)، رودبار جنوب (جیرفت) و ارزوئیه (استان کرمان) بازدید گردید و نمونه برداری از داخل و حاشیه مزارع انجام شد. آلودگی و عدم آلودگی نمونه ها با آزمون PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تعیین گردید. نتایج بدست آمده آلودگی تعداد زیادی از علف های هرز شامل چهارده گونه از دوازده جنس و نه تیره گیاهی را به WmCSV به اثبات رساند، بدون آنکه علائم خاصی روی بیشتر آنها دیده شود. تمامی این علف های هرز بعنوان میزبان WmCSV برای اولین بار معرفی می گردند. به منظور مقایسه جدایه های WmCSV در علف های هرز آلوده، قطعه 655 جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی 11 جدایه مختلف ویروس، همسانه سازی و تعیین ترادف گردید. مقایسه ترادف های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این جدایه ها با یکدیگر و با جدایه های موجود در بانک جهانی ژن نشان داد که جدایه های مورد مطالعه شباهت زیادی با یکدیگر و با سایر جدایه ها دارند. نزدیکترین جدایه WmCSV به جدایه های علف های هرز مورد مطالعه، جدایه بندرعباس (استان هرمزگان) بود که قبلا از این منطقه گزارش شده بود و از نظر ترادف های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بترتیب 99/2٪-98/9 و 100٪-96/8 با جدایه های فوق شباهت داشت. این نتایج نشان می دهد که این گیاهان بعنوان منابع نگاهدارنده WmCSV عمل کرده و بطور بالقوه می توانند در اپیدمیولوژی ویروس نقش اساسی داشته باشند.

واژه های کلیدی: جمینی ویروس، بگوموویروس، ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه، *Bemisia tabaci*، سفیدبالک، علف های هرز.

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

مقدمه

تیره ویروس های دوقلو (*Geminiviridae*) گروه بزرگ و متنوعی از ویروس های گیاهی بوده که با ژنوم DNA تک لای حلقوی با اندازه Kb 3-2/5 و با پیکره‌های چند وجهی بصورت دو قلوی به هم چسبیده در نقاط مختلف دنیا به گیاهان تک لپه و دولپه حمله می کنند. این ویروس ها بر اساس سازمان ژنوم، ناقل و دامنه میزبانی به چهار جنس مسترویروس (*Mastrevirus*)، کرتوویروس (*Curtovirus*)، توپوکوویروس (*Topocuvirus*) و بگوموویروس (*Begomovirus*) تقسیم بندی می-شوند (Brown *et al.*, 2012).

ایران بعنوان بخشی از منطقه خاور میانه، یکی از کانون های اولیه خسارت ناشی از مجموعه بگوموویروس ها از جمله ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) است (Lefeuvre *et al.*, 2010). اولین بار در سال 1996 این ویروس با ژنوم تک بخشی از مناطق مرکزی و جنوبی ایران گزارش گردید (Hajimorad *et al.*, 1996). سپس WmCSV اولین بگوموویروس با ژنوم دو بخشی بود که از جنوب ایران گزارش شد (Bananej *et al.*, 1998).

ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه برای اولین بار در سال 1986 در جمهوری یمن گزارش و باعث آلودگی 100-90 درصد بوته های هندوانه (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) به این ویروس گردید (Jones *et al.*, 1988; Bedford *et al.*, 1994). علائم این ویروس روی هندوانه عبارتند از زردی رگبرگ ها، لکه های زرد، پیچیدگی برگ ها، کوتولگی شدید و کاهش اندازه میوه (شکل 1) (Bananej *et al.*, 2002). ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه برای اولین بار در سال 1998 از جنوب ایران گزارش گردید (Bananej *et al.*, 1998) و تاکنون از سودان،یمن، ایران، لبنان، اردن، فلسطین و فلسطین اشغالی گزارش شده است (Ali-Shtayeh *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 1988; Al-Musa *et al.*, 2011; Kheyr-Pour *et al.*, 2000). در ایران WmCSV از استان های سیستان و بلوچستان، بوشهر، هرمزگان (Bananej *et al.*, 2002; Kheyr-Pour *et al.*, 2000) کرمان، فارس و گیلان گزارش شده است (Gholamalizadeh *et al.*, 2008; Heydarnejad *et al.*, 2010). این ویروس قادر به آلوده کردن انواع کدوئیان شامل هندوانه (*C. lanatus*)، خربزه (*Cucumis melo* L.)، خیار (*Cucumis sativus* L.) و کدو (*Cucurbita pepo* L.) است و می‌تواند کدوییان وحشی نظیر *Cucumis melo* var. *agrestis* و هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad.) را نیز آلوده کند

Abudy *et al*., 2009; Bananej *et al*., 2002; Kheyr-Pour *et al*., 2000; Sufrin-Ringwald and Lapidot, 2011).

در امریکای لاتین نقش علف های هرز بعنوان عاملی برای آلوده شدن گیاهان زراعی توسط بگوموویروس ها از دهه 1950 مورد توجه قرار گرفت. در یک بررسی در همین منطقه مشخص گردید که ده علف هرز متفاوت از پنج خانواده مختلف در آلوده شدن لوبیا به جمینی ویروس های منتقل شونده با سفید بالک نقش دارند (Morales, 2006). با توجه به اهمیت WmCSV در مناطق جنوب و جنوب شرق ایران، در این تحقیق گسترش این ویروس روی علف های هرز در استان کرمان مورد بررسی قرار گرفته است.

شکل 1- علائم ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه روی هندوانه شامل زرد شدن رگبرگ ها، ایجاد لکه های زرد و پیچیدگی روی برگ ها.

Figure 1- Symptoms of *Watermelon chlorotic stunt virus* on a watermelon plant including vein yellowing, yellow spot and leaf curling.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها و استخراج DNA

در طی سال های 91-1390 از مزارع هندوانه شدیدا آلوده به WmCSV واقع در رودبار جنوب و ارزوئیه (استان کرمان) و میناب (استان هرمزگان) بازدید گردید و 92 نمونه علف هرز های مختلف واقع در داخل یا حاشیه مزارع که تقریبا همگی آنها بدون علائم بودند جمع آوری شد. در این میان، علف هرز پنیرک (*Malva parviflora* L.) تنها گیاهی بود که دارای علائم زردی در کل بوته بود. نمونه ها در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل گردیدند. استخراج DNA کل از

نمونه ها به روش CTAB و بر اساس مراحل ارائه شده توسط *ژانگ و همکاران* (Zhang *et al.*, 1998) انجام شد.

آزمون PCR

برای شناسائی ویروس در نمونه های جمع آوری شده، از آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی WmCSV-700-F (AGCCCCTACATGAGCCGTGCT)/WmCSV-1334-R (CACACGCATCGAATCCTGTGT) که قادر به تکثیر یک قطعه 655 جفت بازی از ژن پروتئین پوششی با طول کامل 777 جفت باز می باشند، استفاده گردید. طراحی آغازگر با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی جدایه ایرانی WmCSV در بانک ژن (رس شمار AJ245652) انجام شد. ترادف آغازگرهای رفت و برگشت بترتیب منطبق با نوکلئوتیدهای 407-387 و 1041-1021 جدایه ایرانی WmCSV می باشند (Kheyr-Pour *et al.*, 2000). محصولات PCR، در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شده و وضعیت قطعات تکثیر شده با دستگاه Gel documentation مورد ارزیابی قرار گرفت.

همسانه سازی نمونه ها

با درنظر گرفتن معیارهائی از قبیل نوع گیاه و منطقه نمونه برداری شده، از میان نمونه هائی که در آزمون PCR آلودگی آنها به WmCSV اثبات شده بود، 11 نمونه برای همسانه سازی انتخاب شدند (جدول 1). همسانه سازی محصولات PCR با استفاده از کیت InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania) بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده انجام شد. بدین منظور قطعات تکثیر شده با استفاده از آنزیم دی اِن اِ لیگاز (T4 DNA ligase) درون ناقل pTZ57R/T قرار داده شدند و پلاسمیدهای نوترکیب به باکتری *Escherichia coli* نژاد JM107 منتقل گردیدند. شناسائی کلنی های باکتری که حاوی پلاسمید نوترکیب بودند در مرحله نخست از روی رنگ سفید کلنی و سپس با کمک آزمون PCR و آغازگرهای WmCSV-700-F/WmCSV-1334-R انجام شد. در نهایت برای اطمینان از همسانه سازی محصولات PCR، پلاسمیدهای استخراج شده با آنزیم های برشی *Eco*RI و *Pst*I بریده شدند و اندازه قطعات آزاد شده در داخل ژل با محصول اولیه PCR مقایسه گردیدند. تعیین ترادف قطعات همسانه سازی شده با استفاده از دستگاه ABI 3730XL DNA Analyzer توسط شرکت Bioneer (South Korea) انجام گردید.

جدول 1- مشخصات علف های هرز جمع آوری شده آلوده به ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه در داخل یا اطراف مزارع کدوئیان واقع در رودبار جنوب و ارزوئیه (استان کرمان) و میناب (استان هرمزگان) به منظور شناسائی علف های هرز میزبان ویروس. رس شمار جدایه های همسانه سازی شده در ستون آخر آورده شده است.

Table 1. The list of weed species collected from cucurbit growing farms in Roodbar-e-Jonob, Arzuiyeh (Kerman province) and Minab (Hormozgan province) for identification of natural wild hosts of *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV). Accession numbers of cloned WmCSV isolates are provided in the right column.

Common name نام عمومی	Scientific name نام علمی	Family تیره	Location محل جمع آوری	Accession number رس شمار
Dyer's croton	*Chrozophora hierosolymitana* Spreng	Euphorbiaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	JX480479
Dyer's croton	*Chrozophora hierosolymitana* Spreng	Euphorbiaceae	Arzuiyeh (Kerman province)	-
Dyer's croton	*Chrozophora hierosolymitana* Spreng	Euphorbiaceae	Minab (Hormozgan province)	-
European heliotrope	*Heliotropium szovitsii* (Stev.) Bunge	Boraginaceae	Minab (Hormozgan province)	JX480487
European heliotrope	*Heliotropium szovitsii* (Stev.) Bunge	Boraginaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	-
European heliotrope	*Heliotropium szovitsii* (Stev.) Bunge	Boraginaceae	Arzuiyeh (Kerman province)	-
Seablite	*Suaeda aegyptiaca* (Hasselq.)	Chenopodiaceae	Minab (Hormozgan province)	JX480480
Mustard	*Brassica* sp.	Brassicaceae	Minab (Hormozgan province)	JX480484
Mustard	*Brassica* sp.	Brassicaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	JX480486
Yellow sweet clover	*Melilotus indicus* (L.)	Fabaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	JX480483
Small-flowered Melilot	*Melilotus dentatus* (Waldst. & Kit.) Pers	Papilionaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	JX480485

Nettle-leaved goosefoot	*Chenopodium murale* L.	Chenopodiaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	JX480482
Nettle-leaved goosefoot	*Chenopodium murale* L.	Chenopodiaceae	Minab (Hormozgan province)	-
Nettle-leaved goosefoot	*Chenopodium murale* L.	Chenopodiaceae	Arzuiyeh (Kerman province)	-
Nettle-leaved goosefoot	*Chenopodium sosnowskyi* Kappeler	Chenopodiaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	-
Tonkin Bean	*Trigonella uncata* Boiss. & Noe	Fabaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	-
Cheeseweed mallow	*Malva parviflora* L.	Malvaceae	Minab (Hormozgan province)	JX480489
Cheeseweed mallow	*Malva parviflora* L.	Malvaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	-
Russian thistle	*Salsola* sp.	Chenopodiaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	-
Scarlet pimpernel	*Anagallis arvensis* L.	Myrsinaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	JX480488
Scarlet pimpernel	*Anagallis arvensis* L.	Myrsinaceae	Minab (Hormozgan province)	-
Burr medic	*Medicago polymorpha* L.	Fabaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	JX480481
Lesser jack	*Emex spinosa* (L.)	Polygonaceae	Roodbar-e-Jonob (Jiroft, Kerman province)	-

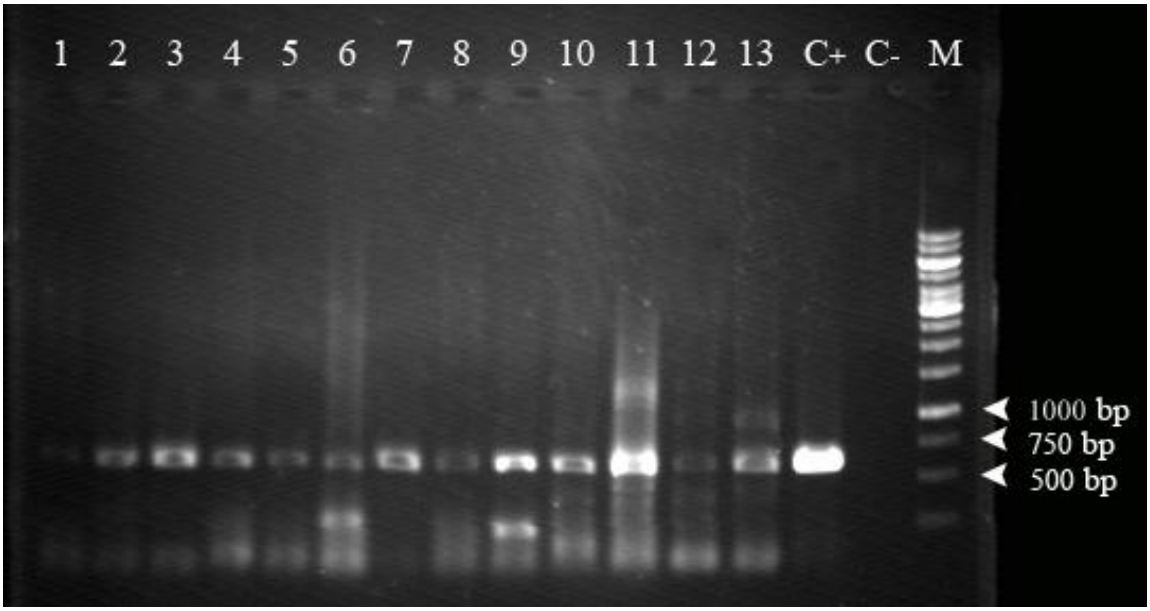
مقایسه ترادف ها

ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی قطعه 655 جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی 11 جدایه که از علف های هرز جدا شده بودند (جدول 1) با استفاده از نرم افزار DNAMAN Version 7 (Lynnon Corporation, Quebec, Canada) با یکدیگر مقایسه شدند و میزان شباهت آنها با یکدیگر و با قطعات موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) تعیین گردید.

نتایج و بحث

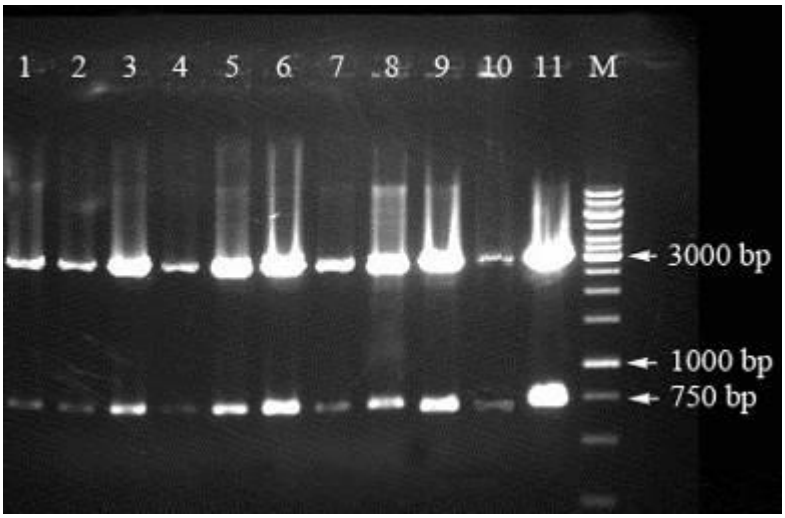
نتایج حاصل از آزمون PCR نشان داد که WmCSV برروی علف های هرز داخل و مجاور مزارع آلوده هندوانه گسترش زیادی دارد. بر اساس این نتایج، از میان 92 نمونه جمع آوری شده، 37 نمونه مربوط به 14 گونه علف هرز از 12 جنس و 9 خانواده مختلف به WmCSV آلوده بودند. اسامی گیاهان و مشخصات آنها که در این مطالعه آلودگی آنها به WmCSV اثبات گردید در جدول 1 آورده شده است. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از DNA استخراج شده از نمونه های فوق، منجر به تشکیل قطعه 655 جفت بازی (شکل 2) برای 37 نمونه فوق گردید. از میان نمونه هائی که برای همسانه سازی انتخاب شدند، صحت همسانه سازی با برش پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم های *Eco*RI و *Pst*I تائید شده و منجر به رها شدن قطعه 655 جفت بازی از پلاسمید برای تمام نمونه ها در ژل آگاروز گردید (شکل 3). تعیین ترادف این قطعات نشان داد که یازده جدایه بدست آمده از گیاهان مختلف، به لحاظ ترادف های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بسیار نزدیک بهم بوده و بترتیب دارای شباهت 100٪-98/9 و 100٪-95/9 هستند (رس شمارهای JX480489 -JX480479) (شکل 4). در میان جدایه های موجود در بانک جهانی ژن، نزدیک ترین جدایه به لحاظ ترادف نوکلئوتیدی، جدایه هندوانه بندرعباس (استان هرمزگان) بود که با رس شمار AJ245652 قبلا از این منطقه گزارش شده بود (Kheyr-Pour *et al*., 2000). جدایه بندرعباس از نظر ترادف ژن پوشش پروتئینی به میزان 99/2٪ با چند جدایه مربوط به علف های هرز مختلف در مطالعه حاضر شباهت داشت. میزان شباهت جدایه بندرعباس با کل جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق برای ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی بترتیب 99/2٪-98/9 و 100٪-96/8 بود. کمترین میزان تشابه نوکلئوتیدی نیز بین جدایه *Anagallis arvensis* (Jiroft) و جدایه هندوانه لبنان به میزان 97/3٪ بود.

آلودگی های ناشی از WmCSV در مزارع هندوانه جنوب و جنوب شرق ایران معمولا بسیار گسترده است (Bananej *et al*., 2002; Kheyr-Pour *et al*., 2000). در مواردی شدت آلودگی تا 80 درصد نیز برآورد گردیده است. پیش از این با استفاده از آزمون الایزا و/یا هیبریداسیون نقطه ای (dot-blot hybridization) با کمک DNA استخراج شده از گیاهان، دو نمونه از انواع کدوئیان وحشی شامل *Cucumis melo* var. *agrestis* و هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad.) بعنوان میزبان WmCSV معرفی شده اند (Kheyr-Pour *et al*., 2000).



شکل 2- نقش الکتروفورزی محصولات پی سی آر تکثیر شده با آغازگرهای WmCSV-700-F/WmCSV-1334-R در ژل آگاروز 1٪ مربوط به سیزده علف هرز آلوده به ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه (WmCSV). علف هرز *Melilotus dentatus* (1)، علف هرز *Heliotropium szovitsii* (Minab) (2)، علف هرز *Brassica* sp. (Minab) (3)، علف هرز *Medicago polymorpha* (4)، علف هرز *Suaeda aegyptiaca* (5)، علف هرز *Salsola* sp. (6)، علف هرز *Chenopodium murale* (Jiroft) (7)، علف هرز *Melilotus dentatus* (8)، علف هرز *Anagallis arvensis* (Jiroft) (9)، علف هرز *Chrozophora hierosolymitana* (Jiroft) (10)، علف هرز *Chenopodium sosnowskyi* (11)، علف هرز *Brassica* sp. (Jiroft) (12)، علف هرز *Malva parviflora* (Minab) (13)، هندوانه آلوده بهWmCSV بعنوان شاهد مثبت (+C)، هندوانه سالم بعنوان شاهد منفی (-C)، نشانگر مولکولی (M).

Fig. 2. Electrophoretic patterns of PCR products of *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) on 1% agarose gel using WmCSV-700-F/WmCSV-1334-R primer pair from 13 WmCDV-infected weed species; *Melilotus dentatus* (1), *Heliotropium szovitsii* (Minab) (2), *Brassica* sp. (Minab) (3), *Medicago polymorpha* (4), *Suaeda aegyptiaca* (5), *Salsola* sp. (6), *Chenopodium murale* (Jiroft) (7), *Melilotus indicus* (8), *Anagallis arvensis* (Jiroft) (9), *Chrozophora hierosolymitana* (Jiroft) (10), *Chenopodium sosnowskyi* (11), *Brassica* sp. (Jiroft) (12), *Malva parviflora* (Minab) (13) WmCSV infected watermelon as the positive control (C+), healthy watermelon as the negative control (C-), molecular marker (M).

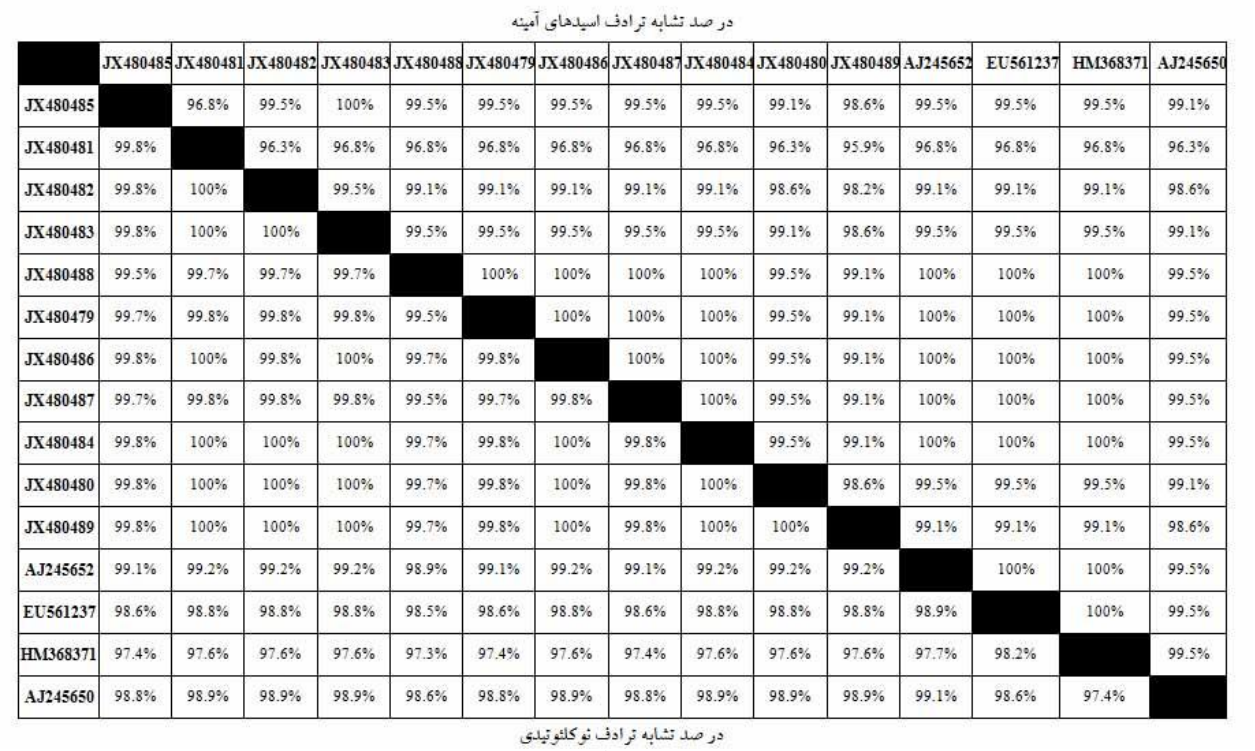


شکل 3- نقش الکتروفورزی حاصل از برش پلاسمیدهای نوترکیب توسط آنزیم های برشی *Eco*RI و *Pst*I حاوی قطعه 655 جفت بازی از ژن پروتئین پوششی مربوط به 11 جدایه ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه از علف های هرز در ژل آگاروز 1٪. علف هرز *Melilotus dentatus* (1)، علف هرز *Heliotropium szovitsii* (Minab) (2)، علف هرز *Brassica* sp. (Minab) (3)، علف هرز *Medicago polymorpha* (4)، علف هرز *Suaeda aegyptiaca* (5)، علف هرز *Chenopodium murale* (Jiroft) (6)، علف هرز *Melilotus indicus* (7)، علف هرز *Anagallis arvensis* (Jiroft) (8)، علف هرز *Chrozophora hierosolymitana* (Jiroft) (9)، علف هرز *Brassica* sp. (Jiroft) (10)، علف هرز *Malva parviflora* (Minab) (11)، نشانگر مولکولی (M).

Fig. 3. Band pattern of digested recombinant plasmids by *Eco*RI and *Pst*I restriction enzymes containing 655 bp fragment of coat protein gene of 11 *Watermelon chlorotic stunt virus* isolates from weed species in 1% agarose gel; *Melilotus dentatus* (1), *Heliotropium szovitsii* (Minab) (2), *Brassica* sp. (Minab) (3), *Medicago polymorpha* (4), *Suaeda aegyptiaca* (5), *Chenopodium murale* (Jiroft) (6), *Melilotus indicus* (7), *Anagallis arvensis* (Jiroft) (8), *Chrozophora hierosolymitana* (Jiroft) (9), *Brassica* sp. (Jiroft) (10), *Malva parviflora* (Minab) (11) and molecular marker (M).

علاوه بر این، در یک مطالعه دیگر در استان کرمان با استفاده از آزمون PCR و تعیین ترادف بخشی از ژنوم ویروس، علف هرز ازرق اورشلیمی (*Chrozophora hierosolymitana* Spreng) از خانواده Euphorbiaceae بعنوان میزبان TYLCV با ژنوم تک بخشی و همین گیاه به همراه علف هرز دیگری بنام *Herniaria* sp. از خانواده Caryophyllaceae بعنوان میزبان ToLCPMV با ژنوم دو بخشی گزارش شده اند (Fazeli *et al.*, 2009). به عبارت دیگر، علف هرز ازرق اورشلیمی (شکل 5A) تاکنون بعنوان میزبان سه بگوموویروس متفاوت یعنی WmCSV، TYLCV و ToLCPMV در جنوب و جنوب شرق ایران معرفی شده اند. گیاه فوق، یکساله بوده و یکی از علف های هرز غالب در بیشتر مزارع در مناطق مورد بررسی است. شایان ذکر است که ازرق اورشلیمی یک گیاه داروئی بوده و بر اساس برخی از گزارش ها خاصیت ضد باکتریائی دارد (Jamil *et al.*, 2012). علف هرز دیگری که در این تحقیق بعنوان میزبان WmCSV شناسائی شده است گیاه آفتاب پرست (*Heliotropium szovitsii* (Stev.) Bunge) از خانواده Boraginaceae می باشد (شکل 5B). گونه دیگری از این گیاه یعنی *H. europaeum* که از نظر شکل ظاهری تاحدودی به ازرق اورشلیمی شبیه می باشد قبلا نیز با استفاده از آزمون PCR بعنوان یکی از میزبان های ToLCPMV شناسائی شده است (Heydarnejad *et al.*, 2013). نمونه برداری های متعدد، آلودگی گیاهان *C. hierosolymitana* و *H. szovitsii* را به WmCSV در چند منطقه شامل میناب (استان هرمزگان)، رودبار جنوب (جیرفت) و اُرزوئیه (استان کرمان) به اثبات رساند. با توجه به گستردگی خسارت های ناشی از این ویروس ها در ایران، این نتایج، نقش بالقوه علف های هرز بخصوص دو گیاه فوق را در اپیدمیولوژی WTGs از جمله WmCSV در این مناطق نشان می دهد. در میان علف های هرز مورد بررسی، گیاه پنیرک (*Malva parviflora* L.) از خانواده Malvaceae تنها گیاهی بود که هر چهار نمونه جمع آوری شده از مناطق رودبار جنوب (جیرفت) و میناب دارای علائم زردی عمومی بود (شکل 5C). یکی دیگر از علف هرزهائی که در این تحقیق آلودگی آنها به WmCSV اثبات گردید، علف شور (*Salsola* sp.) از خانواده Chenopodiaceae بود که قبلا نیز با استفاده از آزمون الایزا بعنوان یکی از میزبان های کرتوویروس (های) عامل پیچیدگی برگ چغندرقند از مزارع کرمان گزارش شده بود (Heydarnejad *et al.*, 2007). کدوییان از نظر اقتصادی دارای اهمیت فراوانی می‌باشند و با تولید سالانه بیش از 60 میلیون تن حدود 14 درصد تولید جهانی سایر

سبزی‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. در بین سایر سبزی‌ها محصول هندوانه مقام سوم را دارا می‌باشد و ایران نیز از نظر سطح زیر کشت این محصول در جهان مقام دوم و از نظر مقدار تولید مقام سوم را به خود اختصاص داده است (Peyvast, 2005). از میان کشورهای آلوده به WmCSV از جمله ایران، گیاهان خانواده کدوییان (شامل هندوانه، کدو، خربزه و خیار) و همچنین گیاهانی مثل توتون و لوبیا به عنوان میزبانان این ویروس شناخته شده اند (Dafalla *et al*., 1998; Lecoq *et al*., 1994; Bananej *et al*., 1998; Kheyr-Pour *et al*., 2000; Al-Musa *et al*., 2011; Abou-Jawdah *et al*., 2010; Abudy *et al*., 2009; Bananej *et al*., 2002; Bedford *et al*., 1994). اما آلودگی علف های هرز به این ویروس به جزء موارد بسیار اندک در یک یا دو کشور، گزارش مفصلی وجود ندارد. اخیرا" در اسرائیل خیار وحشی (*Ecballium elaterium*) به عنوان میزبان جدایه اسرائیلی WmCSV گزارش شده است (Abudy *et al*., 2009). در یمن گیاهان داتوره (*Datura stramonium*) و توتون به عنوان میزبان این ویروس گزارش شدند (Bedford *et al*., 1994). از طرف دیگر گیاه پنیرک گل ریز (*Malva parviflora*) به عنوان میزبان بسیار خوبی برای سفیدبالک ها گزارش شده است (Muniz, 2000). از نقطه نظر اپیدمیولوژیکی، گونه های *Malva* sp. در بین رایج ترین علف های هرز شایع، دارای اهمیت زیادی می باشند (Brown *et al*., 1993; Idris and Brown, 1998; Ucko *et al*., 1998; Idris *et al*., 2003). در نتیجه نه تنها این علف هرز بلکه مابقی علف‌های هرز می توانند به عنوان پناهگاه و نگهدارنده‌ی ویروس در سراسر طول سال عمل کنند. علف‌های هرز، پناهگاه سفیدبالک‌ها و در نتیجه منبع بگوموویروس‌ها می‌باشند. معمولا"علف‌های هرز با گونه‌های متفاوتی از بگوموویروس‌ها آلوده می‌شوند. به هر حال، اگرچه بیشتر بگوموویروس‌های آلوده کننده‌ی محصولات، از اجداد بگوموویروس‌های آلوده‌کننده علف‌های هرز هستند؛ اما تغییراتی که در ویروس جهت سازگاری با محصول گیاهی کشت شده رخ می‌دهد سبب می‌شود که ویروس تغییر یافته بر روی علف هرز میزبان اصلی خود سازگاری کمتری داشته باشد. هم‌چنین ثابت شده است که یک علف هرز خاص می تواند نقش مهمی را در اپیدمیولوژی بگوموویروس‌های آلوده کننده محصولات کشت شده بازی کند. معمولا بگوموویروس ها در علف-های هرز علائمی ایجاد نمی‌کنند و غلظت این ویروس‌ها در علف‌های هرز نیز پایین می‌باشد. شایان ذکر است که یک ارتباط قوی بین غلظت ویروس در میزبان آلوده و توانایی حشره ناقل جهت کسب و انتقال ویروس وجود دارد.



	JX480485	JX480481	JX480482	JX480483	JX480488	JX480479	JX480486	JX480487	JX480484	JX480480	JX480489	AJ245652	EU561237	HM368371	AJ245650
JX480485		96.8%	99.5%	100%	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.1%	98.6%	99.5%	99.5%	99.5%	99.1%
JX480481	99.8%		96.3%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.3%	95.9%	96.8%	96.8%	96.8%	96.3%
JX480482	99.8%	100%		99.5%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	98.6%	98.2%	99.1%	99.1%	99.1%	98.6%
JX480483	99.8%	100%	100%		99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.1%	98.6%	99.5%	99.5%	99.5%	99.1%
JX480488	99.5%	99.7%	99.7%	99.7%		100%	100%	100%	100%	99.5%	99.1%	100%	100%	100%	99.5%
JX480479	99.7%	99.8%	99.8%	99.8%	99.5%		100%	100%	100%	99.5%	99.1%	100%	100%	100%	99.5%
JX480486	99.8%	100%	99.8%	100%	99.7%	99.8%		100%	100%	99.5%	99.1%	100%	100%	100%	99.5%
JX480487	99.7%	99.8%	99.8%	99.8%	99.5%	99.7%	99.8%		100%	99.5%	99.1%	100%	100%	100%	99.5%
JX480484	99.8%	100%	100%	100%	99.7%	99.8%	100%	99.8%		99.5%	99.1%	100%	100%	100%	99.5%
JX480480	99.8%	100%	100%	100%	99.7%	99.8%	100%	99.8%	100%		98.6%	99.5%	99.5%	99.5%	99.1%
JX480489	99.8%	100%	100%	100%	99.7%	99.8%	100%	99.8%	100%	100%		99.1%	99.1%	99.1%	98.6%
AJ245652	99.1%	99.2%	99.2%	99.2%	98.9%	99.1%	99.2%	99.1%	99.2%	99.2%	99.2%		100%	100%	99.5%
EU561237	98.6%	98.8%	98.8%	98.8%	98.5%	98.6%	98.8%	98.6%	98.8%	98.8%	98.8%	98.9%		100%	99.5%
HM368371	97.4%	97.6%	97.6%	97.6%	97.3%	97.4%	97.6%	97.4%	97.6%	97.6%	97.6%	97.7%	98.2%		99.5%
AJ245650	98.8%	98.9%	98.9%	98.9%	98.6%	98.8%	98.9%	98.8%	98.9%	98.9%	98.9%	99.1%	98.6%	97.4%	

شکل 4- درصد تشابه ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه قسمت عمده ژن پروتئین پوششی جدایه های ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه از 11 علف هرز مختلف از مناطق جنوب و جنوب شرقی ایران و مقایسه آن ها با ترادف های مشابه در بانک ژن (GenBank). شماره های دسترسی (accession number) در بانک ژن مربوط به جدایه های فوق عبارتند از: علف هرز *Melilotus dentatus* (JX480485)، علف هرز *Heliotropium szovitsii* (Minab) (JX480487)، علف هرز *Brassica* sp. (Minab) (JX480484)، علف هرز *Medicago polymorpha* (JX480481)، علف هرز *Suaeda aegyptiaca* (JX480480)، علف هرز *Chenopodium murale* (Jiroft) (JX480482)، علف هرز *Melilotus indicus* (JX480483)، علف هرز *Anagallis arvensis* (Jiroft) (JX480488)، علف هرز *Chrozophora hierosolymitana* (Jiroft) (JX480479)، علف هرز *Brassica* sp. (Jiroft) (JX480486)، علف هرز *Malva parviflora* (Minab) (JX480489)، هندوانه جدایه بندرعباس (AJ245652)، هندوانه جدایه سودان (AJ245650)، هندوانه جدایه لبنان (HM368371) و هندوانه جدایه اردن (EU561237).

Fig 4. Percent homology of nucleotide and amino acid sequences of coat protein gene of *Watermelon chlorotic stunt virus* isolates from 11 different weeds collected from watermelon growing areas in south and southeastern Iran and comparison to the related sequences in GenBank. Accession numbers of the WmCSV isolates; *Melilotus dentatus* (JX480485), *Heliotropium szovitsii* (Minab) (JX480487), *Brassica* sp. (Minab) (JX480484), *Medicago polymorpha* (JX480481), *Suaeda aegyptiaca* (JX480480), *Chenopodium murale* (Jiroft) (JX480482), *Melilotus indicus* (JX480483), *Anagallis arvensis* (Jiroft) (JX480488), *Chrozophora hierosolymitana* (Jiroft) (JX480479), *Brassica* sp. (Jiroft) (JX480486), *Malva parviflora* (Minab) (JX480489), Iranian WmCSV isolate from Bandar Abbas (AJ245652), Sudanese WmCSV isolate (AJ245650), Lebanese WmCSV isolate (HM368371), Jordanian WmCSV isolate (EU561237).

شکل 5- علف هرزهای ازرق اورشلیمی (A) و آفتاب پرست (B) دو میزبان بدون علائم و گیاه پنیرک با علائم زردی عمومی (C) آلوده به ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه جمع آوری شده در مناطق جنوب و جنوب شرقی ایران.

Fig 5. Dyer's croton (*Chrozophora hierosolymitana* Spreng) (A) and European heliotrope or European turnsole [*Heliotropium szovitsii* (Stev.) Bunge] (B), two symptomless wild hosts and cheeseweed mallow (*Malva parviflora* L.) showing general yellowing (C) infected by *Watermelon chlorotic stunt virus* collected in south and southeastern Iran.

بنابراین این موضوع ارتباط نقش علف‌های هرز در اپیدمیولوژی بیماری‌های ایجاد شده توسط بگوموویروس‌ها را تحت تاثیر خود قرار می دهد. همچنین هیچ مدرکی در رابطه با کنترل علف های هرز به تنهایی جهت راهبرد مدیریتی موثر در بگوموویروس ها وجود ندارد. علاوه بر این، به کارگیری این برنامه ها در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری که علف‌های هرز به میزان زیادی در سراسر سال وجود دارند، بسیار مشکل و گران قیمت است. در مناطقی که تعداد محدودی از علف های هرز شناخته شده نقش مهم‌تری را در اپیدمیولوژی بیماری بازی می کند، ممکن است حذف علف های هرز مربوطه موثر باشد. به طور مشابه اگر علف‌های هرز ویژه ای به عنوان میزبانان مناسب سفیدبالک‌ها شناخته شوند، این موضوع نیز می‌تواند جهت ریشه‌کنی یا سم‌پاشی با حشره‌کش موثر باشد. به طور کلی کشاورزان باید جهت مدیریت علف‌های هرز در مزارع و در اطراف مزارع به منظور عملیات کشاورزی موثر آموزش داده شوند (Gilbertson *et al*., 2011).

منابع

Abou-Jawdah Y, Sobh H, Haidar A, Samsatly J (2010). First report in Lebanon on detection of two whitefly transmitted cucurbit viruses and their molecular characterization. In: Proceedings of 13th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Rome, Italy. pp; 20–25.

Abudy A, Sufrin-Ringwald T, Dayan-Glick C, Guenoune-Gelbert D, Livneh O, Zaccai M, Lapidot M (2009). Watermelon chlorotic stunt and Squash leaf curl begomoviruses New threats to cucurbit crops in the Middle East. Israel J Plant Sci 58: 33-42.

Al-Musa A, Anfoka G, Al-Abdulat A, Misbeh S, Haj Ahmad F. Otri I **(**2011). *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV): A serious disease threatening watermelon production in Jordan. Virus Genes 43: 79-89.

Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Hussein EY, Mallah OB, Abu-Zaitoun, SY (2012). First report of *Watermelon chlorotic stunt virus* in watermelon in the Palestinian authority. Plant Dis 96, p. 149.

Bananej K, Ahoonmanesh A Kheyr-Pour A (2002). Host range of an Iranian isolate of *Watermelon chlorotic stunt virus* as determined by whitefly-mediated inoculation and agroinfection, and its geographical distribution. Phytopathology 150: 423-430.

Bananej K, Kheyr-Pour A Ahoonmanesh A (1998). Identification of *watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) in Iran. Proc 13th Iranian Plant Protec Cong, Iran, Karaj, p 194.

Bedford ID, Briddon RW, Jones P, Alkaff N Markharn PG (1994). Differentiation of three whitefly-transmitted geminiviruses from the Republic of Yemen. Eur J Plant Pathol 100: 243-257.

Brown JK, Fauquent CM, Briddon RW, Zerbini M, Moriones E, Navas-Castillo J (2012). Family *Geminiviridae*. Pp. 351-373, *In*: A M Q King, MJ Adams, EB Carstens and EJ Lefkowitz (eds.), Virus Taxonomy: The Ninth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, New York.

Brown JK, Idris AM, Fletcher DC (1993). *Sinaloa tomato leaf curl virus*, a newly described geminivirus of tomato and pepper in west coastal Mexico. Plant Dis. 77:1262.

Dafalla GA, Gronenborn B, Kheyr-Pour A, Lecoq H (1998). *Watermelon chlorotic stunt virus*: A new emerging epidemic in export melons in Sudan. In: *2nd Int. Workshop Bemisia Geminiviruses*, San Juan, Puerto Rico. p; 37.

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

Gilbertson RL, Rojas M, , Natwick E (2011). Development of integrated pest management (IPM) strategies for whitefy (*Bemisia tabaci*)-transmissible geminiviruses. Pp. 323-356, *In*: WMO Thompson (ed.), The Whitefy, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants, Springer Science, New York.

Gholamalizadeh R, Vahdat A, Keshavarz T, Elahinia SA, Shahraeen N, Bananej K (2008). Occurrence, distribution, and relative incidence of viruses infecting cucurbit crops in Guilan Province (Iran). Proc. 18th Iranian Plant Protec. Cong., Iran, Hamedan, p 503.

Hajimorad M, Kheyr-Pour A, Alavi V, Ahoonmanesh 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 Pathol 45: 418-425.

Heydarnejad J, Hesari M, Massumi H, Varsani A (2013). Incidence and natural hosts of Tomato leaf curl Palampur virus in Iran. Aust Plant Pathol DOI 10.1007/s13313-012-0164-0.

Heydarnejad J, Hosseini Abhari E, Bolok Yazdi HR, Massumi H **(**2007). Curly top of cultivated plants and weeds and report of a unique curtovirus from Iran. J Phytopathology 125: 321-325.

Heydarnejad J, Khosrowfar F, Razavinejad S, Massumi H, Tabatabaei Fard SJ (2010). Incidence of *Watermelon chlorotic stunt virus* in Fars and Kerman provinces. Proc. 19th Iranian Plant Protec. Cong., Iran, Tehran, p 672.

Idris AM, Brown JK. (1998). Sinaloa tomato leaf curl geminivirus: biological and molecular evidence for a new subgroup III virus. Phytopathology 88:648–657.

Idris AM, Hiebert E, Bird J, Brown JK. (2003). Two newly described begomoviruses of Macroptilium lathyroides and common bean. Phytopathology 93:774-783.

Jamil M, Ul Haq I, Mirza B, Qayyum M (2012). Isolation of antibacterial compounds from Quercus dilatata L. through bioassay guided fractionation. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 11:1-11.

Jones P, Satar NW, Alkaff N (1988). The incidence of virus disease in watermelon and sweetmelon crops in the Peoples Democratic Republic of Yemen and its impact of cropping policy. Aspects Appl. Biol. 17: 203–207.

Kheyr-Pour A, Bananej K, Dafalla GA, Caciagli P, Noris E, Ahoonmanesh A, Lecoq H, Gronenborn B (2000). *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: Sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. Phytopathology 90: 629-635.

Lecoq H, Dafalla GA, Mohamed YF, Ali HM, Wipf-Scheibel C, Desbiez C, Eljack AE, Omara SK, Pitrat M (1994). Survey of virus diseases infecting cucurbit crops in Eastern, Central and Western Sudan. Khartoum Univ. J. Agric. Sci. 2: 67-82.

Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJA, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett JM, Varsani A, Heydarnejad J (2010). The spread of Tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. PLoS Pathogen 6: 1-12.

Morales FJ (2006). History and current distribution of begomoviruses in Latin America. Adv Virus Res 67:127–162.

Muniz M (2000). Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. Entomol. Exp. Appl. 95**:** 63–70.

Peyvast GA (2005). Vegetable Production. Daneshpazir Publication, Rasht (Gilan), 487pp.

Sufrin-Ringwald T, Lapidot M (2011). Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus. Phytopathology 101:281-289.

Ucko O, Cohen S, Ben Joseph R (1998). Prevention of virus epidemics by a crop-free period in the Arava region of Israel. Phytoparasitica 26:313–321.

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. J Virol Methods 71: 45-50.

Identification of Wild Hosts of Watermelon Chlorotic Stunt Virus in South and Southeastern Iran

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

[1] 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

Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV) is one of the destructive viruses of watermelon in south and southeastern Iran. In order to identify the wild hosts of the virus, watermelon growing areas of Minab (Hormozgan province), Roodbar-e-Jonob and Arzuiyeh (Kerman province) were surveyed and weed samples collected within and around the severely infected farms. The infection of the samples was tested by PCR using specific primer pair. Results showed that 14 weed species from 12 genera and nine plant families are infected with WmCSV. Most of the infected weeds were symptomless and did not show any specific symptoms. All the infected weed species in this study are reported for the first time as the WmCSV host in the world. In order to compare WmCSV isolates from weed species, the amplified 655 bp segment of coat protein (CP) gene from 11 infected weeds were cloned and sequenced. Comparison of nucleotide and amino acid sequences of 11 WmCSV isolates showed close similarities with each other and with the GenBank isolates. The closest GenBank isolate was the previously reported Iranian isolate from Bandar-Abbas (Hormozgan province) with 98/9-99/2 and 96/8-100% homologies for nucleotide and amino acid sequences, respectively. According to the results of this study, weed species are secondary hosts and serve as the reservoirs of the WmCSV. Thus, these weeds could be potentially important in epidemiology of the virus.

Keywords: Geminivirus, *Begomovirus*, *Watermelon chlorotic stunt virus*, *Bemisia tabaci*, Whitefly, Weeds

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