

برهمکنش زیر گروه‌های I و II ویروس موزاییک خیار (CMV) در *Nicotiana rustica*سوسن توکلی، اکبر دیزجی[✉]، غلامحسین مصاحبی، نیایش شاه محمدی

به ترتیب دانش آموخته، دانشیار، استاد و دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷)

چکیده

در این تحقیق بر همکنش دو جدایه Zin1 و Zin2، به ترتیب متعلق به زیر گروه‌های I و II ویروس موزاییک خیار (CMV)، روی بوته‌های *Nicotiana rustica* مطالعه شد. پس از مایه‌زنی مکانیکی انفرادی و دوگانه جدایه‌های خالص ویروس روی برگ‌های توتون، نرخ آلودگی و غلظت نسبی هر جدایه به روش آزمون الایزای کمی در شش بازه زمانی مختلف پس از مایه زنی در تیمارهای مختلف بررسی شد. تحلیل آماری داده‌های تکرار شونده نشان داد که متغیرهای بازه زمانی و تیمار روی فراوانی ردیابی و غلظت نسبی هر دو جدایه تأثیر معنی‌داری ($p < 0.05$) داشت. در تیمارهای دوگانه مایه زنی، نسبت غلظت هر جدایه در گیاهان دوگانه آلوده به تک آلوده (D/S) کمتر از یک بود. در مقاطع زمانی ۵، ۱۰ و ۱۸ روز پس از مایه‌زنی (dpi)، غلظت نسبی هر جدایه در تیمار تک مایه‌زنی با اختلاف معنی‌داری ($p < 0.01$) بیش از تیمارهای دوگانه مایه‌زنی بود. نتایج آزمون وسترن بلات نیز حاکی از افزایش غلظت ویروس در ۱۸ dpi بود. این نتایج بیانگر برهمکنش دگرپادی بین جدایه‌های دو زیرگروه این ویروس می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برخلاف شاخص‌های ناحیه زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و غلظت کلروفیل، شاخص‌های شدت بیماری (DSI)، ارتفاع و وزن تر بوته‌ها بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان دادند. در آزمون‌های انتقال جدایه‌ها با شته‌ها جالیز از منابع تک و دوگانه آلوده هر جدایه، اختلاف معنی‌داری بین نرخ انتقال (T) و کارایی انتقال تک شته (P^*) هر جدایه مشاهده نشد. واژه‌های کلیدی: آلودگی همزمان، انتقال با شته، شاخص شدت بیماری، زیرگروه CMV، غلظت نسبی

Interaction between *Cucumber mosaic virus* subgroup I and II in *Nicotiana rustica*S. TAVAKOLI, A. DIZADJI[✉], G.H. MOSSAHEBI, N. SHAHMOHAMMADI

MSc. Graduated student, Associate professor, professor and PhD. student in Plant Pathology (respectively), Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract

Interaction among two isolates of *Cucumber mosaic virus* (CMV), Zin1 and Zin2 belong to CMV subgroup I and II was investigated on *Nicotiana rustica* plants in current study. Following singly and doubly mechanical inoculation of pure isolates on *N. rustica* plants, infection rate (frequency of detection) and relative concentration of each CMV isolate were calculated in six different time trials (days post inoculation, dpi) by quantitative ELISA. Statistical analysis of repeated measures data showed a meaningful effect ($p < 0.05$) of treatment and time variants on frequency of detection and relative concentration of each isolates. D/S ratio for each CMV isolate was less than 1 in doubly inoculation treatment. The results showed that the relative concentration of each isolate in singly inoculated plants was significantly ($p < 0.01$) more than doubly inoculated ones at 5, 10 and 18 dpi. The increase in virus titre at 18 dpi was confirmed by western blot analysis. These results demonstrated a cross-protection interaction among CMV subgroups. Variance analysis of data showed that unlike area under the disease progress curve (AUDPC) and concentration of chlorophyll, disease severity index (DSI), height and fresh weight of plants showed a significant difference among different treatments. In aphid transmission assays by *Aphis gossypii* fed on singly and doubly infected source plants, no significant difference was observed among transmission rate (T) and single aphid transmission efficiency (P^*) of each CMV isolates.

Keywords: Aphid transmission, CMV subgroup, co-infection, disease severity index, relative concentration

مقدمه

ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus, CMV*) گونه‌ی تیپ جنس *Cucumovirus* از خانواده‌ی *Bromoviridae* می‌باشد (King et al. 2012). این ویروس دارای پیکره‌های ایزومتریکی به قطر ۲۹ نانومتر و ژنوم آر آن مثبت تک رشته‌ای سه بخشی می‌باشد. جدایه‌های CMV براساس معیارهای مختلف از جمله روابط سرولوژیکی، نقشه هضم آنزیمی، هیبریدزاسیون اسید نوکلئیک و ویروس، شباهت توالی نوکلئوتیدی و نیز علائم بیماری در دو زیر گروه اصلی I و II قرار می‌گیرند (Davino et al. 2005).

شباهت توالی نوکلئوتیدی چارچوب ژنی پروتئین پوششی و ناحیه‌ی ترجمه نشدنی انتهای ۵' (5'-UTR) بین سویه‌های دو زیر گروه، ۷۶٪ - ۷۷٪ می‌باشد که تنوع نوکلئوتیدی بالایی برای جدایه‌های یک گونه ویروس گیاهی است. در نتیجه تعدادی از محققین بر این عقیده اند که این دو زیر گروه می‌توانند به عنوان دو گونه مستقل در نظر گرفته شود. در حالی که شباهت بین سویه‌های هر زیر گروه در این ناحیه ژنومی ۹۶٪ - ۹۹٪ است (Jacquemond 2012).

به طور کلی سویه‌های زیر گروه I معمولاً علائم شدیدتری در گیاهان دو لپه‌ای نسبت به زیر گروه II ایجاد می‌کنند (Xu et al. 1999). اخیراً مشخص شده که شدت علائم سویه‌های زیر گروه I در میزبان توتون به دلیل برهمکنش پروتئین پوششی این سویه‌ها با پروتئین کلروپلاست فردوکسین I (*Chloroplast ferredoxin I*) بوده در حالی که چنین برهمکنشی بین پروتئین پوششی سویه‌های زیر گروه II و کلروپلاست فردوکسین I همان میزبان رخ نمی‌دهد (Qiu et al. 2018). سویه‌های متعلق به زیر گروه I CMV بیماری‌زا تر و مقاوم تر به دما بوده در حالی که سویه‌های متعلق به زیر گروه II با بیماری‌زایی کمتر و نسبت به دما حساس تر هستند (Shi et al. 2002, Jacquemond 2012, Koundal et al. 2011).

آلودگی همزمان یا مخلوط یک گیاه میزبان به بیش از یک ویروس در طبیعت امری عادی است که برهمکنش بین ویروس‌ها

ممکن است به صورت خنثی، دگرپادی (cross protection)، هم افزایی (synergism) یا وابستگی در انتقال بروز نماید (Hammod et al. 1999). برهمکنش دگرپادی بین سویه‌های CMV که منجر به کاهش سطح همانندسازی آنها در میزبان می‌شود قبلاً گزارش شده است (Dodds 1982, Tomaru et al. 1967).

سویه‌های زیر گروه I معمولاً نسبت به سویه‌های زیر گروه II توانایی رقابتی بالاتری داشته و در آلودگی‌های همزمان (مخلوط) باعث حذف سویه‌های زیر گروه II می‌شود، البته توانایی رقابتی جدایه‌های زیر گروه II نیز متفاوت می‌باشند (Tian et al. 2009). همچنین در آلودگی مخلوط سویه‌های این دو زیر گروه در لوبیا چشم بلبلی، جدایه هر زیر گروه در مکان جداگانه‌ای از جدایه دیگر در برگ‌های آلوده مستقر می‌شوند (Takeshita et al. 2004).

ویروس موزاییک خیار توسط بیش از ۸۰ گونه‌ی شته به صورت ناپایا انتقال می‌یابد (Galitelli 2000). نرخ انتقال ویروس توسط ناقل تحت تاثیر سویه ویروس، گونه‌ی شته و گونه‌ی گیاهان مورد تغذیه گیرش و دهش متفاوت است. به طوری که برخی از سویه‌های CMV قادر به انتقال با شته نبوده یا با کارایی خیلی ضعیف منتقل می‌شود. همچنین تأثیر پروتئین پوششی در کارایی انتقال سویه‌های مختلف این ویروس قبلاً گزارش شده است (Galitelli 2000; Garcia-Arenal & Palukaitis 2008).

مطالعه‌ی رقابت بین سویه‌های زیر گروه‌های CMV به تخمین ظهور هر یک از زیر گروه‌ها در میزبان‌های مختلف کمک می‌کند (Power 1996). لذا هدف از این تحقیق بررسی برهمکنش دو جدایه از زیر گروه‌های I و II ویروس موزاییک خیار در آلودگی مخلوط میزبان توتون (*Nicotiana rustica*) است.

روش بررسی

جدایه‌های ویروس، خالص سازی و تکثیر: طی نمونه برداری از گلخانه‌های زینتی و فضای سبز استان البرز در سال ۱۳۹۱، دو جدایه CMV به نام‌های Zin1 (با رس شمار

آنتی‌بادی تک همسانه ای اختصاصی زیرگروه‌های ویروس مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین رقت مناسب عصاره گیاهی جهت استفاده در الایزای کمی، میزان جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر (OD_{405}) رقت‌های مختلفی از عصاره بافت برگ یک گیاه تک آلوده به هر جدایه تهیه و با سه تکرار از هر رقت در آزمون TAS-ELISA استفاده شد. براساس منحنی بین OD_{405} و رقت‌های مختلف عصاره گیاه آلوده، رقتی از عصاره که بهترین رابطه خطی با غلظت نسبی ویروس را نشان دهد انتخاب و در آزمون الایزای کمی استفاده شد. غلظت نسبی هر جدایه در هر تیمار براساس OD_{405} تعیین شده در الایزا برای بوته‌های مایه زنی شده تعیین شد. براساس نتایج TAS-ELISA، بوته‌هایی که OD_{405} آنها سه برابر OD_{405} گیاه سالم بود به عنوان گیاه آلوده در نظر گرفته شد. نرخ آلودگی به هر جدایه بین تیمارها در بازه زمانی با بیشترین غلظت نسبی جدایه‌ها مورد تجزیه آماری قرار گرفت. اثر دو متغیر بازه زمانی پس از مایه زنی و تیمارهای مایه زنی روی میانگین داده‌ها در آزمایش فاکتوریل و قالب طرح کاملاً تصادفی، به روش دانکن و توسط نرم افزار SAS 9.1 انجام شد. در تیمارهای مایه زنی دوگانه، نسبت D به S (D/S)، نسبت میانگین OD_{405} بوته‌های دوگانه آلوده منهای میانگین OD_{405} بوته‌های سالم به میانگین OD_{405} بوته‌های تک آلوده منهای میانگین OD_{405} بوته‌های سالم) برای هر جدایه محاسبه شد (Wen et al. 1991).

تأثیر آلودگی انفرادی و دوگانه جدایه‌های CMV روی

سطح تجمع پروتئین پوششی هر جدایه: مقایسه سطح تجمع پروتئین پوششی ویروس در بوته‌های آلوده به روش وسترن بلات (Towbin et al. 1979) انجام شد. نمونه برداری از برگ‌هایی با موقعیت یکسان از بوته‌های تک یا دوگانه آلوده تیمارهای ویروسی T1 تا T5 و بوته‌های سالم تیمار شاهد در بازه زمانی ۱۸ dpi انجام و از هر تیمار یک نمونه مرکب (حاوی نسبت مساوی از بافت برگ بوته‌های آلوده همان تیمار) تهیه و برای استخراج پروتئین کل استفاده شد. پس از تعیین

Zin2 و (KP455736) (با رس شمار KP662628) از گیاه زینتی گل آهار (*Zinnia elegans*) به دست آمد که براساس خصوصیات بیولوژیکی، سرولوژیکی و توالی نوکلئوتیدی چارچوب زنی پروتئین پوششی تعلق آنها به ترتیب به زیرگروه‌های I و II به اثبات رسید (Shahmohammadi et al. 2015)، که در این بررسی از این جدایه‌ها استفاده شد. جدایه‌ها روی گیاهان *Nicotiana tabacum* cv. Samsun به روش مکانیکی با استفاده از بافر فسفات ۰/۱ مولار، pH ۷ مایه زنی شدند. برای اطمینان از خلوص جدایه‌ها و زیرگروه هر یک، بوته‌های آلوده با آزمون ساندویچ سه طرفه الایزا (Triple antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay, TAS-ELISA) (Thomas et al. 1986) و با استفاده از آنتی‌بادی تک همسانه‌ای AS-489/1 و AS-490/1، به ترتیب اختصاصی زیرگروه I و II ویروس موزائیک خیار (DSMZ, Germany) بررسی شدند. این بوته‌ها به عنوان منبع هر جدایه ویروس در مراحل بعدی استفاده شد.

تأثیر مایه زنی انفرادی و دوگانه با جدایه‌های CMV روی

نرخ آلودگی و غلظت نسبی هر جدایه: مایه زنی جدایه‌های CMV-Zin1 و Zin2 روی بوته‌های *Nicotiana rustica* در مرحله ی رشدی سه تا چهار برگگی انجام شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار شامل T1، مایه زنی انفرادی با جدایه Zin1، T2، مایه زنی انفرادی با جدایه Zin2، T3، مایه زنی دوگانه همزمان با جدایه‌های Zin1 و Zin2، T4، مایه زنی دوگانه ترتیبی اول با Zin1 و بعد با Zin2 (Zin1/Zin2) با فاصله زمانی ۲۴ ساعت، T5، مایه زنی دوگانه ترتیبی اول با Zin2 و بعد با Zin1 (Zin2/Zin1) با فاصله زمانی ۲۴ ساعت و T6، مایه زنی با بافر (شاهد) و در پنج تکرار انجام شد. همچنین در هر تکرار نیز چهار بوته برای هر تیمار در نظر گرفته شد.

گیاهان مایه زنی شده در بازه‌های زمانی شامل سه، پنج، ۱۰، ۱۸، ۲۵ و ۲۸ روز پس از مایه زنی (dpi) با آزمون الایزای کمی (quantitative TAS-ELISA) و با استفاده از

تأثیر آلودگی انفرادی و دو گانه جدایه‌های CMV روی کارایی انتقال با *Aphis gossypii*: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار (تیمارهای T'1 و T'2 مایه زنی انفرادی با شته تغذیه شده از منابع تک آلوده به Zin1 و Zin2 (به ترتیب)، تیمار T'3، T'4 و T'5 مایه زنی دوگانه با شته تغذیه شده از منابع دوگانه آلوده تیمارهای T3، T4 و T5 (به ترتیب) و T'6 مایه زنی با شته تغذیه شده از تیمار T6 (شاهد) و ۱۵ بوته کدو برای هر تیمار (پنج تکرار سه تایی) انجام شد. پس از تهیه کلنی خالص شته جالیز (*A. gossypii*) از تک پوره بر روی بوته خیار، شش پوره سن سوم شته برای مایه‌زنی هر بوته کدو استفاده شد. پس از یک ساعت دوره گرسنگی و سپری شدن پنج دقیقه دوره دسترسی گیرش ویروس توسط شته‌ها روی بوته‌های تک و دوگانه آلوده، شته‌ها به مدت یک شب روی بوته‌های کدو برای تغذیه مایه زنی ویروس قرار گرفته و سپس با استفاده از حشره کش‌های سیستمیک از روی گیاهان گیرنده حذف گردیدند (Noordam 1973). دو هفته پس از مایه‌زنی گیاهان کدو با شته آلودگی آنها به هر جدایه با TAS-ELISA و با استفاده از آنتی بادی تک‌همسانه ای اختصاصی زیرگروه بررسی و غلظت نسبی ویروس (OD_{405})، نرخ انتقال (T، نسبت تعداد گیاهان آلوده به تعداد گیاهان مایه‌زنی شده) و کارایی انتقال ($P^* = 1 - (1 - T)^{1/4}$) برای هر جدایه محاسبه شد. داده‌ها به روش دانکن و با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

تأثیر آلودگی انفرادی و دو گانه جدایه‌های CMV روی غلظت کلروفیل، ارتفاع و وزن تر توتون: براساس نتایج آزمون TAS-ELISA در ۴۲ و ۷۰ dpi، بوته‌های تک آلوده به هر جدایه (در تیمارهای T1 و T2) و دوگانه آلوده (در تیمارهای T3، T4 و T5) تعیین و دو برگ انتهایی (با موقعیت یکسان) هر بوته آلوده و نیز بوته‌های سالم (T6) نمونه برداری شد. پس از مخلوط کردن نمونه‌های هر بوته با وزن یکسان، پنج گرم از نمونه مخلوط هر تیمار برای تعیین غلظت کلروفیل a و b و کلروفیل کل به روش Amon (۱۹۴۹) استفاده شد. همچنین ارتفاع

غلظت پروتئین کل آماده‌ها به روش برادفورد (Bradford 1976)، ۱۰ میکروگرم پروتئین کل از هر آماده (براساس غلظت تعیین شده) برای تفکیک پروتئین‌های محلول با الکتروفورز عمودی در ژل پلی‌اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (Laemmli 1970) استفاده شد. پس از انتقال باندهای پروتئینی از ژل به غشای نیتروسولوزی با دستگاه Mini VE (ساخت شرکت Biosciences Amersham)، ردیابی باند پروتئین پوششی هر جدایه با استفاده از آنتی بادی تک همسانه‌ای اختصاصی هر زیر گروه CMV انجام و غشا با NBT/BCIP رنگ آمیزی شد.

تأثیر مایه زنی انفرادی و دو گانه جدایه‌های CMV روی شاخص‌های بیماری: دو شاخص شدت بیماری^۱ و ناحیه زیر منحنی پیشرفت بیماری^۲ در بوته‌های مایه زنی شده توتون *N. rustica* در تیمارهای مختلف بررسی شد. نوع و شدت علائم بیماری ظاهر شده در بازه‌های زمانی ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲، ۴۹، ۵۶ و ۶۳ روز پس از مایه زنی (dpi) بین صفر (بدون علائم قابل مشاهده) تا ۱۰ (علائم بسیار شدید، کوتولگی و مرگ بوته) درجه بندی و شاخص شدت بیماری (DSI) و پیشرفت بیماری براساس ناحیه زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) برای هر تکرار (شامل چهار بوته) از هر تیمار محاسبه و با هم مقایسه آماری شدند. شاخص شدت بیماری با فرمول $DSI(\%) = \sum(Vn)/NZX100$ (Tao et al. 2013)، $(V = \text{درجه شدت علائم، } n = \text{تعداد گیاهان آلوده ی با درجه شدت علائم یکسان، } Z = \text{بیشترین درجه علائم (عدد ۱۰ در این تحقیق)}) = N$ تعداد کل گیاهان موجود در تیمار) محاسبه شد و براساس DSI محاسبه شده در هر تکرار، ناحیه زیر منحنی پیشرفت بیماری براساس فرمول زیر (Shaner & Finney 1977) محاسبه شد.

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

$DSI = y_i$ در مشاهده i ام، $t_i =$ زمان (روز) مشاهده i ام، $n =$ تعداد کل مشاهدات

¹ Disease severity index, DSI

² Area under disease progress curve, AUDPC

غلظت نسبی هر جدایه در بازه های زمانی مختلف بعد از مایه زنی در جدول ۲ آورده شده است. غلظت نسبی جدایه Zin 1 تمام تیمارهای مایه زنی انفرادی و دوگانه و تیمار مایه زنی انفرادی و غلظت نسبی جدایه Zin2 در تیمار مایه زنی انفرادی از ۱۸-۵ dpi افزایش یافته و پس از رسیدن به حدکثر مقدار در ۱۸ dpi، سیر کاهشی داشت، در حالی که در تیمارهای دوگانه Zin2 غلظت نسبی جدایه از ۲۸-۵ تغییرات جزئی افزایشی نشان داد. غلظت هر دو جدایه در تیمارهای مایه زنی انفرادی بیش از تیمارهای دوگانه مایه زنی بود ولی در ۱۸ dpi بین غلظت هر جدایه در تیمارهای تک و دوگانه مایه زنی تفاوت معنی داری ($p < 0.01$) مشاهده شد. در این بازه زمانی (۱۸ dpi)، غلظت Zin1 در تیمار مایه زنی انفرادی و دوگانه مایه زنی ترتیبی (T4) به طور معنی داری ($p < 0.01$) بیشتر از T3 بود، در حالی که غلظت Zin2 در تیمار مایه زنی انفرادی (T2) بطور معنی داری بیش از غلظت آن نسبت به تیمارهای دوگانه مایه زنی بود. در ۲۸ dpi غلظت جدایه Zin2 در تیمارهای مایه زنی انفرادی T2 و دوگانه T5 (مایه زنی ترتیبی Zin2/Zin1) مشابه هم و بیش از غلظت جدایه در تیمارهای T3 و T4 (بدون اختلاف معنی دار) بود.

تجزیه واریانس اثر متقابل تیمارها (نحوه مایه زنی) و بازه زمانی مورد بررسی (پنج، ۱۰، ۱۸، ۲۵ و ۲۸ dpi) روی غلظت نسبی جدایه ها در تکرارهای مستقل (غیر تکراری) نشان داد که نحوه مایه زنی انفرادی یا دوگانه ($p < 0.05$) و بازه های زمانی مورد بررسی بعد از مایه زنی ($p < 0.01$) روی غلظت نسبی هر دو جدایه تاثیر معنی داری داشته ولی اثر متقابل این دو عامل معنی دار نبود.

آلودگی مخلوط به دو جدایه فقط در سه بازه زمانی ۱۸، ۲۵ و ۲۸ dpi ردیابی شد که بیشترین نرخ آلودگی مخلوط در بازه زمانی ۱۸ dpi و به میزان یکسان (۱۰ درصد) در هر سه تیمار مایه زنی دوگانه مشاهده شد (جدول ۱). نکته جالب این که در همین بازه زمانی، در هیچ یک از تیمارهای دوگانه مایه زنی T3 و T4 آلودگی انفرادی به Zin2 مشاهده نشد و این جدایه فقط در ۱۰ درصد از

و وزن تر بوته های مایه زنی شده در هر تیمار و بوته های سالم (کنترل منفی) در بازه زمانی ۸۰ dpi مقایسه آماری شد. نتایج در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل آماری شد.

نتایج

براساس نتایج TAS-ELISA، جدایه های Zin1 و Zin2 به ترتیب با آنتی بادی های تک همسانه ای اختصاصی AS-490/1 و AS-489/1 و ویروس موزائیک خیار واکنش مثبت نشان داد. بنابراین صحت تعلق جدایه های Zin1 و Zin2 به ترتیب به زیر گروه I و II و عدم آلودگی مخلوط آنها تأیید و کارایی این دو آنتی بادی تک همسانه ای در تشخیص دو زیرگروه ویروس موزائیک خیار محرز شد. براساس منحنی رسم شده بین OD₄₀₅ و رقت های مختلف عصاره گیاه آلوده در آزمون TAS-ELISA، رقت ۱:۵۰۰ برای جدایه Zin1 و رقت ۱:۱۰ برای جدایه Zin2 به عنوان رقت مناسب جهت استفاده در آزمون الایزای کمی و تخمین غلظت نسبی ویروس تعیین شد.

تأثیر مایه زنی انفرادی و دوگانه روی نرخ آلودگی و غلظت

نسبی هر جدایه: بر اساس نتایج آزمون TAS-ELISA، نرخ آلودگی در بازه های زمانی مختلف بعد از مایه زنی در جدول (۱) آورده شده است. در بازه زمانی ۳ dpi، آلودگی به هیچ یک از جدایه های ویروس ردیابی نشد. بالاترین نرخ آلودگی برای هر دو جدایه در ۱۸ dpi به دست آمد. در این بازه زمانی، نرخ آلودگی Zin1 در تیمارهای تک و دو گانه مایه زنی شده به ترتیب ۹۵ و ۹۰-۷۰ درصد (بدون اختلاف معنی دار، $p = 0.33$) تعیین شد اما نرخ آلودگی به Zin2 در T2 ($50 \pm 15/81$) با اختلاف معنی داری ($p = 0.03$) بیشتر از نرخ آلودگی T3 و T4 ($10 \pm 6/12$) بود. در این بازه زمانی و در مجموع تیمارهای تک و دوگانه مایه زنی، نرخ آلودگی Zin1 به ترتیب ۸۲/۵±۵/۴۷ با اختلاف معنی داری ($p < 0.0001$) بیشتر از نرخ آلودگی Zin2 ($23/75 \pm 5/87$) بود.

بوته‌های دوگانه آلوده ردیابی شد. در حالی که نرخ آلودگی انفرادی به این جدایه در تیمار T5 معادل ۱۵٪ و برای جدایه Zin1 در T3، T4 و T5 به ترتیب ۶۰، ۸۰ و ۶۵ درصد تعیین شد. به این دلیل نسبت D/S برای جدایه Zin2 فقط در تیمار T5 قابل محاسبه بود که ۸۷٪ تعیین شد. نسبت D/S برای جدایه Zin1 در تیمارهای T3، T4 و T5 به ترتیب ۷۲، ۷۶ و ۱۸٪ (جدول ۲) محاسبه شد.

جدول ۱- نرخ آلودگی (درصد) انفرادی و دوگانه گیاهان *Nicotiana rustica* به جدایه‌های Zin1 و Zin2 ویروس موزائیک خیار در تیمارهای مختلف مایه زنی و بازه‌های زمانی مختلف بعد از مایه زنی.

Table 1. Single and double infection rate (percentage) of *Nicotiana rustica* plants with CMV- Zin1 and Zin2 isolates in different inoculation treatments at different time intervals after inoculation

| Treatment | 5dpi | | | 10dpi | | | 18dpi | | | 25dpi | | | 28dpi | | |
|-----------|------|------|-----------|-------|------|-----------|-------|------|-----------|-------|------|-----------|-------|------|-----------|
| | Zin1 | Zin2 | Zin1+Zin2 | Zin1 | Zin2 | Zin1+Zin2 | Zin1 | Zin2 | Zin1+Zin2 | Zin1 | Zin2 | Zin1+Zin2 | Zin1 | Zin2 | Zin1+Zin2 |
| T1 | 35 | - | - | 45 | - | - | 95 | - | - | 60 | - | - | 40 | - | - |
| T2 | - | 5 | - | - | 15 | - | - | 50 | - | - | 35 | - | - | 35 | - |
| T3 | 15 | 5 | 0 | 35 | - | - | 70 | 10 | 10 | 10 | 5 | 0 | 15 | 5 | 0 |
| T4 | 10 | 0 | 0 | 42 | 10 | 0 | 90 | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 | 31 | 21 | 5.25 |
| T5 | 5 | 0 | 0 | 31 | 10 | 0 | 75 | 25 | 10 | 26 | 21 | 10.5 | 36 | 31 | 5.25 |

T1 و T2 مایه زنی انفرادی به ترتیب با جدایه Zin1 و Zin2، تیمار T3 مایه زنی دوگانه همزمان، T4 و T5 تیمارهای مایه زنی دوگانه ترتیبی (به ترتیب، اول با Zin1 و بعد با Zin2 (Zin1/Zin2) و برعکس (Zin2/Zin1) با فاصله زمانی ۲۴ ساعت، T6 مایه زنی با بافر (شاهد).

T1 and T2, singly inoculation with Zin1 and Zin2, respectively; T3, simultaneous double inoculation; T4 and T5, sequential double inoculation with Zin1/Zin2 and Zin2/Zin1, with an interval of 24 h; T6, mock inoculation.

جدول ۲- غلظت نسبی ویروس (میانگین جذب OD₄₀₅ در TAS-ELISA) در تیمارهای تک و دوگانه مایه زنی *Nicotiana rustica* با جدایه‌های Zin1 و Zin2 ویروس موزائیک خیار در بازه‌های زمانی مختلف بعد از مایه زنی

Table 2. Relative viral concentration (OD₄₀₅ values average in TAS-ELISA) in singly and doubly inoculation treatments of *Nicotiana rustica* with CMV-Zin1 and Zin2 in time intervals after inoculation

| Treatment | CMV-Zin1 | | | | | CMV-Zin2 | | | | |
|-----------|--------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|----------------------|
| | 5dpi | 10dpi | 18dpi | 25dpi | 28dpi | 5dpi | 10dpi | 18dpi | 25dpi | 28dpi |
| T1 | 0.48±0.007a | 0.35±0.03a | 2.52±0.14a | 0.46±0.06a | 0.52±0.13a | - | - | - | - | - |
| T2 | - | - | - | - | - | 0.21±0.02b | 0.27±0.04a | 0.72±0.13a | 0.51±0.08a | 0.55±0.1a |
| T3 | 0.35±0.007ab | 0.28±0.02ab | 1.2±0.24b (0.72) | 0.21±0.012b | 0.19±0.02ab | 0.21±0.02b | 0.2±0.01a | 0.2±0.01b | 0.19±0.02b | 0.3±0.06ab |
| T4 | 0.32±0.009ab | 0.39±0.025a | 2.41±0.24a (0.76) | 0.26±0.05a | 0.3±0.08ab | 0.26±0.01ab | 0.23±0.02a | 0.23±0.02b | 0.25±0.04b | 0.35±0.06ab |
| T5 | 0.3±0.04ab | 0.3±0.04ab | 1.66±0.3ab (0.18) | 0.32±0.05ab | 0.41±0.11ab | 0.35±0.02 a | 0.25±0.02a | 0.37±0.09b | 0.34±0.07ab | 0.46±0.1ab (0.87) |
| T6 | 0.13±0.004b | 0.13±0.004b | 0.14±0.006c | 0.14±0.006b | 0.14±0.006b | 0.2±0.004b | 0.19±0.004a | 0.16±0.01b | 0.16±0.01b | 0.16±0.01b |

T1 و T2 مایه زنی انفرادی به ترتیب با جدایه Zin1 و Zin2، تیمار T3 مایه زنی دوگانه همزمان، T4 و T5 تیمارهای مایه زنی دوگانه ترتیبی (به ترتیب، اول با Zin1 و بعد با Zin2 (Zin1/Zin2) و برعکس (Zin2/Zin1) با فاصله زمانی ۲۴ ساعت، T6 مایه زنی با بافر (شاهد).

T1 and T2, singly inoculation with Zin1 and Zin2, respectively; T3, simultaneous double inoculation; T4 and T5, sequential double inoculation with Zin1/Zin2 and Zin2/Zin1, with an interval of 24 h; T6, mock inoculation.

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار بین تیمارها در سطح ۱ درصد می باشد.

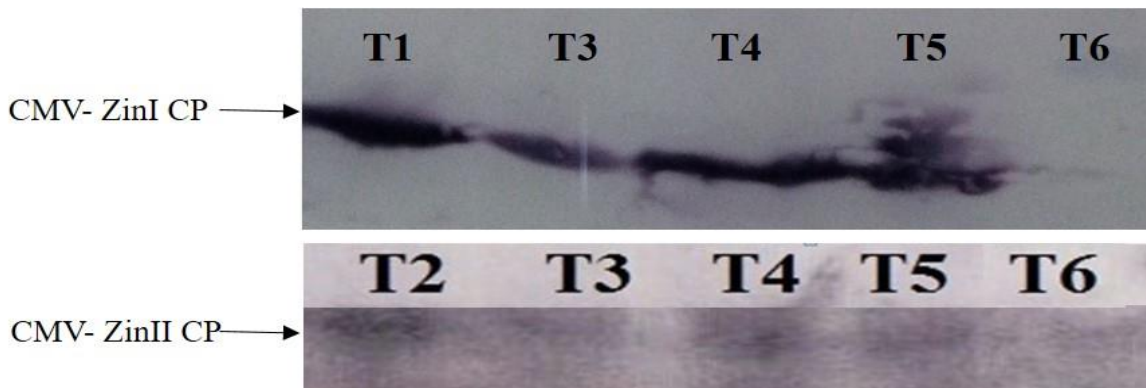
اعداد داخل پرانتز، نسبت D/S مربوط به جدایه‌ها می باشد. D/S عبارت است از نسبت میانگین OD₄₀₅ بوته‌های دوگانه آلوده منهای میانگین OD₄₀₅ بوته‌های منفی به میانگین OD₄₀₅ بوته‌های تک آلوده منهای میانگین OD₄₀₅ بوته‌های منفی.

تیمارها در هر بازه حاکی از وجود اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) فقط در ۲۸ dpi بود، به طوری که در این زمان شاخص شدت بیماری T4 با اختلاف معنی داری بیش از T2 و T3 و نیز T5 بیش از T2 تعیین گردید. همچنین بیشینه و کمینه مقدار این شاخص در ۲۸ dpi برای تیمارهای T2 و T4 (به ترتیب) به دست آمد (جدول ۳).

مقایسه آماری ناحیه زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) در هر تکرار چهار بوته ای از هر تیمار، اختلاف معنی داری بین تیمارها نشان نداد ($p = 0.17$)، البته T1 و T2 به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار این شاخص را دارا بودند (جدول ۳).

تأثیر آلودگی انفرادی و دوگانه جدایه های CMV روی سطوح تجمع پروتئین پوششی هر جدایه: سطوح تجمع پروتئین پوششی هر جدایه در مقدار مساوی (۱۰ میکروگرم) از پروتئین کل هر تیمار مایه زنی تک و دوگانه مایه زنی به روش وسترن بلات تعیین شد. بر اساس نتایج غلظت هر جدایه در بوته های تک آلوده بیشتر از غلظت آن در بوته های دوگانه آلوده بود (شکل ۱).

تأثیر مایه زنی انفرادی و دوگانه جدایه های CMV روی شاخص های بیماری: شاخص شدت بیماری (DSI) محاسبه شده برای هر تیمار در هشت بازه زمانی ۶۳-۱۴ dpi، روند افزایشی نشان داد، لیکن مقایسه آماری این شاخص بین



شکل ۱- نقوش وسترن بلات آلوده های پروتئین کل بوته های آلوده *Nicotiana rustica* به جدایه های Zin1 (بالا) و Zin2 (پایین) ویروس موزاییک خیار در تیمارهای مایه زنی انفرادی (T1, T2)، مایه زنی دوگانه T3, T4, T5 و تیمار شاهد (T6).

Fig. 1. Western blotting of extracted total proteins from CMV-infected *Nicotiana rustica* plants (Zin1 (up) and Zin2 (below)) belong to singly (T1, T2), doubly (T3, T4, T5) and mock inoculated treatments.

جدول ۳- مقایسه آماری میانگین شاخص شدت بیماری (DSI) و ناحیه زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) تیمارهای تک و دوگانه مایه زنی شده *Nicotiana rustica* با جدایه های Zin1 و Zin2 ویروس موزاییک خیار

Table 3. Statistical comparison of DSI and AUDPC in singly and dually inoculation treatments of *Nicotiana rustica* with CMV-Zin1 and Zin2 /

| Treatment | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
|-------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|----------------|
| DSI (28dpi) | 22.5±5.48abc | 15±4.81c | 19.5±2.42bc | 33.16±3.10a | 27.66±2.55ab |
| AUDPC | 1555.75±190.87a | 1039.0 ±174.66a | 1160.25 ±195.43a | 1415.37 ± 82.93a | 1354.78±94.27a |

T1 و T2 مایه زنی انفرادی به ترتیب با جدایه Zin1 و Zin2، تیمار T3 مایه زنی دوگانه همزمان، T4 و T5 تیمارهای مایه زنی دوگانه ترتیبی (به ترتیب، اول با Zin1 و بعد با Zin2 (Zin1/Zin2)) و برعکس (Zin2/Zin1) با فاصله زمانی ۲۴ ساعت.

T1 and T2, singly inoculation with Zin1 and Zin2, respectively; T3, simultaneous double inoculation; T4 and T5, sequential double inoculation with Zin1/Zin2 and Zin2/Zin1, with an interval of 24 h.

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها می باشد.

اعداد میانگین DSI یا AUDPC ± خطای استاندارد (SE) است.

جدول ۴- مقایسه غلظت نسبی (OD₄₀₅) جدایه های Zin1 و Zin2

ویروس موزائیک خیار در بوته های کدو مایه زنی شده با

Aphis gossypii در طرح کاملاً تصادفی.

Table 4. Comparison of relative concentration (OD₄₀₅) of CMV-Zin1 and Zin2 in squash inoculated plants by *Aphis gossypii*: in a completely randomized design.

| Treatment | OD ₄₀₅ ± SE* | |
|-----------|-------------------------|-------------|
| | CMV-Zin1 | CMV-Zin2 |
| T1 | 0.66±0.1a | - |
| T2 | - | 0.23±0.03a |
| T3 | 0.40±0.1ab | 0.28±0.08a |
| T4 | 0.17±0.01b | 0.24±0.09a |
| T5 | 0.19±0.01b | 0.17±0.01a |
| T6 | 0.12±0.01b | 0.12±0.005a |

تیمارهای T1 و T2 مایه زنی انفرادی با شته تغذیه شده از منابع تک آلوده به Zin1 و Zin2 (به ترتیب)، تیمار T3، T4 و T5 مایه زنی دوگانه با شته تغذیه شده از منابع دوگانه آلوده تیمارهای T3، T4 و T5 (به ترتیب) و T6 مایه زنی با شته تغذیه شده از تیمار T6 (شاهد).

T1 and T2, single inoculated with aphids fed on single infected source plant with Zin1 and Zin2, respectively; T3, T4 and T5, inoculated with aphids fed on double infected source plants of T3, T4 and T5 treatments, respectively; T6, inoculated with aphid fed on healthy plant of T6 treatment.

* میانگین OD₄₀₅ ± خطای استاندارد (SE)

حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار بین تیمارها در سطح ۱ درصد می باشد.

جدول ۵- مقایسه آماری میانگین ارتفاع و وزن تر بوته های

Nicotiana rustica در تیمارهای مختلف مایه زنی با جدایه های Zin1 و

Zin2 ویروس موزائیک خیار.

Table 5. Statistical comparison of *Nicotiana rustica* plants height and fresh weight in different inoculation treatments of *Nicotiana rustica* with CMV-Zin1 and Zin2.

| Treatment | height (cm)** | Fresh weight (gr)* |
|-----------|---------------|--------------------|
| T1 | 32.26±1.9bc | 19.3±2.4ab |
| T2 | 33.00±1.8bc | 21.01±2.3a |
| T3 | 34.76±1.4b | 19.84±1.6ab |
| T4 | 28.20±1.7c | 13.7±1.7b |
| T5 | 34.06±2.08b | 19.78±2.1ab |
| T6 | 40.66±0.72a | 22.4±1.5a |

T1 و T2 مایه زنی انفرادی به ترتیب با جدایه Zin1 و Zin2، تیمار T3 مایه زنی دوگانه همزمان، T4 و T5 تیمارهای مایه زنی دوگانه ترتیبی (به ترتیب، اول با Zin1 و بعد با Zin2 (Zin1/Zin2) و برعکس (Zin2/Zin1) با فاصله زمانی ۲۴ ساعت، T6 مایه زنی با بافر (شاهد).

T1 and T2, singly inoculation with Zin1 and Zin2, respectively; T3, simultaneous double inoculation; T4 and T5, sequential double inoculation with Zin1/Zin2 and Zin2/Zin1, with an interval of 24 h; T6, mock inoculation.

** حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح ۱ درصد می باشد.

* حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در

سطح ۵ درصد می باشد.

اعداد میانگین ارتفاع/ وزن تر بوته ها ± خطای استاندارد (SE) می باشد.

بررسی تأثیر آلودگی انفرادی و دوگانه روی کارایی انتقال

هر جدایه توسط شته *A. gossypii*: نتایج بررسی کارایی انتقال

ویروس از منبع تک و دوگانه آلوده به جدایه های Zin1 و Zin2

توسط شته جالیز نشان داد که نرخ انتقال هر جدایه از منبع

تک آلوده (تیمارهای T1 و T2) مساوی (۰/۴۰٪) و بیشتر از

نرخ انتقال از منبع دوگانه آلوده (تیمارهای T3، T4 و T5)

بوده است. پس از تغذیه شته‌ها از منبع دوگانه آلوده، بیشترین

و کمترین نرخ انتقال هر دو جدایه Zin1 و Zin2 از منبع

دوگانه آلوده T3 (به ترتیب ۱۳/۳ و ۳۳/۳ درصد)، T4 (به ترتیب

۰ و ۱۳ درصد) و T5 (به ترتیب ۶/۶ و ۱۳/۳ درصد) به دست

آمد. اختلاف معنی داری بین نرخ انتقال هر جدایه در

تیمارهای پنج گانه T1- T5 و نیز بین نرخ انتقال دو جدایه

Zin1 و Zin2 مشاهده نشد. پس از انتقال جدایه ها با شته،

غلظت نسبی جدایه Zin2 بین بوته های آلوده تیمارهای پنج

گانه T1- T5 تفاوت معنی داری نشان نداد، در حالی که

غلظت نسبی جدایه Zin1 در بوته های آلوده تیمار T1 با

اختلاف معنی داری (p < ۰/۰۱) بیشتر از T4 و T5 بود (جدول

۴). کارایی انتقال هر دو جدایه توسط تک شته (P*) از منبع

تک آلوده (۰/۱) بیشتر از دوگانه آلوده (۰/۰۸ - ۰) بود. در

مجموع نیز کارایی انتقال Zin2 توسط تک شته (۰/۲۴) بیش از

Zin1 (۰/۱۴) تعیین شد.

تأثیر آلودگی انفرادی و دوگانه به CMV روی غلظت

کلروفیل، ارتفاع و وزن تر گیاهان توتون: تجزیه واریانس

غلظت کلروفیل a، b و کلروفیل کل در ۴۲ و ۷۰ dpi، نشان

داد که تفاوت معنی داری بین بوته های تک آلوده، دوگانه

آلوده و تیمار شاهد وجود ندارد. تجزیه واریانس شاخص

های رشدی ارتفاع و وزن تر بوته های تک و دوگانه مایه زنی

شده و سالم (تیمارهای T1 تا T6) در بازه زمانی ۸۰ dpi نشان

داد که بین تیمارهای مختلف، ارتفاع (p < ۰/۰۱) و وزن تر

(p = ۰/۰۴۵) بوته ها تفاوت معنی داری نشان می دهند

(جدول ۵). ارتفاع و وزن تر بوته‌ها در تیمارهای T1 و T2

دارد. بین تیمارهای دوگانه مایه زنی شده از نظر فراوانی ردیابی (نرخ آلودگی) در هیچ بازه زمانی اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در این مطالعه، مایه زنی دوگانه منجر به تعداد بسیار معدودی از بوته های دوگانه آلوده شد که بیشترین ردیابی آلودگی دوگانه نیز در dpi ۱۸ رخ داد. با توجه به کاهش معنی دار نرخ آلودگی و غلظت نسبی هر جدایه در مایه زنی های دوگانه نسبت به انفرادی (حداقل در یکی از بازه های زمانی بعد از مایه زنی) می توان گفت که در تیمارهای مایه زنی دوگانه، برهمکنش جدایه های متعلق به دو زیرگروه CMV مورد مطالعه در این تحقیق از نوع بازدارندگی بوده است.

در بوته های دوگانه آلوده هر تیمار مایه زنی مخلوط، نسبت D/S هر جدایه محاسبه شد که عددی کوچک تر از ۱ بود، بنابراین می توان اذعان کرد که در آلودگی های دوگانه *N. rustica* با این دو جدایه، برهمکنش از نوع دگرپادی بوده و جدایه ها در همانندسازی و تکثیر و شاید حرکت سیستمیک یکدیگر تأثیر منفی داشته اند. برهمکنش بازدارندگی یا مزاحمت دو سویه ویروس موزاییک خیار از دو زیرگروه I و II در میزبان *N. tabacum* قبلاً نیز گزارش شده بود (Tian et al. 2009). نتایج آزمون وسترن بلات در dpi ۱۸ نیز این نتایج را تأیید کرد، به طوری که غلظت نسبی هر جدایه در تیمارهای مایه زنی انفرادی بیشتر از دوگانه بود.

مقایسه شاخص شدت بیماری بین تیمارها در هشت بازه زمانی مختلف (۱۴ تا ۶۳ dpi) نشان داد که فقط در dpi ۲۸، DSI تیمار دوگانه مایه زنی ترتیبی T4 (Zin1/Zin2) با اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) بیشتر از تیمار تک مایه زنی با Zin2 (T2) می باشد. مقایسه آماری داده های تکراری (DSI (repeated measure) در بازه های زمانی مختلف برای تیمارهای مختلف با نرم افزار SAS نشان داد که در مجموع هشت بازه زمانی، تیمار تأثیر معنی داری روی DSI نداشته اما تغییرات DSI در این هشت بازه زمانی تغییرات افزایش معنی داری ($P < 0.0001$) داشته است. در این تحقیق نیز پس از محاسبه AUDPC برای تیمارها

(مایه زنی انفرادی با هر جدایه) تفاوتی با هم نداشتند ولی ارتفاع بوته های تیمار T4 نسبت به دو تیمار T3 و T5 وزن تر بوته های T4 نسبت به T2 کاهش معنی داری نشان داد. بر اساس آن نتایج، آلودگی به ویروس (به استثنای تیمار T2) باعث کاهش معنی دار ارتفاع و وزن تر بوته ها نسبت به تیمار شاهد (سالم) شده بود.

بحث

نتایج آزمون TAS-ELISA در بازه های زمانی مختلف بعد از مایه زنی نشان داد که اولین زمان ردیابی هر دو جدایه dpi ۵ می باشد. پس از مایه زنی های انفرادی و دوگانه با دو جدایه متعلق به دو زیر گروه CMV، نرخ آلودگی به هر جدایه و غلظت نسبی آن جدایه از dpi ۵ تا dpi ۱۸ روند افزایشی و از dpi ۱۸ به بعد روند کاهشی پیدا کرد، به طوری که در dpi ۱۸ بیشینه درصد آلودگی و غلظت نسبی جدایه ها در تیمارهای تک مایه زنی حاصل شد. البته برخلاف Zin1، نرخ آلودگی و غلظت جدایه Zin2 در تیمارهای دوگانه مایه زنی (خصوصاً حالت ترتیبی) از dpi ۲۵ به dpi ۲۸ دوباره حالت افزایشی به خود گرفت. بر اساس نتایج این تحقیق، مقایسه بین تیمارهای تک و دوگانه مایه زنی شده در dpi ۱۸ نشان داد که بالاترین نرخ آلودگی به هر جدایه و غلظت آن در تیمارهای تک مایه زنی مشاهده می شود. البته نرخ آلودگی به Zin1 در dpi ۲۵ و Zin2 در dpi ۱۸ در تیمارهای تک مایه زنی شده با اختلاف معنی داری (به ترتیب $p = 0.007$ و $p = 0.03$) نسبت به نرخ آلودگی حداقل دو تیمار دوگانه مایه زنی شده بیشتر بود. به عبارت دیگر مایه زنی دوگانه نرخ آلودگی جدایه ها را کاهش می دهد. در تیمارهای مایه زنی مخلوط نیز تیمارهای دوگانه مایه زنی ترتیبی که جدایه مورد نظر اول مایه زنی شده بود بیشترین نرخ آلودگی به آن جدایه و بالاترین غلظت آن جدایه (حداقل در یکی از بازه های زمانی) را نشان داد. این نتایج نشان دهنده تأثیر ترتیب مایه زنی جدایه ها در مایه زنی دوگانه روی نرخ آلودگی و غلظت هر جدایه در این میزبان

و مقایسه آن، علیرغم اینکه تیمار T1 و تیمار T2 به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار شاخص را داشتند (با مقادیر AUDPC به ترتیب $1555/8 \pm 19$ و $1039/5 \pm 174$)، اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. همچنین AUDPC بین دو جدایه Zin1 و Zin2 نیز اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند با اینکه مقدار آن برای Zin1 ($1051/8$) بیشتر از Zin2 ($962/3$) بود. نتایج مربوط به نرخ آلودگی، DSI و AUDPC دو جدایه نشان می‌دهد که Zin2 نسبت به Zin1 جدایه‌ای خفیف می‌باشد. براساس نتایج مطالعات قبلی، علائم زیرگروه I در طبیعت غالب بوده و علائم شدیدتری نیز در مقایسه با زیرگروه II در گیاهان ایجاد می‌کنند (Galitelli 2000; Tian et al. 2009). در تحقیق حاضر و به دنبال مایه زنی انفرادی و دوگانه توتون با جدایه‌هایی از دو زیرگروه CMV، از نظر نرخ آلودگی پس از مایه زنی مکانیکی (انفرادی و دوگانه) و غلظت نسبی، جدایه Zin1 نسبت به Zin2 غالب بود اما از نظر شاخص شدت بیماری DSI و AUDPC اختلاف معنی‌داری بین این دو جدایه مشاهده نگردید که این نتایج با نتایج تحقیقات قبلی تا حدی متفاوت می‌باشد که احتمالاً به خصوصیات ژنتیکی جدایه‌ها و نیز میزبان ارتباط داشته باشد، به طوری که قبلاً نیز اشاره شده که رقابت پذیری جدایه‌های زیرگروه‌ها متفاوت می‌باشد (Tian et al. 2009).

تحلیل آماری نرخ انتقال جدایه‌ها توسط شته از منابع تک و دوگانه آلوده نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از بابت نرخ انتقال جدایه‌ها وجود ندارد. با اینکه نرخ انتقال Zin2 از منابع دوگانه آلوده (با میانگین $20 \pm 8/16$ درصد در مجموع T'3، T'4، T'5) بیشتر از نرخ انتقال Zin1 از همان منابع دوگانه آلوده (با میانگین $6/67 \pm 3/3$) بوده است اما اختلاف معنی‌داری بین این دو وجود ندارد. تعدادی از تحقیقات انجام شده روی انتقال پذیری مکانیکی و شته‌ای

برخی جدایه‌های CMV نشان داده است که برخی از جدایه‌های زیرگروه II در رقابت با زیرگروه I از کارایی بالاتر انتقال مکانیکی و شته‌ای برخوردارند (Tian et al. 2009). نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تأثیر آلودگی انفرادی و دوگانه *N. rustica* به دو جدایه مورد مطالعه CMV روی محتوای کلروفیل گیاه نداشته است. این در حالی است که آلودگی گیاه گوجه فرنگی با جدایه Fny (از زیرگروه CMV-I) باعث کاهش معنی‌دار محتوای کل کلروفیل نسبت به تیمار شاهد سالم شده بود (Vitti et al. 2016). براساس نتایج تحقیق حاضر، ارتفاع و وزن تر بوته‌های توتون در تیمارهای T1 بیشتر از T2 (بدون اختلاف معنی‌دار) بوده که بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین جدایه‌های جدایه‌های متعلق به دو زیرگروه مورد مطالعه در این تحقیق بوده است. مایه زنی دوگانه در مقایسه با مایه زنی انفرادی تأثیر معنی‌داری روی ارتفاع بوته‌ها نداشته اما در مورد وزن تر بوته‌ها، حداقل در یک تیمار (T4) باعث کاهش معنی‌دار نسبت به T2 شده است. این نتیجه با تغییرات DSI در 28 dpi نیز همخوانی دارد. بین تیمارهای مایه زنی دوگانه نیز مایه زنی ترتیبی Zin1/Zin2 نسبت به Zin2/Zin1 اثر منفی بیشتری روی این دو شاخص رشدی داشته است. در تحقیقات پیشین نیز کاهش معنی‌دار ارتفاع، وزن تر و خشک گوجه فرنگی (Mahjabeen et al. 2011) و ارقام مختلف لوبیا چیتی (Azizi & Shamsbakhsh 2014) پس از مایه زنی با CMV گزارش شده است.

سپاسگزاری

بخشی از این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران به شماره ۷۳۱۴۸۹۲۴/۶/۰۸ اجرا شده که بدینوسیله قدردانی می‌شود.

References

- ARNON, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- AZIZI, A. and M. SHAMS-BAKHSI, 2014. Impact of cucumber mosaic virus infection on the varietal traits of common bean cultivars in Iran. *Virus Disease*, 25(4): 447-454. <http://doi.org/10.1007/s13337-014-0233-9>
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- DAVINO, M., BELLARDI, M. G., DI BELLA, M., DAVINO, S. and A. BERTACCINI, 2005. Characterization of a *Cucumber mosaic virus* isolate infecting *Mandevilla sanderi* (Hemsl.) Woodson. *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 220-225.
- DODDS, J.A. 1982. Cross-protection and interference between electrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. *Virology* 118, 235- 240.
- GALITELLI, D. 2000. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research*, 71: 9-21.
- GARCIA-ARENAL, F. and P. PALUKAITIS, 2008. *Cucumber mosaic virus*. In: MAHY, B. W. J. and VAN REGENMORTEL, M. H. V. (eds). *Encyclopedia of Virology*. 3th ed., Academic Press of Elsevier, New York. 3057 pp.
- Hammod, J., Lecoq. H. and B. Racciah, 1999. Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Advances in Virus Research* 54: 189-314.
- JACQUEMOND, M. 2012. *Cucumber mosaic virus*. *Advances in Virus Research*, 8: 439-504.
- KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B. and E. J. LEFKOWITZ, 2012. *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. San Diego. USA.
- KOUNDAL, V., MOHD, Q., HAQ, R. and S. PRAVEEN, 2011. Characterization, genetic diversity and evolutionary link of *Cucumber mosaic virus* strain New Dehli from India. *Biochemical Genetics*, 49:25-38
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- NOORDAM, D. 1973. *Identification of Plant Viruses. Methods and Experiments*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc), Wageningen. p. 207.
- MAHJABEEN, M., AKHTAR, K. P., SARWAR, N., SALEEM, M. Y., ASGHAR, M., IQBAL, Q. and F. JAMIL, 2011. Effect of *Cucumber mosaic virus* infection on morphology, yield and phenolic contents of tomato, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(7): 1-17. DOI:10.1080/03235408.2011.595965
- POWER, A. G. 1996. Competition between viruses in a complex plant pathogen system. *Ecology*, 77: 1004 - 1010.
- QIU, Y., ZHANG, Y., WANG, C., LEI, R., WU, Y., LI, X. and S. ZHU, 2018. *Cucumber mosaic virus* coat protein induces the development of chlorotic symptoms through interacting with the chloroplast ferredoxin I protein. *Scientific Reports*, 8: 1205.
- SHAHMOHAMMADI, N., DIZADJI, A., KOOHI HABIBI, M. and M. NATEQI, 2015. First report of *Cucumber mosaic virus* infecting *Bougainvillea spectabilis*, *Coleus blumei*, *Kalanchoe blossfeldiana* ,and *Zinnia elegans* in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 97(2):391-403.
- SHANER, G. and R. E. FINNEY, 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67: 1051-6
- SHI B. J., PALUKAITIS, P. and R. H. SYMONS, 2002. Differential virulence by strains of *Cucumber mosaic virus* is mediated by the 2b gene. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 15: 947-965.
- TAKESHITA, M., SHIGEMUNE, N., KIKUHARA, K., FURUYA, N., and Y. TAKANAMI, 2004. Spatial analysis for exclusive interactions between subgroup I

- and II of *Cucumber mosaic virus* in cowpea. *Virology*, 328: 45-51
- TAO, Y., LIU, Q., WANG H., ZHANG, Y., HUANG, X., WANG, B., LAI, J., YE, J., LIU, B. and M. XU, 2013. Identification and fine-mapping of a QTL, qMrdd1, that confers recessive resistance to maize rough dwarf disease. *Plant Biology*, 13: 145-158.
- THOMAS, J. E., MASSALSKI, P. R. AND B. D. HARRISON, 1986. Production of monoclonal antibodies to *African cassava mosaic virus* and differences in their reactivities with other whitefly transmitted geminiviruses. *Journal of General Virology*, 67: 2739-2748.
- TIAN, Z., QIU, J., YU, J., HAN, C. and W. LIU, 2009. Competition between *Cucumber mosaic virus* subgroup I and II isolates in Tobacco. *Phytopathology*, 157: 457-464.
- TOMARU, K., HIDAKA, Z., and A. UDAGAWA, 1967. Strains of cucumber mosaic virus isolated from tobacco plants: V. Studies on interference among *Cucumber mosaic virus* strains. *Bulletin of Hatano Tobacco Experimental Station*, 58, 79- 88.
- TOWBIN, H., STAEHELIN, T. and J. GORDON, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76:4350-4354
- VITTI, A., PELLEGRINI, E., NALI, C., LOVELLI, S., SOFO, A., VALERIOM., ANTONIO, S. and M. NUZZACI, 2016. *Trichoderma harzianum* T-22 Induces Systemic Resistance in Tomato Infected by *Cucumber mosaic virus*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1520. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.01520>
- WEN, F., LISTER, R.M., and F. A. FATTOUH, 1991. Cross-protection among strains of *Barley yellow dwarf virus*. *Journal of General Virology*, 72:791-799.
- XU P., LI M. and Q. LIN, 1999. Comparative studies on properties of five *Cucumber mosaic virus* isolates infecting passiflora in China. *Virologica Sinica*, 14:73-79.