ارزیابی واکنش ارقام هندوانه در برابر ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه با استفاده از مایه‌کوبی با سازه عفونت‌زای ویروس*

مریم اسماعیلی[1]** و جهانگیر حیدرنژاد[2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵)

چکیده

ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه (Watermelon chlorotic stunt virus, WmCSV) یکی از ویروس‌های بیماری‌زای مهم در هندوانه در مناطق جنوب و جنوب شرقی ایران است. این ویروس در سال‌های اخیر باعث خسارت‌های سنگینی به محصول هندوانه در مناطق فوق الذکر شده است. در این تحقیق، واکنش ۱۱ رقم تجارتی هندوانه در برابر WmCSV با استفاده از روش مایه‌کوبی با سازه‌ی عفونت‌زای ویروس ارزیابی گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ارقام PS (کریمسون سوییت)، Proseed، WLNOOL-201046 و Charlee (چارلستون گری) در برابر WmCSV کمتر حساس بوده و به ترتیب با ۲٤/٤، ۵۲/۱۷، ٦۷/۷٤ و ۷٤/۰۷ درصد آلودگی، بهترین واکنش را در برابر آلودگی به این ویروس نشان دادند. در صورتیکه سایر ارقام بعد از مایه‌کوبی با سازه عفونت‌زای ویروس ۱۰۰٪ آلوده شدند. علاوه بر این، چهار رقم فوق الذکر از نظر شدت آلودگی با هم متفاوت بودند بطوریکه هندوانه کریمسون سوییت رقم PS علائم خفیف‌تری نسبت به سه رقم دیگر نشان داد. با تولید سازه همسانه‌ی عفونت‌زا WmCSV منبع نامحدودی از این ویروس برای ایجاد آلودگی و ارزیابی واکنش ارقام هندوانه و دیگر گیاهان میزبان ویروس فراهم شده است.

کلیدواژه: همسانه عفونت‌زا، مقاومت، ارقام هندوانه، ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه

---

* قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر کرمان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: esmaeily_maryam@yahoo.com

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

Evaluation of reaction of watermelon cultivars to watermelon chlorotic stunt virus by agroinoculation with an infectious clone of the virus*

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

(Received: 1.10.2015; Accepted: 14.2.2016)

Abstract

Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV) is a bipartite begomovirus and one of the destructive watermelon viruses in the south and south-eastern Iran. WmCSV is responsible for huge losses of watermelon production in these regions. In this study, 11 commercial watermelon cultivars from the most current available cultivars were selected and used to evaluate their reaction against WmCSV by agroinoculation method with an infectious clone of the virus. Results showed that cultivar PS of Crimson Sweet watermelon, and Proseed, WLNOOL-201046 and Charlee cultivars of Charleston Gray watermelon are relatively less susceptible to WmCSV with infection rate of 24.4, 52.17, 67.74 and 74.07%, respectively, whereas watermelon plants of the rest of the cultivars were completely susceptible. In addition, four relatively resistant cultivars were differently reacted to WmCSV infection and among them, Proseed cultivar showed the mildest symptoms. The infectious construct is a rapid tool to evaluate the reaction of cultivars and can facilitate the identification of the resistant genetic sources against viral diseases.

Keywords: Infectious clone, Resistance, watermelon cultivars, *Watermelon chlorotic stunt virus*

---

* A part of MSc. thesis of the first author submitted to College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

** Corresponding author's E-mail: esmaeily_maryam@yahoo.com

1. Former MSc student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2. Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

مقدمه

هندوانه با تولید سالانه حدود ۳۰ تن در واحد سطح در جهان پس از گوجه‌فرنگی و کلم‌پیچ در بین سایر سبزی‌ها مقام سوم را دارا است. ایران از نظر سطح زیر کشت این محصول در جهان، مقام دوم و از نظر تولید مقام سوم را به خود اختصاص داده است (Peyvast 2005). بیماری‌های ویروسی کدوئیان در سراسر دنیا سبب خسارت‌های اقتصادی مهم کیفی و کمی به محصولات کدوئیان می‌شوند و از مهمترین عوامل محدود کننده‌ی کشت این محصولات برای کشاورزان به شمار می‌آیند (Nameth *et al.* 1986). تاکنون بیش از ۳۵ ویروس در دنیا از کدوئیان گزارش شده است (Provvidenti 1996). که یکی از مهمترین آنها ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه است (Bananej *et al.* 1998).

ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه از جنس *Begomovirus* و خانواده *Geminiviridae* دارای ژنوم دوبخشی با عناوین DNA A و DNA B می‌باشد. این ویروس یکی از ویروس‌های مهم هندوانه بوده و همانند سایر بگوموویروس‌ها توسط سفیدبالک *Bemisia tabaci* به روش پایا و گردشی منتقل می‌شود (Brown *et al.* 2012, Fauquet *et al.* 2008, Jones 2003, Kheyr-Pour *et al.* 2000). این ویروس در سال‌های اخیر با ایجاد خسارت‌های بسیار سنگین در بسیاری از کشورهای مدیترانه‌ای شرقی گسترده شده است (Al-Musa *et al.* 2011) و در کشورهائی مثل سودان، یمن و ایران یک تهدید جدی در گیاهانی مثل خربزه و هندوانه می‌باشد (Yousif *et al.* 2007). علائم بیماری روی هندوانه‌های آلوده شامل سبزردی (کلروز) و پیچیدگی برگ می‌باشد. در شرایط آلودگی شدید، گیاهان بیمار کوتوله شده و عملکرد آن‌ها به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (Al-Musa *et al.* 2011). این ویروس برای اولین بار در جمهوری یمن (Jones *et al.* 1987)، سپس از ایران (Bananej *et al.* 1998)، سودان، اسرائیل (Abudy *et al.* 2009)، اردن (Al-Musa *et al.* 2011) و لبنان (Abou-Jawdah *et al.* 2010) گزارش گردید. این ویروس دارای دامنه میزبانی نسبتا" وسیعی است اما هندوانه، خیار، کدو و خربزه بعنوان میزبانان اصلی ویروس محسوب می‌شوند (Abudy *et al.* 2010, Bananej *et al.* 2002).

ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه برای اولین بار از ایران در سال ۱۹۹۸ توسط بنانج و همکاران گزارش شد و تاکنون وجود آن در مناطق جنوبی ایران از جمله استان‌های بوشهر، سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان و همچنین استان شمالی گلستان اثبات شده است (Bananej *et al.* 1998, Bananej *et al.* 2002, Bananej & Vahdat 2008, Kheyr- Pour *et al.* 2000). علیرغم خسارت‌های گسترده این ویروس در مزارع هندوانه بویژه در مناطق جنوب و جنوب شرقی ایران، هنوز هیچ مطالعه ای روی میزان مقاومت یا حساسیت ارقام هندوانه در برابر این ویروس انجام نشده است و تنها مطالعاتی روی ویژگی‌های ژنوم، بیماری‌زائی، دامنه میزبانی و مناطق انتشار WmCSV صورت گرفته است (Bananej *et al.* 1998, Bananej *et al.* 2002, Kheyr- Pour *et al.* 2000, Esmaeili & Heydarnejad 2014). هدف از تحقیق حاضر، بررسی و مقایسه عکس العمل ارقام رایج هندوانه در برابر مایه‌کوبی با سازه عفونت‌زای ویروس به منظور یافتن منبع ژنتیکی مناسب و در نتیجه کاهش خسارت است.

جدول ۱. راندمان آلوده سازی همسانه‌ی عفونت‌زای ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه در ارقام هندوانه (*Citrullus lanatus* Thunb.).

Table 1. Infection rate (%) of Watermelon chlorotic stunt virus infectious clone in watermelon cultivars (*Citrullus lanatus* Thunb.).

نوع هندوانه	رقم هندوانه	تعداد گیاهان مایه‌کوبی شده	تعداد گیاهان آلوده شده	درصد آلودگی
Watermelon type	Watermelon cultivar	No. of inoculated plants	No. of infected plants	Infection rate (%)
Crimson Sweet	ZODIAK	23	23	100
Crimson Sweet	Varda	20	20	100
Crimson Sweet	Bonanza	21	21	100
Crimson Sweet	Nickerson	19	19	100
Crimson Sweet	EDENA	16	16	100
Crimson Sweet	PS	45	11	24.44
Charleston Gray	Niagara	19	19	100
Charleston Gray	WLNOOL-201046	31	21	67.74
Charleston Gray	World Queen	21	21	100
Charleston Gray	Proseed	23	12	52.17
Charleston Gray	Charlee	27	20	74.07

روش بررسی

کاشت گیاهان

از آنجایی‌که استان‌های هرمزگان و کرمان مراکز اصلی کشت هندوانه در ایران هستند و شهرستان میناب در استان هرمزگان و شهرستان‌های فاریاب، رودبار جنوب و اُرزوئیه در استان کرمان از کانون‌های اصلی آلودگی مزارع هندوانه به WmCSV می‌باشند سعی گردید ارقامی از هندوانه که در این مناطق بیشترین سطح زیر کشت را دارند، انتخاب شوند. از این رو از بین ارقام بسیار متنوع هندوانه، یازده رقم که در این مناطق شناخته شده‌تر بوده و بیشتر کشت می‌شوند، انتخاب گردید. مشخصات کامل این ارقام در جدول ۱ ذکر گردیده است. بذر این ارقام در گلدان‌های حاوی خاک برگ کودی و ماسه بادی (به نسبت ۱:۱) در عمق ۱/۵–۱ سانتی‌متری از سطح خاک کشت و در گلخانه تحت شرایط دمایی کنترل شده ۲۸–۲۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

آماده‌سازی سازه‌های عفونت‌زا

ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه جدایه‌ی خنج (با رس شمار KT272769 و KT272770 به ترتیب برای قطعات ژنومی DNA A و DNA B) بعنوان منبع اولیه برای ساخت سازه‌ی عفونت‌زا (infectious clone) برای هر دو بخش ژنومی ویروس انتخاب گردید. سازه‌ی عفونت‌زا برای هر دو قطعه ژنوم، بصورت دوتائی (دوپار یا dimer) طراحی (Sabouri & Heydarnejad 2013) و داخل پلاسمید pGreen 0029 (Helens *et al.* 2000) قرار داده شد. سپس این دو سازه بطور جداگانه و به همراه پلاسمید pSoup به روش انجماد/ذوب (Freeze/Thaw) به سلول‌های مستعد (competent cells) آگروباکتریوم سویه C58 منتقل گردیدند (Boulton 2008).

مایه‌کوبی گیاهان با سازه‌های عفونت‌زا

از سلول‌های آگروباکتریوم حاوی هر یک از پلاسمیدهای نوترکیب pGreen 0029 برای قطعات ژنومی A یا B، یک پرگنه که در آزمون PCR مثبت ارزیابی شده بودند، انتخاب شدند و به منظور تلقیح سلول‌های آگروباکتریوم به ارقام مختلف هندوانه استفاده گردیدند. مایه‌کوبی در مرحله‌ی سه برگی و در سه قسمت مختلف

گیاه (نزدیک طوقه، ساقه و محل انشعاب برگ‌ها) بر اساس روش ارائه شده توسط گریمسلی و همکاران (Grimsley *et al.* 1986) انجام شد. تعداد گیاهان مایه‌کوبی‌شده در جدول ۱ آورده شده است. بوته‌های فوق به مدت ۲۸-۵ روز بعد از زمان تزریق به منظور ایجاد علائم، مورد بررسی قرار گرفتند. در طی این مدت تعداد بوته‌های آلوده شده، شدت و زمان بروز علائم ثبت گردید. علاوه بر این، تعدادی از بوته‌های هندوانه بعنوان شاهد منفی، با استفاده از سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pGreen 0029 ولی فاقد قطعات ژنومی ویروس، مایه‌کوبی شدند.

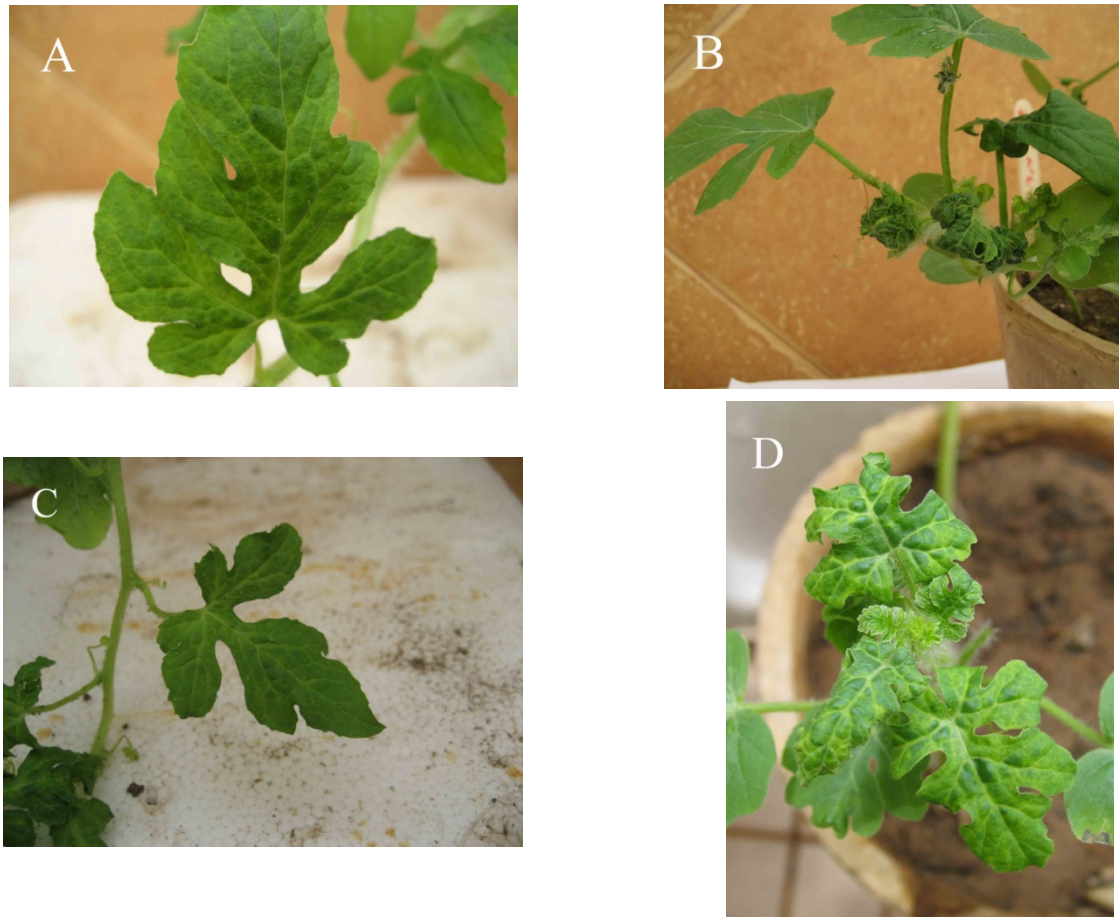
آزمون PCR

بعد از مشاهده‌ی علائم بیماری بر روی گیاهان تزریق شده در گلخانه، جهت اطمینان از آلودگی بوته‌های هندوانه به WmCSV و صحت علائم ایجاد شده، قسمتی از بافت برگ‌های حاوی علائم برداشت شده و استخراج دی اِن اِ با روش CTAB (Zhang *et al.* 1998) انجام شد. سپس آزمون زنجیره ای پلی مراز (PCR) با جفت آغازگر اختصاصی به نام‌های (ATC GAT TGT CCC AAC WmCSV-1440A-F (AAG GAC و (TTG CAA TCC WmCSV- 2016A- R (GGG CCC ATC TTC که قادر به تکثیر یک قطعه‌ی ۶۰۰ جفت بازی از قطعه ژنومی A می‌باشند، از نمونه‌ها انجام شد. مواد و برنامه مورد استفاده در آزمون PCR براساس روش صبوری و حیدرنژاد (۱۳۹۲) انتخاب گردید.

نتایج و بحث

هفت تا ده روز بعد از تزریق سازه عفونت‌زا، علائم WmCSV شامل سبزردی (کلروز) و پیچیدگی برگ، بتدریج در ارقام مختلف هندوانه ظاهر گشت. نوع علائم ایجاد شده بر روی هندوانه دقیقا" مشابه با نوع علائم ایجاد شده‌ی ویروس بر روی هندوانه در طبیعت بود که قاعدتا" باید با سفیدبالک منتقل شده باشد. در پایان هفته‌ی چهارم علائم در ارقام حساس هندوانه پیشرفت زیادی داشت؛ بعنوان مثال در ارقام EDENA و WLNOOL-201046 علائم شامل زرد شدن بوته‌ها، پیچیدگی برگ‌ها، کوتولگی، کم رشدی و جمع شدن بوته‌ها بود (شکل‌های ۱B و ۱D). در مقایسه، ارقام Proseed و PS با تاخیر نسبت به ارقام قبلی، علائم پیسه‌ای شکل خفیفی از خود نشان دادند (شکل‌های ۱Aو ۱C). گیاهان شاهد شامل گیاهان سالم (تزریق نشده) و گیاهان تزریق شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pGreen 0029 (بدون در بر داشتن قطعات ژنومی ویروس) همگی بدون علائم بودند. آلودگی یا عدم آلودگی گیاهان فوق با استفاده از آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی تائید گردید.

بررسی نتایج نشان داد که به استثنای چهار رقم شامل رقم PS هندوانه‌ی کریمسون سوییت (هندوانه خطی)، ارقام Charlee، Proseed و WLNOOL-201046 هندوانه-ی چارلستون گری، بقیه ارقام صد در صد به WmCSV آلوده بودند. بعلاوه، در بین ۱۱ رقم نیز شدت علائم با هم متفاوت بود؛ به طوری که ارقام PS، Varda و ZODIAK هندوانه‌ی کریمسون سوییت و ارقام Charlee و Proseed هندوانه‌ی چارلستون گری دارای علائم خفیف‌تری بودند و در بین آن‌ها ابتدا رقم PS هندوانه‌ی کریمسون سوییت و بعد به ترتیب ارقام Proseed و Charlee هندوانه‌ی چارلستون گری عکس العمل خفیف تری از خود نشان دادند. ارقام ZODIAK و Varda هندوانه‌ی کریمسون سوییت از نظر شدت علائم بعد از سه رقم مذکور قرار گرفتند. بعد از این ارقام می‌توان به ارقام حساس تر Bonanza، Niagara و World Queen اشاره نمود و در

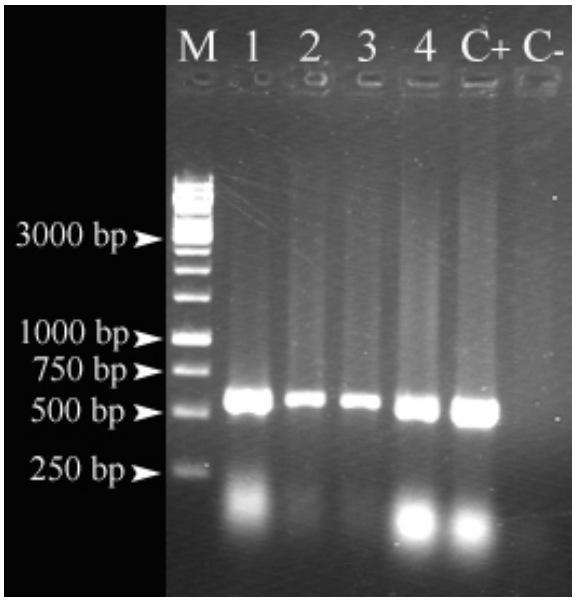


شکل ۱. علائم ناشی از مایه کوبی سازه عفونت زای ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه در ارقام مختلف هندوانه. A و B) پیسه ای شدن خفیف در رقم Proseed هندوانه چارلستون گری و رقم PS هندوانه کریمسون سوییت به ترتیب ۱۴ و ۲۱ روز بعد از مایه کوبی، C) پیچیدگی شدید برگ‌ها و توقف رشد در رقم EDENA هندوانه کریمسون سوییت ۱۴روز بعد از مایه کوبی، D) لکه های سبزرد و کوتولگی در رقم WLNOOL-201046هندوانه چارلستون گری ۳۱ روز بعد از مایه کوبی.

Fig 1. Symptoms of different watermelon cultivars inoculated with the infectious clone of Watermelon chlorotic stunt virus. A and B) mild mosaic in Proseed cultivar of Charleston Gray watermelon and PS cultivar of Crimson Sweet watermelon 14 and 21 days post inoculation (dpi), respectively; C) severe leaf curling and stopped growing in EDENA cultivar of Crimson Sweet watermelon 14 dpi; D) chlorotic spots and dwarfing in WLNOOL-201046 cultivar of Charleston Gray watermelon 31 dpi.

درجات پایین‌تر از لحاظ میزان تحمل و مقاومت، ارقام Nickerson و EDENA بودند. از طرف دیگر، شدت آلودگی در ارقام EDENA و Nickerson بسیار بالا بود؛ به طوری‌که در پایان هفته‌ی چهارم، علاوه بر سبزردی و پیچیدگی برگ‌ها، بوته‌ها به شدت کوتوله شده و رشد آن‌ها متوقف گردید. آلودگی یا عدم آلودگی بوته‌ها به WmCSV، از طریق آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی به اثبات رسید (شکل ۲).

با توجه به گسترش بالای WmCSV در مناطق جنوبی و جنوب شرقی ایران، می‌توان گفت که تقریبا" تمامی ارقام موجود در بازار به این ویروس حساس هستند. در این مطالعه نیز رقم مناسبی که مقاومت بالایی به WmCSV داشته باشد، تشخیص داده نشد. در تحقیق حاضر، تنها تعداد معدودی از ارقام هندوانه که طی سه یا چهار سال



شکل ۲. قطعه تکثیر شده ۶۰۰ جفت بازی در آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی WmCSV-1440A-F / WmCSV-2016A-R در ژل آگاروز ۱٪ به منظور اثبات آلودگی گیاهان به WmCSV بعد از مایه کوبی با سازه عفونت‌زای ویروس. M) نشانگر اندازه DNA (Gene Ruler™1Kb DNA Ladder, Fermentas, Lithuania)؛ ستون های 1-4، ارقام هندوانه Nickersoin، Niagara، EDENA و Proseed مایه کوبی شده؛ +C) شاهد مثبت؛ -C) شاهد منفی.

Fig 2.The 600 bp fragments amplified in PCR using specific primer pair WmCSV-1440A-F /WmCSV-2016A-R in 1% agarose gel confirming infection of plants to WmCSV which inoculated with WmCSV infectious clone. M) Gene Ruler™1Kb DNA Ladder (Fermentas, Lithuania); lanes 1-4, inoculated watermelon cultivars Nickersoin, Niagara, EDENA and Proseed; C+, positive control; C-, negative control.

اخیر بیشتر توسط کشاورزان کشت می‌شوند، مورد بررسی قرار گرفتند؛ با وجود این، نیاز به مطالعات گسترده‌تر و در سطح وسیع‌تری می‌باشد. هرچند در مناطق آلوده، کشاورزان به تجربه متوجه شده‌اند که با کاهش دوره‌ی آبیاری می‌توانند تا حدودی از شدت بیماری بکاهند. هرچند این موضوع جنبه‌ی علمی نداشته اما تجربه‌ی کشاورزان در این زمینه می‌تواند ارتباط بین عواملی نظیر ویروس، ناقل، میزان آب آبیاریو خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه را دقیقتر مشخص نماید.

استفاده از سازه‌های عفونت‌زا برای ارزیابی مقاومت ارقام در برابر آلودگی‌های ویروسی، قبلا نیز مورد استفاده قرار گرفته است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ در سودان جهت تشخیص منابع مقاومت به WmCSV در خربزه با مایه‌کوبی سازه عفونت‌زا، لاین‌هایی مقاوم به این ویروس شامل رقم سودانی HSD 2445-005، رقم آفریقای جنوبی PI 282448 و سه رقم هندی شامل 90625، PI 124112 و PI 414723 معرفی شدند. در این مطالعه (Yousif *et al.* 2007)، به منظور تائید مقاومت ارقام فوق در برابر WmCSV، این ارقام به یک پایه آلوده و بسیار حساس (رقم Ve´drantais) پیوند زده شدند. با وجود این ، علیرغم آلودگی شدید پایه، ویروس در هیچکدام از پیوندک‌ها ردیابی نشد (Yousif *et al.* 2007). همین روش برای ارزیابی مقاومت ارقام خیار گلخانه‌ای در برابر ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (*Tomato leaf curl Palampur virus*, ToLCPMV) نیز مورد استفاده قرار گرفته و چند رقم با مقاومت نسبی معرفی شده است (Sabouri & Heydarnejad 2013).

روش تزریق با استفاده از سازه عفونت‌زا (agroinoculation) یکی از روش‌های سریع برای بررسی و مقایسه اولیه واکنش ارقام در برابر جمینی‌ویروس‌هاست. تلفیق این روش با روش‌هائی مثل تیمار گیاهان با غلظت-های مختلف تنظیم کننده‌های رشد (اطلاعات منتشر نشده)، ممکن است بتواند ارزیابی دقیق‌تری از پتانسیل مقاومت این ارقام در برابر بیمارگرهای ویروسی در اختیار محققین قرار دهد. با توجه به پتانسیل خسارت بالای این دو ویروس در ایران، ارزیابی ژرم‌پلاسم انواع کدوئیان برای شناسائی منابع مقاومت در برابر این دو ویروس در سطح گسترده تری ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

Abou-Jawdah Y., Sobh H., Haidar A. and 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-Gelbart D., Livneh O., Zaccai M. and Lapidot M. 2010. Watermelon chlorotic stunt and Squash leaf curl begomoviruses- new threats to cucurbit crops in the Middle East. Israel Journal of Plant Sciences 58: 33-42.

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

Bananej K., Kheyr-Pour A. and Ahoonmanesh A. 1998. Identification of *watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) in Iran. In: Proceeding of the 13th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran. p; 194.

Bananej K., Ahoonmanesh A. and 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. Journal of Phytopathology 150: 423-430.

Bananej K. and Vahdat A. 2008. Identification, distribution and incidence of viruses in field-grown cucurbit crops of Iran. Phytopathologia Mediterranea 47: 247-257.

Boulton M. I. 2008. Construction of infectious clones for DNA viruses: Masterviruses, pp. 503-523. In: G. D. Foster, I. E. Johansen, Y. Hong and P. D. Nagy (Eds.). Methods in Molecular Biology 451, Plant Virology Protocols: From Viral Sequence to Protein Function. Humana Press, Totowa, NJ.

Brown J. K., Fauquet C. M., Briddon R.W., Zerbini M., Moriones E. and Navas-Castillo J. 2012. Geminivirideae, pp. 351-373. In: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz (Eds.). Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London.

Esmaeili M. and Heydarnejad J. 2014. Identification of wild hosts of watermelon chlorotic stunt virus in south and southeastern Iran. Journal of Agricultural Biotechnology 6: 1-17.

Fauquet C. M., Briddon R.W., Brown J. K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M. and Zhou X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Archives of Virology 153: 783-821.

Grimsley N., Hohn B., Hohn T. and Walden R. 1986. "Agroinfection"; an alternative route for viral infection of plants by using the Ti-plasmid. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 83: 3282–3286.

Helens R. P., Edwards E. A., Leyland N. R., Bean S. and Mullineaux P. M. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. Plant Molecular Biology 42: 819–832.

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

Jones P., Satar M. H. and Alkaff N. 1987.Viruses of Tropical Crops. Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Herts, UK. p; 76.

Jones D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. European Journal of Plant Pathology 109: 195-219.

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

Moffat A. S. 1999. Geminiviruses emerge as serious crop threat. Science 286: 1835.

Nameth S. T., Dodds J. A., Paulus A. O. and Laemmlen F. F. 1986. Cucurbit viruses of California: an ever-changing problem. Plant Diseases 70: 8–11.

Peyvast G. A. 2005. Vegetable Production. Daneshpazir Publication, Rasht (Gilan), 487pp.Provvidenti R. 1996. Diseases caused by viruses, pp. 37-45. In: T. A. Zitter, D. L. Hopkins and C. E. Thomas (Eds.). Compendium of Cucurbit Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.

Sabouri M. and Heydarnejad J. 2013. Evaluation of the reaction of greenhouse cucumber cultivars inoculated by the infectious clone of Tomato leaf curl Palampur virus. Journal of Agricultural Biotechnology 5: 83-95.

Sabouri M. and Heydarnejad J. 2013. Construction and demonstration of infectivity of the infectious clone of the bipartite genome of tomato leaf curl Palampur virus-Iranian isolate. Iranian Plant Pathology Journal 49: 403–409.

Yousif M.T., Kheyr-pour A., Gronenborn B., Pitrat M. and Dogimont C. 2007. Sources of resistance to

Watermelon chlorotic stunt virus in melon. Plant Breeding 126: 422-427.
Zhang Y. P., Uyemoto J. K. and Kirkpatrick B. C. 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.