جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Vol. 25, No. 4, Winter 2012, P. 407-416 دانشگاه فردوسی مشهد جلد ۲۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، ص. ۴۱۶-۴۰۷

تعیین ترادف نوکلئوتیدی و بررسی علائم دو جدایه جدید ویروس موزائیک هندوانه از استان‌های خراسان رضوی و شمالی

زهره مرادی[1*] - بهروز جعفرپور[2] - محمد علی سبک خیز[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۳

چکیده

طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۹، تعداد ۳۲۳ نمونه با علایمی از قبیل موزائیک، بدشکلی، تاولی برگ ، رگبرگ نواری و زردی از مزارع مختلف کدوئیان و گلخانه‌های خیار استان‌های خراسان رضوی و شمالی جمع آوری شد. با استفاده از آزمون DAS-ELISA آلودگی ۹۵ نمونه به ویروس موزاییک هندوانه (WMV) تایید شد. واکنش RT-PCR با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی از ناحیه ژن پروتئین پوششی منجر به تکثیر قطعه‌ای در حدود ۸۲۲ جفت باز در نمونه‌های الایزا مثبت شد. محصول PCR مربوط به دو جدایه از کدو (شیروان) و خربزه (طرقبه-شاندیز) تعیین توالی شدند. ترادف‌های بدست آمده پس از هم‌ردیف‌سازی چندگانه با برنامه ClustalW2 با برخی از توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردیدند. جهت تعیین جایگاه تکاملی و رسم دندروگرام تبارزائی این جدایه‌ها از روش Neighbor-joining نرم افزار Mega 4.0 استفاده گردید. آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های تعیین ترادف شده نشان داد که این دو جدایه با سایر جدایه‌های ویروس موزائیک هندوانه بین ۹۲ و ۹۹ درصد در سطح نوکلئوتیدی و بین ۹۶ و۱۰۰ درصد در سطح اسید آمینه‌ای مشابهت دارند. تشابه توالی نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه این دو جدایه با یکدیگر به ترتیب ۹۹/۱ و ۹۹/۶ درصد تعیین گردید. علائم دو جدایه روی برخی از گیاهان محک از جمله *Cucumis sativus*، *C. melo* var. reticulatus، *Cucurbita pepo* و *Citrullus lanatus* کمی متفاوت بود. طبق نتایج این بررسی جدایه‌های تعیین ترادف شده دارای شباهت بالایی با سایر جدایه‌های گزارش شده WMV در نقاط مختلف ایران می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک هندوانه، DAS-ELISA، RT-PCR، توالی یابی، آنالیز فیلوژنتیک

مقدمه

ویروس موزائیک هندوانه متعلق به جنس پوتی ویروس از خانواده *Potyviridae* است و دارای ژنومی یک بخشی از نوع RNA تک لای مثبت به طول ۱۰۰۳۵ نوکلئوتید است که توسط یک پروتئین پوششی (cp)[4] که وزن مولکولی آن ۳۴ کیلودالتون است در برگرفته شده است. این ژنوم حاوی یک چهار چوب باز خواندنی (ORF)[5] واحد است که کد کننده یک پلی پروتئین با ۳۲۱۷ اسید آمینه می‌باشد. این پلی پروتین به کمک آنزیمهای پروتئاز که توسط ویروس کد می‌شود، در محل‌های خاص شکسته شده و هر یک از پروتئین‌های کوچک نقش خاصی را ایفا می‌کنند (۲). پیکره ویروس رشته ای شکل و انعطاف پذیر و فاقد غشا و دارای طول ۷۶۰ و عرض ۱۶ نانومتر است (۱۲). تاکنون بیش از ۳۱ ویروس آلوده کننده کدوئیان شناسایی شده اند که ۹ تای آن‌ها جزء خانواده پوتی ویریده و جنس پوتی ویروس می‌باشند (۱۳، ۲۲). ویروس‌های خانواده پوتی ویریده و جنس پوتی ویروس بزرگترین گروه ویروس‌های گیاهی هستند و دارای بیشترین اهمیت اقتصادی می‌باشند (۶).WMV نخستین بار در سال ۱۹۶۵ توسط *وب* و *اسکات* از روی هندوانه (*Citrullus lanatus*) گزارش شد (۱۲). در سطح مولکولی، WMV رابطه فیلوژنتیکی نزدیکی با ویروس موزاییک سویا (SMV) دارد و به عقیده برخی از محققین WMV یکی از نژادهای SMV[6] می‌باشد، در حالیکه این ویروس‌ها از نظر سرولوژیکی و بیولوژیکی تفاوت زیادی با هم دارند (۴، ۲۱). WMV دارای پراکنش

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: zohrehmoradi2008@yahoo.com)

4- Coat protein
5- open reading frame
6- *Soybean mosaic virus*

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

وسیعی در سراسر جهان است و بیشتر در مناطق با آب و هوای معتدل و مدیترانه ای گسترش دارد و از جمله عمده ترین پوتی ویروس‌های خسارت زا در مزارع جالیزی می‌باشد (۳). WMV دامنه میزبانی وسیعتری در مقایسه با سایر پوتی ویروس‌ها دارد و بیش از ۱۷۰ گونه گیاهی متعلق به ۲۷ خانواده گیاهی را آلوده می‌کند (۱۸). به‌طور طبیعی این ویروس به تعداد زیادی علفهای هرز که می‌توانند به عنوان میزبانی برای ویروس در بین محصولات باشند حمله می‌برد (۱۰) و علاوه بر کدوئیان به گیاهانی مثل انواع نخود (۸، ۱۴)، شبدر (۱۷)، ارکیده‌ها مثل وانیل (۷، ۲۰) و *Habenaria radiata* (۵)، پنیرک و اسفناجیان (۱۲) نیز حمله می‌کند. مهم‌ترین روش انتقال آن در طبیعت توسط شته‌ها به صورت ناپایا است و به راحتی از طریق مکانیکی نیز منتقل می‌شود. شدت و درصد بیماری‌های ناشی از ویروس‌ها ممکن است متغیر باشد و بستگی به روابط و هبستگی بین پاتوژن‌ها و میزبانان، ناقلین و شرایط محیطی و موقعیت جغرافیایی مکانی که در آن جا بیماری اتفاق می‌افتد، دارد (۲۲). در ایران برای اولین بار دسبیز و همکارانش در سال ۲۰۰۷ تنوع مولکولی ۸ جدایه WMV از ایران را بر اساس یک قطعه ۲۱۸ نوکلئوتیدی از ناحیه ′۵ ژن cp بررسی و در سال ۲۰۰۸ ترادف کامل جدایه IR02-54 را تعیین کردند. به دنبال آن شریفی و همکاران (۱۶)، ۱۸ جدایه از مناطق مرکزی و جنوبی ایران را بر اساس ژن cp آنالیز کردند (۱۶). پس از آن شعیبی و همکاران (۱۹)، ۴ جدایه از استان گلستان و یک جدایه از مشهد و یک جدایه از شیراز را بر اساس ژن cp با سایر جدایه‌های دنیا مقایسه کردند.

استان خراسان از جمله مناطق مهم کشت انواع مختلف گیاهان جالیزی در ایران است و در سال‌های اخیر WMV به دلیل گستردگی وسیع روی کیفیت و کمیت محصولات تأثیر مهمی گذاشته و عملاً بازار پسندی آن‌ها را کاهش داده است به همین دلیل و نیز برای تعیین تنوع مولکولی و بیولوژیکی جدایه‌های WMV نمونه برداری از مزارع و گلخانه‌های خیار مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی و شمالی صورت گرفت. سپس با توجه به نوع گیاه میزبان و منطقه نمونه برداری محصول PCR مربوط به ژن پروتئین پوششی یک جدایه از خراسان شمالی (منطقه شیروان) و یک جدایه از خراسان رضوی (منطقه طرقبه-شاندیز) از دو جهت تعیین ترادف شدند و ترادف‌های به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت و با سایر ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و شناسایی ویروس

به منظور شناسایی این ویروس در پائیز و تابستان سال ۱۳۸۸ از برگ‌های ارقام مختلف خیار ، خربزه ، هندوانه، خیار چنبر، طالبی و انواع کدو (*Cucurbita spp.*) مشکوک به آلودگی از مزارع مختلف و گلخانه‌های خیار مناطق سرخس، تربت جام، تربت حیدریه، نیشابور، مشهد و اطراف آن، چناران، فریمان، کاشمر، خواف، فاروج، شیروان، بجنورد و سبزوار نمونه‌برداری انجام شد. برگ‌های جمع‌آوری شده از هر بوته در پاکت جداگانه قرار داده شد و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شد. برای شناسایی ویروس عامل آلودگی به نمونه‌های بیمار از روش ساندویچ دو طرفه الایزا[1] (DAS-ELISA) و آنتی سرم چند همسانه ای اختصاصی WMV (DSMZ، آلمان) استفاده گردید. آزمون الایزا طبق روش *کلارک و آدامز* (۱۹۷۷) انجام شد (۱). نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الایزا خوان در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) و با در نظر گرفتن فرمول $\bar{x}$ 3DS + آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین شد. در این فرمول $\bar{x}$ میانگین جذب و DS انحراف معیار استاندارد مقادیر جذب چاهکهای سالم است.

خالص‌سازی بیولوژیکی، تکثیر و دامنه میزبانی ویروس

برای جداسازی بیولوژیکی ویروس از گیاه سلمه تره (*Chenopodium amaranticolor* coste&Reyn) استفاده شد. به‌منظور تکثیر و نگهداری جدایه‌ها، پس از ظهور لکه‌های موضعی، لکه‌های مذکور جدا و در یک قطره بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار با pH= ۷ له و روی بوته‌های سالم کدو (*Cucurbita pepo cv.* zucchini) در مرحله دو برگی مایه‌زنی گردید. برای مطالعه دامنه میزبانی و بررسی علائم جدایه‌ها عصاره برگ‌های آلوده به نسبت ۱:۱۰ (V/W) در بافر فسفات فوق الذکر تهیه و با کمک پودر کربوراندوم به برگ‌های گیاهان محک شامل خربزه (*Cucumis melo* var.cantaloupensis)، دو گونه سلمه تره (*C.quinoa* willd, *C. amaranticolor*.)، نخود فرنگی (*pisum sativum* L)، داتوره (*Datura stramonium*) طالبی (*C. melo* var. reticulatus)، خیار (*Cucumis sativus* L.CV. Dominus)، کدو مسمایی (*Cucurbita pepo* cv. zucchini)، توتون (*N. tobacum* L.cv. Samsun و *N.clevelendii* Gray)، هندوانه (*Citrullus lanatus* Cv. Crimson sweet) و لوبیا چیتی (*phaseulus vulgaris* cv. khorram) مایه زنی گردید. این گیاهان در گلخانه عاری از حشرات در دمای ۲۰-۲۵°C نگه‌داری شدند و نهایتاً علایم هر یک از این گیاهان پس از ۱۴ تا ۲۸ روز بعد از مایه زنی مکانیکی با آزمون الایزا مورد بررسی قرار گرفتند.

1- Double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

واکنش نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلیمراز[1]

نمونه‌هایی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند با توجه به گیاه میزبان و منطقه نمونه برداری، برای استخراج آر.ان ای مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج آر.ان ای از بافت گیاهی با استفاده از محلول RNX™(Plus) سیناژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کلیه مراحل استخراج آر.ان. ای در شرایط سترون انجام شدند و تمامی محلول‌های مورد استفاده با آب سترون تیمار شده با آب دیپسی (DEPC) تهیه شدند. جهت انجام واکنش‌های RT-PCR از یک جفت آغازگر اختصاصی WMV شامل آغازگر معکوس (5′-ATT CAC GTC CCT TGC AGT GTG-3′) و مستقیم (5′-GAA TCA GTG TCT CTG CAA TCA GG-3′) (۱۵) به ترتیب واقع در ناحیه ۹۷۲۷- ۹۷۴۷ و ۸۹۲۶- ۸۹۴۸ ژنوم کامل به شماره EU660584 استفاده شد.

سنتز cDNA با استفاده از کیت‌های Accupower RT Premix (Bioneer Inc. Korea) صورت گرفت. ابتدا مخلوط ۳ میکرولیتر از RNA استخراج شده و ۱ میکرولیتر از پرایمر برگشت (۱۵pmol) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ °C در دستگاه ترموسایکلر با دمای درپوش ۱۰۴ °C گرما داده شد تا آر.ان.ای واسرشته گردد و بلافاصله به مدت ۵ دقیقه داخل یخ قرار داده شد. مخلوط حاصل با افزودن ۱۶ میکرولیتر از آب مقطر تزریقاتی به میکروتیوب‌های مخصوص کیت cDNA منتقل شد تا حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر برسد. پس از یک ورتکس کوتاه میکروتیوب‌ها در داخل دستگاه ترموسایکلر با دمای ۴۲ °C به مدت یک ساعت به‌منظور سنتز cDNA قرار گرفت و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ °C جهت غیر فعال ساختن آنزیمها قرار داده شد. بعد از ساخت cDNA برای تکثیر آن از کیت Accupower PCR Premix (Bioneer) استفاده گردید. مقدار ۴ میکرولیتر از cDNA ساخته شده همراه با یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰pmol) و ۱۵ میکرولیتر آب در واکنش ۲۵ میکرولیتری زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت. چرخه دمایی PCR عبارت از یک برنامه یک چرخه‌ای شامل دمای ۹۴ °C به مدت ۳ دقیقه و یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای شامل دمای ۹۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه ، ۶۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه بود. پس از آخرین چرخه مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C نگهداری شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۷ درصد در بافر TBE (۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم اسید بوریک و ۰/۷۳ گرم EDTA در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر، pH= ۸/۳) مورد بررسی قرار گرفت. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید با دستگاه UV Transilluminator باندهای اسید نوکلئیک مشاهده و به وسیله دستگاه Gel documentation از ژل عکسبرداری شد.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی

از بین تعداد زیادی جدایه که از میزبانان و مکان‌های مختلف جمع آوری شدند و پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۷ درصد در ناحیه مورد انتظار باند داده بودند، محصول PCR مربوط به دو جدایه از کدو (منطقه شیروان) و خربزه (منطقه طرقبه-شاندیز) به همراه جفت آغازگر اختصاصی تکثیر کننده ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک هندوانه به شرکت MWG کشور آلمان ارسال و از دو جهت تعیین ترادف شدند. ترادف‌های به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST با ترادف‌های موجود در GenBank مقایسه شدند.

آنالیز ترادف نوکلئوتیدی و رسم درخت فیلوژنتیکی

مقایسه هم‌ردیف سازی چندگانه[2] ترادف نوکلئوتیدی بین جدایه‌های WMV از ایران و برخی از جدایه‌های سایر نقاط دنیا که در بانک ژن ثبت شده بودند، با استفاده از برنامه ClustalW2 و نیز نرم‌افزار DNAMAN (Version 4.02) انجام شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی از جمله درصد تشابه نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای بین برخی از جدایه‌های مورد استفاده با استفاده از نرم افزار DNAMAN انجام شد. درخت فیلوژنتیکی این جدایه‌ها بر حسب تطابق ترادف نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای با استفاده از روش Neighbor-joining نرم افزار Mega 4.0 و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (bootstrap)، رسم گردید.

نتایج

آزمون سرولوژیکی و علائم ویروس

از ۳۲۳ نمونه جمع آوری شده ، ۹۵ نمونه آلوده به WMV بودند. آلودگی در تمام انواع کدوئیان دیده شد. عمده ترین علائمی که مشاهده گردید موزاییک شدید و خفیف، بد شکلی برگ، تاولی، بند کفشی شدن برگ‌ها بود. البته وجود لکه‌های سبز روشن در زمینه برگ و کلروز حاشیه آن نیز مشاهده شد. در گیاه جوان طالبی و هندوانه میوه‌های تولید شده کوچک مانده و لکه‌هایی در روی آن‌ها مشاهده می‌شود. در کدو برگ‌ها زرد رنگ، بد شکل و تاولی شده بودند. مهم‌ترین نشانه روی میوه‌های کدو برآمدگی‌هایی بود که بیش

1- Polymerase chain reaction

2- Multiple alignment

از حد طبیعی رشد کرده و سبب بد شکلی میوه می‌شدند. عمده‌ترین علائم مشاهده شده در خیارهای گلخانه‌ای موزاییک همراه با تاولی شدن برگ به صورت خفیف تا شدید بود، گاهی اوقات میوه‌ها کوتاه و کمانی که برآمدگی‌هائی روی آن‌ها مشاهده می‌شد، نیز آلودگی به این ویروس را نشان دادند.

بررسی علائم دو جدایه روی گیاهان محک

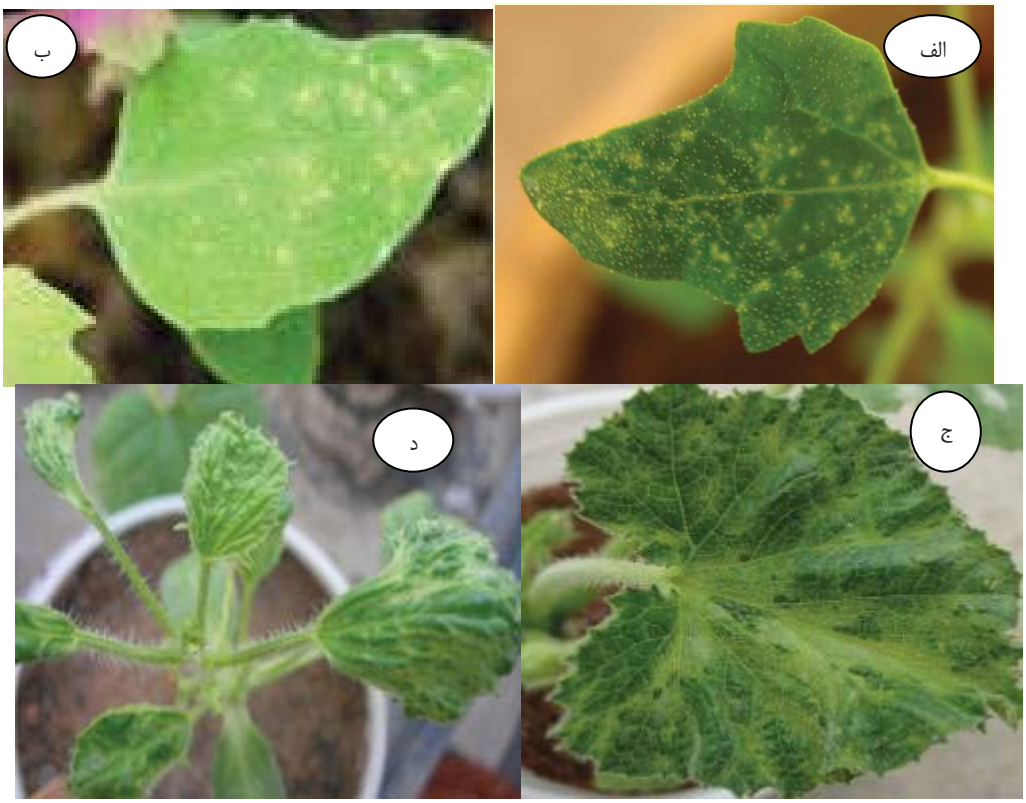
جدایه‌ها بر اساس ظهور علائم در گیاهان محک مختلف مقایسه شدند. هر دو جدایه روی برگ‌های تلقیح شده دو گونه سلمه تره (*C. amaranticolor* و *C. quinoa*) لکه‌های موضعی کلروزه ایجاد کردند. این جدایه‌ها بر روی خربزه و کدو مسمایی سبب ایجاد موزاییک سیستمیک، تاولی و بدشکلی برگ شدند. جدایه FUM4 بر روی هندوانه سبب ایجاد تاولی برگ و موزاییک سیستمیک شده و روی طالبی موزاییک خفیف و زردی سیستمیک ایجاد نمود (شکل ۱) در حالیکه FUM3 سبب ایجاد روشنی رگبرگ سیستمیک در هندوانه و طالبی شد و بر روی کدو مسمایی علاوه بر علائم ذکر شده سبب رگبرگ نواری برگ نیز گردید. جدایه FUM4 روی خیار موزاییک سیستمیک نشان داد ولی علائم جدایه FUM3 به‌صورت نهفته بود. جدایه‌ها روی گونه‌های توتون، نخود فرنگی، لوبیا چیتی و داتوره علائمی نشان ندادند.

واکنش نسخه‌برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR)

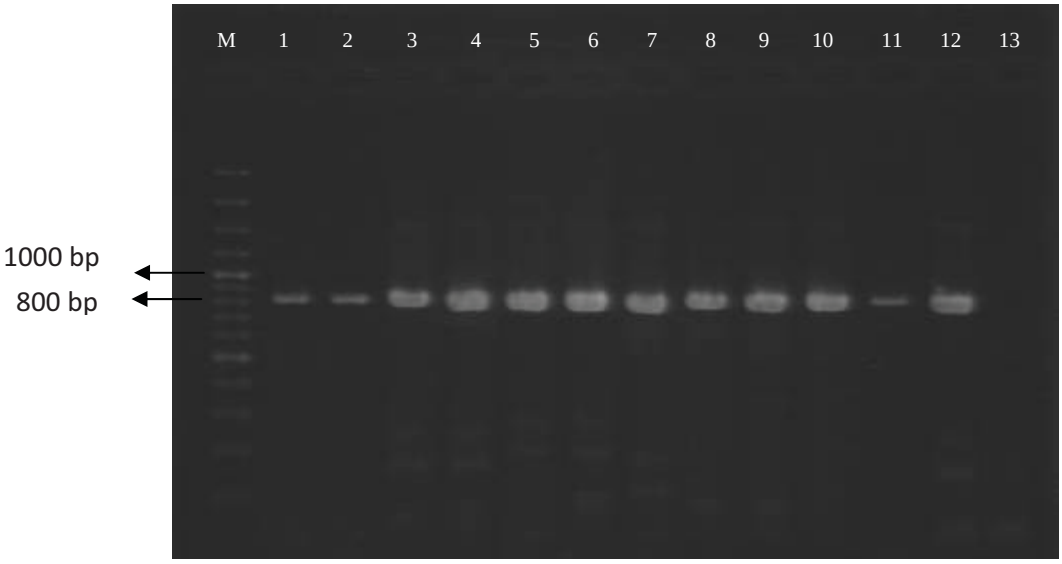
واکنش RT-PCR که با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی از ژن cp انجام گردید، منجر به تکثیر قطعه ای به طول حدود ۸۲۲ جفت نوکلئوتید شد (شکل۲). محصول PCR مربوط به دو جدایه از کدو (منطقه شیروان) و خربزه (منطقه طرقبه-شاندیز) تعیین توالی شدند. با مقایسه ترادف‌های حاصل با اطلاعات موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه BLAST شباهت آن‌ها با جدایه‌های مختلف ویروس موزاییک هندوانه مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز ترادف‌های نوکلئوتیدی

اندازه قطعه تکثیر شده مربوط به دو جدایه از کدو (منطقه شیروان) ۷۶۶ نوکلئوتید و خربزه (منطقه طرقبه-شاندیز) ۸۲۲ نوکلئوتید تعیین شد.



شکل ۱ - علائم WMV روی تعدادی از گیاهان محک کاشته شده در گلخانه. الف- لکه موضعی کلروزه در سلمه تره (*C.quinoa*) و ب- (*C.amaranticolor*) ج- موزاییک سیستمیک و تاولی برگ در کدو مسمایی د- موزاییک، تاولی و بد شکلی برگ در خربزه



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی قطعه تکثیر شده در RT-PCR در ژل آگاروز ۱/۷ ٪ مربوط به ۱۲ جدایه ی انتخابی WMV از نقاط مختلف استان-های خراسان رضوی و شمالی (۱ تا ۱۲). ٤ و ٥- FUM3, FUM4 ۱۳: کنترل منفی با آب مقطر. M- مارکر دی.ان.ای

این قطعات به ترتیب در بانک ژن[1] با رس شمارهای[2] GU374126 و GU388311 تحت نامهای FUM3 و FUM4 ثبت شدند. ترادف ابتدا و انتهای FUM3 (قطعه شیروان) به دلیل اینکه درست خوانده نشده بود حذف شده لذا ترادف حاصل کمی کوچک‌تر از محصول PCR بود.

برای مقایسه جدایه‌ها، ۴۶ جدایه (جدول ۱) موجود در GenBank بررسی شدند. ترادف‌های موجود از ناحیه ژنوم متناظر با ناحیه تعیین ترادف شده حدود ۷۲۰ نوکلئوتید با موقعیت ۸۹۷۵ تا ۹۶۹۴ ترادف کامل جدایه ایرانی IR02-54 (EU660584) انتخاب و همردیف سازی شدند. تعداد هجده جدایه از ایران مربوط به استانهای اصفهان، یزد و کرمان و یک نمونه از ارومیه که توسط شریفی و همکاران (۱۶) گزارش شده بود و همچنین ۶ جدایه دیگر مربوط به گلستان، شیراز، مشهد که توسط شعیبی و همکاران (۱۹) گزارش شده بود نیز از بانک ژن انتخاب گردیدند. پس از ادغام و تصحیح ترادف‌های حاصل، مقایسه هم‌ردیف سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های مذکور با دیگر جدایه‌های WMV از ایران و سایر نقاط دنیا نشان داد که همواره شباهت بین جدایه‌ها بیش از ۹۰درصد می‌باشد (جدول ۲). دندروگرام حاصل از مطالعات تبارزائی (شکل ۳) نشان می‌دهد که جدایه‌های مورد بررسی WMV در ۶ گروه جدا از هم قرار می‌گیرند. شباهت این دو جدایه با سایر جدایه-های ویروس موزائیک هندوانه بین ۹۲ تا ۹۶ درصد (در سطح نوکلئوتیدی) و ۹۶ تا ۱۰۰ درصد (در سطح اسید آمینه‌ای) است. درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی این دو جدایه (FUM4, FUM3) با یکدیگر ۹۹/۱ ٪ و درصد تشابه توالی اسیدهای آمینه این دو جدایه با یکدیگر ۹۹/۶ ٪ می‌باشد.

در سطح نوکلئوتیدی جدایه FUM3 کمترین شباهت (۹۲ درصد) را با جدایه WMV-Tonga (نام منطقه ای در جنوب شرقی آسیا) و بیشترین شباهت (۹۸/۶ درصد) را با جدایه ESF.ES.1 دارد و جدایه FUM4 کمترین شباهت (۹۲/۶ درصد) را با WMV-Tonga و بیشترین شباهت (۹۹/۱ درصد) را با جدایه Mashhad دارد (جدول ۲). در سطح اسیدآمینه‌ای جدایه FUM3 کمترین شباهت (۹۶/۲ درصد) را با جدایه USA (آمریکا) و بیشترین شباهت (۱۰۰ درصد) را با جدایه کرمان (KER.KE.1) و همچنین جدایه FUM4 کمترین شباهت (۹۶/۲ درصد) را با جدایه USA (آمریکا) و بیشترین شباهت را با جدایه‌های Mashhad و کرمان (KER.KE.1) (۹۹/۶ درصد) دارد (جدول ۲). با توجه به دندروگرام رسم شده در بیشتر موارد بین دندروگرام تبارزائی و موقعیت جغرافیایی جدایه‌ها همخوانی وجود دارد. طبق نتایج این بررسی جدایه‌های تعیین ترادف شده از استان‌های خراسان رضوی و شمالی دارای شباهت بالایی با سایر جدایه‌های گزارش شده از این ویروس در نقاط مختلف ایران می‌باشند.

در دندروگرام رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های FUM3 و FUM4 همراه با جدایه Mashhad در یک گروه قرار گرفته‌اند که این نتیجه می‌تواند تاییدی بر توالی‌یابی درست جدایه‌های FUM3 و FUM4 باشد.

1- GenBank مراکز اطلاعات

2- Accession number

بحث

WMV جزء اولین پوتی ویروس‌های شناخته شده آلوده کننده کدوئیان است که سبب بیماری‌های مهم اقتصادی در محصولات خانواده کدوییان می‌شود (۱۲).

علائم بیماری ناشی از این ویروس ارتباط به میزبان، سن گیاه و زمان آلودگی دارد و در گیاهان مختلف خانواده کدوئیان متنوع است.

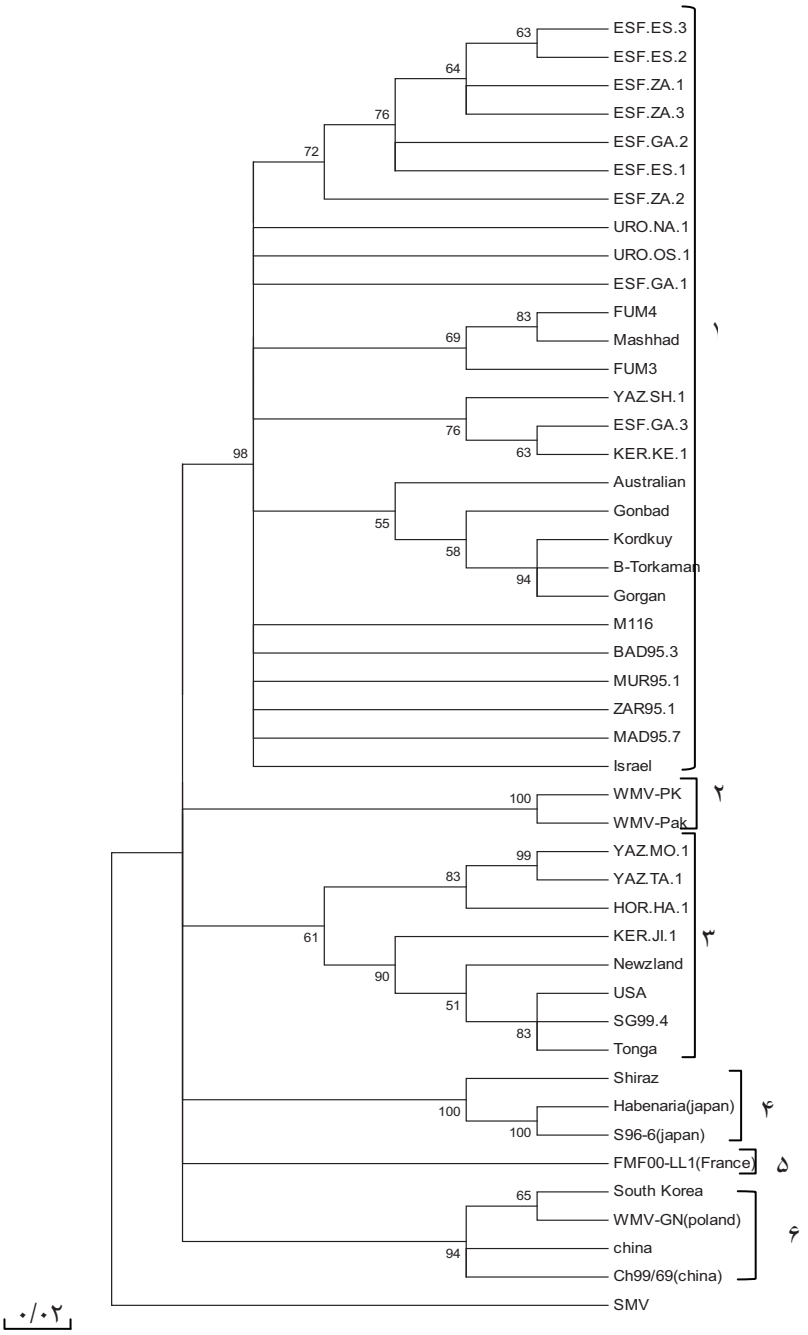
با توجه به اینکه تنوع بیولوژیکی WMV به خوبی شناخته شده است (۱۲) اما شناخت تمایز سویه‌ها و جدایه‌های آن به خصوص تجزیه و تحلیل‌های تنوع ژنتیکی و تکامل آن می‌تواند در مقیاس‌های جهانی و قاره‌ای و یا حتی منطقه‌ای راهگشای درک تکامل و توسعه بیمارگر و در نتیجه ارائه راهکار مناسب برای کنترل آن باشد (۱۱).

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های ویروس موزاییک هندوانه مورد استفاده در این مطالعه

Isolate جدایه	Accession no. رس شمار	Host میزبان	Origin منشاء	Number of nucleotides تعداد نوکلئوتید (bp)
FUM3	**GU374126**	**zucchini squash**	**shirvan**	**760**
FUM4	**GU388311**	**melon**	**Torghabe-shandiz**	**822**
WMV	D13913	melon	USA	3308
WMV (Comp)	AB369278	melon	South Korea	10037
WMV(CP-UTR)	D00535	Melon	Australia	1157
WMV-Fr	NC_006262	Watermelon	France	10035
WMV-ch99/69(Nib-CP-UTR)	EF127832	melon	China	1154
WMV-CHN(comp)	DQ399708	Watermelon	China	10037
WMV(comp)	AY995215	Watermelon	NewZealand	10037
WMV-Pak(comp)	AB218280	*C.melo* var. flexuosus	Pakistan	10039
WMV (NIb-CP)	AB353119	Pumpkin	Japan	1167
WMV-HLJ(cp)	AY464948	Snake gourd	China	852
WMV Pak(Nib-CP-UTR)	AB127934	Snake gourd	Pakistan	2045
WMV SG99.3(cp)	AJ579524	*C.melo*	Spain	873
WMVMAD95.6(CP)	AJ579509	*C.melo*	Spain	873
WMV (CP)	AJ579493	*C.melo*	Spain	873
WMV (CP)	AJ579491	*C.melo*	Spain	873
WMV (CP)	AJ579493	*C.melo*	Spain	873
WMV (CP)	AJ579486	*C.melo*	Spain	873
WMV (Nib-CP)	AF551334	*C.melo*	Spain	1602
WMVHabenaria (Nib-CP)	AB001994	*C.melo*	Japan	1180
WMV (CP)	AF322376	*C.melo*	Israel	843
WMV Tonga(Nib-CP)	L22907	*C.melo*		1656
KER.JI.1(CP)	EU667627	*Citrullus colocynthis*	kerman-Jiroft	822
KER.KE.1(cp)	EU667644	*Cucumis melo* L.	Kerman-Kerman	822
YAZ.SH.1(cp)	EU667635	*C.melo* L.	Yazd-Sadogh	822
Yaz.MO.1(cp)	EU667638	*Cucumis sativus*	Yazd-Mohsenabad	822
Yaz.MO.2(cp)	EU667630	*Cucurbita pepo*	Yazd-Mohsenabad	822
Yaz.TA.1(cp)	EU667632	*Cucurbita pepo*	Yazd-Taft	822
ESF.ES.1(cp)	EU667637	*C. moschata*	Esfahan-esfahanak	822
ESF.ES.2(cp)	EU667640	*C.melo* L.	Esfahan-esfahanak	822
ESF.ES.3(cp)	EU667633	*Cucumis sativus*	Esfahan-esfahanak	822
ESF.GA.1(cp)	EU667641	*Cucumis sativus*	Esfahan-Gaz	822
ESF.GA.2(cp)	EU667634	*Cucurbita maxima*	Esfahan-Gaz	822
ESF.GA.3(cp)	EU667643	*Cucumis sativus*	Esfahan-Gaz	822
URO.NA.1(cp)	EU667629	*C. maxima*	Uromiae-Naghadae	822
URO.OS.1(cp)	EU667631	*C.melo* L.	Uromiae-Oshnavia	822
Bandar-Torkaman 129(cp)	GQ421156	Watermelon	BandarTorkaman	958
Gonbad 68 (cp)	GQ421157	Watermelon	Gonbad- Gorgan	958
Mashhad(cp)	GQ421158	Summer squash	Mashhad	963
Gorgan 132(cp)	GQ421159	winter squash	Gorgan- Gorgan	958
Kordkuy 127(cp)	GQ421160	Summer squash	Kordkuy	958
Shiraz (cp)	GQ421161	Summer squash	Shiraz	962

جدول۲- درصد تشابه نوکلئوتیدی (سمت راست و بالا) و اسیدآمینه‌ای (سمت چپ و پایین) بین برخی از جدایه‌های مورد استفاده WMV در این مطالعه

	SMV	FUM3	FUM4	HOR.HA.1	URO.NA.1	YAZ.MO.16	ESF.ES.1	KER.KE.1	WMV-GN	Mashhad	Gorgan	Shiraz	Habenaria	WMV-Pak	Israel	FMF00-LL1	SG99.4	ZAR95.1	MAD95.7	Newzland	Australia	USA	Ch99/69	Tonga
۱	*	۷۸/۱	۷۸/۶	۷۹/۴	۷۸/۱	۷۹/۳	۷۹/۱	۷۸/۸	۷۹/۸	۷۸/۶	۷۸/۳	۷۷/۹	۷۸/۶	۷۹/۱	۷۷/۳	۷۹/۱	۷۹/۵	۷۸/۸	۷۸/۴	۷۸/۷	۷۸/۷	۷۹/۳	۷۹/۳	۷۹/۷
۲	۶۸/۲	*	۹۹/۱	۹۵/۴	۹۷/۶	۹۴/۱	۹۸/۶	۹۷/۷	۹۳/۶	۹۸/۳	۹۸	۹۳	۹۳	۹۵/۱	۹۷	۹۴/۱	۹۳/۳	۹۸/۱	۹۷/۶	۹۳/۸	۹۷/۳	۹۲/۵	۹۳/۶	۹۲
۳	۶۸/۲	۹۹/۶	*	۹۵/۶	۹۷/۹	۹۴/۴	۹۸/۸	۹۸	۹۳/۶	۹۹/۱	۹۸/۳	۹۳	۹۳	۹۵/۴	۹۷	۹۴/۴	۹۳/۸	۹۸/۴	۹۷/۹	۹۴/۱	۹۷/۹	۹۳	۹۳/۶	۹۲/۶
٤	۶۸/۲	۹۸/۷	۹۸/۳	*	۹۵/۸	۹۷/۹	۹۵/۹	۹۵/۶	۹۳/۸	۹۵/۱	۹۶/۲	۹۲/۳	۹۲/۶	۹۶/۱	۹۵/۶	۹۵/۱	۹۶/۵	۹۶/۶	۹۵/۸	۹۶/۵	۹۵/۵	۹۵/۶	۹۳/۶	۹۵/۲
۵	۶۸/۲	۹۹/۲	۹۸/۷	۹۹/۶	*	۹۴/۵	۹۸/۱	۹۷/۳	۹۴	۹۷/۳	۹۸/۱	۹۳/۱	۹۲/۶	۹۵/۵	۹۶/۹	۹۴/۳	۹۳/۷	۹۸	۹۷/۵	۹۳/۷	۹۷/۲	۹۲/۹	۹۴	۹۲/۷
٦	۶۵/۵	۹۸/۳	۹۸/۳	۹۸/۷	۹۹/۲	*	۹۴/۷	۹۴/۴	۹۳/۱	۹۳/۸	۹۵/۲	۹۱/۳	۹۱/۶	۹۵/۱	۹۴/۴	۹۴/۱	۹۵/۸	۹۵/۱	۹۴/۸	۹۵/۵	۹۴	۹۵	۹۲/۹	۹۴/۵
۷	۶۸/۷	۹۹/۶	۹۹/۲	۹۸/۳	۹۸/۷	۹۷/۹	*	۹۸/۳	۹۴/۱	۹۸	۹۸/۶	۹۳	۹۳/۳	۹۵/۶	۹۷/۳	۹۵	۹۳/۸	۹۸/۷	۹۸/۱	۹۴/۱	۹۷/۹	۹۳	۹۴/۴	۹۲/۶
۸	۶۸/۲	۱۰۰	۹۹/۶	۹۸/۷	۹۹/۲	۹۸/۳	۹۹/۶	*	۹۳/۳	۹۷/۲	۹۷/۷	۹۲/۲	۹۲/۲	۹۵/۶	۹۶/۵	۹۳/۸	۹۴	۹۷/۹	۹۷/۳	۹۴	۹۷	۹۳/۱	۹۳/۳	۹۲/۶
۹	۶۸/۲	۹۷/۹	۹۷/۵	۹۸/۳	۹۸/۷	۹۷/۹	۹۸/۳	۹۷/۹	*	۹۳/۴	۹۴/۳	۹۳/۳	۹۳/۸	۹۴/۱	۹۳/۳	۹۵/۱	۹۳/۳	۹۴/۳	۹۴	۹۳/۶	۹۳/۶	۹۲/۷	۹۸/۳	۹۲/۳
۱۰	۶۸/۲	۹۹/۲	۹۹/۶	۹۷/۹	۹۸/۳	۹۷/۹	۹۸/۷	۹۹/۲	۹۷/۱	*	۹۷/۷	۹۳/۱	۹۲/۹	۹۴/۸	۹۶/۲	۹۴	۹۳/۳	۹۷/۶	۹۷	۹۳/۶	۹۷/۳	۹۲/۷	۹۳/۴	۹۲/۳
۱۱	۶۸/۲	۹۸/۷	۹۸/۳	۹۹/۲	۹۹/۶	۹۸/۷	۹۸/۳	۹۸/۷	۹۸/۳	۹۸/۳	*	۹۳/۱	۹۳/۱	۹۵/۶	۹۷/۳	۹۵/۱	۹۴/۱	۹۸/۷	۹۸/۱	۹۴/۴	۹۸/۱	۹۳/۳	۹۴/۳	۹۲/۹
۱۲	۶۹/۲	۹۷/۹	۹۷/۵	۹۷/۵	۹۷/۹	۹۷/۱	۹۷/۵	۹۷/۹	۹۷/۵	۹۷/۱	۹۷/۵	*	۹۷/۹	۹۲/۶	۹۲/۵	۹۳/۷	۹۱/۹	۹۳/۴	۹۳/۱	۹۱/۹	۹۳	۹۱/۶	۹۲/۷	۹۰/۸
۱۳	۶۸/۲	۹۷/۱	۹۶/۷	۹۶/۷	۹۷/۱	۹۶/۲	۹۷/۵	۹۷/۱	۹۷/۵	۹۶/۲	۹۶/۷	۹۹/۲	*	۹۲/۹	۹۲/۵	۹۴/۷	۹۲/۲	۹۳/۴	۹۳/۱	۹۲/۲	۹۳/۳	۹۱/۶	۹۳	۹۱/۲
۱٤	۶۹/۲	۹۹/۲	۹۸/۷	۹۸/۷	۹۹/۲	۹۸/۳	۹۹/۲	۹۹/۲	۹۸/۳	۹۸/۳	۹۸/۷	۹۷/۹	۹۷/۵	*	۹۵/۱	۹۵/۱	۹۵/۲	۹۶/۱	۹۵/۸	۹۵	۹۵/۵	۹۴/۱	۹۳/۸	۹۳/۷
۱۵	۶۸/۷	۹۸/۳	۹۷/۸	۸۸/۸	۹۸/۳	۹۷/۴	۹۷/۸	۹۸/۳	۹۶/۹	۹۷/۴	۹۷/۸	۹۶/۹	۹۶/۱	۹۸/۳	*	۹۴/۱	۹۳/۶	۹۷/۵	۹۶/۹	۹۴/۱	۹۶/۶	۹۲/۷	۹۳/۳	۹۲/۳
۱٦	۶۷/۸	۹۷/۹	۹۷/۵	۸۸/۳	۹۷/۹	۹۷/۱	۹۸/۳	۹۷/۹	۹۷/۵	۹۷/۱	۹۷/۵	۹۶/۷	۹۶/۷	۹۸/۳	۹۷/۴	*	۹۴/۷	۹۵/۱	۹۵/۱	۹۴/۷	۹۴/۱	۹۴/۱	۹۴/۳	۹۴
۱۷	۶۷/۸	۹۷/۱	۹۷/۱	۸۸/۸	۹۷/۱	۹۶/۷	۹۷/۱	۹۷/۱	۹۷/۱	۹۶/۷	۹۶/۷	۹۶/۷	۹۶/۲	۹۷/۹	۹۶/۱	۹۶/۲	*	۹۴/۳	۹۴	۹۸/۸	۹۳/۴	۹۸/۴	۹۳	۹۷/۹
۱۸	۶۷/۳	۹۹/۲	۹۸/۷	۸۵/۷	۹۹/۲	۹۸/۳	۹۸/۷	۹۹/۲	۹۷/۹	۹۸/۳	۹۸/۷	۹۷/۹	۹۷/۱	۹۹/۲	۹۸/۳	۹۷/۹	۹۷/۱	*	۹۸/۸	۹۴/۵	۹۸/۳	۹۳/۴	۹۴/۳	۹۳
۱۹	۶۷/۳	۹۷/۹	۹۷/۵	۸۸	۷۹/۹	۹۷/۱	۹۷/۵	۹۷/۹	۹۶/۷	۹۷/۱	۹۷/۵	۹۶/۷	۹۵/۸	۹۷/۹	۹۶/۹	۹۷/۵	۹۵/۸	۹۷/۹	*	۹۴/۳	۹۷/۵	۹۳/۱	۹۴	۹۲/۷
۲۰	۶۷/۸	۹۷/۵	۹۷/۵	۸۵/۷	۹۷/۵	۹۷/۱	۹۷/۱	۹۷/۵	۹۷/۱	۹۷/۱	۹۷/۱	۹۷/۱	۹۶/۲	۹۷/۵	۹۶/۵	۹۶/۲	۹۹/۶	۹۷/۵	۹۶/۲	*	۹۳/۴	۹۷/۹	۹۳/۳	۹۷
۲۱	۶۷/۸	۹۸/۳	۷۹/۹	۸۷	۹۸/۳	۹۷/۵	۹۸/۳	۹۸/۳	۹۷/۵	۹۷/۵	۹۷/۹	۹۷/۵	۹۷/۱	۹۹/۲	۹۷/۴	۹۷/۵	۹۷/۱	۹۸/۳	۹۷/۱	۹۶/۷	*	۹۲/۳	۹۳/۶	۹۱/۹
۲۲	۶۶/۸	۹۶/۲	۹۶/۲	۸۸	۹۶/۲	۹۵/۸	۹۵/۸	۹۶/۲	۹۵/۸	۹۵/۸	۹۵/۸	۹۵/۸	۹۵/۰	۹۶/۲	۹۵/۶	۹۵/۴	۹۸/۳	۹۶/۲	۹۵/۰	۹۸/۷	۹۵/۴	*	۹۲/۵	۹۷/۲
۲۳	۶۸/۲	۹۷/۹	۹۷/۵	۸۰	۹۸/۷	۹۷/۹	۹۸/۳	۹۷/۹	۹۹/۲	۹۷/۱	۹۸/۳	۹۷/۵	۹۷/۵	۹۸/۳	۹۶/۹	۹۷/۵	۹۷/۱	۹۷/۹	۹۶/۷	۹۷/۱	۹۷/۵	۹۵/۸	*	۹۱/۸
۲٤	۶۷/۳	۹۶/۷	۹۶/۷	۸۵	۹۶/۷	۹۶/۲	۹۶/۲	۹۶/۷	۹۶/۲	۹۶/۲	۹۶/۲	۹۶/۲	۹۵/۴	۹۶/۷	۹۵/۶	۹۵/۴	۹۸/۷	۹۶/۷	۹۵/۴	۹۹/۲	۹۵/۸	۹۷/۹	۹۶/۲	*



شکل۳- دندروگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی ٤٦ جدایه WMV از همردیف سازی ۷۲۰ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی با استفاده از روش Neighbor-joining. اعداد نمایانگر درصد bootstrap هستند و مقدار bootstrap، براساس۱۰۰۰ تکرار برای محاسبه روابط فیلوژنتیکی به کار رفته است. مقادیر bootstrap بیشتر از ۵۰ درصد روی گره‌ها نشان داده شده است و ریشه‌های با ارقام کمتر از آن فشرده شده‌اند. SMV (*Soybean mosaic virus*) به عنوان عضو برون گروه در نظر گرفته شده است.

علی‌رغم نظریه برخی از محققین مبنی بر استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن CI در تعیین روابط فیلوژنتیک بین جدایه‌ها و سویه‌های پوتی‌ویروس‌ها، هنوز ناحیه CP-UTR ۵′ در آنالیز فیلوژنتیک و تعیین این روابط بیشترین کاربرد را دارد و بیشترین ترادف‌های ثبت شده در بانک ژن مربوط به این ناحیه است (۱۹) که در این بررسی نیز از ترادف‌های ژن CP برای مقایسه و آنالیز استفاده شده است. به‌طور کلی در این تحقیق به منظور طبقه‌بندی جدایه‌های WMV از دو استان و تعیین موقعیت آن‌ها در جایگاه صحیح، تمامی

خصوصیات بیولوژی، سرولوژی، مولکولی و توالی ژنی جدایه‌ها با توجه به تنوع ژنتیکی بالای ویروس WMV مدنظر قرار گرفت. در اغلب موارد علایم مشاهده شده در مزرعه با علایم گزارش شده توسط شعیبی و همکاران (۱۹) مشابهت داشت و همچنین اکثر علایم ایجاد شده بر روی گیاهان محک موجود در گلخانه مشابه با علایم گزارش شده از جدایه‌های مختلف این ویروس از سایر نقاط ایران بود.

از آنجاییکه دو جدایه مذکور از دو استان و از میزبان‌های متفاوت جدا شده‌اند بروز علائم متفاوت روی تعدادی از گیاهان محک بیانگر تنوع بیولوژیکی دو جدایه است. دندروگرام رسم شده با روش Neighbor-joining و بر اساس توالی نوکلئوتیدی نشان داد که گروه ۱ با بیشترین تعداد، طیف وسیعی از جدایه‌های اروپا و خاورمیانه را در برگرفته است و اغلب جدایه‌های ایرانی ثبت شده در بانک ژن و همچنین جدایه‌های FUM3 و FUM4 در این گروه قرار گرفته‌اند. جدایه‌های FUM3 و FUM4 با سایر جدایه های گروه ۱ ویروس موزائیک هندوانه بین ۹۷ و ۹۹ درصد در سطح نوکلئوتیدی و بین ۹۸ و ۱۰۰ درصد در سطح اسیدآمینه‌ای مشابهت دارند. همچنین در دندروگرام رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی، این دو جدایه همراه با جدایه Mashhad که توسط شعیبی و همکاران (۱۹) گزارش شده بود در یک گروه قرار گرفته‌اند. جدایه FUM3 از استان خراسان شمالی بیشترین شباهت (۹۸/۶ درصد) را با جدایه ESF.ES.1 دارد، در حالیکه جدایه FUM4 (منطقه طرقبه–شاندیز) از استان خراسان رضوی بیشترین شباهت (۹۹/۱ درصد) را با جدایه Mashhad (خراسان رضوی) که قبلاً توسط شعیبی و همکاران (۱۹) گزارش شده بود دارد، این امر تاییدکننده این مطلب است که در اکثر موارد بین دندروگرام تبارزائی و تشابه نوکلئوتیدی و موقعیت جغرافیایی جدایه‌ها همخوانی وجود دارد و هرچه فاصله جغرافیایی جدایه‌ها از هم بیشتر باشد این فاصله در دندروگرام تبارزائی آن‌ها هم مشاهده خواهد شد.

اهمیت شناسایی ویروس WMV علاوه بر تأثیر آن در کاهش کمیت و کیفیت محصولات کدوئیان در این است که می‌تواند به عنوان کانون آلودگی برای سایر محصولات کشاورزی عمل نماید. از آنجا که خیار یکی از گیاهان پر مصرف جالیزی است، آلودگی تعداد زیادی از گلخانه‌های خیار به این ویروس نشان می‌دهد که گلخانه‌های خیار منطقه نیز در معرض خسارت جدی توسط این ویروس هستند. رعایت عملیات زراعی و به کارگیری ارقام مقاوم مؤثرترین راه کنترل این بیماری ویروسی شناخته شده است که از نظر اقتصادی و زیست محیطی ارزشمند می‌باشد برای انجام مطالعات دقیق‌تر در زمینه شناسایی چگونگی مقاومت در گیاهان کدوئیان بررسی فراتر سویه‌های ویروس موزاییک هندوانه در جهت معرفی ارقام مقاوم راهگشا خواهد.

منابع

1- Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characteristics of the micro plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.

2- Desbiez C., and Lecoq H. 2004. The nucleotide sequence of *Watermelon mosaic virus* (WMV, Potyvirus) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 50 part of the genome. Arch Virol 149: 1619–1632

3- Desbiez C., and Lecoq H. 2008. Evidence for multiple intraspecific recombinants in natural populations of *Watermelon mosaic virus* (WMV, Potyvirus). Virology 153: 1749-1754.

4- Frenkel M.J., Ward C.W., Shukla D.D., 1989. The use of 30 non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: application to *Watermelon mosaic virus 2* and *Soybean mosaic virus*-N. J. Gen. Virol. 70: 2775–2783

5- Gara I.W., Kondo H., Maeda T., Inouye N., Tamada T. 1997. Stunt disease of *Habenaria radiata* caused by a strain of *Watermelon mosaic virus*. Ann. Phytopathl. Soc. Jpn 63: 113–117

6- Gray D.F., and Taylor S.C., 1998.Plant virology protocols. Humana press Inc. P:151-154

7- Grisoni M., Davidson F., Hyrondelle C., Caruana M-L., Pearson M. 2004. Nature, incidence, and symptomatology of viruses infecting Vanilla tahitensis in French Polynesia. Plant Dis. 88: 119–124

8- Inouye T. 1964. A virus disease of pea caused by *Watermelon mosaic virus*. Berlin Ohara Inst. Landwirtsch Biol. 12: 133–143

9- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural ptoteins during the assembly of the head of bactriophage. Nature 227:680-689

10- Lecoq H. 1992. Les virus des cultures de melon et de courgette de plein champ (I). PHM. Rev. Horticole. 324:15-25

11- Moreno I.M., Malipica J.M, Diaz- Pendon J.A., Moriones E., Fraile A., and Gracia- Arenal F. 2004.Varibility and genetic structure of the population of *Watermelon mosaic virus* infecting melon in Spain. virology 318:451-460

12- Purcifull D.E., Hiebert E., Edwardson J. 1984. *Watermelon mosaic virus 2*. Description of Plant Viruses CMI/AAB 293
13- Sidek Z. 1999. Viruses of cucurbits: The strategies. Sustainable crop protection practices in the next Millennium: MCB-MAPPS Plant protection conference 99 proceeding. p.68-71
14- Schroeder WT., Provvidenti R. 1971. A common gene for resistance to *Bean yellow mosaic virus* and *Watermelon mosaic virus 2* in Pisum sativum. Phytopathology 61: 846–848
15- Shabanian M., Masomi H., Hoseinipour A., Heidarnejad J., and Azami Z. 2007. Identification and distribution of cucumber-infecting viruses in the jiroft greenhouses and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic virus* collected from this region. J. sci. and Technol. of Agric and Natur. Resour. 11: 393 – 406.
16- Sharifi M., Massumi H., Heydarnejad J., Hosseini pour A., Shaabanian M., and Rahimian H. 2008. Analysis of the biological and molecular variability of *Watermelon mosaic virus* isolates from Iran. Virus genes 37: 304–313.
17- Sherf A.F., and Macnab A. A. 1986. Vegetable Disease and Their Control. John Wiley and Sons, New York.
18- Shukla D.D., Ward C.W., Brunt A.A. 1994. The potyviridae. CAB International, Walling ford, UK
19- Shoeibi S., Masumi M., Nasrollahnezhad S., Heydari S., Izadpanah K., and Ahmadikhah A., 2009. Sequencing of Six Iranian Isolates of *Watermelon Mosaic virus* and phylogenetic comparation of Iranian isolates with other isolates of the word. Iran. J. Plant Path. 45: 39-42
20- Wang Y.Y., Beck D.L., Gardner R.C., Pearson M.N. 1993. Nucleotide sequence, serology and symptomatology suggest that vanilla necrosis potyvirus is a strain of *Watermelon mosaic virus II*. Arch Virol 129: 93–103
21- Yu M.H., Frenkel M.J, Ward C.W., Shukla D.D., Strike P.M., and Ward C.W. 1989. Coat pritein of potyviruses, 6. Amino acid sequences suggest *Watermelon mosaic virus* 2 and *Soybean mosaic virus* –N are strains of the same potyvirus. Archives of Virology 105, 55-64
22- Zitter T.A., Hopkins D.L., and Thomas C.E. 1996. Compendium of cucurbit diseases. American phytopathological society, st. paul, mn.