

## شناسایی سرولوژیکی، مولکولی و فیلوژنتیکی ویروس موزائیک زرد کدو مسمایی در استان خراسان رضوی

زینب حیدری نیا<sup>۱\*</sup> - بهروز جعفرپور<sup>۲</sup> - پریسا طاهری<sup>۳</sup> - مهناز آشنایی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۷

### چکیده

در بسیاری از مناطق جهان، ویروس موزائیک زرد کدو باعث کاهش شدید محصول در کدوئیان می‌گردد. در طی بازدیدهای انجام شده طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۹، از مناطق مختلف در استان‌های خراسان رضوی، شمالی و جنوبی، از بین ۳۹۲ نمونه جمع‌آوری شده، ۷۲ نمونه در آزمون الیزا با آنتی بادی اختصاصی چند همسانه‌ای ویروس ZYMV دارای واکنش مثبت بودند. در ادامه تحقیق، دو نمونه مثبت بر اساس دامنه میزبانی و منطقه جغرافیایی برای مطالعات بیش‌تر مورد بررسی قرار گرفتند. این دو جدایه انتخاب شده و ژن پروتئین پوششی (۹۷۰bp) آن‌ها (cp) از طریق نسخه‌برداری معکوس مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با کمک آغازگرهای اختصاصی تکثیر ZYMV پس از همسانه سازی، تعیین ترادف گردید. جهت تعیین جایگاه تکاملی دو جدایه ایرانی ZYMV مورد بررسی در مقایسه با سایر جدایه‌های ZYMV گزارش شده در دنیا درخت فیلوژنتیکی توسط نرم افزار MEGA4×1 رسم گردید. نتایج حاصله بیانگر آن است که بر مبنای ترادف نوکلئوتیدی، ناحیه ژن cp جدایه‌های درگز (Da) و نیشابور (Po3) بیش‌ترین تشابه را با جدایه SYZY-30 از کشور سوریه نشان دادند.

**واژه‌های کلیدی:** ویروس موزائیک زرد کدو، آزمون داس الیزا، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، آنالیز فیلوژنتیکی

### مقدمه

حداقل هفت جنس از پوتی ویروس‌ها شناسایی شده‌اند که در خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) ایجاد آلودگی می‌نمایند (۱۱) و (۱۲). ویروس موزائیک زرد کدو (ZYMV) به عنوان یک گروه جدید از این جنس اولین بار از ایتالیا گزارش گردید (۹). سپس از فرانسه (۸) ، آمریکا (۱۳ و ۱۲)، لبنان (۷) و تایوان (۶) گزارش گردید. ویروس ZYMV به عنوان عامل محدود کننده کشت کدوئیان در تایوان شناخته شده است (۶).

ZYMV متعلق به خانواده پوتی ویروس‌ها می‌باشد (۱ و ۲). گروهی از ویروس‌های گیاهی که ژنوم یک قطعه‌ای آر.ان.ای تک رشته‌ای مثبت و ذرات رشته‌ای شکل از خصوصیات بارز آن‌ها می‌باشد. آر.ان.ای به یک پروتئین ترجمه شده که بعداً به‌وسیله سه پروتئاز وابسته به خود ویروس شکسته می‌شود (۳). پوشش پروتئینی

۳۶ کیلوالتونی آر.ان.ای ویروس را در بر می‌گیرد که در تعیین خصوصیات مانند انتقال بوسیله شته، دامنه میزبانی و علائم بیماری نقش مهمی دارد (۵).

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری و شناسایی ویروس‌ها

در بهار و تابستان سال ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ به‌منظور شناسایی ویروس موزائیک زرد کدو مسمایی از مناطق اصلی کشت کدو (*Cucurbita* sp.)، خربزه (*Cucumis melo*)، خیار (*Cucumis sativus*)، مزرعه‌ای و گلخانه‌ای، هندوانه (*Citrullus lanatus*)، طالبی (*Cucumis melo* var. *reticulatus*)، خیارچنبر (*Cucumis melo* var. *flexuosus*) در استان خراسان رضوی، شمالی و جنوبی شامل مناطق خواجه ربیع، نیشابور، فریمان، سبزوار، تربت حیدریه، تربت جام، سبزوار، درگز، بیرجند، سریشه، شیروان و بجنورد نمونه برداری‌های متوالی در مراحل مختلف رشد به‌عمل آمد. علائم آلودگی ویروسی بعد از تشکیل میوه قابل تشخیص بود. علائم مشاهده شده شامل: موزائیک، زردی، بدشکلی در برگ‌ها، نخ‌شدن برگ‌ها،

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، استادیار و دانشجو کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد  
\* نویسنده مسئول: (Email: zheydariniya@yahoo.com)

RNA کل گیاه با استفاده از کیت Accuzol و طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده (Bioneer) مورد استفاده قرار گرفتند. جهت تعیین میزان کیفیت RNA استخراجی پس از انجام اسپکتروفتومتری، بهترین کیفیت از RNA استخراج شده تعیین و از آن در واکنش PCR استفاده شد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از جفت آغازگرهای اختصاصی ناحیه ژن کد کننده پروتئین پوششی که توسط سنگ وک وون و همکاران (۱۴) طراحی شده بود، استفاده گردید (جدول ۱).

برای ساخت این رشته از کیت سنتز cDNA طبق روش توصیه شده در کیت Accupower™ Premix تهیه شده از شرکت Bioneer استفاده گردید. سه میکرولیتر از RNA ی مورد نظر و ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (Reverse) با غلظت ۱۵ پیکومول و یا معادل آن ۱ میکرولیتر از Oligo dT در یک میکروتیوپ استریل ریخته شده و بقیه مراحل طبق دستورالعمل کیت اجرا می‌شود. آزمون PCR با استفاده از کیت (PCR Premix, Kit, Bioneer) در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل سه میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها به غلظت ۱۰ پیکومول و ۱۵ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت. برنامه PCR به وسیله دستگاه ترموسایکلر Biometra (USA) مطابق جدول ۲ انجام گرفت. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۷ درصد در بافر TBE و با ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت ۸۰ دقیقه الکتروفورز گردید و آنگاه پس از رنگ آمیزی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر رنگ آمیزی شده و سپس در آب مقطر به مدت ۵ دقیقه رنگ بری انجام گرفت. ژل بر روی صفحه UV Transilluminator بررسی و با دستگاه Gel documentation عکسبرداری شد.

بدشکلی در میوه و کاهش محصول می‌باشد (شکل ۱). برگ‌های جوان از گیاهان آلوده جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در طولانی مدت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت شناسایی و تعیین پراکنش ویروس‌ها از آزمون الایزا استفاده گردید.

#### آزمون الایزا Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

برای شناسایی و تعیین پراکنش ویروس ZYMV در نمونه‌های جمع‌آوری شده، از آزمون DAS-ELISA و آنتی‌بادی اهدایی از شرکت Agdia و تهیه شده از موسسه تحقیقاتی DSMZ (DSMZ-AS 0239) آلمان استفاده گردید. آزمون الایزا طبق روش کلارک و آدامز (۶) انجام شد. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الایزا خوان (STAT FAX 2100, USA) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) با استفاده از فرمول  $X + 3SD$ ، آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. در این فرمول  $X$  میانگین جذب و SD انحراف معیار استاندارد چاهک‌های سالم است. با استفاده از این آزمون، نمونه‌های بیمار مشخص و درصد آلودگی نقاط مختلف تعیین گردید.

#### شناسایی مولکولی ویروس با استفاده از روش نسخه‌برداری معکوس مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR)

نمونه‌هایی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند، برای استخراج

جدول ۱- توالی و موقعیت آغازگر اختصاصی مورد استفاده جهت شناسایی مولکولی ZYMV طراحی شده توسط سنگ وک وون و همکاران

آغازگر	ترادف آغازگر (۳' - ۵')	موقعیت در ژنوم	اندازه قطعه
prZCP-Forward	CTTTGAACAAGGAGACACTG	8528-8547	970bp
prZCP-Reverse	GCGGTAATATTAGAATTAC	9439-9458	

جدول ۲- برنامه انجام آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگرهای prZCPF/prZCPR جهت شناسایی مولکولی ZYMV

مرحله	نوع واکنش	دما (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	تکرار سیکل
۱	واسرشت سازی اولیه	۹۴	۴	۱
۲	Denaturation	۹۴	۱	۳۵
۳	Annealing	۵۶	۱	۳۵
۴	Extensions	۷۲	۱	۳۵
۵	مرحله تکمیل پلیمریزاسیون	۷۲	۷	۱

### آنالیز توالی

بررسی توالی با استفاده از نرم افزار MEGA4.1 انجام شد. برای جداسازی قطعه تکثیر شده (ZYMV,970bp) از کیت خالص سازی ژن شرکت Bioneer, Korea (شماره کاتالوگ K-3035-1) استفاده گردید و نمونه برای تعیین توالی به شرکت MWG (Biotech AG, Germany) همراه با آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش های زنجیره ای پلیمرز، ارسال گردید. جدایه های ایزوله شده از نیشابور (Po3) و درگز (Da) به همراه ۲۴ جدایه دیگر (قابل دسترس در Gene Bank) جهانی برای تعیین روابط فیلوژنتیکی مورد بررسی

قرار گرفتند (جدول ۳). آنالیز فیلوژنتیکی جدایه ایرانی با مقایسه ۹۷۰ جفت باز از ژن پروتئین پوششی با سایر جدایه های دنیا انجام گرفت. همردیفی چندگانه توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه با استفاده از برنامه Clustal W در نرم افزار Bioedit (version 7.0.9) انجام گرفت. درخت فیلوژنتیکی برای گروه بندی جدایه های مورد بررسی، بر اساس توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه با استفاده از نرم افزار MEGA 4.1 با استفاده از روش Similarity matrix و Neighbor-joining (Bootstrapped-1000 replication) انجام گرفت.

جدول ۳- اطلاعات مربوط به جدایه های ZYMV ثبت شده در Gene-Bank

تعداد نوکلئوتید	منشاء	میزبان	شماره نمونه	جدایه
837	Poland	<i>Cucurbita pepo</i>	EF178505	ZYMV-Zug
840	China	Cucurbita	AY597207	ZYMV-Hefei
607	Syria	Squash	GU903892	ZYMV-SYZY30
459	Iran	<i>Cucurbita Maxima</i>	FJ752262	ZYMV-Kho-Mash
1684	China	Pumpkin	EF122498	ZYMV-Liacheng
837	Brazil	<i>Trichosanthes cucumerina</i>	GU586790	ZYMV-ZTRICH
1944	Florida	Cucurbita	D13914	ZYMV-Florida
1944	Florida	Cucurbita	D00593	ZYMV-Florida
1130	Italy	Cucurbita	AJ420020	ZYMV-PV0416
تعداد نوکلئوتید	منشاء	میزبان	شماره نمونه	جدایه
1166	China: Shanxi	Squash	AY611023	ZYMV-CH99/193
850	South Africa	Cucumber	DQ978272	ZYMV-KZN
531	Czech Republic	<i>Cucurbita pepo</i> .	DQ124244	ZYMV-H
1669	Poland	Zucchini	EU561044	ZYMV-Zuy
840	Japan	<i>Cucumis melo</i> .	AB063251	ZYMV-M39
1260	Syria: Hama	<i>Cucurbita pepo</i> .	AB458596	ZYMV-SYZY3
1105	Taiwan: Tainan	<i>Cucumis melo</i> .	AF127932	ZYMV-Tw-TNML1
1224	China: Hainan	Watermelon	AY611026	HN-01
9591	Taiwan: Tainan	<i>Luffa cylindrical</i>	AF127929	TW-TN3
1683	China: Zhejiangi	<i>Cucurbita muschata</i>	AJ316227	P
1172	Japan	<i>Cucurbita pepo</i>	AB004641	M
250	Pakistan	<i>Cucurbita pepo</i> .	AY016524/1	PAK
1652	Vietnam	Cucumber	DQ925449	VN/CS1
1130	Germany	<i>Cucurbita pepo</i>	AJ420019	Berlin 1
9593	Israel	Zucchini	AY188994	B*
970	Iran: Dargaz	Zucchini		ZYMV-Dargaz
970	Iran: Neyshabour	Zucchini		ZYMV-Neyshabour

جدول ۴- درصد آلودگی و پراکنش نمونه های آلوده محصولات مختلف خانواده کدوئیان به

ZYMV در شهرستان های مختلف استان خراسان رضوی، شمالی و جنوبی

شهرستان ها	محصول	تعداد مزارع مورد بررسی	تعداد نمونه آلوده/تعداد کل نمونه ها	درصد آلودگی
تربت جام	M,Z,S,C	۵	۲۱/۳۶	۵۸
نیشابور	M,Z,C,S,W	۱۱	۲۲/۸۰	۲۷
مشهد و تربت حیدریه	Z,M,Ca,S	۱۰	۷/۱۰۷	۶
بجنورد و شیروان	M,S,Z	۴	۲/۵۰	۴
سبزوار	M,Z,C,W	۳	۴/۱۱	۳۶
کاشمر و بیرجند	M,Z,C	۷	۰/۳۳	۰
درگز	Z,C,Ca,M	۳	۱۶/۷۵	۲۱

\* - در جدول Ca;Cantaloup.W;Watermelon .S;Sunflower. C;Cucumber. Z;Zucchini .M;Melon

## نتایج و بحث

### بررسی میزان آلودگی ویروس

از میان ۳۹۲ نمونه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی، شمالی و جنوبی، شامل ۱۵۳ نمونه کدو، ۶۱ نمونه خربزه، ۱۴ نمونه خیار، ۵ نمونه آفتابگردان، ۹ نمونه هندوانه و ۳۲ نمونه طالبی، ۷۲ نمونه در آزمون الایزا با آنتی بادی اختصاصی ZYMV واکنش مثبت نشان دادند.

درصد آلودگی در استان خراسان رضوی ۹۱ درصد در استان خراسان شمالی ۴۰ درصد و در استان خراسان جنوبی ۲۱ درصد تخمین زده شده است. از این میان بیش‌ترین و کم‌ترین آلودگی به ترتیب مربوط به شهرستان‌های تربت جام و کاشمر، بیرجند می‌باشد. جهت تعیین دامنه میزبانی از آفتابگردان‌های حاشیه مزرعه، گوجه فرنگی، بادمجان و چغندر قندهای کشت شده در مزارع مجاور که به ترتیب مربوط به خانواده‌های *Solanaceae*, *Compositae*, *Cruciferae* بودند، نمونه برداری بعمل آمد ولی هیچ یک از این نمونه‌های در آزمون الایزا مثبت نشدند و تنها ۳ نمونه از آفتابگردان‌ها در آزمون الایزا دارای واکنش مثبت بودند (جدول ۵).

### نسخه برداری معکوس مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز RT-PCR

به منظور شناسایی سریع و دقیق علاوه بر روش سرولوژی و

دامنه میزبانی، از روش واکنش نسخه برداری معکوس مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده گردید. RNA کل از نمونه‌های آلوده به ویروس، استخراج شده و با استفاده از آغازگرهای prZCPF و prZCPR قطعه‌ای در حدود 976 bp مربوط به ژن پروتئین پوششی در جدایه‌های دارای آلودگی از نیشابور (Po3) و درگز (Da) تکثیر گردید (شکل ۲).

### توالی نوکلئوتیدی

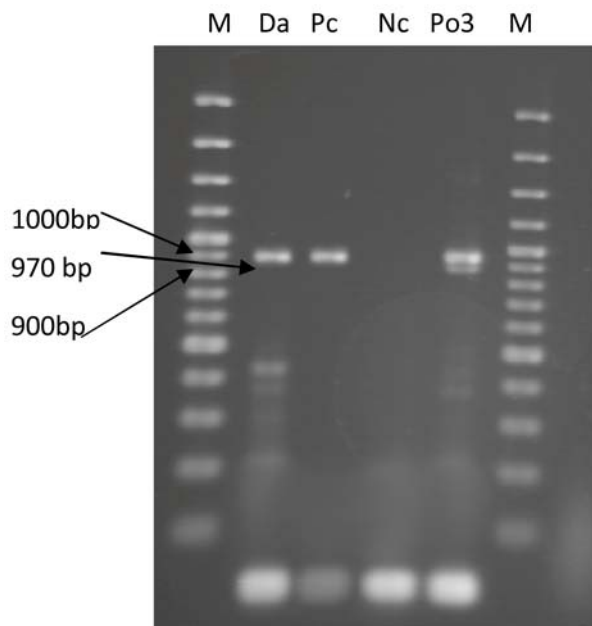
توالی نوکلئوتیدی به منظور تعیین فاصله ژنتیکی جدایه مورد بررسی با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن جهانی مورد مقایسه قرار گرفت. بیش‌ترین تشابه (Similarity) بین جدایه‌های مورد بررسی و *Syria* جدایه از کشور سوریه به میزان ۹۴ درصد تعیین گردید (جدول ۵).

### آنالیز فیلوژنتیکی

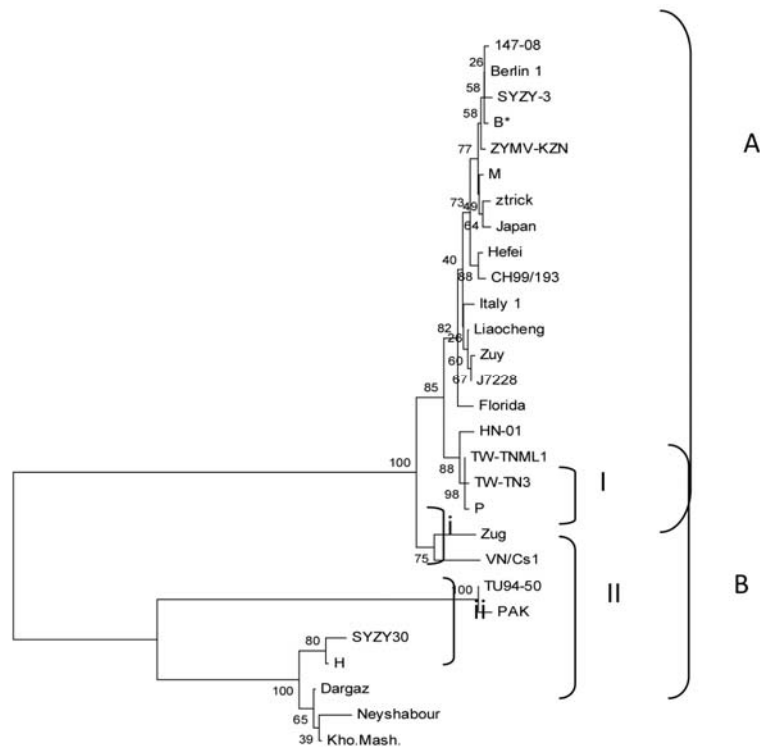
درخت فیلوژنتیکی بر اساس هم‌دیفی چندگانه، توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی، جدایه‌های مورد بررسی را در دو گروه جداگانه A و B قرار می‌دهد: گروه B شامل دو زیر I و II می‌باشد. زیر گروه I شامل جدایه‌های پاکستان و ترکیه است. گروه II شامل جدایه‌های جمهوری چک و سوریه در گروه i و جدایه‌های مشهد، درگز و نیشابور در گروه ii می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۱- نمونه‌های طالبی آلوده به ویروس موزائیک زرد کدو مسمایی در مزرعه



شکل ۲- نتیجه الکتروفورز محصول PCR برای ویروس ZYMV با استفاده از آغازگرهای PrZCPR و PrZCPF بر روی ژل آگارز ۱٪/۷: M. مارکر PC، نمونه شاهد مثبت. NC: شاهد منفی. Po3: نمونه مثبت طالبی از نیشابور، Da نمونه مثبت طالبی از درگز



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی بر اساس درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی بین جدایه نیشابور، درگز و سایر جدایه ها با استفاده از نرم افزار MEGA 4.1

ترتیب به میزان ۹۴ و ۹۲ درصد و همچنین بیشترین درصد تشابه اسید آمینه بین جدایه های درگز و نیشابور و SYZY-30 به میزان ۹۷ و ۹۴ درصد می باشد (شکل ۴).

در بررسی فیلوژنتیکی بر اساس نتایج حاصل از همردیفی چندگانه به روش Clustal W، بیشترین درصد تشابه نوکلئوتیدی بین دوجدايه درگز (Da) و نیشابور (Po3) و SYZY-30 از سوریه به

جدول ۵- درصد تشابه نوکلئوتید و اسید آمینه بین جدایه‌های مختلف ZYMV. (اعداد زیر ۱۰۰ مربوط به درصد نوکلئوتید و اعداد بالای ۱۰۰ مربوط به اسید آمینه هستند)

26.VC/CSI	86	89	86	86	85	87	4	4	4	89	86	10	86	86	6	86	86	
25.Berlin I	95	94	94	95	94	92	4	10	10	87	95	6	94	98	6	95	95	
24. B*	94	95	95	94	95	92	4	10	10	86	95	6	94	97	10	94	94	
23.PAK	13	13	13	13	13	92	70	68	69	19	6	72	6	6	70	6	6	
22.M	94	95	94	95	94	13	7	10	10	87	95	6	95	97	6	95	95	
21.P	92	92	92	92	92	94	7	6	6	86	92	6	93	92	7	92	92	
20.JW-JN3	92	92	92	92	92	95	7	10	10	86	92	6	93	92	4	93	92	
19.HN-01	92	92	92	92	92	94	7	10	10	85	92	6	93	92	4	93	92	
18.J7228	95	97	97	95	94	93	7	10	10	87	95	6	98	95	3	98	100	
17.Zuy	95	97	97	95	94	93	7	10	10	87	95	5	99	95	5	100	100	
16.H	6	3	3	6	6	4	93	91	92	5	3	97	3	3	6	100	7	
15.KZN	97	94	95	96	97	92	4	10	10	87	95	6	95	94	100	7	99	
14.ch99/193	94	94	95	94	94	93	7	8	9	87	98	6	95	100	97	7	98	
13.Liaocheng	95	96	98	95	94	94	7	10	10	86	96	6	100	97	98	7	99	
12.SyZY30	3	6	6	6	6	6	94	92	93	5	3	100	7	7	95	7	7	
11.Hefei	95	94	95	95	94	93	4	8	8	87	100	7	97	100	97	7	98	
10.IZug	85	87	86	86	87	87	4	4	4	100	96	7	95	96	95	7	96	
9.kho.mash	5	9	10	10	10	10	97	96	100	7	7	98	7	7	95	7	7	
8.Neyshabour	4	8	10	10	10	10	96	100	96	7	7	94	7	7	92	7	7	
7.Dargaz	4	7	7	4	4	7	100	95	96	7	7	97	7	7	94	7	7	
6.Tw-tnmlI	92	93	94	92	93	100	7	7	7	95	98	7	99	100	99	7	100	
5.SYZY-3	98	93	95	97	100	97	7	7	7	96	98	7	99	98	99	7	100	
.Japan	98	94	95	100	100	97	7	7	7	96	98	7	99	98	99	7	100	
3.Italy	95	97	100	100	100	97	7	7	7	96	98	7	99	98	99	7	100	
ridaUv52.Flo	94	100	98	98	98	97	7	7	7	96	98	7	98	98	97	7	98	
1.ZTRICH	100	98	100	100	100	97	7	7	7	96	98	7	99	98	99	7	100	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18



۳-واکی د. ۱۳۸۲. ویروس شناسی گیاهی. ترجمه ب. جعفرپور و بیتا جعفرپور. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

- 4-Clark M.F., and Adams S.A.N. 1977. Characteristics of micro plates method of enzyme linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virology*, 34: 475- 483.
- 5-Desbiez C., Wipf-Scheibel C., and Lecoq H. 2002. Biological and serological variability, evolution and molecular epidemiology of Zucchini Yellow Mosaic Virus with special reference to Caribbean Island. *Virus Research*, 85: 5-16.
- 6-Hseu S.H., Huang C.H., Change C.A., Yang W.Z., Chang Y.M., and Hsiao C.H. 1985. The occurrence of five viruses in six cucurbits in Taiwan. *Plant protection Bulletin, Taiwan*, 29(3): 233-244.
- 7-Lesemenn D.E., Makkouk K.M., Koenig R., and Natafji Samman E. 1985. Natural infection of cucumbers by zucchini yellow mosaic virus in Lebanon. *Phytopathologische Zeitschrift*, 108: 304-313.
- 8-Lecoq H., Bourdin D., Raccach B., Hiebert E., and Parcifull D.E. ۱۹۸۳. Characterization of a Zucchini Yellow Mosaic Virus isolate with a deficient helper component. *Phytopathology*, 81:187-1091.
- 9-Lisa V., Boccardo G.D., Dellavalle G., and d'Aquilio A. 1981. Characterization of potyvirus that causes Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Phytopathology*, 71(7):672-677.
- 10-Lockhart B.E.L., Ferji Z., and Hafidi B. 1982. Squash Mosaic Virus in Morocco. *Plant Disease*: 66: 1191-1193.
- 11- Lovisolo O. 1980. Virus and viroid disease of Cucurbits. *Acta Horticulture*, 88:33-81.
- 12- Purcifull D.E., Adlerz W.C., Simone G.W., and Hiebert E. 1984. Serological relationships and partial characterization of Zucchini Yellow Mosaic Virus isolated from squash in Florida. *Plant Disease*, 68:443-446.
- 13- Provvidenti R., Gonsalves D., and Humaydan H.S. 1984. Occurrence of Zucchini Yellow Mosaic Virus in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. *Plant Disease*, 68:443-446.
- 14- Wook k.S., Kim M.S., Choi H.S. 2005. Biological characteristics and nucleotide sequences of three Korean isolates of Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 71:80-85.