نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۱۶۶-۱۵۹

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 2, Summer 2015, P. 159-166

شناسایی سرولوژیکی و مولکولی ویروس موزائیک کدو در مزارع کدوئیان استان‌های خراسان رضوی و شمالی

زینب حیدری نیا[1*]- بهروز جعفرپور[2]- پریسا طاهری[3]- مهناز آشنایی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۱۳

چکیده

موزائیک رگبرگ روشنی خربزه از طریق تشکیل نوارهای سبز رنگ در اطراف رگبرگ در جدایه‌های مختلف خربزه قابل شناسایی است. این بیماری به‌وسیله ویروسی که دارای ۳۰nm طول است، به‌وجود می‌آید. به منظور بررسی پراکندگی و تعیین موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌های SqMV در طی ماه‌های خرداد لغایت مهر ماه ۱۳۸۸ تعداد ۲۷۰ نمونه گیاهی از مزارع کدوئیان واقع در استان خراسان رضوی و شمالی جمع‌آوری گردید. آلودگی نمونه‌های با آزمون DAS-ELISA به‌وسیله آنتی‌بادی چند همسانه‌ای اختصاصی SqMV اهدایی از شرکت Agdia مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۴۶ نمونه از ۲۷۰ نمونه آلوده به SqMV بودند. از میان نمونه‌های آلوده به این ویروس، هشت نمونه، براساس دامنهٔ میزبانی و منطقه برای بررسی‌های بیشتر و تلقیح مکانیکی بر روی گیاهان محک در شرایط گلخانه انتخاب گردیدند. یک جدایه از تربت جام به منظور تکثیر بخشی از ژن پروتئاز کوفاکتور انتخاب شد. قطعه مذکور (۲۲۶bp) از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز – نسخه‌برداری معکوس با استفاده از RNA کل استخراج شده از نمونه‌های آلوده با کمک آغازگرهای اختصاصی تکثیر و پس از همسانه‌سازی، تعیین ترادف گردید. جهت تعیین جایگاه تکاملی جدایه ایرانی در مقایسه با جدایه‌های مختلف دنیا درخت فیلوژنتیکی توسط نرم افزار MEGA4×1 رسم گردید. نتایج حاصله بیانگر آن است که بر مبنای ترادف نوکلئوتیدی، جدایه ایران بیشترین تشابه را با جدایه گزارش شده از ژاپن به میزان ۹۷ درصد نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک کدو، *Comovirus*، RT-PCR

مقدمه

ویروس موزائیک کدو (SqMV) یکی از اعضاء جنس *Comovirus* و خانوادهٔ *Comoviridae* می باشد (۵، ۱۰ و ۲۳). این ویروس از طریق بذر و سوسک منتقل شده و بسیاری از گیاهان خانوادهٔ کدوئیان را آلوده می‌کند (۱، ۲، ۴، ۸، ۹ و ۱۱) و ژنوم آن دو قطعه آر. ان. ای تک رشته‌ای مثبت به نام‌های RNA-1(ca. 5900nt) و RNA-2 (ca. 3600nt) می‌باشد که هر کدام از آن‌ها درون یک پیکرهٔ مجزا قرار می‌گیرد (۳، ۱۳ و ۱۵). RNA-1 پروتئین‌های پلی‌مراز، هلیکاز، پروتئاز، کوفاکتور پروتئاز و پروتئین ویروسی وابسته به ژنوم را تولید می‌کند، درحالی‌که RNA-2 پروتئین حرکتی (MP) ، پروتئین پوششی بزرگ (LCP) و پروتئین پوششی کوچک (SCP) را تولید می‌کند (۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۲۲).

در حالی‌که ویروس موزائیک کدو در مناطق غربی (برومه و کونونورا از شهرهای کشور استرالیا) گسترش زیادی دارد، گزارش‌های کمی در مورد وقوع این ویروس در سایر مناطق وجود دارد. این بیماری اولین بار در سال ۱۹۳۴ در کالیفرنیا گزارش شد. از آن زمان به بعد در امریکای شمالی، امریکای جنوبی، اروپا و استرالیا (۱۲) مشاهده شده است. این بیماری در ژاپن (۱۴)، مراکش (۲۰) و اسرائیل (۷) نیز گزارش شده است. در نیوزیلند SqMV از بذرهای ارسالی از آمریکا جدا شده ولی هنوز در مزرعه شناسایی نشده است (۲۳). این بیماری در نواحی جنوبی کالیفرنیا و جنوب کارولینا در اواخر فصل سبب خسارت شدیدی می‌گردد. روی Muskmelon این ویروس سبب کاهش تعداد میوه‌ها و دیررسی میوه‌ها می‌شود، ولی هیچ اثری روی وزن، اندازه و کیفیت غذائی میوه ندارد. خسارت این ویروس کمتر از Cucumber Mosaic Virus، Watermelon Mosaic Virus وTobacco Ring Spot Virus می‌باشد. ویروس موزائیک کدو بیشتر گیاهان خانواده کدوئیان را مورد حمله قرار می‌دهد اما بیشتر جدایه‌ها اثری روی هندوانه ندارند. علاوه بر کدوئیان

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

این ویروس می‌تواند به گیاهان دیگر از قبیل نخود حمله کند (۲۱). در ایران، این بیماری اولین بار توسط ایزدپناه در سال ۱۳۶۸ از استان بوشهر گزارش شده است (۱۶، ۱۸ و ۱۹).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و شناسایی ویروس‌ها

جهت شناسایی و تعیین پراکنش ویروس موزائیک کدو (Squash mosaic virus) از مناطق اصلی کشت کدو (*Cucurbita* sp.)، خربزه (*Cucumis melo*.)، خیار (*Cucumis sativus*)، هندوانه (*Citrullus lanatus*) طالبی (*Cucumis melo* var.*reticulatus*)، خیارچنبر (*Cucumis melo* var.*flexuosus*) و آفتابگردان‌های حاشیه مزارع در استان خراسان رضوی و خراسان شمالی شامل مناطق خواجه ربیع، نیشابور، فریمان، سبزوار، تربت حیدریه، تربت جام، سبزوار، درگز، شیروان و بجنورد نمونه‌برداری‌های متوالی در مراحل مختلف رشد اعم از مرحله ۲ تا ۴برگی، گلدهی، تشکیل میوه و در هنگام زمان برداشت میوه‌ها از بوته‌های کدو بعمل آمد. با مشاهده علائمی از قبیل موزائیک، لکه‌های کلروز و روشن شدن رگبرگ‌ها بر روی آفتابگردان‌های حاشیه مزرعه، از این گیاه برای انجام آزمایش شناسایی ویروس موزائیک کدو نمونه‌برداری انجام گرفت. در طی ۴۲ بازدید انجام شده، از هر مزرعه با توجه به وسعت آن از بوته‌های آلوده که دارای علائمی از قبیل روشن شدن رگبرگ‌ها و لکه‌های کلروز در روی برگ‌های جوان، پیچ خوردگی برگ‌ها به‌طرف بالا، نخی شدن برگ‌های آلوده بودند، نمونه‌برداری انجام و هر گیاه آلوده به عنوان یک نمونه داخل یک پاکت گذاشته و در روی آن تاریخ، محل نمونه‌برداری و نوع رقم کشت شده درج گردید. 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 DAS-ELISA استفاده گردید.

تعین دامنه میزبانی

برای تعیین دامنه میزبانی و مشاهده علائم ویروس مورد نظر از میزبان‌های متعددی شامل گونه‌ها و رقم‌های موجود در خانواده گیاهی *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Asteraceae*, *Cucurbitaceae* استفاده گردید. گیاهان مورد استفاده شامل: *Cucurbita pepo*, *Chenopodium amaranticolor*, *C.quinoa*, *Gompherna globosa*, *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus* بودند. عصاره نمونه‌های آلوده به نسبت ۱:۱۰(W/V) در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار با pH=7 تهیه و با کمک پودر کاربراندوم به برگ‌های گیاهان محک مایه‌زنی گردید. این گیاهان در گلخانه در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و نهایتاً ۱۴ روز بعد از مایه‌زنی علائم در گیاهان محک مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون الایزا

برای شناسایی و تعیین پراکنش ویروس SqMV از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای تهیه شده از شرکت Agdia استفاده شد. از روش ساندویچ دوطرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) (۶) استفاده شد. کلیه بافرها طبق روش شرکت سازنده آنتی سرم‌ها (Agdia, America) تهیه گردید. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الایزا خوان مدل (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 $\bar{X} + 3\,SD$، آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. در این فرمول $\bar{X}$ میانگین جذب و SD انحراف معیار استاندارد چاهک‌های سالم است. بر این اساس نمونه‌های بیمار مشخص و درصد آلودگی نقاط مختلف تعیین گردید.

استخراج آر.ان.ای با استفاده از کیت Accuzol

در این حالت طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده (Bioneer,) آر.ان.ای کل گیاه استخراج گردید. نمونه‌هایی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند، برای استخراج RNA با استفاده از کیت Accuzol مورد استفاده قرار گرفتند.

شناسایی مولکولی ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز-نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

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 پلیمراز از جفت آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن کد کنندهٔ پروتئاز کوفاکتور که از روی ترادف جدایه ژاپنی ویروس موزائیک کدو (به شماره دسترسی AB054688/1) به‌وسیله نرم افزار Primer 3 استفاده گردید (جدول ۱).

برای ساخت این رشته از کیت سنتز cDNA طبق روش موجود در کیت Accupower ™ RT Premix انجام شد. ۳ میکرولیتر از RNAی مورد نظر و ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر برگشت (Reverse) با غلظت ۱۵ پیکومول و یا بجای آغازگر برگشت ۱ میکرولیتر از Oligo dT در یک میکروتیوپ سترون ریخته شد.

جدول ۱- ترادف و موقعیت آغازگر اختصاصی مورد استفاده

آغازگر	جهت ترادف آغازگر (´۳-´۵)	موقعیت	اندازه قطعه
SqMV-F	ACT GGA AAT GGG AGT GTT GC	245-264	226 bp
SqMV-R	ACG TCA ACA GAG TGG GGT TC	471-452	

جدول ۲-زمان و دمای لازم انجام مراحل PCR با استفاده از آغازگرهای F-SqMV/R-SqMV

ردیف	مرحله	دما	زمان	تکرار سیکل
۱	واسرشت سازی اولیه	۹۴C°	۴ دقیقه	۱
۲	واسرشت سازی (Denaturation)	۹۴C°	۳۰ثانیه	۳۵
۳	اتصال (Anealing)	۵۶C°	۳۰ ثانیه	۳۵
۴	بسط (Extention)	۷۲C°	۳۰ ثانیه	۳۵
۵	مرحله تکمیل پلیمریزاسیون	۷۲C°	۷دقیقه	۱

آزمون PCR با استفاده از کیت(PCR Premix, Kit, Bionner Accupower) 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 به‌وسیله 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 ۷۵ دقیقه الکتروفورز گردید. پس از رنگ‌آمیزی 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 Transilluminator UVبررسی و با دستگاه Gel documentation عکس‌برداری شد.

آنالیز ترادف

بررسی ترادف با استفاده از نرم افزار MEGA4.1 انجام شد. برای جداسازی قطعه تکثیر شده (SqMV,226bp) از کیت خالص‌سازی ژن شرکت Bioneer ,Korea با شماره کاتالوگ K-3035-1 استفاده گردید و نمونه برای تعیین ترادف به شرکت MWG (Biotech AG, Ebersberg, Germany) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ارسال گردید، البته این قطعه را می‌توان با استفاده از آغازگرهای عمومی مانند M_{BF} و M_{BR} نیز تعیین ترادف کرد. جدایه جداشده از تربت جام به همراه ۵ جدایه دیگر دنیا ثبت شده در GeneBank برای تعیین روابط فیلوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز فیلوژنتیکی جدایه ایرانی با مقایسه ۲۲۶ نوکلئوتید از ژن Protease-cofactor سایر جدایه‌های دنیا انجام گرفت.Multiple alignment توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه با استفاده از برنامه Clustal W در نرم افزار Bioedit (version 7.0.9.) انجام گرفت.

درخت فیلوژنتیکی برای گروه‌بندی جدایه‌های مورد بررسی، براساس ترادف نوکلئوتیدی و اسید آمینه با استفاده از نرم افزار MEGA 4.1 و روشSimilarity matrix و Neighbor-joinig (Bootstrapped-1000 replication) انجام گرفت.

نتایج و بحث

بررسی میزان آلودگی ویروس

نتایج حاصله از این تحقیق نشان می‌دهد که عامل ایجاد موزائیک رگبرگ روشنی بر روی خربزه در خراسان رضوی و شمالی ویروس موزائیک کدو می‌باشد. طی نمونه‌برداری‌های انجام شده از مزارع کدوئیان استان خراسان رضوی و شمالی، تعداد ۴۶ نمونه از ۲۷۰ نمونه مورد آزمون، آلوده به ویروس موزائیک کدو تشخیص داده شدند و آلودگی به ویروس مذکور در هر دو استان بر روی خانوادهٔ کدوئیان مورد تائید قرار گرفت. درصد آلودگی در استان خراسان رضوی ۶۱ درصد و در استان خراسان شمالی ۰/۰۸ درصد و در مجموع در هر دو استان ۶۱/۸ درصد تخمین زده شده است. از این میان بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به شهرستان‌های تربت جام و سبزوار با ۲۷ درصد و صفر درصد بود. جهت تعیین دامنه میزبانی از آفتابگردان‌های حاشیه مزرعه، گوجه فرنگی، بادمجان و چغندرقندهای کشت شده در مزارع مجاور، که به ترتیب مربوط به خانواده های *Brassicaceae, Asteraceae, Solanaceae* بودند، نمونه‌برداری بعمل آمد ولی هیچ یک از نمونه‌های نام برده به جزء آفتابگردان در آزمون الایزا مثبت ارزیابی نشدند که این موضوع مطابق با نتایج ایزدپناه (۱۹)، بوده و نشان می‌دهد که دامنهٔ میزبانی SqMV محدود به خانوادهٔ کدوئیان می‌باشد. از میان آفتابگردان‌های جمع‌آوری شده تنها ۲ نمونه به واکنش الایزا واکنش مثبت نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۳-آلودگی شهرستان‌ها،تعدادکل نمونه‌ها (اعم از آلوده و غیر آلوده) و نمونه‌های آلوده به SqMV

منطقه	محصول	تعداد مزارع مورد بررسی	تعداد نمونه‌های مثبت	تعدادکل نمونه‌ها	*درصد آلودگی (درصد)
تربت جام	M,Z,S,C	۵	۱۰	۳۶	۰/۲۷
نیشابور	M,Z,C,S	۱۱	۲	۸۰	۰/۰۲۵
مشهد و تربت حیدریه	Z,M,Ca,S	۹	۳۰	۹۳	۰/۳۲
بجنورد و شیروان	M,S,Z	۵	۴	۵۰	۰/۰۸
سبزوار	M,Z,C	۳	۰	۱۱	۰

(در جدول بالا Ca;Cantaloup،S; Sunflower، C; Cucumber ، Z; Zucchini ،W;Watermelon, M; Melon می‌باشد)

*- درصدآلودگی از تقسیم تعداد نمونه‌های مثبت بر تعداد کل نمونه‌ها به‌دست آمده است.

کاهش آلودگی به ویروس فوق، در شیروان و بجنورد می‌تواند به عواملی نظیر پائین بودن سطح زیر کشت کدوئیان در این مناطق، کشت تک محصولی در مزارع، نبود میزبان‌های واسط برای ناقلین و استفاده از ارقام مقاوم تر در کنار شرایط محیطی نسبت داده شود.

بررسی خصوصیات بیولوژیکی ویروس

از تلقیح مکانیکی SqMV با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار بر روی گیاهان محک ذکر شده در جدول۴، جهت نگهداری و تکثیر ویروس استفاده گردید (۱۶).

علائم ظاهر شده با سایر منابع مطابقت داشت، به‌طوری‌که در گیاه محک خربزه۱۴-۱۰ روز پس از مایه‌زنی با ویروس، علائم رگبرگ روشنی مشاهده گردید که با نتایج ایزدپناه (۱۹)، مطابقت دارد. همچنین بر روی طالبی علائم رگبرگ روشنی و لکه‌های کلروز پس از ۱۱ روز مشاهده گردید که با نتایج لوکارت (۲۰) مطابقت داشت. بر روی خیار در برگ‌های حقیقی اولیه نقاط زرد رنگ همراه با علائم رگبرگ روشنی دیده شد که این علائم در برگ‌های بعدی محو گشتند که با نتایج کوهن و نیتزانی (۷) مطابقت داشت. بر روی سایر گیاهان محک علائمی مشاهده نگردید (شکل ۱). نلسون و نوستن در سال ۱۹۷۳دو سروتیپ را برای SqMV شناسایی کردند (۲۱). سروتیپ ۱ گسترش بیشتری داشته و رگبرگ نواری و یا موزائیک شدید را بر روی خربزه ایجاد می‌کند و علائم لکه حلقوی یا موزائیک خفیف را بر روی کدو ایجاد می‌کند. جدایه‌های ژاپنی (۱۴) و مراکشی (۲۰) ویروس موزائیک کدو به عنوان سروتیپ ۱ شناخته شدند. بررسی علائم ایجاد شده، دامنه میزبانی و آزمون سرولوژیکی نشان می‌دهد که جدایه مربوط به تربت جام نیز متعلق به سروتیپ ۱ می‌باشد.

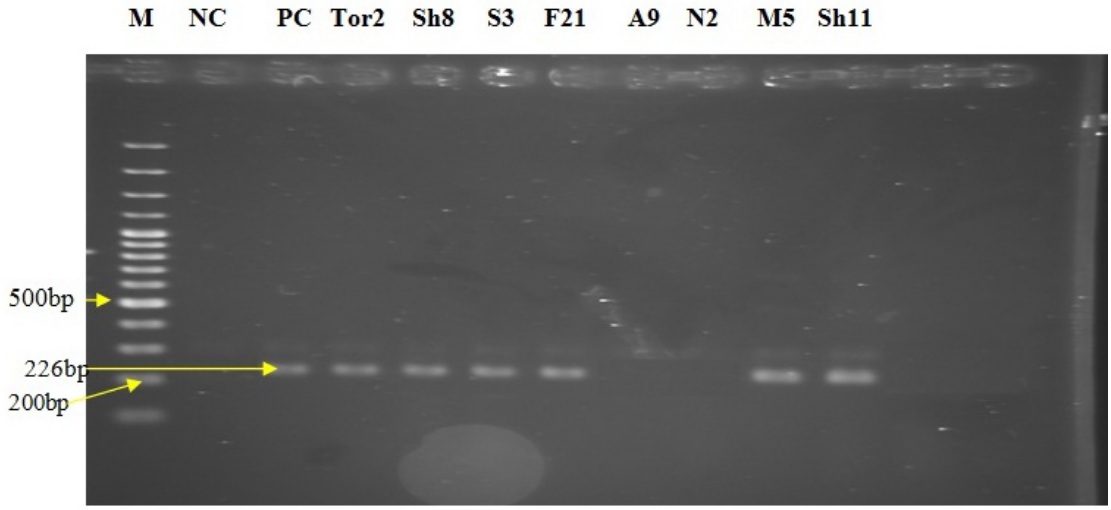
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) - نسخه‌برداری معکوس

به منظور شناسایی سریع و دقیق علاوه بر روش سرولوژی و دامنه میزبانی از روش واکنش زنجیره پلیمراز-نسخه‌برداری معکوس استفاده گردید.

جدول ٤- لیست گیاهان محک مورد استفاده جهت نگهداری و تکثیر ویروس و سن مایه‌زنی آن‌ها

گیاهان محک	نام فارسی	نحوه کاشت	ویروس تلقیح شده	سن مایه زنی
Chenopodium quinoa	سلمه تره	خزانه	SqMV	۶-۴ برگی
C.amaranticolor	سلمه تره	خزانه	SqMV	۶-۴ برگی
Cucumis melo	خربزه	خزانه	SqMV	برگ های کوتیلدونی
C.melo var.flexousus	طالبی	خزانه	SqMV	برگ های کوتیلدوتی
Cucumis sativus	خیار	خزانه	SqMV	برگ های کوتیلدونی
Citrullus lanatus	هندوانه	خزانه	SqMV	برگ های کوتیلدونی
Cucurbita pepo	کدو مسمایی	خزانه	SqMV	برگ های کوتیلدونی
Gomphorna globosa	گل دکمه ای	مستقیم	SqMV	۶-۴ برگی

شکل۱- علائم ویروس موزائیک کدو بر روی تعدادی از گیاهان محک در گلخانه



شکل ۲- نتیجه الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جدایه های مختلف ویروس موزائیک کدو بوسیله جفت پرایمر M.Sq-F/Sq-R مارکر مولکولی (GeneRulerTM 1Kb).NC شاهد منفی، PC : شاهد مثبت، Tor2 : نمونه مثبت از تربت جام (خربزه، Sh8 : نمونه مثبت شیروان (آفتاب گردان)، S3 نمونه مثبت از مشهد (خربزه)، F21 : نمونه مثبت از تربت حیدریه (خربزه)، A9 : نمونه از سبزوار (هندوانه)، N2 : نمونه از نیشابور (خیار)، M5 : نمونه مثبت از مشهد (کدو)، Sh11 : نمونه مثبت از شیروان (کدو)

آر.ان.ای کل از نمونه‌های آلوده به ویروس، استخراج شده و با استفاده از آغازگرهای F-Sq و R-Sq قطعه‌ای در حدود ۲۲۶bp مربوط به توالی قسمتی از ژن protease-cofactor از نمونه‌های دارای علائم SqMV شامل Tor2, Sh11, Sh8, S3, F21, A9, N2, M5, تکثیر گردید. این باند در آموده حاصل از گیاه سالم تشکیل نشد و اختلافی نیز در بین باندهای نمونه‌های آلوده مشاهده نگردید، از نمونه مربوط به A9 و N2 باندی مشاهده نگردید (شکل۲).

ترادف نوکلئوتیدی

ترادف نوکلئوتیدی به منظور تعیین فاصله ژنتیکی جدایه مورد بررسی با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژنی EMBL تحت شمارهٔ پذیرش AB054688.1(Y-SqMV), EU421059 .1 (CH99/211) و در بانک ژنی Gene-Bank تحت شماره پذیرش NC_003549.1(CPMV), U70866.1 (BPMoV), NC_003741.1(RCMoV) مورد مقایسه قرار گرفت. بیشترین تشابه (Similarity) بین جدایه مورد بررسی (Tor2) و جدایه ژاپن (Y-SqMV) به میزان ۹۷ درصد تعیین گردید.

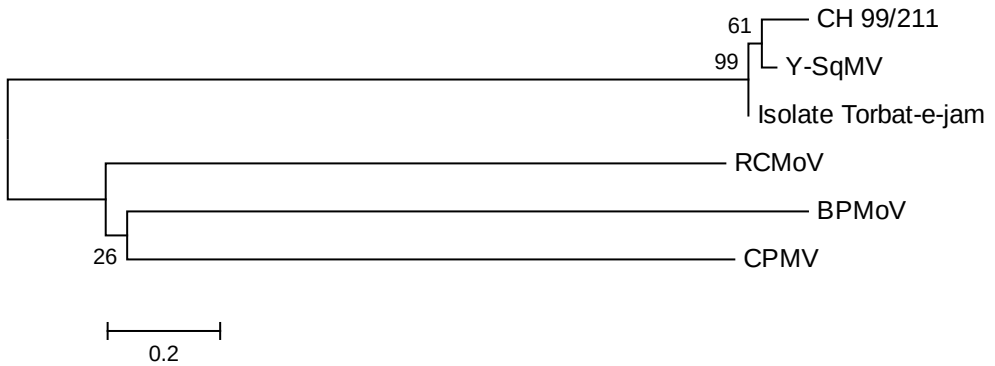
Clustal alignment برای مقایسه درصد تشابه نوکلئوتید و اسید آمینه قطعه مورد بررسی، مورد استفاده قرار گرفت. در صد تشابه نوکلئوتید بین ۹۷ درصد برای جدایه تربت جام و ژاپن تا ۸ درصد برای دو جدایه تربت جام و Red Clover Mottle Virus (Comovirus) می‌باشد (جدول۴). درصد تشابه پروتئین از ۸۴ درصد بین دو جدایه تربت جام و ژاپن تا ۶ درصد بین دو جدایه CPMV و BPMoV می‌باشد.

جدول ۵- درصد تشابه نوکلئوتید و اسید آمینه بین جدایه تربت جام و جدایه‌های ثبت شده در Gene-Bank

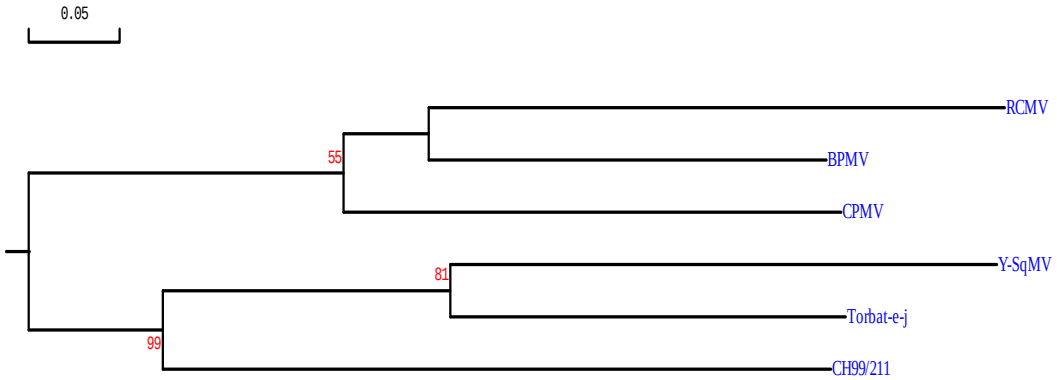
	1- CPMV	2-CH99/211	3-BPMoV	4-RCMoV	5-Y-SqMV	6-Torbat-e-jam
1	100	50	51	53	14	15
2	6	100	44	52	90	91
3	6	12	100	50	11	25
4	20	6	8	100	16	8
5	11	61	21	11	100	97
6	10	64	17	14	84	100

اعداد بالای ۱۰۰ مربوط به نوکلئوتید و اعداد زیر ۱۰۰ مربوط به اسید آمینه است.

درخت فیلوژنتیکی بر اساس درصد تشابه نوکلئوتید و اسیدآمینه با استفاده از نرم افزار MEGA4.1 رسم گردید. نتایج حاصله نشان می‌دهد که جدایه تربت جام همراه با جدایه ژاپن و چین در یک clade جداگانه قرار می‌گیرد (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳- درخت فیلوژنی بر اساس تشابه توالی نوکلئوتیدی بین جدایه تربت جام و سایر جدایه‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA4.1



شکل ٤ – درخت فیلوژنی بر اساس تشابه توالی اسید آمینه بین جدایه تربت جام و سایر جدایه‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA4.1

منابع

۱–جعفرپور ب. ۱۳۷۰. روش‌های تشخیصی ویروس‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۲۰۷ صفحه.

۲–ماتیوس آر. ای. اف. ۱۳۸۱. مبانی ویروس شناسی گیاهی. ترجمه پوررحیم ر.، فرزاد فر ش.، و گلنراقی ع. انتشارات سامان پیشه گستر. ۴۵۷ صفحه.

۳–واکی د. ۱۳۸۲. ویروس شناسی گیاهی. ترجمه جعفرپور ب و جعفرپور ب. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۶۰ صفحه.

4- Alvarez M. and Campbell R.N. 1978.Transmission and distribution of Squash Mosaic Virus in seed of cantaloupe. Phytopathology, 68:257-263.

5-Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J. and Gibbs A.J. 1997. Viruses of plants, Descriptions and lists from wide database. CAB international. 140pp.

6-Clark M.F. and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immuno Sorbant Assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34:475-483

7-Cohen S. and Nitzany F.E. 1963. Identify of viruses affecting cucurbits in Israel. Phytopathology, 53:193-196.

8-Ebrahim-Nesbat T.F. 1974. Disturbtion of Watermelon Mosaic Virus 1 and 2 in Iran. Phytopathology, 79: 352-358.

9-Franken A.A.J.M., Maat D.Z. and Kamminga G.C. 1990. Detection of Squash Mosaic Virus in seeds of melon (Cucumis melo) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELIZA). Netharlands Journal of Plant Pathology, 96:91-102.

10-Fletcher J.D. 2000. Mosaic viruses of squash. Crop and Food Research, Broad Sheet 66.4 pp.

11-Freitag J.H.1956. Beetle transmission, host rang and properties of Squash Mosaic Virus. Phytopathology, 46: 73-81.

12-Gerber R.S. 1969. Viruses infecting cucurbits in Queensland. Queens Land .J.Agric.Anim . Sci, 26:145-171.

13-Goldbach R.W. and Wellink J .1996. Comoviruses: molecular biology and replication. In: Harrison BD, Murant AF (eds) The plant viruses, Vol5: Polyhedral virions and bipartite RNA genomes. Plenum Press, New York, London, 35-76 pp.

14-Han S.S., Yoshida K., Karasev A.V. and Iwanami T. 2002. Nucleotide sequence of a Japanese isolate of Squash Mosaic Virus. Archives of Virology, 147:437-443.

15-Haudenshield J.S. and Palukaitis P. 1998. Diversity among isolates of Squash Mosaic Virus. Journal of General Virology, 79:2331-2341.

16-Izadpanah K. 1970. Studies on the viral disease of plants in Shiraz and it's vicinity. Progress Reports, Collage of Agriculture, Shiraz Univ,46-62 pp.

17-Izadpanah K. 1983. An Annotated List of Virus and Virus like Disease of Plants in Fars. Collage of Agriculture, Shiraz Univ. (Farsi, English index). 188p.

18-Izadpanah K. 1986. Unreported disease of cucurbits in the Bushehr Province. p122. Proc. 8th Plant Protecection. Cong. Isfahan. Iran.

19-Izadpanah K. 1987.Squash mosaic virus as the cause of melon vein banding mosaic in Iran. Phytopathology, 120: 276–282.

20-Lockhart B.E.L., Ferji Z. and Hafidi B. 1982. Squash mosaic virus in Morocco. Plant Disease, 66: 1191-1193.

21-Nelson M.R. and Knuhtsen H.K. 1973. Squash Mosaic Virus variability: Review and serological comparison of six biotypes. Phytopathology, 63: 920-926.

22-Shindo N., Brioso P.S.T., Vicente A.C.P., Krengiel R., Felix D.B., Bauw G. and Oliveria D.E.D. 1992. Molecular cloning and sequence analysis of an Andean potato mottle virus cDNA clone encoding the major coat protein. Plant Physiology, 100: 539-541.

23- Thomas W. 1973. Seed-transmitted squash mosaic virus. N.Z.J. Agriculture. Research, 16: 561-567.

24-Wellink J., Le Gall O., Sanfacon H., Ikegami M. and Jones. 2000. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds) Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, 691-701pp.