نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، ص. ۱۵-۹

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 1, Spring 2015, P. 9-15

شناسایی ویروس موزائیک کلم گل با روش‌های سرولوژیکی و مولکولی در استان‌های خراسان رضوی و شمالی

آزاده انتظاری[۱*]- بهروز جعفرپور[۲]- محسن مهرور[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۳/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۴/۱۱

چکیده

ویروس موزائیک کلم گل عضو تیپ جنس *Caulimovirus* از خانواده *Caulimoviridae* می‌باشد. این ویروس با ژنوم دی ان ای حلقوی دو رشته‌ای یکی از مهم‌ترین ویروس‌های خسارت‌زای خانواده کروسیفر می‌باشد. به منظور شناسایی ویروس موزائیک کلم گل (CaMV[۴])، در تابستان سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ از مناطق کشت کلم گل در استان‌های خراسان رضوی و شمالی تعداد ۳۴۳ نمونه مشکوک به آلودگی جمع‌آوری شد. آلودگی نمونه‌ها با کمک روش سرولوژیکی DAS-ELISA[۵] و با استفاده از آنتی‌سرم پلی کلونال تعیین شد. جهت تایید آلودگی نمونه‌ها با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی یک قطعه از ژنوم به اندازه ۱۴۰۰ جفت باز واقع در ناحیه پروتئین پوششی به روش PCR[۶] تکثیر شد. محصولات PCR تعیین توالی شدند و اطلاعات حاصل از آن با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردیدند. رسم درخت فیلوژنی برای ژن پروتئین پوششی CaMV با استفاده از نرم افزار MEGA5 و بکارگیری روش Neighbour joining نشان داد که جدایه‌های ایرانی زیر گروه مستقلی را تشکیل داده و همراه با جدایه هایی از چین و مجارستان در گروه جدایه‌های غیر آمریکای شمالی و مجزا از گروه جدایه‌های آمریکای شمالی قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: ویروس موزائیک کلم گل، پروتئین پوششی، DAS-ELISA، PCR

مقدمه

کلم گل (*Brassica oleracea var botrytis* L.) یکی از پرارزش‌ترین فرآورده‌های کشاورزی است که قسمت خوراکی آن یعنی غنچه‌های باز نشده که مجموعاً به‌صورت کپه‌ای، متراکم و سفیدرنگ دیده می‌شوند، به طرق مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. تولید جهانی کلم گل از ۴/۶۳ میلیون تن در سال ۱۹۸۱-۱۹۷۹ تا ۸/۸۶ میلیون تن در سال ۱۹۹۱-۱۹۸۹ و ۱۵/۷۲ میلیون تن در سال ۲۰۰۱ متغیر بود (۱۷). در سال‌های اخیر سطح زیر کشت محصولات تیره کلم به‌خصوص کلم گل نیز در ایران افزایش یافته است (۸).

بیماری‌های ویروسی متعددی برروی انواع مختلفی از سبزیجات اثر کرده و باعث بروز علائم بیماری و به دنبال آن کاهش کمیت و بازده محصول می‌شود. تعداد زیادی از ویروس‌های بیماری‌زا که باعث کاهش عملکرد محصول در گیاهان خانواده کروسیفر می‌شوند، در سرتاسر جهان پراکنده شده‌اند که یکی از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده کننده این گروه، ویروس موزائیک کلم گل (CaMV) بوده که گسترش زیادی خصوصاً در مناطق معتدل نظیر آفریقا، آسیا، نیوزلند، آمریکا، شوروی و چندین کشور دیگر دارد. میزان آلودگی CaMV بر روی سبزیجات خانواده کروسیفر ۶۰ درصد گزارش شده است (۱۷). در ایران این ویروس به عنوان اصلی‌ترین بیماری ویروسی در گیاهان خانواده کروسیفر شناخته شده است (۱۶).

ویروس موزائیک کلم گل عضو تیپ جنس *Caulimovirus* از خانواده *Caulimoviridae* متعلق به گروه پارارتروویروس‌های[۷] گیاهی می‌باشد (۱۰)، که اولین بار از ایالات متحده آمریکا در سال ۱۹۳۷ توسط Tompkins از روی دو گونه *Brassica campestris* و *Brassica oleracea* گزارش شد (۴).

ژنوم این ویروس از نوع دی ان ای حلقوی دو رشته‌ای به اندازه تقریبی ۸۰۰۰bp در برگیرنده ۸-۶ چارچوب ژنی بوده (۲) که درون

۱، ۲، ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، استاد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: ez.entezari@yahoo.com)

4 - Cauliflower mosaic virus
5 -Double-Antibody Sandwich-Enzyme Linked
6 - Polymeras Chain Reaction
7 - Pararetroviruses

پوشش پروتئینی چند وجهی به قطر ۵۰nm با تقارن ۲۰ وجهی (T=7) قرار می‌گیرد (۱ و ۷). در میان چارچوب‌های ژنی ویروسی صرفاً چارچوب‌های I-VI به خوبی شناخته شده‌اند و دارای عملکردهای بیولوژیکی مشخصی می‌باشند. محصولات ژن‌های IV-VI اساساً در پروسه تکثیر و شکل‌گیری ویریون‌ها دخالت دارند در حالی‌که محصولات ژن‌های I-III در ارتباط با عملکردهای مربوط به گیاه میزبان می‌باشند (۱۱).

یکی از نکات جالب توجه در مورد ژنوم ویروس وجود ناپیوستگی‌های تک رشته‌ای در ساختار حلقوی ژنوم بوده، به طوری که یکی از آن‌ها بر روی یک رشته و دو ناپیوستگی دیگر برروی رشته دیگری قرار گرفته‌اند. این ناپیوستگی‌ها بعد از ورود دی.ان.ای ژنومی ویروس به داخل هسته میزبان از بین رفته و به صورت یک مولکول پیوسته قابل مشاهده است. موقعیت ۳ شکاف در تمام جدایه‌های مورد مطالعه به جزء جدایه CM1841 که دستخوش حذف شده است، حفاظت شده می‌باشد (۹ و ۱۱).

تکثیر درCaMV همانند سایر پارارتروویروس‌ها از نوع نسخه برداری معکوس بوده که از طریق یک آر.ان.ای حدواسط (RNA intermediate) انجام می‌شود (۱۰).

اغلب جدایه‌های این ویروس به روش ناپایا و به‌وسیله شته ناقل *Myzus persicae* منتقل می‌شوند هرچند که بعضی از جدایه‌های ویروسی از طریق شته قابل انتقال نیستند. این ویروس از طریق مکانیکی نیز منتقل می‌شود. فرآیند انتقال CaMV توسط شته از استراتژی کمکی (helper strategy) پیروی کرده که بر این اساس حضور یک مؤلفه کمکی[1] یا یک پروتئین غیر ساختاری ویروسی جهت واسطه انتقال توسط ناقل ضروری است (۱۸). فاکتور انتقال پلی پپتیدی به وزن ۱۸۰۰۰ دالتون به نام P۱۸ است که محصول چارچوب ژنی ۲(ORF2)[2] در ژنوم ویروس می‌باشد (۱۸).

جدایه‌های مختلف ویروسی آلوده کننده تعداد زیادی از گیاهان خانواده کروسیفر بوده هرچند تعداد اندکی از این ویروس‌ها قادرند تعدادی از گونه‌های سولاناسه نظیر *Datura stramonium* و *Nicotiana bigelovii* و چندین گونه دیگر را آلوده کنند (۱۳). جدایه‌های CaMV از نظر قابلیت آلودگی گونه‌های سولاناسه و هم‌چنین علائمی که در میزبان‌های معمول خود نظیر شلغم (*Brassica rapa* L.) و آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) ایجاد می‌کنند باهم متفاوت‌اند (۶).

ویروس موزائیک کلم گل باعث ایجاد علائم گوناگونی نظیر موزائیک (Mosaic)، رگبرگ روشنی (Vein clearing)، رگبرگ نواری (Vein banding)، بدشکلی برگ (Leaf deformation)، سبزردی (Chlorosis) و بازماندن از رشد (Stunting) در گیاهان آلوده می‌شود (۵، ۱۳،۸ و ۱۵). علائم ممکن است به صورت پوشیده (Masked) و به طور مزمن خصوصاً در درجه حرارت بالا در گیاهان آلوده ظاهر شوند (۱۶).

آلودگی کلم گل به ویروس CaMV قبلاً توسط فرزادفر و همکاران (۸) از ایران گزارش شده است. فرزادفر و همکاران (۸) برخی از خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی CaMV را درجدایه‌های ایرانی تعیین کردند. نظر به این‌که استان خراسان یکی از مراکز تولید سبزیجات و به‌خصوص کلم گل در سطح کشور است، در این تحقیق ما وجود این ویروس را در کلم کاری‌های استان‌های خراسان رضوی و شمالی بررسی نمودیم. این اولین گزارش از وقوع ویروس موزائیک کلم گل در استان خراسان شمالی و بعضی از شهرستان‌های خراسان رضوی نظیر تربت حیدریه، قوچان، گناباد، فریمان و تربت جام است، که جهت بررسی خصوصیات مولکولی ویروس، ژن شماره ۴ (ORF IV) ویروسی مربوط به چهار جدایه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و سپس تعیین ترادف شده، نهایتا با اطلاعات موجود در بانک ژن مقایسه گردیدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و ردیابی ویروس با روش الایزا

در تابستان سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ از مناطق زیر کشت کلم گل در استان‌های خراسان رضوی و شمالی تعداد ۳۴۳ نمونه که عمدتاً دارای علائم رگبرگ روشنی، رگبرگ نواری، موزائیک و بدشکلی برگ بودند، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در شرایط خنک و برروی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت بررسی وجود ویروس در نمونه‌ها، آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA به روش کلارک و آدامز با اندکی تغییرات و با استفاده از آنتی سرم پلی کلونال تهیه شده از شرکت آلمانی DSMZ انجام شد.

نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الایزاخوان و در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با در نظر گرفتن میزان جذب عصاره برگ سالم کنترل منفی و با استفاده از فرمول 3X آستانه جذب گیاهان سالم تعیین و ارقام بالاتر از این مقدار به عنوان نمونه آلوده مشخص و درصد آلودگی مناطق مختلف تعیین گردید. در این فرمول 3X میزان جذب شاهد منفی است.

نگهداری ویروس

جهت نگهداری نمونه‌های آلوده، بخشی از این نمونه‌ها در حرارت معمولی در آزمایشگاه خشک گردیدند و تعداد دیگری از نمونه‌ها در فریزر ۲۰- نگهداری شدند تا در صورت لزوم جهت استخراج مورد استفاده قرار گیرند.

1 - Helper Component
2 - Open Reading Frame

شناسایی مولکولی ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

نمونه‌هایی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند با استفاده از روش CTAB جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. جهت انتخاب نمونه‌های مناسب برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، غلظت DNA استخراج شده در نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ توسط دستگاه نانودراپ تعیین و بهترین کیفیت DNA استخراج شده مشخص گردید. در این واکنش از جفت آغازگرهای اختصاصی سنتز شده توسط شرکت تکاپوزیست با نام‌های
CMcp-F1
(5'-TGGCCGAATCAATTTTAGACC-3') و
CMcp- R1
(5'-CTCAGTCTGAGTCTGAATCTG-3')
مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن کد کننده پروتئین پوششی به اندازه تقریبی ۱۴۰۰bp استفاده شد. آزمون PCR با استفاده از کیت تهیه شده از شرکت Bioneer در حجم ۲۰ میکرولیتر مطابق با دستورالعمل اشاره شده در جدول ۱ صورت گرفت. نهایتاً محصولات به‌دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به همراه مارکر مولکولی در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند (شکل۱).

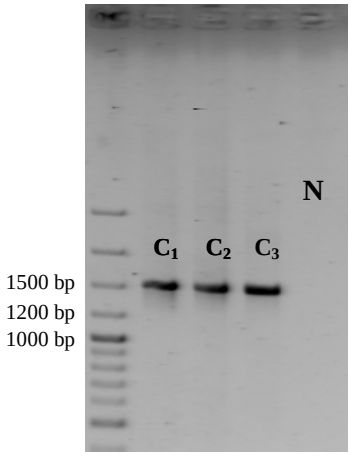
تعیین توالی بخشی از پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی CaMV

جهت تایید وجود ویروس در استان‌هایی که نمونه‌برداری در آن‌ها صورت گرفته بود و هم‌چنین بررسی جایگاه فیلوژنی جدایه‌های ایرانی در میان سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن (جدول۲)، محصول PCR چهار جدایه مربوط به مشهد، تربت حیدریه، قوچان و بجنورد برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید تا پس از توالی یابی ژنوم ویروس بررسی‌های تکمیلی صورت گیرد.

نتایج و بحث

بررسی میزان آلودگی ویروس

در تابستان سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ از مناطق عمده کاشت کلم گل در استان‌های خراسان رضوی شامل:



شکل۱- الکتروفورز محصول PCR ویروس CaMV بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی CMcpF1/CMcpR1 و مشاهده باند مربوط به ژن پروتئین پوششی. ویروس در محدوده ۱۴۰۰ جفت باز دارای باند می‌باشد. در تصویر، M مارکر مولکولی، N شاهد منفی، C1 نمونه بجنورد، C2 نمونه تربت حیدریه و C3 نمونه مشهد می‌باشد.

جدول۱- برنامه استفاده شده جهت انجام آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی

ردیف	مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان(برحسب ثانیه)	تعداد سیکل
۱	واسرشت‌سازی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
۲	واسرشت‌سازی	۹۴	۵۰	۳۵
۳	اتصال	۵۵	۶۰	
۴	بسط	۷۲	۱۲۰	
	مرحله تکمیل پلیمریزاسیون	۷۲	۶۰۰	۱

مشهد و حومه، قوچان، فریمان، نیشابور، گناباد، تربت حیدریه، تربت جام و در استان خراسان شمالی از شهرستان های بجنورد و شیروان تعداد ۳۴۳ نمونه مشکوک به آلودگی جمع‌آوری شد، که جهت بررسی وجود آلودگی در ابتدا نمونه‌ها با استفاده از روش سرولوژیکی DAS-ELISA مورد بررسی قرار گرفتند. نهایتاً نتایج بر اساس مشاهده چشمی و هم‌چنین تعیین میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه الایزا خوان بیانگر وجود آلودگی در تمام مناطق نمونه‌برداری شده بود، که البته از نظر شدت ومیزان آلودگی باهم متفاوت بودند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج DNA به روش CTAB انجام شد و بهترین کیفیت DNA استخراج شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کار رفت. آغازگرهای اختصاصی CMcp-F1/CMcp-R1 قطعاتی به طول تقریبی ۱۴۰۰ جفت باز مربوط به بخشی از پروتئین پوششی این ویروس را تکثیر کرد. این آغازگرها کاملاً اختصاصی بوده و ترادف نوکلئوتیدی مشابه‌ای را در گیاه تکثیر نکردند. عدم تکثیر هیچ قطعه‌ای در نمونه شاهد منفی و تکثیر قطعه‌ای با طول مورد نظر در شاهد مثبت تاییدی بر اختصاصی بودن پرایمرها بود.

تعیین توالی بخشی از پروتئین پوششی ویروس موزائیک کلم گل

جهت تکمیل بررسی‌های انجام شده، ۴ جدایه از میان سایر جدایه‌های ویروسی جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید. جستجو با استفاده از ابزار Blast[1] (۳) تائید نمود که این ترادف‌ها با ORF IV ویروس موزائیک کلم گل مطابقت دارد.

در ORF IV ویروس موزائیک کلم گل که کد کننده پروتئین پوششی ویروس می‌باشد می‌توان حضور RNA binding domain (موتیف Zinc finger) را به صورت آرایش $CX_2CX_4HX_4C$ مشاهده نمود، که X هرنوع اسیدآمینه‌ای می‌تواند باشد. هم‌چنین در این ناحیه موتیف آمینواسیدی حفاظت شده EG/KHYANECP نیز وجود دارد که بخشی از توالی پروتئین پوششی ویروس بوده و شامل دمین اتصال یافته با RNA است. قسمتی از این موتیف (HX_4C) که به صورت HYANECP می‌باشد در تمام *Caulimoviruses* شناخته شده، به جز در ویروس رگبرگ نواری توت فرنگی (SVBV)[2] حفاظت شده است (۱۲).

در هم ردیف‌سازی توالی آمینواسیدی مربوط به ژن CP، این دمین حفاظت شده در بین جدایه‌های مختلف CaMV ازجمله جدایه‌های ایرانی این ویروس مشاهده شد که با یافته‌های سایر محققین مطابقت داشت (۱۲ و ۱۴) (شکل۲).

در این تحقیق به منظور مطالعه بخشی از پروتئین پوششی ویروس و تعیین جایگاه جدایه‌های ایرانی در مقایسه با سایر جدایه‌های دنیا، درخت فیلوژنی مربوط به این ژن با استفاده از نرم افزار MEGA5 و با روش Neighbour joining، با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap رسم شد. بر اساس درخت رسم شده جدایه‌های ویروسی در دو گروه اصلی شامل آمریکای شمالی (North-American) و غیر آمریکای شمالی (non-North-American) گروه‌بندی می‌شوند (۶). همان‌طور که در درخت رسم شده مشاهده می‌نمایید تنها استثناء جدایه‌ای از فرانسه به نام B_{29} (X79465) می‌باشد که در گروه جدایه‌های آمریکای شمالی قرار می‌گیرد. جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک کلم گل زیر گروه مستقلی را تشکیل داده و همراه با جدایه‌هایی از چین و مجارستان گروه جدایه‌های غیر آمریکای شمالی را تشکیل می‌دهند (شکل ۳).

در این مطالعه به دلیل نزدیکی منشاء فیلوژنی که میان CaMV و ویروس خراشک حلقوی میخک (CERV[3]) از گروه *Caulimoviruses* وجود داشت، باعث شد که از آن به عنوان Outgroup در این آنالیزها استفاده کنیم (۶).

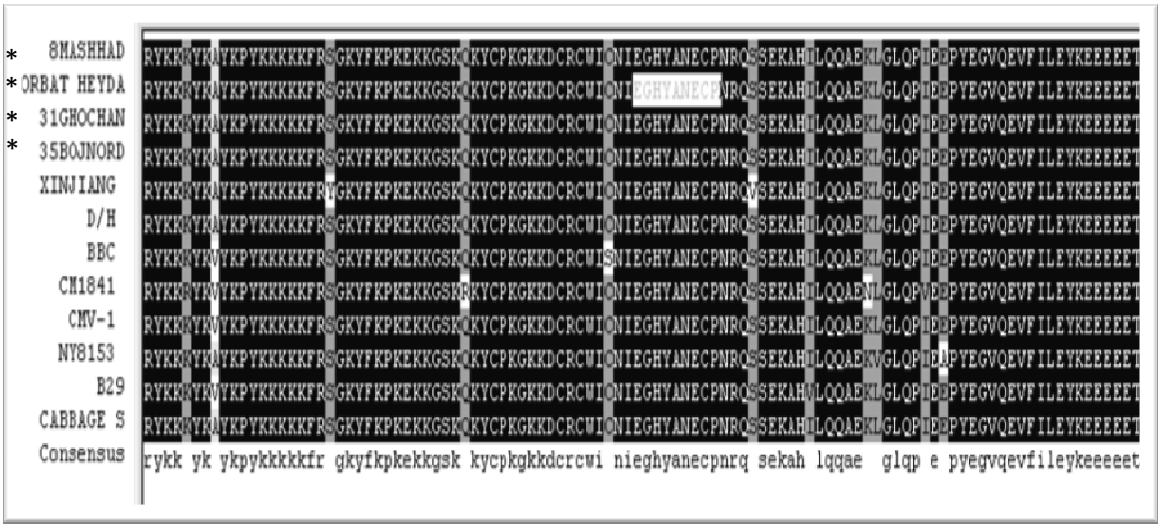
هم‌چنین هم ردیف‌سازی چندگانه این ژن در برنامه DNAMAN نشان داد که جدایه‌های ایرانی بیش‌ترین تشابه را در سطح نوکلئیک اسیدی با جدایه‌هایی از چین (AF140604) و مجارستان (M10376) (۹۷-۹۶ درصد) و کم‌ترین تشابه را با جدایه‌ای از آمریکای شمالی به نام NY8153 (M90541) به میزان ۹۳ درصد دارا می‌باشند (جدول ۳).

نتیجه‌گیری کلی

در سال‌های اخیر سطح زیر کشت محصولات تیره کلم خصوصاً کلم گل افزایش یافته به طوری که سطح زیر کشت این محصول از ۸۰۰ هکتار با تولید ۲۰ هزار تن در سال ۲۰۰۰، به ۱۰۰۰ هکتار با تولید ۲۵ هزار تن در سال ۲۰۰۳ رسیده است (۸). در این تحقیق با توجه به افزایش سطح زیر کشت این محصول و اهمیت آن در میان گیاهان باغی از نظر تغذیه‌ای، تصمیم بر شناسایی یکی از ویروس‌های مهم و خسارت‌زای این محصول یعنی ویروس موزائیک کلم گل در استان گرفته شد. که پس از بررسی‌های آزمایشگاهی، چهار جدایه ایرانی ویروس پس از توالی‌یابی ژنومی همراه با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفتند. که نتایج مقایسه انجام

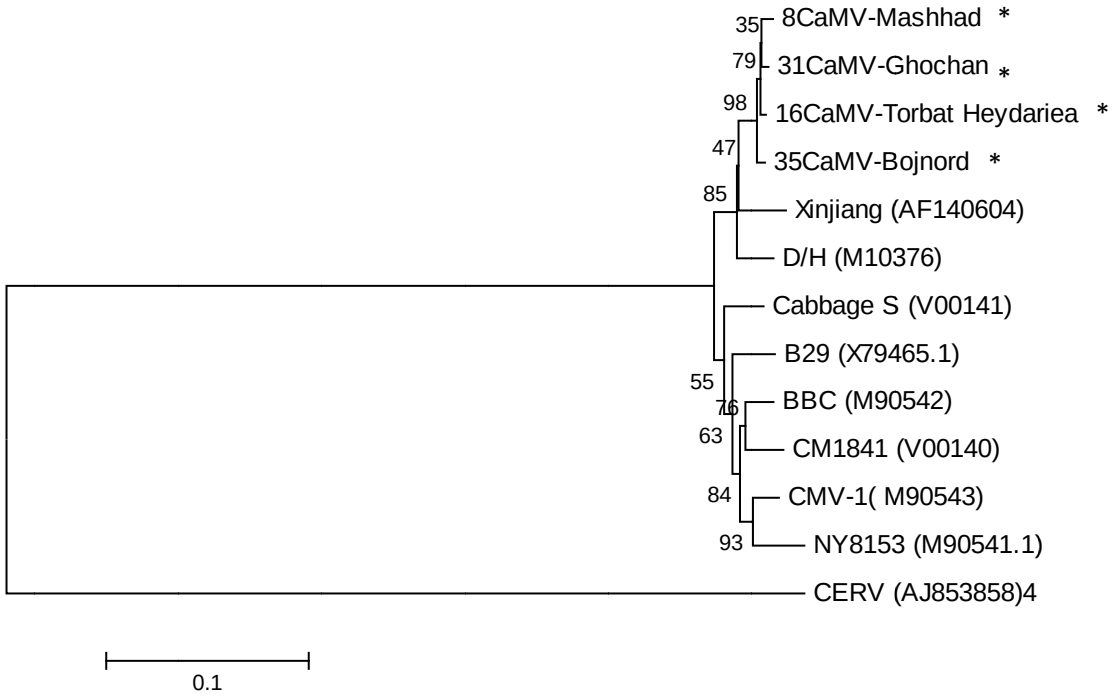
1 - Basic Local Aligment Search Tool
2- Strawberry vein banding virus
3- Carnation etched ring virus

گرفته حاکی از تشابه بالا ۹۷-۹۶ درصد این جدایه‌ها بـا دو جدایـه از چین و مجارستان در سطح نوکلئیک اسیدی بود.



شکل۲- هم ردیف‌سازی چند گانه ترادف‌های آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی CaMV با سایر ژن‌های موجود در بانک ژن که توسط نرم افزار DNAMAN ترسیم شده است. دمین حفاظت شده zinc finger با آرایش CX2CX4HX4C و دمین مربوط به بخشی از پروتئین پوششی اتصال یافته با RNA به صورت EG/KHYANECP در تصویر نشان داده شده است.

***- توالی‌های آمینواسیدی جدایه‌های ایرانی**



شکل۳ - درخت فیلوژنی ترسیم شده به روش Neighbour joining (bootstrap- × 1000) بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی CaMV با استفاده از نرم افزار MEGA 5

جدول۲ - جدایه‌هایی از CaMV موجود در بانک ژن جهت مقایسه با جدایه‌های ایرانی

نام جدایه	منطقه	شماره توالی
Xinjiang	چین	AF140604
B29	فرانسه	X79465
CMV-1	آمریکا (کالیفرنیا)	M90543
NY8153	آمریکا (نیویورک)	M90541
D/H	مجارستان	M10376
Cabbage S	ایتالیا	V00141
BBC	آمریکا (کالیفرنیا)	M90542
CM1841	آمریکا (کالیفرنیا)	V00140

جدول۳- ماتریکس تشابه رسم شده برای جدایه‌های ایرانی CaMV در مقایسه با سایر جدایه‌های دنیا

Xinjiang	100%											
D/H	95.8%	100%										
BBC	94.2%	94.5%	100%									
CM1841	93.6%	94.1%	96.8%	100%								
CMV-1	93.3%	94.1%	96.4%	96.1%	100%							
NY8153	92.5%	93.2%	95.0%	94.9%	96.1%	100%						
B29	93.9%	94.7%	95.8%	95.5%	95.8%	94.5%	100%					
Cabbage S	94.5%	94.7%	95.2%	94.3%	95.8%	94.4%	96.0%	100%				
Torbat.H	96.4%	96.8%	94.4%	94.1%	94.1%	92.9%	94.1%	94.8%	100%			
Mashhad	96.0%	96.5%	94.8%	94.6%	94.3%	93.1%	94.2%	94.9%	98.9%	100%		
Bojnord	96.4%	96.7%	94.9%	94.3%	94.4%	93.2%	94.5%	95.2%	99.0%	98.8%	100%	
Ghochan	96.2%	96.7%	94.7%	94.4%	94.2%	93.2%	94.2%	95.0%	99.2%	99.0%	99.1%	100%

درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی پروتئین پوششی نشان داد که اصلی‌ترین عامل واگرایی جدایه‌های CaMV پراکندگی جغرافیایی ویروس-میزبان می‌باشد. که بر این اساس در درخت فیلوژنی رسم شده، جدایه‌های ویروسی در دو گروه اصلی آمریکای شمالی (North-American) و غیر آمریکای شمالی (non-North-American) گروه‌بندی می‌شوند. تا کنون هیچ جدایه‌ای از CaMV بر اساس این‌که دارای قابلیت انتقال توسط شته می‌باشد یا نه، گروه‌بندی نشده است (۶).

به دلیل این‌که تمام جدایه‌هایی که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفته‌اند از یک گونه جدا شده‌اند، هیچ الگوی انشعاب اختصاصی از نظر منبع میزبانی برای جدایه‌های ویروسی مشاهده نشد.

منابع

۱-جعفرپور ب. و جعفرپور ب. ۱۳۸۲. ویروس‌شناسی گیاهی کاربردی (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. صفحه ۸۷ و صفحات ۳۰۹-۳۰۸.

2-Agama K., Beach S., Schoelz J., and Leisner S.M. 2002. The 5' third of *Cauliflower mosaic virus* gene VI conditions resistance breakage in *Arabidopsis* Ecotype Tsu-0. Phytopathology, 92:190-196.

3-Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic acids Res, 25: 3389-3402.

4-Buchen-Osmond C. 2006. *Cauliflower mosaic virus*: Description. CMI/AAB USA. www.ictvdb.org/ICTVdB/00.015.0.01.003.htm, visited: 2010/11/7.

5-Cecchini E., Al-Kaff N.S., Bannister A., Giannakou M.E., McCallum D.G.,Maule A.J., Milner J.J., and Covey S.N. 1998. Pathogenic interactions between variants of *cauliflower mosaic virus* and *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 321(49):731-737.

6-Chenault K.D., and Melcher U. 1994. Phylogenetic relationships reveal recombination among isolates of *Cauliflower*

mosaic virus. Journal of molecular evolution, 39:496-505.
7-Cheng R.H., Olson N.H., and Baker T.S. 1992. *Cauliflower Mosaic Virus*: A 420 Subunit (T = 7), Multilayer Structure. Virology, 186: 655-668.
8-Farzadfar Sh., Ahoonmanesh A., Mosahebi G.H., Ohshima K., Koohi-Habibi M., Pourrahim R., and Golnaraghi A.R. 2007. Partial biological and molecular characterization of *Cauliflower mosaic virus* isolates in Iran. Plant pathology journal, 6(4): 291-298.
9-Franck A., Guilley H., Jonard G., Richards K., and Hirth L. 1980. Nucleotide sequence of *Cauliflower mosaic virus* DNA. Cell , 21: 285-294.
10-Hoh F., Uzest M., Drucker M., Plisson-Chastang C., Bron P., Blanc S., and Dumas Ch. 2010. Structural Insights into the Molecular Mechanisms of *Cauliflower Mosaic Virus* Transmission by Its Insect Vector. Jornal of virology, 84(9)p: 4706–4713.
11-Leisner S.M., Neher D.A. 2002. Third Position Codon Composition Suggests Two Classes of Genes Within the *Cauliflower Mosaic Virus* Genome. J. theor. Biol, 217:195-201.
12-Pappu H.R., and Druffel K.L. 2009. Use of conserved genomic regions and degenerate primers in a PCR-based assay for the detection of members of the genus *Caulimovirus*. Journal of virological methods, 157:102-104.
13-Qiu S.G., and Schoelz J.E. 1992. Three Regions *of Cauliflower Mosaic Virus* Strain W260 are Involved in Systemic Infection of Solanaceous Hosts. Virology, 190:773-782.
14-Raikhy, G., Hallan, V., Kulshrestha, S., and Zaidia, A. 2007. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Carnation etched ring virus* expressed in bacterial system: Production & use in immunodiagnosis. Phtopathology, 155:616-622.
15-Saunders K., Lucy A.P., and Covey S.N. 1990. Susceptibility of *Brassica* species to *cauliflower mosaic virus* infection is related to a specific stage in the virus multiplication cycle. Journal of General Virology, 71: 1641-1647.
16-Shahraeen N. 2012. An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran. International Research Journal of Microbiology, 3(1):024-028.
17-Spence N.J., Phiri N.A., Hughes S.L., Mwaniki A., Simons S., Oduor G., Chacha D., Kuria A., Ndirangu S., Kibata G.N., and Marris G.C. 2007. Economic impact of *Turnip mosaic virus*, *Cauliflower mosaic virus* and *Beet mosaic virus* in three Kenyan vegetables. Plant pathology, 56: 317-323.
18-Woolston C.J., Covey S.N., Penswick J.R., and Davies J.W. Aphid transmission polypeptide are specified by a defined region of the *Cauliflower mosaic virus* genome. Gene, 23: 15-23.