نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۲۳۷-۲۳۱

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 2, Summer 2015, P. 231-237

شناسایی مولکولی ویروس موزائیک شلغم (*Turnip mosaic virus*; TuMV) در خردل کاذب (*Herschfeldia incana*) از ایران

محمد علی سبک خیز خیاط[1*]- بهروز جعفرپور[2]- فرج الله شهریاری احمدی[3]- سعید طریقی[4]- محمدرضا صفرنژاد[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۹

چکیده

ویروس موزائیک شلغم (*Turnip mosaic virus*; TuMV) یکی از اعضاء مهم جنس *Potyvirus* در خانواده *Potyviridae* و یکی از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده گیاهان خانواده چلیپائیان (Brassicaceae) می‌باشد. در فروردین ۱۳۹۱ علایم یک بیماری مشکوک ویروسی مانند موزائیک، کوتولگی و بدشکلی بوته در علف هرز خردل کاذب مشاهده گردید و وجود ویروس موزائیک شلغم با آزمون RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی (coat protein; CP) این ویروس مورد بررسی قرار گرفت. قطعه تکثیر شده (۹۸۶ جفت باز) ابتدا خالص‌سازی و سپس تعیین ترادف گردید. آنالیز توالی نوکلئوتیدی وآمینواسیدی پروتئین پوششی، به ترتیب شباهت بین ۸۵/۴۲ تا ۸۹/۵۸ و ۹۱/۶۴ تا ۹۵/۱۲ را با ۳۱ جدایه دیگر این ویروس در دنیا نشان داد. درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار MEGA6 و روش Neighbour joining ترسیم شد. نتایج این بررسی فیلوژنتیکی نشان داد که این جدایه ویروس موزائیک شلغم با سه جدایه دیگر از ایران در گروه Basal-B قرار دارند.

واژه‌های کلیدی: تحلیل فیلوژنتیکی، خردل کاذب، شناسایی مولکولی، ویروس موزائیک شلغم (TuMV)

مقدمه

ویروس موزائیک شلغم (*Turnip mosaic virus*; TuMV) یکی از اعضاء جنس پوتی ویروس *(Potyvirus)* از خانواده *Potyviridae* بوده و اولین بار توسط تاملینسون در سال ۱۹۷۰ گزارش و توصیف شد. TuMV بالاترین دامنه میزبانی را در بین پوتی‌ویروس‌ها داشته و سالانه خسارت‌های زیادی را به گونه‌های مختلف جنس Brassica از جمله کلزا وارد می‌کند. این ویروس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده کننده محصولات زراعی در ۲۸ کشور جهان شناخته شده است (۱۸). ویروس موزائیک شلغم همانند سایر اعضاء جنس پوتی ویروس در طبیعت توسط تعداد زیادی گونه شته از جمله *Brevicoryne brassica*، *Myzus persicae*، *Aphis gossypii*، *Aphis craccivora* و *Lipaphis erysimi* به روش ناپایا منتقل می‌شود (۶، ۱۱ و ۲۸).

ذرات رشته‌ای این ویروس (به طول ۷۲۰ نانومتر) دارای یک قطعه اسید ریبونوکلئیک (ribonucleic acid; RNA) تک رشته‌ای مثبت خطی به طول ۹۸۳۰ الی ۹۸۳۳ نوکلئوتید و با دو انتهای 5′-Vpg و 3′-Poly(A) می‌باشد. این ژنوم مشتمل بر یک قاب خواندنی باز (open reading frame; ORF) بوده که ابتدا به‌صورت یک پلی‌پروتئین به‌طول ۳۱۶۳ یا ۳۱۶۴ اسیدآمینه ترجمه شده و سپس توسط پروتئازهای ویروسی به حداقل ۱۰ پروتئین شکسته می‌شود (۱۳ و ۲۵). پروتئین پوششی (coat protein; CP) که یکی از محصولات این استراتژی بیان می‌باشد و در انتقال ویروس با شته، حرکت سلول به سلول و سیستمیک ویروس در داخل گیاه و تنظیم همانندسازی اسید ریبونوکلئیک ویروس نقش دارد. ژن پروتئین پوششی، یک ناحیه بسیار متغیر در ژنوم پوتی‌ویروس‌ها بوده و در طبقه‌بندی جدایه‌های مختلف و همچنین در تعیین تفاوت درون گونه‌ای یا بین گونه‌ای آن‌ها بسیار حائز اهمیت است (۲۱، ۲۵ و ۲۶). علاوه بر این که ژنوم جدایه‌های مختلف ویروس موزائیک شلغم از ایران، ایتالیا، آلمان، کانادا، ژاپن، دانمارک، روسیه، لهستان، نیوزلند و انگلستان به‌صورت کامل تعیین توالی شده است، توالی کامل ژن پروتئین پوششی نیز در بسیاری از جدایه‌های این ویروس در دنیا مشخص شده است (۷، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۲۶ و ۲۷). ویروس موزائیک شلغم براساس تفاوت در توالی نوکلئوتیدی به چهار گروه

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق دکتری، استاد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: sabokkhiz2000@yahoo.com)
۳- استاد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۵- استادیار موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

ژنتیکی (Genogroup) تقسیم شده است: Basal-B؛ Basal-BR؛ Asian-BR و World-B. جدایه‌های تیپ میزبانی B بسیار متغیر بوده، مونوفیلتیک نیستند و از دو گروه میزبانی Brassica و غیر Brassica مشتق شده‌اند. به نظر می‌رسد که جدایه‌های گروه‌های Basal-BR و Asian-BR و جدایه‌های آسیایی موجود در گروه World-B به میزبان‌های خود از جمله Brassica و Raphanus بیشتر سازگار شده‌اند. در تعیین گروه‌بندی جدایه‌های TuMV نیازی به توالی کامل ژنوم ویروس نمی‌باشد و با داشتن توالی CP ویروس (همانند سایر پوتی‌ویروس‌ها) می‌توان این گروه‌بندی را انجام داد (۸، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۴ و ۲۵).

در ایران نخستین بار ایزدپناه، ویروس موزائیک شلغم را از استان فارس گزارش نمود (۱) و در اصفهان نیز توسط بهار و همکاران از روی گیاه شب بو گزارش گردید (۲). قربانی و همکاران خصوصیات سرم‌شناسی، دامنه میزبانی، انتقال با *B. brassica* و مورفولوژی این ویروس را که از گیاه کلزا در ورامین جدا شده بود، بررسی کردند (۶). ویروس موزائیک شلغم در ایران از گیاهان زینتی شب‌بوی خیری (*Cheiranthus cheiri*)، گونه‌ای گل داوودی (*Chrysanthemum* sp.)، گل حنا (*Impatiens balsamina*)، اطلسی (*Petunia hybrida*) و آهار (*Zinnia elegans*) و همچنین از چند گونه علف هرز از خانواده چلیپائیان (Brassicaceae) مانند خردلی یا خردل کاذب (*Hirschfeldia incana*)، شلمی (Rapistrum rugosum)، خاکشیر تلخ (*Sisymbrium irio*) و خاکشیر بی‌کرک (S. loeselii) گزارش شده است (۸ و ۹). شهرآیین و همکاران از ۱۱۶۰ نمونه گیاه کلزا که از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری کرده بودند، ویروس موزائیک شلغم را در ۲۷۸ نمونه شناسایی کردند (۵). این ویروس تاکنون از نقاط مختلف کلزاکاری ایران از جمله زنجان، ساری، ورامین و استان گلستان گزارش شده است (۴ و ۲۲).

در این مطالعه، ژن پروتئین پوششی جدایه‌ای از ویروس موزائیک شلغم از علف هرز خردل کاذب به‌طور کامل تعیین ترادف شد و با توالی ۳۱ جدایه دیگر در دنیا مقایسه و رابطه فیلوژنتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی ویروس

در فروردین سال ۱۳۹۱ در شهرستان تربت حیدریه (بخش کدکن)، علائم مشکوک به آلودگی به ویروس موزائیک شلغم در علف هرز خردلی (خردل کاذب) به‌صورت موزائیک، کوتولگی و بدشکلی برگ ها و بوته مشاهده شد و جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور ردیابی و شناسایی این ویروس، از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نسخه‌برداری معکوس (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) و آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس استفاده شد (۲۱). با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، اسید ریبونوکلئیک (ribonucleic acid; RNA) از نمونه های مورد بررسی استخراج گردید. به منظور سنتز cDNA، از کیت AccupowerTM RT Premix (Bioneer Inc., Korea) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. تکثیر ژن پروتئین پوششی این ویروس با آزمون PCR و با استفاده از کیت AccuPowerTM PCR PreMix (Bioneer Inc., Korea) و آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت (جدول ۱) در دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Tpersonal, Germany) با برنامه حرارتی یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه و به‌دنبال آن ۳۵ چرخه متشکل از دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای ۵۵/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و همچنین دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه به‌عنوان تکمیل پلیمریزاسیون، انجام شد (۲۱). محصول PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی رنگ DNA Green Viewer (پارس طوس – ایران) با غلظت یک میکرولیتر در میلی‌لیتر و در حضور نشانگر Gene Ruler™ 100 Plus DNA Ladder (Fermentase)، الکتروفورز گردید. دلیل انتخاب آغازگرها در نواحی بالادست و پایین‌دست ژن پروتئین پوششی این بود که در صورت از دست رفتن برخی توالی‌های ابتدا و انتهای قسمت تکثیر شده در حین تعیین ترادف نوکلئوتیدی، توالی ژن پروتئین پوششی به‌صورت کامل به دست آید. پس از پایان الکتروفورز و مشاهده باند مورد نظر در زیر نور ماوراء بنفش، این باند با استفاده از کیت AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer Inc., Korea) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص شد و جهت تعیین توالی، به شرکت Bioneer در کره جنوبی ارسال گردید.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده (۲۱)

نام آغازگر	محدوده آغازگر در ژنوم ویروس	ترادف آغازگر
Forward primer (TuMVF)	8705-8726	5’-CAAGCAATCTTTGAGGATTAT-3’
Reverse primer (TuMVR)	9690-9669	5’-TATTTCCCATAAGCGAGAATA-3’

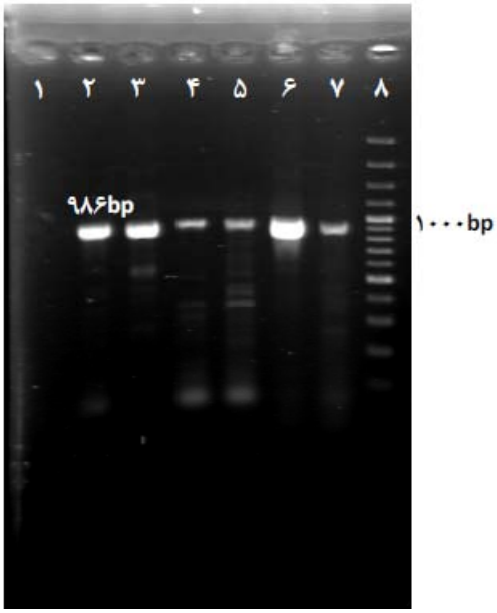
تحلیل فیلوژنتیکی

پس از تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی و ترجمه آن به توالی آمینواسیدی، این توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با استفاده از برنامه ClustalW2 هم‌ردیف سازی چندگانه شد و با توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی موجود در بانک های اطلاعاتی ژنوم (NCBI GenBank) مقایسه گردید. تمام نواحی فاصله (Gap) و نواحی ابتدای قطعه که خوب خوانده نشده بود از توالی مورد نظر حذف و در نهایت ۸۶۴ نوکلئوتید و یا ۲۸۸ اسیدآمینه باقیمانده با توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ۳۱ جدایه موجود در GenBank (جدول ۲) جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی استفاده گردید. برای تعیین روابط فیلوژنتیکی، درخت فیلوژنتیکی این جدایه‌ها بر اساس توالی کامل ژن پروتئین پوششی و با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایه (Neibour-joining) در نرم افزار Mega6 (۲۳) و درجه اعتبار (bootstrap) ۱۰۰۰ تکرار، رسم گردید.

نتایج و بحث

با این‌که ویروس موزائیک شلغم در مزارع کلزای استان خراسان شناسایی شده است (۲۰)، اما علف های هرز میزبان این ویروس (به‌عنوان یکی از مکان‌های بقا ویروس) در مزارع کلزای این استان بررسی نشده است. لذا با توجه به مشاهده علایم مشکوک ویروسی در این گیاه (۹) اقدام به جمع‌آوری نمونه شد. نتایج حاصل از آزمون RT-PCR منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول حدود ۹۸۶ جفت باز شد و آلودگی نمونه مورد بررسی را به ویروس موزائیک شلغم تایید کرد. در شاهد منفی (گیاه سالم شلغم) این باند مشاهده نشد. قطعه تکثیر شده شامل ۵۴ جفت باز از انتهای ′3 ژن NIb، طول کامل ژن پروتئین پوششی و ۶۵ جفت باز از انتهای ′3-UTR بود (شکل ۱). جدایه شناسایی شده، TuMV-IRN HFI نامگذاری شده و توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی آن با رس شمار KJ142139 در GenBank به ثبت رسید.

در جدول ۲ درصد تشابه جدایه مورد بررسی (TuMV-IRN HFI)، در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با ۳۱ جدایه دیگر نشان داده شده است. درصد تشابه ترادفی ژن پروتئین پوششی این جدایه با سایر جدایه‌ها در سطح نوکلئوتیدی بین ۸۵/۴۲ درصد (با RUS2) و ۸۹/۵۸ درصد (با TUR9) و در سطح آمینواسیدی بین ۹۱/۶۴ درصد (با BZ1 و ITA2) و ۹۵/۱۲ درصد (با VIET15) بود. تشابه توالی آمینواسیدی این جدایه با چهار جدایه از ژاپن (CP845، GFD097J، GFD462J و TRD05J) و یک جدایه از ایتالیا(ITA7)، ۹۴/۷۷ درصد بود. توالی آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی TuMV-IRN HFI با سه جدایه دیگر از ایران (IRN GSK، IRN TRa9 و IRN SS5) به ترتیب ۹۳/۷۳ درصد، ۹۴/۰۸ درصد و ۹۳/۳۸ درصد بود.



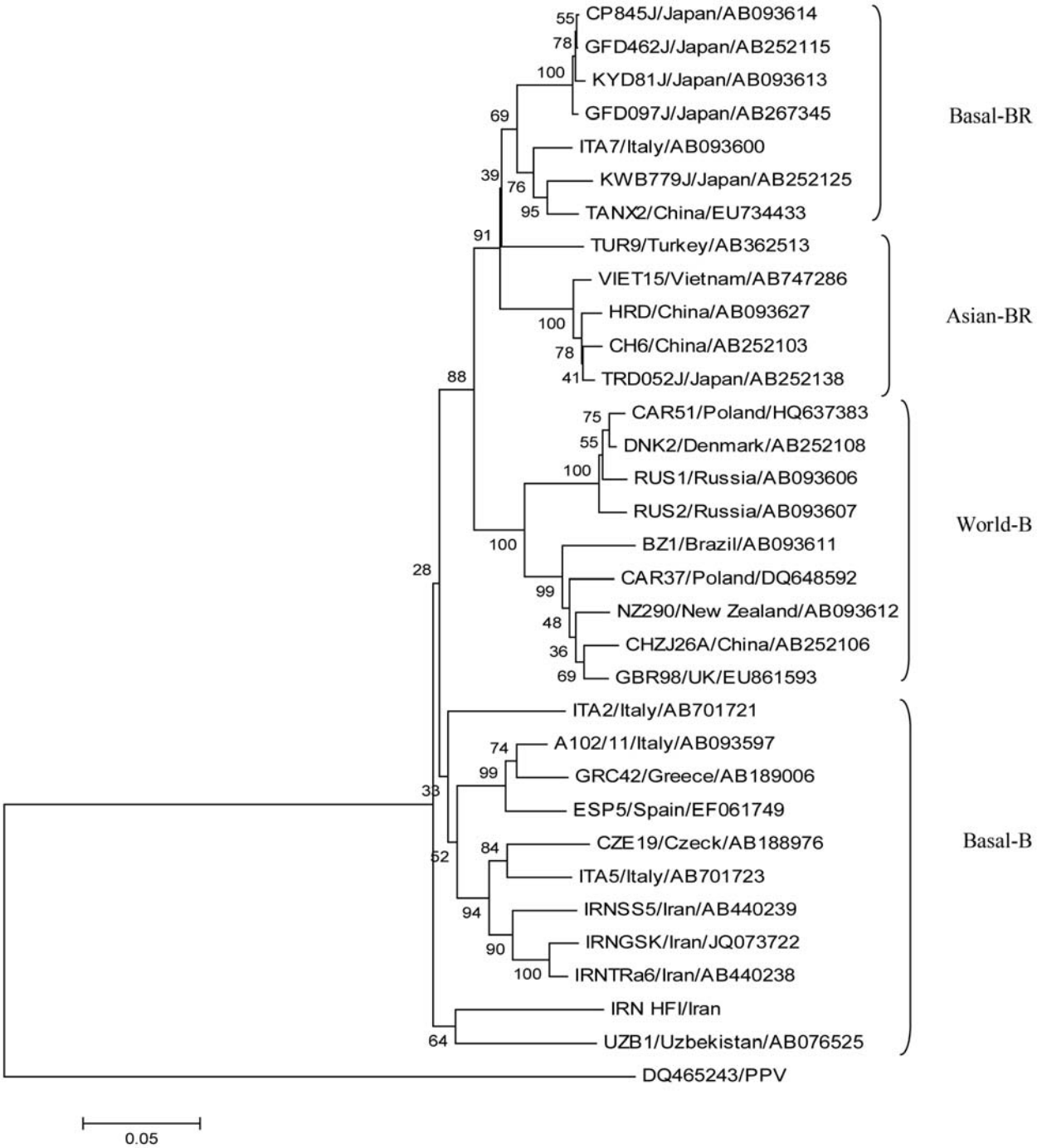
شکل ۱- ردیابی ویروس موزائیک شلغم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آنالیز محصولات RT-PCR بر روی ژل آگارز یک درصد (ستون‌های ۲، ۳ و ٦)، ستون ۹ نشانگر bp ۱۰۰، ستون ۱ شاهد منفی (گیاه سالم *Brassica rapa*)

به‌منظور تجزیه و تحلیل توالی به‌دست آمده، تعیین جایگاه جدایه مورد مطالعه در گروه‌بندی جدایه‌های ویروس موزائیک شلغم و ترسیم درخت فیلوژنتیکی، ابتدا توالی آمینواسیدی جدایه‌های مورد بررسی با ClustalW2 و در نرم‌افزار MEGA6 همردیف‌سازی چندگانه شد. داده‌های به‌دست آمده از همردیف سازی چندگانه، برای رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار Mega6 (۲۳) مورد استفاده قرار گرفتند. در ترسیم این درخت، روش‌های نزدیک‌ترین همسایه (Neibour-joining)، Maximum Likelihood و UPGMA استفاده گردید اما چون نتایج به‌دست آمده از این روش‌ها مشابه بود بنابراین فقط نتایج مربوط به روش نزدیک‌ترین همسایه (NJ) در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی این درخت فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که جدایه مورد مطالعه همراه با دیگر جدایه‌های مورد بررسی، در چهار گروه basal-B؛ basal-BR؛ Asian BR و world B گروه‌بندی شده‌اند. این نتایج با مطالعات قبلی تطابق دارد (۷، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۲۶ و ۲۷). در این بررسی فیلوژنتیکی جدایه TuMV-IRN HFI همراه با سه جدایه دیگر ایرانی در گروه پلی‌فیلتیک Basal-B قرار گرفتند.

در این مطالعه، ویروس موزائیک شلغم در علف هرز خردل کاذب شناسایی شد. این علف هرز در مزارع کلزا به‌عنوان یکی از علف‌های‌هرز غالب مشاهده می‌شود و به‌علت هم خانواده بودن آن با کلزا، کنترل شیمیایی آن مشکل است. این علف هرز همراه با چندین گونه علف هرز دیگر از خانواده چلیپائیان نقش مهمی در اکولوژی و اپیدمیولوژی این ویروس در منطقه دارند (۱۰). آلوده شدن علف‌های هرز به ویروس‌های گیاهی علاوه بر خسارت مستقیمی که به محصول وارد می‌کند، می‌تواند عامل بقا و انتشار ویروس‌های گیاهی باشد. اکثر ویروس‌ها دارای میزبان‌هایی در بین علف‌های هرز هستند که منابعی را جهت آلودگی گیاهان مهم زراعی فراهم می‌کنند. آلودگی این علف‌های هرز به‌عنوان منابع و کانون‌های اولیه آلودگی که از آن‌ها ویروس به داخل مزرعه منتشر می‌شود بسیار مهم است. انتشار ویروس از علف‌های هرز به داخل مزارع به‌وسیله شته‌ها صورت می‌گیرد. این علف‌های هرز می‌توانند عامل بقا ویروس از فصلی به فصل دیگر باشند؛ لذا کنترل علف‌های هرز با عملیات زراعی، سوزاندن و استفاده از علف‌کش‌ها اغلب مؤثرترین راه جلوگیری از انتشار این گونه ویروس‌هاست (۳).

جدول ۲- درصد تشابه جدایه TuMV-IRN HFI در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با ۳۱ جدایه دیگر

نام جدایه/محل جدایه/شماره پذیرش	نوکلئوتیدی	آمینواسیدی	نام جدایه/محل جدایه/شماره پذیرش	نوکلئوتیدی	آمینواسیدی
A102/11/Italy/AB093597	۸۸/۰۸	۹۳/۳۸	IRNSS5/Iran/AB440239	۸۷/۸۵	۹۳/۳۸
BZ1/Brazil/AB093611	۸۵/۸۸	۹۱/۶۴	IRNTRa6/Iran/AB440238	۸۸/۳۱	۹۴/۰۸
CAR37/Poland/DQ648592	۸۶/۴۶	۹۲/۳۳	ITA2/Italy/AB701721	۸۸/۰۸	۹۱/۶۴
CAR51/Poland/HQ637383	۸۵/۷۶	۹۲/۳۳	ITA5/Italy/AB701723	۸۸/۵۴	۹۴/۰۸
CH6/China/AB252103	۸۷/۵۰	۹۴/۰۸	ITA7/Italy/AB093600	۸۸/۵۴	۹۴/۷۷
CHZJ26A/China/AB252106	۸۶/۱۱	۹۲/۳۳	KWB779J/Japan/AB252125	۸۷/۵۰	۹۴/۰۸
CP845J/Japan/AB093614	۸۹/۰۰	۹۴/۷۷	KYD81J/Japan/AB093613	۸۸/۷۷	۹۴/۴۳
CZE19/Czeck/AB188976	۸۶/۸۱	۹۳/۷۳	NZ290/NewZealand/AB093612	۸۶/۱۱	۹۳/۰۳
DNK2/Denmark/AB252108	۸۶/۰۰	۹۲/۶۸	RUS1/Russia/AB093606	۸۵/۶۵	۹۱/۹۹
ESP5/Spain/EF061749	۸۸/۵۴	۹۳/۳۸	RUS2/Russia/AB093607	۸۵/۴۲	۹۲/۳۳
GBR98/UK/EU861593	۸۶/۵۷	۹۲/۳۳	TANX2/China/EU734433	۸۸/۱۹	۹۴/۴۳
GFD097J/Japan/AB267345	۸۹/۱۲	۹۴/۷۷	TRD052J/Japan/AB252138	۸۸/۰۸	۹۴/۷۷
GFD462J/Japan/AB252115	۸۹/۰۰	۹۴/۷۷	TUR9/Turkey/AB362513	۸۹/۵۸	۹۴/۴۳
GRC42/Greece/AB189006	۸۷/۳۸	۹۳/۳۸	UZB1/Uzbekistan/AB076525	۸۸/۸۹	۹۴/۰۸
HRD/China/AB093627	۸۷/۳۸	۹۴/۰۸	VIET15/Vietnam/AB747286	۸۷/۹۶	۹۵/۱۲
IRNGSK/Iran/JQ073722	۸۷/۷۳	۹۳/۷۳			



شکل ۲- دندروگرام خوشه‌ای (cluster dendrogram) که روابط فیلوژنتیکی را بر اساس همردیف‌سازی چند گانه ای توالی آمینواسیدی پروتئین پوششی در ۳۱ جدایه ویروس موزائیک شلغم در دنیا و جدایه شناسایی شده در این مطالعه، نشان می‌دهد. اعداد روی گره‌ها درصد درجه اعتبار ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. ترادف مربوط به ویروس آبله آلو (*Plum pox virus*; PPV) به‌عنوان گروه خارجی (outgroup) استفاده شده است.

سپاسگزاری

از آقای دکتر کمال حاج محمدنیا قالی‌باف، به‌خاطر شناسایی علف‌های هرز تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- ایزدپناه ک. ۱۳۶۱. لیست مشروح بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی گیاهان در استان فارس. دانشگاه شیراز. ۱۸۸ صفحه.

۲- بهار م.، دانش د. و دهقان م. ۱۳۶۴. ویروس موزاییک شلغم درگیاه شب بو. نشریه بیماری های گیاهی. ۲۱. صفحات ۳۹-۳۳.

۳- جعفرپور ب. و جعفرپور ب. ۱۳۸۲. ویروس‌شناسی گیاهی کاربردی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۶۰ صفحه.

۴- زاهدی طبرستانی آ.، شمس بخش م. و صفایی ن. ۱۳۸۹. مقایسه شیوع ویروس‌های مهم کلزا در استان گلستان در سال‌های زراعی ۱۳۸۷ ـ ۱۳۸۸. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، صفحه ۶۹۲.

۵- شهرآئین، ن.، قطبی ت.، کامران ر.، صلاتی م.، رعیت‌پناه س. و آزادبخت ن. ۱۳۸۵. وضعیت بیماری‌های ویروسی گیاهان روغنی کلزا در ایران. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۲۴۵

۶- قربانی ش.، شهرآئین ن.، دهقانیار ح.، سهندی ا. و پوررحیم ر. ۱۳۸۶. تشخیص سرولوژیکی و خالص‌سازی ویروس موزائیک شلغم (TuMV) از گیاه کلزا. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۰، صفحات ۷۱-۶۱.

7- Chen C.C., Chang C.A., and Yeh S.D. 2006. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Turnip mosaic virus* collected from calla lily. Plant Pathology. Bull, 15: 1-8.

8- Farzadfar S., Ohshima K., Pourrahim R., Golnaraghi A.R., Jalali S., and Ahoonmanesh A. 2004. Occurrence of *Turnip mosaic virus* on ornamental crops in Iran. Plant Pathology., 54: 261.

9- Farzadfar S., Ohshima K., Pourrahim R., Golnaraghi A., Sajedi S. and Ahoonmanesh A. 2005. Reservoir weed hosts for *Turnip mosaic virus* in Iran. Plant Disease, 89: 339.

10- Farzadfar S., Tomitaka Y., Ikematsu M., Golnaraghi A.R., Pourrahim R., and Ohshima K. 2009. Molecular characterisation of *Turnip mosaic virus* isolates from Brassicaceae weeds. European Journal of Plant Pathology., 124: 45-55.

11- Haj Kassem A., and Walsh J. 2008. Characterising resistance to *Turnip mosaic virus* (TuMV) in turnip (*Brassica rapa rapa*). Arabian Journal of Plant Protection, 26: 168-172.

12- Kozubek E., Irzykowski W., and Lehmann P. 2007. Genetic and molecular variability of a *Turnip mosaic virus* population from horseradish (*Cochlearia armoracia* L.). Journal of Applied Genetics. 48: 295-306.

13- Nguyen H. D., Tomitaka Y., Ho S. Y., Duchene S., Vetten H. J., Lesemann D., Walsh J. A., Gibbs A. J. and Ohshima K. 2013. Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. PLoS One, 8 (2): E55336.

14- Nguyen H.D., Tran H.T., and Ohshima K. 2013. Genetic variation of the *Turnip mosaic virus* population of Vietnam: a case study of founder, regional and local influences. Virus Research, 171: 138-149.

15- Nicolas O., and Laliberte J.F. 1992. The complete nucleotide sequence of Turnip mosaic potyvirus RNA. Journal of General Virology, 73: 2785-2793.

16- Ohshima K., Akaishi S., Kajiyama H., Koga R., and Gibbs A. J. 2010. Evolutionary trajectory of *Turnip mosaic virus* populations adapting to a new host. Journal of General Virology, 91: 788-801.

17- Ohshima K., Tanaka M., and Sako N. 1996: The complete nucleotide sequence of *Turnip mosaic virus* RNA Japanese strain. Archives of Virology., 141: 1991-01997.

18- Ohshima K., Tomitaka Y., Wood J.T., Minematsu Y., Kajiyama H., Tomimura K., and Gibbs A. J. 2007. Patterns of recombination in *Turnip mosaic virus* genomic sequences indicate hotspots of recombination. Journal of General Virology, 88: 298-315.

19- Ohshima K., Yamaguchi Y., Hirota R., Hamamoto T., Tomimura K., and Tan Z. 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*; evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. Journal of General Virology, 83: 1511-1521.

20- Sabokkhiz M. A., Jafarpour B, Shahriari Ahmadi F. and Tarighi S. 2012. Identification of *Turnip mosaic virus* isolated from canola in northeast area of Iran. African Journal of Biotechnology, 11: 14553-14560

21- Sanchez F., Wang X., Jenner C.E., Walsh J.A., and Ponz F. 2003. Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. Virus Research, 94: 33-43.

22- Shahraeen N., Farzadfar Sh., and Lesemann D.E. 2003. Incidence of viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. oleifera) in Iran. Journal of Phytopathology, 151: 614-616

23- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.

24- Tomimura K., Gibbs A.J., Jenner C.E., Walsh J.A., and Ohshima K. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of thirty-eight genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in East Asia. Molecular Ecology, 12: 2099-2111

25- Tomimura K., Spak J., Katis N., Jenner C.E., Walsh J.A., and Gibbs A.J. 2004. Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in West and East Eurasia. Virology, 330: 408-423.

26- Tomitaka Y. and Ohshima K. 2006. A phylogeographical study of the *Turnip mosaic virus* population in East Asia

reveals an ‘emergent’ lineage in Japan. Molecular Ecology, 15: 4437-4457
27- Wang H.Y., Liu J.L., Gao R., Chen J., Shao Y.H., and Li X.D. 2009. Complete genomic sequence analyses of *Turnip mosaic virus* basal-BR isolates from China. Virus Genes, 38: 421–428.
28- Wang R.Y., and Pirone T.P. 1999. Purification and characterization of *Turnip mosaic virus* helper component protein. Phytopathology, 89:564-567.