

شناسایی مولکولی، بررسی تبارزایی و تنوع ژنتیکی ویروس موزاییک شلغم در مزارع کلزا استان خراسان جنوبی

حمیده حسن پور^۱، سیده عاطفه حسینی^{۲*} و مهدی جهانی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵)

چکیده

کلزا با نام علمی (*Brassica napus*) یکی از اعضای خانواده Brassicaceae (خردل یا خانواده کلم) با گل‌های زرد رنگ می‌باشد. که عمدتاً به دلیل داشتن دانه‌های غنی از روغن کشت می‌شود. ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus*) از شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی کلزا در دنیا به‌شمار می‌آید. در فروردین و اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۷، به‌منظور شناسایی مولکولی ویروس‌های جنس *Potyvirus*، تعداد ۶۶ نمونه برگ از شهرستان‌های سربان، فردوس، سه قلعه و آیسک در استان خراسان جنوبی جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها دارای علائم مشکوک ویروسی نظیر زردی، کوتولگی، موزاییک، چروکیدگی برگی بودند. برای شناسایی ویروس، آر. ان. ای کل، با استفاده از کیت شرکت دنزیست استخراج و دی. ان. ای مکمل از روی آر. ان. ای ویروسی ساخته شد. سپس با استفاده از یک جفت آغازگر دژنره مربوط به جنس پتی ویروس به نام CIR/CIF که منطبق بر قسمتی از ناحیه ژن کدکننده پروتئین CI بود، قطعه‌ای به طول ۶۸۰ جفت باز در ۱۲ نمونه کلزا تکثیر و تعیین توالی شد که شباهت بالایی به ویروس موزاییک شلغم داشت. سپس این نمونه‌ها، با آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک شلغم (TuMV/TuMVR)، آزمایش شدند، که نهایتاً منجر به تکثیر قطعه ای به طول ۹۸۰ جفت باز در هشت نمونه گردید. نتایج تعیین توالی نشان داد که هشت نمونه گیاهی کلزا به ویروس TuMV آلوده می‌باشند. در نهایت شش نمونه که خوانش آنها به صورت کامل انجام شده بود، در بررسی‌های تبارزایی بر مبنای توالی پروتئین پوششی مورد استفاده قرار گرفت. بررسی‌های نوترکیبی نشان از وجود دو نمونه نوترکیب داشت که از بررسی تبارزایی حذف شد. چهار جدایه ایرانی غیر نوترکیب در گروه Asian BR و در مجاورت سایر جدایه‌های آسیا قرار گرفتند. تشابه توالی نوکلئوتیدی در ناحیه پروتئین پوششی در بین گونه‌های این تحقیق ۹۵-۹۰ درصد تعیین گردید. بررسی‌های نوترکیبی نشان داد که در دو جدایه ویروس موزاییک شلغم مطالعه‌شده در این تحقیق به نام‌های CSe55 و CSe39 نوترکیبی محتمل است. همچنین بررسی‌های تنوع نوکلئوتیدی جدایه‌ها بانرم افزار DnaSP و منفی بودن آزمون آماری Tajima's D به این معنی است که انتخاب در جهت متنوع شدن و بزرگ شدن جمعیت رخ داده است. تحقیق حاضر اولین گزارش از وقوع این ویروس در مزارع کلزا استان خراسان جنوبی و اولین بررسی مولکولی و تبارزایی جدایه‌های ویروس مذکور در مزارع کلزا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آغازگر دژنره، پروتئین پوششی، کلزا.

Molecular characterization, phylogenetic analysis and nucleotide diversity of *Turnip mosaic virus* in canola fields of south Khorasan

Hamideh Hassanpour¹, Seyyede Atefeh Hosseini^{2*} and Mehdi Jahani³

1. M. Sc. Student, Assistant Professor and Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran
(Received: Mar. 6, 2019 - Accepted: Jan. 5, 2020)

ABSTRACT

Canola (*Brassica napus*) is one of the most important members of Brassicaceae family and *Turnip mosaic virus* is one of the most widespread viruses in canola fields all around the world. During May and April of 2018, 66 canola samples were collected from different regions of south Khorasan Province. The samples showed symptoms such as yellowing, stunning, mosaic and leaf distortion. Total RNA of samples was extracted by Dena Zist kit (Iran) and then DNA complementary was made by reverse primer. RT-PCR is done using specific primers of TuMV. A fragment with 680 bp length was amplified and sequenced in 12 canola samples that had high similarity to TuMV. Therefore, positive samples used in RT-PCR by specific primers of TuMV related to coat protein coding regions. Finally eight amplified fragments with 980 bp length were sequenced and then analyzed by Blast, MegaX, SDTV and DnaSPs softwares. Results showed that six samples of canola were infected by TuMV. Consequently, phylogenetic analysis of four non-recombinant isolates that are sequenced perfectly used in the phylogeny analysis and results showed that Iranian isolates in this study located in Asian BR phylogeny group included other Asian isolates. Nucleotide similarity between Iranian isolates ranged from 90 to 95%. Recombination analysis using RDP4 showed that two Iranian isolates (CSe55, CSe39) are recombinant and are evolved from minor and major parents. Nucleotide diversity by DnaSP showed that population of TuMV is developing in this part of Iran. This survey is the first report of TuMV in south khorasan and molecular investigation of TuMV in Canola field.

Keywords: Canola, coat protein, degenerate primers.

* Corresponding author E-mail: ahosseini@birjand.ac.ir

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* یکی از دانه‌های روغنی خانواده Brassicaceae می‌باشد که به طور عمده به دلیل بذر غنی از روغن آن کشت می‌شود. خاستگاه کلزا نامشخص است، گروهی از محققان معتقدند که مبدأ پیدایش آن اروپای مدیترانه‌ای است، درحالی‌که گروهی دیگر بر این باورند که کلزا از مناطق دیگری منشأ گرفته‌است (OECD, 2012; Rakow, 2004).

از ویژگی‌های ممتاز آن سازگاری با شرایط مختلف آب و هوایی، درصد بالای روغن و داشتن تیپ‌های بهاره، پاییزه و همچنین قرارگرفتن در تناوب گندم و جو می‌باشد که به این دلیل کشت آن از سال ۱۳۷۲ در ایران آغاز و به‌عنوان نقطه امیدیه جهت تأمین روغن خوراکی مورد نیاز کشور به‌شمار می‌آید (Rezaiizad & Zareii, 2015). در حال حاضر با توجه به صرف هزینه‌های هنگفت بدلیل واردات دانه‌های روغنی و عواقب اقتصادی سیاسی آن توسعه کشت این محصولات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

ویروس موزاییک شلغم متعلق به جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* است که ۳۰۰ گونه از ۴۳ خانواده گیاهی را آلوده و از شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی خانواده *Brassicaceae* در سراسر جهان به‌شمار می‌رود (Edwardson *et al.*, 1992; Riechmann *et al.*, 1984). در سال ۱۹۷۰ خصوصیات کامل این ویروس توصیف شد (Tomlinson, 1970). در ایران نخستین بار ویروس موزاییک شلغم از استان فارس گزارش گردید (Izadpanah *et al.*, 2007). این ویروس در اصفهان نیز توسط بهار و همکاران از روی گیاه شب بو گزارش گردید. خصوصیات سرم‌شناسی، دامنه میزبانی، انتقال با شته و ریخت‌شناسی این ویروس که از گیاه کلزا در ورامین جدا شده‌بود، بررسی گردید (Ghorbaniet *al.*, 2007). ویروس موزاییک شلغم در ایران از اطلسی (*Petunia hybrida*)، آهار (*Zinnia elegans*) گیاه زینتی شب‌بوی خیری (*Cheiranthus cheiri*) گونه‌ای گل‌داوودی (*Chrysanthemum sp.*)، گل حنا (*Impatiens balsamina*) و همچنین از چند گونه علف هرز از خانواده چلیپائیان گزارش شده است

(Farzadfar *et al.*, 2005). تعداد ۲۷۸ نمونه آلوده به ویروس موزاییک شلغم از بین ۱۱۶۰ نمونه گیاه کلزای جمع‌آوری شده از تمام مناطق کشور توسط شهرآیین و همکاران با روش‌های سرولوژی شناسایی گردید (Shahraeen *et al.*, 2003). همچنین این ویروس از مناطق مختلف کلزاکاری ایران از جمله ورامین، ساری، استان گلستان و زنجان گزارش شده است (Ghorbani *et al.*, 2003; Tabarestani, 2010). ویروس مذکور را با روش‌های مولکولی از مزارع استان خراسان رضوی روی گیاه خردل کاذب ردیابی کردند (Sabokkhiz *et al.*, 2016).

این ویروس پیکره‌ی رشته‌ای بطول ۷۰۰-۷۵۰ نانومتر دارد که به‌صورت ناپایا به وسیله ۵۰-۴۰ گونه منتقل می‌شود (Shukla *et al.*, 1994; Tomlinson, 1987). ژنوم TuMV یک مولکول آر. آن. ای تک‌رشته‌ای مثبت متشکل از ۹۸۳۰ نوکلئوتید و دارای یک چارچوب ژنی است که آر. آن. ای ژنومی ابتدا به یک پلی‌پروتئین بزرگ ترجمه و در نهایت بوسیله پروتئین‌های ویروسی به حداقل ده پروتئین‌ها وظایف مختلف شکسته می‌شود (Nguyen *et al.*, 2013; Tomimura *et al.*, 2004). در بررسی‌های گسترده انجام شده در ۲۸ کشور، TuMV رتبه دوم افت عملکرد محصول را به خود اختصاص داده است (Tomlinson, 1987). پروتئین پوششی^۱ که یکی از محصولات استراتژی بیان ژن می‌باشد در انتقال ویروس با شته، حرکت سلول به سلول و سیستمیک ویروس در داخل گیاه و تنظیم همانندسازی اسید ریبونوکلیک ویروس نقش دارد. ژن پروتئین پوششی، یک ناحیه متغیر در ژنوم پتی‌ویروس‌ها بوده و در طبقه‌بندی جدایه‌های مختلف و همچنین در تعیین تفاوت درون گونه‌ای یا بین‌گونه‌ای آنها بسیار حائز اهمیت است (Tomitaka & Ohshima, 2006; Tomimura *et al.*, 2004). مطالعات پیشین، نشان می‌دهد که TuMV بر اساس نوع میزبان به چهار گروه بیولوژیک طبقه‌بندی می‌شوند: گروه (B): جدایه‌هایی که کلم را با تاخیر و گاهی اوقات آلوده می‌کنند ولی

1. CP (Coat protein)

جدول ۱. مناطق جمع‌آوری، تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده و

تعداد نمونه‌های مثبت در آزمون RT-PCR

Table 1. Occurrence of TMV on canola samples collected from different parts of South Khorasan by RT-PCR

Regions	Number of Samples	Numbers of Positive samples by specific primers
Sarayan	19	2
Sarayan	4	1
Ferdows	11	0
Ferdows	21	4
Ayask	6	1
Ayask	5	0
Total	66	8

شناسایی ویروس با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس استخراج آر. ان. ای با کیت استخراج آر. ان. ای توتال شرکت دنا زیست ایران و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، انجام پذیرفت. ردیابی ابتدایی با آغازگرهای عمومی جنس پتی ویروس (Ha *et al.*, 2008) و سپس با آغازگرهای اختصاصی مربوط به ناحیه کدکننده پروتئین پوششی ویروس موزاییک شلغم و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس 5'-TATTTCCATAAGCGAGAATA-3' و 5'-CAAGCAATCTTTGAGGATTAT-3' می‌باشد که به ترتیب با توالی‌های ۹۶۶۹-۹۶۹۰ و ۸۷۲۶-Sanchez *et al.*، ژنوم TuMV مطابقت داشتند (Sanchez *et al.*, 2003). برای سنتز دی. ان. ای مکمل، به ازای هر نمونه شش میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲/۵ میکرولیتر از آغازگر معکوس (۱۵ پیکومول) اضافه شد، سپس ۸/۵ میکرولیتر از مخلوط تهیه شده بعلاوه پنج میکرولیتر از آر. ان. ای استخراج شده از هر نمونه را در لوله‌های جداگانه ریخته و مواد مخلوط شده به مدت ده دقیقه در دمای ۶۰ درجه درون بن‌ماری قرار گرفت. پس از آن نمونه‌ها به مدت یک دقیقه روی یخ قرار داده و به هر نمونه مقدار چهار میکرولیتر بافر، دو میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (۱۰۰۰ U) (RevertAidFermentase, Reverse Transcriptase) اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سه دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلیوس در دستگاه ترموسایکلر Bioreba کشور آلمان قرار گرفت. برای تکثیر ژن پروتئین پوششی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در لوله‌های ۱۲/۵ میکرولیتر از premix (Master mix Red 2x PCR)، یک میکرولیتر آغازگر مستقیم (۱۰

ترب را آلوده نمی‌کنند، گروه [B]: جدایه‌هایی که کلم را به صورت سیستمیک با علائم موزاییک روی برگها آلوده می‌کنند ولی ترب را آلوده نمی‌کنند، گروه [B(R)]: جدایه‌هایی که کلم را به صورت سیستمیک و با علائم موزاییک در برگها آلوده می‌کنند ولی ترب را با تاخیر و گاهی اوقات آلوده می‌کنند و گروه [BR]: جدایه‌هایی که کلم و ترب را به صورت سیستمیک و با علائم موزاییک روی برگها آلوده می‌کنند (Ohshima *et al.*, 2002). علاوه براین، تجزیه و تحلیل تبارزایی که با استفاده از جدایه‌های مختلف ویروسی جمع‌آوری شده از سراسر جهان انجام شده چهار ژنوتیپ اصلی برای TuMV نشان داده شده که عبارتند از: basal-B, basal-BR, world-B و Asian-BR (Tumitaka *et al.*, 2003). در ایران فرزادفر و همکاران، ویروس مذکور را در شلغم، تربچه، کلزا و علف‌های هرز شناسایی کردند و بررسی تبارزایی جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌های ایرانی در گروه Basal-B و Asian-BR قرار گرفتند (Farzadfar *et al.*, 2014). همچنین در مطالعه دیگری، جدایه‌های مربوط به یونان، ایران و ترکیه بررسی شده است که در نهایت علاوه بر گروه‌های تبارزایی ذکر شده در بالا یک گروه جدید Iranian نیز به گروه‌های تبارزایی اضافه گردیده است (Yasaka *et al.*, 2017). با توجه به توسعه کشت کلزا در مزارع استان خراسان جنوبی، بررسی عوامل خسارتزای آن اهمیت دارد، لذا هدف از این تحقیق، ردیابی و شناسایی مولکولی، عامل ایجاد کننده علائم ویروسی مشاهده شده در مزارع کلزا (TuMV) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و ردیابی ویروس

در فروردین و اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۷، نمونه‌برداری از مزارع کلزای شهرستان‌های استان خراسان جنوبی (فردوس، سراپان، سه‌قلعه، آیسک) صورت گرفت. تعداد ۶۶ نمونه مشکوک به علائم ویروسی جمع‌آوری گردید. این نمونه‌ها دارای علائمی نظیر زردی، کوتولگی، موزاییک و چروکیدگی برگ بودند. نمونه‌ها در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل گردیدند (جدول ۱).

استان، با برنامه Clustal W انجام شد (Thompson *et al.*, 1994). درخت تبارزایی شش جدایه ویروس موزاییک شلغم و ۳۰ جدایه موجود در بانک ژن و مربوط به نقاط متفاوت دنیا با استفاده از روش Maximum likelihood (ML) و Neighborjoining با نرم افزار MegaX رسم گردید (Tamura *et al.*, 2013). اما به دلیل نوترکیب بودن دو جدایه مجدداً با چهار جدایه رسم گردید. ژن پروتئین پوششی ویروس *Narcissus yellow strip virus* به عنوان جدایه برون گروه استفاده گردید (Chen *et al.*, 2003). رسم درخت تبارزایی با ۱۰۰۰ بوت استرپ برای ارزیابی صحت شاخه‌های درونی صورت گرفت. سپس مجموعه داده‌های هم ردیف شده برای مقایسه درصد همولوژی نوکلئوتیدی در نرم افزار SDTv مورد بررسی قرار گرفت (Muhire *et al.*, 2014).

بررسی وقوع نوترکیبی در بین جدایه‌های ویروس

احتمال وقوع نوترکیبی در ناحیه پروتئین پوششی شش جدایه ایرانی و جدایه‌های دنیا موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار RDP4 صورت گرفت. این بررسی با روش‌های RDPGENECONV (Sawyer, 1989)، BOOTSCAN (Salminen *et al.*, 1995)، MAXCHI (Smith, 1992)، CHIMERA (Posada & Crandall, 2007) و SISCAN و با استفاده از P -value 0.05 صورت گرفت. روش‌های RDP، BOOTSCAN و SISCAN بر مبنای روش‌های تبارزایی در صورتی که روش‌های GENECOV، MAXCHI و CHIMAERA بر اساس روش‌های جایگزین‌سازی می‌باشد.

بررسی‌های دموگرافی جمعیت و تنوع توالی‌ها

نرم افزار DnaSP برای اندازه‌گیری میزان تنوع نوکلئوتیدی در بین جدایه‌های ایرانی و دنیا ویروس موزاییک شلغم استفاده شد که در این تحقیق تنوع نوکلئوتیدی با آزمون‌های آماری Tajimas D، Fu and Lis D و آزمون F برای تنوع هاپلوئیدی بررسی گردید (Fu & Li, 1993; Librado & Rozas, 2009). نتایج آزمون Tajimas D بستگی به تفاوت‌های بین تعداد مکان‌های تفرق یافته و میانگین تعداد تفاوت‌ها در نوکلئوتیدها دارد. ضرایب Ki

پیکومول)، یک میکرولیتر آغازگر معکوس (۱۰ پیکومول) و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه کرده و سپس ۲۱ میکرولیتر از مخلوط حاصل به میکروتیوب منتقل شده و چهار میکرولیتر از دی. ان. ای مکمل هر نمونه اضافه شد. سپس در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه متشکل از دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه و به دنبال 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 به مدت یک دقیقه قرار گرفت. در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه به عنوان تکمیل پلیمریزاسیون، به کار رفت. محصولات PCR به طول ۹۸۰ جفت باز، در ژل آگارز ۰/۵ درصد حاوی رنگ DNA Green Viewer (پارس طوس-ایران) الکتروفورز گردید.

تعیین توالی ویروس

هشت نمونه کلزا مربوط به استان خراسان جنوبی که در آزمون زنجیره‌ای پلیمرز و با آغازگر اختصاصی مربوط به ژن پروتئین پوششی تکثیر شده بود، تعیین توالی گردید. بدین منظور محصول PCR موردنظر، از روی ژل بریده شد و با استفاده از کیت Clean-up System Wizard® SV Gel خالص‌سازی و جهت تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال گردید. توالی یابی به صورت دوطرفه با آغازگر معکوس و مستقیم مربوط به پروتئین پوششی ویروس موزاییک شلغم صورت گرفت. توالی‌های به دست آمده به شکل فایل‌های با فرمت Fasta و Text آماده شد. به منظور تایید کامل وجود جدایه‌های این ویروس و همچنین بررسی جایگاه تبارزایی آنها در مقایسه با جدایه‌های دنیا، توالی‌های حاصل با استفاده از ابزار BLAST در پایگاه (<http://www.ncbi.nlm.nih>) NCBI مشابهت‌یابی شد.

تجزیه و تحلیل تبارزایی در جمعیت ویروس موزاییک شلغم

همردیف‌سازی شش توالی مربوط به پوشش پروتئینی ویروس موزاییک شلغم شده جدا شده از مزارع کلزا

تعیین توالی جدایه‌های ویروس

به‌منظور مطالعات تبارزایی، هشت جدایه از ویروس موزاییک شلغم که از مزارع کلزا شهرستان‌های سرایان، آیسک و فردوس جمع‌آوری شده بود، تعیین توالی گردید. مقایسه توالی‌های حاصل با سایر توالی‌ها در پایگاه بلاست، نشان از آلودگی هشت جدایه تعیین توالی شده در این تحقیق، به ویروس موزاییک شلغم داشت (جدول ۲). اما بررسی تبارزایی تنها در شش نمونه انجام شد، به این دلیل که در دو نمونه این ویروس، علیرغم نشان دادن آلودگی به ویروس موزاییک شلغم، به دلیل ناخالصی زیاد، خوانش کاملی از پروتئین پوششی ارائه نشد.

بررسی وقوع نوترکیبی

به‌منظور بررسی وقوع احتمال نوترکیبی در جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق از برنامه RDP4 استفاده گردید. بررسی‌های نوترکیبی با روش‌های RDP، BOOTSCAN، MaxCh، Chimaera، GENECOVE و SISCAN صورت گرفت که نتایج نشان از وقوع نوترکیبی در دو جدایه ویروس موزاییک شلغم مطالعه شده در این تحقیق به نام‌های CSe55 و CSe39 مربوط به کلزا داشت. در جدول ۴ والد اصلی، فرعی و روش‌های تأییدکننده نوترکیبی ذکر گردیده است.

به بررسی تنوع نوکلئوتیدی و Pi به بررسی تفاوت بین تعداد تک نوکلئوتیدها و تعداد متوسط تفاوت‌های نوکلئوتیدی در بین همه توالی‌ها برمی‌گردد. تنوع هاپلوئیدی نیز به تعداد متفاوت هاپلوטיפ‌ها در کل جمعیت برمی‌گردد.

نتایج و بحث

واکنش زنجیره ای پلیمرز

از بین ۶۶ نمونه کلزا جمع‌آوری شده از مزارع کلزا به‌منظور شناسایی مولکولی ویروس‌های جنس پتی‌ویروس با استفاده از یک جفت آغازگر دژنره مربوط به جنس پتی‌ویروس به نام CIR/CIF که منطبق بر قسمتی از ناحیه ژن کدکننده پروتئین CI بود، قطعه‌ای به طول ۶۸۰ جفت باز در ۱۲ نمونه تکثیر شد. این نمونه‌ها تعیین توالی گردید که بیشترین شباهت را به ویروس موزاییک شلغم نشان داد. لذا به‌منظور ردیابی ویروس موزاییک شلغم از جفت آغازگر اختصاصی پروتئین پوششی (جدول ۲)، استفاده و در هشت نمونه، قطعه‌ای به طول ۹۸۰ جفت باز تکثیر گردید. این نمونه‌ها مربوط به مناطق سرایان، آیسک و فردوس بودند که بیشترین سطح زیر کشت این محصول را در استان خراسان جنوبی دارا می‌باشند. در این نمونه‌ها علائم زردی، پیچیدگی و کم‌رشدی مشاهده گردید (شکل ۱).

جدول ۲. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. Primer sequences of TuMV used in this research

Primers	Genomic location	Primer sequence
Forward primer (TuMVF)	8705-8726	5'-CAAGCAATCTTTGAGGATTAT-3'
Reverse primer (TuMVR)	9690-9669	5'-TATTTCCCATAGCGAGAATA-3'
Forward primer (CIF)		GGIVVIGTIGGIVVSIGGIAARTCIAC
Reverse primer (CIR)		ACICCRTTYTCDATDATRTTIGTIGC



شکل ۱. علائم قابل مشاهده در نمونه‌های کلزا که حضور ویروس موزاییک شلغم در آنها اثبات شده است

Figure 1. Symptoms that are visible in samples infected by TuMV in canola fields

در گروه World B جدایه‌هایی از ایران (Farzadfar *et al.*, 2014) و اسرائیل قرار گرفتند. در گروه Basal B نیز جدایه‌هایی از کانادا، چک، نیوزلند و ایران (Heydari *et al.*, 2018) واقع شدند.

بررسی تنوع ژنتیکی و حرکت جمعیت در جدایه‌های ویروس موزاییک شلغم

به‌منظور بررسی تنوع نوکلئوتیدی در ژن پروتئین پوششی ویروس به طول ۸۶۷ نوکلئوتید، از روش‌های مختلف در نرم‌افزار DnaSP استفاده شد. این تنوع ژنتیکی در چهار گروه تبارزایی ویروس موزاییک شلغم که شامل Basal B، Asian-BR، Basal BR و world-B است بررسی گردید. گروه‌های تبارزایی Asian-BR، Basal BR و World B به ترتیب برای وقوع هاپلوטיפ‌ها ۲،۲،۳ و ۲، برای ضریب تنوع هاپلوئیدی به ترتیب ۰/۳۴۵، ۰/۲۵۰، ۰/۲۵۸ و ۰/۲۸۶ بودند که تفاوت کم بین اعداد، بیانگر وقوع تنوع هاپلوئیدی کم در بین گروه‌های تبارزایی است. در بررسی ضریب k با ضریب تنوع نوکلئوتیدی، نیز به ترتیب اعداد ۰/۵۰۹، ۰/۲۵۰، ۰/۲۷۰ و ۰/۲۸۶ محاسبه گردید که از ۰/۵ تا ۰/۲۵ متغیر بود و نشان‌دهنده تفاوت اندک نوکلئوتیدی در بین گروه‌های تبارزایی ویروس داشت. همچنین جدایه‌های گروه Basal BR کمترین تنوع نوکلئوتیدی به میزان ۰/۰۰۲ و جدایه‌های Asian بیشترین تنوع نوکلئوتیدی به میزان ۰/۰۰۵ را در ضریب Pi نشان دادند، که مشابه نتایج Li *et al.* (2017) بود (جدول ۵). منفی و معنادار بودن آزمون آماری Tajima's D نیز به این معنی است که انتخاب در جهت متنوع شدن و بزرگ شدن گروه‌های جمعیت ویروسی رخ داده است.

بحث

تحقیق حاضر به ردیابی مولکولی و بررسی تبارزایی ویروس موزاییک شلغم در مزارع کلزای استان خراسان جنوبی برای اولین بار پرداخته است. از میان ۶۶ نمونه جمع‌آوری شده از استان خراسان جنوبی تنها در شش نمونه با روش‌های مولکولی، آلودگی به ویروس تایید گردید و سایر نمونه‌هایی که در آزمون زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگر دژنره پتی ویروس تکثیر شدند احتمالاً

در جدایه CSe39 یک احتمال نوترکیبی با روش‌های GENECOVE، BOOTSCAN و MaxCh و همچنین در جدایه CSe55 نیز یک مکان نوترکیب با روش‌های MaxCh و SISCAN و Tamura محتمل است. محل این نوترکیبی‌ها در نوکلئوتید ۲۴۳ و ۴۸۶ می باشد (شکل ۴). دو جدایه‌ای که به‌عنوان نوترکیب انتخاب شدند، حداقل با سه روش متفاوت و با P -value به میزان بیشتر از 10^{-6} تایید گردید (Yasaka *et al.*, 2017).

بررسی‌های تبارزایی

درخت تبارزایی بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی به طول ۸۶۷ نوکلئوتید که به‌خوبی خوانش شده و از کل قطعه تعیین توالی شده به طول تقریبی ۹۸۰ جفت باز جدا شد، رسم گردید. بررسی تبارزایی جدایه‌های ایرانی ویروس موزاییک شلغم مربوط به کلزا و ۳۰ جدایه موجود در بانک ژن با روش Maximum likelihood به‌عنوان بهترین روش انجام شد (جدول ۳). مشخصات جدایه‌های بانک ژن نیز در درخت تبارزایی ذکر گردید. در درخت تبارزایی، توالی‌ها در پنج گروه مشخص مشابه تحقیقات پیشین گروه‌بندی شدند. این پنج گروه شامل basal B، Asian-BR، Iranian، basal BR و world-B می‌باشند (شکل ۲).

جدول ۳. لیست جدایه‌های جمع‌آوری شده از خراسان جنوبی و مورد استفاده در این تحقیق

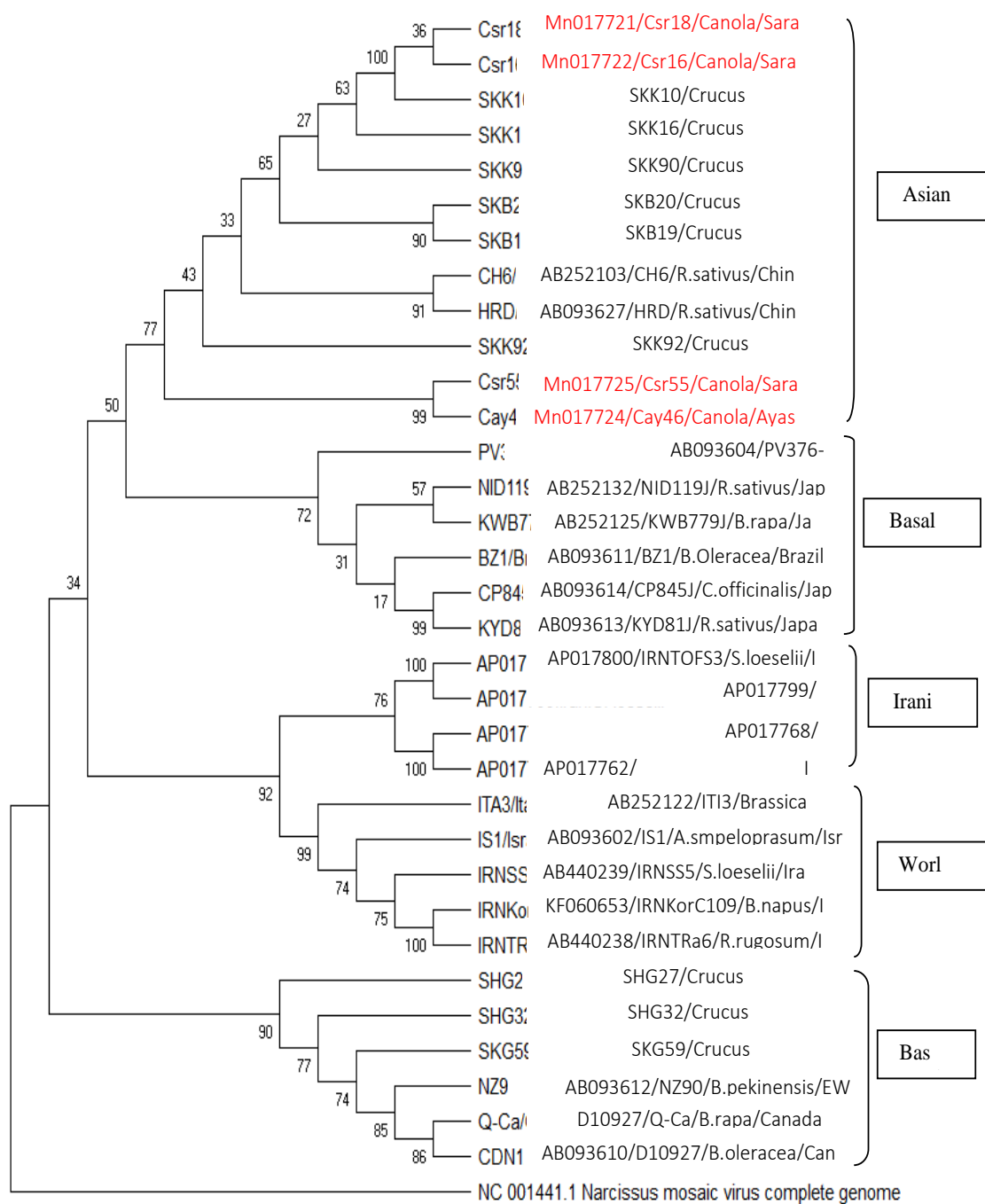
Table 3. List of collected isolates from South Khorasan

Region of sampling	Isolate name	Recombinant	Accession Number
Ayask	Cay46	-	Mn017724
Sarayan	CSr55	+	Mn017725
Sarayan	CSr16	-	Mn017722
Sarayan	CSr18	-	Mn017721
Ferdows	CSe55	-	Mn017725
Ferdows	CSe39	+	Mn017720

چهار جدایه این تحقیق در گروه Asian BR قرار گرفتند. به این صورت که دو جدایه CSr18 و CSr16 نزدیک به جدایه‌هایی از کشور چین و جدایه‌های ایرانی مربوط به گیاه زعفران (Heydari *et al.*, 2018) قرار گرفتند و دو جدایه Cay45 و CSr55 نزدیک به جدایه‌ای از ترکیه واقع شدند. در گروه Basal BR جدایه‌هایی از ژاپن، برزیل و آلمان قرار دارند. همچنین

موزاییک شلغم ردیابی نگردید که احتمالاً عوامل بیماریزای دیگری سبب بروز علائم گردیده است.

به سایر ویروس‌های این جنس آلوده بوده اند. همچنین در تعدادی از نمونه‌های دارای علائم، آلودگی به ویروس



شکل ۲. درخت تبارزایی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس موزاییک شلغم مربوط به شش جدایه کلزا و جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGAX و روش Maximum likelihood و بوت استرپ ۱۰۰۰ به‌عنوان بهترین روش رسم شد. ویروس *Narcissus yellow strip virus (NYSV)* به‌عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است.

Figure 2. Phylogenetic tree obtained from the alignment of nucleotide sequences of the Coat protein of TuMV isolates from 6 Iranian isolates of Canola with some other of isolates the world. For each sequence, the country of origin, name of isolate and accession No. are indicated. Phylogenetic trees were constructed using MEGAX version 6 and the maximum likelihood tree test with 1000 bootstrap replications as the best method for phylogeny of this virus. NYSV is considered as outgroup

جدول ۴. بررسی احتمال وقوع نوترکیبی در جدایه‌های TuMV بررسی‌شده در این تحقیق با نرم افزار RDP4
Table 4. Investigation on recombination events in Iranian isolates of TuMV from Canola using RDP4

Recombinant isolates	Major parent	Minor parent	Methods						
			R	G	B	M	C	S	T
CSe39	Skk16	Q-Ca/Canada/Brassica rapa/D10927	-	+	+	+	-	-	+
SKK90/Iran/C.sativus	KwB779J/Japan/B.rapa/AB25	SKB20/Iran/Crocus sativus	-	-	-	+	-	+	+
SHG32/Iran/c.sativus	SKK10/Iran/crocus_sa	Unknown	-	+	-	+	+	+	-
KYD81J/Japan/Radish sativus/AB09361	Unknown	IS1/Israel/Allium ampeloprasum/AB0936	-	+	-	+	-	+	-
SKK92/Iran/C.sativus	Unknown	PV376-Br/Germany/B.napus/Ab093	-	-	-	+	+	+	-
CSf55	SKK10/Iran/ (C.sativus)	Unknown	-	-	-	+	-	+	+
SHG27/Iran/C.sativus	BZ1/Brazil/B.Oleracea/AB093611	Q-Ca/Canada/B.rapa/D10927	-	-	-	-	-	+	+
HRD/China/R.sativus/AB093627	BZ1/Brazil/B.Oleracea/AB0	Cay46	-	-	-	+	-	+	+

جدول ۵. بررسی تنوع ژنتیکی در چهار گروه تبارزایی بررسی‌شده در این تحقیق با نرم افزار DnaSp

Table 5. Investigation of the possibility of nucleotide diversity among four phylogenic groups in this study by DnaSp

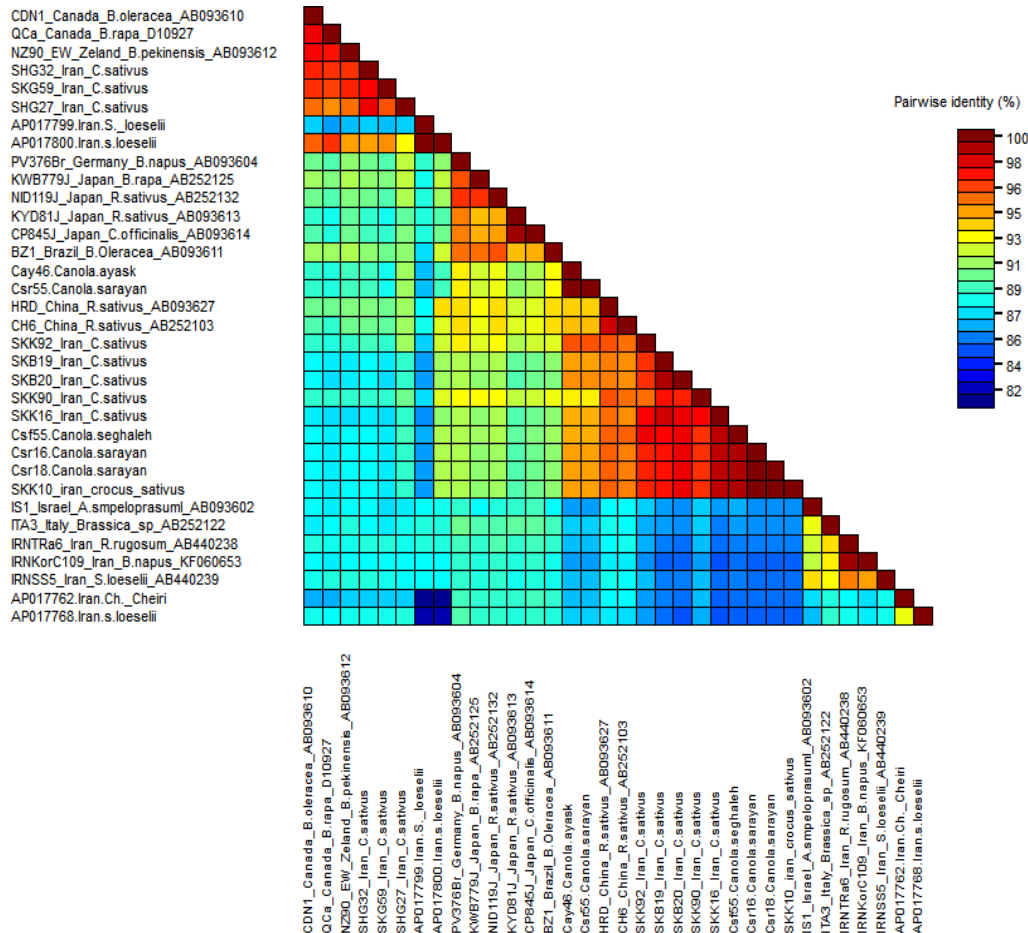
	Number of InDel Haplotypes	InDel Haplotype Diversity	InDel Diversity, k(i):	InDel Diversity per site, Pi(i)	Theta (per sequence) from I, Theta(i)-W	Tajima's D
Asian	3	0.345	0.509	0.00054	0.683	-0.77815
Basal BR	2	0.250	0.250	0.00029	0.386	-1.05482
World B	2	0.21	0.235	0.00023	0.363	-1.0043
BasalB	2	0.286	0.286	0.00033	0.408	-1.00623

Ki: تنوع در نوکلئوتیدها؛ Pi: تنوع نوکلئیدی در هر نوکلئوتید مشابه؛ InDel: تنوع هاپلوئیدی؛ $P < 0.05$.

Ki: Nucleotid diversity, Pi: Nucleotid diversity in each nucleotid, InDel: Haplod diversity, $P < 0.05$

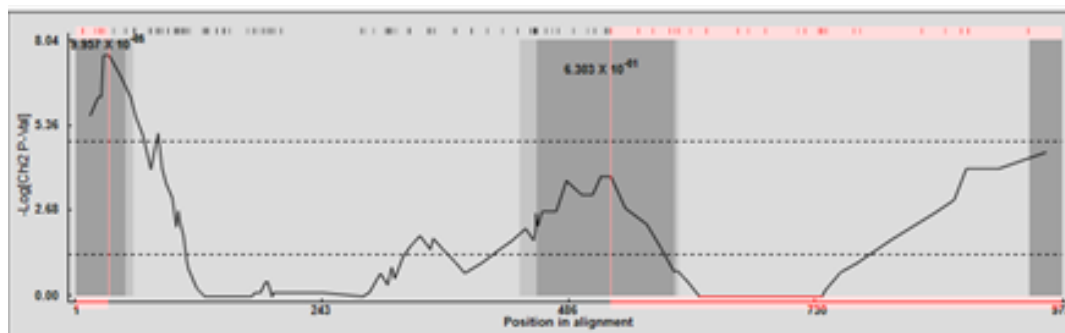
World B دارای جدایه‌های نوترکیبی از نیوزلند و کانادا است که مربوط به جدایه‌های قدیمی‌تر از آلمان و انگلیس بوده که به این منطقه مهاجرت کرده و نوظهور می‌باشند و جالب این که اگر در درخت تبارزایی جدایه نوترکیب CSe39 اضافه گردد، در مجاورت این جدایه‌های نوترکیب طبقه‌بندی می‌شود (داده نمایش داده نشده است) (Yasaka *et al.*, 2015). ماتریکس تشابه رسم‌شده با نرم‌افزار SDtv نشان داد که بیشترین شباهت بین جدایه ایرانی CSe39 از ایران با جدایه AB093627 مربوط به چین و کمترین شباهت در سطح ۸۴ درصد بین CAT46 با جدایه AB2552117 از کشور یونان می‌باشد. تشابه توالی نوکلئوتیدی در ناحیه پروتئین پوششی در بین گونه‌ها بین ۹۰-۹۵ درصد متغیر بود (شکل ۳). وقوع نوترکیبی در بین جدایه‌های این ویروس بیانگر این مطلب است که نوترکیبی در طبیعت جریان دارد و قطعاً بررسی این تنوع در ژنوم ویروسی مرتبط با گونه‌های مختلف در طراحی روش‌های کنترل بهتر، مؤثر است و این نوترکیبی در بین جمعیت‌های ویروسی منجر به تطابق بهتر آن‌ها با شرایط محیطی می‌گردد (Bruyere *et al.*, 2000). در بررسی تنوع ژنتیکی، پایین‌ترین میزان تنوع نوکلئوتیدی (۰/۲۱) در جمعیت World B مشاهده گردید.

در برخی از مناطق استان که نمونه‌برداری شده بود، این ویروس ردیابی نگردید که می‌تواند به دلایل متعددی نظیر تفاوت در ارقام که در خراسان جنوبی شامل ارقام اکاپی و هایولا بود، عدم حضور منابع اولیه آلودگی، فعالیت ناقلین و تغییرات اکولوژیکی متفاوت باشد. در بررسی تبارزایی این ویروس، پنج گروه تبارزایی بر مبنای توالی پروتئین پوششی تشکیل گردید که جدایه‌های این تحقیق در گروه Asian BR واقع شدند (Tan *et al.*, 2004). دو جدایه این ویروس (CSe39 و CSe55) در تحقیق حاضر و با نرم افزار RDP4 به‌عنوان جدایه نوترکیب معرفی گردید و چهار جدایه دیگر این تحقیق غیر نوترکیب می‌باشند. در گروه Basal B و Basal BR اگر چه جدایه‌های ایرانی مربوط به تحقیقات پیشین قرار گرفتند (Farzadfar *et al.*, 2009; Heydari *et al.*, 2018)، هیچ جدایه مربوط به این تحقیق قرار نگرفت. جدایه‌های این تحقیق در گروه‌های مشابه با جدایه‌های مربوط به گیاه زعفران از ایران می‌باشد که نشان می‌دهد این جدایه‌ها اجداد مشترکی دارند. همین‌طور بیانگر این مساله است که میزبان در گروه‌بندی جدایه‌های این ویروس بر مبنای پروتئین پوششی تأثیر چندانی ندارد و تفاوت در منطقه جغرافیایی در قرارگیری جدایه‌ها در یک گروه و مجزا از سایر جدایه‌ها مؤثر بوده‌است. از طرف دیگر گروه



شکل ۳. مقایسه درصد همولوژی نوکلئوتید پیرتین پوششی جدایه ایرانی و جدایه‌های موجود در بانک ژن به روش Clustal W برنامۀ SDT. جدایه‌های ایرانی شباهت ۹۵-۹۰ درصدی را نشان می‌دهند.

Figure 3. Homology matrix of Coat protein of 6 Iranian isolates of TuMV compared with some world isolates using SDT. Similarity among Iranian isolates of TuMV was 90-95%.



شکل ۴. جایگاه احتمالی وقوع نوترکیبی در جدایه‌های بررسی شده در این تحقیق

Figure 4. Position of recombination events in TuMV samples isolated from canola in this research

تحقیق و دنیا منفی بود که این نشان‌دهنده این مطلب است که جمعیت جدیدی از این ویروس توسعه یافته است (Desbiez *et al.*, 2009). تحقیق حاضر، اولین گزارش از آلودگی مزارع کلزا استان خراسان جنوبی به

انتخاب مرتبط با میزان سبب کاهش میزان تنوع نوکلئوتیدی در بین ویروس‌های گیاهی دارای آر. ان. ای می‌گردد (Garcia Arenal *et al.*, 2012). همچنین نتایج آزمون آماری Tajima's D در جدایه‌های این

بار صورت گرفت که نشانگر آلودگی این مزارع به ویروس مذکور می‌باشد. تمامی جدایه‌های نوترکیب این ویروس در کنار سایر جدایه‌های آسیایی در گروه Asain BR قرار گرفته‌اند. بررسی نوترکیبی با نرم‌افزار RDP4 نشان داد که دو جدایه این ویروس نوترکیب بوده که البته به دلیل دامنه میزبانی وسیع این ویروس و پراکنش آن در مناطق مختلف ایران، قابل پیش بینی است. همچنین بررسی تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که جمعیت جدایه‌های این ویروس در گروه‌های تبارزایی، در حال گسترش است.

ویروس موزاییک شلغم می‌باشد. همچنین شواهدی مبنی بر وقوع نوترکیبی در دو جدایه آن، بیانگر وقوع مکانیسم‌های تکاملی به‌منظور تطابق ویروس در نقاط متفاوت و با اقلیم متنوع است. همچنین این داده‌ها برای توسعه روش‌های ردیابی و مدیریت TuMV حائز اهمیت است.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق، بررسی مولکولی ویروس موزاییک شلغم در مزارع کلزا استان خراسان جنوبی برای اولین

REFERENCES

1. Bruyere, A., Wantroba, M., Flasiniski, S., Dzianott, A. & Bujarski, J. J. (2000). Frequent homologous recombination events between molecules of one RNA component in a multipartite RNA virus. *Journal of Virology*, 74(9), 4214-4219.
2. Chen, J., Chen, J. P., Langeveld, S. A., Derks, A. F. L. M. & Adams, M. J. (2003). Molecular Characterization of Carla-and Potyviruses from Narcissus in China. *Journal of Phytopathology*, 151(1), 26-29.
3. Desbiez, C., Joannon, B., Wipf-Scheibel, C., Chandeysson, C. & Lecoq, H. (2009). Emergence of new strains of *Watermelon mosaic virus* in South-eastern France: Evidence for limited spread but rapid local population shift. *Virus Research*, 141(2), 201-208.
4. Farzadfar, S., Tomitaka, Y., Ikematsu, M., Golnaraghi, A. R., Pourrahim, R. & Ohshima, K. (2009). Molecular characterisation of *Turnip mosaic virus* isolates from Brassicaceae weeds. *European Journal of Plant Pathology*, 124(1), 45-55.
5. Farzadfar, S. & Pourrahim, R. (2014). Characterization of *Turnip mosaic virus* from the AsianBR Population in Iran. *Journal of Phytopathology*, 162(11-12), 824-828.
6. Fu, Y. X. & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3), 693-709.
7. Ha, C., Coombs S., Revill P.A., Harding R.M., Vu M. & Dale J.L. (2008). Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of Virology*, 153(1):25-36
8. Heydari, M., Hosseini, A. & Duri, R. (2018). Detection and Phylogenetic Analysis of *Turnip mosaic virus* on Saffron (*Crocus sativus*) in Iran. *Applied Researches in Plant Protection*, 7(1), 17-28. (in Farsi)
9. Ghorbani, S., Dehghanyar, H., Sahandi, A., Pourrahim, R. & Shahrain, n. (2007). Serological identification and purification of *Turnip mosaic virus* (TuMV) in the oil-seed rape. *Iranian Journal of Plant Biology*, 20, 21-31. (in Farsi)
10. Izadpanah, K. (1982). *List of plant viral disease in Fars province*. University of Shiraz: Iran. (In Farsi)
11. Nguyen, H. D., Tomitaka, Y., Ho, S. Y., Duchene, S., Vetten, H. J., Lesemann, D., Walsh, J. A., Gibbs, A. J. & 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.
12. OECD. (2012). Organisation for Economic Co-operation and Development. Consensus document on the biology of the brassica crops (*Brassica* spp.). *Series on Harmonisation of Regulatory oversight of Biotechnology*, 54, OECD, Paris, 142.
13. Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z. & Chen, J. (2002). Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, 83(6), 1511-1521.
14. Li, X., Zhu, T., Yin, X., Zhang, C., Chen, J., Tian, Y. & Liu, J. (2017). The genetic structure of *Turnip mosaic virus* population reveals the rapid expansion of a new emergent lineage in China. *Virology Journal*, 14(1), 165.
15. Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
16. Muhire, B. M., Varsani, A. & Martin, D. P. (2014). SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS one*, 9(9), 1-8.

17. Posada, D. & Crandall, K. A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*, 98(24), 13757-13762.
18. Rakow, G. (2004). Species origin and economic importance of Brassica. Springer, Berlin, Heidelberg.
19. Rezaeiizad, A. & zareisiabidi, A. (2016). Direction of Canola Farming in Kermanshah Province. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Iran. (in Farsi)
20. Riechmann, J. L., Laín, S. & García, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, 73(1), 1-16.
21. Sabokkhiz, M. A., Jafarpour, B., Ahmadi, F. S., Tarighi, S. & Safarnejad, M. R. (2016). Molecular Identification of *Turnip Mosaic virus* (TuMV) in Hoary Mustard (*Herschfeldiaicrana*) From Iran. *Plant Protection Journal*, 29(2), 231-237.(in Farsi)
22. Sawyer, S. (1989). Statistical tests for detecting gene conversion. *Molecular Biology and Evolution*, 6(5), 526-538.
23. Salminen, M. O., Carr, J. K., Burke, D. S. & Mccutchan, F. E. (1995). Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 11(11), 1423-1425.
24. Sanchez, F., Wang, X., Jenner, C. E., Walsh, J. A. & 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(1), 33-43.
25. Shahraeen N., Farzadfar Sh. & Lesemann D.E. 2003. Incidence of viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) in Iran. *Journal of Phytopathology*, 151, 614-616
26. Shukla, D. D., Ward, C. W. & Brunt, A. A. (1994). *The Potyviridae*. CAB international.
27. Smith, J. M. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of molecular evolution*, 34(2), 126-129.
28. Tabarestani, A. Z., Shamsbakhsh, M. & Safaei, N. (2010). Distribution of three important aphid borne canola viruses in Golestan province. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 41(2), 251-259. (in Farsi)
29. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
30. Tomimura, K., Gibbs, A. J., Jenner, C. E., Walsh, J. A. & Ohshima, K. (2003). The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent emergence' in east Asia. *Molecular Ecology*, 12, 2099-2111
31. Tan, Z., Wada, Y., Chen, J. & Ohshima, K. (2004). Inter-and intralinear recombinants are common in natural populations of *Turnip mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 85(9), 2683-2696.
32. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
33. Tomlinson, J. A. (1987). Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals of Applied Biology*, 110(3), 661-681.
34. Tomlinson, J. A. (1970). *Turnip mosaic virus*. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, 8(4), 1-8
35. Tomimura, K., Špak, J., Katis, N., Jenner, C. E., Walsh, J. A., Gibbs, A. J. & Ohshima, K. (2004). Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in West and East Eurasia. *Virology*, 330(2), 408-423.
36. Tomitaka, Y. & Ohshima, K. (2006). A phylogeographical study of the *Turnip mosaic virus* population in East Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan. *Molecular Ecology*, 15(14), 4437-4457.
37. Yasaka, R., Ohba, K., Schwinghamer, M. W., Fletcher, J., Ochoa-Corona, F. M., Thomas, J. E. & Ohshima, K. (2015). Phylodynamic evidence of the migration of *Turnip mosaic* potyvirus from Europe to Australia and New Zealand. *Journal of General Virology*, 96,701-713
38. Yasaka, R., Fukagawa, H., Ikematsu, M., Soda, H., Korkmaz, S., Golnaraghi, A. & Ohshima, K. (2017). The timescale of emergence and spread of turnip mosaic potyvirus. *Scientific reports*, 7(1), 4240.