

شناسایی سرولوژیکی و مولکولی ویروس زردی شلغم در مزارع کلزای استان کرمانشاه

راحله امینی^۱، هادی خاتری^{۲*} و ناهید معرفزاده^۲

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

۲. استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۲۷)

چکیده

اعضای جنس پولروویروس از جمله ویروس زردی شلغم (*Turnip yellows virus, TuYV*) از ویروس های مهم در گیاهان زراعی هستند. این ویروس ها توسط شته ها به صورت گردشی - غیر تکثیری انتقال پیدا می کنند. طی سال های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ تعداد ۳۲ نمونه برگ کلزا و یک نمونه خردل وحشی از مزارع استان کرمانشاه جمع آوری شد. این نمونه ها با کیت تاس-الیزا DSMZ که چهار گونه پولروویروس شامل *TuYV, Beet mild yellowing virus (BMV), Beet western yellows virus (BWV)* و *Beet chlorosis virus (BChV)* را شناسایی می کند، آزمایش شدند. در آزمون تاس-الیزا، هفت نمونه کلزا و نمونه خردل وحشی پاسخ مثبت نشان دادند. برای آزمون انتقال ویروس از *Myzus persicae* و *Brevicoryne brassicae* استفاده شد که در گیاهان کلزا و تربچه موفقیت آمیز بود ولی آلودگی به چغندر قند منتقل نگردید. در IC-RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی، یک قطعه با اندازه ۷۸۰ جفت باز از ژن کد کننده P0 از نمونه خردل وحشی و دو نمونه کلزا تکثیر گردید. توالی های نوکلئوتیدی جدایه های کلزا و خردل وحشی بسیار مشابه بودند (۹۹.۴ درصد همسانی) و در جستجوی BLAST با توالی های نوکلئوتیدی جدایه های *TuYV*، که بسیاری از آن ها از استرالیا و از گیاهان مختلف مانند شنبلبله، کلزا، نخودفرنگی و نخود بودند، تا ۹۷.۲ درصد شباهت داشتند. در تحلیل فیلوژنتیک توالی های نوکلئوتیدی ناحیه کد کننده P0، این دو جدایه به همراه سایر جدایه های *TuYV* در یک گروه قرار گرفته و از سایر پولروویروس ها مانند *BMV, BWV* و *BChV* متمایز بودند. در این پژوهش، شناسایی ویروس زردی شلغم در مزارع کلزای ایران بر اساس تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه کد کننده P0 برای اولین بار در شهرستان کرمانشاه انجام گرفت.

واژه های کلیدی: پولروویروس، تاس-الیزا، IC-RT-PCR، انتقال پایا، کلزا.

Serological and molecular detection of *Turnip yellows virus* in rapeseed fields in Kermanshah Province, Iran

Authors: Rahele Amini¹, Hadi Khateri^{2*} and Nahid Moarrefzadeh²

Former M.Sc. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

2. Assistant professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

(Received: October 7, 2020- Accepted: November 17, 2020)

ABSTRACT

Members of the genus *Polerovirus*, including *Turnip yellows virus (TuYV)*, are important viruses on field crops. They are being transmitted by aphids in a circulative non-propagative manner. During 2018 and 2019, 32 leaf samples from rapeseed (*Brassica napus*) and one sample from wild mustard (*Sinapis arvensis*) were collected in Kermanshah Province, Iran. The samples were tested by a TAS-ELISA kit (DSMZ) that detects four poleroviruses including *TuYV, Beet mild yellowing virus (BMV), Beet western yellows virus (BWV)* and *Beet chlorosis virus (BChV)*. A positive reaction was observed for the wild mustard and seven rapeseed samples. *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae* were used for virus transmission. The virus was successfully transmitted by the aphids to rapeseed and radish but not to sugar beet plants. In IC-RT-PCR using a specific primer pair, a 780 bp fragment was amplified from wild mustard and two rapeseed samples. The two nucleotide sequences from rapeseed and wild mustard had 99.4% identity to each other and showed up to 97.2% similarity to *TuYV* isolates previously deposited in GenBank from fenugreek, rapeseed, pea and chickpea plants in Australia. In phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of ORF0, two Iranian isolates of *TuYV* were placed in the same clade with other *TuYV* isolates and were distinct from other poleroviruses such as *BMV, BWV* and *BChV*. In this study, for the first time in Kermanshah Province, *TuYV* was identified in Iranian rapeseed fields based on nucleotide sequencing of the P0 coding region.

Keywords: *Polerovirus*, TAS-ELISA, IC-RT-PCR, Persistent Transmission, Rapeseed.

* Corresponding author E-mail: hkhatari@gmail.com

مقدمه

گیاه کلزا (*Brassica napus*) مهم‌ترین محصول دانه‌روغنی جهان پس از سویا است (Hackenberg et al., 2020). در سال‌های گذشته سطح زیر کشت کلزا در ایران افزایش قابل توجهی یافته به طوری که در سال زراعی ۹۷-۱۳۹۶ (حدود ۱۹۱ هزار هکتار) در مقایسه با سال ۹۰-۱۳۸۹ بیش از دو برابر بوده است (Ahmadi et al., 2019; Anonymous, 2011). در بین استان‌های تولید کننده کلزا در ایران، استان کرمانشاه در سال زراعی ۹۷-۱۳۹۶ از نظر عملکرد محصول در واحد سطح (حدود ۲/۵ تن) رتبه دوم و از نظر میزان تولید (حدود ۲۰ هزار تن) و نیز سطح زیر کشت، رتبه پنجم کشور را داشته است (Ahmadi et al., 2019). بیمارگرهای گیاهی از عوامل کاهش محصول کلزا بوده و در بین آن‌ها ویروس‌های گیاهی از اهمیت زیادی برخوردار هستند (Shahraeen, 2012). ویروس زردی شلغم (*Turnip yellows virus, TuYV*) که متعلق به جنس *Polerovirus* (خانواده *Luteoviridae*) است، یکی از بیماری‌های مهم ویروسی خسارت‌زا در کلزا به شمار می‌آید (Asare- Bediako et al., 2020). میزان آلودگی مزارع کلزا به ویروس زردی شلغم متغیر است و در انگلستان تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (Asare- Bediako et al., 2020). میزان کاهش محصول کلزا توسط ویروس زردی شلغم در انگلستان تا ۲۶ درصد (Coleman, 2013)، در آلمان تا ۳۴ درصد (Graichen et al., 1999) و در استرالیا تا ۴۶ درصد (Stevens et al., 2008) گزارش گردیده است. تمامی شاخص‌های عملکرد و از جمله تعداد انشعابات اولیه، تعداد بذر در غلاف و درصد روغن دانه تحت تأثیر آلودگی به این ویروس قرار می‌گیرند. همچنین آلودگی به TuYV سبب افزایش معنی‌دار غلظت گلوکوزینولات‌ها در روغن می‌شود (Stevens et al., 2008). معمولاً نشانه‌های آلودگی به ویروس زردی شلغم تا قبل از توسعه ساقه‌ها به راحتی قابل تشخیص نیستند و ممکن است به دلیل شباهت با اثر عوامل دیگری مانند تنش‌ها و مشکلات تغذیه‌ای مورد توجه قرار نگیرند. نشانه‌های بیماری ناشی از این ویروس

شامل قرمزی حواشی برگ و زردی و قرمزی نواحی بین رگبرگ‌ها است (Stevens et al., 2008). این نوع نشانه‌ها در آلودگی‌های ناشی از اعضای جنس پولروویروس (*Polerovirus*) معمول بوده و به تدریج گسترش می‌یابند. آلودگی محدود به آوندهای آبکش است و در سراسر گیاه حرکت می‌کند و باعث زردی می‌شود (Farzadfar et al., 2014; Newbert, 2016). ویروس زردی شلغم نیز مانند سایر پولروویروس‌ها توسط شته‌ها به صورت گردشی - غیر تکثیری انتقال پیدا می‌کند (Zhou et al., 2011) و از طریق بذر منتقل نمی‌شود. شته سبز هلو (*Myzus persicae*) به عنوان مهم‌ترین ناقل این ویروس در مزارع کلزای اروپا (Asare- Bediako et al., 2020; Schliephake et al., 2000; Stevens et al., 2008) شناخته شده است. این شته در سراسر جهان گسترش دارد و روی بیش از ۴۰ خانواده گیاهی تغذیه می‌کند. از مهم‌ترین میزبان‌های این شته می‌توان به چغندر، کاهو، کلمیان و حبوبات اشاره کرد (CABI, 2019). در افراد بالدار شته سبز هلو تا ۷۲ درصد آلودگی به TuYV تشخیص داده شده است (Stevens et al., 2008). شته مومی کلم (*Brevicoryne brassicae*) نیز قادر به انتقال این ویروس است (Schliephake et al., 2000). کارایی انتقال ویروس زردی شلغم توسط شته سبز هلو ۹۶ درصد بوده که بسیار بیشتر از شته مومی کلم (حدود ۱۴ درصد) است (Coutts et al., 2006). در سال ۲۰۰۰، برای جدایه‌های شبیه به ویروس زردی غربی چغندر (*Beet western yellows virus, BWYV*) که در چغندر قند آلودگی ایجاد نمی‌کردند، نام *Brassica yellowing virus* به کمیته بین‌المللی رده‌بندی ویروس‌ها پیشنهاد گردید و نهایتاً نام *Turnip yellows virus* تصویب شد (Hauser et al., 2000a; Hauser et al., 2000b; Mayo, 2002). ژنوم TuYV از نوع ssRNA (+) با طول حدود ۵۶۴۱ نوکلئوتید است. انتهای 5' ژنوم به یک پروتئین ویروسی (VPg) متصل بوده و در انتهای 3' فاقد Poly A یا ساختار شبه RNA است. پروتئین‌های ویروس از روی شش چارچوب خوانش (Open Reading Frame, ORF)

آلودگی گیاه کلزا به ویروس BWYV در استان گلستان در سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ توسط آزمون DAS-ELISA و RT-PCR شناسایی شد (Zahedi Tabarestani *et al.*, 2012; Zahedi Tabarestani *et al.*, 2011). حاجی یوسف و همکاران (2016) با استفاده از پادتن‌های تک‌همسانه‌ای 5G4 و 6G4 و نیز جفت آغازگرهای عمومی، آلودگی نمونه‌های نخود به BWYV در استان لرستان را گزارش نمودند. با توجه به اهمیت کشت کلزا در استان کرمانشاه، تحقیق حاضر به منظور بررسی احتمال وجود ویروس زردی شلغم در مزارع کلزای استان صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

طی سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸، تعداد ۳۲ نمونه کلزا از مزارع استان کرمانشاه در شهرستان‌های اسلام‌آباد غرب (۶)، صحنه (۹)، کرمانشاه (۱۵) و هرسین (۲) و یک نمونه خردل وحشی از شهرستان کرمانشاه جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری به روش انتخابی و از گیاهان دارای نشانه‌های زردی صورت گرفت. نمونه‌ها توسط کیت تاس-الیزای DSMZ (Braunschweig, Germany) که شامل یک پادتن تک‌همسانه‌ای (AS-0049/1) است مورد آزمایش قرار گرفتند. این کیت برای ردیابی چهار گونه پلوروویروس شامل ویروس زردی غربی چغندر (*Beet western yellows virus*)، ویروس زردی شلغم (*Turnip yellows virus*)، ویروس زردی خفیف چغندر (*Beet mild yellowing virus*) و ویروس سبزدی چغندر (*Beet chlorosis virus*) توسعه یافته است. تهیه بافرها و تاس-الیزا طبق دستورالعمل دریافتی از DSMZ انجام گرفت.

بذرهای گیاهان چغندر (*Beta vulgaris*)، نخود (*Cicer arietinum*)، شاهی (*Lepidium sativum*)، کلزا و تربچه (*Raphanus sativus* var. *sativus*) در مخلوط پیت‌ماس و پرلیت سترن (به نسبت حجمی ۱ به ۲) کشت گردیدند و در گلخانه با دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. این گیاهان به صورت مرتب با آب حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام کود کامل

شامل ORF0 تا ORF5 ترجمه می‌شوند (King *et al.*, 2012). در پلوروویروس‌ها، پروتئین P0 (حاصل از ترجمه ORF0) در سرکوب خاموشی ژن نقش دارد (Wetzel *et al.*, 2018). فرزادفر و پوررحیم (۲۰۱۷) ویروس زردی شلغم را از مزارع یونجه ایران گزارش نمودند. شهرآیین و همکاران (۲۰۰۳) وجود آلودگی به BWYV در نمونه‌های جمع‌آوری شده سال‌های ۱۳۷۹-۱۳۸۰ از مزارع کلزای استان فارس، بندرعباس و ورامین را با استفاده از روش داس-الیزا گزارش کردند و مشخص نمودند که این آلودگی توسط شته سبز هلو به گیاه چغندر قابل انتقال بود. فرزادفر و همکاران (2006) با استفاده از روش Tissue-blot (TBIA) وجود BWYV در مزارع چغندر استان‌های قزوین، کرمانشاه، اصفهان، خراسان، سمنان، فارس و آذربایجان غربی را گزارش نمودند. اولین گزارش BWYV از محصولات لگوم در ایران از مزارع نخود و از جمله در استان کرمانشاه بود (Makkouk *et al.*, 2003). نمونه‌هایی که آلودگی به ویروس در آن‌ها توسط آزمون TBIA با پادتن تک‌همسانه‌ای 5G4 (پادتن طیف گسترده) تشخیص داده شد، توسط پادتن تک‌همسانه‌ای ATCC PVAS-647 برای ردیابی BWYV مورد آزمایش قرار گرفتند. در سال‌های ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ آلودگی به BWYV و *Bean leaf roll virus* (BLRV) در مزارع نخود و عدس ایران مشخص شد (Makkouk *et al.*, 2003).

فرزادفر و همکاران با استفاده از پادتن تک‌همسانه‌ای 5G4 وجود آلودگی پلوروویروس در نمونه‌های مزارع یونجه استان‌های لرستان و ایلام را مشخص نمودند. آنالیز مولکولی نشان داد که تعداد زیادی از این نمونه‌ها به BWYV آلوده بودند. این آلودگی توسط شته سبز هلو منتقل شد و نشانه‌های رگبرگ روشنی در چغندر، زردی رگبرگ در کلزا، زردی رگبرگ و کم‌رشدی در خردل سفید و زردی رگبرگ شدید در یونجه مشاهده شد. با تکثیر ژن پروتئین پوششی با آغازگرهای اختصاصی BWYV-CPF و BWYV-CPR و توالی‌یابی، آلودگی نمونه‌ها به ویروس BWYV تأیید شد (Farzadfar *et al.*, 2014).

(TCATACAAACATTTTCGGTGTAGAC) با هدف فراوانسازی قطعه‌ای به طول حدود ۷۸۰ جفت‌باز از ژن P0 انجام شد. این جفت آغازگر و برخی آغازگرهای گزارش شده قبلی، با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime 2019.1.3 از نظر امکان انطباق با توالی‌های متعددی از انواع پولروویروس‌ها مانند BMYV و BChV، BWYV که در دسترس‌اند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. به دام اندازی ویروس توسط پادتن (Immunocapture, IC) مشابه روش لِمیتی و همکاران (1997) صورت گرفت. ابتدا ۵۰ میکرولیتر مخلوط پادتن IgG (AS-0049) که با غلظت یک به ۵۰۰ در بافر پوششی (مطابق روش تاس-الیزا) تهیه شده بود داخل میکروتیوب ۰.۲ میلی‌لیتری ریخته شد. میکروتیوب به مدت دو تا چهار ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از سه مرتبه شستشو با بافر شستشو، مرحله بلاکینگ همانند آزمون تاس-الیزا انجام شد. میکروتیوب پس از نیم ساعت نگهداری در انکوباتور، با ضربه زدن تخلیه گردید. عصاره نمونه گیاهی آلوده به ویروس به نسبت یک به ده در بافر استخراج مورد استفاده در الیزا تهیه شد و ۵۰ میکرولیتر از آن به میکروتیوب افزوده شد. میکروتیوب به مدت یک‌شب داخل یخچال (دمای چهار درجه سلسیوس) قرار گرفت و سپس پنج مرتبه با بافر شستشو شسته شد. در ترانویسی وارونه (reverse transcription, RT) برای سنتز cDNA، هفت میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC به میکروتیوب افزوده شد و پس از ده دقیقه نگهداری در دمای ۶۵ درجه سلسیوس، میکروتیوب روی یخ قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت پارس توس (شماره کاتالوگ A101161) و طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. یک میکرولیتر آغازگر معکوس (TuYVorf0R) به میکروتیوب افزوده شد و با میکروپیپیت به آرامی مخلوط گردید. نمونه ده دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس و سپس روی یخ قرار گرفت. ده میکرولیتر از مخلوط بافر و دو میکرولیتر از مخلوط آنزیم MMLV به نمونه افزوده شد. نمونه در دستگاه ترمال‌سایکلر به ترتیب در دمای ۲۵ درجه

(NPK+TE, 20-20-20) آبیاری شدند و برای آزمون انتقال ویروس با شته به منظور بررسی دامنه میزبانی مورد استفاده قرار گرفتند. در این پژوهش از دو گونه‌ی شته سبز هلو (*M. persicae*) و شته مومی کلم (*B. brassicae*) برای انتقال ویروس استفاده شد. تکثیر و نگهداری کلنی شته سبز هلو روی گیاهچه‌های فلفل دلمه‌ای و کلزا انجام شد. این گیاهان داخل قفس‌های پلاستیکی شفاف و دارای توری، در ژرمیناتور با رطوبت ۵۵ درصد و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تکثیر و نگهداری کلنی شته مومی کلم نیز روی گیاه کلزا انجام شد. برای تهیه کلنی شته خالص و عاری از ویروس، یک شته بالغ درون قوطی پلاستیکی در دار با حجم حدود ۲۰ میلی‌لیتر قرار گرفت و تا حدود ۲۴ ساعت در ژرمیناتور نگهداری شد. پوره حاصل از این شته به یک گیاهچه سالم حاصل از بذر گیاه مورد نظر منتقل شد تا کلنی تشکیل دهد. از این کلنی برای آزمایش‌های انتقال استفاده شد. تعدادی از شته‌های کلنی خالص که عاری از ویروس بودند به مدت ۷۲ ساعت روی بوته آلوده به ویروس قرار داده شدند. سپس به هر یک از گیاهچه‌های سالم (تکثیر شده از بذر) ده عدد شته منتقل شد. شته‌ها پس از ۴۸ ساعت تغذیه از گیاهچه‌ها حذف شدند. سپس گیاهچه‌ها به مدت حدود سه هفته برای ظهور نشانه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از این مدت، الیزا روی تمامی گیاهان صورت گرفت تا انتقال ویروس به آن‌ها ارزیابی شود. گیاهان تا دو ماه نگهداری شدند و وضعیت نشانه‌ها در آن‌ها بررسی گردید. دو نمونه کلزا و یک نمونه خردل وحشی (*Sinapis arvensis*) که در آزمون تاس-الیزا پاسخ مثبت داشتند، برای بررسی مولکولی انتخاب شدند.

بررسی‌های مولکولی به روش Immunocapture Reverse Transcription PCR (IC-RT-PCR) توسط جفت آغازگر اختصاصی (Schubert *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2012) به نام‌های TuYVorf0F (ACAAAAGAAACCAGGAGGGAATCCTTA) و TuYVorf0R

به شرکت زیست‌فناوری پیشگام ارسال شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی دریافتی با استفاده از نرم‌افزار Geneious Prime 2019.1.3 ویرایش گردیدند و با تنظیمات پیش‌فرض ابزار BLASTn با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه شدند. این توالی‌ها به همراه توالی‌های مشابه دریافتی از GenBank (جدول ۱)، هم‌ردیف‌سازی شدند. موقعیت چارچوب خوانش ORF0 بر اساس توالی‌های مشابه و از جمله رس‌شمار NC_003743 (توالی مرجع TuYV) مشخص گردید. ترسیم درخت فیلوژنتیک توسط Geneious Tree Builder با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده P0 دو جدایه RA109 و RA595d به همراه جدایه‌های دیگری از TuYV و جدایه‌هایی از سایر پولروویروس‌ها شامل BMV، BChV و BWYV (جدول ۱) به روش Neighbor-Joining با ۱۰۰۰ تکرار صورت گرفت. علاوه بر اعضای جنس پولروویروس، توالی مرجع ویروس موزائیک توت‌های نخودفرنگی شماره ۱ با رس‌شمار NC_003629 که از جنس *Enamovirus* است نیز به عنوان فرد برون گروه در این آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۷ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه نگهداری شد. آزمون PCR توسط جفت آغازگر اختصاصی (TuYVorf0F و TuYVorf0R) با استفاده از کیت شرکت سینا کلون (Reddy[®] to use PCR master mix, 2X با شماره کاتالوگ MM2061) و طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. مراحل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، چرخه دمایی (شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه) و مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترمال‌سایکلر Biometra TPersonal انجام شد. محصول واکنش روی ژل آگاروز ۲ درصد حاوی DNA Green ViewerTM (شرکت پارس توس، با شماره کاتالوگ B111151) مورد بررسی قرار گرفت. اندازه تقریبی قطعات تکثیرشده در مقایسه با نشانگر اندازه DNA (DNA size marker II, 100bp plus) تهیه شده از شرکت دنا زیست آسیا، شماره کاتالوگ S-5091) برآورد شد. محصولات PCR برای تعیین توالی

جدول ۱. فهرست توالی‌های نوکلئوتیدی مورد استفاده در ترسیم درخت فیلوژنتیک.

Table 1. List of nucleotide sequences used for phylogenetic tree reconstruction.

Accession number	Virus	Country	Host	Isolate or Strain
HQ543127	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Pisum sativum</i>	20pP0
HQ543129	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Pisum sativum</i>	23pP0
HQ543132	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Pisum sativum</i>	47bP0
LR584019	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Brassica napus</i>	
LR584020	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Cicer arietinum</i>	
LR584024	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Brassica oleracea</i>	
LR584025	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Brassica oleracea</i>	
LR584026	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Raphanus raphanistrum</i>	
LR584027	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Cicer arietinum</i>	
MF176652	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Fg-SA
MH427303	<i>Turnip yellows virus</i>	Australia	<i>Apis mellifera</i>	TuYV-SA
MN497810	<i>Turnip yellows virus</i>	Germany	<i>Pisum sativum</i>	Landkreis Meissen_17
MN602973	<i>Turnip yellows virus</i>	Serbia	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	345Cb
MW026683	<i>Turnip yellows virus</i>	Iran	<i>Brassica napus</i>	RA595d
MW026684	<i>Turnip yellows virus</i>	Iran	<i>Sinapis arvensis</i>	RA109
NC_001747	<i>Potato leafroll virus</i>	Scotland	<i>Solanum tuberosum</i>	
NC_002766	<i>Beet chlorosis virus</i>	England		BChV-2a
NC_003491	<i>Beet mild yellowing virus</i>	France	sugarbeet	2ITB
NC_003629	<i>Pea enation mosaic virus 1</i>			WSG
NC_003743	<i>Turnip yellows virus</i>	France	<i>Lactuca sativa</i>	FL1
NC_004756	<i>Beet western yellows virus</i>			USA
NC_008249	<i>Chickpea chlorotic stunt virus</i>	Ethiopia	faba bean	Et-fb-am1



شکل ۱) و قرمزی و خشکیدگی حاشیه برگها دیده شد. این گیاهان در آزمون تاس-لیزا پاسخ مثبت نشان دادند.

نتایج

هفت نمونه از ۳۲ نمونه کلزای جمع‌آوری شده از استان کرمانشاه و نیز نمونه خردل وحشی در آزمون تاس-لیزا پاسخ مثبت نشان دادند. در آزمون انتقال با شته روی گیاهان نخود، شاهی و چغندر قند تا دو ماه هیچ‌گونه نشانه بیماری مشاهده نشد و این گیاهان در آزمون تاس-لیزا نیز پاسخ منفی داشتند. گیاهان کلزا و تربچه که با شته مایه‌زنی شده بودند، پس از گذشت دو تا سه هفته نشانه‌های زردی خفیف از خود بروز دادند. در مورد کلزا به تدریج نشانه‌های زردی شدیدتر



شکل ۱. نشانه‌های زردی ناشی از جدایه RA595d ویروس زردی شلغم در برگ گیاه کلزا که انتقال به آن توسط شته *Myzus persicae* انجام گرفت.

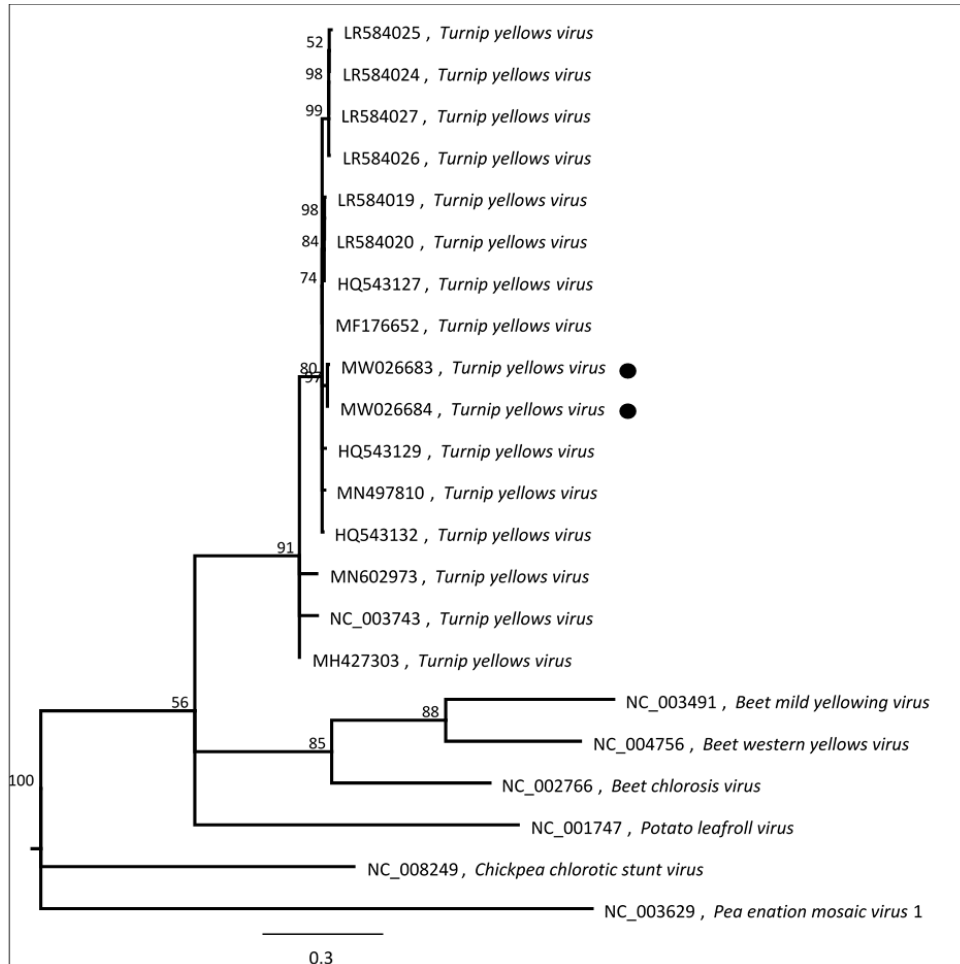
Figure 1. Yellows symptoms caused by TuYV isolate RA595d on the leaf of aphid-inoculated (*Myzus persicae*) rapeseed plant.

(جدایه RA109) در GenBank ثبت شده‌اند به ترتیب مربوط به یک نمونه کلزا (۷۳۳ جفت‌باز) و یک نمونه خردل وحشی (۶۸۵ جفت‌باز) بوده و دارای ۹۹.۷ درصد یکسانی بودند. توالی‌های نوکلئوتیدی مذکور در جستجوی BLAST، با یک جدایه ویروس زردی شلغم با نام Fg-SA (رس‌شمار MF176652) که از گیاه

در مورد هر دو نمونه کلزا و نیز نمونه خردل وحشی که با آزمون IC-RT-PCR توسط آغازگرهای اختصاصی بررسی شدند، قطعه‌ای به طول حدود ۷۸۰ جفت‌باز روی ژل آگاروز مشاهده شد. توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از این پژوهش که با دو رس‌شمار MW026683 (جدایه RA595d) و MW026684

کلزا، نخودفرنگی و نخود بودند. توالی‌های نوکلئوتیدی دو جدایه مورد بررسی در تحلیل فیلوژنتیک، به همراه سایر جدایه‌های TuYV در یک گروه قرار گرفته و از سایر پولروویروس‌ها مانند BMYV، BChV و BWYV متمایز بودند (شکل ۲).

شنبلیله از استرالیا گزارش شده است (Aftab *et al.*, 2018) بیش از ۹۷/۴ درصد همسانی نوکلئوتیدی (با پوشش دهی بیش از ۹۷ درصد) داشتند. بسیاری از نزدیک‌ترین جدایه‌های یافت شده در GenBank مربوط به استرالیا و از گیاهان مختلف مانند شنبلیله،



شکل ۲) تحلیل فیلوژنتیک توالی نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده پروتئین P0 از جدایه‌های RA109 و RA595d (به ترتیب با راس‌شماره‌های MW026684 و MW026683) Turnip yellows virus به همراه برخی از جدایه‌های دیگر این ویروس و سایر پولروویروس‌ها (جدول ۱). آنالیز به روش Neighbor joining با ۱۰۰۰ تکرار در آزمون بوت استرپ انجام شد. توالی مرجع *Pea enation mosaic virus 1* از جنس *Enamovirus* (راس‌شمار NC_003629) به عنوان فرد برون گروه به کار رفت.

Figure 2) Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the P0 coding region of RA109 and RA595d isolates (MW026684 and MW026683, respectively) of *Turnip yellows virus* along with some other isolates of the virus and other poleroviruses (Table 1). Analysis was performed by Neighbor joining method with 1000 replicates in bootstrap test. The reference sequence of *Pea enation mosaic virus 1* from the genus *Enamovirus* (NC_003629) was used as outgroup.

این ویروس از سال ۲۰۰۲ به عنوان یک گونه مستقل از BWYV تأیید شده است (Mayo, 2002). در ایران، قبلاً TuYV از مزارع یونجه همدان گزارش شده است (Farzadfar *et al.*, 2017). در پژوهش حاضر،

بحث و نتیجه‌گیری

ویروس زردی شلغم از مهم‌ترین ویروس‌های خسارت‌زای مزارع کلزا در مناطق مختلف دنیا خصوصاً اروپا و استرالیا است و اهمیت اقتصادی زیادی دارد.

شناسایی ویروس زردی شلغم در مزارع کلزای ایران (استان کرمانشاه) بر اساس تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده P0 انجام گرفت.

در تحقیقات گذشته، BWYV از مزارع کلزای ایران گزارش شده است (Shahraeen *et al.*, 2003; Zahedi Tabarestani *et al.*, 2011). جدایه‌های TuYV مورد بررسی در تحقیق حاضر توسط شته سبز هلو به چغندرقد منتقل نشدند و از این نظر مشابه جدایه‌های TuYV یونجه مورد بررسی در تحقیق فرزادفر و پوررحیم (۲۰۱۷) بودند و با جدایه‌های BWYV که توسط شته سبز هلو از نمونه‌های کلزا به گیاه چغندرقد قابل انتقال بودند (Shahraeen *et al.*, 2003) تفاوت داشتند. از آنجا که توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از این تحقیق مربوط به ORF0 بودند، امکان مقایسه آن‌ها با سه توالی ژن پروتئین پوششی TuYV که قبلاً از ایران گزارش شده‌اند (Farzadfar *et al.*, 2017) و نیز توالی‌های CP جدایه‌های BWYV عامل آلودگی مزارع کلزای استان‌های تهران و گلستان (Zahedi Tabarestani *et al.*, 2012) وجود نداشت و تنها از توالی‌های مربوط به جدایه‌های غیر ایرانی TuYV در آنالیز تبارزایی استفاده شد. از توالی‌های اعضای جنس لوتئوویروس نیز در این آنالیز استفاده نشد چون در ژنوم آن‌ها ناحیه کدکننده P0 وجود ندارد.

روش‌های سرولوژیکی از سال‌ها پیش در شناسایی ویروس‌های گیاهی به‌کار رفته‌اند ولی با وجود استفاده گسترده از آن‌ها، در زمینه تفکیک پولروویروس‌ها با این روش‌ها مشکلاتی وجود دارد. در سال ۱۹۷۲ آزمایش‌های سرولوژیکی با پادتن‌های چندهمسانه‌ای تفاوتی بین دو جدایه آمریکایی و انگلیسی BWYV با دو جدایه انگلیسی و آلمانی TuYV نشان نداد (Duffus *et al.*, 1972). پادتن‌های تهیه شده علیه جدایه‌های اروپایی و آمریکایی دو ویروس BMYV و BWYV نیز قادر به تفکیک این دو ویروس از یکدیگر نبودند (Duffus, 1975). استفاده از پادتن‌های تک‌همسانه‌ای نیز تاکنون راهگشا نبوده است. به عنوان مثال، پادتن‌های تک‌همسانه‌ای که برای شناسایی

Barley yellow dwarf virus PAV (جنس لوتئوویروس) و BYDV-RPV (که در حال حاضر با نام *Cereal yellow dwarf virus RPV* در جنس پولروویروس قرار دارد) تهیه شده بودند، به ترتیب با ویروس‌های BMYV و BWYV نیز واکنش نشان دادند (D'Arcy *et al.*, 1989) و قادر به تفکیک این دو ویروس از یکدیگر نبود (Herrbach *et al.*, 1991). در سال ۱۹۹۲ دو پادتن تک‌همسانه‌ای به نام‌های 5G4 و 6G4 تهیه شدند که اعضای از جنس پولروویروس را روی لگوم‌ها شناسایی می‌کردند (Katul, 1992). از این پادتن‌ها در چندین تحقیق استفاده شده و همچنان به کار می‌روند (Abraham *et al.*, 2006; Farzadfar *et al.*, 2014; Gaafar *et al.*, 2019; Hajiusef *et al.*, 2016; Makkouk *et al.*, 2003). از بین پادتن‌های تک‌همسانه‌ای متعددی که برای دو ویروس BMYV (جدایه چغندر) و BWYV (جدایه کلزا) تهیه شده بودند، هیچ‌یک قادر به تفکیک این دو ویروس از یکدیگر نبودند (Smith *et al.*, 1996). در سال ۲۰۱۶ حاجی یوسف از پادتن‌های تک‌همسانه‌ای و چندهمسانه‌ای (5G4 و 6G4) برای شناسایی BLRV استفاده کرد، اما ویروس BWYV نیز با این پادتن واکنش مثبت نشان داد (Hajiusef *et al.*, 2016). تاکنون هیچ پادتنی که به طور اختصاصی TuYV را ردیابی کند تولید نشده است. آفتاب و همکاران از طیف وسیعی از پادتن‌های BWYV برای ردیابی TuYV استفاده کردند و با استفاده از آزمون RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی TuYV و BWYV مشخص گردید که نمونه‌هایی که با آزمون‌های سرولوژیکی به عنوان BWYV شناخته شده بودند، همان TuYV هستند (Aftab *et al.*, 2018). نتیجه مشابهی نیز توسط ویلسون و همکاران (۲۰۱۲) گزارش شده است. کیت‌های تجاری عرضه شده توسط شرکت‌های مختلف نیز هم‌زمان بیش از یک نوع از این پولروویروس‌ها را شناسایی می‌کنند و قادر به تفکیک آن‌ها نیستند. کیت Agdia (کد SRA 32100) علاوه بر BWYV با جدایه‌های BYDV-RPV (که در حال حاضر با نام *Cereal yellow dwarf virus RPV* در جنس پولروویروس قرار دارد) نیز واکنش

روشن‌های سرولوژیکی از سال‌ها پیش در شناسایی ویروس‌های گیاهی به‌کار رفته‌اند ولی با وجود استفاده گسترده از آن‌ها، در زمینه تفکیک پولروویروس‌ها با این روش‌ها مشکلاتی وجود دارد. در سال ۱۹۷۲ آزمایش‌های سرولوژیکی با پادتن‌های چندهمسانه‌ای تفاوتی بین دو جدایه آمریکایی و انگلیسی BWYV با دو جدایه انگلیسی و آلمانی TuYV نشان نداد (Duffus *et al.*, 1972). پادتن‌های تهیه شده علیه جدایه‌های اروپایی و آمریکایی دو ویروس BMYV و BWYV نیز قادر به تفکیک این دو ویروس از یکدیگر نبودند (Duffus, 1975). استفاده از پادتن‌های تک‌همسانه‌ای نیز تاکنون راهگشا نبوده است. به عنوان مثال، پادتن‌های تک‌همسانه‌ای که برای شناسایی

تکثیر ژن پروتئین پوششی هر چهار ویروس توسط این جفت آغازگر وجود دارد. علت کارایی این جفت آغازگر برای گونه‌های مختلف ویروس، حفاظت‌شدگی زیاد ژن مذکور در پولروویروس‌ها است (Hauser *et al.*, 2000a). بنابراین جفت آغازگر طراحی شده بر اساس ناحیه CP برای بررسی‌های عمومی پولروویروس‌ها مناسب است و برای شناسایی یک گونه خاص، لازم است که از آغازگر اختصاصی استفاده شود. در آزمایش‌های انجام شده، TuYV توسط شته به گیاهان محک کلزا و تربچه انتقال یافت و آلودگی سیستمیک توسط تاس-الیزا تأیید گردید ولی قادر به آلوده کردن چغندرقد نبود. این نتیجه با گزارش‌های سایر محققین (Farzadfar *et al.*, 2017; Graichen *et al.*, 2019; Kehoe *et al.*, 1996) همخوانی دارد. بر اساس مشاهدات نگارندگان در استان کرمانشاه، جمعیت شته مومی کلم در مزارع کلزا غالب و بسیار بیشتر از شته سبز هلو است. بنابراین با وجود کارایی کمتر شته مومی کلم در انتقال ویروس زردی شلغم (Coutts *et al.*, 2000; Schliephake *et al.*, 2006)، احتمالاً جمعیت بالای این شته سبب افزایش اهمیت آن در انتقال این ویروس می‌گردد.

توالی‌های نوکلئوتیدی دو جدایه خردل وحشی و کلزا از استان کرمانشاه (رس‌شمارهای MW026683 و MW026684) همسانی بسیار بالایی داشتند بنابراین با توجه به گزارش‌های قبلی (Graichen *et al.*, 1996; Stevens *et al.*, 2008)، خردل وحشی می‌تواند منبع مهمی برای آلودگی مزارع کلزا در این منطقه باشد. با توجه به اینکه در حواشی و داخل مزارع کلزای استان کرمانشاه، جمعیت زیادی از خردل وحشی و علف‌های هرز دیگر مانند *Capsella bursa-pastoris* و *Senecio vulgaris* که به عنوان میزبان‌های این ویروس گزارش شده‌اند (Smith, 1988) وجود دارد، لازم است در پژوهش‌های آتی به علف‌های هرز نیز به عنوان منابع احتمالی آلودگی به این ویروس توجه شود. مطالعه بیشتر حشرات ناقل و بررسی عکس‌العمل ارقام مختلف کلزا در برابر این ویروس نیز ضروری به نظر می‌رسند.

می‌دهد. کیت LOEVE (کد 07009) که برای تشخیص TuYV و BMYV عرضه شده است، با نمونه‌های آلوده به BChV و BWYV نیز واکنش مثبت نشان می‌دهد (Farzadfar *et al.*, 2010). کیت DSMZ (AS-0049) که در این تحقیق استفاده شد، چهار نوع پولروویروس TuYV، BWYV و BChV را شناسایی می‌کند؛ بنابراین در نمونه‌هایی که با این کیت پاسخ مثبت نشان دهند، امکان آلودگی به یک یا تعداد بیشتری از این چهار ویروس وجود خواهد داشت. در حال حاضر هیچ کیت تجاری برای تفکیک سرولوژیکی این ویروس‌ها در دسترس نیست به همین دلیل برای تفکیک نمونه‌هایی که در آزمون تاس-الیزا پاسخ مثبت دهند، انجام آزمایش‌های تکمیلی مولکولی ضروری است. در این تحقیق بررسی مولکولی به صورت محدود انجام گرفت ولی با توجه به اهمیت این پولروویروس‌ها و خصوصاً اهمیت TuYV برای کشت کلزا لازم است که تحقیقات کامل‌تری در این زمینه صورت گیرد. امروزه از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس ناحیه 5' برای تفکیک پولروویروس‌ها استفاده می‌شود (Lemaire *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 1995) چون پولروویروس‌ها در این ناحیه تنوع بیشتری دارند و همان‌گونه که در شکل ۲ دیده می‌شود، به‌خوبی از یکدیگر تفکیک می‌گردند. جفت آغازگری که در این تحقیق برای ویروس زردی شلغم به کار برده شد (TuYVorf0R و TuYVorf0F) بر اساس ناحیه ژنی بیان‌کننده P0 طراحی شده است (Schubert *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2012). بررسی انطباق این جفت آغازگر با توالی‌های انواع پولروویروس‌ها مانند BWYV، BChV و BMYV نشان داد که کاملاً اختصاصی TuYV بوده و نمی‌تواند از هیچ‌یک از سایر گونه‌ها محصولی تکثیر نماید. بررسی جفت آغازگر طراحی شده بر اساس ناحیه ژن پروتئین پوششی (Zahedi Tabarestani *et al.*, 2011) نشان داد که با اغلب توالی‌های در دسترس از جدایه‌های TuYV، BWYV، BMYV و BChV تا حد بسیار زیادی (در مواردی تا ۱۰۰ درصد) منطبق است و بنابراین امکان

سپاسگزاری

زمانی (گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زاری، کرمانشاه) بابت تعیین گونه شته‌های ناقل قدردانی می‌نمایند.

نویسندگان مقاله از آقای دکتر Stephan Winter (DSMZ, Braunschweig, Germany) به دلیل فراهم نمودن پادتن مورد استفاده و از آقای دکتر عباسعلی

REFERENES

1. Abraham, A. D., Menzel, W., Lesemann, D. E., Varrelmann, M., & Vetten, H. J. (2006). Chickpea chlorotic stunt virus: A New Polerovirus Infecting Cool-Season Food Legumes in Ethiopia. *Phytopathology*, 96(5), 437-446.
2. Aftab, M., Nancarrow, N., Freeman, A., Davidson, J., Rodoni, B., & Trębicki, P. (2018). Natural infection of *Cucumber mosaic virus*, *Pea seed-borne mosaic virus* and *Turnip yellows virus* in a fenugreek crop (*Trigonella foenum-graecum*). *Australasian Plant Disease Notes*, 13(2), 1-6.
3. Ahmadi, K., Ebadzadeh, H. R., Hatami, F., Abdeshah, H., & Kazemian, A. (2019). Agricultural Statistics of 2017-2018, Vol 1: Field Crops (in Persian). Tehran, Iran: Ministry of Agriculture, Statistics and Information Technology Office.
4. Anonymous. (2011). Agricultural Statistics of 2010-2011, Vol 1: Field Crops (in Persian). Tehran, Iran: Ministry of Agriculture, Statistics and Information Technology Office.
5. Asare-Bediako, E., Jones, J. E., Hambidge, A. J., Stevens, M., Mead, A., Jenner, C. E., & Walsh, J. A. (2020). The incidence of turnip yellows virus in oilseed rape crops (*Brassica napus* L.) in three different regions of England over three consecutive growing seasons and the relationship with the abundance of flying *Myzus persicae*. *Annals of Applied Biology*, 176(2), 130-137.
6. CABI. (2019). *Myzus persicae* (green peach aphid). In *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc.
7. Coleman, A. (2013). Control of *Turnip yellows virus*: Assessing impact on oilseed rape quality traits and dissecting circulative transmission by aphids. (PhD Thesis), University of East Anglia, Retrieved from <https://ueaeprints.uea.ac.uk/47976/>
8. Coutts, B. A., Hawkes, J. R., & Jones, R. A. C. (2006). Occurrence of *Beet western yellows virus* and its aphid vectors in over-summering broad-leaved weeds and volunteer crop plants in the grainbelt region of south-western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(9), 975-982.
9. D'Arcy, C., Torrance, L., & Martin, R. (1989). Discrimination among luteoviruses and their strains by monoclonal antibodies and identification of common epitopes. *Phytopathology*, 79(8), 869-873.
10. Duffus, J. E. (1975). Serological relationship between beet western yellows and beet mild yellowing viruses. *Phytopathology*, 65(7), 811.
11. Duffus, J. E., & Russell, G. E. (1972). Serological relationship between Beet western yellows and Turnip yellows viruses. *Phytopathology*, 62(11), 1274-1277.
12. Farzadfar, S., & Pourrahim, R. (2010). Characterizations of Iranian isolates of beet mild yellowing virus. In (pp. 33): Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research and Education Organization.
13. Farzadfar, S., & Pourrahim, R. (2017). Molecular detection of *Turnip yellows virus* (TuYV) infecting alfalfa in Iran. *Australasian Plant Disease Notes*, 12(1), 12.
14. Farzadfar, S., Pourrahim, R., Golnaraghi, A. R., & Ahoonmanesh, A. (2006). Distribution and incidence of some aphid and leafhopper transmitted viruses infecting sugar beets in Iran. *Plant Disease*, 90(3), 252-258.
15. Farzadfar, S., Pourrahim, R., & Maleki, M. (2014). Incidence of *Beet western yellows virus* (BWYV) in alfalfa fields of Lorestan and Ilam Provinces (West Iran) and its taxonomical place using coat protein gene. *Applied Entomology and Phytopathology*, 82(1), 37-52.
16. Gaafar, Y. Z. A., & Ziebell, H. (2019). Two divergent isolates of *Turnip yellows virus* from pea and rapeseed and first report of *Turnip yellows virus*-associated RNA in Germany. *Microbiology Resource Announcements*, 8(17), e00214-00219.
17. Graichen, K., & Rabenstein, F. F. (1996). European isolates of beet western yellows virus (BWYV) from oilseed rape (*Brassica napus* L. ssp. *napus*) are non-pathogenic on sugar beet (*Beta vulgaris* L. var. *altissima*) but represent isolates of turnip yellows virus (TuYV). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 103, 233-245.
18. Graichen, K., & Schliephake, E. (1999). Infestation of winter oilseed rape by turnip yellows Luteovirus and its effect on yield in Germany. Paper presented at the 10th International Rapeseed Congress - New horizons for an old crop.

19. Hackenberg, D., Asare-Bediako, E., Baker, A., Walley, P., Jenner, C., Greer, S., Bramham, L., Batley, J., Edwards, D., Delourme, R., Barker, G., Teakle, G., & Walsh, J. (2020). Identification and QTL mapping of resistance to Turnip yellows virus (TuYV) in oilseed rape, *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 133(2), 383-393.
20. Hajiusef, T., Shahraeen, N., & Maleki, M. (2016). Serological and molecular diagnosis of some viral diseases infecting chickpea (*Cicer arietinum*) in Lorestan and Hamadan provinces in Iran. *Journal of Crop Ecophysiology*, 272-280.
21. Hauser, S., Stevens, M., Mougél, C., Smith, H. G., Fritsch, C., Herrbach, E., & Lemaire, O. (2000a). Biological, serological, and molecular variability suggest three distinct polerovirus species infecting beet or rape. *Phytopathology*, 90(5), 460-466.
22. Hauser, S., Weber, C., Vetter, G., Stevens, M., Beuve, M., & Lemaire, O. (2000b). Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 89(1-2), 11-21.
23. Herrbach E, Lemaire O, Ziegler-Graff V, Lot H, Rabenstein F, & Bouchery Y. (1991). Detection of BMVYV and BWYV isolates using monoclonal antibodies and radioactive RNA probes, and relationships among luteoviruses. *Annals of Applied Biology*, 118(1), 127-138.
24. Katul, L. (1992). Serological and molecular characterization of bean leaf roll virus and faba bean necrotic yellows virus. (PhD), University of Göttingen, Göttingen, Germany.
25. Kehoe, M. A., & Coutts, B. A. (2019). *Turnip yellows virus* and *Soybean dwarf virus* in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 48(4), 323-329.
26. King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Elsevier.
27. Lemaire, O., Herrbach, E., Stevens, M., Bouchery, Y., & Smith, H. G. (1995). Detection of sugar beet-infecting beet mild yellowing luteovirus isolates with a specific RNA probe. *The American Phytopathological Society*, 85, 1513-1518.
28. Lemmetty, A., Latvala, S., Jones, A. T., Susi, P., McGavin, W. J., & Lehto, K. (1997). Purification and properties of a new virus from black currant, its affinities with nepoviruses, and its close association with black currant reversion disease. *Phytopathology*, 87(4), 404-413.
29. Makkouk, K., Kumari, S. G., Shahraeen, N., & Farzadfar, S. (2003). Identification and seasonal variation of viral diseases of chickpea and lentil in Iran. *Plant Diseases and Protection*, 110, 157-169.
30. Mayo, M. A. (2002). ICTV at the Paris ICV: results of the plenary session and the binomial ballot. *Archives of Virology*, 147, 2254-2260.
31. Newbert, M. J. (2016). The genetic diversity of *Turnip yellows virus* in oilseed rape (*Brassica napus*) in Europe, pathogenic determinants, new sources of resistance and host range. (PhD), School of Life Sciences, University of Warwick, UK, Retrieved from <http://wrap.warwick.ac.uk/79104>
32. Schliephake, E., Graichen, K., & Rabenstein, F. (2000). Investigations on the vector transmission of the *Beet mild yellowing virus* (BMVYV) and the *Turnip yellows virus* (TuYV). [Untersuchungen zur Vektorübertragung des Milden Rübenvergilbungsvirus (Beet mild yellowing virus) und des Wasserrübenvergilbungsvirus (Turnip yellows virus)]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 107(1), 81-87.
33. Schubert, J., Rabenstein, F., Graichen, K., & Richter, K. (1998). Comparison of the 5'-end nucleotide sequences of luteoviruses from oilseed rape and sugar beet. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 31(6), 519-530.
34. Shahraeen, N. (2012). An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran. *International Research Journal of Microbiology*, 3(1), 024-028.
35. Shahraeen, N., Farzadfar, S., & Lesemann, D. E. (2003). Incidence of viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) in Iran. *Journal of Phytopathology*, 151(11-12), 614-616.
36. Smith, H., I, B., G, B., M, S., & PB, H. (1996). Production and evaluation of monoclonal antibodies for the detection of beet mild yellowing luteovirus and related strains. *European Journal of Plant Pathology*, 102(2), 163-169.
37. Smith, I. M. (1988). *European Handbook of Plant Diseases*. London, Great Britain: Blackwell Scientific Publications.
38. Stevens, M., McGrann, G., & Clark, B. (2008). *Turnip yellows virus* (syn *Beet western yellows virus*): an emerging threat to European oilseed rape production? HGCA Research Review No. 69: Agriculture and Horticulture Development Board, Broom's Barn Research Centre, Higham.
39. Stevens, M., Patron, N. J., Dolby, C. A., Weekes, R., Hallsworth, P. B., Lemaire, O., & Smith, H. G. (2005). Distribution and properties of geographically distinct isolates of sugar beet yellowing viruses. *Plant Pathology*, 54(2), 100-107.

40. Wetzel, V., Brault, V., & Varrelmann, M. (2018). Production of a Beet chlorosis virus full-length cDNA clone by means of Gibson assembly and analysis of biological properties. *Journal of General Virology*.
41. Wilson, C. R., Lambert, S. J., Dann, A. L., Cross, P., & Hay, F. S. (2012). Occurrence of viruses within Tasmanian vegetable crops and identification of a novel *Polerovirus* infecting pea. *Australasian Plant Pathology*, 41(3), 311-319.
42. Zahedi Tabarestani, A., Shams-Bakhsh, M., & Safaie, N. (2012). Comparison of the coat protein gene sequence of Iranian canola- infecting *Beet western yellows virus* isolates. *Journal of Crop Protection*, 1(3), 211-219.
43. Zahedi Tabarestani, A., Shamsbakhsh, M., & Safaei, N. (2011). Distribution of three important aphid borne canola viruses in Golestan province. *Plant Protection Science*, 41, 251-259.
44. Zhou, C. J., Xiang, H. Y., Zhuo, T., Li, D. W., Yu, J. L., & Han, C. G. (2011). A novel strain of *Beet western yellows virus* infecting sugar beet with two distinct genotypes differing in the 5'-terminal half of genome. *Virus Genes*, 42(1), 141-149.