

ردیابی مولکولی و جایگاه تبار زایشی نژاد B ویروس موزائیک زرد لوبیا از مزارع باقلا استان گلستان

Molecular detection and phylogenetic position of B strain bean yellow mosaic virus from broad bean fields in Golestan province

زهرا صادقی*^۱، سعید نصرالله نژاد^۱، فروه سادات مصطفوی نیشابوری^۱، احد یامچی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

Sadeghi Z^{*1}, Nasrollahnejad S¹, Mostafavy Neishaboori FS¹, Yamchi A¹

1-Graduated Student, Associate Professor, Graduated MSc Student, Assistant Professor, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zahrasadeghi226@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

در سال‌های اخیر علائم بیماری ویروسی (موزائیک و زردی) در سطح وسیعی از مزارع باقلا استان گلستان مشاهده شده است. ویروس‌های گیاهی متعلق به جنس پوتی ویروس، یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای ویروسی در گیاهان می‌باشند. به منظور ردیابی پوتی ویروس‌ها حبوبات گیاهانی با علائم موزائیک، زردی، بدشکلی و پیچیدگی برگ‌ها طی فصل زراعی از استان گلستان جمع‌آوری شد. به منظور تایید آلودگی نمونه‌ها، RNA کل از نمونه‌های مذکور استخراج شد. پس از بررسی با جفت آغازگر عمومی پوتی ویروس (Oligo1n/Oligo2n) از بین ۳۵ نمونه، تعداد ۱۲ نمونه آلوده تشخیص داده شد. از بین نمونه‌های آلوده، تعدادی از نمونه‌ها به منظور ردیابی ویروس تعیین توالی شدند. نتایج نشان داد که نمونه‌های استان گلستان آلوده به ویروس موزائیک زرد لوبیا (Bean yellow mosaic virus, BYMV) می‌باشند. تجربه‌های تبارزایی، محاسبه فاصله ژنتیکی و تنوع نشان داد که جدایه گلستان در کنار جدایه‌های استرالیا و ژاپن در یک گروه قرار می‌گیرند. تعیین جایگاه جدایه ایرانی ویروس BYMV و مقایسه آن با سایر جدایه‌های دنیا منشا تکاملی و پیدایش این جدایه در ایران را مشخص کرد و به نظر می‌رسد منشا خارجی دارد. بیش‌ترین تنوع مولکولی و میزبانی در شرق آسیا موجود می‌باشد. براساس این نتایج باقلا با علائم موزائیک و بدشکلی برگ بیش‌ترین میزان آلودگی را به ویروس BYMV در بین میزبان‌های دیگر دارد.

واژه‌های کلیدی

آغازگر عمومی

پروتئین پوششی

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز معکوس

ویروس موزائیک زرد لوبیا

مقدمه

یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده افزایش تولید حبوبات در نقاط مختلف کشور، عوامل بیماری‌زای ویروسی می‌باشند (Salari et al. 2013). از جمله پوتی‌ویروس‌های آلودکننده حبوبات می‌توان به Bean yellow mosaic virus، Pea mosaic virus، White lupin mosaic virus و Clover yellow vein virus اشاره کرد (Hammond and Hammond 2003). در این میان ویروس BYMV مشکل بسیار جدی بوده که به طیف گسترده‌ای از حبوبات حمله می‌کند (AI-Ani et al. 2012). BYMV متعلق به خانواده Potyviridae و جنس Potyvirus می‌باشد. این جنس یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین جنس‌ها در بین ۲۸ خانواده ویروس‌های گیاهی می‌باشد که حاوی ۹۰ درصد گونه‌های این خانواده است (Nguyen et al. 2013). ژنوم این ویروس RNA تک رشته‌ای مثبت و شامل یک ORF^۱ است که یک پلی‌پروتئین بزرگ را کد می‌کند (Gibbs and Ohshima 2010). این ویروس توسط بیش از ۲۰ گونه شته به روش ناپایا^۲ و هم‌چنین به خوبی از طریق بذر گیاهان منتقل می‌شود. در ایران، اولین بار در سال ۱۹۶۸ از حبوبات و مناطق مختلف کشور گزارش شد (Saeedizadeh 2005).

اولین توالی کامل ژن پوشش پروتئینی^۳ (CP) ویروس BYMV در سال ۱۹۸۹ توالی‌یابی شد (Hammond et al. 1989). در بررسی‌های انجام گرفته براساس دامنه میزبانی در ژاپن، سه نژاد از ویروس BYMV شامل نژاد B از گیاه باقلا، نژاد P از نخودفرنگی^۴ و نژاد O از گیاه لوبیای معمولی^۵ معرفی شد (Inouye 1968). بعدها با بررسی ژنوم کامل ویروس، نژاد دیگری نیز از گلابول گزارش شد (Wada et al. 2000). تا سال ۱۹۹۱ جدایه‌های ویروس BYMV، Pea mosaic virus، White lupin mosaic virus و Clover yellow vein virus در زیرگروه BYMV طبقه بندی می‌شدند (Jones and Randles et al. 1980). Diachun 1977) اما مقایسه توالی‌های ناحیه پوشش پروتئینی و

3'-UTR و تشابه کم در این نواحی نشان داد که ویروس-های BYMV، CYVV و PMV سه ویروس متمایز می‌باشند (Tracy et al. 1991). در ایران پراکنش این ویروس در استان‌های مهم کشت باقلا (خوزستان، گلستان، اصفهان و تهران) به روش سرولوژیکی بررسی شد و بالاترین درصد آلودگی با میانگین ۷۲/۸۲ درصد به استان اصفهان اختصاص داشت (Rohani et al. 2007). تاکنون هیچ توالی از ناحیه پوشش پروتئینی جدایه ایرانی ویروس BYMV در بانک ژن وجود نداشته و تنها ژن Nib این ویروس از استان آذربایجان شرقی تعیین توالی شده و در بانک ژن با شماره دسترسی JF707769 موجود می‌باشد (Ghasemzadeh et al. 2012). CP متنوع‌ترین ژن است که به خوبی در ویروس BYMV و دیگر پوتی‌ویروس‌ها مطالعه شده است (Cuevas et al. 2012). بنابراین از بسیاری پارامترهای قابل دسترس برای تعیین جایگاه تاکسونومیک نژاد، اطلاعات پوشش پروتئینی و توالی ژن‌ها موفق‌ترین و مفیدترین پارامتر برای تمایز بین پوتی‌ویروس‌ها و نژادها می‌باشد (Mckern et al. 1993; Fuji et al. 2003). با توجه به اینکه در مطالعات قبلی پراکنش گسترده این ویروس از مناطق مختلف کشور گزارش شده و این ویروس سالانه باعث خسارات فراوانی به محصولات کشاورزی به-خصوص حبوبات می‌شود (Rohani et al. 2007). بنابراین شناسایی و مطالعات جزئی‌تر بر روی ژنوم آن امر ضروری بوده که ممکن است گام اولیه در جهت مدیریت این بیماری و کاهش خسارات ناشی از این ویروس باشد. همچنین، با توجه به بررسی تبارزایی می‌توان به سیر تکامل و تحول آن پی برد. لذا هدف این تحقیق ردیابی مولکولی و تعیین توالی ناحیه پوشش پروتئینی ویروس BYMV با استفاده از آغازگرهای عمومی جنس پوتی‌ویروس می‌باشد که از مناطق استان گلستان و از میزبان‌های مختلف حبوبات جمع‌آوری شده بود.

مواد و روش‌ها

منابع ویروسی

به‌منظور ردیابی ویروس موزائیک زرد لوبیا، ابتدا نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی ویروسی طی فصل‌های تابستان و بهار سال

¹ Open reading frame

² Non-persistent

³ Coat protein

⁴ *Pisum sativum*

⁵ *Phaseolus vulgaris*

جدول ۱- شماره دسترسی، منشأ و میزبان جدایه‌های ویروس BYMV موجود در بانک ژن و مورد استفاده در تجزیه‌های تبارزایی

میزبان	منشأ	شماره دسترسی	میزبان	منشأ	شماره دسترسی
-	آمریکا	AY520092	<i>Vicia faba</i>	استرالیا	EU082112
Canna sp.	چین	DQ060521	<i>Vicia faba</i>	استرالیا	EU082128
<i>Lupinus angustifolius</i>	استرالیا	AF192783	<i>Vicia faba</i>	ژاپن	D89545
<i>Lupinus angustifolius</i>	استرالیا	AF192781	<i>Gladiolus</i> sp.	ژاپن	AB041970
<i>Vicia faba</i>	آمریکا	NC_003492	Gentiana	هلند	AJ289199
<i>Phaseolus vulgaris</i>	استرالیا	EU082123	<i>Lupinus luteus</i>	روسیه	EU082127
<i>Gladiolus</i> sp.	آمریکا	AY192568	<i>Vicia faba</i>	اسپانیا	JN792544
<i>Kennedia prostrata</i>	استرالیا	DQ901432	<i>Eustoma russellianum</i>	تایوان	AM884180
-	هندوستان	EF611822	Gentiana	آلمان	AJ289200
<i>Diuris magnifica</i>	استرالیا	JX173278	<i>Vanilla fragrans</i>	هندوستان	AY845011
Danish gladiolus	دانمارک	X53684	<i>Vanilla fragrans</i>	هندوستان	AY845012
			<i>Freesia</i> sp	کره جنوبی	FJ492961

دژنره Oligo1n (رفت) و Oligo2n (برگشت) به ترتیب با توالی - های 5'-atggtHtggtgYatH gaRaaYgg-3' و 5'-tgctgcKgcYttcatYtg-3' دو واحد آنزیم Taq DNA polymerase (5 U/ul) (شرکت تکاپوزیست، ایران) و ۳ میکرولیتر cDNA (20 ng/μl) بود. برنامه PCR شامل ۳۶ چرخه واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (یک چرخه)، ۳۵ چرخه (شامل واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) و تکثیر نهایی واکنش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. قطعه تکثیر شده در الکتروفورز ژل آگارز یک درصد رویت و از اندازه باند مورد نظر اطمینان حاصل شد. محصول PCR مستقیماً همراه با آغازگرها برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست (ایران، تهران) ارسال شد.

تجزیه تبارزایی

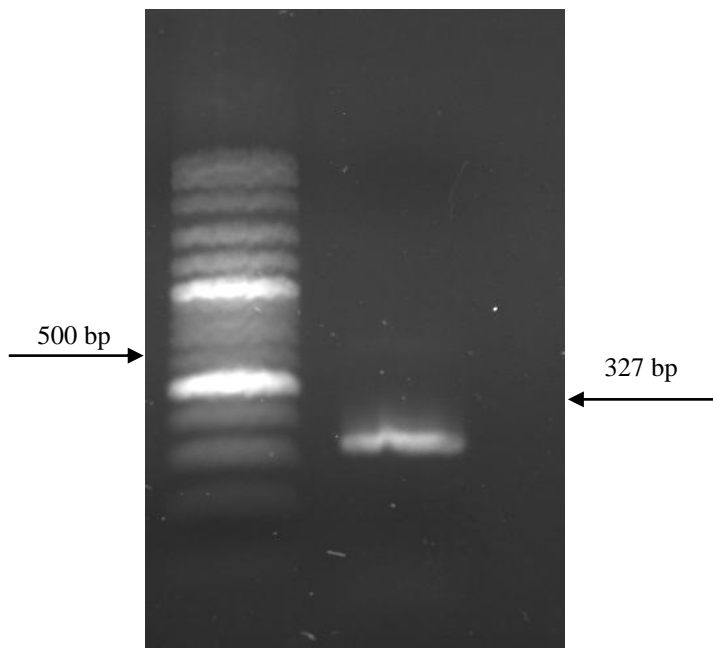
پس از تعیین ترادف قطعه موردنظر، توالی‌های استتاجی با استفاده از نرم‌افزارهای DNAMAN و Editseq بدست آمد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه و محاسبه فاصله ژنتیکی توالی موردنظر با ۲۵ جدایه ویروس BYMV موجود در بانک ژن که حاوی منطقه مورد نظر بودند توسط نرم‌افزارهای Clustal X (Thompson et al. 2002) و MegAling (Clewley and Arnold 1997) انجام شد (جدول ۱). نمودار درختی این جدایه‌ها به روش Neighbour joining در برنامه MEGA5 (Kumar et al. 2008) ترسیم شد. در

از گیاهان باقلا، نخودفرنگی، لوبیا سبز، ماش و نخود ایرانی مزارع حبوبات استان گلستان جمع‌آوری و برای آزمایش‌های مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش‌های PCR

پس از عصاره‌گیری، نمونه‌ها در سه برابر حجم بافر سیترات آمونیوم ۰/۱ مولار (pH=۶/۵)، با کلروفرم به نسبت ۳۰ درصد تیمار و سانتریفوژ شدند و از رونشین به دست آمده برای سنتز cDNA استفاده شد. RNA ویروس، با استفاده از mRNA capture Kit (شرکت Roche، آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سنتز cDNA با استفاده از RNA جذب شده به لوله با آنزیم Revert Aid (Mmulv) Moloney murine leukemia virus (شرکت Fermentas، لیتوانی) صورت گرفت. واکنش سنتز cDNA با مخلوط کردن ۱۰ میکرولیتر بافر ۵ برابر Expand RT، دو میکرولیتر dNTP (10 mM)، دو میکرولیتر DTT (100 mM)، ۳ میکرولیتر آغازگر oligodT (10 μM) تهیه شد. مخلوط حاصل با افزودن آب به حجم ۵۰ میکرولیتر رسیده و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. در مرحله بعد برای تکثیر قطعه مورد نظر، cDNA حاصل با جفت آغازگرهای عمومی ناحیه پوشش پروتئینی پوتی‌ویروس تکثیر شد. مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر Buffer PCR (10x)، یک میکرولیتر Mgcl₂ (50 mM)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (10 mM)، دو میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای

میانگین تنوع ژنتیکی درون گروه‌ها حدود ۰/۰۱۹ یعنی دو درصد بود.



شکل ۱- نتایج آزمون PCR در ژل آگارز یک درصد مربوط به ناحیه ژن پوشش پروتئینی ویروس موزائیک زرد لوبیا. چاهک یک باند حاصل از آغازگرهای (Oligo1n/Oligo2n)؛ چاهک M مربوط به نشانگر اندازه Gene ruler DNA ladder 1 Kb (شرکت Fermentas، لیتوانی).

جدول ۲- تعداد و محل نمونه برداری گیاهان مختلف حبوبات و میزان آلودگی آن‌ها به ویروس BYMV در استان گلستان

محل نمونه برداری	میزبان	تعداد نمونه‌های مورد آزمایش	تعداد نمونه آلوده
هاشم‌آباد، کردکوی و لمسک	لوبیا سبز	۷	۰
هاشم‌آباد و کفشگیری	نخود معمولی	۳	۰
سالیکنده و دلند	ماش	۳	۰
هاشم‌آباد و کردکوی	باقلا	۱۵	۱۲
خطیر آباد	نخود فرنگی	۷	۰

بیشترین تنوع ژنتیکی مربوط به گروه ۱ می‌باشد. نسبت dN/dS در گروه‌های مختلف ذکر شده و برای جمعیت کل ۰/۰۱۹ بدست آمد که نشان دهنده نقش انتخاب طبیعی در تکامل و تنوع این ویروس می‌باشد. بیشترین مقدار dN/dS در گروه ۱ با مقدار ۰/۲۹۷ مشاهده شد (جدول ۳). ویروس BYMV یکی از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده حبوبات می‌باشد که از لحاظ

این تجزیه ویروس موزائیک هندوانه (Watermelon mosaic virus, WMV) به عنوان گروه خارجی مورد استفاده قرار گرفت. تعیین تنوع ژنتیکی، انتخاب طبیعی^۱ و نسبت جانشینی نامترادف^۲ (dN) بر جانشینی مترادف^۳ (dS) که با علامت ω نشان داده می‌شود با نرم افزار MEGA5 و به روش Kimura's two parameter بین توالی گلستان و دیگر کشورها انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج بررسی‌های مولکولی روی نمونه‌های گیاهی (باقلا، نخودفرنگی، نخود معمولی و لوبیا سبز) مشکوک به بیماری ویروسی نشان داد که در ۱۲ نمونه از ۳۵ نمونه با استفاده از آغازگرهای عمومی جنس پوتی ویروس قطعه‌ای به اندازه ۳۲۷ جفت باز از ناحیه CP تکثیر شد (شکل ۱). پس از تعیین توالی و بلاست نتایج، صحت ویروسی بودن قطعات و شباهت آن به توالی ناحیه پروتئین پوششی ویروس BYMV موجود بانک ژن تایید شد. نتایج نمونه برداری نشان داد که باقلا با علائم موزائیک و بدشکلی پهنک برگ بیشترین میزان آلودگی را به ویروس BYMV در بین میزبان‌های دیگر در سال زراعی ۹۱ در مناطق هاشم‌آباد و کردکوی داشته است (جدول ۲). بر اساس تجزیه کلاستر توالی‌ها به روش Neighbour joining، کلیه جدایه‌های تجزیه شده در ۴ گروه قرار گرفتند (شکل ۲). جدایه ایران (گلستان) در گروه یک به همراه دو جدایه از استرالیا، دو جدایه از ژاپن و یک جدایه از هلند قرار گرفت. موقعیت جدایه ایرانی در بین سایر جدایه‌ها متمایز بود. جدایه‌های این گروه، از روی میزبان‌های باقلا و گیاهان زینتی شناسایی و خالص‌سازی شدند. نتایج حاصل از تجزیه فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه ایران (گلستان) به جدایه‌های استرالیا و ژاپن نزدیکتر بوده و از نظر تکاملی بیشترین شباهت را به این جدایه‌ها داشت (Wylie et al., 2008). میانگین فاصله ژنتیکی در کل جدایه‌ها ۰/۰۱۹ بود و مقدار π (شاخص تنوع ژنتیکی) در گروه‌های یک تا ۴ به ترتیب برابر با ۰/۰۵۵، ۰/۰۳۰، ۰/۰۱۸ و ۰/۰۲۴ بود، در صورتی‌که

¹ Natural selection

² Nonsynonymous substitution

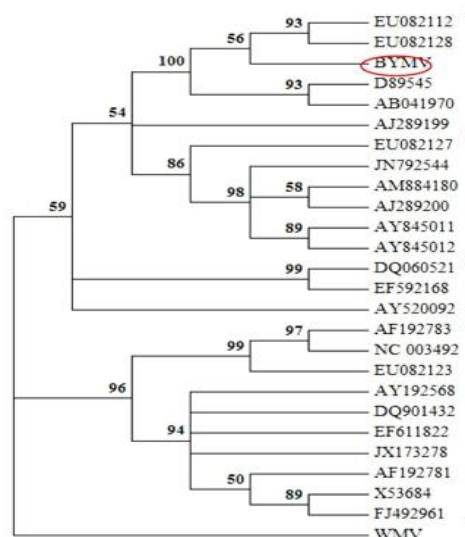
³ Synonymous substitution

شامل جدایه‌های *V. faba* بود که با نژاد B اینوای از ژاپن مطابقت داشت. از آنجاکه جدایه‌های موجود در گروه B فقط در ژاپن و استرالیا وجود داشتند در نتیجه از طریق بذر در اقیانوسیه، اروپا و آمریکای جنوبی گسترش یافتند (Spetz et al. 2003؛ Lovisololo et al. 2003). پراکنش این ویروس در سال‌های ۱۳۸۵-۱۳۸۴ در مناطق مهم کشت این گیاه به روش سرولوژیکی تعیین شد و میزان آلودگی استان گلستان ۵۷/۶۵ درصد بود (Rohani et al. 2007). با توجه به نتایج تحقیق حاضر میزان آلودگی ۲۲/۳۵ درصد افزایش یافته‌است. بنابراین انتشار گسترده ویروس BYMV، نمی‌تواند تنها به وسیله ناقلین طبیعی یعنی شته‌ها صورت گرفته باشد و این مسئله انتشار با بذر توسط انسان را تقویت می‌کند. همچنین بیشترین مقدار dN/dS مربوط به گروه ۱ بوده که نشان دهنده قدمت بالای این ویروس در این گروه و همچنین نشان دهنده نقش اصلی انتخاب منفی در تکامل این ویروس می‌باشد. بنابراین تغییرات نوکلئوتیدی منجر به تغییر آمینواسیدی نشده و تغییرات فنوتیپی زیاد نبوده‌است. این احتمال وجود دارد که منشا جدایه استان گلستان، از جنوب شرق آسیا و نژاد آن B باشد. در ایران مطالعات محدودی در مورد این ویروس انجام شده و تنها بخش‌های کوچکی از ژنوم جدایه آذربایجان شرقی تعیین توالی شده‌است. جدایه آذربایجان، بیش‌ترین تشابه نوکلئوتیدی را با جدایه استرالیایی داشته که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد اما با نتایج (Kaur et al. 2013) در هند مطابقت ندارد. زیرا جدایه‌های هند ارتباط نزدیکی با جدایه‌های گزارش شده از استرالیا و ژاپن بر روی باقلا نداشتند. این اولین گزارش از ردیابی و تعیین ترادف پروتئین پوششی ویروس BYMV در ایران و مزارع باقلا استان گلستان می‌باشد. ویروس ردیابی شده با شماره دسترسی *KM209330* در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شده‌است. درک عوامل دخیل در رقابت بین جدایه‌های ویروس و تکامل ویروس‌های گیاهی گام اول به سوی گسترش استراتژی-های بادوام به خصوص از طریق اصلاح گیاهان برای تولید ارقام مقاوم و تراریخته می‌باشد (Desbiez et al. 1977). مقاومت با انتقال ژن CP در تعدادی از پوتی‌ویروس‌ها گزارش شده‌است و تولید گیاهان مقاوم به ویروس BYMV در استرالیا پس از انتقال ژن CP در شبدر موفقیت‌آمیز بوده‌است (Chu et al. 1999).

خسارتی که به گیاه باقلا وارد می‌کند بسیار مورد توجه است (Hemida et al. 2005). مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های ویروسی از مناطق جغرافیایی متفاوت امکان تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی ویروس‌های گیاهی را فراهم می‌سازد (Abubakar 2003).

جدول ۳- تنوع ژنتیکی و نسبت جانیشینی آمینواسیدی در جدایه‌های مختلف ویروس BYMV در گروه‌های تبارزایی.

تنوع ژنتیکی (π)	dN/dS	جانیشینی نامترادف با اعمال تصحیح (dN)	جانیشینی مترادف با اعمال تصحیح (dS)	دنیای
۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۱۴	۰/۰۳۲	دنیای
۰/۰۵۵	۰/۰۲۹۷	۰/۰۰۴	۰/۱۵۵	گروه ۱
۰/۰۳۰	۰/۰۲۹۴	۰/۰۰۴	۰/۱۳۵	گروه ۲
۰/۰۱۸	۰/۰۱۷	۰/۰۱۵	۰/۸۹۴	گروه ۳
۰/۰۲۴	۰/۰۲۳	۰/۰۰۴	۰/۲۰۷	گروه ۴



شکل ۲- نمودار درختی رسم شده به روش Neighbour joining بر اساس توالی نوکلئوتیدی قطعه ۳۲۷ جفت بازی ژن پوشش پروتئینی جدایه ویروس BYMV و جدایه‌های موجود در بانک ژن، (Watermelon mosaic virus, WMV) به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده‌است.

طبق نظر محققان ناحیه CP در تجزیه‌های تبارزایی بیش‌ترین کاربرد را دارد و توالی‌های ذخیره شده در بانک ژن بیشتر مربوط به این ناحیه می‌باشد (Cuevas et al. 2012). Wylie et al. (2008)، جدایه‌های BYMV را بر اساس توزیع جغرافیایی و تخصص میزبانی مورد بررسی فیلوژنی قرار دادند. گروه باقلا تنها

استفاده قرار گیرد.

بنابراین تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی می‌تواند در تحقیقات آینده در کارهای به نژادی و تولید ارقام مقاوم مورد

منابع

- Abubakar Z, Ali F, Pinel A, Traore O, Guessan P, Notteghem JL, Konate G, Fargette D (2003) Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Africa. *Journal of General Virology* 84:733-743.
- AI-Ani R, Adhab M (2012) Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) on Broadbean Characterization and Resistance Induced by Rhizobium leguminosarum. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 7: 135-142.
- Chare ER, Holmes EC (2006) A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of Virology* 151: 933-946.
- Chu PWG, Anderson BJ, Khan MRI, Shukla D, Higgins TJV (1999) Production of bean yellow mosaic virus resistant subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) plants by transformation with the virus coat protein gene. *Annals of Applied Biology* 135: 469-480.
- Clewley J, Arnold C (1977) The multiple alignment module of lasergene. *Methods in Molecular Biology* 70:119.
- Cuevas JM, Delaunay A, Rupar TM, Jacquot E, Elena SF (2012) Molecular evolution and phylogeography of potato virus Y based on the CP gene. *Journal of General Virology* 93: 2496-2501.
- Desbiez C, Gal-On A, Racciah B, Lecoq H (1997) Characterization of epitopes on Zucchini yellow mosaic potyvirus coat protein permits studies on the interactions between strains. *Journal of General Virology* 78: 2073-2076.
- Fuji S, Inoue M, Yamamoto H, Furuya H, Naito H, Matsumoto T (2003) Nucleotide sequences of the coat protein gene of potyviruses infecting Ornithogalum thyrsoides. *Archives of Virology* 148: 613-621.
- Gibbs AJ, Ohshima K (2010) Potyviruses in the digital age. *Annual Reviews in Phytopathology* 48: 205-223.
- Ghasemzadeh A, Sokhandan Bashir N, Khakvar R (2012) Identification of important viruses for Leguminosae family with using of universal primers from East-Azerbaijan province. In: Edition of 12th Iranian Congress of Genetics, Iran. 5. (In Farsi)
- Hammond J, Hammond RW (1989) Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the bean yellow mosaic virus coat protein gene. *Journal of General Virology* 70: 1961-1974.
- Hammond J, Hammond RW (2003) The complete nucleotide sequence of isolate BYMV-GDD of Bean yellow mosaic virus, and comparison to other potyviruses. *Archives of virology* 148: 2461-2470.
- Hemida SK (2005) Effect of bean yellow mosaic virus on physiological parameters of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Agriculture and Biology* 2: 154-157.
- Inouye T (1968) Studies on host range of PVY-group viruses in leguminous plants in Japan, and the identification of them by selected differential test plants. *Nogaku Kenkyu* 52: 11-29.
- Jones RT, Diachun S (1977) Serologically and biologically distinct Bean Yellow Mosaic Virus Strains. *Phytopathology* 67: 831-838.
- Kaur Ch, Kumar S, Raj ShK (2013) New Record of Association of Bean yellow mosaic virus with Mosaic Disease of *Vicia faba* in India. *Indian Journal of Virology* 24(1): 95-96.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics* 9(4): 299-306.
- Lovisol O, Hull R, Rosler O (2003) Coevolution of viruses with hosts and vectors and possible palaeontology. *Advances in Virus Research* 62: 325-379.
- McKern NM, Barnett OW, Whittaker LA, Mishra A, Strike PM, Xiao XW, Ward CW, Shukla DD (1993) Sequence relationships among the coat proteins of strains of pea mosaic, white lupin mosaic, and bean yellow mosaic potyviruses. *Phytopathology* 83: 355-361.
- Nguyen HD, Tomitaka Y, Ho SYW, Duchene S, Vetten H, Lesemann D, Walsh JA, Gibbs AJ, Ohshima K (2013) Turnip mosaic potyvirus probably first spread to eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 Years Ago. *PLoS ONE* 8: e55336.
- Randles JW, Davies C, Gibbs AJ, Hatta, T (1980) Amino acid composition of capsid protein as a taxonomic criterion for classifying the atypical S strain of bean yellow mosaic virus. *Australian Journal of Biological Science* 33: 245-254.
- Rohani B, Koochi Habibi M, Mosahebi Gh (2007) Occurrence and distribution of Bean Yellow Mosaic Virus in Faba bean fields of important provinces of Iran. In: 4th Iranian Congress of Virology, Iran. 38. (In Farsi)
- Saeedizadeh A (2005) Compendium of bean diseases. Tehran University Press. Iran. (In Farsi)
- Salari N, Musavi MS, Shahraeen N, Ghobani SH, Maleki M (2013) Identification and diagnosis of isolates of bean common mosaic viruses and bean common mosaic necrosis viruses by immunocapture RT-PCR. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 3: 21-28. (In Farsi).
- Spetz C, Taboada AM, Darwich S, Ramsell J, Salazar LF, Valkonen JPT (2003) Molecular resolution of a complex of potyviruses infecting solanaceous crops at the centre of origin in Peru. *Journal of General Virology* 84: 2565-2578.
- Suresh S, Park JH, Cho GT, Lee HS, Baek HJ, Lee SY, Chung JW (2013) Development and molecular characterization of 55 novel polymorphic cDNA-SSR markers in faba bean (*Vicia faba* L.) using 454 Pyrosequencing. *Molecules* 18: 1844-1856.

Thompson JD, Gibson T, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics* 2.3-22.

Tracy SL, Frenkel MJ, Gough KH, Hanna PJ, Shukla DD (1992) Bean yellow mosaic, clover yellow vein, and pea mosaic are distinct potyviruses: evidence from coat protein gene sequences and molecular hybridization involving the 3' non-coding regions. *Archives of virology* 122: 249-261.

Uga H, Kobayashi YO, Hagiwara K, Honda Y, Omura T (2004) Selection of an attenuated isolate of Bean yellow mosaic virus for protection of dwarf gentian plants from viral infection in the field. *Journal of General Plant Pathology* 70: 54-60.

Wada Y, Iwai H, Ogawa Y, Arai K (2000) Comparison of pathogenicity and nucleotide sequences of 3'-terminal regions of bean yellow mosaic virus isolates from *Gladiolus*. *Journal of General Plant Pathology* 66: 345-352.

Wylie SJ, Coutts BA, Jones MGK, Jones RAC (2008) Phylogenetic analysis of Bean yellow mosaic virus isolates from four continents: relationship between the seven groups found and their hosts and origins. *Plant Disease* 92: 1596-1603.