

## بررسی ساختار و روابط تبارزایی پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس موزائیک زرد لوبیا از مزارع باقلای ایران

علی برادر<sup>۱</sup>، احمد حسینی<sup>۲\*</sup>، سمیه عبدانی بابکی<sup>۳</sup> و ثمین حسینی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۲ و ۴. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۲۶)

## چکیده

ویروس موزائیک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*) یکی از ویروس‌های متعلق به جنس پوتی ویروس، دارای دامنه میزبانی وسیع و پراکندگی جغرافیایی گسترده‌ای می‌باشد. این ویروس سالانه خسارت بالایی به حبوبات مختلف از جمله باقلا در ایران وارد می‌کند. در این پژوهش ۱۳ جدایه ویروس موزائیک زرد لوبیا از مزارع باقلای استان‌های مختلف ایران (استان‌های سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان، خوزستان، فارس، لرستان، ایلام، همدان، قزوین، زنجان، اردبیل و آذربایجان شرقی) جمع‌آوری گردید. ناحیه پروتئین پوششی جدایه‌های جمع‌آوری شده پس از توالی‌یابی با توالی پروتئین پوششی ۱۷۸ جدایه منتخب از GenBank، مورد مقایسه قرار گرفت. توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی مورد بررسی، به میزان ۸۶-۹۹ درصد با سایر توالی‌های BYMV مشابهت داشتند. روابط تبارزایی جدایه‌های ویروس موزائیک زرد لوبیا پس از حذف جدایه‌های نوترکیب، با رسم درخت به روش Maximum Likelihood و بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین پوششی مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس همه جدایه‌ها به جز سه جدایه AI38، PAC-1، BYMV-W در هشت گروه مونوفیلتیک قرار گرفتند. جدایه‌های ایرانی در دو گروه متمایز در کنار جدایه‌های باقلا، عدس، لوبیا، گلابول و آفتابگردان از کشورهای ژاپن، استرالیا، عراق و اسپانیا تقسیم‌بندی شدند. براساس نتایج بدست آمده، رابطه مستقیمی بین گروه‌بندی جدایه‌ها براساس بررسی تبارزایی توالی نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین پوششی و منشا میزبانی و جغرافیایی مشاهده نشد. بررسی ساختار پروتئین پوششی در جدایه‌های ایرانی و سایر جدایه‌های موجود در GenBank نشان‌دهنده حفاظت‌شدگی بالای نواحی انتهایی کربوکسیل و ناحیه مرکزی پروتئین پوششی و متغیر بودن ناحیه ابتدای آمینی بود.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های ویروسی، پی‌سی‌آر، تبارزایی، موتیف، نوترکیبی.

Structure and phylogenetic analysis of the coat protein of *Bean yellow mosaic virus* isolates from Iranian faba bean farmsAli Baradar<sup>1</sup>, Ahmad Hossini<sup>2\*</sup>, Somayeh Abdani Babaki<sup>3</sup> and Simin Hossini<sup>4</sup>

1. Ph.D. Candidate, Department of Agricultural and Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.

2, 4. Assistant Professor, Department of Agricultural and Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

3. Former M. Sc. Student, Department of Agricultural and Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.

(Received: Apr 22, 2020 - Accepted: Jul 16, 2020)

## ABSTRACT

*Bean yellow mosaic virus*, a species of the genus *Potivirus*, has a wide host range and a broad geographical distribution. BYMV causes high annual economic damage in various legumes such as faba beans in Iran. In this study, 13 BYMV isolates were collected from faba bean fields of different provinces of Iran (Sistan and Baluchestan, Hormozgan, Kerman, Khuzestan, Fars, Lorestan, Ilam, Hamadan, Ghazvin, Zanjan, Ardabil, East Azerbaijan). The coat protein (CP) region of the collected isolates was sequenced and then compared with the CP sequence of 178 isolates available in GenBank. The selected Iranian sequences showed 86-99% nucleotide sequence identities with other BYMV isolates. Phylogenetic relationships based on CP nucleotide sequences were estimated using the Maximum Likelihood method, after removing all recombinant sequences. Accordingly, all isolates excluding three isolates, AI38, PAC-1, BYMV-W were placed in eight monophyletic groups. Iranian isolates were located in two distinct groups, along with broadbean, lentil, bean, gladiolus and sunflower isolates from Japan, Australia, Iraq and Spain. According to the results there is no significant relation among clustering of BYMV isolates based on phylogenetic analysis of CP sequences and original host and country. The CP structure analysis of Iranian isolates and other selected isolates from GenBank revealed conservation of the C-terminus and the central region of the coat protein and the variation of the N-terminus.

**Key words:** Viral disease, PCR, Phylogeny, Motif, Recombination.

\* Corresponding author E-mail: . Hossini@vru.ac.ir

## مقدمه

باقلا با نام علمی *Vicia faba* L. یکی از حبوبات مهم است که بومی جنوب غربی آسیا می‌باشد ( Hosseini, 2008). دانه باقلا سرشار از فسفر، کلسیم و آهن است که حدود ۲۵-۲۰ درصد پروتئین دارد ( Kouchaki and Banayan Aval, 2004). سطح زیر کشت جهانی باقلا حدود ۲/۹ میلیون هکتار است که ایران با تولید بیش از ۴۶ هزار تن باقلا در سطح ۳۶ هزار هکتار، مقام دوازدهم تولید این محصول را در جهان به خود اختصاص می‌دهد (Hassanvand et al., 2015). باقلا در نقاط مختلف ایران به خصوص نواحی شمالی، جنوب و جنوب غربی به عنوان محصول عمده، کشت می‌گردد. با این حال، محدودیت‌های زیادی از جمله: خشکسالی، بازدهی کم ارقام محلی و آفات و بیماری‌ها، تولید این محصول را تهدید می‌کند. در بین تمام محدودیت‌ها، بیماری‌های خسارت‌زننده به باقلا به عنوان مخرب‌ترین عامل در نظر گرفته شده‌اند و باعث ضرر و زیان قابل توجهی (بیش از ۵۰ درصد) در عملکرد محصول می‌شوند. از جمله‌ی این بیماری‌ها، عوامل ویروسی هستند که به دلیل تشخیص دشوار و نبود روش کنترلی مناسب، به عنوان یک مشکل جدی برای گیاه باقلا در سراسر جهان گزارش شده‌اند ( Sillero et al., 2010). بیماری‌های ویروسی نه تنها باعث آسیب مستقیم به میزبان می‌شوند، بلکه گیاه را نسبت به حمله‌ی بیمارگرهای ثانویه، مستعد می‌کنند ( Khalil and Erskine, 2001).

تعداد زیادی ویروس خسارت‌زا از گیاه باقلا گزارش و جداسازی شده‌اند، از جمله: ویروس موزائیک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus; BYMV*)، ویروس زردی بافت مرده باقلا (*Faba bean necrotic yellow virus; FBNYB*)، ویروس پیسک باقلا (*Broad bean mottle virus; BBMV*)، ویروس پیچیدگی برگ لوبیا (*Bean leaf roll virus; BLRV*) و ویروس موزائیک توت‌های نخودفرنگی (*Pea enation mosaic virus; PEMV*) (Bond et al., 1994). در میان ویروس‌های گزارش شده از باقلا، BYMV یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین بیماری‌های ویروسی است

که دامنه‌ی وسیعی از گیاهان را آلوده می‌کند. در ایران اولین گزارش BYMV از گیاهانی مانند نخود، نخود-فرنگی، عدس، لوبیا و باقلا توسط Kaiser و همکاران (1968) ارائه شد. تاکنون BYMV از مزارع باقلای استان‌های تهران، فارس، خوزستان، گیلان، مازندران، کرمانشاه، اصفهان، لرستان (Farzadfar et al., 2002) و کرمان (Davodi et al., 2014) گزارش شده است. ویروس BYMV متعلق به جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* است و حاوی ژنوم آر.ان.ا تک‌رشته‌ای مثبت با پیکره رشته‌ای به طول تقریبی ۷۵۰ نانومتر می‌باشد. ویروس موزائیک زرد لوبیا توسط چندین گونه شته به صورت ناپایا منتقل می‌شود. این ویروس، دارای طیف میزبانی نسبتاً وسیعی است و گیاهان زیادی متعلق به تک لپه‌ای‌ها و دو لپه‌ای‌ها را آلوده کرده و علائم موزائیک خفیف تا شدید در قسمت‌های مختلف گیاه بسته به نوع گیاه، سویه ویروس و زمان آلودگی ایجاد می‌کند. جدایه‌های ویروس مذکور از نظر میزان بیماری‌زایی و خصوصیات سرولوژیکی در گیاهان مختلف، متفاوت هستند ( King et al., 2011; Kyrichenko et al., 2017). قبل از ظهور روش‌های ژنتیک مولکولی، معیارهایی از قبیل نوع میزبان، علائم و خصوصیات سرولوژیکی ویروس برای توصیف و شناسایی ویروس‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت. امروزه برای تفکیک سویه‌های ویروس‌های مختلف از جمله BYMV از روش‌های مولکولی استفاده می‌شود. استفاده از داده‌های توالی‌یابی قسمتی از ژنوم و یا ژنوم کامل به عنوان یک معیار معتبر در طبقه‌بندی گونه‌های ویروسی مطرح می‌گردد. پروتئین پوششی یکی از نواحی ژنومی است که به علت حفاظت‌شدگی بالا (Seifers et al., 2013) بالا و دارا بودن اکثر اپی‌توپ‌های اختصاصی پوتی‌ویروس‌ها (Shukla et al., 1988) از اهمیت زیادی برخوردار است. Wylie و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی روابط تبارزایی ۶۴ جدایه ویروس موزائیک زرد لوبیا بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی پرداختند. بر اساس تحقیق مذکور، جدایه‌های BYMV براساس میزبان اصلی و توزیع جغرافیایی در

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌های آلوده به ویروس موزائیک

#### زرد لوبیا از استان‌های مختلف ایران

برای انجام این پژوهش، نمونه‌برداری در سال‌های زراعی ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ از مزارع باقلای نواحی مختلف ایران (استان‌های سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان، خوزستان، فارس، لرستان، ایلام، همدان، قزوین، زنجان، اردبیل و آذربایجان شرقی) که جزء مناطق عمده باقلاکاری کشور به شمار می‌روند، انجام گردید. گیاهان مشکوک به آلودگی ویروسی با علائم موزائیک خفیف تا شدید، کوچکی و بدشکلی برگ‌ها (شکل ۱) و تعدادی فاقد علائم ویروسی مشخص، جمع‌آوری و در کیسه‌های پلاستیکی جداگانه با ذکر نام محل و تاریخ نمونه‌برداری در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل و در دمای چهار درجه سلسیوس تا زمان انجام و اتمام آزمایش‌های مربوطه نگهداری شدند.

### تشخیص ویروس موزائیک زرد لوبیا با آزمون

#### داس-الایزا و تکثیر جدایه‌های انتخابی در

#### شرایط گلخانه‌ای

برای شناسایی و تشخیص ویروس موزائیک زرد لوبیا در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، از روش داس-الایزا<sup>۱</sup> طبق توصیف Clark & Adams (1977)، با بهره‌گیری از آنتی‌بادی‌های اختصاصی و چند همسانه‌ای BYMV تهیه‌شده از موسسه Bioreba (کشور سوئیس) استفاده شد. نتایج پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه با دستگاه الایزاخوان (BioTech Epoch<sup>۲</sup> در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد و از هر منطقه یک نمونه آلوده به ویروس که دارای بیش‌ترین میزان جذب بود، برای بررسی‌های بیش‌تر انتخاب گردید. مایه‌زنی جدایه‌های انتخابی روی گیاهان باقلا، در شرایط گلخانه‌ای به روش مکانیکی انجام گردید.

هفت گروه Lupin, General, Canna, Broad bean, Monocot, Pea و W قرار گرفتند. براساس نتایج حاصل از این پژوهش، بین طبقه‌بندی ویروس براساس روابط تبارزایی توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی، میزبان و مبدا جغرافیایی جدایه‌ها، رابطه مستقیم وجود داشت. در مطالعه‌ای دیگر، در بررسی تبارزایی انجام شده بر اساس توالی کامل ژنوم ۴۰ جدایه ویروس موزائیک زرد لوبیا چنین ارتباطی مشاهده نشد (Kehoe et al., 2014). در این تحقیق، بر اساس توالی کامل ژنوم ویروس BYMV یک سیستم طبقه‌بندی جدید ارائه گردید و جدایه‌ها در نه گروه I-IX طبقه‌بندی شدند. با وجود تاکید بر استفاده از توالی کامل ژنوم ویروس موزائیک زرد لوبیا برای بررسی روابط تبارزایی در پژوهش‌های گذشته (Kehoe et al., 2014) اکثر توالی‌های ثبت شده BYMV در GenBank مربوط به پروتئین پوششی هستند و تاکنون تنها ۴۸ جدایه این ویروس به صورت کامل توالی‌یابی شده است.

از این رو به علت بالا بودن تعداد توالی‌های ثبت شده مربوط به ناحیه پروتئین پوششی و همچنین ویژگی‌های ذکر شده برای این ناحیه، بیشتر مطالعات انجام شده در مورد BYMV با استفاده از پروتئین پوششی انجام می‌شود. با توجه به وجود گزارش‌های متعدد در مورد خسارت بالای ویروس موزائیک زرد لوبیا در ایران (Sharifi, 2015; Rabiee et al., 2015; Davodi et al., 2014; Nezamabad et al., 2015)، در پژوهش حاضر، جدایه‌های این ویروس از مناطق عمده کشت باقلا جمع‌آوری و ناحیه پروتئین پوششی برخی جدایه‌ها توالی‌یابی گردید و سپس رابطه تبارزایی آن‌ها با سایر جدایه‌های موجود در GenBank مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که تاکنون در هیچ مطالعه‌ای توالی پروتئینی ناحیه CP همه جدایه‌های موجود BYMV مورد آنالیز قرار نگرفته است و به علت اهمیت این ناحیه، در قسمت دوم این پژوهش، ساختار و الگوی حفاظدگی پروتئین پوششی در تمام جدایه‌های موجود BYMV تعیین گردید.

1. DAS-ELISA  
2. ELISA reader



شکل ۱. علائم سبزدی، موزائیک و پیچیدگی برگ در گیاهان باقلا آلوده به BYMV  
Figure 1. Chlorosis, mosaic and leaf roll symptoms on BYMV-infected broadbean plants

transcriptase (200u/  $\mu$ l) و RNase inhibitor (40U/ul) هرکدام به میزان ۰/۵ میکرولیتر به میکروتیوب اضافه گردیدند و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۵/۵ میکرولیتر آب استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) (تهیه شده از شرکت ویراژن، ایران)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای BYMVCfor و BYMVCPrev (10 pmol/ul) و پنج میکرولیتر cDNA در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. برنامه گرمایی واکنش PCR به صورت واسرشت سازی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال به مدت یک دقیقه در دمای ۵۳ درجه سلسیوس و بسط یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس تنظیم شد. در نهایت بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت. فرآیند خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت Wizard<sup>(R)</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Promega, USA) انجام گردید. کیفیت قطعات تکثیر

#### تکثیر و تعیین توالی ناحیه پروتئین پوششی ویروس موزائیک زرد لوبیا

از ۱۳ نمونه انتخابی آلوده به BYMV، آر.ان.ا. کل با استفاده از کیت Purification kit (شرکت توپاز ژن - ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج گردید. برای تکثیر ناحیه مورد نظر، از جفت آغازگر اختصاصی ناحیه پروتئین پوششی ویروس موزائیک زرد لوبیا با نام BYMVCPrev (GTCTGTTCCAACATTGCCAT) و BYMVCfor (CGKTTTCARTCWGATCAAGA) که با نرم افزار Vector NTI Advance<sup>TM</sup> 11 (Invitrogen) طراحی شده بود، استفاده گردید. واکنش RT-PCR در دو مرحله و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گردید. ابتدا میکروتیوب‌های حاوی چهار میکرولیتر Reverse transcriptase buffer 10X، یک میکرولیتر dNTPs (10 mmol/ul)، یک میکرولیتر آغازگر BYMVCPrev (10 pmol/ul)، هشت میکرولیتر آب مقطر استریل و پنج میکرولیتر از آر.ان.ا. کل استخراج شده به مدت پنج دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, T-100) و سپس روی یخ قرار داده شد. در مرحله بعد آنزیم‌های MuMLV Reverse

IQ-TREE Maximum Likelihood (ML) با برنامه (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). v.1.6 رسم گردید. این برنامه به صورت خودکار بهترین و مناسبترین مدل را برای رسم درخت تبارزایی انتخاب می‌نماید.

### بررسی توالی پروتئینی ناحیه پروتئین پوششی در جدایه‌های BYMV

توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده از جدایه‌های ایرانی پس از ثبت در GenBank (جدول ۱ پیوست) با برنامه ترجمه ExPASy (<https://web.expasy.org/translate>) به توالی اسیدآمینه‌ای متناظر ترجمه شدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های ترجمه اسیدآمینه‌ای، از طریق نرم‌افزار MAFFT v.7 انجام شد (Katoh and Standley, 2013) و پس از بازبینی دستی با برنامه Mesquite v.3.04 (Maddison and Maddison, 2015)، توالی‌های مذکور با برنامه Weblogo.v.2.8.2 (Crooks *et al.*, 2004) به تصویر کشیده شدند. ارزیابی عملکرد پروتئینی جدایه‌های مورد بررسی، با برنامه Pfam<sup>۴</sup> انجام گرفت. برای بررسی بیش‌تر یک ساختار کریستالی مربوط به پروتئین پوششی موجود در PDB با شماره شناسه 5ODV انتخاب گردید. این ساختار متعلق به ویروس موزائیک هندوانه است که با روش تفرق میکروسکوپ الکترونی توسط Zamora و همکاران در سال ۲۰۱۷ تعیین شده است. توالی‌های پروتئینی موجود که در قسمت‌های قبل هم‌ردیف‌سازی شده‌اند با برنامه تحت وب ConSurf (<http://consurf.tau.ac.il>) روی ساختار کریستالی پروتئین 5ODV هم‌ردیف‌سازی شدند.

### نتایج و بحث

#### تکثیر پروتئین پوششی و توالی‌یابی جدایه‌های انتخابی

بر اساس نتایج آزمون الیزا و به منظور بررسی و مقایسه ناحیه پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس موزائیک زرد لوبیا جدا شده از مزارع باقلای استان‌های

شده حاصل از واکنش، روی ژل آگارز یک درصد در بافر TBE (Tris-Borate-EDTA) مورد بررسی قرار گرفت. پس از حصول اطمینان از خالص بودن قطعه تکثیری به طول حدود ۷۵۰ جفت باز، ناحیه مورد نظر تکثیر شده از جدایه‌های مختلف، برای تعیین توالی با جفت آغازگر مورد استفاده در پی‌سی‌آر، به شرکت Eurofins در کشور لوکزامبورگ ارسال گردیدند.

#### بررسی امکان وقوع نوترکیبی در سطح توالی نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین پوششی با استفاده از RDP

بررسی پدیده نوترکیبی در بین توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین پوششی، از طریق نرم‌افزار RDP5 با تنظیمات پیش‌فرض انجام گرفت. وقوع نوترکیبی، والد اصلی، والد فرعی، نقاط شروع و پایان نوترکیبی توسط روش‌های (Martin *et al.*, 2015) RDP، (Bootscan، GENECONV (Padidam *et al.*, 1999) MaxChi (Maynard Smith، (Martin *et al.*, 2005) (1992)، (Chimaera (Posada and Crandall, 2001) (Lam *et al.*, 2018) و SiScan (Gibbs *et al.*, 2000) مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌ای که وجود نوترکیبی با حداقل چهار روش با  $p\text{-value} < 1 \times 10^{-6}$  در آن تشخیص داده شد، به عنوان جدایه نوترکیب محسوب شد.

#### بررسی روابط تبارزایی جدایه‌های BYMV بر اساس توالی پروتئین پوششی

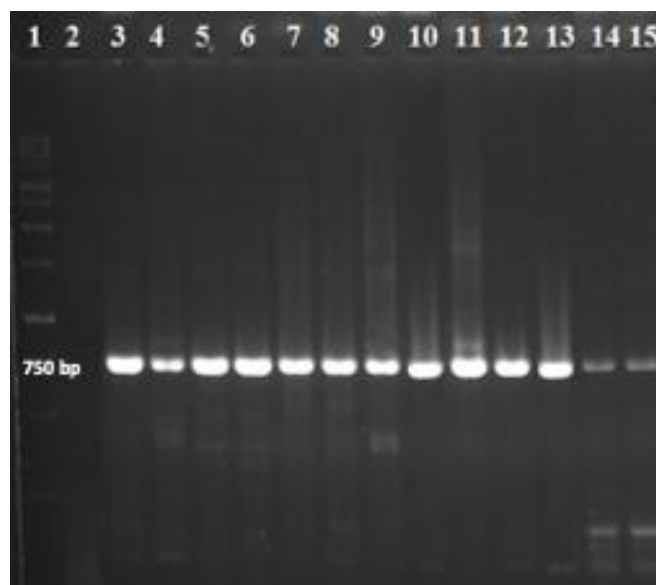
برای ارزیابی روابط تبارزایی، پس از حذف جدایه‌های نوترکیب سایر جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش و همچنین سایر جدایه‌های منتخب از GenBank (جدول ۱)، ابتدا با نرم‌افزار MAFFT<sup>۳</sup> v.7 (Katoh and Standley, 2013) با تنظیمات پیش‌فرض هم‌ردیف‌سازی شدند. فایل هم‌ردیف‌سازی شده به صورت دستی با برنامه Mesquite v.3.04 (Maddison and Maddison, 2015) مورد بازبینی قرار گرفت. درخت تبارزایی بر اساس توالی نوکلئوتیدی به روش

4. Protein families database

3. Multiple Alignment using Fast Fourier Transform, version 7

مربوط به استان‌های ایلام، آذربایجان شرقی، لرستان، زنجان، هرمزگان، همدان، اردبیل، خوزستان، سیستان و بلوچستان، قزوین، فارس و کرمان بودند (لازم به ذکر است که کنترل منفی در این آزمایش، شامل تمامی موارد مورد استفاده در واکنش پی‌سی‌آر منهای نمونه استخراج شده از بافت برگ‌گی بود که به‌جای آن از آب دوبار تقطیر استفاده شد). نتایج حاصل از بررسی توالی جدایه‌های ایرانی مورد بررسی نشان داد که جدایه‌های مذکور به میزان ۹۹-۸۶ درصد با سایر جدایه‌های موجود در GenBank شباهت داشتند.

مختلف ایران، از میان حدود ۱۰۰ نمونه برگ‌گی از هر استان که بیش از نیمی از آن‌ها مثبت بود، یک جدایه که بالاترین میزان جذب را داشت، انتخاب گردید (جدول ۲ پیوست). واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه CP منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول حدود ۷۵۰ جفت باز شد. نتایج حاصل از تکثیر ژن CP روی ژل آگارز یک درصد در تصویر شماره ۲ مشاهده می‌شود. توالی‌های ۱۳ جدایه مورد بررسی با نام‌های 3H, 8R, 1Z, 32L, 6T, 39I, 4A, 28KH, 26S, 2Gh, 2Fa, 1Ka و 50G به ترتیب



شکل ۲. الگوی الکتروفورزی نتایج حاصل از آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای BYMVCPfor و BYMVCPprev در ژل آگارز ۱٪ رنگ آمیزی شده به‌وسیله Red-safe. راهک ۱: نشانگر دی.ان.ا یک کیلو بازی، راهک ۲: کنترل منفی، راهک ۳-۱۵: جدایه‌های BYMV جدا شده از گیاهان باقلای نواحی مختلف ایران (استان‌های ایلام، آذربایجان شرقی، لرستان، زنجان، هرمزگان، همدان، اردبیل، خوزستان، سیستان و بلوچستان، قزوین، فارس و کرمان).

Figure 2. Electrophoretic pattern of RT-PCR products using BYMVCPprev and BYMVCPfor primers on 1% agarose gel, stained with Red-safe. Lane 1: DNA Ladder (1kb), Lane 2: Negative control, Lane 3- 15: Isolates from different geographical areas of Iran (Sistan and Baluchestan, Hormozgan, Kerman, Khuzestan, Fars, Lorestan, Ilam, Hamadan, Ghazvin, Zanjan, Ardebil and East Azarbaijan provinces).

رسم درخت تبارزایی بر اساس روش ML با استفاده از نرم افزار IQ-TREE با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ انجام گردید. مدل TIM2+F+G4 بهترین مدل برای رسم درخت تبارزایی بر اساس توالی نوکلئوتیدی توسط برنامه مدل‌یاب نرم افزار IQ-TREE شناخته شد. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، همه جدایه‌ها به جز سه جدایه AI38، PAC-1، BYMV-W در هشت گروه

تحلیل تبارزایی جدایه‌های انتخابی BYMV و

مقایسه با سایر جدایه‌های موجود در GenBank

قبل از بررسی روابط تبارزایی، آزمون وقوع نو ترکیبی با برنامه RDP انجام شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده (جدول ۳ پیوست) جدایه‌های GB2، Glad2، BYMVS، Masdevellia که به عنوان جدایه‌های نو ترکیب شناسایی شدند، حذف و سپس

نتایج به دست آمده در پژوهش انجام شده مشابه توسط Wylie و همکاران (۲۰۰۸) که اصلی ترین مطالعه صورت گرفته در این زمینه است مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین به منظور یافتن تفاوت های موجود در گروه بندی های صورت گرفته در آنالیز تبارزایی براساس پروتئین پوششی و کل ژنوم ویروس موزائیک زرد لوبیا، نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش Kehoe و همکاران (۲۰۱۴) نیز مقایسه شد. نتیجه حاصل از مقایسه گروه بندی های انجام شده در دو پژوهش ذکر شده و تحقیق حاضر در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. در تقسیم بندی انجام شده توسط Wylie و همکاران (۲۰۰۸) ۶۸ جدایه ویروس موزائیک زرد لوبیا براساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی در هفت گروه با نامهای Broad bean، Canna، General، Lupin، Monocot، Pea و W قرار گرفتند. همان گونه که در جدول ۱ نیز ذکر شده، گروه General که شامل مجموعه ای از جدایه های مربوط به گیاهان تک لپه و دولپه بوده است در گروه ۱، سه جدایه گروه Canna در گروه ۲، جدایه های گروه Pea در گروه ۳، جدایه های گروه Broad bean در گروه های ۴ و ۶، اعضای گروه Monocot در گروه ۵ و بالاخره اعضای گروه Lupin در گروه ۷ و ۸ این تحقیق قرار گرفته اند. بنابراین، همان گونه که شرح داده شد؛ نتایج به دست آمده در این مقاله با نتایج Wylie و همکاران (۲۰۰۸) تفاوت هایی را نشان می دهند. علت اصلی گروه بندی متفاوت ایجاد شده در دو پژوهش، استفاده از تعداد بالاتر توالی (۱۹۱ توالی) در پژوهش حاضر نسبت به تحقیق Wylie و همکاران (۲۰۰۸) است که تنها از ۶۵ جدایه استفاده کرده بودند. همچنین در این پژوهش از روش متفاوت و با دقت بالاتری (ML) برای رسم درخت تبارزایی نسبت به Wylie و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شده است. علی رغم این که روش NJ<sup>۵</sup> به کار رفته توسط Wylie و همکاران (۲۰۰۸) از نظر محاسبات سریع تر می باشد، اما در مقایسه با ML بسیار ضعیف تر عمل می کند. روش ML از مدل تکاملی پیچیده تری استفاده می کند (Arif et al.,

مونوفیلتیک قرار گرفتند. گروه اول در درخت رسم شده در شکل ۳ شامل ۶۵ جدایه است که از گیاهان تک لپه و دولپه مختلف و از کشورهای استرالیا، کره جنوبی، ژاپن و تایوان می باشند. گروه دوم شامل ۱۵ جدایه است که همگی از روی گل اختر (Canna) و از کشور ژاپن جدا شده اند. گروه سوم دارای هفت جدایه می باشد که یکی از جدایه ها از شبدر و بقیه از میزبان نامعلوم و از کشورهای ژاپن، آمریکا و آفریقای جنوبی جداسازی شده اند. گروه چهارم دارای ۳۵ جدایه است. ده جدایه ی ایرانی جدا شده از باقلا از استان های فارس، لرستان، کرمان، سیستان و بلوچستان، هرمزگان، ایلام، همدان، زنجان، قزوین و آذربایجان شرقی در این گروه قرار گرفتند. بقیه جدایه ها از گیاه باقلا و کشورهای عراق، ژاپن و استرالیا جدا شده اند. گروه پنجم متشکل از ۲۰ جدایه متعلق به کشورهای ژاپن و تایوان و جدا شده از گیاهان گلابول، توتون و لیسیانوس است. گروه ششم با ۲۳ جدایه از روی گیاهان عدس، باقلا، لوبیا، گلابول و آفتابگردان و از کشورهای اسپانیا و ایران گزارش شده اند. جدایه های ایرانی این گروه از مزارع باقلا در استان های فارس، خوزستان، اردبیل و یک جدایه آفتابگردان از اصفهان جداسازی شده اند. گروه هفتم به ترتیب دارای سه و ده جدایه هستند. گروه هفت از گیاهان شبدر، باقلا و سویا و کشور ژاپن و گروه هشت از گیاهان باقلا و کشور استرالیا جداسازی شده اند. در پژوهش حاضر، از بین هشت گروه موجود، تنها جدایه های مربوط به گیاه اختر در یک گروه مجزا (گروه ۲) قرار می گیرند. سایر گروه ها متشکل از جدایه های مربوط به میزبان های مختلف با مبدا جغرافیایی متفاوت می باشند. جدایه های ایرانی BYMV علی رغم این که همگی از گیاهان باقلا جدا شده بودند، در دو گروه مجزا (۴ و ۶) قرار گرفتند (شکل ۳) و ارتباط خاصی بین تقسیم بندی آنها و منطقه جغرافیایی که از آن جدا شده بودند، مشاهده نشد. در ادامه، نتایج گروه بندی به دست آمده براساس روابط تبارزایی جدایه های ویروس موزائیک زرد لوبیا براساس توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی در این پژوهش، با

5. Neighbor joining

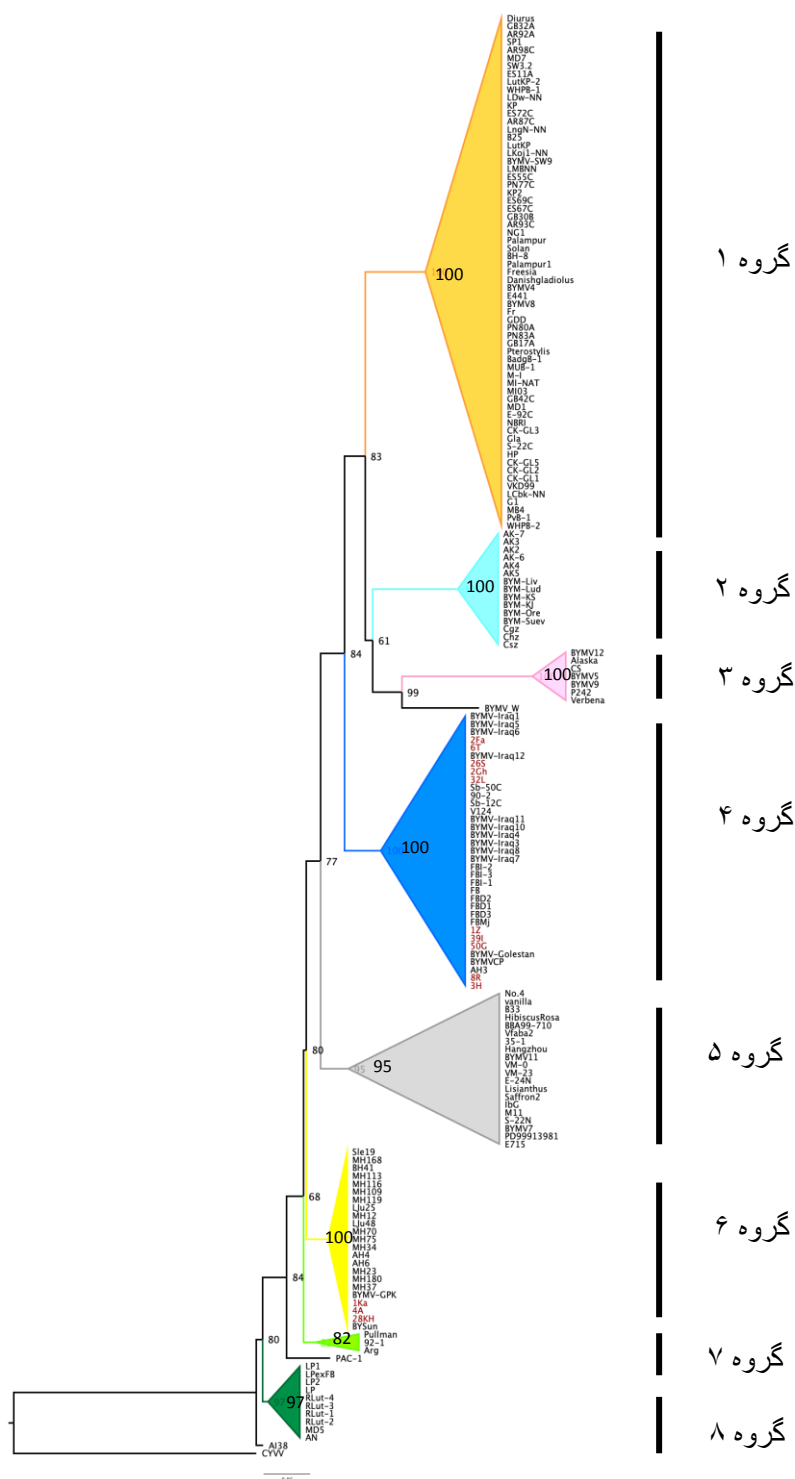
در جدول ۴- پیوست قابل مشاهده است، توالی تمام جدایه‌های مورد بررسی مربوط به پروتئین پوششی پوتی ویروس‌ها می‌باشند. برای بررسی بیشتر، توالی‌های پروتئین پوششی ۱۷۸ جدایه BYMV که در GenBank ثبت شده‌اند به همراه ۱۳ توالی مربوط به جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این پژوهش، پس از هم‌ردیف‌سازی با برنامه Weblogo به تصویر کشیده شدند (شکل ۴). در ادامه‌ی ارزیابی‌ها، توالی ترجمه اسیدآمینه‌ای جدایه‌های ویروس موزائیک زرد لوبیا مورد بررسی روی شکل سه بعدی یک پروتئین پوششی که ساختار آن در بانک پروتئینی به صورت سه بعدی رسم شده است، هم‌ردیف‌سازی شدند (شکل ۴-ب). توالی پروتئینی ناحیه پروتئین پوششی به سه قسمت انتهایی آمینی (N-terminal)، ناحیه مرکزی و انتهایی کربوکسیلی (C-terminal) تقسیم می‌گردد که در شکل ۴-الف مشخص شده‌اند. همان‌گونه که در تصویر سه بعدی پروتئین پوششی شکل ۴ مشاهده می‌شود نواحی انتهایی کربوکسیلی و آمینی به صورت دو بازو در دو طرف پروتئین قرار می‌گیرند و دارای ساختار ثانویه نیستند، اما ناحیه مرکزی شامل چندین ماریج آلفاست که از ژنوم ویروس محافظت می‌کنند. تصویر مربوط به توالی‌های هم‌ردیف‌سازی بر روی شکل سه بعدی پروتئین پوششی در تأیید شکل حاصل از برنامه Weblogo نشان‌دهنده متغیر بودن انتهایی آمینی و حفاظت‌شدگی بالای ناحیه انتهایی کربوکسیلی می‌باشند. همان‌گونه که در شکل ۴-الف مشاهده می‌شود، در جدایه‌های انتخابی ویروس موزائیک زرد لوبیا یک موتیف با نام NAG در ناحیه انتهایی آمینی قرار دارد که در پژوهش‌های گذشته به جای موتیف معروف DAG که در اغلب پوتی ویروس‌ها وجود دارد به عنوان موتیف مهم در انتقال ویروس موزائیک زرد لوبیا توسط شسته شناخته شده است. این موتیف در ناحیه انتهایی آمینی و در موقعیت ۷ تا ۹ در تمام جدایه‌های مورد بررسی جدا شده از ایران و سایر نقاط دنیا قرار گرفته است (Shukla et al., 1991).

2009). هم‌چنین مقایسه نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج Kehoe و همکاران (۲۰۱۴) نشان‌دهنده متفاوت بودن گروه‌بندی تبارزایی براساس توالی ژن پروتئین پوششی و توالی کامل ژنوم ویروس است. در تحقیق Kehoe و همکاران (۲۰۱۴) جدایه‌ها در نه گروه (I-IX) طبقه‌بندی شدند. برخی از اعضای گروه‌های I,II,III,IV در گروه ۱، اعضای گروه IX در گروه ۳، تمام جدایه‌های گروه VII در گروه ۴، تمام اعضای گروه III به همراه برخی از اعضای گروه IV در گروه ۵، هم‌چنین جدایه‌های گروه V در گروه ۷ و اعضای گروه II,VI در گروه ۸ پژوهش حاضر قرار گرفتند. در گروه ۲ و ۶ هیچ کدام از جدایه‌های موجود در تحقیق Kehoe و همکاران دیده نمی‌شوند. تفاوت نتایج حاصل از بررسی تبارزایی براساس ناحیه پروتئین پوششی و ژنوم کامل نشان‌دهنده متفاوت بودن تاریخچه تکاملی این ناحیه نسبت به سایر نواحی ژنوم می‌باشد و نشان می‌دهد این ژن نمی‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی نماینده خوبی برای ژنوم کامل ویروس موزائیک زرد لوبیا در تقسیم‌بندی جدایه‌های مختلف باشد.

### بررسی ساختار توالی پروتئین پوششی در جدایه‌های مورد بررسی

از آنجایی که عملکرد هر پروتئین براساس ساختار ویژه آن تعیین می‌گردد و با توجه به اهمیت پروتئین پوششی به عنوان یک پروتئین با چندین عملکرد در پوتی ویروس‌های مختلف از جمله ویروس موزائیک زرد لوبیا، در قسمت دوم پژوهش حاضر، به بررسی ساختار و الگوی حفاظت‌شدگی این پروتئین پرداخته شد. تاکنون تمام نتایج حاصل از بررسی عملکرد پروتئین پوششی ویروس موزائیک زرد لوبیا حاصل بررسی تعداد محدودی از جدایه‌های این ویروس بوده است، به همین علت برای بررسی دقیق‌تر ساختار این پروتئین، تمام توالی‌های موجود و در دسترس مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا توالی‌های ۱۳ جدایه مورد بررسی پس از ترجمه به توالی‌های اسیدآمینه‌ای متناظر با استفاده از برنامه Pfam مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان‌گونه که





شکل ۳. درخت تبارزایی رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی ۱۷۸ جدایه ثبت شده در GenBank به همراه ۱۳ جدایه حاصل از پژوهش حاضر به روش Maximum likelihood با استفاده از نرم افزار IQ-TREE (بوت استرپ ۱۰۰۰) و مدل TIM2+F+G4. جدایه‌های ایرانی با رنگ قرمز مشخص شده‌اند. ویروس زردی شبدر (CYVV) به خاطر قرابت زیاد با BYMV، به عنوان برون‌گروه به کار گرفته شده است.

Figure 3. Phylogenetic tree based on CP nucleotide sequence of the 178 isolates recorded in GenBank, along with the 13 isolates obtained from this study by Maximum likelihood method using IQ-TREE software (boot strap: 1000) and TIM2+F+G4 model. The Iranian isolates are marked in red color. (Out group virus: Clover yellow vein virus)

جدول ۱. تقسیم‌بندی جدایه‌های BYMV موجود در GenBank در پژوهش حاضر در مقایسه با مطالعات پیشین

Table 1. Grouping of BYMV isolates retrieved from GenBank in the present study compared to previous studies

Group name	Wylie <i>et al</i> (2008)	Kehoe <i>et al</i> (2014)	Host	Country
1	General	I,II,III,IV	Broad bean, Lisianthus, Gladiolus, Freesia, Orchid, Tobacco	Australia, South Korea, Japan, Taiwan
2	Canna	-	Canna	
3	Pea	IX	Trifolium	Japan, USA, South Africa
4	Broad Bean	VII	Broad bean	Iran, Japan, Australia, Iraq
5	Monocot	III, IV	Gladiolus, Lisianthus, Tobacco	Japan, Taiwan
6	Broad Bean	-	Broad bean, Gladiolus, Bean, Lentil, Sunflower	Iran and Spain
7	Lupin	V	Trifolium	Japan
8	Lupin	II,VI	Broad bean	Australia

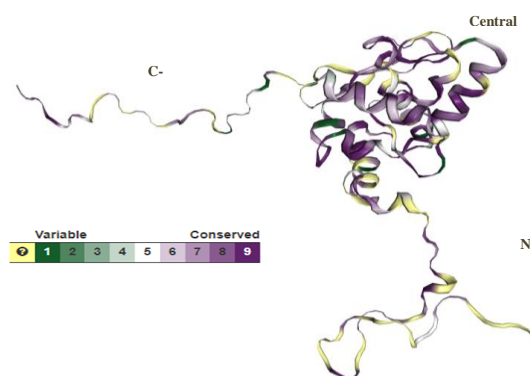
بر اساس تصویر پروتئین پوششی سه بعدی و الگوی حفاظت‌شدگی مشاهده شده در Weblogo در شکل ۴ ناحیه مرکزی که در بین ناحیه ابتدای آمینی و انتهای کربوکسیلی قرار دارد در بین جدایه‌های مورد بررسی دارای حفاظت‌شدگی بالایی است. در ناحیه مرکزی در شکل ۴-الف، جایگاه سه موتیف مشخص شده است. بر اساس تحقیقات پیشین ( Zamora *et al.*, 2017;

Harrison and Robinson, 1988) این موتیف‌ها در برهمکنش با ژنوم ویروس نقش دارند. سه اسید آمینه سرین در موتیف اول، آرژینین در موتیف دوم و آسپاراژین در موتیف سوم که با ستاره مشخص شده‌اند، در بین پروتئین‌های رشته‌ای کاملاً حفظ شده می‌باشند (Zamora *et al.*, 2017).

(الف)



(ب)



شکل ۴. الف) نمای کلی از هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های ترجمه اسید آمینه‌ای پروتئین CP جدایه‌های ایرانی و سایر جدایه‌های موجود در GenBank با برنامه Weblogo. ب) طرح حفاظت‌شدگی توالی‌های پروتئینی CP پس از هم‌ردیف‌سازی روی یک ساختار سه بعدی پروتئینی موجود در PDB با شماره شناسه 5ODV با استفاده از برنامه Consurf.

Figure 4. A) Overview of alignment of CP amino acid sequences of Iranian isolates and other isolates in the GenBank using Weblogo.,B) Conservation pattern of CP sequences aligned on a 3D protein structure in PDB with ID: 5ODV using the Consurf program.

گرفتند. جدایه‌های ایرانی در دو گروه ۴ و ۶ در کنار جدایه‌های باقلا، عدس، لوبیا، گلابول و آفتابگردان از کشورهای ژاپن، استرالیا، عراق و اسپانیا تقسیم‌بندی شدند. نتایج حاصل از بررسی تبارزایی نشان داد که بر خلاف پژوهش انجام شده توسط Wylie و همکاران (2008)، رابطه مستقیم و قابل ملاحظه‌ای بین گروه‌های تبارزایی به دست آمده براساس توالی پروتئین پوششی، میزبان و منشأ جغرافیای ویروس وجود ندارد. نتایج حاصل از ساختار پروتئینی جدایه‌های انتخابی BYMV، نشان‌دهنده وجود ساختارهای دوبعدی متعدد در قسمت میانی پروتئین پوششی در راستای حفاظت از ژنوم ویروس و وجود چندین موتیف حفظ‌شده بین همه جدایه‌ها در ناحیه مرکزی و آمینی بود که برای انجام وظایف پروتئین پوششی مانند انتقال شته و بازدارندگی خاموشی ژن ضروری هستند. (Lindbo *et al.*, 2017)

### نتیجه‌گیری کلی

پروتئین پوششی یکی از نواحی مهم کد شونده توسط پوتی‌ویروس‌ها است که در فعالیت‌های مختلفی از جمله؛ پوشش‌دار کردن ژنوم ویروس، انتقال با شته، حرکت سلول به سلول، حرکت در فواصل طولانی و تنظیم تکثیر ژنوم ویروس نقش دارد (Kežar *et al.*, 2019). با توجه به اهمیت زیاد پروتئین پوششی، اکثر توالی‌های ثبت شده از پوتی‌ویروس‌ها در GenBank مربوط به این ناحیه ژنومی می‌باشند. در همین راستا، در پژوهش حاضر به بررسی این ناحیه ژنومی در جدایه‌های ایرانی یک پوتی‌ویروس مهم با نام ویروس موزائیک زرد لوبیا (BYMV) که دارای دامنه میزبانی وسیع و پراکندگی جغرافیایی بالا بوده و در نتیجه اهمیت اقتصادی زیادی دارد، پرداخته شد. براساس بررسی‌های تبارزایی انجام شده در این تحقیق، جدایه‌های BYMV در هشت گروه مونوفیلیتیک قرار

### REFERENCES

1. Arif, I. A., Khan, H. A., Bahkali, A. H., Al Homaidan, A. A., Al Farhan, A. H., Shobrak, M. and Al Sadoon, M. (2009). Comparison of neighbor-joining and maximum-parsimony methods for molecular phylogeny of *Oryx* species using 12s rRNA and 16s rRNA gene sequences. *Animal Biology Journal*, 1(2), 1-9.
2. Bond, D. A., Jellis, G. J., Rowland, G. G., Le Guen, J., Robertson, L. D., Khalil, S. A. and Li-Juan, L. (1994). Present status and future strategy in breeding faba beans (*Vicia faba* L.) for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*, 73, 151-166.
3. Boye, K., Jensen, P. E., Stummann, B. M. and Henningsen, K. W. (1990). Nucleotide sequence of cDNA encoding the BYMV coat protein gene. *Nucleic Acids Research*, 18(16), 4926.
4. Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
5. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. and Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6), 1188-90.
6. Davodi, Z., Hosseini, S. and Hosseini, A. (2014). Occurance and Detection of *Bean Yellow Mosaic Virus* in faba bean Fields of Kerman Province. *Agricultural Biotechnology*, 7(2), 73-78.
7. Farzadfar, Sh., Golnaraghi, A. R. and Pourrahim, R. (2002). Plant viruses of Iran. Saman company, Iran.
8. Gibbs, M. J., Armstrong, J. S. and Gibbs, A. J. (2000). Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*, 16, 573-582.
9. Harrison, B. D. and Robinson, D. J. (1988). Molecular variation in vector-borne plant viruses: Epidemiological [and Discussion] significance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, 321, 447-462.
10. Hassanvand, H., Siyadat, S. A., Moradi Telavat, M. R., Mousavi, S. H. and Karaminegad, A. (2015). Response of Yield and Some Morphological Traits of Two Bean (*Vicia faba* L.) Cultivars to Different Planting Dates in Ahvaz. *Agricultural Knowledge and Sustainable Production*, 25 (2), 79-89.
11. Kaiser, W. J., Mueller, K. E. and Danesh, D. (1968). An outbreak of broad bean disease in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 4, 1.
12. Kalyanamorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., von Haeseler, A., and Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*, 14 (6), 587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
13. Kashiwazaki, S., Hayano, Y., Minobe, Y., Omura, T., Hibino, H. and Tsuchizaki, T. (1989).

- Nucleotide sequence of the capsid protein gene of *barley yellow mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 70(11), 3015-3023.
14. Katoh, K., Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-80.
  15. Kehoe, M. A., Coutts, B. A., Buirchell, B. J. and Jones, R. A. (2014). Plant virology and next generation sequencing: experiences with a *Potyvirus*. *PLoS One*, 9(8), e104580.
  16. Kežar, A., Kavčič, L., Polák, M., Nováček, J., Gutiérrez-Aguirre, I., Žnidarič, M. T. and Pahovnik, D. (2019). Structural basis for the multitasking nature of the *potato virus Y* coat protein. *Science advances*, 5(7), eaaw3808.
  17. Khalil, S. A. and Erskine, W. (2001). Combating disease problems of grain legumes in Egypt. *Grain Legumes*, 32, 24-26.
  18. King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J. and Carstens, E. B. (Eds.). (2011). Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Vol. 9). Elsevier.
  19. Kouchaki, A. and Banayan Aval, M. (2004). Cultivation of legumes, Publications University of Mashhad.
  20. Kyrychenko, A. M., Antipov, I. O. and Hrynychuk, K. V. (2017). Phylogenetic analysis of Ukrainian BYMV isolates from soybeans and beans. *Cytology and Genetics*, 51(3), 173-178.
  21. Lam H.M., Ratmann O., Boni M.F. (2018). Improved algorithmic complexity for the 3SEQ recombination detection algorithm. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 247-251.
  22. Lindbo, J.A. and Falk, B.W., (2017). The impact of “coat protein-mediated virus resistance” in applied plant pathology and basic research. *Phytopathology*, 107(6), 624-634.
  23. Maddison, W. P., Maddison, D. R. (2015). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis, Version 2.75. Hosseini, M. (2008). Agriculture and Bean Production (New Version of Beans in Iran). Tehran University Jahad Publications.
  24. Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. and Muhire, B. (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1 (1).
  25. Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A. and Williamson, C. (2005). A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 21, 98-102.
  26. Maynard Smith, J. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution*, 34, 126-129.
  27. Padidam, M., Sawyer, S. and Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, 265, 218-225.
  28. Pappu, S. S., Brand, R., Pappu, H. R., Rybicki, E. P., Gough, K. H., Frenkel, M. J. and Niblett, C. L. (1993). A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genome: application to *dasheen mosaic virus*, *Journal Virology Methods*, 41(1), 9-20.
  29. Posada, D. and Crandall, K. A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 13757-13762.
  30. Rabiee, S., Hosseini, S. and Hosseini, A. (2015). Occurrence and distribution of some sunflower viruses from sunflower fields in Kerman and Isfahan provinces, Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 1, 223-228.
  31. Salomon, R. (1989). A possible mechanism for exclusion of plant viruses from embryonic and meristemic tissues. *Research in virology*, 140, 453-455.
  32. Salomon, R. and Raccah, B. (1990). The role of the N-terminus of potyvirus coat in aphid transmission. In: Proceedings of *VIIIth International Congress of Virology*, August, Berlin, pp. 83-007.
  33. Seifers, D.L., Tatineni, S. and French, R. (2013). Variants of *Triticum mosaic virus* isolated from wheat in Colorado show divergent biological behavior. *Plant Disease*, 97(7), 903-911.
  34. Selvaraj, D., Pokorný, R. and Holková, L. (2009). Variability of *Bean yellow mosaic virus* isolates in the Czech Republic, *Acta Virology*, 53(4), 277-280.
  35. Sharifi Nezamabad, P., Koochi Habibi, M., Dizadji, A., Kalantari, S. and Ranjbar Aghdam, M. (2015). Biological and phylogenetic characteristics of an Iranian gladiolus isolate of *Bean yellow mosaic virus*. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 45(1), 13-27.
  36. Sherwood, J. L. and Fulton, R. W. (1982). The specific involvement of coat protein in *Tobacco mosaic virus* cross protection. *Virology*, 119, 150-158.
  37. Shukla, D. D. and Ward, C. W. (1989b). Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Archives of Virology*, 106(3-4), 171-200.

38. Shukla, D. D., Ford, R. E., Tomic, M., Jilka, J. and Ward, C. W. (1989a). Possible members of the *potyvirus* group transmitted by mites or whiteflies share epitopes with aphid-transmitted definitive members of the group. *Archives of virology*, 105(3-4), 143-151.
39. Shukla, D. D., Frnkel, M. J. and Ward, C. W. (1991). Structure and function of the *potyvirus* genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13(2), 178-191.
40. Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H. and Ward, C. W. (1988). The N and C termini of the coat proteins of *potyviruses* are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology*, 69(7), 1497-1508.
41. Shukla, D. D., Tomic, M., Jilka, J., Ford, R. E., Toler, R. W. and Langham, M. A. C. (1989b). Taxonomy of *potyviruses* infecting maize, sorghum and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. *Phytopathology*, 79(2), 223-229.
42. Shukla, D. T. and Ward, C. W. (1989a). Structure of *potyvirus* coat proteins and its application in the taxonomy of the *potyvirus* group. In *Advances in virus research* (Vol. 36, pp. 273-314). Academic Press.
43. Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. and Ward, C.W. (1988). The N and C Termini of the coat proteins of *Potyviruses* are surface located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology*, 69, 1497-1508.
44. Sillero, J. C., Villegas-Fernandez, A. M., Thomas, J., Rojas-Molina, M. M., Emeran, A. A., Fernandez-Aparicio, M. and Rubialez, D. (2010). Faba bean breeding for disease resistance. *Field Crops Research*, 115, 297-307.
45. Wada, Y., Iwai, H., Ogawa, Y. and Arai, K. (2000). Pathogenicity and serological properties of *Bean yellow mosaic virus* isolates from gladiolus in Kagoshima prefecture, Japan. *Journal Phytopathology*, 66(1), 44-48.
46. Ward, C. W. and Shukla, D. D. (1991). Taxonomy of *potyviruses*: current problems and some solutions. *Intervirology*, 32(5), 269-296.
47. Wylie, S. J., Coutts, B. A., Jones, M. G. K. and Jones, R. A. C. (2008). Phylogenetic analysis of *Bean yellow mosaic virus* isolates from four continents: Relationship between the seven distinct groups found and their natural isolation hosts and geographical origins. *Plant Disease*, 92, 1596-1603.
48. Zamora, M., Méndez-López, E., Agirrezabala, X., Cuesta, R., Lavín, J. L., Sánchez-Pina, M. A. and Valle, M. (2017). *Potyvirus* virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in ssRNA viruses. *Science advances*, 3(9), eaao2182.