

ویژگی‌های مولکولی و تبارزایی جدایه آفتابگردان ویروس موزائیک زرد لوبیا

محمد مرادی^۱، احمد حسینی^۲ و ثمین حسینی فرهنگی^۲

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه

ولی عصر (عج) رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۲)

چکیده

ویروس موزائیک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) از گونه‌های مهم جنس پوتی‌ویروس است که دارای گسترش جهانی می‌باشد. در پژوهش حاضر ژنوم کامل یک جدایه ایرانی از این ویروس با نام اختصاری BYSun که برای اولین بار از آفتابگردان جداسازی شده است، توالی‌یابی شد و مورد بررسی قرار گرفت. برای تکثیر ژنوم تمام طول جدایه BYSun از سه راهکار کلی، بهره‌گیری از آغازگرهای دژره و اختصاصی و تکثیر انتهای 5' با استفاده از روش RACE 5' استفاده گردید. اندازه آر آن ای ژنومی BYSun (بدون محاسبه دنباله polyA) ۹۵۴۷ نوکلئوتید تعیین شد که پلی‌پروتئین بزرگی دارای ۳۰۵۶ اسید آمینه را رمزگردانی می‌کند. در نواحی ترجمه‌نشده 3' و 5' به ترتیب ۱۷۱ و ۲۰۶ نوکلئوتید شناسایی شد. علاوه بر این، چارچوب خوانش PIPO نیز به صورت همپوشان در ناحیه P3 این جدایه مورد شناسایی قرار گرفت. بررسی با روش‌های مختلف در نرم‌افزار RDP4 نشان داد که جدایه BYSun دارای حداقل یک نوترکیبی در ژنوم خود می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه ترادف نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژنوم جدایه BYSun با ترادف ۲۳ جدایه موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه استرالیایی BYMV-S که از باقلا جداسازی شده است بیشترین شباهت را با این جدایه دارد. در درخت‌های تبارزایی رسم شده بر اساس ترادف جدایه‌های مورد بررسی، جدایه‌های مختلف BYMV بسته به ناحیه ژنومی در شش تا هشت گروه قابل تفکیک هستند که جدایه BYSun به همراه جدایه استرالیایی در شاخه‌ای تحت عنوان S قرار می‌گیرند. جدایه BYSun اولین جدایه ایرانی ویروس موزائیک زرد لوبیا است که به صورت کامل تعیین ترادف شده است.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان و تبارزایی، توالی کامل، ویروس موزائیک زرد لوبیا.

Molecular and phylogenetic characteristics of sunflower isolate of *Bean yellow mosaic virus*

Mohammad Moradi¹, Ahmad Hosseini² and Samin Hosseini Farhangi²

1, 2. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

(Received: Aug. 18, 2019 - Accepted: Dec. 3, 2019)

ABSTRACT

Bean yellow mosaic virus (BYMV) is one of the most important members of the genus *Potyvirus* that is distributed worldwide. In the present study, the complete genome sequence and molecular characteristics of a BYMV sunflower isolate (BYSun) from Iran has been reported. The complete nucleotide sequence of BYSun was determined using degenerate and specific primers and 5'-RACE. The viral genome comprises 9547 nucleotides, excluding a 3'-terminal poly (A) sequence. The genome of BYSun has a 206 nt 5'-non coding and a 171 nt 3'-non coding region. The RNA encodes a single polypeptide of 3056 amino acid residues and has a deduced genome organization typical for the members of the genus *Potyvirus* and nine cleavage sites of the polypeptide were predicted. The small overlapping ORF (PIPO) in the P3 gene was also deduced. When analyzed using the RDP4 program, at least one recombination breakpoint was identified in BYSun genome. BYSun along with 23 full-length sequences of BYMV isolates from Genbank were subjected to phylogenetic analysis that showed the highest nucleotide and amino acid sequence identity with Australian isolate of BYMV-S isolated from Broad bean. Phylogenetic analysis of different BYMV isolates sequences revealed existence of six to eight phylogenetic groupings depending on parts of investigated genome. BYSun and BYMV-S grouped apart from other isolates and were placed within a distinct group, currently designated "S". This is the first report of a full-length sequence of a BYMV isolate from Iran.

Keywords: *Bean yellow mosaic virus*, full length genome sequence, sunflower, phylogeny.

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

مقدمه

ویروس موزائیک زرد لوبیا (Bean yellow mosaic virus, BYMV) متعلق به جنس پوتی ویروس و تیره پوتی‌ویریده است (Chu et al., 1999). این ویروس دارای پیکره میله‌ای خمش‌پذیر با طول ۷۵۰ نانومتر و عرض ۱۲-۱۵ نانومتر می‌باشد. این ویروس دارای ژنوم یک قسمتی و آر آن ای تک لای مثبت به اندازه حدود ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید است. مانند سایر پوتی‌ویروس‌ها، یک پروتئین ویروسی وابسته به ژنوم (Viral protein genome-linked, VPg) در انتهای ۵' و دنباله پلی‌آدنین (poly A) در انتهای ۳' ژنوم قرار دارد. VPg یک پروتئین نسبتاً کوچک متصل به ژنوم ویروس است که توسط ویروس کد می‌شود. قطعات پلی‌آدنین به طول ۲۵ تا ۴۰۰ باز در انتهای ۳' ژنوم این دسته از ویروس‌ها قرار دارند که چنین توالی در انتهای ۳'، آر آن ای‌های پیک بعضی یوکاریوت‌ها، نیز شناسایی شده است. ژنوم BYMV دارای یک چهارچوب خوانش (ORF) است که یک پلی‌پروتئین را رمزگردانی می‌کند. این پلی‌پروتئین به ده پروتئین (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, VPg, Nib and CP) دارای عملکرد مشخص تقسیم می‌شود (Adams et al., 2005).

از نواحی پوشش پروتئینی (CP) و 3'UTR برای بررسی روابط تبارزایی و تعیین سویه‌های مختلف BYMV استفاده شده است (Guyat, 1996). Wylie et al. (2008) با بررسی روابط فیلوژنتیک بر اساس توالی CP، جدایه‌های BYMV را در هفت گروه Broad bean, Pea, Monocot, Lupin, General, Canna و دادند. این گروه‌بندی با دامنه میزبانی یا مناطق جغرافیایی جمع‌آوری ویروس مطابقت داشت (Wylie et al., 2008). از پروتئین VPg برای تمایز جدایه‌ها در مطالعات فیلوژنی استفاده گردیده است. بر این اساس جدایه‌های BYMV به پنج گروه متمایز I, II, III, IV و V تقسیم شدند. گفته می‌شود این پروتئین به تنهایی یا در ارتباط با سایر پروتئین‌ها دارای عملکرد چندگانه می‌باشد و برای تعیین روابط تبارزایی قابل استفاده است (Parrella and Lanave, 2009).

با وجودی که بسیاری از درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس ترادف قسمت‌های مختلف ژنوم (به‌ویژه

پروتئین پوششی) به گروه‌بندی‌های نسبتاً دقیقی بر اساس منشأ میزبانی منجر شده است، برخی بررسی‌ها نشان از ناپایداری گروه‌بندی با استفاده از ترادف قطعات ناقص ژنومی داشته که با معرفی بعضی جدایه‌های جدید دچار دگرگونی می‌شود (Parrella and Lanave, 2009). به همین دلیل برخی محققین استفاده از ترادف تمام طول ژنوم را همراه با جایگزینی سامانه شماره‌دهی به گروه‌ها به جای نامگذاری بر اساس میزبان پیشنهاد می‌کنند (Kehoe et al., 2014). اگرچه ترادف کامل ژنوم چندین جدایه BYMV تعیین و در بانک ژن قرار داده شده است، اکثر آنها از باقلا و یا گلابول جداسازی شده‌اند. بنابراین اطلاعات بسیار اندکی از ترادف سایر جدایه‌های این ویروس از دیگر میزبان‌ها در دست می‌باشد.

برای اولین بار Rabiee (2013) با شناسایی پوتی‌ویروس‌های احتمالی آلوده‌کننده مزارع آفتابگردان در ایران، این گیاه را به‌عنوان یک میزبان طبیعی جدید برای BYMV معرفی نمود. هدف از انجام تحقیق حاضر تعیین ترادف کامل ژنوم و پروتئین‌های احتمالی رمزگردانی شده توسط جدایه BYMV به دست آمده از مزارع آفتابگردان استان اصفهان بود. بر اساس تجزیه و تحلیل تبارزایی ترادف تمام طول ژنوم ویروس و مقایسه آن با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن، جایگاه تاکسونومیکی این جدایه مشخص شد.

مواد و روش‌ها

تکثیر ویروس در شرایط گلخانه

برای انجام این پژوهش از جدایه BYSun ویروس موزائیک زرد لوبیا موجود در کلکسیون ویروس‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان که از مزارع آفتابگردان استان اصفهان در سال ۱۳۹۱ توسط ربیعی جداسازی و خالص‌سازی بیولوژیکی شده بود، استفاده شد. نمونه آلوده به نسبت یک به ۱۰ در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار با اسیدیته هفت همگن‌سازی شده و برای مایه‌زنی آماده شد. عصاره گیاه آلوده در شرایط گلخانه‌ای مناسب با دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس با دوره روشنایی ۱۶ ساعت روی بوته‌های باقلا سالم و

نسبت آر آن ای به پروتئین بیشتر از ۱/۹ و کمتر از ۲/۱ بود، برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. تبدیل آر آن ای به cDNA در دو مرحله و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. در مرحله اول ۱۰ میکرولیتر آب، دو میکرولیتر (Reverse transcriptase buffer (10X، یک میکرولیتر (dNTPs (10 mmol/μlit)، یک میکرولیتر آغازگر برگشتی (10 pmol/μl) و پنج میکرولیتر از آر آن ای کل درون میکروتیوب ریخته و به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار داده تا ساختارهای ثانویه آن شکسته و بلافاصله به روی یخ منتقل گردید. در مرحله دوم نیم میکرولیتر آنزیم MuMLV Reverse transcriptase (RT) و نیم میکرولیتر RNase inhibitor (40 U/μl) اضافه و میکروتیوبها به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل شش میکرولیتر آب، ۱۲ میکرولیتر Master mix (شرکت ویراژن، ایران)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشتی (10 pmol/μl) و پنج میکرولیتر cDNA انجام گرفت.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز از سه جفت آغازگر عمومی پوتی‌ویروس‌ها طراحی شده توسط Ha *et al.* (2008) (HPfor/HPrev و Clfor/Clrev) و ده آغازگر *Chen et al.* (2001) (Oligodt/Sprimer) و ده آغازگر اختصاصی طراحی شده در این پژوهش استفاده شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی نواحی باقیمانده ژنوم با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI Advance™ (Invitrogen) انجام گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده و جایگاه قطعات تکثیر شده روی ژنوم در جدول ۱ نشان داده شده است.

تکثیر انتهای ۵' ژنوم ویروس موزائیک زرد باقلا با استفاده از روش RACE-5' انجام شد. برای ساخت رشته اول cDNA، ۱۰ میکرولیتر آر آن ای حاصل از ویروس خالص با یک میکرولیتر آغازگر BYSUN8rev (جدول ۱) ترکیب شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و بلافاصله به روی یخ منتقل شد.

عاری از آلودگی که قبلاً با پودر کاربوراندوم گردپاشی شده بودند، به صورت مکانیکی مایه‌زنی شد. بوته‌ها به طور مداوم مورد بازرسی قرار گرفتند. به منظور اطمینان از تکثیر و حضور ویروس در بوته‌های باقلای آلوده، حدود یک ماه پس از مایه‌زنی و ظهور علائم موزائیک (شکل ۱)، از آزمون DAS-ELISA و آنتی‌بادی چند همسانه‌ای BYMV (AS-0471) تهیه‌شده از مؤسسه DSMZ آلمان با روش Clark & Adams (1977) استفاده شد.



شکل ۱. علایم موزائیک خفیف در آفتابگردان دارای آلودگی طبیعی (راست) و موزائیک در گیاه باقلا مایه‌زنی‌شده (چپ) با جدایه BYSun

Figure 1. Mild mosaic symptom in naturally infected sunflower plant (right) and mosaic symptom in faba bean plant (left) mechanically inoculated with BYSun

استخراج آر آن ای کل و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز آر آن ای کل نمونه باقلای آلوده به جدایه BYSun با استفاده از کیت Column RNA isolation kit (شرکت دنازیست- ایران) استخراج شد. برای بررسی کمیت محصول استخراج شده، با استفاده از دستگاه Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTech, USA) جذب نمونه استخراج شده در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایی که در آنها

جدول ۱. جایگاه و اندازه قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عمومی روی ژنوم

جدایه BYSun

Table 1. Amplicon size and position on BYSun genome and properties of specific and degenerate primers used in this study

Primer name	Primer sequence	Annealing Temp.(° C)	Amplicon size (bp)	Amplicon position (bp)
Clrev	5'-ACICCRTTYTCDATDATRTTGTIGTC-3'	40	700	4071-4752 (Partial CI)
Clfor	5'-GIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC-3'			
HPrev	5'-GAICCRWAIGARTCIAIACRTG-3'			
HPfor	5'-TGYGAYAAAYCARYTIGAYIIIAAYG-3'	40	700	1643-2330(Partial HC-Pro)
OligodT	5'-GTTTTCCAGTCACGAC(T) ₁₅ -3'			
Sprimer	5'-GGXAAAYAAAYAGYGGXCAZCC-3'			
BYSUN1rev	5'-AATTGCAAACATTCAAGGGC-3'	55	1012	4520-5532(Partial CI)
BYSUN1for	5'-TCAAAGCGACACTTTATTGTGGCAA-3'			
BYSUN2rev	5'-CGTTTCCATACCCAATGCGC-3'			
BYSUN2for	5'-TCAACTCTAAGCGAATTTGGTGCCCC-3'	63	895	5492-6386(Partial CI, 6k2, VPg, Partial NIa)
BYSUN3rev	5'-TGCTGCTGTGAACGATCGGG-3'			
BYSUN3for	5'-GTTCGTGTGATCCTAAGGAGCTGCCCC-3'			
BYSUN4rev	5'-TIGATACCAAGCTTTTCGCG-3'	52	674	7336-8010 (partial NIb)
BYSUN4for	5'-CACTTATGGGCCCGACATTC-3'			
BYSUN5rev	5'-ACACCAAGCATGGTGTGCATATCAC-3'			
BYSUN5for	5'-ACTGAGGAGAGAGTCACACCAGCCG-3'	56	914	8453-9366 (partial CP)
BYSUN6rev	5'-TGTTGCTCAAATAAAACGGC-3'			
BYSUN6for	5'-GAACCAAGAAGTTTGTGCGC-3'			
BYSUN7rev	5'-AACTAATGGACTGGTTCGCG-3'	62	997	2174-3170 (partial HCPro, Partial P3)
BYSUN7for	5'-CCAAAGTTAGGTGAGTGGCC-3'			
BYSUN8rev	5'-CATGATATGCTCTCTGACCCC-3'			
BYSUN8for	5'-CGCAACCTTTAAGAAGTACG-3'	57	974	727-1700(partial P1, partial HCPro)
BYSUN9rev	5'-TIGTTGTGTGAATATTGGCC-3'			
BYSUN9for	5'-ATACAAGACAACGATTCAAGCC-3'			
BYSUN10rev	5'-AACTTGTAATCCTTGCCCC-3'	55	550	1-553(5-UTR, partial P1)

۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تکثیر cDNA تک‌لا دارای دنباله poly C، ۱۰ میکرولیتر بافر 5xPCR، سه میکرولیتر $MgCl_2$ (25mM)، دو میکرولیتر آغازگر BYSUN9rev (10uM)، دو میکرولیتر آغازگر OligodG (10uM)، یک میکرولیتر مخلوط (10uM) dNTPs، ۲۶/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و پنج میکرولیتر cDNA با یکدیگر ترکیب شدند. از آغازگر اختصاصی BYSUN10rev و آغازگر oligo dG در این واکنش استفاده و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد (جدول ۱).

تعیین توالی نوکلئوتیدی نواحی تکثیر شده و بررسی خصوصیات ژنوم جدایه مورد بررسی

پس از تکثیر ژنوم جدایه مورد بررسی در ۱۳ قطعه و حصول اطمینان از خالص بودن قطعات تکثیری، تمامی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به شرکت ماکروژن کره جنوبی به‌منظور توالی‌یابی ارسال گردید. هر قطعه حداقل دو بار توسط آغازگرهای مستقیم و معکوس مورد خوانش قرار گرفتند. توالی قطعات تکثیر شده ابتدا با برنامه Chromas version 2.13 بازبینی و در صورت نیاز اصلاح شد و سپس با نرم‌افزار بلاست در پایگاه اطلاعاتی

چهار میکرولیتر بافر ترانسکریپتاز معکوس 5X AMV، یک میکرولیتر مخلوط چهار نوع dNTP (10mM)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (25 mM)، ۱/۵ میکرولیتر DTT و یک میکرولیتر آنزیم ترانسکریپتاز معکوس AMV (10u/μl) به مخلوط اضافه گردید تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر برسد.

مخلوط حاصل به‌مدت پنج دقیقه در ۲۵ درجه، یک ساعت در ۴۲ درجه، ۱۵ دقیقه در ۷۰ درجه و در نهایت به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. به محصول واکنش قبل ۳۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. برای حذف آر آن ای باقیمانده در مخلوط، نیم میکرولیتر RNase I (۵۰۰۰۰ u/ml) محصول شرکت BioLabs و نیم میکرولیتر RNase A (۱۰۴ u/mg) محصول شرکت Applichem به ترکیبات قبلی افزوده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. از کیت PCR Clean-up Gel Extraction/ Nucleospin Extract II برای خالص کردن قطعات cDNA تک‌لا قبل از افزودن دنباله C استفاده گردید. برای افزودن دنباله C به قطعات cDNA، یک میکرولیتر آنزیم Terminal deoxynucleotidyl transferase (Promega) به مخلوط dCTP و cDNA اضافه و به‌مدت

به منظور بررسی رابطه تبارزایی جدایه ویروسی مورد بررسی با سایر جدایه‌های انتخابی موجود در بانک ژن (جدول ۲) پس از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با نرم‌افزار Clustal W از نرم‌افزار MEGA 7 و روش Maximum Likelihood استفاده گردید.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل ترادف‌های تکثیرشده و مقایسه آن

با سایر جدایه‌های BYMV

بررسی نتایج حاصل از ترادف‌های تعیین‌شده، حذف ترادف‌های هم‌پوشان و ترکیب قطعات با یکدیگر با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI Advance (Invitrogen) انجام گرفت (شکل ۲). ترادف ژنوم کامل جدایه BYSun از ویروس موزاییک زرد لوبیا با بهره‌گیری از ترادف‌های ۱۳ قطعه مختلف (با حداقل ۱۰۰ باز همپوشانی) به دست آمد که با رس شمار KT934334 در بانک ژن NCBI ثبت گردید. این ژنوم دارای یک قطعه آر ان ای تک لا به طول ۹۵۴۷ نوکلئوتید بدون در نظر گرفتن دنباله poly A می‌باشد که یک چهارچوب ژنی بزرگ را رمزگردانی می‌نماید. طول ژنوم جدایه BYSun نسبتاً بلندتر از ژنوم اکثر جدایه‌های BYMV می‌باشد.

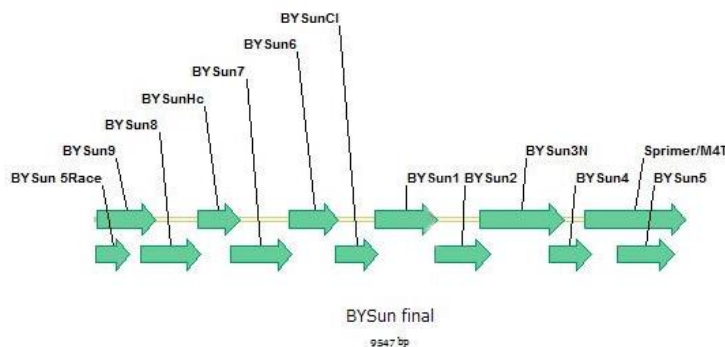
NCBI با ترادف‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت. برای ارزیابی ماهیت پروتئین‌های حاصل از ترجمه توالی‌های به‌دست‌آمده، در پایگاه اطلاعاتی Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) ترادف آمینواسیدی آن‌ها مورد جستجو قرار گرفت.

ساختار ثانویه ناحیه 3'-UTR جدایه BYSun با استفاده از نرم‌افزار MFOLD با در نظر گرفتن معیارهای استفاده شده توسط برخی از بررسی‌های قبلی مورد ارزیابی قرار گرفت (Parrella and Lanave, 2009). علامت اختصاری و رس شمار جدایه‌های دریافت شده از بانک ژن برای مقایسه‌های آمینواسیدی و نوکلئوتیدی با جدایه انتخابی مورد بررسی در جدول ۲ آورده شده است. برای بررسی پدیده نوترکیبی در بین جدایه‌های BYMV از نرم‌افزار RDP4 بهره گرفته شد. وقایع نوترکیبی، والد اصلی، والد فرعی و نقاط شروع و پایان نوترکیبی توسط روش‌های RDP، GENECONV، Bootscan، MaxChi، Chimaera، SiScan، 3Seq و Phylpro مورد بررسی قرار گرفت. معیارهای مختلفی برای تأیید نتایج حاصل از این نرم‌افزار وجود دارد. به‌طور کلی در صورتی که وجود نوترکیبی با حداقل سه یا چهار روش با p-value کمتر از 10^{-6} شناسایی بود، وقوع پدیده نوترکیبی قابل قبول شناخته شد.

جدول ۲. جدایه‌های BYMV دریافت شده از بانک ژن

Table 2. BYMV isolates retrieved from Genbank and used in this study

Isolate	Acc. No.	Origin	Host
Fr	FJ492961	S. Korea	<i>Freesia</i> sp.
PN83A	HG970860	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
MD1	HG970847	Australia	<i>Lupinus cosentinii</i>
GB42C	HG970853	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
SW3.2	JX156423	Australia	<i>Diuris</i> sp.
NG1	HG970869	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
KP2	JX173278	Australia	<i>Diuris magnifica</i>
ES55C	HG970858	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
MB4	D83749	Japan	<i>Gladiolus hybrida</i>
G1	AB439730	Japan	<i>Gladiolus</i> sp.
GIa	AB439729	Japan	<i>Gladiolus</i> sp.
LP	HG970866	Australia	<i>Lupinus pilosus</i>
LPexFB	HG970868	Australia	<i>Vicia faba</i>
MD5	HG970848	Australia	<i>Lupinus angustifolius</i>
BYMV-S	U47033	Australia	<i>Vicia faba</i>
GDD	AY192568	USA	<i>Gladiolus hybrida</i>
IbG	AB079887	Japan	<i>Gladiolus</i> sp.
FBI-1	EU082116	Australia	<i>Vicia faba</i>
MB4	D83749	Japan	<i>Gladiolus hybrida</i>
90-2	AB439731	Japan	<i>Vicia faba</i>
W	DQ641248	USA	<i>Lupinus albus</i>
CS	AB373203	Japan	<i>Pisum sativum</i>



شکل ۲. نمای مکانی قطعات تکثیری همپوشان تکثیر شده برای ایجاد ترادف تمام طول ژنوم جدایه BYSun تهیه شده با نرم افزار Vector NTI Advance (Invitrogen)

FIGURE 2. Overlapping amplicons to obtain full-length genome of BYSun isolate prepared using Vector NTI Advance (Invitrogen)

در موقعیت ۴۵-۵۰ یافت گردید. علاوه بر این، وجود تعداد قابل توجهی از موتیف‌های CAA (حداقل ده ترادف) در این ناحیه از ژنوم ارتباط آن را با فرایند ترجمه نشان می‌دهد. مشابه ساختار مذکور در ترادف تسهیل کننده ترجمه Ω مربوط به ویروس TMV نیز گزارش شده است (Xu et al., 2010).

تجزیه و تحلیل مکان‌های برش احتمالی در پلی پروتئین جدایه BYSun

قسمت کدشونده جدایه BYSun به یک پلی پروتئین بزرگ با ۳۰۵۶ آمینو اسید با وزن تقریبی ۳۴۷ کیلودالتون ترجمه می‌شود. بر اساس موقعیت احتمالی مکان‌های برش در ویروس‌های تیره *Potyviridae* (Adams et al., 2005) و همچنین بر پایه هم‌ردیف‌سازی ترادف اسید آمینه‌ای جدایه BYSun با پروتئین‌های ده‌گانه این تیره، نه محل برش احتمالی در پلی پروتئین این ویروس تعیین گردید. ترادف اسید آمینه‌ای در محل برش این پلی پروتئین به صورت شش اسید آمینه قبل (A1 تا A6) و دو اسید آمینه بعد از نقطه برش (A1' و A2') برای هر یک از پروتئین‌ها در جدول ۳ آورده شده است. با در نظر گرفتن محل‌های برش در پلی پروتئین BYSun، پروتئین‌های حاصل به همان ترتیب حفاظت شده در تیره *Potyviridae* استقرار دارند، به این صورت که P1 اولین پروتئین در قسمت انتهایی آمینی پلی پروتئین و پس از آن به ترتیب HC-Pro، P3، پروتئین شش کیلو دالتونی اول (6K1)، پروتئین اندامک‌های همراه درون سیتوپلاسمی (CI)، پروتئین شش کیلو

نقطه آغاز ترجمه پلی پروتئین کدون آغازین، در موقعیت ۲۰۶-۲۰۸ و کدون خاتمه ترجمه پلی پروتئین BYSun در نوکلئوتیدهای ۹۳۷۴-۹۳۷۶ واقع شده است. ترکیب بازها در ژنوم به این صورت است که آدنین با ۳۱۶۰ (۳۳/۰۹٪) بیشترین و سیتوزین با ۱۶۷۳ (۱۷/۵۲٪) کمترین میزان را دارد. تعداد بازهای گوانین ۲۱۸۵ (۲۲/۸۸٪) و اوراسیل ۲۵۲۹ (۲۶/۴۸٪) می‌باشد. ترکیب بازهای مشاهده شده با اکثر پوتی ویروس‌های گزارش شده مشابهت دارد (Xu et al., 2010).

ناحیه 5'-UTR در ژنوم BYSun ناحیه غنی از آدنین می‌باشد. علاوه بر این، تعداد بازهای گوانین در این ناحیه از ژنوم نسبتاً پایین است. به نظر می‌رسد این ویژگی یک خصوصیت مشترک در ترادف این ناحیه از ویروس‌های گیاهی باشد (Gallie & Walbot, 1992). در بسیاری از پوتی ویروس‌ها ترادف‌های حفاظت شده‌ای به نام potybox a و potybox b وجود دارند که در بعضی منابع نقش آنها در فرایند ترجمه یا همانندسازی ویروس مهم ارزیابی شده است (Shukla et al., 1994). ترادف AGACAATAC در ابتدای ناحیه 5'-UTR ژنوم (نوکلئوتیدهای ۳۰-۲۲) جدایه BYSun قرار دارد، تا حد زیادی با ترادف potybox a (AACAACAT) تشابه دارد. موتیف مذکور در پوتی ویروس‌های واجد آن عموماً پس از نوکلئوتید ۱۵ دیده می‌شود (Shukla et al., 1994). ترادفی مشابه با موتیف potybox b (TCAAGCA) در ناحیه 5'-UTR ژنوم این جدایه به صورت TCAAGCC

ORF پلی پروتئین انجام می گیرد. بررسی ژنوم BYSun وجود این موتیف را به صورت G_2A_6 در نوکلئوتیدهای ۲۸۹۷-۲۸۹۰ مشخص می کند. محصول این چارچوب ژنی در BYSun پروتئینی متشکل از ۱۲۲ اسیدآمینه می باشد که وزن مولکولی معادل ۱۳/۴ کیلو دالتون را دارا می باشد.

در فرایند شکستن پلی پروتئین، سه پروتئیناز شامل پروتئیناز P1، پروتئیناز HC-Pro و پروتئیناز N1a-Pro نقش دارند. پروتئینازهای P1 و HC-Pro طی فرایند خودبرشی از پلی پروتئین جدا می شوند. پروتئیناز N1a-Pro نیز مسئول شکستن باقیمانده پلی پروتئین به سایر پروتئین ها می باشد. برای بررسی میزان درستی مرزبندی های احتمالی پروتئین ها در پلی پروتئین و همچنین یافتن دامانه های بالقوه و موقعیت آن ها در این پروتئین ها، ترادف کامل اسیدآمینه ای BYSun در پایگاه اطلاعاتی Pfam مورد جستجو قرار گرفت (جدول ۴).

دالتونی دوم (6K2)، دامانه VPg از پروتئین اندامک هسته ای کوچک (N1a-VPg)، دامانه پروتئیناز از پروتئین اندامک هسته ای کوچک (N1a-Pro)، پروتئین اندامک هسته ای بزرگ (N1b)، و پروتئین پوششی (CP) قرار می گیرند. شکل ۳ محل شکسته شدن پروتئین ها روی ژنوم بر اساس موقعیت نوکلئوتیدی نقطه برش آن ها را نشان می دهد.

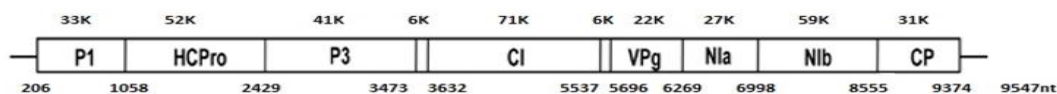
Chung *et al.* (2008) یک چارچوب خوانش همپوشان در سیستمون P3 و ویروس های تیره *Potyviridae* را مورد شناسایی قرار داده اند که به اختصار PIPO (pretty interesting Potyviridae) نامگذاری شده است. پروتئین PIPO به صورت یک محصول ترکیبی با P3 (P3-PIPO) از طریق فرایندهایی چون ribosomal frameshift یا transcriptional slippage در موتیف $G_{1-2}A_{6-7}$ که در انتهای 5' چهارچوب ژنی PIPO قرار دارد بیان می شود. بیان این محصول با شیفت +۲ نسبت به

جدول ۳. ترادف اسیدآمینه های مجاور نقطه برش به صورت شش اسیدآمینه قبل (A1 تا A6) و دو اسیدآمینه بعد از نقطه برش

(A1' و A2') در سایت های برش احتمالی جدایه BYSun

Table 3. Amino acid sequences around restriction sites of BYSun polyprotein. Six amino acids before (A1 to A6) and two amino acids after (A1' to A2') of restriction sites are represented

	A6	A5	A4	A3	A2	A1	A1'	A2'
P1/HCPPro	N	T	I	R	E	F	S	A
HCPPro/P3	K	Y	Y	R	V	G	G	D
P3/6K1	D	K	Y	V	F	Q	A	K
6K1/CI	D	A	Y	R	F	Q	S	L
CI/6K2	E	C	L	Q	F	E	S	L
6K2/VPg	K	E	F	I	F	Q	G	K
VPg/N1a	A	D	F	D	F	E	S	L
N1a/N1b	L	Q	L	S	F	Q	S	A
N1b/CP	L	E	C	Y	F	Q	S	D



شکل ۳. ساختار پلی پروتئین جدایه BYSun

FIGURE 3. The predicted organization of BYSun polyprotein

جدول ۴. مشخصات دامانه های پروتئینی پلی پروتئین جدایه ویروسی BYSun بر اساس جستجوی ترادف اسیدآمینه ای در پایگاه

اطلاعاتی Pfam

Table 4. Properties of protein domain of BYSun polyprotein based on Pfam databank

Domain name	Domain properties	Position on genome
Peptidas-S30	Potyvirus P1 protease	40 – 283
Peptidas-C6	Helper component proteinase	302 – 741
Potyvird-p3	Protein P3 of Potyvirid polyprotein	756 – 1193
DEAD	DEAD/DEAH box helicase	1206 – 1356
Helicase-C	Helicase conserved C-terminal domain	1371 – 1502
Poty PP	Potyvirdae polyprotein	1527 – 1800
Peptidas-C4	Peptidase family C4	2020 – 2253
RDRP-1	RNA dependent RNA polymerase	2283 – 2750
Poty-coat	Potyvirus coat protein	2822 – 3055

همان‌گونه که ذکر شد نه محل برش احتمالی در پلی‌پروتئین جدایه ویروسی BYSun بر پایه همدیف‌سازی ترادف اسیدآمینه‌ای پلی‌پروتئین این ویروس با هر یک از پروتئین‌های ده‌گانه جدایه‌های BYMV شناسایی گردید. تقریباً ترادف اکثر مکان‌های برشی با برآیند ترادف‌های جایگاه برش N1a توصیف شده توسط Riechmann *et al.* (1992) مطابقت دارد. جایگاه برش انتهایی آمینی P1 جدایه مورد بررسی با اکثر پوتی‌ویروس‌ها همخوانی دارد. نقطه جداسدن پروتئین HC-Pro از P3 نیز قسمتی از موتیف حفاظت شده YXVG/G می‌باشد (Adams *et al.*, 2005). پروتئین N1a در هفت نقطه برش با ترادف‌های Q/S، E/S و Q/G پروتئین‌های باقیمانده را از پلی‌پروتئین جدا می‌کند. این ترادف‌ها در سایر پوتی‌ویروس‌ها به وفور گزارش شده است. با این وجود جایگاه برش غیر معمول یا جدیدی در پلی‌پروتئین این ویروس یافت نگردید و همه آن‌ها مشابه با محل‌های برش جدایه‌های BYMV می‌باشد. بر اساس همدیف‌سازی ترادف اسیدآمینه‌ای هر یک از پروتئین‌ها و همچنین بر پایه موقعیت احتمالی جایگاه برشی، پلی‌پروتئین BYSun به‌وسیله سه پروتئین N1a، HC-Pro و P1، وجود Pro به ده پروتئین کوچک‌تر شکسته می‌شود. وجود فعالیت پروتئازی در پروتئین‌های ذکرشده با حضور دامانه پروتئیناز نوع سرین H-8X-D-25X-GDSG (در ناحیه P1)، موتیف C-71X-H (در HC-Pro) و موتیف کاتالیتیک H-34X-D-66X-GQCG (در N1a-Pro) در BYSun با کمی تغییر مورد تأیید قرار می‌گیرد. پروتئین‌های شکسته‌شده به همان ترتیب حفاظت‌شده در تیره *Potyviridae* یعنی به صورت P1، HC-Pro، P3، 6K1، CI، 6K2، VPg، N1a-Pro، N1b و CP قبل شناسایی می‌باشند. اندازه پروتئین‌های به‌دست آمده جدایه BYSun بر اساس تجزیه و تحلیل مولکولی با اندازه پروتئین‌های ایجادشده توسط آزمون‌های ترجمه درون‌شیشه‌ای (*in vitro*) و همچنین پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان آلوده به جدایه‌های مختلف BYMV همخوانی دارد (Chang *et al.*, 1988).

میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای

نواحی مختلف ژنوم جدایه ویروسی BYSun با قسمت‌های متناظر در جدایه‌های BYMV که با بهره‌گیری از نرم‌افزار Vector NTI حاصل شده، در جدول ۵ آمده است. پروتئین P1 در جدایه ویروسی BYSun دارای ۵۷-۹۶ درصد شباهت اسیدآمینه‌ای با پروتئین‌های مشابه در جدایه‌های BYMV می‌باشد و بیشترین شباهت را با جدایه BYMV-S دارد. این پروتئین نسبت به سایر پروتئین‌های گونه BYMV از تنوع بیشتری برخوردار است و به غیر از موتیف‌های H-8X-D-32X-GXSG (دامانه پروتئیناز نوع سرین) و FXXRG (دامانه فعالیت خودبرشی) ناحیه حفاظت‌شده‌ای ندارد. از میان موتیف‌های شناخته‌شده در ناحیه HC-Pro از پلی‌پروتئین ویروس‌های *Potyviridae* تعدادی به‌صورت کامل و برخی نیز به صورت ترادف‌های تغییریافته در این ناحیه از پلی‌پروتئین جدایه ویروسی BYSun مورد شناسایی قرار گرفت. موتیف zinc finger (C-8X-C-13X-C-) (4X-C-2X-C)، موتیف مؤثر در برهم‌کنش بین پروتئین‌های HC-Pro (H-X-C-27X-C) و موتیف حفاظت‌شده C-72X-H دارای قابلیت پروتئینازی به‌صورت تقریباً حفاظت‌شده دیده می‌شوند. موتیف‌های LAIGN دارای نقش جابجایی سلول به سلول به‌صورت LAIGR و موتیف CCC مؤثر در حرکت ویروس به مسافت‌های طولانی در موقعیت‌های متناظر جدایه ویروسی BYSun استقرار دارند. از میان موتیف‌های مؤثر در انتقال ویروس توسط شته، موتیف PTK و FRNK به صورت محافظت شده و موتیف KITC به صورت ترادف RITC در نیمه آمینی پروتئین HC-Pro دیده می‌شود. مقایسه ترادف اسیدآمینه‌ای پروتئین HC-Pro در جدایه ویروسی BYSun با پروتئین‌های متناظر در سایر جدایه‌های BYMV از شباهت ۸۹-۱۰۰ درصدی آن‌ها حکایت دارد که در این میان با جدایه BYMV-S کاملاً مشابه می‌باشد. پروتئین P3 جدایه ویروسی BYSun با پروتئین‌های متناظر سایر جدایه‌های BYMV دارای شباهت اسیدآمینه‌ای ۹۰-۱۰۰ درصد می‌باشد که بیشترین میزان شباهت با ویروس BYMV-S قابل مشاهده است. پروتئین 6K1 تا حدودی در بین

ویروس‌های *Potyvirus* مشترک می‌باشد به صورت کاملاً حفاظت شده قابل مشاهده است. موتیف‌های TERHT و MVWCIENG نیز که در پروتئین پوششی پوتی‌ویروس‌ها و رایموویروس‌ها کمابیش به صورت حفاظت شده وجود دارد (Goetz et al., 2002) در جدایه مورد مطالعه نیز دیده می‌شوند.

مطالعات قبلی که به منظور بررسی برخی ویژگی‌های بیولوژیک BYSun انجام گردیده است، انتقال با کارایی بالای این جدایه توسط شته *A. gossypii* را نشان می‌دهد (Rabiee, 2013). از دیدگاه مولکولی در ویروس‌های جنس *Potyvirus*، انتقال توسط شته با پروتئین HC-Pro و پروتئین پوششی ارتباط زیادی دارد. تاکنون نقش چندین دامانه مانند KITC (یا KLSC) در ناحیه انتهای آمینی، PTK و FRNK در ناحیه مرکزی پروتئین HC-Pro در انتقال ویروس توسط شته به اثبات رسیده است (Dombrovsky et al., 2005). موتیف PTK در اتصال HC-Pro به ویروس‌ها نقش اساسی دارد. در حالی که دامانه KITS باعث چسبیدن این پروتئین به پوششی پوتی‌ویروس‌ها به‌خصوص موتیف DAG (و یا موتیف‌های مشابه مثل NAG، DAG و DVG) نقش تعیین کننده‌ای در انتقال ویروس توسط شته را دارا هستند. پوتی‌ویروس‌هایی که در این موتیف دچار جهش شده باشند در محیط مصنوعی قادر به اتصال به پروتئین HC-Pro نیستند. از میان موتیف‌های ذکر شده، موتیف‌های PTK و FRNK به‌صورت کاملاً دست نخورده در پروتئین HC-Pro ویروس BYSun دیده می‌شوند. اما موتیف KITS به صورت ناقص (RITS) در پروتئین HC-Pro و در موقعیت متناظر با سایر پوتی‌ویروس‌ها دیده می‌شود (Gal-On, 2007). موتیف NAG که از موتیف‌های مؤثر در انتقال ویروس توسط شته در پروتئین پوششی است نیز در این ویروس مشاهده گردید. بر این اساس، نتایج به دست آمده از بررسی‌های کنونی حاصل از تعیین توالی ژنوم تأییدکننده نتایج آزمون‌های انتقال با شته (Rabiee, 2013) می‌باشد.

بررسی ساختار ثانویه ناحیه 3'-UTR

با توجه به اهمیت نقش ساختار ثانویه ناحیه 3'-UTR در

پوتی‌ویروس‌ها حفاظت شده است. این پروتئین که در جدایه ویروسی BYSun دارای موتیف A-22X-K می‌باشد، بیشترین شباهت اسیدآمینه‌ای را با BYMV-S نشان می‌دهد. شش موتیف حفاظت‌شده در توالی پروتئین CI شناسایی شده‌اند که با دارا بودن فعالیت آر آن ای هلیکازی در تکثیر ویروس نقش دارند. در جدایه ویروسی BYSun به غیر از موتیف IV، سایر موتیف‌ها با تغییرات اندک در موقعیت متناظر با سایر پوتی‌ویروس‌ها مشاهده شدند. این پروتئین در BYSun با جدایه با BYMV-S شباهت ۹۸ درصدی را نشان داد ولی در مورد سایر جدایه‌ها این مقدار در دامنه ۷۸-۸۹ قرار می‌گیرد. پروتئین 6K2 بر خلاف 6K1 در میان ویروس‌های تیره *Potyvirus* از تنوع بالاتری برخوردار است. بیشترین شباهت اسیدآمینه‌ای بین پروتئین 6K2 در BYSun با جدایه BYMV-S مشاهده شد. پروتئین VPg جدایه مورد بررسی با پروتئین‌های متناظر سایر جدایه‌های BYMV دارای شباهت اسیدآمینه‌ای ۷۵-۹۸ درصدی می‌باشد. موتیف اتصال VPg به انتهای 5' ژنوم (NMYG) مهمترین موتیف محافظت شده بین اعضاء *Potyvirus* در این ناحیه است که در BYSun هم دیده می‌شود. پروتئین NIa-Pro جدایه ویروسی BYSun دارای شباهت ۸۹-۱۰۰ درصدی با پروتئین‌های متناظر در جدایه‌های BYMV است. موتیف کاتالیتیک پروتئیناز نوع سیستئین در این پروتئین به صورت حفاظت‌شده وجود دارد. پروتئین Nib از حفاظت‌شدگی زیادی برخوردار است. موتیف‌های SG-3X-T-3X-NT-30X-GDD و CHADGS که با فعالیت آنزیم RdRP مرتبط هستند در این ناحیه از جدایه مورد بررسی مشاهده می‌شود. میزان ۷۷-۹۹ درصد شباهت اسیدآمینه‌ای این ناحیه از پلی‌پروتئین در جدایه ویروسی BYSun با پروتئین‌های متناظر جدایه‌های دیگر BYMV برآورد شده است. جدایه BYMV-S بیشترین شباهت را در این زمینه نشان می‌دهد. پروتئین پوششی علاوه بر نقش اصلی خود که پوشش‌دار شدن آر آن ای ویروسی می‌باشد، در ویروس‌های جنس پوتی‌ویروس در انتقال با شته نیز نقش مهمی دارد. موتیف گردایش که بین

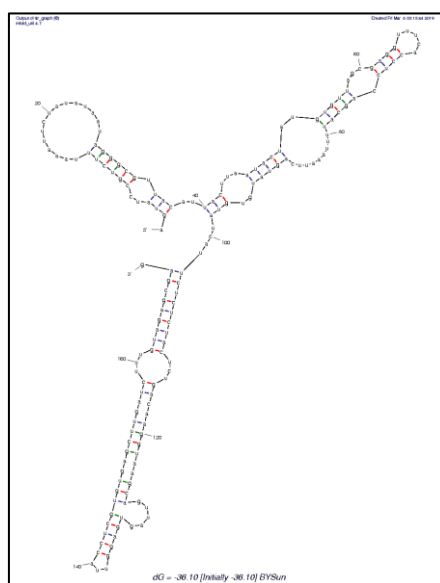
اساس ساختار ثانویه این ناحیه از ژنوم جدایه‌های مختلف BYMV صورت گرفت، ۳۲ جدایه در نه گروه مختلف (از A تا I) تقسیم‌بندی گردیدند. هفت گروه از این گروه‌های ساختاری جدایه‌هایی که از میزبان‌های مشخص جداسازی شده‌اند، هستند. این امر نقش این قسمت از ژنوم در اختصاصیت میزبانی جدایه‌های BYMV را آشکار می‌کند. بر اساس معیارهای گروه‌بندی یاد شده، جدایه BYSun به‌همراه تعداد زیادی از جدایه‌های گروه فیلوژنتیک broadbean (به غیر از MB4) در تیپ C قرار می‌گیرد.

توانایی سازگاری با میزبان که در پژوهش‌های قبلی مشخص شده است (Zhou *et al.*, 2006)، ویژگی‌های این ناحیه از ژنوم با استفاده از برنامه MFOLD بررسی گردید. ساختار ثانویه ناحیه 3'-UTR در این ویروس دارای هشت ساقه و انرژی آزاد معادل $-17/3$ kcal/mol می‌باشد (شکل ۴). مقایسه ساختار این ناحیه ترجمه نشدنی از جدایه BYSun با تعداد زیادی از ویروس‌های تیره *Potyviridae* نشان دهنده پایداری مناسب آن‌ان ای این ویروس در نواحی مذکور می‌باشد. در گروه‌بندی ارائه‌شده توسط Parrella & Lanave (2009) که بر

جدول ۵. درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی (nt) و اسیدآمینه‌ای (aa) نواحی مختلف ژنوم جدایه BYSun با قسمت‌های متناظر در جدایه‌های BYMV

Table 5. Percentage of similarity of nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences of different parts of BYSun genome compared to corresponding parts in selected BYMV isolates

	5' UTR		P1		HC-Pro		P3		6K1		CI		6K2		VPg		NIa		NIb		CP		3' UTR
	nt	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	
AB079887	94	93	90	83	91	92	90	90	98	88	96	90	94	81	87	88	98	84	93	92	93	95	
AB439729	95	95	93	95	98	92	91	90	100	89	97	90	94	81	86	88	98	85	93	85	92	95	
AB439730	60	74	70	85	93	92	93	89	98	89	97	89	92	81	87	88	98	85	93	84	92	95	
D83749	69	74	70	81	92	93	92	90	100	89	96	91	94	81	86	88	98	85	93	85	92	95	
AY192568	70	74	70	85	93	92	91	87	94	89	97	89	90	80	84	87	96	85	93	83	92	93	
AB373203	59	60	57	76	86	72	90	84	98	78	93	80	90	76	82	79	89	77	90	82	89	91	
DQ641248	53	68	62	80	89	74	90	79	94	78	92	84	90	75	83	83	97	79	90	86	93	95	
AB439731	48	70	69	80	92	80	90	84	92	81	94	83	94	80	89	86	97	82	92	86	96	97	
HG970867	49	69	69	80	92	79	90	82	92	81	94	83	96	80	90	86	98	81	92	87	98	95	
HG970866	81	82	81	88	97	86	90	79	96	80	94	80	98	85	94	91	99	87	96	91	96	96	
HG970868	77	82	81	88	97	86	90	79	96	80	94	80	98	86	95	91	100	87	96	90	95	94	
U47033	96	97	96	98	100	99	100	98	100	98	100	100	100	98	100	98	100	99	99	97	98	97	
HG970848	-	73	70	84	94	83	90	90	100	86	96	81	98	85	95	91	99	87	96	90	93	96	
FJ492961	68	73	71	80	92	82	90	89	100	87	96	80	92	81	87	86	97	82	92	85	92	94	
HG970860	64	73	71	80	91	83	92	90	100	87	97	80	92	81	87	86	98	82	93	85	91	95	
HG970847	61	73	69	80	91	83	91	89	96	88	97	84	98	82	86	86	98	82	93	84	92	-	
HG970853	66	73	70	80	91	83	92	89	96	88	97	84	98	82	86	86	98	82	93	85	91	-	
HG970858	65	73	70	80	91	83	93	90	98	88	97	84	98	88	97	94	100	86	95	84	91	94	
JX156423	63	73	71	80	92	84	92	89	98	88	97	84	98	87	96	94	100	86	95	84	92	95	
KF632713	64	73	70	80	91	83	93	90	100	88	98	84	98	87	95	94	99	86	95	85	92		
HG970869	63	72	68	80	91	82	91	90	98	88	97	81	94	83	88	86	98	82	93	84	92	95	
JX173278	64	72	70	80	91	83	92	88	92	88	97	84	98	83	87	88	98	82	93	84	92	95	



شکل ۴. ساختار ثانویه آر ان ای در ناحیه 3'-UTR جدایه BYSun -

Figure 4. Secondary structure predictions of 3'-UTR sequences of BYSun

بررسی نوترکیبی‌های احتمالی

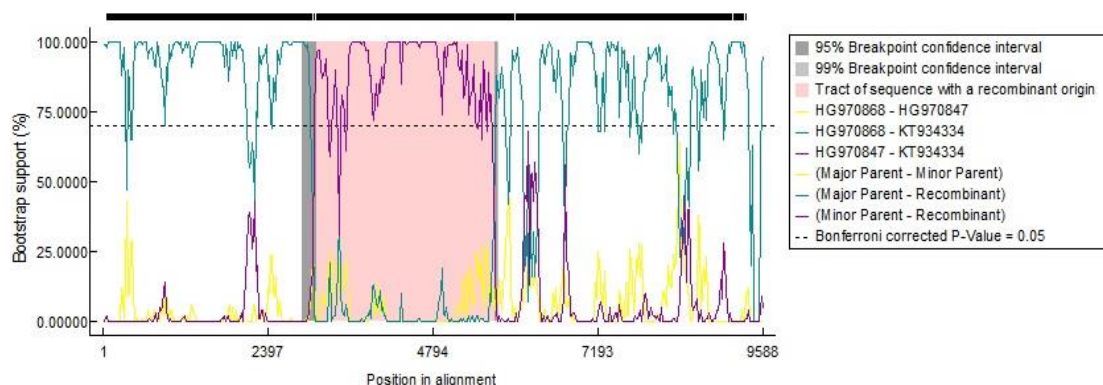
نوترکیبی از پدیده‌های رایج در چرخه تکثیر ویروس‌ها می‌باشد. نوترکیبی در پوتی‌ویروس‌ها به‌ویژه ویروس وای سیب‌زمینی به‌دفعات گزارش شده است. این پدیده معمولاً در بین جدایه‌های یک‌گونه پوتی‌ویروسی باعث جابجایی قطعات ژنومی می‌شود. وقوع این پدیده در بین جنس‌های مختلف به‌ندرت گزارش شده است. در مطالعه حاضر هر ۲۳ جدایه برای بررسی نوترکیبی بررسی شدند. نتایج نشان داد که بر اساس معیارهای استاندارد جدایه BYSun دارای نوترکیبی در ژنوم خود می‌باشد. همچنین ده جدایه دیگر مورد بررسی شامل SW9، MD5، ES55C، IbG، G1، Gla، GDD، MB4، SW3.2 و BYMV-S نیز جدایه‌هایی نوترکیب هستند (جدول ۶). بر اساس این نتایج دو جدایه MD1 و LPexFB به‌ترتیب به عنوان والد اصلی و والد فرعی جدایه BYSun شناخته می‌شوند. این نوترکیبی از نوکلئوتید ۳۰۷۹ شروع و در نوکلئوتید ۵۶۷۰ خاتمه یافته (شکل ۵)، که پروتئین‌های P3 تا 6K2 را شامل می‌شود. همچنین نوترکیبی مشابهی در جدایه BYMV-S که از نظر تبارزایی به جدایه ایرانی BYSun بسیار نزدیک می‌باشد، یافت شد. جدایه BYMV-S از مزارع باقلای استرالیا جدا شده است و یک جدایه غیرمعمول (atypical) در بین سایر جدایه‌های BYMV است. این جدایه که از لحاظ بیماری‌زایی در زیرگروه پاتوتیپ II جدایه‌های BYMV قرار می‌گیرد (Sasaya *et al.*, 1997)، از نظر دامنه میزبانی (عدم توانایی آلوده‌سازی لوبیا) و نوع علائم با

سایر جدایه‌های باقلای BYMV متفاوت است (Hammond & Hammond, 2003). با توجه به اینکه جدایه BYSun (مانند BYMV-S) بر خلاف اکثر جدایه‌های BYMV قادر به ایجاد آلودگی سیستمیک در لوبیا نیست، برخی محققان تبادل ژنی مصنوعی در قسمت کمتر حفاظت یافته P3 را برای اثبات نقش آن در دامنه میزبانی این گروه از پوتی‌ویروس‌ها پیشنهاد نموده‌اند (Hammond & Hammond, 2003). ناحیه P3 نقش مهمی در همانندسازی ویروس دارد. این ناحیه به‌همراه 6K1 در ایجاد علائم، حرکت سیستمیک و تخصص میزبانی تأثیر زیادی دارد. همان‌گونه که در بررسی‌های نوترکیبی نشان داده شد، ناحیه وقوع نوترکیبی در جدایه BYSun در بازه‌ای بین پروتئین‌های P3 تا 6K2 قرار داشته که انطباق زیادی با ژن‌های مرتبط در بیماری‌زایی دارند. این واقعیت تأییدی بر نتایج حاصل از مطالعه ساختار ثانویه ناحیه 3'-UTR جدایه BYSun می‌باشد که تفاوت دامنه میزبانی این جدایه را با بسیاری از جدایه‌های BYMV توجیه می‌کند.

جدول ۶. بررسی وقوع نوترکیبی در ژنوم کامل جدایه

Table 6. Recombination events in complete genomes of BYSun

Detection Method	No. of recombination events found	P-Value
RDP	1	4.43×10^{-27}
3Seq	1	8.76×10^{-7}
BootScan	1	6.73×10^{-26}
MaxChi	1	3.098×10^{-19}
Chimaera	1	8.308×10^{-10}
SiScan	1	1.529×10^{-16}



شکل ۵. الگوی نوترکیبی جدایه BYSun و سایر جدایه‌های BYMV

Figure 5. Recombination patterns between BYSun and other BYMV isolates

تجزیه و تحلیل تبارزایی و تاکسونومیک BYSun

ترادف تمام طول ژنوم جدایه BYSun کمترین و بیشترین میزان شباهت نوکلئوتیدی با جدایه‌های BYMV را به ترتیب معادل ۷۵ و ۹۸ درصد دارا است (جدول ۷). در سطح اسیدآمینه‌ای نیز، پلی‌پروتئین جدایه BYSun بیشترین شباهت را با جدایه BYMV-S به میزان ۹۹ درصد نشان داد. این در حالی است که از نظر ترادف کامل اسیدآمینه‌ای پلی‌پروتئین، با جدایه‌های LP، GLA و LPexFB شباهت ۹۴ درصدی را نشان می‌دهد. در مورد سایر جدایه‌ها این میزان از ۹۳-۸۵ درصد متغیر است (جدول ۷).

هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های جدایه مورد بررسی با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد که این جدایه رابطه نزدیک و قابل توجهی با جدایه BYMV-S در سطوح آمینواسیدی و نوکلئوتیدی به ترتیب معادل ۹۹ و ۹۸ درصدی دارد. همچنین این دو جدایه از شباهت کامل برای پروتئین‌های HC-Pro، P3، CI، NIa و VPg برخوردار هستند. در مورد سایر پروتئین‌ها نیز این شباهت از ۹۶-۹۹ درصد متغیر است. جدایه‌های BYSun و BYMV-S از نظر ترادف نوکلئوتیدی قسمت‌های مختلف ژنوم دارای شباهتی

معادل با ۹۸،۹۷ و ۹۹ درصد به ترتیب برای CP و P1، HC-Pro، CI، NIa و VPg و P3 و NIb می‌باشند. میزان شباهت نواحی مختلف ویروس با دیگر جدایه‌های BYMV بسته به نوع پروتئین و نوع جدایه متغیر بود. بیشترین میزان شباهت در پروتئین‌های NIa و CI و کمترین میزان شباهت برای P1 و VPg مشاهده شد.

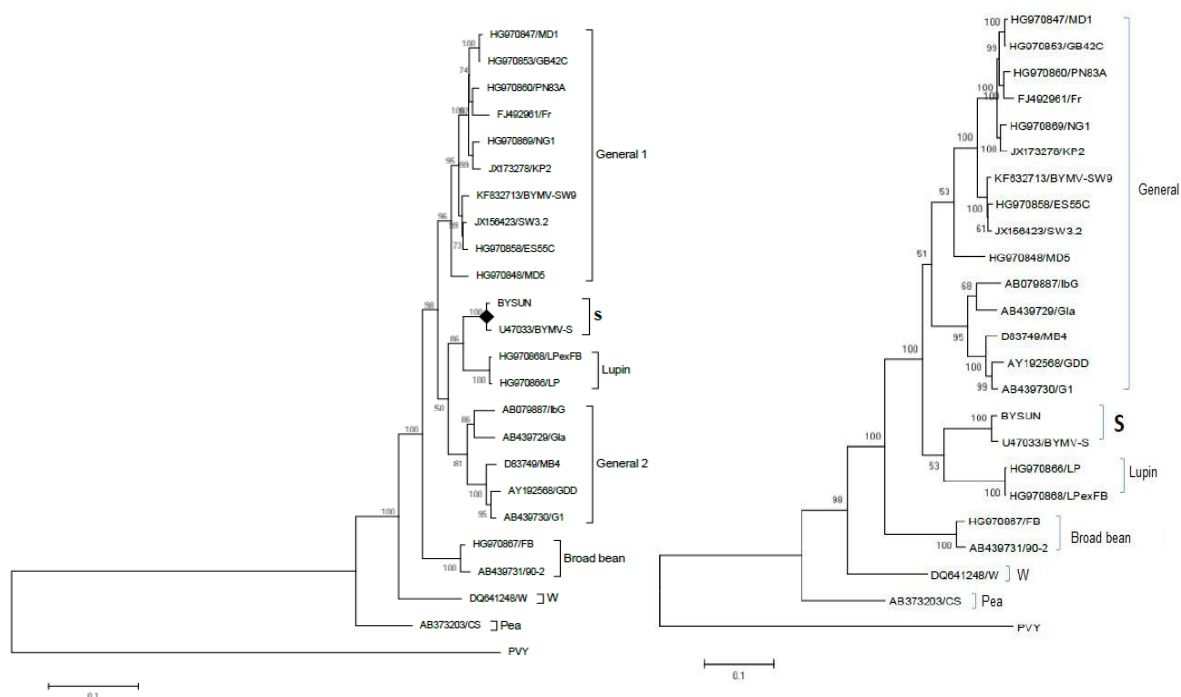
درخت تبارزایی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی تمام طول ژنوم و اسیدآمینه‌ای پلی‌پروتئین جدایه BYSun با سایر جدایه‌های BYMV در شکل ۶ نمایش داده شده است. در این بررسی که ترادف کامل ژنوم ۲۳ جدایه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است، هفت و شش گروه تباری به ترتیب برای ترادف‌های اسیدآمینه‌ای و نوکلئوتیدی قابل شناسایی است. هرچند میزبان طبیعی جدایه‌ها نقش زیادی در این گروه‌بندی ایفا می‌کند، دامنه آن در زیرگروه‌های مختلف متفاوت است. در درخت رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی تمام طول ژنوم، شاخه General از ۱۵ جدایه آلوده‌کننده گونه‌های گیاهی تک لپه و دو لپه از تیره‌های Fabaceae، Orchidaceae و Iridaceae تشکیل می‌شود.

جدول ۷. درصد شباهت نوکلئوتیدی ژنوم تمام طول (بالای خط مورب) و اسیدآمینه‌ای پلی‌پروتئین (پایین خط مورب) جدایه

ویروسی BYSun با تعدادی از جدایه‌های BYMV

Table 7. Similarity percentage of full-length genome (nucleotides, upper the diagonal line) and polypeptide (amino acids, lower the diagonal line) sequences of BYSun and comparing to selected BYMV isolates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1 AB079887/IbG	*	94	92	92	92	75	78	80	81	88	88	84	83	87	87	87	88	87	87	87	87	87	87
2 AB439729/Gla	94	*	93	93	93	76	78	80	80	89	90	84	84	86	86	86	86	86	86	85	86	86	86
3 AB439730/G1	94	94	*	97	97	76	79	81	81	86	86	83	82	86	87	87	87	87	87	87	87	87	87
4 AY192568/GDD	94	94	98	*	96	76	78	81	81	85	85	82	82	86	87	87	87	87	87	87	87	87	87
5 D83749/MB4	84	95	98	97	*	76	78	81	81	85	85	82	82	86	87	87	88	87	87	87	87	87	87
6 AB373203/CS	87	85	85	85	85	*	76	76	76	75	76	76	76	77	76	77	77	76	76	76	76	76	76
7 DQ641248/W	90	86	88	87	87	84	*	79	79	78	78	78	78	80	79	79	79	79	80	79	79	79	80
8 AB439731/90-2	90	89	90	90	90	85	87	*	98	80	80	81	81	82	82	82	82	82	82	81	82	82	82
9 HG970867/FB	93	89	91	90	90	85	88	98	*	80	80	81	81	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82
10 BYSUN	93	94	92	92	91	85	87	90	91	*	98	86	86	85	84	84	84	82	83	82	82	82	83
11 U47033/S	92	94	92	91	91	85	87	90	90	99	*	85	85	85	84	84	84	82	83	82	82	83	83
12 HG970866/LP	92	92	91	91	91	85	88	91	91	94	94	*	100	91	83	83	83	81	82	81	81	81	82
13 HG970868/LPexFB	92	92	91	91	91	85	88	91	91	94	94	100	*	91	83	83	83	81	81	81	81	81	81
14 HG970848/MD5	93	92	92	92	92	86	88	91	92	93	93	95	95	*	91	91	92	90	90	90	90	90	90
15 HG970858/ES55C	93	92	93	93	93	86	88	91	91	92	92	92	92	96	*	99	99	94	94	94	94	94	95
16 KF632713/SW9	93	92	94	93	93	86	88	91	91	92	93	92	92	97	99	*	99	94	94	94	95	94	95
17 JX156423/SW3.2	92	92	93	93	93	86	88	91	91	92	92	92	92	96	99	99	*	94	94	94	95	94	95
18 FJ492961/Fr	92	92	93	92	92	85	88	90	91	91	91	91	91	94	96	96	96	*	98	97	97	97	97
19 HG970860/PN83A	92	92	93	93	93	86	88	91	91	92	92	91	91	96	97	97	97	97	*	98	98	97	97
20 HG970847/MD1	92	92	93	93	93	86	88	91	91	91	91	91	91	95	97	97	96	97	98	*	100	97	97
21 HG970853/GB42C	92	92	93	93	93	86	88	91	91	91	91	91	91	95	97	97	96	97	98	100	*	98	98
22 HG970869/NG1	92	92	93	93	93	86	88	91	91	91	91	91	91	96	97	97	97	97	98	98	98	*	98
23 JX173278/KP2	92	92	93	92	93	86	88	91	91	91	91	91	91	95	97	97	96	97	97	97	97	98	*



شکل ۶. موقعیت BYSun در درخت تبارزایی ترسیم شده به روش Maximum Likelihood بر اساس مقایسه ترادف کامل نوکلئوتیدی (راست) و اسید آمینه‌ای پلی پروتئین (چپ) ژنوم در مقایسه با سایر جدایه‌های BYMV. ویروس PVY به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است.

Figure 6. Phylogenetic trees constructed using the maximum-likelihood method using complete nucleotide (right) and polyprotein amino acid (left) sequences of BYSun genome. PVY is considered as outgroup sequence.

مطالعات پس از آن از این شاخه کاملاً مجزا شد (Parrella & Lanave, 2009; Kaur *et al.*, 2018). برای بسیاری از درخت‌های تبارزایی دیگر ترسیم شده بر اساس ترادف‌هایی از ژنوم (به‌ویژه پروتئین پوششی)، گروه‌بندی‌های مشابهی بر اساس منشأ میزبانی حاصل شده است (اطلاعات منتشر نشده). با این تفاوت که در برخی از این درخت‌ها گروه‌های یاد شده در یکدیگر ادغام شده و در برخی دیگر مانند آنچه در مورد ترادف نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین پوششی وجود دارد، علاوه بر افزایش تعداد جدایه‌ها در هر زیرگروه، شاخه‌های جدیدی مانند Monocot (شامل جدایه‌های آلوده‌کننده تیره‌های تک‌لپه‌ای Orchidaceae و Iridaceae) و Canna (شامل جدایه‌های آلوده‌کننده گیاه اختر) نیز شکل می‌گیرند. نکته قابل توجه در همه این بررسی‌ها این است که دو جدایه BYSun و S در تمام درخت‌های تبارزایی رسم شده، در همسایگی جدایه‌های دو زیر گروه Monocot و Lupin ولی در شاخه‌ای کاملاً مجزا از آنها قرار می‌گیرند.

براساس توالی اسیدآمینه‌ای این گروه به زیرگروه 1 General و 2 General تقسیم می‌شود. جدایه‌های گلابول جمع‌آوری شده از نقاط مختلف جهان از گروه 1 Genera تفکیک شده و شاخه 2 General را تشکیل می‌دهند. در زیر گروه broad bean جدایه‌هایی جای دارند که از باقلا جدا شده‌اند. جدایه‌هایی که از لوبیای مصری (*Lupinus spp.*) جدا شده‌اند نیز در گروه Lupin جای دارند. تنها جدایه زیر گروه W نیز از گونه *Lupinus albus* از امریکا جدا شده است. در زیرگروه Pea یک جدایه قابل شناسایی بود که از نخودفرنگی جدا شده است. آخرین زیرگروه هر یک از این درخت‌های تبارزایی بر اساس ترادف‌های اسیدآمینه‌ای و نوکلئوتیدی مربوط به شاخه‌ای است که دو جدایه BYSun و S را در بر گرفته و در این تحقیق تحت عنوان شاخه S نامگذاری گردید. جدایه S که از مزارع باقلای استرالیا جداسازی شده است در برخی بررسی‌های پیشین در زیر گروه Broad bean جای داده می‌شد (Wylie et al., 2008)، اما در

باشد. فرضیه محتمل دیگر ورود مستقیم جدایه BYSun از طریق بذر آفتابگردان به ایران است. وجود قابلیت بذربردی در جدایه BYMV-S (به عنوان نزدیک‌ترین جدایه به BYSun) در برخی ارقام باقلا مشخص شده است (Sasaya et al., 1997).

نتیجه‌گیری کلی

در پژوهش حاضر خصوصیات مولکولی جدایه‌ای از ویروس موزائیک زرد لوبیا تحت عنوان BYSun مورد بررسی قرار گرفت. تعیین ترادف کامل ژنوم BYSun به منظور تعیین موقعیت تاکسونومیکی این ویروس مشخص کرد که BYSun یک عضو مشخص از پوتی‌ویروس *Bean yellow mosaic virus* می‌باشد. ژنوم جدایه BYSun دارای ۹۵۴۷ نوکلئوتید بدون در نظر گرفتن دنباله پلی‌A می‌باشد. آنالیز توالی‌ها نشان داد که این ویروس دارای یک چهارچوب خوانش (ORF) بلند به طول ۹۱۶۸ نوکلئوتید می‌باشد که پلی‌پروتئینی به طول ۳۰۵۶ آمینواسید را کد می‌کند بر اساس هم ردیف سازی ترادف آمینو اسیدی و همچنین بر پایه موقعیت احتمالی نه جایگاه برش، به وسیله سه پروتئاز P1، HC-Pro و NIa-Pro به ده پروتئین کوچک‌تر شکسته می‌شود. مجموع بررسی‌های فیلوژنتیکی انجام شده بر اساس ترادف آمینواسیدی و نوکلئوتیدی ژنوم جدایه BYSun، نشانگر نزدیکی و شباهت زیاد آن با جدایه BYMV-S می‌باشد، به‌صورتی که در همه درخت‌های فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس ترادف آمینواسیدی و نوکلئوتیدی نواحی مختلف ژنوم، این دو جدایه در کنار یکدیگر در یک شاخه مجزا از دیگر جدایه‌های BYMV قرار می‌گیرند. جدایه BYSun اولین جدایه از ویروس موزائیک زرد لوبیا است که در ایران به صورت کامل تعیین ترادف شده است.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان انجام گرفته است. نویسندگان از معاونت پژوهشی این دانشگاه به خاطر تامین هزینه‌های این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

به‌نظر می‌رسد که در گروه‌بندی‌های شکل گرفته در درخت‌های تبارزایی مختلف ویروس BYMV، گستره جغرافیای جدایه‌ها نقش زیادی ایفا نمی‌کند. به‌عبارت دیگر جدایی جغرافیایی با شاخه‌بندی تبارزایی همخوانی زیادی ندارد. این وضعیت را می‌توان با احتمال انتشار میزبان با غده (در مورد میزبان‌هایی مثل گلابول که تکثیر رویشی دارند) و بذر (در حبوبات) توجیه کرد.

امکان اظهارنظر قطعی درباره منشأ میزبانی یا جغرافیایی جدایه BYSun به دلیل کمبود برخی اطلاعات وجود ندارد. بر اساس عقیده Wylie & Jones (2009) به نظر می‌رسد در میان جدایه‌های BYMV، گروه General به‌عنوان جد گروه Broad bean عمل نموده و دو گروه یاد شده به‌عنوان جد مشترک دو گروه *monocot* و *Lupin* شناخته می‌شوند. جایگاه دو جدایه زیر شاخه S (BYSun و S) تا حدود زیادی مشابه جدایه‌های دو زیر گروه *Monocot* و *Lupin* است و در همسایگی آنها قرار می‌گیرد. از طرف دیگر با توجه به اینکه شاخه S در بررسی‌های نوترکیبی نیز مانند جدایه‌های دو شاخه *Monocot* و *Lupin* دارای والدهای شناخته شده‌ای از دو گروه General و Broad bean هستند، نظریه Wylie & Jones (2009) در مورد این شاخه هم قابل تعمیم می‌باشد.

به دلیل عدم دسترسی به ژنوم کامل جدایه‌های ایرانی ویروس BYMV، تعیین رابطه تبارزایی جدایه BYSun با این جدایه‌ها بر اساس خصوصیات ژنومی غیر ممکن می‌باشد. به بیان دیگر، این موضوع که تغییرات نوترکیبی جدایه BYSun از جدایه‌های والد ایرانی کسب شده یا منشأ نوترکیبی آن را باید از میان جدایه‌های استرالیایی MD1 و LPexFB جستجو کرد، چندان قابل اثبات نیست. از نقطه‌نظر منشأ میزبانی نیز ابهام‌های زیادی وجود دارد. یکی از فرضیه‌ها در این زمینه این است که جدایه BYSun پس از ورود احتمالی به ایران، در باقلا به صورت بومی در آمده است و با توجه به راندمان انتقال بالای آن توسط شته از این طریق به مزارع آفتابگردان گسترش یافته است. ردیابی و شناسایی این جدایه در مزارع باقلای ایران می‌تواند کمک زیادی در اثبات این نظریه

REFERENCES

1. Adams, M.J., Antoniwi, J.F. & Beaudoin, F. (2005). Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Molecular Plant Pathology*, 6, 471-487.
2. Chen, J., Chen, J. & Adams, M.J. (2001). A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology*, 146, 757-766.
3. Chang, C., Hiebert, E. & Purcifull, D. E. (1988). Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by *bean yellow mosaic* and *clover yellow vein potyviruses*. *Phytopathology*, 78(10), 1266-1275.
4. Chu, P., Anderson, B., Khan, M., Shukla, D. & Higgins, T. (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.
5. Chung, B. Y. W., Miller, W. A., Atkins, J. F. & Firth, A. E. (2008). An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 5897-5902.
6. Clark, M. F. & 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.
7. Dombrovsky, A., Huet, H., Chejanovsky, N. & Raccah, B. (2005). Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. *Archives of Virology*, 150, 287-298.
8. Gallie, D. R. & Walbot, V. (1992). Identification of the motifs within the *Tobacco mosaic virus* 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Research*, 20, 4631-4638.
9. Gal-On, A. (2007). Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 8, 139-150.
10. Goetz, R., Huth, W., Lesemann, D.E. & Maiss, E. (2002). Molecular and serological relationships of *Spartina mottle virus* (SpMV) strains from *Spartina* spec. and from *Cynodon dactylon* to other members of the *Potyviridae*. *Archives of Virology*, 147, 379-391.
11. Guyatt, K. J., Prohl, D. F., Menssen, A. & Davidson, A. D. (1996). The complete nucleotide sequence of bean yellow mosaic potyvirus RNA. *Archives of Virology*, 141(7), 1231-1246.
12. Ha, C., Coombs, S., Revill, P.A., Harding, R.M., Vu, M. & Dale, J. L. (2008). Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of Virology*, 153, 25-36.
13. Hammond, J. & Hammond, R. W. (2003). The complete nucleotide sequence of isolate BYMV-GDD of Bean yellow mosaic virus, and comparison to other potyviruses. *Archives of Virology*, 148(12), 2461-2470.
14. Kaur, C., Raj, R., Srivastava, A., Kumar, S. & Raj, S.K. (2018). Sequence analysis of six full-length bean yellow mosaic virus genomes reveals phylogenetic diversity in India strains, suggesting subdivision of phylogenetic group-IV. *Archives of Virology*, 163, 235-242.
15. Kehoe, M. A., Coutts, B. A., Buirchell, B. J. & Jones, R. A. (2014). Plant virology and next generation sequencing: experiences with a *Potyvirus*. *PLoS ONE*, 9(8), e104580.
16. Parrella, G. & Lanave, C. (2009). Identification of a new pathotype of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) infecting blue passion flower and some evolutionary characteristics of BYMV. *Archives of Virology*, 154, 1689-1694.
17. Rabiee, S. (2013). *Distribution and characterization of most prevalent potyviruses in sunflower fields of Isfahan province*. M.Sc. Thesis in Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran (in Farsi with English abstract).
18. Riechmann, J.L., Lain, S. & Garcia, J.A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, 73, 1-16.
19. Sasaya, T., Shimizu, T., Nozu, Y., Nishiguchi, M., Inouye, N. & Koganezawa, H. (1997). Biological, serological, and molecular variabilities of *clover yellow vein virus*. *Phytopathology*, 87(10), 1014-1019.
20. Shukla, D. D., Ward, C. W. & Brunt, A. A. (1994). *The Potyviridae*. Wallingford, UK, CAB International.
21. Wylie, S., Coutts, B., Jones, M. & Jones, R. (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.
22. Wylie, S. & Jones, R. (2009). Role of recombination in the evolution of host specialization within *Bean yellow mosaic virus*. *Phytopathology*, 99, 512-518.

23. Xu, D. L., Zhou, G. H., Xie, Y. J., Mock, R. & Li, R. (2010). Complete nucleotide sequence and taxonomy of *Sugarcane streak mosaic virus*, member of a novel genus in the family *Potyviridae*. *Virus Genes*, 40, 432-439.
24. Zhou, Y., Mammen, M.P., Klungthong, C., Chinnawirotpisan, P., Vaughn, D.W., Nimmannitya, S., Kalayanaroj, S., Holmes, E.C. & Zhang, C. (2006). Comparative analysis reveals no consistent association between the secondary structure of the 3'-untranslated region of dengue viruses and disease syndrome. *Journal of General Virology*, 87, 2595-2603.