شناسایی و تعیین ویژگی‌های مولکولی ویروس کوتولگی بافت مرده‌ی باقلا، یک نانوویروس جدید در مزارع حبوبات ایران*

مائده لطفی‌پور، کرامت‌اله ایزدپناه و سیدعلی‌اکبر بهجت‌نیا[1]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۲۱)

چکیده

ویروس‌های عامل زردی و کوتولگی حبوبات از جمله نانوویروس‌ها هر ساله سبب کاهش محصول در انواع حبوبات بخصوص باقلا می‌شوند. مهمترین ویروس خسارت‌زای این گروه، ویروس زردی بافت مرده‌ی باقلا (FBNYV) است. بمنظور ردیابی مولکولی نانوویروس‌ها در ایران، از مزارع باقلا و لوبیا بترتیب در استان‌های فارس و خوزستان در سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ نمونه برداری شد. در مورد نمونه‌های انتخابی استخراج دی‌انا، تکثیر ژنوم با آغازگرهای نانوویروس‌ها، همسانه‌سازی و تعیین ترادف انجام شد. چهار قطعه‌ی ژنوم شامل DNA-R، DNA-M، DNA-U1 و DNA-U2 تکثیر و تعیین ترادف شدند. نتایج تعیین ترادف نشان داد که این قطعات مربوط به ویروس کوتولگی بافت مرده‌ی باقلا (Faba bean necrotic stunt virus, FBNSV) می‌باشند. این اولین گزارش از وقوع این ویروس در ایران است. مقایسه ترادف ژنوم قطعات فوق‌الذکر با قطعات مشابه جدایه‌های FBNSV و نانوویروس‌های موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه‌های باقلا و لوبیای FBNSV در ایران بیشترین شباهت را با جدایه‌های این ویروس از کشور آذربایجان دارند. مطالعات تبارزایی نشان داد که FBNSV به FBNYV و Milk vetch dwarf virus (MDV) در مقایسه با Subterranean clover stunt virus نزدیک‌تر می‌باشد. در دندروگرام‌های رسم شده برای قطعات DNA-R و DNA-U2، FBNSV بیشترین نزدیکی را با FBNYV نشان داد، در حالیکه در دندروگرام‌های قطعات DNA-M و DNA-U1، FBNSV به ترتیب به MDV و ویروس برگ زرد باقلا (FBYLV) نزدیک‌تر بود. در تمام موارد جدایه‌های FBNSV از کشورهای آذربایجان، اتیوپی، مراکش و ایران یک گروه مجزا از FBNYV را تشکیل دادند. بنظر می‌رسد FBNSV و FBNYV دو گونه مجزا از نانوویروس‌ها باشند.

کلیدواژه: باقلا، حبوبات، کوتولگی، لوبیا، ویروس زردی بافت مرده‌ی باقلا

---

* بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: behjatni@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Identification and molecular characterization of Faba bean necrotic stunt virus, a new nanovirus in legume fields in Iran*

M. Lotfipour, K. Izadpanah, and S.A.A. Behjatnia[1]**

(Received: 2.7.2016; Accepted: 11.8.2016)

Abstract

Viruses inducing yellowing and stunting syndrome in legumes including nanoviruses cause losses in several species particularly broad bean in Iran. One of the most damaging nanoviruses in legumes is Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV). To detect nanoviruses in infected fields, symptomatic plants including broad bean and common bean were collected from Fars and Khuzestan provinces, respectively, in 2014-2015. DNA was extracted and subjected to PCR, cloning and sequencing using specific nanovirus primers. Four fragments of a nanovirus genome including DNA-R, DNA-M, DNA-U1 and DNA-U2 were amplified and sequenced. The results of sequencing showed that these fragments belong to Faba bean necrotic stunt virus (FBNSV). This is the first report of this virus in Iran. Sequence comparison of aforementioned genomic fragments with corresponding DNA fragments of FBNSV isolates and other nanoviruses for which nucleotide sequence information was available in GenBank indicated that both Iranian isolates of FBNSV are most similar to Azerbaijani isolates of this virus. Phylogenetic analysis showed that FBNSV is closer to FBNYV and Milk vetch dwarf virus (MDV) than to subterranean clover stunt virus. Dendrograms obtained by phylogenetic analyses of DNA-R and DNA-U2 sequences indicated that FBNSV was closest to FBNYV while in those obtained for DNA-M and DNA-U1, FBNSV was closer to MDV and Faba bean yellow leaf virus than to other nanoviruses. For all DNAs characterized in this study, FBNSV isolates from Azerbaijan, Ethiopia, Morocco and Iran formed a separate group distinct from FBNYV isolates. It seems that FBNSV and FBNYV are distinct nanovirus species.

Keywords: broad bean, common bean, Faba bean yellow vein virus, legume, stunting

---

* Part of PhD Thesis of the First Author, College of Agric. Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

** Corresponding author's E-mail: behjatni@shirazu.ac.ir

1. PhD Student, Prof. and Assoc.Prof. of Plant Pathol. College of Agric. Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

مقدمه

نانوویرس‌ها (genus, *Nanovirus*, family, *Nanoviridae*)، اخیرا" به عنوان پاتوژن‌های مهم بر روی حبوبات در غرب آسیا، شمال افریقا و اسپانیا معرفی شده‌اند (Babin *et al.* 2000, Hema *et al.* 2013, Vetten *et al.* 2005). مهمترین ویروس خسارت زای این گروه در حبوبات ویروس زردی بافت مرده‌ی باقلا (Faba bean necrotic yellows virus, FBNYV) است. این ویروس اولین بار از باقلا و در نزدیکی منطقه‌ای به نام Lattakia در سوریه توسط Katul و همکاران در سال ۱۹۸۸ گزارش شد (Katul *et al.* 1993). سپس در طی سال‌های ۱۹۹۲، ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ در مصر بصورت اپیدمی بروز کرد و خسارت ۹۰ درصدی را در مزارع باقلا به وجود آورد و بدین ترتیب به عنوان خسارت زا ترین ویروس روی محصولات لگوم تغذیه‌ای در غرب آسیا و شمال افریقا شناخته شد. FBNYV در تونس نیز در سال ۲۰۰۱ خسارت زیادی را در مزارع حبوبات بوجود آورد (Abraham *et al.* 2012). مطالعات انجام شده در اتیوپی نشان داد که جدایه‌هائی از ویروس وجود دارند که از لحاظ سرولوژیکی و ژنتیکی با FBNYV متفاوت می‌باشند. در نهایت در سال ۲۰۰۹ نانوویروس دیگری بنام ویروس کوتولگی بافت مرده‌ی باقلا (Faba bean necrotic stun virus, FBNSV) از اتیوپی گزارش شد. این گونه به عنوان مخرب‌ترین و فراوان‌ترین ویروس باقلا در این کشور معرفی گردید (Grigoras *et al.* 2009). با انجام آزمایش‌های سرولوژیکی با استفاده از آنتی بادی یک‌همسانه‌ای FBNSV و FBNYV بر روی شمار زیادی از نمونه‌های آلوده باقلا و تعیین توالی ژنوم، پیشنهاد شده این دو ویروس بعنوان دو گونه مجزا از نانوویروس‌ها معرفی شوند (Grigoras *et al.* 2009). علاوه بر این، وجود یک نانوویروس دیگر به نام Faba bean yellow leaf virus (FBYLV) نیز از اتیوپی گزارش شده است (Abraham *et al.* 2012). کوتولگی بافت مرده‌ی باقلا علاوه بر اتیوپی از کشور آذربایجان و مراکش نیز گزارش شده است (Grigoras *et al.* 2014).

FBNYV دارای دامنه میزبانی وسیع است و تا کنون بیش از ۵۰ گونه گیاهی به طور عمده متعلق به خانواده Fabaceae به عنوان میزبان‌های این ویروس شناسایی شده‌اند (Timchenko *et al.* 2006). اما FBNSV دارای دامنه میزبانی محدودتری می‌باشد. هر دو ویروس توسط گونه‌های مختلف شته از جمله *Aphis craccivora* و *Acyrthosiphon pisum* به صورت پایا منتقل می‌شوند و انتقال مکانیکی ندارند. موثرترین ناقل طبیعی آنها *A. craccivora* معرفی شده‌است (Grigoras *et al.* 2009, Kumari *et al.* 2009, Ortiz *et al.* 2006).

ژنوم FBNSV مانند FBNYV از ۸ قطعه دی‌ان‌ای تک‌لای حلقوی تشکیل شده است. اندازه هر قطعه از ۹۲۳ تا ۱۰۲۰ نوکلئوتید متغیر است. هر قطعه دی‌انا بطور جداگانه در پیکره‌های بیست وجهی با قطر ۱۸ تا ۲۰ نانومتر بسته بندی شده و حاوی یک چارچوب خوانش باز بر روی رشته مثبت است که یک پروتئین را رمز گذاری می‌کند. پروتئین‌های شناخته شده شامل پروتئین اصلی همانندسازی (master replication initiator protein, M Rep)، پروتئین پوششی (coat protein, CP)، پروتئین تعدیل کننده چرخه سلول (cell-cycle link protein, Clink)، پروتئین حرکتی (movement protein, MP)، و پروتئین رفت‌وآمد هسته‌ای (Nuclear shuttle protein, NSP) هستند که به ترتیب توسط قطعات DNA-R، DNA-S، DNA-C، DNA-M و DNA-N بیان می‌شوند.

سه قطعه دی‌ان‌ای دیگر بنام‌های U1، U2 و U4 که پروتئین‌هائی با عمل نامشخص بیان می‌کنند در نانوویروس‌ها شناسائی شده اند. قبل از توالی هر چارچوب خوانش یک توالی پروموتر با یک جعبه TATA و بعد از آن یک سیگنال پلی آدنیلاسیون وجود دارد (Aronson *et al.* 2000, Gronenborn 2004, Katul *et al.* 1993, Timchenko *et al.* 2000, Vetten *et al.* 2012).

در ایران اولین بار ماکوک و همکاران (Makkouk *et al.* 2002) ضمن نمونه برداری وسیع از حبوبات چندین استان کشور شامل آذربایجان شرقی و غربی، کرمانشاه، قزوین و کردستان آلودگی طبیعی نخود ایرانی و عدس را به FBNYV گزارش دادند. سپس علوی نژاد و همکاران (Alavinejad *et al.* 2011) وجود این ویروس را در مزارع باقلا، یونجه، لوبیا، عدس و نخود چند استان کشور ردیابی نموده و با تعیین ترادف بخشی از ژن پروتئین پوششی (DNA-S) ویروس نشان دادند که تنوع مولکولی قابل توجهی در این بخش از ژنوم ویروس در بین جدایه‌های ایرانی FBNYV مشاهده نمی‌شود. منظری و همکاران (Manzari *et al.* 2012) برای تعیین خسارت بیماری ناشی از FBNYV در باقلا اقدام به اندازه گیری بیماری به کمک پارامترهای شدت و میزان وقوع پرداختند. در این مطالعه مدل‌های توانی تیلور و نمایی (Madden *et al.* 2007) به عنوان بهترین مدل‌ها بترتیب برای بیان رابطه‌ی میان شدت و میزان وقوع بیماری و رابطه میان عملکرد محصول با شدت بیماری پیشنهاد شد. همچنین نتایج حاصل از بررسی کارایی انتقال FBNYV در باقلا به کمک دو گونه شته ی سیاه باقلا و شته ی سبز نخودفرنگی نشان داده شد که هر دو گونه شته ناقلین کارا در انتقال ویروس هستند اما کارایی شته سیاه باقلا کمی بیشتر از شته‌ی سبز نخود فرنگی بود (Manzari *et al.* 2012).

تا کنون وجود FBNSV از ایران گزارش نشده است. در این مطالعه بررسی مولکولی نمونه‌های جمع آوری شده از مزارع باقلا در استان فارس و لوبیا در استان خوزستان با علائم زردی، پیچیدگی برگ، کوتولگی و نکروز منجر به تکثیر چهار قطعه DNA-R، DNA-M، DNA-U1 و DNA-U2 از FBNSV شد و وجود این گونه از جنس *Nanovirus* را در مزارع حبوبات استان‌های فارس و خوزستان قطعی نمود.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری

در طول سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ از مزارع کشت حبوبات مناطق مختلف استان‌های فارس و خوزستان بازدید به عمل آمد و از گیاهان با علائم زردی، پیچیدگی برگ، کوتولگی و نکروز نمونه برداری صورت گرفت. از برگ‌های انتهایی هر گیاه به مقدار ۲۰۰ میلی گرم بافت برگ برداشت و پس از فرو بردن در ازت مایع در دمای ۷۰°C- نگهداری شد تا در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

استخراج دی ان ا از گیاه، تکثیر و تعیین ترادف قطعاتی از ژنوم ویروس مورد مطالعه

دی‌ان‌ای کل گیاه با استفاده از روش CTAB (Gawel and Jarret 1991) استخراج و در واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) بکار برده شد. به منظور ردیابی ویروس در نمونه‌های دارای علائم از دو دسته آغازگر هر کدام حاوی چهار جفت آغازگر استفاده شد. دسته اول شامل جفت آغازگرهای قطعات ژنوم یک جدایه مصر ویروس زردی بافت مرده‌ی باقلا (جدول ۱) بود که ترادف آنها از مقاله Timchenko *et al.* (2006) بدست آمد. بعد از تعیین توالی

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر قطعات ژنوم ویروس مورد مطالعه

Table 1. Oligonucleotide primers used in PCR for amplification of viral DNAs

Primers (virus)	Primers	Nucleotide position[a]	Annealing Temperature (ºC)	Sequence (5' to 3')
First set (FBNYV)	DNA-R^V	798-828	60	ACGAAGCTTCGAGGAGTATGTTAATTACGG
	DNA-R^C	780-810	60	TCGAAGCTTCGTGGAAAGTCGAAGAGCACT
	DNA-M^V	564-591	52	TCTACCTTAACAAGAACTCCATTCGAA
	DNA-M^C	552-580	52	TTCTTGTTAAGGTAGAAGCAACTCTTCT
	DNA-U1^V	637-664	60	GCTTGAATTCGTTGAAGAGTCTTCTCC
	DNA-U1^C	625-652	60	TCAACGAATTCAGACTTGTGTTCTTCA
	DNA-U2^V	647-677	55	GAAGGCCTGCAGGACTTGTATGATTACGGT
	DNA-U2^C	625-652	55	CAAGTCCTGCAGGCCTTCTGTATTTCTGAC
Second set (FBNSV)	DNA-R^V	629-649	60	TGGGTGTATGGCCCACAAGG
	DNA-R^C	609-633	60	CCCAAATGATTCTTCTTCCATCTC
	DNA-M^V	569-590	52	TTTGAAGCATCGCTTCCTGAG
	DNA-M^C	545-569	52	TGGTGTTCTAGTTAGAGTTGAGGC
	DNA-U1^V	367-388	55	TGTTGGTTGATGAAGCCACTG
	DNA-U1^C	350-372	55	CAACAAGTAATGGACTAACGGC
	DNA-U2^V	488-509	55	CAAGGTTACCCAGTTACGCAC
	DNA-U2^C	545-569	55	TTGGATATGATAGGACTCTTCTTCC

^{V} virion-sense strand primer

C complementary-sense strand primer

a Nucleotide position of Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) DNA-R, DNA-M, DNAU1 and DNA-U2 primers (Timchenko et al. 2006) as in the GenBank database under accession numbers, AJ132180, AJ132182, AJ132181 and AJ132184, respectively, and of Faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) DNA-R, DNA-M, DNAU1 and DNA-U2 primers as in the GenBank database under accession numbers, KX086235, KX086238, KX086236 and KX086237, respectively.

قطعات جدایه ایرانی FBNSV با دستهٔ اول آغازگرها، به منظور تأئید صحت نوکلئوتیدهای محل آغازگرهای جدایهٔ مصر FBNYV در توالی قطعات جدایه ایرانی FBNSV، دستهٔ دوم شامل آغازگرهای اختصاصی این جدایه (جدول ۱) که با نرم افزار Fast PCR در محل‌های دیگری از هر یک از قطعات ژنوم تعبیه شده بود جهت تکثیر و تعیین ترادف مجدد قطعات جدایه ایرانی FBNSV استفاده شد.

واکنش PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل دی‌انای قالب استخراج شده از حدود ۴۰۰ میکروگرم بافت برگ (۱ میکرولیتر)، آغازگرها (هر کدام به غلظت ۴/. میکرومولار)، چهار داکسی‌نوکلئوتید تری‌فسفات هر یک به غلظت ۲۰۰ میکرومولار، ۱/۵ میلی مولار از کلرید منیزیوم ($MgCL_2$)، ۱/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز *Taq* (شرکت سیناژن، ایران) و ۲/۵ میکرولیتر از بافر اختصاصی (10X) انجام گرفت. برنامه PCR شامل یک مرحله ابتدائی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C به منظور واسرشت نمودن دی‌انای و یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای شامل دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال بسته به نوع آغازگرها (جدول ۱) به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بود. پس از آخرین چرخه، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C نگهداری گردید. قطعات تکثیر شده با الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. در هر مورد، قطعه دی‌انای مورد نظر از ژل بریده شد و دی‌انای با استفاده از Qiaquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany) از ژل استخراج و همسانه سازی گردید. برای همسانه‌سازی از Ins T/A clone PCR product cloning kit (Fermentas) استفاده شد و دی‌انای استخراج شده از ژل بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده در داخل ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T قرار داده شد. سپس از هر قطعه ۳ همسانه جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت

Bioneer کشور کره جنوبی ارسال گردید.

آنالیز و مقایسه ترادف‌های نوکلئوتیدی

ترادف‌های به دست آمده از قطعات تکثیری با ترادف‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLAST مقایسه شدند و پس از تأیید صحت آنها، هم ردیف سازی ترادف‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با استفاده از نرم افزارهای DNAMAN (Lynnon Biosoft ،(1998, Version 9.02 ClustalX (Thompson *et al.* ،(1997 MegAlign (DNASTAR) ، MEGA5 و Vector NTI Explorer 11 انجام شد. بدین ترتیب ترادف‌های بدست آمده با یکدیگر و با ترادف جدایه‌های نانوویروس‌های موجود در GenBank مورد مقایسه قرار گرفتند، درصد شباهت آنها تعیین و درخت فیلوژنتیکی مربوطه توسط نرم افزار MEGA5 و روش neighbor-joining رسم و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. علامت اختصاری و رس‌شمار (Accession number) ویروس‌هایی که در مقایسه‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی مورد استفاده واقع شدند در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. مشخصات نانوویروس ها که در مقایسه ترادف ها و آنالیز فیلوژنتیکی دراین مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

Table 2. Characteristics of nanoviruses used in sequence comparisons and phylogenetic analyses in this study

Genome component	Virus	Abbreviation	Host	Country	Acc. number
DNA - R	*Faba bean necrotic stunt virus* [AZ;1]	FBNSV-[AZ;1]	*Phaseolus vulgaris*	Azerbaijan	KC978966.1
	Faba bean necrotic stunt virus [AZ;10]	FBNSV-[AZ;10]	*Lens culinaris*	Azerbaijan	KC978974.1
	Faba bean necrotic stunt virus [ET:Hol]	FBNSV-[ET:Hol]	*Vicia faba*	Ethiopia:Holetta	AJ749894
	Faba bean necrotic stunt virus [IR:Ka]	FBNSV-[IR:Ka]	*Vicia faba*	Iran	KX086235
	Faba bean necrotic stunt virus [IR:Kh]	FBNSV-[IR:Kh]	*Phaseolus vulgaris*	Iran	KX086239
	Faba bean necrotic stunt virus [MOR5]	FBNSV-[MOR5]	*Vicia faba*	Morocco	GQ274033.1
	Faba bean necrotic yellows virus [AZ;12]	FBNYV-[AZ;12]	*Vicia faba*	Azerbaijan	KC979000.1
	Faba bean necrotic yellows virus [EV1-93]	FBNYV-[EV1-93]	*Vicia faba*	Egypt	AJ132180.1
	Faba bean yellow leaf virus [ETH-231]	FBYLV-[ETH-231]	*Vicia faba*	Ethiopia	HE654123.1
	Milk vetch dwarf virus [BA]	MDV-[BA]c	*Dolichos lablab*	Bangladesh	LC010103.1
	Milk vetch dwarf virus [JP]	MDV-[JP]	*Pisum sativum*	Japan	AB027511.1
	Milk vetch dwarf virus [JP]	MDV-[JP]	*Pisum sativum*	Japan	NC_003648.1
	Subterranean clover stunt virus (SCSV7)	SCSV7	*Trifolium subterraneum*	Australia	AJ290434.1
	Banana bunchy top virus [AU]	BBTV-[AU]	*Musa cv. Cavendish*	Australia	NC_003479.1
DNA - M	*Faba bean necrotic stunt virus*-[AZ;10]	FBNSV-[AZ;10]	*Lens culinaris*	Azerbaijan	KC978977
	Faba bean necrotic stunt virus [AZ;12b])	FBNSV-[AZ;12b]	*Lens culinaris*	Azerbaijan	KC978985.1
	Faba bean necrotic stunt virus [ET:Hol]	FBNSV-[ET:Hol]	*Vicia faba*	Ethiopia:Holetta	GU983869.1

Table 2. Continued.

ادامه جدول ۲.

Genome component	Virus	Abbreviation	Host	Country	Acc. number
	Faba bean necrotic stunt virus [ET:Hol]	FBNSV-[ET:Hol]	*Vicia faba*	Ethiopia:Holetta	AJ749896.2
	Faba bean necrotic stunt virus [IR:Ka]	FBNSV-[IR:Ka]	*Vicia faba*	Iran	KX086238
	Faba bean necrotic yellows virus [AZ;12]	FBNYV-[AZ;12]	*Vicia faba*	Azerbaijan	KC979003.1
	Faba bean necrotic yellows virus [EV193]	FBNYV-[EV1-93]	*Vicia faba*	Egypt	AJ132182
	Faba bean yellow leaf virus [ETH-231]	FBYLV-[ETH-231]	*Vicia faba*	Ethiopia	HE654125
	Milk vetch dwarf virus [BA]	MDV-[BA]	*Dolichos lablab*	Bangladesh	LC010101.1
	Milk vetch dwarf virus [JP]	MDV-[JP]	*Pisum sativum*	Japan	AB000927
	Subterranean clover stunt virus (SCSV7)	SCSV7	*Trifolium subterraneum*	Australia	U16730.1
	Banana bunchy top virus [AU]	BBTV-[AU]	*Musa cv. Cavendish*	Australia	NC_003474.1
DNA – U1	*Faba bean necrotic stunt virus* [AJ]	FBNSV-[AJ]	*Vicia faba*	Ethiopia:Holetta	AJ749895
	Faba bean necrotic stunt virus [AZ;12b]	FBNSV-[AZ;12b]	*Lens culinaris*	Azerbaijan	KC978987.1
	Faba bean necrotic stunt virus ([AZ;15])	FBNSV-[AZ;15]	*Vicia sativa*	Azerbaijan	KC978997.1
	Faba bean necrotic stunt virus ([ET:Hol]	FBNSV-[ET:Hol	*Vicia faba*	Ethiopia:Holetta	GU983871.1
	Faba bean necrotic stunt virus [IR:Ka]	FBNSV-[IR:Ka]	*Vicia faba*	Iran	KX086236
	Faba bean necrotic yellows virus [AZ;12]	FBNYV-[AZ;12]	*Vicia faba*	Azerbaijan	KC979005.1
	Faba bean necrotic yellows virus [EV1-93]	FBNYV-[EV1-93]	*Vicia faba*	Egypt	NC_003561.1
	Faba bean yellow leaf virus [ETH-231]	FBYLV-[ETH-231]	*Vicia faba*	Ethiopia	HE654128.1
	Milk vetch dwarf virus [BA]	MDV-[BA]	*Dolichos lablab*	Bangladesh	LC010098.1
	Milk vetch dwarf virus [JP]	MDV-[JP]	*Pisum sativum*	Japan	AB000924
	Cardamom bushy dwarf virus[IN]	CdBDV-[IN]	*Elettaria cardamomum*	India	KF435145
DNA – U2	*Faba bean necrotic stunt virus* [AJ]	FBNSV-[AJ]	*Vicia faba*	Ethiopia:Holetta	AJ749898
	Faba bean necrotic stunt virus [AZ;1],	FBNSV-[AZ;1])	*Phaseolus vulgaris*	Azerbaijan	KC978972.1
	Faba bean necrotic stunt virus [AZ;12],	FBNSV-[AZ;15]	*Lens culinaris*	Azerbaijan	KC978988.1
	Faba bean necrotic stunt virus [IR:Ka],	FBNSV-[IR:Ka]	*Vicia faba*	Iran	KX086237
	Faba bean necrotic stunt virus [MOR],	FBNSV-[MOR]	*Vicia faba*	Morocco	GQ274037.1
	Faba bean necrotic yellows virus [AZ;12],	FBNYV-[AZ;12]	*Vicia faba*	Azerbaijan	KC979006
	Faba bean necrotic yellows virus [EV1-93],	FBNYV-[EV1-93]	*Vicia faba*	Egypt	NC_003564.1
	Faba bean yellow leaf virus [ETH-231]	FBYLV-[ETH-231]	*Vicia faba*	Egypt	HE654129.1
	Milk vetch dwarf virus [JP]	MDV-[JP]	*Pisum sativum*	Japan	NC_003644.1
	Milk vetch dwarf virus [JP]	MDV-[JP]	*Pisum sativum*	Japan	AB000926.1
	Cardamom bushy dwarf virus[IN]	CdBDV-[IN]	*Elettaria cardamomum*	India	KF435146

شکل ۱. علائم زردی، کوتولگی و پیچیدگی برگ در باقلا از یک مزرعه در منطقه قلعه سید از شهرستان کازرون در استان فارس (A) و در لوبیا از یک مزرعه در شهرستان ملاثانی از استان خوزستان (B).

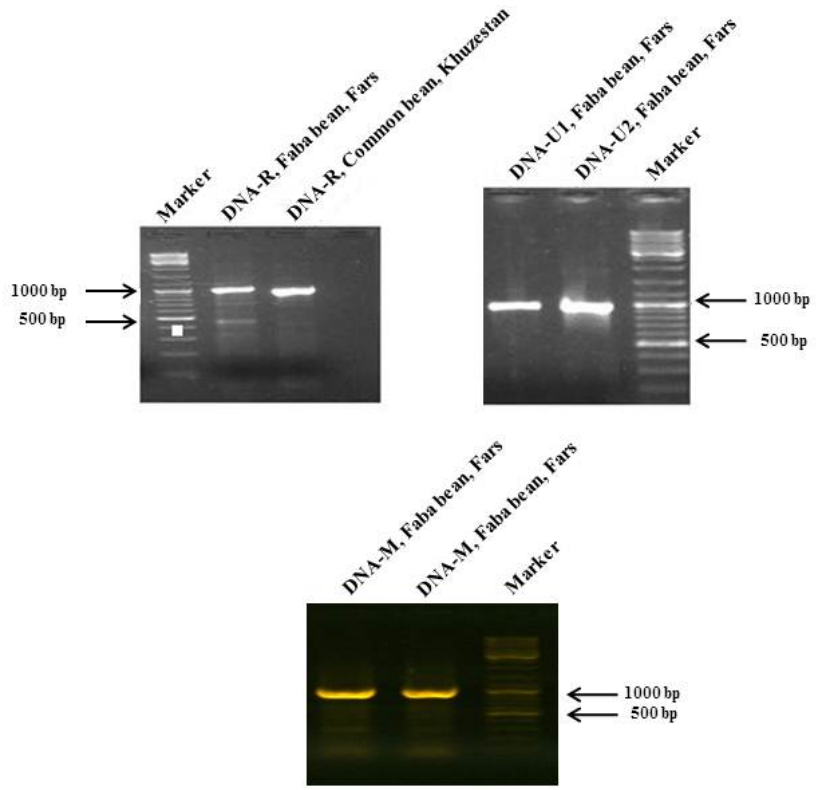
Fig 1. Yellowing, dwarfing and leaf curl symptoms in *Vicia faba* from a field in Ghaleh Seyed region, Kazeroun, Fars Province (A) and in *Phaseolus vulgaris* from a field in Mollasani region, Khuzestan Province (B).

در دندروگرام‌ها برای قطعات DNA-R و DNA-M از ژنوم Banana bunchy top virus (BBTV) و برای قطعات DNA-U1 و DNA-U2 از ژنوم Cardamom bushy dwarf virus (CdBDV) به عنوان عضو خارج از گروه استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی و تعیین ویژگی‌های مولکولی ویروس کوتولگی بافت مرده‌ی باقلا در ایران

در بازدیدهائی که در سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ از مزارع کشت حبوبات مناطق مختلف استان‌های فارس و خوزستان به عمل آمد علائم زردی، کوتولگی و پیچیدگی برگ‌ها در مزارع باقلا و لوبیای استان‌های فارس و خوزستان مشاهده شد. زردی در باقلا نسبت به لوبیا شدیدتر بود (شکل ۱). از این گیاهان نمونه برداری صورت گرفت. دی ان ای کل گیاه استخراج و جهت تشخیص آلودگی به نانوویروس‌ها در واکنش زنجیره ای پلی مراز بکار رفت. با استفاده از جفت آغازگرهای نانوویروس‌ها که هر کدام قطعه ی حدود ۱۰۰۰ جفت بازی را تکثیر می‌کنند قطعات مربوط به DNA-R، DNA-M، DNA-U1 و DNA-U2 از یک نمونه باقلا و قطعه مربوط به DNA-R از یک نمونه لوبیا به ترتیب از منطقه قلعه سید شهرستان کازرون در استان فارس و شهرستان ملاثانی از استان خوزستان که علائم زردی، کوتولگی و پیچیدگی برگ (شکل ۱) را نشان می‌دادند تکثیر شد (شکل ۲). قطعات حاصل همسانه سازی و تعیین ترادف گردیدند. با مقایسه ترادف‌های حاصل با اطلاعات موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه Blast یکسان بودن آنها با قطعات مشابه ویروس کوتولگی بافت مرده ی باقلا (FBNSV) به اثبات رسید. بنابراین FBNSV می‌تواند بعنوان یک عامل بیماری زردی و کوتولگی باقلا و لوبیا در



شکل ۲. نقوشی الکتروفورزی محصول PCR ویروس کوتولگی بافت مرده‌ی باقلا (FBNSV) تکثیر شده با جفت آغازگرهای قطعات DNA-R ، DNA-M، DNA-U1 و DNA-U2. در بالای هر راهک به ترتیب نام قطعه تکثیر شده، نوع میزبان و منطقه نمونه برداری شده نشان داده شده است. نشانگر=DNA ladder mix (Fermentas).

Fig 2. Electrophoresis pattern of PCR products amplified from FBNSV-infected plants from different regions as outlined at the top of each lane using primers for amplification of DNA-R, DNA-M, DNA-U1 or DNA-U2. Marker = DNA ladder mix (Fermentas).

مناطق ذکر شده باشد.

تعیین ترادف قطعات تکثیر شده نشان داد که طول قطعات مربوط به DNA-R، DNA-M، DNA-U1 و DNA-U2 جدایه باقلای استان فارس به ترتیب ۱۰۰۳، ۹۸۳، ۹۸۱ و ۹۸۱ نوکلئوتید و طول قطعه DNA-R مربوط به جدایه لوبیای استان خوزستان، ۱۰۰۳ نوکلئوتید می‌باشد. طبق اصول International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) برای داده‌های نوکلئوتیدی قطعات ژنوم جدایه باقلای ایرانی FBNSV به ترتیب نام‌های FBNSV-[IR:Ka:DNA-R]، FBNSV-[IR:Ka:DNA-M]، FBNSV-[IR:Ka:DNA-U1] و FBNSV-[IR:Ka:DNAU2] انتخاب و به ترتیب تحت رس شمارهای KX086235، KX086238، KX086236 و KX086237 در بانک ژن قرار داده شدند. همچنین نام FBNSV-[IR:Kh:DNA-R] برای قطعه DNA-R ژنوم جدایه لوبیای ایران انتخاب و به شماره KX086239 در بانک ژن ثبت شد. هرکدام از این قطعات حاوی یک چارچوب خوانش و یک ناحیه غیر رمز شونده است که در آن یک ساختار حلقه-ساقه (CR-SL) وجود دارد. در قسمت حلقه این ساختار در تمام قطعات موتیف ۹ نوکلئوتیدی حفاظت شده TAGTATTAC قرار دارد که در کنار ترادف‌های تکراری وارونه که بخش ساقه را

جدول ۳. اندازه و موقعیت نواحی ژنوم جدایه ایرانی ویروس کوتولگی بافت مرده‌ی باقلا

Table 3. Size and position of genomic regions of Iranian isolate of Faba bean necrotic stunt virus DNAs

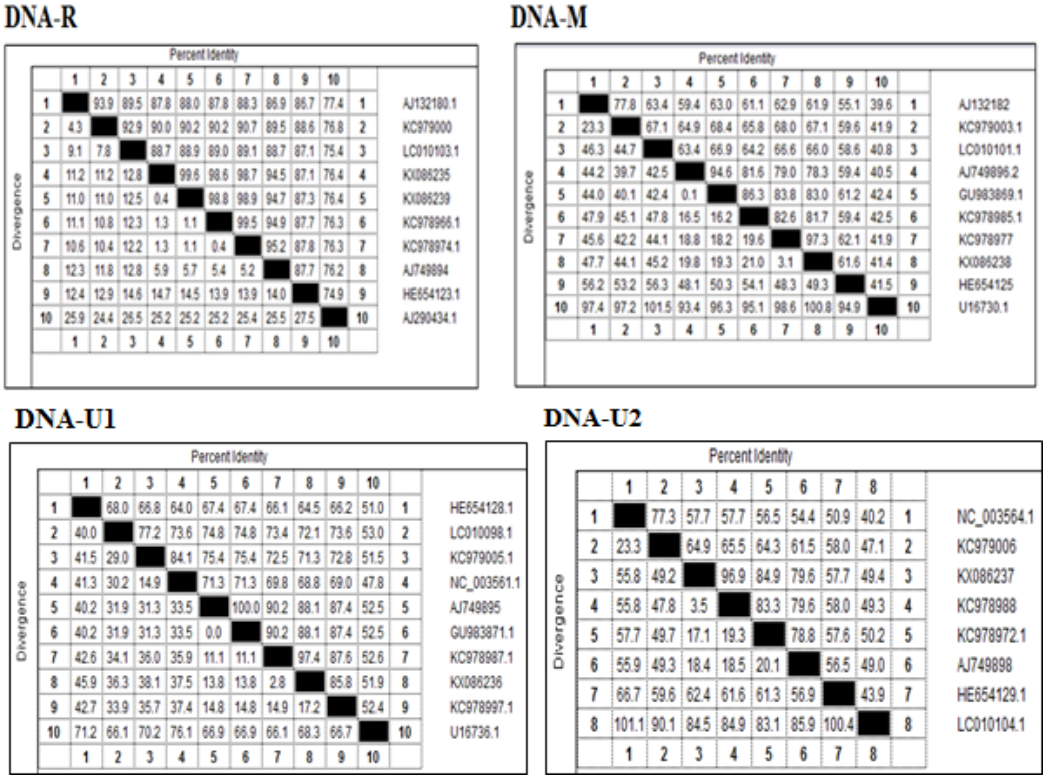
DNA component	Size of DNA (nts)	ORF (protein)	nt position of ORF	Size of ORF (protein)		nt position (start-stop) of CR-SL	nt position of TATA box	nt position of polyA signal	Potential protein function
				nt	aa				
DNA-R	1003	M-Rep	101-961	861	286	(985-1003, 1-12)	55-60	93-99	Master replication initiator protein
DNA-M	983	MP	326-664	339	112	(964-983, 1-13)	260-265	683-688	Movement protein
DNA-U1	981	Unknown	348-782	435	144	(964-981, 1-11)	255-263	778-784	Unknown
DNA-U2	981	Unknown	328-693	366	121	(963-981, 1-12)	260-265	717-721	Unknown

تشکیل میدهند قرار گرفته است. این ساختار حلقه–ساقه بخشی از مبداء همانند سازی (origin of replication, *Ori*) ژنوم ویروس را تشکیل می‌دهد. اندازه و جایگاه چارچوب خوانش و ناحیه غیر رمز شونده در قطعات ژنومی DNA-R، DNA-M، DNA-U1 و DNA-U2 جدایه باقلای ایرانی FBNSV و سایر خصوصیات این قطعات در جدول ۳ نشان داده شده است. در مقایسه با سایر جدایه‌های FBNSV، می‌توان گفت قطعات DNA-R و DNA-M این جدایه به ترتیب پروتئین اصلی شروع کننده همانند سازی (M-Rep) و پروتئین حرکتی ویروس (MP) را رمزگذاری می‌کنند. فرض شده است که DNA-U1 و DNA-U2 پروتئین‌هائی رمزگذاری می‌کنند که نقش آنها هنوز شناسائی نشده است.

موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌های ایرانی ویروس کوتولگی بافت مرده ی باقلا

ترادف قطعات ژنومی DNA-R، DNA-M، DNA-U1 و DNA-U2 با قطعات مشابه جدایه‌های FBNSV از کشورهای دیگر و سایر نانوویروس‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. این مقایسه نشان داد که ژن اصلی شروع کننده همانند سازی جدایه‌های ایرانی باقلا و لوبیای FBNSV بیشترین میزان تشابه را با یک جدایه عدس FBNSV از کشور آذربایجان با رس شمار KC978974.1 بترتیب به‌میزان ۹۸/۷ و ۹۸/۹ درصد از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی و ۹۹/. و ۹۸/۶ از لحاظ ترادف آمینواسیدی دارند. جدایه‌های باقلا و لوبیای ایران در این ژن در سطح نوکلئوتیدی و امینو اسیدی به ترتیب ۹۹/۶ و ۹۹/۷ درصد با یکدیگر شبیه هستند. پروتئین همانندسازی جدایه باقلای ایرانی FBNSV از لحاظ ترادف آمینواسیدی با پروتئین مشابه جدایه‌های مصر و آذربایجان FBNYV به ترتیب ۹۲/۳ و ۹۳/. درصد و با پروتئین مشابه FBYLV، ۸۲/۵ درصد همولوژی نشان می‌دهد (شکل‌های ۳ و ۴).

DNA-M جدایه باقلای ایرانی FBNSV از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی و امینو اسیدی بیشترین میزان تشابه



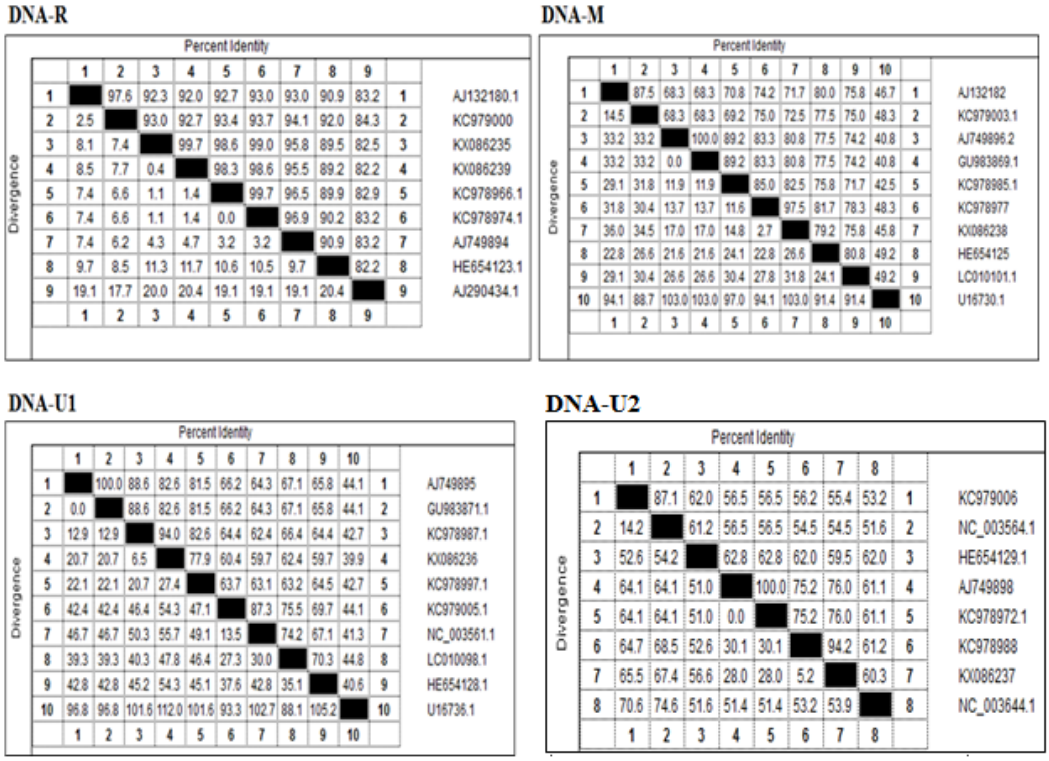
شکل ۳ . درصد تشابه (محور افقی) و واگرایی (محور عمودی) نوکلئوتیدی قطعات DNA-R، DNA-M، DNA-U1 و DNA-U2 نانوویروس های مورد استفاده در این مطالعه. مشخصات رس شمارها در جدول ۲ قید شده است.

Fig 3. Percent nucleotide sequence identity and diversity of genomic DNA-R, DNA-M, DNA-U1 and DNA-U2 of nanoviruses used in this study. See Table 2 for characteristics of each accession number.

(بترتیب ۹۷/۳ و ۹۷/۵ درصد) را با یک جدایه عدس از کشور آذربایجان با رس شمار KC978977 نشان داد. جدایه ایرانی از لحاظ ترادف آمینواسیدی در این ژن با پروتئین‌های حرکتی جدایه‌های مصر و آذربایجان FBNYV بترتیب ۷۱/۷ و ۷۲/۵ درصد و با پروتئین حرکتی FBYLV، ۷۹/۲ درصد شباهت نشان داد (شکل‌های ۳ و ۴).

چارچوب‌های خوانش U1 و U2 جدایه باقلای ایرانی FBNSV بیشترین میزان تشابه را از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (بترتیب ۹۷/۴ و ۹۶/۹ درصد) و از لحاظ ترادف امینو اسیدی (بترتیب ./ ۹۴ و ۹۴/۲ درصد) با یک جدایه عدس از کشور آذربایجان به ترتیب با رس شمارهای KC978987.1 و KC978988 نشان دادند. پروتئین U1 از لحاظ ترادف آمینواسیدی با پروتئین‌های همولوگ جدایه‌های مصر و آذربایجان FBNYV به ترتیب ۵۹/۷ و ۶۰/۴ و با پروتئین همولوگ FBYLV، ۵۹/۷ درصد شبیه بود در حالیکه پروتئین U2 با پروتئین‌های همولوگ جدایه‌های مصر و آذربایجان FBNYV به ترتیب ۵۴/۵ و ۵۵/۴ و با پروتئین همولوگ FBYLV، ۵۹/۵ درصد شبیه بود.

رسم دندروگرام‌های حاصل از مطالعات تبارزایی نشان داد که FBNSV به MDV و FBNYV در مقایسه با SCSV نزدیک تر می‌باشد و SCSV یک زیرگروه مجزا از دیگر نانوویروس‌ها تشکیل داده و کمترین شباهت را با

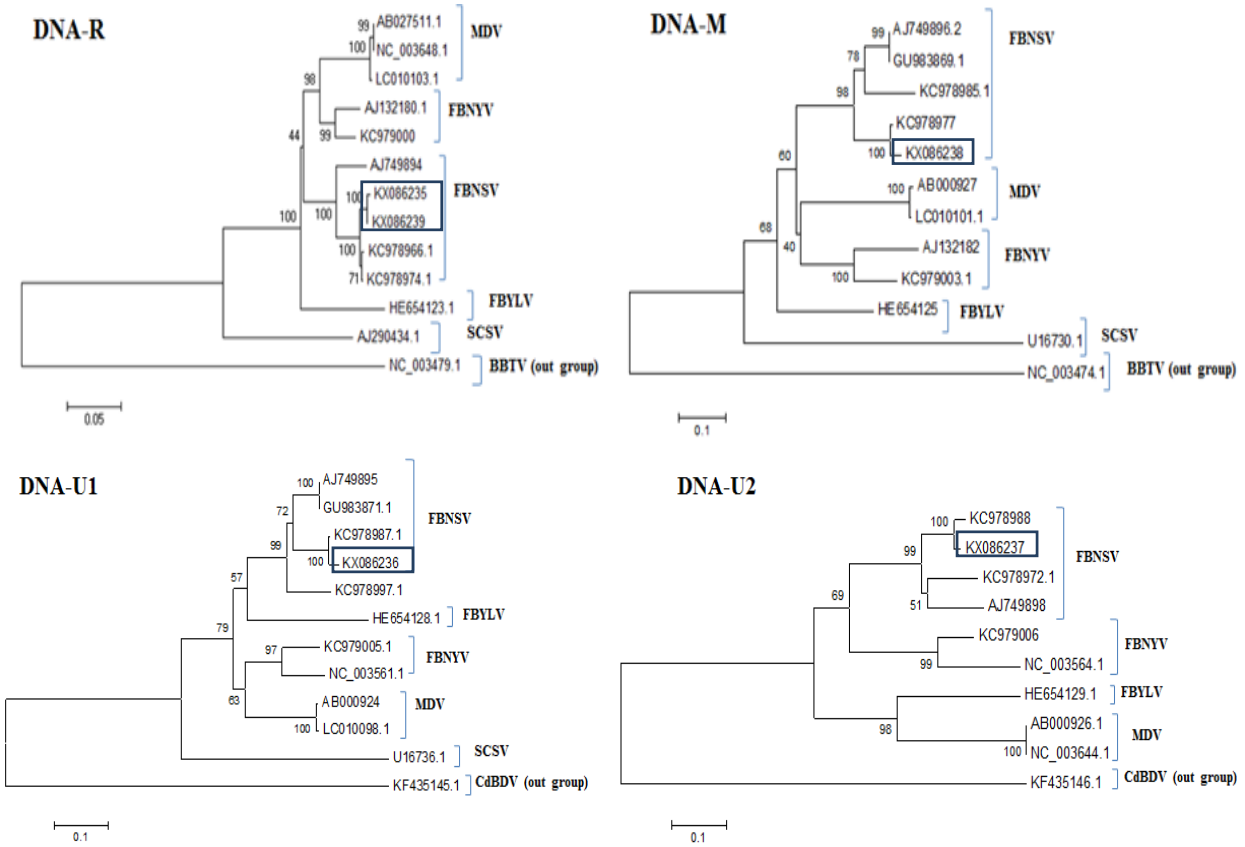


شکل ٤. درصد تشابه (محور افقی) و واگرایی (محور عمودی) امینو اسیدی قطعات DNA-R، DNA-M، DNA-U1 و DNA-U2 نانوویروس های مورد استفاده در این مطالعه. مشخصات رس شمارها در جدول ۲ قید شده است.

Fig 3. Percent amino acid sequence identity and diversity of genomic DNA-R, DNA-M, DNA-U1 and DNA-U2 of nanoviruses used in this study. See Table 2 for characteristics of each accession number.

دیگر اعضای خانواده نشان می‌دهد. در دندروگرام‌های قطعات DNA-R و DNA-U2 ، FBNSV بیشترین نزدیکی را با FBNYV دارد در حالی که در دندروگرام‌های قطعات DNA-M و DNA-U1، FBNSV به ترتیب به MDV و FBYLV نزدیک تر می‌باشد. . این شواهد نشان دهنده این است که FBNSV از FBNYV متمایز می‌باشد و به همین دلیل این ویروس در لیست ICTV به عنوان یک استرین FBNYV محسوب نشده و در لیست اعضای پیشنهادی گونه‌های جدید قرار گرفته است. از طرف دیگر، بررسی و مقایسه ترادف نوکلئوتیدی قطعات DNA-M و DNA-U1 با نانوویروس‌های دیگر نشان می‌دهد که در این قطعات نوترکیبی و موتاسیون بیشتر اتفاق افتاده است (Grigoras *et al.* 2009). همچنین جدایه‌های FBNSV از کشورهای آذربایجان، اتیوپی، مراکش و ایران یک گروه مجزا ازFBNYV را تشکیل داده و در تمام قطعات، جدایه‌های ایران به جدایه‌های آذربایجان نزدیک تر می‌باشد (شکل ۵).

مطالعات در مورد تنوع در خانواده *Nanoviridae* بیشتر در مورد جنس *Babuvirus* انجام شده است (Burns *et al.* 1994, Wanitchakorn *et al.* 2000). در جنس *Nanovirus*، FBNSV تنوع بیشتری نسبت به FBNYV دارد. کمترین تنوع در FBNSV برای پروتئین همانندسازی و پروتئین پوششی و بیشترین تنوع برای پروتئین رفت‌وآمد هسته‌ای گزارش شده است (Abraham *et al.* 2012, Grigoras *et al.* 2010, Grigoras *et al.* 2014). بررسی



شکل ۵. دندروگرام های حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنوم جدایه‌های Faba bean necrotic stunt (FBNSV) با سایر نانوویروس ها با استفاده از نرم افزارMEGA5 و روش neighbor-joining. اعداد کنار شاخه ها درصد ارزش bootstrap در میان ۱۰۰ تکرار را نشان می دهد. برای قطعات DNA-R و DNA-M از Banana bunchy top virus (BBTV) و برای قطعات DNA-U1 و DNA-U2 از Cardamom bushy dwarf virus (CdBDV) بعنوان ویروس‌های خارج از گروه استفاده شد. جدایه های ایرانی FBNSV در کادر مستطیلی مشخص شده اند. مشخصات رس شمارها در جدول ۲ قید شده است.

Figure 5. Phylogenetic tree obtained from the alignment of nucleotide sequences of Faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) isolates and other nanoviruses using MEGA5 program and neighbor-joining method. Numbers on the branches indicate bootstrap percentage. In Phylogenetic analysis of DNA-R and DNA-M, Banana bunchy top virus (BBTV) and for those of DNA-U1 and DNA-U2, Cardamom bushy dwarf virus (CdBDV) were used as out-group members. Iranian isolates of FBYSV are boxed. See Table 2 for characteristics of each accession number.

تنوع ژنتیکی برای FBNSV در اتیوپی نشان داد که این ویروس در پروتئین پوششی خود با FBNYV، ۸۰ تا ۸۴ درصد شبیه می‌باشد و در پروتئین‌هایی که عمل آنها ناشناخته است کمتر از ۷۵ درصد شبیه هستند. یکی از معیارهای تفکیک گونه از نظر ICTV برای نانوویروس‌ها شباهت کمتر از ۷۵ درصد در کل ژنوم گزارش شده است (Vetten *et al.* 2012). اگر چه دو ویروس FBNYV و FBNSV در قطعات DNA-U1 و DNA-U2 کمتر از ۷۵ درصد شبیه هستند اما در کل ژنوم ۷۵ درصد به هم شبیه می‌باشند (Abraham *et al.* 2012, Grigoras *et al.* 2009, Vetten *et al.* 2012)، لذا در گزارش نهم ICTV، FBNSV در فهرست ویروس‌های مرتبط که ممکن است

بعنوان عضو جدید جنس *Nanovirus* در نظر گرفته شوند قرار گرفته است اگرچه هنوز بعنوان یک گونه جدید مورد تایید قرار نگرفته است (Vetten *et al.* 2012). مسلما" تعیین ترادف تمام قطعات ژنوم جدایه‌های بیشتری از FBNSV از جمله جدایه‌های ایرانی این ویروس وضعیت تاکسونومی آن را روشن تر می‌نماید.

تفاوت بین ویروس و استرین در اپیدمیولوژی بسیار مهم می‌باشد، زیرا آنها از لحاظ بیماریزایی، دامنه میزبانی، اختصاصیت ناقل، پراکنش جغرافیایی و بر همکنش با میزبان با یکدیگر متفاوت هستند. از آنجا که یک روش مطمئن برای کنترل بیماری‌های ویروسی استفاده از واریته‌های مقاوم می‌باشد، داشتن اطلاعات در مورد تنوع ویروس‌ها و استرین‌های آنها و واکنش هر یک با میزبان خود در مناطق جغرافیایی مختلف برای انتخاب ژنوتیپ گیاه با صفت مقاومت در برنامه‌های اصلاح نباتات لازم است (Grigoras *et al.* 2014). بنابراین لزوم بررسی تنوع در مورد نانوویروس‌های آلوده کننده حبوبات و اینکه کدام ویروس در مناطق مختلف کشور غالب می‌باشد ضروری بنظر می‌رسد.

منابع

Abraham A. D., Bencharki B., Torok V., Katul L., Varrelmann M. and Vetten H. J. 2010. Two distinct nanovirus species infecting faba bean in Morocco. Archives of Virology 155: 37-46.

Abraham A. D., Varrelmann M. and Vetten H. J. 2012. Three distinct nanoviruses, one of which represents a new species, infect faba bean in Ethiopia. Plant Disease 96: 1045-1053.

Alavinejad E., Behjatnia S. A. A., Izadpanah K. and M. Masoumi 2011. Molecular detection of Faba bean necrotic yellows virus in legume fields of some North, North West and South provinces of Iran. The 7th National Biotechnology Congress of I. R. Iran. 6 pp.

Aronson M. N., Meyer A. D., Györgyey J., Katul L., Vetten H. J., Gronenborn B. and Timchenko T. 2000. Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. Journal of Virology 74: 2967-2972.

Babin M., Ortiz V., Castro S. and Romero J. 2000. First detection of Faba bean necrotic yellows virus in Spain. Plant Disease 84: 707.

Burns T. M., Harding R. M. and Dale J. L. 1994. Evidence that banana bunchy top virus has a multiple component genome. Archives of Virology 137: 371-380.

Gawel N. J. and Jarret R. L. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. Plant Molecular Biology Reporter 9: 262-266.

Grigoras I., del Cueto Ginzo A. I., Martin D. P., Varsani A., Romero J., Mammadov A. C., Huseynova I. M., Aliyev J. A., Kheyr-Pour A., Huss H. and Ziebell H. 2014. Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe. Journal of General Virology 95: 1178-1191.

Grigoras I., Timchenko T., Grande-Pérez A., Katul L., Vetten H. J. and Gronenborn B. 2010. High variability and rapid evolution of a nanovirus. Journal of Virology 84: 9105-9117.

Grigoras I., Timchenko T., Katul L., Grande-Pérez A., Vetten H. J. and Gronenborn B. 2009. Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. Journal of Virology 83: 10778-10787.

Gronenborn B. 2004. Nanoviruses: genome organization and protein function. Veterinary Microbiology 98: 103-109.

Hema M., Sreenivasulu P., Patil B. L., Kumar P. L. and Reddy D. V. 2013. Tropical food legumes: Virus diseases of economic importance and their control. Advances in Virus Research 90: 431-505.

Katul U., Vetten H. J., Maiss E., Makkouk K. M., Lesemann D. E. and Casper R. 1993. Characterization and serology of virus-like particles associated with faba bean necrotic yellows. Annals of Applied Biology 123: 629-647.

Kumari S. G., Attar N., Mustafayev E. and Akparov Z. 2009. First report of Faba bean necrotic yellows virus affecting legume crops in Azerbaijan. Plant Disease 93: 1220.

Makkouk K. M., Fazlali Y., Kumari S. G. and Farzadfar S. 2002. First record of Beet western yellows virus, Chickpea chlorotic dwarf virus, Faba bean necrotic yellows virus and Soybean dwarf virus infecting chickpea and lentil crops in Iran. Plant Pathology 51: 387-387.

Madden L., Hughes G., and Van Den Bosch F. 2007. Study of Plant Disease Epidemics. American Phytopathological Society. 421 pp.

Manzari F., Behjatnia S. A. A., Hamzehzarghani H. Izadpanah K. and Ghorbani A. 2012. Estimation of disease severity of Faba bean necrotic yellows virus based on disease incidence. Proceedings of the 20th Iranian Plant Protection Congress. P 781.

Ortiz V., Navarro E., Castro S., Carazo G. and Romero J. 2006. Incidence and transmission of *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV) in Spain. Spanish Journal of Agricultural Research 4: 255-260.

Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25: 4876-4882.

Timchenko T., Katul L., Aronson M., Vega-Arreguin J. C., Ramirez B. C., Vetten H. J. and Gronenborn B. 2006. Infectivity of nanovirus DNAs: induction of disease by cloned genome components of Faba bean necrotic yellows virus. Journal of General Virology 87: 1735-1743.

Timchenko T., Katul L., Sano Y., de Kouchkovsky F., Vetten H. J. and Gronenborn B. 2000. The master Rep concept in nanovirus replication: identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. Virology 274: 189-195.

Vetten H. J., Chu P. W. G., Dale J. L., Harding R., Hu J., Katul L., Kojima M., Randles J.W., Sano Y. and Thomas J. E. 2005. Family *Nanoviridae*. pp 343–352. In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball (Eds). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Eigth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London.

Vetten H. J., Dale J. L., Grigoras I., Gronenborn B., Harding R., Randles J. W., Sano Y., Thomas J. E., Timchenko T. and Yeh, H. H. 2012. Family *Nanoviridae*. pp. 394-404. In: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz (Eds). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London.

Wanitchakorn R., Harding R. M. and Dale J. L. 2000. Sequence variability in the coat protein gene of two groups of banana bunchy top isolates. Archives of Virology 145: 593-602.