

Received: 13.10.2021 / Accepted: 09.02.2022

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Zróżnicowanie polskich izolatów wirusa żółtej mozaiki fasoli (bean yellow mosaic virus, BYMV) wyizolowanych z roślin bobu

Diversity of the Polish isolates of bean yellow mosaic virus (BYMV) isolated from broad bean

Beata Hasiów-Jaroszewska^{1,A*}, Beata Komorowska^{2,B}

Streszczenie

Wirus żółtej mozaiki fasoli (bean yellow mosaic virus, BYMV) jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych i szkodliwych wirusów roślin strączkowych na świecie. W celu scharakteryzowania izolatów BYMV wykrytych w dziesięciu roślinach bobu w Polsce, wyizolowano całkowite kwasy nukleinowe, zamplikowano metodą RT-PCR fragment genu kodującego poliproteinę, a następnie poddano go sekwencjonowaniu. Sekwencje genu kodującego białka płaszcza (CP) trzech polskich izolatów (E1, E2, E3) porównano z 33 sekwencjami pobranymi z Banku Genów. Sekwencje badanych izolatów wykazały 81,8–99,8% identyczności na poziomie nukleotydów i 84,9–99,6% na poziomie aminokwasów z innymi izolatami BYMV. Analizy przeprowadzone z wykorzystaniem sekwencji CP potwierdziły zróżnicowanie populacji BYMV i obecność trzech grup filogenetycznych. Polskie izolaty zostały zakwalifikowane do grupy I (E1 i E2) oraz III (E3).

Słowa kluczowe: BYMV, bób, RT-PCR, ELISA, filogeneza

Abstract

Bean yellow mosaic virus (BYMV) is one of the most widespread and damaging viruses of cultivated legumes in the world. In order to characterise BYMV isolates detected in ten broad bean plants in Poland, total nucleic acids were isolated, a fragment of the gene encoding the polyprotein was amplified by RT-PCR and then sequenced. The sequences of the coat protein (CP) gene of the three Polish isolates (E1, E2, E3) were compared with 33 sequences retrieved from the GenBank database. The sequences of the tested isolates showed 81.8–99.8% identity at the nucleotide level and 84.9–99.6% at the amino acid level with other BYMV isolates. The analysis performed based on CP sequences confirmed the genetic diversity of the BYMV population and revealed the presence of three phylogenetic groups. The Polish isolates were classified into I (E1 and E2) and III (E3) group.

Key words: BYMV, broad bean, RT-PCR, ELISA, phylogenesis

¹Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

²Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

*corresponding author: b.hasiow@iorpib.poznan.pl

ORCID: ^A0000-0002-8267-023X, ^B0000-0002-0093-3842

Wstęp / Introduction

Bób (*Vicia faba* L.) jest jednym z powszechnie uprawianych warzyw zielonych na świecie. W Polsce uprawiany jest na ograniczoną skalę, głównie w gospodarstwach o małym i średnim areale (do 5 ha). Porażany jest przez różne patogeny roślinne, a wśród nich przez wirusa żółtej mozaiki fasoli (bean yellow mosaic virus, BYMV), należącego do rodzaju *Potyvirus* (rodzina Potyviridae). BYMV występuje na całym świecie i infekuje gatunki należące do kilku rodzin roślin jedno- i dwuliściennych. Jest przenoszony w sposób nietrwały przez kilka gatunków mszyc (Berlandier i wsp. 1997). Chociaż przenoszenie wirusa przez nasiona odbywa się na niskim poziomie, może prowadzić do niezamierzonego wprowadzenia patogenu do nowego zasiewu (McKirdy i wsp. 2000). Patogen powoduje poważne choroby i straty w wielu uprawach roślin strączkowych na całym świecie, a wczesna infekcja skutkuje nekrozą systemową, prowadzącą do śmierci roślin. BYMV wywołuje różnego rodzaju objawy w zależności od gospodarza i szczepu wirusa, które obejmują żółtą mozaikę na zainfekowanych liściach, marszczenie i zniekształcenie liści oraz zahamowanie wzrostu roślin (Jones i McLean 1989; Jones i wsp. 2003). Niektóre z izolatów BYMV powodują także nekrozę pąków, co ostatecznie prowadzi do zamierania roślin (Bos 1970; Sutic i wsp. 1999). Opisano wiele szczepów BYMV, które różnią się właściwościami biologicznymi i genetycznymi (Sasaya i wsp. 1998; Wada i wsp. 2000; Chare i Holmes 2006). W Polsce BYMV został wykryty na roślinach bobu przy użyciu techniki sekwencjonowania o wysokiej przepustowości (Minicka i wsp. 2020).

Genom wirusa stanowi jednoniciowy, sensowny RNA o orientacji dodatniej i długości około 9700 nt. Genom posiada pojedynczą, otwartą ramkę odczytu otoczoną regionami nieulegającymi translacji. Pojedyncza, duża poliproteina jest cięta przez proteazy na co najmniej 10 białek: P1-Pro, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, Vpg, NIa-Pro, NIb RdRp, CP (Riechmann i wsp. 1992; Urcuqui-Inchima i wsp. 2001; Revers i García 2015). Dodatkowo w wyniku zmiany ramki odczytu w cistronie P3 powstaje jedenaste białko P3N-PIPO (Chung i wsp. 2008; Olsper i wsp. 2015; Revers i García 2015). Cząstki wirusów są nitkowate o długości około 750 nm (Lisa i wsp. 1981). Scharakteryzowanie zmienności genetycznej populacji wirusów dostarcza istotnych informacji na temat procesów zaangażowanych w ewolucję wirusa i epidemiologię, a także ma kluczowe znaczenie dla projektowania wiarygodnych narzędzi diagnostycznych oraz opracowywania bardziej skutecznych i trwałych strategii kontroli choroby. Pierwsza kompletna sekwencja nukleotydów genu białka płaszcza (ang. coat protein – CP) dla BYMV została opublikowana w 1989 roku (Hammond i Hammond 1989). Analiza sekwencji CP 24 izolatów wskazała na istnienie czterech odrębnych grup BYMV (Chare i Holmes 2006). Wylie i wsp. (2008) przeprowadzili analizę

filogenetyczną wirusa na podstawie porównania sekwencji genu CP 64 izolatów w odniesieniu do pierwotnych gospodarzy oraz rozmieszczenia geograficznego. Autorzy zaproponowali, że grupa ogólna może reprezentować pierwotną grupę ancestralną, z której po pojawieniu się rolnictwa ewoluowały grupy specjalistyczne na różnych gatunkach roślin udomowionych, w różnych rejonach geograficznych (Lovisolo i wsp. 2003).

W Polsce badania dotyczące BYMV są nieliczne. Celem przeprowadzonych badań była (i) identyfikacja patogenów odpowiedzialnych za objawy infekcji wirusowej na roślinach bobu, (ii) charakterystyka molekularna trzech nowych izolatów BYMV, (iii) analiza zróżnicowania populacji BYMV na podstawie sekwencji CP oraz (iv) określenie relacji filogenetycznych między izolatami.

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał roślinny

W lipcu 2019 roku na polach doświadczalnych bobu należących do Instytutu Ogrodnictwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Skierniewicach prowadzono monitoring pod kątem obecności wirusów. Na 90% roślin obserwowano objawy typowe dla infekcji wirusowych, w tym mozaikę i deformacje liści. Próbkę do identyfikacji wirusów pobrano z 10 roślin z objawami i czterech pozornie zdrowych. Wykonano testy ELISA na obecność wirusów z rodzaju *Potyvirus* (Agdia, Inc., Elkhart, IN) oraz wirusa mozaiki ogórka (cucumber mosaic virus, CMV).

Izolacja RNA i RT-PCR

W celu identyfikacji wykrytego potywirusa, wyizolowano całkowite kwasy nukleinowe z liści bobu metodą adsorpcji na żelu krzemionkowym (Boom i wsp. 1990), a następnie poddano jednoetapowej reakcji odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR). W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję ze starterami NIB2F–NIB3R, uniwersalnymi dla wirusów należących do rodzaju potywirus (Zheng i wsp. 2008). Następnie zastosowano startery specyficzne dla BYMV zaprojektowane w ramach prowadzonych badań (tab. 1). Startery zaprojektowano na podstawie zestawienia sekwencji izolatów BYMV dostępnych w Banku Genów (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), za pomocą programu OligoAnalyze (<https://oligo-analyzer.software.informer.com/1.0/>) i zsyntetyzowano przez firmę zewnętrzną (Genomed, Warszawa, Polska). Reakcje RT-PCR prowadzono za pomocą zestawu odczynników Transcriptor One-Step RT-PCR (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) w końcowej objętości 10 µl. W pierwszym etapie, w celu wybrania odpowiedniej temperatury przyłączania starterów przeprowadzono reakcje RT-PCR dla każdej pary starterów oddzielnie, w termocyklerze gradientowym

Tabela 1. Startery zaprojektowane do wykrywania BYMV metodą RT-PCR**Table 1.** The primers used in RT-PCR for the detection of BYMV

Starter Primer	Sekwencja 5'-3' Sequence 5'-3'	Długość produktu [pz] Product length [bp]
BYMVF1BK	TGGTGTGTGTTGGAAGTTG	1574
BYMVR1BK	GCGACTTCTGAAATGTATGCTGC	
BYMVF2BK	GCAATGATTGAAGCATGGGG	1153
BYMVR2BK	AAAATGCTGGAGGTGAAACC	

Mastercycler ep Gradient (Eppendorf, Hamburg, Niemcy), z zaprogramowanym gradientem temperatur od 45 do 60°C. Reakcje prowadzono w objętości 10 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała 2 µl buforu reakcyjnego, 5,5 µl wody, 0,2 µl mieszaniny enzymów, po 0,4 µl odpowiedniej pary starterów: BYMVF1BK/BYMVR1BK lub BYMVF2BK/BYMVR2BK oraz po 1 µl RNA (500 ng/µl) na każdą próbkę. Profil termiczny reakcji obejmował: odwrotną transkrypcję w 50°C przez 30 min, wstępną denaturację w 95°C przez 3 min, a następnie amplifikację w 35 cyklach obejmujących: denaturację w 94°C przez 30 s, przyłączanie starterów w 52°C przez 30 s i wydłużanie nici w 68°C przez 1 min 30 s oraz wydłużanie końcowe w 68°C przez 7 min. Warunki reakcji dla starterów NIB2F–NIB3R były identyczne z opisanymi w publikacji (Zheng i wsp. 2008). Produkty PCR rozdzielono za pomocą elektroforezy na 1% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydy względem markera wielkości DNA 1 kb Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) i obserwowano w świetle UV za pomocą systemu obrazowania (Bio-Rad documentation system). Zamplifikowane produkty PCR zsekwencjonowano w firmie zewnętrznej (Genomed, Warszawa, Polska).

Analiza filogenetyczna

Do przeprowadzenia analizy filogenetycznej wykorzystano trzy sekwencje genu kodującego białko płaszczka BYMV (822 nt) uzyskane w ramach niniejszej pracy (izolaty E1, E2, E3) oraz 32 inne sekwencje BYMV pobrane z Banku Genów (tab. 2). Izolaty pochodzą z różnych gatunków roślin oraz lokalizacji geograficznych. Sekwencje analizowano i edytowano w programie BioEdit (Hall 1999). Przed przystąpieniem do konstruowania drzew filogenetycznych analizowano występowanie zjawiska rekombinacji w programie RDP4 (Martin i wsp. 2015). Zastosowano algorytmy wykrywania rekombinacji GENCONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan, 3Seq i RDP, a zdarzenia rekombinacji uznawano za istotne statystycznie, jeśli cztery lub więcej metod wykazywało wartość $p < 0,05$. Zestawienia sekwencji dokonano w programie MEGA X (Kumar i wsp. 2018). Drzewo filogenetyczne skonstruowano metodą największej wiarygodności (ML) w programie MEGA X stosując model Tamura-Nei (TN-93+G+I). War-

tości „bootstrap” zostały obliczone przy użyciu 1000 losowych pseudoreplikacji.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Dla wszystkich roślin wykazujących objawy uzyskano wynik pozytywny w teście ELISA na obecność wirusów należących do rodzaju *Potyvirus*. Przy użyciu starterów NIB2F–NIB3R (Zheng i wsp. 2008) zamplifikowano fragmenty cDNA o długości 350 pz, które następnie zsekwencjonowano. Na podstawie porównania odczytanych sekwencji z sekwencjami znajdującymi się w Banku Genów zidentyfikowano BYMV. W żadnej z badanych roślin nie wykryto CMV.

Produkty PCR o oczekiwanej wielkości 1574 pz i 1153 pz zostały uzyskane dla dziesięciu roślin zainfekowanych BYMV (fot. 1, 2). Nie uzyskano produktów amplifikacji z roślin bezobjawowych. Wyniki sekwencjonowania produktów PCR potwierdziły, że 10 roślin wykazujących objawy infekcji wirusowej było porażonych BYMV. Niektóre z uzyskanych sekwencji były identyczne, dlatego sekwencje reprezentatywne trzech izolatów wirusa zdeponowano w Banku Genów pod numerami MN017305–MN017307. Analiza BLASTN sekwencji izolatu E1 wykazała najwyższą identyczność wynoszącą 98,18% z sekwencją izolatu „Salzlandkreis-1_18” z Niemiec (MN399728). Sekwencja izolatu E2 jest w 97,51% identyczna z sekwencją australijskiego izolatu FB (HG970867), natomiast dla sekwencji izolatu E3 stwierdzono 93% identyczność sekwencji nukleotydów z izolatem z Korei Południowej (KJ4000002). Identyczność sekwencji nukleotydów analizowanych sekwencji CP BYMV oszacowana w programie BioEdit wyniosła od 81,8–99,8%, a sekwencji aminokwasów 84,9–99,6%. Analiza zjawiska rekombinacji przeprowadzona na podstawie 35 sekwencji genu CP BYMV wykazała, że izolat BYMV-CB1 jest potencjalnym rekombinantem, a izolat E3 został wskazany jako główny donor. Izolat BYMV-CB1 został usunięty z zestawienia. Analiza filogenetyczna ujawniła obecność trzech grup: I, II i III (rys. 1). Izolaty tworzące grupę I pochodziły z Australii, Japonii, Niemiec, Iraku i Polski (E1, E2). W drugiej grupie znalazły się izolaty z Australii, Japonii, Indii, Rosji i Chin. Trzecia grupa składała się z ośmiu izolatów z Japonii, USA, Indii, Włoch i Polski (E3).

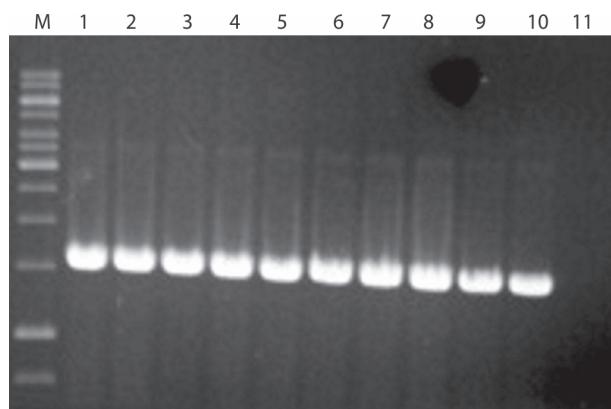
Tabela 2. Analizowane sekwencje genu kodującego białko płaszcza BYMV**Table 2.** The analysed sequences of the BYMV coat protein gene

Gospodarz Host	Izolat Isolate	Numer dostępu Accession number	Pochodzenie geograficzne Geographic origin	Filogrupa Phylogroup
Groch – Pea	Salzlandkreis-1_18	MN399728	Niemcy – Germany	I
Bób – Broad bean	BYMV-Iraq4	JQ025999	Irak – Iraq	I
Bób – Broad bean	E1	MN017305	Polska – Poland	I
Bób – Broad bean	E2	MN017305	Polska – Poland	I
Bób – Broad bean	FBD2	EU082128	Australia	I
Bób – Broad bean	FB	HG970867	Australia	I
Bób – Broad bean	FBI-1	EU082116	Australia	I
Bób – Broad bean	FBI-2	EU082114	Australia	I
Bób – Broad bean	FBI-3	EU082115	Australia	I
Bób – Broad bean	FBD1	EU082117	Australia	I
Bób – Broad bean	FBD3	EU082113	Australia	I
Bób – Broad bean	Sb-12C	AB029440	Japonia – Japan	I
Bób – Broad bean	Sb-50C	AB029437	Japonia – Japan	I
Koniczyna – Clover	90-2	D89545	Japonia – Japan	I
Mieczyk – Gladiolus	V124	AB041970	Japonia – Japan	I
Mieczyk – Gladiolus	BH-8	AB041972	Japonia – Japan	II
Paciorecznik – Canna	AK5	KP177962	Indie – India	II
Paciorecznik – Canna	BYM-Ore	KY595423	Rosja – Russia	II
Paciorecznik – Canna	BYM-Suev	KY595424	Rosja – Russia	II
Paciorecznik – Canna	Csz	EF592169	Chiny – China	II
Łubin – Lupine	LCbk-NN	AF192783	Australia	II
Łubin – Lupine	LngN-NN	EU082121	Australia	II
Łubin – Lupine	LutKP	AF192781	Australia	II
<i>Melilotus indicus</i>	M-I	X81124	Australia	II
<i>Melilotus indicus</i>	MI-NAT	AF434661	Australia	II
<i>Kennedia prostrata</i>	WHPB-1	DQ901435	Australia	II
Bób – Broad bean	LDw-NN	EU082118	Australia	II
Bób – Broad bean	E3	MN017307	Polska – Poland	III
Bób – Broad bean	M-11	AB079886	Japonia – Japan	III
Mieczyk – Gladiolus	S-22N	AB029435	Japonia – Japan	III
Koniczyna – Clover	92-1	AB439732	Japonia – Japan	III
Goryczka – Bitterness	No.4	AB079782	Japonia – Japan	III
Łubin – Lupine	Pullman	EU144223	USA	III
<i>Alpinia galanga</i>	Delhi	KM198742	Indie – India	III
<i>Passiflora caerulea</i>	PAC-1	FM180011	Włochy – Italy	III
<i>Senna bicapsularis</i>	BYMV-CB1	MK516282*	Chiny – China	–

*izolat BYMV-CB1 nie został uwzględniony w analizie filogenetycznej – BYMV-CB1 isolate was not included in the phylogenetic analysis

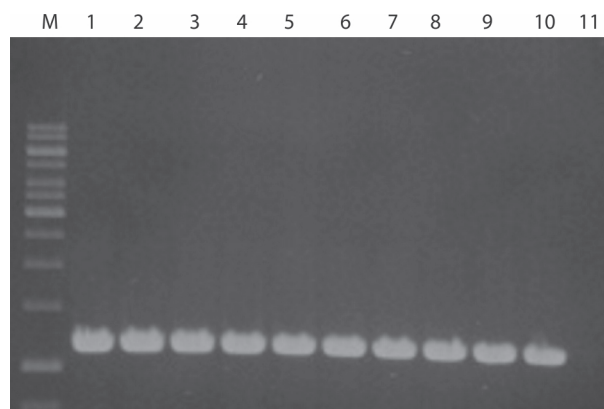
Obecność izolatów z Australii, Japonii i Polski w różnych grupach filogenetycznych wyklucza sformułowanie jednoznacznego stwierdzenia związku między zróżnicowaniem genetycznym a ich pochodzeniem geograficznym. Z kolei podobieństwo sekwencji polskich izolatów do izolatów pochodzących z różnych regionów geograficznych może mieć związek z przenoszeniem wirusa przez nasiona i ro-

snącym obrotem materiałem nasiennym na świecie. Wylie i wsp. (2008) porównali sekwencje CP 64 izolatów BYMV z czterech kontynentów. Analiza filogenetyczna tych sekwencji ujawniła siedem odrębnych grup. Największa i najbardziej zróżnicowana genetycznie grupa nazwana przez autorów „Ogólna” zawiera 25 izolatów wykrytych w ośmiu gatunkach roślin z Azji, Australii, Ameryki Południowej



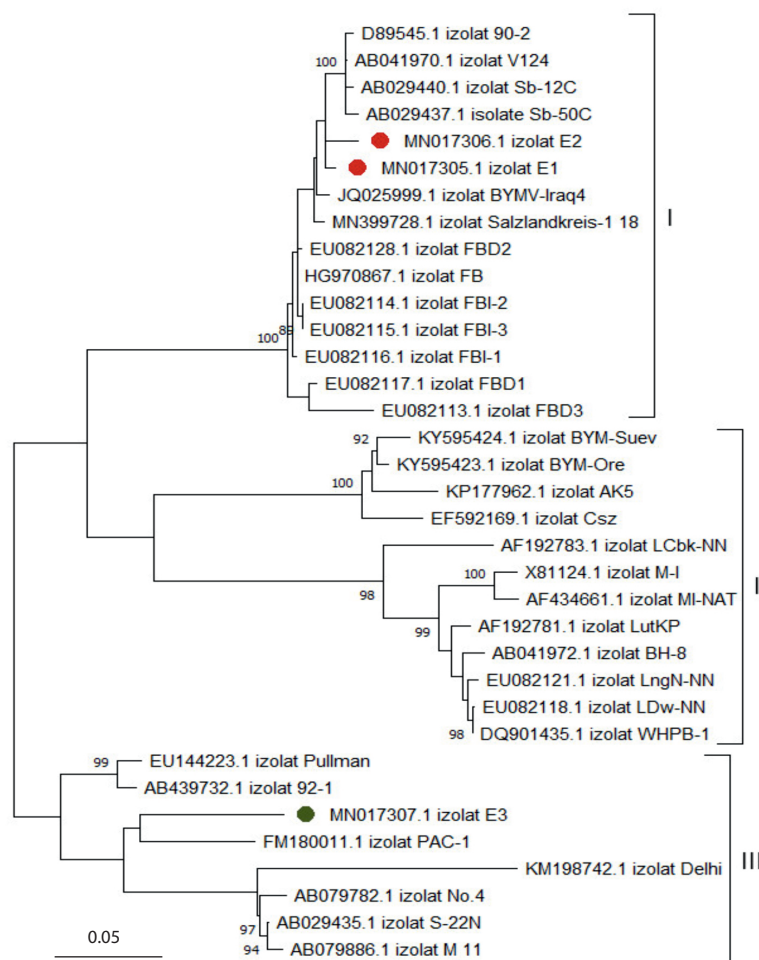
Fot. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RT-PCR uzyskanych ze starterami BYMV F1BK/BYMVR1BK dla izolatów E1, E2, E3. M – marker wielkości (Thermo Scientific 1000 bp Ladder), 1–10 – próbki z roślin porażonych BYMV, 11 – kontrola negatywna

Photo 1. Electrophoretic separation of RT-PCR amplification products with the primers BYMV F1BK/BYMVR1BK for E1, E2, E3 isolates. M – size marker (Thermo Scientific 1000 bp Ladder), 1–10 – samples isolated from BYMV – infected plants, 11 – negative control



Fot. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RT-PCR uzyskanych ze starterami BYMV F2BK/BYMVR2BK dla izolatów E1, E2, E3. M – marker wielkości (Thermo Scientific 1000 bp Ladder), 1–10 – próbki z roślin porażonych BYMV, 11 – kontrola negatywna

Photo 2. Electrophoretic separation of RT-PCR amplification products with the primers BYMV F2BK/BYMVR2BK for E1, E2, E3 isolates. M – size marker (Thermo Scientific 1000 bp Ladder), 1–10 – samples isolated from BYMV – infected plants, 11 – negative control



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne uzyskane na podstawie sekwencji nukleotydów izolatów E1, E2, E3 oraz wybranych izolatów BYMV znajdujących się w Banku Genów

Fig. 1. Phylogenetic tree derived from the nucleotide sequences of isolates E1, E2, E3 and selected BYMV isolates from the GenBank database

i Europy. Cztery kolejne grupy nazwano od gatunku rośliny, z której wyizolowano umieszczone w nich izolaty: „Łubin”, „Bób”, „Paciorecznik” i „Groch”. Do grupy „Jednoliściennne” należą izolaty wykryte w roślinach jednoliściennych, za wyjątkiem izolatów: No. 4, 35-1 i B-33 wyizolowanych z goryczki. W grupie „W” znajduje się tylko jeden izolat znaleziony w łubinie. W przeprowadzonych badaniach grupa I zawierała 15 izolatów BYMV, z których 12 wykryto w bobie, podobnie jak w przypadku grupy „Bób”. Specjalistyczne grupy żywicieli prawdopodobnie powstały tam, gdzie ich główni żywiele zostali po raz pierwszy udomowieni, jednak ze względu na zbyt małą liczbę izolatów, trudno potwierdzić tę hipotezę. W grupie II znajdowało się 12 izolatów znalezionych w różnych gatunkach roślin, podobnie jak w przypadku grupy „Ogólna”. Izolaty należące do tej grupy pochodziły z dzikich i udomowionych żywicieli należących zarówno do roślin jednoliściennych, jak i dwuliściennych. Natomiast w grupie III znalazły się izolaty wykryte zarówno w roślinach jednoliściennych (M11, S-22N, Delhi), jak i dwuliściennych (No. 4, PAC-1, E3, 92-1, Pullman). Prawdopodobnym wyjaśnieniem takiego rozmieszczenia izolatów BYMV jest to, że grupa „Ogólna” reprezentuje pierwotny typ ancestralny, z którego wyewoluowały grupy żywicieli specjalistycznych w odpowiedzi na udomowienie po pojawieniu się rolnictwa.

Wnioski / Conclusions

1. W 10 roślinach bobu, na których obserwowano mozaikę i deformacje liści wykryto wirusa żółtej mozaiki fasoli.
2. Polskie izolaty BYMV należą do trzech grup filogenetycznych. W każdej grupie znajdują się izolaty pochodzące z różnych krajów, co raczej wyklucza związek między zróżnicowaniem genetycznym izolatów a ich pochodzeniem geograficznym.

Finansowanie / Funding

Badania zrealizowane w ramach tematu statutowego 3.2.5 „Monitorowanie, wykrywanie i identyfikacja patogenów w uprawach warzyw i roślin ozdobnych oraz ustalenie potrzeby i terminów ich zwalczania” Instytutu Ogrodnictwa – Państwowego Instytutu Badawczego (2017–2022) oraz częściowo w ramach tematu statutowego WIB 03 „Identyfikacja nowych zagrożeń w uprawach roślin rolniczych oraz opracowanie nowoczesnych technik wykrywania różnych patogenów roślinnych jako efektywnych sposobów ograniczania ich występowania” Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego (2021–2023).

Literatura / References

- Berlandier F.A., Thackray D.J., Jones R.A.C., Latham L.J., Cartwright L. 1997. Determining the relative roles of different aphid species as vectors of cucumber mosaic and bean yellow mosaic viruses in lupins. *Annals of Applied Biology* 131 (2): 297–314. DOI: 1744-7348.1997.tb05158.x
- Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (3): 495–503. DOI: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990
- Bos L. 1970. Bean yellow mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses. No. 40. Association of Applied Biology, Kew, Surrey, England, 4 ss.
- Chare E.R., Holmes E.C. 2006. A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of Virology* 151: 933–946. DOI: 10.1007/s00705-005-0675-x
- Chung B.Y., Miller W.A., Atkins J.F., Firth A.E. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (15): 5897–5902. DOI: 10.1073/pnas.0800468105
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29
- Hammond J., Hammond R.W. 1989. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the bean yellow mosaic virus coat protein gene. *Journal of General Virology* 70: 1961–1974. DOI: 10.1099/0022-1317-70-8-1961
- Jones R.A.C., Coutts B.A., Cheng Y. 2003. Yield limiting potential of necrotic and non-necrotic strains of Bean yellow mosaic virus in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*). *Australian Journal of Agricultural Research* 54 (9): 849–859. DOI: 10.1071/AR03087
- Jones R.A.C., McLean G.D. 1989. Virus diseases of lupins. *Annals of Applied Biology* 114 (3): 609–637. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1989.tb03376.x
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35 (6): 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Lisa V., Boccardo G., D’Agostino G., Dellavalle G., D’Aquilino M. 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. *Phytopathology* 71 (7): 667–672. DOI: 10.1094/Phyto-71-667
- Lovisolo O., Hull R., Rösler O. 2003. Coevolution of viruses with hosts and vectors and possible palaeontology. *Advances in Virus Research* 62: 325–379. DOI: 10.1016/s0065-3527(03)62006-3
- Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1 (1): 1–5. DOI: 10.1093/ve/vev003
- McKirdy S.J., Jones R.A.C., Latham L.J., Coutts B.A. 2000. Bean yellow mosaic potyvirus infection of alternative annual pasture, forage, and cool season crop legumes: susceptibility, sensitivity, and seed transmission. *Australian Journal of Agricultural Research* 51 (3): 325–346. DOI: 10.1071/AR99110

- Minicka J., Zarzyńska-Nowak A., Budzyńska D., Borodynko-Filas N., Hasiów-Jaroszewska B. 2020. High-throughput sequencing facilitates discovery of new plant viruses in Poland. *Plants* 9 (7): 820. DOI: 10.3390/plants9070820
- Olsper A., Chung B.Y.-W., Atkins J.F., Carr J.P., Firth A.E. 2015. Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae. *EMBO Reports* 16 (8): 995–1004. DOI: 10.15252/embr.201540509
- Revers F., García J.A. 2015. Molecular biology of potyviruses. *Advances in Virus Research* 92: 101–199. DOI: 10.1016/bs.aivir.2014.11.006
- Riechmann J.L., Lain S., Garcia J.A. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73: 1–16. DOI: 10.1099/0022-1317-73-1-1
- Sasaya T., Nozu Y., Koganezawa H. 1998. Biological and serological comparisons of bean yellow mosaic virus (BYMV) isolates in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology* 64 (1): 24–33. DOI: 10.3186/jjphytopath.64.24
- Sutic D.D., Ford R.E., Tosic M.T. 1999. *Handbook of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, USA, 584 ss. ISBN 978-08-49323-027.
- Urcuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research* 74 (1–2): 157–175. DOI: 10.1016/s0168-1702(01)00220-9
- Wada Y., Iwai H., Ogawa Y., Arai K. 2000. Comparison of pathogenicity and nucleotide sequences of 3'-terminal regions of Bean yellow mosaic virus isolates from gladiolus. *Journal of General Plant Pathology* 66: 345–352. DOI: 10.1007/PL00012976
- Wylie S.J., Coutts B.A., Jones M.G.K., Jones R.A.C. 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 (12): 1596–1603. DOI: 10.1094/PDIS-92-12-1596
- Zheng L., Wayper P.J., Gibbs A.J., Fourment M., Rodoni B.C., Gibbs M.J. 2008. Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. *PLOS ONE* 3 (2): e1586. DOI: 10.1371/journal.pone.0001586