نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، ص. ۴۵۰-۴۴۵

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 4, Winter 2015, P. 445-450

شناسایی ویروس موزاییک خفیف جو با روش‌های سرولوژی و مولکولی در برخی از استان‌های ایران

سیده عاطفه حسینی[۱*]- بهروز جعفرپور[۲]- عصمت مهدیخانی مقدم[۳]- محسن مهرور[۴]- محمد زکی عقل[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۹/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۰۹

چکیده

ویروس موزاییک خفیف جو متعلق به جنس *Bymovirus* و خانواده *Potyviridae* می باشد. این ویروس توسط قارچ منتقل شده و ژنوم ssRNA دارد و یکی از ویروس های خسارت‌زای غلات می باشد. به منظور شناسایی ویروس موزاییک خفیف جو (BaMMV[6])، در ماه های اسفند و فروردین ۱۳۹۰-۱۳۸۹ از مزارع گندم و جو استان های خراسان رضوی، خراسان شمالی، گلستان، یزد و آذربایجان غربی بازدید و تعداد۴۲۵ نمونه دارای علائم جمع آوری گردید. آلودگی نمونه ها با آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA[7] با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال تعیین شد. در نمونه های جمع آوری شده، استان آذربایجان غربی بیشترین درصد آلودگی را نشان داد. آلودگی در سایر استان ها به جز یزد نیز ردیابی شد. پس از بکار بردن جفت آغازگرهای اختصاصی برای نواحی حفاظت شده از ژن پروتئین پوششی این ویروس، قطعه ای به طول ۳۹۲ جفت باز تکثیر شد. سپس محصول PCR یک جدایه از آذربایجان غربی به منظور بررسی های تکمیلی تعیین توالی گردید. این اولین گزارش از وجود این ویروس در استان های مذکور است.

واژه‌های کلیدی: PCR ، *Barley mild mosaic virus*، ایران، پوشش پروتئینی

مقدمه

ویروس موزاییک خفیف جو، از جنس *Bymovirus* و خانواده *Potyviridae* است. این بیماری اولین بار در سال ۱۹۴۰ در ژاپن مشاهده گردید (۷). علائم موزاییک اولین بار در سال ۱۹۷۸در غرب اروپا گزارش گردید (۶). این ویروس به تنهایی و یا همراه با ویروس موزاییک زرد جو[8] سبب موزاییک خاکزاد در غلات و به خصوص جو پاییزه می‌شود (۲۱). ژنوم ویروس به صورت ssRNA[9] دو بخشی است که هر قسمت دارای یک قاب خوانندی باز (ORF[10]) می‌باشد (۹). هر قاب خواندنی باز یک پلی‌پروتئین بزرگ را کد می‌کند که این پروتئین بزرگ به وسیله پروتئازهای کد شده توسط ویروس به پروتئین‌های وظیفه‌ای شکسته می‌شود. بخش کد کننده پوشش پروتئینی در انتهای ۳´ RNA1 این ویروس واقع شده است. پوشش پروتئینی ویروس‌های خانواده پتی ویریده نقش مهمی در فیلوژنی این ویروس‌ها دارند (۱۳). هر دو ویروس به وسیله قارچ *Polymyxa graminis* که پارازیت اجباری ریشه است منتقل می‌شوند (۱ و ۱۸). ژن‌های دخیل در انتقال این ویروس به وسیله قارچ بر روی RNA2 ویروس واقع شده است (۱۷). قارچ ناقل در خاک به صورت اسپورهای استراحتی تا چندین سال می‌تواند زنده بماند و بنابراین تنها راه کنترل بیماری ناشی از این ویروس استفاده از ارقام مقاوم است (۴ و ۱۱). کولتیوارهایی از جو که دارای ژن rym4 بودند به این ویروس مقاومت نشان دادند (۳، ۱۵ و ۲۲). در مزرعه علائم موزاییک به صورت لکه‌های نامنظم زرد یا سبز می‌باشد. نقاط طولی رنگ پریده بر روی برگ‌های گیاهان آلوده تولید شده و رشد گیاه محدود شود. علائم این بیماری ویروسی دراواخر زمستان و اوایل بهار ظاهرشده و با افزایش دما ناپدید می‌شود (۱۴). پیکره‌های این ویروس خمش پذیر رشته‌ای است و دارای دو طول ۶۰۰-۵۰۰ و۳۰۰-۲۰۰ نانومتر و قطر ۱۳

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
(*-نویسنده مسئول: Email :ahosseini@birjand.ac.ir)
۲، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب استاد، دانشیار و استادیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

6- Barley mild mosaic virus
7-(Double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay)
8- Barley yellow mosaic virus, BYMV
9- Single strand RNA
10- Open Reading Frame

نانومتر می‌باشند (۱۰). تا بـه حـال ایـن ویـروس از روی جـو، گنـدم، یولاف و تریتیکاله جداسازی شده اسـت. ایـن ویـروس از کشـورهای متعددی از جمله فرانسه، ایتالیا، بلژیک، انگلیس، هلنـد، کـره، ژاپـن و چین گزارش شده است. اهمیت مطالعه این ویروس به علت خسـارت بالایی است که در مناطق کشت غلات در دنیا وارد کـرده و آن را بـه یکی از ویروس‌های اقتصادی غلات تبدیل می‌کند. بـه طـوری‌کـه در صورت کشت ارقام حساس جـو، میـزان خسـارت در اروپـا بـین ۴۵-۲۰درصد خواهد بود و در صورتی‌که زمستان سرد تر باشد این خسارت افزایش خواهد یافت (۱۲). تاکنون تـوالی کامـل چنـدین جدایـه ایـن ویروس مشخص گردید، نشان داده شده که پوشـش پروتئینـی نقـش مهمـی در فیلـوژنی و تعـین جایگـاه تکـاملی ویـروس‌هـای جـنس *Bymovirus* دارد (۱۹). مقایسه پوشش پروتئینـی ایـن ویـروس در تحقیقات پیشین نشان داد که جدایه‌های این ویـروس در سـه گـروه مجزا قرار گرفته‌اند. در گروه اول جدایه‌های آلمـان و ژاپـن، در گـروه دوم جدایه‌های انگلیس و فرانسه و در گروه سوم جدایـه‌هـای کـره و یک جدایه از ژاپن قرار گرفت (۵ و ۲۳). هدف از این تحقیق شناسایی و بررسی برخی از خصوصیات مولکولی ایـن ویـروس در اسـتان‌هـای خراسان رضوی، خراسان شـمالی، گلسـتان، آذربایجـان غربـی و یـزد می‌باشد. لازم به ذکر است که تا کنون هیچ بررسی جـامعی در مـورد آن در ایران صورت نگرفته است.

جدول۱- استان‌های نمونه‌برداری شده برای ویروس BaMMV

استان نمونه‌برداری	تعداد نمونه
خراسان رضوی (نیشابور، سبزوار، بردسکن، کاشمر، تربت حیدریه، فریمان)	۲۵۰
خراسان شمالی (بجنورد، شیروان)	۹۰
گلستان (گالیکش، مینودشت، فاضل آباد، آزاد شهر، گرگان)	۶۰
آذربایجان غربی (ارومیه، مهاباد)	۲۵
یزد (تفت، محمد آباد)	۲۵

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و ردیابی ویروس با روش الایزا

در اسفند و فروردین سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ از منـاطق زیرکشـت گندم و جو در استان‌های خراسان رضوی، خراسان شـمالی، گلسـتان، یزد و آذربایجان غربی تعـداد ۴۲۵ نمونـه جمع‌آوری شـد (جـدول۱). نمونه‌ها در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل گردیـد. جهـت بررسـی وجود ویروس در نمونه‌ها آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA به روش کلارک و آدامز با استفاده از آنتی سرم چند همسانه‌ای (اهـدایی دکتـر Kuhne) انجام شد. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفـرات بـا اسـتفاده از دستگاه الایزا خوان و در طول موج 405 نـانومتر مـورد ارزیـابی قـرار گرفتند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم کنتـرل منفـی و بـا استفاده از فرمول 3x آستانه جذب گیاهان سالم تعیین گردیده و ارقام بالاتر از این مقدار به عنوان نمونه آلـوده مشـخص و درصـد آلـودگی مناطق مختلـف تعیـین گردیـد. در ایـن فرمـول 3x میـانگین جـذب شاهدهای منفی است.

نگهداری ویروس

به منظور نگهداری نمونه‌های آلوده، بخشی از نمونه‌ها در حـرارت اتاق خشک گردید و قسمتی از آن در فریزر ۲۵- نگهداری شد.

شناسـایی مولکـولی ویـروس بـا اسـتفاده از واکـنش زنجیره‌ای پلی مراز

نمون هایی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شد بـرای اسـتخراج RNA با استفاده از کیت پرومگا و مطابق با دستورالعمل ذکر شـده در آن، مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت (Promega-USA). غلظـت RNA استخراج شده در نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ توسط دستگاه نانودراپ (Cole parmer- USA) تعیین و بهترین کیفیت RNA استخراج شده بـرای واکنش RT-PCR استفاده شد. برای انجام مرحله سـنتز cDNA[1] در آزمون RT-PCR[2]، ابتدا بایستی RNA ویروسی را تبدیل به cDNA cDNA نمود. این مرحله در یک مخلوط واکـنش ۲۰ میکرولیتـری و با استفاده از کیت Promega و مطابق بـا دسـتورالعمل ذکـر شـده در جدول ۲ انجام شد. بعد از تهیه cDNA واکنش زنجیـره‌ای پلـی‌مـراز انجام شد. در این واکنش از جفت آغازگرهای اختصاصـی مبتنـی بـر ترادف نوکلئوتیدی ژن کدکننده پروتئین پوششی مطابق بـا جـدول ۳، استفاده گردید (Kuhne, Unpublished). آزمون PCR با استفاده از کیـت (AccuPower PCR PreMix Kit, Bioneer- South Korea) در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل یک میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتـر از هریـک از آغازگرهـا بـه غلظـت ۲۰ پیکومـول و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. برنامه دمایی PCR بـه وسـیله دستگاه ترمو سایکلر Biometra (USA) مطابق جدول ۴ انجام شد.

تعیین توالی بخشـی از پوشـش پروتئینـی جدایـه ایرانـی BaMMV

در این مرحله به منظور تایید کامل وجود ویروس در اسـتان‌هـای مذکور و هم‌چنـین بررسـی جایگـاه فیلـوژنی جدایـه ایرانـی در میـان جدایه‌های دنیا، محصول PCR یک جدایه مربوط به آذربایجان غربـی برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال گردید تا بررسی‌هـای تکمیلی بر روی توالی ویروس صورت گیرد.

1- Complementry DNA
2- Reverse transcriptase- Polymerase chain reaction

جدول۲- مواد لازم برای ساختن cDNA در مرحله RT

ماده	مقدار (میکرولیتر)
RNA	۱
Primer(20 picomoles)	۱
DEPC Water	۱۲
5XRT buffer[۱]	۴
DNTPs(10mM)	۲
MMLVEnzyme(200U/ μl)	۰/۲۵
Total	۲۰/۲۵

نتایج و بحث

بررسی میزان آلودگی ویروس

طی نمونه‌برداری‌های انجام شده از مزارع غلات استان‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی، گلستان، یزد و آذربایجان غربی به طور کلی تعداد ۲۴ نمونه از ۴۵۰ نمونه مورد آزمون آلودگی به ویروس BaMMV نشان داد که استان آذربایجان غربی با ۹ نمونه آلوده از بین ۲۵ نمونه بیشترین میزان آلودگی و استان خراسان رضوی با ۴۰ نمونه از میان ۲۵۰ نمونه کمترین میزان آلودگی به این ویروس را نشان داد. استان‌های گلستان و خراسان شمالی نیز آلودگی به این ویروس را نشان دادند و در گیاهان نمونه‌برداری شده استان یزد ویروس ردیابی نشد (جدول ۵). در مورد علت کم بودن پراکنش این ویروس در مزارع غلات به عواملی نظیر روش انتقال آن‌ها و دمای مورد نیاز برای ایجاد آلودگی می‌توان اشاره کرد به نحوی‌که جهت انتقال و تکثیر این ویروس دمای ۱۸-۱۵ درجه سانتی‌گرادی مورد نیاز است (۱۲). بنابراین درصد آلودگی بالا در استان‌هایی نظیر آذربایجان غربی به دلیل وجود دمای مناسب در این استان می‌باشد از طرف دیگر استان یزد نیز احتمالاً به دلیل داشتن دمای بالا در زمان نمونه‌برداری کم‌ترین میزان آلودگی را نشان داد. با توجه به اهمیت گیاه جو و سطح زیر کشت این محصول در ایران شناسایی و بررسی بیماری‌های آن از جمله بیماری‌های ویروسی ضروری به نظر می‌رسد چنان‌چه گزارش از ویروس مذکور در استان‌های خراسان، گلستان و آذربایجان غربی برای اولین باردر ایران می‌باشد

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج RNA با استفاده از کیت Promega انجام شد و بهترین کیفیت RNA استخراج شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کار رفت. آغازگرهای اختصاصی BMMV-CP-F/R قطعات به طول ۳۹۲ جفت باز مربوط به بخشی از پوشش پروتئینی این ویروس تکثیر کرد. این آغازگرها کاملاً اختصاصی بوده و ترادف مشابه‌ای را در گیاه تکثیر نکردند.

جدول ۳ - توالی و موقعیت آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده

آغازگر	جهت	ترادف آغازگر	موقعیت قطعه تکثیری بر روی ژنوم	اندازه تقریبی قطعه (bp)
BMMV-CP-F	رفت	ACGAAGAGATAGTCAACACGA	۵۵۰۸-۵۵۲۸	۳۹۲
BMMV-CP-R	برگشت	GCTCAATGGAGAGAGAGAAAC	۵۸۸۰-۵۹۰۰	

جدول ٤- زمان و دمای لازم برای آزمون PCR با استفاده از آغازگر های اختصاصی

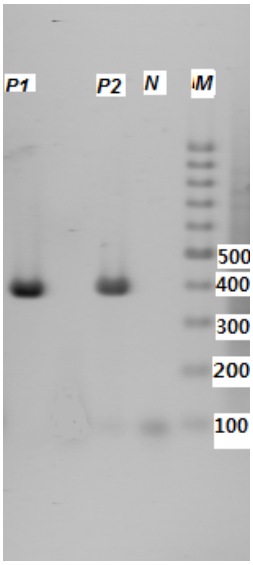
ردیف	مرحله	دما	زمان (بر حسب ثانیه)	تعداد سیکل
۱	واسرشت سازی اولیه	۹۴°C	۱۲۰	۱
۲	واسرشت سازی	۹۴°C	۳۰	
۳	اتصال	۵۳°C	۶۰	۳۵
۴	بسط	۷۲°C	۱۰۰	
	مرحله تکمیل پلیمریزاسیون	۷۲°C	۶۰۰	۱

جدول۵- استان‌های نمونه‌برداری شده به منظور شناسایی ویروس‌ها و میزان آلودگی آن‌ها

ردیف	استان‌های نمونه‌برداری شده	تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده	تعداد نمونه‌های آلوده
۱	خراسان رضوی	۲۵۰	۴۰
۲	خراسان شمالی	۹۰	۴
۳	یزد	۲۵	۰
۴	گلستان	۶۰	۷
۵	آذربایجان غربی	۲۵	۹

عدم تکثیر هیچ قطعه‌ای در شاهد منفی و تکثیر قطعه‌ای با طول مورد نظر در شاهد مثبت تاییدی بر اختصاصی بودن پرایمرها است.

روش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای این ویروس قطعه مورد نظر را نه تنها در نمونه برگ بلکه در ریشه گیاهان آلوده تکثیر کرد. ردیابی این ویروس در ریشه برای مطالعات اپیدمیولوژی این ویروس موثر است زیرا این ویروس با قارچ *P. graminis* در ریشه منتقل می‌شود (۲۰). به علاوه RT-PCR حضور ویروس در برگ‌هایی از جو که هیچ علائمی را نشان نمی‌دادند نیز تایید کرد. دلیل این امر شاید وجود پاتوتایپ‌های جدیدی از این ویروس باشد که در ارقام متحمل ایجاد آلودگی کرده است (۵). در تعداد کمی از نمونه‌های گیاهی دو ویروس BaYMV و BaMMV با هم حضور داشتند.



شکل۱-الکتروفورز محصول PCR ویروس BaMMV بر روی ژل آگار ۱/۷ درصد با استفاده از جفت آغازگرهای BMMV-CP-F/R و مشاهده باند مربوط به ژن پروتئین پوششی. ویروس به ترتیب در محدوده تقریبی ۳۹۰ جفت باز قرار گرفته است. M:مارکر، N: شاهد منفی، P1,2 نمونه‌های مربوط به استان آذربایجان غربی

تعیین توالی بخشی از پوشش پروتئینی ویروس موزاییک خفیف جو

در این تحقیق به منظور مطالعه بخشی از پوشش پروتئینی ویروس و تعیین جایگاه جدایه ایرانی در مقایسه با سایر جدایه‌های دنیا، درخت فیلوژنی مربوط به این ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN رسم گردید و نهایتاً دو گروه فیلوژنی تشکیل گردید. گروه اول دارای دو زیر گروه است که در یکی از آن‌ها جدایه ایرانی ویروس BaMMV همراه با جدایه هایی ازکشور آلمان و ژاپن قرار گرفت و در زیرگروه دیگر جدایه‌های مربوط به کشورهای انگلیس و آمریکا واقع شدند (شکل ۲).

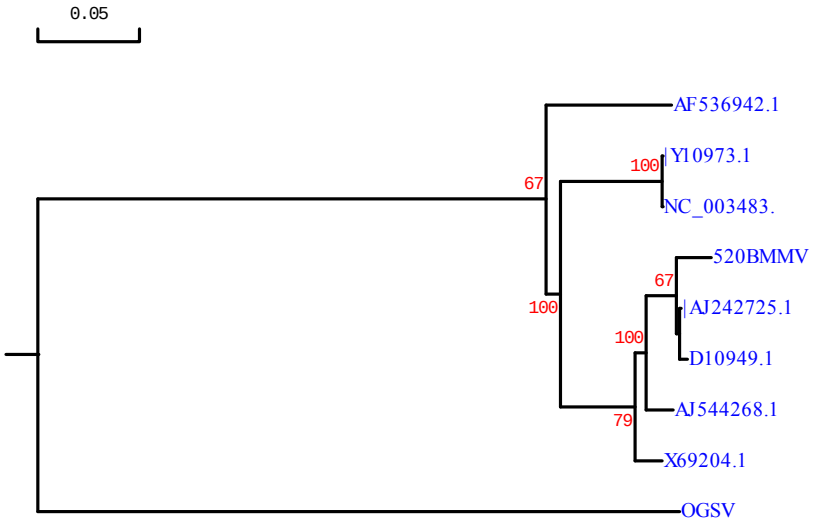
جدول٦- جدایه های مورد بررسی BaMMV مربوط به ناحیه کد کننده CP موجود در بانک ژن جهت مقایسه با جدایه‌های ایرانی

منطقه	شماره توالی
کره	AF536942
انگلیس	Y10973
کانادا	NC-003483
آلمان	AJ24275
ایتالیا	D10949
فرانسه	AJ544268
آلمان	X69204

جدایه مربوط به کشور کره در گروه مجزایی قرار گرفت. ماتریکس تشابه اسید نوکلئیک این جدایه‌ها نشان داد که ایزوله ایرانی بیشترین شباهت (۹۸ درصد) را با توالی پوشش پروتئینی جدایه‌ای ازآلمان (AJ242725) و ژاپن (D10949) و کم‌ترین شباهت را با جدایه AF536942 مربوط به کشور کره به میزان ۸۶/۱ درصد داشت (جدول۷). نتایج به دست آمده تقریباً مشابه با تحقیقات حریری (۵) بود که در این تحقیق جدایه‌های ویروس BaMMV در سه گروه واقع شدند. جدایه‌های آلمان و ژاپن در یک گروه و جدایه‌های کره و فرانسه در دو گروه دیگر قرار گرفتند (۵ و ۲۳). مطالعات شوبر و همکاران (۱۶) نیز نشان دهنده شباهت ۹۹درصد جدایه‌های ژاپنی و آلمانی می‌باشد. بنابراین به دلیل شباهت بالای این دو جدایه از نظر توالی و بیولوژی در یک گروه از استرین‌های BaMMV طبقه‌بندی می‌شوند (۱۶). با توجه به شباهت بالای جدایه ایرانی به این جدایه‌ها در توالی پوشش پروتئینی و اهمیت پوشش پروتئینی در طبقه‌بندی ویروس‌های این جنس احتمال قرار گرفتن جدایه ایرانی در این گروه وجود دارد که البته تعیین دقیق جایگاه جدایه ایرانی نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. در این تحقیق حضور این ویرس برای اولین بار در جدایه‌ای مربوط به آذربایجان غربی به صورت کاملاً قطعی در ایران به اثبات رسید و جایگاه تکاملی آن نیز تا حدودی مشخص گردید.

جدول ۷- ماتریکس تشابه رسم شده برای جدایه ایرانی BaMMV در مقایسه با سایر جدایه‌های دنیا

520BMMV	100%							
Y10973.	87.2%	100%						
X69204.	94.8%	90.2%	100%					
AJ544268	95.4%	89.7%	96.7%	100%				
D10949	97.8%	88.3%	95.9%	96.5%	100%			
AJ242725	97.8%	88.9%	96.5%	97.0%	99.5%	100%		
NC_003483	87.2%	100.0%	90.2%	89.7%	88.3%	88.9%	100%	
AF536942	86.1%	87.5%	88.0%	87.2%	86.7%	87.2%	87.5%	100%



شکل۲- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی. جدایه ایرانی BaMMVبا سایر جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN. جدایه‌ای از OGSV به عنوان Outgroup انتخاب گردیده است. حروف مخفف و کدهای (Accession numbers) مورد استفاده برای ویروس‌ها و جدایه‌های مختلف BaMMV در جدول ذکر گردید.

منابع

1- Adams M.J., and Jacquier C. 1994. Infection of cereals and grasses by isolates of *Polymyxa graminis* (Plasmodiophorales). Annual Applied Biology, 125:53-60.

2- Adams M.J. 2002. The mosaic viruses of winter barley: problemsand prospects. In: Proceedings of the BCPC Conference: Pestsand Diseases, 2002. Farnham, UK: British Crop Protection Council, 105–12.

3- Bauer E., Weyen J., Schiemann A., Graner A., Ordon F. 1997.Molecular mapping of novel resistance genes against *barley mild mosaic virus* (BaMMV). Theoretical and Applied Genetics, 95:1263–9.

4- Hariri D., Meyer M., Le Gouis J., Bahrman N., Fouchard M., Forget C., Andre A. 2000. Characterisation of BaYMV and BaMMV pathotypes in France. European Journal of Plant Pathology, 106: 365–72.

5- Hariri D., Meyer M., Prud'homme H. 2003. Characterization of a new *Barley mild mosaic virus* pathotype in France. European Journal of Plant Pathology, 109: 921–928

6- Huth W. 1989. Ein weiterer Stamm des *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) gefunden. Nachrichtenblatt des DeutschenPflanzenschutzdienstes, 41: 6–7.

7- Inouye T. and Saito Y. 1975. Barley yellow mosaic virus.CMI/AAB Description of Plant Viruses, 143.

8- Kashiwazaki S., Ogawa K., Usugi T., Omura T and Tsuchizaki T. 1989 Characterization of several strains of *Barley yellow mosaic virus*. Annals of Phytopathological Society of Japan, 55: 16–25.

9-Kashiwazaki S., and Hibino H. 1996. Genomic reassortmentof barley mild mosaic virus: Evidence for the involvementof RNA1 in pathogenicity. Journal of General Virology, 77: 581–585.

10- Kashiwazaki S. 1996. The complete nucleotide sequence and genome organization of barley mild mosaic virus (Na1 strain). Archives of virology, 141: 2077–2089.

11- Kanyuka K., Ward E., Adams M.J. 2003. *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research

challenge. Molecular Plant Pathology, 4: 393–406.
12- Kühne, T. 2009. Soil-borne viruses affecting cereals—Known for long but still a threat. Virus Research, 141:174–183.
13- Lee K.J., Kashiwazaki S., Hibi T., and So I.Y. 1996. Properties andcapsid protein gene sequence of a korean isolate of *Barley mild mosaic virus*. Annals of Phytopathological Society of Japan, 62:397–401.
14- Nomura K., Kashiwazaki S., Hibino H., Inoue T., Nakata E., Tsuzaki Y., Okuyama S. 1996. Biological and serological properties of two strains of *Barley mild mosaic virus*. Journal Phytopathol, 144: 103–107.
15- Okada Y., Kashiwazaki S., Kanatani R., Arai S., Ito K. 2003.Effects of *Barley yellow mosaic* disease resistant gene rym1on the infection by strains of Barley yellow mosaic virus and Barley mild mosaic virus. Theoretical and Applied Genetics, 106: 181–9.
16- Subr Z., Fomitcheva V.W., Kühne T. 2000. The complete sequence of RNA1 of the German isolate BaMMV-ASL1 and preparation of an antiserum specific to the nonstructural protein P3. Journal of Phytopathol, 148: 461–467.
17- Timpe U., Kühne T. 1994. The complete nucleotide sequence of RNA 2 of *Barley mild mosaic virus* (BaMMV). European Journal of Plant Pathology, 100: 233–242.
18- Usugi T. 1988. Epidemiology and management in Japan of *Soil-borne cereal mosaic viruses* with filamentous particles. In: Cooper JI, Asher MJC, eds. Developments in AppliedBiology II. Viruses with Fungal Vectors. Wellesbourne,UK: Association of Applied Biologists: 213–25.
19- Urcuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. 2001. *Potyvirus* proteins: a wealth of functions. Virus Research 74: 157-175.
20- Vaianopoulos C. 2008. Widespread occurance of *Soil-born mosaic viruses* in Belgium. In plant pathology, vol. Ph.D, pp.212. UCL, Louvain-la-Neuve, Belgium.
21- Vaianopoulos C., Legreve A., Moreau V., Steyer S., Maraite H., Bragard C. 2005..Occurrence of bymo- and *furoviruses* on wheat in Belgium. Parasitica, 6:47–53.
22- Werner K., Friedt W., Ordon F. 2000. Strategies for ‘pyramiding’resistance genes against the *Barley yellow mosaic virus* complex based on molecular markers and Dh-lines. In: Logue S,ed. Proceedings of the Eighth International Barley GeneticsSymposium, 2000. Adelaide, Australia: University of Adelaide, 200–2.
23- Zheng T., Cheng Y., Chen J.P., Antoniw J.F., and Adams M.J. 1999. The occurrence of *barley mild mosaic virus* (BaMMV)in China and the nucleotide sequence of its coat protein gene. Journal of Phytopathology, 147: 229-234.