**Journal of Iranian Plant Protection Research**

https://jpp.um.ac.ir

**Research Article**
**Vol. 37, No. 4, 2024, p. 399-410**

# Molecular Detection of Three Viruses Infecting Mallow Plants in Golestan Province

**M. Sadeghi Nichkoohi[1], Z. Moradi[2*], M. Mehrvar[3], V. Babaeizad[4]**

1, 2 and 4- M.Sc. Student, Assistant Professor, and Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, respectively.
3- Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
*-Corresponding author Email: z.moradi@sanru.ac.ir

Received: 21-07-2023
Revised:26-09-2023
Accepted: 01-10-2023
Available Online: 01-10-2023

**How to cite this article:**
Sadeghi Nichkoohi, M. Moradi, Z. Mehrvar, M & Babaeizad, V (2024). Molecular Detection of Three Viruses Infecting Mallow Plants in Golestan Province. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *37*(4), 399-410. (In Persian with English abstract).
https://doi.org/10.22067/jpp.2023.83549.1157

## Introduction

The genus *Malva* (family *Malvaceae*) includes species of herbaceous plants which are often pluriannual and very common in borders and boundaries of cultivated fields, making them proper reservoirs for plant pathogens. They are most commonly used as ornamental plants, although they may be used as a food resource and remedy for various diseases. Common mallow (*Malva sylvestris*) is the most important *Malva* species which is used as garden flower as well as widely recognized for food and medicinal purposes. *Malva sylvestris* are reported to be affected by several viruses from different genera including malva vein clearing virus (MVCV, *Potyvirus*), alfalfa mosaic virus (AMV, *Alfamovirus*), malva-associated soymovirus 1 (MaSV1, *Soymovirus*) cucumber mosaic virus (CMV, *Cucumovirus*), and cotton leaf curl Gezira virus (CLCuGeV, *Begomovirus*). In this study, we attempted to identify important viruses infecting mallow plants and compare mallow isolates with other sequences in the GenBank.

## Materials and Methods

In 2022-2023, twenty samples of mallow plants with viral-like symptoms on the leaves were collected from the urban landscape of Golestan province. Total RNA was extracted by DENAzist Total RNA Isolation Kit from fresh, infected mallow leaves. All samples were analyzed by RT-PCR with specific primer pairs for the detection of CMV, AMV, and MVCV. The amplified fragments in expected size of coat protein (CP) gene of each virus were visualized under UV light in agarose gel after electrophoresis, then amplified fragment of one isolate of each virus was bi-directionally sequenced. Obtained sequences were compared to data available in GenBank. The phylogenetic trees of viruses were constructed based on the nucleotide sequences of the coat protein gene using the neighbor-joining method by MEGA11.

## Results and Discussion

All three viruses were detected in some symptomatic samples collected from Golestan province. The most typical symptoms in positive samples were mosaic, vein clearing, and leaf malformation. Of a total of 20 sampled plants, MVCV, CMV and AMV were detected by RT-PCR in nine, five and two samples, respectively. An amplicon of each virus was selected and sequenced in both directions. BLASTn analysis of the sequenced data confirmed that the PCR-amplified fragments belonged to MVCV, AMV, and CMV. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of CP gene of MVCV (n=21) including Iranian and GenBank isolates showed

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

https://doi.org/10.22067/jpp.2023.83549.1157

that all isolates are divided into six groups: G1 to G6. All Iranian isolates along with the isolate from the Netherlands were placed in group G5. The phylogenetic tree placed the CMV sequences (n=51) into two distinct phylogroups I and II; the obtained isolate CMV-IR-Ma clustered together with isolates from Iran, Netherlands, South Korea, Japan, China, Hungary, Australia, France and the USA into group II. According to the results of this study, AMV isolates (n=17) can be divided into two groups, I and II. Group I which includes isolates from Canada, China, Italy, Spain, Argentina, Australia and the USA, was divided into six subgroups. The obtained isolate AMV-IR-Ma was clustered in subgroup IB with a Chinese isolate (HZ) and forms a common branch with isolates (Ir-VM, Ir-WS, and Ir-WS2) from Iran. This is the first report of mallow (*Malva sylvestris*) infection with CMV and AMV in Iran using RT-PCR. In addition, mixed infection with two (MVCV+CMV and MVCV+AMV) or all three viruses (MVCV+CMV+AMV) was also confirmed in some samples. The phylogenetic trees showed that most of the viral isolates were not grouped according to their geographic locations. This suggests the dissemination and spread of these viruses through infected seeds. In Iran, *M. sylvestris* is a common weed found in fields, waste grounds, roadside verges and gardens. Considering the potential non-persistent aphid transmission as well as mechanical transmission, virus-infected mallows can act as a natural reservoir, thereby posing a threat to other ornamental plants and crops. Since the studied viruses were not detected in the other symptomatic plants, the observed symptoms can be caused by physiological disorders such as nutrient deficiencies, the presence of different viral strains, or other unknown and undetected viral species.

**Conclusions**

This study provides new knowledge on the diversity and molecular characteristics of viruses in mallow plants (*M. sylvestris*) affected by the viral disease. The information obtained from this study can be helpful in improving management strategies for disease caused by these viruses in Iran. Albeit *M. sylvestris* is a host of these viruses, but more comprehensive research on other viral species that may infect this plant need to be conducted. Weed management could be an effective way to eliminate inoculum sources of these viruses.

**Keywords:** Viral diseases, Mallow, Sequencing, Detection

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۷ شماره ٤، زمستان ۱٤۰۲، ص. ٤۱۰-۳۹۹

# ردیابی مولکولی سه ویروس آلوده کننده گیاه پنیرک در استان گلستان

محدثه صادقی نیچکوهی[۱]- زهره مرادی[۲*]- محسن مهرور[۳]- ولی اله بابایی‌زاد[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۹

## چکیده

ویروسهای گیاهی یکی از عوامل مهم محدودکننده تولید گیاهان مختلف می‌باشند. در این مطالعه وقوع سه ویروس مهم به نام‌های ویروس موزاییک خیار (cucumber mosaic virus, CMV)، ویروس موزاییک یونجه (alfalfa mosaic virus, AMV)، و ویروس رگبرگ روشنی پنیرک (malva vein clearing virus , MVCV) در گیاهان پنیرک (*Malva sylvestris*) در استان گلستان مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، در سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۲، تعداد ۲۰ نمونه برگی با علایم مشکوک به آلودگی ویروسی از فضای سبز و گلخانه‌های پرورش این گیاه جمع آوری گردید. نمونه‌ها توسط آزمون مولکولی Reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) با آغازگرهای اختصاصی مربوط به هر ویروس مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر سه ویروس ردیابی شدند و در مجموع بیشترین آلودگی مربوط به ویروس MVCV بود (نه نمونه)، پس از آن به ترتیب CMV (پنج نمونه) و AMV (دو نمونه) قرار داشتند. در بررسی مولکولی نمونه‌ها، ترادف ژن پروتئین پوششی (CP) جدایه MVCV مورد مطالعه (Ma2) بیشترین شباهت نوکلئوتیدی را با جدایه ایرانی IR1 (۹۹/۶۷ درصد) و بعد از آن با جدایه NAKT-NL از هلند (۹۳/۷۳ درصد) نشان داد. ترادف ژن CP جدایه CMV-IR-Ma بیشترین شباهت (۱۰۰-۹۹ درصد) را با جدایه‌های Ir-VM و Ir-WS از خراسان رضوی و جدایه Tsh از چین داشت. ترادف ژن CP جدایه AMV-IR-Ma دارای بیشترین شباهت نوکلئوتیدی (۹۹-۹۸ درصد) با جدایه‌های Ir-VM، Ir-WS و Ir-WS2 از خراسان رضوی بود. براساس اطلاعات نگارندگان، این اولین گزارش از آلودگی گیاه پنیرک به ویروسهای AMV و CMV در ایران با استفاده از آزمون RT-PCR می‌باشد. نتایج این تحقیق زمینه را برای کارهای تکمیلی از جمله بررسی آلودگی مخلوط ویروسها، ارزیابی خسارت، و میزان پراکندگی آنها فراهم می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** بیماری‌های ویروسی، پنیرک، توالی‌یابی، ردیابی

## مقدمه

آلودگی‌های ویروسی گیاه یکی از جدی‌ترین مسائل تهدید کننده و برهم زننده امنیت غذایی در سراسر جهان بوده که منجر به زیان قابل توجهی در تولید محصول می‌شوند. جنس *Malva* (خانواده *Malvaceae*) شامل گونه‌هایی است که اغلب چند ساله بوده و معمولاً در فضای سبز شهری به عنوان گیاهان زینتی کاشته می‌شوند. گونه‌های مختلف *Malva* به عنوان گیاهان دارویی نیز شناخته شده‌اند و به طور گسترده‌ای برای اهداف غذایی و دارویی در نقاط مختلف جهان استفاده می‌شوند (Gasparetto *et al*., 2012؛ Heydarirad *et al*., 2017؛ Al- Rubaye *et al*., 2017). *Malva sylvestris* (پنیرک معمولی)، مهمترین گونه جنس *Malva*، بومی منطقه مدیترانه است که می‌تواند میزبان ویروس‌های مهم گیاهی از جنس‌های مختلف باشد. برخی از ویروس‌های بیماری‌زایی که از روی *M.*

۱، ۲، و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران
۳-دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، خراسان رضوی، ایران
(*-نویسنده مسئول: Email: z.moradi@sanru.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/jpp.2023.83549.1157

*sylvestris* به روش سرولوژیکی و یا مولکولی در سراسر جهان گزارش شده‌اند شامل: malva vein clearing virus (جنس *Potyvirus*)، alfalfa mosaic virus (جنس *Alfamovirus*)، cucumber mosaic virus (جنس *Cucumovirus*)، و malva-associated soymovirus 1 (جنس *Soymovirus*)، و cotton leaf curl Gezira virus (جنس *Begomovirus*) می‌باشند (Ozdag and Sertkaya, 2017؛ Bergua *et al*., 2014؛ Moradi and Mehrvar, 2023؛ Maachi *et al*., 2022؛ Bananej *et al*., 2021). برخی از این ویروس‌ها تأثیرات منفی قابل‌توجهی روی این گیاهان دارند و سبب ایجاد طیف وسیعی از علائم می‌شوند. CMV متعلق به جنس *Cucumovirus* از خانواده *Bromoviridae* دارای پراکنش جهانی بوده، و در ایران نیز از مناطق مختلف گزارش شده است. این ویروس در مقایسه با دیگر ویروسهای گیاهی دارای دامنه میزبانی وسیع‌تری بوده و قادر به آلوده‌سازی ۱۳۰۰ گونه در بیش از ۱۰۰ خانواده گیاهی است (García-Arenal & Palukaitis, 2008؛ Duarte *et al*., 2013). CMV از طریق شته، بذر آلوده، پیوند و انتقال مکانیکی منتقل می‌شود، همچنین گیاهان خودروی مختلف نیز به عنوان منبع آلودگی و عامل انتشار این ویروس محسوب می‌شوند (Jacquemond, 2012). پیکره آن ایزومتریک و ژنوم از سه قطعه RNA تک رشته با قطبیت مثبت تشکیل شده است (Palukaitis and García-Arenal, 2003). RNA1 پروتئین 1a را رمزگذاری می‌کند که برای تکثیر ویروس ضروری است و دارای دامنه متیل ترانسفراز در انتهای N و دامنه هلیکاز در انتهای C است (Kadaré and Haenni, 1997). RNA2 پروتئین 2a و 2b را رمزگذاری می‌کند. پروتئین 2a نقش مهمی در همانندسازی دارد (O'Reilly and Kao, 1998)، و 2b نیز در حرکت مسافت طولانی، سرکوب خاموشی ژن و بیماری‌زایی ویروس نقش دارد (Soards *et al*., 2002). RNA3 نیز دو پروتئین 3a (پروتئین حرکتی ویروس) و 3b (پروتئین پوششی ویروس) را تولید می‌کند. انتهای ′۵ RNAهای ژنومی متصل به cap و انتهای ′۳ نیز دارای ساختار شبه t-RNA می‌باشند.

AMV گونه تیپ جنس *Alfamovirus* (خانواده *Bromoviridae*) است که گسترش جهانی دارد و از نظر اقتصادی به عنوان عامل بیماری‌زای مهم در ایران و جهان مطرح می‌باشد (Salamon *et al*., 2018؛ Gao *et al*., 2020؛ Parrella *et al*., 2021). این ویروس دامنه میزبانی بسیار وسیعی دارد و بیش از ۷۰۰ گونه گیاهی متعلق به ۱۶۹ جنس از ۷۱ خانواده را آلوده می‌کند که بیشتر آنها متعلق به خانواده‌های *Fabaceae*، *Solanaceae*، *Asteraceae* و *Apiaceae* می‌باشند (Jasper and Bos, 1980؛ Xu and Nie, 2006؛ Moradi and Mehrvar, 2021؛ Edwardson and Christie, 1997). در طبیعت حداقل ۲۵ گونه شته به صورت ناپایا قادر به انتقال AMV هستند که در این میان شته سبز هلو (*Myzus persicae*) کارآترین آنها می‌باشد. همچنین انتقال این ویروس توسط بذر، دانه گرده، غده، گونه‌های مختلف سس، و تلقیح مکانیکی عصاره آلوده به گیاهان سالم نیز امکان‌پذیر است (Hiruki and Hampton, 1990؛ He *et al*., 2010؛ Edwardson and Christie, 1997). علائم AMV با توجه به ژنوتیپ میزبان می‌تواند متفاوت می‌باشد، هرچند در برخی شرایط ممکن است بدون علائم خاصی در گیاه باشد. این ویروس باعث ایجاد علائمی مانند کوتولگی، بدشکلی، موزاییک زرد روشن تا سفید در برگهای یونجه، زردی برگها در نخود، زرد و ابلقی شدن برگ‌ها (Calico)، نکروز رگبرگ‌ها و غده‌ها در سیب‌زمینی می‌شود (Jaspars and Bos, 1980؛ Balasubramaniam *et al*., 2006). AMV دارای چهار نوع پیکره می‌باشد که سه تای آن باسیلی شکل و پیکره چهارم کروی شکل می‌باشد. ژنوم آن از سه قطعه RNA تک رشته با قطبیت مثبت به نامهای RNA1، RNA2 و RNA3 تشکیل شده است، همچنین دارای یک RNA زیرژنومی (sgRNA) می باشد که از ناحیه ′۳ قطعه RNA3 نسخه‌برداری می‌شود (Bujarski *et al*., 2012). RNA1 و RNA2 دارای یک چارچوب ژنی بزرگ هستند که پروتئین‌های رپلیکاز P1 و P2 را رمزگذاری می‌کنند که این پروتئین‌ها در همانندسازی ویروس نقش دارند. RNA3 دارای دو چارچوب ژنی بوده و پروتئین‌های حرکتی (MP) و پوششی (CP) را رمزگذاری می‌کند (Van Dun *et al*., 1987؛ Bol, 1999). در واقع، CP توسط sgRNA رمزگذاری می‌گردد (Smit and Jaspars, 1982). تمامی قطعات ژنومی در انتهای ′۵ خود دارای ساختار cap و در انتهای ′۳ دارای یک ساختار شبه t-RNA هستند.

ویروس رشته‌ای MVCV متعلق به جنس *Potyvirus* (خانواده *Potyviridae*) بوده و به طور طبیعی گیاهان خانواده *Malvaceae* را آلوده می‌کند و باعث ایجاد موزائیک خفیف تا شدید، بدشکلی برگ، رگبرگ روشنی، و کلروز خفیف می‌گردد. انتقال آن توسط شته‌ها به طریق ناپایا و توسط عصاره گیاه آلوده به روش مکانیکی صورت می‌گیرد (Lunello *et al*., 2009؛ Horváth1979). ژنوم آن از یک مولکول RNA تک‌رشته مثبت تشکیل شده که در انتهای ′۳ دارای polyA و در انتهای ′۵ دارای vpg می‌باشد (King *et al*., 2012). با توجه به اینکه این گیاهان در حاشیه‌ی باغ ها و مزارع بسیار رایج هستند، می‌توانند به عنوان منبع مناسبی برای آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهی عمل نمایند. استراتژی کلی مدیریت بیماری‌های ویروسی در گیاهان زینتی و دارویی شامل شناسایی سریع و حذف آلودگی‌های ویروسی در مناطق کشت، اعمال ضوابط بهداشتی-قرنطینه‌ای و کنترل ناقلین آنها می‌باشد (Hull, 2014). از اینرو تشخیص به‌موقع

آلودگی ویروسی، اطلاعات مربوط به علائم بیماری و خصوصیات عوامل بیماری‌زا به توسعه عملی روشهای پیشگیری از بیماری و به حداقل رساندن استفاده از آفت‌کش‌ها کمک می‌کند. با توجه به پراکنش گسترده ویروس‌های مهم و خسارت‌زای نامبرده در گیاهان مختلف در دنیا، لذا هدف از این تحقیق شناسایی و بررسی میزان آلودگی مخلوط آنها برای اولین بار در کشور از روی *M. sylvestris* با استفاده از آزمون‌های مولکولی و تعیین جایگاه تبارزایی جدایه‌های ایرانی به منظور دستیابی به اطلاعات کافی و تدوین برنامه مدیریتی مناسب می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

در سالهای ۱۴۰۱ تا ۱۴۰۲ طی بازدید از محوطه، فضای سبز و گلخانه‌های پرورش پنیرک در استان گلستان، ۲۰ نمونه برگی (۶ نمونه از آزادشهر، ۹ نمونه از گرگان، و ۵ نمونه از گنبد کاووس) از گیاهان دارای نشانه‌های بیماری ویروسی جمع‌آوری شد. هر نمونه گیاهی بر مبنای علائمی از قبیل موزائیک، موزائیک زرد–روشن (ابلقی)، رگبرگ روشنی، و بدشکلی برگها (شکل ۱) جمع آوری و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل گردید.

### ردیابی مولکولی ویروس‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با نسخه‌برداری معکوس (Reverse transcription- polymerase chain reaction, RT-PCR)

با استفاده از کیت استخراج RNA (شرکت دنازیست، ایران) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، RNA کل از بافت برگی نمونه‌ها استخراج شد. نمونه‌های RNA استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ژن کامل پروتئین پوششی هر ویروس وارد واکنش RT-PCR دو مرحله‌ای گردید. در مورد AMV از آغازگرهای توصیفی توسط معصومی و همکاران (Masumi *et al.*, 2012) و در مورد CMV از آغازگرهای اختصاصی ارائه شده توسط هو و همکاران (Hu *et al.*, 2016)، و برای MVCV از آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش (براساس توالی ژنوم کامل جدایه ایرانی این ویروس با رس شمار MZ555807) استفاده شد (جدول ۱). آزمون نسخه‌برداری معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت زیر انجام شد: سه میکرولیتر از RNA کل استخراج شده با دو میکرولیتر از آغازگر اختصاصی معکوس مربوط هریک از ویروسها و هشت میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و میکروتیوب در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه قرار داده شد. سپس دو میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، چهار میکرولیتر بافر 5X واکنش (5X RT Buffer) و یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌بردار معکوس (MMuLV Reverse Transcriptase) (پارس توس، ایران) به مخلوط اضافه گردید و میکروتیوب به مدت یک ساعت در دمای ۴۷ °C دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از مخلوط آماده PCR (Taq DNA Polymerase Master Mix Red) (شرکت Ampliqon، دانمارک) انجام شد. برای انجام این آزمون، سه میکرولیتر از محصول مرحله رونوشت‌برداری برگردان (cDNA)، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس هر یک از ویروس‌ها (غلظت ۱۰ پیکومول)، و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط آماده Master Mix Red PCR با هم ترکیب و در نهایت با آب مقطر استریل حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش در دستگاه ترموسایکلر طبق برنامه توصیفی برای هر یک از سه ویروس انجام گرفت. بدین ترتیب که برای MVCV برنامه به صورت ۹۵° C به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۹۴° C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲° C به مدت ۹۰ ثانیه و در پایان یک چرخه در دمای ۷۲ °C به مدت هفت دقیقه، در مورد AMV برنامه به صورت ۹۵° C به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۹۴° C به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۸° C به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲° C به مدت ۶۰ ثانیه و در پایان پنج دقیقه در ۷۲° C، و برای CMV به صورت ۹۵° C به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۹۴° C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵° C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲° C به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان پنج دقیقه در ۷۲° C انجام گردید. به منظور ارزیابی محصول حاصل از واکنش PCR از روش الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد حاوی DNA Green viewer 0.5 µg/ml (پارس توس، ایران) استفاده شد. نشانگر با وزن مولکولی استاندارد ۱۰۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران) برای تعیین اندازه قطعات تکثیر یافته مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تأیید آلودگی و نیز بررسی جایگاه تبارزائی جدایه‌های ویروسی در مقایسه با جدایه‌های دنیا، محصول PCR قطعات تکثیر شده‌ی موردنظر پس از خالص‌سازی در دو جهت تعیین توالی شدند (شرکت ماکروژن، کره جنوبی). توالی‌های به دست آمده، با اطلاعات و توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) مورد مقایسه قرار گرفتند. سپس با استفاده از نرم افزار BioEdit v.7.2.5 توالی‌های حاصل از خوانش مستقیم و معکوس مونتاژ شده و توالی استنتاجی (Consensus sequence) به دست آمد. داده‌های نوکلئوتیدی تعیین ترادف شده برای هر ویروس با دیگر جدایه‌های مربوط به آن ویروس که از قبل در پایگاه اطلاعاتی NCBI موجود بودند با استفاده از نرم افزار Mega 11 و روش ClustalW هم‌ردیف‌سازی چندگانه شدند. آنالیز تبارزایی با استفاده از روش Neighbor-Joining در نرم افزار Mega 11، با شاخص اعتبارسنجی bootstrap و با ۱۰۰۰ تکرار صورت گرفت. کلیه شاخه‌ها با ارزش بوت استرپ پایین‌تر از ۵۰ درصد ادغام شدند. در این تجزیه و تحلیل برای

توالی‌های MVCV ، CMV و AMV به ترتیب از توالی ژن کدکننده پروتئین پوششی ویروس‌های pea seed-borne mosaic virus، peanut stunt virus و cucumber mosaic virus به عنوان عضو برون گروه (outgroup) استفاده شد. میزان شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در توالی ها با همردیف‌سازی در نرم‌افزار SDTv.1.2 در الگوریتم MUSCLE محاسبه شد.

**جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص عوامل ویروسی گیاه پنیرک**

**Table1. The primers information used to detection of the mallow viral agents**

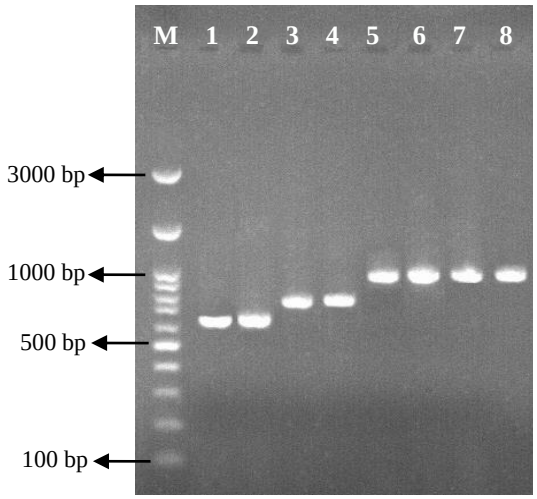
| آغازگر | توالی (´۳-´۵) | اندازه قطعه مورد انتظار | منبع |
|---|---|---|---|
| MVCV-CPF<br>MVCV-CPR | GCGGACGAAAAATTAAACGC<br>CTGAACACCTCTCATGCCA | 909 bp | طراحی شده در این تحقیق |
| AMV-F<br>AMV-R | CATTGATCGGTAATGGGCCGT<br>ATCCACCCAGTGGAGGTCAGCA | 780 bp | Masumi *et al*., 2012 |
| CMV-CPF<br>CMV-CPR | ATGGACAAATCTGAATCAACC<br>TCAGACTGGGAGCACCCC | 657 bp | Hu *et al*., 2016 |

## نتایج و بحث

واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی MVCV، AMV، و CMV منجر به تکثیر قطعاتی به طول مورد انتظار برای هر یک از ویروس‌ها شد (شکل ۲). پس از توالی‌یابی، نتایج حاصل از جستجو با ابزار BLASTn در پایگاه داده‌های NCBI، حضور هر سه ویروس (AMV، CMV، MVCV) را در نمونه‌ها تایید نمود. قطعات تکثیر شده شامل طول کامل ژن پروتئین پوششی هر یک از ویروس‌ها بود. بررسی‌ها نشان داد که از تعداد ۲۰ نمونه آزمایش شده با علائم مشکوک به آلودگی ویروسی به ترتیب نه نمونه آلوده به MVCV (۴۵ درصد)، پنج نمونه آلوده به CMV (۲۵ درصد)، و دو نمونه آلوده به AMV (۱۰ درصد) بودند. علاوه بر این، آلودگی مخلوط به دو (MVCV+CMV و MVCV+AMV) یا هر سه ویروس (MVCV+CMV+AMV) نیز در برخی نمونه‌ها تایید شد.

**شکل ۱- علائم موزائیک، رگبرگ روشنی، زردی، بدشکلی و تاولی شدن سطح برگ در گیاهان پنیرک آلوده به MVCV، CMV و AMV.**

**Figure 1- Symptoms of mosaic pattern, vein clearing, light green, deformation, and blistering on Mallow leaves infected by MVCV, CMV, and AMV.**

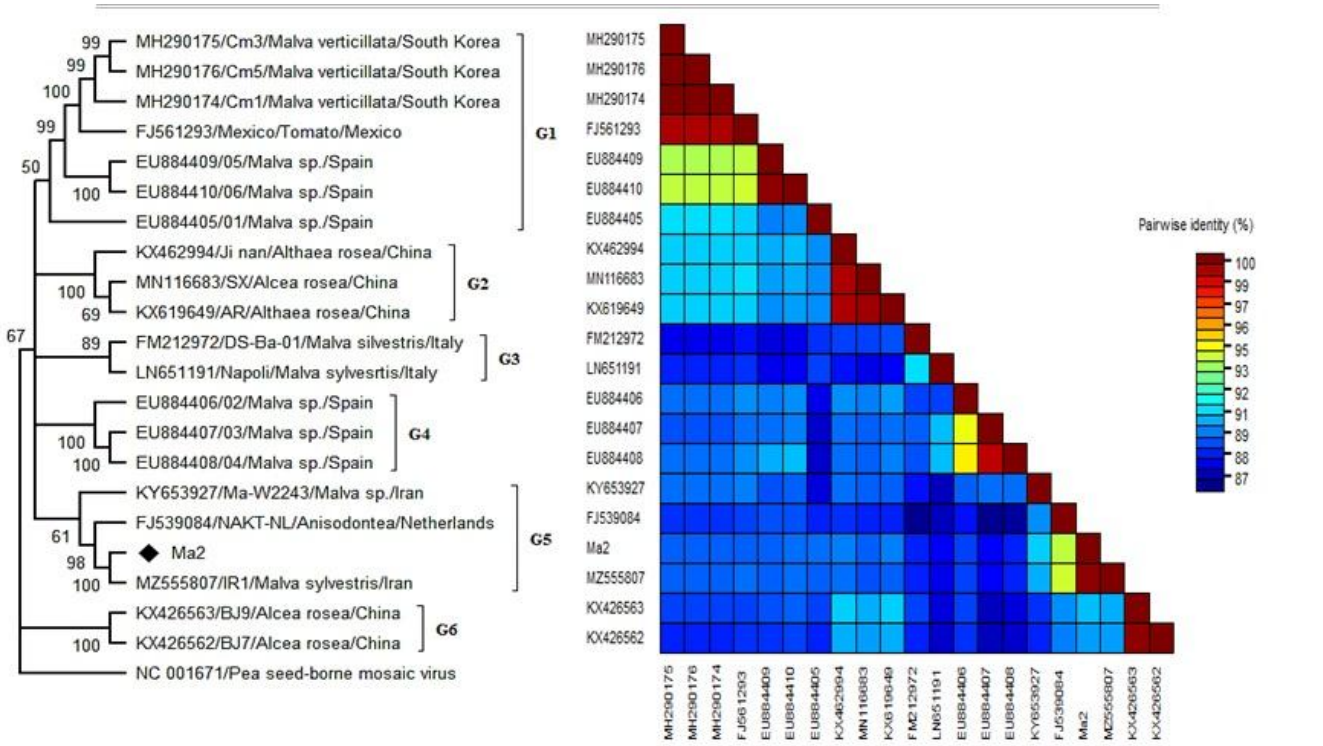



**شکل ۲- نقوش الکتروفورزی قطعات DNA تکثیر شده در RT-PCR مربوط به توالی کامل ژن پروتئین پوششی هر یک از ویروسهای MVCV، CMV و AMV در ژل آگارز ۱ ٪. راهک‌های ۱ و ۲: باندهای ٦٥٧ جفت‌بازی از RNA3 ویروس CMV با جفت آغازگر اختصاصی CMV-CPF/CPR. راهک‌های ۳ و ٤: باندهای ۷۸۰ جفت‌بازی از RNA3 ویروس AMV با جفت آغازگر AMV-CPF/CPR. راهک‌های ٥ تا ۸: باندهای ۹۰۹ جفت‌بازی مربوط به ژن کامل پروتئین پوششی ویروس MVCV با جفت آغازگرهای MVCV-CPF/R. راهک M: مارکر DNA ۱۰۰ جفت-بازی (سیناکلون).**

**Figure 2- Electrophoresis patterns of DNA fragments amplified by RT-PCR in 1% agarose gel related to complete coat protein gene of each virus: MVCV, CMV, and AMV.**
**Lanes 1& 2: 657-bp fragments related to complete CP gene of CMV RNA3 amplified by specific primers CMV-CPF/CPR.**
**Lanes 3 &4: 780-bp fragments related to complete CP gene of AMV RNA3 amplified by specific primers AMV-CPF/CPR.**
**Lanes 5-8: 909-bp fragments related to complete CP gene of MVCV amplified by specific primers MVCV-CPF/R. M: 100 bp DNA marker (Sinaclon).**

در درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس طول کامل ژن CP، ۲۱ جدایه ویروس MVCV به شش گروه تقسیم شدند. گروه G1 شامل جدایه‌هایی از کشورهای کره‌جنوبی، مکزیک، و اسپانیا می‌باشد. در گروه G2 سه جدایه از چین، در گروه G3 دو جدایه از ایتالیا، در گروه G4 سه جدایه از اسپانیا و در گروه G6 نیز دو جدایه از چین قرار گرفتند. جدایه مورد مطالعه (Ma2) در کنار جدایه‌های ایران (Ma-W2243 و IR1) و جدایه‌ای از هلند (NAKT-NL) در گروه G5 قرار گرفت (شکل ۳). در ماتریکس شباهت نوکلئوتیدی جدایه MVCV مورد مطالعه (Ma2) در طول کامل ژن CP بین ۹۹/۶۷–۸۷/۵۷ درصد با سایر جدایه‌های MVCV موجود در بانک ژن مشابه بود. جدایه Ma2 بیشترین شباهت نوکلئوتیدی (۹۹/۶۷ درصد) و آمینواسیدی (۱۰۰ درصد) را با جدایه IR1 (دیگر جدایه گزارش شده از این ویروس در استان گلستان) داشت. جدایه Ma2 کمترین شباهت نوکلئوتیدی (۸۷/۵۷ درصد) را با جدایه‌های 03 از اسپانیا و Napoli از ایتالیا داشت. جدایه مذکور کمترین شباهت آمینواسیدی را (۹۰/۰۹ درصد) را با جدایه DS-Ba-01 از ایتالیا داشت.

در درخت تبارزایی ترسیم شده براساس طول کامل ژن CP ۵۱ جدایه CMV، دو شاخه اصلی (I و II) با حمایت بوت استرپ بالا قابل شناسایی بود (شکل ۴). جدایه IR-Ma و جدایه‌های ایرانی Ir-VM، Ir-VS و Zin2 همراه با جدایه‌هایی از ژاپن، هلند، مجارستان، کره جنوبی، آمریکا، فرانسه، چین و استرالیا در گروه II قرار گرفتند که با مطالعات سایر محققان (Dabiri *et al*., 2020؛ Ohshima *et al*., 2016) همخوانی دارد. جدایه پنیرک CMV (IR-Ma) در طول کامل ژن CP بین ۱۰۰– ۷۵/۳۴ درصد با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن شباهت نوکلئوتیدی داشت. جدایه CMV IR-Ma دارای بیشترین شباهت نوکلئوتیدی با جدایه‌های Ir-VM و Ir-WS از خراسان رضوی (۱۰۰–۹۹/۸۵ درصد) و جدایه Tsh از چین (۹۹/۵۴ درصد) بوده و کمترین شباهت (۷۵/۹۵–۷۵/۳۴ درصد) را با جدایه-های Vir از ایتالیا، Ixora از آمریکا و PHz از چین داشت. در سطح آمینواسیدی، میزان شباهت این جدایه با سایر جدایه‌ها بین ۱۰۰– ۸۲/۱۱ درصد بود که بیشترین میزان شباهت (۱۰۰ درصد) با جدایه-های ایرانی Ir-VM و Ir-WS و کمترین میزان شباهت (۸۲/۷۵– ۸۲/۱۱ درصد) با جدایه‌های CS و WN1 از چین، CLW2 از مالزی، Mf و Ze از کره‌جنوبی، NT9 از تایوان، Ixora از آمریکا، I17F از فرانسه، و Vir از ایتالیا بود.



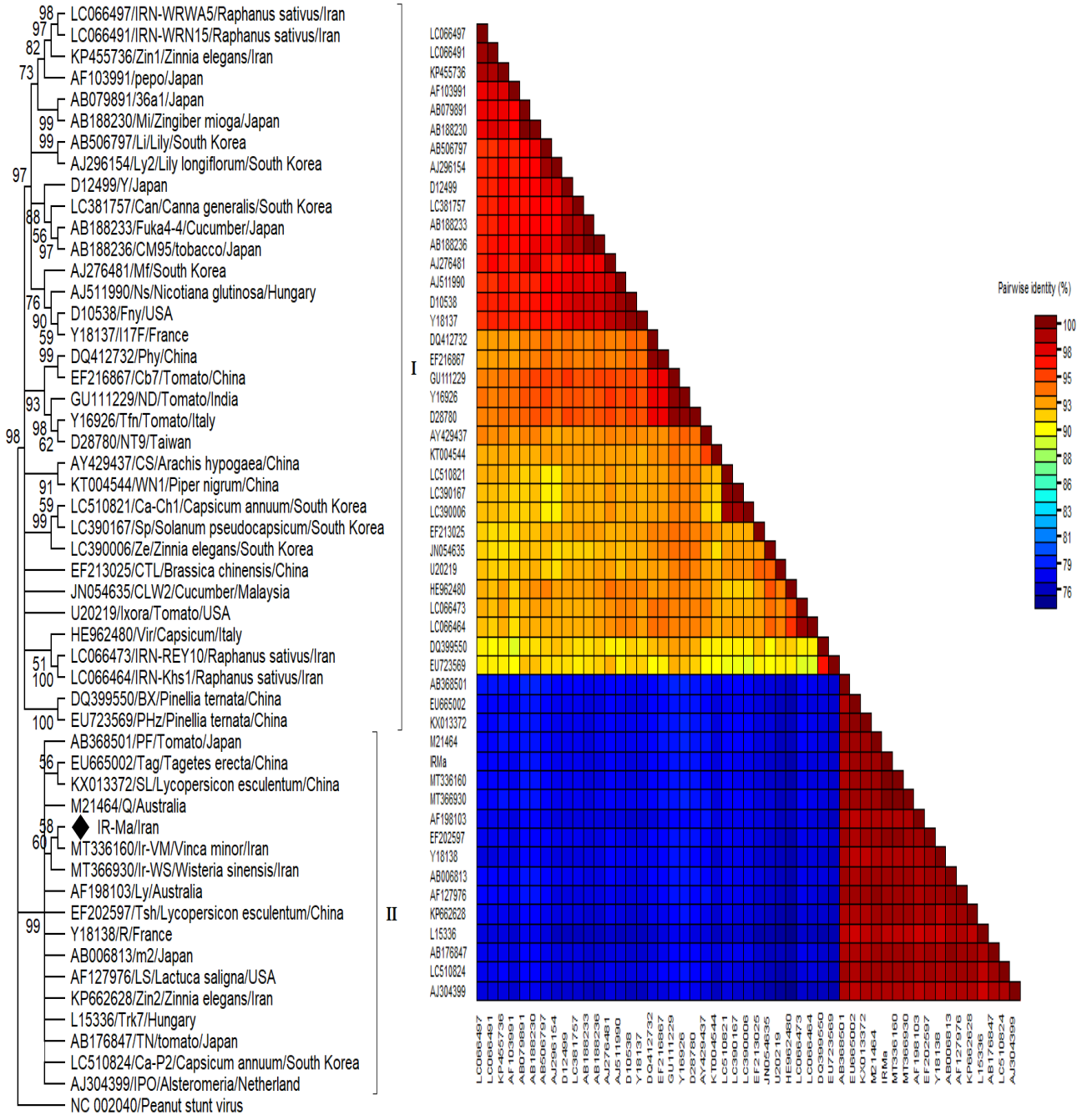

**شکل ۳- درخت تبارزایی رسم شده براساس ترادف نوکلئوتیدی ژن کامل پروتئین پوششی جدایه‌ی پنیرک ویروس رگبرگ روشنی پنیرک و برخی از جدایه‌های موجود در بانک ژن (NCBI). رسم دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 به روش Neighbor-joining با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی bootstrap انجام شده است. مقادیر bootstrap کمتر از ۵۰ درصد فشرده شده‌اند. جدایه‌ی مورد بررسی در این مطالعه علامت‌دار شده است. از توالی ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک بذرزاد نخودفرنگی به عنوان عضو برون گروه استفاده شده است. در سمت راست پلات رنگی مقایسات دو به دوی جدایه‌های MVCV به منظور محاسبه درصد تشابه نوکلئوتیدی نشان داده شده است.**

**Figure 3- Phylogenetic tree constructed based on the nucleotide sequence of complete coat protein gene of mallow isolate of MVCV and other MVCV isolates available in NCBI GenBank database. The dendrogram was generated by MEGA11 using was used as an outgroup the neighbor- joining method with 1000 replicates of the bootstrap test. Pea seed-borne mosaic virus in this study. Two-dimensional pair wise sequence identity color plot of the MVCV isolates was shown at right.**

AMV در دو گروه اصلی جدا از هم (I, II) قرار گرفته و گروه I که شامل جدایه‌هایی از کشورهای کانادا، چین، ایتالیا، اسپانیا، آرژانتین، آمریکا و استرالیا می‌باشد، به شش زیرگروه تقسیم شد (شکل ۵). جدایه مورد مطالعه (AMV-IR-Ma) در کنار جدایه‌های ایران (Ir-VM، Ir-WS و Ir-WS2) و یک جدایه از چین (HZ) در زیر گروه IB قرار گرفت که با نتایج پژوهش‌های قبلی (Moradi and Mehrvar, 2021) مطابقت دارد. جدایه FERA_160224 از بریتانیا به تنهایی در زیرگروه II قرار گرفت. جدایه مورد مطالعه AMV-IR-Ma دارای ۹۹/۷۴-۹۳/۷۲ درصد تشابه نوکلئوتیدی و ۱۰۰-۸۹/۱۴ درصد تشابه آمینواسیدی با دیگر توالی‌های ثبت شده از این ویروس در بانک ژن در ناحیه ژنی مورد نظر بود. با مقایسه توالی‌ها، بیشترین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی (۹۹/۷۴ درصد) و آمینواسیدی (۱۰۰ درصد) بین جدایه پنیرک گلستان (IR-Ma) و جدایه‌های Ir-VM و Ir-WS از خراسان رضوی وجود داشت. تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جدایه AMV-IR-Ma با جدایه IR-WS2 (از خراسان رضوی) به ترتیب ۹۸/۳۳ و ۹۶/۳۳ درصد بود. کمترین تشابه نوکلئوتیدی (۹۳/۷۲ درصد) و آمینواسیدی (۸۹/۱۴ درصد) جدایه مورد مطالعه با استرین FERA_160224 از بریتانیا بود.

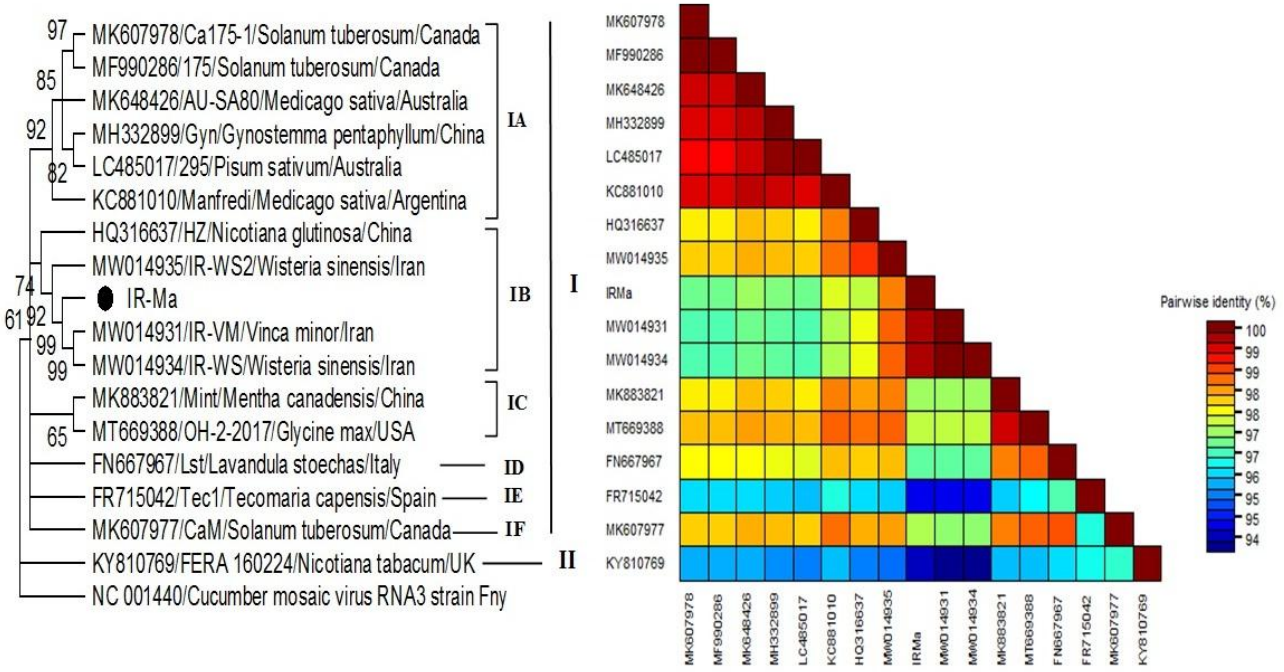
در مطالعه حاضر، آلودگی گیاه پنیرک به AMV و CMV برای اولین بار در ایران با استفاده از آزمون RT-PCR گزارش شد. علائم بارز نمونه‌های آلوده در این بررسی به صورت موزاییک، رگبرگ روشنی، و بدشکلی برگ بود (شکل ۱) و در آلودگی مخلوط تفکیک ویروسها از روی علائم غیرممکن بود. از سوی دیگر با توجه به عدم ردیابی ویروسهای اشاره شده در سایر گیاهان علائم‌دار مورد بررسی، این احتمال وجود دارد که علائم مشاهده شده ناشی از عوارض فیزیولوژیکی همانند کمبود برخی عناصر غذایی، وجود نژادهای ویروسی مختلف و یا وجود گونه‌های ویروسی ناشناخته و ردیابی نشده‌ی دیگر باشد. بیماری‌های مهم ویروسی باعث ایجاد خسارت های مستمر بر تولیدات گیاهی می‌شوند، از اینرو شناسایی میزبانهای ویروس‌های مهم و خسارت‌زا برای مدیریت مناسب بیماری در برنامه-

های بلند مدت موثر خواهد بود.




**شکل ٤- درخت تبارزایی رسم شده براساس ترادف نوکلئوتیدی ژن کامل پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار-جدایه پنیرک و برخی از جدایه-های موجود در بانک ژن (NCBI). رسم دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 به روش Neighbor-joining با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی bootstrap انجام شده است. مقادیر bootstrap کمتر از ۵۰ درصد فشرده شده‌اند. جدایه‌ی مورد بررسی در این مطالعه علامت‌دار شده است. از توالی ژن پروتئین پوششی ویروس کوتولگی بادام زمینی به عنوان عضو برون گروه استفاده شده است. در سمت راست پلات رنگی مقایسات دو به دوی جدایه‌های CMV به منظور محاسبه درصد تشابه نوکلئوتیدی نشان داده شده است.**

**Figure 4- Phylogenetic tree constructed based on the nucleotide sequence of coat protein gene of mallow isolate of CMV and some CMV isolates available in NCBI GenBank database. The dendrogram was generated by MEGA11 using the neighbor-joining method with 1000 replicates of the bootstrap test. Peanut stunt virus was used as an outgroup in this study. Two-dimensional pair wise sequence identity color plot of the CMV isolates was shown at right.**




**شکل ۵- درخت تبارزایی رسم شده براساس ترادف نوکلئوتیدی ژن کامل پروتئین پوششی ویروس موزاییک یونجه-جدایه پنیرک و برخی از جدایه‌های موجود در بانک ژن (NCBI). رسم دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 به روش Neighbor-joining با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی bootstrap انجام شده است. مقادیر bootstrap کمتر از ۵۰ درصد فشرده شده‌اند. جدایه‌ی مورد بررسی در این مطالعه علامت‌دار شده است. از توالی ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار به عنوان عضو برون گروه استفاده شده است. در سمت راست پلات رنگی مقایسات دو به دوی جدایه‌های AMV به منظور محاسبه درصد تشابه نوکلئوتیدی نشان داده شده است.**

**Figure 6- Phylogenetic tree constructed based on the nucleotide sequence of coat protein gene of mallow isolate of AMV and some AMV isolates available in NCBI GenBank database. The dendrogram was generated by MEGA11 using the neighbor-joining method with 1000 replicates of the bootstrap test. Cucumber mosaic virus was used as an outgroup in this study. Two-dimensional pair wise sequence identity color plot of the AMV isolates was shown at right.**

همچنین مطالعات تبارزایی نشان داد که ۱۷ جدایه ویروس

علاوه بر این، میزبان‌های جدید برای AMV و CMV به طور مداوم گزارش می‌شوند، که مدیریت اپیدمیولوژیک بیماری ناشی از آنها را بسیار پیچیده می‌کند. در درخت تبارزایی به دست آمده، مشخص شد که همگروه شدن بعضی از جدایه‌ها از مناطق مختلف جهان با یکدیگر با موقعیت جغرافیایی همخوانی ندارد که این موضوع می تواند انتقال و انتشار این ویروسها از طریق بذور آلوده را تقویت کند. در ایران، *M. sylvestris* گیاه خودرو رایجی است که در مزارع، حاشیه جاده‌ها و باغ‌ها یافت می‌شود و می‌تواند نقش مهمی در اکولوژی و اپیدمیولوژی بیماری‌های ویروسی به عنوان منبع طبیعی آلودگی با پتانسیل بالا داشته باشد (Bananej *et al*., 2021). از سوی دیگر، ناقل هر سه ویروس گونه‌های مختلف شته می‌باشد که با توجه به شرایط اکولوژیکی مناسب برای فعالیت ناقل، وجود گیاهان حساس و خودرو منبع ویروس، این احتمال وجود دارد که در آینده شاهد گسترش بیشتر این ویروس‌ها در مناطق شمالی و روی سایر گیاهان زینتی و محصولات زراعی باشیم. از اینرو پیشنهاد می‌شود علفهای خودرو حذف شده، و تحقیق‌های جامع‌تری در مورد گونه‌های دیگر ویروسی صورت گیرد تا بتوان استراتژی‌های با دوام‌تر و کارآتر برای مدیریت بیماری در نظر گرفت.

## Refrences


1. Al- Rubaye, A.F., Kaizal, A.F., & Hameed, I.H. (2017). Phytochemical screening of methanolic leaves extract of *Malva sylvestris*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, *9*(4), 537–552. https://doi.org/10.25258/phyto.v9i4.8127
2. Balasubramaniam, M., Ibrahim, A., Kim, B.S., & Loesch-Fries, L.S. (2006). *Arabidopsis thaliana* is an asymptomatic host of Alfalfa mosaic virus. *Virus Research*, *121*(2), 215–219. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.04.005

3. Bananej, K., Shahid, M.S. & Shafiq, M. (2021). Evidence that leaf curl disease of *Malva sylvestris* in Iran is associated with cotton leaf curl Gezira virus and associated betasatellite. *Journal of Plant Patholo*gy, *103*(2), 671–672. https://doi.org/10.1007/s42161-021-00758-9
4. Bergua, M., Luis-Arteaga, M., & Escriu, F. (2014). Genetic diversity, reassortment, and recombination in alfalfa mosaic virus population in Spain. *Phytopathology*, *104*(11), 1241-1250. doi: https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-13-0309-R
5. Bujarski, J., Figlerowicz, M., Gallitelli, D., Roossinck, M.J., & Scott, S.W. (2012). Family *Bromoviridae*. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (eds) Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, New York, pp 965–976.
6. Bol, J.F. (1999). Alfalfa mosaic virus and ilarviruses: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *Journal of General Virology*, *80* (Pt 5), 1089-1102. http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-80-5-1089
7. Dabiri, S., Moradi, Z., Mehrvar, M. & Zakiaghl, M. (2020). Analysis of the complete genome sequence of cucumber mosaic virus from *Vinca minor* and *Wisteria sinensis* in Iran. *Journal of Plant Pathology*, *102*, 1263–1268. https://doi.org/10.1007/s42161-020-00650-y
8. Duarte, L.M.L., Rivas, E.B., Alexandre, M.A.V., Harakava, R. & Veauvy, M.C.D. (2013). Genealogy of Cucumber mosaic virus isolated from ornamental species. *American Journal of Plant Sciences*, *4*, 1081-1087. https://doi.org/10.4236/ajps.2013.45134
9. Gasparetto, J.C., Martins, C.A., Hayashi, S.S., Otuky, M.F., & Pontarolo, R. (2012). Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: A millennial herbal medicine. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *64*(2), 172–189. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01383.x
10. Edwardson, J.R., & Christie, R.G. (1997). Alfamovirus Genus. Alfalfa mosaic virus species. Pages 63-94 in: viruses infecting peppers and other solanaceous crops. Monogr. 18-I. University of Florida Press, Gainesville.
11. Gao, S.Q., Liang, J., Guo, K., Zhou, X., & Su, X. (2020). First report of alfalfa mosaic virus in Cayratia japonica, Justicia procumbens and Veronica persica in China. *Journal of Plant Pathology*, *102*(1), 267. https://doi.org/10.1007/s42161-019-00408-1
12. García-Arenal, F., & Palukaitis, P. (2008). Cucumber mosaic virus. In: García-Arenal F, Palukaitis P, Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, editors. Encyclopedia of Virology. 3. Oxford: Academic Press; pp. 614–619.
13. Heydarirad, G., Rezaeizadeh, H., Choopani, R., Mosavat, S. H., & Ameri, A. (2017). Efficacy of a traditional Persian medicine preparation for radiation- induced xerostomia: A randomized, open- label, active- controlled trial. *Journal of Integrative Medicine*, *15*, 201–208. https://doi.org/10.1016/S2095-4964(17)60333-9
14. He, B., Fajolu, O.L., Wen, R-H., & Hajimorad, M.R. (2010). Seed transmissibility of Alfalfa mosaic virus in soybean. *Plant Health Progress*, 11, 41. https://doi.org/10.1094/PHP-2010-1227-01-BR
15. Hiruki, C., & Hampton, R.O. (1990). Diseases caused by viruses and viruses infectious to alfalfa. Pages 51-58 in: Compendium of alfalfa diseases. D. L. Stuteville and D. C. Erwin, eds. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN.
16. Horváth, J., Mamula, D., Besada, W.H., & Juretic, N. (1979). Some properties of Malva Vein Clearing Virus isolated in Hungary and Yugoslavia. *Journal of Phytopathology*, *95*, 51–58. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1979.tb01577.x
17. Hu, Y., Shi, H.W., Jing, C.C., Li, K., Sun, X.C., Wu, G.T., Zhou, C.Y., & Qing, L. (2016). First report of cucumber mosaic virus infecting apple in China. *Journal of Plant Pathology*, 98, 181–181. https://doi.org/10.4454/JPP.V98I1.065
18. Hull, R. (2014). Plant virology (5th ed.). New York: Academic Press.1098 p.
19. Jacquemond, M. (2012). Cucumber mosaic virus, pp. 439-504. In: Loebenstein G. and Lecoq H. (Eds.). *Advances in Virus Research*. Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00013-0
20. Jasper, E.M.J., & Bos, L. (1980). Alfalfa mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 229. *Association of Applied Biologists*, Warwick
21. Kadare´, G., & Haenni, A-L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*, *71*, 2583–2590. https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2583-2590.1997
22. King, A.M., Lefkowitz, E., Adams, M.J., & Carstens, E.B. (2012). Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam. pp 1272.
23. Lunello, P., Tourino, A., Nunez, Y., Ponz, F., & Sanchez, F. (2009). Genomic heterogeneity and host recovery of isolates of malva vein clearing virus. *Virus Research*, *140*, 91-97. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.11.006
24. Maachi, A., Hernando, Y., Aranda, M.A., & Donaire, L. (2022). Complete genome sequence of malva-associated soymovirus 1: a novel virus infecting common mallow. *Virus Genes*, *58*(4), 372-375. https://doi.org/10.1007/s11262-022-01900-0
25. Massumi, H., Maddahian, M., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., & Farahmand, A. (2012). Incidence of viruses infecting alfalfa in the southeast and central regions of Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *14* (5), 1141-1148.

26. Moradi, Z., & Mehrvar, M. (2021). Whole-genome characterization of alfalfa mosaic virus obtained from metagenomic analysis of *Vinca minor* and *Wisteria sinensis* in Iran: with Implications for the genetic structure of the virus. *Plant Pathology Journal*, *37*(6), 619-631. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.10.2021.0151
27. Moradi, Z., & Mehrvar, M. (2023). Metagenomic analysis of *Malva sylvestris* from Iran displays a malva vein clearing virus genome. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *25*(1), 213–223. https://doi.org/10.52547/jast.25.1.213
28. Ohshima, K., Matsumoto, K., Yasaka, R., Nishiyama, M., Soejima, K., Korkmaz, S., Simon, Ho SY, Gibbs, A., & Takeshita, M. (2016). Temporal analysis of reassortment and molecular evolution of cucumber mosaic virus: Extra clues from its segmented genome. *Virology*, *487*, 188–197. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.024
29. O'Reilly, E.K., & Kao, C.C. (1998). Analysis of RNA dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology*, *252*(2), 287–303. https://doi.org/10.1006/viro.1998.9463
30. Ozdag, Y., & G. Sertkaya. (2017). Investigation on viruses causing yellowing disease in pepper in Hatay-Turkey. *Journal of Agricultural Faculty of Mustafa Kemal University*, *22*(1), 16-22.
31. Palukaitis, P., & García-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, *62*, 241–323. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)62005-1
32. Parrella, G., Troiano, E., Faure, C., Marais, A., & Candresse, T. (2021). First report of alfalfa mosaic virus in chayote in Italy. *Plant Disease*, *105*(3), 698. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2117-PDN
33. Salamon, P., Sos-Hegedus, A., Gyula, P., & Szittya, G. (2018). First report of the infection of alfalfa mosaic virus in *Salvia sclarea* in Hungary. *Journal of Plant Pathology*, *100*(3), 607. https://doi.org/10.1007/s42161-018-0117-8
34. Smit, C.H., & Jaspars, E.M. (1982). Evidence that RNA4 of alfalfa mosaic virus does not replicate autonomously. *Virology*, *117*(1), 271-274. https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90528-1
35. Soards, A.J., Murphy, A.M., Palukaitis, P., & Carr, J.P. (2002) Virulence and differential local and systemic spread of cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *15*(7), 647–653. https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.7.647
36. Van Dun, C.M.P., Bol, J.F., & Van Vloten-Doting, L. (1987). Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology*, *159*(2), 299–305. https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90467-3
37. Xu, H., & Nie, J. (2006). Identification, characterization, and molecular detection of Alfalfa mosaic virus in potato. *Phytopathology*, *96*(11), 1237-1242. http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-96-1237