



## Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of *Peanut mottle virus* in Soybean Fields in the North of Iran

J. Ramezani Avval Reibi<sup>1</sup>, M. Mehrvar<sup>2\*</sup>

Received: 07-12-2021

Revised: 18-12-2021

Accepted: 25-05-2022

Available Online: 08-12-2022

**How to cite this article:**Ramezani Avval Reibi, J., & Mehrvar, M. (2022). Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of *Peanut mottle virus* in Soybean Fields in the North of Iran. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(3): 301-312. (In Persian with English abstract)DOI: [10.22067/JPP.2022.73939.1067](https://doi.org/10.22067/JPP.2022.73939.1067)

### Introduction

Soybean (*Glycine max*) is one of the major oilseeds of the Fabaceae family. *Peanut mottle virus* (PeMoV) is a *Potyvirus* that can infect not only peanuts, but also soybeans, and some other legumes. Aphids and contaminated peanut seeds transmit the virus to healthy peanut and soybean plants, causing significant damage. Soybeans infected with the virus have been found to exhibit symptoms such as mosaic, mottling, yellowing, and stunting.

### Materials and Methods

From May to October 2020, 132 leaf samples with presumptive symptoms of the virus, such as mosaic, mottling, deformation, stunting, yellowing, and wrinkling, were collected from soybean fields in Mazandaran and Golestan provinces of Iran. Total RNA was isolated using Promega SV Total RNA Isolation Kit (USA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using random hexamer primers and reverse transcriptase enzyme, M-MuLV thermo-resistant H (ParsTous, Iran). Subsequently, the cDNA library was amplified in the presence of Taq DNA polymerase with degenerate primers related to the genomic regions of the cylindrical inclusion (CI) and Helper component proteinase (HC-Pro) of potyviruses and the coat protein (CP)-specific primer pairs of PeMoV for Sanger sequencing. Phylogenetic analysis was performed using MEXA X (Kumar *et al.*, 2018). Multiple alignments were performed using the MAFFT software version 7. A phylogenetic tree was constructed using the Minimum Evolution (ME) and Tamura-Nei methods with 1000 bootstraps.

### Results and Discussion

RT-PCR tests with degenerate primers for potyviruses (HC-Pro and CI) and specific primer pairs for PeMoV virus (CP), followed by Sanger sequencing, confirmed the presence of this virus in soybean samples. The RT-PCR amplified fragments of 700 and 1450 bp with degenerate primers for potyviruses and CP-specific primer pairs for PeMoV, respectively, whereas no fragment was amplified from the healthy plants. The nucleotide sequence of the coat protein region of this isolate shared 88.56-95.80% identity with the corresponding sequence of other GenBank isolates. Phylogenetic trees based on coat protein alignments of the PeMoV-soya isolate with 16 other PeMoV isolates in the GeneBank grouped these isolates into two phylogroups I and II. Group I included isolates from China, Israel, Brazil, Iran, Kenya, South Korea, Turkey, Colombia, Australia, and the USA isolated from soybean, *Arachis pintoi*, and peanut. Group II were consisted of two isolates from Zambia (*Phaseolus vulgaris*). The Iranian isolate (PeMoV-soya) was placed in Group I and formed a clade with isolates from Kenya, South Korea, and Turkey. Based on phylogenetic analysis, the results showed that isolates from different hosts with different geographical origins belonged to the same phylogenetic group and probably shared a common ancestor. It indicates that geographical distribution and host do not play a role in grouping of Iranian isolate. Accordingly, it can be assumed that the multiple transmissions from one host to another (peanuts, beans, and

1 and 2- Former Ph.D. Student of Plant Pathology and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, respectively.

(\* - Corresponding Author Email: [mehrvar@um.ac.ir](mailto:mehrvar@um.ac.ir))

soybeans) or host jumping, has led to the accumulation of mutations in its coating protein gene. In the study of motifs in this region (CP), the functional DAA motif at the amino terminus of the PeMoV coat protein replaced the DAG motif which is involved in aphid transmission. All PeMoV isolates contain the DAA motif, allowing their identification. A repetitive conserved sequence (EK)<sub>3</sub> was observed upstream of this motif. PeMoV isolates (distributed across Africa, Asia, and the United States) may be geographically widespread due to this conserved sequence. In bioassay, there was a limited host range for this isolate, which was limited to soybean (Williams 82 and Essex) and peanut.

### Conclusion

For effective disease management, viruses must be correctly identified. Virus detection and disease management are difficult as viruses can evolve and produce molecular and biological variations. A well-established approach that is usually used when a new virus-like disease appears is to test for known viruses. PCR is the most widely used technique for detection of plant viruses. Based on the results of this study, the presence of the peanut mottle virus was confirmed in soybean fields in the north of Iran using the RT-PCR test. Based on the CP gene, the molecular characteristics of the virus were determined. According to this, unlike mutations, recombination plays no role in the evolution of the new PeMoV. Since the *Peanut mottle virus* can infect peanut plants, soybeans, beans, and most legumes, avoiding cultivating soybeans, peanuts, and beans close to each other will assist in management of the disease. Using integrated cultivation and avoiding crofting will effectively reduce the creation of recombinant isolates and appearance of the resistance-breaking isolates.

**Keywords:** PeMoV, Phylogeny, *Potyvirus*, Soybean

مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱، ص. ۳۱۲-۳۰۱

## شناسایی مولکولی و بررسی جایگاه تبارزایی ویروس پیسک بادامزمینی در مزارع سویای شمال ایران

جواد رمضانی اول ریایی<sup>۱</sup> - محسن مهرور<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۴

### چکیده

ویروس پیسک بادامزمینی (*Peanut mottle virus, PeMoV*) یک پوتی‌ویروس است که می‌تواند علاوه بر بادامزمینی، با سویا و برخی حبوبات دیگر نیز سازگار شود. این ویروس در بادامزمینی و سویا خسارت قابل توجهی ایجاد می‌کند و از طریق بذرها، آلوده بادامزمینی و شته‌های ناقل به روش ناپایا به گیاهان سالم بادامزمینی و سویا منتقل می‌شود. طی فصل زراعی ۱۳۹۹، تعداد ۱۳۲ نمونه برگی دارای نشانه‌های مشکوک به ویروس شامل موزائیک، پیسک، بدشکلی، کوتولگی، زردی و چروکیدگی برگ، از مزارع سویا در دو استان مازندران و گلستان جمع‌آوری و آران‌ای کل با استفاده از کیت پرومگا استخراج و دی‌ان‌ای کامل ساخته شد. در ادامه، با استفاده از آغازگرهای دژنره مربوط به نواحی ژنومی *cylindrical inclusion (CI)* و *helper component proteinase (HC-Pro)* پوتی‌ویروس‌ها و جفت آغازگر اختصاصی پروتئین پوششی (*coat protein, CP*) ویروس پیسک بادامزمینی، قطعاتی به طول ۷۰۰ و ۱۴۵۰ جفت باز تکثیر شد. توالی‌یابی سنگر محصول پی‌سی‌آر و بلاست نوکلئوتیدی، وجود این ویروس را در سویا تأیید نمود. نتیجه به‌دست‌آمده نشان داد که ناحیه پروتئین پوششی این جدایه در سطح نوکلئوتیدی، به میزان ۸۸/۵۶ تا ۹۵/۸۰ درصد با توالی‌های دیگری از *PeMoV* در *GenBank*، شباهت دارد. این جدایه، با نام *PeMoV-soya* و رس شمار *MW464637* در *GenBank* ثبت شد. بررسی روابط تبارزایی با روش حداقل تکامل بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین پوششی نشان داد که جدایه‌های مختلف *PeMoV* در دو گروه تبارزایی قابل تفکیک بوده و جدایه *PeMoV-soya* در گروه I تبارزایی و در کنار جدایه‌هایی از کنیا، کره جنوبی و ترکیه قرار گرفت. در جدایه *soya* نیز مانند سایر جدایه‌های *PeMoV*، موتیف DAG در پروتئین پوششی با موتیف DAA جایگزین شده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که *PeMoV-soya* دارای دامنه میزبانی محدودی در میان گیاهان خانواده *Fabaceae* است.

واژه‌های کلیدی: پوتی‌ویروس، تبارزایی، سویا، *PeMoV*

### مقدمه

(1989). در ایران، این گیاه در سال ۱۳۴۲، توسط گروه صنعتی بهشهر در مازندران کشت شد. بیشترین سطح زیر کشت سویای جهان، در قاره آمریکا وجود دارد و آسیا، اروپا و آفریقا در رتبه‌های بعدی قرار دارند. ایالات متحده آمریکا با ۸۷/۱ درصد، بالاترین رتبه تولید جهانی سویا را به خود اختصاص داده است. در آسیا، هندوستان با بیش از یازده میلیون و چین با بیش از هشت میلیون هکتار، بزرگ‌ترین کشورهای تولیدکننده‌های سویا می‌باشند. بر اساس آمار نامه کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، در سال زراعی ۹۸-۹۷، سطح زیر کشت سویا در دو استان گلستان و مازندران، به ترتیب، ۱۵۵۰۰ و ۳۶۴۰ هکتار بوده است (Ahmadi et al., 2021).

سویا با نام علمی *Glycine max*، یکی از گیاهان دانه روغنی مهم در خانواده *Fabaceae* است. این گیاه، بومی آسیای جنوب شرقی بوده و بالاترین سطح زیر کشت و تولید دانه روغنی و پروتئینی را در جهان به خود اختصاص داده است (Sinclair and Backman, ).

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق دکتری و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

\* - نویسنده مسئول: (Email: mehrvar@um.ac.ir)

DOI: 10.22067/JPP.2022.73939.1067

مدرکی که ثابت کند که ویروس از طریق خاک منتقل می‌شود نیز وجود ندارد (Bock, 1973; Demski and Harris, 1974).

مطالعات نشان داده است که گیاهان سویای آلوده‌شده با این ویروس، نشانه‌های موزاییک، پیسک، زردی و کوتولگی را نشان می‌دهند (Lim et al., 2014).

در ایران، این ویروس قبلاً توسط گلنراقی و همکاران با استفاده از روش سرولوژیکی الیزا از مزارع سویای گرگان گزارش شده است (Golnaraghi et al., 2004). قبل از ظهور روش‌های مولکولی، محققین از معیارهایی از جمله نوع میزبان، نشانه‌های مشاهده‌شده در مزرعه و روش‌های سرولوژیکی برای شناسایی و توصیف ویروس‌ها استفاده می‌کردند. در حال حاضر از روش‌های مولکولی مختلف و همچنین، فناوری‌های نسل جدید تعیین توالی برای شناسایی ویروس‌ها و سویه‌های مختلف آن‌ها به فراوانی استفاده می‌شود. استفاده از اطلاعات مربوط به بخشی از ژنوم یا ژنوم کامل ویروس، به عنوان معیاری برای تعیین گونه‌های ویروسی مطرح شده است (Wylie et al., 2017). مطالعات گذشته بیان داشته است که پروتئین پوششی ویروس، یکی از نواحی ژنومی است که با توجه به حفاظت‌شدگی بالای توالی‌های آن و نیز وجود تعداد زیادی اپی‌توپ اختصاصی پوتی‌ویروس‌ها در این ناحیه از اهمیت بالایی برخوردار است (Baradar et al., 2020).

در این مطالعه با توجه به مشاهده نشانه‌های ویروس پیسک بادام‌زمینی (موزاییک، پیسک، زردی و کوتولگی) در مزارع سویای شمال کشور باهدف شناسایی مولکولی و بررسی جایگاه تبارزایی این جدایه تعیین ترادف ناحیه ژنومی پروتئین پوششی ویروس انجام شده و با مقایسه آن با سایر جدایه‌های موجود در GenBank جایگاه تبارزایی آن مشخص شد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری و جمع‌آوری گیاهان سویای دارای نشانه‌های

#### ویروسی

در طول فصل زراعی (اردیبهشت تا مهرماه) سال ۱۳۹۹ مناطق عمده کشت سویا در دو استان شمالی ایران (گلستان و مازندران) مورد پایش و نمونه‌برداری قرار گرفت. تعداد ۱۳۲ نمونه برگ دارای نشانه‌های مشکوک ویروسی (شکل ۱) از مناطق عمده کشت سویا در استان‌های گلستان و مازندران جمع‌آوری شد (جدول ۱). نمونه‌ها داخل کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار قرار داده شده، مشخصات جغرافیایی محل جمع‌آوری روی آن‌ها نوشته شد. کیسه‌ها روی یخ داخل یخدان یونولیتی (به ابعاد ۱۹×۲۳/۵×۴۲) قرار داده شده، برای مراحل بعدی مطالعه به آزمایشگاه و دمای چهار درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

عوامل زنده و غیرزنده زیادی وجود دارند که می‌توانند روی کیفیت محصول سویا تأثیرگذار باشند (Khalil et al., 2001). تخمین زده می‌شود که عواملی مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتودها و ویروس‌ها قادرند در مجموع، ۱۲ درصد از کل محصول یک سال سویا را از بین ببرند (Dunleavy et al., 1966). در بین این عوامل، بعد از قارچ‌ها، ویروس‌ها نقش مهمی در کاهش محصول دارند. نیمی از اپیدمی‌های بیماری‌های گیاهی، مربوط به ویروس‌ها است (Strange and Scott, 2005). بیماری‌های ویروسی علاوه بر این که باعث آسیب مستقیم به میزبان می‌شوند، گیاه را نسبت به حمله بیمارگرهای ثانویه، مستعد می‌کنند (Hull, 2013).

تاکنون، چندین ویروس آلوده‌کننده سویا، از دنیا و ایران گزارش شده‌اند. مهم‌ترین این ویروس‌ها عبارت‌اند از: ویروس موزاییک سویا (*Soybean mosaic virus; SMV*)، ویروس موزاییک یونجه (*Alfalfa mosaic virus; AMV*)، ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus; CMV*)، ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus; BYMV*)، ویروس معمولی لوبیا (*Bean common mosaic virus; BCMV*)، ویروس پیسک بادام‌زمینی (*Peanut mottle virus; PeMoV*)، ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus; TSWV*)، ویروس لکه حلقوی توتون (*Tobacco ringspot virus; TRSV*)، ویروس رگه‌ای توتون (*Tobacco streak virus; TSV*) و ویروس غلاف پیسکی لوبیا (*Bean pod mottle virus; BPMV*) (Golnaraghi et al., 2002). در بین این‌ها، ویروس‌های متعلق به جنس پوتی‌ویروس، فراوان‌تر هستند (Golnaraghi et al., 2004).

ویروس PeMoV، متعلق به جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* بوده و دارای ژنوم آر آن ای تک‌لای مثبت با پیکره رشته‌ای خمش‌پذیر به طول تقریبی ۷۴۰ تا ۷۵۰ نانومتر است. این ویروس، توسط چندین گونه شته به صورت ناپایا و مایه‌زنی مکانیکی منتقل می‌شود. این ویروس، اولین بار در سال ۱۹۶۵ از بادام زمینی (*Arachis hypogaea*) در ایالت جورجیای آمریکا شناسایی و گزارش شد. انتقال آن از طریق بذر بادام‌زمینی نیز گزارش شده است (Kuhn, 1965). علاوه بر بادام‌زمینی، این ویروس قادر به آلوده نمودن سویا (*Glycine max*)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، نخودفرنگی (*Pisum sativum*) و گونه‌های مختلف درختی از جنس *Cassia* می‌باشد (Shahraeen and Bananej, 1995). با توجه به اینکه PeMoV در بادام‌زمینی از طریق بذر قابل انتقال است در تمام مناطق کشت بادام‌زمینی قابل مشاهده است (Demski and Kuhn, 1977). انتقال این ویروس از طریق بذر بادام‌زمینی نتیجه آلودگی جنین بذر بوده و ویروس از پوشش بذر یا لپه‌ها جداسازی نشده است (Adams and Kuhn, 1977). مطالعات باک، دمیسکی و هریس نشان داد که PeMoV از طریق بذر سویا منتقل نمی‌شود. همچنین،



شکل ۱- نشانه‌های بدشکلی، موزائیک، پیسک و زردی همراه با ویروس پیسک بادام زمینی مشاهده شده در مزارع سویای شمال ایران  
Figure 1- The symptoms of deformation, mosaic, mottling and yellowing associated with *Peanut mottle virus* observed in the soybean fields in the north of Iran

جدول ۱- مناطق عمده نمونه برداری از مزارع سویا در شمال ایران  
Table 1- The major areas of soybean sampling in the north of Iran

نام استان Province	شهرستان / شهر County	روستا Vilage	تعداد نمونه Number of sample	توضیحات Description
	گرگان Gorgan		5	ایستگاه تحقیقات کشاورزی عراقی محله Agricultural Research Station of Araghimahaleh
	گرگان Gorgan		17	ارقام عمده سویای کشت شده در استان: گرگان ۳، کتول، سامان، سحر، دی بی ایکس Major Varieties of soybean cultivated in the province: Gorgan3, Katool, Saman, Sahar, dpx
گلستان Golestan	گرگان Gorgan	مرزن کلاته Marzankalateh	14	
	گرگان Gorgan	میان آباد Meianabad	13	
	گرگان Gorgan	شصت کلاته Shastkelateh	10	
	جلین Jelin		14	
	سرخنگلاته Sorkhankalateh		12	
	کالاله Kalaleh		9	
	کردکوی Kordkooy	بالاچاده Balachadeh	6	
مازندران Mazandaran	ساری Sari		15	ارقام عمده سویای کشت شده در استان: ساری، تپور، ویلیامز Major Varieties of soybean cultivated in the province: Sari, Tapour, Williams
	دشت ناز Dasht e naz		7	
	ساری Sari	بادله Badleh	10	
جمع کل نمونه‌ها Total of samples			132	

ویروسی (بدشکلی برگ، موزائیک، زردی و چروکیدگی سطح برگ) را نشان می‌دادند انتخاب شدند. از هریک از این ده نمونه برگ، قطعات کوچک (disk) تهیه و با هم تلفیق (pooling) شدند. مقدار نیم گرم از قطعات برگ تلفیق شده انتخاب و برای استخراج RNA کل، از

استخراج آر ان ای کل، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) و توالی‌یابی سنگر

از بین ۱۳۲ نمونه برگ دارای نشانه‌های مشکوک به این ویروس، در مجموع تعداد ۱۰ نمونه برگ که نشانه‌های مختلف

بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Promega, USA) برای انجام شد. براین اساس، مقدار ۳ میکرولیتر از حجم نهایی آران‌ای کل به ۸ میکرولیتر آب فاقد ریبونوکلاز اضافه شد و به مدت پنج دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  نگهداری و سپس بلافاصله به روی یخ انتقال داده شد. سایر مواد مورد نیاز شامل ۴ میکرولیتر از بافر RT (5x buffer)، یک میکرولیتر از آغازگر تصادفی (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTPs (10 mM) و ۲ میکرولیتر از آنزیم RT، روی یخ به محلول بالا اضافه شد. مخلوط RT در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه،  $47^{\circ}\text{C}$  به مدت یک ساعت و در پایان به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  برای غیرفعال کردن آنزیم RT نگهداری شد.

cDNA سنتز شده، با استفاده از آزمون PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در حضور آنزیم Taq DNA Polymerase و با کمک آغازگرهای دژنره HC-Pro و CI جنس پوتی‌ویروس و اختصاصی پروتئین پوششی (CP) PeMoV (جدول ۲) تکثیر شد.

کیت پرومگا بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Promega, USA) استفاده شد. برای بررسی کمی و کیفی RNA، از دستگاه طیف‌سنج نوری (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, USA) و همچنین ژل آگارز با غلظت یک درصد و نیز ده درصد از ماده رنگ‌آمیزی ایمن اسیدهای نوکلئیک (DNA Green Viewer<sup>TM</sup>, ParsTous) استفاده شد. فرایند الکتروفورز با استفاده از سیستم الکتروفورز یکپارچه (شرکت دانش‌بنیان سلول بافت زیست، شماره کاتالوگ SB-14001) با ولتاژ ۱۱۰ ولت و به مدت نیم ساعت اجرا شد. در پایان، باندهای مربوط به آران‌ای‌های ریبوزومی (18S rRNAs و 28S) زیر نور آبی دستگاه مشاهده و بررسی شد. برای ساخت رشته مکمل دی‌ان‌ای، از RNA کل استخراج شده از نمونه‌های برگ‌ی سویای دارای نشانه‌های ویروسی و سالم استفاده شد. فرایند ساخت در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در حضور آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Thermo-resistant H M-MuLV (200u/ $\mu\text{l}$ ) ParsTous) و آغازگر تصادفی شش نوکلئوتیدی (یکتا تجهیز آزما) و

جدول ۲- جفت آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 2- The primer pairs used in this study

ویروس/ژن Gene/Virus	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence (5'→3')	اندازه قطعه Amplicon size (bp)	دمای اتصال Annealing temperature	منبع Reference
CI/potyvirus	CIFor	GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIC	~700	40	(Ha et al., 2008)
	CIRev	ACICCRTTYTCDATDATRTTIGTIGC			
HC-Pro/potyvirus	HPFo	TGYGAYAAAYCARYTIGAYIIIAAYG	~700	40	(Ha et al., 2008)
	HPRev	GAICCRWAIGARTCIAIIACRTG			
CP/PeMoV	pmvF*	TGAGCAGGAAAGAATTGTGTC	1449	50	(Lim et al., 2014)
	pmvR	GGAAGCGATATACACACCAAC			

- در توالی این آغازگرها: D= A/G/T و S= C/G، V= A/C/G، W= A/T، R= G/A، Y= C/T، I= inosine

\* در این مطالعه، نوکلئوتید T در آغازگر اولیه، به نوکلئوتید G تغییر داده شد.

- In the sequence of this primers: I=inosine, Y= C/T, R= G/A, W=A/T, V= A/C/G, S= C/G and D=A/G/T

\* In this study nucleotide T in original primer was substituted with nucleotide G.

جهت خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت ماکروژن (سئول، کره جنوبی) ارسال شد. نمونه قبل از ارسال بر اساس دستورالعمل شرکت ماکروژن آماده‌سازی شد.

### بررسی روابط تبارزایی و جایگاه تاکسونومیک جدایه

#### PeMoV-soya بر اساس توالی پروتئین پوششی

برای تجزیه و تحلیل تبارزایی (phylogenetic analysis)، ابتدا توالی نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین پوششی جدایه‌های مختلف PeMoV از GenBank به دست آمد. توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی جدایه‌ها با شباهت بالا و با تکیه بر انتشار آنها در نشریات معتبر علمی، به همراه توالی نوکلئوتیدی کامل پروتئین پوششی جدایه PeMoV-soya و توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی ویروس آبله آلو (*Plum pox virus*, PPV) [M92280.1] به‌عنوان یک توالی

برای این منظور، ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, Ampliqon, Odense, Denmark) یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) و در نهایت ۳ میکرولیتر از cDNA، مخلوط و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Peltier-based Thermal Cycler, UK) در سه مرحله شامل: مرحله یک، واسرشت‌سازی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای  $94^{\circ}\text{C}$ ؛ مرحله دو (۳۵ چرخه)، واسرشت‌سازی به مدت سی ثانیه در دمای  $94^{\circ}\text{C}$ ، اتصال به مدت ۴۰ ثانیه در دمای  $40^{\circ}\text{C}$  برای جفت آغازگرهای دژنره و  $50^{\circ}\text{C}$  برای جفت آغازگر CP و بسط به مدت دو دقیقه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  و مرحله سه، بسط نهایی به مدت ده دقیقه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  انجام شد.

محصول PCR قبل از توالی‌یابی سنگر ابتدا روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد و پس از اطمینان از وجود تک باند موردنظر

استفاده از آغازگرهای دژنره پوتی‌ویروس‌ها (CI و HC-Pro) و همچنین، آغازگرهای اختصاصی پروتئین پوششی ویروس PeMoV وجود این ویروس را در نمونه‌های سویا اثبات کرد که این نتایج هم راستا با نتایج حاصل از مطالعات ها و همکاران و لیم و همکاران است (Ha et al., 2008; Lim et al., 2014). بلاست نوکلئوتیدی داده‌های حاصل از تعیین توالی قطعه دی‌ان‌ای پروتئین پوششی این ویروس، بیشترین یکسانی (۹۵/۸۰ درصد) با جدایه Liaoning از کشور چین (رس شمار MH270528) و کمترین یکسانی (۸۸/۵۶ درصد) با جدایه CP415-56 از کشور زامبیا (رس شمار MT900844) نشان داد. پس از مشخص شدن توالی نوکلئوتیدی منطقه تکثیر شده پروتئین پوششی ویروس، این توالی با رس شمار GenBank در MW464637 ثبت شد.

### تجزیه و تحلیل تبارزایی و جایگاه تاکسونومیک PeMoV-soya

در این جدایه‌ها، بهترین مدل جانمایی برای رسم درخت تبارزایی بر اساس رج‌بندی توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه پروتئین پوششی برآورد شده با برنامه مدل‌یاب موجود در نرم‌افزار مگا، مدل T93+I (Tamura-Nei) بود. درخت تبارزایی حاصل از رج‌بندی ژن پروتئین پوششی جدایه PeMoV-soya با توالی‌های متناظر آن در ۱۶ جدایه ثبت شده از PeMoV در GenBank، این جدایه‌ها را در دو گروه تبارزایی I و II قرار داد (شکل ۳).

گروه I، شامل جدایه‌هایی از چین، اسرائیل، برزیل، کنیا، کره جنوبی، ترکیه، کلمبیا، استرالیا، مکزیک، ایران و ایالات متحده آمریکا بود که از میزبان‌های بادام‌زمینی، pinto peanut (*Arachis pintoi*) و سویا جداسازی شده بودند. جدایه ایرانی شناسایی شده در این پژوهش (PeMoV-soya)، در گروه I تبارزایی به همراه جدایه‌هایی از کنیا، کره جنوبی و ترکیه یک کلاد را تشکیل دادند. در مطالعه قبلی انجام شده در ایران توسط بیک‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۵، جدایه PeMoV-IR در میزبان بادام‌زمینی از ایران گزارش شد. در مطالعه مذکور، آنالیز تبارزایی بر اساس رج‌بندی توالی‌های آمینواسیدی پروتئین پوششی، جدایه‌های PeMoV را در دو گروه تبارزایی طبقه‌بندی کرد که احتمالاً تا حدودی با منشأ جغرافیایی و میزبان طبیعی آن‌ها در ارتباط بود. نتایج آنالیز تبارزایی در پژوهش مذکور نشان داد که جدایه ایرانی، استرالیایی، اسرائیلی و آمریکایی PeMoV در یک گروه قرار گرفته و ممکن است جد مشترکی داشته باشند (Beikzadeh et al., 2015).

برون‌گروه (outgroup) برای رج‌بندی و بررسی جایگاه تبارزایی استخراج و ذخیره شدند. رج‌بندی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MAFFT version 7 (الگوریتم G-INS-i) انجام شد (Kato et al., 2019). برای شناسایی بهترین مدل ساخت درخت از برنامه مدل‌یاب موجود در نرم‌افزار مگا کمک گرفته شد. کمترین نمره معیار اطلاعات بی‌زی (BIC) [Bayesian information score] به‌عنوان بهترین مدل ساخت درخت انتخاب شد. درخت تبارزایی با استفاده از روش حداقل تکامل (Minimum Evolution) با نرم‌افزار MEXA X (Kumar et al., 2018) براساس مدل Tamura-Nei با ۱۰۰۰ تکرار حمایت بوت‌استرپ رسم شد. درخت رسم شده، با بکاربردن برنامه (iTOL) interactive Tree Of Life (itol.embl.de) v4 به‌صورت گرافیکی ویرایش شده و با استفاده از نرم‌افزارهای (Adobe Illustrator (version 25.1.0.90, 2021) و Microsoft Paint 3D به تصویر کشیده شدند.

### آزمایش زیستی (Bioassay) و تعیین دامنه میزبانی (host range)

بهدف مطالعه خصوصیات زیستی و تعیین دامنه میزبانی جدایه PeMoV-soya بذرهای گیاهان از خانواده‌ها و ارقام مختلف گیاهی از شرکت‌های معتبر داخلی از جمله شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی (تکاتو) تهیه و در گلدان‌های پلاستیکی دارای خاک پیت ماس ضد عفونی شده با قارچ‌کش کشت شدند (جدول ۳). گلدان‌ها در دمای ۲۲ تا ۲۵°C و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاهچه‌های تولید شده از این بذرها، بسته به نوع و خانواده گیاهی در مراحل رشدی متفاوت، با عصاره گیاهی به‌دست‌آمده از برگ‌های سویای دارای نشانه‌های ویروسی مایه‌زنی شدند. در هر مورد گیاهچه‌های یک گلدان به‌عنوان شاهد مایه‌زنی نشدند. برای تهیه عصاره گیاهی از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=7) استفاده شد. گیاهچه‌ها قبل از مایه‌زنی، با پودر کاربوراندوم (۶۰۰ مش) گردپاشی شدند.

### نتایج و بحث

#### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) و توالی‌یابی سنگر

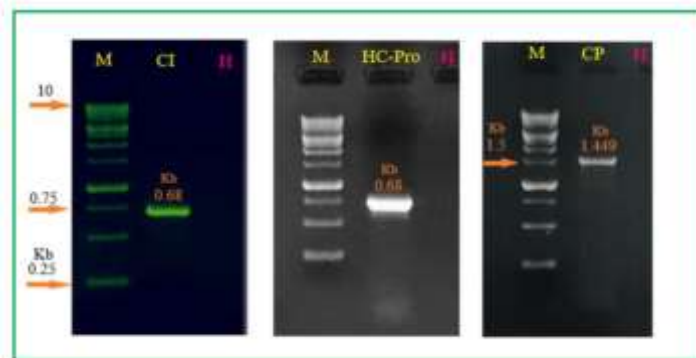
آزمون RT-PCR با آغازگرهای دژنره و اختصاصی پروتئین پوششی PeMoV قطعه‌هایی به‌اندازه حدود ۷۰۰ و ۱۴۵۰ جفت بازی تکثیر کرد، درحالی‌که در محصول پی‌سی‌آر تکثیر شده از گیاه سالم هیچ قطعه تکثیری مشاهده نشد (شکل ۲).

نتایج به‌دست‌آمده از تعیین توالی محصولات آزمون RT-PCR با

جدول ۳- نتایج زیست‌سنجی ویروس بیسک بادام‌زمینی در گیاهان مختلف  
Table 3- Bioassay results of PeMoV in different plants

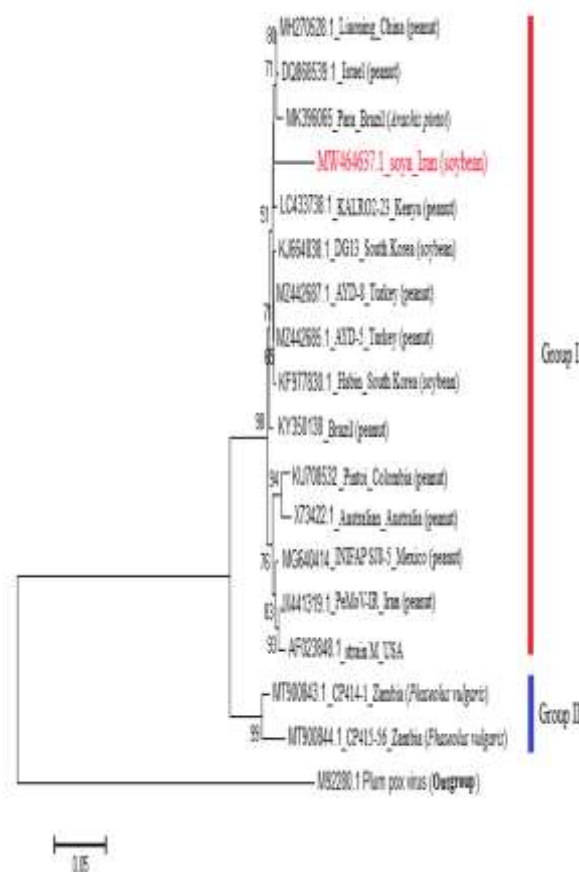
نام علمی Scientific name	نتایج Results	رقم Cultivar	نوع آلودگی Infection type
	+	Williams 82	حساس Susceptible
	+	Essex	حساس Susceptible
	-	سامان Saman	مقاوم Resistance
<i>Glycine max</i>	-	امیر Amir	مقاوم Resistance
	-	کتول Katoool	مقاوم Resistance
	-	سحر Sahar	متحمل Tolerance
	-	گرگان ۳ Gorgan3	متحمل Tolerance
<i>Vicia faba</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Pisum sativum</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Lens esculinaris</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Wisteria sinensis</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Arachis hypogaea</i>	+		حساس Susceptible
<i>Physalis sp.</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Solanum nigrum</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Solanum dulcamara</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	Samsun	مقاوم Resistance
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	Xanthi	مقاوم Resistance
<i>Nicotiana rustica</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Datura stramonium</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Datura metel</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Chenopodium quinoa</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Beta vulgaris</i>	-		مقاوم Resistance
<i>Cucumis melo</i>	-	agrestis	مقاوم Resistance
<i>Gossypium herbaceum</i>	-	Khordad	مقاوم Resistance





شکل ۲- الگوی الکتروفورزی نتایج به دست آمده از آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره HC-Pro و CI جنس پوتی ویروس و جفت آغازگر اختصاصی پروتئین پوششی PeMoV، در ژل آگارز یک درصد، رنگ آمیزی شده به وسیله DNA green viewer؛ M: 1 kb DNA ladder؛ H: گیاه سالم.

Figure 2- Electrophoretic pattern of RT-PCR results using HC-Pro & CI degenerate primers of *Potyvirus* and CP-specific primer pairs of PeMoV on 1% agarose gel, stained with DNA green viewer; M: 1 kb DNA ladder RTU GeneDirex®, Seoul, Korea; H: Healthy plant.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی ۱۶ جدایه ویروس پیسک بادامزمینی ثبت شده در GenBank و جدایه به دست آمده از پژوهش حاضر به روش حداقل تکامل با استفاده از نرم افزار مگا ۱۰، بوت استرپ ۱۰۰۰ و مدل T93+I. مقادیر بوت استرپ کمتر از ۵۰ روی گره ها نشان داده نشده است. جدایه ویروس آبله آلو به عنوان برون گروه استفاده شده است.

Figure 3- Phylogenetic tree constructed based on CP nucleotide sequence of the 16 isolates deposited in GenBank, and the isolate obtained from this study by Minimum-evolution method using Mega 10 software, bootstrapping 1000 and T93+I model. Nodes with bootstrap values less than 50 have not shown. *Plum pox virus* isolate has been used as an outgroup virus.

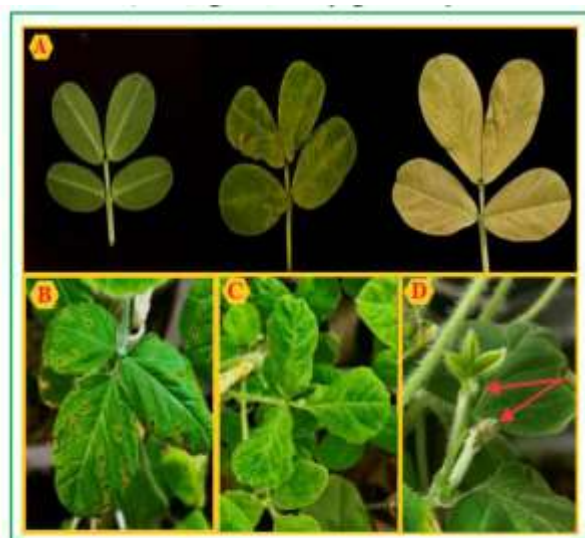
ناهمگونی‌های زیادی در طول آن ایجاد شود. این ویژگی به گسترش جغرافیایی وسیع این ویروس ربط داده شده است. با در نظر گرفتن این ویژگی در پروتئین پوششی جدایه PeMoV-soya، می‌توان گسترش جغرافیایی وسیع جدایه‌های PeMoV (پراکنده‌شده در قاره‌های آمریکا، آسیا و آفریقا) را به این ویژگی ارتباط داد (Srinivasulu and Gopal, 2011). همچنین، موتیف DTG که محل شروع بخش مرکزی پروتئین پوششی (core CP) هست در پروتئین پوششی این جدایه شناسایی شد.

#### زیست‌سنجی و بررسی دامنه میزبانی

دامنه میزبانی این جدایه، محدود به چند رقم از گیاه سویا (Essex و Williams 82) و نیز گیاه بادام‌زمینی بود. نشانه‌های ویروسی همراه با این جدایه در رقم Essex به شکل زخم‌های موضعی نکروتیک در سه برگچه اول و موزائیک، ریزبرگی و خمیده شدن حاشیه برگ‌ها به سمت پایین در سه برگچه‌های بعدی ظاهر شد. گاهی اوقات در بعضی از گیاهچه‌های Essex، مرگ جوانه انتهایی دیده شد. نشانه‌های ویروسی روی گیاه بادام‌زمینی به شکل زخم‌های موضعی کلروتیک و زردی برگ‌ها مشاهده شد (شکل ۴).

هم‌راستا با مطالعه قبلی، در پژوهش حاضر نیز نتایج آنالیز تبارزایی نشان داد که جدایه‌ها با منشأ جغرافیایی و میزبانی مختلف در یک گروه تبارزایی قرار گرفته و احتمالاً جد مشترکی داشته و میزبان و منطقه جغرافیایی در گروه‌بندی جدایه‌های PeMoV بر اساس پروتئین پوششی نقشی ندارند؛ بنابراین، این‌طور می‌توان تصور کرد که انتقال‌های متعدد این ویروس از میزبانی به میزبان دیگر (بادام‌زمینی، لوبیا و سویا) و یا به عبارتی دیگر، پرش میزبانی (host jumping)، منجر به فراوانی جهش در پروتئین پوششی آن و قرار گرفتن جدایه‌ها با میزبان و منشأ جغرافیایی متفاوت، در کنار هم شده است.

در بررسی موتیف‌های این ناحیه، موتیف عملکردی DAA در انتهای آمینی پروتئین پوششی PeMoV جایگزین موتیف DAG شده که در انتقال ویروس با شته نقش دارد. موتیف DAA در همه جدایه‌های PeMoV مشاهده شده و شاخصی برای شناسایی این جدایه‌ها است (Spiegel et al., 2008). در بالادست این موتیف، توالی حفاظت‌شده تکراری  $(EK)_3$  مشاهده شد. وجود تعداد زیادی از این جعبه‌های EK در انتهای آمینی پروتئین پوششی ویروس لکه حلقوی خربزه درختی (*Papaya ringspot virus, Potyviridae*) نیز گزارش شده است. این توالی‌های تکراری باعث شده است که این ناحیه مانند یک آکاردئون، گسترش یافته و



شکل ۴- علائم همراه با ویروس پیسک بادام‌زمینی روی برگ‌های بادام‌زمینی (A) و سویا (B، C و D) در شرایط گلخانه  
Figure 4- PeMoV-associated symptoms on the peanut (A) and soybean (B, C and D) leaves at greenhouse condition

مایه‌زنی شده ممکن است بسته به سویه ویروس، شرایط آب‌وهوایی، رقم کشت شده و مرحله رشدی گیاه میزبان، متفاوت باشد. همچنین،

وجود ویروس در این گیاهان با آزمون RT-PCR تأیید شد. نشانه‌های ویروسی ایجاد شده توسط PeMoV-soya روی گیاهان

نمونه برداری از مزارع سویای شمال کشور، مزارع بادامزمینی در مجاورت مزارع سویا وجود نداشت و تنها مزارع لوبیا مشاهده شد؛ بنابراین، مزارع لوبیای آلوده به PeMoV در مجاورت مزارع سویا را می توان منشأ آلودگی مزارع سویا به این ویروس تصور کرد.

باتوجه به اینکه نشانه های ناشی از آفات و کمبود یا بیش بود مواد غذایی گاهی شبیه نشانه های ویروسی است، شناسایی دقیق گونه ویروسی با استفاده از روش های دقیق مولکولی در کنترل مؤثر آن مفید خواهد بود. جلوگیری از گسترش این ویروس در مزارع سویا توسط شته ها به دلیل انتقال ناپایای آن مشکل است؛ بنابراین، استفاده از روش مدیریت تلفیقی آفات برای کنترل و مدیریت مؤثر این ویروس توصیه می شود. درصد بالای انتقال این ویروس از طریق بذر بادامزمینی قبلاً گزارش شده است؛ بنابراین، قرنطینه قبل از ورود و استفاده از بذره های گواهی شده عاری از ویروس و یا بذره های تولیدشده در مناطق عاری از ویروس توصیه می شود. با در نظر گرفتن اینکه ویروس پیسک بادامزمینی قادر به آلودگی گیاهان بادامزمینی، سویا، لوبیا و بیشتر حبوبات بوده، اجتناب از کشت سویا، بادامزمینی و لوبیا در مجاورت و با فواصل کم از هم در مدیریت این بیماری مفید خواهد بود. کشت یکپارچه و پرهیز از کشت به صورت خرده مالکی در کنترل بهتر این ویروس و کاهش شیوع آن و همچنین کاهش ظهور جدایه های نوترکیب و شکست مقاومت ارقام مقاوم مؤثر خواهد بود.

### سپاسگزاری

از آقای دکتر محمدرضا میرزایی، محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان جنوبی، به خاطر کمک های علمی ایشان، قدردانی می گردد.

دماهای بالا ممکن است باعث بروز نشانه های ویروسی مختلف و توسعه نشانه های نکروز در برگ ها شود. مطالعات قبلی نشان داده اند که گیاهان بادامزمینی که به مدت یک ماه در دمای  $16^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند، نشانه های نکروز در آنها ظاهر نشد، ولی زمانی که دما به  $26^{\circ}\text{C}$  تا  $32^{\circ}\text{C}$  افزایش داده شد، نشانه های نکروز در آنها مشاهده شد (Beikzadeh et al., 2015).

تحقیقات انجام شده در ویروس های آلوده کننده سویا نشان داده است که PeMoV در سویا بذرزاد نیست (Demski and Harris, 1974)؛ بنابراین، در طبیعت این ویروس بایستی توسط سایر عوامل انتقال از جمله ناقلین شته ای از مزارع بادامزمینی و لوبیای مجاور و گیاهان بادامزمینی خودرو آلوده به این ویروس، به مزارع سویا منتقل و با آن سازگار شده باشد. مطالعات قبلی نشان داده اند که این ویروس می تواند از طریق شته های *Aphis craccivora* و *Myzus persicae* از بادامزمینی به سویا منتقل شود. کارایی انتقال از بادامزمینی به بادامزمینی بیشتر از بادامزمینی به سویا است. میزان انتقال از بادامزمینی به بادامزمینی،  $25$  تا  $55$  درصد و از بادامزمینی به سویا  $3$  تا  $17$  درصد تخمین زده شده است. به همین علت، گسترش PeMoV در مزارع سویا، در مقایسه با مزارع بادامزمینی کمتر است (Demski and Kuhn, 1977). آزمایش های قبلی نشان داده اند که گسترش PeMoV در مزرعه از بادامزمینی به سویا، سویا به بادامزمینی و یا سویا به سویا فقط در فواصل کوتاه (تا  $12$  متر) به راحتی امکان پذیر هست. بعد از  $12$  متر، گسترش خیلی کمتر شده و فراوانی ویروس بسیار کمتر مشاهده می شود. نتایج این آزمایش ها، ارتباط نزدیک بین فاصله از منبع PeMoV و درصد گیاهان آلوده به این ویروس را نشان می دهد (Demski et al., 1975). با در نظر گرفتن نتایج این آزمایش ها و باتوجه به اینکه در مناطق

### منابع

- Adams, D., & Kuhn, C. (1977). Seed transmission of *Peanut mottle virus* in peanuts. *Phytopathology* 67(9): 1126-1129.
- Ahmadi, K., Ebadzadeh, H.R., Hatami, F., Mohammadnia Afroozi, S., Esfandiari-pour, E., & Abbas-Taghani, R. (2021). *Iran Agricultural Statistics of 2019-2020*, Vol 1: Field Crops (In Persian). Ministry of Agriculture, Statistics and Information Technology Office, Tehran, Iran.
- Baradar, A., Hosseini, A., Abdani Babaki, S., & Hosseini Farhangi, S.A. (2020). Structure and phylogenetic analysis of the coat protein of *Bean yellow mosaic virus* isolates from Iranian faba bean farms. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 51(1): 147-159. <https://dx.doi.org/10.22059/ijpps.2020.299695.1006933>.
- Beikzadeh, N., Hassani-Mehraban, A., & Peters, D. (2015). Molecular identification of an isolate of *Peanut mottle virus* (PeMoV) in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 17(3): 765-776.
- Bock, K. (1973). *Peanut mottle virus* in East Africa. *Annals of Applied Biology* 74(2): 171-179. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1973.tb07736.x>.
- Demski, J., Smith, D., & Kuhn, C. (1975). Incidence and distribution of *Peanut mottle virus* in peanut in the United States. *Peanut Science* 2(2): 91-93. <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-2-2-14>.
- Demski, J.W., & Harris, H. (1974). Seed transmission of viruses in soybean. *Crop Science* 14(6): 888-890. <https://doi.org/10.2135/cropsci1974.0011183X001400060034x>.
- Demski, J.W., & Kuhn, C.W. (1977). A soybean disease caused by the *Peanut mottle virus*. *Research Bulletin-Georgia Experiment Station (USA)*.

9. Dunleavy, J.M., Ross, J.P., & Chamberlain, D.W. (1966). Soybean diseases. *Agricultural Research Service, US Department of Agriculture*.
10. Golnaraghi, A., Shahraeen, N., Pourrahim, R., Farzadfar, S., & Ghasemi, A. (2002). First report of the natural occurrence of eight viruses affecting soybeans in Iran. *Plant Pathology* 51(6): 794-794.
11. Golnaraghi, A., Shahraeen, N., Pourrahim, R., Farzadfar, S., & Ghasemi, A. (2004). Occurrence and the relative incidence of viruses infecting soybeans in Iran. *Plant Disease* 88(10): 1069-1074. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.10.1069>.
12. Ha, C., Coombs, S., Revill, P.A., Harding, R.M., Vu, M., & Dale, J.L. (2008). Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of Virology* 153(1): 25-36. (In eng). <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1053-7>.
13. Hull, R. (2013). *Plant virology*. Academic Press.
14. Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K.D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20: 1160-1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.
15. Khalil, S., Erskine, W., & No, G.L. (2001). Combating disease problems of grain legumes in Egypt. *Grain Legumes* 32: 24-26.
16. Kuhn, CW. (1965). Symptomatology, host range, and effect on yield of a seed-transmitted Peanut virus. *Phytopathology* 55(8): 880-884.
17. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549. (In eng). <https://doi.org/10.1093%2Fmolbev%2Fmsy096>.
18. Lim, S., Lee, Y.-H., Igori, D., Zhao, F., Yoo, R., Lee, S.-H., Baek, I., & Moon, J.S. (2014). First report of *Peanut mottle virus* infecting soybean in South Korea. *Plant Disease* 98(9): 1285-1285. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0356-PDN>.
19. Shahraeen, N., & Bananej, K. (1995). Occurrence of *Peanut mottle virus* in Gorgan province. In *proceeding of the 12<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress 2-7 September 1995 Karaj (Iran Islamic Republic)*
20. Sinclair, J.B., & Backman, P. (1989). *Compendium of soybean diseases*. American Phytopathological Society.
21. Spiegel, S., Sobolev, I., Dombrovsky, A., Gera, A., Racciah, B., Tam, Y., Beckelman, Y., Feigelson, L., Holdengreber, V., & Antignus, Y. (2008). Note: Characterization of a *Peanut mottle virus* isolate infecting peanut in Israel. *Phytoparasitica* 36(2): 168-174. <https://doi.org/10.1007/BF02981329>.
22. Srinivasulu, M., & Gopal, D.S. (2011). Coat protein sequence comparison of south Indian isolates of *Papaya ringspot virus* with other Indian subcontinent isolates. *Phytopathologia Mediterranea* 50(3): 359-367.
23. Strange, R.N., & Scott, P.R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* 43: 83-116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>.
24. Wylie, S.J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., López-Moya, J.J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., & Wang, A. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae. *The Journal of general virology* 98(3): 352. <https://doi.org/10.1099%2Fjgv.0.000740>.