

Molecular characterization of Iranian isolates of *Alfalfa mosaic virus* based on movement protein gene

Fereshteh Alipour

Former MSc. student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran E-mail: fereshteh.alipour70@gmail.com

Hossain Massumi

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran E-mail: masoomi@uk.ac.ir

Jahangir Heydarnejad

Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran E-mail: jheydarnejad@uk.ac.ir

Akbar Hosseinipour

Associate professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran E-mail: hosseini@uk.ac.ir

Mohammad Maddahian

Former Ph.D. student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran E-mail: maddahian91@gmail.com

Abstract

Objective

Alfalfa mosaic virus (AMV) is one of the most important plant viruses that has a wide host range and economically is a destructive virus in the world and Iran. The aim of this research is to study the MP gene of Iranian AMV isolates and its application in the phylogenetical analysis and compare it with the CP gene.

Materials and methods

During 2014 to 2017, a number of plant samples including alfalfa and weeds were collected from alfalfa fields in six Iranian provinces. ELISA test using polyclonal antibodies and RT-PCR were employed to check the AMV infection of the samples. Among the AMV infected samples, 20 isolates including 17 from alfalfa and three wild species including *Sonchus oleraceus* L.,

Chenopodium amaranticolor L. and *Plantago ovate* L. were chosen for phylogenetical analysis based on the sequence of the *MP* gene.

Results

Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of movement protein (MP) gene of AMV including Iranian ($n=20$) and GenBank isolates ($n=15$) showed that all isolates are divided into two group I and II and each group is also divided into two subgroups A and B. The majority of Iranian isolates were placed in group II. All abroad and two Iranian isolates (Accession numbers: KX535454 and KX535456) were placed in subgroup IA, and subgroup IB is limited to three Iranian isolates (Accession numbers: KX535460, KX535458 and KX535462). Whereas based on the part of the nucleotide sequence of the *MP* gene (468nt), most of Iranian isolates, together with one Spanish isolate (JQ691163) were clustered in a new subgroup (IIB).

Conclusions

According to the results of this study, it seems that the *MP* gene can be used to analyze the phylogenetic relationships between AMV isolates. Since the origin of AMV is from Far-East and central Asia and due to the host variability of the virus in these regions, AMV probably has a high genetic diversity in Iran.

Keywords: Alfalfa mosaic virus, Indirect ELISA, movement protein.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Alipour F, Massumi H, Heydarnejad J, Hosseinipour A, Maddahian M (2021) Molecular characterization of Iranian isolates of *Alfalfa mosaic virus* based on movement protein gene. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 81-100.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (4), 81-100.

DOI: 10.22103/jab.2021.17934.1328

Received: September 15, 2021.

Accepted: October 20, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

شناسایی و توصیف تبارزائی تعدادی از جدایه‌های ایرنی ویروس موزائیک یونجه مبتنی بر ترادف ژن پروتئین حرکتی

فرشته علی‌پور

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:
fereshteh.alipour70@gmail.com

حسین معصومی

*نویسنده مسئول: استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:
masoomi@uk.ac.ir

جهانگیر حیدرنژاد

استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:
jheydarnejad@uk.ac.ir

اکبر حسینی‌پور

دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:
hosseini@uk.ac.ir

محمد مداحیان

دانش‌آموخته دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:
maddahian91@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۴

چکیده

هدف: ویروس موزائیک یونجه (AMV) یکی از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی در ایران و جهان می‌باشد. هدف از این تحقیق، مطالعه تعدادی از جدایه‌های ایرانی این ویروس بر اساس ترادف ژن *MP* بر روی موقعیت تبارزائی آن‌ها و مقایسه آن با ژن *CP* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۶، از مزارع یونجه شش استان کشور (کرمان، هرمزگان، اصفهان، فارس، خوزستان و گلستان) بازدید گردید و از بوته‌های مشکوک (یونجه و علف هرز) نمونه‌گیری شد. جهت بررسی آلودگی نمونه‌ها، از آزمون الایزا و همچنین RT-PCR استفاده گردید. از بین جدایه‌های بررسی شده، ۲۰ جدایه شامل ۱۷ جدایه از گیاه یونجه و سه جدایه از

علف‌های هرز نام‌های شیرتیغی (*Sonchus oleraceus*. L.)، سلمه‌تره (*Chenopodium amaranticolor*. L.) و بارهنگ (*Plantago ovate* L.) جهت مطالعه مولکولی انتخاب و به دنبال آن موقعیت تاکسونومیک جادیه‌های این ویروس براساس ژنوم کامل پروتئین حرکتی و همچنین ناحیه‌ای از آن مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: رسم درخت تبارزایی بر اساس طول کامل ژن پروتئین حرکتی ویروس نشان داد که جدایه‌ها در دو گروه I و II قرار می‌گیرند که هر گروه نیز به دو زیر گروه A و B تقسیم می‌شوند. اکثر جدایه‌های ایرانی به تنهایی در گروه II واقع گردیده و تمامی جدایه‌های انتخاب شده از بانک ژن به همراه دو جدایه از ایران با رس شماره‌های KX535456 و KX535454 در زیرگروه IA قرار گرفتند. اما زیرگروه IB نیز منحصر به سه جدایه ایرانی (رس شماره‌های KX535462، KX535458 و KX535460) است. در حالیکه براساس درخت تبارزایی بخشی از ژن یاد شده (۴۶۸ نوکلئوتید) اکثر جدایه‌های ایرانی به همراه یک جدایه از اسپانیا (JQ691163) زیر گروه جدیدی را تشکیل دادند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد ترادف ژن پروتئین حرکتی برای تعیین روابط تبارزایی جدایه‌های AMV موفق عمل نمود. از آنجائیکه گیاه یونجه بومی خاور نزدیک و آسیای مرکزی است احتمالاً این ویروس از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی در ایران برخوردار می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ویروس موزائیک یونجه، الی‌زای غیرمستقیم، پروتئین حرکتی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: علی‌پور فرشته، معصومی حسین، حیدرنازاد جهانگیر، حسینی‌پور اکبر، مداحیان محمد (۱۴۰۰) شناسایی و توصیف تبارزایی تعدادی از جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک یونجه مبتنی بر ترادف ژن پروتئین حرکتی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۴)، ۸۱-۱۰۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

ویروس موزائیک یونجه^۱ یکی از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی است که برای اولین بار توسط Weimer et al. (1931) از روی گیاه یونجه^۲ در ایالات متحده آمریکا به‌عنوان عامل ایجاد موزائیک در این گیاه گزارش گردید (Hull 1969). این ویروس دارای دامنه میزبانی گسترده‌ای می‌باشد و ۵۹۹ گونه گیاهی متعلق به ۲۴۵ جنس از ۶۸ خانواده را آلوده می‌کند که بیشتر آن‌ها متعلق

^۱ Alfalfa mosaic virus, AMV

^۲ Medicago sativa

به خانواده بقولات می‌باشند (Jaspars and Bos 1980). بیشتر گونه‌های گیاهی که توسط این ویروس آلوده می‌شوند از چهار خانواده *Leguminosae* و *Solanaceae*، *Compositae* و *Umbeliferae* (Crill et al. 1970; Smith 1972;) Miczynski and Hiruki 1987) بوده و بطور طبیعی بسیاری از گیاهان چوبی و علفی را آلوده می‌کند. AMV باعث ایجاد علائم مشخص از جمله موزائیک خفیف و سبزد بین رگبرگ‌های جانبی برگ‌ها، رگبرگ روشنی، تغییر شکل برگ و دمبرگ، بافت مردگی و مرگ گیاه در وارسته‌های حساس، کوتولگی شدید، بدشکلی، پیچیدگی، ایجاد نوارهای سبزد و علائم موزائیک مخصوصا در برگ‌های تازه روئیده می‌گردد. AMV روی گره‌زایی یونجه اثر گذاشته و باعث کاهش قدرت بقای گیاه و کاهش معنی دار عملکرد آن می‌شود (Tu and Hulmes 1980).

ویروس موزائیک یونجه گونه تیپ جنس *Alfamovirus* و از خانواده Bromoviridae است، پیکره‌های آن باسیلی^۱ شکل بوده و ژنوم آن از نوع آر‌ان‌ای تک‌لا^۲ می‌باشد که در سه پیکره جداگانه قرار می‌گیرند (Bergua et al. 2014). در سال ۱۹۵۸ برای اولین بار وجود سه پیکره از این ویروس تشخیص داده شد که این پیکره‌ها پائینی^۳ (B)، وسطی^۴ (M) و بالایی^۵ (T) نام گذاری شده‌اند (Hull 1969). این ویروس دارای ژنوم سه قسمتی موسوم به آر‌ان‌ای ۱، آر‌ان‌ای ۲ و آر‌ان‌ای ۳ می‌باشد که قطعات ۱ و ۲ به ترتیب پروتئین‌های رپلیکاز P1 و P2 را رمزگذاری می‌کنند. قطعه آر‌ان‌ای ۳ دارای دو سیستمون می‌باشد و پروتئین پوششی^۶ و پروتئین حرکتی^۷ را رمزگذاری می‌کنند. تمامی قطعات ژنومی دارای یک ساختار درپوش^۸ در انتهای^۵ و یک ساختار شبه t-RNA در انتهای^۳ خود هستند (Parrella et al. 2011). این ویروس دارای چهار نوع پیکره می‌باشد که سه پیکره آن باسیلی شکل به طول‌های ۵۷-۳۰ نانومتر و قطر ۱۸ نانومتر و پیکره چهارم کروی شکل به قطر ۱۸ نانومتر می‌باشد. ژن رپلیکاز این ویروس روی آر‌ان‌ای شماره یک ویروس قرار دارد و پروتئین پوششی ویروس توسط آر‌ان‌ای زیرژنومی^۹ ویروس نیز رمزگذاری می‌گردد (King et al. 2012). ویروس موزائیک یونجه هیچ رابطه سرولوژیکی با سایر ویروس‌ها ندارد. استرین‌های مختلف این ویروس، از نظر بیماری‌زایی و منشأ جغرافیایی بسیار متفاوت می‌باشند، اما از نظر سرولوژیکی بسیار نزدیک به هم هستند. این ویروس در سراسر جهان گسترش داشته و میزبان اصلی آن عمدتا یونجه است ولی در میان سبزیجات گوجه و فلفل را نیز آلوده می‌کند (Bergua et al. 2014).

^۱ bacilli shape

^۲ single stranded ribonucleic acid, ssRNA

^۳ Bottom

^۴ Middle

^۵ Top

^۶ coat protein, CP

^۷ movement protein, MP

^۸ cap

^۹ Sub-genomic RNA

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ از مزارع یونجه استان‌های کرمان، هرمزگان، اصفهان، فارس، خوزستان، گلستان بازدید شد و از گیاهان دارای نشانه‌های بیماری و همچنین برخی از علف‌های هرز در مزارع یونجه نمونه‌برداری به عمل آمد. هر نمونه گیاهی (۲۰ نمونه) بر مبنای علائمی از قبیل موزائیک، موزائیک زرد-روشن (البلقی)، مائل^۱، زردی، تاولی، بدشکلی و پیچیدگی برگ‌ها در مزارع یونجه جمع آوری شد.

آزمون الایزا^۲: جهت بررسی آلودگی ویروسی نمونه‌ها، آزمون‌های الایزا براساس روش Adams و Clark و به روش

الایزای غیر مستقیم^۳ (Indirect ELISA) (Clark and adams 1977) و از آنتی بادی‌های چند همسانه‌ای^۴ استفاده شد. در روش الایزا از آنتی سرم^۵ AMV (تهیه شده از پروفسور Phil Jones در انگلستان) استفاده گردید. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الایزا خوان مدل EL800 (Biotek Instrument) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (شاهد منفی) و با استفاده از فرمول $\bar{x} + 3 SD$ آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. در این فرمول \bar{x} میانگین جذب و SD انحراف معیار استاندارد چاهک‌های نمونه سالم است. بر این اساس نمونه‌های آلوده مشخص گردیدند.

شناسایی جدایه‌های ویروس با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز معکوس^۶: عصاره نمونه‌هایی که در

آزمون الایزا نسبت به AMV واکنش مثبت نشان دادند بر روی توتون رقم سامسون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) مایه کوبی شدند. پس از بروز علائم بر روی بوته‌های توتون، با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Biochemical, Germany) و براساس دستورالعمل ارائه شده مورد استفاده قرار گرفتند. آغازگرهای^۷ مورد استفاده در این بررسی با استفاده از نرم افزار Fast-PCR طراحی گردیدند. سنتز^۸ cDNA مطابق روش Sharifi et al. (2008) به کمک آغازگر معکوس^۳. 3'-GTAGGTTTACCAGCTTTCCACCA-5' AMV-R انجام شد. جهت تکثیر ژن پروتئین حرکتی جدایه‌های AMV و تکثیر cDNA از آغازگرهای (AMV-F: 5'-TTCGTGAGTAAGTTGTGTTAGCCA) و (AMV-R'^۹) و (AMV-R'^{۱۰}) مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن رمزکننده پروتئین حرکتی استفاده گردید. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مرز به

^۱ mottle

^۲ enzyme linked immunosorbent assay, ELISA

^۳ Indirect ELISA

^۴ polyclonal antibodies

^۵ antiserum

^۶ reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR

^۷ primers

^۸ complementary DNA

صورت ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۲ درجه سانتیگراد، اتصال یک دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتیگراد و گسترش یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در پایان به مدت سه دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، واکنش ها کامل شدند. سپس محصول پی سی آر با استفاده از ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین توالی پروتئین حرکتی و بررسی تبارزائی جدایه های ایرانی AMV: به منظور تأیید آلودگی و همچنین

بررسی جایگاه تبارزائی آن ها در مقایسه با جدایه های دنیا، محصول پی سی آر جدایه ها جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer در کره جنوبی ارسال شد. توالی های حاصل با استفاده از نرم افزار BLAST در پایگاه (http://www.ncbi.nlm.nih) NCBI مشابهت یابی شدند. پس از تعیین میزان شباهت، قطعات ۹۰۳ جفت بازی مربوط به ژن پروتئین حرکتی توسط نرم افزار Bio Edit (Hall 1999) هم ردیف سازی^۲ شدند. سپس درخت تبارزائی به روش Neighbor joining توسط نرم افزار MEGA6 (Tamura et al. 2013) رسم شد. همچنین جهت تبدیل توالی های نوکلئوتیدی جدایه ها به ترادف های اسیدهای آمینه، از نرم افزار MEGA6 استفاده شد. جهت بررسی و تجزیه تحلیل ترادف های اسیدهای آمینه از برنامه نرم افزاری پروتئینی DNAMAN استفاده گردید. سپس با استفاده از نرم افزار SDTv1/2 (Muhire et al. 2014)، ماتریس تشابه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جدایه ها به همراه ماتریس فاصله ژنتیکی^۳ ایجاد شدند. جهت تخمین فاصله ژنتیکی و تعیین میزان تنوع ژنتیکی بین و درون گروه های تبارزائی و همچنین جدایه های AMV از ایران و سایر مناطق دنیا که جداگانه هم ردیف سازی شده بودند، با استفاده از روش PBL (Li 1993; Pamilo and Bianchi 1993) و نیز روش دو پارامتری کیمورا (Kimura 1980) در نرم افزار MEGA6 استفاده گردید. برای تعیین نسبت جانشینی نامترادف^۴ به جانشینی مترادف^۵ از نرم افزار DnaSP (Libardo and Rozas 2009) استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی جدایه های ویروس موزاییک یونجه: از بین نمونه های بررسی شده با آزمون الایزا و RT-PCR جمعا ۲۰

نمونه شامل ۱۷ نمونه از یونجه و سه نمونه از علف های هرز گونه های *Chenopodium album* L.، *Sonchus asper* L. و *Plantago major* L. از استان های کرمان، هرمزگان، اصفهان، فارس، گلستان، خوزستان، آذربایجان غربی، سیستان و بلوچستان، یزد و خراسان رضوی (شکل ۱) جهت مطالعات مولکولی انتخاب گردیدند (جدول ۱).

^۱ National Center for Biotechnology Information

^۲ alignment

^۳ genetic distance

^۴ non-synonymous substitution

^۵ synonymous substitution

استخراج آر.ان.ای کل، آزمون RT-PCR، تکثیر ژنوم پروتئین حرکتی و تعیین توالی: در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AMV-MPF/AMV-MPR قطعاتی به طول ۱۰۰۵ جفت باز شامل طول کامل ژنوم پروتئین حرکتی جدایه‌های مورد مطالعه تکثیر شد. در شرایط مشابه، این قطعه از نمونه‌های سالم یونجه تکثیر نگردید. محصولات پی‌سی‌آر پس از تعیین ترادف و ویرایش ترادف‌ها، قطعات به اندازه طول کامل ناحیه رمزکننده پروتئین حرکتی در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت گردید (جدول ۱) و جهت مطالعات تبارزائی مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱. منشاء جغرافیایی، نوع میزبان و رس شمار ژن پروتئین حرکتی جدایه‌های AMV شناسایی شده در این تحقیق

Table 1. Origins of Iranian AMV isolates used in this study

Isolates	Province-region	Plant host	Accession number (MP gene)
Ya.Ha.A	Yazd.Harat	Alfalfa	KX535451
Ya.Ma.A	Yazd.Marvdasht	Alfalfa	KX535452
Ya.Za.A	Yazd.Zarch	Alfalfa	KX535453
Az.Mi.A	Azarbayejan Gharbi-Miandoab	Alfalfa	KX535454
Az.Sa.A	Azarbayejan Gharbi-Salmas	Alfalfa	KX535455
Es.Fi.A	Esfahan-Filor	Alfalfa	KX535456
Es.Go.A	Esfahan-Goldasht	Alfalfa	KX535457
Fa.Es.A	Fars-Estahban	Alfalfa	KX535458
Fa.Fa.A	Fars-Fasa	Alfalfa	KX535459
Go.Go.A	Golestan-Gorgan	Alfalfa	KX535460
Ho.Mi.A	Hormozgan-Minab	Alfalfa	KX535461
Ke.Ma.A	Kerman-Manujan	Alfalfa	KX535462
Kh.Be.A	Khozestan-Behbahan	Alfalfa	KX535463
Kh.Be.A1	Khozestan-Behbahan	Alfalfa	KX535464
Kh.Be.A2	Khozestan-Behbahan	Alfalfa	KX535465
Kh.Be.A3	Khozestan-Behbahan	Alfalfa	KX535466
Si.Ze.A	Sistan Balochestan-Zehak	Alfalfa	KX535467
Es.Jo.Ch	Esfahan-Jozdan	<i>Chenopodium album</i> L.	KX535468
Kh.Sa.Pl	Khorasane Razavi-Sabzevar	<i>Plantago</i> sp.	KX535469
Kh.Sa.So	Khorasane Razavi-Sabzevar	<i>Sonchus asper</i> L.	KX535470

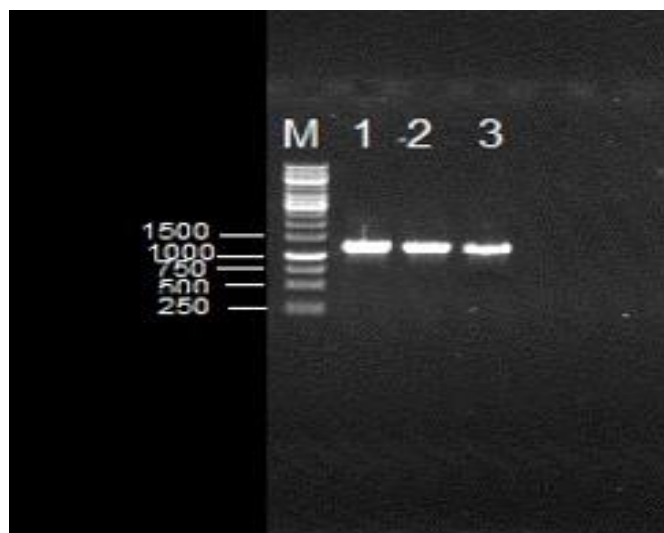


شکل ۱. علائم ناشی از آلودگی طبیعی توسط ویروس موزائیک یونجه (AMV) شامل. A: علف هرز شیر تیغی دارای علائم زرد و موزائیک، B: سلمه تره بدون علائم، C: بارهنگ بدون علائم و D: یونجه دارای علائم موزائیک همراه با روشن شدن شدن برگها

Figure 1. Symptoms of naturally infected with *Alfalfa mosaic virus*, A: *Sonchus oleraceus* showing general yellowing and partial chlorophyll denaturing, B: *Chenopodium amaranticolor* and C: *Plantago ovate* non symptoms, D: *Medicago sativa* showing mosaic and vein clearing

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های AMV: جهت تعیین جایگاه تکاملی و مقایسه بیشتر جدایه‌های AMV، آنالیز تبارزایی قطعه ۹۰۵ نوکلئوتیدی حاوی طول کامل ژن *MP* برای ۲۰ جدایه ایرانی با ۱۵ توالی نوکلئوتیدی (شامل جدایه‌های 425Madison و 1564 VRU) از بانک ژن به عنوان جدایه‌های مرجع با استفاده از نرم افزار MEGA6 انجام گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، این جدایه‌ها در دو گروه طبقه‌بندی شدند (شکل ۳) که هر کدام به دو زیر گروه A و B تقسیم شدند. همه جدایه‌های AMV موجود در بانک ژن به زیر گروه IA تعلق داشتند و سه جدایه ایرانی (Ke.Ma.A و Go.Go.A Fa.Es.A) در زیر گروه IB قرار گرفتند و تنها دو جدایه ایرانی Es.Fi.A و Az.Mi.A در زیر گروه IA و دارای اسیدهای آمینه اختصاصی مربوط به این گروه می‌باشند. همچنین سایر جدایه‌های ایرانی در دو زیر گروه IIA و IIB واقع شدند. بنابراین، به احتمال زیاد گروه II جدایه‌های ایرانی را نیز در بر می‌گیرد. به طور کلی، در زیر گروه IIA ($n=12$) جدایه‌های ایرانی متنوع‌تر از جدایه‌های زیر گروه IIB ($n=3$) بودند. همچنین

ارزیابی تبارزائی بر مبنای توالی‌های ۴۶۸ نوکلئوتیدی ژن *MP* نشان داد جدایه‌های ایرانی با جدایه‌هایی که پیش از این توسط Bergua et al. (2014) تجزیه تبارزائی شده بودند، مطابقت ندارد.

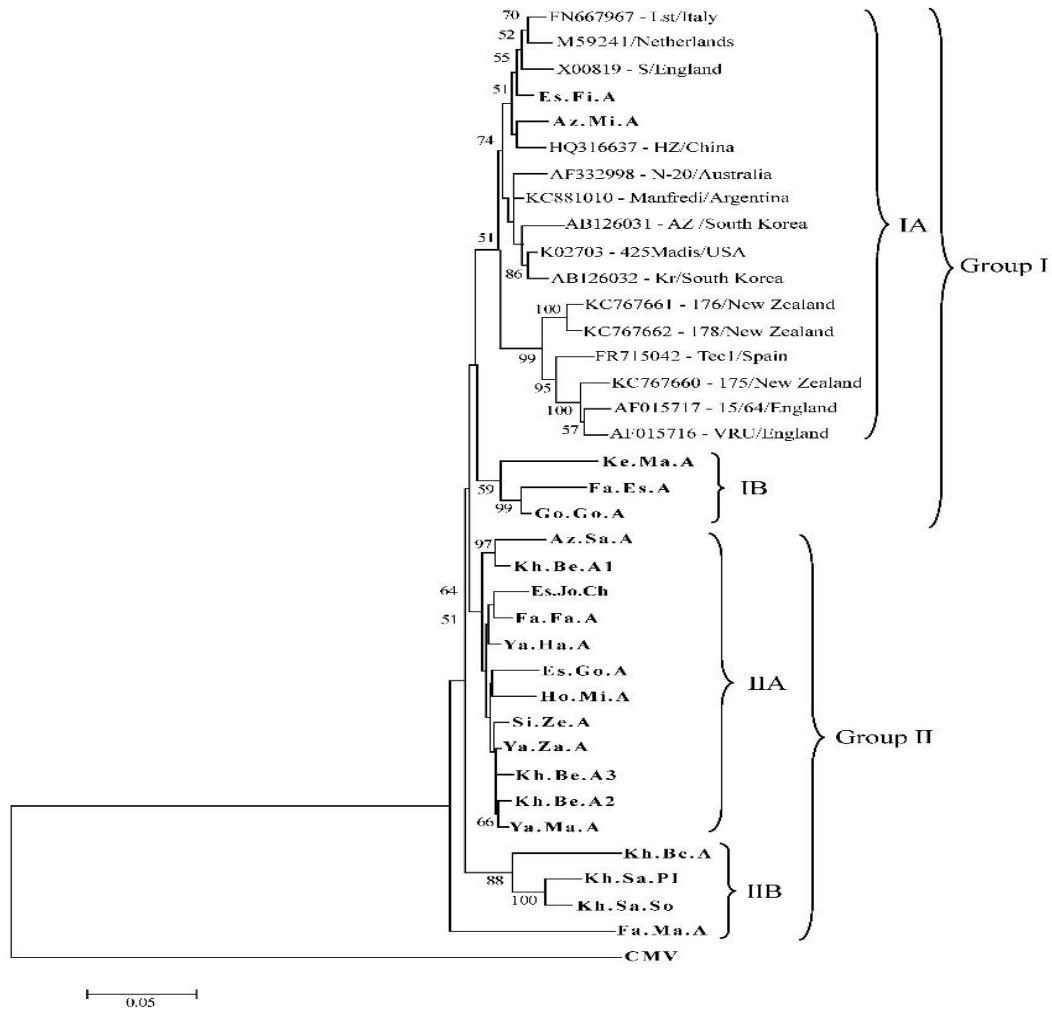


شکل ۲. الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر ژن پروتئین حرکتی تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای AMV-MPF، AMV-MPR در ژل آگارز ۱٪ به اندازه 1105 bp (M) نشانگر اندازه دی.ان.ا. Gen 1، DNA 1Kb Ladder، (Ruler™ Fermentase, lithuania) جدایه Es.Go.A (1)، جدایه Go.Go.A (2)، جدایه Si.Zb.A (3)

Figure 2. Electrophoresis of the PCR products using specific primers of AMV-MPF / AMV-MPR showing amplification of 1105 bp segment of movement protein gene. Lane M, 1-kb DNA ladder, lane 1, Es.Go.A isolate, lane 2, Yaz.Yaz.Tom isolate, lane 2, Si.Zb.A isolate

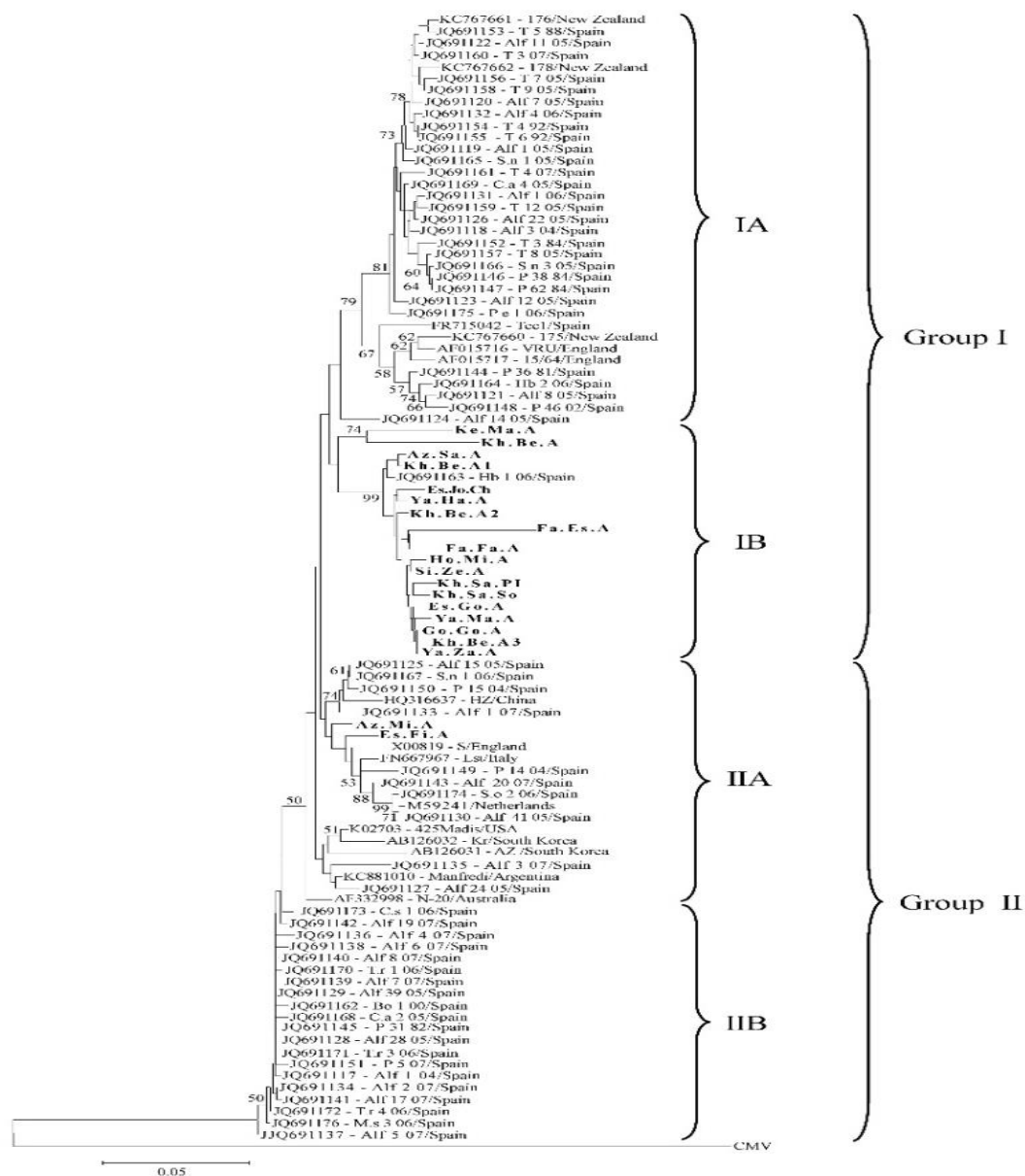
بر اساس گزارش نامبردگان تجزیه تبارزائی ناحیه ۴۶۸ نوکلئوتیدی ژن *MP* شامل دو گروه اصلی می باشد که گروه II نیز به دو زیر گروه A و B تقسیم می‌گردد (Bergua et al. 2014). در حالیکه در این مطالعه، تجزیه تبارزائی ۴۶۸ نوکلئوتیدی ژن *MP* جهت ۲۰ جدایه ایرانی و ۶۰ توالی نوکلئوتیدی از بانک ژن بیانگر آن است که این جدایه‌ها در دو گروه I و II قرار می‌گیرند که هر دو گروه (I و II) نیز به دو زیر گروه A و B تقسیم می‌شوند (شکل ۴). لازم به ذکر است که ۶۰ مترادف نوکلئوتیدی شامل جدایه‌های گزارش شده از اسپانیا توسط Bergua et al. (2014) و همچنین ۱۵ جدایه دیگر موجود در بانک ژن می‌باشند. در این بررسی، اکثر جدایه‌های ایرانی همراه با یک جدایه اسپانیایی (Hb 106) در زیر گروه IB قرار گرفتند که به نظر می‌رسد یک زیر گروه جدید باشد. در حالی که زیر گروه IIB تنها شامل جدایه‌های اسپانیایی (۲۰ جدایه) است. جدایه‌های باقی مانده نیز در دو زیر گروه IA و IIA واقع می‌گردند. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که با اضافه شدن جدایه‌های ایرانی حاصل از این تحقیق به جمع جدایه‌های دنیا

زیر گروه جدیدی نیز که منحصر به جدایه‌های ایرانی می‌باشد به درخت تبارزائی جدایه‌های ویروس AMV اضافه گردیده است (شکل ۴).



شکل ۳. درخت تبارزائی رسم شده بر اساس طول کامل ژن پروتئین حرکتی (۹۰۳ باز) جدایه‌هاجدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق. و جدایه‌هاجدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن. جدایه‌های ایرانی با رنگ تیره مشخص شده اند. ترادف ژن پروتئین حرکتی مربوط به ویروس موزائیک خیار (CMV) به عنوان Outgroup انتخاب گردیده است

Figure 3. Phylogenetic relationships between the Iranian AMV and other published AMV isolates. The tree was drawn using the 903 bp sequence of the MP gene. The Iranian isolates are in bold. MP gene sequence of cucumber mosaic virus (CMV) included as outgroup



شکل ۴. درخت تبارزائی رسم شده بر اساس ناحیه میانی ۴۶۸ نوکلئوتیدی ژن پروتئین حرکتی جدایه‌های ایرانی (جدول ۱) و جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن. جدایه‌های ایرانی با رنگ تیره مشخص شده‌اند. ترادف ژن پروتئین حرکتی مربوط به ویروس موزائیک خیار (CMV) به عنوان Out group انتخاب گردیده است

Figure 4. Phylogenetic relationships between the Iranian AMV and other published AMV isolates. The tree was drawn using the 468 bp of the central region of *MP* gene sequences. *MP* gene sequence of cucumber mosaic virus (CMV) included as outgroup

در درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس ژن *CP* توسط Mangeli et al. (2019) جدایه‌های این ویروس به گروه‌های متعدد تقسیم می‌شوند. نکته مهم این است که بر اساس ژن *CP* چهار جدایه ایرانی (Ke.Ma.A, Kh.Be.A, Kh.Ah.A and Si.Ni.A) هر یک به تنهایی در یک گروه مجزا واقع گردیده که از بین آن‌ها تنها جدایه Kh.Be.A در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه اخیر، این جدایه به همراه دو جدایه دیگر ایرانی (Go.Go.A و Fa.Es.A) که از استان‌های فارس و گلستان از گیاه یونجه جمع آوری شده بودند زیر گروه IB را تشکیل دادند. همچنین با استفاده از ترادف‌های *MP* مورد بررسی در این پژوهش و جدایه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.1 ماتریس برابری رسم شد. بیشترین شباهت نوکلئوتیدی در جدایه‌های ایرانی بین جدایه Ya.Za.A با جدایه Ya.Ma.A به میزان ۹۹/۲ درصد و کمترین تشابه بین دو جدایه Fa.Es.A و Kh.Be.A به میزان ۸۶/۹ درصد برآورد گردید. این میزان کمتر از میزان تشابه نوکلئوتیدی در بین جدایه‌های گزارش شده از سایر مناطق دنیا می‌باشد (۹۳/۵-۱۰۰ درصد). ضمناً میزان شباهت آمینواسیدی بین جدایه‌های ایرانی به میزان ۸۲/۳ تا ۱۰۰ درصد برآورد گردید. در مقایسه بین جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های دنیا جدایه‌های Kh.Sa.Pl و Es.Fi.A به ترتیب کمترین (۸۸/۴) و بیشترین (۹۸/۴) درصد میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی را با جدایه‌های ۱۷۵ (Accession no: KC767660) و Lst (Accession no: FN667967) نشان دادند (شکل ۵). بر اساس مطالعه Bergua et al. (2014) در آنالیز تبارزائی ژن کامل *MP* تعدادی از جدایه‌های AMV در دو گروه مجزای I و II قرار گرفتند که گروه دوم نیز به دو زیر گروه IIA و IIB تقسیم گردیدند. همچنین مشخص گردیده است که در دو جدایه گزارش شده از نیوزلند (KC767660 و KC767661) تعدادی جایگزینی اسیدهای آمینه در تفکیک گروه I و دو زیر گروه IIA از IIB موثر بوده است. واکاوی هم‌ردیف سازی دو گانه ترادف‌های آمینواسیدی بخشی از *MP* (تعداد ۴۶۸ نوکلئوتید) بیانگر آنست که در موقعیت ۱۲۳ (از ۱۲۵ اسید آمینه) یک جایگزینی اسیدهای آمینه در تفکیک دو زیر گروه IA از IB موثر بوده است. بعلاوه در زیر گروه IB، در ۱۷ جدایه (از ۱۹ بین جدایه) توالی اسید آمینه آلانین در موقعیت ۱۲۹ و همچنین در ۱۶ جدایه اسید آمینه والین در موقعیت ۱۳۷ یافت شدند. بر اساس آنالیز هم‌ردیف‌سازی چند گانه ترادف‌های آمینو اسیدی ژن *MP* مشخص گردید که در موقعیت‌های ۲۶۲ تا ۲۸۹ از ۳۰۰ اسید آمینه (تعداد و شماره اسیدهای آمینه براساس رفرنس استرین 425L ارزیابی گردید)، ۱۲ اسید آمینه در موقعیت‌های یاد شده جهت تفکیک دو زیر گروه IIA از IIB جایگزین گردیده‌اند (جدول ۲).

جدول ۲. تمایز در آمینواسیدها در بین گروه‌های تبارزائی مربوط به توالی بخشی و همچنین طول کامل پروتئین حرکتی ویروس موزائیک یونجه

Table 2. Differences in amino acid residues among phylogenetic groups of *Alfalfa mosaic virus* according to complete and partial deduced amino acid sequence of the movement protein

		Amino acid position																
Type ^a	123	262	263	268	269	272	275	277	278	279	284	285	286	289	293	295	297	299
Whole																		
MP																		
IB	-	-	K	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	A	S	P
IIB	-	A	T	-	A	S	D	A	N	V	I	R	S	D	-	-	-	-
Partial																		
MP																		
IB	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Analyzed sequences corresponded to positions 262 to 289 of 299 amino acids of complete MP sequence and position 123 to the 155 amino acids of partial MP sequence.

به منظور بررسی اینکه آیا گروه‌بندی جدایه‌ها یا جمعیت‌های جغرافیایی می‌توانند فاکتورهای انتخاب را تشکیل دهند. توالی‌های نوکلئوتیدی ژن MP در جمعیت‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفتند (جدول ۳). در بین سه جدایه ایرانی که در زیر گروه II-B (شکل ۳) واقع گردیده‌اند، تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی (۰/۰۶۲) وجود دارد. مبداء گیاه یونجه با ارقام مختلف کشور ایران بوده است (Westgate 1908)، بعلاوه قدمت و تطابق AMV با گیاه میزبان و نیز تعدد گونه‌های وحشی میزبانی، سبب تنوع در واریانت‌های این ویروس گردیده است. بر این اساس، احتمالاً جمعیت نسبتاً قدیمی از این ویروس در ایران وجود داشته و واریانت‌ها و یا ژنوتیپ‌های این ویروس به سایر کشورهای دنیا منتقل شده‌اند. این در حالی است که در مطالعات قبلی تعداد معدودی از جدایه‌های AMV مورد بررسی قرار گرفته است و تصور بر این بود که جمعیت‌های این ویروس دارای تنوع ژنتیکی پائین و بادوام هستند (Garcia-Arenal et al. 2001). تا قبل از این مطالعه تنها بررسی که در مورد تنوع ژنتیکی در مورد MP وجود دارد مربوط به مقایسه جدایه‌های بدست آمده از یونجه، فلفل، گوجه‌فرنگی و علف‌های هرز می‌باشد که نتایج حاصله بیانگر آن است که تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های بدست آمده از گوجه‌فرنگی سه برابر کمتر از جدایه‌های سایر گیاهان می‌باشد (Bergua et al. 2014).

جدول ۳. تنوع ژنتیکی و میانگین تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی در ژن پروتئین حرکتی ویروس موزائیک یونجه بر اساس منطقه جغرافیایی و گروه‌های تبارزایی

Table 3. Genetic diversity and average of the nucleotide substitution in *MP* gene sequence of AMV isolates according to the geographical origin and phylogenetic groups

جمعیت‌های جغرافیایی و گروه‌های تبارزایی Geographical populations/Phylogenetic groups	تعداد تبادلات ها Number of sequences	dS ^a	dN ^b	dN/dS ^c	D* ^c تنوع ژنتیکی (Genetic) (diversity)
World	15	0.147	0.021	0.143	0.050
Iran	20	0.114	0.039	0.341	0.056
Asia- Australia	8	0.150	0.024	0.158	0.053
America	2	0.053	0.004	0.083	0.016
Europe	6	0.153	0.023	0.148	0.052
Group I	20	0.157	0.030	0.191	0.059
Group I-A	17	0.141	0.021	0.149	0.048
Group I-B	3	0.146	0.032	0.218	0.058
Group II	15	0.089	0.033	0.368	0.046
Group II-A	12	0.056	0.019	0.344	0.028
Group II-B	3	0.154	0.035	0.226	0.062

^adS: میانگین تعداد جایگزینی‌ها مترادف در هر جایگاه، ^bdN: میانگین تعداد جایگزینی‌های نامترادف در هر جایگاه، ^cdN/dS:

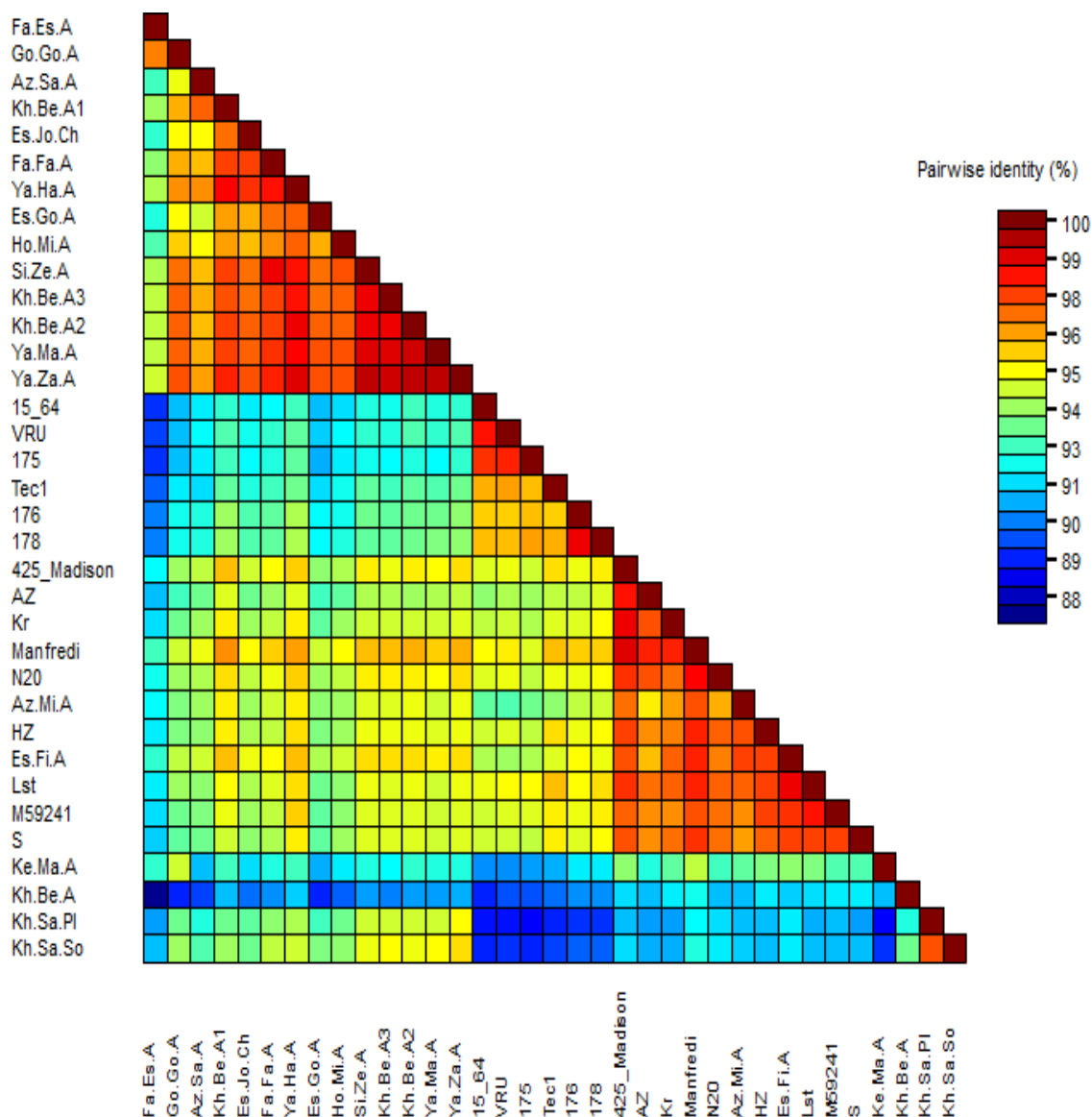
میانگین نسبت بین جایگزینی‌های مترادف و نامترادف برای هر جفت از مقایسات، ^{*}D: تنوع ژنتیکی: میانگین تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی هر جایگاه در بین تبادلات، برای محاسبه ^adS، ^bdN و ^cdN/dS از روش PBL استفاده گردید (Li 1993; Pamilo and Bianchi 1993).

^adS: average number of synonymous substitution per site; ^bdN: average number of synonymous substitution per site; ^cD: Genetic diversity; ^adS and ^bdN are calculated by the PBL method (Li 1993; Pamilo and Bianchi 1993).

مقایسه ژن‌های پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های AMV: در این

مطالعه، رسم درخت تبارزایی بر اساس طول کامل ژن پروتئین حرکتی و بخشی از ژن یاد شده (۴۶۸ نوکلئوتید) بیانگر آن است که جدایه‌های این ویروس در دو گروه I و II قرار می‌گیرند که هر دو گروه (I و II) نیز به دو زیر گروه A و B تقسیم می‌شوند. در مطالعه Bergua et al. 2014 که بر اساس بخشی از ژن‌های CP و MP جدایه‌های ویروس موزائیک یونجه صورت گرفت مشخص گردید که جدایه‌های این ویروس به دو گروه I و II تقسیم شده و گروه II نیز خود در مورد هر دو ژن به دو زیر گروه IIA و IIB تقسیم می‌شوند. همچنین بر اساس بررسی Parrella et al. (2011) و Trucco (2014) در مورد ژنوم کامل CP نیز گروه بندی‌ها بر همین اساس می‌باشد. اگر چه در بررسی Mangeli et al (2019) صرفاً بر اساس یکسری تک ایزوله زیر گروه‌های

جدید در نظر گرفته شده است، اما به طور کلی می توان چنین استنباط نمود که در بررسی تنوع ژنتیکی ویروس موزائیک یونجه اگر چه تاکنون از ژنوم *CP* بیشتر استفاده شده است اما می توان از هر دو ژن *CP* و *MP* در بررسی ها استفاده نمود.



شکل ۵. ماتریس برابری رسم شده با استفاده از ترادف ژن *MP* مربوط به ۲۰ جدایه ایرانی ویروس موزائیک یونجه مورد مطالعه در این پژوهش به همراه والی های ژن *MP* موجود در بانک ژن توسط نرم افزار SDT v1.1

Figure 5. Pairwise identity matrix of 20 *MP* gene sequences of Iranian AMV isolates in this study and GenBank AMV isolates using SDT v1.1

آنالیز پارامترهای ژنتیکی جدایه های AMV بر اساس ژنوم MP: برای تخمین میزان فشار انتخاب بر روی ناحیه MP جایگزین های مترادف (synonymous substitution) و نامترادف (nonsynonymous substitution) به طور جداگانه در مورد مناطق جغرافیایی های مختلف و گروه های فیلوژنتیکی محاسبه گردید. نتایج این بررسی نشان داد نسبت جانشینی نامترادف به جانشینی مترادف (dN/dS) در میان جدایه های ویروس AMV کمتر از یک بود که این امر نشانگر فشار انتخاب منفی بر روی این ژن می باشد (Yang and Nielsen 2000; Garcia-Arenal et al. 2001). از طرفی زیر گروه II-B از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالاتری برخوردار می باشد (۰/۰۶۲)، که این موضوع نشان می دهد اگر چه فشار انتخاب بر ژن پروتئین حرکتی منفی است اما این ژن از تنوع نسبتاً بالایی برخوردار است. ضمناً تفاوت فشار انتخاب در زیر گروه های مختلف ژن MP مربوط به جدایه های مختلف AMV ناشی از برهمکنش متفاوت آن ها با میزبان و ناقل نیز محتمل است (Ouibrahim and Caranta 2013). در واقع فشار انتخابی منفی به معنی نبود تنوع ژنتیکی در ژن یا ناحیه ژنی مربوطه نیست. بدین صورت که ژن ممکن است تحت فشار انتخابی منفی قرار داشته باشد ولی کدون های اختصاصی^۱ بر روی ژن تحت فشار انتخابی مثبت و تنوع قرار داشته باشند. به طور مثال Yoon et al. (2014) در مورد ویروس *Apple Stem Pitting Virus (ASPV)* نشان دادند علی رغم غالب بودن فشار انتخاب منفی ژن CP در جدایه های مورد بررسی چهار کدون ژنتیکی در موقعیت های ۱۰، ۲۲، ۱۰۲ و ۱۵۸ تحت فشار انتخابی مثبت قرار دارند و این موضوع می تواند باعث ایجاد تنوع در یک ناحیه ژنی شود. نتایج تحقیقات Tian et al (2011) نشان دادند دو ژن Hc-pro و CP مربوط به ویروس Y سیب زمینی (جدا شده از گیاهان توتون) تحت فشار انتخابی منفی هستند. این در حالیست که ۷ موقعیت آمینو اسیدی در HC-pro و شش موقعیت در ژن CP تحت فشار انتخابی مثبت قرار داشتند. بنابراین فشار انتخابی بین زیر جمعیت های (sub-population) یک گونه و یا شبه گونه های (quasi-species) یک ویروس ممکن است بر پایه چند اسید آمینه متفاوت باشد (Tian et al. 2011). تنوع جهانی جمعیت AMV در اروپا، استرالیا، آسیا و آمریکا به میزان ۰/۰۳۸ بوده که کمتر از میزان گزارشات مربوط به سایر ویروس های گیاهی می باشد (Garcia-Arenal et al. 2001). انتقال و تکثیر ویروس هایی که از طریق روش های جنسی (با اندام های گیاهی مانند بذر) تکثیر پیدا می کنند از تنوع بیشتری برخوردار خواهند بود. برعکس در صورتیکه تکثیر آن ها از طریق غیرجنسی (با اندام های گیاهی همچون غده ها و پیازها) باشد دارای تنوع ژنتیکی کمتری می باشند (Guyader & Ducray 2002). با توجه به تنوع پائین جمعیت جهانی AMV و نیز انتشار این ویروس با بیش از ۲۸ گونه از شته ها (Edwardson & Christie, 1997) که اکثراً از طریق بکرزایی^۲ تکثیر پیدا می کنند، احتمالاً انتشار این ویروس بین مناطق مختلف از طریق بذر صورت نمی گیرد.

^۱ site-specific

^۲ parthenogenesis

نتیجه گیری: به طور کلی تعیین جایگاه صفات مولکولی جدایه‌های ویروس به دلیل جداکردن اثر ژن‌ها در مقایسه با اثر محیط حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به نتایج تبارزائی جامع مبتنی بر ترادف ژن پروتئین حرکتی به دست آمده از این تحقیق و نیز یافته‌های تبارزائی حاصل از ترادف ژن پروتئین پوششی (Mangeli et al. 2019; Bergua et al. 2014; Trucco et al. 2014)، این موضوع بیانگر آن است که ژن پروتئین حرکتی مشابه به ژن پروتئین پوششی از حفاظت کمتری برخوردار است و از این نظر جدایه‌های این ویروس متنوع هستند. با توجه به وجود اقلیم‌های متفاوت آب و هوایی و نیز وجود تنوع ارقام مختلف از جمله وارته‌های بومی یونجه در ایران از عوامل مهم تنوع ژنتیکی بیشتر جدایه‌های این ویروس نسبت به جدایه‌های گزارش شده از سایر مناطق دنیا است. لذا پیشنهاد می‌شود مطالعاتی در خصوص رابطه احتمالی بین ویژگی‌های بیولوژیک از جمله نوع و شدت علائم بر روی میزبان یا نوع میزبان و تغییرات تبارزائی در جدایه‌های واجد تغییرات از نوع جایگزین‌های نامترادف انجام شود.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به خاطر حمایت مالی و از داوران محترم به دلیل ارائه نظرهای ساختاری و علمی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Bergua M, Luis- Artega M, Escriu F (2014) Genetic diversity, reassortment, and recombination in Alfalfa mosaic virus population in Spain. *Phytopathol* 104 (11), 1241-1250.
- Clark MF, Adams SAN (1997) Characteristics of microplates method of enzyme-linked-immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34, 475-483.
- Crill P, Hagedorn DJ, Hanson EW (1970). Incidence and effect of AMV on alfalfa. *Phytopathol* 60, 1432-1435.
- Edwardson JR, Christie RG (1997) Virus infecting peppers and others solanaceous crops (volume I). Agricultural Experiment Station, University of Florida.
- Garcia-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopathol* 39, 157-186.
- Guyader S, Ducray DG (2002) Sequence analysis of Potato leaf roll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *J Gen Virol* 83, 1799–1807.
- Hall TA (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hull R (1969) Alfalfa mosaic virus. *Adv Virus Res* 15, 365 – 433.
- Jaspars EMJ, Bos JF (1980) Alfalfa Mosaic virus. CMI/ AAB. DPV No. 229.

- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleic sequences. *J Mol Evol* 16,111-120.
- King AMQ, Adams MJ, Carestens EB, Lefkowitz EJ (2012) Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. Ninth report of international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press. 1327pp.
- Li WH (1993) Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *J Mol Evol* 36, 96–99.
- Libardo P, Rozas J (2009) DnaSP V5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Mangeli F, Massumi H, Alipour F et al. (2019) Molecular and partial biological characterization of the coat protein sequences of Iranian alfalfa mosaic virus isolates. *J Plant Pathol* 101, 735–742.
- Miczynski KA, Hiruki C (1987) Effect of Alfalfa mosaic virus on the yield and regeneration of alfalfa at different growth temperature. *Can J Plant Pathol* 9, 49- 55.
- Muhire BM, Varsani A, Martin DP (2014) SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE* 9, e108277.
- Ouibrahim L, Caranta C (2013) Exploitation of natural genetic diversity to study plant-virus interactions: what can we learn from *Arabidopsis thaliana*? *Mol plant Pathol* 14(8), 844-854.
- Pamilo P, Bianchi NO (1993) Evolution of the Zfx and Zfy genes: rates and independence between the genes. *Mol Biol Evol* 10, 271–281.
- Parrella G, Acanfora N, Orilio A F, Navas-Castillo J (2011) Complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of Alfalfa mosaic virus: evidence for additional genetic variability. *Arch Virol* 156, 1049-1052.
- Sharifi M, Massumi H, Heydarnejad J et al. (2008) Analysis of the biological and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from Iran. *Virus Genes* 37, 304-313.
- Smith K M (1972). A textbook of Plant Virus Diseases, 3rd ed., Academic Press, New York.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.
- Tian YP, Liu JL, Zhang CL, Liu YY, Wang B, Li XD, Valkonen JPT (2011) Genetic diversity of Potato virus Y infecting tobacco crops in China. *Phytopathol* 101(3), 377-387.
- Trucco VN, Breuil SD, Bejerman N, Lenardon S, Giolitti F (2014) Complete nucleotide sequence of Alfalfa mosaic virus isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) in Argentina. *Virus Genes* 48, 562–565.

- Tu JC, Holmes TM (1980). Effect of Alfalfa mosaic virus infection on nodulation, forage yield, forage protein and overwintering of alfalfa. *Phytopathol* 97, 1- 9.
- Westgate JM (1908) Alfalfa. Washington: U.S. Department of Agriculture. P.5. Retrieved July 2013.
- Weimer JL (1931). Alfalfa mosaic virus. *Phytopathol* 21, 122 - 123.
- Yang Z, Nielsen R (2000) Estimating synonymous and non-synonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Mol Biol Evol* 17, 32-43.
- Yoon JY, Joa JH, San Choi K, Do KS, Lim HC, Chung BN (2014) Genetic diversity of a natural population of Apple stem pitting virus isolated from apple in Korea. *Plant Pathol J* 30(2), 195-199.