

ID: 698

Molecular Characterization of Tomato brown rugose fruit virus-Isparta Isolates Movement Protein

Ali Enes ÖZDEMİR, Eminur ELÇİ

Plant Production and Technologies Department, Agricultural Sciences and Technologies Faculty, Niğde Ömer Halisdemir University, Niğde, Türkiye

Correspondence: eminur@gmail.com

Abstract

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV; genus Tobamovirus) poses a significant threat to plants belonging to the Solanaceae family, especially tomato and pepper. ToBRFV is rapidly spreading worldwide and threatens global tomato production. This virus is transmitted mechanically or via seeds during agricultural activities. Therefore, effective methods and resistance genes are needed to control ToBRFV and other tobamoviruses. The aim of this study is to characterize the movement protein, which is an important gene region in the transmission, spread and resistance of the virus, by molecular methods. For this purpose, in this study, tomato seedlings showing disease symptoms were collected from tomato greenhouses in Isparta province in the summer of 2023 upon the complaints of the producers and 5 seedling samples from 14 different greenhouses (70 seedlings in total) were tested for the presence of the virus. Mechanical inoculations were done to susceptible tomato varieties using the provided plant leaves and disease symptoms were observed. Nucleic acid isolations were made from plant leaves and cDNA was synthesized. PCR analyses were performed using primer sequences of the virus-specific movement protein and the obtained PCR bands were subjected to DNA sequence analysis. The obtained nucleotide sequences were analyzed in the NCBI database and BLASTn analyses proved the existence of the virus. In addition, alignment of the obtained nucleotide sequences was performed with CLUSTAL W and the neighbor-joining method was used to create a phylogenetic tree with the MEGA11 program. It is thought that the findings will guide the fight against the disease.

Key Words: *tomato, ToBRFV, Mp protein, PCR, phylogenetic.*

Domates Kahverengi Buruşuk Meyve Virüsü- Isparta izolatlarının Hareket Proteininin Moleküler Karakterizasyonu

Özet

Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (ToBRFV) özellikle domates ve biber olmak üzere Solanaceae familyasına ait bitkilerde önemli bir sorun oluşturmaktadır. ToBRFV dünya çapında hızla yayılmakta ve küresel çapta domates üretimini tehdit etmektedir. Bu virüs, tarımsal faaliyetler sırasında mekanik olarak veya tohumlar yoluyla bulaşmaktadır. Bu nedenle, ToBRFV ve diğer tobamovirüsleri kontrol etmek için etkili yöntemlere ve dayanıklılık genlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı, virüsün bulaşması, yayılması ve dayanıklılığında önemli bir gen bölgesi olan hareket proteininin (movement protein) moleküler yöntemler aracılığıyla karakterize edilmesidir. Bu amaçla, bu çalışmada 2023 yılının yaz aylarında Isparta ili domates seralarından üreticilerin şikâyeti üzerine hastalık belirtileri gösteren domates fideleri toplanmış ve 14 farklı seradan alınan 5'er fide örneği (toplam 70 fide) virüs varlığı açısından test edilmiştir. Temin edilen bitki yaprakları kullanılarak hassas domates çeşidine mekanik inokulasyonlar yapılmış ve hastalık belirtileri gözlenmiştir. Bitki yapraklarından nükleik asit izolasyonları yapılmış ve cDNA sentez edilmiştir. Virüse özgü hareket proteine ait primer dizileri kullanılarak PCR analizleri yapılmış ve elde edilen PCR bantları DNA dizi analizine tabii tutulmuştur. Temin edilen nükleotid dizileri NCBI veritabanında analiz edilmiş ve BLASTn analizleri virüsün varlığını kanıtlamıştır. Ayrıca elde edilen nükleotid dizilerinin hizalanması CLUSTAL W ile gerçekleştirilmiş ve MEGA11 programı ile filogenetik ağaç oluşturmak için neighbor-joining yöntemi kullanılmıştır. Bulguların, hastalık ile mücadelede yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Domates, ToBRFV, Mp proteini, PCR, filogenetik*

Giriş

Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (Tomato brown rugose fruit virus: ToBRFV) özellikle domates başta olmak üzere Solanaceae (patlıcangiller) familyasına ait bitkilerde önemli bir tehdit oluşturan virüsdür. ToBRFV, 2014'ün sonlarında İsrail'de keşfedilmiştir. 2015 yılında İsrail'in domates yetiştirilen Melilot, Beit Ezra ve Achituv



alanlarına yayılmıştır. İlk olarak 2016 yılında Ürdün’de rapor edilmiştir (Salem ve diğerleri, 2016). Virüs İsrail’de bir yıl içerisinde neredeyse ülke çapında domates seralarına yayılmıştır. ToBRFV dünya çapında hızla yayılmakta ve küresel domates üretimini tehdit etmektedir. Bu virüs, tarımsal faaliyetler sırasında mekanik olarak veya tohum yoluyla bulaşmaktadır (Dombrovsky ve diğerleri, 2017). Bu nedenle, ToBRFV ve diğer tobamovirüsleri kontrol etmek için etkili ve dayanıklılık genlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Virüs enfeksiyon oluşturduğu domates bitkilerinde şiddetli semptomlara neden olur. Hastalık domates yapraklarında mozaikleşme, klorozis, benek şeklinde lekelenme ile ileri dönemlerde nekrotik dokular ve cüceliğe ve sonunda da bitki ölümüne neden olmaktadır. Meyvelerde ise kahverengi lekeler ve buruşuk meyve oluşumu en temel semptomları arasında yer almaktadır (Salem ve diğerleri, 2016).

ToBRFV, uzun ve simetrik çubuksu yapıda virion yapısına sahiptir ve diğer Tobamovirüslerle benzerlik göstermektedir. ToBRFV genomu da diğer tobamovirüslerinkine çok benzerdir. Bu virüslerin genomu, dört açık okuma çerçevesi (ORF) içeren yaklaşık 6.400 nükleotid uzunluğunda tek zincirli pozitif anlamlı bir RNA molekülünden oluşmaktadır. Genomik RNA, CAA tekrarları açısından zengin kısa bir 5' çevrilmemiş bölge (UTR) ve psödoknotlara katlanabilen bir 3' UTR ile kapatılır ve bunu transfer RNA benzeri, amino asit olan bir yapı izlemektedir. İki 5' -terminal ORF doğrudan genomik RNA'dan çevrilir. ORF1, metiltransferaz ve helikaz alanları içeren 126 kDa'lık bir proteine (p126) çevrilir. ORF1 ve ORF2 arasındaki UAG durdurma kodunun okunması, C-terminal ucunda RNA'ya bağımlı bir RNA polimeraz alanı içeren 183 kDa'lık bir proteinin (p183) ekspresyonu ile sonuçlanabilir. Her iki protein de replikasyon için gereklidir ve p126 ayrıca diğer tobamovirüslerde gösterildiği gibi bir susturma baskılayıcısı olarak işlev görmektedir. ORF3 ve ORF4, 3' -koterminale olan ve sırasıyla 30 kDa'lık bir hareket proteini (MP) ve 17,5 kDa'lık bir kılıf proteini (CP) kodlayan 5' -subgenomik RNA 1 ve 2' den çevrilir (Salem N. ve diğerleri, 2022).

Tobamovirüslerin enfeksiyon döngüsünde en önemli proteinlerden biri hareket proteini. Bu protein virüsün bitki içerisinde hareket etmesini sağlar. Virüs, enfekte ettiği hücre içerisinde çoğaldıktan sonra komşu hücrelere yayılmak zorundadır. Hareket proteinleri, virüs genomlarının hücreler arası kanallardan (plasmodesmata) geçerek komşu hücrelere taşınmasını kolaylaştırır. Ayrıca bitki hücresinin mikrotübüller ve aktin filamentleri ile etkileşime girerek virüsün hücre içindeki hareketini yönlendirir ve hızlandırır. Bazı hareket proteinleri, hücre duvarının geçirgenliğini artırarak virüsün hücreler arası geçişini kolaylaştırır. Hareket proteinleri, bitkinin savunma mekanizmalarını baskılayarak virüsün çoğalmasını ve yayılmasını sağlar. Hareket proteini sayesinde tobamovirüsler, enfekte ettikleri bitkinin tüm kısımlarına yayılarak sistemik bir enfeksiyona neden olurlar. Hareket proteininin etkinliği, hastalığın şiddeti ile doğrudan ilişkilidir. Daha etkin hareket proteinlerine sahip virüsler, daha hızlı ve daha geniş alanlara yayılarak bitkiye daha fazla zarar verir. Bununla birlikte, virüsün evrimi için önemli bir faktördür. Mutasyonlar sonucu oluşan yeni hareket proteinleri, virüse yeni konukçularına adapte olma ve daha etkili bir şekilde yayılma avantajı sağlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Tobamovirus cinsinin hızla yayılmakta olan bu ToBRFV virüsünün bulaşması, yayılması ve dayanıklılığında önemli bir gen bölgesi olan hareket proteininin (movement protein) moleküler yöntemler aracılığıyla karakterize edilmesidir. Bu amaçla, hastalıklı bitki temin edilerek sağlıklı fideler inokule edilmiştir. Bitkilerden nükleik asit izole edilerek virüsün hareket proteini nükleotid düzeyinde moleküler olarak karakterize edilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Virüs Kaynağı

Domates kahverengi rugose meyve virüsü (ToBRFV) kaynağı Isparta İlinde bulunan 14 farklı seralardan temin edilmiştir. Her bir seradan beşer adet bitki olmak üzere toplam olarak 70 bitki örneği temin edilmiş olup bu bitkiler şiddetli hastlık belirtisi içeren ve üreticilerin şikâyetleri üzerine toplanmıştır.

Mekanik İnokulasyonlar

Virüs kaynağını çoğaltmak için mekanik inokulasyonlar yapılmıştır. Her bir serayı temsilen 14 adet hassas olduğu bilinen H2274 domates tohumları kullanılmış olup tohum ekimi, fide yetiştirme ve belirtileri gözlemleme işlemleri Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi'ndeki Bitki Virolojisi bitki yetiştirme odasında gerçekleştirilmiştir. Domateslerin 4-5 yapraklı olduğu zaman mekanik inokulasyonu yapılmıştır. Mekanik inokulasyon için, 0.199 g/l KH₂PO₄, 1.14 g/l Na₂HPO₄ ve %0,1 Na₂SO₃ ve 1% PVP-40 içeren inokulasyon tampon çözeltisi (pH: 7.4) kullanılmıştır. Mekanik inokulasyon için fosfat solüsyonu içinde homojenize edilen virüs kaynağı yapraklara karborandum serpilmesi ile aşındırma sonucu yaprak yüzeyine sürülmüştür ve yarım saat sonra musluk suyu ile durulanmıştır. İnokulasyonu yapılan domates bitkileri, inokulasyondan bir ay sonra virüs enfeksiyonunu doğrulamak için PCR analizleri yapılmıştır.



Moleküler Analizler**Toplam NA Ekstraksiyonu**

İnokulum kaynaklarındaki enfeksiyondan emin olabilmek için, toplam NA, üreticinin talimatlarını izleyerek domates yaprağı dokularından çıkarılmış ve saflaştırılmıştır. İnokule bitkiler ile inokulum kaynağını oluşturan bitkilerin (her bir seradan temin edilen beşer bitki karıştırılarak) yaprak dokularından NA ekstraksiyonu için hızlı ve etkili bir yöntem olan hızlı CTAB yöntemi (Gambino ve diğerleri, 2008) kullanılmıştır. Toplam NA'ların verimi ve kalitesi, bir BioSpec spektrofotometre (Shimatzu, ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

cDNA Sentezi ve PCR Analizi

İki aşamalı bir RT-PCR protokolü kullanılmıştır. Birinci iplikçik cDNA, cDNA Sentez Kiti talimatları için rastgele heksamer primerleri ve Superscript Choice Sistemi kullanılarak toplam RNA'ların Ters transkripsiyonuyla sentezlenmiştir. PCR, 2 µl cDNA, 0,5 µl 10mM dNTP, 1 µl 25 mM MgCl₂, 2,5 µl 5X PCR tampon çözeltisi ve virüse spesifik primerlerden 0,5 µl 10 µM ve 0.25 µl 5 birim /µl Taq DNA polimerazı ile yapılmıştır. PCR, aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirilmiştir: 94 °C'de 5 dakika denatürasyon, 30 saniye boyunca 94 °C'de, 45 saniye boyunca 55 °C'de ve 1 dakika boyunca 72 °C'de 40 döngü ve 72 °C'de 10 dakika boyunca son bir uzama. PCR ürünleri, %1,5 agarose jele yüklenip elektroforezde koşturulmuş ve bir UV-transillüminatör altında ethidium bromide ile uygulandıktan sonra UV ışığı altında incelenmiştir. ToBRFV MP geni için F- 5'-GATGGCTCTTGTTAAGGGTAAA-3' and R- 5'-CCCATGCTGATGACAAAAAC-3'-858 bp primer çifti kullanılmıştır (Güller A ve diğerleri., 2023).

Nükleotid Dizi Analizleri

PCR ürünlerinin nükleotid dizi analizleri, BMLabosis Firması (Ankara, Türkiye) ABI 3730 Automated Genetic Analyzer cihazı ile doğrudan dizilenmiştir. Nükleotidleri belirlemek için BLASTn ve BLASTx modülleri kullanılmıştır.

Filogenetik Analizler

GenBank'ta (NCBI) depolanan farklı izolatların dizileri hem nükleotid hem de aminosit düzeyinde filogenetik analize alınmıştır. Nükleotid dizilerinin çoklu hizalaması CLUSTAL W ile gerçekleştirilmiş ve Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA11 programı ile filogenetik ağaç oluşturmak için neighbor-joining yöntemi kullanılmıştır (Tamura ve diğerleri, 2011). Filogenetik ağaçların her bir düğümünün sağlamlığı, 1000 bootstrap kopyasından değerlendirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma**Mekanik İnokulasyon Sonuçları**

Yapılan inokulasyonlar sonrasında virüs belirtilerinin çok hızlı görülmeye başlandığı gözlenmiştir. İnokulasyondan 5-7 gün sonra ilk belirtiler oluşmuştur. Belirtiler arasında en yaygın olanlar mozaikleşmeler olup yaprak kıvrıklığı ve sarı benekler de yaygın olarak gözlenmiştir. Semptom gelişimleri bir ay boyunca gözlenmiştir. Virüs belirtileri yedinci gün, onuncu gün belirti vermiştir ve on beş, yirmi, yirmi beş ve otuz günün semptom gelişimleri incelenmiştir ve şiddetli virüs belirtileri kaydedilmiştir. Yapraklarda şiddetli belirtiler örneğin yapraklarda mozaikleşme ve sarı renkte benek oluşumları ve kıvrıklanmalar yaygındır.

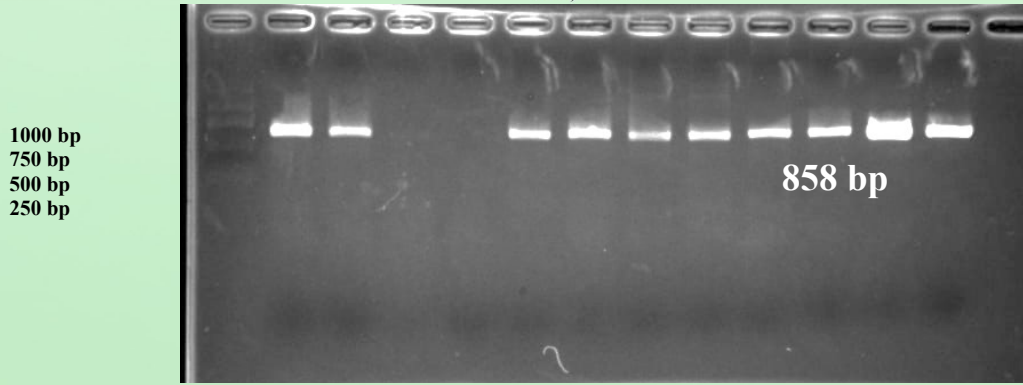
Total NA İzolasyonu Sonuçları

CTAB yöntemine göre yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen nükleik asitlerin kalite değerleri nanodrop spektrofotometre cihazı aracılığıyla ölçülmüş olup 230/260 optik okuma değerleri elde edilmiştir. Bu değerlerin 1.5 ila 2-2 ng/ul arası olduğu tespit edilmiş olup bu değerlerin PCR analizleri için uygun kalitede olduğu görülmüştür. Optimum RNA saflığı 260/280 oranının yaklaşık 2,0 ve 260/230 oranının 2,0 ile 2,2 arasında olmasıyla gösterilir. pH bu oranları etkileyebilirken, yukarıdaki değerler 1.8 genellikle kabul edilebilir olarak değerlendirilmektedir.

RT-PCR Analiz sonuçları

Yapraklardan izole edilen virüs RNA'larının iki aşamalı cDNA sentezi yapıp MP genine özgü primer çiftlerinin kullanılması ile ToBRFV'nin kısmi nükleotid dizileri çoğaltılmıştır. Testlenen tüm izolatlar beklenildiği gibi 858 bp'lik bant göstermiştir (Şekil 1).





Şekil 1: RT- PCR analizi sonucu agaroz jel görüntüsü, M: Thermo scientific 1 kb plus DNA Ladder

DNA Dizi Analizi Sonuçları

Elde edilen PCR ürünleri DNA dizi analizine alınmış olup 858 bp büyüklüğünde nükleotid dizileri elde edilmiştir. Bu dizilerin BLASTn analizleri yapılmış olup örneklerimizin Gen Bankasına kayıtlı örneklerle kıyaslandığında yakınlık olarak %98 ila 99,5 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Filogenetik Analiz Sonuçları

Nükleotid ve amino asit dizilerinin tanımlanması ve hizalanması, virüslerin genetik çeşitliliğini analiz etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Nyalugwe ve diğerleri, 2015; Farzadfar ve Pourrahim, 2017). Isparta ToBRFV izolatının MP gen bölgesinin nükleotid ve amino asit dizileri, maksimum olabilirlik analizi kullanılarak NCBI veri tabanında halihazırda bulunan diğer gen dizileri ile filogenetik ilişkileri açısından karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir. Isparta ToBRFV izolatlarının genetik yapısı mevcut literatürle örtüşmekte, ancak aynı zamanda yeni bilgiler de ortaya koymaktadır.

Kullandığımız Komşu Birleştirme Yönteminde kümelene temelli algoritmada olduğu gibi taksonların kökten eşit uzaklıkta olduğu varsayılmaz. Yöntemimiz oldukça verimlidir ve geniş çapta verileri ve veri topluluklarını analiz etmeye yardımcı olur. Dış grup takson olarak incelenen organizma grubu TMV ise, evrimsel ilişkileri belirlerken daha uzaktan ilişkili olan ve referans grubu olarak kullanılan organizmalardır ve dış grup, iç grup için bir karşılaştırma noktası olarak kullanılır ve özel olarak da filogeninin kökünün olmasını sağlar.

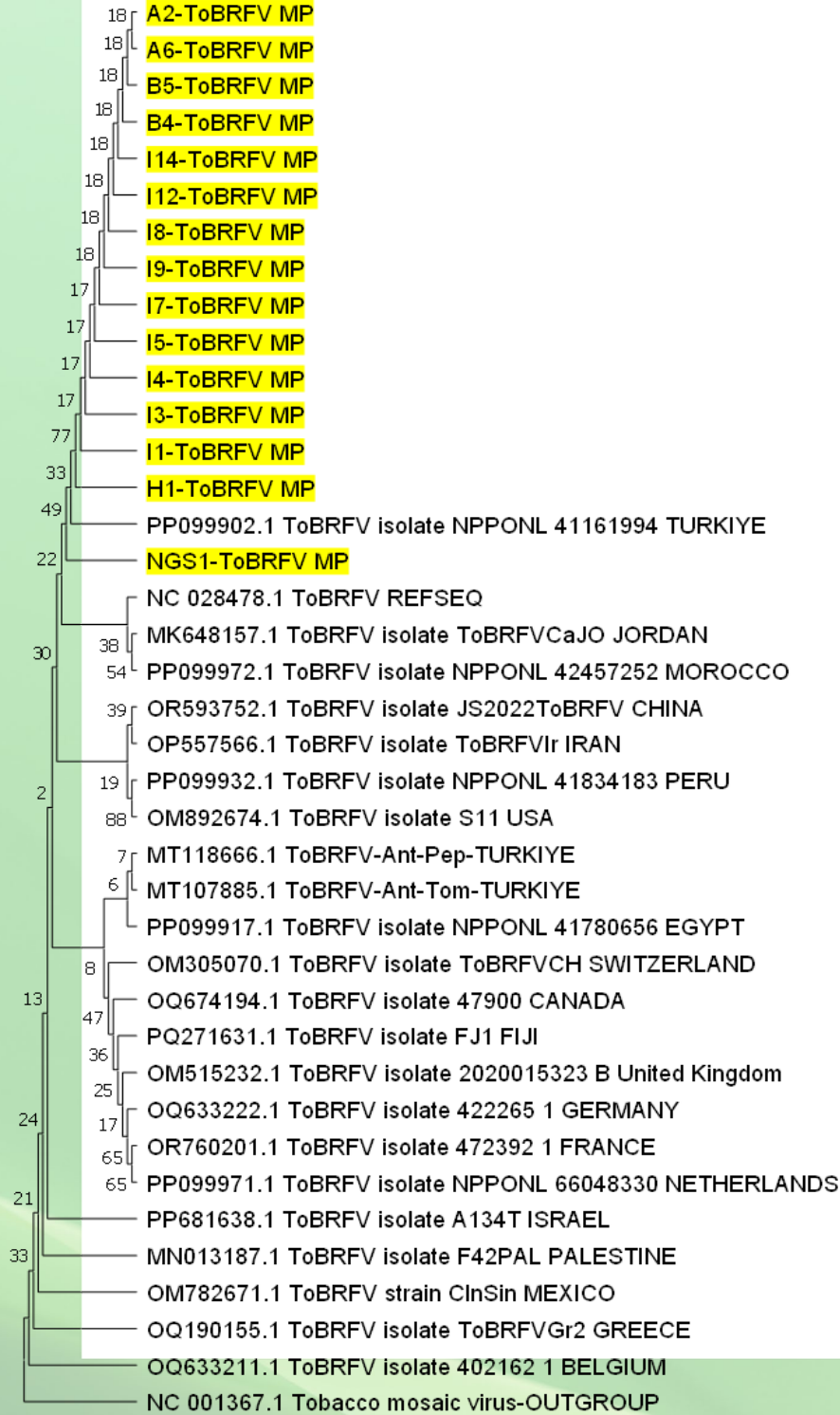
Nükleotid dizileri ile oluşturulan MP gen bölgesi ağacında, Isparta izolatlarının birbiri ile çok benzer olduğu ve bu izolatların GenBankasına kayıtlı olan PP099902.1 numaralı NPPLONL41161994 nolu Türkiye izolatı ile yüksek oranda homoloji gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 2). Ayrıca Türkiye’den izole edilen Antalya örneklerinin de bizim izolatlarımız ile yakın bir dalda kümelendiği tespit edilmiştir (MT107885.1 ToBRFV-Ant-Tom-TURKIYE ile biberden izole edilen MT118666.1 ToBRFV-Ant-Pep-TURKIYE izolatı). Kontrol grubu olarak kullanılan Tütün mozaik virüsü ise beklendiği gibi en uzak dalda yer almaktadır.

Virüsün nükleotid dizilerinin aminoasite çevrilmesi ile oluşturulan ağaç nükleotid ağacı ile benzer sonuçlar vermiş olup farklı olarak MK648157.1 ToBRFV isolate ToBRFVCaJO JORDAN kodlu Ürdün izolatı da bizim örneklerimizle aynı grupta kümelenemiştir (Şekil 3). Tobamovirüslerin stabil yapısı dikkate alındığında bu sonuçların beklenildiği gibi olduğu düşünülmektedir.

Tüm elde edilen verilere dayanarak; domates buruşuk meyve virüsünün hareket proteini moleküler karakterizasyonu yapılmış olup virüsün bu genindeki varyasyon moleküler olarak belirlenmiştir. Isparta ToBRFV izolatlarının genetik yapısı analiz edilmiş olup GenBankasındaki mevcut dizilerle yüksek oranda homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Tobamovirüs enfeksiyon döngüsü için çok önemli olan bu hareket proteininin komşu hücrelere geçişi kolaylaştırdığı gibi bitkinin savunma mekanizmasını da baskılayarak virüsün yayılımını ve çoğalmasını sağladığı bilinmektedir. Bu nedenle, elde edilen verilerle MP geninin çok fazla varyasyon içermediği ve taşıma kaynaklı mücadele yöntemlerine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

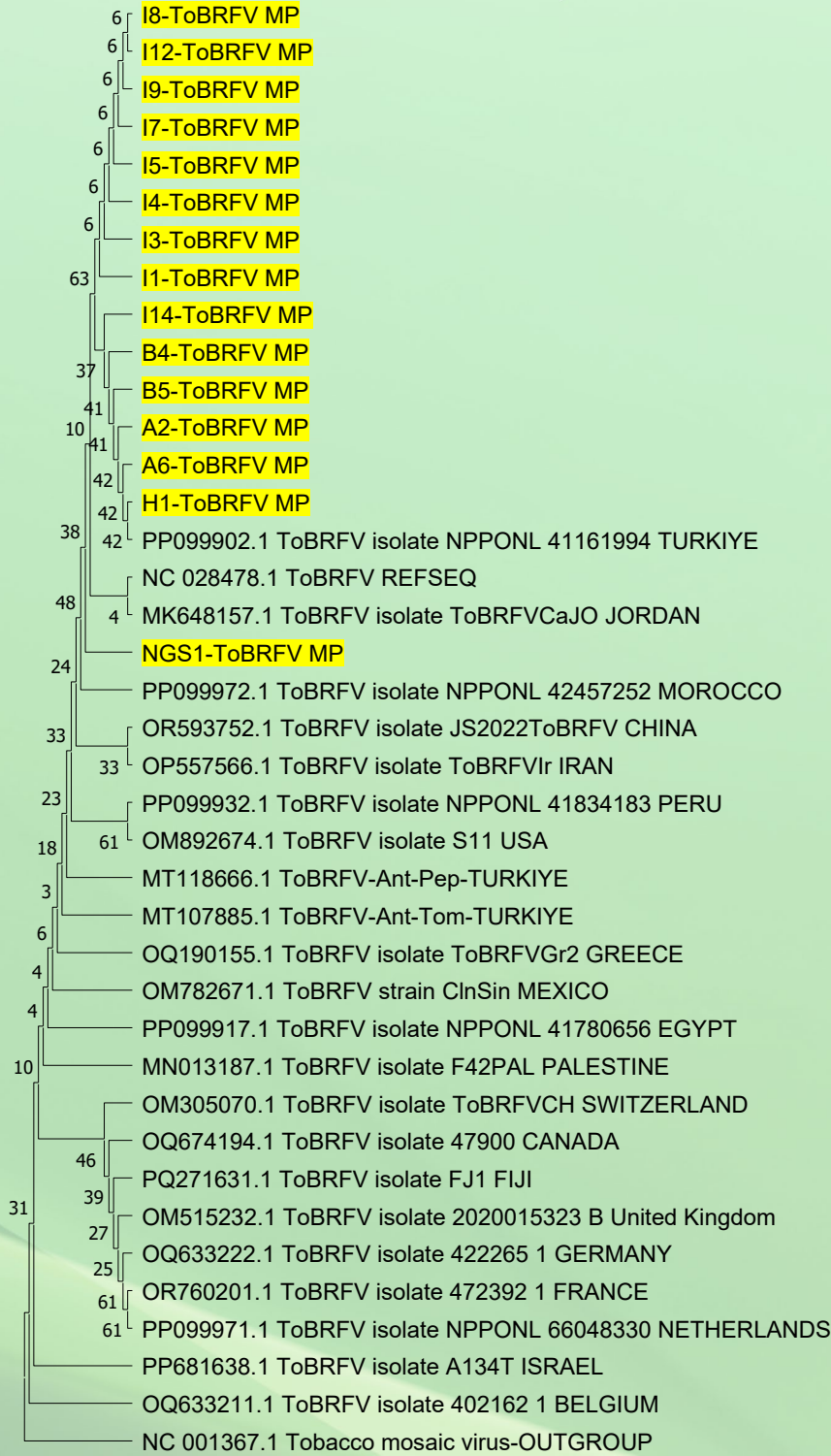
ToBRFV tarımsal faaliyetler sırasında mekanik veya tohum yoluyla bulaşmaktadır. Bundan dolayı ToBRFV ve diğer tobamovirüsleri kontrol etmek için etkili ve dayanıklılık genlere ihtiyaç olduğu saptanmıştır. Bu dayanıklılık genlerin ve bitkilerin CRISPR/Cas9 en kısa en doğru genom düzenleme aracı ile üretilebileceği düşünülmekte olup bu yöntem ile ToBRFV dayanıklı domates yetiştiriciliği kolaylaşacağı düşünülmektedir.





Şekil 2: ToBRFV izolatlarının MP (movement protein) nükleotid dizilerinden MEGA11'de Komşu-Birleştirme yöntemi ile çıkarılan filogenetik ağacı. Bu çalışmadan elde edilen izolatlar sarı ile vurgulanmıştır. NGS1 izolatu iç kontrol izolatımızdır. İç düğümlerdeki sayılar, 1.000 tekrarlamaya dayalı bootstrap yüzdelerini göstermektedir. TMV izolatu dizileri dış grup taksonu olarak kullanılmıştır.





Şekil 3: ToBRFV izolatlarının MP (movement protein) aminoasit dizilerinden MEGA11'de Komşu-Birleştirme yöntemi ile çıkarılan filogenetik ağacı. Bu çalışmadan elde edilen izolatlar sarı ile vurgulanmıştır. NGS1 izolatu iç kontrol izolatımızdır. İç düğümlerdeki sayılar, 1.000 tekrarlamaaya dayalı bootstrap yüzdeleri göstermektedir. TMV izolatının aa dizileri dış grup taksonu olarak kullanılmıştır.

Teşekkür

Bu makale, Ali Enes ÖZDEMİR'in yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Kaynaklar

Caruso AG, Bertacca S, Parrella G, Rizzo R, Davino S, Panno S. 2022. Tomato brown rugose fruit virus: a pathogen that is changing the tomato production worldwide. Ann. Appl. Biol. 181(3):258–74



- Dombrovsky A, Smith E. 2017. Seed transmission of tobamoviruses: aspects of global disease distribution. In *Advances in Seed Biology*, ed. JC Jimenez-Lopez, pp. 233–60. London: IntechOpen
- EPPO. 2022. Tomato brown rugose fruit virus (TOBRFV) datasheet. EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/datasheet>
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Güller, A., Usta, M., & Randa-Zelyüt, F. (2023). Genetic diversity and population structure of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) variants from Antalya province, Turkey. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 51(3), 13356. <https://doi.org/10.15835/nbha51313356>.
- Hak, H., & Spiegelman, Z. (2021). The Tomato brown rugose fruit virus movement protein overcomes Tm-2² resistance in tomato while attenuating viral transport. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(9), 1024-1032.
- He S, Krainer KMC. 2020. Pandemics of people and plants: Which is the greater threat to food security? *Mol. Plant* 13(7):933–34
- Kang BC, Yeam I, Jahn MM (2005) Genetics of plant virus resistance. *Annu Rev Phytopathol* 43: 581–621
- Klap C, Luria N, Smith E, Hadad L, Bakelman E, et al. 2020. Tomato brown rugose fruit virus contributes to enhanced pepino mosaic virus titers in tomato plants. *Viruses* 12(8):879
- Levitzky N, Smith E, Lachman O, Luria N, Mizrahi Y, et al. 2019. The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. *PLOS ONE* 14(1):e0210871
- Pandey AK, Sain SK, Singh P. 2016. A perspective on integrated disease management in agriculture. *Bio Bull.* 2(2):13–29
- Pelham J (1966) Resistance in tomato to tobacco mosaic virus. *Euphytica* 15: 258–267 Piron F,
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salem, N. M., Jewehan, A., Aranda, M. A., & Fox, A. (2023). Tomato brown rugose fruit virus pandemic. *Annual review of phytopathology*, 61(1), 137-164.
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Zuckerkindl E. and Pauling L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel, pp. 97-166. Academic Press, New York.

