



گزارش علمی کوتاه

اولین گزارش از ویروس پیچیدگی برگ فلفل و بتاستلایت همراه با آن از فلفل دلمه‌ای و گوجه‌فرنگی در استانهای مرکزی ایران

مهرداد صالح‌زاده^{۱*}، علیرضا افشاریفر^۱، سعیده دهقانپور فراشاه^۲ و مسعود رضائی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۳۱)

بیماری پیچیدگی برگ فلفل (Chilli leaf curl disease)، یک تهدید جدی در فلفل و چندین محصول مهم دیگر در خانواده سولاناسه است که توسط تعدادی از بگوموویروس‌ها ایجاد می‌شود که از میان آن‌ها ویروس پیچیدگی برگ فلفل (*chilli leaf curl virus; ChiLCV*) از پراکنش زیادی برخوردار است و خسارات عمده‌ای را به این محصولات در سرتاسر نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان وارد می‌نماید (Nigam et al. 2015). ویروس پیچیدگی برگ فلفل از جنس *Begomovirus* و تیره *Geminiviridae* است (Senanayake et al. 2007). دی ان ای ژنومی بگوموویروس‌ها که از نوع تک‌لای حلقوی هستند می‌توانند بصورت یک‌قسمتی یا دو قسمتی باشند. ژنوم‌های یک‌قسمتی معمولاً همراه با مولکول‌هایی بنام ستلایت می‌باشند (آلفاستلایت یا بتاستلایت). نشان داده شده است که بتاستلایت‌ها در القاء و شدت علائم بیماری ناشی از بگوموویروس‌های کمکی خود نقش دارند (Bridson et al. 2001; Chattopadhyay et al. 2008). در بازدیدی که در پائیز ۱۴۰۰ از گلخانه‌های فلفل و گوجه‌فرنگی استان‌های مرکزی ایران (یزد، اصفهان و کرمان)، به عمل آمد، از تعدادی از گیاهان فلفل دلمه‌ای و گوجه‌فرنگی با علائم بوته‌انبوهی، کاهش اندازه و پیچیدگی برگ‌ها مخصوصاً برگ‌های انتهایی (شکل‌های ۱ و ۲) و برجسته شدن رگبرگ‌ها و همچنین از برخی علف‌های هرز از جمله عروسک پشت‌پرده با علائم زردی در اطراف گلخانه‌ها نمونه‌برداری شد (شکل ۳). به منظور بررسی نقش بگوموویروس‌ها در آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده، دی‌ان‌ای کل از بافت برگ‌های جمع‌آوری شده به روش CTAB (Gawel, 1991) استخراج و همراه با یک جفت آغازگر دژنره بگوموویروس‌ها شامل B^C primer (Deng et al., 1994) و primer PCR181^V (Rojas et al., 1993) در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از جفت آغازگر مذکور، منجر به تکثیر قطعه‌ای حدود ۵۰۰ جفت‌باز متعلق به بخشی از ژنوم بگوموویروس‌ها در چارچوب خوانش (open reading frame) پروتئین پوششی در نمونه‌های فلفل دلمه‌ای (یزد و کرمان)، گوجه‌فرنگی (یزد) و عروسک پشت‌پرده (یزد) شد. تعیین ترادف نوکلئوتیدی قطعه‌ی ۵۰۰ جفت‌بازی و مقایسه اولیه توالی آن با ناحیه متناظر ژنوم بگوموویروس‌ها با استفاده از برنامه

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

۱ و ۳. مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز.

۲. استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.



شکل ۲. زردی، لوله شدن به طرف بالا و پیچیدگی برگ‌های گوجه‌فرنگی در مجاورت بوته‌های فلفل آلوده به ویروس پیچیدگی برگ فلفل در منطقه تفت یزد (دی ۱۴۰۰)

Fig. 2. Yellowing, upward rolling and curling of tomato leaves in the vicinity of chilli leaf curl virus-infected pepper plants in Taft region of Yazd (December 1400)



شکل ۱. کوچک شدن، چین خوردگی، پیچیدگی و زردی فاصله بین رگبرگ‌ها (در شکل راست واضح‌تر است) برگ‌های بوته‌های فلفل دلمه‌ای در منطقه ملاباشی یزد (آبان ۱۴۰۰)

Fig. 1. Smalling, wrinkling, curling and interveinal chlorosis (more clear in the right figure) of the leaves of the bell pepper plants in Mollabashi region of Yazd (November 1400)

NCBI BLAST نشان داد که این قطعه بیشترین شباهت را با ناحیه متناظر ژنوم ChiLCV دارد و لذا ویروس جدا شده به- عنوان جدایه ایرانی ChiLCV در نظر گرفته شد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های حاصل از محصولات PCR با توالی- های متناظر موجود در GenBank نشان داد که جدایه ایرانی ChiLCV بیشترین شباهت را به میزان ۹۷/۸۳ درصد با دو جدایه گوجه‌فرنگی همین ویروس از عمان (رس‌شمار HG969197.1) و پاکستان (رس‌شمار LN680624.1) و کمترین

میزان شباهت را به میزان ۸۹/۹۶ درصد با جدایه‌ی ChiLCV پایا از هند (رس‌شمار MF737343.1) دارد. در ادامه برای بررسی احتمال وجود بتاستلایت همراه با ChiLCV، از یک جفت آغازگر اختصاصی بتاستلایت (Bridson *et al.* 2001) Beta01/Beta02; استفاده شد که منجر به تکثیر یک قطعه حدود ۱۳۵۰ جفت‌بازی از گیاهان فلفل دلمه‌ای و گوجه‌فرنگی نمونه‌برداری شده از ملاباشی یزد و دهقانان اصفهان گردید. مقایسه میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی این قطعه (۱۳۵۱ جفت‌باز) با توالی‌های متناظر موجود در GenBank نشان داد که بتاستلایت جدایه‌ی ایرانی ChiLCV دارای بیشترین شباهت با بتاستلایت همراه با ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (tomato leaf curl virus, ToLCV) گزارش شده از ایران به میزان ۱۰۰ درصد (رس‌شمار MN175237.1) (Bananej *et al.* 2019)، و میزان ۹۹/۲۷ درصد با بتاستلایت همراه



شکل ۳. زردی برگ‌های علف هرز عروسک پشت پرده در که در گلخانه‌های فلفل‌کاری در کنار جاده‌ی کرمان - یزد (مهر ۱۴۰۰) مشاهده شد.

Fig. 3. Yellowing of the leaves of the *Physalis* weed plants in the bell pepper greenhouses that was observed along the Kerman-Yazd road (October 1400).

جدایه عمان همین ویروس (رس شمار MN328260.1)، و کمترین میزان مشابهت به میزان ۹۷/۶۰ درصد با بتاستلایت جدایه‌ی پنبه ویروس پیچیدگی برگ پنبه (cotton leaf curl virus, CLCuV) از پاکستان (رس شمار MN175236) را دارد. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش و پژوهش‌های مشابه به نظر می‌رسد که به دلایل مختلفی که نیاز به بررسی بیشتری دارد، بگوموویروس‌ها در ایران با سرعت زیادی در حال گسترش هستند. بررسی‌های بیشتر جهت تعیین تنوع ژنتیکی، تفاوت شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف ویروس، دامنه میزبانی، پراکنش و فراوانی ویروس در کشور، در دست انجام می‌باشد. این اولین گزارش از وجود ویروس پیچیدگی برگ فلفل و بتاستلایت همراه با آن در ایران می‌باشد.

واژگان کلیدی: بتاستلایت، بگوموویروس، جمینی‌ویروس، ویروس پیچیدگی برگ فلفل و ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی



Short Report

The first report of the chilli leaf curl virus and its associated-betasatellite from bell pepper and tomato in the central provinces of Iran**M. Salehzadeh^{1*}, A. Afsharifar¹, S. Dehghanpour Farashah², and M. Rezaei³**

(Received: 27.2.2022; Accepted: 20.4.2022)

Chilli leaf curl disease is one of the serious threats to pepper and several major solanaceous crops, caused by a number of begomoviruses, among which *chilli leaf curl virus* (a member of the *Begomovirus* genus, *Geminiviridae*) is the most prevalent and causes significant damage to these crops throughout the tropics and subtropics regions of the world (Nigam *et al.* 2015; Senanayake *et al.* 2007). Single-stranded (ss)-circular DNA genome of begomoviruses are either monopartite bipartite or. Satellite molecules (betasatellite or alphasatellite) are often associated with monopartite begomoviruses genomes. Betasatellites have been shown to be involved in inducing and the severity of disease symptoms of their helper monopartite begomoviruses (Briddon *et al.* 2001; Chattopadhyay *et al.* 2008). During a survey to the greenhouses of pepper and tomato in the central provinces of Iran (Yazd, Isfahan and Kerman) in the fall of 2021, samples were collected from a number of bell pepper and tomato plants showing begomovirus-like symptoms such as bushy growth, reduced leaf size, leaf curling (Figs 1 and 20 and vein swelling especially in the terminal leaves. Some weed species, occurring within proximity to the tomato greenhouses, including *Physalis* weeds that showed yellowing (Fig. 3) were also sampled. To identify the *Begomovirus* infection in the collected samples, total DNA samples were extracted using a CTAB-based (Gawel, 1991) method. The extracted DNAs were subjected to polymerase chain reaction (PCR) using a begomovirus degenerate primer pair including B^C primer Deng *et al.*, 1994) and primer181PCR^V (Rojas *et al.*, 1993). Using the aforementioned primer pair in PCR reactions led to the amplification of a fragment of about 500 bp belonging to a part of the genome of Begomoviruses in the open reading frame of the coat protein in the samples of bell pepper (Yazd and Kerman), tomato (Yazd) and *Physalis* sp. (Yazd). Nucleotide sequencing of the 500-bp fragment and an initial comparison of its sequence to the corresponding region of begomoviruses genomes using NCBI BLAST program indicated that this DNA fragment is most similar to the corresponding region of chilli leaf curl virus (ChiLCV) genome, and therefore the isolated virus was considered as the Iranian isolate of ChiLCV. Multiple alignments of the resulted nucleotide sequences with the corresponding sequences in GenBank showed that the Iranian isolate of ChiLCV was most similar (97.83%) to two tomato isolates of the same virus from Oman (Acc. No. HG969197.1) and Pakistan (Acc. No. LN680624.1) and was less similar (89.96%) to papaya ChiLCV isolate from India (Acc. No. MF737343.1). To further investigate the possibility of association of a betasatellite with ChiLCV, a specific betasatellite primer pair (Beta01/Beta02; Briddon *et al.* 2001) was used which led to amplification of an approximately 1300 bp fragment of betasatellite from bell pepper and tomato samples collected in Molabashi and Dehaghan regions in Yazd and Isfahan provinces, respectively, The comparison of the nucleotide sequence of this DNA fragment (1351 bp in size) with the corresponding sequences in GenBank indicated that the betasatellite of the Iranian isolate of ChiLCV had the highest similarity (100 %) with the betasatellite DNA associated with the Iranian isolate of ToLCV (Acc. No. MN175237.1) (Benanej *et al.* 2019) and 99.27% with the betasatellite DNA associated

* Corresponding author's email: MehردادSalehzadeh@gmail.com

1. 1,3Plant Virology Research Center, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Assistant professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

with Oman's isolator of the same virus (Acc. No. MN328260.1), and less similarity of 60.97% with the betasatellite DNA associated with a cotton isolate of cotton leaf curl virus (CLCuV) from Pakistan (Acc. N. MN175236). In accordance on the results of this study and similar other studies, it seems that for various reasons that need further investigation, begomoviruses in Iran that have special climatic conditions, ie having a tropical and subtropical climate, are spreading rapidly,. Further investigations are underway to identify the genetic diversity, differences in pathogenicity of different virus strains, natural host range, and virus distribution and frequency of the virus in the country. This is the first report of chilli leaf curl virus and its associated-betasatellite in Iran.

Keywords: Betasatellite, *Begomovirus*, *Geminivirus*, *Chilli leaf curl virus*, Tomato leaf curl virus

منابع

- Anfoka G. H., Abhary M. and Nakhla M. K. 2005. Molecular identification of species of the *Tomato yellow leaf curl virus* complex in Jordan. *Journal of Plant Pathology* 65-70.
- Bananej K., Shafiq M. and Shahid M. S. 2021. Association of *cotton leaf curl Gezira virus* with tomato leaf curl betasatellite infecting *Carica papaya* in Iran. *Australasian Plant Disease Notes* 16(1): 1-4.
- Briddon R. W., Mansoor S., Bedford I. D., Pinner M. S., Saunders K., Stanley J. and Markham P. G. 2001. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology* 285(2): 234-243.
- Cui X., Tao X., Xie Y., Fauquet C. M. and Zhou X. 2004. A DNA β associated with *Tomato yellow leaf curl China virus* is required for symptom induction. *Journal of Virology* 78(24): 13966-13974.
- Chattopadhyay B., Singh A. K., Yadav T., Fauquet C. M., Sarin N. B. and Chakraborty S. 2008. Infectivity of the cloned components of a begomovirus: DNA beta complex causing *chilli leaf curl virus* in India. *Archive of Virology* 153:533-539.
- Deng D., McGrath P. F., Robinson D. J. and Harrison B. D. 1994. Detection and differentiation of whitefly-transmitted Geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology* 125(2): 327-336.
- Gawel N. J. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomea*. *Plant Molecular Biology Report* 9, 292-296.
- Nigam K., Suhail S., Verma Y., Singh V. and Gupta S. 2015. Molecular characterization of Begomovirus associated with leaf curl disease in chilli. *World Journal of Pharm Research* 4:1579-1592.
- Pakniat A., Behjatnia S. A. A., Kharazmi S., Shahbazi M. and Izadpanah K. 2011. Molecular characterization and construction of an infectious clone of a new strain of *Tomato yellow leaf curl virus* in southern Iran.
- Rojas M. R. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77, 340-347.
- Senanayake D. M. J. B., Mandal B., Lodha S., Varma A. 2007. First report of *Chilli leaf curl virus* affecting chilli in India. *Plant Pathology Journal* 56:343.