



## مقاله پژوهشی

میزبان‌های طبیعی جدید و تحلیل تبارزائی پنج جدایه ویروس پیچیدگی برگ‌زرد  
گوجه‌فرنگی و ستلایت‌های همراه در استان کرماناسرا سالاری<sup>۱،۲</sup>، جهانگیر حیدر نژاد<sup>۳،۴\*</sup>، حسین معصومی<sup>۳</sup>، وحید حسونند<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۷)

## چکیده

ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV*) یکی از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده گوجه‌فرنگی و تعدادی دیگر از گیاهان زراعی، سبزیجات و گیاهان وحشی در نقاط مختلف جهان است. در این مطالعه، نمونه‌های گیاهی بادرشوبی (*Dracocephalum moldavica L.*)، باقلا، سویا، ریحان و فرفیون (*Euphorbia sp. L.*) دارای علائم زردی عمومی پیچیدگی و فنجان‌شدن برگ، ریزبرگی، بدشکلی و کوتولگی از مزارع شهرستان جیرفت در استان کرمان در سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند و آلودگی تعدادی از آنها به *TYLCV* و ستلایت‌های همراه (بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی *Tomato leaf curl betasatellite, ToLCB*) و آلفاستلایت بدون علائم پنبه‌ دارویی *Gossypium darwinii symptomless alphasatellite, GDarSLA*) اثبات گردید. ترادف ژنوم کامل پنج جدایه *TYLCV* از میزبان‌های فوق دارای ۹۹-۹۰ و ۹۷-۸۸ درصد یکسانی به ترتیب با یکدیگر و با سایر جدایه‌های انتخابی این ویروس از ژن‌بانک بودند. علاوه بر این، طول کامل مولکول *ToLCB* که در چهار میزبان بادرشوبی، باقلا، سویا و ریحان شناسائی شدند دارای ۹۹-۹۶ درصد یکسانی با یکدیگر و ۹۵-۹۴ درصد با جدایه‌های انتخابی همین بتاستلایت در ژن‌بانک بودند. ترادف ژنوم کامل مولکول *GDarSLA* که تنها در گیاه سویا شناسائی گردید دارای ۹۸-۹۳ درصد یکسانی با ژنوم دو جدایه از همین آلفاستلایت بود که قبلاً از ایران گزارش شده‌اند. پنج گیاه فوق به عنوان میزبان‌های جدید *TYLCV, ToLCB* و/یا *GDarSLA* در ایران و دو گیاه بادرشوبی و باقلا به عنوان میزبان‌های جدید این ویروس در دنیا معرفی می‌گردند. نتایج بدست‌آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که *TYLCV* و بتاستلایت همراه آن دارای گسترش وسیعی در مزارع جیرفت می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آلفاستلایت، بتاستلایت، بگومو ویروس، پیچیدگی برگ، گوجه‌فرنگی

\* قسمتی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: [jheydarnejad@uk.ac.ir](mailto:jheydarnejad@uk.ac.ir)

۱ دانش آموخته دوره دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲ استادیار بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت

۳ استاد بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کد پستی ۷۶۱۶۹۱۴۱۱۱

۴ پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان



DOI:10.22034/ijpp.2023.1988545.398

## Research Article

# New natural hosts and phylogenetic analysis of five *Tomato yellow leaf curl virus* isolates and associated satellites in Kerman province\*

Asra Salari<sup>1,2</sup>, Jahangir Heydarnejad<sup>3,4\*\*</sup>, Hossain Massumi<sup>3</sup>, Vahid Hassanvand<sup>1</sup>

(Received: 28.1.2023; Accepted: 17.5.2023)

### Abstract

*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) is one of the most important tomato infecting viruses worldwide. In this study, symptomatic plant samples of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.), broad bean, soybean, basil and euphorbia (*Euphorbia* sp. L.) were collected from Jiroft farms (Kerman province) in 2018-2019 and TYLCV infection as well as association of *Tomato leaf curl betasatellite* (ToLCB) and/or *Gossypium darwinii symptomless alphasatellite* (GDarSLA) with some of the samples were identified. Complete nucleotide sequences of the genome of five selected TYLCV isolates obtained from five plant hosts shared identities of 90-99% with each other and 88-97 with the selected GenBank isolates of TYLCV. Furthermore, the genome of ToLCB isolates from Moldavian dragonhead, broad bean, soybean and basil shared identities of 96-99% with each other and 94-95% with the counterpart betasatellite molecules from the GenBank database. Nucleotide sequence of GDarSLA, identified in soybean shared 93-98% identities with two Iranian GenBank isolates of GDarSLA. The above five plants are reported as new natural hosts of TYLCV, ToLCB and/or GDarSLA in Iran and also Moldavian dragonhead as well as broad bean are reported as new natural hosts of the virus in the world. Results of the current study indicate that TYLCV and the associated betasatellite have a wide distribution in Jiroft farms (Kerman province).

**Key words:** Alphasatellite, Betasatellite, Begomovirus, Leaf curl, Tomato

\*A part of PhD thesis of the first author submitted to College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

\*\*Corresponding author's, E-mail address: jheydarnejad@uk.ac.ir

1 Graduated PhD student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

2 Assistant professor of Plant Pathology, College of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran

3 Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman 7616914111, Iran

4 Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman

## مقدمه

حلقوی بگوموویروس‌ها گزارش شده است. ژنوم آلفا- و بتاستلایت‌ها به اندازه تقریبی ۱/۴ کیلوباز و بطور عمده همراه با بگوموویروس‌های تک‌بخشی از دنیای قدیم می‌باشند (Gnanasekaran & Chakraborty 2018). با این وجود، در دهه گذشته مولکول‌های آلفا- و بتاستلایت همراه با برخی از اعضای جنس *Mastrevirus* نیز گزارش شده‌اند (Hamza et al. 2018; Kumar et al. 2014).

بیماری پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) که توسط مجموعه‌ای از بگوموویروس‌ها ایجاد می‌گردد، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه در مناطق گرمسیری و معتدل است. احتمالاً خاستگاه این بیماری و مرکز تنوع ژنتیکی مجموعه ویروس‌های پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (tomato yellow leaf curl viruses, TYLCVs) خاورمیانه بوده و بیماری از این منطقه به سایر مناطق انتشار یافته است (Lefevre et al. 2010). ایران به عنوان بخشی از خاورمیانه، یکی از مراکز مهم شیوع بگوموویروس‌هاست و تاکنون چندین گونه و نژاد متفاوت از مجموعه ویروس‌های عامل TYLCD از نقاط مختلف کشور گزارش شده‌اند. اولین بار شیوع TYLCV در مزارع گوجه‌فرنگی ایران در سال ۱۹۹۶ گزارش گردید (Hajimorad et al. 1996) و سپس مترادف ژنوم کامل چندین جدایه و نژاد TYLCV تعیین شد (Bananej et al. 2004; Behjatnia et al. 2003; Fazeli et al. 2009). گونه‌های دیگری از ویروس‌های ایجادکننده TYLCD شامل ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (Tomato leaf curl Palampur virus, ToLCPMV) (Heydarnejad et al. 2009, 2013) و ویروس نیودله‌لی پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (Tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV) (Yazdani-Khameneh et al. 2016) از ایران در میزبان‌های مختلف از جمله کدوئیان گزارش شدند.

خانواده *Geminiviridae* یکی از بزرگترین خانواده‌های ویروس‌های گیاهی با بیش از ۵۰۰ گونه است. ژنوم این ویروس‌ها از نوع دی‌ان‌ای حلقوی و تک‌رشته‌ای به اندازه ۲/۵-۵/۲ کیلوباز می‌باشد که در پیکره‌های دوقلوی به هم چسبیده به ابعاد ۲۲×۳۸ نانومتر بسته‌بندی می‌گردند (Fiallo-Olivé et al. 2021). بر اساس آخرین گزارش کمیته بین‌المللی تقسیم‌بندی ویروس‌ها (ICTV)، جیمینی ویروس‌ها بر اساس ویژگی‌هایی مانند دامنه میزبانی، حشره ناقل و محتوای ژنتیکی به ۱۴ جنس شامل *Mastrevirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Becurtovirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus*, *Capulavirus*, *Grablovirus*, *Citlodavirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus* و *Topilevirus* تقسیم‌بندی می‌شوند (Roumagnac et al. 2022). جنس *Begomovirus* با بیش از ۴۴۰ گونه ویروسی، بزرگترین جنس ویروس‌های گیاهی است که غالباً در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان، بسیاری از گیاهان زراعی، سبزیجات و علف‌های هرز را آلوده کرده و باعث ایجاد خسارت‌های سنگینی به برخی از این گیاهان می‌گردند. ژنوم بگوموویروس‌ها، بصورت تک‌بخشی و یا دوبخشی (DNA-A و DNA-B) است و طول هر بخش از ژنوم حدود ۲/۵-۲/۶ کیلوباز است (Fiallo-Olivé et al. 2021; Varma & Malathi 2003). بگوموویروس‌های تک‌بخشی غالباً از دنیای قدیم و بگوموویروس‌های دوبخشی بیشتر از دنیای جدید گزارش شده‌اند. هر دو گروه از بگوموویروس‌ها در طبیعت توسط سفیدبالک *Bemisia tabaci* با رابطه پایا-گردشی منتقل می‌شوند (Brown et al. 2012).

تاکنون همراهی سه نوع مولکول دی‌ان‌ا ستلایت شامل بتاستلایت، آلفاستلایت و دلتاستلایت با ژنوم تک‌لای

نمونه از هر گونه گیاهی انتخاب شد و جهت غنی‌سازی مولکول‌های حلقوی موجود در آن‌ها، از روش دایره غلتان (rolling circle amplification, RCA) و آنزیم فی ۲۹ دی‌ان‌ا پلی‌مراز (Templphi Healthcare) استفاده گردید (Shepherd *et al.* 2008). محصول آرسی‌ای مربوط به پنج جدایه از پنج گیاه مختلف با آنزیم‌های برشی مختلف شامل *BamHI*، *SaII*، *EcoRI*، *HindIII* بریده شدند تا آنزیمی شناسائی گردد که تنها دارای یک جایگاه در ژنوم ویروس باشد. در نهایت آنزیم *HindIII* برای برش ژنوم کامل ویروس و همسانه‌سازی آن در پلاسמיד pBluescript SK(+) انتخاب گردید.

### تکثیر ژنوم ستلایت‌های همراه

محصول آرسی‌ای به عنوان رشته الگو و آغازگرهای اختصاصی همپوشان Alpha-F/Alpha-R (Salari *et al.* 2023) و Beta01/Beta02 (Briddon *et al.* 2002) به ترتیب برای تکثیر ژنوم کامل آلفا- و بتاستلایت‌ها استفاده شد. برنامه آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به منظور واسرشته‌سازی اولیه و سپس ۳۵ چرخه تکثیری شامل ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها به رشته الگو و یک دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای ساخته شدن قطعات انتخاب گردید. در نهایت، در پایان چرخه‌ها و به منظور تکمیل ساخت قطعات، ده دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اضافه گردید.

### همسانه‌سازی و تعیین ترادف

محصول آرسی‌ای مربوط به ژنوم کامل هر کدام از پنج جدایه TYLCV (جدایه‌های 70J، 44J، 87J، Soja-J و 71J) به ترتیب مربوط به بادرشوبی، باقلا، سویا، ریحان و فرفیون) و همچنین پلاسמיד pBluescript SK(+) بطور جداگانه با آنزیم برشی *HindIII* برش داده شدند و سپس ژنوم ویروس مربوط به هر پنج جدایه با استفاده از آنزیم

در این مطالعه، وقوع ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی، آلفاستلایت و بتاستلایت‌های همراه آن در گیاهان بادرشوبی، باقلا، سویا، ریحان و فرفیون در مزارع جیرفت واقع در استان کرمان مورد بررسی قرار گرفته و ژنوم کامل پنج جدایه ویروس از میزبان‌های فوق و همچنین ژنوم کامل ستلایت‌های همراه آن‌ها به لحاظ تبارشناسی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌های بررسی

### نمونه‌برداری

طی بازدیدهایی که در سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ از مزارع شهرستان جیرفت استان کرمان انجام گرفت ۴۰ نمونه از گیاهان زراعی، سبزیجات و علف‌های هرز با نشانه‌های پیچیدگی و فنجانی شدن برگ، زردی، ریزبرگی، بدشکلی و کوتولگی بوته جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها روی یخ برای ادامه کار به آزمایشگاه منتقل شدند.

### استخراج دی‌ان‌ا کل و آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

دی‌ان‌ای کل از نمونه‌های جمع‌آوری شده به روش CTAB (Zhang *et al.* 1998) استخراج گردید و با توجه به شیوع گسترده TYLCV در منطقه، برای بررسی مقدماتی آلودگی نمونه‌ها، از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و جفت‌آغازگر عمومی 181v/Bc (Rojas *et al.* 1993; Deng *et al.* 1994) و سپس جفت‌آغازگر اختصاصی -TYLCV-526-F/TYLCV-1237-R (Shamshiri *et al.* 2019) استفاده شد. این آغازگرها قادر به تکثیر قطعاتی به اندازه‌های به ترتیب ۵۵۰ و ۷۳۰ جفت‌باز از ژنوم بگوموویروس‌ها و TYLCV می‌باشند.

### تکثیر ژنوم ویروس

از میان نمونه‌هایی که در آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، آلودگی آن‌ها به TYLCV اثبات شده بود، یک

تبارزائی، از نرم‌افزار MEGAX و روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) با اعتبارسنجی ۱۰۰۰ استفاده گردید و از ترادف قطعه A ژنوم مربوط به ویروس مالی پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl Mali virus*, TYLCMLV; FM212663) و بتاستلایت جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (*Cotton leaf curl Gezira betasatellite*, CLCuGeB; KM279620) به عنوان مدل‌های خارج گروه استفاده شد. به منظور تعیین نژادهای جدایه‌های به دست آمده از این تحقیق، ترادف‌های به دست آمده با نمایندگانی از نژادهای مختلف این ویروس در دنیا (Lefeuvre et al. 2010) مقایسه شدند.

### واکاوی نو ترکیبی

به منظور بررسی احتمال وقوع رویدادهای نو ترکیبی بین جدایه‌های مورد مطالعه TYLCV در این تحقیق و ۲۱ جدایه انتخابی از ژن‌بانک مربوط به نژادهای مختلف این ویروس و تشخیص والدین آن‌ها (ترادف‌های شرکت‌کننده در این رویدادها)، واکاوی نو ترکیبی با استفاده از نرم‌افزار RDP5 (Martin et al. 2021) و الگوریتم‌های ردیابی نو ترکیبی شامل RDP، 3SEQ، MAXIMUM CHI، CHIMERA، GENECONV و BOOTSCAN انجام شد.

### نتایج و بحث

بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به همراه آغازگرهای عمومی بگومو ویروس‌ها و سپس آغازگرهای اختصاصی TYLCV نشان داد که گیاهان بادرشسبوی با علائم کوتولگی، زردی شدید و فنجان‌شدن برگ‌ها؛ باقلا با علائم کوتولگی و فنجان‌شدن برگ‌ها؛ سویا با علائم کوتولگی و زردی عمومی؛ ریحان با علائم کوتولگی، فنجان‌شدن برگ‌ها، ریزبرگی، لکه‌های بافت‌مرده و زردی عمومی و فریون با نشانه‌های زردی عمومی و پیچیدگی برگ‌ها به TYLCV

pBluescript SK(+), T4 DNA Ligase، در داخل ناقل pGEM®-T Easy (Promega, USA) همسانه‌سازی شدند. سپس پلاسمیدهای نو ترکیب بدست آمده حاوی ژنوم پنج جدایه TYLCV، یک مولکول آلفاستلایت (جدایه Soja-J از گیاه سویا) و چهار مولکول بتاستلایت (جدایه‌های 44J، 70J، Soja-J و 87J) به باکتری *Escherichia coli* نژاد XLI Blue منتقل شدند. پس از تکثیر باکتری، پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی ژنوم ویروس و یا ستلایت‌های همراه از باکتری استخراج گردیدند و از هر دو طرف توسط کمپانی ماکروژن (Macrogen Company, South Korea) به روش Sanger تعیین ترادف شدند. ترادف‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SeqMan به عنوان بخشی از مجموعه DNASTAR Lasergene (نرم‌افزار واکاوی ترادف (DNA Star Inc., Madison, WI, USA)) بررسی شدند و بعد از ویرایش و تجمیع ترادف‌های مربوط به هر نمونه، برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند. ترادف‌های نوکلئوتیدی بدست آمده شامل ژنوم کامل پنج جدایه TYLCV، چهار مولکول بتاستلایت و یک مولکول آلفاستلایت با رس‌شمارهای OQ319123- OQ319131 و MZ911865 در ژن‌بانک (GenBank) ثبت گردیدند.

### واکاوی‌های تبارزائی

برای مقایسه درصد یکسانی (identity) ترادف‌های بدست آمده با یکدیگر و با سایر ترادف‌های TYLCV موجود در ژن‌بانک، از نرم‌افزار SDT v1.2 (Muhire et al. 2014) استفاده گردید. هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های بدست آمده، با استفاده از نرم‌افزار MEGAX (Kumar et al. 2018) و بکارگیری روش MUSCLE (Edgar 2004) صورت گرفت. برای بازسازی درخت‌های

SK(+) همسانه‌سازی شدند. تعیین ترادف نوکلئوتیدی پلاسمیدهای نوترکیب، آلودگی این پنج گیاه به TYLCV را تأیید نمود. به استثنای جدایه Soja-J مربوط به گیاه سویا که طول ژنوم آن ۲۷۸۱ نوکلئوتید تعیین گردید، طول ژنوم چهار جدایه دیگر ۲۷۸۲ نوکلئوتید بدست آمد (جدول ۱).

آلوده می‌باشند (شکل ۱). از هر گونه گیاهی، یک نمونه انتخاب گردید و بعد از برش محصول آر سی ای مربوط به هر کدام توسط چهار آنزیم برشی مختلف، در نهایت محصول آر سی ای بریده شده با آنزیم *HindIII* به اندازه تقریبی ۲/۷ کیلوباز مربوط به هر جدایه، در داخل پلاسمید pBluescript



شکل ۱- علائم گیاهان آلوده به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی جمع‌آوری شده از مزارع جیرفت (استان کرمان). (a) ریحان (نمونه 87J) با علائم زردی عمومی، ریزبرگی، لکه‌های بافت مرده و کوتولگی؛ (b) باقلا (نمونه 70J) با نشانه‌های زردی خفیف، فنجان‌شدن برگ‌ها و کوتولگی؛ (c) فرفیون (نمونه 71J) با نشانه‌های فنجان‌شدن و زردی حاشیه برگ‌ها و (d) بادرشوبی (نمونه 44J) با نشانه‌های زردی حاشیه برگ‌ها، فنجان‌شدن برگ‌ها و کوتولگی.

**Figure 1. Symptoms of the samples infected with *Tomato yellow leaf curl virus* collected from Jiroft farms (Kerman province). a) Basil (87J sample) showing general yellowing, little leaf, necrotic spots and dwarfing; b) broad bean (70J sample) showing mild yellowing, cupped leaves and dwarfing; c) euphorbia (71J sample) showing marginal leaf yellowing and cupped leaves and d) Moldavian dragonhead (44J sample) showing general yellowing, cupped leaves and dwarfing.**

جدول ۱- نتایج حاصل از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تعیین آلودگی نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده از مزارع جیرفت (استان کرمان) به ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی، جدایه‌های ویروس، ستلایت‌های همراه و رس شماره‌های هر کدام.

**Table 1. Results of polymerase chain reaction test for detection of *Tomato yellow leaf curl virus* in collected samples from Jiroft (Kerman province) and virus isolates, associated satellites and their accession numbers.**

Plant host Family	<i>Euphorbia</i> sp. L. Euphorbiaceae	<i>Ocimum basillicum</i> L. Lamiaceae	<i>Glycine max</i> (L.) Merr. Fabaceae	<i>Vicia fabae</i> L. Fabaceae	<i>Dracocephalum moldavica</i> L. Lamiaceae
Number of samples (infected samples)	4 (2)	14 (6)	5 (2)	10 (4)	7 (4)
TYLCV TYLCV isolate	TYLCV- Ker[IR:Jir:71J:Spur:19]	TYLCV- Ker[IR:Jir:87J:Bas:19]	TYLCV-Ker[IR:Jir:Soja-J:Soja:19]	TYLCV- Ker[IR:Jir:70J:Faba:19]	TYLCV- Ker[IR:Jir:44J:DM:18]
Accession number	OQ319126	OQ319123	OQ319127	OQ319125	OQ319130
Associated satellite molecule	-	ToLCB- Ker[IR:Jir:87J:Bas:19]	GDarSLA-Ker[IR:Jir:Soja-J:Soja:19] and ToLCB-Ker[IR:Jir:Soja- J:Soja:19]	ToLCB- Ker[IR:Jir:70J:Faba:19]	ToLCB- Ker[IR:Jir:44J:DM:18]
Accession number	-	OQ319124	OQ319128 OQ319129	MZ911865	OQ319131

فرسیون به ترتیب ۹۹ و ۹۲-۹۰ درصد می باشد. درصد یکسانی سه جدایه مربوط به سویه دوم نیز با یکدیگر ۹۶-۹۷ درصد تعیین گردید.

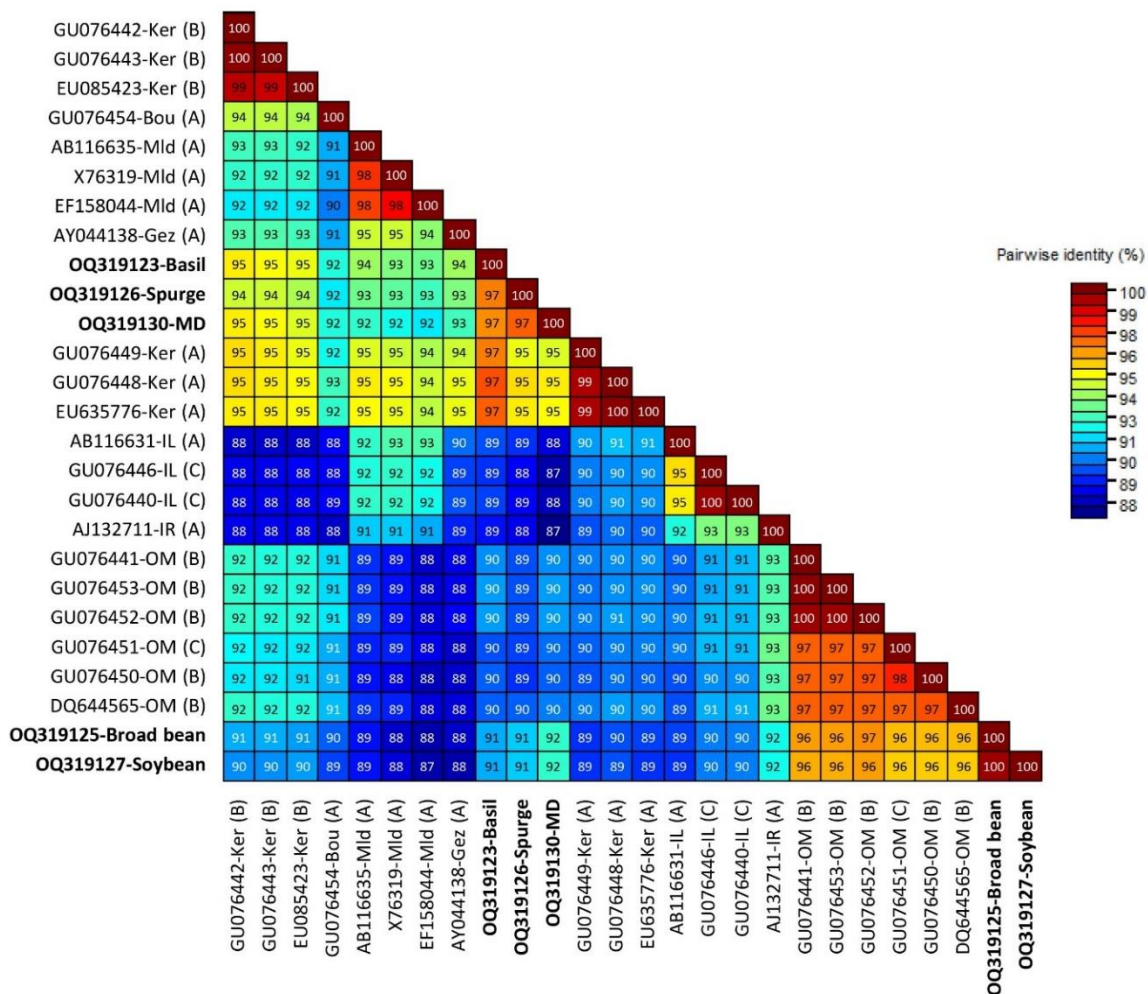
بررسی احتمال وقوع نوترکیبی در ترادف نوکلئوتیدی ژنوم ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی در پنج جدایه حاصل از این تحقیق و ۲۱ جدایه انتخابی از ژن بانک مربوط به نژادهای مختلف این ویروس، بوسیله نرم افزار RDP5، وجود ۲۷ رویداد نوترکیبی را آشکار کرد که هفت رویداد مربوط به جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق بود. جدایه سویا و باقلا از نوترکیبی بین جدایه‌ای از نژاد عمان (TYLCV-OM) به عنوان والد اصلی و جدایه‌ای از فلسطین اشغالی (TYLCV-IL) به عنوان والد فرعی ایجاد شده اند. میزان یکسانی نوکلئوتیدی این دو جدایه با جدایه‌های منتخب ژن بانک متعلق به نژاد عمان (TYLCV-OM)، ۹۶ درصد تعیین شد. با توجه به مرز تعیین نژاد، این دو جدایه متعلق به نژاد عمان (TYLCV-OM) محسوب می شوند. در ژنوم جدایه‌های بادرشوبی و فرسیون در دو محل وقوع نوترکیبی ردیابی شد. در جدایه فرسیون در یک ناحیه، نوترکیبی بین جدایه‌ای از نژاد فلسطین اشغالی (TYLCV-IL) با جدایه‌ای از نژاد کرمان (TYLCV-Ker (A)) و در ناحیه دیگر، نوترکیبی بین جدایه‌های از نژاد عمان (TYLCV-OM) با جدایه بادرشوبی از نژاد کرمان (TYLCV-Ker (A)) ردیابی شد. در جدایه بادرشوبی در یک ناحیه، نوترکیبی بین جدایه‌ای از نژاد فلسطین اشغالی (TYLCV-IL) با جدایه‌ای از نژاد جزیرا (TYLCV-Gez) و در ناحیه دیگر نوترکیبی بین جدایه‌ای از نژاد فلسطین اشغالی (TYLCV-IL) با جدایه‌ای از نژاد عمان (TYLCV-OM) حاصل نوترکیبی بین جدایه‌ای از نژاد عمان (TYLCV-OM) با جدایه‌های از نژاد ملایم (TYLCV-Mld) می باشد (جدول ۲). میزان یکسانی ترادف نوکلئوتیدی این سه جدایه با ترادف‌های منتخب ژن بانک

واکوی ترادف‌های نوکلئوتیدی بدست آمده مربوط به جدایه‌های TYLCV نشان داد که ژنوم آن‌ها مشابه بگومو ویروس‌های تک‌بخشی دنیای قدیم و دارای دو و چهار چارچوب خوانش بترتیب روی رشته ویروسی و رشته مکمل می باشند. جستجو در ژن بانک از طریق نرم افزار نوکلئوتید بلاست (BLASTn) (Altschul et al. 1990) نشان داد که این ترادف‌ها دارای دامنه یکسانی نسبتاً زیادی با جدایه‌های ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) می باشند که قبلاً از ایران یا کشورهای نزدیک ایران گزارش شده اند. با استفاده از نرم افزار SDT v1.2، درصد یکسانی ترادف نوکلئوتیدی ژنوم پنج جدایه با یکدیگر ۹۹-۹۰ درصد تعیین گردید (شکل ۲). این دامنه تغییرات، مربوط به متفاوت بودن دو جدایه باقلا و سویا نسبت به سه جدایه دیگر است. در درخت تبارزائی بازسازی شده نیز جدایه‌های ایرانی مربوط به این تحقیق، در دو شاخه مجزا گروه بندی شدند. دو جدایه باقلا و سویا در کنار جدایه‌هایی از نژاد عمان (TYLCV-OM) قرار گرفتند (شکل ۳). سه جدایه بادرشوبی، فرسیون و ریحان نیز با جدایه‌هایی از زیرنژاد TYLCV-Ker (A) گروه بندی شدند. مرز تفکیک گونه و نژاد در اعضای جنس *Begomovirus* توسط کمیته بین المللی طبقه بندی ویروس‌ها، به ترتیب شباهت کمتر از ۹۱ و ۹۴ درصد ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل در نظر گرفته شده است (Brown et al. 2015). میزان یکسان بودن ترادف نوکلئوتیدی پنج جدایه مورد تحقیق با جدایه‌های انتخابی ژن بانک ۹۷-۸۸ درصد تعیین گردید. بر این اساس، تمام پنج جدایه مورد مطالعه در این تحقیق، به عنوان ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی و از دو نژاد TYLCV-OM و TYLCV-Ker (A) محسوب می گردند (شکل ۳). پنج جدایه مورد مطالعه در این تحقیق، به دو سویه مختلف تقسیم می گردند. در سویه اول دو جدایه باقلا و سویا قرار دارند که میزان یکسانی آن‌ها با یکدیگر و با سه جدایه مربوط به سویه دوم یعنی بادرشوبی، ریحان و



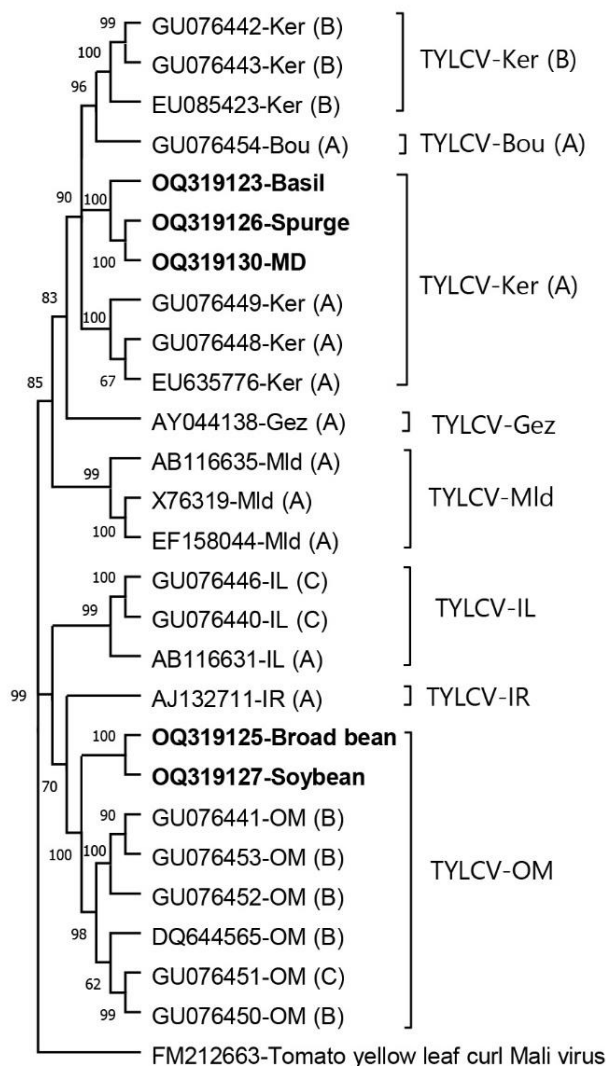
(Lefevre et al. 2010). درجات بالای تنوع TYLCV و مقدار بالای نوترکیبی درون گونه‌ای و درون نژادی بین TYLCV و گونه‌های مختلف بگوموویروس در خاورمیانه ردیابی شده است (Bananej et al. 2004, Khan et al. 2008). با توجه به این اطلاعات، تکامل این ویروس در خاورمیانه و بخصوص اطراف ایران اتفاق افتاده است و بسیار سریع به سایر مناطق گسترش یافته است (Lefevre et al. 2010).

مربوط به نژاد کرمان (TYLCV-Ker)، ۹۵ درصد تعیین گردید. با توجه به مرز تعیین نژاد، سه جدایه بادرشوبوی، فرفیون و ریحان متعلق به نژاد کرمان (TYLCV-Ker) می باشند. نوترکیبی فرآیندی است که تکامل TYLCV و سایر بگوموویروس‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. نژادهای مختلفی از TYLCV وجود دارند که بر اساس نوترکیبی درون و بین گونه‌ای ایجاد شده‌اند و برخی از این نژادها در دنیا گسترش وسیع‌تری دارند



شکل ۲- ماتریس درصد یکسانی (identity) مترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه‌های ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی مطالعه شده در این تحقیق (با حروف پررنگ) با سایر جدایه‌های انتخابی این ویروس موجود در ژن‌بانک با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2.

Figure 2. Pairwise identity matrix of the sequence of full-length genome of Tomato yellow leaf curl virus isolates studied (bold letters) and the selected GenBank isolates using SDT v1.2 software.



شکل ۳- درخت تبارزائی بازسازی شده به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) با استفاده از ترادف‌های ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه فرنگی مربوط به این تحقیق (حروف پررنگ) و سایر جدایه‌های انتخابی آن از ژن‌بانک. برای محاسبه اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار استفاده شده است و ترادف قطعه ژنومی A ویروس مالی پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی به عنوان مدل خارج گروه (outgroup) در نظر گرفته شده است.

**Figure 3. Maximum likelihood phylogenetic tree using nucleotide sequences of the full-length genome of *Tomato yellow leaf curl virus* isolates obtained in this study (bold letters) and the selected GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and the genome sequence of DNA-A component of *Tomato yellow leaf curl Mali virus* was used as outgroup.**

جدول ۲- وقوع رویدادهای نوترکیبی در طول ترادف ژنوم کامل جدایه‌های TYLCV مورد مطالعه در این تحقیق. الگوریتم (روش) های تأییدکننده نوترکیبی به صورت تک‌حرفی نمایش داده شده اند. میزان احتمال (*P value*) مربوط به روشی که بالاترین میزان حمایت از هر رویداد نوترکیبی را نشان می‌دهد، در جدول بصورت پررنگ و با خط زیر نشان داده شده است.

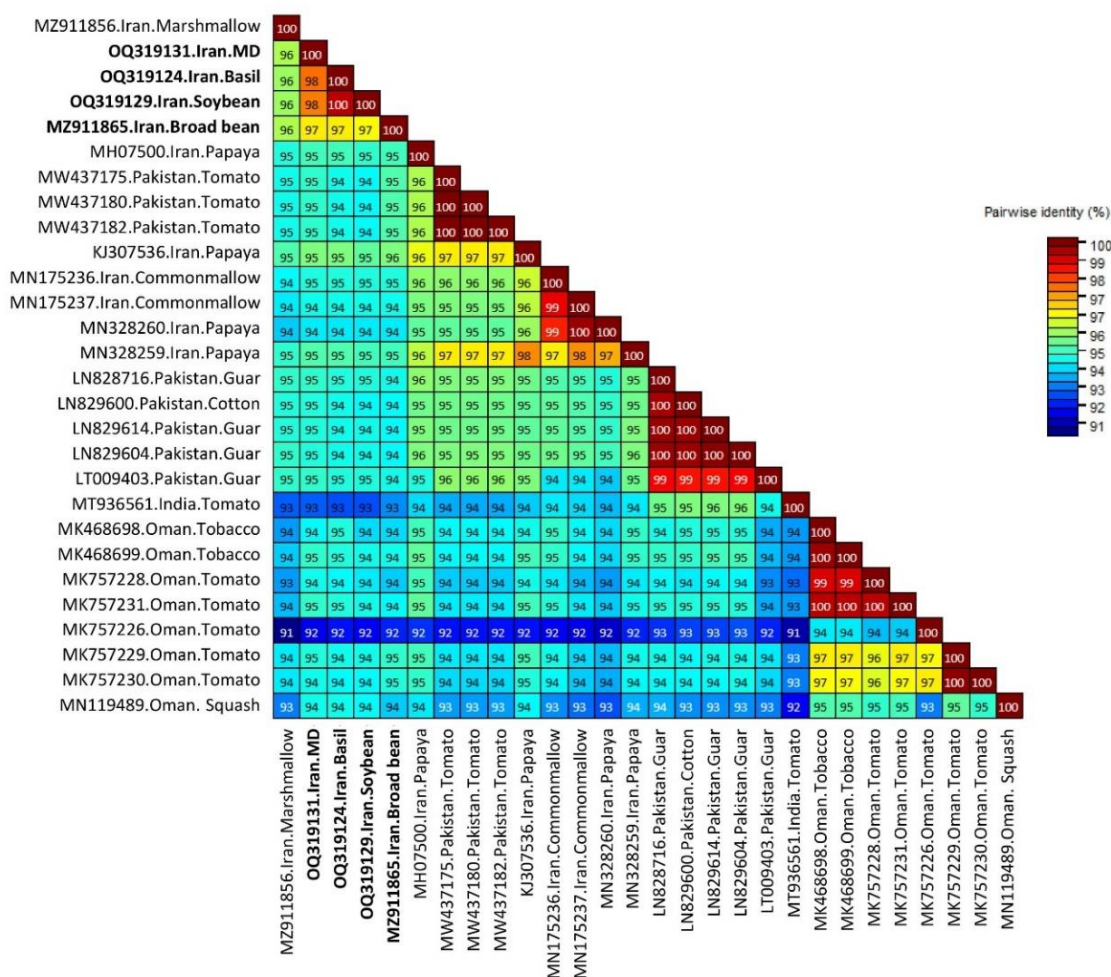
**Table 2. Potential recombination events in the full-length genome of TYLCV isolates obtained in the current study. Confirmative recombination detection algorithms have been shown in single letter. *P* value of confirmative recombination detection algorithms with the highest probability has been shown in bold and underlined letters.**

Event	Recombinant	Recombination region	Potential major parent	Potential minor parent	Detection method	<i>P</i> value
1	DQ319130 MD	22-136	GU076440- IL	AY044138- Gez	RBGM <u>C</u> ST	1.527×10 <sup>-10</sup>
8	DQ319127- Soybean	2084-2731	GU076450- OM	GU076440- IL	<b>RBGM</b> CST	1.651×10 <sup>-4</sup>
8	DQ319125- Broad bean	2075-2764	GU076450- OM	GU076440- IL	<b>RBGM</b> CST	1.651×10 <sup>-4</sup>
11	DQ319126 Spurge	1821-2742	GU076446- IL	EU085423- Ker (A)	RBGM <u>C</u> ST	6.700×10 <sup>-1</sup>
12	DQ319126 Spurge	148-515	DQ644456- OM	DQ319130 MD	RBGM <u>C</u> MCT	5.343×10 <sup>-8</sup>
14	DQ319130 MD	582-1552	GU076446- IL	GU076443- Ker (B)	RBGM <u>C</u> MCT	3.293×10 <sup>-7</sup>
15	DQ319123 Basil	1237-1547	GU076440- OM	EF158044-Mld	RGM <u>C</u> ST	1.127×10 <sup>-5</sup>

Abbreviations are B, BOOTSCAB; C, CHIMERA; G, GENECONV; M, MACHI; R, RDP; S, SISCAN; T, 3SEQ

آغازگرهای Beta01/Beta02. یک قطعه به طول تقریبی ۱/۴ کیلوباز در نمونه مربوط به گیاهان بادرشوبی، باقلا، سویا و ریحان شناسائی گردید. همسانه‌سازی و تعیین ترادف ژنوم این قطعه، همراهی بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (ToLCB) با TYLCV در این چهار نمونه را اثبات نمود. طول ژنوم بتاستلایت همراه در نمونه‌های بادرشوبی، باقلا، سویا و ریحان به ترتیب ۱۳۶۸، ۱۳۷۲ و ۱۳۷۴ نوکلئوتید و میزان شباهت بین آنها با استفاده از نرم افزار SDT v1.2 بالاتر از ۹۶ درصد تعیین گردید (شکل ۴). قبلاً همراهی این بتاستلایت با ویروس جزیرای پیچیدگی برگ پنبه در گیاهان پاپایا (Bananej *et al.* 2021) و ختمی (Salari *et al.* 2023) و ویروس پیچیدگی برگ فلفل (*Chilli leaf curl virus*) (Salehzadeh *et al.* 2022) از ایران گزارش شده است. در درخت

ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی در طبیعت دارای دامنه‌میزبانی وسیعی است (Papayiannis *et al.* 2011). گیاهان بادرشوبی، باقلا، سویا، ریحان و فریون به عنوان میزبان‌های جدید این ویروس در ایران گزارش می‌گردند. قبلاً آلودگی گیاهان سویا (Kil *et al.* 2017)، ریحان (Ammara *et al.* 2015) و فریون (Abraham *et al.* 2021) به TYLCV از برخی از نقاط دنیا گزارش شده است. آلودگی دو گیاه بادرشوبی و باقلا (به ترتیب از خانواده‌های Fabaceae و Lamiaceae) به TYLCV برای اولین بار از دنیا گزارش می‌شود. این ویروس قبلاً نیز از گیاهان شلغم (Heydarnejad *et al.* 2018)، علف هرز عروسک پشت پرده و چند علف هرز دیگر (Hosseinzadeh *et al.* 2014; Shamshiri *et al.* 2019) به ترتیب از مزارع کرمان، جیرفت و بجنورد گزارش شده است. با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و

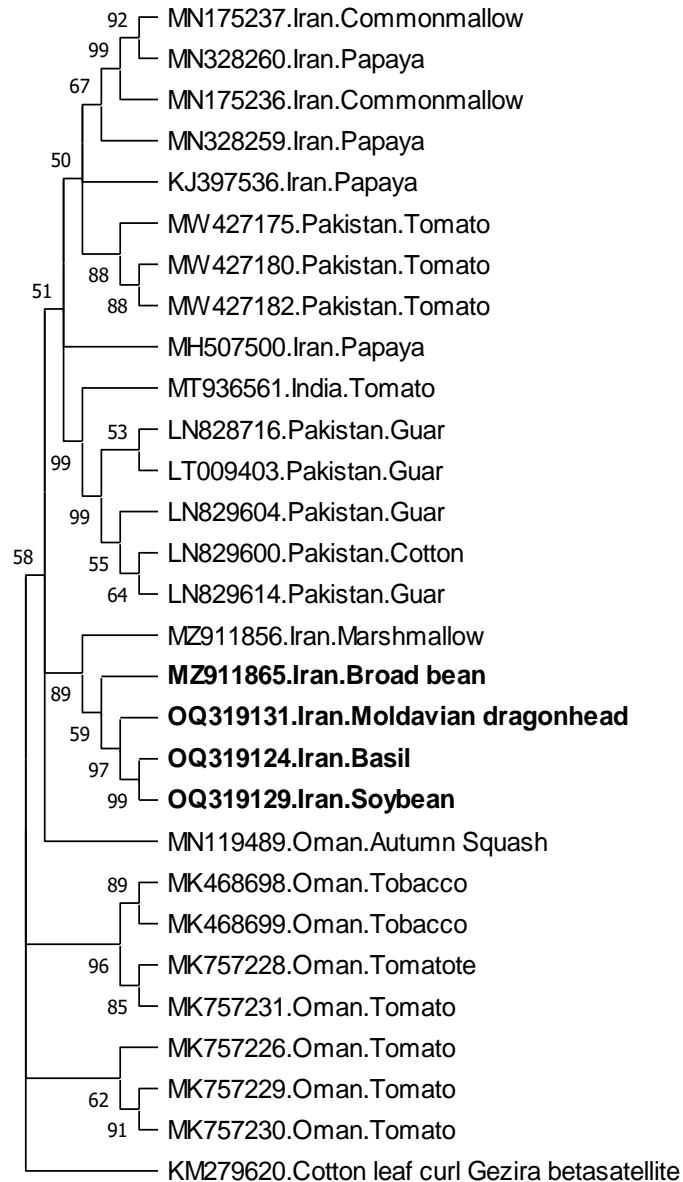


شکل ۴- ماتریس درصد یکسانی (identity) ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه‌های بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در این تحقیق (با حروف پررنگ) با سایر جدایه‌های انتخابی آن از ژن‌بانک بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2.

Figure 4. Pairwise identity matrix of the nucleotide sequence of the full-length genome of *Tomato leaf curl betasatellite* isolates obtained in this study (bold letters) and the selected GenBank isolates using SDT v1.2 software.

مولکول‌های بتاستلایت، برای تکثیر، وابسته به پروتئین Rep و ویروس کمکی هستند. بنابراین، آن‌ها دارای قدرت سازگاری با طیف وسیعی از بگومو ویروس‌ها می‌باشند. از طرف دیگر، این مولکول‌ها پروتئین  $\beta C1$  را رمزگذاری می‌کنند که باعث تجمع دی‌ان‌ای ویروس کمکی در بافت‌های آلوده گیاه و همچنین تشدید علائم ناشی از آن از طریق اختلال در ساز و کارهای دفاعی گیاه میزبان می‌گردند (Gnanasekaran *et al.* 2019). اخیراً نقش

تبارزایی بازسازی شده با استفاده از ترادف کامل ژنوم، تمامی جدایه‌های بتاستلایت بدست آمده از این تحقیق در یک شاخه و نزدیک به سایر جدایه‌های این بتاستلایت، موجود در ژن‌بانک مربوط به ایران و کشورهای پاکستان و عمان قرار گرفتند (شکل ۵). این نتایج نشان دهنده گسترش وسیع این بتاستلایت در گیاهان مختلف و همراهی آن با حداقل سه بگومو ویروس متفاوت یعنی TYLCV و ChiLCV، CLCuGeV در ایران است.



شکل ۵- درخت تبارزائی بازسازی شده به روش حداکثر تشابه (**Maximum likelihood**) با استفاده از ترادف جدایه‌های بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی مربوط به این تحقیق (حروف پررنگ) و سایر جدایه‌های انتخابی این بتاستلایت از ژن‌بانک. برای محاسبه اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار استفاده شده است و ترادف بتاستلایت جزیرای پیچیدگی برگ پنبه به عنوان مدل خارج‌گروه (**outgroup**) در نظر گرفته شده است.

**Figure 5. Maximum likelihood phylogenetic tree using nucleotide sequence of *Tomato leaf curl betasatellite* isolates obtained in this study (bold letters) and those of the selected GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and the genome sequence of DNA-A component of *Cotton leaf curl Gezira betasatellite* was used as outgroup.**

۱۳۶۲ نوکلئوتید است و با استفاده از نرم افزار SDT v1.2 میزان شباهت مترادف نوکلئوتیدی آن با ژنوم سایر جدایه‌های این ستلایت که اخیراً همراه با ویروس جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (*Cotton leaf curl Gezira virus*, CLCuGeV) از گیاهان آلوده آفتاب‌گردان و ختمی به ترتیب از مناطق جنوب غربی و جنوب شرقی ایران گزارش شده‌اند (Salari et al. 2023)، ۹۸ و ۹۳ درصد تعیین گردید. همراهی GDarSLA با TYLCV برای اولین بار از ایران گزارش می‌گردد. ژنوم آلفاستلایت‌ها به طور مستقل از بگوموویروس کمکی، پروتئین Rep مربوط به خود را رمزگذاری می‌کند که در فرآیند تکثیر آلفاستلایت به کار گرفته می‌شود. اثرات متقابل بین پروتئین Rep رمزگذاری شده توسط بگوموویروس کمکی و مولکول آلفاستلایت در هنگام تکثیر، باعث کاهش تجمع و بیماری‌زایی مجموعه بگوموویروس کمکی و مولکول بتاستلایت می‌گردد زیرا مولکول بتاستلایت برای تکثیر به پروتئین Rep رمزگذاری شده توسط بگوموویروس کمکی وابسته می‌باشد (Gnanasekaran & Chakraborty 2018; Gnanasekaran et al. 2019).

در مجموع، نتایج بدست‌آمده از این تحقیق و سایر مطالعات نشان می‌دهد که TYLCV و بتاستلایت ToLCB دارای شیوع نسبتاً وسیعی در جنوب شرق ایران و در گیاهان مختلف هستند (Bananej et al. 2021; Bananej et al. 2004; Behjatnia et al. 2003; Fazeli et al. 2009; Hajimorad et al. 1996; Salari et al. 2023; Salehzadeh et al. 2022). با توجه به نقش ToLCB در تشدید بیماری‌زایی ناشی از بگوموویروس‌ها از جمله TYLCV، مطالعات بیشتری روی شیوع ترکیب این بگوموویروس و بتاستلایت و حتی ترکیب این بگوموویروس با سایر ستلایت‌ها در گوجه‌فرنگی و گیاهان دیگر در مناطق وسیع‌تری از ایران ضروری به نظر می‌رسد. همراهی مولکول‌های آلفا- و بتاستلایت با TYLCV از ویژگی

بتاستلایت عمّانی پیچیدگی برگ بامیه (*Okra leaf curl Oman betasatellite*) در تشدید بیماری‌زایی ویروس جزیرای پیچیدگی برگ پنبه در گیاهان آفتاب‌گردان و بامیه در استان‌های خوزستان و کرمان مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص گردیده که در حضور بتاستلایت عمّانی پیچیدگی برگ بامیه، بیماری‌زایی ناشی از بگوموویروس کمکی تشدید می‌گردد (Salari et al. 2023). به دلیل فعالیت‌های کشاورزی و شرایط آب و هوایی گرم در استان‌های جنوبی و جنوب شرقی ایران، تاکنون بگوموویروس‌های دیگری نیز مانند ToLCPMV (Heydarnejad et al. 2009, 2013) و ToLCNDV (Yazdani-Khameneh et al. 2016)، ویروس کوتولگی سبزد هندوانه (Kheyr-Pour et al. 2000) ChiLCV (Salehzadeh et al. 2022)، ویروس جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (Bananej et al. 2021; Salari et al. 2023) و ویروس پیچیدگی برگ‌توت‌های بامیه (Bananej et al. 2016) از این نواحی گزارش شده‌اند. در کنار هم قرارگرفتن انواع بگوموویروس‌ها با طیف متنوعی از انواع مولکول‌های بتاستلایت، ترکیب‌های جدیدی را از نقطه نظر مجموعه بگوموویروس-بتاستلایت ایجاد کرده که با توجه به نقش مولکول‌های بتاستلایت در تشدید بیماری‌زایی ناشی از بگوموویروس‌ها، این موضوع به طور بالقوه می‌تواند منجر به آلودگی‌های شدیدتری در گیاهان میزبان گردند.

نتایج بدست‌آمده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و آغازگرهای Alpha-F/Alpha-R به منظور شناسایی مولکول آلفاستلایت همراه با نمونه‌های آلوده به TYLCV، منجر به تکثیر یک قطعه به طول تقریبی ۱/۴ کیلوباز تنها برای نمونه سویا گردید. همسانه‌سازی و تعیین مترادف این قطعه نشان داد که آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی (GDarSLA) همراه با نمونه آلوده گیاه سویا به TYLCV می‌باشد. طول ژنوم آلفاستلایت همراه با نمونه گیاه سویا

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان (طرح و/۵۷/۰۱/۰۴/۲۸ مورخ ۱۴۰۱/۰۴/۲۸) انجام شده است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

بگوموویروس‌های با ژنوم تک بخشی در دنیای قدیم از جمله ایران است (Gnanasekaran and Chakraborty 2018).

## سپاسگزاری

## References

## منابع

- Abraham P., Banwo O.O., Kashina B.D., Alegbejo M.D. 2021. Identification of weed hosts of *Tomato yellow leaf curl virus* in field-grown tomato in Sudan savanna, Nigeria. *International Journal of Horticultural Science and Technology* 8(3): 235-246.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-10.
- Ammara U.E., Al-Ansari M., Al-Shihi A., Amin I., Mansoor S., Al-Maskri A.Y., Al-Sadi A.M. 2015. Association of three begomoviruses and a betasatellite with leaf curl disease of basil in Oman. *Canadian Journal of Plant Pathology* 37(4): 506-513.
- Bananej K., Kheyr-Pour A., Hossieni G., Ahoonmanesh A. 2004. Complete nucleotide sequence of Iranian tomato yellow leaf curl virus isolate: further evidence for natural recombination amongst begomoviruses. *Archives of Virology* 149: 1435-1443.
- Bananej K., Kraberger S., Varsani A. 2016. Okra enation leaf curl virus in papaya from Iran displaying severe leaf curl symptoms. *Journal of Plant Pathology* 98(3): 637-639.
- Bananej K., Shafiq M., 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.
- Behjatnia A., Izadpanah K., Dry I.B., Rezaian A. 2003. Molecular characterization and taxonomic position of the Iranian isolate of Tomato leaf curl virus. *Iranian Journal of Plant Pathology* 40: 77-94
- Briddon R.W., Bull S.E., Mansoor S., Amin I., Markham P. G. 2002. Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA  $\beta$ ; a molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Molecular Biotechnology* 20: 315-318.
- Brown J.K., Fauquet C.M., Briddon R.W., Zerbini M., Moriones E., Navas-Castillo J. 2012. Geminiviridae. pp 351-373. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. and Lefkowitz E.J. (Eds.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, San Diego, USA.
- Brown J.K., Zerbini F.M., Navas-Castillo J., Moriones E., Ramos-Sobrinho R., Silva J.C., Fiallo-Olivé E., Briddon R.W., Hernández-Zepeda C., Idris A., Malathi V.G., Martin D.P., Rivera-Bustamante R., Ueda S., Varsani A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* 160(6): 1593-619.
- Deng D., McGrath P.F., Robinson D.J., 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.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-7.
- Fazeli R., Heydarnejad J., Massumi H., Shaabani M., Varsani A. 2009. Genetic diversity and distribution of tomato-infecting begomoviruses in Iran. *Virus Genes* 38: 311-319.
- Fiallo-Olivé E., Lett J.M., Martin D.P., Roumagnac P., Varsani A., Zerbini F.M., Navas-Castillo J. 2021. ICTV virus taxonomy profile: *Geminiviridae*. *Journal of General Virology* 102(12): 001696.
- Gnanasekaran P., Chakraborty S. 2018. Biology of viral satellites and their role in pathogenesis. *Current*

- Opinion in Virology 33: 96-105.
- Gnanasekaran P., Ponnusamy K., Chakraborty S. 2019. A geminivirus betasatellite encoded  $\beta$ C1 protein interacts with PsbP and subverts PsbP-mediated antiviral defense in plants. *Molecular Plant Pathology* 20(7): 943-960.
- Hajimorad M.R., Kheyr-Pour A., Alavi V., Ahoonmanesh A., Bahar M., Rezaian M.A., Gronenborn B. 1996. Identification of whitefly transmitted tomato yellow leaf curl geminivirus from Iran and a survey of its distribution with molecular probes. *Plant Pathology* 45(3): 418-25.
- Hamza M., Tahir M.N., Mustafa R., Kamal H., Khan M.Z., Mansoor S., Briddon R.W., Amin I. 2018. Identification of a dicot infecting mastrevirus along with alpha- and betasatellite associated with leaf curl disease of spinach (*Spinacia oleracea*) in Pakistan. *Virus Research* 256: 174-182.
- Heydarnejad J., Hesari M., Massumi H., Varsani A. 2013. Incidence and natural hosts of Tomato leaf curl Palampur virus in Iran. *Australasian Plant Pathology* 42: 195-203.
- Heydarnejad J., Kamali M., Hassanvand V., Massumi H., Shamshiri M., Varsani A. 2018. Turnip leaf curl disease associated with two begomoviruses in south-eastern Iran. *Tropical Plant Pathology* 43: 165-169.
- Heydarnejad J., Mozaffari A., Massumi H., Fazeli R., Gray A.J., Meredith S., Lakay F., Shepherd D.N., Martin D.P., Varsani A. 2009. Complete sequences of tomato leaf curl Palampur virus isolates infecting cucurbits in Iran. *Archives of Virology* 154(6): 1015-8.
- Hosseinzadeh M.R., Shams-Bakhsh M., Kazempour-Osalou S.H. 2014. Full-length genome sequencing and phylogeny of severe strain isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL) originating from *Datura stramonium* L. in Bojnurd region, Iran. *Agricultural Biotechnology Journal* 6(1): 61-76.
- Khan A.J., Idris A.M, Al-Saady N.A., Al-Mahruki M.S., Al-Subhi A.M, Brown J.K. 2008. A divergent isolate of *Tomato yellow leaf curl virus* from Oman with an associated DNA beta satellite: an evolutionary link between Asian and the Middle Eastern virus-satellite complexes. *Virus Genes* 36: 169-176.
- Kil E.J., Park J., Choi H.S., Kim C.S., Lee S. 2017. Seed transmission of *Tomato yellow leaf curl virus* in white soybean (*Glycine max*). *The Plant Pathology Journal* 33(4): 424-428.
- Kumar J., Kumar J., Singh S.P., Tuli R., 2014. Association of satellites with a mastrevirus in natural infection: complexity of wheat dwarf India virus disease. *Journal of Virology* 88: 7093-7104.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547.
- Lefevre P., Martin D.P., Harkins G., Lemey P., Gray A.J.A. Meredith S., Lakay F., Monjane A., Lett J.M., Varsani A., Heydarnejad J. 2010. The spread of Tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathogens* 6(10): 1-12.
- Kheyr-Pour A., Bananej K., Dafalla G.A., Caciagli P., Noris E., Ahoonmanesh A., Lecoq H., Gronenborn B. 2000. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: Sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology* 90: 629-635.
- Martin D.P., Varsani A., Roumagnac P., Botha G., Maslamoney S., Schwab T., Kelz Z., Kumar V., Murrell B. 2021. RDP5: A computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evolution* 7: veaa087.
- Muhire B.M., Varsani A., Martin D.P. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS one* 9(9): e108277.
- Papayiannis L.C., Katis N.I., Idris A.M., Brown J.K. 2011. Identification of weed hosts of Tomato yellow leaf curl virus in Cyprus. *Plant Disease* 95: 120-125.
- Rojas M.R., Gilbertson R.I., Russell D.R., Maxwell D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347.
- Roumagnac P., Lett J.M., Fiallo-Olivé E., Navas-Castillo J., Zerbini F.M., Martin D.P., Varsani A. 2022. Establishment of five new genera in the family *Geminiviridae*: *Citlodavirus*, *Maldovirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, and *Topilevirus*. *Archives of Virology* 167(2): 695-710.
- Salari Kh., Heydarnejad J., Massumi H., Varsani A. 2023. Incidence of cotton leaf curl Gezira virus and the associated alphasatellites and betasatellites in crops and ornamental plants in southern Iran. *Tropical Plant*



- Pathology 48: 62-72.
- Salehzadeh M., Afsharifar A., Dehghanpour Farashah S., Rezaei M. 2022. The first report of the *Chilli leaf curl virus* and its betasatellite from bell peppers and tomatoes from the central provinces of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 57:337-341.
- Shamshiri M., Heydarnejad J., Kamali M., Pouramini N., Massumi H. 2019. Identification of wild hosts of tomato yellow leaf curl virus in south-eastern Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 52(9-10): 917-929.
- Shepherd D.N., Martin D.P., Lefeuvre P., Monjane A.L., Owor B.E., Rybicki E.P., Varsani A. 2008. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of Virological Methods* 149(1): 97-102.
- Varma A., Malathi V.G. 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142(2): 145-64.
- Yazdani-Khameneh S., Aboutorabi S., Shoori M., Aghazadeh A., Jahanshahi P., Golnaraghi A., Maleki M. 2016. Natural occurrence of *Tomato leaf curl New Delhi virus* in Iranian cucurbit crops. *The Plant Pathology Journal* 32(3): 201-208.
- Zhang Y.P., Uyemoto J.K., Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71(1): 45-50.