



گزارش علمی کوتاه

همراهی یک مولکول بتاستلایت با ویروس پیچیدگی برگ کنجد در آلودگی شدید گیاه هندوانه

اسرا سالاری^۱، جهانگیر حیدرنژاد^{۳*}، مریم میرزازاده^۴ و حسین معصومی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۳۱)

بتاستلایت‌های مرتبط با بگومو ویروس‌ها و برخی از مسترو ویروس‌ها، مولکول‌های دی‌ان‌ای تک‌رشته‌ای و حلقوی به اندازه تقریبی ۱/۴ کیلوباز هستند که در طیف وسیعی از گیاهان آلوده به این ویروس‌ها ردیابی شده و نقش آن‌ها افزایش تجمع ویروس کمکی و تشدید علائم ناشی از آن است (Navas-Castillo & Fiallo-Olivé 2021). در بررسی‌های قبلی روی بیماری پیچیدگی شدید برگ‌های هندوانه (شکل 1a) در مزارع شهرستان رودبار جنوب واقع در استان کرمان (جنوب شرق ایران)، ویروس پیچیدگی برگ کنجد (*Sesame curly top virus, SeCTV*) از جنس *Turncurtovirus* و خانواده *Geminiviridae* در گیاهان بیمار ردیابی گردید. با این وجود، مایه‌زنی بوته‌های هندوانه با استفاده از سازه عفونت‌زای این ویروس، منجر به آلودگی نسبتاً خفیف‌تر بوته‌های هندوانه با علائم کوتولگی و زردی خفیف بوته‌ها در مقایسه با آلودگی طبیعی گردید (شکل 1b) (Hasanvand et al. 2021). به منظور بررسی عامل تشدیدکننده علائم در نمونه هندوانه، دی‌ان‌ای کل از بافت گیاه هندوانه آلوده به SeCTV در شرایط طبیعی (جدایه IW)، استخراج شد

واژه‌های کلیدی: بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی، جمینی ویروس، ویروس پیچیدگی برگ کنجد، هندوانه

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

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: 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

۴ دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

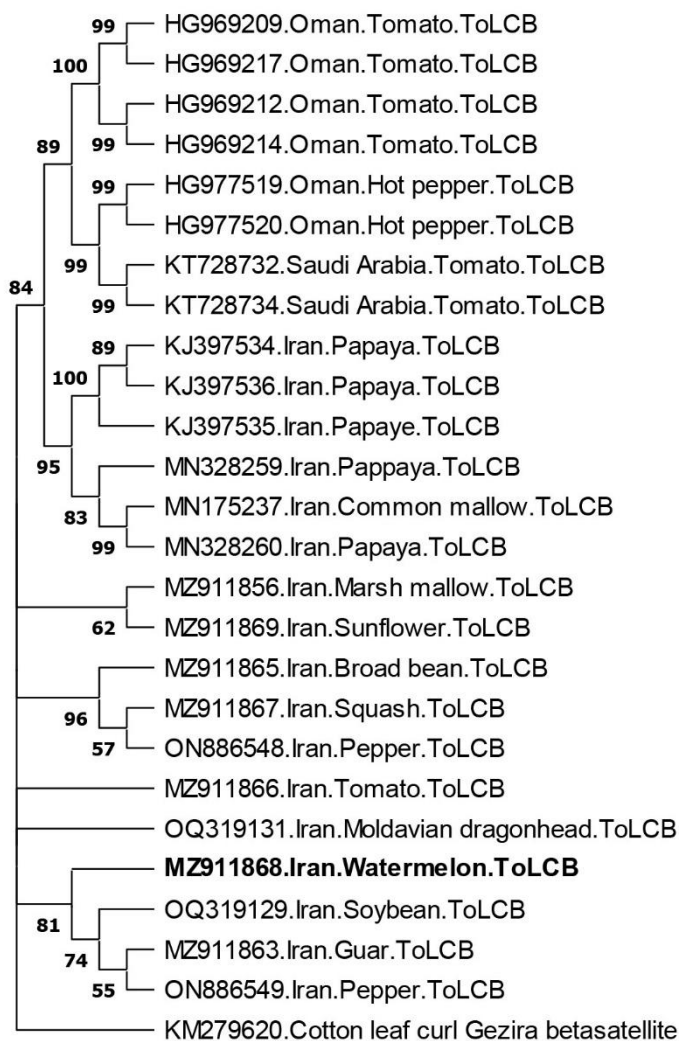


شکل ۱- علائم بوته‌های هندوانه آلوده به ویروس پیچیدگی برگ کنجد جمع‌آوری شده از مزارع شهرستان رودبار جنوب (استان کرمان، جنوب شرق ایران) (a)؛ بوته هندوانه مایه‌زنی شده با سازه عفونت‌زای ویروس با علائم کوتولگی و زردی خفیف (b). در سمت چپ تصویر در شکل b، بوته سالم هندوانه نشان داده شده است.

Figure 1. Symptoms of naturally infected watermelon plants with sesame curly top virus showing severe leaf curling and dwarfing collected from Rudbar-e-Jonub (Kerman province, southeastern Iran) (a); agroinoculated watermelon plant with constructed infectious clone of the virus showing dwarfing and mild yellowing (b). Healthy watermelon plant has been shown in left side of panel b.

و سپس مولکول‌های حلقوی موجود در آن با استفاده از روش تکثیر دایره غلتان (rolling circle amplification, RCA) غنی‌سازی گردید. در ابتدا، امکان آلودگی مخلوط این نمونه با سایر جمینی ویروس‌های شایع در منطقه مانند ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندر (chickpea chlorotic dwarf virus, BCTIV)، ویروس کوتولگی سبزرده نخود ایرانی (beet curly top Iran virus, BCTIV)، و بگوموویروس‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. برای این کار، از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و آغازگرهای اختصاصی و یا عمومی (در مورد بگوموویروس‌ها) به همراه محصول آر سی ۱ به عنوان رشته الگو استفاده گردید. نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور ردیابی BCTIV، CpCDV و بگوموویروس‌ها منجر به تکثیر هیچ قطعه‌ای برای نمونه 1W نگردید. در ادامه، با توجه به اینکه در سال‌های اخیر، نقش مولکول‌های بتاستلایت به عنوان عوامل تشدیدکننده بیماری ناشی از بگوموویروس‌ها و در مواردی مستروویروس‌ها در گیاهان مختلف به اثبات رسیده است (Navas-Castillo & Fiallo-Olivé 2021; Salari et al. 2023)، احتمال همراهی مولکول بتاستلایت با بوته‌های هندوانه با علائم شدید بیماری مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از آغازگرهای همپوشان و اختصاصی $5'-CCG TAT GGG ATC ATG AAG GTC TT-3'$ و $5'-GGC CAT GAA GGG ATC ATA CCT C-3'$ استفاده گردید. این آغازگرها قادر به تکثیر ژنوم کامل بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی

(tomato leaf curl betasatellite, ToLCB) هستند که اخیراً در تعدادی از گیاهان آلوده به بگوموویروس‌ها در مزارع جنوب استان کرمان ردیابی شده‌اند (Salari *et al.* 2022). آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از محصول RCA، منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۱/۴ کیلوباز گردید که بعد از همسانه‌سازی در ناقل pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA) به روش سنگر تعیین ترادف شد و ترادف حاصل در بانک ژن با رس‌شمار MZ911868 ثبت گردید. بررسی نتایج حاصل از تعیین ترادف نشان داد که بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در بیماری پیچیدگی شدید برگ‌های هندوانه، همراه با SeCTV می‌باشد. به لحاظ میزان یکسانی ترادف نوکلئوتیدی، نزدیک‌ترین جدایه‌های بتاستلایت در بانک ژن به جدایه 1W هندوانه، جدایه‌هایی از همین بتاستلایت با درصد یکسانی نزدیک به ۹۹ درصد هستند که در چند سال اخیر از گیاهان گوار، سویا و فلفل از ایران در بانک ژن ثبت شده‌اند (به ترتیب رس‌شمارهای MZ911863، OQ319129 و ON886549) و در درخت تبارزایی رسم شده، در کنار این جدایه‌ها در یک شاخه قرار گرفتند (شکل ۲). به نظر می‌رسد که همراهی بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی با ویروس پیچیدگی برگ کنگد باعث ایجاد علائم شدید در گیاه هندوانه شده است. با این وجود، برای اثبات این فرضیه، نیاز به مطالعات بیشتر با استفاده از سازه‌های عفونت‌زای ویروس و بتاستلایت همراه می‌باشد. ضمن اینکه، احتمال آلودگی نمونه هندوانه به سایر ویروس‌ها از جمله ویروس‌هایی با ژنوم آر آن ۱ مانند پوتی ویروس‌های آلوده کننده کدوئیان دور از انتظار نیست. بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق، این اولین گزارش از همراهی یک بتاستلایت با یک ترنکرتوویروس در آلودگی طبیعی یک گیاه می‌باشد.



شکل ۲- درخت تبارزائی بازسازی شده به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) با استفاده از ترادف جدایه هندوانه 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 با رس‌شمار KM279620 به عنوان مدل خارج‌گروه (outgroup) در نظر گرفته شده است.

Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree using nucleotide sequence of tomato leaf curl betasatellite (watermelon isolate) 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 cotton leaf curl gezira betasatellite (accession number KM279620) was used as outgroup.



DOI: 10.22034/ijpp.2023.2009034.423

Short Scientific Report

Association of a betasatellite molecule with sesame curly top virus in severe infection of watermelon

Asra Salari^{1,2}, Jahangir Heydarnejad^{3**}, Maryam Mirzazadeh⁴ and Hossain Massumi³

(Received: 12.08.2023; Accepted: 22.09.2023)

Associated betasatellites with begomoviruses and mastreviruses are small single stranded circular DNA molecules ~1.4 kb in size which have been detected in various infected plants and cause enhanced accumulation of helper viruses as well as induction of severe symptoms (Navas-Castillo & Fiallo-Olivé 2021). In previous study, *Sesame curly top virus* (SeCTV) (genus *Turncurtovirus*, family *Geminiviridae*) was detected in infected watermelon plants showing severe leaf curling in Rudbar-e-Jonub farms (Kerman province, southeastern Iran) (Fig. 1a). Whereas, agroinoculation of watermelon plants with constructed infectious clone of SeCTV resulted in somewhat mild symptoms showing dwarfing and mild yellowing of plants (Fig. 1b) in compared with the natural SeCTV infection of watermelon plants (Hasanvand *et al.* 2021). In order to investigate the causal agent of severe symptoms in watermelon plant, total DNA were extracted from SeCTV infected sample (isolate 1W) followed by enrichment of circular DNA molecules using (RCA). Initially, possible co-infection of sample with other common geminiviruses in the region including beet curly top Iran virus (BCTIV), chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV) and begomoviruses was tested using PCR assay, specific or degenerate (in case of begomoviruses) primer pairs and RCA product as template. The PCR assay did not result in detection of amplicon for aforementioned viruses. Subsequently, due to the role of betasatellite molecules in induction of severe symptoms and enhanced pathogenesis of helper begomoviruses and two mastreviruses in different plants (Navas-Castillo & Fiallo-Olivé 2021; Salari *et al.* 2022), the possible association of betasatellite molecule with the natural SeCTV infected watermelon plant showing severe symptoms was studied. PCR assay was carried out using RCA product and specific overlapping primer pair BS-F/BS-R (5'-CCG TAT GGG ATC ATG AAG GTC TT-3'/5'-GGC CAT GAA GGG ATC ATA CCT C-3'). These primers can amplify the full-length genome of tomato leaf curl betasatellite (ToLCB), recently found to be associated with a number of begomoviruses in infected plants in south of Kerman province (Salari *et al.* 2022). The PCR assay resulted in 1.4 kb amplicon for the 1W isolate followed by cloning of the PCR product into pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA). Recombinant plasmid was Sanger sequenced and the resulting assembled sequence was recorded in GenBank (accession number MZ911868). Sequence analysis indicated that ToLCB is associated with SeCTV in severe diseased watermelon plant. ToLCB sequence of the 1W isolate shares ~99% pairwise identity with the Iranian GenBank isolates recently detected from guar, soybean and pepper (MZ911863, OQ319129 and ON886549, respectively) and grouped with these isolates in constructed phylogenetic tree (Fig.2). It seems that severe symptoms of watermelon plants are due to the presence of tomato leaf curl betasatellite in association with sesame curly top virus in infected plants. However, further studies using infectious clone of SeCTV and ToLCB are necessary to confirm this interaction. Furthermore, possibility of co-infection of watermelon sample with RNA viruses, *i. e.*, cucurbit infecting potyviruses is not far-fetched. Based on the results of this study, this is the first report of the association of a betasatellite with a turncurtovirus in the natural infection of a plant.

Keywords: Geminivirus, Sesame curly top virus, Tomato leaf curl betasatellite, Watermelon

*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, Iran

4 MS student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

References

منابع

- Hasanvand V., Heydarnejad J., Salari Kh., Massumi H. and Varsani A. 2021. Genome sequence of new isolates of sesame curly top virus in Kerman province and identification of new hosts of the virus. *Iranian Journal of Plant Pathology* 57(4): 281-289.
- Navas-Castillo J. and Fiallo-Olivé E. 2021. Geminiviruses (*Geminiviridae*). pp 411–419. In: Bamford D.H., Zuckerman M. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, 4th ed., Vol. 3. Academic Press, Oxford, UK.
- Salari Kh., Heydarnejad J., Massumi H. and Hasanvand V. 2022. New natural hosts and phylogenetic analysis of five tomato yellow leaf curl virus isolates and associated satellites in Kerman province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 58(2): 60-76.