



مقاله پژوهشی

تعیین مشخصات ژنوم ویروس پیچیدگی برگ فلفل، آلفاستلایت و بتاستلایت‌های همراه و اثبات بیماری‌زایی ویروس در جنوب شرق ایران*

اسرا سالاری^۱، جهانگیر حیدر نژاد^{۲*} و حسین معصومی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۴)

چکیده

بگومو ویروس‌های آلوده‌کننده سبزیجات، یکی از عوامل اصلی کاهش عملکرد این گیاهان در جنوب شرق ایران محسوب می‌گردند. در این مطالعه، وقوع ویروس پیچیدگی برگ فلفل (chili leaf curl virus, ChiLCV) و ستلایت‌های همراه آن در مزارع کاشت فلفل و گلخانه‌های تجارتي جیرفت و منوجان واقع در استان کرمان مورد بررسی قرار گرفت. ژنوم کامل سه جدایه ChiLCV به روش دایره غلتان تکثیر شد و بعد از همسانه‌سازی، تعیین ترادف گردید. همچنین، ژنوم آلفا- و بتاستلایت‌های همراه به ترتیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عمومی و آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین ترادف گردیدند. براساس مقایسه‌های صورت گرفته، درصد یکسانی ژنوم کامل ویروس بین سه جدایه ایران با جدایه‌های منتخب از ژن‌بانک بالاتر از ۹۵ درصد بدست آمد. در هر سه جدایه مورد بررسی، وجود آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی (gossypium darwinii symptomless alphasatellite, GDarSLA) با میزان یکسانی ترادف نوکلئوتیدی بالای ۸۹ درصد در مقایسه با جدایه‌های منتخب از ژن‌بانک و همچنین در دو جدایه از منوجان، وجود بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (tomato leaf curl betasatellite, ToLCB) با درصد یکسانی بالای ۹۴ درصد در مقایسه با جدایه‌های منتخب از ژن‌بانک اثبات گردید. در آزمون بیماری‌زایی، سازه دوپار ناقص طراحی و ساخته شد. این سازه، بعد از مایه‌زنی به گیاهچه‌های فلفل، باعث ایجاد علائم کوتولگی و پیچیدگی برگ شد. بر اساس نتایج بدست آمده، ChiLCV یکی از بگومو ویروس‌های آلوده کننده گیاه فلفل در جنوب شرق ایران بوده و ژنوم کامل ویروس و وجود آلفاستلایت همراه با آن برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی، بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه فرنگی، بگومو ویروس، تکثیر دایره غلتان

* بخشی از این مقاله، مستخرج از رساله نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان و بخشی دیگر مربوط به یک تحقیق مستقل است.

** 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



DOI: 10.22034/ijpp.2023.2010123.425

Research Article

Genome characterization of chili leaf curl virus, the associated alphasatellite and betasatellite and demonstration of pathogenesis of the virus in south-eastern Iran*

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

(Received: 27.08.2023; Accepted: 26.10.2023)

Abstract

Begomovirus infecting vegetables is one of the main components of yield losses in south-eastern Iran. In this study, the incidence of chili leaf curl virus (ChiLCV) and the associated satellites were studied in pepper farms and commercial greenhouses of Jiroft and Manoojan (Kerman province). Full-length genome of three ChiLCV isolates was amplified using the rolling circle amplification method followed by cloning and sequencing. Furthermore, associated alpha- and betasatellites genomes were amplified in the PCR assay using specific and degenerate primer pairs, respectively. Sequence comparison showed that three ChiLCV isolates shared >95% pairwise nucleotide identities with the selected GenBank isolates. *Gossypium darwinii* symptomless alphasatellite (GDarSLA) was also found to be associated with three ChiLCV isolates and shared >89% pairwise identities with the selected GenBank isolates. Furthermore, tomato leaf curl betasatellite (ToLCB) was identified in two pepper isolates from Manoojan and shared >94% pairwise identities with the selected GenBank isolates. To demonstrate the pathogenesis of ChiLCV, a partial dimer of the viral genome was designed, constructed and agroinoculated into pepper seedlings. This led to the appearance of typical ChiLCV symptoms, including dwarfing and yellowing. Collectively, ChiLCV is one of the important begomoviruses infecting pepper in south-eastern Iran and the full-length genome of the virus as well as the associated alphasatellite are reported for the first time in Iran.

Key words: *Gossypium darwinii* symptomless alphasatellite, Tomato leaf curl betasatellite, Begomovirus, Rolling circle amplification

*A part of this paper is from PhD thesis of the first author submitted to College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran and another part is related to an independent research

**Corresponding author, 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

مقدمه

(TrAP)، پروتئین تشدیدکننده همانندسازی (REn) و پروتئین تعیین‌کننده بیماری‌زایی (C4) را رمزگذاری می‌کند. در ژنوم بگوموویروس‌های دوبخشی، قطعه DNA-B پروتئین رفت و آمد هسته‌ای (NSP) و پروتئین حرکتی (MP) را رمزگذاری می‌کند (Brown et al. 2012).

تاکنون در ارتباط با بگوموویروس‌ها سه نوع دی‌ان‌ا ستلایت شامل بتاستلایت (Briddon 2003)، آلفاستلایت (Briddon et al. 2004) و دلتاستلایت (Lozano et al. 2016) توصیف شده‌است. بتاستلایت‌ها عمدتاً در ارتباط با بگوموویروس‌های تک‌بخشی در دنیای قدیم می‌باشند (Zhou 2013). مولکول‌های آلفاستلایت در ارتباط با برخی از اعضای خانواده‌های *Geminiviridae* (دو جنس *Begomovirus* و *Mastrevirus*)، *Nanoviridae* و *Metaxyviridae* (جنس *Cofodovirus*) شناسایی شده‌اند (Varsani et al. 2021). اغلب آلفاستلایت‌های مرتبط با جمینی‌ویروس‌ها از دنیای قدیم و در ارتباط با بگوموویروس‌های تک‌بخشی و بتاستلایت همراه آن‌ها گزارش شده‌اند (Zhou 2013).

مناطق مرکزی و جنوبی کشور ایران به دلیل دارا بودن شرایط آب و هوایی نیمه‌گرمسیری، یکی از مراکز مهم شیوع بگوموویروس‌هاست و تاکنون چندین بگوموویروس از گیاهان زراعی و علف‌های هرز از این نقاط گزارش شده است که شامل ویروس پیچیدگی برگ‌زرد گوجه‌فرنگی (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) (Hajimorad et al. 1996)، ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (tomato leaf curl Palampur virus, ToLCPMV) (Heydarnejad et al. 2009)، ویروس مالتان پیچیدگی برگ پنبه (cotton leaf curl Multan virus, CLCuMuV) (Mosharaf et al. 2020)، ویروس نیودهلی پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (New Delhi virus, ToLCNDV) (Yazdani-Khameneh

خانواده *Geminiviridae* یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های ویروس‌های گیاهی با ژنوم دی‌ان‌ای تک‌لای حلقوی است (Fiallo-Olivé et al. 2021) که در سراسر جهان سبب بیماری‌های شدیدی در بسیاری از گیاهان زراعی و باغی شامل گیاهان تک‌لپه و دولپه می‌شوند (Varma & Malathi 2003). اخیراً کمیته بین‌المللی تقسیم‌بندی ویروس‌ها (ICTV) اعضای این خانواده را بر اساس نوع حشرات ناقل، محتوای ژنوم، دامنه میزبانی و روابط تبارزایی به ۱۴ جنس شامل *Eragrovirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus*, *Topocovirus*, *Mastrevirus*, *Maldovirus*, *Citlodavirus*, *Grablovirus*, *Capulavirus*, *Opunvirus* و *Mulcrilevirus* طبقه‌بندی کرده است (Roumagnac et al. 2022).

جنس *Begomovirus* با بیش از ۴۴۰ گونه ویروسی، بزرگترین جنس در بین جمینی‌ویروس‌ها است (Fiallo-Olivé et al. 2021) و دامنه وسیعی از گیاهان دولپه، عمدتاً در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا را آلوده می‌کند. این ویروس‌ها در طبیعت توسط سفیدبالک *Bemisia tabaci* به روش پایا-گردشی منتقل می‌شوند (Navas-castillo et al. 2011). ژنوم بگوموویروس‌ها، به صورت تک‌بخشی و یا دوبخشی (DNA-A و DNA-B) می‌باشد که طول هر بخش حدود ۲/۷ کیلوباز است. بگوموویروس‌های تک‌بخشی بومی دنیای قدیم هستند؛ اما تعداد کمی از آن‌ها در دنیای جدید نیز گزارش شده‌اند. ژنوم بگوموویروس‌های تک‌بخشی معادل بخش DNA-A در بگوموویروس‌های دوبخشی است. در بگوموویروس‌ها با ژنوم تک‌بخشی، رشته ویروسی پروتئین حرکتی (MP) و پروتئین پوششی (CP) را رمزگذاری می‌کند درحالی‌که رشته مکمل، پروتئین مرتبط با همانندسازی (Rep)، پروتئین فعال‌کننده رونویسی

(مزارع منوجان) دارای علائم پیچیدگی و فنجان‌ی شدن برگ، زردی و/یا در مواردی کوتولگی بوته جمع‌آوری شدند.

استخراج دی‌ان‌ا و آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

استخراج دی‌ان‌ای کل از نمونه‌های جمع‌آوری شده به روش CTAB (Zhang *et al.* 1998) انجام شد و برای بررسی مقدماتی آلودگی نمونه‌ها، از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و جفت آغازگر عمومی 181v/Bc (Rojas *et al.* 1993; Deng *et al.* 1994) که قادر به تکثیر قطعه‌ای ۵۵۰ جفت‌بازی از ژنوم بگوموویروس‌هاست، استفاده شد.

تکثیر ژنوم ویروس

از میان نمونه‌هایی که در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، آلودگی آن‌ها به بگوموویروس‌ها اثبات شده بود، سه نمونه فلفل به نام‌های G3 (از منطقه جیرفت)، M11 و M12 (از منطقه منوجان) انتخاب شدند و مولکول‌های حلقوی موجود در آن‌ها با استفاده از روش تکثیر دایره‌ای غلتان (rolling circle amplification, RCA) و آنزیم فی ۲۹ دی‌ان‌ای پلی‌مراز (Templiphi Healthcare) غنی‌سازی گردیدند (Shepherd *et al.* 2008). به منظور انتخاب آنزیم برشی مناسب که تنها دارای یک جایگاه برش در ژنوم کامل ویروس باشد، محصول آرسی‌ای هر سه جدایه با آنزیم‌های برشی مختلف بریده شد و در نهایت از آنزیم *PstI* برای برش ژنوم ویروس و همسانه‌سازی آن در پلاسمید pBluescript SK(+) استفاده گردید.

تکثیر ژنوم ستلایت‌های همراه

به منظور شناسایی آلفاستلایت و بتاستلایت‌های احتمالی همراه با ویروس کمکی در نمونه‌های فلفل، از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و آغازگرهای اختصاصی، جهت تکثیر ژنوم کامل ستلایت‌ها استفاده شد. برای

(*et al.* 2016) ویروس کوتولگی سبزردهندوانه (watermelon chlorotic stunt virus, WmCSV) (Kheyr-Pour *et al.* 2000)، ویروس پیچیدگی برگ‌توت‌ای بامیه (okra enation leaf curl virus, OELCuV) (Bananej *et al.* 2016) و ویروس جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (cotton leaf curl Gezira virus, CLCuGV) (Salari *et al.* 2023) می‌باشند. اخیراً نیز وجود ویروس پیچیدگی برگ فلفل (chili leaf curl virus, ChiLCV) در ایران با تعیین ترادف یک قطعه ۵۵۰ جفت‌بازی از ژنوم ویروس اثبات گردیده است (Salehzadeh *et al.* 2022). علاوه بر این، تاکنون دو بتاستلایت همراه با ویروس جزیرای برگ پنبه (CLCuGV) شامل بتاستلایت عمانی پیچیدگی برگ بامیه (okra leaf curl Oman betasatellite, OLCuOMB) (Salari *et al.* 2023) و ToLCB (Bananej *et al.* 2021; Salari *et al.* 2023; Salehzadeh *et al.* 2022) نیز از ایران گزارش شده‌اند. در این مطالعه، وقوع ویروس پیچیدگی برگ فلفل با تعیین ترادف ژنوم کامل سه جدایه ویروس از گیاه فلفل و همچنین بتاستلایت و آلفاستلایت‌های همراه آن‌ها از منطقه جیرفت و منوجان واقع در استان کرمان مورد مطالعه قرار گرفته و موقعیت تبارزائی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری

طی بازدیدهای انجام شده در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۴۰۰، نمونه‌برداری از مزارع و گلخانه‌های تجارتي فلفل در شهرستان‌های جیرفت و منوجان استان کرمان انجام گرفت و ۱۰ نمونه شامل شش نمونه فلفل دلمه‌ای (گلخانه‌های جیرفت) و چهار نمونه فلفل شمشیری

حاوی ژنوم ویروس و یا ستلایت همراه، به باکتری *E. coli* انتقال داده شدند و بعد از استخراج، از هر دو طرف توسط کمپانی ماکروژن (Macrogen Company, South Korea) به روش Sanger تعیین ترادف شدند. ترادف‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SeqMan بعنوان بخشی از مجموعه Lasergene، نرم افزار واکاوی توالی (DNA Star Inc., Madison, WI, USA) ویرایش شده و سپس برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند.

ساخت سازه عفونت‌زا

به منظور ساخت همسانه عفونت‌زا از روش قراردادن ژنوم دوپار ناقص در داخل ناقل دوتائی pGreen0029 (Hellen *et al.* 2000) استفاده گردید. برای این منظور، ژنوم کامل ویروس (جدایه G3) با آنزیم‌های برشی *PstI* و *SalI* بریده شد و قطعه حاصل به اندازه تقریبی ۲۴۰۰ جفت‌باز در داخل پلاسمید pGreen که قبلاً با همین دو آنزیم بریده شده بود، همسانه‌سازی گردید. این قطعه حاوی ترادف‌های لازم برای شروع تکثیر ژنوم ویروس شامل مبدأ همانندسازی (origin of replication) می‌باشد. پلاسمید نو ترکیب بدست آمده تحت عنوان pGreen0.87 نامگذاری شد و در مرحله بعد، ژنوم کامل ویروس در آن همسانه‌سازی گردید. قبل از همسانه‌سازی، به طور جداگانه پلاسمید pGreen0.87 و پلاسمید حاوی ژنوم کامل ویروس با آنزیم *PstI* بریده شدند. پلاسمید نو ترکیب حاوی ژنوم دوپار ناقص بنام pGreen1.87 نامگذاری شد و در مراحل بعد به همراه پلاسمید کمکی pSoup برای انتقال به سلول‌های *Agrobacterium tumefaciens* استرین C58 به روش ذوب و انجماد (Boulton 2008) مورد استفاده قرار گرفتند.

به منظور اثبات بیماری‌زایی ویروس، تعداد ۶۰ گیاهچه فلفل در مرحله ۳-۴ برگی براساس روش مورد استفاده

طراحی آغازگرها به منظور تشخیص وجود آلفاستلایت، ترادف‌های ژنوم آلفاستلایت، موجود در ژن‌بانک که در یک دهه گذشته از کشورهای اطراف ایران گزارش شده بودند، هم‌ردیف‌سازی شدند و یک جفت آغازگر اختصاصی و همپوشان بنام‌های AS-F (5'-GGT GGC) و AS-R (5'-ACC) (TCT GCA GAT AAT GTT-3') و (ACG TGT ATA GAA CCA GGA-3') طراحی و ساخته شد. به منظور شناسایی بتاستلایت احتمالی همراه با بیماری در نمونه‌ها، از آغازگرهای عمومی Beta01/Beta02 (Briddon *et al.* 2002) و محصول آرسی‌ا به عنوان رشته الگو استفاده گردید. برنامه آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس برای تکثیر قطعات آلفا- و بتاستلایت شامل سه دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه تکثیری شامل ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها به رشته الگو و یک دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ساخته‌شدن قطعات و در نهایت در پایان چرخه‌ها ده دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تکمیل ساخت قطعات انتخاب شدند. درجه حرارت اتصال آغازگرها به ترتیب برای قطعات آلفا- و بتاستلایت ۵۴ و ۵۷ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد.

همسانه‌سازی و تعیین ترادف

بعد از تکثیر ژنوم ویروس به روش دایره غلتان، محصول آرسی‌ا و ناقل pBluescript SK(+) بطور جداگانه با آنزیم برشی *PstI* بریده شدند و سپس ژنوم ویروس مربوط به هر سه جدایه با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase در داخل ناقل pBluescript SK(+) قرار داده شد. پلاسمیدهای نو ترکیب بدست آمده به باکتری *Escherichia coli* نژاد XLI Blue منتقل گردیدند. در مورد ستلایت‌ها، برای همسانه‌سازی از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس و ناقل pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA) استفاده شد. پلاسمیدهای نو ترکیب

نتایج

شناسایی و تعیین خصوصیات ژنوم ویروس همراه با بیماری

در بازدید از گیاهان فلفل در گلخانه و فضای آزاد در جنوب استان کرمان (شهرستان جیرفت و منوجان)، ده نمونه گیاه فلفل با علائم پیچیدگی، قاشقی شدن برگ، زردی و کوتولگی (شکل ۱) جمع آوری شدند که پس از استخراج دی ان ا، با استفاده از آغازگرهای عمومی بگوموویروس‌ها، قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۵۵۰ جفت‌باز در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر گردید. در نتیجه آلودگی هر ده نمونه فلفل به بگوموویروس‌ها تأیید شد. از بین جدایه‌های بررسی شده در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، سه جدایه G3، M11 و M12 انتخاب و پس از همسانه‌سازی، توالی‌یابی شدند (رس‌شمارهای OM885882-OM885884). بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی ژنوم این سه جدایه نشان داد که سازمان ژنوم این جدایه‌ها مشابه سایر بگوموویروس‌های تک‌بخشی دنیای قدیم، با دو و چهار قاب خواندنی باز بترتیب روی رشته ویروسی و رشته مکمل می‌باشند.

مقایسه توالی جدایه‌های ایرانی با توالی‌های موجود در ژن‌بانک از طریق نرم‌افزار نوکلئوتید بلاست (BLASTn) (Altschul et al. 1990) نشان داد که این جدایه‌ها دارای درصد یکسانی بالائی از نظر ترادف نوکلئوتیدی با ویروس پیچیدگی برگ فلفل (ChiLCV) هستند. درصد یکسانی با استفاده از نرم افزار SDT بین این سه جدایه با جدایه‌های منتخب از ژن‌بانک بالای ۹۵ درصد و با یکدیگر ۹۹/۷-۱۰۰ درصد تعیین گردید. مرز تفکیک گونه و نژاد در اعضای جنس *Begomovirus* توسط کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها، به ترتیب درصد یکسانی کمتر از ۹۱ و ۹۴ درصد ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل در نظر گرفته شده است (Brown et al. 2015). بر این اساس، مشخص گردید که هر سه جدایه مورد بررسی مربوط به گونه

توسط عسکری و همکاران (Askari et al. 2021) مایه‌زنی شدند. برای مقایسه، تعدادی گیاهچه نیز با سلول‌های *A. tumefaciens* حاوی پلاسمیدهای کمکی pSoup و pGreen (بدون ژنوم ویروس) مایه‌زنی شده و سپس گیاهان مایه‌زنی شده به مدت شش هفته در شرایط گلخانه نگهداری شدند. بعد از طی این مدت، آلودگی یا عدم آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، دی ان ای استخراج شده از برگ‌های جوان و مایه‌زنی نشده و آغازگرهای اختصاصی ChiLCV-R (5'-GCA TAC ACA GGG TTT GAG) و ChiLCV-G (5'-TTA TGT CGA AGC GAC CAG CA-3') و (GCA-3' که در این تحقیق طراحی شدند، مورد بررسی قرار گرفت.

واکوی تبارزائی

جهت بررسی درصد یکسانی، توالی نوکلئوتیدی ژنوم کامل ویروس و ستلائیتهای همراه با سایر توالی‌های موجود در ژن‌بانک با استفاده از نرم افزار SDT v1.2 (Muhire et al. 2014) با یکدیگر مقایسه شدند. سپس، توالی‌های موجود با استفاده از نرم‌افزار MEGAX (Kumar et al. 2018) و به کارگیری روش MUSCLE (Edgar, 2004) هم‌ردیف‌سازی شدند. درخت‌های تبارزائی به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood) و اعتبارسنجی ۱۰۰۰ با استفاده از نرم افزار MEGAX رسم شد. از ترادف ژنوم مربوط به ویروس پیچیدگی کاذب برگ گوجه‌فرنگی (tomato pseudo-curly top virus, TPCTV)، آلفاستلائیته و بتاستلائیته جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (به ترتیب cotton leaf curl Gezira alphasatellite و cotton leaf curl Gezira betasatellite) به عنوان مدل خارج گروه به ترتیب برای رسم درخت تبارزائی ویروس، آلفاستلائیته و بتاستلائیته استفاده شد.

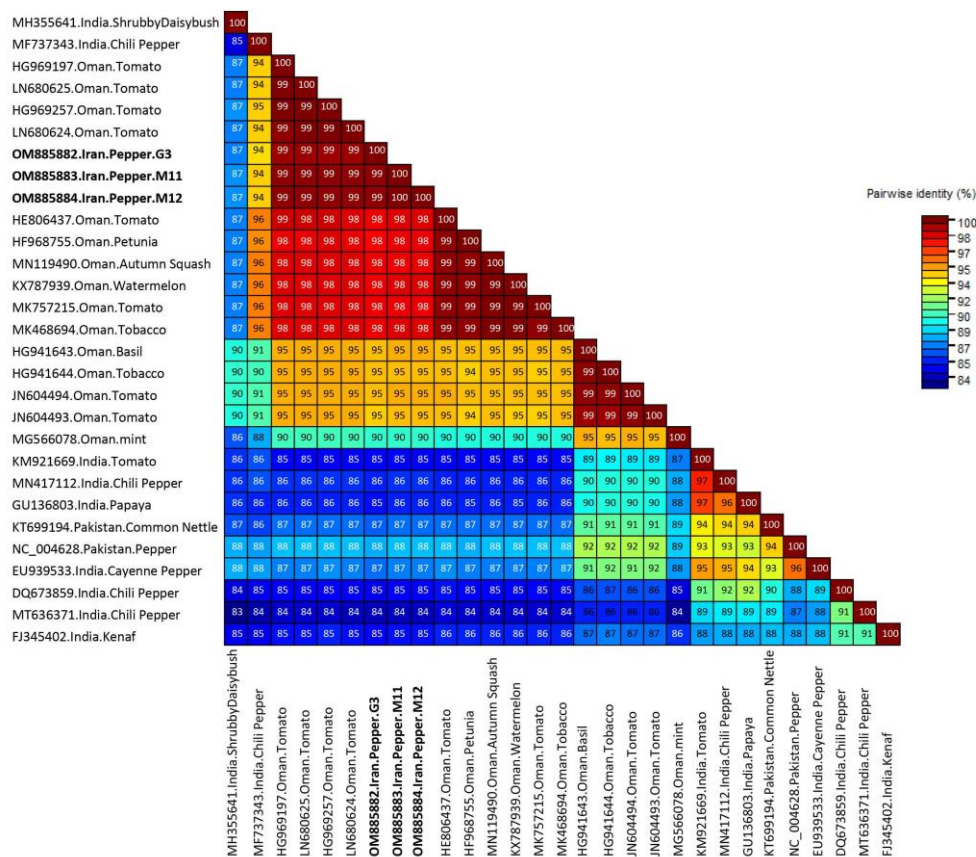
۹۹/۶-۹۹/۸ درصد با جدایه‌ای از کشور عمان با رس‌شمار HG969257 دارا می‌باشند (شکل ۲). مطابق انتظار، درخت تبارزائی رسم شده، جدایه‌های ایرانی در کنار جدایه‌های کشور عمان در یک شاخه مستقل از جدایه‌های شبه قاره هند قرار گرفتند (شکل ۳).

می‌باشند. همچنین، مقایسه دو به دوی ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه و ترادف‌های انتخابی از ژن‌بانک با نرم افزار SDT از طریق هم‌ردیف‌سازی ژنوم کامل ترادف جدایه‌های بدست آمده و جدایه‌های منتخب ژن‌بانک نشان داد که جدایه‌های ایرانی مورد بررسی، بیشترین درصد یکسانی را به میزان



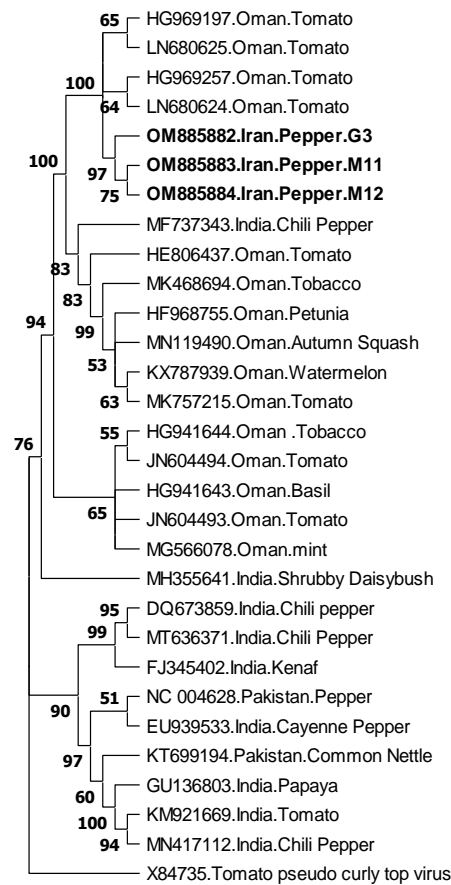
شکل ۱- گیاهان آلوده به ویروس پیچیدگی برگ فلفل؛ (a) فلفل شمشیری با علائم پیچیدگی و سبزدی خفیف، (b) فلفل دلمه‌ای با علائم چروکیدگی و فنجان‌ی شدن برگ‌ها، به‌ترتیب جمع‌آوری شده از کشت فضای آزاد و گلخانه‌های شهرستان‌های منوجان و جیرفت (استان کرمان).

Figure 1. ChiLCV infected pepper plants; a) chili pepper showing leaf curling and mild chlorosis symptoms, b) bell pepper showing crinkling and cup-shaped leaves symptoms collected from open farm and commercial greenhouse in Manoojan and Jiroft (Kerman province), respectively.



شکل ۲- ماتریس مربوط به درصد یکسانی (identity) مترادف نوکلئوتیدی طول ژنوم کامل جدایه‌های ویروس پیچیدگی برگ فلفل بدست آمده از گیاه فلفل از استان کرمان (حروف پررنگ) و جدایه‌های دیگر همین ویروس موجود در ژن‌بانک با استفاده از نرم‌افزار SDT.

Figure 2. Pairwise identity matrix of full-length genome sequence of three ChiLCV isolates recovered from pepper hosts in Kerman province (bold letters) and those of GenBank isolates using SDT software.



شکل ۳- درخت تبارزائی براساس ترادف نوکلئوتیدی طول ژنوم کامل مربوط به جدایه‌های ویروس پیچیدگی برگ فلفل بدست آمده از گیاه فلفل در این تحقیق (حروف پررنگ) و جدایه‌های دیگر همین ویروس موجود در ژن‌بانک به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood). برای محاسبه اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار استفاده شده است و ویروس پیچیدگی دروغین برگ گوجه‌فرنگی به عنوان مدل خارج گروه (outgroup) در نظر گرفته شده است. انشعابات با حمایت کمتر از ۵۰٪ از شکل حذف شده‌اند.

Figure 3. Maximum likelihood phylogenetic tree using nucleotide sequence of the full-length genome of ChiLCV recovered from pepper hosts in current study (bold letters) and counterpart sequences of GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and the genome sequence of tomato pseudo-curly top virus was used as outgroup. Branches with <50% bootstrap support have been collapsed.

نتایج بدست آمده، در هر سه جدایه مورد بررسی، ژنوم کامل آلفاستلایت توسط این دو آغازگر در آزمون فوق، قطعه‌ای به اندازه مورد انتظار تکثیر شد که بعد از همسانه‌سازی، تعیین ترادف شدند (رس‌شمارهای

شناسایی و واکاوی ژنوم آلفاستلایت‌های همراه

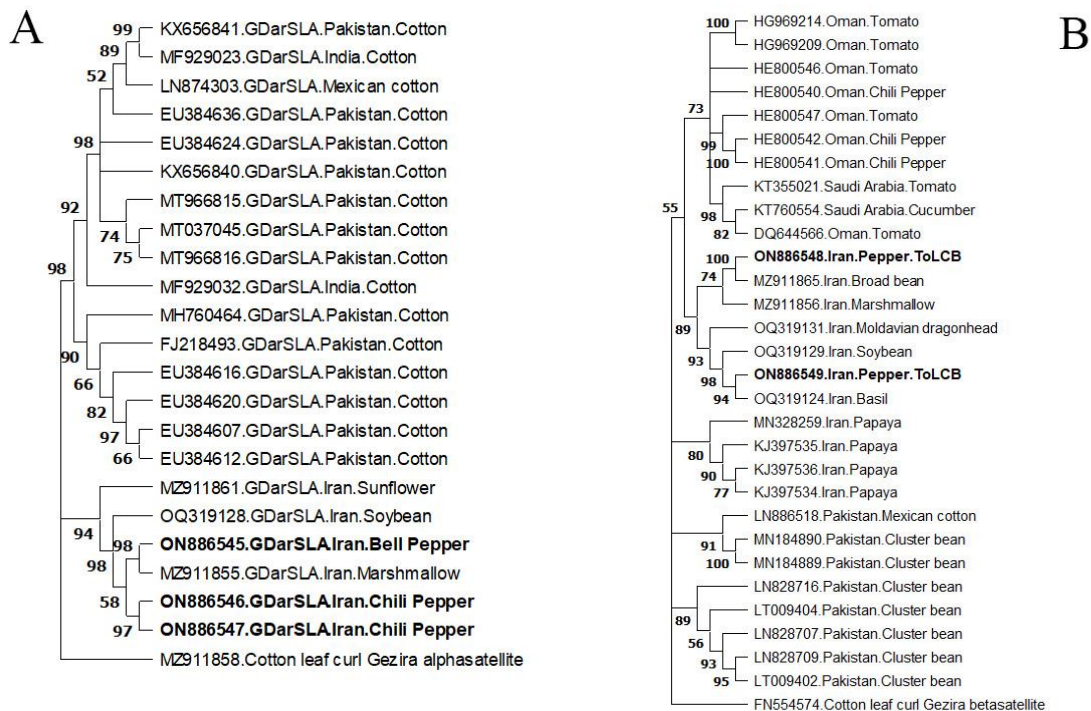
از آغازگرهای اختصاصی AS-F/AS-R و آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس برای ردیابی آلفاستلایت‌های همراه در نمونه‌های مورد بررسی استفاده شد. بر اساس

بتاستلایت‌های همراه، منجر به تکثیر قطعه مورد انتظار به طول تقریبی ۱۴۰۰ نوکلئوتید در دو جدایه M11 و M12 گردید که بعد از همسانه‌سازی، توالی‌یابی شدند (رس‌شمارهای ON886548-ON886549). طول ژنوم بتاستلایت جدا شده مربوط به این دو جدایه به ترتیب ۱۳۷۴ و ۱۳۶۷ نوکلئوتید تعیین گردید. مقایسه دو به دو توالی بتاستلایت تکثیر شده در جدایه‌های ایرانی با توالی‌های موجود در ژن‌بانک از طریق نرم‌افزار نوکلئوتید بلاست (BLASTn) نشان داد که بتاستلایت همراه با نمونه‌ها، دارای درصد یکسانی بالائی از نظر ترادف نوکلئوتیدی با بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (ToLCB) هستند. با استفاده از نرم‌افزار SDT، میزان درصد یکسانی ترادف نوکلئوتیدی دو بتاستلایت جدا شده از گیاه فلفل در ایران با جدایه‌های منتخب از ژن‌بانک، بالای ۹۴ درصد و با یکدیگر ۹۶/۵ درصد تعیین شد. مرز تفکیک گونه در اعضای جنس *Betasatellite* از خانواده *Toleucusatellitidae* توسط کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی بتاستلایت‌ها، یکسانی کمتر از ۹۱ درصد در ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل بتاستلایت در نظر گرفته شده است (Briddon et al. 2016). بر این اساس، مشخص گردید که هر دو جدایه به بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (ToLCB) تعلق دارند. در درخت تبارزائی ترسیم شده، دو بتاستلایت مربوط به این مطالعه در کنار سایر بتاستلایت‌های ایرانی از همین گونه و در یک شاخه مجزا قرار گرفتند (شکل ۴B).

طول ژنوم آلفاستلایت همراه در سه جدایه G3 و M11 و M12 به ترتیب ۱۳۵۷، ۱۳۵۷ و ۱۳۵۵ نوکلئوتید بدست آمد. مقایسه دو به دو توالی تکثیر شده در جدایه‌های ایرانی با توالی‌های موجود در ژن‌بانک از طریق نرم‌افزار نوکلئوتید بلاست (BLASTn) نشان داد که آلفاستلایت همراه با نمونه‌ها، دارای درصد یکسانی بالائی با آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی (GDarSLA) هستند. با استفاده از نرم‌افزار SDT، میزان درصد یکسانی ترادف نوکلئوتیدی سه آلفاستلایت جدا شده از گیاه فلفل در این تحقیق با جدایه‌های منتخب از ژن‌بانک بالای ۸۹ درصد و با یکدیگر ۹۹/۸۰-۹۹/۳۰ درصد تعیین گردید. مرز تفکیک جنس و گونه در اعضای زیر خانواده *Geminialphasatelineae* از خانواده *Alphasatellitidae* توسط کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی آلفاستلایت‌ها، به ترتیب درصد یکسانی کمتر از ۷۰ و ۸۸ درصد در ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل ستلایت در نظر گرفته شده است (Briddon et al. 2018). بر این اساس، مشخص گردید که هر سه جدایه مربوط به گونه GDarSLA می‌باشند. درخت تبارزائی در مورد جدایه‌های آلفاستلایت از ایران و جدایه‌های منتخب از ژن‌بانک ترسیم شد و جدایه‌های مورد مطالعه در کنار سایر جدایه‌های GDarSLA قرار گرفتند (شکل ۴A).

شناسایی و واکاوی ژنوم بتاستلایت‌های همراه

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از آغازگرهای عمومی Beta01/Beta02، به منظور ردیابی



شکل ۴- درخت تبارزائی براساس ترادف نوکلئوتیدی ژنوم مربوط به جدایه‌های آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی (*gossypium darwinii symptomless alphasatellite*) (A)، جدایه‌های بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (*tomato leaf curl betasatellite*) (B) همراه با ویروس پیچیدگی برگ فلفل بدست آمده از گیاه فلفل در در این تحقیق (حروف پررنگ) و جدایه‌های انتخابی موجود در ژن‌بانک به روش حداکثر تشابه (Maximum likelihood). برای محاسبه اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار استفاده شده است. آلفاستلایت جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (*cotton leaf curl Gezira alphasatellite*) و بتاستلایت جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (*cotton leaf curl Gezira betasatellite*) به عنوان مدل خارج گروه (outgroup) در نظر گرفته شده‌اند. انشعابات با حمایت کمتر از ۵۰٪ از شکل حذف شده‌اند.

Figure 4. Maximum likelihood phylogenetic tree using the nucleotide sequence of *gossypium darwinii symptomless alphasatellite* (A), *Tomato leaf curl betasatellite* (B) associated with chili leaf curl virus recovered from pepper hosts in the current study (bold letters) and counterpart sequences of selected GenBank isolates. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and the genome sequence of cotton leaf curl Gezira alphasatellite and cotton leaf curl Gezira betasatellite were used as outgroup. Branches with <50% bootstrap support have been collapsed.

تورم رگبرگ و در مواردی زردی عمومی در گیاهان ظاهر گردید (شکل ۵). آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ChiLCV-F/ChiLCV-

اثبات بیماری‌زائی ویروس

سی روز پس از مایه-زنی گیاهچه‌های فلفل با سازه عفونت‌زای ChiLCV. علائم کوتولگی، پیچیدگی برگ،

و pSoup فاقد سازهٔ ویروسی مشاهده نشد و آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز در مورد این گیاهان منفی بود. راندمان آلودگی در گیاهان مایه‌زنی شده ۳۵ درصد (۲۰ گیاه آلوده از ۶۰ گیاه مایه‌زنی شده) محاسبه گردید.

R و دی ان ای استخراج شده از برگ‌های دارای علائم، منجر به تکثیر قطعهٔ قابل انتظار ۷۳۰ جفت بازی گردید. در حالیکه هیچگونه علائمی در گیاهان فلفل مایه‌زنی شده با سلول‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمیدهای pGreen0029



شکل ۵- علائم گیاه فلفل مایه‌زنی شده با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pGreen دارای سازهٔ عفونت‌زای ویروس پیچیدگی برگ فلفل شامل پیچیدگی برگ‌ها و کوتولگی (a) در مقایسه با گیاه مایه‌زنی شده توسط آگروباکتریوم حاوی پلاسمید pGreen بدون سازهٔ ویروس (b)، ۵۶ روز بعد از مایه‌زنی. (c) نمای نزدیک از علائم گیاه مایه‌زنی شده از سمت راست (a) شامل پیچیدگی مشخص برگ‌ها و تورم رگبرگ.

Figure 5. Symptoms of agroinoculated pepper with the infectious clone of chili leaf curl virus showing leaf curling and dwarfing (a) compared to plant mock-inoculated with an *Agrobacterium* culture bearing empty pGreen plasmid (b) 56 dpi. c) Close-up of agroinoculated pepper from right picture (a) showing typical leaf curling and vein swelling.

(et al. 2020). این ویروس دارای دامنهٔ میزبانی وسیعی است و گیاهان مختلفی از جمله گیاهان خانوادهٔ Solanaceae مانند فلفل، گوجه‌فرنگی، بادمجان و همچنین گیاهانی از خانوادهٔ Malvaceae را آلوده می‌کند (Malathi et al. 2017). در این مطالعه، وجود ویروس پیچیدگی برگ فلفل در گلخانه‌ها و مزارع جنوب استان کرمان با تعیین ترادف ژنوم کامل سه جدایه و ستلایت‌های

بحث

تاکنون بگوموویروس‌های مختلفی در ارتباط با بیماری پیچیدگی برگ فلفل از نقاط مختلف دنیا گزارش شده‌اند. بعنوان مثال ۱۲ بگوموویروس متفاوت همراه با این بیماری از کشور هند گزارش شده است که در میان آن‌ها ویروس غالب، ChiLCV می‌باشد (Malathi et al. 2017; Mishra)

گیاه فلفل (Salehzadeh *et al.* 2022)، CLCuGV از گیاه پاپایا (Bananej *et al.* 2021) و ختمی (Salari *et al.* 2023) و TYLCV از گیاهان سویا، ریحان، باقلا و بادرشبوی (Salari *et al.* 2022) گزارش شده‌اند. در این مطالعه نیز همراهی ToLCB با بیماری پیچیدگی برگ فلفل تأیید گردید. بر اساس یک نظریه و با استفاده از واکاوی‌های تبارزائی، گفته می‌شود که ویروس عامل بیماری یعنی ChiLCV (Khan *et al.* 2013) و یکی از بتاستلایت‌های همراه آن (ToLCB) از شبه قاره هند منشاء گرفته و سپس به خاورمیانه وارد شده است (Shahid *et al.* 2019).

همراهی بتاستلایت‌ها و بگوموویروس‌ها در دو گروه دسته بندی می‌شود. اولین نوع آن یک ارتباط اجباری است که بگوموویروس به بتاستلایت جهت آلوده‌سازی یک میزبان خاص نیاز مبرم دارد و بهترین مثال آن ویروس‌های عامل بیماری پیچیدگی برگ پنبه و ستلایت همراه در جنوب آسیا است (Bridson *et al.* 2001; Mansoor *et al.* 2003; Sattar *et al.* 2013). دومین نوع، بگوموویروس‌هایی هستند که یک ارتباط اختیاری تر با بتاستلایت‌ها دارند و تنها برخی از این ویروس‌ها در مزرعه در ارتباط با بتاستلایت‌ها هستند. نمونه این نوع ارتباط، ویروس پیچیدگی ساقه توتون (tobacco curly shoot virus) با بتاستلایت پیچیدگی ساقه توتون (tobacco curly shoot betasatellite) است (Li *et al.* 2005). مطالعات اختر و همکاران نشان می‌دهد که ChiLCV ارتباط اختیاری با ToLCB دارد و بتاستلایت فقط در برخی از گیاهان فلفل و گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس شناسایی شده است (Khan *et al.* 2013) که با نتایج تحقیق حاضر نیز همخوانی دارد و در دو گیاه از سه نمونه گیاه فلفل مورد بررسی، بتاستلایت شناسایی شد. در این مطالعه، وجود آلفاستلایت بدون علائم پنبه داروینی (GDarSLA) نیز با تعیین ترادف ژنوم کامل در هر سه

همراه آن اثبات گردید. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که علائم پیچیدگی برگ در گیاه فلفل در گلخانه‌های مورد بررسی در جنوب استان کرمان بسیار شدید می‌باشد و توسط ChiLCV و بطور غالب با همراهی بتاستلایت ToLCB و/یا آلفاستلایت GDarSLA ایجاد می‌گردد. علائم شدید پیچیدگی برگ در آلودگی طبیعی گیاهان فلفل در مقایسه با علائم خفیف‌تر گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه را می‌توان به عواملی مختلفی از جمله همراهی مولکول‌های بتاستلایت با بگوموویروس کمکی در گیاهان آلوده شده در شرایط طبیعی نسبت داد. همراهی این مولکول‌ها با بگوموویروس‌های کمکی باعث تجمع ویروس و تشدید علائم ناشی از آن می‌گردد (Gnanasekaran and Chakraborty 2018). با این وجود، برای اثبات این فرضیه، نیاز به آزمایش‌های تکمیلی و استفاده از سازه عفونت‌زای ویروس به همراه سازه بتاستلایت می‌باشد.

جمینی ویروس‌هایی که تاکنون از گیاه فلفل در ایران گزارش شده‌اند شامل ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) (Shirazi *et al.* 2014; Yazdani-*et al.* 2016) و ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندر قند (BCTIV) (Eini *et al.* 2016; Tahan *et al.* 2020) می‌باشند. اخیراً نیز ویروس پیچیدگی برگ فلفل با تعیین ترادف یک قطعه ۵۰۰ جفت‌بازی از ژنوم آن به همراه بتاستلایت ToLCB از فلفل (استان‌های یزد و کرمان)، گوجه‌فرنگی و عروسک پشت‌پرده (هر دو از استان یزد) گزارش شده است (Salehzadeh *et al.* 2022). تاکنون دو بتاستلایت از ایران شامل بتاستلایت عمانی پیچیدگی برگ بامیه (okra leaf curl Oman betasatellite) در ارتباط با ویروس جزیرای پیچیدگی برگ پنبه (CLCuGV) از گیاه بامیه (Salari *et al.* 2023) و بتاستلایت پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (ToLCB) در ارتباط با چندین گونه بگوموویروس شامل ChiLCV از

خسارت در کشت فلفل است. مطالعات بیشتر در مورد ردیابی و تشخیص ویروس‌های آلوده‌کننده فلفل در این مناطق می‌تواند تصویر واضح‌تری از میزان خسارت، تنوع و توزیع جغرافیایی این ویروس‌ها را نشان دهد.

قدردانی

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

نمونه گیاه فلفل اثبات گردید. این اولین گزارش از همراهی یک آلفاستلایت با یک بگوموویروس در گیاه فلفل از ایران می‌باشد.

در بین محصولات مختلفی که در استان کرمان کشت می‌گردند، فلفل یکی از محصولات مهم و اقتصادی می‌باشد و شامل انواع فلفل شمشیری، دلمه‌ای سبز فسفری و رنگی می‌باشند. شرایط آب و هوایی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری مناطق مرکزی و جنوبی ایران از جمله استان کرمان، برای گسترش بگوموویروس‌ها مطلوب است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ChiLCV و ستلایت‌های همراه آن در جنوب استان کرمان یکی از عوامل ایجاد

منابع

- References
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Askari F., Heydarnejad J., Vaziri S., Esmaeili M. and Massumi H. 2021. Chickpea chlorotic dwarf virus: natural hosts and genome characterization of an isolate in eastern and southern Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 57(3): 203-216. <https://doi.org/10.22034/ijpp.2021.535291.363>
- Bananej K., Kraberger S. and 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. <https://doi.org/10.4454/JPP.V98I3.043>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13314-021-00417-z>
- Boulton M. 2008. Construction of infectious clones for DNA viruses: Masterviruses. pp 503–523. In: Foster G.D., Johansen I.E., Hong Y. and P.D. Nagy (Eds.), *Methods in Molecular Biology* 451, plant virology protocols: from viral sequence to protein function. Humana Press, Totowa, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-102-4_34
- Briddon R.W. 2003. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology* 4(6): 427-434. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00188.x>
- Briddon R.W., Bull S.E., Amin I., Mansoor S., Bedford I.D., Rishi N., Siwatch S.S., Zafar Y., Abdel-Salam A.M. and Markham P.G. 2004. Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus-DNA β complexes. *Virology* 324(2): 462-74. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.041>
- Briddon R.W., Bull S.E., Mansoor S., Amin I. and Markham P. G. 2002. Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA β ; a molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Molecular Biotechnology* 20: 315–318. <https://doi.org/10.1385/MB:20:3:315>
- Briddon R.W., Mansoor S., Bedford I.D., Pinner M.S., Saunders K., Stanley J., Zafar Y., Malik K.A. and Markham P.G. 2001. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology* 285(2): 234-43. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0949>
- Briddon R.W., Martin D.P., Roumagnac P., Navas-Castillo J., Fiallo-Olivé E., Moriones E., Lett J.M., Zerbini F.M. and Varsani A. 2018. Alphasatellitidae: a new family with two subfamilies for the classification of geminivirus-and nanovirus-associated alphasatellites. *Archives of Virology* 163: 2587-2600. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3854-2>
- Briddon R.W., Navas-Castillo J. and Fiallo-Olivé E. 2016. ICTV taxonomic proposal 2016.021a-kP.A.v2.Tolecusatellitidae. Create the *Tolecusatellitidae*, a new family of single-stranded DNA satellites with two genera. Available at: <http://www.ictv.global/proposals-16/2016.021a-kP.A.v2.Tolecusatellitidae.pdf>
- Brown J.K., Fauquet C.M., Briddon R.W., Zerbini M., Moriones E. and 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. and Varsani A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* 160(6): 1593-619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1994.tb04973.x>
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Eini O., Ebadzad Sahraei Gh. and Behjatnia S.A.A. 2016. Molecular characterization and construction of an infectious clone of a pepper isolate of *Beet curly top Iran virus*. *Molecular Biology Research Communications* 5(2): 101-113. <https://doi.org/10.22099/MBRC.2016.3707>
- Fiallo-Olivé E., Lett J.M., Martin D.P., Roumagnac P., Varsani A., Zerbini F.M. and Navas-Castillo J. 2021. ICTV virus taxonomy profile: *Geminiviridae*. *Journal of General Virology* 102(12): 001696. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001696>
- Gnanasekaran P. and Chakraborty S. 2018. Biology of viral satellites and their role in pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 33: 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.002>
- Hajimorad M.R., Kheyr-Pour A., Alavi V., Ahoonmanesh A., Bahar M., Rezaian M.A. and 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): 418-425. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-151.x>
- Hellens R.P., Edwards E.A., Leyland N.R., Bean S. and Mullineaux P.M. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 42(6): 819-832. <https://doi.org/10.1023/A:1006496308160>
- Heydarnejad J., Mozaffari A., Massumi H., Fazeli R., Gray A.J., Meredith S., Lakay F., Shepherd D.N., Martin D.P. and Varsani A. 2009. Complete sequences of tomato leaf curl Palampur virus isolates infecting cucurbits in Iran. *Archives of Virology* 154(6): 1015-1018. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0389-6>
- Khan A.J., Akhtar S., Al-Zaidi A.M., Singh A.K. and Briddon R.W. 2013. Genetic diversity and distribution of a distinct strain of *Chili leaf curl virus* and associated betasatellite infecting tomato and pepper in Oman. *Virus Research* 177(1): 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.018>
- Kheyr-Pour A., Bananej K., Dafalla G.A., Caciagli P., Noris E., Ahoonmanesh A., Lecoq H. and Gronenborn B. 2000. *Watermelon chlorotic stunt virus* from the Sudan and Iran: sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology* 90(6): 629-35. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.6.629>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Li Z., Xie Y. and Zhou X. 2005. Tobacco curly shoot virus DNA β is not necessary for infection but intensifies symptoms in a host-dependent manner. *Phytopathology* 95(8): 902-908. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0902>
- Lozano G., Trenado H.P., Fiallo-Olivé E., Chirinos D., Geraud-Pouey F., Briddon R.W. and Navas-Castillo J. 2016. Characterization of non-coding DNA satellites associated with sweepoviruses (genus Begomovirus, Geminiviridae)-definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. *Frontiers in Microbiology* 7: 162. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00162>
- Malathi V.G., Renukadevi P., Chakraborty S., Biswas K.K., Roy A., Sivalingam P.N., Venkataravanappa V. and Mandal B. 2017. Begomoviruses and their satellites occurring in India: distribution, diversity and pathogenesis. pp 75-177. In: Mandal B., Rao G., Baranval V. and Jain R. (Eds.), *A Century of Plant Virology in India*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5672-7_5
- Mansoor S., Briddon R.W., Zafar Y. and Stanley J. 2003. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in Plant Science* 8(3): 128-134. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00007-4)
- Mishra M., Verma R.K., Marwal A., Sharma P. and Gaur R.K. 2020. Biology and interaction of the natural occurrence

- of distinct monopartite begomoviruses associated with satellites in *Capsicum annum* from India. *Frontiers in Microbiology* 11: 512957. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.512957>
- Mosharaf N., Tabein S., Behjatnia S.A.A. and Accotto G.P. 2020. Identification of cotton leaf curl Multan virus, a new threatening begomovirus in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 56: 217-218.
- Muhire B.M., Varsani A. and Martin D.P. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS one* 9(9): e108277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>
- Navas-Castillo J., Fiallo-Olivé E. and Sánchez-Campos S. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49: 219-248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102234>
- Rojas M.R., Gilbertson R.I., Russell D.R. and Maxwell D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0340>
- Roumagnac P., Lett J.M., Fiallo-Olivé E., Navas-Castillo J., Zerbini F.M., Martin D.P. and 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. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05309-2>
- 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.
- Salari Kh., Heydarnejad J., Massumi H. and 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. <https://doi.org/10.1007/s40858-022-00546-5>
- Salehzadeh M., Afsharifar A., Dehghanpour Farashah S. and 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(4): 337-341.
- Sattar M.N., Kvarnheden A., Saeed M. and Briddon R.W. 2013. Cotton leaf curl disease—an emerging threat to cotton production worldwide. *Journal of General Virology* 94(4): 695-710. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049627-0>
- Shepherd D.N., Martin D.P., Lefeuvre P., Monjane A.L., Owor B.E., Rybicki E.P. and 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. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.12.014>
- Shahid M.S., Shafiq M., Raza A., Al-Sadi A.M. and Briddon R.W. 2019. Molecular and biological characterization of chili leaf curl virus and associated tomato leaf curl betasatellite infecting tobacco in Oman. *Virology Journal* 16(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1235-4>
- Shirazi M., Mozafari J., Rakhshandehroo F. and Shams-Bakhsh M. 2014. Genetic diversity, host range, and distribution of tomato yellow leaf curl virus in Iran. *Acta Virologica* 58: 128-136. https://doi.org/10.4149/AV_2014_02_128
- Tahan V., Heydarnejad J. and Jafarpour B. 2020. Characterization of beet curly top Iran virus infecting eggplant and pepper in north-eastern Iran. *Indian Phytopathology* 73(3): 577-581. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00218-x>
- Varma A. and Malathi V.G. 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142(2): 145-64. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2003.tb00240.x>
- Varsani A., Martin D.P., Randles J.W., Vetten H.J., Thomas J.E., Fiallo-Olivé E., Navas-Castillo J., Lett J.M., Zerbini F.M., Roumagnac P. and Gronenborn B. 2021. Taxonomy update for the family *Alphasatellitidae*: new subfamily, genera, and species. *Archives of Virology* 166(12): 3503-3511. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05232-6>
- Yazdani-Khameneh S., Aboutorabi S., Shoori M., Aghazadeh A., Jahanshahi P., Golnaraghi A. and Maleki M. 2016. Natural occurrence of tomato leaf curl New Delhi virus in Iranian cucurbit crops. *The Plant Pathology Journal* 32(3): 201-208. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.10.2015.0210>
- Zhang Y.P., Uyemoto J.K. and 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. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)
- Zhou X. 2013. Advances in understanding begomovirus satellites. *Annual Review of Phytopathology* 51: 357-81. [10.1146/annurev-phyto-082712-102234](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102234)