نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 29، شماره 3، پاییز 1394، ص. 436-427

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 3, Fall 2015, P. 427-436

شناسایی مولکولی میزبان‌های علفی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی در جنوب استان کرمان

خدیجه سالاری[1*]- سیده عاطفه حسینی[2]- جهانگیر حیدرنژاد[3]

تاریخ دریافت: 1393/04/26
تاریخ پذیرش: 1394/06/23

چکیده

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) در سال‌های اخیر خسارت گسترده‌ای به کشت‌های گوجه فرنگی و انواع کدوئیان در مناطق جنوب و جنوب شرقی ایران وارد نموده است. به منظور شناسایی علف‌های هرز میزبان این ویروس، از علف‌های هرز حاشیه و داخل گلخانه‌ها و مزارع به شدت آلوده انواع کدوئیان و گوجه فرنگی در مناطق منوجان، کهنوج، فاریاب، عنبرآباد و جیرفت نمونه‌برداری صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که علف‌های هرز ارزق اورشلیمی (*Chrozophora tinctoria*)، آفتاب پرست (*Heliotropium annum*)، پنیرک (*Malva neglecta*) و سلمه تره (*Chenopodium murale*) به این ویروس آلوده بودند. به منظور مقایسه جدایه‌های TYLCV موجود در علف‌های هرز آلوده، قطعه 550 جفت بازی مربوط به بخشی از ناحیه بین ژنی و بخشی از ژن پروتئین پوششی 4 جدایه مختلف ویروس تعیین توالف گردید. بررسی شباهت ژنتیکی این جدایه‌ها با جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن نشان داد که این جدایه‌ها با جدایه‌های مورد مقایسه از بانک ژن در گستره 99/98-93/24 درصد در سطح نوکلئوتیدی و 98/15-87/42 درصد در سطح آمینواسیدی تشابه دارند و تعداد 66 جهش در بین توالی‌های مورد مقایسه در این تحقیق در سطح نوکلئوتیدی مشاهده شد، هم‌چنین نتایج به دست آمده نشان داد که شناسایی علف‌های هرز میزبان که در همه‌گیری شناسی بیماری نقش مهمی دارند، در برنامه مدیریت این بیماری حائز اهمیت می‌باشد. این اولین گزارش از گیاه سلمه تره و پنیرک به عنوان میزبان علفی TYLCV در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بگوموویروس، علف‌های هرز، سفید بالک، واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی، از جنس *Begomovirus* و تیره Geminiviridae است. ویروس‌های این خانواده ژنوم DNA تک لا و حلقوی دارند و در نواحی گرمسیر و نیمه گرمسیر گسترده هستند و چندین گونه گیاهی با اهمیت اقتصادی را آلوده می‌کنند (27و 30). این خانواده بر اساس نوع حشره ناقل، دامنه میزبانی، ساختمان ژنوم و بررسی‌های فیلوژنی به هفت جنس (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* و *Turncurtovirus*) تقسیم می‌شود (42). بگوموویروس‌ها در بین خطرناک‌ترین پاتوژن‌های آلوده کننده گیاهان کشت شده در سراسر دنیا هستند و تنها گیاهان دو لپه را مورد حمله قرار می‌دهند (27 و 31). ویروس‌هایی که در جنس *Begomovirus* طبقه‌بندی می‌شوند توسط سفید بالک (*Bemisia tabaci*) منتقل می‌شوند و به دو تیپ بگوموویروس‌های با ژنوم تک بخشی و دو بخشی تقسیم می‌شوند (5). بگوموویروس‌ها بر اساس ساختمان ژنوم، تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی در دو گروه جهان قدیم (اروپا، آفریقا، آسیا و استرالیا) و جهان جدید (آمریکا) تقسیم می‌شوند (4). بگوموویروس‌هایی که از جهان جدید منشا می‌گیرند ژنوم دو بخشی دارند که تحت عنوان DNA-A و DNA-B شناخته می‌شوند، اما فقط DNA-A در طبقه‌بندی تاکسونومیکی بگوموویروس‌های دو بخشی استفاده می‌شود و تاکنون هیچ بگوموویروس بومی با ژنوم تک بخشی از جهان جدید شناسایی نشده است (5). پروتئین‌های کد شده توسط DNA-A در همانندسازی و کپسیددار شدن نقش دارند، در حالی‌که پروتئین‌های کد شده توسط DNA-B برای حرکت بین و درون سلولی و ظهور علائم در گیاه ضروری می‌باشند (22). در جهان قدیم اگرچه تعداد کمی بگوموویروس با ژنوم دو بخشی وجود دارد اما اکثریت ژنوم تک بخشی مشابه DNA-A در بگوموویروس‌های دو بخشی دارند (4). در بگوموویروس‌های دو بخشی شش قاب خواندنی باز ORF شامل (AV1, AV2, AV3, AV4) روی DNA-A و دو ORF شامل (BC1, BV1) روی DNA-B قرار می گیرند (36).

1- مربی بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت
(*- نویسنده مسئول: Email: khadijeh.salari@ujiroft.ac.ir)
2- استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
3- استاد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

بیماری پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی اولین بار در دنیا سال 1939 با شیوع گسترده سفید بالک (*Bemisia tabaci*) از اسرائیل گزارش شد ولی اولین علائم بیماری از روی گوجه فرنگی در سال 1931مشاهده و سبب کاهش شدید محصول شد (7). این بیماری اولین بار در ایران در سال1996 میلادی از مزارع گوجه فرنگی استان‌های جنوبی ایران شامل سیستان و بلوچستان، هرمزگان، خوزستان، فارس و کرمان گزارش شد (19). تشخیص علف‌های هرز منبع ویروس می‌تواند یک بخش مهم مدیریت بیماری‌های ویروسی باشد (33) تا کنون مطالعات زیادی در مورد بررسی و شناسایی میزبان‌های علف هرز ویروس TYLCV در دنیا انجام شده است. در اسپانیا علف هرز تاج‌ریزی (*Solanum nigrum*) به‌عنوان میزبان این ویروس شناسایی شد (2). هم‌چنین در جنوب کالیفرنیا آلودگی علف‌های هرز آکالیفا (*Acalypha virginica*) از تیره فرفیون، بگونیا (*Begonia* sp)، شیرتیغی (*Sonchus oleraceus*)، تاج خروس (*Amaranthus retroflexus*) و توتون (*Nicotiana tabacum*) در آزمون PCR مثبت ارزیابی شد (44). در بررسی انجام شده در تانزانیا علف‌های هرز توتون و تاتوره (*Datura stramonium*) آلوده گزارش شدند (26). در قبرس در 461 نمونه علف هرز از 49 گونه مختلف متعلق به چندین خانواده گیاهی حضور ویروس مشخص شد (32). فانیگلیلو و همکاران در ایتالیا وجود ویروس مذکور را در علف‌هرز ازمک (*Cardaria draba*)، شیرتیغی (*Sonchus asper*)، تاج‌ریزی و تاتوره ردیابی کردند (10). فاضلی و همکاران علف‌های هرز ارزق اورشلیمی (*Chrozophora heirosolymitana*) و فتق کرک آلود (*Herniaria* sp). را از ایران به عنوان میزبان TYLCV معرفی کردند (13). حسین زاده و همکاران نیز علف هرز تاتوره را از بجنورد در ایران آلوده به این ویروس گزارش کردند (24). هم‌چنین حیدر نژاد و همکاران آلودگی گونه‌ای از علف هرز آفتاب پرست (*Heliotropium annum*) به TYLCV را گزارش نمودند (23). مشاهدات مزرعه‌ای در طی سال‌های اخیر نشان می‌دهد که عامل اصلی خسارت در گلخانه‌ها و مزارع کدوئیان و گوجه فرنگی در جنوب استان کرمان ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی می‌باشد (25). حشرات ناقل سفید بالک‌های ناقل در حین تغذیه از شیره گیاهی بگوموویروس‌ها را بین میزبان‌های هرز و میزبان‌های گیاهی کشت شده منتقل می‌کنند و در تکامل ویروس‌ها و اپیدمی بیماری نقش دارند (1 و 34). در ایران واریانت‌های جدیدی از این ویروس در مناطق شمال شرقی مشاهده شده است که بر اساس مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد ظهور واریانت‌های جدید از نژادهای این ویروس ناشی از انتشار طبیعی جمعیت های آلوده به ویروس از حشرات ناقل، سفید بالک‌ها یا از طریق انتقال مواد گیاهی آلوده به ویروس از مناطق جنوبی به مناطق شمال شرقی باشد (24). بدلیل فقدان اطلاعات منطقه‌ای در خصوص نحوه پایداری و بقاء عامل بیماری در خارج از فصل زراعی، روش‌های جاری در کنترل این بیماری موثر نبوده و هم‌چنان به‌عنوان بیماری مهم در منطقه شناخته می‌شود. هدف از این تحقیق شناسایی میزبان‌های علفی ویروس و دستیابی به اطلاعات کافی و تدوین برنامه مدیریتی مناسب جهت کاهش خسارت بیماری و افزایش عملکرد می‌باشد.

مواد و رو ش‌ها

نمونه‌برداری و ردیابی ویروس در علف‌های هرز

در طی بازدید ازحاشیه و داخل مزارع و گلخانه‌های کدوئیان و گوجه فرنگی در سال‌های 1393-1391 نمونه‌های علف هرز با و بدون علائم از حاشیه و داخل مزارع گوجه فرنگی، خیار، کدو، خربزه، گرمک از مناطق کشت آن‌ها در جنوب استان کرمان (منوجان، کهنوج، فاریاب، جیرفت، عنبرآباد و ساردوئیه) جمع‌آوری شد (جدول 1).

جدول 1- مشخصات مناطق مختلف نمونه برداری شده به منظور شناسایی میزبان های هرز ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی

Table 1- Details of sample collection sites to identifty weed hosts of TYLCV

ردیف Row	شهرستان Province	مناطق نمونه برداری شده sample collection sites
1	منوجان Manoojan	چاه حسن، چاه آموزی، نهضت آباد، چنوکی، نور آباد Chah hasan, Chah amoozi, Nehzat Abad, Choghooki, Noor Abad
2	کهنوج Kahnooj	دهپیش سهران، سعید آباد، زه، رضاآباد، چاه زیارت، زه واردراز Dehpish Sohran, Saeed Abad, Reza Abad, Zeh, Chah Ziarat, Zehvar Deraz
3	جیرفت Jiroft	مزارع حاشیه رودخانه هلیل، باقرآباد، بهجرد Halil River Farms, Bagher Abad, Behjerd
4	عنبرآباد Anbarabad	تل شیراز، جهاد آباد، امیر آباد نظری، علی آباد قدیری، توکل آباد Tal shiraz, Jahad Abad, Amir abad Nazari, Aliabad Ghadiri, Tavakol Abad

علائم مشاهده شده در میزبان اصلی در مزرعه شامل موزائیک، کوتولگی، ایجاد علائم ستاره‌ای شکل در سطح برگ، جاروئی‌شدن بوته، پیچیدگی حاشیه برگ به سمت بالا، تاولی‌شدن سطح برگ و بد شکلی در میوه می‌باشد.

جدول2- مشخصات علف های هرز جمع آوری شده از مزارع مختلف کدوئیان و گوجه فرنگی جهت ردیابی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی TYLCV

Table 2- Detail of collected Weeds from different fields of tomato and cucurbitae to detecting TYLCV.

منطقه نمونه برداری Sample collection site	تعداد نمونه برداشت شده Number of collected samples	خانواده Family	گونه Species
مزرعه گوجه فرنگی (جیرفت) Tomato field(Jiroft)	20	*Amaranthaceae*	تاج خروس برگ نازک *Amaranthus viridis*
"	15		تاج خروس وحشی *Amaranthus retroflexus*
"	7	*Asteraceae*	گاوچاق‌کن *Lactuca serriola* (L.)
مزرعه خربزه(منوجان) Melon field(Manoojan)	8		گلرنگ *Carthamus tinctorius* L.
"	6	*Compositae*	گل گندم *Centaurea solstitialis* L.
"	10		پیر گیاه *Senecio vulgaris L.*
مزرعه گوجه فرنگی (کهنوج) Tomato field(Kahnooj)	30	*Boraginaceae*	آفتاب پرست اروپایی *Heliotropium europaeum* L
"	26	*Chenopidiaceae*	سلمه تره *Chenopodium murale* L.
"	30		سلمه تره *Chenopodium album* L.
"	20	*Convolvulaceae*	علف شور *Salsola sp.*
"	5		علف مورچه *Cressa cretica* L.
مزارع کدو و خیار(عنبر آباد)	15	*Cruciferae*	تره تیزک (ازمک) *Cardaria draba*
"	10		شلغمی *Rapistrum crantz*
"			اویارسلام *Cyperus* sp.
مزرعه گوجه فرنگی (منوجان)	10	*Cyperaceae*	فرفیون *Euphorbium helioscopia* L
"	16	*Euphorbiaceae*	رنگینک(ارزق)-گوش بره *Chrozophora tinctoria*
"	14		علف عشق *Eragrostis* sp. P.Beauv
"	10	*Gramineae*	سوروف *Echinochloa* sp.
"	8		یونجه زرد *Melilotus officinalis* (L.) Desr
"	7	*Legominosae*	پنیرک *Malva neglecta*L
مزرعه کدو(جیرفت)	25	*Malvaceae*	
"	5	*Orobanchaceae*	

گل جالیز تاج خروس برگ نازک *Amaranthus viridis*	*Papilionaceae*	9	"
تاج خروس وحشی *Amaranthus retroflexus*	*Polygonaceae*	10	"
گاوچاق‌کن *Lactuca serriola* (L.)		10	"
گلرنگ *Carthamus tinctorius* L.	*primulaceae*	10	"
گل گندم *Centaurea solstitialis* L.	*Protulacaceae*	10	"
پیر گیاه *Senecio vulgaris L.*	*Solanaceae*	10	"
آفتاب پرست اروپایی *Heliotropium europaeum* L		10	مزرعه کدو (منوجان)
سلمه تره *Chenopodium murale* L.	*Umbelliferae*	5	"
سلمه تره *Chenopodium album* L.	*Zygophyllaceae*	5	"
علف شور *Salsola sp.*		7	"
علف مورچه *Cressa cretica* L. تره تیزک (ازمک)	*Cucurbitaceae*	15	"

علف‌های هرز جمع آوری شده (بجزء در مواردی) بدون علائم بودند. نمونه‌های مشکوک درون پلاستیک قرار داده شد و بر روی آن‌ها محل جمع‌آوری و تاریخ نمونه‌برداری ثبت شد. تمامی نمونه‌ها روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

شناسایی علف های هرز

شناسایی جنس و گونه نمونه‌های جمع‌آوری شده، توسط متخصین گیاه شناسی انجام شد (جدول 2).

استخراج DNA

استخراج DNA به روش سی‌تب [1](CTAB) و بر اساس ژانگ و همکاران (45) انجام شد. DNA حاصل به دمای20- درجه سانتی گراد منتقل شد.

شناسایی مولکولی ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، الکتروفورز و تعیین ترادف توالی‌ها

DNAهایی استخراجی از علف های‌هرز جمع‌آوری شده، جهت تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفتند. در این واکنش از آغازگرهای رشته ویروسی (PCR v181 TAATATTACCGGWTGGCC) و رشته مکمل (PCR Bc TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA) (37) که اختصاصی جهت شناسایی DNA-A جمینی ویروس‌های منتقل شده با سفید بالک می‌باشد، استفاده شد. بازهای نامشخص که باحروف دیگری غیرازA، T، C وG درترادف آغازگرقراردارند به صورت زیرهستند: Y= C/T, W=A/T, R=A/G,K= G/T, B= C/G. این جفت آغازگر قطعه‌ای به طول 550 جفت باز در نمونه‌های آلوده تکثیر نمود (39). آزمون PCR با استفاده از کیت (AccuPower PCR PreMix Kit, Bioneer- South Korea) در حجم 25 میکرولیتری شامل یک میکرولیتر cDNA به غلظت 200نانو گرم بر میکرولیتر، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها به غلظت 10 پیکومول، 1/2میکرولیتر از بافر $MgCl_2$ (10میلی مولار)، 0/5میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتید تری فسفات ها(dNTPs) (10میلی‌مولار)، 0/ 5 میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase به غلظت 5 واحد در میکرولیتر،4/3 میکرولیتر بافر PCR و 15/5 میکرولیتر آب مقطر استریل انجام گرفت. در برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ابتدا یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت سه دقیقه در 94 درجه سانتی‌گراد، 30 چرخه شامل مرحله واسرشت سازی 50 ثانیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، اتصال 50 ثانیه در دمای 55 درجه سانتی‌گراد و

1 cetyltrimethylammonium bromide, hexadecyltrimethylammonium bromide

گسترش 60 ثانیه در 72 درجه سانتی‌گراد و در انتها برای مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز 1 درصد و رنگ آمیزی ژل با DNAsafe stain (sinaclon-IRAN) صورت گرفت. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، به منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانجر توالی‌یابی شدند.

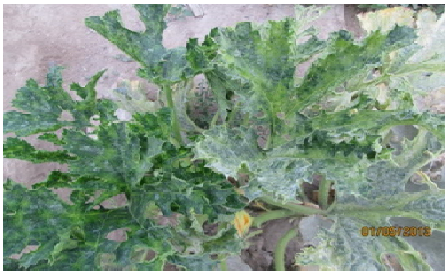
مقایسه ترادف‌ها

توالی‌های حاصل با استفاده از ابزار BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih) مشابهت‌یابی شدند. پس از به دست آوردن میزان همولوژی قطعه 550 جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی چهار جدایه علف‌های هرز ارزق اورشلیمی، آفتاب پرست، پنیرک و سلمه تره توالی آنها توسط نرم افزار Bio edit (21) رج بندی شدند. به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه، درخت فیلوژنتیکی به روش Maximum likelihood توسط نرم افزار MEGA 5 (40) با حذف تمامی جایگاه‌های دارای خطا و فواصل ترسیم شد. سپس با استفاده از نرم افزار CLC Main work bench درصد شباهت در سطح توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای به همراه ماتریس فاصله ژنتیکی تعیین گردید.

نتایج و بحث

بررسی میزان آلودگی ویروس

به منظور تعیین دامنه میزبانی گیاهان علفی میزبان ویروس TYLCV از مناطق مختلف تحت کشت کدوئیان و گوجه فرنگی در جنوب استان کرمان (منوجان، فاریاب، کهنوج، عنبر آباد و جیرفت) از آذر ماه 91تا خرداد ماه 93 نمونه‌برداری صورت گرفت. تعداد 350 نمونه علف هرز متعلق به 21خانواده شامل30 جنس با گونه‌های مختلف از مزارع و گلخانه‌های (گوجه فرنگی، خیار، خربزه، طالبی و کدو) مناطق فوق جمع‌آوری شده، با آزمون PCR مورد بررسی قرارگرفتند. بررسی نمونه‌های فوق با آزمون PCR نشان داد که علف‌های هرز آفتاب پرست، سلمه تره، ارزق اورشلیمی و پنیرک آلوده به ویروس فوق می‌باشند. اغلب علف‌های هرز معمولاً هیچ گونه علائمی نشان نمی‌دادند اما بندرت در علف‌های هرز آفتاب پرست و پنیرک آلوده، مقداری علائم کلروز و رنگ پریدگی مشاهده شد (شکل 3 و 5). نمونه برداری معمولا از داخل و حاشیه مزارع با آلودگی شدید صورت گرفت. علائم در کدو شامل موزائیک شدید، کوچک شدن برگ‌ها، لوله شدن برگ‌ها به سمت داخل، صاف ایستادن برگ‌ها، تاولی شدن برگ‌ها و ایجاد لکه سبز رنگ روی میوه می‌باشد (**Error! Reference source not found.**شکل 1). علائم در میزبان خیار شامل ایجاد لکه‌های کلروز ستاره‌ای شکل در متن برگ، موزائیک خفیف در سطح برگ، کلروز حاشیه برگ، سبز روشن شدن حاشیه برگ، زردی در متن برگ و کمی لوله شدن برگ‌ها به سمت پائین می‌باشد (شکل2).



شکل 1- علائم ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی روی کدو شامل ایجاد لکه های زرد و پیچیدگی برگ ها

Figure 1-Symptoms of Tomato yellow leaf curl virus on a pumpkin plant including yellow spot and leaf curling

شکل 2- علائم ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی روی خیار شامل لکه های ستاره ای شکل و موزائیک در برگ ها

Figure2- *Symptoms of* star shape spot and mosaic Tomato yellow leaf curl virus on *Cucumber plant including*

شکل 3- علائم ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی روی پنیرک شامل زرد شدن رگبرگ ها و ایجاد لکه های زرد

Figure3- Symptoms of *Tomato yellow leaf curl virus* on Common mollow plant including vein yellowing and yellow spot

شکل 4- علائم ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی روی سلمه تره شامل ایجاد لکه های زرد و رنگ پریدگی برگ ها

Figure 4- Symptoms of *Tomato yellow leaf curl virus* on Common lambsquarters plant including yellowing and yellow spot

شکل 5- علائم ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی روی سلمه تره شامل رنگ پریدگی برگ ها

Figure 5-Symptoms of *Tomato yellow leaf curl virus* on Heliotropium plant including yellowing.

شکل6-ارزق اورشلیمی *Chrozophora tinctoria* بدون علائم آلوه به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی روی

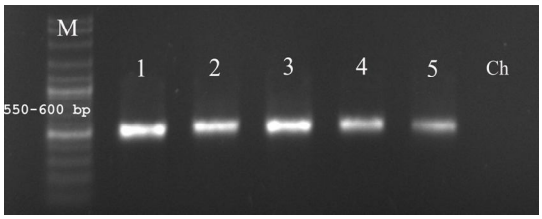
Figure6- Dyer's litmus no symptoms and infected to *Tomato yellow leaf curl virus*.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج DNA به روش سی تب (CTAB) به دلیل بالا بودن غلظت ویروس درون عصاره به دست آمده نتیجه خوبی نشان می‌دهد. الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های گیاهان زراعی کدو، خیار، گوجه و علف‌هایهرز سلمه تره، آفتاب پرست، ارزق اورشلیمی و پنیرک منجر به تشکیل باند حدودا 550 جفت بازی درون ژل آگاروز یک درصد گردید و در سایر نمونه‌ها باند مورد نظر تشکیل نشد (**Error! Reference source not found.**7). تعیین توالی قطعه 550 جفت بازی برای چهار جدایه علف‌هرز ارزق اورشلیمی، سلمه تره، پنیرک و آفتاب پرست انجام گرفت. قطعه 550 جفت بازی به‌دست آمده از توالی یابی، در آنالیزهای فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنیکی

با استفاده از ابزار BLAST درصد تشابه توالی ژن پروتئین پوششی با توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI تعیین شد. نتایج نشان داد که اکثر توالی‌های تکثیر شده مربوط به بخشی از ژن پروتئین پوششی و ناحیه بین ژنی به‌دست آمده از جدایه‌های TYLCV علف‌های هرز مورد مطالعه در سطح بالای 93 درصد با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مورد استفاده در این تحقیق شباهت داشتند.



شکل 7- نقش الکتروفورزی محصول *PCR* تکثیر شده از *DNA* کل استخراج شده با استفاده از آغازگرهای دژنره *181v* و *Bc* در ژل آگاروز 1% مربوط به چهار علف هرز آلوده به *TYLCV*. علف هرز سلمه تره *Chenopodium murale* (2)، علف هرز ارزق اورشلیمی *Chrozophora tinctoria* (3)، علف هرز آفتاب پرست *Heliotropium annum* (4)، علف هرز پنیرک *Malva neglecta* (5)، گوجه فرنگی آلوده به TYLCV به عنوان شاهد مثبت (1)، گوجه فرنگی سالم به عنوان شاهد منفی (Ch)، نشانگر مولکولی Gene Ruler DNA Ladder 100bp, Sinaclon-IRAN) (M). در نمونه های آلوده و شاهد مثبت قطعه 550 جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی تکثیر گردید.

Figure 7- Electrophoretic patterns of PCR products of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) on 1% agarose gel using 181v/Bc primer degenerated from 4 TYLCV-infected weed species; *Chenopodium murale* (2), *Chrozophora tinctoria* (3), *Heliotropium annum* (4), *Malva neglecta* (4) TYLCV infected Tomato as the positive control (1 healthy Tomato as the negative control (Ch), molecular marker (M).

نتایج حاصله نشان می‌دهد که این ناحیه از ژنوم این ویروس حفاظت شده بوده، تغییر نوکلئوتیدی در آن به ندرت رخ می‌دهد (25). در مقایسه توالی جدایه‌هایTYLCV علف‌های هرز مورد مطالعه با جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن مورد استفاده در این تحقیق (جدول 3) مشخص شد که، نزدیک‌ترین جدایه به لحاظ شباهت ژنتیکی در سطح نوکلوتیدی به جدایه علف‌هرز ارزق اورشلیمی، جدایه گوجه فرنگی از کشور هند با رس شمار (HM448447)، به میزان

98/36 درصد بود. نزدیک‌ترین جدایه به لحاظ شباهت ژنتیکی در سطح نوکلئوتیدی به جدایه علف هرز آفتاب پرست، جدایه خیار از اسپانیا با رس شمار (EU143745)، به میزان 99/98 درصد بود. نزدیک‌ترین جدایه به لحاظ شباهت ژنتیکی در سطح نوکلئوتیدی به جدایه علف هرز پنیرک جدایه کدو از اردن با رس شمار (EU143754) به میزان 99/59 درصد و نزدیک‌ترین جدایه به لحاظ شباهت ژنتیکی در سطح نوکلئوتیدی به جدایه علف هرز سلمه تره، جدایه گوجه فرنگی از عمان با رس شمار (JN604484) به میزان 98/36 درصد بود. جهت تایید نتایج حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی، درخت فیلوژنتیکی توالی ژنCP جدایه های مورد مطالعه با سایر توالی های موجود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم افزار MEGA5 ترسیم شد (شکل 8). درخت فیلوژنیکی ترسیم شده نتایج به‌دست آمده از ماتریس فواصل ژنتیکی را تایید کرد. نمودار ماتریس تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب در جدول 4 و 5 آورده شده است.

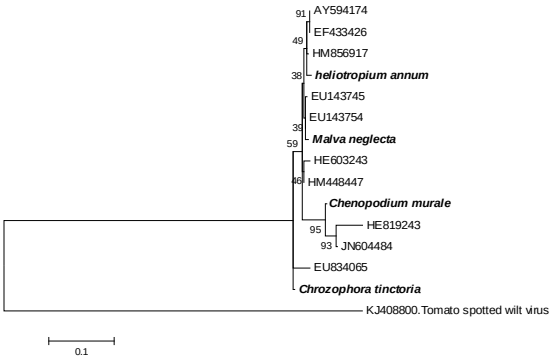
جدول 3- جدایه های ویروسی انتخاب شده که از بانک ژن GenBank توالی آنها بازیابی گردیده؛ نام هر جدایه، شماره دسترسی(رس شمار)، میزبان و محل جمع آوری.

Table 3-Details of isolates obtained from GenBank; code of isolates, accession numbers, host plant species and location

ایزوله Isolate	رس شمار در بانک ژن accession numbers	میزبان Host	کشور Country
TYLCV-mild	EU143754	کدو *Cucurbitae pepo*	اردن Jordan
TYLCV-mild(sp)	EU143745	خیار *Cucumis sativus*	اسپانیا Spain
Ch16	EU834065	ارزق اورشلیمی *Chrozophora hierosolymitana*	ایران Iran
Israel	HE603243	گوجه فرنگی *Lycopersicum esculentom*	فرانسه French
BidBid	HE819243	گوجه فرنگی *Lycopersicum esculentom*	عمان Jordan
Mauritius	HM448447	گوجه فرنگی *Lycopersicum esculentom*	هندوستان India
Jangheung 44	HM856917	گوجه فرنگی *Lycopersicum esculentom*	کره جنوبی South Korea
Jordan	EF433426	خیار *Cucumis sativus*	اردن Jordan
Egypt	AY594174		مصر Egypt
KW1	JN604484	گوجه فرنگی *Lycopersicum esculentom*	عمان Jordan

بحث

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی مهم‌ترین بگوموویروس خسارت زا در کشت‌های گوجه فرنگی می‌باشد که آلودگی ناشی از آن در مزارع جنوب و جنوب شرق ایران معمولاً بسیار گسترده است (3). به دلیل آب و هوای نیمه گرمسیری در این مناطق که برای فعالیت و تکثیر ناقل یعنی سفید بالک ضروری است، این ویروس باعث ایجاد خسارت زیادی در این مناطق شده است (34).



شکل 8- درخت روابط فیلوژنتیکی براساس توالی بخشی از ژن پروتئین پوششی و بخشی از ناحیه بین ژنی جدایه های TYLCV مورد مطالعه به همراه جدایه های ویروس از ایران و سایر مناطق موجود در بانک جهانی ژن (جدول 3) که بر اساس روش *Maximum likelihood* ترسیم گردید (رفرنس). مقادیر درصدی حمایت با Bootstrap 1000 تکرار در هر گروه نشان داده شده است. خط مقیاس تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی هر جایگاه را نشان می دهد. جدایه های *TYLCV* مورد مطالعه با نام میزبان جداشده و پررنگ نشان داده شده است. ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی tomato spotted wilt virus به عنوان *outgroup* در نظر گرفته شده است.

Figure 8- Phylogenetic tree of portion of coat protein gene and portion of intergenic region (IR) studied isolates plus the selected isolates of TYLCV from Iran and other parts of the world (Table 3) was inferred by using the Maximum likelihood method (Tamura *et al.*, 2011). The tree is midpoint rooted to enable easier interpretation, and the percentage values of the bootstrap support (1000 iterations) are indicated at each major node. The bar shows the number of substitutions per site. The tree was rooted with the CP nucleotide sequences of *Tomato spotted wilt virus* as an out-group species.

جدول 4- ماتریس فواصل ژنتیکی توالی بخشی از ژن پروتئین پوششی و بخشی از ناحیه بین ژنی جدایه های ایرانی *TYLCV* مورد مطالعه و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن

Table 4- Matris of genetic distance of nucleotide sequences of portion of coat protein gene and portion of intergenic region(IR) Tomato yellow leaf curl *virus* isolates from 4 different and comparison to the related sequences inGenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
AY594174	1		0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.03	0.03	0.09	0.04
EF433426	2	100.00		0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.03	0.05	0.06	0.04
HM856917	3	99.39	99.39		0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.04	0.06	0.04
helintropium annum	4	98.77	98.77	98.98		0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.05	0.05	0.04
EU143745	5	98.57	98.57	98.77	98.98		0.00	0.02	0.01	0.01	0.02	0.04	0.06	0.04
EU143754	6	98.77	98.77	98.98	99.18	99.69		0.01	0.01	0.00	0.02	0.04	0.05	0.04
HE603243	7	97.75	97.75	97.95	97.75	98.36	98.57		0.01	0.01	0.02	0.04	0.06	0.04
HM448447	8	98.57	98.57	98.77	98.57	99.18	99.39	99.18		0.01	0.02	0.04	0.05	0.03
Malva neglecta	9	98.36	98.36	98.57	98.77	99.39	99.59	98.57	99.39		0.02	0.05	0.06	0.04
Chrozophora tinctoria	10	97.34	97.34	97.95	97.75	97.95	98.16	97.95	98.36	97.75		0.03	0.06	0.04
EU834065	11	95.08	95.08	95.70	95.08	95.70	95.90	95.70	96.11	95.49	97.34		0.09	0.07
JN604484	12	94.26	94.26	94.26	94.88	94.67	94.88	94.47	95.08	94.47	94.26	91.80		0.02
Chenopodium murale	13	95.90	95.90	95.90	96.52	96.31	96.52	96.11	96.72	96.11	95.90	93.24	98.36	

جدول 5- ماتریس فواصل ژنتیکی توالی بخشی از پروتئین پوششی و بخشی از پروتئین ناحیه بین ژنی جدایه های ایرانی TYLCV مورد مطالعه و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن

Table 5- Matris of genetic distance of protein sequences of portion of coat protein gene and portion of intergenic region(IR) Tomato yellow leaf curl *virus* isolates from 4 different and comparison to the related sequences inGenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
EU143745	1		0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.09	0.13	0.09
EU143754.squash	2	99.38		0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.07	0.12	0.07
HM448447	3	98.77	99.38		0.01	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.08	0.13	0.08
Malva neglecta	4	98.15	98.77	99.38		0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.08	0.13	0.08
HE603243	5	98.15	98.77	98.77	98.15		0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.08	0.13	0.08
heliotropium annum	6	97.53	98.15	97.53	96.91	96.91		0.03	0.03	0.03	0.04	0.06	0.11	0.09
AY594174	7	97.53	98.15	97.53	96.91	96.91	97.53		0.00	0.01	0.05	0.08	0.13	0.09
EF433426	8	97.53	98.15	97.53	96.91	96.91	97.53	100.00		0.01	0.05	0.08	0.13	0.09
HM856917	9	97.53	98.15	97.53	96.91	96.91	97.53	98.77	98.77		0.04	0.09	0.14	0.08
Chrozophora tinctoria	10	96.30	96.91	96.30	95.68	95.68	96.30	95.06	95.06	96.30		0.09	0.13	0.05
chenopodium murale	11	92.59	93.21	92.59	91.98	92.59	93.83	91.98	91.98	91.36	91.36		0.04	0.15
JN604484	12	88.27	88.89	88.27	87.65	88.27	89.51	87.65	87.65	87.04	87.65	95.68		0.18
EU834065	13	92.59	93.21	92.59	91.98	91.98	91.36	91.36	91.36	92.59	95.06	86.42	83.33	

تغییرات ژنتیکی در سطح بسیار بالا در جمعیت بگوموویروس‌هایی که میزبان‌های هرز مختلف را آلوده می‌کنند گزارش شده است (28، 35 و 38). و بر عکس به نظر می‌رسد در جمعیت‌های بگوموویروس‌های آلوده کننده محصولات کشت شده، تغییرات ژنتیکی در سطح پائین اتفاق می‌افتد (11، 16 و 28). ساختار ژنتیکی جمعیت‌های بگوموویروس‌ها به‌وسیله جهش، نوترکیبی و اثر متقابل سازگاری به گونه میزبان و بیوتیپ ناقل تعیین می‌شود و با جغرافیای میزبان، ناقل و سایر بگوموویروس‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرد (28 و 35). میزبان‌های هرز از خانواده‌های مختلف گیاهی می‌توانند تنوع بالایی را در بگوموویروس‌ها ایجاد کنند (6، 14، 41 و 43). و به عنوان میزبان نگهدارنده می‌توانند نقش مهمی در اپیدمیولوژی و بقاء آن‌ها در زمانی که میزبان اصلی حضور ندارد ایفا کنند (1 و 41). در این موارد سفید بالک‌ها بگوموویروس‌ها را بین میزبان‌های هرز و اصلی منتقل می‌کنند و در تکامل ویروس‌ها و همه گیری بیماری نقش دارند (1 و 34). علاوه بر این آلودگی مخلوط توسط بگوموویروس‌های مختلف در میزبان‌های هرز شایع می‌باشد (1 و 15) که نوترکیبی بین بگوموویروس‌های دورتر از هم را تسهیل می‌بخشد. نوترکیبی یک مکانیزم تکاملی با اهمیت در بگوموویروس‌ها می‌باشد (28) و این امر تغییر پذیری ژنتیکی بسیار بالایی را در جمعیت‌های بگوموویروسی آلوده کننده میزبان‌های هرز ایجاد می‌کند (28). تشخیص علف‌های هرز نگهدارنده ویروس از مهم‌ترین روش‌های مدیریتی ویروس‌های گیاهی می‌باشد (33). یکی از علف‌های هرزی که در این تحقیق آلوده به TYLCV تشخیص داده شد ارزق یا گوش بره *Chrozophora tinctoria* از خانواده Euphoriaceae می‌باشد که از مزارع گوجه فرنگی جدا شد و در مطالعات دیگری در استان کرمان با استفاده از آزمون PCR گونه‌های دیگری از این جنس به‌عنوان میزبان ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی *(Tomato leaf curl palampur virus,* ToLCOMV) و ویروس کوتولگی سبزرد هندوانه *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) معرفی شده بود و بیانگر اهمیت این گیاه، در گسترش بگوموویروس‌ها می‌باشد (9). نتایج حاصل از رسم ماتریس فاصله ژنتیکی و درخت فیلوژنتیکی نشان داد که توالی ژن پروتئین پوششی TYLCV جداشده از علف هرز ارزق اورشلیمی در این مطالعه بیشترین شباهت را در سطح نوکلئوتیدی با ویروس جدا شده از گوجه فرنگی در بانک جهانی ژن با رس شمار HM448447 از کشور هند به میزان 98/36 درصد دارد. علف هرز دیگر معرفی شده در این تحقیق آفتاب پرست از خانواده Boraginaceae می‌باشد که از مزرعه خیار جدا شده بود. این گیاه علف هرز یکساله تابستانه و رایج در کشت‌های منطقه مورد بررسی بوده، در مزرعه علائم زردی در پهنک برگ را نشان می‌دهد، قبلاً نیز گونه دیگری از آن به‌عنوان میزبان ویروس WmCSV در این منطقه معرفی شده است (9). بیشترین شباهت ژنتیکی این جدایه با توالی ویروس TYLCV جداشده از خیار در بانک جهانی ژن با رس شمار EU143745 از کشور اسپانیا به میزان 98/98 می‌باشد. علف هرز سلمه تره از خانواده Chenopodiaceae علف هرز دیگری است که در این تحقیق از مزرعه گوجه فرنگی جدا شده، آلودگی آن به TYLCV به اثبات رسید. سلمه تره گیاه یکساله با ساقه ایستا و انشعابات فراوان می‌باشد و علف هرز معمول در مزارع کدوئیان و گوجه فرنگی می‌باشد و نمونه های آلوده هیچ گونه علائم ویروسی نشان نمی دادند و در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داده شد که این جدایه با جدایه‌های گوجه فرنگی موجود در بانک جهانی ژن، در یک شاخه در درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی قرار می‌گیرد. پنیرک علف هرز دیگری است که از مزارع کدو جمع‌آوری شد و آلودگی آن در این بررسی به TYLCV به اثبات رسید. این علف هرز گیاهی پهن برگ از خانواده Malvaceae می‌باشد و علائم زردی ویروسی در آن آشکار بود. نتایج بررسی فیلوژنتیکی نشان داد

که این جدایه بیشترین شباهت ژنتیکی را با جدایه کدو و خیار دارد و در درخت فیلوژنتیکی با این جدایه‌ها در یک گروه قرار گرفت. در بررسی‌های دیگری که قبلاً در ایران صورت گرفته است علف‌های هرز ارزق اورشلیمی از خانواده Euphorbiaceae، تاتوره از خانواده Solanaceae، فتق کرک آلود *Herniaria* sp. از خانواده Caryophyllaceae وآفتاب پرست از خانواده Boraginaceae به عنوان میزبان‌های این ویروس معرفی شدند (9 و 13) علاوه بر علف‌های هرز شناسایی شده در ایران، آلودگی علف های هرز در کشورهای دیگر نیز به اثبات رسیده است. در جنوب فلوریدا آلودگی علف‌های هرز آکالیفا، شیرتیغی، تاج خروس و تاجریزی به TYLCV توسط آزمون PCR مثبت ارزیابی شد (33). در اسپانیا علف هرز تاجریزی به‌عنوان میزبان این ویروس معرفی شد (2). نقش و اهمیت علف‌های هرز در اکولوژی ویروس‌ها، بسته به نوع ویروس‌ها، نوع محصول و موقعیت منطقه متغیر می‌باشد و علف‌های هرز میزبان به عنوان منبع نگهدارنده ویروس‌ها نقش مهمی در اپیدمیولوژی دارند (33). اگر چه اغلب علف‌های هرز آلوده فاقد علائم می‌باشند و عدم وجود علائم ویروسی بعد از آلودگی قبلاً برای تعداد زیادی از ویروس‌ها شامل بگوموویروس‌ها گزارش شده است (32). اما در این بررسی علائمی که با آلودگی توسط TYLCV ارتباط دارند نظیر زردی، پیچیدگی و کلروز در برخی گونه‌های متعلق به جنس پنیرک و آفتاب پرست مشاهده شد. با وجودی که تعداد زیادی نمونه علف‌هرز از مزارع جنوب استان کرمان جمع‌آوری شد، اما تعداد معدودی آلوده به این ویروس بودند دلیل این امر شاید این باشد که گونه‌های گیاهی وحشی به علت این‌که تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به گونه‌های زراعی دارند اساساً کمتر مستعد هجوم بیماری می‌باشند (32). علاوه بر این تغییر در جمعیت ناقل و ترجیح میزبانی آن‌ها وقوع بیماری در علف‌های هرز اطراف مزارع را تحت تاثیر قرار می‌دهد و از طرف دیگر شدت علائم ویروسی می تواند تا حدودی به مرحله‌ای از رشد گیاه که به ویروس آلوده شده است وابسته باشد (32). علف‌های هرز و میزبان‌های گیاهی خودرو با منشا بومی و وارداتی می‌توانند توسط تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی از جمله بگوموویروس‌ها آلوده شوند و به عنوان مخازن ویروس، کانون‌های اولیه برای آلودگی گیاهان زراعی به شمار روند و نقش محوری در ظهور نژادهای ویروسی جدید ایفا نمایند (35). در ایران بر اساس مطالعات انجام شده روی توالی ژنوم کامل واریانت‌های نژاد ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی مشخص شد که این واریانت‌ها در یک گروه مونوفیلتیک قرار می‌گیرند و مسیر حرکت از جنوب به شمال شرق برای آن‌ها متصور شدند (24). به نظر می‌رسد ظهور واریانت‌های جدید از نژادهای این ویروس ناشی از انتشار طبیعی جمعیت‌های آلوده به ویروس از حشرات ناقل، سفید بالک ها، یا از طریق انتقال مواد گیاهی آلوده به ویروس از مناطق جنوبی به مناطق شمال شرقی باشد. در طول چندین سال گذشته کشاورزان از روش‌های مدیریتی مانند دوره‌های عاری از میزبان در طول تابستان، استفاده از حشره‌کش و استفاده از توری‌های ضد حشره‌ای استفاده کرده اند، اما هم‌چنان آلودگی به این بیماری در سطح بالایی قرار دارد. تحقیقات ما نشان می‌دهد که این بیماری هم اکنون نیز در استان همه گیر می‌باشد و از لحاظ اقتصادی خسارت بالایی وارد می‌کند و پیدا کردن یک روش مدیریت کار آمد برای آن بسیار با اهمیت می‌باشد. از سوی دیگر چون علف‌های هرز به عنوان میزبان واسط و زمستان گذران وسیله بقا ویروس در غیاب میزبان اصلی را فراهم می‌کنند، اما به دلیل دارا بودن مواد بازدارنده و تنوع ژنتیکی بالا علائم آلودگی را کمتر نشان می‌دهند و به دنبال آن شناسایی گونه‌های آلوده در مزرعه مشکل می‌باشد (1). در صورتی‌که شناسایی این علف‌های هرز و کنترل آن‌ها نقش به سزایی در مدیریت بیماری دارد. به طور کلی وقوع نسبتا زیاد این ویروس در علف‌های هرز همراه با تراکم بالای جمعیت مگس‌های سفید در سراسر سال، راهکار جدید مدیریتی را می‌طلبد که در آن تاکید بر استفاده از ارقام مقاوم و متحمل، حذف منابع وحشی نگهدارنده و کنترل بیشتر ناقلین باشد.

منابع

1- Alabi O., Ogbe F., Bandyopadhyay R., Lava Kumar P., and Dixon A. *et al*. 2008. Alternate hosts of *African cassava mosaic virus* and *East African cassava mosaic Cameroon virus* in Nigeria. Archive of Virology, 153:1743–1747.

2- Bedford I.D., Kelly A., Banks G.K., Briddon R.W., Cenis J.L., and Markham P.G. 1998. *Solanum nigrum*: an indigenous weed reservoir for a *Tomato yellow leaf curl geminivirus* in southern Spain March. European Journal of Plant Pathology, 104(2): 221-222.

3- Briddon R.W., Bull S.E., Amin I., Idris A. M., Mansoor Sh., Belford I. D., and Dhawan P. 2003. Diversity of DNA, a satellite molecular associated with some monopartite *begomovirus*. Virology Journal 53:763-781.

4- Brown J.K., Fauquet C.M., Briddon R.W., Zerbini M., and Moriones E. 2011. Geminiviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, Waltham, San Diego: Associated Press, Elsevier Inc. 351–373.

5- Brown J. K., Fauquet C. M., Briddon R. W., Zerbini F. M., Moriones E., and Navas-Castillo J. 2012. Family Geminiviridae. In Virus Taxonomy 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 351–373.

6- Castillo-Urquiza G. P., Beserra J. E. A., Jr, Bruckner F. P., Lima A. T. M., Varsani A., Alfenas-Zerbini P., and

Murilo Zerbini F. 2008. Six novel *begomoviruses* infecting tomato and associated weeds in southeastern Brazil. Archive of Virology 153:1985–1989.

7-Czonsek H. 2007. *Tomato yellow leaf curl virus* management. Molecular Biology, Breeding for resistance. Spring 2007 chapter 3: 263-278.

8- Doyle J.J., and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissuse. Phytochemistry Bulletin, 19: 11-15.

9- Esmaili M., and Heydarnejad J. 2013. Identification of Wild Hosts of *Watermelon Chlorotic Stunt Virus* in South and Southeastern Iran. Journal of Agriculture Biotechnology, 13:2-18.

10- Fanigliulo A., Pacella R., Comes S., and Crescenzi A. 2007. Three years survey of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* reservoir weed hosts in southern Italy. Commun Agriculture Applied Biological Science, 72(4): 1023-1028.

11-Faria J. C., and Maxwell D. P. 1999. Variability in *geminivirus* isolates associated with Phaseolus spp. in Brazil. Phytopathology, 89: 262–268.

12- Fauquet C.M., Briddon R.W., Brown J.K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M., and Zhou X., 2008. *Geminivirus* strain demarcation and nomenclature. Archive of Virology, 153: 783-821.

13- Fazeli R, Heydarnejad J, Massumi H., and Shaabanian M. 2009. Genetic diversity and distribution of tomato-infecting *begomoviruses* in Iran. Virus Genes, 38: 311-319.

14- Fiallo-Olive´ E., Navas-Castillo J., Moriones E., and Martı´nez-Zubiaur Y. 2012. *Begomoviruses* infecting weeds in Cuba: increased host range and a novel virus infecting Sida rhombifolia. Archive of Virology, 157: 141–146.

15- Garcı´a-Andre´ S.S., Monci F., Navas-Castillo J., and Moriones E. 2006. *Begomovirus* genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of
recombinant nature. Virology Journal, 350: 433–442.

16- Gonza´ lez-Aguilera J., Tavares S.S., Sobrinho R.R., Xavier C.A.D., Duen˜as-Hurtado F., Lara-Rodrigues R.M., Silva D.J.H., and Zerbini F.M. 2012. Genetic structure of a Brazilian population of the *begomovirus* Tomato severe rugose virus (ToSRV). Tropical Plant Pathology, 37: 346–353.

17- Gronenborn B. 2007. The *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* genome and function of its proteins,
In: H. Czosnek, Ed., *Tomato yellow leaf curl virus* disease: management, molecular biology,
breeding for resistance, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 67-84.

37- Rojas M.R., Noueiry A.O., and Lucase W.J. 1998. *Bean dwarf mosaic geminivirus* movment protein recognize DNA in a form-and size-specific manner. Cellular, 95: 105-113.

38- Silva SJC, Castillo-Urquiza GP, Hora-Júnior BT, Assunção IP, Lima GSA, Pio-Ribeiro G,Mizubuti ESG., and Zerbini FM . 2012. Species diversity, phylogeny and genetic variability of *begomovirus* populations infecting leguminous weeds in ortheastern Brazi. Plant Pathology, 61: 457-467.

39- Stanley J., Bisaro D.M., and Briddon R.W. 2005. Family *Geminiviridae*. In:Fauquet C.M., Mayo M.A.Virus Taxonomy, eight report of international committe on taxonomy of viruses. 301-326.

40- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.

41- Tavares S. S., Ramos-Sobrinho R., Gonzalez-Aguilera J., Lima G. S. A., Assunc a˜ o, I. P., and Zerbini F. M. 2012. Further molecular characterization of weed-associated *begomoviruses* in Brazil with an emphasis on Sida spp. Planta Daninha, 30: 305–315.

42- Varsani A., Navas-Castillo J., Moriones E., Herna´ndez-Zepeda C.,Idris A., Brown J. K., Zerbini F. M., and Martin D. P. 2014. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae:*Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. Archives of Virology, 159: 2193-2203.

43- Wyant P. S., Gotthardt D., Scha fer B., Krenz B., and Jeske H. 2011. The genomes of four novel *begomoviruses* and a new Sida micrantha mosaic virus strain from Bolivian weeds. Archives of Virology, 156: 347–352.

44-Ying Z. T., and Davis M. J. 2000. Partial characterization and host range of *Tomato yellow leaf curl* virus in South Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 113: 185-190.

45- 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: 45-50.