نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، ص. ۴۳۳-۴۲۷

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 4, Winter 2014, P. 427-433

شناسایی و تعیین ترادف ژن پروتئین پوششی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی در استانهای خراسان رضوی، شمالی و جنوبی

سارا قارونی کاردانی[1*] - بهروز جعفرپور [2]- محسن مهرور [3]- سعید طریقی [4]

تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۸/۲۲
تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۱۲/۷

چکیده

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (Tomato yellow leaf curl virus) یکی از مخرب‌ترین ویروس های گوجه‌فرنگی در نواحی گرمسیر و نیمه گرمسیر جهان محسوب می‌شود. به منظور شناسایی و ردیابی ویروس مذکور، در طی بازدید از مزارع، گلخانه‌ها و تونل‌های کاشت گوجه-فرنگی استانهای خراسان رضوی، شمالی و جنوبی طی سال های ۱۳۸۸ تا ۱۳۹۰، نمونه‌های مشکوک به آلودگی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. استخراج دی. ان. ای از برگهای تازه نمونه‌های مشکوک به آلودگی، با استفاده از بافر CTAB انجام شد. در آزمون PCR پس از بکاربردن جفت آغازگرهای دژنره اختصاصی DNA-A در جمینی ویروس های منتقل شونده با سفید بالک، قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۵۵۰ جفت باز تکثیر شد که نشان دهنده آلودگی به ویروس TYLCV در مناطق بررسی شده دارد. ژن کامل پروتئین پوششی ویروس با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده به اندازه تقریبی ۷۷۶ جفت باز تکثیر و همسانه سازی شد و دندروگرام با استفاده از ترادف ژن پوشش پروتئینی با نرم افزار MEGA5 و به روش Neighbor joining ترسیم گردید. نتایج حاصل از آنالیزهای فیلوژنی نشان داد که جدایه های خراسان رضوی و شمالی در کنار جدایه های اسرائیل (AB110218) و شیراز (GU076444) در یک گروه و جدایه خراسان جنوبی در گروه جداگانه ای قرار گرفته و رابطه نزدیکی را با جدایه های جیرفت (GU076452) و عمان (DQ644565) نشان داد. این نتایج نشان میدهد که از زمان اولین گزارش از وجود TYLCV در استانهای جنوبی کشور تاکنون، دامنه پراکنش این ویروس به سمت عرضهای جغرافیایی بالاتر کشیده شده به نحوی که وجود میزان بالای آلودگی از شهرستان نیشابور و درگز در این تحقیق گزارش می‌شود.

واژه های کلیدی: ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV)، واکنش زنجیره ای پلیمراز، آنالیز فیلوژنی، همسانه سازی

مقدمه

یکی از ویروسهای آلوده کننده گوجه فرنگی، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی[5] است که از جمله مخرب ترین ویروس‌های گوجه فرنگی در بسیاری از نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان محسوب می‌شود، خسارت این ویروس از ۵۵ تا ۱۰۰ درصد متغیر است (۲۱).

مجموعه ویروس های پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی در خانواده جمینی ویریده[6] و جنس بگوموویروس[7] طبقه بندی می‌شوند. بنابر نظر کمیته بین المللی ویروس ها، بر اساس تفاوت در ساختار ژنتیکی، دامنه میزبانی و نوع حشره ناقل، این خانواده به چهار جنس تقسیم شده است (۱۲).

ویروس یاد شده برای اولین بار از اسرائیل گزارش شد (۷). امروزه TYLCV انتشار جهانی داشته به طوریکه در بسیاری ازکشورهای خاورمیانه و کشورهای ایران، تایلند، هند، چین، ژاپن و کشورهای آمریکا، استرالیا، اروپای غربی، شمال آفریقا و جزایر کارائیب[8] وجود دارد (۸، ۹، ۱۰، ۱۷ و ۱۸).

TYLCV در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۷۵ از استانهای

۱، ۲، ۳، ۴- به ترتیب دانش آموخته دکتری، استاد و استادیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: saragharooni@yahoo.com)

5- Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV

6- Geminiviridae
7- Begomovirus
8- Caribbean Islands

جنوبی کشور شامل سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، بوشهر و خوزستان گزارش شد (۱۵). به دنبال آن ویروس یاد شده از استانهای خراسان، اصفهان (دهند)، مرکزی (دلیجان)، گلستان (گرگان و آق قلا) (۱) و تهران (ورامین) (۲۳) نیز گزارش شد.

ژنوم ویروس های مولد پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی یک بخشی یا دوبخشی است. بگموویروسهای ایجاد کننده بیماری پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی به ۴۲ گونه و ۱۷۸ استرین تعلق دارند (۱۳). بگموویروس های یک بخشی دارای شش ORF هستند که دوتای آن روی رشته ویروسی (V1 و V2) چهارتای آن روی رشته مکمل (C1 تا C4) می باشند، به طوری که ORF های C1، C2 و C3 با هم نسبتا همپوشانی دارند و C4 به طور کامل توسط C1پوشیده می‌شود. بگموویروس‌های یک بخشی فاقد دو ژن قسمت B می‌باشند (۱۹).

ویروسهای ایجاد کننده پیچیدگی برگ گوجه فرنگی مانند سایر بگموویروسها توسط سفید بالک توتون (*Bemisia tabaci*) به صورت پایا و گردشی منتقل می شوند (۳ و ۱۶). در سالهای اخیر گسترش این ویروسها با گسترش جهانی بیوتیپ B حشره همراه بوده است. این بیوتیپ نسبت به بیوتیپهای دیگر، قدرت باروری و زاد و ولد بیشتری دارد. همچنین دامنه میزبانی وسیع تر و رفتار تغذیه ای آن با تهاجم بیشتری همراه است (۵ و ۹).

تاکنون توالی کامل جدایه های TYLCV از نقاط مختلف کشور با نام TYLCV-Ir (۲)، TLCV-Ir (۴)، TYLCV-Kahnooj (۱۴) و TYLCV-Abadeh (۲۰) گزارش شده است. با توجه به اینکه TYLCV در سالهای اخیر به سمت عرضهای جغرافیایی بالاتر گسترش یافته است، نیاز به بررسی پراکنش و رابطه فیلوژنیک این ویروس در این مناطق می‌باشد.

مواد و روش ها

طی بازدید از مزارع، گلخانه ها و تونل های کاشت گوجه فرنگی در استان خراسان رضوی، شمالی و جنوبی در سال های ۱۳۸۸-۱۳۹۰، نمونه برداری از نمونه های گیاهی مشکوک به آلودگی TYLCV انجام شد (جدول ۱). نمونه ها بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند و تا زمان آزمایش در دمای۴°C و در طولانی مدت در دمای۲۰ °C- و یا به صورت خشک شده نگهداری شدند.

تشخیص TYLCV با استفاده از آزمون زنجیره ای پلیمراز

آلودگی یا عدم آلودگی کلیه نمونه ها با استفاده از آزمون زنجیره‌ای پلی مراز [1]تعیین گردید. برای انجام این آزمون ابتدا دی. ان. ای گیاه استخراج و به عنوان دی. ان. ای الگو مورد استفاده قرار گرفت. استخراج دی. ان. ای به روش ژانگ و همکاران (۲۴) با استفاده از بافر CTAB[2] با اندکی تغییرات انجام شد.

جدول۱- پراکنش ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی در نقاط مختلف استانهای خراسان رضوی، شمالی و جنوبی طی سال های ۱۳۸۸-۹۰

مناطق آلوده	تعداد نمونه ها	تعداد نمونه های آلوده
مشهد	۳۸	۰
نیشابور	۴۰	۱۹
فدیشه	۲۰	۱۲
فریمان	۲۰	۰
سبزوار	۲۰	۵
چناران	۴۴	۰
کلات	۱۸	۲
تربت جام	۲۵	۰
درگز	۵۰	۳۸
بجنورد	۲۲	۶
بیرجند	۲۵	۷

برای تشخیص TYLCV در آزمون PCR، از یک جفت آغازگر دژنره PCRv181 و Bc (جدول ۲) اختصاصی DNA-A ، جمینی ویروس های قابل انتقال با سفید بالک استفاده شد. قسمت تکثیر شده شامل قسمت آخر ناحیه بین ژنی[3] و حدود ۲۰۰ جفت باز از ناحیه '5 ژن پروتئین پوششی می باشد (۱۱ و ۲۲). شرایط و مواد تشکیل دهنده واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و به شرح زیر بود:

۱/۵ میکرولیتر دی.ان.ای قالب (الگو)، ۱۰ پیکومول[4] از هر یک از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۱/۲۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ میلی مولار)، ۰/۲۵ میکرلیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (جنت بایو[5]،کره) با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر.

پروفایل دمایی واکنش شامل ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه بعنوان واسرشته سازی آغازین و بدنبال آن، ۳۵ چرخه شامل۹۴ °C به مدت ۵۰ ثانیه، ۵۶ °C به مدت ۱ دقیقه ، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه انتهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C بعنوان تکمیل پلیمریزاسیون بود.

1- Polymerase chain reaction, PCR

2- Cetyltrimethyl ammonium bromide
3- Intergenic region
4- pmol
5- Genet bio

جدول۲- آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	اندازه	ترادف (3́-5́)
PCRv 181	۱۸	TAATATTACCGGWTGGCC
Primer Bc	۲۳	TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA

بازهای نامشخص که با حروف دیگری غیر از A، T، C وG در ترادف آغازگر قرار دارند به صورت زیرهستند:
.Y= C/T, W=A/T, R= A/G, K= G/T, B= C/G

جدول ۳- حروف اختصاری و شماره دسترسی جدایه ها یا ویروس های مورد استفاده در آنالیزهای فیلوژنتیکی انجام شده در تحقیق حاضر

نام جدایه	رس شمار	نام مخفف
Tomato yellow leaf curl virus-[Jiroft:Iran]	GU076452	TYLCV-Jr
Tomato yellow leaf curl virus-[Shiraz:Iran]	GU076447	TYLCV-Sh
Tomato yellow leaf curl virus-[Shiraz:Iran]	GU076444	TYLCV-Sh2
Tomato yellow leaf curl virus - Israel	AB110218	TYLCV-Is
Tomato yellow leaf curl virus [Abadeh-Iran]	FJ355946	TYLCV-Ab
Tomato yellow leaf curl virus-Iran	AJ132711	TYLCV-Ir
Tomato leaf curl Iran virus	AY297924	TLCV-Ir
Tomato yellow leaf curl virus isolate Al-Batinah	DQ644565	TYLCV-Alb
Maize streak virus	HQ693474	MSV

محصول پی سی آر، در ژل آگارز ۱/۲ درصد در حضور نشانگر (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, Fermentase) الکتروفورز شد و نتایج با دستگاه Gel documentation مشاهده گردید.

همسانه سازی و تعیین ترادف

به کمک کیت استخراج از ژل شرکت کیاژن[1] طبق دستورالعمل شرکت سازنده، قطعات تکثیر شده، از ژل استخراج و همسانه سازی با استفاده از کیت شرکت فرمنتاس[2] انجام شد.

سپس نمونه های همسانه سازی شده تعیین ترادف شدند. بدین منظور با کیت استخراج شده و به کمپانی ماکروژن، کشورکره جنوبی ارسال شد و با دستگاه Automatic Sequencer 3730XL تعیین ترادف شدند. نتایج حاصل از تعیین ترادف با استفاده ازنرم افزار BioEdit مورد بررسی قرارگرفتند. پس از اخذ توالی، از هر دو خوانش رفت و برگشت مربوط به هر قطعه، توالی نهایی با برنامه BLAST[3] در پایگاه اطلاعاتی NCBI بررسی شد. آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس ژن CP پس از هم ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های TYLCV با برخی از جدایه های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega5 نسخه β و به روش Neighbor joining، با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شد. سپس با استفاده از نرم افزار DNAMAN درصد شباهت در سطح نوکلئوتیدی به همراه ماتریس فاصله تعیین گردید.

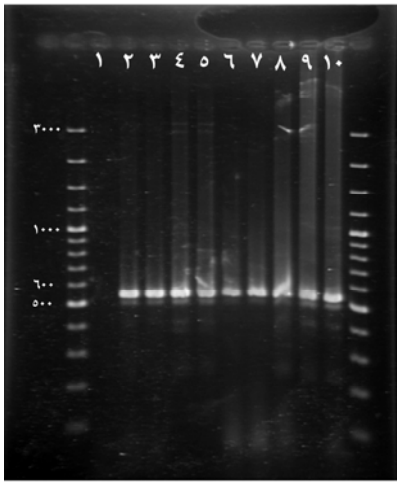
نتایج و بحث

مشاهدات مزرعه‌ای طی سال های ۹۰-۸۸ نشان داد که ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی یکی از عوامل خسارت‌زای محصول گوجه‌فرنگی در مزارع، گلخانه‌ها و تونل‌های کاشت گوجه فرنگی در استانهای خراسان رضوی، شمالی و جنوبی می‌باشد. در گوجه فرنگی های آلوده علائم به صورت کوتولگی، کوچک شدن سطح برگ، زردی، پیچیدگی حاشیه های برگ به سمت داخل، چروکیدگی، تاولی شدن و بدشکلی برگ ها مشاهده شد (شکل۱). در نمونه‌های گوجه فرنگی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف و حتی در یک مزرعه مشخص و در یک رقم واحد گوجه فرنگی، تنوع علائم قابل توجهی در نمونه‌های آلوده به TYLCV دیده شد (شکل ۱). این تنوع علائم با گزارشهای قبلی (۱۵) مشابهت داشت. تنوع مشاهده شده می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع ارقام کشت شده، تفاوت در سن آلودگی و همچنین تفاوت در جدایه‌های آلوده کننده باشد.

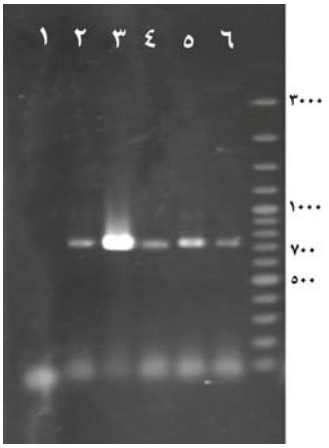
نتایج حاصل از آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره PCRv181 و Bc، آلودگی نمونه های گوجه فرنگی، را به TYLCV تایید کرد. باندهای حاصل در همان موقعیت قابل انتظار (حدودا ۵۵۰bp) تشکیل گردید و در شاهد منفی این باند مشاهده نشد (شکل ۲). قسمت تکثیر شده شامل قسمت آخر ناحیه بین ژنی و حدود ۲۰۰ جفت باز از ناحیه 5' ژن پروتئین پوششی است. سپس برای دسترسی به طول کامل ژن پروتئین پوششی در نمونه های آلوده از دو آغازگر دیگر، استفاده شد. دو آغازگر TYLCV-CP F و TYLCV-CP R قادر به تکثیر کامل ژن پروتئین پوششی در ژنوم TYLCV بودند.

1- QIAquick Gel Extraction Kit
2- Ins T/A Clone ™ PCR Cloning Kit ,Fermentas
3- Basic Local Alingment Search Tool

شکل ۱- علائم پیچیدگی،کوچک شدن و زردی حاشیه برگ های گوجه فرنگی در اثر ابتلاء به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV)



شکل ۲- نتیجه الکتروفورز قطعات تکثیر شده با آغازگرهای دژنره PCRv181 و Bc در محدوده ۵۵۰ bp بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، ستون ۱ شاهد منفی



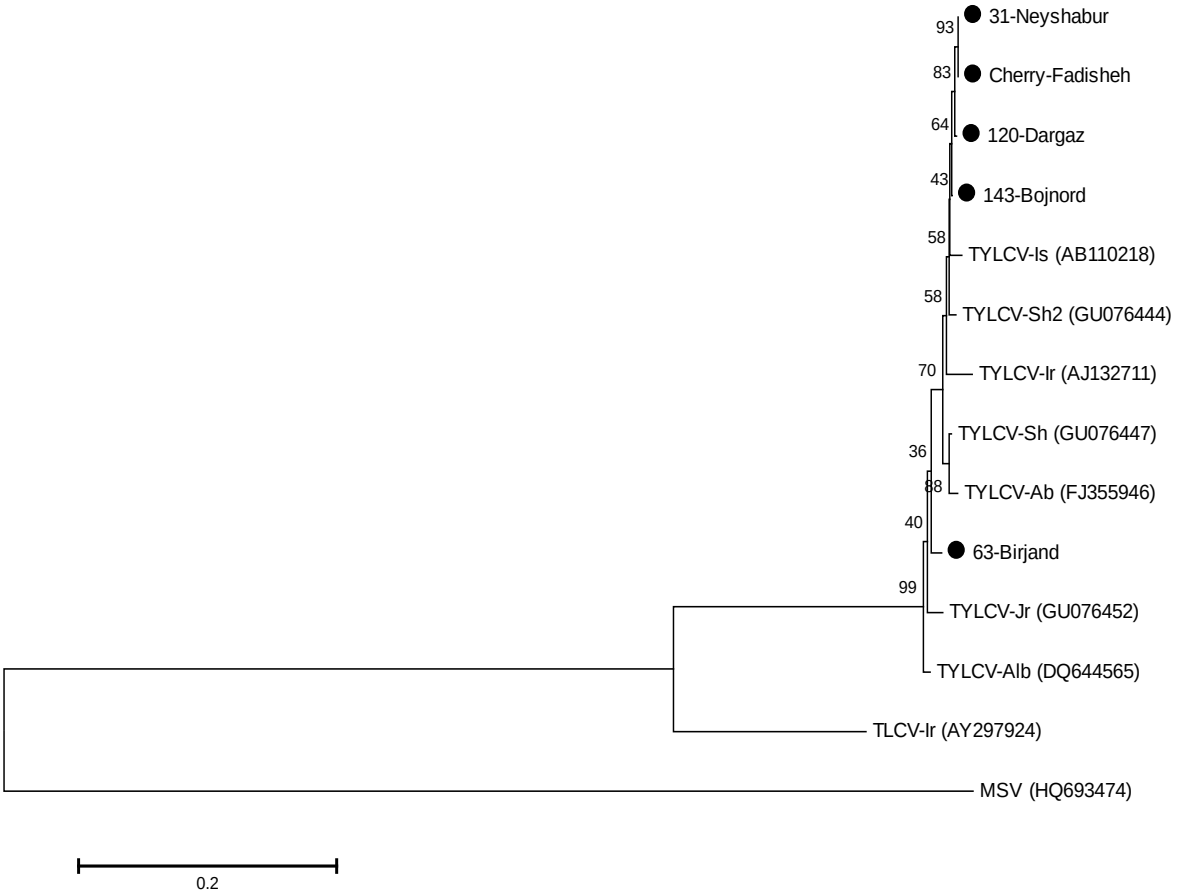
شکل ۳- نتیجه الکتروفورز قطعات تکثیر شده در محدوده ۷۷٦bp مربوط به ژنوم کامل پروتئین پوششی ویروس TYLCV، بر روی ژل آگارز ۱/۲٪، ستون ۱ شاهد منفی

الکتروفورزمحصول PCR با استفاده از این آغازگرها نیز منجر به تشکیل یک باند حدودا ۷۷۶ جفت بازی درون ژل گردید. در حالی که الکتروفورز محصول PCR با استفاده از دی. ان. ای استخراج شده ازگیاه سالم منجر به تشکیل چنین باندی درون ژل نشد (شکل۳).

در این بررسی شناسایی پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی با استفاده از روش PCR با موفقیت صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی قادر به شناسایی این ویروس در عصاره گیاه آلوده بوده و کاملا اختصاصی عمل کردند. بطوری که با وجود استخراج DNA کل از بافت گیاه، پرایمرهای مربوطه باعث تکثیر ترادف های مشابه در گیاه نشدند. عدم تکثیر هیچ قطعه‌ای در نمونه شاهد منفی، این مطلب را تایید می‌کند.

به منظور انتخاب پرگنه‌های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب، آزمایش PCR بر روی آن ها انجام گرفت. نتایج حاصل از آزمایش PCR روی تعدادی از پرگنه های سفید منجر به تشکیل باند مورد انتظار درون ژل آگارز ۱/۲ درصد گردید.

جهت تعیین رابطه خویشاوندی جدایه های TYLCV، سه ناحیه بسیار اختصاصی ژنوم ویروسی شامل IR ، CP و Rep مورد مقایسه قرار میگیرد (۹). به منظور تعیین رابطه خویشاوندی جدایه های TYLCV همچنین می توان از ژن CP، CP core و دویست نوکلئوتید انتهای ’5 ژن CP استفاده کرد. آنالیزهای فیلوژنتیکی براساس این سه ناحیه از CP بسیار مشابه هم می باشد، اما مقایسه بر اساس دویست نوکلئوتید انتهای ’5 ژن CP نژادها را بهتر تفکیک می‌کند (۶). در این تحقیق جهت رسم درخت فیلوژنتیکی از توالی کامل ژن CP استفاده شد.



شکل ٤- دندروگرام رسم شده با نرم افزار MEGA5 به روش Neighbour joining (Bt× 1000) با استفاده از ترادف ژن CP جدایه های TYLCV توالی یابی شده در تحقیق حاضر و بعضی از جدایه های موجود در بانک جهانی ژن. ترادف مربوط به MSV به عنوان outgroup انتخاب شده است. حروف اختصاری و شماره دسترسی مربوط به هر جدایه در جدول ۳ ذکر شده است. جدایه های توالی یابی شده در تحقیق حاضر با علامت ● مشخص شده اند.

مقایسه بین جدایه‌های خراسان رضوی و شمالی نشان داد که اختلاف زیادی در ناحیه مورد بررسی بین آنها وجود ندارد و میزان شباهت آنها از ۹۹/۵ تا ۱۰۰ درصد می باشد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده، نمونه های توالی یابی شده در دو گروه[1] قرار گرفتند (شکل ۴). گروه I که شامل جدایه های خراسان رضوی و خراسان شمالی بوده و در کنار جدایه های اسرائیل (AB110218)، شیراز (GU076444) و آباده (FJ355946) قرار گرفته و بیشترین شباهت را در سطح توالی نوکلئوتیدی با جدایه های شیراز و اسرائیل به ترتیب ۹۸/۶ و ۹۸/۳ درصد و کمترین شباهت را با جدایه ایرانشهر (AY297924) به میزان ۷۲/۴ درصد دارا می باشند. گروه II شامل جدایه خراسان جنوبی (63-Birjand) بوده که رابطه نزدیکی را با جدایه های جیرفت (GU076452) و عمان (DQ644565) نشان داد و بیشترین شباهت را در سطح توالی نوکلئوتیدی با دو جدایه فوق به ترتیب ۹۷/۸ و ۹۷/۹ درصد و کمترین شباهت را با جدایه ایرانشهر (AY297924) به میزان ۷۲/۹ درصد دارا می باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد امروزه TYLCV محدود به استانهای جنوبی کشور نبوده و به مناطق شمالی کشور نیز کشیده شده است، به نحوی که وجود درصد بالای آلودگی از شهرستان نیشابور و درگز در این تحقیق گزارش می‌شود. علاوه براین، ویروس فوق در ایران دارای تنوع ژنتیکی زیادی بوده و تعیین وجود نژادهای نوترکیب جدید در ایران مستلزم مطالعات بیشتر جدایه‌های ایرانی می‌باشد.

منابع

1- Bananej K., Ahoonmanesh A. and Shahraeen N. 1998. Occurrence and identification of *Tomato yellow leaf curl virus* from Khorasan province of Iran. Proc. the 13th Iranian Plant Protec. Karaj-Iran. p 193.

2- Bananej K., Kheyr-Pour A., Salekdeh G.H. and Ahoonmanesh A. 2004. Complete nucleotide sequence of Iranian *Tomato yellow leaf curl virus* isolate: further evidence for natural recombination amongst begomoviruses. Brief Report J. Arch. Virol. 149 (7), 1435-1443.

3- Bedford I.D., Briddon R.W., Brown J.K., Rosell R.C. and Markham P.G. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. Ann. Appl. Bio., 125: 311-325.

4- Behjatnia A., Izadpanah K., Dry I.B. and Rezaian A. 2004. Molecular characterization and taxonomic position of the Iranian isolate of *Tomato leaf curl virus*. Iranian J. Plant Pathol. 40: 77-94.

5- Behjatnia S.A.A., Gandomani O.E. and Rasoulpour R. 2009. Infectivity of the cloned genome, transmission and host range of an Iranian isolate of *tomato leaf curl geminivirus*. Iran. J. Plant Path. 45: 47-59 (In Farsi with English summery).

6- Brown J.K., Idris A.M., Torres-Jerez I., Banks G.K. and Wyatt S.D. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. Arch. Virol. 146: 1581–1598.

7- Cohen S. and Harpaz I. 1964. Periodic rather than continual acquisition of new tomato virus by its vector, the tobacco withefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). Entomol. Exp. Appl.7: 155-166.

8- Czosnek H. 1999. *Tomato yellow leaf curl virus*. CMI/ABB. Description of plant virus. No. 368. 12p.

9- Czosnek H. and Laterrot H. 1997. A worldwide survey of *tomato yellow leaf curl viruses*. Arch. Virol. 142: 1391-1406.

10- Czosnek H., Navot N. and Laterrot H. 1990. Geographical distribution of *tomato yellow leaf curl virus*. A first survey using a specific DNA probe. Phytopath. Medit. 29: 1-6.

11- 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 polymerase chain reaction with degenerate primers. Ann. Appl. Biol. 125: 327-336.

12- Fauquet C.M., Bisaro D.M., Briddon R.W., Brown J.K., Harrison B.D., Rybicki E.P., Stenger D.C. and Stanley J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. Arch. Virol., 148: 405-421.

13- Fauquet C.M., Briddon R.W., Brown J.K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M. and Zhou X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature Arch. Virol. 153: 783–821.

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

1- Cluster

15- Hajimorad M., Kheyr-pour A., Alavi V., Ahoonmanesh A., Bahar M., Rezaian M.A. and Gronenborn B. 1996. Identification of whitefly transmitted *tomato yallow leaf cur*l geminivirus from Iran and a survey of its distribution with molecular probes. Plant Path. 45: 418-425
16- Jones D.R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. Euro. J. Plant Pathol.109: 195–219.
17- Morris J., Harju V., Cambridge J., Boonham N. and Henry C. 2002. Virus transmission studies and diagnostic detection of four begomovirus isolates in selected crop hosts and in *Bemisia tabaci* biotype B. OEPP/EPPO, Bulletin. 32: 41-45.
18- Nakhla M.K., Maxwell D.P. 1998. Epidemiology and management of *tomato yellow leaf curl* disease. In: A. Hadid R., Khetarpal K. and Koganezawa H. (Eds), Plant Virus Disease Control. St Paul, MN, USA: APS Press, pp. 565-583.
19- Navot N., Pichersky E., Zeidan M., Zamir D. and Czosnek H. 1991. *Tomato yellow leaf curl virus*: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component.Virology, 185: 151-161.
20- Pakniat A., Behjatnia S.A.A., Kharazmi M., Shahabazi M. and Izadpanah K. 2010. Molecular characterization and construction of an infectious clone of a new strain of *tomato yellow leaf curl virus* in southern Iran. J. Plant Path. 46: 101-115.
21- Pico B., Jose Diaz M., and Nues F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the *tomato yellow leaf curl virus*- a review. Scientia Hort. 67: 151-196.
22- Rojas M.R., Gilbertson R.L., Russell D.R., and Maxwell D.P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction todetect whitefly-transmitted Geminiviruses. Plant Dis. 77: 340-347.
23- Shahriary D., and Bananej K. 1998. Occurrence of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in tomato fields of Varamin. J. Appl. Entomol. Phytopathol. 65: 29–30.
24- 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. Virology Method, 71: 45-50.