مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تعیین توالی ژنوم کامل و فیلوژنی جدایه‌های نژاد شدید ویروس پیچیدگی زرد برگ گوجه فرنگی جدا شده از تاتوره *Datura stramomum* L. در منطقه بجنورد، ایران

محمدرضا حسین زاده [1]، مسعود شمس بخش*[2]، شاهرخ کاظم پوراوصالو[3]

[1]دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

[2]دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

[3]دانشیار گروه علوم گیاهی دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: 1391/10/25، تاریخ پذیرش: 1392/02/01

چکیده

ویروس پیچیدگی زرد برگ گوجه فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus* , TYLCV) به همراه ده گونه ویروسی و نژادهایشان که به ویروس‌های شبه TYLCV معروفند عامل خسارت به گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) در مناطق گرمسیر، نیمه گرمسیر و معتدل دنیا می باشند. در این بررسی تعداد سه جدایه TYLCV-IL از گیاهان تاتوره در منطقه بجنورد همسانه سازی و ژنوم کامل آنها تعیین توالی گردید. توالی اسید نوکلئیک ژنوم کامل آنها به همراه تعداد نه جدایه TYLCV-IL گزارش شده ازایران و هشت توالی سایر ویروس‌های *Begomovirus* گوجه فرنگی از ایران و سایر مناطق دنیا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج فیلوژنی جدایه‌ها نشان داد که تکامل جمعیت نژاد TYLCV-IL در ایران وابسته به جغرافیا بوده و صرفنظر از گونه میزبان واریانت‌های شمال شرق و جنوب ایران به طور مجزا در دو زیرگروه جداگانه قرار گرفتند. جدایه TYLCV-IL[IR:Sh40:07], GUO76444 از منطقه شیراز با هیچکدام از جمعیت‌های شمال شرق و جنوب ایران گروه بندی نشد. این جدایه با نژاد تیپ TYLCV-IL گزارش شده از فلسطین اشغالی قرابت نزدیکی داشته و با یکدیگر در یک زیر گروه مجزا قرار گرفتند. نتایج تجزیه فیلوژنی نشان داد که این جدایه از نظر تکاملی به عنوان پل ژنتیکی بین جدایه‌های TYLCV-IL حوزه مدیترانه‌ای و ایران محسوب می‌شود. این اولین گزارش از گیاه تاتوره به عنوان میزبان نژاد TYLCV-IL در ایران و همچنین حضور این نژاد ویروسی در منطقه بجنورد و استان خراسان شمالی می‌باشد.

واژه های کلیدی: *TYLCV-IL ، خراسان شمالی، بگوموویروس.*

*نویسنده مسئول: **مسعود شمس بخش** تلفن: 02148292274 Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir

مقدمه

بیماری پیچیدگی زرد برگ گوجه فرنگی یکی از مخربترین بیماری‌های ویروسی گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) در مناطق گرمسیر، نیمه گرمسیر و معتدل دنیاست (Moriones & Czosnek & Laterrot, 1997 ; Navas-Castillo, 2000). این بیماری توسط گونه تیپ ویروس پیچیدگی زرد برگ گوجه فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) به علاوه مجموعه‌ای از ده گونه ویروسی و نژادهای‌شان که به ویروس‌های شبه TYLCV (TYLCVs) معروفند، ایجاد می‌شود (Diaz-Pendon *et al*., 2010). از نظر تاکسونومیکی این ویروس‌ها به جنس *Begomovirus* از خانواده *Geminiviridae* تعلق داشته و نامگذاری آنها براساس معیارهای تعیین گونه و استرین کمیته بین المللی تاکسونومی ویروس‌ها (ICTV)[1] صورت گرفته است (Brown *et al*., 2012). میزبان اولیه این ویروس‌ها گیاه گوجه فرنگی بوده ولی میزبان‌های دیگری نیز دارند. این ویروس‌ها قادر به آلودگی لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris*)، فلفل شیرین (*Capsicum annum*)، فلفل تند (*C. chinense*)، گیاهان تیره کدوئیان، توتون (*Nicotiana tabacum*) و تعدادی از گیاهان زینتی شامل اطلسی (*Petunia×hybridia*) و لیزیانتوس (*Eustoma grandiflora*) می‌باشند.

همچنین علف‌های هرزی نظیر تاجریزی (*Solanum nigrum*) و تاتوره (*Datura stramonium*) توسط این ویروس‌ها آلوده می‌شوند و گیاه محک *N. benthamiana* را هم باید به این فهرست اضافه نمود (Diaz-Pendon *et al*., 2010).

گونه تیپ TYLCV و گونه‌های شبه TYLCV (TYLCVs) توسط بیوتیپ‌های مختلف سفیدبالک *Bemisia tabaci* (Gennadius) (*Hemiptera: Aleyrodidae*) شامل بیوتیپ‌های A , B , Q به روش گردشی پایا منتقل می‌شوند (Moriones & Navas-Castillo, 2000). این ویروس‌ها دارای ژنوم تک لای DNA یک قسمتی (Monopartite) به استثنای گونه‌های TYLCTHV[2] و TYLCKaV[3] که دارای ژنوم دو قسمتی (Bipartite) هستند. ژنوم در این ویروس‌ها در حدود 2/8 Kb (Diaz-Pendon *et al*., 2010) و دارای شش قالب خواندنی با همپوشانی ناقص است که در دو جهت ژنومی (جهت رشته ویروسی و جهت رشته مکمل) سازماندهی شده‌اند. در جهت ویروسی قالب‌های خواندنی V_1 و V_2 و در جهت مکمل قالب‌های خواندنی C_1 ، C_4 ، C_2 و C_3 قرار گرفته‌اند (Jupin *et al*., 1994 ; Wartig *et al*., 1997) که توسط ناحیه بین ژنی (IR[4]) به طول تقریبا 300 نوکلئوتید از هم جدا می‌شوند (Kheyr-Pour *et al*., 1991; Navot *et al*.,

1 - International Committee on Taxonomy of Viruses

2 - Tomato yellow leaf curl Thailand virus

3 - Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus

4- Intergenic region

(1991 ناحیه IR حاوی عناصر اصلی تنظیم همانندسازی و نسخه برداری ژنوم بوده و بخش ساقه – حلقه آن در بین تمام اعضای خانواده *Geminiviridae* محافظت شده می‌باشد (Behjatnia *et al*., 2001).

در ایران TYLCV اولین بار از استان‌های سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، بوشهر و خوزستان گزارش گردید (Hajimorad *et al*., 1996). اولین جدایه‌ای از TYLCV که بطور کامل تعیین توالی شد جدایه TYLCV-IR از ایرانشهر بود. نتایج نشان داد که این جدایه در اثر نوترکیبی بین ویروس ایرانی پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (TLCIRV) به عنوان دهنده و TYLCV-Mld به عنوان گیرنده قطعه ژنومی ایجاد شده است (Bananej *et al*., 2004) . دیگر جدایه‌هایی که بطور کامل تعیین توالی شده‌اند عبارتند از $TYLCV\text{-}Ir_2$ (Azizi *et al*., 2012) و TYLCV-Ab (Pakniat *et al*., 2010) به ترتیب از مزارع گوجه فرنگی بندرعباس و آباده، شش جدایه این نژاد ویروسی از گیاه گوجه فرنگی در مناطق جنوبی ایران (Lefeuvre *et al*., 2010) و ژنوم کامل سه جدایه از خراسان رضوی (نیشابور و درگز) تعیین توالی و در بانک ژن جهانی پایگاه NCBI ثبت شده است. نژاد TYLCV-IL که مخربترین نژاد TYLCV در دنیا محسوب می‌شود از مناطق مختلف کشور از گیاه گوجه فرنگی گزارش گردیده است (Bananej *et al*., 2009).

به طور کلی نژادهای توصیف شده TYLCV تاکنون شامل هفت نژاد بوده که عبارتند از TYLCV-IL (فلسطین اشغالی–ایران)، TYLCV-Mld (فلسطین اشغالی)، TYLCV-Gez (سودان)، TYLCV-OM (عمان–ایران)، TYLCV-IR (ایران)، TYLCV-Bou (ایران) و TYLCV-Ker (ایران) (Lefeuvre *et al*., 2010) و از این میان پنج نژاد از هفت نژاد توصیف شده TYLCV از ایران گزارش شده است که بیشترین تعداد نسبت به هر کشور دیگری است . جدایه TYLCV-Ab از منطقه آباده استان فارس که به عنوان نژاد جدید TYLCV از ایران گزارش شده بود (Pakniat *et al*., 2010)، امروزه یک واریانت جدید از نژاد TYLCV-IL محسوب می‌شود (Brown *et al*., 2012). از بین تمام نژادهای شناسایی شده، نژاد TYLCV-IL بیشترین انتشار جغرافیایی در دنیا داشته و دامنه پراکنش آن دنیای قدیم و جدید را دربر می‌گیرد (Duffy & Holmes, 2007; Lefeuvre *et al*., 2010, 2008; Polston *et al*., 1999).

علف‌های هرز و میزبان‌های گیاهی خودرو با منشاء بومی یا وارداتی می‌توانند توسط تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی از جمله بگوموویروس‌ها آلوده شده و به عنوان مخازن ویروسی، کانون اولیه‌ای برای آلودگی گیاهان زراعی به شمار روند و نیز نقش محوری در ظهور نژادهای ویروسی جدید ایفا نمایند (Mubin *et al*., 2010; Silva *et al*., 2012). به دلیل تنوع ژنتیکی بالای گونه‌های گیاهی وحشی و در مقایسه با گونه‌های زراعی، جمعیت‌های ویروسی در این میزبان‌های خودرو ممکن است در معرض محدودیت‌های انتخابی ویژه‌ای قرار

داشته باشند (Webster *et al*., 2007). هم چنین نشان داده شده است که بگوموویروس‌های علف هرز تغییرات ژنتیکی بیشتری نسبت به بگوموویروس‌های آلوده کننده گیاهان زراعی نشان می‌دهند (Silva *et al*., 2012). پویایی جمعیت ویروسی غالبا منجر به تکامل و ظهور واریانت‌های جدید سازگار با محیط می‌شود که این امر باعث غلبه ذخیره ژنومی شبه گونه ویروسی بر مقاومت گیاه میزبان شده و در نتیجه منجر به شیوع بیماری ویروسی می‌شود (Mansoor *et al*., 2003). از این رو درک بهتر تنوع جمعیت‌های ویروسی در میزبان‌های گیاهی خودرو و مقایسه آن با ارقام زراعی پیش شرط در تولید و کاربرد ارقام مقاوم به ویروس است.

در ایران دو گونه علف هرز *hierosolymitana* (*Euphorbiaceae*) *Chrozophora* (*Caryophyllaceae*) و *Hermania* sp. به عنوان میزبان‌های فاقد علائم ویروس‌های مرتبط با بیماری‌های پیچیدگی برگ گوجه فرنگی معرفی شده اند (Fazeli *et al*., 2009). در پژوهش حاضر برای اولین بار سه جدایه‌ی نژاد TYLCV-IL از گیاه تاتوره *Datura stramonium* (*Solanaceae*) در منطقه بجنورد تعیین توالی گردید و روابط فیلوژنتیکی آنها با سایر جدایه‌های این نژاد درایران که همگی از گیاه زراعی گوجه فرنگی جداسازی شده‌اند به همراه سایر بگوموویروس‌های گوجه فرنگی از ایران و سایر مناطق دنیا مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

منبع ویروس

نمونه‌های برگی از سه گیاه تاتوره دارای علائم موزائیک زردی و پیچیدگی برگ‌های جوان به سمت بالا (شکل 1) به همراه یک گیاه تاتوره فاقد علائم به عنوان کنترل منفی از اطراف یک مزرعه رها شده کدوئیان در منطقه بجنورد، خراسان شمالی (GPS: 37°28'23.12"N 57°21'44.65"E) در اواخر تابستان سال 1390 جمع آوری و جهت نگهداری به فریزر 70- منتقل گردید. استخراج DNA کلی از نمونه‌های برگی براساس روش تغییر یافته CTAB انجام شد (Cullings, 1992; Doyle & Doyle, 1987). ردیابی اولیه بگوموویروس در DNA های استخراج شده با PCR و به کمک آغازگرهای عمومی ACcore و AVcore (J.K. Brown، منتشر نشده) که قادر به تکثیر قطعه 576 نوکلوتیدی بخش مرکزی ژن رمز کننده پروتئین پوششی تقریبا تمام بگوموویروس‌ها می‌باشد، انجام گرفت. سپس با آغازگرهای اختصاصی TYC1F (5'-GGG CCT AGA GAC CTG GCC CAC-3'، موقعیت‌های نوکلئوتیدی 2076 تا 2071) و TYC1R (5'-CCGG TAA TAT TAT ACG GAT GGC-3'، موقعیت‌های نوکلئوتیدی 150-171) که قادر به تکثیر قطعه 856 نوکلئوتیدی از ناحیه IR و نیمه '5 پروتئین Rep ویروس TYLCV-IL (Lapidot, 2002) است، حضور TYLCV در نمونه‌های برگی آلوده تأیید گردید. DNA های استخراجی از گیاه

تاتوره فاقد علائم و گوجه فرنگی آلوده به TYLCV-Ir_2 (Azizi *et al*., 2012) به ترتیب به عنوان کنترل‌های منفی و مثبت در PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

حضور احتمالی DNA-B و مولکول ماهواره ای DNA-β در نمونه‌های برگی به ترتیب با استفاده از آغازگرهای عمومی PBL1v2040/PCRc1 (Rojas *et al*., 1993) و Beta 01/Beta02 (Briddon *et al*., 2002) بررسی گردید. نمونه برگی گوجه فرنگی آلوده به *Tomato leaf curl Palampour virus* (ToLCPav) اهدایی توسط دکتر جهانگیر حیدرنژاد (دانشگاه شهید باهنر کرمان) و نمونه برگی گوجه فرنگی آلوده به *Tomato yellow leaf curl*-Oman (TYLCV-OM) اهدایی توسط دکتر بهجت نیا (دانشگاه شیراز، شیراز) به ترتیب به عنوان کنترل-های مثبت در ردیابی جزء DNA-B و DNA-β در نمونه‌های مورد بررسی به کار رفتند. جهت تکثیر قطعه نوکلئوتیدی هدف با استفاده از یک میکروگرم DNA ژنومی، PCR با حجم نهایی 25 میکرولیتر با غلظت‌های نهایی اجزاء واکنش شامل 2/5 میلی مولار $MgCl_2$، 200 میکرومولار از هر یک از dNTP ها، 0/4 میکرومولار از هر یک از آغازگرها و 0/625 واحد آنزیم *Taq* پلیمراز (TAKARA BIO Inc., Japan) در دستگاه ترموسایکلر (Biometra 050-801, Tgradient96, Germany) با برنامه اختصاصی هر واکنش انجام گرفت (Brown *et al*., 2001; Lapidot, 2002).

تکثیر دایره غلتان[1] (RCA)، همسانه سازی و تعیین توالی ژنوم کامل بگوموویروس

واحدهای چندتایی خطی (Linear concatemers) از ژنوم حلقوی بگوموویروس موجود در DNA کل استخراج شده از بافت‌های برگی گیاهان تاتوره با استفاده از DNA پلیمراز Ø29 (Inoue-Nagata *et al*., 2004) و با کمک کیت تجاری RCA (Templiphi Amplification Kit, GE Healthcare, USA) به روش تکثیر دایره غلتان براساس دستورالعمل سازنده کیت تجاری تکثیر گردیدند. سپس جهت انجام همسانه سازی ژنوم کامل ویروس واحدهای چندتایی خطی ژنوم ویروسی با کمک آنزیم محدود کننده *Sph*I (Promega, USA) برش داده شد تا مونومر ژنوم کامل (2/8 kb) ویروسی به دست آید. مونومرهای خطی برش خورده دارای انتهای چسبنده، طی واکنش اتصال (Ligation) به حامل پلاسمیدی pGEM-3Z f(+) (3197bp) تیمار شده با آنزیم CIAP[2] (TAKARA BIO Inc., Japan) و خطی شده با هضم آنزیمی *Sph*I متصل گردیدند (Lefeuvre *et al*., 2010). حامل پلاسمیدی حاوی مونومر ژنوم کامل ویروسی به روش شوک حرارتی به داخل نژاد DH5α باکتری *Escherichia coli* منتقل گردید (Sambrook & Russel, 2001). کلنی‌های مثبت باکتریایی دارای حامل پلاسمیدی نوترکیب به روش غربالگری آبی و سفید انتخاب شده و سپس استخراج

1 - Rolling circle amplification
2 - Calf Intestine Alkaline Phosphatase

پلاسمید از هر یک از باکترها با کمک کیت تجاری استخراج پلاسمید (QIAGEN, USA) انجام گرفت. تعداد سه کلون حاوی ژنوم کامل ویروس (2-5 , 1-8 , 1-11) از گیاهان تاتوره 5 ، 8 و 11 جهت تعیین توالی ژنوم کامل ویروس به شرکت BIONEER، کره جنوبی ارسال و تعیین توالی شدند.

تجزیه و تحلیل توالی‌های ویروسی و بازسازی روابط فیلوژنتیکی

قطعات تعیین توالی شده ژنوم جدایه‌های ویروسی با کمک نرم افزارهای تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی موجود در بسته نرم افزاری Lasergene (DNA Star Inc., Madison, WI, USA) به شکل یک توالی واحد در هر مورد تنظیم و سپس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه درصد برابری دو به دو ژنوم‌های ویروسی در هر مورد جداگانه با کمک الگوریتم BLASTn موجود در پایگاه NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) با نزدیکترین خویشاوندان میان سایر بگوموویروس‌های موجود در GenBank تعیین گردید. هم چنین برای شناسایی قاب باز خواندنی ORF[1]های هر یک از ژنوم‌های ویروسی از نرم افزار اینترنتی ORF Finder موجود در پایگاه NCBI استفاده گردید.

توالی‌های ژنوم کامل خویشاوندان نزدیک ایرانی جدایه‌های ویروس گیاهان تاتوره شامل نه توالی ژنوم کامل ویروسی جداسازی شده از گیاه زراعی گوجه فرنگی (جدول 1) به همراه هشت توالی ژنوم کامل تعدادی از بگوموویروس‌ها (جدول 2) از GenBank پایگاه NCBI بازیابی گردید تا در تجزیه و تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرند. سپس همردیف سازی توالی‌های ویروسی در سطح ژنوم کامل، با کمک الگوریتم CLASTAL W موجود در نرم افزار MEGA5 (Tamura *et al*., 2011) با رعایت پارامترهای پیش فرض همردیفی، صورت گرفت. درخت فیلوژنتیکی به روش اتصال همسایه (NJ)[2] به کمک نرم افزار MEGA5 بعد از تعیین مدل تکاملی بهینه برای مجموعه توالی‌های همردیف شده و با 1000 تکرار روش آماری Bootstrap ترسیم گردید.

نتایج و بحث

ردیابی TYLCV-IL با کمک PCR در گیاهان تاتوره، منطقه بجنورد

نتایج PCR با استفاده از جفت آغازگر عمومی ACcore/AVcore و جفت آغازگر اختصاصی TYC1F/TYC1R (شکل 2) نشان داد که هر سه گیاه تاتوره 5 ، 8 و 11 دارای علائم ویروسی (شکل 1) آلودگی به TYLCV را داشتند. انجام PCR با جفت آغازگرهای عمومی PBL1v2040/PCRc1 و Beta 01/Beta 02 که به ترتیب جهت ردیابی جزء DNA-B و جزء DNA-β به کار رفتند، هیچ گونه نشانه ای از آلودگی بوته‌های تاتوره به این اجزاء نشان نداد.

1 - Open Reading Frame

2 - Neighbor Joining Method

بنابراین TYLCV ردیابی شده در گیاهان تاتوره ماهیت یک قسمتی داشت.

جدول 1- جدایه‌های ایرانی نژاد TYLCV-IL دارای توالی‌های ژنوم کامل منتشر شده در GenBank؛ نام اختصاری هر جدایه، میزبان، منشاء جغرافیایی (استان-ناحیه)، سال انتشار توالی ژنوم، شماره دسترسی ژنوم و اندازه ژنوم کامل.

Table 1- Publicly available Iranian TYLCV-IL sequences in GenBank; their acronym, host species, geographical origin (province-region), published year, GenBank accession number and full-length genome size.

جدایه ویروس **Virus isolate**	میزبان اصلی **Original host**	منشاء جغرافیایی(استان- ناحیه)- **Geographical origin (province –county)**	شماره دسترسی بانک ژن **GenBank accession no.**	اندازه ژنوم کامل(نوکلئوتید) **Full -genome Size (nt)**
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR:Sh47:07]	Tomato	Fars/Shiraz	GU076447	2781
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR:Or28:07]	Tomato	Kerman/Orzueeyeh	GU076445	2781
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR:Sh46:07]	Tomato	Fars/Shiraz	GU076446	2781
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR:Sh40:07]	Tomato	Fars/Shiraz	GU076444	2781
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR:Ta30:06]	Tomato	Kerman/Taft	GU076440	2781
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR:Abadeh]	Tomato	Fars/Abadeh	FJ355946	2782
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR: Neyshabur]	Tomato	Razavi Khorasan/Neyshabur	JQ414025	2780
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR: Cherry Fadisheh-Neyshabur]	Tomato	Razavi Khorasan/Neyshabur	JQ928347	2780
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR: Dargaz]	Tomato	Razavi Khorasan/Dargaz	JQ928348	2779
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR:Boj:5-2]	Datura	North Khorasan/Bojnurd	KC106635	2782
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR:Boj:8-1]	Datura	North Khorasan/Bojnurd	KC106636	2779
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [IR:Boj:11-1]	Datura	North Khorasan/Bojnurd	KC106637	2779

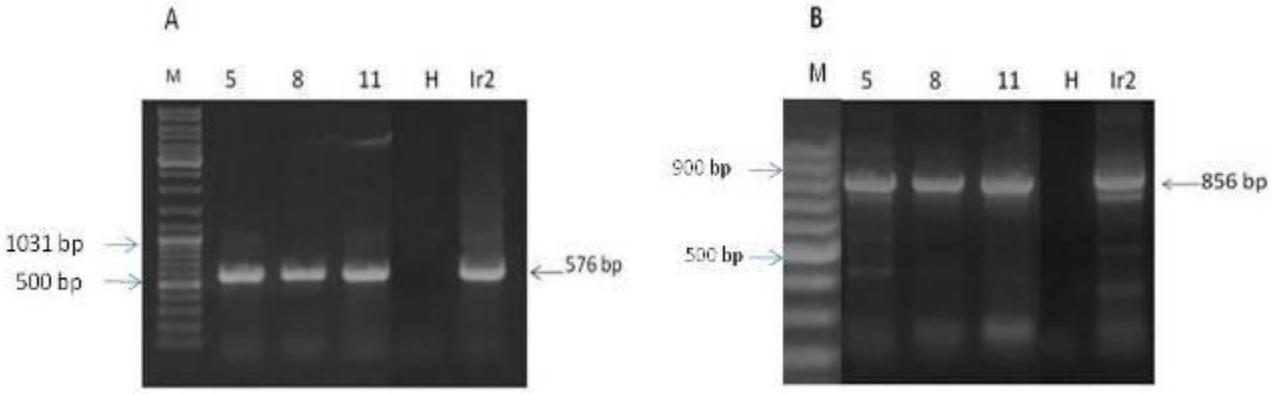
شکل 1- علائم ویروسی موزائیک زردی به همراه پیچ خوردگی برگ‌های جوان به سمت بالا در گیاهان تاتوره (A-C) و گیاه تاتوره فاقد علائم (D) نمونه برداری شده در منطقه بجنورد (GPS: 37°28'23.12"N 57°21'44.65"E) در سال 1390.

Figure 1- Viral symptoms of yellow mosaic with upward leaf curl of young leaves in Datura plants (A-C) and asymptomatic Datura plant (D), sampled in Bojnurd region (GPS: 37°28'23.12"N 57°21'44.65"E) during 2011.

تجزیه و تحلیل توالی‌های ویروسی و بازسازی روابط فیلوژنتیکی

نتایج BLASTn نشان داد که ژنوم جدایه-های TYLCV گیاهان تاتوره در منطقه بجنورد بیش از 93٪ (94 -98٪) برابری با ژنوم نزدیکترین خویشاوندان خود شامل نه جدایه از گیاه گوجه فرنگی از مناطق شمال شرق (سه جدایه) و جنوب (شش جدایه) ایران و هم چنین بانژاد تیپ IL[IL:Reo:86], X15656 -TYLCV (جداول 1 و 2) که برای اولین بار از فلسطین اشغالی گزارش شده (Navot *et al.*, 1991) داشتند. میزان برابری حداقل 93٪ به عنوان سطح پایین برابری توالی‌ها در تعیین واریانت‌های بگوموویروس‌ها توسط گروه مطالعات *Geminivirus* در ICTV در نظر گرفته شده است (Brown *et al.*, 2012). بنابراین جدایه‌های TYLCV گیاهان تاتوره در منطقه بجنورد به عنوان واریانت‌های جدید نژاد TYLCV-IL در ایران تعیین گردیدند. در ادامه توالی سه واریانت متفاوت از گیاهان تاتوره شامل 5-2 , 11-1 , 8-1 به GenBank معرفی و شماره دسترسی به آنها تعلق گرفت. شماره دسترسی هر

واریانت به همراه نام کامل جدایه ویروسی، نام اختصاصی و اندازه ژنوم آن در جدول شماره 1 درج شده است.



شکل 2- نتایج الکتروفورز ژل آگارز محصول تکثیر شده PCR از DNA کل استخراج شده از بافت برگی گیاهان تاتوره با استفاده از آغازگرهای عمومی AVcore و ACcore (A) و آغازگرهای اختصاصی TYC1F و TYC1R (B). M: نشانگر وزنی مولکولی (GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use, Fermentas) (A) و GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas (B)، 5، 8 و 11: گیاهان تاتوره دارای علائم ویروسی نمونه برداری شده در منطقه بجنورد. H و Ir_2: به ترتیب گیاه تاتوره فاقد علائم و گیاه گوجه فرنگی آلوده به TYLCV- Ir2 به عنوان کنترل منفی و مثبت در PCR.

Figure 2- Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products of the total DNA extracted from the leaf tissue of the datura plants, using primers AVcore, ACcore (A) and primers TYC1F, TYC1R (B). M, molecular size marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use, Fermentas) (A) and GeneRuler DNA Ladder, 1 Kb, Fermentas (B) ; 5,8 and 11: symptomatic tomato plants sampled in Bojnurd region; H and Ir2: healthy datura and infected tomato plant with TYLCV-Ir2 as negative and positive controls in PCR, respectively.

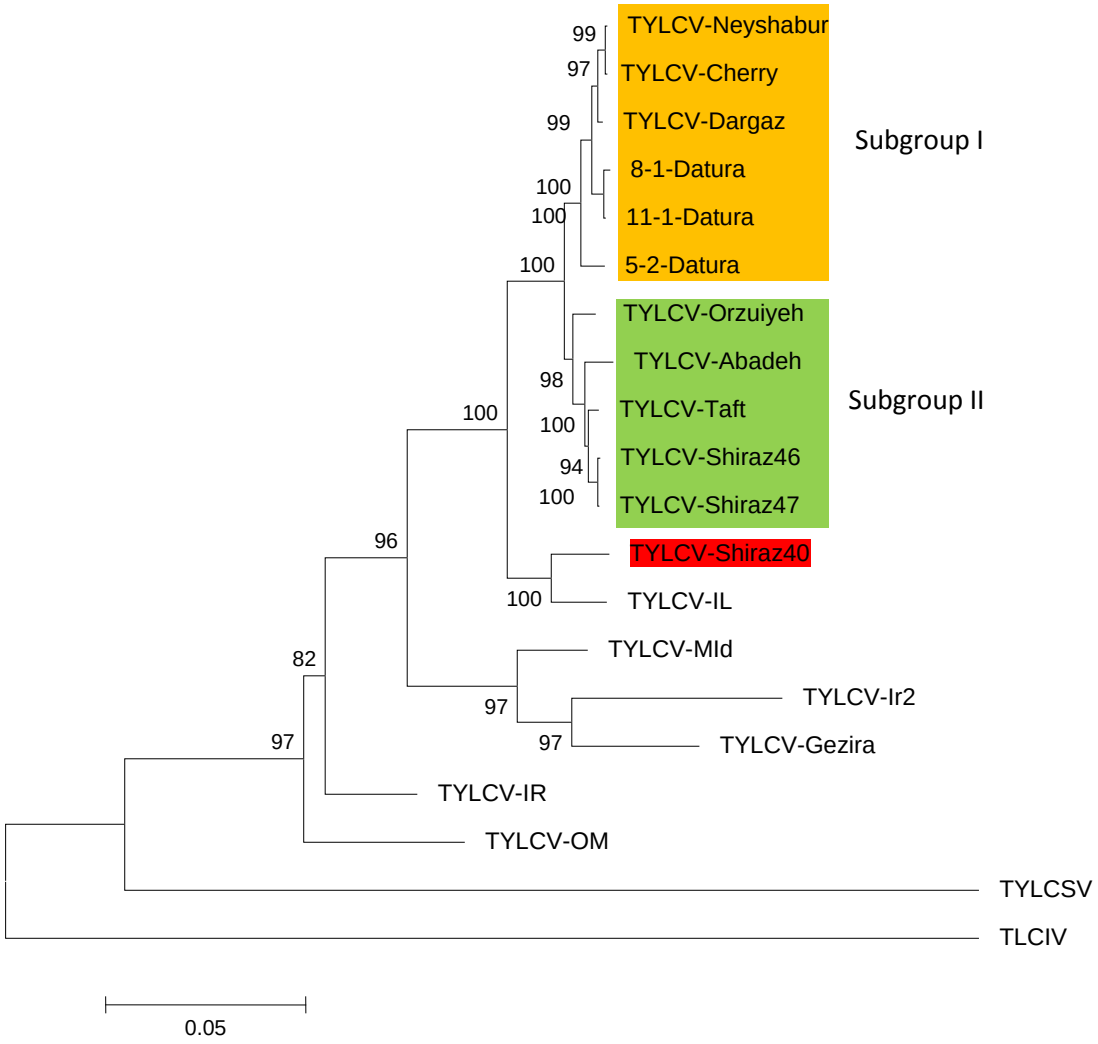
درخت فیلوژنتیکی به روش اتصال همسایه (NJ) براساس ژنوم کامل بعد از تعیین بهترین مدل تکاملی (TN93+G) با نرم افزار MEGA5 (شکل 3) نشان داد که گروه مونوفیلتیک جمعیت واریانت‌های نژاد TYLCV-IL در ایران صرف نظر از نوع میزبان در دو زیرگروه شامل زیر گروه واریانت‌های شمال شرق (زیر گروه I) و زیر گروه واریانت‌های جنوب ایران (زیر گروه II) براساس منشاء جغرافیایی گروه بندی شدند. در این گروه بندی فیلوژنتیکی واریانت TYLCV-IL [IR:Sh40:07] (ناحیه قرمز رنگ در شکل 3) جداسازی شده از شیراز با هیچکدام از زیرگروه-های واریانت‌های شمال شرق و جنوب ایران هم گروه نشد بلکه با نژاد تیپ TYLCV-IL در گروه جداگانه‌ای قرار گرفتند.

جدول 2- جدایه‌های بگوموویروس‌های انتخاب شده که از بانک ژن GenBank توالی ژنوم کامل آنها بازیابی گردیده؛ نام اختصاری هر جدایه، شماره دسترسی و اندازه ژنوم کامل.

Table 2- Selected begomoviral full genomes retrieved from GenBank; their acronym, accession number, and full-length genome size.

جدایه ویروس **Virus Isolates**	نام اختصاری **Acronym**	شماره دسترسی بانک ژن **GenBank accession no.**	اندازه ژنوم (نوکلئوتید) **Genome size (nt)**
Tomato yellow leaf curl virus-Ir2[Iran]	TYLCV-Ir2	EU085423	2776
Tomato yellow leaf curl virus-Oman	TYLCV-OM	DQ644565	2765
Tomato yellow leaf curl virus-Iran	TYLCV-IR	AJ132711	2771
Tomato yellow leaf curl virus-Mild[Israel]	TYLCV-Mld	X76319	2790
Tomato yellow leaf curl virus-Israel[Israel:Rehovotl]	TYLCV-IL	X15656	2787
Tomato yellow leaf curl virus-Gezira[Sudan]	TYLCV-Gez	AY044138	2780
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus[Spain]	TYLCSV	X61153	2773
Tomato leaf curl Iran virus[Iran]	TLCIV	NC005842	2763

قبلاً بررسی روابط فیلوژنتیکی بگوموویروس‌های مرتبط با بیماری پیچیدگی زرد برگ گوجه فرنگی (TYLCD) در ایران براساس توالی ناحیه IR آنها را به دو گروه A و B تقسیم کرده (Bananej *et al*., 2009) و در گروه A ، هفت جدایه که قرابت زیادی به TYLCV-IL فلسطین اشغالی داشته قرار گرفته‌اند. تعیین روابط فیلوژنتیکی بگوموویروس‌ها براساس توالی‌های نواحی ژنومی به جای استفاده از توالی ژنوم کامل منجر به مبهم شدن بررسی روابط فیلوژنتیکی این گروه از ویروس‌ها شده است (Silva *et al*., 2012). در پژوهش حاضر براساس توالی ژنوم کامل واریانت‌های نژاد TYLCV-IL در ایران سعی در ارائه تصویری روشن از روابط فیلوژنتیکی این واریانت‌ها بوده است که آنها را در یک گروه مونوفیتیک با نوع تکاملی وابسته به جغرافیا در دو زیر گروه I و II قرار داده است. بر این اساس مسیر حرکتی از جنوب به شمال شرق برای این واریانت‌های ویروسی می‌توان متصور شد. به نظر می‌رسد ظهور واریانت‌های نژاد TYLCV-IL در شمال شرق ایران ناشی از انتشار طبیعی جمعیت‌های آلوده به ویروس توسط حشره ناقل، سفیدبالک، یا از طریق انتقال مواد گیاهی آلوده به ویروس از مناطق جنوبی به مناطق شمال شرقی ایران باشد.



شکل 3- درخت روابط فیلوژنتیکی براساس ژنوم کامل واریانت‌های نژاد TYLCV-IL جداسازی شده از گیاهان تاتوره در منطقه بجنورد، سایر واریانت‌های این نژاد ویروسی جداسازی شده از گوجه فرنگی در مناطق شمال شرق (زیر گروه I) و جنوب (زیر گروه II) ایران به همراه جدایه‌هایی از بگوموویروس‌های جداسازی شده از گوجه فرنگی در ایران و سایر مناطق دنیا (جدول 1و2) که براساس روش Neighbor-Joining با مدل تکاملی TN93+G ترسیم گردید (Tamura *et al.*, 2011). درخت فیلوژنتیکی جهت تسهیل در تفسیر در نقطه میانی ریشه داد شده و مقادیر درصدی حمایت Bootstrap با 1000 تکرار در هر گره اصلی نشان داده شده است. خط مقیاس تعداد جایگزینی نوکلئوتید در هر جایگاه را نشان می‌دهد.

Figure 3- Phylogenetic tree of the full genome of the TYLCV-IL variants isolated from datura plants in Bojnurd, Iran and from tomato plants in northeastern (Subgroup I) and southern Iran (SubgroupII) plus the selected begomoviruses of tomato from Iran and other parts of the world (Table 1 and 2) was inferred by using the Neighbor-Joining method based on the TN93+G best-fit model (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.

الگوی انتشار جهانی TYLCV-IL در سال-های اخیر که انتشار این نژاد ویروسی را از شرق دور تا آمریکای شمالی نشان می‌دهد (Duffy & Polston *et* ; Idris *et al*., 2007Holmes, 2007 ; *al*., 1999) می‌تواند دلیلی بر تأیید انتشار این نژاد در ایران به شمار رود.

از آنجایی که مناطق مجاور ایران به عنوان کانون احتمالی تنوع حال حاضر TYLCV و تکامل پیش رونده آن بشمار می‌روند، حضور پنج نژاد TYLCV در ایران از جمله نژاد خطرناک و مخرب TYLCV-IL نشان می‌دهد که ایران ممکن است بخشی از مرکز تنوع جهانی TYLCV-IL یا نزدیک به آن باشد (Lefeuvre *et al*., 2010). براساس تجزیه و تحلیل صورت گرفته در این مطالعه براساس ژنوم کامل واریانت-های نژاد مخرب در ایران، واریانت TYLCV-IL [IR:Sh40:07] جداسازی شده از شیراز، جنوب ایران را می‌توان به عنوان یک پل ژنتیکی بین جدایه‌های TYLCV-IL ایران و مناطق مدیترانه-ای پیشنهاد کرد. بررسی فیلوژنتیکی نشان داد که دو جدایه شناخته شده TYLCV-Mld و TYLCV-IR به احتمال زیاد می‌توانند به عنوان اجداد جدایه شیراز که به نوبه خود نقش جدی برای جدایه شناخته شده فلسطین اشغالی TYLCV-IL [IL:Reo:86], X15656 ایفا می-کند، به شمار روند. هر چند این یافته جدیدی در جغرافیای ایران محسوب می‌شود ولی نیاز به بررسی جدایه‌های بیشتری از منطقه شیراز دارد.

در این پژوهش گیاه تاتوره برای اولین بار به عنوان میزبان غیرزراعی نژاد TYLCV-IL در ایران معرفی می‌شود. هم چنین واریانت‌های جدید نژاد TYLCV-IL از گیاهان تاتوره برای اولین بار از منطقه بجنورد، خراسان شمالی گزارش می‌شوند. حضور واریانت‌های جدید در مناطقی که قبلا حضور این واریانت‌ها در آنجا گزارش نشده است می‌تواند تهدیدی برای شیوع بیماری‌های گیاهی ویروس باشد که این موضوع در مورد برخی از ویروس‌های *Geminivirus* مشاهده شده است (Varma & Malathi, 2003).

با توجه به اهمیت بالقوه جغرافیای ایران در تکامل واریانت‌های TYLCV-IL، نظارت بر جمعیت‌های این نژاد ویروسی در علف‌های هرز و گیاهان خود رو طبیعی به همراه بررسی‌های فیلوژنتیکی ضروری به نظر می‌رسد. نتایج این پژوهش نشان داد که گیاهان خودرو طبیعی خانواده *Solanacea*e نظیر تاتوره منبع ظهور واریانت‌های جدید TYLCV-IL می‌باشند. هم چنین نقش این میزبان خودرو طبیعی به عنوان ظرف مخلوط کننده جمعیت‌های ویروسی فرضیه دیگری است که نیاز به بررسی دارد. بنابراین از نظر اپیدمیولوژی، این میزبان طبیعی به عنوان منبع آلودگی اولیه و هم چنین به عنوان مخزن ویروسی در پیدایش واریانت‌های جدید TYLCV-IL می-تواند نقش عمده ای ایفا نموده و در روش‌های مدیریت بیماری براساس ارقام مقاوم اختلال ایجاد نماید.

سپاسگزاری

نویسندگان بدینوسیله از آقای دکتر جهانگیر حیدر نژاد گروه گیاه پزشکی دانشگاه شهید با هنر کرمان و دکتر سید علی اکبربهجت نیا گروه گیاه پزشکی دانشگاه شیراز به دلیل ارسال کنترل‌های مثبت ویروس‌های ToLCPaV و TYLCV-OM صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند. هم چنین از همکاری‌های مدیریت و معاونت محترم حفظ نباتات خراسان شمالی در طی مراحل اولیه این پژوهش نهایت سپاس و قدر دانی را دارند.

منابع

Azizi A, Shams-Bakhsh M, Mozafari J, Montazeri-Hedesh R (2012). Complete genomic sequence of a strain of tomato yellow leaf curl virus from iran. Iranian Journal of virology 5: 18-27.

Bananej K, Kheyr-Pour A, Salekdeh GH, Ahoonmanesh A (2004). Complete nucleotide sequence of Iranian tomato yellow leaf curl virus isolate: further evidence for natural recombination amongst begomoviruses. Archives of Virology149:1435-1443.

Bananej K, Vahdat A, Hosseini-Salekdeh G (2009). Begomoviruses associated with yellow leaf curl disease of tomato in Iran. Journal of Phytopathology 157: 243-247.

Behjatnia SAA, Dry IB, Rezaian MA (2001). Sequence divergence in new strains of Tomato leaf curl virus resulting in replication specificity. Australian journal of Plant Pathology 30: 337-342.

Briddon RW, Bull SE, Mansoor S, Amin I, Markham PG (2002). Universal primers for the PCR-Mediated Amplification of DNA β, a molecule associated with some monopartite begomoviruses. Molecular Biotechnology 20:315-318.

Brown JK, Idris AM, Torres-Jerez I, Banks G K, Wyatt S D (2001). The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. Archives of Virology146:1581-1598.

Brown JK, Fauquet CM, Briddon RW, Zerbini M, Moriones E, Navas-Castillo J (2012). Family Geminiviridae, In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (Eds.), Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses- Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, USA, pp. 351-373.

Cullings KW (1992). Design and testing of a plant -specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Molecular Ecology 1: 233-240.

Czosnek H, Laterrot H (1997). A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. Archives of Virology 142: 1391-1406.

Diaz-Pendon JA, Canizares MC, Moriones E, Bejarano ER, Czosnek H, Navas-Castillo J (2010). Tomato yellow leaf curl viruses: menage a trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. Molecular Plant Pathology 11: 441-450.

Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissuse. Phytochemistry Bulletin 19:11-15.

Duffy S, Holmes EC (2007). Multiple introductions of the Old World begomovirus Tomato yellow leaf curl virus into the New World. Applied Environmental Microbiology 73:7114-7117.

Duffy S, Holmes EC (2008). Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. Journal of Virology 82: 957-965.

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

Hajimorad MR, Kheyr-pour A, Alavi V, Ahoonmanesh A, Bahar M, Rezaian MA, 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: 418-425.

Idris AM, Guerrero JC, Brown JK (2007). Two distinct isolates of Tomato yellow leaf curl virus threaten tomato production in Arizona and Sonora, Mexico. Plant Disease 91: 910-910.

Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004). A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage Ø29 DNA polymerase. Journal of Virological Methods 116: 209-211.

Jupin I, De Kouchkovsky F, Jouanneau F, Gronenborn B (1994). Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. Virology 204: 82-90.

Kheyr-Pour A, Bendahmane M, Matzeit V, Accotto G P, Crespi S, Gronenborn B (1991). Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. Nucleic Acids Research 19: 6763-6769.

Lapidot M (2002). Screening common bean (Phaseolus vulgaris) for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. Plant disease 86: 429-432.

Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJ, Meredith S, Heydarnejad J (2010). The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. PLoS Pathog, 6: e1001164.

Mansoor S, Amin I, Iram S, Hussain M, Zafar Y, Malik KA, Briddon RW (2003). Breakdown of resistance in cotton to cotton leaf curl disease in Pakistan. Plant pathology, 52: 784-784.

Moriones E, Navas-Castillo J (2000). Tomato yellow leaf curl virus ,an emerging virus complex causing epidemics worldwide. Virus Research 71: 123-134.

Mubin M, Shahid MS, Tahir MN, Briddon RW, Mansoor S (2010). Characterization of begomovirus components from a weed suggests that begomoviruses may associate with multiple distinct DNA satellites. Virus Genes, 40: 452-457.

Navot N, Pichersky E, Zeidan M, Zamir D, Czosnek H (1991). Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. Virology, 185: 151-161.

Pakniat A, Behjatnia SAA., Kharazmi S, Shahbazi M, Izadpanah K (2010). Molecular characterization and construction of an infectious clone of a new strain of tomato yellow leaf curl virus in southern Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 46:101-115.

Polston J, McGovern R, Brown L (1999). Introduction of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other Geminiviruses of tomato. Plant Disease 83:984-988.

Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. Plant Disease 77: 340-347.

Sambrook JR, Russel DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL press, Cold Spring Harbor, USA.

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

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Varma A, Malathi VG (2003). Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. Annual Applied Biology 142: 145–164.

Wartig L, Kheyr-Pour A, Noris E, De Kouchkovsky F, Jouanneau F, Gronenborn B, Jupin I (1997). Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. Virology 228: 132-140.

Webster CG, Coutts BA, Jones RAC, Jones MGK, Wylie SJ (2007). Virus impact at the interface of an ancient ecosystem and a recent agroecosystem: studies on three legume-infecting potyviruses in the southwest Australian floristic region. Plant pathology 56: 729-742.

Full-length genome sequencing and phylogeny of severe strain isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-IL) originating from *Datura stramonium* L. in Bojnurd region, Iran

Hosseinzadeh M.R.[1], Shams-Bakhsh M.[1*], Kazempour-Osalou SH.[2]

[1]Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2] Plant Sciences Department, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and a complex of ten virus species and their strains referred to as TYLCV-like viruses cause damage on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) crops in tropical, subtropical and temperate regions of the world. In this study, full-length genome of three TYLCV-IL isolates originating from *Datura stramonium* L. in Bojnurd region, Iran were cloned, sequenced and subsequently entered the phylogenetic analysis with nine TYLCV-IL isolates from Iran and eight selected begomoviruses of tomato from Iran and other part of the world. The phylogenetic analysis suggested the geographical-dependent evolution of Iranian TYLCV-IL populations so that regardless of host species the monophyletic group of the northeastern and southern isolates was clustered separately into two subgroups. TYLCV-IL [IR: Sh40:07], GU076444 isolated in Shiraz region was not clustered with none of the Iranian TYLCV-IL isolates but rather was grouped with the type strain of TYLCV-IL from Israel in a separate group. Evolutionally, this isolate could be a "genetic bridge" between Mediterranean and Iranian TYLCV-IL isolates. This is the first report of *Datura stramonium* L. as the host species of TYLCV-IL in Iran and also the first-time occurrence of the viral stain in North Khorasan province, Bojnurd, Iran.

Key Words: *TYLCV-IL, North Khorasan, Begomovirus.*

[*] Corresponding Author: Shams-Bakhsh M. Tel: + (98)2148292274 Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir