

## تنوع ژنتیکی و پراکنش ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی در مزارع و گلخانه های ایران

مهدی شیرازی<sup>1</sup>، جواد مظفری<sup>2\*</sup>، فرشاد رخشنده رو<sup>3</sup>، مسعود شمس بخش<sup>4</sup>

- 1- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
- 2- دانشیار، بخش ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر
- 3- استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
- 4- دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: 1390/6/2، تاریخ پذیرش: 1391/3/9

### چکیده

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) یکی از عوامل بیماریزای مهم گوجه فرنگی در ایران می باشد. به منظور بررسی پراکنش TYLCV در ایران از مزارع و گلخانه های کشت گوجه فرنگی واقع در هشت استان کشور طی سالهای زراعی 86-87 و 87-88 نمونه برداری شد. از بین 284 نمونه بررسی شده ویروس در 153 نمونه از شش استان کشور با استفاده از آزمون PCR ردیابی شد. بر این اساس، وجود TYLCV در مناطق رضوان (هرمزگان)، دشتستان (بوشهر)، دزفول (خوزستان)، پاکدشت و اسلامشهر (تهران) برای اولین بار گزارش می گردد. همچنین بر اساس مناطق جغرافیایی و علائم، 9 جدایه برای تعیین ترادف انتخاب شدند. مقایسه ترادف DNA ویروسی تکثیر شده به طول 670 نوکلئوتید شامل بخشی از ژن های پروتئین پوششی و حرکتی ویروس با ترادف های گزارش شده از ایران و ترادف نژاد های نزدیک به آنها در بانک ژن نشان داد که جدایه های مورد مطالعه در این پژوهش در دو گروه اصلی قرار می گیرند؛ جدایه های جمع آوری شده از استانهای هرمزگان، خوزستان و کرمان با جدایه های ایرانی TYLCV-Kahnooj و TYLCV-Ir2 و جدایه ای از عمان در یک گروه و جدایه های بدست آمده از بوشهر، فارس و تهران نزدیک به جدایه ایرانی TYLCV-Abadeh و جدایه هایی از مصر و فلسطین اشغالی در کنار هم قرار گرفتند. نتایج حاصل از این بررسی بیانگر آن است که TYLCV در ایران از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است.

کلمات کلیدی: جمینی ویروس، *Solanum lycopersicon*، PCR، TYLCV

گیاهان و میزبان های زراعی مختلف متفاوت می باشد و میزبان های غیرزراعی آلوده، به خصوص برخی از علف های هرز بدون علائم هستند ( Zakary et al., 1991; Fazeli et al., 2009).

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی از تیره ویروس های دو قلو *Geminiviridae* بوده و به جنس *Begomovirus* تعلق دارد. ژنوم اعضای این تیره DNA تک لای حلقوی می باشد و توسط سفید بالک (*Bemisia tabaci*) به روش پایا و چرخشی منتقل می شود. هر چند بیشتر جدایه های ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی ژنوم دو قطعه ای دارند، اما ژنوم گروهی از آنها نیز تک بخشی است (Stanley et al., 2005). در بگوموویروس های با ژنوم تک بخشی، ژنوم دارای شش قاب خواندنی باز بوده که مسئول رمز کردن ژن های مسئول همانند سازی، تنظیم بیان ژن، پروتئین های پوششی و حرکتی، بروز علائم و بیماریزایی هستند (Czosnek, 2007). علاوه بر این، DNA های تک رشته حلقوی کوچک به طول حدود 1350 جفت باز که معمولاً مسئول تشدید علائم هستند با اغلب TYLCV های تک بخشی همراه هستند (Bridson & Stanley, 2006). یک ناحیه بین ژنی با نام منطقه مشترک<sup>1</sup> نیز در ژنوم وجود دارد که ترادف حفاظت شده TAATATTAC در این ناحیه قرار دارد (Czosnek, 2007).

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV*) یکی از مخرب ترین ویروس های گیاهی در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان محسوب می شود که خسارت آن از 50 تا 99 درصد در محصول گوجه فرنگی گزارش شده است (Pico et al., 1996). این ویروس برای اولین بار از فلسطین اشغالی گزارش شده (Cohen & Harpez, 1964) و در ایران نیز برای اولین بار در سال 1375 از استان های جنوبی ایران شامل سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، بوشهر و خوزستان (Hajimorad et al., 1996) و به دنبال آن از استان های خراسان، اصفهان، مرکزی، گلستان (Bananej et al., 1998)، تهران (Shahriary & Bananej, 1998) و یزد (Bananej et al., 2008) گزارش شده است.

اگرچه مهمترین میزبان این ویروس گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicon*) است، ولی در میزبان های دیگری، از جمله لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) (Navas-Castillo et al., 1999)، فلفل (*Capsicum annuum*) (Reina et al., 1999)، تاجریزی (*Solanum nigrum*) (Bedford et al. 1998)، *Solanum luteum*، *Sanches-compos* et *Mercularis ambigua* *Eustomus grandiflorum* (al., 2000)، (Cohen et al., 1995) نیز ایجاد بیماری می کند. علائم بیماری شامل کوتولگی، پیچیدگی برگ، زردی و ریزش گلها بوده که این علائم در

<sup>1</sup> Common region

انجام گرفت و نمونه ها به آزمایشگاه منتقل گردید.

#### استخراج DNA

استخراج DNA بر اساس روش تغییر یافته (Dellaporta *et al.*, 1983) به صورت زیر انجام شد:

دو دهم گرم از بافت گیاهی در ازت مایع خرد شد و در 500 میکرولیتر بافر استخراج (شامل 100mM Tris-HCl [pH=8.0]، 50mM EDTA، 500mM NaCl، 10mM 2β- mercaptoethanol و 1% SDS) حل شد و سپس به مدت 15 دقیقه در دمای 65 درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس 600 میکرولیتر کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (24:1) به هر نمونه اضافه و پنج دقیقه در دمای اتاق بهم زده شدند. میانگریز با سرعت 13000 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه انجام و فاز روشنین به لوله جدید منتقل گردید. سپس به هر نمونه به نسبت یک دهم حجم فاز رویی استات سدیم 5 مولار [pH=5.2] اضافه شد. بعد از اضافه شدن استات سدیم و چند بار هم زدن، ایزوپروپانول سرد (به مقدار هم حجم) به هر نمونه اضافه گردید. نمونه ها در سرمای 20- درجه سلسیوس به مدت 20 دقیقه قرار گرفت. در ادامه میانگریز دوم با شرایط یاد شده به مدت 5 دقیقه انجام گرفت و فاز روشنین حذف گردید. شستشوی رسوب DNA با اتانول 70% انجام گرفت. رسوب حاصل پس از خشک شدن در دمای اتاق در 50 میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید.

تاکنون با بررسی های انجام شده بر روی این ویروس در نقاط مختلف کشور، ترادف کامل نژاد های TYLCV-Ir (Bananej *et al.*, 2004)، TYLCV-Ir2 (Azizi *et al.*, 2008)، و Abadeh (Pakniat *et al.*, 2008) و Kahnooj (Fazeli *et al.*, 2009) و چندین جدایه از ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه فرنگی (Heydarnejad *et al.*, 2009) تعیین شده است. با توجه به تغییرات ژنومی بالا و خسارات سنگین این ویروس در مزارع گوجه فرنگی به خصوص در استان های جنوبی و گسترش آن در سال های اخیر به سمت مناطق مرکزی و شمالی کشور نیاز به بررسی پراکنش این ویروس در مناطق عمده کشت گوجه فرنگی و شناسایی و مقایسه جدایه های آلوده کننده گوجه فرنگی در این مناطق می باشد. در این پژوهش پراکنش ویروس با نمونه برداری از مناطق جدیدی در هشت استان کشور و بررسی فیلوژنتیکی جدایه- های مناطق مختلف انجام شد.

#### مواد و روشها

به منظور بررسی پراکنش TYLCV در ایران در سال های زراعی 86-87 و 87-88 از مزارع و گلخانه های کشت گوجه فرنگی در استان های هرمزگان (سرخون و رضوان)، کرمان (جیرفت)، بوشهر (دشتستان و خورموج)، خوزستان (دزفول، صفی آباد)، فارس (آباد)، اصفهان، تهران (ورامین، پاکدشت، اسلامشهر و کرج) و خراسان رضوی (مشهد) نمونه برداری

در ژل آگارز 1/2% در بافر TAE (شامل 20 mM Tris-Base، 40 mM [pH=8.0] EDTA 1 mM، Acetic Acid) با ولتاژ 100 ولت به مدت یک ساعت با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی (Agagel mini, Biometra) انجام شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه Gel Document مدل photo print (1-p-1150D) زیر نور UV مشاهده و عکس برداری شد.

#### تعیین ترادف قطعات تکثیر شده و تجزیه داده-ها

بعد از ردیابی TYLCV در نمونه های آلوده بر اساس منطقه نمونه برداری و علائم، چند جدایه برای تعیین ترادف انتخاب شدند و محصولات PCR پس از خالص سازی با کیت استخراج DNA از ژل شرکت Fermentas، به شرکت Gene Service انگلستان ارسال گردید. تجزیه داده ها نیز به دنبال همردیف سازی آنها در بانک ژن جهانی، با استفاده از نرم افزار Clustal X انجام و درخت فیلوژنتیکی حاصل با نرم افزار Mega 4 با Bootstrap 1000 ترسیم گردید.

#### نتایج و بحث

از مجموع تعداد 284 نمونه جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور، قطعه ای به اندازه حدود 670 جفت باز با استفاده از آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی sense و antisense در

#### واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

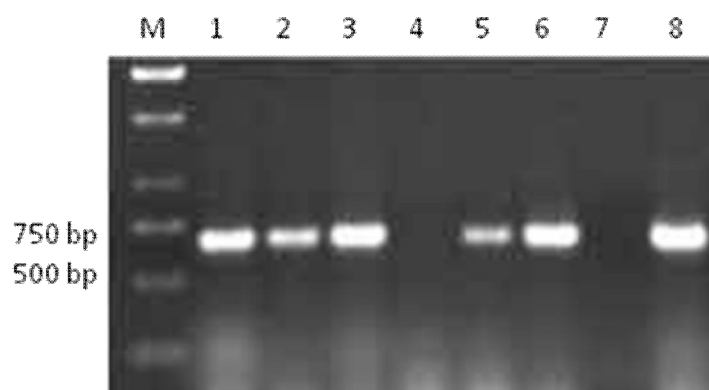
برای تشخیص TYLCV در نمونه ها واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی sense و antisense (Pico et al., 1998)، که قطعه ای به اندازه حدود 670 جفت باز از ژن های پروتئین های پوششی و حرکتی ویروس را تکثیر می کند، استفاده شد. این یک جفت آغازگر برای یک ناحیه مشترک از TYLCV-Sar و TYLCV-Is طراحی شده است. واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل یک واحد از آنزیم Taq DNA polymerase (Fermentas)، 50 نانو گرم از DNA، 2/5 میکرولیتر از بافر واکنش با غلظت ده برابر، 0/9 میکرولیتر از dNTPs (50mM)، 0/5 میکرولیتر از MgCl<sub>2</sub> (10mM)، 10 پیکومول از هر کدام از آغازگرها بود و با آب دیونیزه به حجم نهایی رسانده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز با چرخه های حرارتی شامل یک چرخه به مدت 4 دقیقه در دمای 94 درجه سلسیوس برای واسرشته سازی و سپس 35 چرخه شامل واسرشته شدن، اتصال آغازگر و گسترش به ترتیب به مدت یک دقیقه در دمای 94 درجه سلسیوس، یک دقیقه در دمای 56 درجه سلسیوس و دو دقیقه در دمای 72 درجه سلسیوس و در آخر گسترش نهایی با یک چرخه در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler ep. Gradient, eppendorf, Germany) انجام شد. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز

153 نمونه گوجه فرنگی ردیابی گردید (شکل 1 و جدول 1). در نمونه های جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور، TYLCV در شش استان هرمزگان (سرخون و رضوان)، کرمان (جیرفت)، بوشهر (دشتستان)، خوزستان (دزفول)، فارس (آباد)، تهران (ورامین، پاکدشت، اسلامشهر) ردیابی گردید. از میان مناطق مورد بررسی، آلودگی به TYLCV از مناطق رضوان، دشتستان، دزفول، پاکدشت و اسلامشهر برای اولین بار از کشور گزارش می شود.

جدول 1- نتایج حاصل از ردیابی TYLCV در نمونه های جمع آوری شده با استفاده از آزمون PCR.

Table 1- Results of TYLCV detection using PCR test in collected samples.

گوجه فرنگی (Tomato)		تاریخ نمونه برداری	منطقه
نمونه آلوده	نمونه جمع آوری شده	Date of sampling	Region
Positive samples	Collected samples		
17	17	87/9/7	آباد (Abadeh)
5	25	86/9/23	سرخون (Sarkhun)
69	80	86/9/23	رضوان (Rezvan)
2	4	87/12/17	دشتستان (Dashtestan)
-	4	87/12/17	خورموج (Khormuj)
4	6	87/2/15	جیرفت (Jiroft)
3	5	86/12/1	دزفول (Dezful)
-	10	86/12/10	صفی آباد (Safi Abad)
-	26	87/4/31	اصفهان (Isfahan)
19	27	87/6/5	ورامین (Varamin)
23	32	87/5/13	پاکدشت (Pakdasht)
11	19	87/5/28	اسلامشهر (Islamshahr)
-	11	87/6/1	کرج (Karaj)
-	18	87/6/11	مشهد (Mashhad)
153	284	-	جمع کل



شکل 1- قطعه تکثیر شده به طول 670 bp در نمونه های گوجه فرنگی جمع آوری شده از نقاط مختلف ایران: M: Gene Ruler™ 1 Kb Ladder (Fermentas), 1, 2, 3, 5, 6, نمونه های گوجه فرنگی آلوده به TYLCV، 7) چاهک خالی، 8) کنترل مثبت، 4) کنترل منفی.

**Figure 1- Amplified fragment of 670 bp in tomato samples collected from different parts of the country: M) Gene Ruler™ 1 Kb Ladder (Fermentas), 1, 2, 3, 5, 6) samples infected with TYLCV, 7) Empty, 4) Negative control, 8) Positive control.**

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی محدود به استان های جنوبی کشور نبوده و دامنه آلودگی آن به مناطق مرکزی کشور نیز کشیده شده و میزان آلودگی در مناطق مرکزی کشور و به خصوص استان تهران بسیار بالاست. گواه دیگری بر روند رو به گسترش این ویروس در کشور، معرفی مناطق آلوده جدید طی گزارشات متوالی طی سالیان گذشته است (Bananej *et al.*, 1998; 2008; Shahriary & Bananej, 1998; Pakniat *et al.*, 2008). این موضوع با توجه به کشت گسترده گوجه فرنگی در استان تهران و پتانسیل بالای TYLCV در آلوده کنندگی و کاهش محصول می تواند TYLCV را به عنوان یکی از مهمترین عوامل ممانعت کننده از کشت این محصولات در سالهای آینده در این استان مطرح سازد. گسترش TYLCV در سال های اخیر از نوار جنوبی کشور به مناطق مرکزی خطری جدی برای کشت میزبان های زراعی این

گیاهانی که در واکنش PCR آلودگی آنها به TYLCV اثبات گردید، علائم متفاوتی داشتند به نحوی که علاوه بر وابستگی علائم به نوع رقم میزبان و منطقه جمع آوری نمونه، بعضاً در یک منطقه مشخص و روی یک رقم معین نیز علائم متفاوتی مشاهده شد (شکل 2). تنوع علائم در نمونه های جمع آوری شده می تواند دلیلی بر تنوع ژنتیکی جدایه های ایران باشد. همچنین این علائم متفاوت می تواند ناشی از تفاوت در نوع ارقام گوجه فرنگی و همچنین آلوده شدن گیاه در زمان های متفاوت باشد. این تنوع علائم در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Hajimorad *et al.*, 1996).

نتایج این پژوهش نشان داد که از زمان اولین گزارش از TYLCV از پنج استان جنوبی کشور (Hajimorad *et al.*, 1996)، پراکنش این ویروس دائماً در حال گسترش است و امروزه

دیگر علل گسترش TYLCV می تواند انتقال نشاهای گوجه فرنگی آلوده از منطقه ای به منطقه دیگر و انتقال از طریق میوه های آلوده باشد (Czosnek, 2007).

ویروس به شمار می رود. با توجه به عدم انتقال مکانیکی، بذر بردی و خاک بردی این ویروس، سفید بالک ناقل طبیعی آن به عنوان مهمترین عامل انتقال نقش مهمی در گسترش آن دارد.



شکل 2 - تنوع علائم در گیاهان گوجه فرنگی آلوده به TYLCV. (A) لوله ای شدن شدید برگ ها همراه با زردی جزئی، (B) کوچک شدن و فشردگی شدید برگ ها در انتهای ساقه همراه با زردی جزئی، (C) پیچیدگی جزئی برگ و ایجاد لکه های زرد در پهنک های نسبتاً بزرگ، (D) زردی یکنواخت بوته همراه با توقف رشد و پیچیدگی برگ.

**Figure 2- Symptoms variety observed on plants infected with TYLCV: A) severe leaf curl with slight yellowing, B) small leaflets and end compression with slight yellowing, C) slight leaf curl with yellow spots on leaflets, D) yellowing, stunting and leaf curl.**

نزدیکی دارند. مقایسه میان جدایه های ویروسی که از یک منطقه جمع آوری شده بودند (آباده)، نشان داد که اختلاف زیادی در ناحیه مورد بررسی در بین جدایه های این منطقه وجود ندارد، به طوری که میزان شباهت در بین جدایه های آباده بیش از 99% بود (جدول 3). بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش حداقل

از بین جدایه های مثبت با توجه به نوع علائم و منطقه جغرافیایی تعداد نه جدایه برای مقایسه ترادف ژنوم انتخاب شدند (جدول 2). نتایج حاصل از همردیف سازی ترادف جدایه ها در بانک جهانی ژن NCBI نشان داد که جدایه های مورد بررسی با جدایه های مختلفی از ایران، عمان، مصر و فلسطین اشغالی رابطه

را در گروه های جداگانه قرار داد (Fazeli et al., 2009). در مطالعه (Hong et al., 1995) نیز جدایه های مورد بررسی در سه گروه بر اساس منطقه جغرافیایی قرار گرفتند. با توجه به این که ویروس ها در نقاط جغرافیایی مختلف می توانند نیمرخ های اپیتوبی متفاوت ولی در یک منطقه نیمرخ مشترکی داشته باشند (Macintosh et al., 1992)، مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ژنوم و ترادف آمینو اسیدی پوشش پروتئینی و مطالعه قرابت ژنتیکی آنها تنوع جغرافیایی جدایه ها را نشان می دهد (Padidam et al., 1995).

نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان از گسترش TYLCV به سمت عرض های جغرافیایی بالاتر دارد و حتی در استان هایی همچون تهران که در گذشته آلودگی محدودی در آن ها گزارش شده بود، امروزه گسترش آلودگی را نشان می دهند و شهرستانهای جدیدی از این استان مانند پاکدشت و اسلامشهر به این ویروس آلوده شده اند. این نتایج لزوم بررسی های بیشتر در خصوص پراکنش TYLCV در استان های واقع در عرض های جغرافیایی بالاتر را پیشنهاد می کند. از طرف دیگر بین جدایه های شایع در مناطق مختلف ایران تنوع قابل ملاحظه ای در علائم و ترادف ژنوم وجود دارد. پیشنهاد می شود که ارتباط بین این تنوع علائم و گروه بندی جدایه ها بر اساس ترادف کامل ژنوم نیز مورد بررسی قرار گیرد.

شبهات در بین جدایه های ایران 94/7% است که بین TYLCV-Ir با TYLCV-Ir2 و جدایه D2 (GU585394) و حداکثر شبهات در ناحیه مورد بررسی نیز 100% می باشد که بین TYLCV-Ir2 با جدایه D2 و همچنین بین جدایه های MZ (GU585399) و ES (GU585396) مشاهده گردید. در این بررسی جدایه های مورد مطالعه بر اساس مناطق جغرافیایی از یکدیگر تفکیک شدند. این نتایج نشان می دهد جدایه های ایران حداقل در دو گروه قرار می گیرند. گروه اول جدایه های استان های هرمزگان، کرمان و خوزستان را شامل می شود که رابطه نزدیکی با سویه گزارش شده از کشور عمان (TYLCV-Albitaneh) نشان می دهند و گروه دوم شامل جدایه های استان های بوشهر، فارس و مرکز ایران بوده که در کنار سویه های گزارش شده از مصر (TYLCV-Egypt) و فلسطین اشغالی (TYLCV-Mid) قرار گرفتند (شکل 3). جدایه TYLCV-Ir هم که در گذشته از جنوب ایران گزارش شده بود به تنهایی و کاملاً مجزا از تمام جدایه های مورد بررسی در گروه مستقلی قرار گرفت. نتایج پژوهش های Bananej et al. (2008) با تعیین ترادف بخشی از ناحیه بین ژنی جدایه هایی از چند استان کشور، این جدایه ها را در دو گروه جای داد، در حالی که ترادف انتهای CP این جدایه ها قادر به گروه بندی آنها نبود. مطالعه دیگری نیز با استفاده از مقایسه بخشی از ترادف CP و نیز Rep چند جدایه، آنها



جدول 2- جدایه های انتخابی جهت تعیین ترادف به تفکیک رقم، منطقه و علائم.

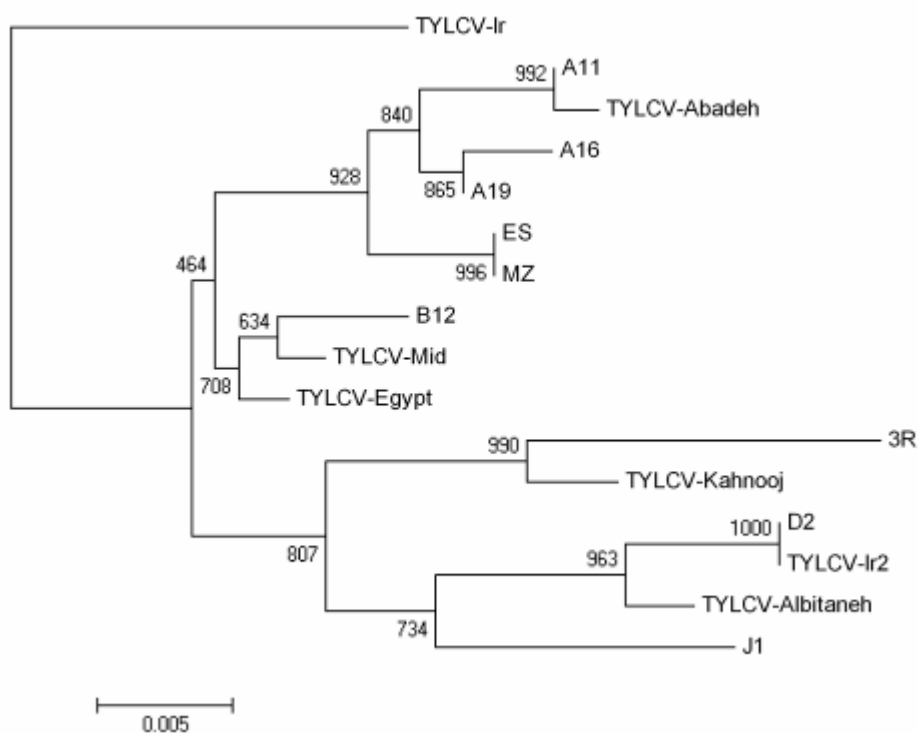
Table 2- List of selected isolates for sequencing based on variety, region and symptoms

کد بانک ژن Accession number	علائم Symptoms	منطقه Region	رقم Variety	نام جدایه Isolate name
GU585384	کوچک شدن و فشردگی شدید برگ ها در انتهای ساقه همراه با زردی جزئی End compression, small leaves with slight yellowing	آباده Abadeh	فالکاتو Falcato	A11
GU585385	لوله ای شدن شدید برگ ها همراه با زردی جزئی Leaf rolling with slight yellowing	آباده Abadeh	فالکاتو Falcato	A16
GU585386	پیچیدگی برگ و لکه های زرد در پهنک های نسبتاً بزرگ Leaf rolling with slight yellowing	آباده Abadeh	فالکاتو Falcato	A19
GU585381	زردی، پیچیدگی برگ و توقف شدید رشد Yellowing, leaf curl and severe stunting	رضوان Rezvan	پی اس PS	3R
GU585397	زردی و پیچیدگی برگ همراه با توقف رشد Yellowing, leaf curl and severe stunting	جیرفت Jiroft	پی اس PS	J1
GU585394	زردی و پیچیدگی برگ همراه با توقف رشد Yellowing, leaf curl and severe stunting	دزفول Dezful	پی اس PS	D2
GU585393	زردی شدید همراه با پیچیدگی جزئی برگ Severe yellowing with slight leaf curl	دشتستان Dashtestan	رویال Royal	B12
GU585396	زردی، پیچیدگی برگ، توقف رشد و فشردگی انتهای ساقه Yellowing, leaf curl, stunting and end compression	اسلامشهر Islamshahr	بنمی Banemi	ES
GU585399	پیچیدگی برگ و ریز برگ و کوتولگی بوته Leaf curl, stunting with small leaves	پاکدشت Pakdasht	وای Y	MZ

جدول 3- ماتریس فاصله جدایه های TYLCV براساس مقایسه دو به دو ترادف دی ان ا ناحیه پروتئین پوششی و حرکتی آنها.

Table 3- Distance matrix of TYLCV isolates based on two by two comparison of their coat protein and movement protein genes.

		Percent Identity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	■	98.2	98.8	98.8	99.2	98.2	96.7	100.0	98.9	98.7	96.7	98.7	96.9	96.7	97.2	98.5	1	MZ
	2	3.9	■	98.1	96.1	96.4	96.7	95.7	98.2	98.5	95.9	96.5	97.2	95.4	95.7	98.4	97.0	2	3R
	3	1.2	4.1	■	99.0	99.3	98.0	96.9	98.8	96.7	99.8	96.5	98.5	96.4	96.9	97.0	98.4	3	A11
	4	1.2	4.1	1.0	■	99.7	98.0	96.9	98.8	96.7	98.8	96.8	98.5	96.4	96.9	97.0	98.4	4	A16
	5	0.8	3.7	0.7	0.3	■	98.4	97.2	99.2	97.0	99.2	97.2	98.8	96.7	97.2	97.4	98.7	5	A19
	6	1.8	3.4	2.0	2.0	1.7	■	97.2	98.2	97.0	97.9	97.7	99.2	97.0	97.2	97.7	99.3	6	B12
	7	3.2	4.2	3.0	3.0	2.7	2.9	■	96.7	97.2	96.7	99.2	96.9	94.7	100.0	96.4	97.0	7	D2
	8	0.0	3.9	1.2	1.2	0.8	1.8	3.2	■	96.9	98.7	96.7	98.7	96.9	96.7	97.2	98.5	8	ES
	9	3.2	3.4	3.4	3.4	3.0	3.0	2.7	3.2	■	96.5	98.0	97.5	96.1	97.2	97.5	97.4	9	J1
	10	1.3	4.2	0.2	1.2	0.8	2.2	3.2	1.3	3.5	■	96.4	98.4	96.2	96.7	96.9	98.2	10	TYLCV-Abadeh
	11	3.2	3.4	3.4	3.0	2.7	2.3	0.8	3.2	1.8	3.6	■	97.4	95.6	99.2	97.2	97.5	11	TYLCV-Albitaneh
	12	1.3	2.9	1.5	1.5	1.2	0.8	3.0	1.3	2.5	1.7	2.5	■	97.5	96.9	98.2	98.5	12	TYLCV-Egypt
	13	3.2	4.8	3.7	3.7	3.4	3.0	5.3	3.2	4.1	3.9	4.4	2.5	■	84.7	96.5	97.4	13	TYLCV-IR
	14	3.2	4.2	3.0	3.0	2.7	2.9	0.0	3.2	2.7	3.2	0.8	3.0	5.3	■	96.4	97.0	14	TYLCV-IR2
	15	2.9	1.7	3.0	3.0	2.7	2.3	3.6	2.9	2.3	3.2	2.7	1.8	3.6	3.6	■	98.0	15	TYLCV-Kahnooj
	16	1.5	3.0	1.7	1.7	1.3	0.7	2.9	1.5	2.7	1.8	2.3	0.5	2.7	2.9	2.0	■	16	TYLCV-Mid



شکل 3- درخت فیلوژنتیکی جدایه های TYLCV براساس تشابه ترادف دی ان ا ناحیه پروتئین پوششی و حرکتی آنها، ترسیم شده با نرم افزار Mega 4.

Figure 3- Phylogenetic tree constructed based on similarity of CP and MP genes using MEGA 4.

- Azizi A, Mozafari J, Shams-bakhsh M (2008). Phenotypic and molecular screening of tomato germplasm for resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Iranian Journal of Biotechnology* 6: 199-206.
- Bananej K, Ahoonmanesh A, Shahraeen N (1998). Occurrence and identification of Tomato yellow leaf curl virus from Khorasan province of Iran. *Proc. of 13<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress. Volume II, Aug. 23-27, 1998. Agricultural Research and Education Organisation (AREO), Karaj, Iran.* p. 193.
- 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 Virology* 149: 1435-1443.
- Bananej K, Vahdat A, Hoseini-salekdeh G (2008). Begomoviruses associated with yellow leaf curl disease of tomato in Iran. *Journal of Phytopathology* 10: 434-439.
- Bedford ID, Kelly A, Banks GK, Briddon RW, Cenis JL, Markham PG (1998). *Solanum nigrum*: an indigenous weed reservoir for a tomato yellow leaf curl geminivirus in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology* 104: 221-222.
- Briddon RW, Stanley J (2006). Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology* 344: 198-210.
- Cohen S, Harpez I (1964). Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomologia Experimentalist Applicata* 7: 155-166.
- Cohen J, Gera A (1995). Lisianthus leaf curl a new disease of lisianthus caused by *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Disease* 79: 416-420.
- Czosneck H (2007) *Tomato yellow leaf curl virus disease*. Springer Publisher Netherland.
- Dellaporta SL, Wood JY, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology* 1: 19-21.
- Fazeli R, Heydarnejad J, Massumi H, Shaabani M, Varsani A (2009). Genetic diversity and distribution 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.
- Heydarnejad J, Mozaffari A, Massumi H, Fazeli R, Gray AJ, Meredith S, Lakay F, Shepherd DN, Martin DP, Varsani A (2009). Complete sequences of tomato leaf curl Palampur virus isolates infecting cucurbits in Iran. *Archives of Virology* 154(6):1015-8.14.
- Hong YG, Harrison BD (1995). Nucleotide sequences from tomato leaf curl viruses from different countries: evidence for three geographically separate branches in the evolution of the coat protein of whitefly-transmitted geminiviruses. *Journal of Genetic Virology* 76: 2043-2049.
- Macintosh S, Robinson DJ, Harrison BD (1992). Detection of three whitefly transmitted geminiviruses occurring in Europe by tests with heterologous monoclonal antibodies. *Annals of Applied Biology* 121: 297-303.
- Navas-Castillo J, Sánchez-Campos S, Díaz JA, Sáez-Alonso E, Moriones E (1999). *Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Is* causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Disease* 83: 29-32.
- Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM (1995). Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of Genetic Virology* 76: 249-263.

- Pakniat Jahromy A, Behjatnia SA, Izadpanah K (2008). A new strain of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in Fars province. Proc. of 18<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress. Volume II, Aug. 24-27, 2008. University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran. P. 491.
- Picó B, Diez MJ, Nuez F (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus – a review. *Science of Horticulture* 67: 151–196.
- Pico B, Diez MJ, Nuez F (1998). Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Euphytica* 101: 259-271.
- Reina J, Morilla G, Bejarano ER, Rodríguez MD, Janssen DY, Cuadrado IM (1999). First report of *Capsicum annum* plants infected by *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Disease* 83: 1176.
- Sanchez-Campos S, Navas-Castillo J, Monci F, Diaz JA, Moriones E (2000). *Mercurialis ambigua* and *Solanum luteum*: two newly discovered natural hosts of tomato yellow leaf curl geminiviruses. *European Journal of Plant Pathology* 106: 391–394.
- Shahriary D, Bananej K (1998). Occurrence of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in tomato fields of Varamin. *Applied Entomology and Phytopathology* 65: 29–30.
- Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger D.C., 2005. Family Geminiviridae. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U, Ball LA (Eds.) *Virus taxonomy: the eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, pp. 301–326.
- Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Kedar N, Rabinowitch H, Czosnek H, Zamir D (1991). Screening of *Lycopersicon* accessions for resistance to tomato yellow leaf curl virus: presence of viral DNA and symptom development. *Plant Disease* 75: 279–281.

## Genetic Diversity and Distribution of *Tomato yellow leaf curl virus* in Fields and Greenhouses of Iran

Mehdi Shirazi<sup>1</sup>, Javad Mozafari\*<sup>2</sup>, Farshad Rakhshandehroo<sup>3</sup> and Masood Shams-Bakhsh<sup>4</sup>

1- M. Sc. Graduate student, Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Associate Professor, Department of Genetics and National Plant Gene- Bank, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4- Associate Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

### Abstract

*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) is considered as one of the most important tomato pathogens in Iran. During the years 2007 to 2009, a total number of 284 symptomatic samples were collected from tomato fields and greenhouses from eight provinces of the country. The PCR test showed that 153 tomato samples from six provinces were infected by TYLCV. This is the first report of TYLCV in Rezvan (Hormozgan), Dashtestan (Bushehr), Dezful (Khuzestan), Pakdasht and Islamshahr (Tehran) regions. Based on geographical region and symptoms, nine isolates from six provinces were selected for further studies. Comparison of an amplified DNA fragment of 670 bp, including a part of coat protein and movement protein genes of the virus, with those of previously reported isolates from Iran and closely related isolates available in GenBank, suggested that Iranian isolates examined in this study were grouped into two major groups. Isolates collected from Hormozgan, Khuzestan and Kerman provinces were grouped with other Iranian isolates including TYLCV-Ir2 and TYLCV-Kahnooj and an isolate from Oman. Whereas, isolates collected from Bushehr, Fars, and Tehran were placed close to the Iranian isolate of TYLCV-Abadeh and isolates from occupied Palestine and Egypt. Based on our study, TYLCV has a high genetic diversity in Iran.

**Keywords:** *Geminivirus, TYLCV, PCR, Solanum lycopersicom*

\*Corresponding author: Javad Mozafari

Tel: 02632701260

Email: jmozafar@yahoo.com