

اولین گزارش از وقوع ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی از مزارع هندوانه شمال استان خوزستان

The first report of *Tomato leaf curl Palampur virus* (ToLCPMV) from the watermelon fields in the north of Khuzestan province

زهره جلوی^۱، سمیرا پاکباز^{۱*}، سارا قارونی کاردانی^۲، مصطفی درویش‌نیا^۱

Zahra Jelavi¹, Samira Pakbaz^{1*}, Sara Gharouni-Kardani², Mostafa Darvishnia¹

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده

کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان

رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

1. Master Student of Plant Pathology, Assistant and Associate Professor of Department of Plant Pathology respectively, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2. Faculty member of Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO), Mashhad, Iran

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: *

pakbaz.s@lu.ac.ir , Samira.pakbaz@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۹)

چکیده

واژه‌های کلیدی

خوزستان،

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی،

هندوانه،

Begomovirus

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (*Tomato leaf curl Palampur virus*, ToLCPMV) یک *Begomovirus* جدید با ژنوم دوبخشی از خانواده *Geminiviridae* و تنها ناقل آن *Bemisia tabaci* می‌باشد. این ویروس اولین بار در سال ۲۰۰۸ از روی گوجه‌فرنگی در نواحی نیمه‌گرمسیری هند و سپس از پاکستان، عمان و عراق گزارش شد. به‌منظور شناسایی ToLCPMV در سال ۱۴۰۰، حدود ۸۰ نمونه هندوانه دارای علائم ویروسی از مزارع شمال استان خوزستان (دزفول، شوش و اندیمشک) جمع‌آوری شد. آزمون PCR به کمک آغازگر دژنره *Begomovirus* (PCRv181/Bc) انجام و قطعه ۵۵۰ جفت‌بازی مربوط به ژن Pre-coat protein روی DNA-A در نمونه‌های آلوده تکثیر شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی این ناحیه در NCBI، حضور ToLCPMV را در مناطق مورد مطالعه تأیید کرد. آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه، توانست بخشی از DNA-B (ژن پروتئین حرکتی و ناحیه بین ژنی) را در ۶۱ نمونه هندوانه تکثیر کند. ترادف‌های نوکلئوتیدی تعیین شده به‌ترتیب و به‌طور میانگین ۹۶/۷۷-۹۰/۰۳ و ۹۷/۲۸-۹۱/۴۳ درصد تشابه نوکلئوتیدی و اسیدآمینهای را با دیگر توالی‌های موجود در NCBI نشان دادند. هر سه جدایه استان خوزستان بیشترین و کمترین شباهت را به جدایه‌های شهر جیرفت استان کرمان و جدایه‌های هند و پاکستان نشان دادند. ToLCPMV تاکنون از استان‌های هرمزگان، کرمان، فارس، یزد و خراسان رضوی از روی گوجه‌فرنگی، انواع کدو، خیار، خربزه و لوبیا و نیز از روی یک نمونه هندوانه در شهرستان خاش استان سیستان و بلوچستان گزارش شده بود. در پژوهش حاضر، پراکنش و میزان خسارت ToLCPMV در برخی مناطق مانند اندیمشک بسیار زیاد بود. این اولین گزارش از وقوع گسترده ToLCPMV در مزارع هندوانه استان خوزستان می‌باشد.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1, 2022

Abstract

Tomato leaf curl Palampur virus (ToLCPMV) is a novel *Begomovirus* from *Geminiviridae* family with a bipartite genome and *Bemisia tabaci* is its unique vector. This virus was reported on tomato in the subtropical regions of India for the first time in 2008 and then from Pakistan, Oman and Iraq. In order to identify this virus, about 80 samples of watermelon with viral symptoms were collected from watermelon fields in the north regions of Khouzestan province (Dezfoul, Shoush and Andimeshk) in 2021. PCR was performed with *Begomovirus* degenerate primer (PCRv181/Bc) and 550 bp fragment of pre-coat protein gene on DNA-A was amplified in the infected samples. Comparison of the nucleotide sequence of this region in NCBI confirmed the presence of ToLCPMV in the studied cities. PCR was able to amplify a part of DNA-B (a part of Movement protein gene and intergenic region) using species-specific primers in 61 watermelon samples. The determined nucleotide sequences showed an average of 90.03-96.67 and 91.43-97.28% nucleotide and amino acid identity with the other NCBI sequences, respectively. The isolates of Khouzestan province showed the most and the least similarity to the isolates of Jiroft city (Kerman province) and the isolates of India and Pakistan. ToLCPMV has been reported from Hormozgan, Kerman, Fars, Yazd and Khorasan Razavi provinces in terms of tomato, types of squash, cucumbers, melons and beans, as well as a watermelon sample in Khash city of Sistan and Balouchestan province. In the present study, the distribution and the amount of damages of ToLCPMV was too much in some areas such as Andimeshk. This is the first report of the widespread occurrence of ToLCPMV in the watermelon fields in Khouzestan province.

Keywords: *Begomovirus*, Khouzestan, ToLCPMV, Watermelon

مقدمه

بیماری‌های ویروسی کدوئیان یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده کشت این محصولات در دنیا هستند. از نظر اقتصادی مهم‌ترین و فراوان‌ترین این ویروس‌ها، اعضاء جنس *Begomovirus* هستند (Brown et al. 2002) و به‌عنوان یکی از جنس‌های مهم خانواده *Geminiviridae*، بیش از ۴۴۰ گونه متنوع را در برمی‌گیرد که در مناطق گرمسیری تا نیمه‌گرمسیری فعالیت می‌کنند (Brown et al. 2015; Fiallo-Olivé et al. 2021) و سبب خسارت‌های اقتصادی بسیاری در نقاط مختلف جهان می‌شوند (Varma and Malathi, 2003). اعضاء این جنس محدود به آوند آبکش بوده و مایه‌زنی مکانیکی در آن‌ها امکان‌پذیر نیست و یا در مواردی به‌سختی انجام می‌شود (Jeske, 2009). *Begomovirus* توسط سفیدبالک (*Bemisia tabaci* (Genn.) منتقل می‌شوند (De Barro et al. 2011) و بیشتر آن‌ها دارای ژنوم دوبخشی از نوع DNA تک رشته‌ای (Single stranded DNA, ssDNA) حلقوی

می‌باشند که درون پیکره‌های دوقلوی به هم چسبیده قرار می‌گیرد (Sánchez-Campos et al. 2013).

ایران به‌عنوان بخشی از منطقه خاورمیانه، یکی از کانون‌های اولیه خسارت ناشی از *Begomovirus*‌های تک‌بخشی و یا دو بخشی است که باعث بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (Tomato leaf curl disease, TLCD) می‌شوند (Lefeuve et al. 2010). ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) با ژنوم تک‌بخشی، اولین بار در سال ۱۹۹۵ از مناطق مرکزی و جنوبی ایران گزارش شد (Hajimorad et al. 1996) و ویروس کوتولگی کلروتیک هندوانه (*Watermelon chlorotic stunt virus*, WmCSV) اولین *Begomovirus* با ژنوم دوبخشی بود که از جنوب ایران گزارش شد (Bananej et al. 1998). پژوهش‌های اخیر، ارتباط *Begomovirus*‌های دارای ژنوم دوبخشی را مانند تک‌بخشی‌ها با DNA‌های وابسته (Satellite) نشان می‌دهد (Venkataravanappa et al. 2019).

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (ToLCPMV) گونه جدیدی از جنس *Begomovirus* بوده و دارای ژنوم دوبخشی و متشکل از دو قطعه ssDNA موسوم به DNA-A و DNA-B می‌باشد. مطالعه ترادف نوکلئوتیدی کامل قطعات ژنومی در این ویروس، حضور هشت چارچوب خوانش ORF را روی ژنوم نشان داد که شش ORF آن روی DNA-A شامل دو ORF روی رشته ویروسی (AV1 و AV2) و چهار ORF دیگر روی رشته مکمل (AC1 تا AC4) و دو ORF نیز روی رشته DNA-B قرار گرفته‌اند. پروتئین‌های کد شده توسط DNA-A، در همانندسازی و بیان ژن نقش دارند (Stanley et al. 2005). دو پروتئین کد شده توسط DNA-B نیز جهت حرکت ویروس در درون و بین سلول‌ها و ظهور علائم در گیاه میزبان ضروری می‌باشند. همانندسازی در این جنس به روش دایره غلتان می‌باشد (Stanley et al. 2005; Hasanvand & Pakbaz, 2022).

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی اولین بار در سال ۲۰۰۸ با علائم زردی و پیچیدگی برگ روی گوجه‌فرنگی در نواحی نیمه‌گرمسیری هند (Kumar et al. 2008) و سپس از روی محصولات فلفل، کدو، گوجه‌فرنگی، خیار، خربزه و هندوانه در پنجاب پاکستان و دیگر مناطق این کشور (Malik et al. 2011) و کدوئیان و بادمجان در هند (Venkataravanappa et al. 2018) شناسایی و گزارش شد. این ویروس اولین بار در ایران از مزارع گوجه‌فرنگی در استان‌های هرمزگان و کرمان ردیابی (Fazeli et al. 2009) و سپس از مزارع و گلخانه‌های خیار و خربزه در این دو استان گزارش شد (Heydarnejad et al. 2009). علاوه بر این، ویروس پالامپور تاکنون از استان‌های فارس، سیستان و بلوچستان، خراسان رضوی (نیشابور) و یزد (تفت) از روی برخی کدوئیان، لوبیا و علف‌های هرز *Chenopodium sp.* و *Heliotropium europaeum* نیز گزارش شده است (Heydarnejad et al. 2013). همچنین فلفل و بادمجان در استان سیستان و بلوچستان، به عنوان میزبان‌های جدید ویروس پالامپور در ایران گزارش شدند (Abkhoo and Mehraban, 2020).

ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در سال ۲۰۱۳ به عنوان یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده گوجه‌فرنگی و انواع کدوئیان (به جزء هندوانه) در مناطق مرکزی و جنوبی ایران معرفی شد، به طوری که میزان خسارت آن در بعضی مناطق تا صد درصد تخمین زده شد. علی‌رغم تلاش‌هایی که برای تشخیص آلودگی هندوانه در این مناطق صورت گرفت، تنها یک نمونه هندوانه در شهر خاش استان سیستان و بلوچستان در آزمایشات مولکولی، آلوده به ToLCPMV تشخیص داده شد (Heydarnejad et al. 2009; Heydarnejad et al. 2013). با توجه به اهمیت و سطح زیرکشت وسیع محصولات کشاورزی از جمله هندوانه در شهرهای شمالی استان خوزستان، مشاهده علائم ویروسی همزمان با جمعیت بالای سفیدبالک‌ها در مزارع هندوانه این مناطق و شناسایی ویروس‌های مخرب و جدیدی از جنس *Begomovirus* روی کدوئیان در نواحی جنوبی کشور، هدف از انجام این تحقیق، شناسایی و ردیابی ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در مزارع هندوانه استان خوزستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج اسیدنوکلئیک: طی بازدید از مزارع هندوانه در شهرهای شمال استان خوزستان (دزفول، شوش و اندیمشک) در بهار و تابستان سال ۱۴۰۰، نمونه‌برداری از بوته‌های دارای علائم ویروسی هم‌چون لکه‌های کلروتیک بین رگبرگی، تاولی شدن و پیچیدگی برگ، ریزبرگی و کوتولگی بوته انجام شد. نمونه‌ها در شرایط خنک و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل و جهت انجام آزمایشات مولکولی استفاده شدند. مقداری از هر نمونه برای نگهداری طولانی مدت به فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB-PVPP (Zhang et al. 1998) انجام و در دمای ۲۰- درجه سانتی-گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای دژنره و تعیین ترادف نوکلئوتیدی: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ابتدا با استفاده از یک جفت آغازگر دژنره و اختصاصی قطعه DNA-A در *Begomovirus*‌های قابل انتقال با سفیدبالک (Bc) و

دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در یک نمونه از واکنش، به جای DNA از آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. جهت رنگ‌آمیزی محصولات PCR از محلول Safe DNA stain شرکت پیشگام استفاده شد و برای مشاهده محصولات تکثیر شده و ارزیابی کمیت و کیفیت آن‌ها، الکتروفورز ژل آگارز یک درصد در حضور نشانگر مولکولی استاندارد ۱۰۰ جفت باز شرکت پیشگام جهت تعیین اندازه قطعات تکثیر شده انجام شد و نتایج با دستگاه ژل داک مشاهده شد.

PCRv181 (Rojas et al. 1993; Deng et al. 1994) (جدول ۱) انجام شد. آزمون PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر کیت 2x PCR Bio Taq Mix Red شرکت PCR Bio system، ۱۰ پیکومول از آغازگرهای رفت و برگشت و ۱۰۰ نانوگرم DNA انجام شد. برنامه حرارتی مورد نیاز برای تکثیر قطعه مورد نظر شامل یک واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت مرحله بسط نهایی در

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. The primers used in this study

Primer Name	Nucleotide Sequence (5'-3')	Fragment	Product Size
Begomo. PCRv181	TAATATTACCGGTGGCC	DNA-A	bp۵۰۰
Begomo. Bc	TGGACYTTTCAWGGBCCTTCACA		
ToLCPMV-1079-F	TTGGGTCACGTTCCGCGACGAAGA	DNA-B	bp~۹۷۵
ToLCPMV-2054-R	TACGCGCTCACAAACGATGCTGCA		

دمای اتصال آغازگرهای اختصاصی در این واکنش ۵۸ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. محصولات تکثیر شده بر اساس شهرهای محل نمونه‌برداری گروه‌بندی شدند و از هر گروه یک نمونه که از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار بود، جهت انجام خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت ماکروژن ارسال شد. نمونه‌ها به کمک آغازگرهای اختصاصی در دو جهت رفت و برگشت خوانش و توالی‌یابی شدند.

رسم درخت و تعیین جایگاه فیلوژنی: توالی‌های ارسال شده از شرکت ماکروژن ابتدا به کمک ابزار نوکلئوتید بلاست در NCBI ارزیابی و تأیید شدند. پس از ویرایش ابتدا و انتهای توالی‌ها و همپوشانی رشته رفت و برگشت به کمک نرم‌افزار BioEdit، توالی‌های نهایی جهت رسم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفتند. چندین توالی نوکلئوتیدی مربوط به قطعات ژنومی DNA-A و DNA-B ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه-فرنگی که در بانک ژن ثبت شده بودند، جهت رسم درخت و تعیین جایگاه فیلوژنی گونه‌های ویروسی ردیابی شده از استان خوزستان استفاده شدند. به این منظور، هم‌ردیف‌سازی چندگانه

محصولات واکنش PCR که با استفاده از آغازگرهای دژنره جنس *Begomovirus* تکثیر شده بودند، بر اساس کیفیت محصول واکنش و نیز منطقه نمونه‌برداری، گروه‌بندی شدند و سپس به-منظور تعیین گونه ویروس، نمونه‌ها جهت خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی توالی‌های به دست آمده با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن با کمک ابزار نوکلئوتید بلاست (Blastn) در NCBI انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگر اختصاصی **ToLCPMV** و تعیین ترادف نوکلئوتیدی: پس از ارزیابی نتایج به‌دست آمده از تعیین ترادف نوکلئوتیدی بر اساس قطعه DNA-A و تعیین گونه ویروس، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه-فرنگی (ToLCPMV) (Heydarnejad et al. 2013) جهت تکثیر بخشی از ناحیه ژنی قطعه DNA-B (جدول ۱) انجام شد. غلظت و مقادیرهای واکنش PCR، کیت تجاری و برنامه حرارتی مشابه واکنش انجام شده جهت تکثیر با استفاده از آغازگرهای دژنره بود.

شناسایی شد (Heydarnejad et al. 2013). در مطالعه دیگری ToLCPMV از خربزه و نیز برای اولین بار از مزارع فلفل و بادمجان استان سیستان و بلوچستان با علائم زردی و موزائیک ردیابی و گزارش شد (Abkhoo and Mehraban, 2020). آلودگی ToLCPMV منجر به کاهش کلی رشد گیاه و عملکرد آن می‌شود. اگر گیاهان در مراحل اولیه رشد آلوده شوند، تولید تقریباً به طور کامل از بین می‌رود (Kumar et al. 2008).

نتایج آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره و اختصاصی ToLCPMV

در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای دژنره *Begomovirus* های قابل انتقال با سفیدبالک، قطعه‌ای به طول حدود ۵۵۰ جفت باز مربوط به بخشی از ژن پیش‌ساز پروتئین پوششی (AV2) روی قطعه ژنومی DNA-A از نمونه‌های دارای علائم تکثیر شد (شکل ۲، a) که نشان‌دهنده آلودگی قطعی نمونه-ها به گونه‌های ویروسی از جنس *Begomovirus* ها بود. در مطالعه قارونی و همکاران این آغازگرهای دژنره توانستند قطعه مورد انتظار را در نمونه‌های گوجه‌فرنگی مشکوک به آلودگی ویروسی تکثیر کنند. مطالعات تکمیلی شامل توالی‌یابی و استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه، منجر به تأیید آلودگی گلخانه‌ها و مزارع گوجه‌فرنگی استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) شد. قطعه تکثیر شده شامل قسمت انتهایی ناحیه بین ژنی و حدود ۲۰۰ جفت باز از ناحیه ۵' ژن پروتئین پوششی (AV2) می‌باشد (Gharouni-Kardani et al. 2014).

پس از خالص‌سازی و توالی‌یابی قطعه تکثیر شده به کمک آغازگرهای دژنره در شرکت ماکروژن، استفاده از ابزار Blastn بانک ژن نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی، بر اساس ترادف نوکلئوتیدی تعیین شده که مربوط به بخشی از قطعه DNA-A بود، متعلق به ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (ToLCPMV)، عضو جدید و مخربی از جنس *Begomovirus* می‌باشند. این توالی دارای ۹۸/۰۲-۸۳/۴۴ درصد شباهت نوکلئوتیدی با دیگر توالی‌های ثبت شده از این ناحیه در NCBI بود و به ترتیب بیشترین و کمترین شباهت را به جدایه ثبت شده

توالی‌های ژنومی (Multiple sequence alignment) با استفاده از ابزار ClustalW در نرم‌افزار Mega7 صورت گرفت و سپس درخت فیلوژنی با روش Maximum Likelihood (ML) و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی (Bootstrap) رسم شد.

نتایج و بحث

نمونه‌برداری و مشاهدات مزرعه‌ای:

طی بازدید و نمونه‌برداری‌های انجام شده در مراحل مختلف رشد از مزارع هندوانه شمال استان خوزستان (شهرهای دزفول، شوش و اندیمشک)، دامنه وسیعی از علائم ویروسی هم‌چون موزائیک، زردی، ضخیم و تاولی شدن سطح برگ، چین‌خوردگی و موج‌دار شدن حاشیه برگ، بدشکلی، ریزبرگی و پیچیدگی برگ‌های انتهایی و کوتولگی روی بوته‌های آلوده دیده شد. این علائم بیشتر در بوته‌های جوان و یا در بخش‌های جوان و انتهایی بوته قابل مشاهده بود (شکل ۱). در اواخر فصل رشد، کم‌رشدی، کاهش عملکرد محصول و خسارت شدید در مزارع مشهود بود. علائم و آلودگی شدید ویروسی مزارع هندوانه در شمال استان خوزستان در طول فصل رشد به همراه جمعیت بالا و گسترده حشره ناقل *B. tabaci* در این مناطق بود.

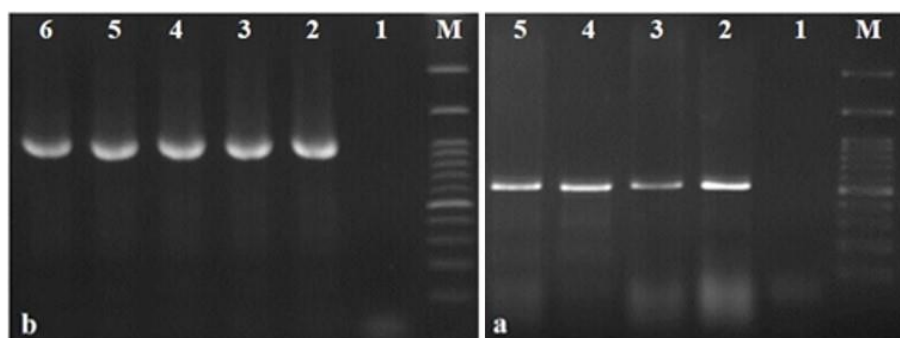
در پژوهش‌های پیشین نیز علائم ویروس پالامپور به صورت کلروز بین رگبرگی و حاشیه برگ، زردی، پیچش برگ و موزائیک توصیف شده بود. در مطالعه حیدرناژاد و همکاران، علائم روی کدو حلوائی شامل موزائیک شدید و تاول و نیز در لوبیا شامل پیچ‌خوردگی برگ، زردی، ریزبرگی و کوتولگی بود. این ویروس به عنوان عامل اصلی خسارت در انواع کدوئیان به غیر از هندوانه و به خصوص در گلخانه‌های خیار در مناطق مرکزی و جنوبی ایران معرفی شده بود (Heydarnejad et al. 2009). اما در نمونه-برداری‌های انجام شده از مزارع شهر خاش استان سیستان و بلوچستان، یک نمونه از ۵۶ نمونه جمع‌آوری شده از هندوانه با علائم ریزبرگی و کوتولگی بوته، پیچیدگی حاشیه برگ به سمت داخل و لکه‌های زرد در سطح برگ آلوده به ویروس پالامپور

از شهر جیرفت استان کرمان (JQ825226) و جدایه‌های کشور هند به خصوص MT433970 داشت. پس از تأیید گونه ویروسی، از آغازگرهای اختصاصی گونه ToLCPMV جهت انجام واکنش PCR استفاده شد (Heydarnejad *et al.* 2013).



شکل ۱- علائم ToLCPMV در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع هندوانه استان خوزستان (دزفول، شوش و اندیمشک). (a) موزائیک، زردی و کم رشدی محصول. (b) زردی، ضخیم و متورم شدن سطح برگ و چین خوردگی حاشیه برگ. (c) ریزبرگی، تغییر شکل و رنگ برگ‌های آلوده انتهایی و جوان بوته نسبت به برگ‌های سالم در همان بوته. (d, e, f) زردی شدید، کم رشدی، پیچیدگی و بدشکلی بوته‌های آلوده.

Fig 1. Symptoms of ToLCPMV in samples collected from the watermelon fields of Khuzestan province (Dezfoul, Shoush and Andimeshk). a) Mosaic, yellowing and reduced growth. b) Yellowing, thickening and swelling of the leaf surface and wrinkling of the leaf margin. c) Small leaves, deformation and discoloration of infected and young leaves at the end of the plant compared to the healthy leaves. d, e, f) Severe yellowing, stunted growth, curling and deformation in infected plants.



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی محصولات واکنش PCR روی ژل آگارز یک درصد. M: نشانگر مولکولی (100 bp). چاهک دوم از سمت راست: شاهد منفی. (a) استفاده از آغازگرهای دژنره *Begomovirus* ها (PCRv181 و Bc) و تکثیر قطعه‌ای به طول 550 bp. (b) استفاده از آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV و تکثیر قطعه‌ای به طول حدود 975 bp.

Fig 2. Electrophoresis pattern of PCR products on 1% agarose gel. M: Molecular marker (100 bp). Second well from the right: Negative control. a) using *Begomovirus* degenerate primers (PCRv181 and Bc) and amplification of a 550 bp fragment. b) using ToLCPMV specific primers and amplification of a ~975bp fragment.

برگشت توالی‌یابی شد. سپس توالی‌های دریافتی در سایت NCBI ارزیابی شدند و ابزار Blastn تأیید کرد که جدایه‌های مورد بررسی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه BC1-MP و ناحیه بین ژنی روی DNA-B متعلق به ToLCPMV هستند و از قابلیت بررسی فیلوژنتیکی مناسبی با جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن برخوردار می‌باشند. جدایه‌های مورد مطالعه به طور میانگین به ترتیب دارای ۹۶/۶۷-۹۰/۰۳ و ۹۷/۲۸-۹۱/۴۳ درصد تشابه نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای با دیگر توالی‌های ثبت شده از این ناحیه در NCBI بودند. شماره‌های دسترسی جدایه‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر در جدول ۲ ذکر شده است. نتایج به دست آمده از مقایسه توالی‌ها در بانک ژن بر اساس قطعه DNA-B نیز بیشترین درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی را بین جدایه‌های خوزستان و جدایه‌های ثبت شده از شهر جیرفت در استان کرمان نشان داد.

جدول ۲- شماره‌های دسترسی بانک ژن مربوط به جدایه‌های ToLCPMV توالی‌یابی شده در این مطالعه

Table 2. The GenBank accession numbers related to ToLCPMV isolates sequenced in this study

Host	Accession number	Genomic fragment	Location
<i>Citrullus lanatus</i>	ON324063	DNA-A	Andimeshk
<i>Citrullus lanatus</i>	OM831132	DNA-B	Dezfoul
<i>Citrullus lanatus</i>	OM831133	DNA-B	Shosh
<i>Citrullus lanatus</i>	OM831134	DNA-B	Andimeshk

جهت تعیین روابط و جایگاه فیلوژنتیکی، هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های استان خوزستان به همراه چندین جدایه دیگر از ToLCPMV موجود در بانک ژن و مربوط به میزبان‌ها و مناطق جغرافیایی مختلف از جمله ایران و سایر کشورها (جدول ۳) به کمک ابزار ClustalW انجام شد و درخت فیلوژنی بر اساس تطابق ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین حرکتی با روش Maximum Likelihood با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی رسم گردید.

بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه تعیین شده روی قطعه ژنومی DNA-A، جدایه‌های مورد بررسی در درخت فیلوژنی در دو گروه I و II قرار گرفتند (شکل ۳). گروه I دارای دو زیرگروه بود. جدایه استان خوزستان بیشترین شباهت را با جدایه‌های شهر جیرفت استان کرمان از روی میزبان‌های خیار (JQ825226) و

این آغازگرها توانستند قطعه‌ای به طول حدود ۹۷۵ جفت باز شامل بخشی از ژن پروتئین حرکتی (BC1-MP) و ناحیه بین ژنی (Intergenic region) ویروس پالامپور که بر روی DNA-B قرار گرفته است را به‌خوبی تکثیر کنند (شکل ۲، b) و در واقع ویروس خسارات‌زای ToLCPMV از مزارع هندوانه سه شهر دزفول، شوش و اندیمشک واقع در شمال استان خوزستان برای اولین بار شناسایی و گزارش شد. از مجموع ۸۰ نمونه جمع‌آوری شده از مزارع هندوانه این مناطق، تعداد ۶۱ نمونه آلوده به ToLCPMV شناسایی شدند که ۳۲/۴۰ نمونه (۳۲ نمونه از کل ۴۰ نمونه جمع‌آوری شده) متعلق به دزفول، ۱۳/۱۵ نمونه متعلق به اندیمشک و ۱۶/۲۵ نمونه متعلق به شهر شوش بود. این نتایج با پژوهش‌های صبوری و حیدرنازاد در سال ۱۳۹۲ مطابقت داشت. در این مطالعات به کمک آغازگرهای اختصاصی ToLCPMV-1079-F/ToLCPMV-2054-R قطعه‌ای حدود ۹۷۵ جفت باز از بخشی از ژنوم B در نمونه‌های آلوده خیار تکثیر شد (Sabori and heydarnejad, 2013).

در پژوهشی دیگر، تکثیر به کمک این آغازگرها در محدوده مورد انتظار انجام و ویروس پالامپور در گیاهان گوجه‌فرنگی (۷۱/۱۲۴)، خیار (۳۷۱/۴۶۲)، سه رقم مختلف محلی خربزه (۸۰/۸۲)، کدو حلواپی (۷۷/۷۸)، هندوانه (۱/۵۶) و همچنین لوبیا (۲/۱۲۵) در گلخانه‌های تجاری، تونل‌های پلاستیکی و یا مزارع استان‌های هرمزگان (میناب، دهبازر، برانتین، رودان و حاجی آباد)، سیستان و بلوچستان (خاش، ایرانشهر و لادیز)، کرمان (کرمان، جیرفت و کهنوج)، فارس (ممسنی، داراب، خنج، کاور و ظفرآباد)، یزد (تفت) و خراسان رضوی (نیشابور) شناسایی و گزارش شد (Heydarnejad et al. 2013; Esmaeili et al. 2015). در سال ۲۰۱۱ در شهر پنجاب هند، ۴۲ نمونه گوجه‌فرنگی با این آغازگرهای دژنره مورد آزمایش قرار گرفتند که ۲۰ نمونه از نظر جنس *Begomovirus* مثبت بودند و در بین آن‌ها شایع‌ترین ویروس، ToLCPMV بود (Gaikwad et al. 2011).

نتایج توالی‌یابی و تعیین جایگاه فیلوژنی:

پس از گروه‌بندی محصولات تکثیر شده بر اساس کیفیت و منطقه نمونه‌برداری، یک نمونه از هر شهر در هر دو جهت رفت و

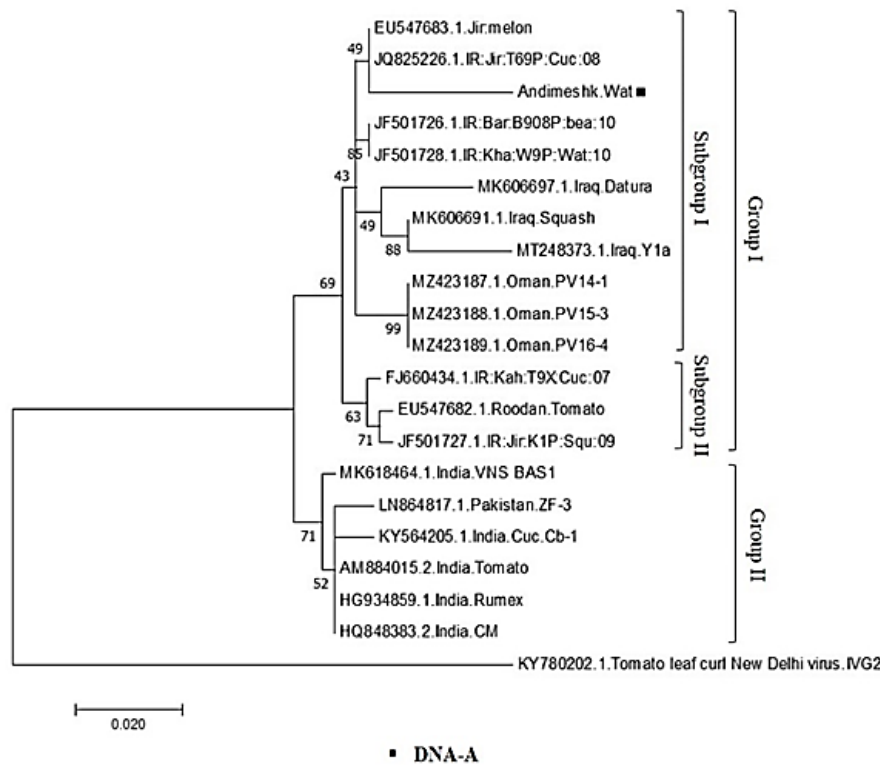
میزبان‌های مختلفی چون خیار، خربزه، گوجه‌فرنگی، پاپایا، ترشک و *Basella alba* قرار گرفت. تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی ToLCPMV بر اساس توالی کامل DNA-A نشان داده است که اکثر جدایه‌های پاکستانی این ویروس از جدایه‌های هندی و ایرانی آن جدا می‌شوند (Malik et al. 2011; Kumar et al. 2011). در رسم این درخت از جدایه IVG2 (KY780202) *Tomato leaf* و ویروس نیودله‌لی پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (*curl New Delhi virus*, ToLCNDV) به عنوان برون گروه (Outgroup) استفاده شد. این ویروس اولین بار در سال ۱۹۹۹ از روی سیب‌زمینی در هند گزارش شد (Usharani et al. 2004) و در استان خوزستان نیز از روی محصول خربزه گزارش شده است (Yazdani- Khameneh et al. 2016).

خربزه (EU547683) داشت و در زیرگروه I (subgroup I) در یک شاخه مجزا در کنار این جدایه ها قرار گرفت. دو جدایه ایرانی دیگر از روی میزبان‌های لوبیا و هندوانه به ترتیب از شهر برائتین استان هرمزگان و شهر خاش استان سیستان و بلوچستان در یک شاخه جداگانه در زیرگروه I قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های مربوط به کشور عراق و نیز عمان در شاخه‌های مجزایی در این زیرگروه طبقه بندی شدند. زیرگروه II نیز شامل جدایه‌های ایرانی از مناطق مختلفی چون شهر کهنوج استان کرمان، رودان استان هرمزگان و جیرفت استان کرمان به ترتیب از روی میزبان‌های خیار، گوجه‌فرنگی و کدو بود. بنابراین جدایه‌های ایرانی همه در گروه I طبقه‌بندی شدند. در گروه II یک جدایه از پاکستان و جدایه‌های مربوط به مناطق مختلف کشور هند از روی

جدول ۳- شماره دسترسی و مشخصات جدایه‌های ToLCPMV موجود در بانک ژن استفاده شده در تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی

Table 3. Accession numbers and characterizations of ToLCPMV isolates in GenBank used in phylogenetic analyses

Genomic fragment	Accession number	Host	Country	Genomic fragment	Accession number	Host	Country
DNA-A	JQ825226	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Jiroft	DNA-B	FJ660427	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Jiroft
DNA-A	EU547683	<i>Cucumis melo</i>	Iran: Jiroft	DNA-B	FJ660430	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Jiroft
DNA-A	JF501727	<i>Cucurbita pepo</i>	Iran: Jiroft	DNA-B	FJ660426	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Jiroft
DNA-A	JF501728	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran: Khash	DNA-B	FJ660428	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Jiroft
DNA-A	JF501726	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Iran: Barantin	DNA-B	FJ668379	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Kerman
DNA-A	EU547682	<i>Solanum lycopersicum</i>	Iran: Roodan	DNA-B	FJ660429	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Jiroft
DNA-A	FJ660434	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Kahnootj	DNA-B	FJ660425	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Jiroft
DNA-A	MK606697	<i>Datura</i>	Iraq	DNA-B	FJ660424	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Kahnootj
DNA-A	MK606691	<i>Cucurbita pepo</i>	Iraq	DNA-B	FJ660423	<i>Cucumis sativus</i>	Iran: Jiroft
DNA-A	MT248373	<i>Cucurbita pepo</i>	Iraq	DNA-B	EU547681	<i>Cucumis melo</i>	Iran: Jiroft
DNA-A	MZ423187	<i>Carica papaya</i>	Oman	DNA-B	FJ660442	<i>Solanum lycopersicum</i>	Iran: Hormozgan
DNA-A	MZ423188	<i>Carica papaya</i>	Oman	DNA-B	MZ423192	<i>Carica papaya</i>	Oman
DNA-A	MZ423189	<i>Carica papaya</i>	Oman	DNA-B	MZ423190	<i>Carica papaya</i>	Oman
DNA-A	LN864817	<i>Carica papaya</i>	Pakistan	DNA-B	MZ423191	<i>Carica papaya</i>	Oman
DNA-A	MK618464	<i>Basella alba</i>	India	DNA-B	MH577029	<i>Solanum lycopersicum</i>	India
DNA-A	KY564205	<i>Cucumis sativus</i>	India	DNA-B	KY564207	<i>Cucumis sativus</i>	India
DNA-A	AM884015	<i>Solanum lycopersicum</i>	India	DNA-B	KC456162	<i>Solanum lycopersicum</i>	India
DNA-A	HG934859	<i>Rumex</i>	India	DNA-B	KY564206	<i>Musk melon</i>	India
DNA-A	HQ848383	<i>Cucumis melo</i>	India	DNA-B	KT895906	<i>Rumex nepalensis</i>	India
DNA-A	KY780202	Ivy gourd	India	DNA-B	AM992534	<i>Solanum lycopersicum</i>	India
				DNA-B	MH577027	<i>Solanum lycopersicum</i>	India
				DNA-B	MK618465	<i>Basella alba</i>	India
				DNA-B	MN181386	<i>Capsicum annum</i>	Pakistan
				DNA-B	LN864818	<i>Carica papaya</i>	Pakistan
				DNA-B	MG252784	<i>Cucumis sativus</i>	Pakistan
				DNA-B	MN993649	<i>Capsicum annum</i>	Pakistan
				DNA-B	FR851930	<i>Cucumis melo</i>	Pakistan
				DNA-B	FR856888	<i>Cucumis melo</i>	Pakistan



■ DNA-A

شکل ۳- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی تعیین شده روی قطعه ژنومی DNA-A ویروس ToLCPMV جدایه‌های استان خوزستان و برخی از جدایه‌های موجود در بانک ژن. رسم درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 به روش Maximum Likelihood با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی انجام شده است. جدایه توالی‌یابی شده در این مطالعه با ■ در درخت مشخص شده است.

Fig 3. Phylogenetic tree drawn based on the nucleotide sequence determined on DNA-A of ToLCPMV in Khuzestan province isolates and some isolates in GenBank. Tree was constructed by MEGA7 software using Maximum Likelihood method with 1000 replicates of bootstrap test. The isolate sequenced in this study is marked with ■ in the tree.

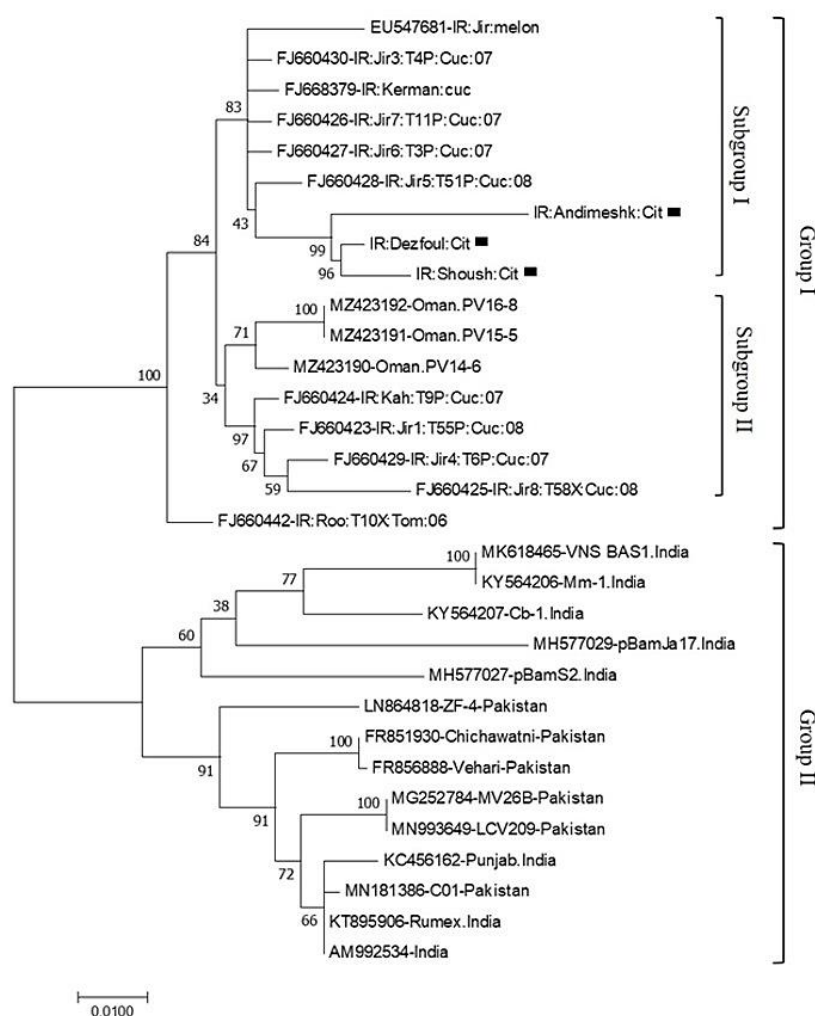
یک جدایه از شهر کرمان در کنار هم و به طور مجزا از جدایه‌های خوزستان در زیرگروه I قرار گرفتند. سه جدایه مربوط به کشور عمان در یک زیرشاخه مجزا در زیرگروه II قرار گرفتند و جدایه‌های استان کرمان شامل شهر جیرفت و کهنوج در کنار هم در یک زیرشاخه جداگانه در این زیرگروه قرار گرفتند. یک جدایه از شهر رودان استان هرمزگان نیز در گروه I قرار گرفت، ولی در هیچ زیرگروهی طبقه‌بندی نشد. گروه II نیز شامل دو زیرگروه بود که زیرگروه I تنها جدایه‌های هندی را شامل شد و در زیرگروه II جدایه‌های مربوط به کشور پاکستان و تعدادی جدایه هندی را در خود جای داد. در پژوهشی، ویروس پالامپور با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی در سه محصول خربزه، بادمجان و فلفل از شهرستان‌های زابل، زهک و هیرمند منطقه سیستان ردیابی شد. ترادف‌های نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی این سه جدایه، ۹۲ تا ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی را با

با توجه به اینکه هر دو ویروس اولین بار از هند گزارش شدند (Juárez *et al.* 2019)، تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی نشان داده است که ToLCPMV شباهت زیادی به ToLCNDV که یکی دیگر از Begomovirus‌های مخرب در کشور هند است، دارد. میزان شباهت این دو ویروس در قطعات DNA-A و DNA-B به ترتیب حدود ۸۴ و ۶۸ درصد است (Heydarnejad *et al.* 2009).

بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ناحیه تعیین شده روی قطعه ژنومی DNA-B بر اساس پرایمرهای اختصاصی، جدایه‌های مورد بررسی در درخت فیلوژنی در دو گروه I و II قرار گرفتند که هر گروه دارای دو زیرگروه بود (شکل ۴). جدایه‌های ایرانی همه در گروه I قرار گرفتند. هر سه جدایه استان خوزستان (دزفول، شوش و اندیمشک) در یک زیرشاخه مجزا در زیرگروه I قرار گرفتند. تعدادی از جدایه‌های ویروس پالامپور مربوط به شهر جیرفت و

در مورد همه‌گیری ToLCPMV نشان داد که این ویروس از کشور همسایه (پاکستان) وارد ایران شده است و به سرعت از جنوب شرقی کشور به سمت جنوب، نواحی شمال شرقی و مرکزی ایران که دارای آب و هوای گرم هستند، در حال حرکت است و ویروس در چندین محصول از جمله گوجه‌فرنگی، خیار، خربزه و کدو حلوائی در گلخانه‌های تجاری، تونل‌های پلاستیکی و مزارع مشکل‌ساز شده است.

سایر جدایه‌های ویروس در بانک ژن نشان دادند و درخت تبارزایی ترسیم شده براساس ترادف ژن پروتئین پوششی نشان داد که جدایه‌های منطقه سیستان با جدایه‌های ایرانی گروه‌بندی می‌شوند. همچنین تکثیر و سپس ترادف نوکلئوتیدی ژن زیرواحد شماره یک سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی نشان داد که نمونه‌های *B. tabaci* جمع‌آوری شده از منطقه سیستان به همراه سایر نمونه‌های سفیدبالک ایرانی در گروه بیوتیپ B قرار می‌گیرند (Abkhoo and Mehraban, 2020). مطالعات انجام شده



■ DNA-B

شکل ۴- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی تعیین شده روی قطعه ژنومی DNA-B ویروس ToLCPMV جدایه‌های استان خوزستان و برخی از جدایه‌های موجود در بانک ژن. رسم درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 به روش Maximum Likelihood با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی انجام شده است. جدایه‌های توالی‌یابی شده در این مطالعه با ■ در درخت مشخص شده است.

Fig 4. Phylogenetic tree drawn based on the nucleotide sequence determined on DNA-B of ToLCPMV in Khuzestan province isolates and some isolates in GenBank. Tree was constructed by MEGA7 software using Maximum Likelihood method with 1000 replicates of bootstrap test. The isolates sequenced in this study is marked with ■ in the tree.

Begomovirus ها روی محصولات کشاورزی و در نتیجه شیوع و همه‌گیری ویروس‌های این جنس فراهم می‌کند. هم‌چنان‌که خسارت ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV*) از جنس نام‌برده در نواحی جنوبی کشور به حدی بالاست که کشاورزان در صورت جایگزین نکردن گیاهی دیگر جهت کشت، نمی‌توانند هیچ محصولی برداشت کنند (Tousi & Eini, 2016). به نتایج مطالعات پژوهش حاضر برای اولین بار حضور ویروس پالامپور پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (*ToLCPMV*) را به طور گسترده در مزارع هندوانه مناطق شمالی استان خوزستان تأیید کرد. پراکنش و میزان خسارت این ویروس در برخی مناطق مانند اندیمشک بسیار زیاد بود. باتوجه به وقوع، پراکنش و خسارت وسیع این بیماری در مزارع هندوانه استان خوزستان، به نظر می‌رسد این ویروس به سرعت در حال پیشروی روی محصولات میزبان خود در کشور به خصوص در مناطق جنوب غربی و غرب کشور می‌باشد و به‌طور قطع، در صورت عدم مدیریت و همچنین استفاده بی‌رویه از حشره‌کش‌ها توسط کشاورزان که منجر به مقاومت جمعیت‌های سفیدبالک می‌شود، در چند سال آینده میزبان‌های این ویروس در کل کشور درگیر خسارت‌های جبران ناپذیر آن خواهند شد. همچنین ظهور نژاد و گونه‌های جدید ویروسی مشابه، به دلیل نوترکیبی و جهش در ژنوم و نیز تغییر شرایط اقلیمی دور از انتظار نیست.

این مطالعات هشدار دادند که اپیدمی‌های شدید *ToLCPMV*، آینده کشت گوجه‌فرنگی و کدو را در مناطق نام‌برده که از جهت تولید این محصولات با اهمیت هستند، تهدید می‌کند (Heydarnejad et al. 2009; Heydarnejad et al. 2013).

در کشور هند، بیماری پیچیدگی برگ و زردی هندوانه که مرتبط با *ToLCPMV* بود، برای اولین بار در سال ۲۰۲۱ گزارش شد. در چهار جدایه هر دو قطعه DNA-A و DNA-B و در دو جدایه تنها قطعه DNA-A ردیابی و به طور کامل توالی‌یابی شد. تجزیه و تحلیل‌های توالی ژنوم نشان داد که میزان شباهت نوکلئوتیدی این شش جدایه با ویروس پالامپور، ۹۳/۳-۹۱/۵ و ۸۰/۸۴-۲/۵ درصد به‌ترتیب در هر یک از قطعات DNA-A و DNA-B می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد که جدایه‌های هندوانه در این مطالعه، از نوترکیبی *ToLCPMV* و *ToLCNDV* به وجود آمده‌اند. نگاهی به سرعت گسترش دامنه میزبانی *ToLCPMV*، نشان می‌دهد که این بیماری در آینده نزدیک به یکی از محدودیت‌های عمده تولید در محصولات متعلق به خانواده‌های *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Basellaceae*, *Leguminaceae* و *Malvaceae* تبدیل خواهد شد (Hanamasagar et al. 2021).

نتیجه‌گیری کلی

استان خوزستان که در جنوب غربی ایران واقع شده و یکی از تأمین‌کننده‌های محصولات سبزی و صیفی در کشور است، به دلیل دارا بودن آب و هوای گرم، شرایط مساعدی را برای کشت کدوئیان و همچنین فعالیت و گسترش سفیدبالک‌های ناقل

منابع

- Abkhoo J, Mehraban A. 2020. Genetic diversity of *Tomato leaf curl Palampur virus* and its whitefly vector, *Bemisia tabaci*, in the Sistan region. *Journal of Microbial World* 13(13): 290-299. (In Farsi with English abstract).
- Bananej K, Kheyr-Pour A, Ahoonmanesh A. 1998. Identification of *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) in Iran. In: *Proceeding of the 13th Iranian Plant Protection Congress*, Karaj, Iran. P194.

- Brown JK, Idris AM, Alteri C, Stenger DC. 2002. Emergence of a new cucurbit-infecting *Begomovirus* species capable of forming viable reassortants with related viruses in the *Squash leaf curl virus* cluster. *Phytopathology* 92: 734-742.
- Brown JK, Zerbini FM, Navas-Castillo J, Moriones E, Ramos-Sobrinho R, Silva JCF. 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archive of Virology* 160: 1593-1619. doi: 10.1007/s00705-015-2398-y.
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species

- status. Annual Review of Entomology 56: 1-19. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085504.
- Deng D, Mcgrath PF, Robinson DJ, Harrison BD. 1994.** Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology* 125: 327-336.
- Esmaili M, Heydarnejad J, Massumi H, Varsani A. 2015.** Analysis of *Watermelon chlorotic stunt virus* and *Tomato leaf curl Palampur virus* mixed and pseudo-recombination infections. *Virus Genes* 51(3): 408-416. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1250-5>.
- Fazeli R, Heydarnejad J, Massumi H, Shabanian M. 2009.** Genetic diversity and distribution of tomato-infecting begomoviruses in Iran. *Virus Genes* 38: 311-319.
- Fiallo-Olivé E, Lett JM, Martin DP, Roumagnac P, Varsani A, Zerbini FM, Navas-Castillo J. 2021.** ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae* 2021. *J Gen Virol.* Dec;102(12):001696. doi: 10.1099/jgv.0.001696. PMID: 34919512; PMCID: PMC8744271.
- Gaikwad KA, Sharma A, Cheema DS. 2011.** Molecular detection and characterization of leaf curl virus infecting tomato in Punjab, India. *Acta Horticulturae [III International Symposium on Tomato Diseases, Ischia, Italy.]* 914: 153-156.
- Gharouni Kardani S, Jafarpour B, Mehrvar M, Tarighi S. 2014.** Identification and Sequencing of Coat Protein Gene of TYLCV Isolates from Khorasan Razavi Southern and Northern Khorasan Provinces. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 27(4): 427-433. doi: 10.22067/jpp.v27i4.29879. (In Farsi with English abstract).
- Hajimorad M, 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.
- Hanamasagar Y, Naganur P, Shankarappa KS, Venkataravanappa V, Lakshminarayana Reddy CN. 2021.** Characterization of *Tomato leaf curl Palampur virus* associated with leaf curl and yellowing disease of watermelon from India. *Indian Phytopathology* 74: 1075-1088. doi.org/10.1007/s42360-021-00394-4.
- Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S. 2013.** Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology* 11: 777-788. doi: 10.1038/nrmicro3117.
- Hasanvand E, Pakbaz S. 2022.** Genome Packaging in Plant Viruses. *Genetic Engineering and Biosafety* Journal. 10 (2) :311-320 URL: <http://gebsj.ir/article-1-417-fa.html> (In Farsi with English abstract).
- Heydarnejad J, Hesari M, Massumi H, Varsani A. 2013.** Incidence and natural hosts of *Tomato leaf curl Palampur virus* in Iran. *Australasian Plant Pathology* 42: 195-203.
- Heydarnejad J, Mozaffari A, Massumi H, Fazeli R, Gray AJ, Meredith S, Lakay F, Shepherd DN, Martin DP, Varsani A. 2009.** *Archives of Virology* 154(6): 1015-1018.
- Jeske H. 2009.** Geminiviruses. In: Villiers EM, Hausen HZ. (eds). *TTViruses: The Still Elusive Human Pathogenes*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp: 185-226.
- Juárez M, Rabadán MP, Martínez LD, Tayahi M, Grande-Pérez A, and Gómez P. 2019.** Natural hosts and genetic diversity of the emerging *Tomato leaf curl New Delhi virus* in Spain. *Front. Microbiology* 10: 140. doi: 10.3389/fmicb.2019.00140
- Kumar Y, Hallan V, Zaidi AA. 2008.** Molecular characterization of a distinct bipartite begomovirus species infecting tomato in India. *Virus enes* 37: 425-431.
- Kumar Y. 2011.** Genome Organization and Mechanism of RNA Silencing Suppression of Begomoviruses Infecting Some Solanaceous Crops. Ph. D. Institute of Himalayan Bioresource Technology.
- Lefevre P, Martin DP, Harkins H, Lemey P, Gray A, Meredith S, Lakay F, Monjane AL, Lett JM, Varsani A, Heydarnejad J. 2010.** The spread of *Tomato yellow leaf curl virus* from the Middle East to the world. *PLoS Pathogen* 28: 6.
- Malik AH, Briddon RW, Mansoor S. 2011.** Infectious clones of *Tomato leaf curl Palampur virus* with a defective DNA B and their pseudo-recombination with *Tomato leaf curl New Delhi virus*. *Virology* 8(1): 173.
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP. 1993.** Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly transmitted Geminiviruses. *Journal of Plant Disease* 77: 340-347.
- Sabori M, heydarnejad J. 2013.** Construction and demonstration of infectivity of the infectious clone of the bipartite genome of *Tomato leaf curl Palampur virus* Iranian isolate. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49(4): 403-409. (In Farsi with English abstract).
- Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC. 2005.** Family geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus taxonomy: the eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic, New York, pp 301-326.

- Tousi N, Eini O. 2016.** In Silico Analysis Reveals that Various Tomato microRNAs target a Mild and Severe Species of ToLCV. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*. 5 (1) :15-22 URL: <http://gebsj.ir/article-1-132-fa.html> (In Farsi with English abstract).
- Usharani K S, Sarendranath B, Paul-Kharana S M, Garg L D, and Malathi V G. 2004.** Potato leaf curl- New disease of potato in northern India causes by a strain of *Tomato leaf curl New Delhi virus*. *Plant Pathology* 53: 235.
- Varma A, Malathi VG. 2003.** Emerging *Geminivirus* problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142: 145-164.
- Venkataravanappa V, Lakshminarayanareddy CN, Shankarappa KS, Jayappa J, Pandey S, Reddy MK. 2019.** Characterization of Tomato leaf curl New Delhi virus and DNA-satellites association with mosaic disease of cucumber. *Int J Biotechnol Bioeng* 5(6): 93-109.
- Venkataravanappa V, Prasanna HC, Lakshminarayana CN, rishna Reddy M. 2018.** Molecular Detection and Characterization of Phytoplasma in Association With *Begomovirus* in Eggplant. *Acta Virology* 62(3): 246-258.
- Yazdani-Khameneh S, Aboutorabi S, Shoori M, Aghazadeh A, Jahanshahi P, Golnaraghi A, Maleki M. 2016.** Natural Occurrence of *Tomato leaf curl New Delhi virus* in Iranian Cucurbit Crops. *Plant Pathology Journal* 32(3): 201-208.
- Zhang Y, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC. 1998.** A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virology Methods* 71: 45-50.