

بر همکنش ویروس‌های عامل بیماری پیچیدگی بوته چغندر قند با ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی در گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه*

سیدعلی اکبر بهجت‌نیا^{۱*}، درنا جهان‌بین^۱، کرامت‌اله ایزدپناه^۱ و علی مقدم^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۱۶)

چکیده

استرین شدید ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند (*Beet curly top virus, BCTV-Svr*) و ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند (*Beet curly top Iran virus, BCTIV*) به ترتیب از جنس‌های *Curtovirus* و *Becurtovirus* به عنوان عوامل بیماری پیچیدگی بوته چغندر قند از ایران گزارش شده‌اند. علاوه بر چغندر قند، گوجه‌فرنگی و فلفل هم از مهم‌ترین میزبان‌های اقتصادی این دو گونه جمینی ویروس در ایران محسوب می‌شوند. همچنین بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی نیز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی گوجه‌فرنگی می‌باشد که توسط گونه‌های متنوعی از جنس *Begomovirus* از جمله جدایه ایرانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV*-[Ab]) ایجاد می‌شود. این ویروس یک سویه شدید و از عوامل اصلی بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در جنوب کشور می‌باشد. در این مطالعه، بر همکنش *BCTV-Svr* و *BCTIV* با *TYLCV*-[Ab] در گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه بررسی شد. واکاوی داده‌های حاصل از آزمون زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (*Real-Time PCR, RT-PCR*) مشخص نمود که در آلودگی‌های مخلوط گیاه گوجه‌فرنگی با *TYLCV*-[Ab] و یکی از ویروس‌های *BCTV-Svr* یا *BCTIV*، رابطه آنتاگونیستی داشتند و غلظت هر دو ویروس نسبت به آلودگی‌های منفرد گیاه به هر یک از آن‌ها کاهش پیدا می‌کند. با وجود این، نتایج نشان داد که در آلودگی گوجه‌فرنگی به این ویروس‌ها، غلظت *TYLCV*-[Ab] در مقایسه با غلظت دو ویروس دیگر بیشتر بود. بنابراین بنظر می‌رسد که *TYLCV*-[Ab] نسبت به *BCTV-Svr* و *BCTIV* سازگاری بیشتری با گوجه‌فرنگی دارد.

کلیدواژه: آلودگی مخلوط، جمینی ویروس، ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندر قند، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی، ویروس پیچیدگی بوته چغندر قند

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده دوم، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: behjatni@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب استاد، دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

۲. استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

Interaction of viruses causing beet curly top disease with *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato plants under greenhouse conditions *

D. Jahanbin¹, S.A.A. Behjatnia^{1**}, K. Izadpanah¹, and A. Moghadam²

(Received: 25.7.2017; Accepted: 8.10.2017)

Abstract

Beet curly top Iran virus (BCTIV, genus *Becurtovirus*) and the severe strain of *Beet curly top virus* (BCTV-Svr, genus *Curtovirus*) are known as the causal agents of curly top disease in sugar beet and several other dicotyledonous plants in Iran. In addition to sugar beet, tomato and pepper are also economically important hosts of these viruses. Tomato leaf curl disease, one of the most important viral diseases of this crop, is caused by several species of the genus *Begomovirus* including the Iranian isolate of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-[Ab]) that is a severe strain of TYLCV. TYLCV-[Ab] is a major component of tomato leaf curl disease in southern Iran. In this study, the interaction of BCTIV and BCTV-Svr with TYLCV-[Ab] in tomato plants was studied under greenhouse conditions. Analysis of the Real-time PCR data showed antagonistic interaction in simultaneous infection of BCTV-Svr or BCTIV with TYLCV-[Ab] as evidenced by decreasing in concentration of each virus involved in mixed infection in comparison to single infections. In general, in mixed infections, TYLCV-[Ab] was dominant and seemed more adaptive to tomato compared to BCTIV and BCTV-Svr.

Keywords: *Beet curly top virus*; *Beet curly top Iran virus*; Geminivirus; mixed infection; *Tomato yellow leaf curl virus*

* Part of MSc Thesis of the Second Author Submitted to College of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

**Corresponding author's E-mail: behjatni@shirazu.ac.ir

1. Prof., Former Student and Professor, respectively, of Plant Pathol., College of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

2. Assist. Prof., of Plant Biotech., College of Agric., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

مقدمه

نواحی که گوجه‌فرنگی کشت می‌شود، وجود دارند و در نواحی استوایی و نیمه استوایی گاهی موجب از بین رفتن کل محصول گوجه‌فرنگی شده‌اند. علائم بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی بر روی گوجه‌فرنگی شامل کاهش شدید اندازه گیاه، پیچیدگی و قاشقی شدن برگ‌ها و ایجاد زردی در حاشیه برگ‌ها می‌باشد. این بیماری موجب عقیم شدن گل‌ها می‌شود (Czosnek, 2007). این ویروس‌ها نیز مانند گونه‌های جنس *Curtovirus*، تفاوت چشمگیری از لحاظ شدت علائمی که روی گوجه‌فرنگی ایجاد می‌کنند با یکدیگر دارند. بر خلاف ویروس‌های عامل بیماری پیچیدگی بوته چغندرقد که با زنجبرک‌های جنس *Circulifer* انتقال می‌یابند (Fatahi et al. 2012; Hosseini et al. 2012)، *TYLCV*، توسط سفیدبالک *Bemisia tabaci* منتقل می‌شود. با وجود این، تمام این ویروس‌ها به حالت گردشی و پایا انتقال می‌یابند (Brown et al. 2012).

آلودگی مخلوط جمینی ویروس‌ها در یک گیاه منبع بالقوه تغییرات در این ویروس‌ها است و بدین وسیله امکان ایجاد گونه‌ها و واریانت‌های جدید، به علت انجام پدیده نوترکیبی بین ویروس‌های آلوده‌کننده همزمان گیاه، فراهم می‌شود (Rentería-Canett et al. 2011). به نظر می‌رسد که *BCTIV* در اثر نوترکیبی بین یک کرتوویروس و یک مستروویروس به وجود آمده است (Bolok Yazdi et al. 2008). آلودگی مخلوط دو بگوموویروس *Pepper huasteco yellow vein virus* و *Pepper golden mosaic virus* در فلفل، در مکزیک و آمریکای جنوبی به علت افزایش غلظت دی‌ان‌ای هر دو ویروس، هم‌افزایی و تشدید آلودگی را نشان داد (Rentería-Canett et al. 2011). طاهری و همکاران (Taheri et al. 2014a and b) به بررسی برهمکنش دو ویروس *BCTIV* و *BCTV-Svr* در

استرین شدید ویروس پیچیدگی بوته چغندرقد (*Beet curly top virus, BCTV-Svr*) و ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقد (*Beet curly top Iran virus, BCTIV*) به ترتیب از جنس‌های *Curtovirus* و *Becurtovirus* (تیره *Gemiviridae*) به عنوان عوامل بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقد در ایران گزارش شده‌اند (Bolok Yazdi et al. 2008; Briddon et al. 1998; Varsani et al. 2014 a and b). دامنه‌ی میزبانی این ویروس‌ها که قبل از تفکیک براساس خصوصیات مولکولی، تحت عنوان *Beet curly top virus (BCTV)* نامیده می‌شدند (Stenger & McMahan 1997) وسیع بوده و علاوه بر محصولات زراعی، بسیاری از گونه‌های علف هرز را نیز شامل می‌شود. بیش از ۳۰۰ گونه گیاه از ۴۴ تیره‌ی گیاهی بعنوان میزبان‌های *BCTV* شناخته شده‌اند (Bennett 1971).

از میزبان‌های مهم *BCTV-Svr* و *BCTIV* گیاه گوجه‌فرنگی است. *BCTV-Svr* در گوجه‌فرنگی موجب پیچیدگی شدید برگ‌ها، ترد و شکننده شدن برگ‌ها، ضخیم شدن رگبرگ‌ها، ریز برگ‌گی، زردی برگ‌ها، ضعف و گاهی مرگ گیاهان می‌شود (Anabestani 2015). بوته‌های گوجه‌فرنگی پس از آلودگی به *BCTIV* علائم خفیف‌تری بروز می‌دهند که اغلب به صورت کوچک شدن برگ‌های انتهایی، ایجاد پیچیدگی و زردی در برگ‌ها است (Jahanbin et al. 2016). این علائم بسیار شبیه به علائم بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی است که یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی گوجه‌فرنگی می‌باشد که توسط گونه‌های متنوعی از جنس *Begomovirus* (تیره *Geminiviridae*) به نام‌های *Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)* و *Tomato leaf curl virus (TLCV)* ایجاد می‌شوند (Czosnek, 2007). این ویروس‌ها در اکثر

آنها در گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه بررسی شد.

مواد و روش‌های بررسی

کشت، پرورش و مایه‌زنی گیاهان

در این مطالعه از رقم *Grosse lisse* گوجه‌فرنگی که به هر سه ویروس حساس است استفاده شد. بذره‌های این رقم در سینی‌های نشاء حاوی ۵۰ درصد پیت‌ماس و ۵۰ درصد پرلیت کشت داده شدند و یک ماه بعد از کشت بذرها، نشاءها به گلدان‌های حاوی ۵۰ درصد خاک مزرعه و ۵۰ درصد کود برگ منتقل و در گلخانه‌ای با دمای ۲۵ تا ۳۱ درجه سلسیوس در روز و ۱۶ تا ۱۷ درجه سلسیوس در شب با متوسط شدت نور لازم برای گوجه‌فرنگی (۲۰۰۰۰ لوکس) نگهداری گردیدند. گیاهچه‌های حاصل در مرحله ۶-۸ برگی با استفاده از همسانه‌های عفونت‌زای سه ویروس *BCTV-Svr* (Ebadzad Sahraei et al. 2008)، *BCTIV* (Eini Gandomani et al. 2016) و *TYLCV* [Ab] (Pakniat Jahromi et al. 2010) به شرح جدول ۱ به روش مایه‌زنی با آگروباکتریوم (*Agroinoculation*) مایه‌زنی شدند. باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 حاوی هر یک از همسانه‌های عفونت‌زای ویروس‌ها در محیط کشت مایع LB حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های کانامیسین و ریفامپیسین در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در حال تکان خوردن کشت شد. در مایه‌زنی‌های منفرد مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری حاوی هر یک از همسانه‌های عفونت‌زا با میزان جذب ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط سرنگ ضدعفونی شده‌ی همیلتون به طوقه و جوانه‌های جانبی هر یک از گیاهچه‌های سالم گوجه‌فرنگی در مرحله ۶-۸ برگی تزریق شد. در مایه‌زنی‌های

رقم P.P.8 چغندر قند و رقم *Grosse Lisse* گوجه‌فرنگی پرداختند. واکاوی داده‌های حاصل از آزمون زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real-Time PCR, RT-PCR) مشخص نمود که در آلودگی مخلوط همزمان غلظت هر دو ویروس نسبت به آلودگی انفرادی افزایش یافته که بیان‌گر وجود برهم‌کنش هم‌افزایی دوجانبه است. از سوی دیگر در آلودگی‌های غیرهم‌زمان میزان *BCTIV* در طی نسل‌های متوالی از گیاهی به گیاه دیگر افزایش یافته در حالیکه میزان *BCTV-Svr* کاهش یافت. همچنین مجیدی و همکاران (Majidi et al. 2017) برهمکنش همین دو ویروس را در سه رقم *Dorothea*, *Brigita* و *7233* چغندر قند بررسی نمودند. واکاوی داده‌های حاصل از آزمون RT-PCR مشخص نمود که در آلودگی‌های انفرادی در هر سه رقم، غلظت *BCTV-Svr* بیشتر از *BCTIV* می‌باشد، در حالیکه در آلودگی‌های مخلوط همزمان صرف نظر از نوع رقم، غلظت *BCTIV* نسبت به آلودگی انفرادی با *BCTIV* افزایش و غلظت *BCTV-Svr* نسبت به آلودگی انفرادی همین ویروس کاهش می‌یابد. در هر حال در آلودگی‌های مخلوط غلظت *BCTIV* همواره از غلظت *BCTV-Svr* بیشتر بود.

از آنجا که گوجه‌فرنگی میزبان مشترک ویروس‌های عامل پیچیدگی بوته چغندر قند گزارش شده از ایران یعنی *BCTV-Svr* و *BCTIV* و بگومو ویروس‌های تولید کننده بیماری پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی است و گزارش‌های متعددی از آلودگی گوجه‌فرنگی به این ویروس‌ها وجود دارد (Anabestani 2015; Behjatnia et al. 2011; Gharouni Kardani et al. 2013; Ghodoum Parizipour 2011; Jahanbin et al. 2016; Pakniat Jahromi et al. 2010; Yazdani-Khameneh et al. 2016) مطالعه بر هم‌کنش این ویروس‌ها در گوجه‌فرنگی ضروری بنظر می‌رسید. لذا در مطالعه حاضر بر همکنش

جدول ۱. تیمارهای استفاده شده در مایه‌زنی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی (۴ گیاهچه در هر تیمار) به‌روش مایه‌زنی با آگروباکتریوم (Agroinoculation)

Table 1. Treatments used to inoculate tomato seedlings (4 seedlings per treatment) by Agroinoculation

Treatment	Inoculum (infectious clone)	Treatment abbreviation
Inoculation method		
Single inoculation	BCTV-Svr	S
Single inoculation	BCTIV	I
Single inoculation	TYLCV-[Ab]	T
Simultaneous mixed inoculation	BCTV-Svr and TYLCV-[Ab]	MST
Simultaneous mixed inoculation	BCTIV and TYLCV-[Ab]	MIT
Non-simultaneous mixed inoculation	First BCTV-Svr and two weeks later TYLCV-[Ab]	ST
Non-simultaneous mixed inoculation	First TYLCV-[Ab] and two weeks later BCTV-Svr	TS
Non-simultaneous mixed inoculation	First BCTIV and two weeks later TYLCV-[Ab]	IT
Non-simultaneous mixed inoculation	First TYLCV-[Ab] and two weeks later BCTIV	TI
Non-inoculated	-	NI

SYBR[®] Green (شرکت تاکارا، ژاپن) انجام شد. دی‌ان‌ا کل برگ‌های تازه ظهور یافته هر تیمار ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی بطور جداگانه استخراج و در واکنش بکار رفت. تیمار کنترل منفی شامل دی‌ان‌ا کل استخراج شده از گیاه گوجه‌فرنگی سالم همسن با گیاهان تیمارهای اصلی بود. آغازگرهای اختصاصی BCTV-Svr، BCTIV و TYLCV-[Ab] به کمک نرم افزار Primer-BLAST طراحی و در واکنش‌ها به کار گرفته شدند (جدول ۲). علاوه بر این، ژن 25S rRNA گوجه‌فرنگی به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد (جدول ۲). از محصول PCR ژن 25S rRNA گوجه‌فرنگی و دی‌ان‌ای ژنوم کامل همسانه‌سازی شده از هر ویروس برای تهیه استانداردهای کنترل مثبت و تعیین عملکرد مناسب آغازگرهای مربوطه استفاده شد (جدول ۲).

هر واکنش ۲۰ میکرولیتری این آزمون شامل دی‌ان‌ای هدف (حدود ۵ نانو گرم)، آغازگرها (هر کدام به غلظت ۰/۴ میکرومولار)، و ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس آنزیم کیت شرکت تاکارا (ژاپن) بود. واکنش بعد از یک مرحله ابتدائی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به منظور واسرشت نمودن دی‌ان‌ا، عبارت از یک برنامه ۴۰

مخلوط دو ویروس، هر گیاهچه با ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط ۱:۱ سوسپانسیون باکتری‌های حاوی هر یک از همسانه‌های عفونت‌زا با میزان جذب ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر مایه‌زنی شدند. تیمارها شامل آلودگی همزمان BCTV-Svr و BCTIV (MIT) و TYLCV-[Ab] (MST) و یا آلودگی غیر همزمان که در آن TYLCV-[Ab] قبل یا بعد از ویروس‌های پیچیدگی بوته چغندر قند (ST، TS، IT و TI) مایه‌زنی شد (جدول ۱) بودند. علایم در گیاهان مایه‌زنی شده در فاصله ۲۱ روز پس از مایه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت و سپس نمونه‌برداری انجام شد. پس از استخراج دی‌ان‌ای کل گیاه نسبت به ردیابی ژنوم ویروس‌ها با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) اقدام شد. برای تعیین غلظت هر ویروس در گیاه و مقایسه مقادیر ویروس‌ها در گیاهان مورد آزمایش، آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ویروس (جدول ۲) انجام شد.

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real-Time PCR, RT-PCR)

این آزمون با استفاده از دستگاه شرکت Bioneer و

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study

Test	Primers	Nucleotide position ^b	Sequence (5' to 3')	Ta °C	Expected fragment size (bp)
PCR	BCTV-Svr358 ^V	358-383	GTGGATCAATTTCCAGACAATTATC	55	520
	BCTV-Svr877 ^C	853-877	CCCCATAAGACCCATATCAAACCTTC		
	BCTIV474 ^V	474-493	TACAAGAAGTATGGCGGTTTC	56	682
	BCTIV1155 ^C	1135-1155	GAGTAAAGCATTCTCCTTCAC		
	TYLCV-[Ab]1543 ^V	1543-1566	TTACGTCCTATTGTTTTCTTCTTG	55	1071
	TYLCV-[Ab]2613 ^C	2590-2613	CCTCGTCTATTTAAAATATATGCC		
Real-time PCR	BCTV-Svr631 ^V	631-651	GCCGAAGAAGAGGAGGACTAC	53	116
	BCTV-Svr ^C	725-746	TACCACCAGCACCCAACATATC		
	BCTIV2056 ^V	2056-2075	TTTGTTCGCCCCACTCTTTG	54	116
	BCTIV2171 ^C	2151-2171	GCCTTCCATTCTATCCTTCGC		
	TYLCV-[Ab]1377 ^V	1377-1400	CTCTGGCTGTGTTCTGTTATCTTG	57.5	153
	TYLCV-[Ab] 1529 ^C	1508-1529	GACTGTGGCTGCTCATACTACC		
	Tomato 25S rRNA ^F		GGGTAACGGCGGGAGTAAC	54	116
	Tomato 25S rRNA ^R		TGGATAGTAGACAGGGACAGTGG		

Ta annealing temperature

^b Nucleotide position of BCTV-Svr, BCTIV and TYLCV-[Ab] primers are according to the GenBank database under accession number X97203, JQ707939 and FJ355946, respectively

^V virion-sense strand primer

^C complementary-sense strand primer

^F forward strand primer

^R reverse strand

(=) و برای بدست آوردن $\Delta\Delta C_T$ هر نمونه، مقدار ΔC_T کنترل منفی (گیاه سالم) از مقدار ΔC_T تیمار تفریق شد ($\Delta\Delta C_T = C_{T\text{تیمار}} - C_{T\text{کنترل منفی}}$). برای بررسی اثر متقابل ویروس‌ها بر غلظت نسبی یکدیگر در گیاهان مایه‌زنی شده، واکاوی واریانس فاکتوریل با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) انجام شد. سپس آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) برای تشخیص اختلاف آماری معنی‌دار مابین میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج

آلوده شدن گیاهان مایه‌زنی‌شده با همسانه‌های

عفونت‌زای ویروس‌ها

نمونه‌های دی‌ان‌ای به دست آمده از گیاهان رقم

چرخه ای شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ثانیه، دمای اتصال طبق جدول ۲ به مدت ۱۵ ثانیه و دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه بود.

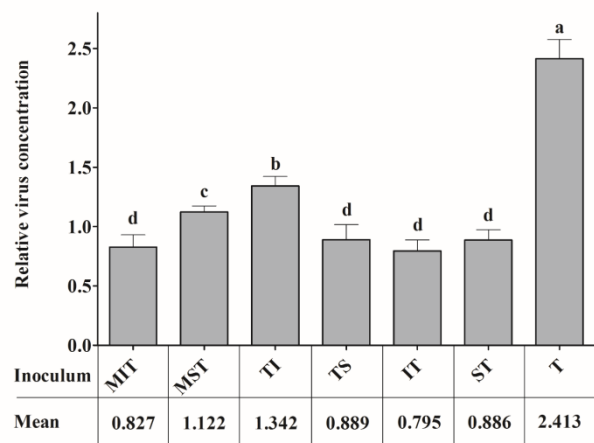
واکاوی داده‌های آزمون Real-Time PCR

برای هر تیمار از چهار تکرار استفاده شد و در نهایت واکاوی داده‌ها به روش کمی‌سنجی نسبی و بر اساس محاسبه سیکل آستانه (cycle threshold, C_T) انجام شد. بدین صورت که ابتدا C_T هر نمونه برای ژن اصلی و کنترل داخلی با استفاده از نرم‌افزار Line Gene K (Bioneer) محاسبه شد. سپس غلظت نسبی ویروس و یا میزان تکثیر ژن هدف توسط معادله $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001) محاسبه شد. برای بدست آوردن ΔC_T (دلنا سی تی) هر نمونه، مقدار C_T ژن هدف از مقدار C_T ژن کنترل داخلی آن نمونه تفریق شد (ژن کنترل داخلی C_T - ژن هدف C_T ΔC_T).

مایه‌زنی شده با اینوکولوم مخلوط دو ویروس، هر دو ویروس قابل تشخیص بودند اگر چه آزمون PCR معمولی قادر به نشان دادن تفاوت بین میزان کمی قطعات تکثیر شده ویروس‌ها در گیاهان تیمارهای مختلف نبود. با وجود این، نتایج این آزمون تائید کرد که رقم Grosse Lisse گوجه‌فرنگی یک رقم حساس به هر سه ویروس BCTV-Svr، BCTIV و TYLCV-[Ab] می‌باشد و راندمان آلوده‌سازی همسانه‌های عفونت‌زای استفاده شده هر سه ویروس در این مطالعه در این رقم ۱۰۰ درصد است. لذا این اطمینان حاصل شد که تمام گیاهان مایه‌زنی شده با همسانه‌های عفونت‌زای هر سه ویروس که متعاقباً در آزمون RT-PCR مورد واکاوی قرار گرفتند به ویروس‌های مورد نظر آلوده بوده‌اند.

ارزیابی غلظت نسبی دی‌ان‌ا ویروسی در گیاهان مایه‌زنی شده

واکاوی غلظت نسبی قطعه تکثیر شده از ژنوم TYLCV-[Ab] در گیاهان مایه‌زنی شده گوجه‌فرنگی (شکل ۱) نشان داد که غلظت نسبی TYLCV-[Ab] در گیاه گوجه‌فرنگی با آلودگی منفرد (T) بیشتر از سایر تیمارهای آلودگی بود؛ به طوریکه میانگین غلظت ویروس در تیمار T اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با سایر تیمارها نشان داد. به عبارت دیگر غلظت TYLCV-[Ab] در تمام تیمارهای آلودگی مخلوط کمتر ($p \leq 0.05$) از آلودگی منفرد TYLCV-[Ab] بود. در بین تیمارهای آلودگی مخلوط، در گیاهانی که با TYLCV-[Ab] و BCTIV مایه‌زنی شده بودند؛ در زمانی که TYLCV-[Ab] بیشترین غلظت ($p \leq 0.05$) را در پی داشت. تیمار بعدی با بیشترین غلظت TYLCV-[Ab]، آلودگی مخلوط و



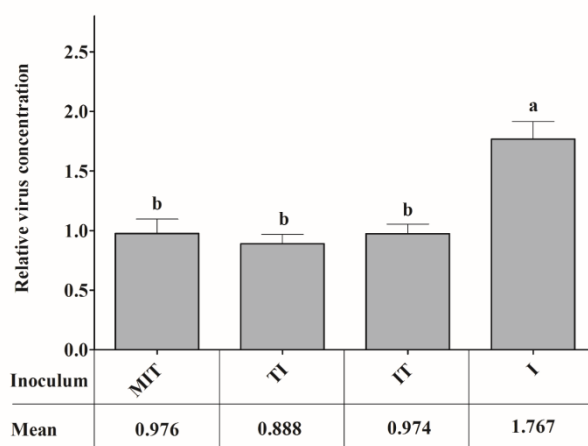
شکل ۱. عیار نسبی دی‌ان‌ا TYLCV-[Ab] در گیاهان گوجه‌فرنگی رقم Grosse Lisse، مایه‌زنی شده با TYLCV-[Ab] به تنهایی (T) یا مخلوط TYLCV-[Ab] با BCTIV (I) یا BCTV-Svr (S) ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی. تیمارهای اینوکولوم در جدول ۱ تعریف شده‌اند. تیمارهای دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Figure 1. Relative DNA titer of TYLCV-[Ab] in tomato plants of Grosse Lisse cultivar inoculated with TYLCV-[Ab] alone (T) or mixed with BCTIV (I) and BCTV-Svr (S) at 21 dpi. Inocula are defined in Table 1. The value represented for each treatment is the mean of four replicates. Bars with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Grosse Lisse گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با همسانه‌های عفونت‌زای ویروس‌های مورد مطالعه ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی هر ویروس (جدول ۲) در آزمون PCR مورد واکاوی قرار گرفتند. نتایج آزمون PCR نشان داد که قطعات دی‌ان‌ای به اندازه‌های مورد انتظار (۱۰۷۱ جفت باز برای TYLCV-[Ab]، ۵۲۰ جفت باز برای BCTV-Svr و ۶۸۲ جفت باز برای BCTIV) از تمام گیاهان مایه‌زنی شده (داده‌ها نشان داده نشده است) تکثیر شد که نشان دهنده آلودگی ۱۰۰ درصد گیاهان رقم Grosse Lisse گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با هر سه ویروس بود. همچنین در تمام گیاهان

میزان غلظت ($p \leq 0.05$) این ویروس را در گیاه در مقایسه با آلودگی‌های مخلوط (MIT، IT، TI) به دنبال داشته است؛ در حالیکه غلظت BCTIV در آلودگی‌های مخلوط، صرف نظر از زمان و ترتیب مایه‌زنی ویروس‌ها، اختلاف معنی‌داری نداشت. در هر حال میزان BCTIV در آلودگی مخلوط نسبت به میزان این ویروس در آلودگی منفرد کمتر بود. این نتایج نشان داد که وجود TYLCV-[Ab] در گیاه اثر آنتاگونیستی بر BCTIV داشت و به عبارت دیگر غلظت BCTIV در آلودگی مخلوط در مقایسه با آلودگی گیاه به تنهایی کاهش پیدا کرد (شکل ۲). به علاوه، در این مطالعه نشان داده شد که BCTIV در آلودگی‌های مخلوط، باعث کاهش غلظت TYLCV-[Ab] نیز می‌شود (شکل ۱). بنابراین رابطه آنتاگونیستی در آلودگی‌های مخلوط گیاه گوجه‌فرنگی با TYLCV-[Ab] و BCTIV مشاهده شد و غلظت هر دو ویروس نسبت به آلودگی‌های منفرد گیاه به آنها کاهش پیدا کرد. همچنین رابطه آنتاگونیستی بین TYLCV-[Ab] و BCTV-Svr در مورد آلودگی‌های مخلوط گیاه گوجه‌فرنگی مشاهده شد. شکل ۳ واکاوی غلظت نسبی قطعه تکثیر شده از ژنوم BCTV-Svr در گیاهان مایه‌زنی شده گوجه‌فرنگی را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد. میزان BCTV-Svr در تمام آلودگی‌های مخلوط با TYLCV-[Ab]، چه همزمان و چه غیر همزمان، از میزان BCTV-Svr در آلودگی منفرد گیاه به این ویروس کمتر بود و با آنها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار داشت.

شکل ۴ مقایسه جمع‌بندی داده‌های این مطالعه را در مورد آلودگی‌های مخلوط TYLCV-[Ab] با یکی از ویروس‌های BCTIV و BCTV-Svr نشان می‌دهد. بر اساس این داده‌ها هنگامی که میزان نسبی ویروس‌ها در آلودگی‌های انفرادی با یکدیگر مقایسه می‌گردد؛ غلظت

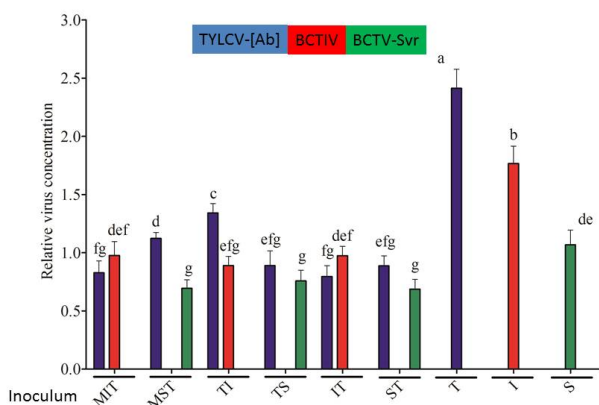


شکل ۲. عیار نسبی وی‌ان‌ا BCTIV در گیاهان گوجه‌فرنگی رقم Grosse Lisse، مایه‌زنی شده با BCTIV به تنهایی (I) یا مخلوط با TYLCV-[Ab] (T) ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی. تیمارهای اینوکولوم در جدول ۱ تعریف شده‌اند. تیمارهای دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Figure 2. Relative DNA titer of BCTIV in tomato plants of Grosse Lisse cultivar inoculated with BCTIV alone (I) or mixed with TYLCV-[Ab] (T) at 21 dpi. Inocula are defined in Table 1. The value represented for each treatment is the mean of four replicates. Bars with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

همزمان BCTV-Svr و TYLCV-[Ab] (MST) بود. بین بقیه تیمارهای آلودگی مخلوط شامل آلودگی مخلوط و همزمان BCTIV و TYLCV-[Ab] (MIT) و آلودگی مخلوط و غیرهمزمان TI، ST و TS اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0.05$) مشاهده نشد. کمترین مقدار TYLCV-[Ab] در برهمکنش با BCTIV مشاهده شد، در زمانی که TYLCV-[Ab] دیرتر از BCTIV مایه‌زنی شد (IT). این نتایج نشان داد که وجود هر یک از ویروس‌های BCTIV و BCTV-Svr در گیاهان مربوط به رقم گوجه‌فرنگی مورد مطالعه اثر آنتاگونیستی بر TYLCV-[Ab] داشت.

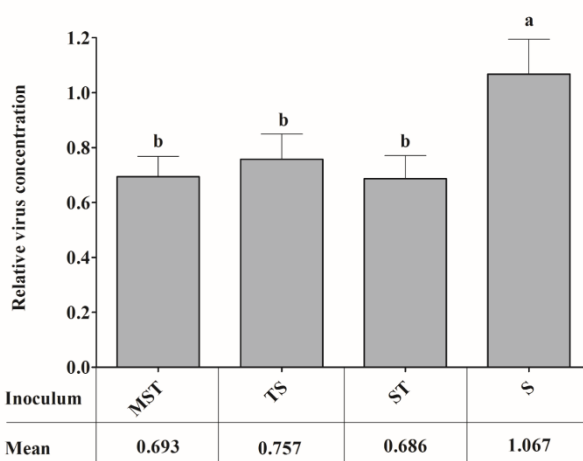
واکاوی غلظت نسبی قطعه تکثیر شده از ژنوم BCTIV در گیاهان مایه‌زنی شده گوجه‌فرنگی (شکل ۲) نشان داد که آلودگی منفرد گیاه گوجه‌فرنگی با BCTIV (I) بیشترین



شکل ۴. عیار نسبی دی‌ان‌ا TYLCV-[Ab]، BCTIV و BCTV-Svr در گیاهان گوجه‌فرنگی رقم *Grosse Lisse*، مایه‌زنی شده با هر یک از ویروس‌ها به تنهایی و مخلوط ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی. تیمارهای اینوکولوم در جدول ۱ تعریف شده‌اند. تیمارهای دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Figure 4. Relative DNA titre of TYLCV-[Ab] (T), BCTIV (I) and BCTV-Svr (S) in tomato plants of *Grosse Lisse* cultivar inoculated with each virus alone or with mixed inocula at 21 dpi. Inocula are defined in Table 1. The value represented for each treatment is the mean of four replicates. Bars with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

اما مجموع غلظت نسبی دو ویروس TYLCV-[Ab] و BCTV-Svr در تمام آلودگی‌های مخلوط به این دو ویروس شامل MST، TS و ST بیشتر از غلظت نسبی BCTV-Svr در آلودگی منفرد به آن ویروس بود (شکل ۵). با وجود این، مجموع غلظت نسبی دو ویروس TYLCV-[Ab] و BCTIV فقط در تیمار TI بیشتر از غلظت نسبی BCTIV در آلودگی منفرد به آن ویروس بود. غلظت نسبی BCTIV در آلودگی منفرد نسبت به مجموع غلظت نسبی دو ویروس TYLCV-[Ab] و BCTIV در دو تیمار مخلوط دیگر شامل MIT و IT اختلاف معنی‌دار نداشتند (شکل ۵). نکته جالب توجه این است که غلظت نسبی TYLCV-[Ab] در آلودگی



شکل ۳. عیار نسبی دی‌ان‌ا BCTV-Svr در گیاهان گوجه‌فرنگی رقم *Grosse Lisse*، مایه‌زنی شده با BCTIV به تنهایی (S) یا مخلوط با TYLCV-[Ab] (T) ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی. تیمارهای اینوکولوم در جدول ۱ تعریف شده‌اند. تیمارهای دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Figure 3. Relative DNA titer of BCTV-Svr in tomato plants of *Grosse Lisse* cultivar inoculated with BCTIV alone (S) or mixed with TYLCV-[Ab] (T) at 21 dpi. Inocula are defined in Table 1. The value represented for each treatment is the mean of four replicates. Bars with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

TYLCV-[Ab] از دو ویروس عامل بیماری پیچیدگی بوته و غلظت BCTIV از BCTV-Svr بطور معنی‌داری بیشتر بود.

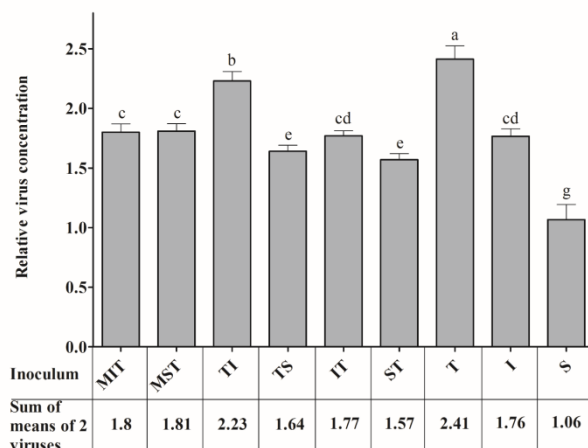
در آلودگی‌های مخلوط TYLCV-[Ab] با BCTV-Svr غلظت هر دو ویروس نسبت به آلودگی انفرادی و همچنین در آلودگی‌های مخلوط TYLCV-[Ab] با BCTIV غلظت TYLCV-[Ab] و غلظت BCTIV نسبت به آلودگی انفرادی کاهش یافت (شکل ۴).

در آلودگی‌های مخلوط گیاه گوجه‌فرنگی با TYLCV-[Ab] و یکی از ویروس‌های BCTV-Svr یا BCTIV رابطه آنتاگونیستی مشاهده شد و غلظت هر ویروس در آلودگی مخلوط نسبت به آلودگی منفرد کاهش پیدا کرد.

عواملی که باعث پدیده‌ی نوترکیبی در این ویروس‌ها می‌شود آلودگی مخلوط آنها در یک گیاه است. در واقع آلودگی مخلوط پیش نیاز لازم برای وقوع پدیده نوترکیبی در بین جمینی‌ویروس‌ها است (Silva et al. 2014). با وجود این، مطالعه بسیار اندکی در مورد بر هم‌کنش این ویروس‌ها در گیاهان میزبان انجام شده است.

طی مطالعاتی که توسط طاهری و همکاران (Taheri et al. 2014a and b) و مجیدی و همکاران (Majidi et al. 2017) انجام شد نشان داده شد که در آلودگی مخلوط همزمان BCTV-Svr و BCTV در چند رقم مختلف چغندر قند میزان هر دو ویروس نسبت به آلودگی انفرادی افزایش می‌یابد که بیان‌گر وجود برهم‌کنش هم‌افزایی بین این دو ویروس در چغندر قند است. در آلودگی‌های مخلوط غلظت BCTV در گیاه چغندر قند در مقایسه با BCTV-Svr بیشتر بود. در مطالعات مشابه طاهری (2013, Taheri) ایجاد علایم خفیف‌تر و سازگاری بیشتر BCTV با گیاه میزبان را از دلایل احتمالی تولید نتاج بیشتر و غالب شدن BCTV بر BCTV-Svr در میزبان طبیعی آن یعنی چغندر قند عنوان کرد. او همچنین نشان داد که BCTV-Svr در مقایسه با BCTV در زمان مساوی پس از مایه‌زنی علایم شدیدتر و غلظت بالاتری دارد و منجر به مرگ گیاه می‌شود.

قدوم پاریزی (Ghodoum Parizipour, 2011) نیز نشان داد که در گیاهان گوجه‌فرنگی علائم بدشکلی برگ، زردی و کاهش رشد پس از ۳۰-۳۵ روز از زمان مایه‌زنی با همسانه‌ی عفونت‌زای BCTV-Svr ظاهر شده و به تدریج بر شدت علائم افزوده می‌شود به طوری‌که شش هفته پس از مایه‌زنی تقریباً تمام گیاهان مایه‌زنی شده در اثر نکرز کامل از بین می‌روند. از بین رفتن گیاه میزبان توسط BCTV-Svr باعث می‌شود که خزانه ژنی آن برای انتقال به



شکل ۵. مجموع عیار نسبی دی‌ان‌ای دو ویروس TYLCV-[Ab] و BCTV در تیمارهای MIT، TI و IT و دو ویروس TYLCV-[Ab] و BCTV-Svr در تیمارهای MST، TS و ST در گیاهان گوجه‌فرنگی رقم Grosse Lisse مایه‌زنی شده با دو ویروس در مقایسه با عیار نسبی دی‌ان‌ای (T) TYLCV-[Ab]، (I) BCTV و (S) BCTV-Svr مایه‌زنی شده به تنهایی. تیمارهای اینوکولوم در جدول ۱ تعریف شده‌اند. تیمارهای دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Figure 5. Relative DNA titre of TYLCV-[Ab] (T), BCTV (I) and BCTV-Svr (S) in tomato plants of Grosse Lisse cultivar inoculated with each virus alone compare with the sum of relative DNA titre of TYLCV-[Ab] and BCTV in MIT, Ti and IT and the sum of relative DNA titre of TYLCV-[Ab] and BCTV-Svr in MST, TS and ST. Inocula treatments are defined in Table 1. Bars with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

منفرد نسبت به مجموع غلظت نسبی این ویروس با یکی از ویروس‌های BCTV-Svr یا BCTV در تمام آلودگی‌های مخلوط MIT، MST، TI، TS، IT و ST بیشتر بود (شکل ۵).

بحث

پدیده نوترکیبی در بین جمینی‌ویروس‌ها منجر به ظهور، شیوع همه‌گیر و تنوع در این ویروس‌ها در سراسر دنیا شده است (Bisaro, 1994; Martin et al. 2011). از

نسل بعد کاهش یابد (Taheri, 2013).

هرچند در آلودگی مخلوط چغندر قند به BCTV-Svr و BCTIV رابطه هم افزایی مشاهده شده است (Taheri et al. 2014a and b; Majidi et al. 2017) اما نتایج مطالعه حاضر نشان داد که وقتی یکی از این ویروس‌ها همزمان با TYLCV-[Ab] در گیاه گوجه فرنگی وجود داشته باشند رابطه آنتاگونیستی بین آنها مشاهده می‌گردد و غلظت هر دو ویروس نسبت به آلودگی‌های منفرد گیاه به هریک از این ویروس‌ها کاهش پیدا می‌کند.

نتایج بررسی غلظت نسبی ویروس‌های TYLCV-[Ab]، BCTV-Svr و BCTIV در گیاه گوجه فرنگی با استفاده از آزمون پی‌سی‌آر در زمان واقعی نشان داد که در اغلب آلودگی‌های هم‌زمان گیاه گوجه فرنگی با ترکیب‌های مختلف ویروس‌های فوق، غلظت TYLCV-[Ab] در مقایسه با غلظت ویروس دیگر موجود در آلودگی مخلوط بیشتر است. این واقعیت که گوجه فرنگی میزبان اصلی TYLCV-[Ab] است، نتایج بدست آمده در این تحقیق را تایید می‌کند. با این حال، در آلودگی هم‌زمان TYLCV-[Ab] و BCTIV و همچنین هنگامی که BCTIV زودتر از TYLCV-[Ab] به گیاه میانه‌زنی شد (تیمارهای MIT و IT)، غلظت BCTIV بیشتر از TYLCV-[Ab] بود. به علاوه در بررسی غلظت هر کدام از ویروس‌های فوق در آلودگی‌های منفرد گیاه گوجه فرنگی نتایج بدست آمده نشان داد که BCTIV و TYLCV-[Ab] بترتیب بیشترین غلظت را در گیاهان آلوده دارند و BCTV-Svr کمترین غلظت را دارد. مشاهدات فوق به خوبی نشان می‌دهد که BCTIV از قابلیت مناسبی برای سازگاری با میزبان‌های مختلف و در نتیجه تولید نتاج بیشتر در گیاهان آلوده نسبت به سایر ویروس‌ها برخوردار است. غلظت بالای BCTIV در مقایسه با غلظت پائین BCTV-Svr در تمامی

آلودگی‌های مخلوط بررسی شده در مطالعات گذشته (Majidi et al. 2017; Taheri et al. 2014a and b) و این تحقیق نیز خود گواهی بر این امر است.

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان عنوان کرد که BCTV-Svr در مقایسه با سایر ویروس‌های مورد مطالعه سازگاری کمتری هم در میزبان اصلی آن یعنی چغندر قند (Majidi et al. 2017; Taheri et al. 2014a and b) و هم در سایر میزبان‌های مهم و اقتصادی آن نظیر گوجه فرنگی دارد. سازگاری کمتر این ویروس با میزبان‌های خود را می‌توان نتیجه‌ی بروز تنگناهای جمعیت (population bottlenecks) هنگام انتقال افقی ویروس از گیاهی به گیاه دیگر توسط ناقل (García-Andrés et al. 2007)، تنگناهای ژنتیک (genetic bottlenecks) در طی فرآیند عفونت سیستمیک (Li & Roossinck 2004)، تغییر رقم گیاه زراعی و واکنش متفاوت ارقام به ویروس‌ها (Fatahi et al. 2012; Majidi et al. 2017; Montazeri et al. 2016) یا تغییرات آب و هوایی و افزایش میانگین جهش‌های مضر (Lynch et al. 1993) دانست. در مورد جهش‌های مضر انتظار می‌رود که جمع تجمعی چنین جهش‌هایی موجب کاهش جمعیت مؤثر و نهایتاً حذف ویروس گردد (Lynch et al. 1993). به علاوه، از آنجا که بطور قطع مشخص شده است که پروتئین‌های متنوعی از جمینی ویروس‌ها در سرکوبی خاموشی ژن‌های گیاهی برای ایجاد بیماری درگیر هستند (Amin et al. 2011; Saeed et al. 2011; Ikegami 2008; Zhang et al. & al. 2015; Sharma 2011)، مقایسه اثربخشی سرکوب کننده‌های خاموش کننده ژن هر ویروس در آلودگی‌های انفرادی و مخلوط ویروس‌های مورد مطالعه، به توضیح مکانیزم‌های درگیر در تعاملات تقابلی/رقابتی کمک خواهد کرد (Majidi et al. 2017). اثبات فرضیه‌های یاد شده نیاز به انجام تحقیقات عملی دارد.

از نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که TYLCV-[Ab] در میزبان گوجه‌فرنگی به علت تولید نتاج بالا کارا تر از سایر ویروس‌های آلوده کننده‌ی مورد مطالعه این گیاه مهم از لحاظ اقتصادی است و بنابراین اقدامات مدیریتی باید بیشتر بر پایه‌ی مبارزه با این ویروس در نظر گرفته شوند. به علاوه ویروس تازه شناسایی شده‌ی BCTIV نیز به دلیل قابلیت زیاد در سازگاری با محیط و تولید آلودگی با جمعیت‌های نسبتاً بالا به خصوص در صورت آلودگی اولیه و همزمان با TYLCV-[Ab] خود می‌تواند تهدیدی برای محصول گوجه‌فرنگی و همچنین سایر میزبان‌های گیاهی بوده و لزوم تنظیم برنامه‌های مدیریتی علیه آن را ایجاب می‌نماید.

منابع

- Amin I., Hussain K., Akbergenov R., Yadav J.S., Qazi J., Mansoor S., Hohn T., Fauquet C.M. and Briddon R.W. 2011. Suppressors of RNA silencing encoded by the components of the cotton leaf curl begomovirus-betasatellite complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 973-983.
- Anabestani A., Izadpanah K., Tabein S., Hamzeh-Zarghani H. and Behjatnia S. A. A. 2015. Beet curly top viruses in Iran: Diversity and incidence in plants and geographical regions. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51: 493-504.
- Behjatnia S. A. A., Izadpanah K. and Afsharifar, A. 2011. The status of geminivirus species in Iran. *First Iranian Plant Virologist Symposium*. Iran, Shiraz.
- Bennett C. W. 1971. The curly top disease of sugar beet and other plants. American Phytopathological Society. Monograph, 81 pp.
- Bisaro D. M. 1994. Recombination in the Geminiviruses: Mechanisms for Maintaining Genome Size and Generating Genomic Diversity, pp 39-60. In: J. Paszkowski (ed.) *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants*. Springer, Dordrecht.
- Bolok Yazdi H. R., Heydarnejad J. and Masumi H. 2008. Genome characterization and genetic diversity of Beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes* 36: 539-545.
- Briddon R.W., Stenger D. C., Bedford I. D., Stanley J., Izadpanah K. and Markham P.G. 1998. Comparison of a beet curly top virus isolate originating from the old world with those from the New World. *European Journal of Plant Pathology* 104: 77-84.
- Brown J. K., Fauquet C. M., Briddon R. W., Zerbini M., Moriones E. and Navas-Castillo J. 2012. *Geminiviridae*, pp. 351-373. In: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz (Eds). *Virus Taxonomy*, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London.
- Czosnek H. (Ed.) 2007. *Tomato yellow leaf curl virus disease: Management, molecular biology, breeding for resistance*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 448 p.
- Ebadzad Sahraei G., Behjatnia S. A. A. and Izadpanah K. 2008. Infectivity of the cloned genome of Iranian isolate of Beet severe curly top virus in experimental hosts. *Iranian Journal of Plant Pathology* 44:176-183.
- Eini Gandomani O., Ebadzad Sahraie G. and Behjatnia S. A. A. 2016. Molecular characterization and construction of an infectious clone of a pepper isolate of Beet curly top Iran virus. *Molecular Biology Research Communications* 5:101-113
- Fatahi Z., Behjatnia S. A. A., Afsharifar A., Hamzehzarghani H. and Izadpanah K., 2012. Screening of sugar beet cultivars resistant to Iranian isolate of Beet severe curly top virus using an infectious clone of the virus. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48: 111-121.
- García-Andrés S., Miguel Tomás D., Sánchez-Campos S., Navas-Castillo J. and Moriones E. 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 365: 210-219
- Gharouni Kardani S., Heydarnejad J., Zakiaghl M., Mehrvar M., Kraberger S. and Varsani, A. 2013. Diversity of Beet curly top Iran virus isolated from different hosts in Iran. *Virus Genes* 46: 571-575.
- Ghodoum Parizipour M. H. 2011. Distribution of viruses causing sugar beet curly top disease and the effect of temperature on recovery of Beet severe curly top virus-infected plants. M.Sc. Thesis, College of Agriculture,

- Shiraz University, Shiraz, Iran.
- Hosseini Abhari E, Heydarnejad J, Massumi H, Hosseini Pour A, Izadpanah K. 2005. Natural hosts, vector and molecular detection of Beet curly top virus (BCTV) in southeast of Iran. Singapore, The Second Asian Conference on Plant Pathology.
- Jahanbin D., Izadpanah K. and Behjatnia S. A. A. 2016. Comparison of natural and experimental host range of Beet severe curly top, Beet curly top Iran and Tomato yellow leaf curl viruses. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51: 505-521.
- Li H. and Roossinck, M. J. 2004. Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *Journal of Virology* 78: 10582-10587.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402-408.
- Lynch M., Burger R., Butcher D. and Gabriel W. (1993). The mutational meltdown in asexual populations. *The Journal of Heredity*. 84: 339-344.
- Majidi A., Hamzehzarghani H., Izadpanah K. and Behjatnia S. A. A. 2017. Interaction between Beet curly top Iran virus and the severe isolate of Beet curly top virus in three selective sugar beet cultivars. *Journal of Plant Pathology* 99: 381-389.
- Martin D.P., Lefeuvre P., Varsani A., Hoareau M., Semegni J.Y., Dijoux B., Vincent C., Reynaud B. and Lett J-M. 2011. Complex recombination patterns arising during geminivirus coinfections both preserve and demarcate biologically important intra-genome interaction networks. *PLoS Pathogen*. 7, e1002203.
- Montazeri R., Shams-Bakhsh M., Mahmoudi S. B. and Rajabi A. 2016. Evaluation of sugar beet lines for resistance to beet curly top viruses. *Euphytica* 210: 31-40.
- Pakniat Jahromi A., Behjatnia S. A. A., Kharazmi S. Shahbazi M. and Izadpanah K. 2010. Molecular characterization and construction of an infectious clone of a new dominant strain of Tomato yellow leaf curl virus in southern Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 46: 101-115.
- Rentería-Canett I., Xoconostle-Cázares B., Ruiz-Medrano R., Rivera-Bustamante R. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal* 8:104 (13 pp.).
- Saeed M., Briddon R.W., Dalakouras A., Krczal G. and Wassenegger, M. 2015. Functional analysis of Cotton leaf curl Kokhran virus/Cotton leaf curl Multan betasatellite RNA silencing suppressors. *Biology* 4: 697-714.
- Silva F. N., Lima A TM., Rocha C. S., Castillo-Urquiza G. P., Alves-Júnior M. and Zerbini F. M. 2014. Recombination and pseudorecombination driving the evolution of the begomoviruses Tomato severe rugose virus (ToSRV) and Tomato rugose mosaic virus (ToRMV): two recombinant DNA-A components sharing the same DNA-B. *Virology Journal* 11:66.
- SAS Institute. SAS user's guide. 1996. 3rd ed. SAS Inst, NC, USA.
- Sharma P. and Ikegami M. 2008. RNA-silencing suppressors of geminiviruses. *Journal of General Plant Pathology* 74: 189-202.
- Soleimani R., Matic, S., Taheri H., Behjatnia S. A. A., Vecchiati M., Izadpanah K. and Accotto G. P. 2012. The unconventional geminivirus Beet curly top Iran virus: satisfying Koch's postulates and determining vector and host range. *Annals of Applied Biology* 162: 174-181.
- Stenger D. C. and McMahon C. L. 1997. Genotypic diversity of beet curly top virus populations in the western United States. *Phytopathology* 87: 737-744.
- Taheri H. 2013. Interaction between Beet curly top Iran virus and Beet severe curly top Virus. M.Sc. Thesis, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
- Taheri H., Izadpanah K., Behjatnia S.A.A., 2014a. Muller's ratchet phenomenon in the interaction between Beet severe curly top virus and Beet curly top Iran virus. *Proceedings of the 21st Iranain Plant Protection Conference, Urmia University, Urmia, Iran.* 2014: 380.
- Taheri H., Izadpanah K., Behjatnia S.A.A., 2014b. Synergism interaction between Beet severe curly top virus and Beet curly top Iran virus in sugar beet and tomato. *Proceedings of the 21st Iranain Plant Protection Conference, Urmia University, Urmia, Iran.* 2014: 398.
- Varsani A., Martin D.P., Navas-Castillo J., Moriones E., Hernandez-Zepeda C., Idris A., Zerbini F.M. and Brown J.K. 2014a. Revisiting the classification of curtoviruses based on genome-wide pairwise identity. *Archives of*

Virology 159: 1873-1882.

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

Yazdani-Khameneh S., Aboutorabi S., Shoori M., Aghazadeh A., Jahanshahi P., Golnarahi A. and Maleki, M. 2016. Natural Occurrence of Tomato leaf curl New Delhi virus in Iranian cucurbit crops. The Plant Pathology Journal 32: 201-208.

Zhang Z., Chen H., Huang X., Xia R., Zhao Q., Lai J., Teng K., Li Y., Liang L., Du Q., Zhou X., Guo H. and Xie Q. 2011. BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*. Plant Cell 23:273-288.