جداسازی و آنالیز فیلوژنتیکی یک جدایه ویروس پیچیدگی برگ شلغم از گیاه تاتوره*

مهدی کمالی[۱]**، جهانگیر حیدرنژاد[۲] و حسین معصومی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳)

چکیده

ویروس پیچیدگی برگ شلغم (*Turnip curly top virus*, TCTV) به عنوان ویروس تیپ جنس *Turncurtovirus* از خانواده *Geminiviridae* چند سال قبل از ایران گزارش گردید. این ویروس دارای دامنه میزبانی وسیعی در میان سبزیجات و علف‌های هرز است. در این پژوهش، آلودگی گیاه تاتوره (*Datura stramonium* L.) با علائم زردی عمومی، پیچیدگی شدید و فنجانی شدن برگ‌ها با استفاده از آزمون پی سی آر، به TCTV اثبات گردید. سپس طول کامل ژنوم ویروس با تلفیق پی سی آر و روش تکثیر دایره غلتان (rolling circle amplification, RCA) و استفاده از یک جفت آغازگر همپوشان تکثیر و بعد از همسانه‌سازی، در ناقل pJET1.2 تعیین ترادف گردید و ترادف بدست آمده به لحاظ فیلوژنتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج بدست آمده بیانگر آن است که جدایه تاتوره دارای بیشترین و کمترین میزان شباهت (بترتیب ۹۹/۲ و ۸۵/۸ درصد) با جدایه‌های همین ویروس می‌باشد که پیشتر بترتیب از گیاهان شلغم و ترب گزارش شده‌اند. به رغم مشابهت بالای ترادف نوکلئوتیدی ژنوم جدایه تاتوره با جدایه شلغم، پروتئین rep رمزشده توسط جدایه تاتوره در انتهای N-terminal دارای ١٤ اسیدآمینه بیشتر است. در میان نژادهای پنج گانه TCTV، جدایه تاتوره متعلق به نژاد C بوده و در کنار جدایه‌هائی قرار می‌گیرند که قبلا از گیاه شلغم یا از بدن زنجرک‌ها گزارش شده است. نتایج این تحقیق، بار دیگر دامنه میزبانی وسیع تِرنکِرتوویروس‌ها در علف‌های هرز و نقش آن‌ها را در آلودگی سبزیجات تائید می‌کند.

کلیدواژه: جمینی ویروس، تِرنکرتوویروس، ویروس پیچیدگی برگ شلغم، تاتوره، تکثیر به روش دایره غلتان

---

* قسمتی از پایان نامه دکتری نگارنده اول، ارائه‌شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mehdikamali59@yahoo.com

۱. دانش آموخته دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

۲. استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کد پستی ۷۶۱۶۹۱۴۱۱۱.

Isolation and phylogenetic analysis of the jimsonweed isolate of *Turnip curly top virus*[*]

M. Kamali[1], J. Heydarnejad[2], and H. Massumi[2]**

(Received: 9.8.2017; Accepted: 1.23.2018)

Abstract

Turnip curly top virus (TCTV) is a type member of the genus *Turncurtovirus* previously reported from Iran. TCTV has a wide host range among vegetables and weeds. In this study, the TCTV infection of the symptomatic jimsonweed (*Datura stramonium* L.) showing general yellowing, severe curling and cup-shaped leaves was confirmed by PCR. Full-length genome of this isolate was amplified using combination of the PCR and rolling circle amplification (RCA) and cloned into the pJET1.2 vector. Resulted nucleotide sequence indicated that the jimsonweed isolate of TCTV shares maximum and minimum identities (85.8-99.2%) with turnip and radish isolates of TCTV, respectively. In spite of high similarity between full-length nucleotide sequence of jimsonweed and several GenBank isolates, predicted rep protein of the jimsonweed isolate has an additional 14 amino acid residues at the N-terminal. Among five TCTV strains, the jimsonweed isolate was classified in the strain C with turnip and leafhopper isolates of the virus. Results of this study again confirm wide host range of turncurtoviruses in weeds and the role of wild species in infection of vegetables.

Keywords: Geminivirus, *Turncurtovirus*, *Turnip curly top virus*, jimsonweed, rolling circle amplification

---

* A part of PhD thesis of the first author submitted to College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

*Corresponding author's E-mail: mehdikamali59@yahoo.com

1. Former PhD student of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2. Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

مقدمه

خانواده *Geminiviridae* شامل ویروس‌هائی است با پیکره‌های چند وجهی و دوقلو به قطر ۳۸-۲۲ نانومتر که حاوی یک یا دو قطعه ژنوم دی اِن اِی تک لای حلقوی به اندازه ۵/۲ kb -۲/۶ می‌باشند (Zerbini *et al.* 2017). اعضای این خانواده بعد از خانواده *Potyviridae* بزرگترین گروه ویروس‌های گیاهی را تشکیل می‌دهند (Brown *et al.* 2012) و در نقاط مختلف جهان گیاهان یک ساله، چند ساله و حتی درختان میوه را آلوده می‌کنند (Varma & Malathi 2003; Krenz *et al.* 2012; Liang *et al.* 2015; Loconsole *et al.* 2012). امروزه با پیشرفت روش‌های جدید مولکولی مانند استفاده از روش تکثیر دایره غلتان و تکنیک‌های نسل جدید توالی یابی (next generation sequencing)، روند تشخیص و معرفی جمینی ویروس‌های جدید و در نتیجه علت بیماری در میزبان‌های آن‌ها شتاب بیشتری به خود گرفته است. در آخرین تقسیم بندی کمیته بین المللی نامگذاری ویروس‌ها (ICTV)، جمینی ویروس‌ها بر اساس دامنه میزبانی، حشرات ناقل و مشخصات ژنوم به ۹ جنس تقسیم می‌شوند (Varsani *et al.* 2017).

اعضای جنس *Turncurtovirus* بعنوان یکی از جنس‌های ۹ گانه جمینی ویروس‌ها دارای ژنوم تک بخشی بوده و تاکنون از این جنس دو گونه به نام‌های ویروس پیچیدگی برگ شلغم (TCTV) و ویروس لوله شدن برگ شلغم (turnip leaf curl virus, TLRV) به‌ترتیب در سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۶ از مزارع شلغم اطراف شیراز گزارش شده‌اند (Briddon *et al.* 2010; Kamali *et al.* 2016a). هر دو ویروس توسط زنجرک *Circulifer haematoceps* (Mulsant & Rey) به روش پایا منتقل می‌شوند (Kamali *et al*, 2016a; Razavinejad & Heydarnejad 2013). اخیرا ویروس دیگری نیز از این جنس و از بدن همین زنجرک در استان کرمان جداسازی و گزارش شده است (Kamali *et al*, 2016b) که تعیین مشخصات بیولوژیکی آن در دست انجام است.

تِرنکِرتوویروس‌ها در ایران از تنوع ژنتیکی بالائی برخوردار بوده و میزبان‌های زیادی را در میان سبزیجات آلوده می‌کنند. بطوریکه تاکنون غیر از شلغم، آلودگی کاهو، چغندر ریشه ای، چغندر برگی، ریحان، بادمجان، انواع ترب و اسفناج نسبت به این ویروس‌ها به اثبات رسیده است (Kamali *et al.* 2016a; Razavinejad *et al.* 2013). علاوه بر این، گیاهان وحشی نیز از آلودگی در برابر تِرنکِرتوویروس‌ها در امان نیستند و تاکنون پنج گونه علف هرز بنام‌های خاکشیر (*Descurainia sophia* (L.) Web ex Prantl)، گاوزبان کوچک (*Anchusa ovata* Lehm.)، تاجریزی سیاه (*Solanum nigrum* L.)، گل یک ساعتی یا بامیه سه شاخ (*Hibiscus trionum* L.) و ترب وحشی (*Raphanus raphanistrum* L.) بعنوان میزبان‌های ثانویه آن‌ها گزارش شده‌اند (Razavinejad & Heydarnejad 2013; Farzadfar & Pourrahim 2013).

در این مطالعه، با استفاده از ترکیب روش‌های پی سی آر و آر سی اِ یکی از میزبان‌های TCTV شناسائی شده و سپس ژنوم و جایگاه تکاملی جدایه بدست آمده، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌های بررسی

در سال ۱۳۹۲ از مزارع زیر کشت شلغم آلوده به TCTV واقع در لپویی (۲۵ کیلومتری شمال شرقی شیراز، استان فارس) با موقعیت طول و عرض جغرافیائی بترتیب 29° 49' 07.28" N و 52° 36' 08.33" E بازدید به عمل آمد و یک نمونه گیاه تاتوره (*D. stramonium*) دارای

شکل ۱. علائم ناشی از ویروس پیچیدگی برگ شلغم شامل زردی عمومی و فنجانی شدن شدید برگ‌ها در گیاه تاتوره (*Datura stramonium*) جمع‌آوری‌شده از منطقه لپوئی (۲۵ کیلومتری شمال شرقی شیراز، استان فارس).

Fig 1. Symptoms of naturally infected jimsonweed (*Datura stramonium*) with *Turnip curly top virus* showing general yellowing and severe cup-shaped leaves collected from Lapooei (25 km northeast of Shiraz, Fars province).

علائم زردی عمومی، پیچیدگی شدید و فنجانی شدن برگ‌ها جمع‌آوری گردید (شکل ۱). نمونه در شرایط سرد (روی یخ) به آزمایشگاه منتقل شد.

استخراج دی‌اِن‌اِی کل از بافت گیاه به روش CTAB و بر اساس روش *ژانگ و همکاران* (Zhang *et al.* 1998) انجام گردید. در آزمون اولیه پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی TCTV شامل TCTV11-1676-F (GCGTAAATCCCTCACCACAGC)/TCTV11-2699-R (CAGCTGCAGAACCTCGCCTGT) آلودگی نمونه‌های تاتوره را به TCTV نشان داد. در صورتیکه استفاده مستقیم از روش تکثیر آرسی‌اِ و برش محصول بدست آمده با چندین آنزیم برشی منجر به تکثیر هیچ قطعه ای نگردید. بهمین دلیل در مرحله دوم ابتدا مولکول‌های حلقوی موجود در دی اِن اِی استخراج‌شده از گیاه با استفاده از روش آرسی‌اِ غنی‌سازی گردید. سپس از محصول بریده نشده آرسی‌اِ بعنوان رشته الگو در آزمون پی سی آر استفاده شد. برای انجام آزمون آرسی‌اِ، از آنزیم فی ۲۹ دی‌اِن‌اِ پلی‌مراز و کیت Templiphi Amplification Kit (GE Healthcare, USA) بر اساس دستورالعمل ارائه‌شده توسط شپرد و *همکاران* (Shepherd *et al.* 2008) استفاده گردید. برای انجام این آزمون، از آغازگرهای عمومی و همپوشان (back to back primers) با مشخصات TCTV-O-F (AGGTTTGTCTGCCACTC CTTT)/TCTV-O-R (GCAGACAAACCTCAAATA CGG) که قادر به تکثیر ژنوم کامل ترنکِرتوویروس‌هاست، استفاده شد (Kamali *et al*, 2016a). این آغازگرها به گونه ای طراحی شده‌اند که دارای یک ناحیه همپوشان با یکدیگر در انتهای '۵ بوده و با وجود تنوع زیاد جدایه‌های ترنکِرتوویروس‌ها، قابلیت اتصال در ناحیه‌ای حفاظت‌شده ژنوم آن‌ها را دارند. برنامه پی سی آر برای تکثیر ژنوم کامل جدایه تاتوره عبارت بود از پنج دقیقه دمای ۹۴°C به منظور واسرشته‌سازی اولیه و ۳۰ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل ۱۵ ثانیه واسرشته‌سازی با دمای ۹۴°C، دمای اتصال آغازگرها ۵۷°C به مدت ۳۰ ثانیه و یک دقیقه دمای ۷۸°C به منظور تکثیر قطعات بود. در انتها برنامه پی سی آر با ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵°C برای تکمیل تکثیر قطعات ناقص ادامه یافت. در واکنش پی‌سی‌آر از آنزیم Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) با ویژگی صحت بالای سنتز برای تکثیر ژنوم ویروس استفاده شد.

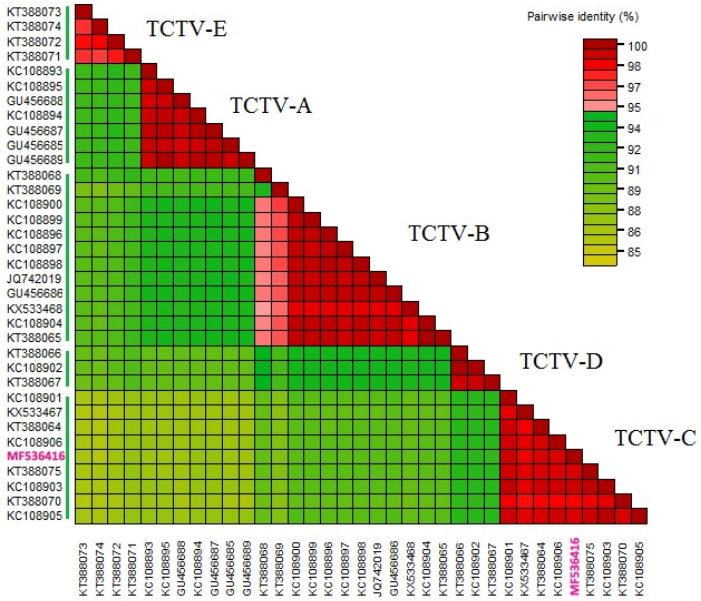
از آنجائی‌که محصول واکنش پی‌سی‌آر فاقد انتهای چسبنده می‌باشد، بنابراین قطعه تکثیرشده با اندازه تقریبی ۳ kb، با استفاده از کیت CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) در پلاسمید pJET1.2 با انتهای صاف (blunt) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده همسانه‌سازی گردید. برای انتقال پلاسمید

نوترکیب به سلول‌های مستعد، از باکتری *Escherichia coli* نژاد DH5α استفاده شد. بعد از عمل transformation، سلول‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب شناسائی و به محیط مایع اِل بی دارای آنتی-بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰µg/ml) اضافه شد. نمونه حاصل، به مدت ۲۰-۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C و ۱۳۰ دور در دقیقه در ترموشیکر کشت داده شد. پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) و بر اساس روش شرکت سازنده انجام شد. نمونه بدست آمده از هر دو جهت با روش primer walking توسط کمپانی ماکروژن (Macrogen, South Korea) تعیین ترادف گردید.

ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه تاتوره، با سایر ترادف‌های موجود در بانک جهانی ژن مقایسه گردید. پس از آن، ترادف‌های موجود با استفاده از نرم افزار MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) و بکارگیری روش MUSCLE (Edgar, 2004) هم‌ردیف‌سازی شدند. ترادف‌های هم-ردیف‌سازی شده برای رسم درخت فیلوژنتیکی به روش اتصال مجاور (neighbor-joining, NJ) با استفاده ازمدل Jukes-Canter و اعتبار سنجی (bootstrap) برابر ۱۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفتند. برای رسم درخت فیلوژنتیکی، از ترادف ژنوم تنها عضو جنس *Topocuvirus* (رس شمار X84735.1) به‌عنوان مدل خارج گروه (outgroup) استفاده شد. به‌علاوه، تشابه دو به‌دوی نوکلئوتیدهای ژنوم کامل جدایه موردنظر با ترنکِرتوویروس‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SDT v 1.2 (Muhire *et al.*, 2014) تجزیه و تحلیل شد.

نتایج و بحث

براساس نتایج بدست آمده، با استفاده آزمون پی سی آر و آغازگرهای TCTV11-1676-F/TCTV11-2699-R آلودگی گیاه تاتوره به ویروس پیچیدگی برگ شلغم تائید شد. برخلاف سایر میزبان‌های وحشی و آلوده به TCTV که قبلا گزارش شده‌اند (Razavinejad & Heydarnejad 2013; Farzadfar & Pourrahim 2013)، گیاه تاتوره علائم مشخص و مشابه ناشی از آلودگی به جمینی ویروس‌ها را نشان داد. آزمون پی سی آر با استفاده از محصول آر سی اِ بعنوان رشته الگو و آغازگرهای اختصاصی انتها به انتها، منجر به تکثیر قطعه قابل انتظار بطول تقریبی ۳ kb شد. جدایه بدست آمده تحت عنوان TCTV-[IR:Lap:L2-7:Dat:13] نامگذاری گردید. در مواردی، بدلیل پایین بودن غلظت ویروس، هر کدام از روش‌های پی سی آر و آر سی اِ به تنهائی قادر به تکثیر ژنوم کامل جمینی ویروس‌ها نیستند. در صورتیکه تلفیق این دو روش یعنی غنی‌سازی مولکول‌های حلقوی در مرحله نخست توسط آنزیم فی ۲۹ دی اِن اِ پلی مراز و سپس استفاده از پی سی آر می‌تواند نتیجه بخش باشد. تاکنون از ترکیب دو روش پی سی آر و آر سی اِ برای شناسائی عامل آلودگی چند گیاه به TCTV و TLRV با موفقیت استفاده شده است (Kamali *et al.* 2016a). علاوه بر این، پیشتر نیز استفاده از ترکیب این دو روش منجر به جداسازی یک تِرنکِرتوویروس جدید از بدن زنجرک *C. haematoceps* شده است (Kamali *et al.* 2016b). در این تحقیق نیز با استفاده از تلفیق این دو روش، ژنوم کامل یک جدایه از گیاه تاتوره تکثیر و در ناقل pJET1.2 همسانه‌سازی گردید. طول ژنوم کامل بعد از تعیین ترادف، در بانک جهانی ژن (GenBank) با رس شمار MF536416 ثبت شد. بر این اساس، ژنوم کامل جدایه تاتوره TCTV-[IR:Lap:L2-7:Dat:13] برابر ۲۹۶۸ نوکلئوتید و میزان شباهت آن با ترادف سایر جدایه‌های

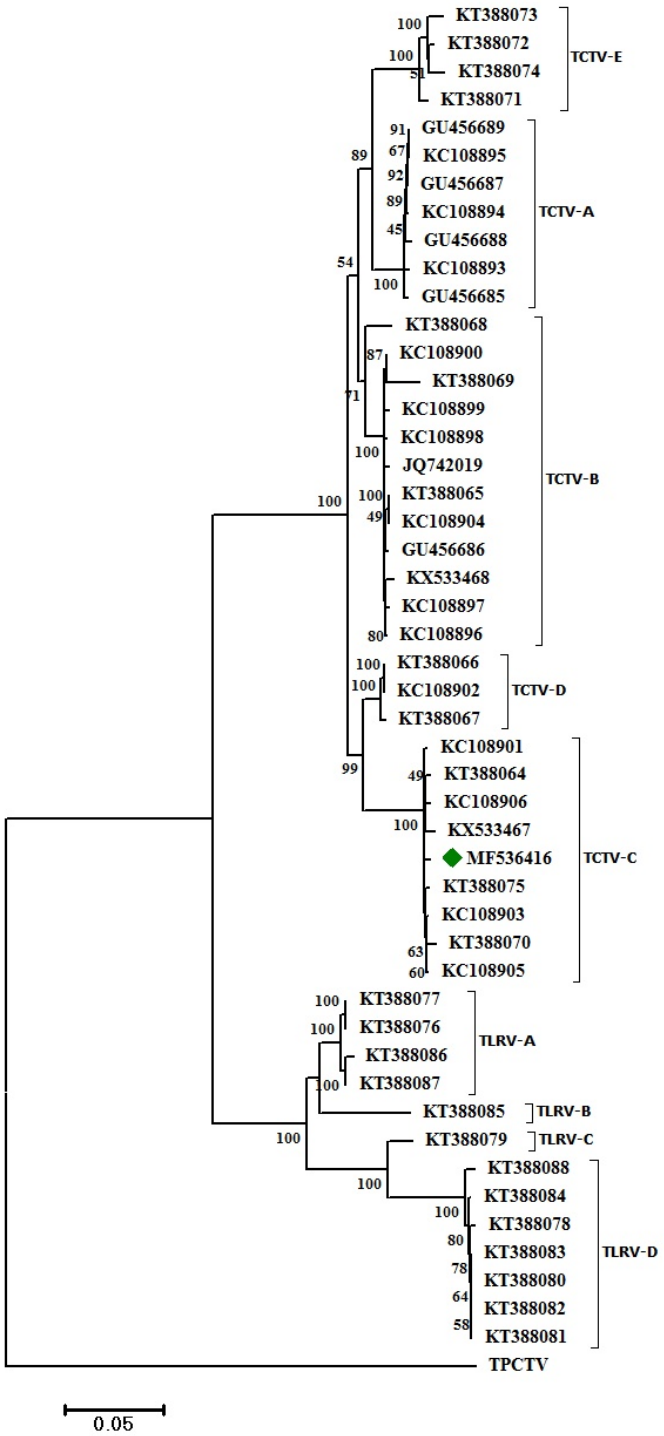


شکل۲. ماتریکس مقایسه دو به‌دوی ترادف‌های نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه تاتوره (MF536416 رنگ بنفش) با سایر ترادف‌های مربوط به ویروس پیچیدگی برگ شلغم (TCTV) موجود در بانک ژن (GenBank) با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2.

Fig 2. Pairwise identity matrix of the jimsonweed (in purple) and GenBank isolates of TCTV calculated using SDT v1.2.

TCTV موجود در بانک جهانی ژن به ترتیب از ۸۵/۸ تا ۹۹/۲ درصد می‌باشد. کمترین میزان تشابه با جدایه ترب از منطقه ظفرآباد فارس (KT388074) متعلق به زیرگروه TCTV-E و بیشترین میزان تشابه با جدایه شلغم از منطقه همایجان فارس (KC108901) متعلق به زیرگروه TCTV-C می‌باشد. در مقایسه ژنوم کامل جدایه تاتوره با اعضای گونه پیشنهادی TLRV (Kamali *et al.* 2016a) موجود در بانک جهانی ژن، میزان شباهت به ترتیب از ۷۳/۱ تا ۷۹/۶ درصد بود. کمترین میزان تشابه با جدایه شلغم از منطقه ظفرآباد فارس (KT388078) متعلق به زیرگروه TLRV-D و بیشترین میزان تشابه با جدایه شلغم از منطقه ظفرآباد فارس (KT388087) متعلق به زیرگروه TLRV-A می‌باشد. موقعیت چارچوب‌های خوانش (ORF) این جدایه شامل دو چارچوب خوانش برروی رشته ویروسی و چهار عدد برروی رشته مکمل، عمدتا شبیه سایر جدایه‌های این ویروس از جمله جدایه IR:Zaf:Z10:Tur:12 با رس شمار KC108903 است (Razavinejad *et al.* 2013)، با این تفاوت که طول چارچوب رمز کننده پروتئین rep بجای ۱۱۱۶ برابر ۱۱۵۸ نوکلئوتید می‌باشد. به همین دلیل، پروتئین rep در این جدایه در انتهای N-terminal دارای ۱۴ اسیدآمینه بیشتر می‌باشد.

بر اساس مطالعات قبلی (Kamali *et al.* 2016a; Razavinejad *et al.* 2013) و بر پایه آنالیزهای فیلوژنتیکی، تمام جدایه‌های TCTV، در پنج نژاد A، B، C، D و E گروه‌بندی می‌گردند. بنابراین، جدایه تاتوره، با توجه به شباهت ژنوم بیش از ۹۸٪ با سایر جدایه‌های مربوط به نژاد TCTV-C، بعنوان نژاد C ویروس پیچیدگی برگ شلغم معرفی می‌گردد (شکل ۲). همچنین، داده‌های درخت فیلوژنتیکی به روش انطباقی (neighbor-joining)، گروه بندی جدایه تاتوره را در نژاد C گونه تیپ این جنس، تأیید می‌کند (شکل ۳). سایر جدایه‌های این



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی براساس ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه تاتوره (لوزی سبز رنگ) و سایر جدایه‌های تِرنکِرتوویروس‌ها به روش اتصال مجاور (**neighbor-joining**). محاسبه **bootstrap** با تعداد ۱۰۰۰ تکرار انجام شده است و تنها عضو جـنس ***Topocuvirus*** به‌عنوان مدل خارج گروه (**outgroup**) در نظر گرفته شده است. انشعابات با حمایت کمتر از ٤٠٪ از شکل حذف شده‌اند.

Fig 3. Neighbor-Joining phylogenetic tree using full-length genome sequence of the jimsonweed (green diamond) and other GenBank isolate of turncurtoviruses. Bootstrap values were calculated from 1000 replicates and tomato pseudo-curly top virus was used as outgroup. Branches with <40% bootstrap support have been collapsed.

ویروس که تاکنون بعنوان نژاد C معرفی شده‌اند یا از گیاه شلغم گزارش شده‌اند (Kamali *et al.* 2016a; Razavinejad *et al.* 2013) و یا در مورد جدایه KX533467، از بدن زنجرک‌ها با روش توالی یابی نسل جدید جداسازی و گزارش گردیده‌اند (Kamali *et al.* 2017). باوجودی‌که تاکنون پنج علف هرز بعنوان میزبان TCTV گزارش شده است (Razavinejad & Heydarnejad 2013; Farzadfar & Pourrahim 2013) این اولین گزارش از جداسازی و تعیین ترادف ژنوم کامل یک جدایه از این ویروس از یک میزبان وحشی است.

تمام ویروس‌های ایجاد کننده بیماری پیچیدگی برگ چغندر قند و شلغم در ایران یعنی ویروس پیچیدگی برگ چغندر قند، ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندر قند، TCTV و TLRV دارای دامنه میزبانی وسیعی هستند (Bennett, 1971; Gharouni *et al.*, 2013; Kamali *et al.* 2016a). نتایج این تحقیق، ضمن معرفی یک میزبان جدید ویروس پیچیدگی برگ شلغم، بار دیگر دامنه میزبانی وسیع تِرنکِرتوویروس‌ها را تائید می‌کند.

منابع

Bennett C.W. 1971. The Curly Top Disease of Sugar Beet and Other Plants. St Paul, MN, APS Press, Monograph No. 7.

Briddon R.W., Heydarnejad J., Khosrowfar F., Massumi H., Martin D. and Varsani A. 2010. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. Virus Research 152: 169–175.

Brown J.K., Fauquet C.M., Briddon R.W., Zerbini M., Moriones E., Navas-Castillo J. 2012. *Geminiviridae*. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (eds) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 351–373.

Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32: 1792-1797.

Farzadfar Sh. and Pourrahim R. 2013. Wild radish (*Raphanus raphanistrum*) a new host for *Turnip curly top virus*. Proceeding of the 7th International Geminivirus Symposium and 5th International ssDNA Comparative Virology Workshop, Hangzhou, China. (http://www.geminivirus.org/doc/Program_and_Abstracts.pdf) (accessed 7 January 2014).

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.

Kamali M., Heydarnejad J., Pouramini N., Massumi M. Farkas K., Kraberger S. and Varsani A. 2017. Genome sequences of Beet curly top Iran virus, Oat dwarf virus, Turnip curly top virus, and Wheat dwarf virus identified in leafhoppers. Genome Announcement 5: 1-2.

Kamali M., Heydarnejad J., Massumi H., Kvarnheden A., Kraberger S. and Varsani A. 2016a. Molecular diversity of turncurtoviruses in Iran. Archives of Virology 161: 551-561.

Kamali M., Heydarnejad J., Massumi H. and Shamshiri M. 2016b. Isolation of a new turncurtovirus from leafhoppers vector in Kerman province. Proceeding of the 22nd Iranian Plant Protection Congress. Iran, Karaj p. 11.

Krenz B., Thompson J.R., Fuchs M. and Perry K.L. 2012. Complete genome sequence of a new circular DNA virus from grapevine. Journal of Virology 86: 7715.

Liang P., Navarro B., Zhang Z., Wang H., Lu M., Xiao H., Wu Q., Zhou X., Di Serio F. and Li S. 2015. Identification and characterization of a novel geminivirus with monopartite genome infecting apple trees. Journal of General Virology 96: 2411-20.

Loconsole G., Saldarelli P., Doddapaneni H., Savino V., Martelli G.P. and Saponari M. 2012. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family *Geminiviridae*. Virology 432: 162–172.

Muhire B.M., Varsani A. and Martin D.P. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence

alignment and identity calculation. PLoS ONE 9: e108277.
Razavinejad S. and Heydarnejad J. 2013. Transmission and natural hosts of turnip curly top virus. Iranian Journal of Plant Pathology 49: 83-91.
Razavinejad S., Heydarnejad J., Kamali M., Massumi H., Kraberger S. and Varsani, A. 2013. Genetic diversity and host range studies of turnip curly top virus. Virus Genes 46: 345–353.
Shepherd D.N., Martin D.P., Lefeuvre P., Monjane A. L., Owor B.E., Rybicki E.P. and Varsani A. 2008. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. Journal of Virological Methods 149: 97-102.
Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
Varma A. and Malathi V. G. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. Annals of Applied Biology 142: 145–164.
Varsani A., Roumagnac P., Fuchs M., Navas-Castillo J., Moriones E., Idris A., Briddon R.W., Rivera-Bustamante R., Murilo Zerbini F. and Martin D.P. 2017. *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family *Geminiviridae*. Archives of Virology 162: 1819-1831.
Zerbini F.M., Briddon R.W., Idris A., Martin D.P., Moriones E., Navas-Castillo J., Rivera-Bustamante R., Rougmanac P. and Varsani A., ICTV Report Consortium (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*. Journal of General Virology 98: 131–133
Zhang Y.P., Uyemoto J.K. and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. Journal of Virological Methods 71: 45-50.