Journal of Microbial World
Volume 14, No. 2, August 2021

Original Article

Full-length genome sequencing of an isolate of tomato yellow leaf curl virus to determine its taxonomical place

Negahdar Oladhossein[1], Kavous Ayazpour[2], Ali Pakniat[3]

[1]MSc. Department of Plant Pathology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [3]Assistant Professor, Plant Protection Department, Fars Research Center for Agriculture and Natural Resources Shiraz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) is one of the most common and important tomato diseases in Iran. Sequences of viral genomes help to find and interbreed resistant plant varieties. This study aimed to sequence the complete genome of an isolate of the TYLCV, determine its strain and taxonomic status.

Materials & Methods: For this purpose, a viral isolate from Assaluyeh was selected and studied. Using degenerate primers of begomoviruses (BC/PCRV 181) a fragment (500bp) of the genome was amplified in a polymerase chain reaction (PCR). According to the sequence of this fragment (500bp), a primer pair was designed (FarsC/FarsV) to achieve the full genome sequence of the virus. By utilizing a combination of primers (FarsC/PAL1V 1978) / (FarsV/TYLCV-[Ab] 1997C) complete sequence of Asalooyeh isolate was amplified and the taxonomic position of that isolate was determined.

Results: Phylogenetic analysis showed that this isolate had a one-part genome and was more than 93% similar to the Omani strain. Therefore, this isolate is an Omani variant of the virus. In other researches, was stated that there is only TYLCV-IL strain in Bushehr province, while the results of this study prove the existence of TYLCV-OMN strain.

Conclusion: According to the results of this study Asalooyeh isolate of TYLCV belongs to the Omani strain of TYLCV that produces severe yellowing in host plants.

Keywords: Bushehr Province, Begomovirus, Farsc/PAL1v1987 primer, Farsv/TYLCV-[Ab]1997c primer.

Received: 20 January 2021 Revised: 30 May 2021 Accepted: 27 July 2021

Correspondence to:Kavous Ayazpour

Tel: +98 9177914650

E-mail: ayazpour@yahoo.com

Journal of Microbial World 2021, 14(2): 69-78

DOI: 10.30495/jmw.2021.690444

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهاردهم شماره دوم (پیاپی۴۷) تابستان ۱۴۰۰
صفحات ۷۸-۶۹

Original Article

ترادف‌یابی کامل ژنوم یک جدایه ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی و تعیین جایگاه تاکسونومیکی آن

نگهدار اولادحسین[۱]، کاوس ایازپور[۲*]، علی پاکنیت[۳]

[۱] گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. [۲] استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.
[۳] گروه گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های گوجه‌فرنگی در ایران است. تعیین ترادف ژنوم ویروس و شناسایی نژاد آن به تولید نژاد مقاوم کمک می‌کند. هدف از این تحقیق تعیین ترادف کامل ژنوم یک جدایه از ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی، تعیین نژاد و جایگاه تاکسونومیکی آن بود.

مواد و روش‌ها: به منظور ترادف‌یابی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی در استان بوشهر، یک جدایه ویروسی از مزارع گوجه‌فرنگی عسلویه انتخاب و بررسی شد. ابتدا با کمک جفت آغازگرهای دژنره بگومو ویروس‌ها قطعه‌ای به طول bp500 در آزمون PCR تکثیر و ترادف‌یابی گردید. سپس با استفاده از ترادف این قطعه یک جفت آغازگر برای دستیابی به ژنوم کامل ویروس با نام Farsc/Farsv طراحی شد. با کمک ترکیب جفت آغازگر Farsc/PAL1v1987 و جفت آغازگر Farsv/TYLCV-[Ab]1997c ترادف کامل ژنوم ویروس تعیین گردید. با کمک برنامه‌های بیوانفورماتیک و مقایسه ژنوم کامل ویروس با سایر ویروس‌های منطقه و جهان، جایگاه تاکسونومیکی ویروس عسلویه تعیین گردید.

یافته‌ها: آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه مذکور دارای ژنوم یک بخشی بوده و با نژاد عمانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی شباهت بیش از ۹۳٪ دارد. لذا این جدایه واریانتی از نژاد عمانی ویروس است. در تحقیقات دیگر محققین بیان شده بود که در استان بوشهر فقط نژاد TYLCV-IL وجود دارد در حالی‌که نتایج این تحقیق وجود نژاد TYLCV-OMN را در استان بوشهر به اثبات می‌رساند.

نتیجه‌گیری: با توجه به مطالعات انجام شده جدایه عسلویه عضوی از گروه عمانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی است که زردی شدید ایجاد می‌کند.

واژگان کلیدی: استان بوشهر، بگومو ویروس، آغازگر Farsc/PAL1v1987، Farsv/TYLCV-[Ab]1997c.

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۱ ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۳/۹ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۵/۵

مقدمه

بیماری پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (Tomato Yellow Leaf Curl Disease, TYLCD) یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی در نواحی گرم و نیمه گرم جهان است که بین ۵۰ تا ۹۹ درصد محصول گوجه‌فرنگی را کاهش می‌دهد (۱). اولین گزارش این ویروس مربوط به سال ۱۹۶۴ از فلسطین است (۲)، در ایران سال ۱۹۹۶ از استان‌های جنوبی گزارش شد (۳). به دنبال آن سال‌های بعد از دیگر نقاط

*) آدرس برای مکاتبه: گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.
تلفن: ۰۹۱۷۷۹۱۴۶۵۰ پست الکترونیک: ayazpour@jia.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

ایران نیز گزارش گردید (٤). گیاهان آلوده بسته به رقم، مرحله رشدی گیاه، زمان آلودگی و شرایط محیطی، دارای میوه‌های کم، ریز و در برخی موارد به دلیل ریزش پیش از موعد گل، فاقد میوه هستند و علائمی از قبیل زردی، کوتولگی شدید و پیچیدگی لبه‌های برگ به سمت بالا بروز می‌دهند (۱).

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی از خانواده Geminiviridae و جنس Begomovirus می‌باشد. خانواده Geminiviridae شامل ویروس‌های ایزومتریک به قطر ۲۰-۱۸ نانومتر است که پیکره‌های آن‌ها اغلب به صورت دوقلو به هم چسبیده‌اند و ژنوم آن‌ها را یک یا دو حلقه DNA تک‌لا هرکدام به اندازه ۳-۲/۵ کیلوباز تشکیل می‌دهد. بیشتر اعضای این جنس دارای ژنوم دوبخشی هستند که به ترتیب DNA-A و DNA-B نامیده می‌شوند. تعدادی از بگوموویروس‌ها مانند ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی و ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی (Tomato Leaf Curl Virus, TLCV) دارای ژنوم یک بخشی هستند که معادل DNA-A در بگوموویروس‌های دوبخشی است و حاوی شش چارچوب ژنی می‌باشد. ژن‌های C1, C2, C3 و C4 که بر روی رشته مکمل بگوموویروس‌های یک بخشی قرار دارند به ترتیب پروتین‌های همراه با همانندسازی و فعال کننده ترانویسی، افزایش دهنده همانندسازی و پروتینی که تکثیر سلول میزبان را القا می‌کند رمزگذاری می‌کنند (۵). چارچوب ژنی V1 روی رشته ویریونی پروتین پوششی ویروس را رمزگذاری می‌کند و چارچوب ژنی V2 نیز در ایجاد بیماری و حرکت سلول به سلول ویروس نقش دارد (٦).

نژادهای توصیف شده TYLCV تاکنون شامل هفت نژاد است که عبارتند از TYLCV-IL (فلسطین اشغالی-ایران)، TYLCV-Mld (فلسطین اشغالی)، TYLCV-Gez (سودان)، TYLCV-OM (عمان-ایران)، TYLCV-IR (ایران)، TYLCV-Bou (ایران) و TYLCV-Ker (ایران) (۷) و از این میان پنج نژاد از هفت نژاد توصیف شده TYLCV از ایران گزارش شده است که بیشترین تعداد نسبت به هر کشور دیگری است.

پویایی جمعیت ویروسی غالبا منجر به تکامل و ظهور واریانت‌های جدید سازگار با محیط می‌شود که این امر باعث غلبه ذخیره ژنومی شبه گونه ویروسی بر مقاومت گیاه میزبان شده و در نتیجه منجر به شیوع بیماری ویروسی می‌شود (۸). از این رو شناسایی تنوع موجود بین این ویروس‌ها به محققین کمک می‌نماید تا راه‌های کارآمدتری جهت مقابله با آن‌ها اتخاذ نمایند. در این تحقیق جدایه‌ای از ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی انتخاب و پس از تعیین توالی ژنوم آن، جایگاه تاکسونومیکی آن نیز بررسی گردیده است.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه از مناطق مرزی استان بوشهر با فارس: به منظور توالی‌یابی ویروس عامل پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی از مناطق مرزی استان بوشهر با استان فارس شامل مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی آبدان، کنگان و عسلویه بازدید به عمل آمد. نمونه‌برداری از بوته‌ها و نشاءهای دارای علایم (کوتولگی، پیچیدگی برگ همراه با زردی حاشیه‌ای و چروکیدگی) به ویژه در جوانه‌های انتهایی انجام پذیرفت و تعداد ۲۸ نمونه برگی درون کیسه‌های پلاستیکی حاوی اطلاعات: مختصات جغرافیایی،نام منطقه، تاریخ نمونه‌برداری و شماره نمونه جمع‌آوری ونمونه‌ها بروی یخ و درون ظروف عایق گذاشته شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

ب) استخراج DNA از نمونه‌های آلوده: استخراج DNA بر اساس روش Dellaporta et al., (9) با اندکی تغییر به صورت زیر انجام شد: ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از بافت برگ گیاه در هاون استریل با استفاده از ازت مایع به حالت پودر درآمد. سپس مقدار ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (CTAB 2gr, NaCl 8.18gr, PVP 2gr, Tris-base 1.25 gr و 2-Mercaptoethanol 100µl, H2O 100µl) اضافه گردید. سوسپانسیون حاصل، درون تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل و در حمام آب گرم 65 C° به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و هر ۵ دقیقه چندین بار به‌هم زده شدند. سپس مقدار ۸۰۰ میکرولیتر کلروفرم و ایزوآمیل الکل به نسبت ٢٤ به ۱ به تیوب‌ها اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه

تیوب‌ها در دمای اتاق بهم زده شد. اولین سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) در دمای 21 C° انجام گرفت. پس از میان‌گریز سازی اول مقدار ۲۵۰ میکرولیتر فاز رونشین برداشته و به تیوب‌های سترون ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه تکان داده شدند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 20 C°- قرار گرفتند. سانتریفیوژ دوم به مدت ۱۲ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای 21 C° انجام و فاز رویی حذف شد و جهت شستشوی رسوب DNA، ۵۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۷۰٪ اضافه گردید. رسوبات DNA در دمای اتاق خشک شده ومقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطراستریل به تیوب‌ها اضافه و در دمای 20 C°- نگهداری گردیدند تا از آن‌ها به عنوان دی ان ای الگو استفاده شود.

ج) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR (Polymerase Chain reaction) و تعیین توالی: آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری شامل: ۰/۲ میلی‌مولار از هرکدام از dNTPs (سیناژن)، ۳ میلی‌مولار MgCl2، ۱۰ میلی‌مولار تریس اسیدی (pH 8.3)، ۵۰ میلی‌مولار KCl، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکو مولار، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq polymerase (سیناژن) و یک میکرولیتر DNA استخراج شده، انجام شد. به این منظور ابتدا از جفت آغازگرهای دژنره PCRV181 و Primer BC که اختصاصی DNA-A در بگوموویروس‌ها هستند و قطعه‌ای حدود۵۰۰ جفت باز (جدول ۱) از ژن‌های پروتین‌های پوششی و حرکتی ویروس را تکثیر می‌کنند، استفاده شد. پس از تکثیر قطعه مورد نظر توسط آغازگر دژنره فوق از جفت آغازگرهای [Ab]-TYLCV/ FarsV 1997C و FarsC/PAL1V1978 به منظور تکثیر قطعات ۱۶۰۰ و ۱۲۰۰ نوکلوتیدی جهت ترادف کامل ژنوم ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی استفاده شد. برای جلوگیری از تبخیر و سرعت بخشیدن به تعادل حرارتی، یک قطره روغن معدنی استریل، به هر میکروتیوپ اضافه شد چرخه دمایی PCR شامل یک واسرشتگی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه و امتداد نهایی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، بود. پس از اتمام مراحل، محصول PCR در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید. ژل، به منظور رنگ‌آمیزی به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قرار داده شد. پس از شستن ژل با آب معمولی از طریق دستگاه ژل داکیومنت مدل GBox بررسی و با استفاده از نرم‌افزار Gen snap از باندهای حاصل در طول موج اشعه ماورابنفش عکسبرداری شد. جهت خالص‌سازی DNA محصول PCR به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر تهیه و به همراه ۲۰ میکرولیتر از جفت پرایمر مورد استفاده به شرکت تکاپو زیست جهت خالص‌سازی و تعیین ترادف ارسال گردید.

د) تعیین جایگاه تاکسونومیکی: با کمک پایگاه NCBI و بانک جهانی ژن ترادف کامل جدایه‌های متفاوت ایران و جهان (جدول ۲) ویروس T(Y) LCV استخراج و با استفاده از نرم افزارهای DNAMAN، Megalign، EditSeq، TreeView و clustalX جایگاه تاکسونومیکی ترادف به‌دست آمده از جدایه عسلویه استان بوشهر و درصد شباهت آن با سایر جدایه‌ها تعیین گردید. ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه آمریکایی Abutilon mosaic virus به عنوان یک گونه خارج از گروه TYLCVs نیز در این مطالعه استفاده شد.

یافته‌ها

الف) شناسایی ویروس مولد پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی در استان بوشهر (تشخیص DNA و ترادف‌یابی قطعه حاصل): پس از استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده، با استفاده از جفت آغازگرهای دژنره PCRV181 (10) و Primer BC (11) که اختصاصی DNA-A در بگوموویروس‌ها هستند بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز قطعه‌ای حدود۵۰۰ جفت باز (شکل ۱) از ژن‌های پروتین‌های پوششی و حرکتی ویروس مناطق مرزی استان بوشهر تکثیر و تعداد ۳ نمونه مثبت

جدول ۱: نام آغازگرها، ترادف و اندازه قطعه تکثیری مورد انتظار.

Name of primer	Annealing temperature	Position on genome	Size	Sequence of primer	Size of amplified segment (bp)	Reference
PCR^{V} 181	55°c	Degenerate	18	5′TAATATTACCGGWTGGCC3′	500	(10)
PCR B^{c}		Degenerate	23	5′TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA3′		(11)
Fars C	55°c	Degenerate	36	5′GCCCTTACAACAGATATAAGATCCCTAATTAAATCG3′	1200	(10)
PAL1^{V}1978		Degenerate	30	5′GCATCTGCAGGCCCACATYGTCTTYCCNGT3′		
Fars V		Degenerate	31	5′GAACTTCGACAGCCCMTACAGCAGCCGTGCT3′		
TYLCV-[Ab] 1997^{C}	55°c	1976-1997	22	5′CGCGGCCATGGAGACCTAATAG3′	1600	(12)

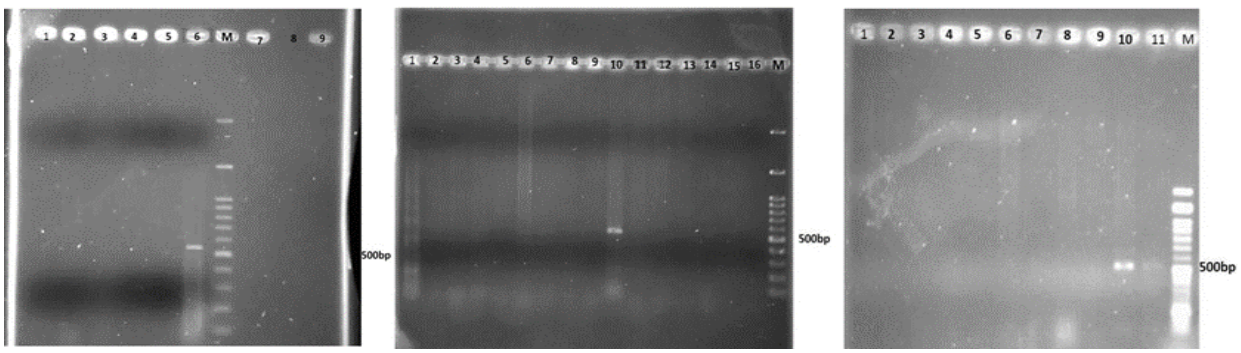
[a]نوکلئوتیدهای دژنره با حروف کد IUPAC بدین قرار می‌باشند: B=C,G; R=A,G; M=A,C; N=A,T,C,G ;W=A,T; Y=C,T. C آغازگر رشته مکمل ویروسی، V آغازگر رشته ویروسی.

تشخیص داده شد.

جفت آغازگر (Primer BC/PCRV181) قطعه‌ای به اندازه ۶۰۰-۵۰۰ جفت باز را تکثیر می‌کنند که یک طرف آن ۹ نوکلوتید ثابت در ناحیه حفاظت شده stem-loop و طرف دیگر آن ترادف مربوط به ۸ آمینواسید حفاظت شده (CEGPCKVQ) در ناحیه انتهایی N در پروتین پوششی است (۱۳).

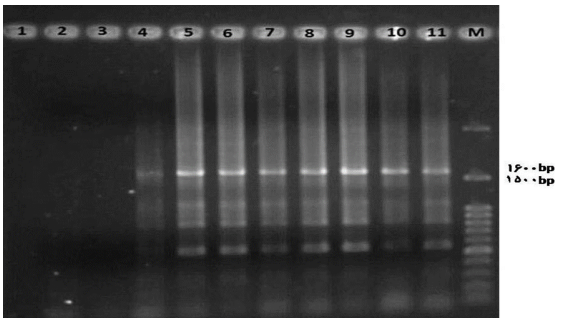
ب) تکثیر ژنوم کامل: نمونه‌های مثبت حاصل از واکنش PCR با کمک جفت آغازگرهای PCRV 181/PrimerBC که قطعه‌ای حدود ۵۰۰ جفت باز را تکثیر نمود، ترادف‌یابی و با استفاده از بانک جهانی ژن مشخص گردید که این قطعه ۵۰۰ جفت بازی مربوط به ویروس پیچیدگی برگ (زرد) گوجه‌فرنگی است. نمونه ۲۸ مربوط به گوجه فرنگی گلخانه‌ای که نشاء آن نیز در گلخانه تولید شده و واقع در روستای آخند عسلویه بود، با توجه به تعیین ترادف این ناحیه از ژنوم و همچنین بعلت وجود علائم تیپیک گیاه، نزدیکی این منطقه به مناطق مرزی با استان فارس و وجود باند مناسب در ژل الکتروفورز جهت تکثیر کامل ژنوم انتخاب گردید. باند حدود ۱۶۰۰ جفت بازی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با کمک جفت آغازگرهای FarsV/ TYLCV-[Ab] 1997C از نمونه ۲۸ عسلویه تکثیر و ردیابی گردید (شکل ۲).

تعدادی باند کوچکتر در زیر باند مورد انتظار (۱۶۰۰جفت بازی) مشاهده گردید، با توجه به اینکه باندهای اضافه احتمالابه علت وجود قطعات کوچکتر حاصل از همانندسازی ویروس به روش RDR می‌باشد، محصول PCR، جهت استخراج قطعه مورد نظر از ژل به شرکت تکاپو زیست ارسال شد و سپس برای ترادف‌یابی به کشور کره جنوبی



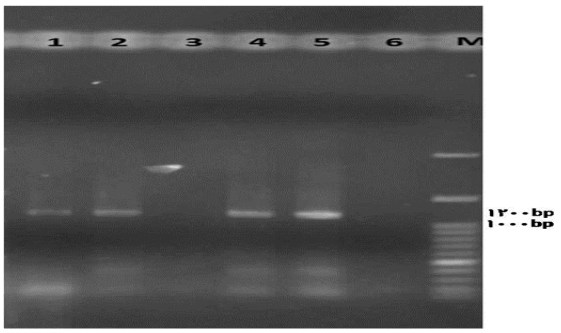
شکل ۱: نقوش الکتروفورزی حاصل از واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای Primer B^{C}/PCR^{V} 181. الف) خط ٦ نمونه ۱ گلخانه تولید نشاء آبدان. ب) خط ۱۰ نمونه ۱۲ کنگان. ج) خط ۱۰ نمونه ۲۸ عسلویه.M= مارکر ۳۰۰۰bp-۱۰۰شرکت سیناژن.

شرکت BioNeer ارسال گردید (شکل ۲).



شکل ۲: نقوش الکتروفورزی حاصل از واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای 1997^{C} FarsV/ TYLCV-[Ab]. خطوط ۵ الی ۱۱ نمونه ۲۸ عسلویه. M= مارکر ۳۰۰۰bp–۱۰۰ شرکت سیناژن.

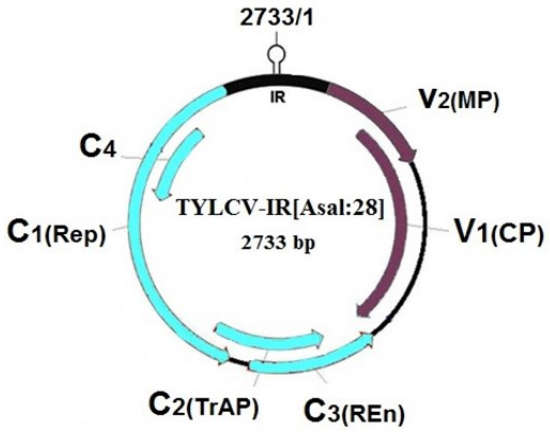
در ادامه باند حدود ۱۲۰۰ جفت بازی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با کمک جفت آغازگرهای FarsC/PAL1^{V}1978 از نمونه ۲۸ عسلویه تکثیر و ردیابی گردید (شکل ۳).



شکل ۳: نقوش الکتروفورزی حاصل از واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای FarsC / PAL1^{V}1978. خطوط ۱ الی ۶ نمونه ۲۸ عسلویه. M= مارکر۳۰۰۰bp–۱۰۰ شرکت سیناژن.

تعدادی باند کوچکتر در زیر باند مورد انتظار (۱۲۰۰جفت بازی) مشاهده می‌گردد (شکل ۳)، نظر به اینکه باندهای اضافه احتمالاً به علت وجود قطعات کوچکتر حاصل از همانندسازی ویروس به روش RDR می‌باشد، محصول PCR به شرکت تکاپو زیست ارسال شد و قطعه مورد نظر از ژل استخراج شده و سپس برای ترادف‌یابی به کشور کره جنوبی شرکت BioNeer ارسال گردید.

ج) تعیین درصد شباهت و موقعیت تاکسونومیکی: تعیین درصد شباهت پس از تعیین ترادف کامل ژنوم نمونه ۲۸عسلویه با کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیک (DNAMAN و Megalign)، نقشه کامل ژنوم (شکل ٤) همراه با پروتین‌های کدپذیر آن مشخص گردید (جدول ۲). بر اساس اطلاعات موجود درجدول ۳ درصد شباهت این جدایه ویروس گیاهی با سایر جدایه‌های ایران و جهان مشخص گردید و نشان داده شد که جدایه ۲۸ عسلویه با جدایه منطقه ارد شهرستان لار TYLCV-IR [Lar:Arad:99] حدود ۹۷ درصد و با سایر جدایه‌ها TYLCV-OM [IR] حدود ۹۵ درصد شباهت دارد.



شکل ٤: نقشه کامل ژنوم همراه با پروتین‌های کدپذیر ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی جدایه عسلویه بوشهر. ژن‌های C1، C2، C3، و C4 که بر روی رشته مکمل قرار دارند به ترتیب پروتین‌های همراه با همانندسازی و فعال کننده ترانویسی، افزایش دهنده همانندسازی و پروتینی که تکثیر سلول میزبان را القا می‌کند رمزگذاری می‌کنند (۵). چارچوب ژنی V1 بر روی رشته ویریونی پروتین پوششی ویروس را رمزگذاری می‌کند و چارچوب ژنی V2 نیز در ایجاد بیماری و حرکت سلول به سلول ویروس نقش دارد (٦).

د) تعیین موقعیت تاکسونومیکی: به منظور تعیین جایگاه تاکسونومیکی جدایه عسلویه ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی با استفاده از نرم افزارهای ClustalX 1.81 و TreeV32 اطلاعات ژنوم کامل ویروس‌های جهان و محلی که ژنوم کامل آن‌ها تعیین ترادف شده بود (جدول ۳) همردیف‌سازی شد و دندروگرام آن تهیه گردید (شکل۵). نتایج حاصل از این دندروگرام نشان داد که جدایه ۲۸ عسلویه با جدایه منطقه ارد شهرستان لار TYLCV-IR [Lar:Arad:99] نزدیک به زیر گروه عمانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی TYLCV-OM [IR] قرار می‌گیرد.

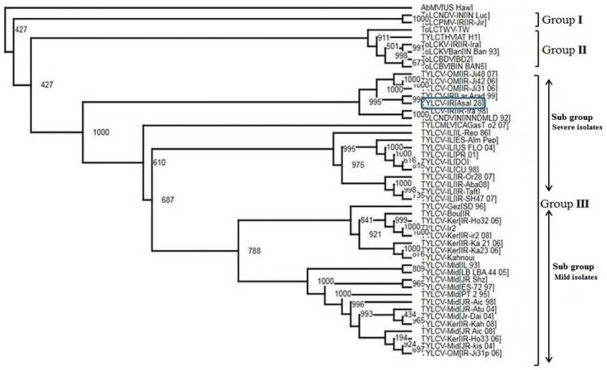
جدول ۲: چارچوب‌های ژنی کد پذیر مربوط به نمونه ۲۸ عسلویه بوشهر.

ORF	Number of amino acid	Position of ORF on genome (5′-3′)
V1	220	289-951
V2	116	129-479
C1	358	1521-2597
C2	135	1205-1612
C3	134	1060-1462
C4	97	2147-2440

جدول ۳: اطلاعات مربوط به ویروس‌های مورد استفاده در مطالعات هم‌ردیف‌سازی و آنالیزهای فیلوژنتیکی و درصد شباهت نوکلئوتیدی آن‌ها با نمونه ۲۸ عسلویه.

Virus name	Short name of virus	Accession number	%similarity
Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV-IL[US:FLO:04]	AY530931	63.7
Tomato yellow leaf curl virus - [Puerto Rico]	TYLCV-IL[PR:01]	AY134494	87.4
Tomato yellow leaf curl virus-[Shiraz:Iran]	TYLCV-IL[IR:SH47:07]	GU076447	88.5
Tomato yellow leaf curl virus-[Taft:Iran]	TYLCV-IL[IR:Ta30:06]	GU076440	88.5
Tomato yellow leaf curl virus strain Abadeh	TYLCV-IL[IR:Aba:08]	FJ355946	88.1
Tomato yellow leaf curl virus-[Orzuiyeh:Iran]	TYLCV-IL[IR:Or28:07]	GU076445	88.7
Abutilon mosaic virus-[USA:Hawaii]	AbMV-[US:Haw]	U51137	63.7
Tomato yellow leaf curl virus-[Jiroft:Iran]	TYLCV-OM [IR:Ji31p:06]	GU076453	87.6
Tomato yellow leaf curl virus-[Jiroft:Iran]	TYLCV-OM[IR:Ji42:06]	GU076452	94.7
Tomato yellow leaf curl virus-[Jiroft:Iran]	TYLCV-OM[IR:Ji48:07]	GU076450	95.2
Tomato yellow leaf curl virus - Mild[Aichi]	TYLCV-Mid[JR:Aic:98]	AB014347	87.6
Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan:Daito]	TYLCV-Mid[JR:Dai:04]	AB116635	87.5
Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan:Kisozaki]	TYLCV-Mid[JR:kis:04]	AB116634	87.6
Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan:Atumi]	TYLCV-Mid[JR:Atu:04]	AB116633	87.4
Tomato yellow leaf curl virus-Mild[Tokai]	TYLCV-Mid[JR:Aic:08]	AB4399842	87.6
Tomato yellow leaf curl virus isolate LBa4 from Lebanon	TYLCV-Mid [LB:LBA44:05]	EF185318	87.1
Tomatoyellow leaf curl virus[India:NewDelhi:Mild:1992]	ToLCNDVIN [IN:ND:Mid:92]	U15016	91.9
Tomato yellow leaf curl virus-[Kahnooj:Iran]	TYLCV-Ker [IR:Ka23:06]	GU076448	89.4
Tomato yellow leaf curl virus-[Kahnooj:Iran]	TYLCV-Ker [IR:Ka21:06]	GU076449	89
Tomato yellow leaf curl virus-[Minab:Iran]	TYLCV-Ker [IR:Ho33:06]	GU0764443	87.6
Tomato yellow leaf curl virus-[Minab:Iran]	TYLCV-Ker [IR:Ho32:06]	GU076442	89.6
Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV-Ker[IR:ir2:08]	EU085423	87.3
Tomato yellow leaf curl virus-Boushehr[Genaveh:Iran]	TYLCV-Bou [IR:Ge29:06]	GU076454	87.2
Tomato yellow leaf curl virus – Gezira	TYLCV-Gez[SD:96]	AY044138	86.9
Tomato yellow leaf curl Mali virus	TYLCMLV-[CA:Gas:To2:07]	FM212663	86
Tomato yellow leaf curl virus-Israel	TYLCVIL [ES:ALm:Pep:99]	AJ489258	88.1
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [Dominican Republic]	TYLCV-IL[DO:94]	AF024715	87.6
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [Cuba]	TYLCV-IL[CU:98]	AJ223505	87.6
Tomato yellow leaf curl virus-Iran [Iran:Iranshahr:1998]	TYLCV-IR[IR:Ira:98]	AJ132711	91.9
Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Portugal:2:1995]	TYLCV-MId[PT:2:95]	AF105975	87.7
Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Spain:72:1997]	TYLCV-MID[ES-72-97]	AF071228	87.4
Tomato yellow leaf curl virus-Israel [Israel:Rehovot:1986]	TYLCV-IL[IL:Reo:86]	X15656	89.3
Tomato yellow leaf curl virus -[Kahnouj]	TYLCV-[Kahnouj]	EU635776	89.3
Tomato yellow leaf curl virus-[Iran 2]	TYLCV-IR2	EU085423	87.3
Tomato yellow leaf curl virus-Mild[Israel:1993]	TYLCV-Mid[IL:93]	X76319	87.3
Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan:Shizuoka]	TYLCV-Mid[JR:Shz]	AB014346	87.5
Tomato leaf curl Karnataka virus-Bangalore [India: Bangalore: 1993]	ToLCKVBan[IN:Ban:93]	U38239	78.7
Tomato leaf curl Bangladesh virus-[Bangladesh:2]	ToLCBDV[BD2]	AY188481	74.1
Tomato leaf curl Karnataka virus-Iran [Iran:Iranshahr]	ToLCKV-IR[IR:Ira]	AY297924	77
Tomato leaf curl Taiwan virus-A [Taiwan]	ToLCTWV-[TW]	U88692	76.1
Tomato leaf curl Bangalore virus-B[India:Bangalore 5]	ToLCBV-B[IN:Ban5]	AF295401	73.6
Tomato yellow leaf curl Thailand virus-A [Thailand:1]	TYLCTHV-A[TH:1]	X63015	74.8
Tomato leaf curl New Delhi virus-India [India:Lucknow]	ToLCNDV-IN[IN:Luc]	Y16421	71.6
Tomato leaf curl Palampur virus IR: Jir: T55X:Cuc:08 DNA-A	TYLCV-IR[Lar:Arad:99] ToLCPMV-IR[IR-Jir] TYLCV-Ker[IR-Kah:08]	FJ660444	98.1 70.2 87.5
Tomato yellow leaf curl virus-[Jiroft:Iran]	TYLCV-OM[IR-Ji31:06]	GU076441	94.5

دندروگرام حاصل از مطالعات تبارزایی نشان می‌دهد که بگومو‌ویروس‌های نام برده شده در جدول ۳ به سه گروه اصلی و چندین زیر گروه تقسیم می‌شوند.



شکل ۵: دندروگرام حاصل از همردیف سازی ژنوم کامل ۴۷ جدایه ویروس پیچیدگی برگ (زرد) گوجه‌فرنگی بر اساس برنامه Clustalx 1.81 که بیانگر رابطه فیلوژنتیکی بین این ویروس‌ها می‌باشد. اعداد واقع شده در Bootstrap بیانگر میزان قابل اعتماد بودن درخت فیلوژنی می‌باشد. TYLCV-IR [Asal:28] (نمونه ۲۸ شهرستان عسلویه استان بوشهر) در مستطیل نشان داده شده است. ویروس ABMV به عنوان outgroup در نظر گرفته شد.

بحث

پس از تعیین توالی جدایه عسلویه، توالی این جدایه در بانک جهانی ژن با رس شمار KT990213 به ثبت رسید. با توجه به تحقیقات گرونن برن (۱۴) و سایر محققین نقشه کامل ژنوم (شکل ٤) نمونه ۲۸ شهرستان عسلویه TYLCV-IR [Asal:28] مشابه ژنوم سایر جدایه‌های یک بخشی TYLCV بود که دو چارچوب ژنی همپوشان V1 و V2 در روی رشته ویروسی و چهار چارچوب ژنی C1، C2، C3 و C4 روی رشته مکمل است. در چارچوب ژنی C3-C1 مقداری همپوشانی وجود دارد در حالی که چارچوب ژنی C4 تماماً در داخل چارچوب ژنی C1 قرار گرفته است (۱٤). درون ناحیه بین ژنی یک ساختمان ساقه حلقه که مشخصه بگومو‌ویروس‌هاست قرار گرفته است. طول ساقه ۱۱ جفت باز است. حلقه متصل به ساقه حاوی ترادف ثابت نونا نوکلئوتیدی TAATATTAC و محل برش T/AC برای شروع همانندسازی ژنوم ویروس به روش دایره غلتان است (۱۵).

جدایه مورد بررسی در این تحقیق نزدیک به نژاد عمانی این ویروس قرار می‌گیرد که با تقسیم نژادهای این ویروس به هفت نژاد اصلی (۷) سازگار است. طبق نظر گروه مطالعات Geminivirus در ICTV حداقل ۹۳٪ تشابه توالی نوکلئوتیدی در تعیین واریانت‌های بگومو‌ویروس‌ها لازم است (۱٦)، طبق نتایج موجود در جدول ۳، جدایه عسلویه با نژاد عمانی ویروس برگ زرد گوجه‌فرنگی تشابه بیش از ۹۳٪ دارد، لذا واریانتی از نژاد عمانی ویروس می‌باشد.

طبق بررسی‌های شیرازی و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۱۷) جدایه‌های ایرانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی حداقل به دو دسته تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل جدایه‌های استان‌های هرمزگان، کرمان و خوزستان است که نزدیک به نژاد عمانی قرار می‌گیرند و گروه دوم جدایه‌های استان‌های بوشهر، فارس و مرکز ایران که نزدیک جدایه‌های مصر و فلسطین اشغالی قرار می‌گیرند. در این تحقیق جدایه عسلویه واریانتی از نژاد عمانی تشخیص داده شده که با نتایج شیرازی و همکاران (۱۷) مطابقت ندارد. همچنین در تحقیقی که توسط ایازپور و زیارتی در سال ۲۰۱۸ (۱) با توجه به توالی ژن پروتین پوششی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی در استان بوشهر انجام شد برخی از جدایه‌های مورد بررسی با جدایه‌های هرمزگان و کرمان در کنار هم قرار گرفتند و برخی با جدایه‌های فارس و مرکزی که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در تحقیق انجام شده توسط مرادپور و ایازپور در سال ۲۰۱٦ (۱۸) در استان هرمزگان نیز نشان داده شد که دو جدایه در گروه مجزایی قرار گرفتند و با نژاد عمانی ویروس قرابت نزدیکی نداشتند. با توجه به موارد فوق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نژادهای این ویروس در استان‌های مختلف کشور در حال انتشارند و دیگر نمی‌توان نژاد خاصی را به یک منطقه از کشور محدود دانست.

استفاده از توالی‌های نواحی ژنومی به جای توالی کامل ژنوم بگومو‌ویروس‌ها روابط فیلوژنتیکی آن‌ها را مبهم کرده است (۱۹). در تحقیق حاضر سعی شد توالی کامل ژنوم جدایه‌ای از ویروس مورد بررسی قرار گیرد که نتایج نشان داد بر خلاف نتایج تحقیقات شیرازی و همکاران این جدایه متعلق

به نژاد عمانی Tomato yellow leaf curl virus-Oman می‌باشد. به نظر می‌رسد ظهور واریانت مربوط به نژاد TYLCV-Oman در استان بوشهر ناشی از انتقال مواد گیاهی آلوده و بخصوص نشاء آلوده از استان هرمزگان و یا انتشار به وسیله حشره ناقل باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به دندروگرام بدست آمده و شباهت ۹۷ درصدی نمونه عسلویه با نمونه ارد لار، همچنین وجود گلخانه‌های وسیع تولید نشاء در مناطق مرزی استان بوشهر بویژه در مناطق آبدان و کاکی و تهیه نشاء گوجه‌فرنگی مورد نیاز کشاورزان استان فارس از این مناطق، که آلودگی مناطق مرزی استان بوشهر در این پژوهش محرز گردیده است؛ می‌توان چنین استنباط کرد که منشاء ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی در استان فارس مناطق مرزی آلوده استان بوشهر می‌باشد. همچنین با توجه به آنالیزهای فیلوژنتیکی مشخص شد که جدایه عسلویه عضوی از گروه عمانی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با کمک و همکاری دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و مرکز تحقیقات کشاورزی فارس انجام گرفته است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Ayazpour K, Ziarati T. Evaluation of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Bushehr Province. J Novel Res Plant Protec. 2018; 9(4): 277-284 (In Persian).
2. Cohen S, Harpaz I. Periodic, Rather Than Continual Acquisition of a New Tomato Virus by Its Vector, The Tobacco Whitefly (Bemisia tabaci Gennadius). Entomol Exp appl. 1964; 7: 155-166.
3. Hajimorad MR, Kheyr-Pour A, Alavi V, Ahoonmanesh A, Bahar M, Rezaian MA, Gronenborn B. Identification of Whitefly Transmitted Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus from Iran and a Survey of Its Distribution with Molecular Probes. Plant Pathol. 1996; 45: 418–425.
4. Ayazpour K. Alphabetic Lists of Plant Viruses and Viroids Reported from Iran. Pub.: Jahrom Branch, Islamic Azad University; 2014.
5. Dry L, Rigden J, Krake L, Mullineaux PM, Rezaian MA. Nucleotide Sequence and Genome Organization of Tomato Leaf Curl Geminivirus. J Gen Virol. 1993; 74:147-151.
6. Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gibertson RL. Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. Annu Rev Phytopathol. 2005; 43: 361-394.
7. Lefeuvre D, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJA, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett JM, Varsani A, Heydarnejad J. The Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from the Middle East to the World. PLoS Pathog. 2010; 6(10): e1001164. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001164.

8. Mansoor S, Rob WB, Zafar Y, Stanley J. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. Trends Plant Sci . 2003; 8: 128-134.
9. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A Plant DNA Minipreparation: Version II. Plant Mol Biol Rep. 1983; 1(4): 19-21.
10. Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-Transmitted Geminiviruses. Plant Dis. 1993; 77: 340-347.
11. Deng D, McGrath PF, Robinson DJ, Harrison BD. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. Ann Appl Biol. 1994; 125: 327-336.
12. Pakniat A, Behjatnia SA, Izadpanah K. 2008. A New Strain of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) in Fars Province. Processing of 18th Iranian Plant Protection Congress. Volume II, Aug. 24-27, 2008. University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran.P. 491.
13. Behjatnia SAA, Izadpanah K., Dry IB, Rezaian A. Molecular characterization and taxonomic position of the Iranian isolate of tomato leaf curl virus. Iran. J. Plant Pathol. 2004; 40: 77-94 (In Persian).
14. Gronenborn B. The Tomato Yellow Curl Virus, Genom and Function of Its Protein. Dordrecht. Springer: 2007.
15. Heyraud-Nitschke F, Schumacher S, Laufs J, Schaefer S, Schell J, Gronenborn B. Determination of the Origin Cleavage and Joining Domain of Geminivirus Rep Proteins. Nucleic Acids Res. 1995; 23: 910-916.
16. Brown JK, Fauquet CM, Briddon RW, Zerbini M, Moriones E, Navas-Castillo J. Family Geminiviridae, In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (Eds.), Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses- Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. USA, Elsevier Academic Press; 2012: 351-373.
17. Shirazi M, Mozafari J, Rakhshandehroo F, Shams-Bakhsh M. Genetic diversity and distribution of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in fields and greenhouses of Iran. J Agri Biotech. 2012; 4: 29-41 (In Persian).
18. Moradpour N, Ayazpour K. Phylogenetic Comparison of three isolates of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from Hormozgan Province (Iran) and world isolates of virus. Int. j. biol. pharm. allied sci. 2016; 5: 191-197.
19. Silva SJC, Castillo-Urquiza GP, Hora-Junior BT, Assuncao IP, Lima GSA, Pio-Ribeiro G, Mizubuti ESG, Zerbini FM. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in Northeastern Brazil. Plant Pathol. 2012; 61:457-467.