



Research Article
Vol. 36, No. 1, Spring 2022, p. 9-19



Comparison of Pathogenicity of Infectious Constructs of *Beet Curly Top Iran Virus* and Improvement of Reproduction and Transmission by Leafhopper Vector in Greenhouse Condition

A.R. Mehrabi Nasab¹- M. Zakiaghil^{2*}- M. Mehrvar³

Received: 16-02-2021

Revised: 09-03-2021

Accepted: 07-05-2021

Available Online: 20-06-2022

How to cite this article:

Mehrabi Nasab, A.R, Zakiaghil, M., & Mehrvar, M. (2022). Comparison of Pathogenicity of Infectious Constructs of *Beet Curly Top Iran Virus* and Improvement of Reproduction and Transmission with Vector Leafhopper in Greenhouse Condition. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(1): 9-19. (In Persian with English abstract)

DOI: [10.22067/JPP.2021.68238.1006](https://doi.org/10.22067/JPP.2021.68238.1006)

Introduction

Beet curly top disease is one of the most important sugar beet viral diseases. Numbers of viruses in the family *Geminiviridae*, including *Beet Curly Top Iran Virus* (BCTIrV), *Beet Curly Top Virus* (BCTV), and *Turnip Curly Top Virus* (TCTV) have generated curly top symptoms in sugar beet. BCTIrV belongs to the genus *Becurtovirus*, but BCTV and TCTV put in *Curtovirus* and *Turncurtovirus* genera, respectively. BCTIrV is known as the most prevalent causal agent of curly top disease in Iran. It has circular single-stranded DNA genomes with 2.8–3.2 kb nucleotides length. The genome encapsidate in quasiicosahedral twinned particle with 22 nm diameters. BCTIrV is transmitted by *Circulifer Haematoceps* leafhopper naturally. Non-uniform transmission and time-consuming process of reproduction of a virus-free population of the leafhopper make experimental transmission of BCTIrV troublesome. Generation of an infectious clone is another strategy for efficient inoculation of BCTIrV to host without dependency on its natural insect vector. The aim of this study is comparison of pathogenicity of two infectious clones of BCTIrV (1.1 and 1.4 mer constructs) in several hosts and optimization of criteria for efficient reproduction of the vector for transmission of the virus.

Material and Method

The complete genome of BCTIrV was cloned in *pBlueScript II SK (+)* previously. Plasmid extraction from the bacterial cells was carried out using plasmid extraction procedure described by Kotchoni *et. al.* (24). The 1.4 and 1.1 BCTIrV infectious clones were made by joining 1029 and 308 kb fragments respectively to a unit length of BCTIrV genome. The infectious clones were agroinoculated to seedlings of sugar beet. DNA extraction from newly grown leaves of agroinoculated plants was performed using CTAB. Polymerase chain reaction (PCR) using specific primer pair for BCTIrV coat protein gene (CP) was carried out to identify infectivity of the constructs. To optimize the reproduction of *Circulifer hematoceps* in greenhouse conditions, *Beta vulgaris*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annum*, *Nicotiana glutinosa*, *Sesamum indicum* and *Amaranthus retroflexus* plants were used as hosts. To determine rate of reproduction of *C. Hematoceps* in greenhouse conditions, firstly optimum temperature for the leafhopper reproduction was determined, then *C. Hematoceps* population was counted at optimum temperature in 21, 45, and 60 days after release. In transmission test, an adult *C. Hematoceps* was used to transmit BCTIrV to sugar beet seedling.

Result

Sequencing data and RFLP pattern using *EcoRI/XhoI* restriction endonuclease were confirmed integrity of

1, 2 and 3- Ph.D. Student in Plant Pathology and Associate Professors, Department of Plant Pathology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: zakiaghil@um.ac.ir)

the 1.4 and 1.1 constructs. Four weeks after inoculation, BCTIrV was identified in newly grown leaves of sugar beet seedlings using PCR. Eight weeks after inoculation yellowing and leaf curling symptoms were generated on infected plants. *Circulifer hemoceps* was successfully reproduced on *B. vulgaris*, *S. indicum* and *A. retroflexus* in greenhouse. Moreover, *S. lycopersicum*, *C. annuum*, *N. glutinosa* were not suitable hosts for the leafhopper reproduction. The maximum, minimum, and optimum of daily temperature required for *C. hemoceps* reproduction was 34°C, 18°C and 29°C, respectively in a period of 45 days after the leafhopper release. Also, the best fitted host for *C. hemoceps* multiplication was *A. retroflexus*, however, BCTIrV was not infective in this plant. BCTIrV was successfully transmitted from pG-BCTIrV 1.4 and pG-BCTIrV 1.1 agroinoculated *B. vulgaris* plants to healthy sugar beet using *C. hemoceps*. Fifth weeks after the leafhopper feeding systemic symptoms of the virus were developed.

Discussion

The curly top is a destructive disease of sugar beet which is a threat to sugar beet production. Previously, several BCTIrV infectious clones with different lengths were made by other researchers. The pG-BCTIrV 1.4 is similar to constructs of previous studies. In this study, pG-BCTIrV 1.1 that is the smallest infectious construct of BCTIrV with a length of 3153 nucleotides, is successfully constructed for the first time. The 1.1 mer infectious clone will provide a facility for induction of point mutation in the BCTIrV genome to identify the role of genetic elements in virus pathogenicity via reverse genetic approach. The results indicated no significant difference in infection efficiency, symptoms severity, and vector transmission rate between pG-BCTIrV 1.4 and pG-BCTIrV 1.1 constructs. Forth weeks after inoculation symptoms were observed in *B. vulgaris* plants that vector transmission by pG-BCTIrV 1.4 and pG-BCTIrV 1.1, but Taheri *et. al.* (2012) represented symptoms appearance at two weeks post inoculation. This discrepancy may cause by differences in host susceptibility, virulence of the virus, or environmental conditions. The results revealed that, the preferential host for *C. haematoceps* multiplication was *A. retroflexus* in greenhouse conditions. The population of *C. haematoceps* increased up to 11.1-fold on this plant in 45 days. In the current study, infectivity of BCTIrV in *A. retroflexus* not identified either using agroinoculation or vector transmission, but Jahanbin *et. al.* (2015) represented BCTIrV infection in 20 % of agroinoculated *A. retroflexus* plants.

Keywords: *Amaranthus retroflexus*, Beet Curly Top Iran Virus, *Circulifer haematoceps*, Infectious clone



مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، ص ۹-۱۹

مقایسه بیماری زایی سازه‌های عفونت‌زای ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندر قند و بهینه‌سازی تکثیر و انتقال با زنجرک ناقل در شرایط گلخانه

عبدالرحمن محرابی نسب^۱ - محمد زکی عقل^{۲*} - محسن مهرور^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۷

چکیده

بیماری پیچیدگی برگ چغندر قند یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی چغندر قند می‌باشد. چندین گونه ویروس از جنس‌های مختلف خانواده جمینی‌ویریده عامل ایجاد این بیماری هستند. ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندر قند (*Beet Curly Top Iran Virus*- BCTIV) شایع‌ترین عامل این بیماری در ایران می‌باشد. ژنوم BCTIV یک قطعه دی‌ان‌ا تکی لای حلقوی بطول تقریبی ۲/۸ تا ۳/۲ کیلو باز است. ناقل طبیعی این ویروس زنجرک *Circulifer haematoceps* است. با توجه به مشکلات تکثیر و انتقال ویروس با ناقل در گلخانه در این تحقیق بیماری زایی دو همسانه عفونت‌زای ویروس با یکدیگر مقایسه شده است. همچنین شرایط لازم برای تکثیر ناقل و انتقال ویروس بهینه‌سازی شده است. به این منظور همسانه‌های عفونت‌زای ۱/۴ و ۱/۱ مر از BCTIV ساخته شد و به روش مایه‌زنی با آگروباکتريوم به گیاهچه‌های چغندر قند مایه‌زنی شدند. جهت تکثیر و نگهداری جمعیت‌های زنجرک ناقل آزمون‌های دمایی و زمانی و میزبان ترجیحی انجام شد. سپس آزمون انتقال با ناقل طبیعی ویروس نیز انجام شد. نتایج نشان داد که سازه‌های ساخته شده در گیاهچه‌های چغندر قند بیماریزا هستند و علائم بیماری مانند زردی و پیچیدگی از هفته چهارم پس از زمان مایه‌زنی با ناقل طبیعی ایجاد شد. تولید همسانه‌های عفونت‌زای کارآمد مطالعه بیولوژی ویروس را تسهیل می‌کند. دمای بهینه روزانه برای تکثیر زنجرک ۲۹ و دمای بیشینه و کمینه بترتیب ۳۴ و ۱۸ سانتی‌گراد تعیین شد و مدت زمان لازم برای تولید هر نسل ۴۵ روز پس از استقرار زنجرک‌ها بود. میزبان ترجیحی زنجرک گیاه تاج خروس وحشی (*Amaranthus retroflexus*) تعیین شد و جمعیت حشره بر روی این گیاه تا ۱۱/۱ برابر افزایش یافت. زنجرک‌های تکثیر شده پس از تغذیه از چغندر قند آلوده، BCTIV را به گیاهان سالم انتقال دادند.

واژه‌های کلیدی: تاج خروس، زنجرک *Circulifer Haematoceps*، ویروس پیچیدگی برگ چغندر قند، همسانه عفونت‌زا

مقدمه

curly top disease) یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی چغندر قند بوده که سبب نقصان تولید و کاهش عیار قند در غده‌های چغندر قند می‌شود (Strausbaugh et al., 2007; Naqvi, 2004); (Whitney and Duffus, 1986). بیماری پیچیدگی برگ چغندر قند توسط ویروس‌های مختلفی از خانواده Geminiviridae شامل *Beet Curly Top Virus*; *Curly Top Virus* و *Turnip Curly Top Virus* ایجاد می‌شود (Bolok-Baliji et al., 2004); (Yazdi et al., 2008; Briddon et al., 1998; Kamali et al., 2016; Loconsole et al., 2012; Stanley et al., 2005; Varsani et al., 2014).

BCTV از جنس کورتووویروس، BCTIV از جنس بی‌کورتووویروس و TCTV از جنس تورنکورتووویروس علائم بیماری پیچیدگی برگ چغندر قند را ایجاد می‌کنند (Adams et al., 2013);

جمینی ویروس‌ها گروهی از ویروس‌های گیاهی با ژنوم دی‌ان‌ا تک لای (ssDNA) حلقوی بطول ۲/۸ تا ۳/۲ کیلو باز و پیکره‌های دوقلو به ابعاد ۲۲ تا ۳۰ نانومتر هستند (King et al., 2012) که به‌روش دایره‌غلطان همانندسازی می‌کنند (Chasan, 1995); (Gutierrez, 2000).

بیماری پیچیدگی برگ چغندر قند یا کرلی‌تاپ چغندر قند (Beet

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری رشته بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
* - نویسنده مسئول: (Email: zakiaghl@um.ac.ir)

DOI: 10.22067/JPP.2021.68238.1006

(Kamali et al., 2016).

جمعیت‌های بالای ناقل طبیعی این ویروس می‌تواند مطالعات تعامل ویروس-ناقل-گیاه میزبان را تسهیل کند. هدف از این تحقیق ساخت و مقایسه بیماری‌زایی سازه‌های ۱/۱ و ۱/۴ ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندرقد و بهینه‌سازی شرایط تکثیر و انتقال با زنجرک C. *haematoceps* در گلخانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت گیاهان: گیاهان چغندرقد (*Beta vulgaris*)، گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، فلفل (*Capsicum annum*)، توتون (*Nicotiana glutinosa*)، کنجد (*Sesamum indicum*) و تاج‌خروس وحشی (*Amaranthus retroflexus*) مورد استفاده قرار گرفتند. چغندرقد به‌عنوان میزبان ویروس برای آزمون بیماری‌زایی همسانه‌های عفونت‌زا در نظر گرفته شد. رقم چغندرقد مورد استفاده در این تحقیق، رقم "شاهد-۱۹۱" بود؛ که دارای حساسیت بالایی به BCTIV بود. سایر گیاهان به همراه چغندرقد در آزمون ارزیابی میزبان ترجیحی برای بهینه‌سازی شرایط تکثیر زنجرک مورد استفاده قرار گرفت. بذرها در سینی نشاء حاوی مخلوط کوکوپیت و پیت‌ماس به نسبت یک به یک کشت گردیدند. سپس نشاءها در مرحله دو برگ حقیقی به گلدان‌های پلاستیکی منتقل گردیده و به صورت روزانه آبیاری شدند.

استخراج دی‌ان‌آ از بافت‌های گیاهی: استخراج دی‌ان‌آ از بافت گیاهی به روش دوپل و دوپل (Doyle and Doyle, 1987) و هیلی (Healey et al., 2014) انجام شد. به این منظور ۰/۲ گرم از بافت برگ تازه گیاه در هاون چینی به همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB عصاره‌گیری و به میکروتیوب منتقل شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس به آنها ۷۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزو آمیل الکل (۱:۲۴) افزوده و مخلوط شدند. لوله‌ها در ۱۳۴۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به فاز رویی یک حجم ایزوپروپانول سرد افزوده شده و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد، میکروتیوب‌ها در ۱۳۴۰۰ دور در دقیقه برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شد.

استخراج پلاسمید از سلول‌های باکتری: استخراج پلاسمید از سلول‌های باکتری با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (GeNet Bio- Cat. No. K-10000) و یا روش کوتچونی و همکاران انجام شد (Kotchoni et al., 2003).

همسانه حاوی ژنوم ویروس: از ژنوم ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندرقد (شماره دسترسی JX082259.1) (موجود در آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد) که با آنزیم Phi29 DNA polymerase از گیاه آلوده همانندسازی شده و پس از

ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندرقد (BCTIV) خصوصیات بیولوژیکی مشابه (مثلاً در علائم بیماری و ناقل بیولوژیک) با کورتووویروس و تورنکورتووویروس عامل کرلی‌تاپ دارد. بی‌کورتووویروس عامل کرلی‌تاپ در توالی ژنومی بین ۵۴/۱ تا ۵۴/۶ درصد با کورتووویروس و بین ۴۳/۹ تا ۴۵/۱ درصد با تورنکورتووویروس عامل این بیماری شباهت دارد (Briddon et al., 2010).

دامنه میزبانی ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندرقد وسیع بوده و محصولات زراعی مانند چغندرقد، گوجه‌فرنگی، اسفناج، شلغم، لوبیا، کدو، خیار و تعدادی از علف‌های هرز مانند تلخه، پیچک، عروسک پشت‌پرده، تاج و تاجریزی را شامل می‌شود (Anabestani Heydarnejad et al., 2007; Varma and et al., 2015; Malathi, 2003).

علائم بیماری کرلی‌تاپ چغندرقد پیچیدگی برگ، تورم رگبرگ، ایجاد برجستگی در سطح زیرین رگبرگ‌ها، ترد و شکننده شدن برگ‌ها، کوچک ماندن و بدشکلی ریشه و نکروز آوند آبکشی در ریشه‌ها است (Whitney and Duffus, Jahanbin et al., 2015; 1986).

ناقل بیولوژیک BCTIV زنجرک *Circulifer tenellus* است و در ایران علاوه بر آن، زنجرک *C. haematoceps* نیز عامل بیماری را با کارایی بالاتری نسبت به گونه *C. tenellus* انتقال می‌دهد (Hosseini Abhari et al., 2005; Fattahi et al., 2012; Soleimani et al., 2012; Taheri et al., 2012).

جمینی ویروس‌ها انتقال مکانیکی ندارند (Hull, 2015) و از طرفی مایه‌زنی مصنوعی گیاهان میزبان توسط زنجرک‌های ناقل با توجه به عدم یکنواختی انتقال و همچنین دشواری تکثیر و تولید زنجرک‌های عاری از ویروس و طولانی بودن پروسه کاری، با دشواری همراه است.

راه دیگر در مطالعه بیولوژی جمینی ویروس‌ها تهیه همسانه عفونت‌زا و استفاده از توانایی باکتری *Agrobacterium tumefaciens* در انتقال دی‌ان‌آ به سلول میزبان گیاهی است (Rigden et al., 1996; Pico et al., 2001). تهیه سازه عفونت‌زای ویروس مطالعه جمینی ویروس‌ها را آسان می‌کند. سازه‌های عفونت‌زای مختلفی از این جمینی ویروس‌ها تهیه شده است. کیوانی و همکاران (Keyvani et al., 2011) سازه عفونت‌زا با دو طول کامل از ژنوم BCTIV بر روی چغندرقد را مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه دیگری از سازه ۱/۴ ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندرقد استفاده شده است (Majidi, 2014; Eini et al., 2016).

تولید همسانه‌های عفونت‌زای کارآمد از ویروس BCTIV می‌تواند منبع نامحدودی برای ایجاد آلودگی و مطالعه خصوصیات بیولوژیکی این ویروس را فراهم کرده و همچنین دستیابی به

۲۳۹۴ جفت بازی از ژنوم BCTIV با استفاده از آغازگرهای BCTIV-1.1R1.eco/ BCTIV-1.1F1xho (جدول ۱) همانندسازی و بوسیله آنزیم‌های برشی *EcoRI/XhoI* (Fermentas) (Cat. No #ER0271/#ER0691) تیمار شده و در محل برش همین آنزیم‌ها در سازه مرحله اول الحاق شد. تایید سازه 1.1 BCTIV مر با هضم آنزیمی با دو آنزیم *BamHI/XhoI* انجام گرفت (Fermentas) (Cat. No. #ER0051/#ER0691). سپس سازه 1.1 BCTIV در محل برش آنزیم‌های *BamHI/XhoI* در پلاسمید pGreen0029 الحاق شد و سازه حاصل 1.1 pG-BCTIV نام گذاری شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای الیگونوکلوئیدهای مورد استفاده در این پژوهش

آغازگر Primer	ترادف آغازگر (5'-3')	طول آغازگر Primer Leng th	محل اتصال Locati on
BCTIV-F1	WSWKYACWATGYTGAAYAAAYT AYGT	25	685- 709
BCTIV-R1	GTTTTCCAAGGCAATTACTA GA	24	1328- 1351
BCTIV-1.1F1xho	AACTCGAGTGTGTTGTTTGTTC CCCTC	27	2714- 2733
BCTIV-1.1R1.eco	GGAGAAGAATTCTTGATTCA	20	2244- 2257
BCTIV-1.1F2.eco	TGAATCAAGAATTCTTCTCC	20	2244- 2257
BCTIV-1.1R2bam	AAGGATCCTTATACGTATAATA TACGCA	28	146- 165

انتقال سازه‌ها به اگروباکتریوم و مایه‌زنی به گیاه: سازه‌های 1.4 pG-BCTIV و 1.1 pG-BCTIV به‌طور جداگانه به سلول‌های مستعد باکتری اگروباکتریوم سویه C5850 حاوی پلاسمید کمکی pSoup به روش شوک حرارتی منتقل شد (Brown, 2010). سلول‌ها در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ µg/ml)، تتراسایکین (۱۰ µg/ml) و ریفامپیسین (۵۰ µg/ml) کشت داده شدند. برای مایه‌زنی یک همسانه از هر سازه عفونت‌زا در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکین، ریفامپین و کانامایسین کشت شد (Holsters et al., 1978). گیاهچه‌های چغندر قند در مرحله چهار تا پنج برگ‌ی مایه‌زنی شدند. آلودگی گیاهان توسط همسانه عفونت‌زا بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت BCTIV-F1 و BCTIV-R1 (جدول ۱) بررسی شد.

جمع‌آوری و تکثیر زنجیرک *C. haematoceps*: زنجیرک‌های

برش با آنزیم *EcoRI* در ناقل پلاسمیدی (+) pBlueScript II SK همسانه‌سازی و تعیین ترادف شده بود استفاده شد.

ساخت همسانه عفونت‌زا

ساخت همسانه‌های عفونت‌زای ۱/۴ مر: ابتدا قطعه ۱۰۲۶ جفت بازی از ژنوم BCTIV توسط آنزیم‌های برشی *HindIII/EcoRI* (Fermentas Cat. No. #ER0501/#ER0271) از همسانه ویروس برش خورده و از ژل آگارز یک درصد به‌وسیله کیت استخراج از ژل (GeNet Bio- Cat. No. K-8000) خالص‌سازی شد. ناقل پلاسمیدی (+) pBlueScript II SK نیز به‌طور جداگانه با آنزیم‌های برشی *HindIII/EcoRI* برش خورده و خالص‌سازی شد. قطعه خالص‌سازی شده با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase (TaKaRa Cat. No. #2011A) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده در پلاسمید برش خورده الحاق شد تا سازه 0.4 BCTIV مر بدست آید. جهت تایید ساخت همسانه 0.4 BCTIV مر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای رفت و برگشت M13F و M13R انجام شد. محصول به سلول‌های مستعد *Escherichia coli* سویه DH5α به روش شوک حرارتی منتقل شد (Brown, 2010) و بر روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ µg/ml) کشت شد. سپس طول کامل ژنوم BCTIV با استفاده از آنزیم‌های برشی *HindIII/XhoI* (Fermentas Cat. No. #ER0501/#ER0691) از پلاسمید حامل خارج و خالص‌سازی شد. سازه pBlueScript-0.4 BCTIV نیز با همین آنزیم‌ها برش داده شد. سپس طول کامل ژنوم در سازه 0.4 BCTIV الحاق شد و محصول حاصل به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* منتقل شد. از آغازگرهای رفت و برگشت M13F و BCTIV-R1 (جدول ۱) جهت تایید سازه مورد نظر استفاده شد. جهت تایید نهایی قطعه 1.4 BCTIV مر واکنش هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم برشی *BamHI/XhoI* انجام گرفت (Fermentas Cat. No. #ER0051/#ER0691).

سپس سازه 1.4 BCTIV از پلاسمید حامل خارج و در محل برش آنزیم‌های برشی *EcoRI/XhoI* در پلاسمید pGreen 0029 الحاق شد. سازه حاصل 1.4 pG-BCTIV نام‌گذاری شد.

ساخت همسانه‌های عفونت‌زای ۱/۱ مر: برای ساخت همسانه

عفونت‌زای ۱/۱ مر، ابتدا قطعه ۷۵۹ جفت بازی از ژنوم BCTIV همانندسازی شده با آغازگرهای BCTIV-1.1F2.eco/BCTIV-1.1R2bam (جدول ۱) بوسیله آنزیم‌های برشی *BamHI/EcoRI* (Fermentas Cat. No #ER0051/#ER0271) تیمار و پس از خالص‌سازی در ناقل پلاسمیدی (+) pBlueScript II SK الحاق و همسانه‌سازی شد. برای تایید همسانه‌سازی قطعه کوچک در وکتور حامل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای رفت و برگشت BCTIV-1.1R2bam /M13F انجام شد. در مرحله دوم قطعه

سازی قطعات ۵۳۴۰ و ۲۳۸۹ جفت بازی از سازه در هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *XhoI/EcoRI* و *XhoI/BamHI* (شکل ۲ ب)، بیانگر اتصال قطعات تکثیر شده به یکدیگر و ساخت همسانه ۱/۱ مری BCTIV است (شکل ۳ ب).

آزمون بیماری‌زایی

سه هفته بعد از مایه‌زنی، استخراج دی ان آ از برگ‌های جوان جهت ردیابی ویروس انجام گرفت. اولین ردیابی موفق ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندرقد با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای BCTIV-F1 و BCTIV-R1 (جدول ۱) در هفته چهارم پس از مایه‌زنی با تکثیر قطعه ۶۵۸ جفت بازی انجام شد. (شکل ۴). با این وجود، گیاهان فاقد علائم آلودگی قابل رویت بودند. علائم بیماری، شامل پیچیدگی و زردی برگ از هفته هشتم پس از مایه‌زنی در بوته‌های چغندرقد قابل مشاهده بود (شکل ۵). از نظر نوع، شدت و زمان ظهور علائم و راندمان ایجاد آلودگی در گیاهان مایه‌زنی شده، تفاوتی بین همسانه ۱/۴ و ۱/۱ مشاهده نشد.

با استفاده از آزمون‌های مایه‌زنی اگروباکتریومی و انتقال همسانه‌های عفونت‌زای ویروسی توسط ناقل، میزبان یا غیرمیزبان بودن گیاه تاج‌خروس وحشی برای ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندرقد مورد آزمایش قرار گرفت. در تمامی آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز نتایج منفی بوده و در گیاهان مایه‌زنی شده علائم خاصی از خود بروز ندادند.

بهینه‌سازی شرایط تکثیر زنجیرک ناقل در شرایط گلخانه:

در بررسی این آزمون مشاهده شد که تمامی زنجیرک‌های منتقل شده بر روی گیاهان گوجه فرنگی، فلفل و توتون تکثیر نشده و پس از گذشت مدت زمانی از بین رفتند. اما بر روی گیاهان چغندرقد، کنگد و تاج خروس به خوبی تکثیر شدند. نتایج نشان داد که انبوهی جمعیت زنجیرک *C. Haematoceps* بر روی گیاه تاج‌خروس وحشی به مراتب بیشتر از تکثیر آن بر روی چغندرقد و کنگد است (جدول ۲).

بیشترین نرخ تکثیر *C. Haematoceps* بر روی گیاه تاج‌خروس وحشی ۴۵ روز پس از استقرار در دمای بهینه ۲۹ با دمای بیشینه و کمینه روزانه ۳۴ و ۱۸ در جه سانتی‌گراد به ترتیب تعیین شد. (شکل ۶ و ۷).

انتقال BCTIV بوسیله زنجیرک ناقل

ردیابی ویروس در گیاهان تیمار شده با زنجیرک‌های ناقل از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز از برگ‌های جوان انجام شد. ردیابی موفق ویروس در گیاهان آلوده شده با همسانه‌های عفونت‌زای pG-BCTIV 1.1 و BCTIV 1.4 در هفته دوم پس از تغذیه دهش

ناقل از مزارع چغندرقد شهرستان مشهد با استفاده از تور حشره‌گیری جمع‌آوری و به گلخانه منتقل شد. زنجیرک‌های جمع‌آوری شده با استفاده از اسپراتور جداسازی و در استوانه پلاستیکی شفاف به ارتفاع ۵۰ سانتیمتر و قطر دهانه ۲۰ سانتیمتر ریخته شدند. به‌منظور حفظ تراکم مطلوب زنجیرک هر چهار هفته یکبار گیاهان تعویض شدند.

بهینه‌سازی تکثیر زنجیرک ناقل در شرایط گلخانه: ابتدا

جهت مشخص نمودن میزبان ترجیحی زنجیرک، گیاهان چغندرقد، گوجه‌فرنگی، فلفل، توتون، کنگد و تاج‌خروس وحشی در گلدان‌های مجزا تهیه شدند. جهت تعیین میزان زادآوری زنجیرک در شرایط گلخانه، چند گروه دمایی (کمینه و بیشینه دمایی: گروه اول ۱۵ - ۲۸، گروه دوم ۱۸ - ۳۴ و گروه سوم ۲۲ - ۴۰) مورد بررسی قرار گرفت. پس از تعیین دمای بهینه تکثیر، بازه‌های مختلف زمانی ۲۱، ۴۵ و ۶۰ روز بعد از رهاسازی زنجیرک‌ها در نظر گرفته شد. تعداد ۲۰ زنجیرک بالغ بر روی هر گیاه قرار داده و در بازه‌های زمانی فوق‌الذکر اقدام به شمارش و تعیین جمعیت زنجیرک‌ها شد.

تهیه زنجیرک‌های عاری از ویروس: جهت تکثیر زنجیرک‌های

سالم از گیاه کنگد (میزبان زنجیرک و غیرمیزبان برای ویروس عامل بیماری) استفاده شد و زنجیرک‌ها چندین نسل بر روی کنگد زاد و ولد کردند.

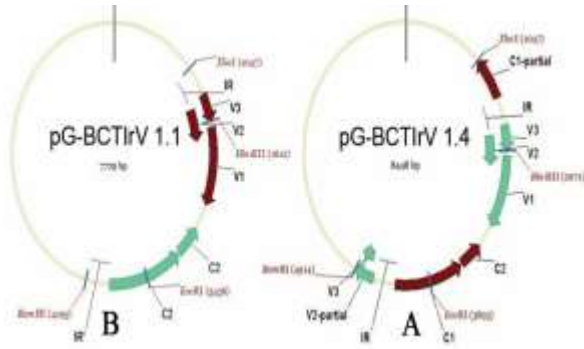
انتقال ویروس توسط ناقل: یک زنجیرک سالم بر روی سطح

روی برگ گیاه چغندرقد مایه‌زنی شده با سازه‌های عفونت‌زای قرار داده و توسط قفس‌های گیره‌ای (Clip cage) محصور شد. مدت زمان مورد نظر برای تغذیه گیرش ۴۸ الی ۷۲ ساعت و تغذیه دهش ۴۸ الی ۷۲ ساعت بود (Fattahi et al., 2012). پس از تغذیه گیرش، زنجیرک به یک گیاهچه چغندرقد سالم (در مرحله پنج برگی) منتقل شد و بعد از طی کردن دوره کمون و تغذیه دهش، زنجیرک ناقل از روی گیاه حذف شد (یک زنجیرک به ازای هر گیاه). تایید انتقال ویروس به گیاه با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از آغازگرهای BCTIV-F1 و BCTIV-R1 انجام شد (جدول ۱).

نتایج

ساخت سازه‌های BCTIV 1.4 و BCTIV 1.1

تکثیر قطعه ۲۰۰۰ جفت بازی از pG-BCTIV 1.4 در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با جفت آغازگر M13F و BCTIV-R1 (شکل ۱ الف) و آزادسازی قطعات ۵۶۰۲ و ۲۸۴۶ جفت بازی از سازه در هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی *XhoI* و *EcoRI* (شکل ۱ ب)، بیانگر اتصال قطعات ۰/۴ و کامل ژنوم BCTIV به یکدیگر و ساخت همسانه ۱/۴ مری BCTIV است (شکل ۳ الف). همچنین، تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی از pG-BCTIV 1.1 در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با جفت آغازگر M13F و BCTIV-R1 (شکل ۲ الف) و آزاد



شکل ۳- دیاگرام همسانه‌های عفونت‌زای pG-BCTIV 1.4 (الف) و pG-BCTIV 1.1 (ب)

Figure 3- Diagram of the pG-BCTIV 1.4(A) and pG-BCTIV 1.1 (B) infectious clones



شکل ۵- علائم در چغندرهای مایه‌زنی شده با همسانه‌های عفونت‌زای pG-BCTIV 1.1 و pG-BCTIV 1.4

Figure 5- Symptom in sugar beet plants inoculated with pG-BCTIV 1.4 and pG-BCTIV 1.1 infectious clones

جدول ۲- جمعیت *C. haematoceps* بر روی گیاهان میزبان پس از ۴۵ روز پس از رهاسازی

Table 2- Population of *C. haematoceps* on host plants 45 days after release

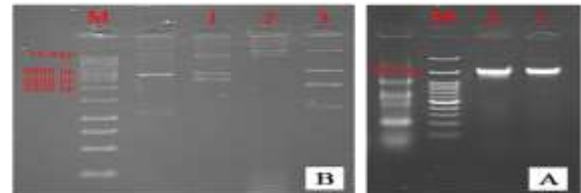
گیاه Plant	میانگین جمعیت پس از ۴۵ روز (تعداد: ۳) Average population after 45 days (n=3) Average±SDTEV (min-max)
<i>Beta vulgaris</i>	30.7±3.5 (27-34)
<i>Sesamum indicum</i>	98.7±11.9 (89-112)
<i>Amaranthus retroflexus</i>	218.7±30.7 (186-274)
<i>Solanum lycopersicum</i>	0
<i>Nicotiana glutinosa</i>	0

(جمعیت اولیه ۲۰ عدد زنجبرک *C. haematoceps* در هر گلدان)
(Initial population is 20 adult *C. haematoceps* per pot)



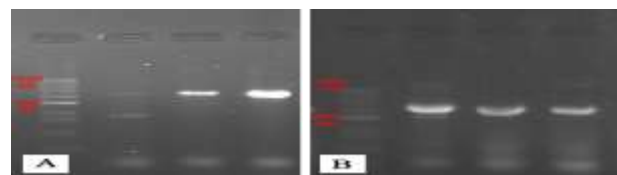
شکل ۱- الف- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای M13F و BCTIV-R1 از سازه pG-BCTIV 1.4 (راهک ۱)؛ ب- هضم آنزیمی سازه pG-BCTIV 1.4 با آنزیم‌های برشی *EcoRI/XhoI* (راهک ۲)، سازه برش نخورده pGreen- BCTIV 1.4 (راهک ۱)؛ M: نشانگر 1kbp

Figure 1- A- Electrophoresis of the PCR product using M13F and BCTIV-R1 primers from pG-BCTIV 1.4 construct (lanes 1-3). B- Restriction enzyme digestion of pG-BCTIV 1.4 construct with *EcoRI/XhoI* restriction endonucleases (lane 2), uncut pG-BCTIV 1.4 construct (lane 1). M: Marker 1kbp



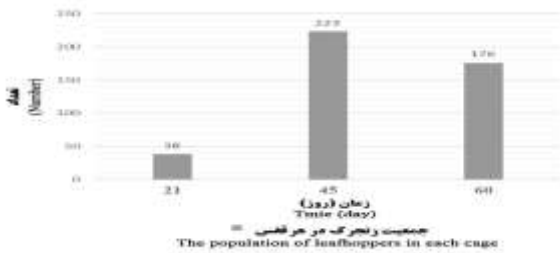
شکل ۲- الف- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای M13F و BCTIV-R1 از سازه pG-BCTIV 1.1 (راهک ۱ و ۲)؛ ب- هضم آنزیمی سازه pG-BCTIV 1.1 با آنزیم‌های برشی *EcoRI/XhoI* (راهک ۳) و *BamHI/XhoI* (راهک ۱) سازه برش نخورده pG-BCTIV 1.1 (راهک ۲). M: نشانگر 1kbp

Figure 2- A- Electrophoresis of the PCR product using M13F and BCTIV-R1 primers from pG-BCTIV 1.1 construct (lanes 1, 2). B- Restriction enzyme digestion of pG-BCTIV 1.1 construct with *EcoRI/XhoI* restriction endonucleases (lane 3) and *BamHI/XhoI* (lane 1), uncut pGreen- BCTIV 1.1 construct (lane 2). M: Marker 1kbp



شکل ۴- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای رفت و برگشت BCTIV-R1 و BCTIV-F1 در گیاهان چغندر قند مایه‌زنی شده؛ الف- همسانه عفونت‌زای pG-BCTIV 1.4؛ ب- همسانه عفونت‌زای pG-BCTIV 1.1؛ M: نشانگر 100bp

Figure 4- Electrophoresis of the PCR product using BCTIV-F1 primers from sugar beet plants inoculated with pG-BCTIV 1.4 (A) and pG-BCTIV 1.1 (B) infectious constructs



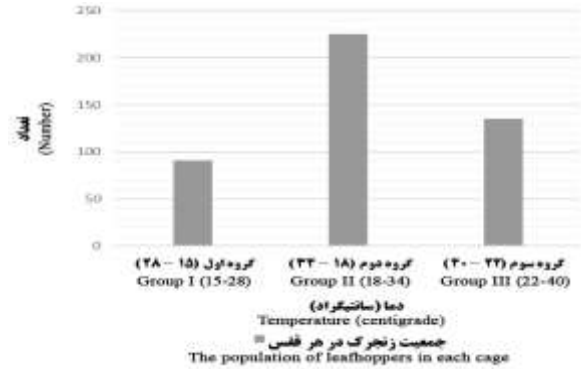
شکل ۷- تغییرات انبوهی جمعیت زنجبرک *C. haematoceps* در زمانهای مختلف در شرایط گلخانه (جمعیت اولیه ۲۰ عدد زنجبرک *C. haematoceps* در هر گلدان)

Figure 7- Variation in *C. haematoceps* population density at different time in greenhouse condition (Initial population is 20 adult *C. haematoceps* per pot)

ساخت موفق همسانه عفونت‌زای 1.1 pG-BCTIV با طول ۳۱۵۳ جفت باز از ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندر قند برای نخستین بار صورت گرفت. سازه ۱/۱ مری BCTIV تنها یک تکرار بیشتر از ناحیه IR ژنوم طبیعی ویروس دارد، در حالی که در سازه ۱/۴ مری علاوه بر IR به ترتیب ۴۶۱ و ۲۶۲ نوکلئوتید از رشته مکمل و ویریون ژنوم ویروس شامل بخش‌هایی از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های Rep (پروتئین همراه با همانندسازی)، حرکتی و تنظیمی نیز تکرار شده است (طول سازه: ۳۸۷۴ جفت باز). نتایج بیانگر آن بود که از لحاظ راندمان آلودگی، شدت علائم و انتقال با ناقل تفاوت معنی‌دار بین دو سازه فوق‌الذکر وجود ندارد. این امر با مطالعات قبلی همسو می‌باشد (Keyvani, 2010).

همانند سازی (IR) سبب افزایش بازدهی تکثیر ژنوم می‌گردد (Stenger et al., 1991). با توجه به اینکه تفاوت چندانی در کارایی سازه‌هایی با دو طول کامل و سازه‌هایی با یک طول کامل و قسمتی از ژنوم حاوی ناحیه آغازکننده مضاعف وجود ندارد؛ بنابراین ساخت سازه‌های با ترادف نوکلئوتیدی کوتاه‌تر می‌تواند همسانه‌سازی سازه عفونت‌زا را آسان‌تر کند. از این رو ساخت سازه ۱/۱ از ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندر قند با توجه به ناحیه همانندسازی مضاعف در ناقلین پلاسمیدی با نرخ تکثیر بالا (مانند pGreen0029) امکان مطالعه این ویروس را تسهیل می‌کند.

به‌منظور مطالعه خصوصیات بیولوژیک ویروس‌هایی با عدم امکان مکانیکی، دستیابی به جمعیت فراوان ناقل بیولوژیک عاری از ویروس بسیار حائز اهمیت است. از این رو دستیابی به گیاهان میزبان جدید با ترجیح بیشتر برای زنجبرک ناقل موجب استقرار سریع و افزایش انبوهی جمعیت این حشره در شرایط گلخانه‌ای می‌شود. در این مطالعه مشخص شد که میزبان ترجیحی زنجبرک در شرایط گلخانه از بین گیاهان مورد آزمایش، گیاه تاج‌خروس وحشی است که جمعیت



شکل ۶- اثر دما بر انبوهی جمعیت زنجبرک *C. haematoceps* در شرایط گلخانه (جمعیت اولیه ۲۰ عدد زنجبرک *C. haematoceps* در هر گلدان)

Figure 6- Effect of temperature on population of *C. haematoceps* in greenhouse condition (Initial population is 20 adult *C. haematoceps* per pot)

زنجبرک حاصل گردید (شکل ۸). این امر موید موفقیت‌آمیز بودن آزمایش انتقال با ناقل بیولوژیک بود. بروز علائم بیماری در گیاهان تحت تیمار با زنجبرک ناقل در همسانه‌های عفونت‌زای pG-BCTIV 1.4 هفته چهارم و در همسانه عفونت‌زا 1.1 pG-BCTIV از هفته پنجم بعد از تغذیه دهش مشاهده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی چغندر قند که تهدید جهانی برای تولید این محصول بوده، بیماری پیچیدگی برگ چغندر قند می‌باشد. تاکنون عوامل ویروسی متعددی برای این بیماری مطرح شده است و در ایران ویروس BSCTV (ویروس پیچیدگی برگ شدید چغندر قند) و ویروس BCTIV به‌عنوان عامل این بیماری مطرح می‌باشد (Stanley et al., 2005; Heydarnejad et al., 2007). با این حال به نظر می‌رسد که عامل اصلی بیماری در ایران BCTIV باشد (Heydarnejad et al., Bolok-Yazdi et al., 2008). با توجه به خصوصیات خاص جینی ویروس‌ها ساخت همسانه عفونت‌زای کارآمد، مطالعه آن‌ها را تسهیل می‌کند.

همسانه‌های عفونت‌زا با طول‌های متفاوت توسط سایر محققین ساخته شده بود (Hossini and Eini, 2017; Eini et al., 2016; Keyvani, 2010; Majidi, 2014; Soleimani et al., 2012). سازه ۱/۴ مری از ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندر قند ساخته شده با سازه‌های ۱/۴ مری ساخته شده پیش از این مطالعه، از لحاظ توانایی نوکلئوتیدی و ترتیب توالی مشابه بوده و تفاوت آنها در ناقل پلاسمیدی آن‌ها می‌باشد (Soleimani et al., Eini et al., 2016). (2012)

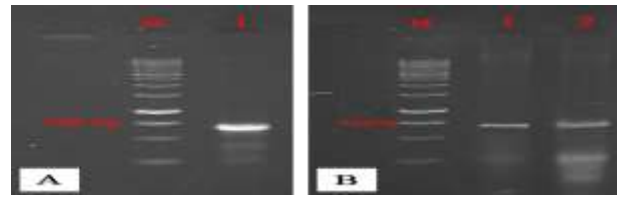
در مطالعه جهان‌بین و همکاران بیان شده بود که گیاه تاج‌خروس وحشی میزبان ویروس ایرانی پیچیدگی برگ چغندرقد می‌باشد (۲۰ درصد آلودگی در جمعیت مورد مطالعه) (Jahanbin *et al.*, 2015)، اما در مطالعه حاضر، در گیاه تاج‌خروس وحشی آلودگی به ویروس BCTIV با مایه‌زنی آگروباکتریومی سازه عفونت‌زا و یا انتقال ویروس توسط زنجبرک ناقل، ردیابی نشد.

انتقال موفق سازه‌های عفونت‌زای pG-BCTIV 1.4 و pG-BCTIV 1.1 توسط ناقل، سیستمیک شدن ویروس در کل گیاه و امکان انتقال مجدد این همسانه‌ها از گیاه اول به گیاه سالم دیگر، موید آن است که سازه‌های فوق‌الذکر در خصوصیات بیولوژیک ویروس تغییری ایجاد نکرده‌اند.

در مطالعه طاهری و همکاران (Taheri *et al.*, 2012) بیان شده بود که ظهور علائم ۱۴ روز پس از تغذیه دهش و مایه‌زنی مشاهده گردید ولی در این مطالعه ظهور علائم در همسانه‌های عفونت‌زای pG-BCTIV 1.1 و pG-BCTIV 1.4 به ترتیب چهار و پنج هفته پس از تغذیه دهش مشاهده شد که با نتایج مطالعه فوق اختلاف دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از خانم مهندس صبورا میرزا محمدی و آقای مهندس عباس احمدی پارسا جهت کمک‌های آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌نمایند.



شکل ۸: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای BCTIV-F1 و BCTIV-R1 در آزمون انتقال BCTIV با زنجبرک C. *haematoceps* از گیاهان مایه‌زنی شده با همسانه‌های عفونت‌زای BCTIV. الف: انتقال از چغندرقد مایه زنی شده با سازه pG-BCTIV 1.4 (راهک ۱)، ب: انتقال از چغندرقد مایه زنی شده با سازه pG-BCTIV 1.1 (راهک ۱)؛ چغندرقد مایه‌زنی شده با آگروباکتریوم حاوی سازه pG-BCTIV 1.1 (راهک ۲)؛ M: نشانگر وزن مولکولی 100bp

Figure 8- Electrophoresis of PCR product using BCTIV-F1/ BCTIV-R1 primer pair in transmission test of BCTIV by *C. haematoceps* from plants inoculated with the infectious clones. A- Transmission from sugar beet inoculated with pG-BCTIV 1.4 (lane 1); B- transmission from sugar beet inoculated with pG-BCTIV 1.1 (lane 1); sugar beet inoculated with agrobacterium containing pG-BCTIV 1.1 infectious clone (lane 2). M: Marker 100bp

C. haematoceps بروی آن تا ۱/۱ برابر افزایش داشت.

همچنین دمای بهینه تکثیر زنجبرک بر روی تاج خروس وحشی ۲۹ با بیشینه ۳۴ و کمینه ۱۸ درجه سانتیگراد روزانه بود. بهترین زمان برای تکثیر، ۴۵ روز پس از استقرار زنجبرک ها بدست آمد.

منابع

- Adams, M.J., King, A.M., & Carstens, E.B. (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Archives of Virology* 158(9): 2023–2030. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1688-5>.
- Anabestani, A., Izadpanah, K., Tabein, S., Hamzeh-Zarghani, H., & 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. (In Persian with English abstract)
- Baliji, S., Black, M.C., French, R., Stenger, D.C., & Sunter, G. (2004). *Spinach curly top virus*: A newly described curtovirus species from southwest Texas with incongruent gene phylogenies. *Phytopathology* 94(7): 772–779. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.772>.
- Bolok-Yazdi, H.R., Heydarnejad, J., & Massumi, H. (2008). Genome characterization and genetic diversity of *beet curly top Iran virus*: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes* 36(3): 539–545. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0224-2>.
- Briddon, R.W., Heydarnejad, J., Khosrowfar, F., Massumi, H., Martin, D.P., & Varsani, A. (2010). *Turnip curly top virus*, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Research* 152(2): 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.05.016>.
- Briddon, R.W., Stenger, D.C., Bedford, I.D., Stanley, J., Izadpanah, K., & 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, T.A. (Terence A.). (2010). Gene cloning and DNA analysis: an introduction. John Wiley & Sons, Ltd., Publication 6th ed.
- Chasan, R. (1995). Geminiviruses: A Twin Approach to Replication. *The Plant Cell*, 7(6), 659–661.

9. Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
10. Eini, O., Ebadzad Sahraei, G., & Behjatnia, S.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(2): 101-113.
11. Fattahi, Z., Behjatnia, S.A.A., Afsharifar, A., Hamzehzarghani, H., & 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: 37-38.
12. Gutierrez, C. (2000). DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *The EMBO Journal* 19(5): 792-799. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.5.792>.
13. Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., & Henry, R.J. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10: 21. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>.
14. Heydarnejad, J., Hosseini, Abhari, E., Bolok-Yazdi, H.R., & Massumi, H. (2007). Curly top of cultivated plants and weeds and report of a unique Curtovirus from Iran. *Journal of Phytopathology* 55: 321-325.
15. Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., & Schell, J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular & General Genetics* 163(2): 181-187. <https://doi.org/10.1007/BF00267408>.
16. 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. *The second Asian conference on plant pathology, Singapore*, p 62.
17. Hossini, V., & Eini, O. (2017). Molecular Identification of *Beet curly top Iran virus* Associated with Bean in Zanjan Province. *Journal of Plant Protection* 30: 654-663. (In Persian)
18. Hull, R. (2015). *Matthews' Plant Virology*. Elsevier/Academic press, California.
19. Jahanbin, D., Izadpanah, K., & Behjatnia, S.A.A. (2015). 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. (In Persian with English abstract)
20. Kamali, M., Heydarnejad, J., Massumi, H., Kvarnheden, A., Kraberger, S., & Varsani, A. (2016). Molecular diversity of turncurtoviruses in Iran. *Archives of Virology* 161(3): 551-561. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2686-6>.
21. Keyvani, N. (2010). Construction of infectious clone of *Beet curly top Iran virus*. Master Thesis in Plant Pathology. Shahid Bahonar University of Kerman, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection. (In Persian with English abstract)
22. Keyvani, N., Heydarnejad, J., Massumi, H., & Razavi, S. (2011). Construction of infectious clone of *Beet curly top Iran virus*. 7th national biotechnology congress of I.R. Iran. (In Persian)
23. King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., & Lefkowitz, E.J. (2012). *Virus taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic press, London, pp 1272. ISBN: 978-0-12-384684-6
24. Kotchoni, S.O., Gachomo, E.W., Betiku, E., & Shonukan, O.O. (2003). A home-made kit for plasmid DNA mini-preparation. *African Journal of Biotechnology* 2: 86-87.
25. Loconsole, G., Saldarelli, P., Doddapaneni, H., Savino, V., Martelli, G.P., & 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(1): 162-172. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.005>.
26. Majidi, A. (2014). Investigating the resistance of different cultivars of sugar beet to the Iranian virus, the complexity of sugar beet plant using the viral infection virus, and examining its interaction with the virus, the severe complexity of sugar beet plant in three varieties of sugar beet. Master Thesis in Plant Pathology. Shiraz University of Shiraz, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection. (In Persian with English abstract)
27. Naqvi, S.A.M.H. (2004). *Diseases of Fruits and Vegetables*. Volume II. Springer Netherlands.
28. Pico, B., Ferriol, M., Diez, M.J., and Vinals, F.N. (2001). Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *Journal of Plant Pathology* 83: 215-220.
29. Rigden, J.E., Dry, I.B., Krake, L.R., & Rezaian, M.A. (1996). Plant virus DNA replication processes in *Agrobacterium*: insight into the origins of geminiviruses?. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(19): 10280-10284. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10280>.
30. Soleimani, R., Matic, S., Taheri, H., Behjatnia, S.A.A., Vecchiati, M., Izadpanah, K. & 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.

31. Stanley, J., Bisaro, D.M., Bridson, R.W., Brown, T.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., & Stenger, D.C. (2005). *Family geminiviridae*. In *the International Committee on the Taxonomy of Viruses, 8th Report*. Eds. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. Elsevier/Academic Press, London.
32. Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C., & Bisaro, D.M. (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 8029–8033. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8029>.
33. Strausbaugh, C.A., Gillen, A.M., Camp, S., Shock, C.C., Eldredge, E.P., & Gallian, J.J. (2007). Relationship of Beet Curly Top Foliar Ratings to Sugar Beet Yield. *Plant Disease* 91(11): 1459–1463. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1459>.
34. Taheri, H., Izadpanah, K. & Behjatnia S. A. A. (2012). *Circulifer haematoceps*, the vector of the Beet curly top Iran virus. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48: 189. (In Persian with English abstract)
35. Varma, A., & Malathi, V.G. (2003). Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142: 145–164
36. Varsani, A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Brown, J.K., Murilo Zerbini, F., & Martin, D.P. (2014). Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Archives of Virology* 159(8): 2193–2203. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2050-2>.
37. Whitney, E.D. & Duffus, J.E. (eds). (1986). Compendium of beet diseases and insects. *American Phytopathological Society Press*, St Paul, USA, p. 76.