

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

مهدی کمالی<sup>۱\*</sup>، جهانگیر حیدر نژاد<sup>۲</sup> و حسین معصومی<sup>۲</sup>

(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 بیشتر بترتیب از گیاهان شلغم و ترب گزارش شده‌اند. به رغم مشابهت بالای ترادف نوکلئوتیدی ژنوم جدایه تاتوره با جدایه شلغم، پروتئین rep رمز شده توسط جدایه تاتوره در انتهای N-terminal دارای ۱۴ اسید آمینه بیشتر است. در میان نژادهای پنج گانه TCTV، جدایه تاتوره متعلق به نژاد C بوده و در کنار جدایه‌هایی قرار می‌گیرند که قبلاً از گیاه شلغم یا از بدن زنجرها گزارش شده است. نتایج این تحقیق، بار دیگر دامنه میزبانی وسیع ترنکرتوویروس‌ها در علف‌های هرز و نقش آن‌ها را در آلودگی سبزیجات تأیید می‌کند.

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

\* قسمتی از پایان نامه دکتری نگارنده اول، ارائه شده 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<sup>1\*\*</sup>, J. Heydarnejad<sup>2</sup>, and H. Massumi<sup>2</sup>

(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

Heydarnejad 2013). اخیراً ویروس دیگری نیز از این جنس و از بدن همین زنجبرک در استان کرمان جداسازی و گزارش شده است (Kamali et al, 2016b) که تعیین مشخصات بیولوژیکی آن در دست انجام است.

ترنکرتوویروس‌ها در ایران از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار بوده و میزبان‌های زیادی را در میان سبزیجات آلوده می‌کنند. بطوریکه تاکنون غیر از شلغم، آلودگی کاهو، چغندر ریشه ای، چغندر برگ، 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 ترنکرتوویروس‌ها 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 ای یکی از میزبان‌های TCTV شناسایی 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 جغرافیایی بترتیب 29° 49' 07.28" N و 52° 36' 08.33" E بازدید به عمل آمد و یک نمونه گیاه تاتوره (*D. stramonium*) دارای

خانواده *Geminiviridae* شامل ویروس‌هایی است با پیکره‌های چند وجهی و دوقلو به قطر ۲۲-۳۸ نانومتر که حاوی یک یا دو قطعه ژنوم دی ان ای تک لای حلقوی به اندازه ۲/۶-۵/۲ kb 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 جینی 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)، جینی 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 جینی 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) به ترتیب در سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۶ از مزارع شلغم اطراف شیراز گزارش شده‌اند (Bridson et al. 2010; Kamali et al. 2016a). هر دو ویروس توسط زنجبرک (*Circulifer haematoceps* (Mulsant & Rey) به روش پایا منتقل می‌شوند (Kamali et al, 2016a; Razavinejad &

محصول بریده نشده آرسی با عنوان رشته الگو در آزمون پی سی آر استفاده شد. برای انجام آزمون آرسی، از آنزیم فی ۲۹ دی‌ان‌ا پلی‌مراز و کیت Templphi Amplification (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 ترنکرتوویروس‌هاست، 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 ترنکرتوویروس‌ها، 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، 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 آنجائی که محصول واکنش پی‌سی‌آر فاقد انتهای چسبیده 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



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 دی‌ان‌ای 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 آرسی 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 دی‌ان‌ای استخراج‌شده از گیاه با استفاده از روش آرسی غنی‌سازی گردید. سپس از

و آغازگرهای TCTV11-1676-F/TCTV11-2699-R آلودگی گیاه تاتوره به ویروس پیچیدگی برگ شلغم تأیید شد. برخلاف سایر میزبان‌های وحشی و آلوده به TCTV که قبلاً 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 I 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 I به تنهایی 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 ان I پلی مرار و سپس استفاده از پی سی آر می‌تواند نتیجه بخش باشد. تاکنون از ترکیب دو روش پی سی آر و آر سی I برای شناسایی 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 ترنکرتوویروس جدید از بدن زنجیرک *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

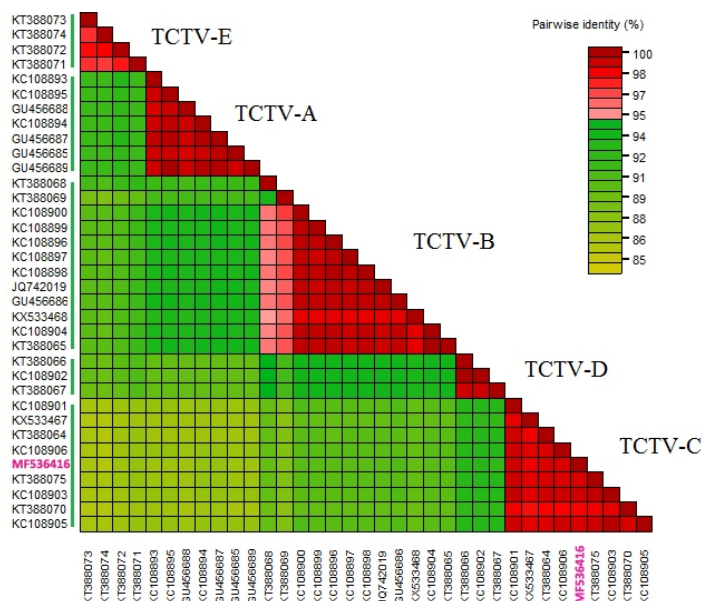
نو ترکیب به سلول‌های مستعد، از باکتری *Escherichia coli* نژاد DH5 $\alpha$  استفاده شد. بعد از عمل transformation، سلول‌های باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب شناسائی و به محیط مایع I بی دارای آنتی-بیوتیک آمپی سیلین (۵۰  $\mu\text{g/ml}$ ) اضافه شد. نمونه حاصل، به مدت ۲۰-۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C و ۱۳۰ دور در دقیقه در ترموشیکر کشت داده شد. پلاسمید نو ترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید GeneJET<sup>TM</sup> Plasmid (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 از مدل Jukes-Cantor 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) به عنوان مدل خارج گروه (outgroup) استفاده شد. به علاوه، تشابه دو به دوی نوکلئوتیدهای ژنوم کامل جدایه مورد نظر با ترنکرتوویروس‌ها، با استفاده از نرم افزار SDT v 1.2 (Muhire et al., 2014) تجزیه و تحلیل شد.

## نتایج و بحث

بر اساس نتایج بدست آمده، با استفاده از آزمون پی سی آر





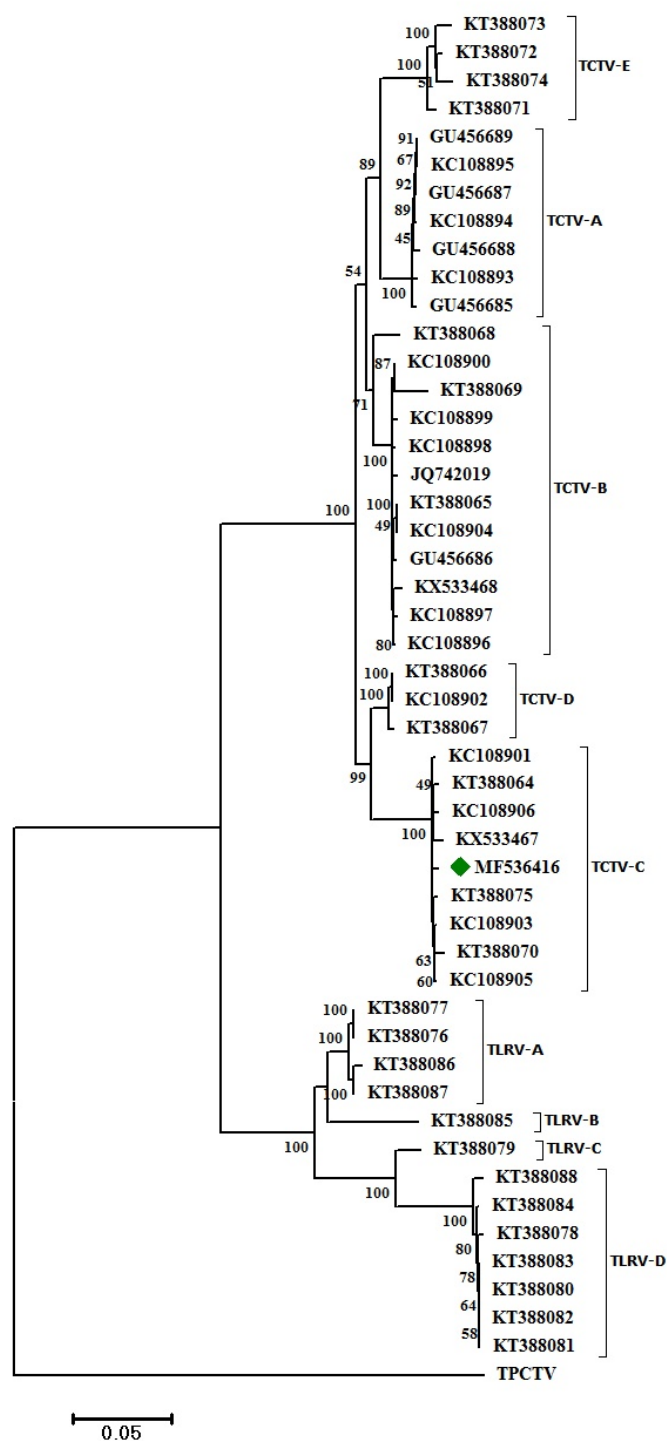
شکل ۲. ماتریکس مقایسه دو به دوی ترادف‌های نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه تاتوره (MF536416 رنگ بنفش) با سایر ترادف‌های مربوط به ویروس پیچیدگی برگ شلغم (TCTV) موجود در بانک ژن (GenBank) با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2.

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

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 اسیدآمینو 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

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 بر روی رشته ویروسی و چهار عدد بر روی رشته مکمل، عمدتاً شبیه سایر جدایه‌های این ویروس از جمله جدایه



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی براساس ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه تاتوره (لوزی سبز رنگ) و سایر جدایه‌های ترنکرتوویروس‌ها به روش اتصال مجاور (neighbor-joining). محاسبه bootstrap با تعداد ۱۰۰۰ تکرار انجام شده است و تنها عضو جنس *Topocuvirus* به‌عنوان مدل خارج گروه (outgroup) در نظر گرفته شده است. انشعابات با حمایت کمتر از ۴۰٪ 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.

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 ترنکرتوویروس‌ها را تأیید می‌کند.

ویروس که تاکنون بعنوان نژاد C معرفی شده‌اند یا از گیاه شلغم گزارش شده‌اند (Kamali *et al.* 2016a; Razavinejad *et al.* 2013) و یادر مورد جدایه KX533467، از بدن زنجربک‌ها با روش توالی‌یابی نسل جدید جداسازی و گزارش گردیده‌اند (Kamali *et al.* 2017). باوجودی که 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

## 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](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 22<sup>nd</sup> 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., Lefevre 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., Roumagnac 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.