فصلنامه گیاه‌پزشکی
۱۳۹۱ -۴ : ۸۳-۹۴

نقشه پراکنش ویروس‌های عامل پیچیدگی برگ (زرد) گوجه فرنگی در مزارع گوجه فرنگی استان فارس

علی پاک نیت*
مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، زرقان، فارس، ایران
ساسان قاسمی، عبداله کاربر
دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، گروه گیاه‌پزشکی، شیراز، ایران

چکیده

طی زمستان سال ۱۳۹۰ و بهار و تابستان ۱۳۹۱ به منظور تعیین پراکندگی جمینی ویروس های مولد بیماری پیچیدگی برگ (زرد) گوجه فرنگی از مناطق عمده گوجه فرنگی کاری استان فارس که شامل شهرستان‌های لامرد، لار، فراشبند، کازرون، ممسنی، شیراز، سعادت شهر و آباده بازدید به عمل آمد. پس از شناسایی مزارع آلوده نمونه‌های مشکوک از مزارع گوجه فرنگی دارای علائم پیچیدگی شدید برگ همراه با کوتولگی و زردی در حاشیه برگ‌ها، ریزش گل و کوتولگی گیاه بودند در این مناطق جمع آوری شدند. پس از استخراج دی ان ای ازآلودگی نمونه‌های دارای علائم با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی جدایه آباده و جفت آغازگرهای دژنره ویروس پیچیدگی برگ (زرد) گوجه فرنگی مورد بررسی پی سی آر قرار گرفتند. در این تحقیق بیماری در مناطق لامرد، لار، سعادت شهر، آباده و ممسنی با استفاده از جفت آغازگرهای مذکور ردیابی و نقشه پراکنش این ویروس در استان تهیه شد.

واژه‌های کلیدی: ویروس عامل پیچیدگی برگ (زرد) گوجه فرنگی پراکندگی، آغازگر دژنره، آزمون پی. سی. آر، نقشه پراکنش

*مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: pakniat@farsagres.ir

مقدمه

امروزه جمینی ویروس‌ها با سرعت بسیار وصف ناپذیری به عنوان گروهی از مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا معرفی گردیده‌اند. وسعت آلودگی و تنوع میزبانی جمینی ویروس‌ها مدیون پدیدار شدن سویه‌های جدید این ویروس ها، فراوانی و تنوع در بیوتیپ‌های ناقل آنها، مقاومت ناقلین به حشره‌کش‌ها و گرم شدن زمین در سال‌های اخیر می‌باشد (Seal *et al*., 2006). یکی از شدیدترین بیماری‌هایی که توسط جمینی ویروس‌ها در گوجه فرنگی ایجاد می‌شود، بیماری پیچیدگی برگ (leaf curl) است که عامل آن چند ویروس از جنس *Begomovirus* می‌باشند که همگی بنام‌های Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) و Tomato leaf curl virus (TLCV) نامیده می‌شوند. که دارای ژنوم یک بخشی بوده و توسط سفید بالک‌ها منتقل می‌گردند (Rojas *et al*, 2005). این کمپلکس ایجاد دو تیپ از بیماری می‌کند که تیپ اول ایجاد زردی در حاشیه برگ‌ها می‌نماید و تیپ دوم بدون علائم زردی می‌باشد.

طبق هشتمین گزارش International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) تعداد ۴۲ گونه بگومو ویروس تحت نام های TLCV و TYLCV از نقاط مختلف دنیا معرفی شده که تولید بیماری پیچیدگی برگ (زرد) در گوجه‌فرنگی می‌نمایند. برخی گونه ها نیز دارای بیش از یک استرین یا جدایه می‌باشند. بعنوان مثال ۱۷۸ استرین متفاوت از نقاط مختلف دنیا از T(Y)LCV گزارش شده است. همگی این ویروس‌ها، به جز جدایه‌های شمال هند و تایلند که ژنوم دو بخشی دارند، دارای ژنوم یک بخشی می باشند (Stanley *et al*., 2005; Fauquet *et al*., 2008). جهت شناسایی این بیماری می‌توان از روشهای سرولوژی و مولکولی کمک گرفت.

پیکو و همکاران در سال ۱۹۹۶ و همچنین موریونس و نواس کاستیلو در سال ۲۰۰۰ و اخیرا" زسنک در سال ۲۰۰۷ ویژگی‌های بیولوژیکی، مولکولی، اپیدمیولوژیکی و مدیریت کمپلکس بیماری پیچیدگی برگ (زرد) گوجه‌فرنگی (TYLCV) را مورد بررسی قرار داده و نشان داده‌اند که این بیماری ویروسی در سال‌های اخیر در سراسر جهان گسترش یافته است (Pico *et al*., 1996; Czosnek, 2007; Moriones & Navas-Castillo, 2000). از زمان اولین گزارش، TYLCV و ویروس‌های مشابه آن به سرعت در منطقه خاورمیانه گسترش یافته‌اند

(Hajimorad *et al*., 1996). علاوه بر آن این ویروس‌ها از جنوب شرقی آسیا، نواحی شمالی و مرکزی آفریقا، آمریکا، اروپا و استرالیا گزارش گردیده‌اند (Rochester *et al*., 1990).

تا کنون شش جدایه از T(Y)LCV دارای ژنوم یک بخشی و دو بخشی از گوجه‌فرنگی در ایران بطور کامل تعیین ترادف گردیده‌اند. دو ویروس شامل Tomato yellow leaf curl virus Iran [Iran:Iranshahr:1998] (TYLCV-IR [IR:Ira]) (Bananej *et al*., 2004) و Tomato leaf curl Karnataka virus-Iran [Iran:Iranshahr] (ToLCKV-IR [IR:Ira]) (Behjatnia *et al*., 2004) از مزارع گوجه‌فرنگی ایرانشهر واقع در استان سیستان و بلوچستان جداسازی گردیده‌اند. یک جدایه دیگر ازTYLCV بنام ((TYLCV-[Kahnouj]) از شهرستان کهنوج در استان کرمان گزارش شده است و یک جدایه بنام TYLCV-IR2 نیز از استان هرمزگان گزارش گردیده است. اخیرا یک جدایه و سویه شدید از گلخانه های گوجه‌فرنگی در منطقه آباده به نام TYLCV-Abadeh جداسازی گردیده است (Pakniat *et al*., 2010).

در سال های اخیر خسارت ناشی از این ویروس‌ها در گوجه فرنگی و سایر بگومو ویروس‌ها در محصولات دیگر با گسترش جهانی بیوتیپ B سفید بالک *Bemisia tabaci* همراه بوده است. این بیوتیپ نسبت به بیوتیپ‌های دیگر دامنه میزبانی وسیع‌تر و قدرت باروری و زاد و ولد بیشتری داشته و رفتار تغذیه ای آن با تهاجم شدیدتری همراه می‌باشد (Bedford *et al*., 1994; Czosnek & Laterrot, 1997; De Barro, 1995). بیماری پیچیدگی برگ گوجه فرنگی ضمن گسترش در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان، در ایران نیز در گوجه-فرنگی و برخی محصولات دیگر به ویژه در استان‌های جنوبی کشور در کشت‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای به صورت همه گیری بروز نموده است. خسارت این بیماری در سال‌های اخیر مورد توجه کشاورزان و وزارت جهاد کشاورزی بوده، محققین و متخصصین علم بیماری‌شناسی گیاهی کشور بدنبال یافتن روش مدیریتی مناسب آن بوده‌اند.

بیماری پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی همانند سایر بیماری‌های ویروسی یکی از بیماری‌های بدون درمان در کشت‌های گوجه‌فرنگی بوده که تاکنون مزارع وسیعی را آلوده نموده و گاهی تا صد در صد به کشاورزان استان خسارت وارد نموده است (مشاهدات منتشر نشده). از آنجایی که سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی در استان فارس بنا به آمار منتشره اداره کل آمار استان فارس در سال زراعی ۱۳۹۰ - ۱۳۸۹ حدود ۱۷۱۴۰ هکتار می‌باشد این محصول از اهمیت ویژه‌ای در استان برخوردار است. یکی از روش‌های مدیریت این بیماری شناسایی کانون‌های پراکندگی، نحوه فعالیت ناقل و روشهای پایداری آن در مزارع از سالی به سال دیگر می‌باشد (Czosnek, 2007). در تحقیق حاضر پراکندگی ویروس در مزارع گوجه‌فرنگی استان فارس مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های آلوده

طی زمستان ۱۳۹۰ و بهار و تابستان ۱۳۹۱ به منظور شناسایی و تعیین پراکندگی جمینی ویروس‌های مولد بیماری پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی از مناطق عمده کشت آن زراعت در استان فارس بازدید به عمل آمد. پس از شناسایی مزارع آلوده، نمونه های مشکوک که دارای علائم پیچیدگی شدید برگ همراه با کوتولگی و زردی در حاشیه برگ‌ها، ریزش گل و کوتولگی گیاه، مناطق جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید (شکل ۱). در هر منطقه حداقل از تعداد ۱۰ مزرعه بازدید به عمل آمده و از هر مزرعه بسته به سطح آلودگی دو تا ده نمونه برداشت شد. گیاهان گوجه‌فرنگی جمع‌آوری شده از کشت‌های گوجه‌فرنگی شهرستان‌های مورد مطالعه که عبارت بودند از شهرستان لامرد، لار، فراشبند، کازرون، ممسنی، شیراز، سعادت شهر و آباده و دارای علائم شبیه به علائم بیماری پیچیدگی برگ (زرد) گوجه‌فرنگی شامل پیچیدگی شدید برگ همراه با زردی رگبرگ‌ها و حاشیه برگ‌ها، ریز شدن برگ و کوتولگی بوته‌ها بودند (شکل ۱) در آزمون PCR برای تعیین وجود T(Y)LCVs مورد آزمایش قرار گرفتند.

B A

شکل۱- پیچیدگی و کوچک شدن برگ‌ها همراه با حاشیه زرد (A)، کوتولگی و پیچیدگی شدید بوته (B)

Figure 1. A. Leaf curl with yellow margin leaves, B. Plant stunting and sever curling

استخراج دی ان ای

به منظور شناسایی ویروس عامل بیماری در گیاهان آلوده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ابتدا اسید نوکلئیک کل گیاه به روش ژانگ و همکاران (Zhang *et al*., 1998) با اعمال

تغییرات جزئی به صورت زیر انجام شد. ۲ گرم بافر CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethyl-amonio bromide)، ۸/۱۸ گرم NaCl، ۲ گرم PVP (Poly vinyl pyrrolidon)، ۱/۲۱ گرم Tris-HCl و ۱۰۰ میکرولیتر 2-Mercaptoethanol در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و ۲۰۰ میلی‌گرم بافت در هاون سترون و به کمک ازت مایع کوبیده تا به صورت پودر در آمد. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (دمای ۶۵ درجه سلسیوس) به هر یک از لوله‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از قرار دادن لوله‌ها روی یخ به‌مدت ۲۰ دقیقه، مقدار ۷۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم و ایزامیل الکل به نسبت ۲۴: ۱ به آنها اضافه به مدت ۱۰ دقیقه بهم زده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و در درجه حرارت اتاق میان گریزسازی شده بخش رویی به آرامی به لوله اضافه و هم حجم آن ایزوپروپانل سرد اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای صفر درجه سلسیوس میان گریزسازی شدند. قسمت رونشین حذف و رسوب حاصله با اتانول ۷۰ درصد شستشو شد. پس از حذف اتانول رسوب حاصل در هوای اتاق خشک گردید. به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بارتقطیر استریل اضافه و سپس در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. از دی ان ای استخراج شده به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) استفاده گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase chain reaction, PCR)

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۰ - ۲۰ نانو گرم از دی ان ای غالب، ۱/۵ میلی مولار MgCl2، ۲۰۰ میکرو مولار از هرکدام از نوکلئوتیدهای چهارگانه (dATP ,dCTP ,dGTP ,dTTP)، یک میکرو مولار از هرکدام از جفت آغازگرهای اختصاصی جدایه آباده (اسرائیلی) TYLCV-[Ab] 349^{V} با توالی (- ′5 CTCGAAGGTTCGCCGAAGGC - ′3) و TYLCV-[Ab] 1997^{C} با توالی (- ′5 CGCGGCCATGGAGACCTAATAG - ′3) (Pakniat *et al*., 2010) و یا جفت آغازگرهای دژنره بگومو ویروس‌ها $PCR^{V}181$ (Rojas *et al*., 1993) با توالی (- ′5 TAATATTACCGGWTGGCC - ′3) و Primer B^{c} (Deng *et al*., 1994) با توالی (- ′5 TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA - ′3)، ۲ واحد از آنزیم پلیمراز Taq و ۲/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰× شرکت سیناژن و ۱۸ میکرولیتر آب انجام پذیرفت. برنامه واکنش شامل یک مرحله ابتدائی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به منظور واسرشت نمودن دی ان ای قالب، ۳۵ چرخه‌ای شامل دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه بود. پس از آخرین چرخه، به مدت ۲۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس نگهداری گردید. نحوه تکثیر قطعات دی ان ای با انجام الکتروفورز در آگاروز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. برای تایید صحت باندهای

تولیدی، تعدادی از باندهای ایجاد شده توسط آغازگر $PCR^{V}181/$ Primer B^{C} جهت تعیین ترادف به شرکت BioNEER کره جنوبی ارسال گردید.

نتایج و بحث

مشخصات محل جمع‌آوری، مختصات جغرافیایی نمونه‌های آلوده و آغازگرهای مورد استفاده در مناطق مختلف استان در جدول ۱ تنظیم گردیده است.

به منظور ردیابی ویروس برگ زرد گوجه‌فرنگی ابتدا از یک آغازگر اختصاصی مربوط به جدایه آباده (اسرائیلی) استفاده گردید و در صورت عدم شناسایی جدایه مذکور از جفت آغازگر دژنره اختصاصی بگومو ویروس‌ها $PCR^{V}181/$ Primer B^{C} استفاده شد. آغازگر اختصاصی جدایه آباده (TYLCV-[Ab]349c/1997v) قطعه دی ان ای به اندازه ۱۶۴۸ bp از گیاهان آلوده تکثیر نمود (شکل ۲) آلودگی نمونه‌هایی که دارای علائم بوده و آغازگر اختصاصی قادر به تکثیر قطعه مورد نظر نبود با استفاده از جفت آغازگر دژنره بگومو ویروس‌ها $PCR^{V}181/$ Primer B^{C} که قادر به تکثیر قطعه حدود ۵۰۰ bp بررسی شد (شکل ۳). همچنین تعدادی از باندهای تکثیر یافته با این جفت آغازگر جهت تعیین صحت باند تولیدی ترادف یابی گردیدند (داده‌ها آورده نشده است) که با ترادف ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی مطابقت داشت.

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد تعداد نمونه‌ها از مناطق مختلف بسته به وسعت آلودگی در منطقه، متفاوت می‌باشد. برای مثال وسعت آلودگی در منطقه لار و خشت شهرستان لامرد دارای گستردگی بالایی بود و با توجه به نتایج حاصل از آزمون پی سی آر می‌توان فهمید که در این منطقه دارای تنوع در سویه ویروس می‌باشیم. زیرا از ۶ نمونه مثبت شناسایی شده توسط آغازگر دژنره بگومو ویروس‌ها ($PCR^{V}181/$ Primer B^{C}) تنها ۴ نمونه با آغازگر اختصاصی جدایه آباده (اسرائیلی) TYLCV-[Ab]$349^{c}/1997^{v}$ (Pakniat *et al*., 2010) قابل ردیابی بودند. همچنین در مورد نمونه آلوده ردیابی شده در منطقه سنگر از شهرستان ممسنی این مطلب دیده می‌شود. این نشان از تفاوت سویه ویروس دخیل در بیماری پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در مناطق مختلف استان فارس می باشد.

جدول ۱- مشخصات محل جمع آوری ، مختصات جغرافیایی مزرعه آلوده و آغازگرهای مورد استفاده

Table 1. sampling location, geographical longitude and latitude of infected farms and positive primers used in PCR reaction

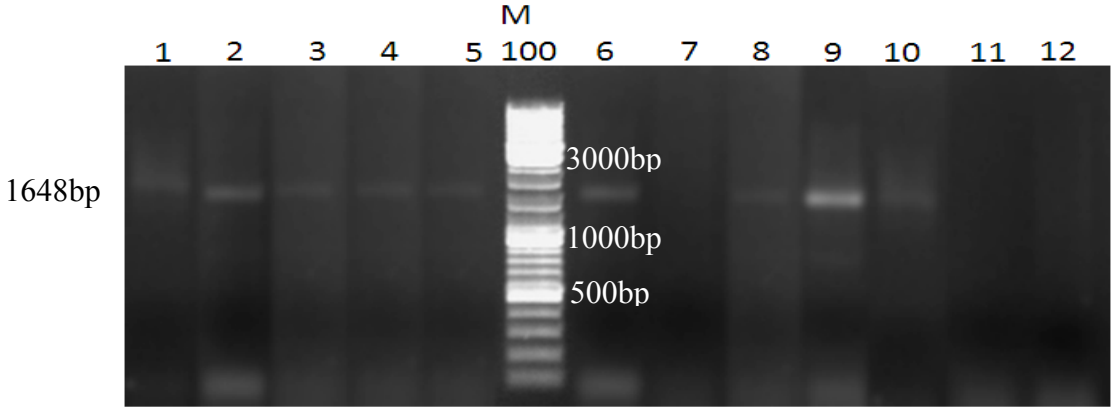
Positive samples	Primer pair	Geographical data of infected samples		PCR positive samples	Symptomatic samples	Sampling location
		Latitude	Longitude			
6	PCR^{V}181/ Primer B^{C}	53° 27′ 04″	27° 08′ 14″	6	71	Lavar-e-khasht of Lamerd
4	TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v}					
1	PCR^{V}181/ Primer B^{C}	51° 33′ 06″	30° 02′ 48″	1	10	Sangar of Norabad-e-Mamasani
0	TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v}					
3	PCR^{V}181/ Primer B^{C}	52° 33′ 44″	31° 12′ 57″	3	6	Abadeh
3	TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v}					
2	PCR^{V}181/ Primer B^{C}	52° 59′ 52″	30° 05′ 43″	2	4	Saadat Shahr
2	TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v}					
1	PCR^{V}181/ Primer B^{C}	53° 37′ 40″	27° 41′ 20″	1	12	Arad of Lar
1	TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v}					
0	PCR^{V}181/ Primer B^{C}	-	-	0	24	Farashband
0	TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v}					
0	PCR^{V}181/ Primer B^{C}	-	-	0	5	Kazeroon
0	TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v}					
0	PCR^{V}181/ Primer B^{C}	-	-	0	5	Shiraz
0	TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v}					

(*) مختصات جغرافیایی تنها مربوط به یک مزرعه آلوده در منطقه مورد مطالعه می باشد

(*) Geographical longitude and latitude is related to an infected farm in the region

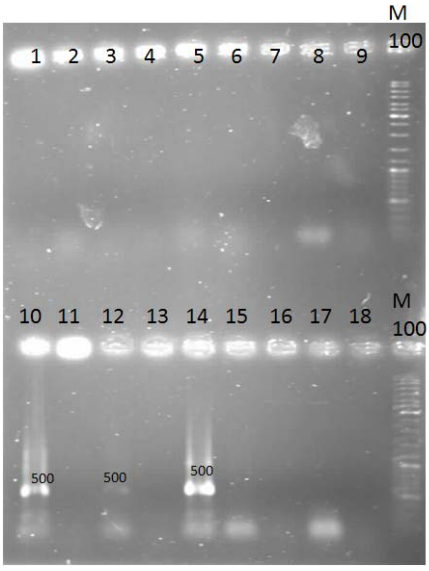
شکل۲- محصول واکنش زنجیرهای پلی مراز نمونه‌های آلوده از مناطق مختلف با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جدایه آباده TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v} (راهک‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ نمونه از شهرستان لامرد، راهک ۵ نمونه از شهرستان لار، راهک ۶ نمونه از شهرستان سعادت شهر، راهک ۷ نمونه از شهرستان شیراز، راهک‌های ۸،۹،۱۰ نمونه از شهرستان آباده،راهک ۱۱ نمونه از شهرستان کازرون و راهک ۱۲ نمونه از شهرستان فراشبند. M= مارکر مولکولی ۱۰۰-۱۰۰۰۰ شرکت فرمنتاز.

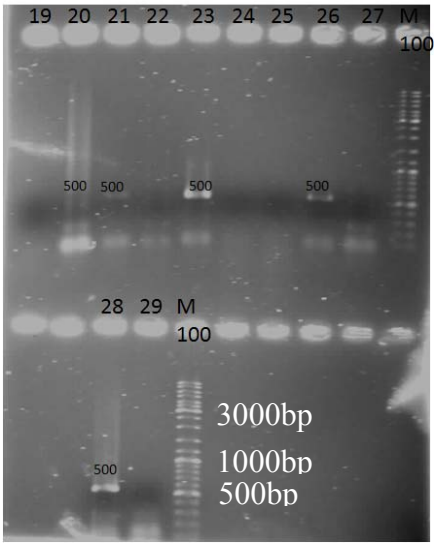
Figure 2. electrophoresis patterns of PCR products using TYLCV-[Ab]349^{c}/1997^{v} primer pairs from different regions. (lane 1, 2, 3, & 4 samples from Lamerd, lane 5 from Lar, lane 6 from Saadat shahr, lane 7 from Shiraz, lane 8, 9 & 10 from Abadeh, lane 11 from Kazeroon and lane 12 from Farashband. M= 100-10000 nt DNA molecular ladder of Fermentase Co.



شکل ۳- محصول زنجیرهای پلی مراز با استفاده ازجفت آغازگر دژنره PCR^{V}181/ Primer B^{C} راهک‌های ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۲۰، ۲۱ و ۲۳ نمونه‌های آلوده از منطقه لاور خشت شهرستان لامرد و راهک ۲۶ نمونه آلوده از منطقه سنگر نور آباد ممسنی. راهک‌های دیگر مربوط به مناطق دیگر استان مانند شیراز، فراشبند و کازرون می‌باشد. راهک ۲۹ نمونه سالم. M= مارکر مولکولی ۱۰۰- ۱۰۰۰۰ شرکت فرمنتاز.

Figure 3. electrophoresis patterns of PCR products using PCR^{V}181/ Primer B^{C} degenerate primer pairs from different regions. (Lane 10, 12, 14, 20, 21 & 23 samples from Lavarekhasht of Lamerd region, lane 26 from Sangar of Norabad-e-Mamasani region, other lanes is related to other regions of Fars province including: Shiraz, Farashband and Kazeroon. Lane 29 is healthy sample. M= 100-10000 nt DNA molecular ladder of Fermentase Co.

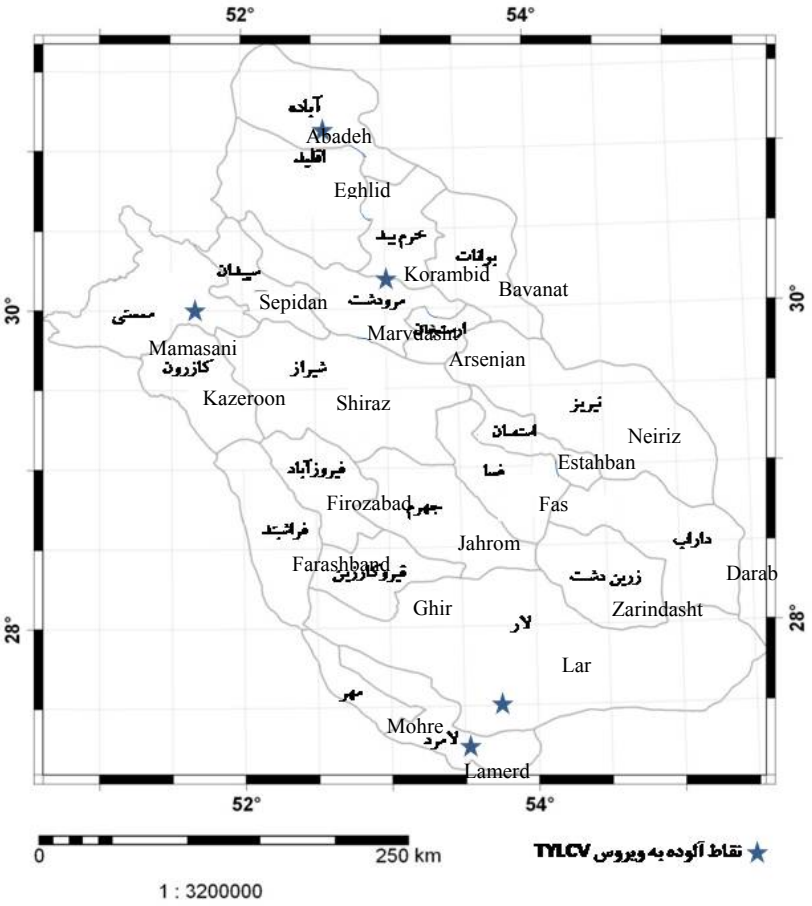




نمونه‌هایی از مناطق حومه شیراز، فراشبند و کازرون جمع آوری شده بود بـا وجـود علائـم مشکوک، واکنش زنجیره‌ای بررسی شده قادر به تکثیر هیچ قطعه‌ای نگردید. این احتمال وجـود دارد که علائم ایجادی در اثر پاشش سموم از جمله علف‌کش‌هـای هورمـونی، سـرمازدگی و یـا عدم توانایی آغازگرها در ردیابی عامل بیماری باشد. آنچه مسلم است احتمال آلودگی در مناطق مختلف به چند عامل از جمله فعالیـت نـاقلین، ورود نشـاء آلـوده و وجـود علفهـای هـرز تیـره سولاناسه میزبان و آلوده که به عنوان منبع آلودگی از سالی به سال دیگـر مـی‌باشـند، بسـتگی دارد. طی این تحقیق نقشه پراکنش بیماری پیچیدگی برگ (زرد) گوجـه فرنگـی (شـکل ۴) در استان فارس تهیه گردید.

شکل ۴- نقشه پراکنش TYLCV به تفکیک شهرستان‌های استان فارس

Figure 4. Distribution map of TYLCV on Fars province towns TYLCV position



سپاسگزاری

بدین وسیله از تمامی دست اندرکاران مدیریت حفظ نباتات و بخش اجرا که در تهیـه نقشـه مکانی و اعلام مزارع گوجه‌فرنگی آلـوده در انجـام ایـن تحقیـق مسـاعدت نمـوده‌انـد، قـدرانی می‌گردد.

منابع

Bananej, K., Kheyr-Pour, A., Salekdeh, G. H. & Ahoonmanesh, A. 2004. Complete nucleotide sequence of Iranian tomato yellow leaf curl virus isolate: Further evidence for natural recombination amongst begomoviruses. *Archives of Virology* 149: 1435-1443.

Bedford, I. D., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C. & Markham, P. G. 1994. Geminivirus-transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology,* 125: 311-325.

Behjatnia, S. A. A., Izadpanah, K. Dry, I. B. & Rezaian, M. A. 2004. Molecular characterization and taxonomic position of the Iranian isolate of tomato leaf curl virus. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 40: 77-94.

Czosnek, H. 2007. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease, Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. Published by Springer Dordrecht, The Netherlands.

Czosnek, H. and Laterrot, H. 1997. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology,* 142: 1391-1406.

De Barro, P. J. 1995. *Bemisia tabaci* biotype B: A review of its biology, distribution and control. *In* "Division of entomology technical paper No. 33". Commomwealth Sientific and Industrial Research Organisation, Canberra, Australia.

Deng, D., McGrath, P. F., Robinson, D. J. & Harrison, B. D. 1994. Detection and differentiation of whitefly-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Annals of Applied Biology,* 125: 327-336.

Fauquet, C. M., Briddon, R. W. Brown, J. K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M. & Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature *Archives of Virology,* 153: 783–821.

Hajimorad, M. R., KheyrPour, A., Alavi, V., Ahoonmanesh, A., Bahar, M., Rezaian, M. A. & Gronenborn, B. 1996. Identification of whitefly transmitted tomato yellow leaf curl geminivirus from Iran and a survey of its distribution with molecular probes. *Plant Pathology*, 45: 418-425.

Moriones, E. & Navas-Castillo, J. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research,* 71: 123-134.

Navas-Castillo, J., Sanchez-Campos, S., Noris, E., Louro, D., Accotto, G. P. & Moriones, E. 2000. Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus . *Journal of General Virology,* 81: 2797- 2801.

Pakniat, A. Behjatnia, S. A. A. Kharazmi, S. Shahbazi, M. & Izadpanah, K. 2010. Molecular characterization and construction of infectious clone of a new strain of Tomato yellow leaf curl virus in southern Iran. *Iranian journal of plant pathology*, 46: 101-115.

Pico, B., Diez, M. J. & Nuez, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop: The tomato yellow leaf curl virus - A review. *Scientia Horticulturae,* 67: 151-196.

Seal, S. E., Jeger, M. J. & Van den Bosch, F. 2006. Begomovirus evolution and disease management. *Advances in Virus Research,* 67: 297–316.

Stanley, J., Bisaro D. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Fauquet, C. M., Harrison, B. D., Rybicki, E. P. & Stenger, D. C. 2005. Geminiviridae. In: Virus Taxonomy, Eighth Report of The International Committee On Taxonomy of Viruses, pp 301-326. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. London: Elsevier/Academic Press

Rochester, D. E., Kositratana, W. & Beachy, R. N. 1990. Systemic movement and symptom production following agroinoculation with a single DNA of tomato yellow leaf curl geminivirus (Thailand). *Virology*, 178: 520-526.

Rojas, M.R., Hagen.C., Lucas, W.J. & Gilbertson, R.L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology,* 43: 361-394

Rojas, M. R., Gilbertson, R. J., Russell, D. R. & Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain-reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease,* 77: 340-347.

Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K. & Kirpatrick, B. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogenic for PCR assay. *Journal of virological methods,* 71: 45-50.