

## Molecular identification, analysis, and sequencing of the coat protein gene of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato fields from selected regions of Iran



Nesa Razavi, Narjes Maleki, Davoud Koolivand✉

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

**Corresponding author**

✉Koolivand@znu.ac.ir

**Keywords**Genetic diversity, Molecular Detection, Phylogenetic analysis, *Tomato yellow leaf curl virus*, Whitefly**Abstract**

*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV; *Begomovirus coheni*) is one of the most destructive plant viruses worldwide, causing severe yield losses in tomato fields. In this study, field surveys were conducted in tomato-growing areas of Isfahan, Yazd, and Varamin (central Iran) to detect and investigate the genetic diversity of TYLCV. Leaf samples showing virus-like symptoms were collected, and total DNA was extracted for molecular detection. PCR amplification using V1 gene-specific primers resulted in a ~670 bp fragment in 12 suspected samples, of which seven isolates were selected for sequencing. The obtained sequences were aligned with reference sequences from GenBank, and phylogenetic analyses were performed using the Neighbor-Joining method in MEGA11. The results revealed that selected Iranian isolates clustered into two distinct groups within clade I, along with isolates from other parts of the world. Haplotype network analysis further supported these groupings. Notably, phylogenetic placement and strain-level classification of the newly identified isolates showed that all seven Iranian isolates (PV579121–PV579127) clustered within the TYLCV-OM group, forming a distinct lineage. This close genetic relationship suggests a common evolutionary origin and supports the hypothesis that these isolates belong to a region-specific strain adapted to the environmental conditions of central Iran. Genetic diversity analyses revealed significant differences among virus populations from the surveyed regions. Furthermore, neutrality tests (Tajima's D, Fu and Li's D\* and F\*) and population genetic analyses provided evidence of purifying selection and recent population expansion. One significant recombination event was also detected using RDP4 software. Selection pressure analysis using FEL and MEME methods identified several codons under both positive and negative selection. Collectively, these findings provide a comprehensive picture of the genetic diversity and evolutionary dynamics of TYLCV in central Iran and offer valuable insights for developing effective regional disease management strategies.

**Received:** 4 May 2025**Revised:** 11 July 2025**Accepted:** 27 July 2024**Available online:** 21  
September 2025**Cite this article:**Razavi N, Meleki N, Koolivand D, 2025. Molecular identification, analysis, and sequencing of the coat protein gene of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato fields from selected regions of Iran. *J Appl Res Plant Prot* 14 (4): 309–327.<https://dx.doi.org/10.22034/ARPP.2025.20383>

Copyright© 2025 University of Tabriz, Published by the University of Tabriz.

This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)

## شناسایی مولکولی، تجزیه و تعیین توالی ژن رمز کننده پروتئین پوششی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی در مزارع گوجه‌فرنگی از برخی مناطق ایران

نسا رضوی، نرجس ملکی، داود کولیوند✉

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

نویسنده مسئول: Koolivand@znu.ac.ir✉

دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۴ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۴/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۵

### چکیده

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus; Begomovirus coheni*) یکی از مخرب‌ترین ویروس‌های گیاهی است که با ایجاد خسارت‌های شدید در مزارع گوجه‌فرنگی، در میان ده ویروس مهم گیاهی جهان قرار گرفته است. در این مطالعه به منظور ردیابی و بررسی تنوع این ویروس، نمونه‌برداری از گیاهان مشکوک به آلودگی ویروسی در برخی مزارع گوجه‌فرنگی مناطق اصفهان، یزد و ورامین انجام شد. پس از استخراج DNA کل از بافت برگ، ردیابی با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توسط جفت آغازگرهای اختصاصی ژن VI ویروس انجام شد. طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، قطعه‌ای به طول تقریبی ۶۷۰ جفت باز در ۱۲ نمونه مشکوک تکثیر شد که نهایتاً هفت جدایه توالی‌یابی شدند. توالی‌های حاصل با توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI هم‌ردیف‌سازی شده و تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی با استفاده از روش‌های Neighbor-Joining، در نرم افزار MEGA 11 انجام شد. براساس نتایج تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی برخی از جدایه‌های منتخب ایرانی در دو گروه متمایز همراه با برخی از جدایه‌ها از سایر مناطق دنیا در شاخه ۱ طبقه‌بندی شدند. تحلیل شبکه هاپلوتیپی نیز این گروه‌بندی‌ها را تأیید کرد. علاوه بر این، بررسی دقیق جایگاه تبارزایی و تعیین نوع سویه جدایه‌های تازه شناسایی شده نشان داد که تمامی این جدایه‌ها درون خوشه TYLCV-OM قرار دارند که بیانگر نزدیکی ژنتیکی و منشأ تکاملی مشترک آن‌هاست. این الگو، فرضیه تعلق این جدایه‌ها به یک استرین منطقه‌ای متمایز و سازگار با شرایط محیطی خاص مناطق مرکزی ایران را تقویت می‌کند. تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین جمعیت‌های مناطق مورد بررسی بود. افزون بر آن، آزمون‌های خنثی بودن Tajima's D، Fu and Li's D و F و سایر آنالیزهای جمعیتی و مولکولی شواهدی از انتخاب خالص‌سازی و گسترش اخیر جمعیت ارائه کردند. همچنین، در بین جدایه‌های مورد بررسی یک رویداد نوترکیبی معنادار با استفاده از نرم‌افزار RDP4 شناسایی شد و آزمون‌های فشار انتخابی با روش‌های FEL و MEME نشان دادند که تعدادی از کدون‌ها تحت فشار انتخابی مثبت یا منفی قرار دارند. این یافته‌ها تصویری جامع از تنوع ژنتیکی و پویایی تکاملی TYLCV در مناطق مرکزی (اصفهان و یزد و ورامین) ایران ارائه می‌دهد که می‌تواند در تدوین راهبردهای مدیریتی مؤثر برای کنترل بیماری در سطح منطقه‌ای مفید باشد.

**کلمات کلیدی:** آنالیز تبارزایی، تنوع ژنتیکی، ردیابی مولکولی، سفید بالک، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی

### مقدمه

غذایی و اقتصاد کشاورزی کشور است. افزون بر این، به دلیل دارا بودن ترکیبات متابولیتی ثانویه‌ی ارزشمند نظیر کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک، گوجه‌فرنگی می‌تواند در ارتقاء سلامت انسان نقش مهمی ایفا کند (Seymour & Rose 2022). با وجود این، گوجه‌فرنگی همانند بسیاری از محصولات زراعی دیگر در مراحل مختلف رشد خود در معرض تهدید عوامل زنده بیماری‌زا از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها، نامات‌ها و به ویژه ویروس‌ها قرار دارد که می‌تواند موجب کاهش شدید عملکرد و کیفیت محصول شود. از میان بیماری‌های ویروسی مهم گوجه‌فرنگی می‌توان به ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus: CMV*)، ویروس موزاییک گوجه‌فرنگی (*Tomato mosaic*)

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* L. از خانواده بادنجانیان (Solanaceae) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی در جهان به شمار می‌آید که پس از سیب‌زمینی به‌عنوان دومین سبزی مهم از نظر اقتصادی و تغذیه‌ای شناخته می‌شود. این گیاه به دلیل مصرف گسترده به صورت خام یا فرآوری‌شده، نقش حیاتی در رژیم غذایی انسان ایفا می‌کند (Seymour & Rose 2022). براساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO)، میزان تولید گوجه‌فرنگی در ایران در سال ۲۰۲۲ حدود ۳/۴ میلیون تن و سطح زیرکشت آن نزدیک به ۷۷ هزار هکتار بوده است، که بیانگر اهمیت ویژه این محصول در سبد

(*et al.* 1996; Yazdani-Khameneh & Golnaraghi 2017) مطالعات بعدی نشان داده‌اند که TYLCV در استان‌های مختلفی از جمله سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان، بوشهر، خوزستان، خراسان، اصفهان، مرکزی، مازندران، گلستان، تهران و یزد شیوع دارد (Shirazi *et al.* 2014; Bananej 2016). گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به TYLCV معمولاً علائمی از قبیل زردی و پیچیدگی برگ‌ها، کاهش رشد، کوتولگی، ریزش گل، کوچک شدن شدید برگ‌های انتهایی و کاهش کمی و کیفی میوه را نشان می‌دهند (Prasad *et al.* 2020; Yan *et al.* 2021).

ژنوم TYLCV از یک مولکول DNA تک‌رشته‌ای حلقوی (ssDNA) به طول تقریبی ۲/۷ کیلوباز تشکیل شده است (Prasad *et al.* 2020). این ژنوم شش قاب خواندنی باز (ORFs) شامل دو ژن V1 و V2 روی رشته ویروسی و چهار ژن C1 تا C4 روی رشته مکمل را رمزگذاری می‌کند (Marchant *et al.* 2020). ژن V1 پروتئین پوششی ویروس را که برای انتقال توسط حشرات ضروری است رمزگذاری می‌کند، در حالی که ژن V2 پروتئین حرکتی ویروس را رمزگذاری می‌کند. ژن C1 پروتئین مرتبط با همانندسازی، ژن C2 پروتئین فعال‌کننده رونویسی و سرکوبگر خاموشی RNA، ژن C3 پروتئین تقویت‌کننده همانندسازی، و ژن C4 پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که در ایجاد علائم بیماری و سرکوب خاموشی RNA نقش دارد (Prasad *et al.* 2020; Li *et al.* 2022).

با توجه به ساختار ژنومی TYLCV و اهمیت بررسی ویژگی‌های ژنتیکی آن، بهره‌گیری از ابزارهای تحلیلی برای مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط تبارزایی این ویروس نقش مهمی در درک روابط تکاملی و طبقه‌بندی آن ایفا می‌کند. از آنجا که ویروس‌های گیاهی تحت تاثیر عواملی چون جهش، وقوع نوترکیبی و فشار انتخابی معمولاً از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند، به‌کارگیری روش‌های ژنتیک جمعیت برای تحلیل این تنوع ضروری است (Rubio *et al.* 2020). تحلیل‌هایی مانند برآورد تنوع نوکلئوتیدی، شبکه هاپلو تیبی، ارزیابی فشار انتخابی و آزمون‌های بی‌طرفی مانند Fu, Tajima's D و Li's D در کنار تحلیل‌های تبارزایی و شناسایی نوترکیبی می‌توانند اطلاعات ارزشمندی درباره‌ی ساختار ژنتیکی، تاریخچه جمعیتی و سازوکارهای تکاملی جمعیت‌های ویروسی فراهم سازند (Martin *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2024).

با توجه به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی، سطح زیرکشت گسترده این محصول در مناطق مختلف کشور و خسارت چشمگیر ناشی از ابتلا به TYLCV در مزارع و گلخانه‌ها، پژوهش حاضر با هدف

ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*virus: ToMV*)، ویروس قهوه‌ای روگوز (*spotted wilt virus: TSWV*)، ویروس گوجه‌فرنگی (*Tomato brown rugose fruit virus: ToBRFV*) و ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus: TYLCV*) اشاره کرد (Panno *et al.* 2019; Ong *et al.* 2020; García-Estrada *et al.* 2022).

در این میان، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) به دلیل خسارت‌های گسترده، یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده تولید گوجه‌فرنگی در بسیاری از مناطق تولیدی جهان محسوب می‌شود. این ویروس به جنس *Begomovirus* از خانواده *Geminiviridae* تعلق دارد که توسط سفیدبالک، *Bemisia tabaci* (Gennadius 1889)، به صورت پایا و به روش گردشی-تکثیری منتقل می‌شود، بدین معنی که ویروس مذکور توانایی تکثیر در بدن ناقل را دارد (Kil *et al.* 2016). گزارش انتقال این ویروس در گوجه‌فرنگی با درصد کم توسط بدر نیز انجام شده است (Kil EuiJoon *et al.* 2016). TYLCV دارای دامنه میزبانی وسیعی در میان خانواده‌های مختلف گیاهی از جمله *Solanaceae*، *Malvaceae* و *Fbaceae* است و علاوه بر گیاهان زراعی بسیاری از گونه‌های علف‌های هرز و گیاهان زینتی را نیز آلوده می‌کند (Bananej 2016; Fidan *et al.* 2019). ویروس TYLCV بیشتر از مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی استان‌های مرکزی و جنوبی از جمله سیستان و بلوچستان، کرمان، یزد، خراسان رضوی، هرمزگان، فارس و خوزستان مشاهده و گسترش یافته است، با این حال، دامنه میزبانی آن محدود به گوجه‌فرنگی نیست و گزارش‌هایی از تاثیر این ویروس در برخی مزارع فلفل (*Capsicum anuum L.*)، خیار (*Cucumis sativus L.*)، یونجه زرد (*Melilotus officinalis L.*)، هویج (*Dacus sp.*)، شنبلیله (*Trigonella sp.*)، پنیرک (*Malva sp.*) ثبت شده است همچنین گیاهان زراعی از جمله فلفل قرمز، فلفل دلمه‌ای، لوبیا چشم بلبلی (*Phaseolus vulgaris L.*)، خیار و از علف‌های هرز، عروسک پشت‌پرده (*Physalis alkekenge L.*)، پنیرک (*Malva sylvestris L.*)، آفتاب پرست (*Heliotropis sp.*)، سلمه تره (*Chenopodium album L.*)، تاجریزی (*Solanum nigrum L.*) و سوروف (*Echinochloa crusgalli L.*) P.Beauv.) به عنوان میزبان‌های طبیعی این ویروس معرفی و ثبت شدند (Bananej, 2016).

نخستین بار این ویروس در دهه ۱۹۳۰ در فلسطین اشغالی شناسایی شد (Cohen & Harpaz 1964) و در ایران نیز برای نخستین بار از مناطق جنوبی کشور گزارش گردید (Hajimorad

۷۲ °C به مدت ۴۰ ثانیه، بسط نهایی در ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه. واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر مدل T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند و با استفاده از دستگاه Documentation مشاهده و اندازه قطعات با کمک نشانگر مولکولی مناسب تخمین زده شد.

#### تعیین توالی قطعات تکثیر شده

هشت محصول PCR نمونه‌های مثبت (چهار نمونه از اصفهان، دو نمونه از یزد و دو نمونه از ورامین)، به همراه آغازگر مستقیم و معکوس مربوطه (۵ پیکومول) در حجم ۳۰ میکرولیتر به شرکت زیست فناوری سینوهه ارسال گردید و توالی‌یابی دو طرفه انجام شد. توالی‌های حاصل در فرمت‌های Fasta و Text دریافت شدند. توالی‌های خام با استفاده از نرم‌افزار Chromas v2.6 بررسی و ویرایش شدند. برای تایید وجود ویروس و تعیین شباهت توالی‌ها با سایر جدایه‌های شناخته شده، آنالیز BLAST در پایگاه داده‌ی (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) NCBI /BLAST انجام گرفت.

#### تجزیه و تحلیل تبارزایی

جهت بررسی روابط تبارزایی و همچنین بررسی نوع نژاد جدایه‌های ردیابی شده بین TYLCV ایران و سایر جدایه‌های ثبت شده در جهان، توالی‌های ژن V1 با استفاده از نرم‌افزار MEGA (version. 11) هم‌ردیف شدند. درخت‌های تبارزایی بر اساس روش‌های Neighbor-Joining (NJ) و Maximum Likelihood (ML) با ۱۰۰۰ تکرار اعتبارسنجی در نرم‌افزار ۱۱ MEGA رسم شدند. تجزیه و تحلیل درخت تبارزایی با توجه به شکل درخت انجام شد. همچنین برای مقایسه درصد شباهت نوکلئوتیدی بین توالی‌ها از نرم‌افزار Sequence Demarcation Tool (SDT) نسخه ۱٫۲ استفاده شد. همچنین، برای بررسی بهتر ساختار روابط تبارزایی، تحلیل شبکه‌ای با استفاده از SplitsTree v4.17.1 و روش Neighbor-Net انجام شد. به منظور تعیین نوع سویه (نژاد) جدایه‌های جدید ردیابی شده درخت تبارزایی با استفاده از جدایه‌هایی از همه سویه‌ها شامل (TYLCV-Mld, TYLCV-IR, TYLCV-IL, TYLCV-Gez, ) (TYLCV-Ker, TYLCV-Bou, TYLCV-OM) رسم شد.

بررسی وقوع نوترکیبی در جدایه‌های ویروس

بررسی احتمال وقوع نوترکیبی در توالی‌های ناحیه ژن V1 با

بررسی تنوع ژنتیکی، تجزیه و تحلیل توالی قطعه ژنومی V1 رمز کننده پروتئین پوششی و شناسایی ویروس TYLCV در برخی مناطق عمده‌ی کشت گوجه‌فرنگی در مرکز و جنوب ایران طراحی و اجرا شد.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌برداری و ردیابی ویروس

در اواخر تابستان ۱۴۰۲، از مزارع و گلخانه‌های کشت گوجه‌فرنگی در برخی مناطق استان‌های اصفهان (تیران، کرون، دهاقان)، یزد (یزد) و ورامین بر اساس علائم توصیف شده ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی نمونه‌برداری صورت گرفت. تعداد ۲۸ نمونه گیاهی مشکوک به علائم ویروسی شامل پیچیدگی، بدشکلی، زردی برگ و کوتولگی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. بخشی از نمونه‌ها در فریزر ۸۰- برای استفاده‌های بعدی ذخیره گردید و بخش دیگر برای استخراج DNA استفاده شد.

##### شناسایی مولکولی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی

استخراج DNA از نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از روش Gambino et al. 2008 با اندکی تغییرات انجام گرفت. رسوب DNA در ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل و برای نگهداری کوتاه‌مدت در دمای ۲۰- C برای نگهداری بلندمدت در دمای ۸۰- C ذخیره گردید. برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد. ردیابی ویروس TYLCV از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه ژن V1 رمز کننده‌ی پروتئین پوششی (CP) انجام شد. (Forward: CGCCCGTC TCGAAGGTTTC, Reverse: ) (GCCATATAACAATAACA AGGC). این آغازگرها قطعه‌ای حدود ۶۷۰ جفت باز را تکثیر می‌کنند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر شامل اجزای زیر انجام شد: ۶/۲۵ میکرولیتر Master Mix 2X، ۲ میکرولیتر از آغازگرهای مستقیم و معکوس (۱۰ پیکومول)، ۲/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده (۵۰۰ نانوگرم)، و ۱/۷۵ میکرولیتر آب دیونیزه. شرایط دمایی واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل: واسرشته‌سازی در ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در

برای بررسی تعیین روابط تبارزایی میان هاپلوتیپ‌ها، از تحلیل شبکه هاپلوتیپی استفاده شد. فایل حاصل از هم‌ردیف‌سازی به فرمت NEXUS به نرم‌افزار PopART v1.7 وارد گردید. برای ساخت شبکه، از الگوریتم TCS (Templeton, Crandall and Sing) استفاده شد که بر مبنای حداکثر احتمال اتصال هاپلوتیپ‌ها با حداقل تعداد جهش طراحی شده است. هاپلوتیپ‌های شناسایی‌شده و تعداد جهش‌های بین آن‌ها برای رسم شبکه به کار گرفته شدند و فراوانی هر هاپلوتیپ بر اساس تعداد جدایه‌های مربوطه محاسبه گردید. خروجی‌های گرافیکی در نرم‌افزار گرافیکی (مانند Adobe Illustrator) آماده شد.

### نتایج و بحث

بر اساس بررسی‌های ظاهری انجام‌شده روی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف و تصویرهای ارائه‌شده، علائم تبییک مربوط به آلودگی به ویروس *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) به وضوح قابل مشاهده بود (شکل ۱). بوته‌های گوجه‌فرنگی که در مراحل اولیه رشد به این بیماری آلوده شده بودند، کوتوله مانده و اندازه آن‌ها به شدت کاهش یافته بود. برگ‌هایی که بلافاصله پس از آلودگی توسعه یافتند، فنجان‌ی شکل شده و لبه آن‌ها به طرف پایین برگ‌گشته بود. اما برگ‌هایی که بعداً به وجود آمدند، کوچک مانده، بدشکل و زرد بودند و لبه آن‌ها به طرف بالا برگ‌گشته بود، که همه از علائم مشاهده شده در نمونه‌های جمع‌آوری شده است (شکل ۱). این علائم شامل زردی بین رگ‌برگی، پیچیدگی شدید برگ‌ها به‌ویژه برگ‌های فوقانی، کوتولگی شدید گیاه، ضخیم شدن برگ‌ها، چروکیدگی و در برخی موارد سقط گل‌ها یا خوشه‌های گل‌دهی ناقص بود. شدت علائم در نمونه‌های مختلف متفاوت بود، به طوری که برخی برگ‌ها علائم خفیف تا متوسط نشان دادند (مانند برگ‌های دارای پیچیدگی یا زردی محدود)، در حالی که در برخی دیگر علائم به‌شدت توسعه یافته بود (شکل ۱). همچنین برخی نمونه‌ها نشان‌دهنده علائم متنوع و متفاوتی بودند که می‌تواند ناشی از آلودگی هم‌زمان به بیش از یک نژاد یا سویه ویروسی و یا حتی سایر ویروس‌های باشد. این علائم در تطابق کامل با گزارش‌های پیشین از آلودگی TYLCV در مناطق مدیترانه‌ای و نیمه‌گرمسیری است (Navot et al. 1991; Hanson et al. 2000; Prasad et al. 2020). به طور کلی، یافته‌های ظاهری، پیش‌زمینه مناسبی برای تأیید مولکولی حضور ویروس و بررسی بیشتر ساختار ژنتیکی آن در جمعیت‌های مختلف فراهم می‌آورد.

استفاده از نرم‌افزار RDP4 (version 4.8) و به‌کارگیری چندین الگوریتم مختلف شامل RDP، GENECONV، Bootscan، MaxChi، Chimaera، SiScan و Seq3 انجام گرفت. رویدادهای نوترکیبی با مقدار  $p$ -value کمتر از ۰/۰۵ و تأیید توسط حداقل سه روش مختلف در نظر گرفته شدند.

### آنالیز جمعیت و مقایسه با سایر جدایه‌های دنیا

جهت بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی جدایه‌های مورد مطالعه، نرم‌افزار DnaSP (version 6.10.01) مورد استفاده قرار گرفت. شاخص‌های آماری شامل میزان تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ )، تعداد هاپلوتیپ‌ها ( $h$ )، میزان تنوع هاپلوتیپی ( $Hd$ )، تعداد جایگاه‌های چندریخت ( $S$ ) و آزمون‌های خنثی بودن مانند آزمون Tajima's D و آزمون Fu and Li's D و  $F$  برای داده‌ها محاسبه شدند. برای بررسی اینکه آیا جمعیت‌های ویروس تحت تأثیر انتخاب طبیعی یا تغییرات جمعیتی (نظیر انبساط یا گلوگاه ژنتیکی) قرار داشته‌اند، آزمون‌های بی‌طرفی شامل آزمون Tajima's D و آزمون Fu and Li's D و  $F$  مورد استفاده قرار گرفتند. در کنار این موارد، الگوی توزیع فرکانس جفت‌پایه‌های تفاوت (Mismatch Distribution) برای بررسی وجود انبساط اخیر جمعیتی رسم گردید. این تحلیل نیز با استفاده از DnaSP انجام شد.

### تحلیل فشار انتخابی (Selection Pressure Analysis)

برای شناسایی جایگاه‌های نوکلئوتیدی تحت فشار انتخاب مثبت یا منفی در ژن V1 ویروس TYLCV، ابتدا توالی‌های رمزکننده پروتئین پوششی هم‌ردیف‌سازی و به فرمت NEXUS ذخیره شدند. سپس فایل‌ها در بستر آنالیز Datamonkey Adaptive (https://datamonkey.org) بارگذاری شدند. سه روش اصلی برای این منظور استفاده شد: SLAC (Single-Likelihood Ancestor Counting)، FEL (Fixed Effects Likelihood) و MEME (Mixed Effects Model of Evolution). مدل جایگزینی نوکلئوتیدی به‌صورت خودکار توسط ابزار Model Selection در Datamonkey انتخاب شد. مقادیر  $dN/dS$  ( $\omega$ ) برای هر کدون محاسبه شد و جایگاه‌هایی با مقدار  $\omega > 1$  و  $p < 0.1$  به‌عنوان تحت فشار انتخاب مثبت در نظر گرفته شدند. این نتایج به‌صورت جدول و نمودار برای تحلیل‌های بعدی ذخیره شدند.

### تحلیل شبکه هاپلوتیپی

## واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

نتایج واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن رمز کننده پروتئین پوششی ویروس TYLCV، منجر به تکثیر DNA به طول تقریبی ۶۷۰ جفت‌باز در هشت نمونه از بین نمونه‌های بررسی شده بود. در حالیکه در سایر نمونه‌های که حتی دارای علائم مشکوک ویروسی بودند باند DNA تکثیر نشد. همچنین با توجه به استفاده از گیاهان سالم و فاقد علائم به عنوان شاهد منفی در این نمونه‌ها نیز باندی تکثیر

نشد با این حال یک نوار DNA واضح در چاهک مربوط به کنترل مثبت مشاهده شد که صحت واکنش را تأیید می‌نماید. همچنین در کنترل منفی (آب مقطر) هیچ بانندی تولید نکرد که نشان‌دهنده عدم آلودگی و صحت اجرای واکنش است. این نتایج مولکولی کاملاً با علائم ظاهری مشاهده شده در نمونه‌های جمع‌آوری شده هم‌راستا بود و حضور TYLCV را در گیاهان دارای علائم تأیید نمود.



شکل ۱. علائم آلودگی گوجه‌فرنگی به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی. علائم مشاهده شده در گیاهان آلوده شامل پیچیدگی و زردی برگ‌ها، تغییر شکل برگ و کاهش فاصل میانگره‌ها در انتهای بوته می‌باشد.

**Figure 1.** Symptoms of tomato infection by *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Symptoms include leaf curling, yellowing, leaf deformation, and reduced internode at the apical parts of the plant.

که با بهره‌گیری از مدل تعویض نوکلئوتیدی مناسب در نرم‌افزار MEGA11 ترسیم گردید. نتایج حاصل نشان داد که هفت جدایه ایرانی شناسایی شده با نام‌های TY1 تا TY7 (PV579127- تا PV579121) در خوشه‌های (شاخه‌های) مختلفی قرار گرفته و در برخی موارد شباهت نزدیکی با جدایه‌های مناطق جغرافیایی خاصی از خاورمیانه و آفریقا نشان دادند. جدایه‌های PV579121، PV579122 و PV579123 در یک خوشه تبارزایی نزدیک به هم قرار گرفته و قرابت ژنتیکی بالایی با جدایه‌های ثبت شده از کشورهای عراق، عمان و سوریه نشان دادند (شکل ۲). این سه جدایه با شباهت بیش از ۹۸٪ در سطح توالی نوکلئوتیدی، احتمالاً نمایانگر یک منشأ مشترک منطقه‌ای هستند که می‌تواند ناشی از تبادل بذری، گیاهان آلوده یا انتقال طبیعی توسط ناقلین

بررسی روابط تکاملی و درخت تبارزایی ترسیم شده برای بررسی جایگاه جدایه‌های ردیابی شده در این تحقیق در بین نژادهای مختلف گزارش شده از ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی و تعیین روابط تکاملی و میزان قرابت ژنتیکی جدایه‌های ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی که در این مطالعه از نواحی مختلف ایران جداسازی و تعیین توالی شدند، از تجزیه و تحلیل تبارزایی بر پایه توالی کامل ژن V1 که رمزکننده پروتئین پوششی (coat protein gene; CP) است استفاده شد. درخت تبارزایی رسم شده با روش Neighbor Joining و Maximum Likelihood از نظر توپولوژی (شکل درخت و محل قرار گرفتن شاخه‌ها) تفاوتی نداشتند و به همین دلیل درخت رسم شده با روش NJ در این تحقیق ارائه شده است (شکل ۲)

مانند سفیدبالک‌ها باشد. در مقابل، جدایه‌های PV579124 و PV579125 در یک شاخه متفاوت قرار گرفتند و بیشترین شباهت را با جدایه‌هایی از عربستان سعودی و یمن داشتند. این دو جدایه نیز شباهت بالایی (بیش از ۹۷٪) با یکدیگر دارند ولی از نظر تبارزایی با جدایه‌های TY1 تا TY3 فاصله دارند (شکل ۲). این نتایج حاکی از آن است که این دو جدایه ممکن است از مسیرهای اپیدمیولوژیک متفاوتی به کشور وارد شده باشند یا اینکه در شرایط اقلیمی خاصی دچار تمایز ژنتیکی شده‌اند. از سوی دیگر، جدایه‌های TY6 و TY7 (PV579126 و PV579127) در یک شاخه مستقل و نسبتاً دورتر از سایر جدایه‌های ایرانی خوشه‌بندی شدند و بیشترین نزدیکی ژنتیکی را با جدایه‌هایی از سودان، اریتره و مصر نشان دادند (شکل ۲). این موضوع نشان‌دهنده منشأ متفاوت این دو جدایه و یا وقوع تغییرات ژنتیکی بیشتر در آن‌ها در مقایسه با سایر جدایه‌های حاضر در کشور است. در مجموع، درخت تبارزایی بیانگر آن است که جدایه‌های TYLCV شناسایی شده در ایران دارای تنوع ژنتیکی قابل توجهی هستند و منشأهای مختلف جغرافیایی و اپیدمیولوژیک برای آن‌ها محتمل است. این تنوع به‌ویژه در نواحی جنوبی و مرکزی کشور که شرایط مساعدتری برای فعالیت ناقل و گسترش ویروس وجود دارد، بیشتر مشاهده شد.

به‌منظور بررسی روابط تبارزایی میان جدایه‌های ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی، درخت شبکه‌ای تبارزایی با استفاده از نرم‌افزار SplitsTree4 و الگوریتم Neighbor-Net بر پایه توالی ژن V1 ترسیم شد (شکل ۳). این روش، برخلاف درخت‌های تبارزایی سنتی، امکان نمایش هم‌زمان چندین فرضیه تکاملی را فراهم می‌کند و برای شناسایی سیگنال‌های نوترکیبی، ناسازگاری‌های تبارزایی، و پیچیدگی‌های ساختار جمعیت ویروسی بسیار مناسب است. در این آنالیز، جدایه‌های جدید به‌دست‌آمده در این تحقیق (TY1 تا TY7) با رس شماره‌های PV579121 تا PV579127 به همراه مجموعه‌ای از جدایه‌های مرجع موجود در GenBank مورد مقایسه قرار گرفتند (شکل ۳). همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، همه جدایه‌های جدید در یک خوشه متراکم و مجزا قرار دارند که حاکی از خویشاوندی نزدیک و تنوع ژنتیکی پایین درون‌گروهی آن‌هاست. این خوشه در نزدیکی جدایه‌هایی از کشورهای منطقه مدیترانه و خاورمیانه با رس شماره‌های KT990215، MF429939، و GU076454 جای گرفته که نشان‌دهنده قرابت ژنتیکی با این جدایه‌ها می‌باشد (شکل ۳). در مقابل، جدایه‌هایی مانند NC\_004044

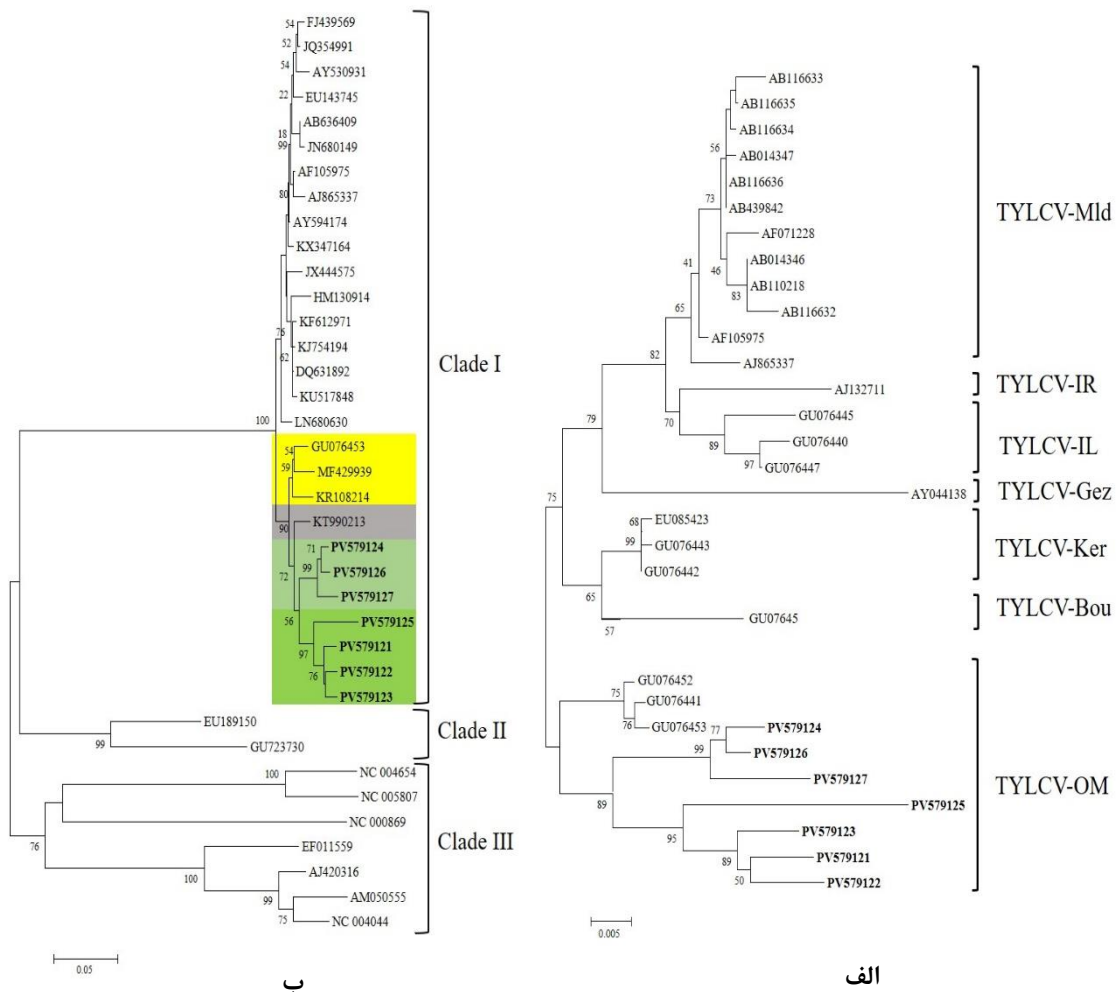
جدایه‌های PV579121 تا PV579127 در گروه نژادهای TYLCV-OM شامل سه زیرگروه با مقادیر بالای بوت‌استرپ دسته‌بندی شدند که بیانگر نزدیکی ژنتیکی بالای آن‌هاست. جدایه‌های PV579124 و PV579126 همراه با جدایه GU076453 در یک زیرخوشه با مقدار بوت‌استرپ ۷۷ قرار گرفتند. جدایه‌های PV579127 و PV579125 نیز زیرخوشه مجزایی را با حمایت ۸۹٪ تشکیل دادند. همچنین، جدایه‌های PV579123، PV579121 و PV579122 در یک زیرگروه با مقدار بوت‌استرپ ۹۵ طبقه‌بندی شدند، اگرچه PV579121 و PV579122 در درون این گروه، تفاوت‌های بیشتری نشان دادند. این نتایج بیانگر آن است که جدایه‌های تازه ردیابی شده در این تحقیق به احتمال زیاد متعلق به یک استرین ناحیه‌ای متمایز از TYLCV تحت عنوان TYLCV-OM هستند که منشأ تکاملی مشترک و تنوع ژنتیکی محدودی در درون این گروه دارند. جداسازی مشخص این خوشه از سایر استرین‌ها، فرضیه‌ی تعلق این جدایه‌ها به یک نژاد ژنتیکی مستقل و احتمالاً سازگار با شرایط محیطی یا گیاهان میزبان خاص منطقه مورد مطالعه را تقویت می‌کند.

#### آزمون‌های جمعیتی

تحلیل پارامترهای ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار DnaSP (Rozas *et al.* 2017) نشان داد که هر سه شاخه مورد بررسی Clade1، Clade2 و Clade3 دارای تنوع هاپلوتیپی بالا ( $Hd = 1$ ) بوده و فاقد هرگونه هاپلوتیپ مشترک بین جدایه‌ها بودند (جدول ۱). بیشترین تعداد جایگاه‌های پلی‌مورفیک ( $S = 282$ ) و تفاوت‌های نوکلئوتیدی ( $\eta = 385$ ) در Clade3 مشاهده شد (جدول ۱). این شاخه همچنین دارای بیشترین میزان تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi = 0.22463$ ) و میانگین تفاوت جفتی ( $k = 143.76$ ) در میان سه شاخه بود که بیانگر تنوع ژنتیکی بسیار بالای آن است. در مقابل، Clade2 با تنها ۲ جدایه و مقادیر نسبتاً پایین‌تر از لحاظ شاخص‌های  $\pi$  و  $k$  نیز  $dN/dS$  بالایی ( $\omega =$

شاخه بررسی شوند.

4.701) نشان داد که می‌تواند ناشی از انتخاب مثبت قوی بر جایگاه‌های رمزکننده باشد، هر چند به منظور حصول نتیجه و تحلیل واقعی تر بهتر است تعداد جدایه‌های بیشتری در این



**شکل ۲.** تجزیه و تحلیل تبارزایی جدایه‌های ویروس پپچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن V1. الف) تعیین استرین جدایه‌های ردیابی شده بر اساس توالی‌های استرین‌های مختلف در نرم افزار MEGA11 با روش Maximum Likelihood و مدل GTR+G4. ب) تعیین جایگاه تبارزایی براساس روش Neighbor-Joining که در نرم افزار Mega 11 بازسازی شده است. درجه اطمینان بیش از ۵۰ درصد در بالای شاخه‌ها نمایش داده شده و جدایه‌های ایرانی ردیابی شده در تحقیق بصورت پر رنگ مشخص شده‌اند

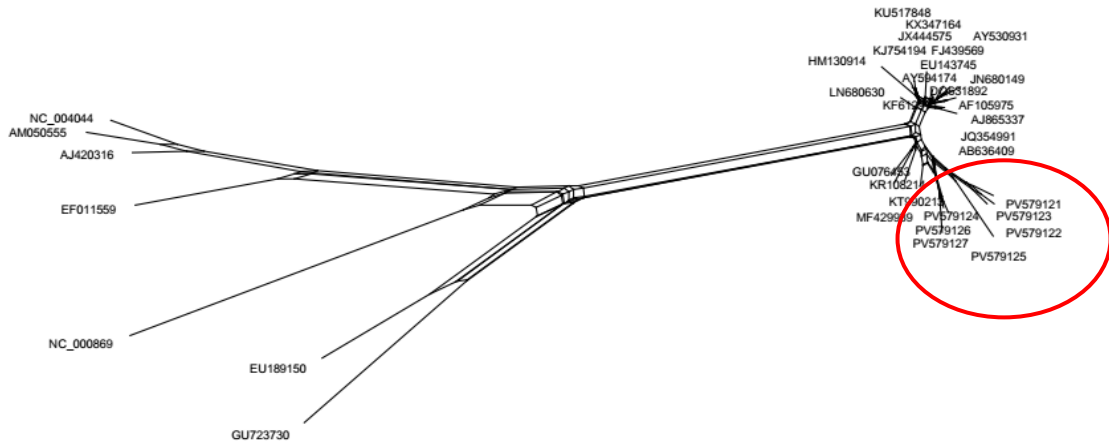
**Figure 2.** Phylogenetic analysis of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) isolates based on the nucleotide sequence of the V1 gene. **a)** Strain classification of the detected isolates was performed by comparing their sequences with known reference strains using the Maximum Likelihood method and the GTR+G4 model in MEGA11. **b)** Phylogenetic relationships were reconstructed using the Neighbor-Joining method implemented in MEGA11. Bootstrap values greater than 50% are shown above the branches, and the Iranian isolates identified in this study are highlighted in bold.

ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مقایسه بین Clade 1 و Clade 2 حاکی از تمایز معنی‌دار ژنتیکی با  $Kst = 0.31$  و  $Fst = 0.642$  بود (P < 0.01)، که با مقدار بالای Snn (۱,۰۰۰) و Z نیز تأیید شد (جدول ۲). مقایسه Clade 1 و Clade 3 نیز اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $Kst = 0.34$ ,  $Snn = 0.928$ ,  $Fst = 0.482$ ; P < 0.001) (جدول ۲ و ۳، شکل ۴ و ۵). در مقابل، اختلاف ژنتیکی

نسبت جایگزینی‌های غیرهم‌معنی به هم‌معنی (0) در تمامی شاخه‌ها بزرگ‌تر از ۱ بود، از ۱/۵۸ در Clade 1 تا ۴/۷۰ در Clade 2 که نشان‌دهنده حضور انتخاب مثبت در سیر تکاملی ویروس TYLCV در تمامی جمعیت‌های بررسی شده است. به‌منظور بررسی تمایز ژنتیکی بین سه شاخه شناسایی شده از جدایه‌های TYLCV، شاخص‌های  $Fst$  و  $Snn$ ،  $Z$ ،  $Ks$ ،  $Kd$ ،  $Ka$  و  $Kp$  مورد

معنی‌دار نبودند ( $P > 0.10$ )، (جدول ۴)، اما می‌توانند به‌طور بالقوه نشان‌دهنده حذف انتخابی یا رشد اخیر جمعیت باشند. نتایج آزمون  $F_{st}$  و Tajima's D و  $F_{st}$  و Li's  $D^*$  برای خوشه‌های ۱ و ۳ مقادیر منفی ولی غیر معنادار را نشان دادند (جدول ۳)، که می‌تواند بیانگر یک گسترش اخیر جمعیت یا انتخاب تصفیه‌ای ضعیف باشد. مقادیر  $F_{st}$  بین خوشه‌ها قابل توجه بودند (به‌ویژه بین Clade 1 و Clade 2 برابر ۰/۶۴۲)، که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بالا میان جمعیت‌هاست. مقدار شاخص  $S_{nn}$  نیز در اغلب مقایسه‌ها بالا و معنادار بود، که نشان‌دهنده ساختار جمعیتی مجزا در بین خوشه‌ها است.

بین Clade 2 و Clade 3 از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $K_{st} =$  نسبی ۰/۱۳،  $F_{st} = 0.309$ ;  $P < 0.05$ )، که نشان‌دهنده نزدیکی نسبی این دو شاخه از نظر ساختار ژنتیکی می‌باشد. به‌طور کلی، بالاترین تمایز ژنتیکی بین شاخه‌های ۱ و ۲ مشاهده شد. به‌منظور بررسی سیگنال‌های احتمالی انتخاب طبیعی یا رشد جمعیت در شاخه‌های TYLCV، شاخص تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ ) و آزمون‌های خنثی بودن محاسبه شدند. شاخه ۱ دارای  $\pi$  نسبتاً پایین‌تری (۰/۰۴۰۴۷) نسبت به شاخه ۳ (۰/۲۲۴۶۳) بود که نشان‌دهنده تنوع نوکلئوتیدی کمتر در این شاخه است (جدول ۲، شکل ۳). مقادیر منفی Tajima's D برای هر دو شاخه (به ترتیب -۱/۳۰ و -۰/۵۰) مشاهده شد که اگرچه از نظر آماری

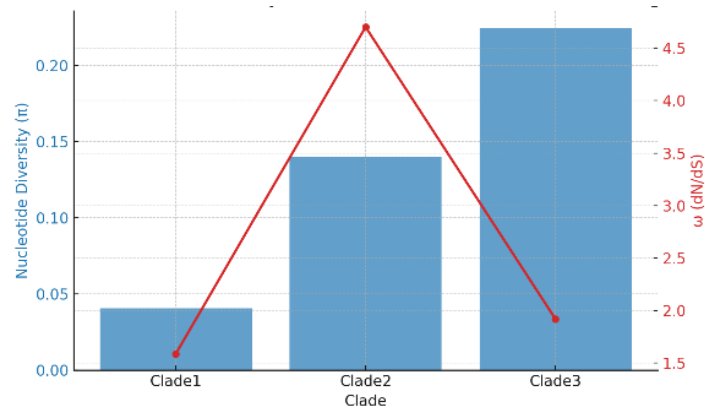


شکل ۳. تحلیل شبکه‌ای Splits از توالی ژن V1 جدایه‌های ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) از مناطق جغرافیایی مختلف. جدایه‌های ایرانی با دایره قرمز رنگ مشخص شده‌اند. این شبکه با استفاده از نرم‌افزار SplitsTree به‌منظور بررسی روابط تکاملی و ساختار ژنتیکی پیچیده بین جدایه‌ها بازسازی شده است.

**Figure 3.** Splits network analysis based on the V1 gene sequences of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) isolates from different geographic regions. Iranian isolates are indicated by red circles. The network was reconstructed using SplitsTree to investigate the evolutionary relationships and complex genetic structure among the isolate.

یا تحت تأثیر فشارهای انتخاب طبیعی یا فرآیندهای نوترکیبی باشد. در مقابل، نواحی ابتدای توالی (تقریباً از ۰ تا ۱۰۰) دارای کمترین مقادیر  $\pi$  بوده‌اند (شکل ۶ و ۷)، که ممکن است نشان‌دهنده ثبات ژنتیکی بیشتر یا انتخاب پایدار در این نواحی باشد (شکل ۷). تغییرات مشاهده‌شده در مقادیر  $\pi$  حاکی از ناهمگنی در الگوی تنوع ژنتیکی در این توالی بوده و می‌تواند به‌عنوان مبنایی برای شناسایی جایگاه‌های ژنی مهم و مناطق هدف مطالعات عملکردی یا تکاملی قرار گیرد.

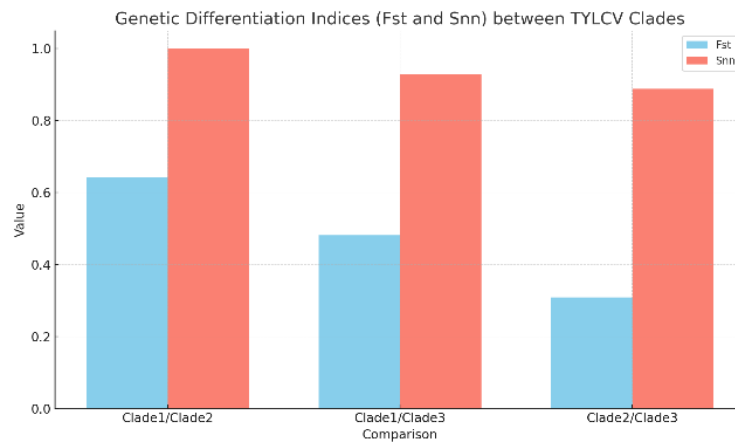
تحلیل شاخص تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ ) در طول توالی مورد بررسی نشان‌داد که میزان تنوع بین جایگاه‌های مختلف نوکلئوتیدی متغیر است. همان‌گونه که در نمودار دیده می‌شود، مقدار  $\pi$  در بازه‌ای بین تقریباً ۰/۱۰ تا حدود ۰/۲۵ نوسان دارد و این شاخص در قالب بازه‌های متحرک (Sliding windows) در طول توالی محاسبه شده است. بیشترین میزان تنوع در موقعیت‌هایی در حدود ۴۰۰ تا ۵۰۰ نوکلئوتیدی مشاهده می‌شود (شکل ۶)، که می‌تواند بیانگر نواحی با نرخ بالاتر جهش



شکل ۴. مقایسه تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ ) و فشار انتخابی (dN/dS) بین شاخه‌های مختلف ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV).  
**Figure 4.** Comparison of nucleotide diversity ( $\pi$ ) and selection pressure (dN/dS) among different clades of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV).

موقعیت‌های حدود ۱۳۰، ۱۸۰ و ۲۲۰ میزان dN-dS به طور قابل توجهی منفی بود که نشان‌دهنده حذف جهش‌های زیان‌بار در این مناطق محافظت‌شده است. تنها تعداد اندکی از جایگاه‌ها دارای مقدار مثبت اندک بودند که می‌تواند ناشی از فشار انتخابی مثبت ضعیف یا تغییرات تصادفی باشد.

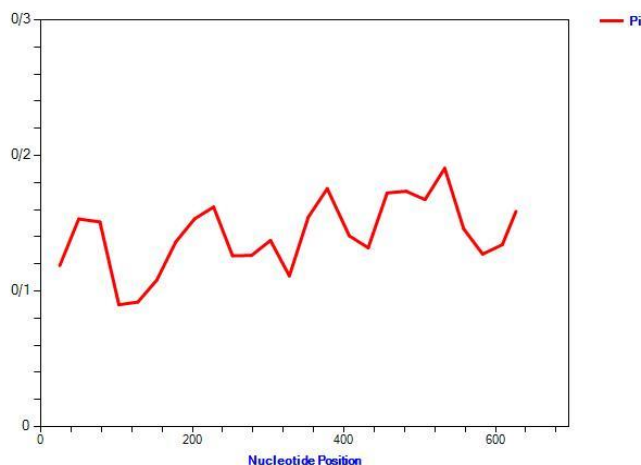
برای بررسی فشار انتخابی در توالی‌های ژن V1 ویروس TYLCV، میزان تفاوت جایگاه‌های غیرهم‌معنی (dN) و هم‌معنی (dS) در هر سایت آمینواسیدی محاسبه شد. نمودار به‌دست‌آمده نشان داد که بیشتر جایگاه‌ها دارای مقادیر منفی (dN-dS) هستند که بیانگر غالب بودن فشار انتخابی منفی (purifying selection) در این ژن است. به‌ویژه در برخی از نواحی مانند



شکل ۵. مقایسه تمایز ژنتیکی ( $F_{ST}$ ,  $S_{nn}$ ) بین شاخه‌های مختلف ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی.  
**Figure 5.** Comparison of genetic differentiation ( $F_{ST}$ ,  $S_{nn}$ ) among different clades of TYLCV.

دارند و این امر با سطح معناداری  $p \leq 0.1$  تایید شد (جدول ۴). این سایت‌ها نرخ‌های بالای تغییرات غیرهم‌سان در بخشی از شاخه‌ها در فیلوژنی نشان دادند که به وقوع رویدادهای انتخاب مثبت خاص در خط مشی‌های خاص دلالت دارد.

تحلیل MEME نشان داد که اکثر موقعیت‌های کدونی در ویروس TYLCV تحت انتخاب منفی (تصفیه‌ای) قوی قرار دارند. با این حال، شش موقعیت کدونی (کدون‌های ۲۲، ۲۳، ۲۵، ۴۴، ۶۷ و ۸۹) شناسایی شدند که تحت انتخاب مثبت اپیزودیک قرار

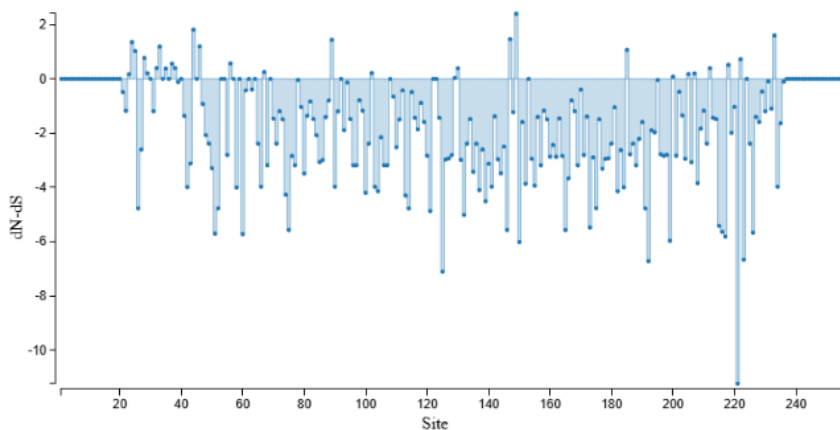


شکل ۶. نتایج بررسی تنوع نوکلئوتیدی در ژن V1 در جمعیت‌های ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی. Pi نشان دهنده تنوع نوکلئوتیدی است.

**Figure 6.** The result of polymorphism trend along the coat protein genes in TYLCV populations, Pi stands for nucleotide diversity.

با پویایی تکاملی ویروس‌های بگومو (Bemogo) که به وسیله تعاملات میزبان و ویروس و سازگاری‌های محلی هدایت می‌شود، همخوانی دارند.

این نتایج نشان می‌دهند که اگرچه ژن V1 ویروس TYLCV عمدتاً حفظ شده است، اما برخی از موقعیت‌های کدونی تحت تاثیر انتخاب مثبت اپیزودیک قرار گرفته‌اند و این رویدادها در شاخه‌های خاصی از درخت تکاملی اتفاق افتاده‌اند. این مشاهدات



شکل ۷. نمودار سایت‌های کدونی حاصل از تحلیل SLAC برای شناسایی کدون‌های تحت فشار انتخابی مثبت و منفی در ژن V1 (پروتئین پوششی) ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی.

**Figure 7.** SLAC site graph for identifying positively and negatively selected codons/sites in the V1 gene (coat protein) of Tomato yellow leaf curl virus.

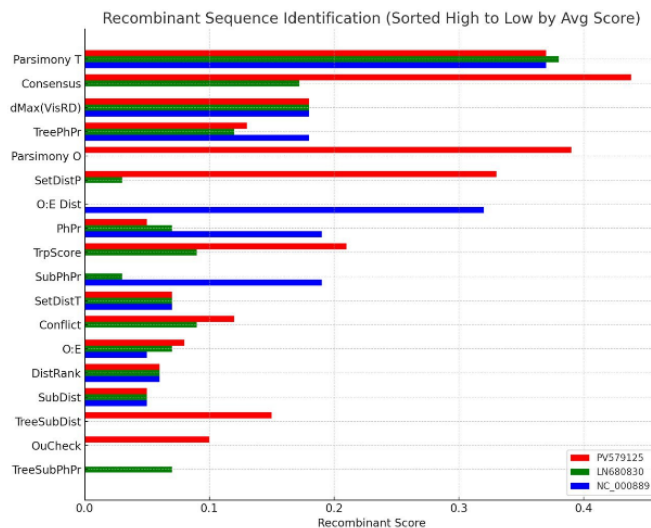
PV579125 به عنوان جدایه نوترکیب شناسایی شد که والد اصلی این آن جدایه LN680630 است. این نتایج با یافته‌های SplitsTree هم‌راستا بود و شاخه‌های غیرخطی در مرکز درخت نیز آن را تأیید می‌کند. نتایج حاصل از تحلیل نوترکیبی نشان می‌دهد که توالی PV579125 با کسب بالاترین امتیاز در معیارهایی همچون Consensus, Parsimony O, و SetDistP،

تحلیل نوترکیبی

آنالیز نوترکیبی با نرم‌افزار RDP4 نشان داد که سه رویداد نوترکیبی مستقل در میان جدایه‌ها رخ داده است. جدایه ایرانی PV579125 نیز در یکی از این رویدادها شرکت داشته‌اند (شکل ۸)، که نشان‌دهنده نقش این جمعیت در فرآیند نوترکیبی ویروس می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده نوترکیبی جدایه

سه توالی امتیاز نسبتاً بالایی دارند که نشان‌دهنده پیچیدگی تبارزایی ساختار آن‌هاست، اما در مجموع، PV579125 در ترکیب سایر شاخص‌ها نیز عملکردی متمایز دارد.

به‌طور برجسته‌ای به عنوان یک توالی نو ترکیب شناخته می‌شود. این توالی، با امتیاز ۰/۴۳۸ در معیار Consensus که نماینده اجماع کلی روش‌های مختلف تحلیل است، بالاتر از سایر توالی‌ها قرار گرفته است (شکل ۸). همچنین در معیار Parsimony T، هر

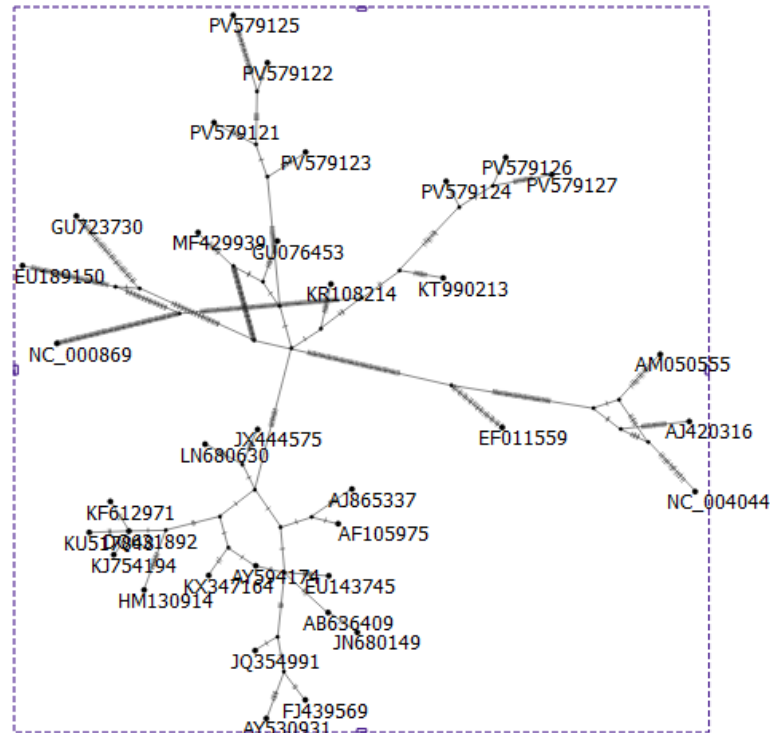


شکل ۸. شناسایی توالی‌های نو ترکیب بر اساس امتیازهای مختلف محاسبه‌شده توسط شاخص‌های گوناگون در نرم‌افزار RDP4. نمودار میله‌ای میانگین امتیاز نو ترکیبی را برای سه توالی PV579125، LN680830، و NC\_000889 بر اساس شاخص‌های مختلف نشان می‌دهد. توالی‌ها با رنگ‌های قرمز، سبز و آبی نمایش داده شده‌اند.

**Figure 8.** Recombinant sequence identification based on various scoring metrics computed in RDP4. The bar chart presents the average recombinant scores for three sequences (PV579125, LN680830, and NC\_000889) across different detection criteria. Sequences are represented in red, green, and blue, respectively.

در این مطالعه، بخش رمز کننده ژن V1 ویروس *Tomato yellow leaf curl virus* (رمز گذاری شده با پیشوند PV) تعیین توالی شد. این جدایه‌ها شامل PV579121، PV579122، PV579123 (از اصفهان)، PV579124 (از دهقان)، PV579125 (از ورامین)، و PV579126 و PV579127 (از یزد) بودند. پس از هم‌تراز سازی چند تایی با استفاده از الگوریتم ClustalW، توالی‌ها در فرمت مناسب وارد نرم‌افزار PopART شدند. تحلیل شبکه هم‌تبارنمایی هاپلوتیپ‌ها با استفاده از الگوریتم Median-Joining، بر پایه تنوع ژن V1 تولید شد (شکل ۹). در این شبکه، گره‌ها نشان‌دهنده هاپلوتیپ‌های منحصر به فرد هستند و خطوط بین آن‌ها معرف تفاوت‌های نوکلئوتیدی می‌باشند. اندازه هر گره متناسب با تعداد توالی‌های منطبق با آن هاپلوتیپ بوده و گره‌های غیر شماره‌دار به عنوان هاپلوتیپ‌های فرضی در مسیرهای تکاملی نقش دارند. جدایه‌های ایرانی به‌طور عمده در دو خوشه نسبتاً مجزا و نزدیک به یکدیگر در بخش فوقانی شبکه قرار گرفتند. خوشه اول شامل جدایه‌های

استان‌های اصفهان و شهرستان ورامین منشأ گرفته‌اند. خوشه دوم شامل PV579124، PV579126 و PV579127 بوده و به ترتیب از مناطق دهقان و یزد جداسازی شده‌اند. نزدیکی توپولوژیکی این دو خوشه حاکی از شباهت ژنتیکی بالا میان آن‌هاست، با این حال فاصله‌ها و تفکیک خوشه‌ای، وجود تفاوت‌های نوکلئوتیدی مشخصی را میان زیر جمعیت‌ها نشان می‌دهد. در ارزیابی روابط ژنتیکی با جدایه‌های خارجی جدایه‌های ایرانی بیشترین ارتباط ژنتیکی را با جدایه‌های KR108214، KT990213، GU076453 و MF429930 از کشورهای آسیای جنوبی و خاورمیانه داشتند. این جدایه‌ها عمدتاً در نواحی مرکزی شبکه قرار گرفته‌اند و به عنوان گره‌های بینابینی در اتصال هاپلوتیپ‌های ایرانی به خوشه‌های دیگر ایفای نقش می‌کنند. فاصله کم خطوط میان این گره‌ها و خوشه‌های ایرانی نشان‌دهنده اشتراکات نوکلئوتیدی در ژن V1 است.



شکل ۹. تحلیل شبکه‌ای تبارزایی از توالی ژن V1 ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) با استفاده از نرم‌افزار PopART. این شبکه به منظور بررسی روابط ژنتیکی و الگوهای تکاملی بین جدایه‌های مختلف TYLCV بازسازی شده است و می‌تواند بیانگر ساختار جمعیتی و رویدادهای احتمالی نوترکیبی باشد.

**Figure 9.** Phylogenetic network analysis of the V1 gene sequences of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) using PopART software. The network was reconstructed to visualize genetic relationships and evolutionary patterns among TYLCV isolates, potentially reflecting population structure and recombination events.

جدول ۱. داده‌های مربوط به پارامترهای جمعیتی در جمعیت‌های مختلف TYLCV مبتنی بر ژن V1.

**Table 1.** Data on population parameters of different TYLCV populations based on the V1 gene.

Comparisons	Ks	Kst	P-value	Z*	P-value Z*	Snn	P-value	Fst
Clade1(n=28)/clade2(n=2)	29.67	0.31	0.001	4.94	0.000	1.000	0.004	0.642
Clade1(n=28)/Clade3(n=7)	48.937	0.34	0.00	5.18	0.000	0.928	0.0000	0.482
Clade2(n=2)/Clade3(n=7)	131.14	0.13	0.1630 <sup>ns</sup>	2.63	0.3200 <sup>ns</sup>	0.888	0.066 <sup>ns</sup>	0.309

جدایه‌های مرجع کلاسیک از جمله NC\_000869 (فلسطین اشغالی)، NC\_004044 (مصر) و EF011559 (اسپانیا) در موقعیت‌های پیرامونی و دورافتاده‌تر شبکه قرار گرفته‌اند. این موقعیت حاکی از فاصله ژنتیکی قابل توجه میان این جدایه‌ها و جدایه‌های حاضر در ایران می‌باشد. مسیرهای متعددی برای اتصال این جدایه‌ها به خوشه‌های ایرانی مشاهده شد که اغلب از طریق گره‌های میانی فرضی عبور کرده‌اند. در ساختار شبکه، چندین گره بدون برجسب (نقاط سیاه) مشاهده شد که به‌عنوان هاپلوتیپ‌های فرضی معرفی شده‌اند (شکل ۹). این گره‌ها به‌صورت پل‌های ژنتیکی میان گروه‌های مختلف توالی عمل می‌کنند و احتمالاً نمایانگر ژنوتیپ‌هایی هستند که در جمعیت

فعالی مشاهده نشده‌اند یا طی فرآیندهای نوترکیبی، حذف یا دگرگون شده‌اند. همچنین، تعدادی از گره‌ها با شاخه‌های متعدد و متقاطع متصل‌اند که می‌تواند نشانه‌ای از رویدادهای نوترکیبی در میان جدایه‌های مورد مطالعه باشد (شکل ۹). با وجود تفاوت‌های جغرافیایی در محل جمع‌آوری جدایه‌ها، تفاوت ژنتیکی میان جدایه‌های ایرانی نسبتاً محدود بود. به‌ویژه سه جدایه از اصفهان (PV579121-123) توالی‌های بسیار مشابهی داشتند و در یک گره مشترک جای گرفتند. این یکنواختی می‌تواند بیانگر حضور یک سویه غالب در مناطق مرکزی ایران باشد.

جدول ۲. تخمین افتراق ژنتیکی برای جمعیت‌های مختلف بر اساس ژن V1 ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی.

**Table 2.** Genetic differentiation estimates for geographical populations of TYLCV V1 gene.

Comparisons	$\pi$	Tajima's D	Fu and Li's D*	Fu and Li's F*
Clade 1	0.04047	-1.30469 $P > 0.10$	-1.67879 <sup>ns</sup> $P > 0.10$	-1.83723 <sup>ns</sup> $P > 0.10$
Clade 3	0.22463	-0.50114 $P > 0.10$	-0.06209 <sup>ns</sup> $P > 0.10$	-0.17846 <sup>ns</sup> $P > 0.10$

جدول ۳. آزمون‌های خنثی بودن (Neutrality Tests) برای جدایه‌های ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) در جمعیت‌های مختلف بر اساس فیلوگروه‌ها و قاره‌ها.

**Table 3.** Neutrality tests of TYLCV isolates in different populations based on phylogroups and continents

Population	N	h	Hd	S	$\eta$	k	$\pi$	dS	dN	$\omega$
Clade1	37	37	1	128	152	25.981	0.04047	0.02723	0.04323	1.587
Clade2	2	2	1	90	90	90.000	0/13997	0.03595	0.16901	4.701
Clade3	7	7	1	282	385	143.762	0.22463	0.12999	0.24950	1.919

### بحث

ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) نشان داد که جدایه‌های تازه شناسایی شده PV57912 تا PV579127 درون گروه TYLCV-OM طبقه‌بندی می‌شوند و در سه زیرگروه مجزا با مقادیر بالای بوت‌استرپ قرار گرفتند. این الگوی گروه‌بندی نشان‌دهنده نزدیکی ژنتیکی بالا در میان این جدایه‌ها و احتمالاً منشأ تکاملی مشترک آن‌هاست. به‌طور خاص، جدایه‌های PV579124 و PV579126 به همراه GU076453 در یک زیرخوشه با مقدار بوت‌استرپ ۷۷ قرار گرفتند، در حالی که PV579127 و PV579125 خوشه‌ای مجزا با حمایت آماری ۸۹٪ تشکیل دادند. همچنین، جدایه‌های PV579123، PV579121 و PV579122 با مقدار بوت‌استرپ ۹۵ در یک زیرگروه قرار گرفتند، اگرچه تفاوت‌های بیشتر بین PV579121 و PV579122 (بوت‌استرپ = ۵۰) می‌تواند نشان‌دهنده آغاز تنوع درون گروهی یا روند تفکیک ژنتیکی باشد. جایگاه تبارزایی این جدایه‌ها و جداسازی واضح آن‌ها از سایر استرین‌های شناخته‌شده نظیر TYLCV-M1d، TYLCV-IL و TYLCV-IR، به‌طور قوی فرضیه تعلق آن‌ها به یک استرین منطقه‌ای متمایز تحت عنوان TYLCV-OM را تأیید می‌کند. این استرین ممکن است از طریق فشارهای انتخابی ناشی از شرایط محیطی خاص، گونه‌های گیاه میزبان، یا جمعیت ناقلین منطقه شکل گرفته و تثبیت شده باشد. همچنین، انسجام ژنتیکی درون خوشه TYLCV-OM می‌تواند حاکی از یک جمعیت ویروسی نسبتاً پایدار با گردش محدود در ناحیه مورد مطالعه باشد. با این حال، مشاهده برخی اختلافات ژنتیکی بین اعضای زیرخوشه‌ها، به‌ویژه در میان PV579121 و PV579122، نیاز به بررسی‌های بیشتر در زمینه پویایی ژنتیکی، تنوع فنوتیپی، و ویژگی‌های بیماری‌زایی این جدایه‌ها را

نتایج واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن V1 ویروس TYLCV حضور باندی به طول ۶۷۰ جفت‌باز را در نمونه‌های دارای علائم تایید کرد. در این مطالعه، همخوانی بین علائم ظاهری شامل پیچیدگی، زردی بین رگبرگی و کوتولگی با نتایج PCR مشاهده شد که این موضوع مؤید یافته‌های پیشین در زمینه رابطه شدت علائم و بار ویروسی است (Pico *et al.* 1999). یافته‌های ما با گزارش‌های پیشین در سطح جهانی و داخلی مطابقت دارد. برای مثال، محققین از آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق برای تشخیص این ویروس در اسرائیل استفاده کردند و باندی با همین اندازه گزارش نمودند (Lapidot & Polston 2006; Polston & Lapidot 2007). عدم مشاهده باند در برخی نمونه‌ها با وجود علائم خفیف می‌تواند به عوامل مختلفی مرتبط باشد، از جمله پایین بودن غلظت ویروس، کیفیت پایین DNA، وجود مهارکننده‌های PCR، یا جهش در ناحیه اتصال آغازگرها. در بررسی TYLCV و سایر بگوموویروس‌ها در غرب آفریقا نیز با وجود علائم واضح ردیابی ویروس انجام نشد (Fiallo-Olivé *et al.* 2019). این مسئله اهمیت طراحی آغازگرهای اختصاصی سویه جهت ردیابی و تشخیص سویه‌های مختلف از طریق واکنش زنجیره ای پلی‌مرز چندگانه (Multiplex PCR) را برای پوشش سویه‌های متنوع این ویروس برجسته می‌سازد. در مجموع، نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده شیوع بالا و تنوع علائمی TYLCV در مناطق مختلف نمونه‌برداری است و نقش PCR را در تأیید تشخیص دقیق و سریع این ویروس به‌خوبی نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تحلیل تبارزایی بر اساس توالی ژن V1

برجسته می‌سازد.

تحلیل تبارزایی بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن V1 ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی برای تعیین نوع استرین جدایه‌ها نشان داد که کل جدایه‌های این ویروس در چندین گروه متمایز تبارزایی شامل TYLCV-Mld، TYLCV-IR، TYLCV-IL، TYLCV-Gez، TYLCV-Ker، TYLCV-Bou و TYLCV-OM طبقه‌بندی می‌شوند. همچنین، تمامی جدایه‌های تازه ردیابی شده در این تحقیق، درون گروه TYLCV-OM قرار گرفتند و یک شاخه مستقل و با حمایت آماری بالا را تشکیل دادند که از سایر جدایه‌های شناخته‌شده، تمایز ژنتیکی مشخصی دارد.

نتایج تجزیه و تحلیل تبارزایی در این مطالعه نشان داد که جدایه‌های ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) در چندین شاخه مختلف با جدایه‌هایی از خاورمیانه، آفریقا و شبه‌جزیره عربستان قرار می‌گیرند (شکل ۲ و ۳). این یافته‌ها چندین نکته اپیدمیولوژیک و تکاملی مهم را مطرح می‌سازد. نخست، حضور جدایه‌هایی با شباهت بسیار بالا به جدایه‌های عراق، عمان، سوریه، عربستان سعودی و سودان نشان‌دهنده آن است که TYLCV احتمالاً چندین بار و از مسیرهای مختلف وارد ایران شده است. انتقال این ویروس به کشور می‌تواند از طریق بذره‌های آلوده، گیاهان زینتی یا سبزیجات وارداتی، و یا ناقلین طبیعی مانند سفیدبالک‌ها (*Bemisia tabaci*) که دارای قدرت پرواز و پراکنش بالایی هستند، صورت گرفته باشد. علاوه بر این، وجود چنین تنوعی ممکن است بازتابی از تکامل ویروس در شرایط اقلیمی متفاوت ایران نیز باشد، به‌ویژه در مناطق جنوبی که فشار انتخابی ناشی از دمای بالا و فعالیت شدید ناقلین می‌تواند عامل تغییرات ژنتیکی باشد. نکته مهم دیگر آن است که تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده می‌تواند اثر مستقیمی بر شدت بیماری، دامنه میزبانی و حتی کارایی روش‌های تشخیصی و مدیریتی داشته باشد. برخی مطالعات پیشین گزارش داده‌اند که تغییرات در ژن V1 می‌تواند بر قابلیت اتصال ویروس به ناقل یا سلول‌های گیاه میزبان تأثیرگذار باشد (Prasad et al. 2020). بنابراین وجود سویه‌های متفاوت در مناطق مختلف کشور باید در توسعه راهکارهای مدیریتی مانند تولید ارقام مقاوم یا طراحی پرایمرهای تشخیصی مد نظر قرار گیرد. چنین پایشی می‌تواند به شناسایی زود هنگام ورود سویه‌های جدید، ردیابی مسیرهای انتشار، و اتخاذ تدابیر قرنطینه‌ای مناسب کمک کند.

نتایج حاصل از تحلیل شبکه‌ای با استفاده از نرم‌افزار SplitsTree اطلاعات ارزشمندی درباره‌ی ساختار ژنتیکی و

تکامل ویروس TYLCV در جمعیت مورد مطالعه ارائه داد (شکل ۳). برخلاف درخت‌های سنتی که تنها یک فرضیه‌ی تبارزایی را ارائه می‌دهند، الگوریتم Neighbor-Net در SplitsTree با ارائه ساختارهای شبکه‌ای، امکان شناسایی نا همخوانی‌های تکاملی و بررسی رویدادهایی چون نوترکیبی را فراهم می‌سازد. مشاهده خوشه متراکم و یکنواخت جدایه‌های جدید در کنار یکدیگر، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی محدود و منشأ احتمالی مشترک آن‌ها در منطقه است. این یافته با فرض وجود یک منبع اولیه یا انتشار یک نژاد غالب از طریق ناقلان مانند سفیدبالک سازگار است. مجاورت آن‌ها با جدایه‌هایی از کشورهای مجاور نیز تأکیدکننده انتقال جغرافیایی ویروس در سطح منطقه‌ای است. وجود شاخه‌های منشعب و شبکه‌ای در درخت، که با الگوریتم Neighbor-Net به خوبی قابل مشاهده است، بیانگر احتمال وقوع نوترکیبی بین برخی از جدایه‌ها یا وجود سیگنال‌های ناسازگار در داده‌ها است. نوترکیبی یکی از مکانیسم‌های کلیدی در تنوع ژنتیکی بگوموویروس‌ها محسوب می‌شود که ممکن است باعث افزایش دامنه میزبانی یا تغییر در شدت بیماری‌زایی ویروس شود. بنابراین، شناسایی این ساختارها از منظر اپیدمیولوژیک و مدیریت بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. هم‌خوشه شدن جدایه‌های ایرانی با نمونه‌هایی از سایر کشورها، احتمال انتقال ویروس از طریق مبادلات کشاورزی یا ناقلین مشترک را مطرح می‌کند. تنوع ژنتیکی بالای مشاهده‌شده در برخی خوشه‌ها به‌ویژه Clade 3 می‌تواند پیامد تکامل سریع ویروس و سازگاری آن با میزبان‌های مختلف باشد. فشار انتخاب مثبت نیز بیانگر سازوکارهایی نظیر فرار از پاسخ‌های دفاعی گیاه یا تغییر در ویژگی‌های ناقل‌پذیری است. نتایج حاصل از آنالیزهای جمعیت‌شناسی و تنوع ژنتیکی نشان داد که جدایه‌های ویروس TYLCV دارای سطح بالایی از تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی بوده‌اند، به‌ویژه در Clade 3 که بالاترین مقادیر  $\pi$  و  $\eta$  را دارا بود. این امر می‌تواند بیانگر تاریخچه‌ای طولانی‌تر، ورودهای متعدد یا وقوع بازآرایی‌های ژنتیکی در این جمعیت باشد. نسبت بالای  $dN/dS$  ( $\omega > 1$ ) در هر سه شاخه نیز بیانگر وجود فشار انتخاب مثبت، به‌ویژه در Clade 2 ( $\omega = 4.701$ ) است که علی‌رغم اندازه کوچک جمعیت، تغییرات غیرهم‌معنی بیشتری را نسبت به جایگزینی‌های بی‌اثر نشان می‌دهد. محققین در مورد بگوموویروس‌ها نیز گزارش کرده‌اند که فشار انتخابی مثبت نقش مهمی در سازگاری ویروس‌ها با میزبان‌های گیاهی و ناقلین دارد (Duffy & Holmes 2008; Lefeuvre et al. 2010). همچنین، گزارش‌هایی از مناطق مدیترانه‌ای مانند اسپانیا و اسرائیل نیز از

پایدار (purifying selection) قرار داشته باشند، یا ممکن است نشان‌دهنده توالی‌هایی با عملکرد حیاتی و پایدار در جمعیت هدف باشند که تنوع کمی را تحمل می‌کنند.

مطابقت این الگو با نتایج حاصل از تحلیل‌های جمعیت‌شناسی (مانند مقادیر غیرمعنی‌دار در آزمون‌های Tajima's D و Fu and Li's D و F) نیز نشان می‌دهد که جهش‌ها در بیشتر موارد خنثی یا زیان‌بار بوده و تحت حذف طبیعی قرار گرفته‌اند. این موضوع با وجود تنوع ژنتیکی بالا در برخی شاخه‌ها (مانند شاخه ۳) نیز در تناقض نیست، زیرا ممکن است تنوع ناشی از جهش‌های خاموش یا قدیمی باشد که هنوز به‌طور کامل حذف نشده‌اند. یافته‌های این تحقیق گواه بر این است که در حالی که بیشتر سایت‌های کدونی در ویروس TYLCV تحت انتخاب منفی قوی قرار دارند، برخی از سایت‌ها در خط‌مشی‌های خاص با فشار انتخاب مثبت مواجه شده‌اند. این نوع انتخاب ممکن است در نتیجه تعاملات خاص با میزبان یا شرایط محیطی خاص به وقوع بپیوندد. انتخاب مثبت اپیزودیک در شش کدون شناسایی شده می‌تواند نشان‌دهنده وجود تغییرات جهشی باشد که ویروس را قادر می‌سازد به‌طور موقت و هدفمند به فشارهای محیطی یا میزبان‌های خاص سازگار شود. یافته‌های این پژوهش نشان دادند که جدایه‌های ایرانی ویروس TYLCV دارای ساختار ژنتیکی نسبتاً یکنواخت ولی به‌صورت دو خوشه متمایز هستند. حضور این خوشه‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف کشور، خوشه اول از اصفهان و ورامین، و خوشه دوم از دهقان و یزد، می‌تواند بازتاب‌دهنده الگوهای پویای پراکنش ویروس در سطح ملی باشد. چنین الگویی ممکن است تحت تأثیر جریان‌های ژن بین‌جمعیتی، تحرک میزبان یا ناقل (سفیدبالک‌ها)، و یا تاریخچه‌های اپیدمیولوژیکی منطقه‌ای قرار گرفته باشد.

نزدیکی ژنتیکی جدایه‌های ایرانی با جدایه‌هایی از کشورهای پاکستان، عربستان سعودی و سودان، احتمال ورود ویروس به ایران از مسیرهای شرقی یا جنوبی را مطرح می‌کند. این نتیجه با مطالعات پیشین که به شباهت‌های ژنتیکی TYLCV در خاورمیانه و جنوب آسیا اشاره کرده‌اند، هم‌راستا است (Lefeuve et al. 2010; Hamilton et al. 2015). همچنین، فاصله ژنتیکی محسوس بین جدایه‌های ایرانی و جدایه‌های مرجع مدیترانه‌ای نظیر NC\_000869 (اسرائیل) و EF011559 (اسپانیا) می‌تواند دلالت بر وجود سویه‌های خاص و بومی شده در ایران داشته باشد که در مسیرهای تکاملی متفاوتی نسبت به جدایه‌های کلاسیک رشد یافته‌اند. وجود گره‌های فرضی (هاپلوטיפ‌های

سطح بالای تنوع هاپلوטיפی TYLCV و تکامل فعال این ویروس حکایت دارند (Polston & Lapidot 2007). در مقایسه با این گزارش‌ها، داده‌های حاضر نه تنها الگوی مشابهی از انتخاب مثبت را نشان می‌دهند، بلکه تنوع بالاتری نیز در برخی شاخص‌ها نظیر  $\pi$  در Clade3 آشکار شده است که اهمیت زیست‌محیطی و اپیدمیولوژیک جدایه‌های ایرانی را برجسته می‌سازد. نتایج تمایز ژنتیکی نشان داد که جدایه‌های TYLCV در شاخه‌های مختلف از ساختار ژنتیکی متمایزی برخوردارند، به‌ویژه بین شاخه‌های Clade1 و Clade2 که شاخص Fst بالا (۰/۶۴۲) و مقدار Snn = 1 نشان‌دهنده جدایی کامل این جمعیت‌ها از یکدیگر است. این میزان تمایز ژنتیکی می‌تواند ناشی از منابع جغرافیایی متفاوت، مسیرهای مستقل ورود ویروس یا فشارهای انتخابی گوناگون در میزبان‌ها باشد. نتایج ما با یافته‌های مطالعاتی که حاکی از به وجود ساختار جمعیتی قوی در بگوموویروس‌ها، به‌ویژه TYLCV، اشاره دارند، مطابقت دارد (Lefeuve et al. 2010; García-Estrada et al. 2022). در عین حال، فقدان تمایز معنی‌دار بین شاخه‌های Clade2 و Clade3 ممکن است ناشی از اندازه نمونه کوچک شاخه دوم یا مهاجرت ژنتیکی اخیر باشد. مقادیر منفی اما غیرمعنی‌دار آزمون‌های خنثی بودن مانند Tajima's D و Fu and Li در شاخه‌های مورد مطالعه حاکی از نبود انحراف قابل توجه از فرض خنثی بودن تکامل در این جمعیت‌ها است. به‌طور خاص، مقدار  $\pi$  پایین‌تر در شاخه ۱ ممکن است نشان‌دهنده یک فشار انتخابی خفیف باشد. در حالی که شاخه ۳ با تنوع ژنتیکی بیشتر، احتمالاً یک جمعیت قدیمی‌تر یا متنوع‌تر از نظر ژنتیکی را نشان می‌دهد. مقادیر منفی اما غیرمعنی‌دار برای آزمون‌های خنثی بودن در بگوموویروس‌ها در مطالعات قبلی نیز مشاهده شده است (Lefeuve et al. 2010; García-Arenal & Zerbini 2019). این نتایج نشان می‌دهد که در حال حاضر شواهد قوی‌ای برای تأثیر انتخاب مثبت یا bottleneck شدید در جمعیت‌های مورد مطالعه وجود ندارد. تحلیل شاخص تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ ) در این مطالعه الگوی ناهمگونی از توزیع تنوع ژنتیکی را در طول توالی مورد بررسی نشان داد که می‌تواند بازتابی از فرآیندهای تکاملی مختلف نظیر انتخاب طبیعی، نوترکیبی ژنتیکی و تاریخچه جمعیتی باشد. افزایش قابل توجه در مقادیر  $\pi$  در برخی نواحی، به‌ویژه در محدوده‌ی ۴۰۰ تا ۵۰۰ نوکلئوتیدی، می‌تواند نشان‌دهنده حضور نواحی ژنی تحت انتخاب مثبت، یا مناطق پرجهش (mutation hotspots) باشد که در آن‌ها نرخ تغییرات ژنتیکی به‌طور طبیعی بالاتر است. در مقابل، نواحی با مقادیر پایین‌تر  $\pi$  ممکن است تحت فشار انتخاب

زراعی، پراکنش ناقل، و تبادل بذر قرار دارد. در مجموع، این نتایج بر اهمیت نظارت مداوم ژنتیکی بر جمعیت‌های TYLCV در کشور تأکید دارد. شناسایی ساختار جمعیتی ویروس، نه تنها در درک مسیرهای انتقال و تکامل آن، بلکه در تدوین برنامه‌های مقاوم‌سازی ژرم‌پلاسم‌های گیاهی و طراحی راهکارهای کنترلی نیز نقش کلیدی دارد.

نتایج حاضر نیز در همین راستا قابل تفسیر هستند و نشان می‌دهند که تحلیل شاخص  $\pi$  می‌تواند به‌عنوان ابزاری قوی برای شناسایی نواحی ژنومی با اهمیت عملکردی، هدف‌های بالقوه‌ی انتخاب طبیعی، و طراحی مارکرهای ژنتیکی برای برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد. برای درک دقیق‌تر دلایل این الگوهای تنوع، انجام مطالعات مکمل مانند آنالیزهای هاپلوتیپ، آزمون‌های انتخاب خنثی، بررسی بیان ژن در شرایط مختلف محیطی، و مدل‌سازی جمعیت پیشنهاد می‌شود.

**جدول ۴.** شناسایی کدون‌های تحت انتخاب مثبت در ژن V1 ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) با استفاده از تحلیل MEME. کدون‌هایی که تحت انتخاب مثبت اپیزودیک قرار گرفته‌اند بر اساس آزمون نسبت احتمال (LRT) با مقدار  $p$  کمتر از ۰/۰۵ شناسایی شده‌اند. ستون‌ها شامل نرخ هم‌سان ( $\alpha$ )، مقدار LRT، مقدار  $p$ -value، تعداد شاخه‌های درگیر، و نمونه‌ای از تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده هستند.

**Table 4.** Identification of codons under episodic positive selection in the V1 gene of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) using MEME analysis. Codons evolving under episodic positive selection were identified based on the Likelihood Ratio Test (LRT) with  $p$ -values  $< 0.05$ . The table includes synonymous rate ( $\alpha$ ), LRT score,  $p$ -value, number of affected branches, and representative codon substitutions.

Codon	(dN/dS) $\alpha$	Likelihood Ratio Test	$p$ -value	Number of affected branches	Codon changes
22	8.957	3.529	0.0809	1	aaC→aaA, aaC→aaT, aaA→aaT
23	0.000	16.462	0.0001	3	tCG→tTC, Ttc→Atc, tTC→tCG
25	0.003	5.546	0.0285	3	Agc→Ggc, Ggc→Cgc, gGc→gCc
44	0.001	5.012	0.0375	0	aTG→aGT, GtA→AtG, TCa→GTa
67	0.000	4.595	0.0465	2	aAg→aGg, CGT→AAG
89	0.000	4.974	0.0382	3	aTT→aAG, Att→Gtt, Gtt→Att

## References

- Bananej K, 2016. An analysis on the status of tomato yellow leaf curl disease. *Applied Entomology & Phytopathology* 84: 157–173.
- Cohen S, & Harpaz I, 1964. Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* gennadius) 1. *Entomologia experimentalis et Applicata* 7: 155–166.
- Duffy S, & Holmes EC, 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl

حد واسط) در شبکه هم‌تبارنمایی، می‌تواند ناشی از دو عامل باشد: یا این که ژنوتیپ‌های واسطه در طبیعت وجود داشته‌اند ولی هنوز شناسایی نشده‌اند، یا در طی تکامل حذف شده‌اند. همچنین، شاخه‌های متقاطع و ساختارهای غیرخطی در شبکه می‌تواند نشانه‌ای از رویدادهای نوترکیبی باشد، که پدیده‌ای رایج در ژنوم‌های ویروسی دی ان ای تک‌رشته‌ای مانند بگوموویروس‌ها است (Lefeuve *et al.* 2010). جالب توجه است که سه جدایه که از اصفهان جمع‌آوری شده‌اند (PV579121-3)، دارای توالی‌های تقریباً یکسانی بوده و در یک هاپلوتیپ قرار گرفته‌اند. این موضوع نشان می‌دهد که در برخی مناطق کشور، احتمالاً یک سویه خاص از ویروس به‌طور غالب وجود دارد که در جمعیت گسترش یافته است. یکنواختی درون منطقه‌ای و همزمان تنوع میان منطقه‌ای درون کشور، پدیده‌ای متداول در اپیدمیولوژی ویروس‌های گیاهی است که تحت تأثیر عواملی چون مدیریت

virus. *Journal of Virology* 82: 957–965.

- Fiallo-Olivé E, Trenado HP, Louro D, & Navas-Castillo J, 2019. Recurrent speciation of a tomato yellow leaf curl geminivirus in Portugal by recombination. *Scientific Reports* 9: 1332.
- Fidan H, Karacaoglu M, Koç G, & Caglar B, 2019. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) strains and epidemiological role of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes on tomato agroecology in Turkey. *Applied Ecology & Environmental Research* 17.

- Gambino G, Perrone I, & Gribaudo IIPA, 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants *Phytochemical Analysis* 19: 520–525.
- García-Arenal F, & Zerbini FM, 2019. Life on the edge: geminiviruses at the interface between crops and wild plant hosts. *Annual Review of Virology* 6: 411–433.
- García-Estrada RS, Diaz-Lara A, Aguilar-Molina VH, & Tovar-Pedraza JM, 2022. Viruses of economic impact on tomato crops in Mexico: From diagnosis to management—A review. *Viruses* 14: 1251.
- Hajimorad M, Kheyr-Pour A, Alavi V, Ahoonmanesh A, Bahar M, Rezaian M, & 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.
- Hamilton C-L, Mazumdar-Leighton S, Amarakoon I, & Roye M, 2015. Tomato yellow leaf curl. In: Tennant P, Fermin G (eds). *Virus diseases of tropical and subtropical crops*, CABI, Wallingford UK. Pp. 177–188.
- Hanson PM, Bernacchi D, Green S, Tanksley SD, Muniyappa V, Padmaja AS, Chen H-M, Kuo G, Fang D, & Chen J-T, 2000. Mapping a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125: 15–20.
- Kil E-J, Kim S, Lee Y-J, Byun H-S, Park J, Seo H, Kim C-S, Shim J-K, Lee J-H, & Kim J-K, 2016. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Scientific Reports* 6: 19013.
- Lapidot M, & Polston JE, 2006. Resistance to tomato yellow leaf curl virus in tomato. *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses* 503–520.
- Lefevre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJ, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett J-M, & Varsani A, 2010. The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathogens* 6: e1001164.
- Li F, Qiao R, Yang X, Gong P, & Zhou X, 2022. Occurrence, distribution, and management of tomato yellow leaf curl virus in China. *Phytopathology* Research 4: 28.
- Marchant WG, Gautam S, Hutton SF, & Srinivasan R, 2020. Tomato yellow leaf curl virus-resistant and-susceptible tomato genotypes similarly impact the virus population genetics. *Frontiers in Plant Science* 11: 599697.
- Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, & Muhire B, 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1(1): vev003.
- Navot N, Pichersky E, Zeidan M, Zamir D, & Czosnek H, 1991. Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* 185: 151-161.
- Ong SN, Taheri S, Othman RY, & Teo CH, 2020. Viral disease of tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.): an overview. *Journal of Plant Diseases & Protection* 127: 725–739.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A, 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology & Evolution* 34: 3299-3302.
- Panno S, Caruso A, & Davino SJPD, 2019. First report of tomato brown rugose fruit virus on tomato crops in Italy. *Plant diseases* 103: 1443–1443.
- Pico B, Diez MJ, & Nuez F, 1999. Improved diagnostic techniques for tomato yellow leaf curl virus in tomato breeding programs. *Plant Disease* 83: 1006–1012.
- Polston JE, & Lapidot M, 2007. Management of Tomato yellow leaf curl virus: US and Israel perspectives. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: management, molecular biology, breeding for resistance*. Springer.
- Prasad A, Sharma N, Hari-Gowthem G, Muthamilarasan M, & Prasad M, 2020. Tomato yellow leaf curl virus: impact, challenges, and management. *Trends in Plant Science* 25: 897–911.
- Rubio L, Galipienso L, & Ferriol I, 2020. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Frontiers in Plant Science* 11:1092. doi: 10.3389/fpls. 2020.01092.
- Seymour GB, & Rose JK, 2022. Tomato molecular biology—special collection of papers for molecular

- horticulture. *Molecular Horticulture* 2: 21.
- Shirazi M, Mozafari J, Rakhshandehroo F, & Shams-Bakhsh M, 2014. Genetic diversity, host range, and distribution of Tomato yellow leaf curl virus in Iran. *Acta Virologica* 58: 128–136.
- Yan Z, Wolters A-MA, Navas-Castillo J, & Bai Y, 2021. The global dimension of tomato yellow leaf curl disease: Current status and breeding perspectives. *Microorganisms* 9: 740.
- Yazdani-Khameneh S, & Golnaraghi A, 2017. The status of Begomoviruses in Iran. In: Saxena S, & Tiwari A K (eds). *Begomoviruses: Occurrence and Management in Asia and Africa*. Springer Nature, Singapore. Pp. 229–253.
- Zhang L, Wu S, Zhao M, Ghanem H, Wu G, Li M, & Qing L, 2024. Molecular Identification and Genetic Diversity Analysis of Papaya Leaf Curl China Virus Infecting *Ageratum conyzoides*. *The Plant Pathology Journal* 40(5): 551.

