

ردیابی و بررسی جایگاه تبارزایی ویروس پنهان زعفران *Saffron latent virus* در مزارع زعفران استان‌های خراسان جنوبی و رضوی

اکرم توکلی بردسکن^۱، سیده عاطفه حسینی^۱✉، سارا قارونی کاردانی^۲

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، خراسان جنوبی. بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. ahosseini@birjand.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۳ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۵/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۹

چکیده

ویروس پنهان زعفران (*Saffron Latent Virus*, SaLV)، یک گونه جدید از جنس *Potyvirus* است که به تازگی در ایران شناسایی شده است. علی‌رغم اینکه بسیاری از علائم این ویروس مخفی می‌باشد، اما خسارت آن در مزارع زعفران قابل ملاحظه است. علیرغم شناسایی این ویروس، تاکنون بررسی تبارزایی جدایه‌های آن بر مبنای پروتئین پوششی صورت نگرفته است. برای بررسی این ویروس تعداد ۱۵۲ نمونه از برگ، گل و بنه زعفران‌های بدون علائم و دارای علائم کوتولگی، زردی و پپیچیدگی از مزارع استان‌های خراسان جنوبی و رضوی، جمع‌آوری گردید. پس از استخراج RNA، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز معکوس (RT-PCR) و آغازگرهای اختصاصی مربوط به پروتئین پوششی، حضور SaLV مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تعداد ۹۲ نمونه از ۱۵۲ نمونه (معادل ۶۰٪) آلوده به ویروس بودند. در نهایت هفت نمونه به عنوان نمونه‌هایی که بر مبنای شهرستان محل نمونه‌برداری از ۹۲ نمونه تکثیر شده در آزمون زنجیره‌ای پلی‌مرز، انتخاب شده بودند مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. بررسی‌های تبارزایی، بر پایه پروتئین پوششی و با نرم افزار MEGAX، نشان داد که جدایه‌های این ویروس دو گروه مجزا تشکیل دادند، که جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در گروه دوم قرار گرفتند. از آنجائیکه جدایه‌های مربوط به یک منطقه و یک محصول در گروه‌های مختلف پخش شده، بنابراین منطقه جغرافیایی جداسازی و نوع میزبان در تبارزایی ویروس تاثیر گذار نمی‌باشد. تحقیق حاضر برای اولین بار به ردیابی ویروس از روی گل و بنه زعفران و نیز بررسی تبارزایی جدایه‌های این ویروس جدید بر مبنای پروتئین پوششی در ایران می‌پردازد.

کلمات کلیدی: آغازگر اختصاصی، پروتئین پوششی، تبارزایی، تعیین توالی

Detection and phylogenetic analysis of saffron latent virus in saffron fields of South Khorasan and Razavi provinces

Akram Tavakoli Bardaskan¹ Seyyedeh Atefeh Hosseini¹✉ Sara Gharouni Kardani²

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, South Khorasan province. ²Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran. ahosseini@birjand.ac.ir

Received: 13 March 2023

Revised: 20 August 2023

Accepted: 20 August 2023

Abstract

The *Saffron Latent Virus* (SaLV) is new species in the *Potyvirus* genus, which has been recently characterized from Iran. Even though most of the symptoms on infected plants remain hidden, it causes considerable damage to saffron fields. There is no data available on the phylogenetic relationship among different strains of this virus based on its coat protein, despite its high incidence and economic significance. To address this, we collected 152 samples of saffron leaves, flowers, and corms from fields in South Khorasan and Razavi Khorasan provinces, both with and without symptoms like stunting, yellowing, and twisting. After extracting RNA, the presence of SaLV was examined using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with specific primers targeting the coat protein. The findings revealed that 92 out of 152 samples (60%) were infected with the virus. Subsequently, seven representative samples, each from a selected region were sequenced. Phylogenetic analysis using MEGAX software showed that the virus strains formed two distinct groups, and the strains studied were placed in the second group. Interestingly, strains from the same geographical region and product were distributed among different groups, suggesting that geographical separation and host type did not significantly impact the viral diversity. This study is the first in detecting of SaLV in saffron flowers and corms and pinpointing the diversity of its new strains based on the coat protein in Iran.

Keywords: Specific primer, Coat protein, Phylogenetic analysis, Sequencing

How to cite:

Tavakoli Bardaskan A, Hosseini SA, Gharouni Kardani S, 2023. Detection and phylogenetic analysis of *saffron latent virus* in saffron fields of South Khorasan and Razavi provinces. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 13 (1): 15-25.

مقدمه

بوده‌اند (Parizad et al. 2018). طبق بررسی‌های (Movi 2018) در گیاه زعفران آلوده به ویروس، درجات مختلفی از علائم بر روی گیاهان زعفران مشاهده گردید که می‌تواند از موزاییک خفیف تا شدید متغیر باشد. در آزمون الیزا نمونه‌هایی که دارای علائم شدید بودند، جذب بالاتری نسبت به نمونه‌هایی که دارای علائم خفیف یا بدون علائم بودند، داشتند.

در سال ۲۰۰۵ در گیاهان دارای علائم کوتولگی، زردی، نکروز و شکستگی رنگ گلبرگ در *Crocus spp.* پوتی ویروس که در واقع همان ویروس پنهان زعفران می‌باشد، ردیابی گردید (Miglino et al. 2005). همچنین در بررسی زعفران‌های آلوده به ویروس پنهان زعفران، میزان ترکیبات کروسین (رنگ)، سافرانال (عطر) و پیکروکروسین (طعم) نسبت به گیاه سالم به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (Parizad et al. 2018). علاوه بر آن ویژگی‌های ریخت‌شناسی گل‌های زعفران موجب می‌شود مشاهده علائمی نظیر کوتولگی یا شکستگی رنگ گلبرگ که گاهی مرتبط با آلودگی پوتی ویروس هاست کار دشواری باشد و بنابراین همه این مسائل سبب انتشار آلودگی پوتی‌ویروسی در زعفران می‌گردد (Grilli Caiola & Faoro 2011).

اطلاعات کافی در رابطه با دامنه میزبانی و ویژگی‌های ویروس پنهان زعفران وجود ندارد. ویروس SaLV در شش استان کشور (تهران، خراسان رضوی، آذربایجان شرقی، خراسان جنوبی و اصفهان) گزارش گردیده است (Parizad & Movi 2018). کارایی انتقال ویروس SaLV توسط سه گونه شته *Myzus persicae* در قالب *Sulzer, Aphis gossypii* Glover, *A. fabae* Scopoli در یک طرح کاملاً تصادفی توسط (Movi ۲۰۱۸) انجام شد که در این تحقیق بیش‌ترین درصد راندمان انتقال مربوط به گونه *M. persicae*, *A. gossypii* با ۵۵/۵۵ درصد و *A. fabae* با ۳۳/۳۳ درصد دارای کم‌ترین راندمان انتقال بود.

تنوع ژنتیکی نقش بسیار مهمی در سازگاری و بقای یک ویروس در محیط‌های مختلف دارد. این تنوع ژنتیکی ناشی از مکانیزم‌های مختلفی از جمله جهش، جریان ژنی، نوترکیبی، رانش ژنتیکی و انتخاب طبیعی به وجود می‌آید (Zhan et al. 2015). تحلیل تنوع ژنتیکی ناحیه کدکننده پروتئین پوششی (CP) در ۵۰ جدایه از ویروس پنهان زعفران در مناطق مختلف ایران نشان داد که تنوع درونی و بین زیرجمعیت‌ها کم است و نشان داد که CP تحت فشار انتخاب منفی قرار دارد (Parizad et al. 2018). در تحقیقاتی که (Parizad & Movi 2018) در سال‌های اخیر انجام داده‌اند، ویروس از روی برگ ردیابی گردید

زعفران با نام عمومی Saffron و نام علمی *Crocus Sativus* L. گیاهی علفی، چند ساله (Paseban 2006)، دارای ساقه زیرزمینی و بنه‌دار است (Escribano et al. 2000). زعفران زراعی از لحاظ ژنتیکی تریپلوئید ($2n=3x=24$)، عقیم بوده و تکثیر آن از طریق بنه صورت می‌گیرد (Omid Beigi 2000) و از نظر طبقه‌بندی در رده تک لپه‌ای‌ها، راسته سوسنی‌ها، خانواده زنبقیان و جنس *Crocus* قرار دارد (Fernandez 2004). جنس *Crocus* تقریباً شامل ۱۰۰ گونه است که از این بین، گونه *Crocus Sativus* به عنوان مهم‌ترین گونه شناسایی شده است (Fernandez 2004) و همچنین؛ گیاهی سرمدوست است که دوره رشد و گلدهی آن در مناطق سردسیر از اوایل پاییز آغاز می‌شود (Molina et al. 2005). ایران، اسپانیا، هند، یونان، آذربایجان، مراکش و استرالیا از بزرگترین تولیدکنندگان زعفران هستند. بجز ایران، سایر کشورها در مجموع تنها ۱۲٪ از تولید جهانی زعفران را به خود اختصاص می‌دهند. در حال حاضر، کشت زعفران به طور گسترده و تجاری فقط در شرق و شمال شرق کشور انجام می‌شود. به طوری که از کل مساحت ۱۲۵ هزار هکتاری کشت زعفران در کشور، ۸۸ هزار هکتار آن در استان خراسان رضوی و ۱۶ هزار هکتار آن در استان خراسان جنوبی قرار دارد (Vejarateh Jahad Keshavarzi 1399). با توجه به اینکه ۹۵٪ تولید زعفران در کشور در استان‌های خراسان رضوی و جنوبی و تنها ۵٪ آن در سایر استان‌ها تولید می‌شود.

در ایران طی چند سال اخیر گونه ویروسی جدیدی از جنس *Potyvirus* شناسایی شد که با نام پیشنهادی *Saffron latent virus* (SaLV) ویروس پنهان زعفران معرفی شد (Parizad et al. 2018). ویروس پنهان زعفران از اعضای جنس پوتی ویروس در خانواده پوتی ویریده است (Shukla et al. 1998)، ژنوم آن همانند سایر اعضای این جنس از نوع آر. آن. ای تک رشته‌ای با قطبیت مثبت و پیکره این ویروس به صورت رشته‌ای خم‌ش پذیر است (Edwardson & Christie 1996) و طول آن‌ها ۸۵۰-۷۲۰ نانومتر است (Hull 2002). پیکره ویروس عاری از لیپید است و در شیره گیاهی تقریباً حالتی ناپایدار دارد. ویروس در محیط آزمایشگاه به مدت بقای یک الی چهار روز زنده باقی می‌ماند (Hollings & Brunt 1981).

غالباً SaLV به صورت پنهان یافت می‌شود و علائم ماکروسکوپی خاصی روی گیاه میزبان ایجاد نمی‌کند ولی به شکل وسیع در زعفران‌کاری‌های ایران ردیابی می‌شود به طوری که حدود ۶۰ تا ۸۵ درصد از بوته‌های مورد بررسی، آلوده به ویروس

ویروس مربوط می‌شود (Parizad 2012). بنابراین، این تحقیق به منظور شناسایی ویژگی‌های مولکولی ویروس پنهان زعفران و بررسی دقیق‌تر تبارزایی و تنوع ژنتیکی در ناحیه کدکننده پروتئین پوششی ویروس انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در پاییز سال ۱۴۰۱ نمونه‌برداری از مزارع زعفران (برگ و گل و بنه) شهرستان‌های قائن، بیرجند، خوسف، فردوس و طبس از استان خراسان جنوبی و شهرستان‌های تربت حیدریه، گناباد، بردسکن و مشهد از استان خراسان رضوی انجام شد (جدول ۱). نمونه‌های جمع‌آوری شده زعفران دارای علائم کوتولگی، کوچک شدن برگ، زردی، نواری شدن و پیچیدگی گلبرگ‌ها، چروکیدگی و بدشکلی برگ‌ها و برخی بدون علائم، بودند.

و به عنوان گونه جدید در جنس پوتی ویروس با سایر گونه‌های این جنس مقایسه تبارزایی گردید، اما بررسی‌های تبارزایی بین جدایه‌های این گونه صورت نگرفت که در تحقیق حاضر علاوه بر ردیابی ویروس از سایر بخش‌های زعفران مثل بنه و کلاله، به بررسی‌های تبارزایی بین جدایه‌های این گونه جدید برای اولین بار پرداخته شد.

با توجه به بررسی‌های انجام شده در دهه‌های اخیر، رشد و عملکرد محصول زعفران، به خصوص در استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی، کاهش یافته و طول عمر زمین‌های کشت زعفران به تقریباً هشت سال کاهش یافته است. به این ترتیب، با توجه به اینکه عوامل دیگر مانند آلودگی، باکتری‌ها و قارچ‌ها توجیه‌کننده مشکلات مرتبط با کاهش محصول نیستند و از آنجا که در تحقیقات اولیه در کشور برای اولین بار پوتی ویروس از گیاه زعفران زراعی جداسازی و شناسایی شده است، به‌همین دلیل احتمالاً دلیل کاهش محصول با علت آلودگی به

جدول ۱. مکان‌های نمونه برداری جهت شناسایی ویروس پنهان زعفران در سال ۱۴۰۱.

Table 1. Sampling locations to identify Saffron latent virus in 1401.

Province	City	Number of samples collected	Sampling date
South Khorasan	Qain	10	1401/08/15
	Esfeden	14	1401/08/27
	Beshrouyeh	18	1401/08/15
	Birjand	5	1401/09/06
	Khousf	12	1401/09/07
	Tabas	15	1401/08/25
	Ferdows	۱۰	1401/09/08
Razavi Khorasan	Sabzevar	18	1401/08/15
	Torbat-e Heydarieh	6	1401/09/15
	Bardaskan	25	1401/09/14
	Ghouchan	3	1401/09/18
	Mashhad	10	1401/10/05
	Gonabad	6	1401/09/10
Total		152	

برای سنتز رشته مکمل، برای هر نمونه چهار میکرولیتر از آر. ان. ای. کل، (غلظت ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) با دو میکرولیتر آغازگر معکوس (۱۰ پیکومول) و چهار میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و میکروتیوب در دمای ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. میکروتیوب‌ها برای یک دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس دو میکرولیتر مخلوط dNTPs ۲۵ میلی‌مولار، چهار میکرولیتر بافر ۵X واکنش و یک میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (Reverse Transcriptase, RevertAid Fermentas,) ۱۰۰۰ U ($50 \frac{\mu}{\mu l}$) و سه میکرولیتر آب دیونیزه به مخلوط اضافه گردیده میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه

استخراج ژنوم ویروس

استخراج RNA از برگ‌های تازه گیاه زعفران، بنه و گلبرگ با استفاده از کیت استخراج آر.ان.ای توتال شرکت دنایست (Total RNA isolation kit, Dena Zist Asia. Cat. No.: S-) (1010-1) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، صورت گرفت. به‌منظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل (Thermoscientificnanodrop 2000c) و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

سنتز رشته مکمل (cDNA)

میکرولیتتر آغازگر مستقیم اختصاصی، ۰/۵ میکرولیتتر آغازگر معکوس اختصاصی با توالی‌های معین و غلظت ۱۰ پیکومول (جدول ۲) و ۹ میکرولیتتر آب مقطر استریل اضافه کرده و سپس ۱۷/۵ میکرولیتتر به لوله‌های کوچک منتقل گردید و ۲/۵ میکرولیتتر از cDNA هر نمونه به لوله موردنظر انتقال یافت.

سلسیوس و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سلسیوس در ترموسایکلر قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرارز (PCR)

برای تکثیر کامل ژن پروتئین پوششی از PCR در لوله‌ای ۷/۵ میکرولیتتر از (Master mix Red 2x PCR) premix، ۰/۵

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای اختصاصی SaLV استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرارز جهت تکثیر کامل پروتئین پوششی (CP).

Table 2. Characteristics of SaLV specific primers used in polymerase chain reaction to amplify the coat protein (CP) region.

Name of the primer	sequence	References	position on the genome
SaLV-F	5'-ACCATACATTGCAGAGACAGC-3'	Parizad <i>et al.</i> 2018	8483-8503
SaLV-R	5'-CGAAAGGTGGTAGAACCACTC-3'	Parizad <i>et al.</i> 2018	9526-9546

BLASTn با استفاده از (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مقایسه و هم ردیف سازی چندگانه با استفاده از MAFFT نسخه ۷ انجام شد. رسم درخت تبارزایی در جدایه‌های تعیین توالی‌یابی شده در ۳۴ جدایه منتخب SaLV از ژن‌بانک با استفاده از نرم‌افزار MEGAX (Kumar *et al.* 2016) انجام شد. تجزیه و تحلیل تشابه توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی بین جدایه‌های این تحقیق و بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2 (Muhire *et al.* 2014) صورت گرفت.

پروفایل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرارز شامل یک چرخه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه در مرحله واسرشت سازی، ۵۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر (Bio-Rad MJ Mini Thermal Cycler, USA) انجام گردید.

محصول PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی دو میکرولیتتر از Green viwer (پارس توس - ایران) الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داگ (Alphaimager Mini ProteinSimple, USA) عکسبرداری شد.

نتایج

نتایج نمونه برداری

از میان ۱۵۲ نمونه بافت برگ، گل و بنه زعفران برداشت شده از مزارع، توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرارز معکوس (-RT-PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای پروتئین SaLV، تعداد ۹۲ نمونه آلوده شناسایی شدند که بیش‌ترین کم‌ترین میزان آلودگی در خراسان رضوی به ترتیب مربوط به منطقه بردسکن و قوچان و در خراسان جنوبی مربوط به طبس و خوسف است (جدول ۳).

بررسی علائم SaLV بر روی گیاه میزبان

نمونه‌های مثبت ارزیابی شده در این تحقیق در برخی از آن‌ها، علائمی نظیر موزائیک خفیف تا شدید و گاه زردی مشاهده شد و در برخی هیچ گونه علائمی دیده نشد (شکل ۱).

تعیین توالی و بررسی‌های تبارزایی ویروس

محصول PCR مربوط به ژن پروتئین پوششی تکثیر شده از هفت نمونه زعفران به نمایندگی از شهرستان‌های بردسکن، تربت حیدریه، مشهد، فردوس و طبس به طول ۱۰۶۳ جفت باز، با پرایمر مستقیم و معکوس تعیین توالی گردید (جدول ۴). بدین منظور محصول PCR مورد نظر، از روی ژل بریده شد و با استفاده از کیت استخراج از ژل (GeNet Bio, Korea, Cat No: K-8000) مطابق دستور العمل شرکت سازنده از ژل آگارز، خالص سازی شد و جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی ارسال گردید. برای انجام ویرایش توالی‌ها از نرم افزار Geneious prime (Biomatters, Auckland, New Zealand) 2019 استفاده شد. توالی‌های حاصله با توالی‌های ویروس پنهان زعفران موجود در پایگاه داده GenBank

جدول ۳. مناطق نمونه برداری و تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس پنهان زعفران.

Table 3. Sampling areas and the number of samples infected with saffron latent virus.

Province	City	Number of samples collected	Number of infected samples
Southern Khorasan	Qain	10	8
	Esfeden	14	11
	Beshrouyeh	18	5
	Birjand	5	3
	Khousf	12	4
	Tabas	15	13
	Ferdows	۱۰	۹
Khorasan Razavi	Sabzevar	18	11
	Torbat-e Heydarieh	6	4
	Bardaskan	25	14
	Ghouchan	3	2
	Mashhad	10	3
	Gonabad	6	5
Total		152	92



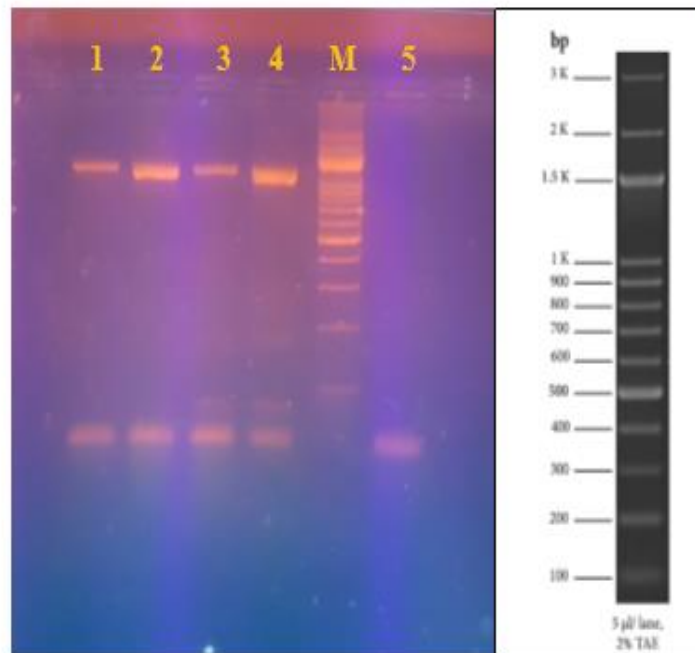
شکل ۱. نمونه‌های آلوده به ویروس پنهان زعفران دارای علائم و فاقد علائم. ۱- نمونه کلالة فاقد علائم نمونه زعفران جمع‌آوری شده از شهرستان بردسکن، ۲- نمونه فاقد علائم در بنه زعفران جمع‌آوری شده از شهرستان بردسکن، ۳- نمونه فاقد علائم در گلبرگ زعفران در مزارع زعفران شهرستان بردسکن، ۴ و ۵- علائم موزائیک خفیف در برگ‌های زعفران جمع‌آوری شده به ترتیب از شهرستان‌های بشرویه و فردوس، ۶- علائم موزائیک شدید بر روی برگ زعفران جمع‌آوری شده از شهرستان فردوس، ۷- گیاه فاقد علائم آلودگی بر روی برگ‌ها در مزارع زعفران شهرستان طبس.

Figure 1. Samples infected with *Saffron latent virus* showing symptomatic and asymptomatic cases. 1. Asymptomatic sample of stigma collected from Bardaskan city. 2. Asymptomatic sample from the bulb of saffron collected from Birjand. 3. Asymptomatic sample from saffron petals in saffron fields of Birjand. 4 and 5. Mild mosaic symptoms on saffron leaves collected from Boshruyeh and Ferdows, respectively. 6. Severe mosaic symptoms on saffron leaves collected from Ferdows. 7. Plant without any symptoms of infection on the leaves in saffron fields of Tabas.

نتایج مربوط به RT-PCR

باند ۱۰۶۳ bp دیده شد در حالی که در راهک شاهد منفی باندی مشاهده نشد. قطعه تکثیر شده شامل ۱۳۳ نوکلئوتید از انتهای Nib polymerase peptide و توالی کامل پروتئین پوششی (۸۲۵ نوکلئوتید) و ۱۰۶ نوکلئوتید از ابتدای UTR 3' می‌باشد. پس از هم‌ردیف‌سازی چندگانه با استفاده از نرم افزار MAFFT (Katoh *et al.* 2019)، توالی مربوط به ژن کامل CP جداسازی و جهت آنالیزهای مولکولی استفاده شد.

نتیجه بررسی‌های مولکولی ویروس SaLV در نمونه‌های زعفران مشکوک به آلودگی در واکنش RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی SaLV-F/SaLV-R، تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۰۶۳ جفت بازی بود. نتیجه الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۲ قابل مشاهده است، که براساس آن در نمونه‌های مثبت ارزیابی شده و نمونه شاهد مثبت،



شکل ۲. الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز یک درصد با جفت آغازگر اختصاصی (SaLV-F/SaLV-R). راهک ۱ شاهد مثبت. راهک ۲، ۳ و ۴ نمونه‌های آلوده به ویروس پنهان زعفران. راهک شماره ۵ شاهد منفی. M نشانگر مولکولی (۱۰۰ bp Fermentas).

Figure 2. Electrophoresis of the RT-PCR product on a 1% agarose gel using specific primers (SaLV-F/SaLV-R). Lane 1: Positive control. Lanes 2, 3, and 4: Samples infected with *Saffron latent virus*. Lane 5: Negative control. M: Molecular marker (100 bp, Fermentas).

(Ir-F3, Ir-F2, و فارس (Ir-kh12, Ir-kh1, Ir-kh16, Ir-kh13, Ir-F1) و اصفهان (Ir-I2, Ir-I3, Ir-I4, Ir-I5, Ir-I9) است (شکل ۳). در حالی که جدایه‌های استان‌های خراسان رضوی (Ir-kh2, Ir-kh3, Ir-kh4, Ir-kh5, Ir-kh7, Ir-kh8, Ir-kh10, Ir-Ir-F4,) و فارس (Ir-kh11, Ir-kh14, Ir-kh19, Ir-kh20, Ir-kh60 Ir-F5, Ir-F13) و تهران (Ir-T3, Ir-T7, Ir-T8) و ایزوله‌های این بررسی در گروه ۲ قرار گرفتند (شکل ۳). همچنین نتایج حاصل از مقایسه دو به دو ترادف نوکلئوتیدی پروتئین پوششی SaLV با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2 (Muhir *et al.* 2014) نشان داد که مقایسه توالی‌های جدایه‌های ویروس از هفت گیاه زعفران مورد مطالعه با هم شباهت بالایی دارند و درصد‌های همسانی نوکلئوتیدی آنها بین ۹۷٫۱ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود (شکل ۴).

بررسی‌های تبارزایی

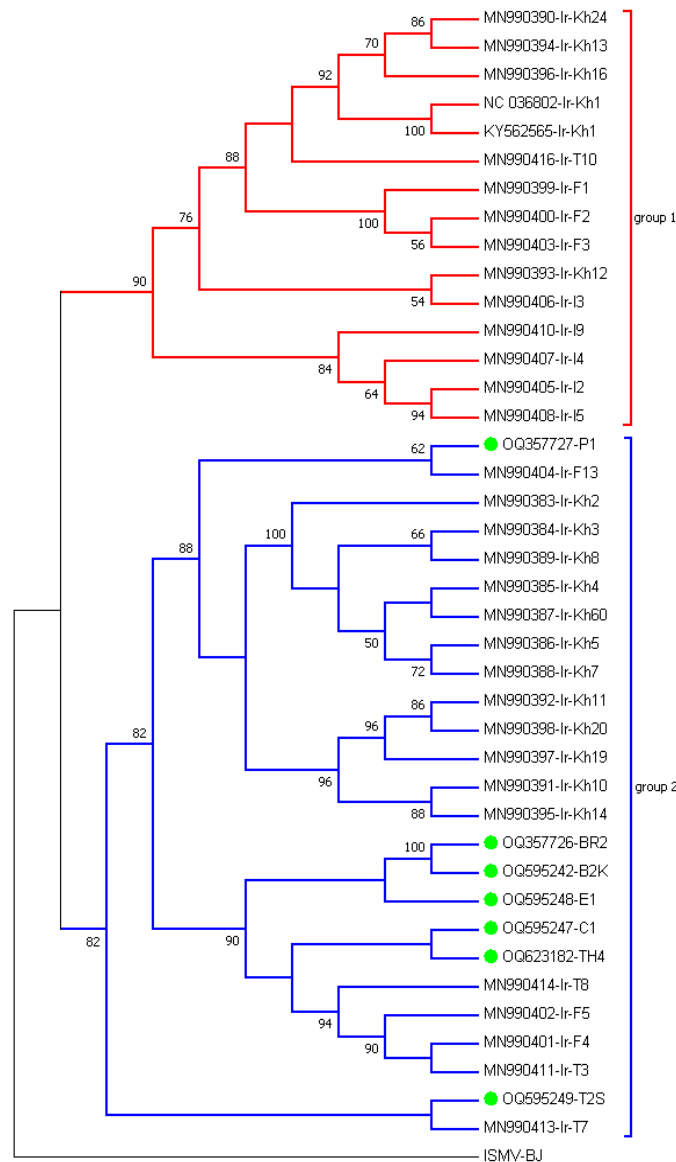
پس از دریافت و مقایسه توالی‌های خام با استفاده از برنامه BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI و تأیید وجود آلودگی ویروس نهفته زعفران، توالی‌ها توسط نرم‌افزار MEGA7 (Kumar *et al.* 2016) ویرایش و در نهایت به وسیله نرم‌افزار Geneious Prime (Biomatters, Auckland, New Zealand) به توالی نهایی تبدیل شدند. توالی‌های به‌دست آمده در ژن‌بانک با رس شماره‌های ذکر شده در جدول (۴) و جدایه‌های مربوطه به هر کدام ثبت شدند (شکل ۳، جدول ۴).

در درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس بهترین مدل انتخاب شده توسط MEGA7، دو گروه مجزا از هم ۱ و ۲ مشاهده شد. گروه ۱ شامل جدایه‌هایی از استان‌های خراسان رضوی (Ir-kh24)

جدول ۴. مشخصات جدایه‌های ایرانی SaLV، توالی‌یابی شده در این تحقیق و ۳۴ جدایه منتخب SaLV از ژن‌بانک (NCBI)، جهت مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی و انجام آنالیزهای تبارزایی.

Table 4. Characteristics of Iranian SaLV isolates identified in this research and 34 selected SaLV isolates from the World Gene Bank, in order to compare the nucleotide synonyms of the coat protein gene and perform genealogy analysis.

Isolate name	Country	Accession number	Host
<i>Ir-Kh2</i>	Iran	MN990383	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh3</i>	Iran	MN990384	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh4</i>	Iran	MN990385	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh5</i>	Iran	MN990386	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh60</i>	Iran	MN990387	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh7</i>	Iran	MN990388	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh8</i>	Iran	MN990389	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh24</i>	Iran	MN990390	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh10</i>	Iran	MN990391	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh11</i>	Iran	MN990392	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh12</i>	Iran	MN990393	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh14</i>	Iran	MN990395	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh16</i>	Iran	MN990396	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh19</i>	Iran	MN990397	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh20</i>	Iran	MN990398	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-F1</i>	Iran	MN990399	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-F2</i>	Iran	MN990400	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-F4</i>	Iran	MN990401	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-F5</i>	Iran	MN990402	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-F3</i>	Iran	MN990403	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-F13</i>	Iran	MN990404	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-I2</i>	Iran	MN990405	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-I3</i>	Iran	MN990406	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-I4</i>	Iran	MN990407	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-I5</i>	Iran	MN990408	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-I6</i>	Iran	MN990409	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-I9</i>	Iran	MN990410	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-T3</i>	Iran	MN990411	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-T7</i>	Iran	MN990413	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-T8</i>	Iran	MN990414	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-T10</i>	Iran	MN990416	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>BJ</i>	Iran	NC_029076	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh1</i>	Iran	NC_036802	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>Ir-Kh1</i>	Iran	KY562565	<i>C. sativus</i> (Saffron)
<i>BR2</i>	Iran(Bardaskan)	OQ357726	<i>C. sativus</i> (Saffron,leaf)
<i>P1</i>	Iran(Ferdows)	OQ357727	<i>C. sativus</i> (Saffron,leaf)
<i>B2K</i>	Iran(Bardaskan)	OQ595242	<i>C. sativus</i> (Saffron, stigma)
<i>C1</i>	Iran(Mashhad)	OQ595247	<i>C. sativus</i> (Saffron,leaf)
<i>E1</i>	Iran(Mashhad)	OQ595248	<i>C. sativus</i> (Saffron,leaf)
<i>T2S</i>	Iran(Tabas)	OQ595249	<i>C. sativus</i> (Saffron,leaf)
<i>TH4</i>	Iran(Torbat-e Heydariyeh)	OQ623182	<i>C. sativus</i> (Saffron,leaf)



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی به روش Maximum-Likelihood (ML) جدایه‌های ویروس پنهان زعفران بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی کامل ژن CP (۸۲۵ جفت باز) با استفاده از نرم‌افزار MEGAX بازسازی شد. مقادیر بوت‌استرپ (۱۰۰۰ تکرار) بر شاخه‌ها نشان داده شده است. مقادیر بوت‌استرپ کمتر از ۵۰٪ نمایش داده نشده‌اند. ویروس موزاییک شدید زنبق (ISMV) به عنوان گروه خارجی استفاده شد. جدایه‌های ایرانی این بررسی به دایره سبز رنگ نشاندار داده شده‌اند.

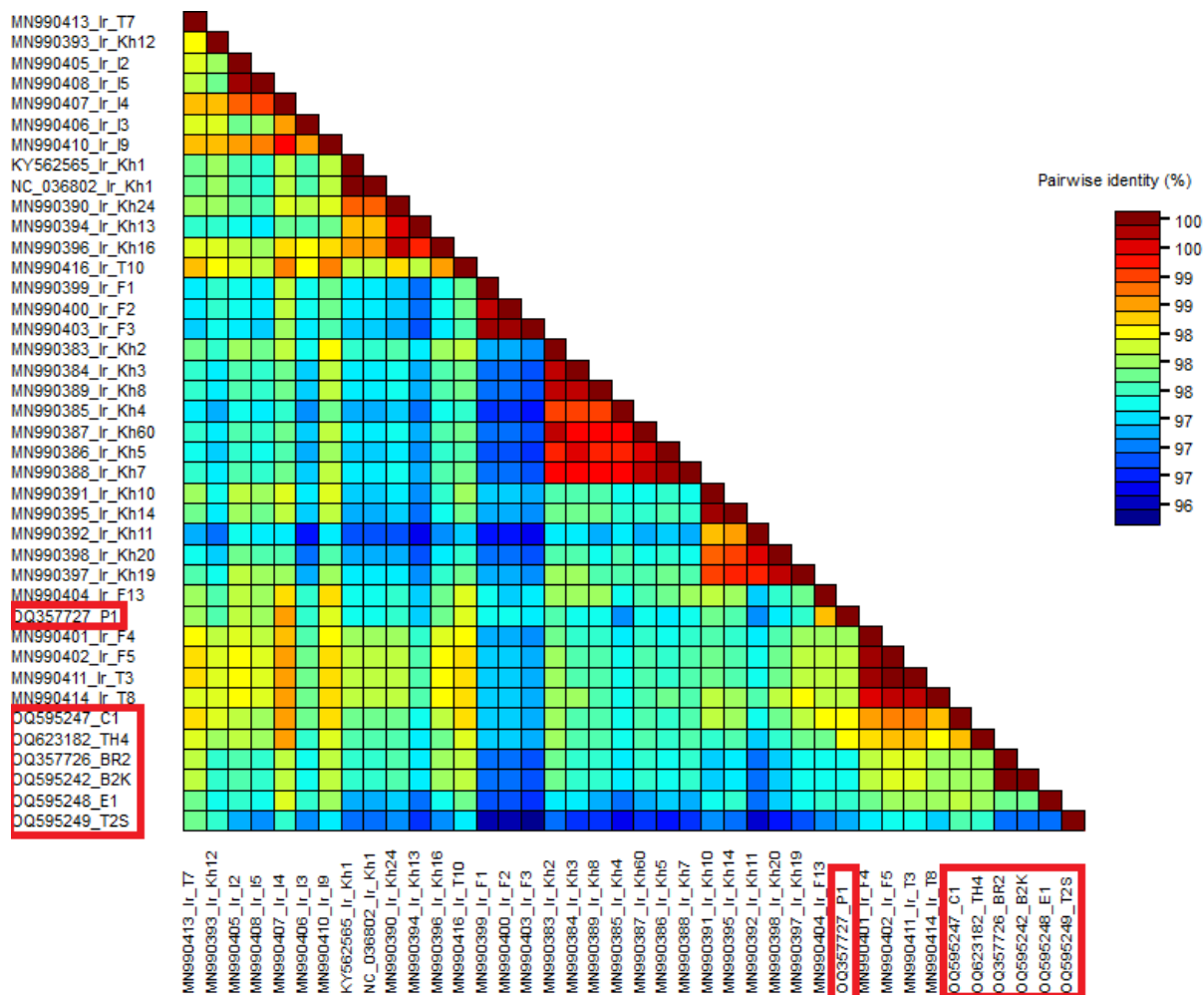
Figure 3. ML phylogenetic tree of *Saffron latent virus*, based on the complete nucleotide sequences of the CP gene (825 base pairs), was reconstructed using MEGAX software. Bootstrap values (1000 replicates) are shown on the branches. Bootstrap values less than 50 are not displayed. *Iris Severe Mosaic Virus* (ISMV) was used as an out-group. Iranian strains in this study are indicated by green circles.

IR-I6) از اصفهان به ترتیب به میزان ۹۸/۹۰، ۹۸/۵۴ و ۹۸/۴۲ و دارای کم‌ترین درصد یکسانی با جدایه‌ی (IR-F3) از استان فارس به ترتیب به میزان ۹۷/۰۹، ۹۶/۷۲ و ۹۶/۸۴ هستند. تک جدایه بردسکن (B2K) از استان خراسان رضوی که از کلاله جداسازی شده دارای بالاترین درصد یکسانی با جدایه (IR-I6) از اصفهان به میزان ۹۸/۴۲ و دارای کم‌ترین درصد یکسانی (۹۶/۸۴) با جدایه‌ای از استان فارس (IR-F3) است و جدایه‌ی

براساس مقایسه همین ناحیه از ژنوم با قطعه مشابه جدایه‌های منتخب از ژن‌بانک، نشان داد که جدایه‌های مشهد (C1) دارای بالاترین درصد یکسانی با دو جدایه (Ir-F5 و Ir-T3) از تهران و فارس به میزان ۹۹٫۱٪ می‌باشند. جدایه طیس T2S دارای کم‌ترین درصد یکسانی (۹۶/۲) با جدایه‌ای از استان فارس (IR-F3) بود. جدایه‌های C1 و E1 از مشهد و بردسکن (BR2) از استان خراسان رضوی دارای بالاترین درصد یکسانی با جدایه‌ی

دارای کم‌ترین درصد یکسانی (۹۷/۲۱) با جدایه‌ای از استان فارس (IR-F3) است.

تربت حیدریه (TH4) از استان خراسان رضوی دارای بالاترین درصد یکسانی با جدایه (IR-I4) از اصفهان به میزان ۹۸/۹۰ و



شکل ۴. ماتریکس مقایسه دو به دو ترادف‌های نوکلئوتیدی کامل ژن پروتئین پوششی هفت جدایه ایرانی (حلقه قرمز رنگ) با ۱۵ جدایه منتخب از ژن‌بانک با استفاده از نرم‌افزار SDT v1.2.

Figure 4. Pair-by-pair comparison matrix of complete nucleotide synonyms of coat protein gene of seven Iranian isolates (red circle) with 15 selected isolates from gene bank using SDT v1.2 software.

کشت، انواع زعفران یا منطقه کشت، می‌تواند باعث افزایش بیماری‌زایی ژنوتیپ‌های فعلی SaLV شود یا تکامل آن را به سمت بیماری‌زایی بالاتر هدایت کند و این مسئله نباید نادیده گرفته شود (García-Arenal & Fraile 2016). بنابراین، SaLV می‌تواند یک مشکل پتانسیلی برای تولید زعفران باشد، زیرا مقاومت کیفی در گیاهان زعفران شناسایی نشده است (Corwin & Kliebenstein, 2017). در بررسی ۱۵۲ نمونه بافت برگ و گل زعفران برداشت شده از مزارع استان‌های خراسان رضوی و جنوبی، توسط آزمون RT-PCR بیش از ۶۰٪ آلودگی به ویروس پنهان زعفران نشان داد. بیش از ۷۰٪ از نمونه‌های زعفران مورد

بحث

زعفران به صورت رویشی از طریق بنه‌ها تکثیر می‌شود و به همین دلیل ویروس می‌تواند به راحتی در هنگام تکثیر گیاهان منتشر شود. با این حال، وجود آلودگی SaLV بدون علائم، به معنی عدم تأثیر آن‌ها بر توسعه و عملکرد گیاهان نیست و این مسئله نیازمند تحلیل‌های دقیق‌تر است. همچنین، آلودگی SaLV در گیاهان زعفران اغلب به صورت پنهان و بدون علائم است، بنابراین تا زمانی که منجر به آلودگی‌های شدیدتری که موجب ایجاد علائم قابل مشاهده و یا کاهش محصول می‌شوند نشود، قابل ردیابی نخواهد بود. تغییرات آینده در سیستم‌های

Movi et al. (2022) براساس ژن P1, P3 بود و تفاوت منطقه جغرافیایی نمونه برداری هیچ اثری بر این جایگاه های ژنی نداشت. این نتیجه به دلیل تکثیر گیاه زعفران از طریق بینه قابل توجه بوده و در نتیجه نمی توان آنها را بر اساس نواحی مختلف جغرافیایی از یکدیگر متمایز نمود. همچنین باتوجه به قرار گرفتن جدایه B2K، جدا شده از کلاله زعفران در کنار سایر جدایه های SaLV جدا شده از برگ زعفران، می توان نتیجه گرفت که محل جداسازی ویروس (برگ و کلاله زعفران) نقشی در گروه بندی جدایه های SaLV ندارد.

لازم به ذکر است که در تحلیل تبارزایی ژن CP در جدایه های SaLV پنج جدایه این تحقیق در یک گروه جداگانه از سایر جدایه های ژن بانک قرار گرفتند که می تواند بیانگر تنوع ناحیه کد کننده این ژن در جدایه های این تحقیق در مقایسه با جدایه های ژن بانک باشد. که نیازمند بررسی های نو ترکیبی دقیق در این ناحیه ژنی است. عدم تاثیر میزبان و منطقه نمونه برداری در بررسی های تبارزایی ناحیه کد کننده پروتئین پوششی نیز می تواند نشان دهنده وجود جریان ژنی (Gene Flow) در این ناحیه است (Movi et al. 2022). تحقیق حاضر برای اولین بار به ردیابی مولکولی ویروس پنهان زعفران در بینه و گل و همینطور بررسی تبارزایی آن بر اساس پروتئین پوششی در ایران پرداخته است.

سپاسگزاری

با تشکر از دانشگاه بیرجند و نیز همکاری بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، که امکان انجام آزمایشات فوق را در مرکز مذکور فراهم نمودند.

بررسی Parizad et al. (2018) (۶۴۱ نمونه از ۸۹۰ نمونه) آلودگی به SaLV نشان دادند که دال بر وقوع بالای این پوتی ویروس جدید شناخته شده در گیاهان زعفران ایران است. همین طور در تحقیق حاضر برای اولین بار ویروس مذکور از بینه و گل نیز گزارش گردید. لذا درصد آلودگی بالا به این ویروس و حضور آن در بخش های مختلف گیاه بیانگر اهمیت خسارت ناشی از آن است. به ویژه همانطور که اشاره گردید با ردیابی ویروس در بینه ها امکان اپیدمی و خسارت بیشتر آن در مزارع شدت می یابد و بنابراین احتمال بروز اپیدمی آن در ابتدای فصل وجود دارد لذا اطمینان از سلامت بینه های زعفران در زمان کشت می تواند به کاهش آلودگی مزارع کمک نماید.

از آنجائیکه این ویروس اولین بار از ایران گزارش گردیده است تحقیقات تبارزایی آن بر اساس تعیین توالی بخش هایی از ژنوم نظیر UTR, P1 تنها به مقایسه جایگاه تاکسونومی این ویروس با سایر گونه های پوتی ویروس پرداخته است و از طرفی آن را به عنوان یکی از گونه های پوتی ویروس و در عین حال ویروس های غالب در مزارع زعفران معرفی می کند (Parizad et al. 2016). همچنین Movi et al. (2022) به بررسی تبارزایی ویروس پنهان زعفران بر اساس دو ناحیه کد کننده ژن P1, P3 که دو پروتئین تاثیر گذار در بیماریزایی می باشند، پرداختند. در این تحقیق جدایه ها بر اساس ژن های ذکر شده در دو گروه تبارزایی قرار گرفتند و منطقه نمونه برداری اثری در تفکیک جدایه ها نداشت. اما از آنجائیکه منطقه ژنی رمز کننده پروتئین پوششی یکی از مهم ترین جایگاه های ژنی در تبارزایی است و در تمامی گونه های جنس پوتی ویروس به عنوان توالی نماینده در تبارزایی مطرح می باشد. در تحقیق حاضر برای اولین بار این ناحیه ژنی در بررسی تبارزایی بین گونه ای این ویروس انتخاب گردید. با بررسی درخت تبارزایی رسم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه CP، جدایه های مختلف در دو گروه اصلی قرار گرفتند که مشابه نتایج

forms of saffron plant (*Crocus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(2): 457–63.

Fernández JA, 2004. Biology. Biotechnology & Biomedicine of Saffron. *Recent Research Developments in Plant Science* 2: 127–159.

Fraila A, García-Arenal F, 2016. Environment & evolution modulate plant virus pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 17: 50–56.

Grilli Caiola M, Faoro F, 2011. Latent virus infections in *Crocus sativus* & *Crocus cartwrightianus*. *Phytopathol Mediterranea* 50(2): 175–182.

References

Corwin JA, Kliebenstein DJ, 2017. Quantitative resistance: More than just perception of a Pathogen. *The Plant Cell* 29: 655–665.

Edwardson JR, Christie RG, Ko NJ, 1984. Potyvirus cylindrical inclusions- Subdivision-IV. *Phytopathology* 74(9): 1111–1114.

Escribano J, Rubio A, Alvarez-Ortí M, Molina A, Fernández JA, 2000. Purification & characterization of a mannan-binding lectin specifically expressed in

- Hollings M, Brunt AA, 1981. *Potyvirus* group. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* 7: 254
- Hull R, 2002. Matthews' Plant Virology. *Academic Press. San Diego, USA*: 1001.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD, 2019. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice & visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20: 1160–1166.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary Genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology & Evolution* 33(7): 1870–4.
- Miglino R, Jodlowska A, Van schadewijk AR, 2005. First report of *Narcissus mosaic virus* infecting *Crocus* spp. cultivars in the Netherlands. *Plant Disease* 89(3): 342–342.
- Molina RV, Valero M, Navarro Y, Guardiola JL, 2005. Temperature effects on flower formation in Saffron (*Crocus Sativus* L.). *Scientia Horticulturae* 103(3): 361–379.
- Movi S, 2018. Genetic diversity of *saffron latent virus* (SaLV) based on the P1 region & its several features, Master Thesis, University of Tehran. 163pp.
- Movi S, Dizadji A, Parizad S, Zarghani SN, 2022. Biological characteristics & genetic variation analyses of *Saffron latent virus* (SaLV) based on genomic P1-Pro and P3 regions. *European Journal of Plant Pathology* 164(2): 299–312.
- Muhire BM, Varsani A, Martin DP, 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS One* 26(9): e108277.
- Omid Beigi R, 2000. Production & Processing of Medicinal Plants. *Astan Quds Razavi Publications* 4: 159–166.
- Parizad S, 2012. Identification & investigation of infectious viruses in saffron (*Crocus sativus* L.) cultivation regions in Iran. Master Thesis. College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran.
- Parizad S, 2018. Description & genetic diversity of saffron pathogenic Poty virus species and investigating the effect of the virus on some metabolites Secondary host, PhD thesis, University of Tehran. 145pp.
- Parizad S, Dizadji A, Kohi Habibi M, Mohammadi GM, Kalantari S, Izadpanah F, García-Arenal F, Winter S, 2016. Identification and Partial characterization of the virus infecting saffron (*Crocus Sativus*) in Iran. *Iranian Journal of Plant Protection Science*; 47(2): 1–25
- Paseban F, 2006. Effective factors on exporting iranian saffron. *Journal of Sustainable Growth & Development (the Economic Research)* 6(2): 1–15.
- Shukla DD, Tosic M, Jilka J, Ford RE, Toler RW, Langham MAC, 1989. Taxonomy of Potyviruses infecting maize, sorghum & sugarcane in Australia & the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. *Phytopathology*. 79(2): 223–229.



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