

مقاله پژوهشی:

ردیابی و بررسی مولکولی ویروس موزاییک شدید زنبق (ISMV) در مزارع زعفران استان خراسان جنوبی و رضوی

معصومه طاووسی^۱، سیده عاطفه حسینی^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی و باغبانی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران.

۲- دانشیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی و باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران.

*نویسنده مسئول: [Email: ahosseini@birjand.ac.ir](mailto:ahosseini@birjand.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۷

چکیده

زعفران با نام علمی (*Crocus sativus* L.) متعلق به خانواده زنبقیان (*Iridaceae*) یکی از محصولات اقتصادی و استراتژیک کشور می‌باشد، اخیراً بیماری‌های ویروسی متعددی از آن گزارش شده است. ویروس موزاییک شدید زنبق (*Iris severe mosaic virus*) روی گیاهان زینتی ایران در سال‌های اخیر گزارش شده اما تا کنون گزارشی از وقوع آن روی زعفران نبوده است. جهت شناسایی ویروس موزاییک شدید زنبق روی این گیاه طی آبان و آذر ماه سال ۱۳۹۸، ۱۳۰ نمونه‌ی دارای علائم زردی، کوتولگی، موزاییک، پیچیدگی برگ‌ها از مزارع زعفران استان‌های خراسان جنوبی و رضوی گزارش گردید. نمونه‌های مشکوک ابتدا با آزمون زنجیره ای پلیمرز و آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک شدید زنبق، آزمایش و نهایتاً منجر به تکثیر قطعه ای به طول ۹۱۷ جفت باز در ۵ نمونه آلوده به ISMV گردید. نمونه‌ها جهت بررسی‌های تکمیلی و تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. بررسی‌های تبارزایی بر مبنای توالی ژن پروتئین پوششی ویروس با نرم افزارهای مرتبط به منظور تعیین جایگاه ویروس، انجام گردید. پنج جدایه شناسایی شده از ویروس موزاییک شدید زنبق و سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن در دو گروه تبارزایی و نزدیک به جدایه‌های چین قرار گرفتند. بررسی‌ها در این تحقیق نشان داد که گروه‌ها و زیرگروه‌های تبارزایی، بر مبنای تفاوت در منطقه جغرافیایی تا حدودی از یکدیگر تفکیک و در زیر گروه‌های جداگانه ای قرار گرفتند. بررسی‌های نوترکیبی در رابطه با این ویروس بیانگر این است که در هیچ کدام از جدایه‌های گزارش شده، نوترکیبی محتمل نیست. این تحقیق اولین گزارش از وقوع این ویروس و اولین بررسی مولکولی و تبارزایی جدایه‌های ویروس مذکور در مزارع زعفران خراسان جنوبی و رضوی است.

واژه‌های کلیدی: آغازگر اختصاصی، توالی‌یابی، ژنوم پروتئین پوششی.

مقدمه

موزاییک روی تعداد زیادی از گیاهان زنبق کاشته شده در ژاپن مشاهده شد (Inouye & Mitsuhashi et al., 1978). سپس در سال ۱۹۹۴ از هلند اولین توالی منتشر شده از ویروس موزاییک شدید زنبق که حاصل توالی‌یابی پروتئین *Nib* موجود در ناحیه ی^۳ پوشش پروتئینی بود گزارش شد (Van der Vlugt et al., 1994). پارک^۱ و همکاران (Park et al., 2000) در سال ۲۰۰۰ جدایه‌ای از ویروس موزاییک شدید زنبق را پیدا کرده و آن را *ISMV-K* نامیدند. گزارشی مبنی بر وجود ویروس موزاییک شدید زنبق در سال ۲۰۰۴ از کشور هند به ثبت رسید (Kulshrestha et al., 2004). در بهار سال ۲۰۰۸ در قسمت‌های شمالی چین مثل شاندانگ^۲ و هانگژو^۳ تخریب بسیار گسترده‌ای در اثر ویروس موزاییک شدید زنبق روی زنبق بومی این مناطق (*Iris ensata Thunb*) مشاهده شد (Yan et al., 2010). اولین بار توالی کامل ژنوم ویروس موزاییک شدید زنبق توسط لی و همکاران (Li et al., 2016) در سال ۲۰۱۶ گزارش شد. این ویروس در ایران اولین بار در سال ۲۰۱۵ توسط ناطقی و همکاران (Nateqi et al., 2015) از دانشگاه تهران و از گیاه زنبق گزارش شد. مصرف بالای ازت در مزارع زعفران آلودگی‌ها را افزایش می‌دهد (Mohtashami, T., 2018). با توجه به اهمیت بیماری‌های ویروسی زعفران که دو تا از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی از منطقه خراسان جنوبی گزارش شده است (Heydari et al., 2018; Farokhvand et al., 2019) و اینکه تاکنون گزارشی مبنی بر ویروس موزاییک شدید زنبق در ایران روی زعفران نبوده است، بنابراین تحقیق حاضر به شناسایی و بررسی مولکولی ویروس موزاییک شدید زنبق روی گیاه زعفران خواهد پرداخت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و ردیابی ویروس در پاییز ۹۸ از مزارع زعفران استان‌های خراسان جنوبی (شهرستان‌های قائن، بشرویه، بیرجند، خوسف و فردوس) و خراسان رضوی (شهرستان‌های تربت حیدریه، سبزوار، فیض‌آباد) بصورت تصادفی انجام و تعداد ۱۳۰ نمونه مشکوک به

زعفران با نام عمومی *Saffron* و با نام علمی *Crocus sativus* L. گیاهی علفی، چند ساله و متعلق به خانواده ی زنبقیان (*Iridaceae*) است. پیاز(بنه) زعفران را کورم می‌نامند که ساقه‌ی زیرزمینی کوتاه، گوشتی، توپر، مدور، سخت و به رنگ سفید بوده و با پوششی از الیاف قهوه‌ای رنگ و شبکه‌مانند پوشیده شده، وزن پیازها متفاوت و از ۰/۵ تا ۶۰ گرم متفاوت است (Ahmadian, 2013). بسیاری از پژوهشگران منشأ زعفران را ایران و کشمیر می‌دانند (Winterhalter & Stranbinger, 2000; Caiola & Canin, 2010). منابع علمی داخلی نیز با استناد به اسناد تاریخی تعلق زعفران به ایران را اثبات کرده‌اند و رویشگاه اولیه‌ی این گیاه را دامنه‌های زاگرس به ویژه الوند و زاگرس ذکر کرده‌اند (Abrishami, 2004; Ebrahimzade et al., 2006). از جنبه‌های گیاه‌شناسی وجود تنوع زیاد گونه‌های وحشی زعفران در ایران (۸ گونه ی وحشی) از جمله *C. hausknechtii* که شبیه به زعفران زراعی است و عقیده بر آن است که زعفران زراعی از آن مشتق شده است، می‌تواند تایید دیگری بر منشأ باشد (Koocheki et al., 2012).

استان‌های خراسان جنوبی و رضوی قطب عمده‌ی تولید زعفران اند و از نظر میزان تولید و عملکرد شهرهای تربت حیدریه و زاوه مقام اول تولید در جهان را دارند و به آنها پایتخت طلای سرخ می‌گویند (Ghorbanpoor & Javan, 2016). علاوه بر دو استان نام‌برده این گیاه در استان‌های فارس، اصفهان، همدان و ... نیز تولید می‌شود (Karbasi et al., 2016).

ویروس موزاییک شدید زنبق *Iris severe mosaic virus (ISMV)* از اعضاء جنس پوتی ویروس از خانواده‌ی پوتی‌ویریده و ژنوم این ویروس *RNA* یک رشته ای مثبت (*ssRNA(+)*) شامل ۱۰۴۳ نوکلئوتید (به جز دم *poly A*) و چهارچوب خوانش (*ORF*) بزرگ است که این قاب خواندنی توسط یک پلی پروتئین که متشکل از ۳۳۱۶ آمینواسید است کد می‌شود. نتایج بررسی‌های تبارزایی نشان داد که این ویروس یک عضو جدا در جنس *Potyvirus* در خانواده ی *Potyviridae*، رشته ای (در اندازه ی ۷۵۰ * ۱۲ نانومتر) و خمش-پذیر است (Li et al., 2016). در سال ۱۹۸۰ علایم

¹ Park² Shondong³ Hangzhou

علایم ویروسی نظیر کوتولگی، کوچک شدن سطح برگ، چروکیدگی و بدشکلی برگ‌ها، جمع‌آوری گردید (جدول زردی، نواری شدن و سوزنی شدن گلبرگ‌ها، (۱).

جدول ۱- مکان‌های نمونه برداری جهت شناسایی ویروس موزاییک شدید زنبق از گیاه زعفران در سال ۱۳۹۸

Table 1- Provinces of Sampling in order to identify ISMV from saffron in 2018

تعداد نمونه Number	تاریخ نمونه برداری Sampling date	مناطق نمونه برداری Sampling sites	شهرستان City	نام استان Province's name
15	2019/11/16	اسفدن Esfaden	قائن Ghayen	خراسان جنوبی South Khorasan
8	2019/11/17	تیغاب Tighab	قائن Ghayen	
9	2019/11/18	نوفرست Noforest	بیرجند Birjand	
15	2019/11/19	بوریا Booriya	تربت حیدریه Torbat heydariye	خراسان رضوی Razavi Khorasan
3	2019/11/19	قلعه نو Ghaleno	تربت حیدریه Torbat heydariye	
5	2019/11/24	خیرآباد (مهولات) Kheyrabad	فیض آباد Feyzabad	
32	2019/11/30	ششتمد Sheshtomad	سبزوار Sabzevar	
4	2019/12/01	فردوس Ferdows	فردوس Ferdows	خراسان جنوبی South Khorasan
26	2019/12/06	خوسف Khusf	خوسف Khusf	
13	2019/12/07	ارسک Eresk	بشروییه Boshruyeh	

مدت یک دقیقه بر روی یخ منتقل و به هر نمونه مقدار ۴ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر dNTPs، و ۰/۵ میکرو-لیتر آنزیم (۱۰۰۰u) (RevertAidFermentase , Reverse Transcriptase) اضافه نموده و نمونه‌ها را به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر گذاشته شد.

تکثیر پروتئین پوششی با استفاده روش واکنش

زنجیره ای پلی مرز

برای تکثیر ژن پروتئین پوششی در لوله‌ای ۱۲/۵ میکرولیتر از premix(Master mix Red 2x (PCR، یک میکرولیتر آغازگر مستقیم، یک میکرولیتر آغازگر معکوس و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه کرده و سپس ۲۱ میکرولیتر به لوله‌های کوچک منتقل شده و چهار میکرولیتر از cDNA هر نمونه به

استخراج RNA کل

استخراج RNA به‌طور عمده از برگ‌های جوان و تازه گیاه با استفاده از کیت استخراج RNA توتال شرکت دنایست و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

روش نسخه برداری معکوس

برای سنتز cDNA (رشته‌ی مکمل) در این تحقیق از آغازگرهای اختصاصی ویروس موزاییک شدید زنبق استفاده شد (جدول ۲)، در یک لوله، به ازای هر نمونه ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲/۵ میکرولیتر از آغازگر معکوس اضافه شد، سپس ۸/۵ میکرولیتر از مخلوط تهیه شده بعلاوه ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده از هر نمونه را در لوله‌های جداگانه ریخته و مواد مخلوط شده را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه در دستگاه بن ماری قرار گرفت پس از آن نمونه‌ها را به

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی ISMV مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلی‌مراز برای تکثیر ناحیه‌ی پوشش پروتئینی (CP)

Table 2- Specifications of ISMV specific primers used in polymerase chain reaction to amplify the coat protein (CP) region

مشخصات Properties	ترادف Sequence	نام آغازگر Primer name
Specific Primers اختصاصی	GGAGATAGTGAGGACGCTGC	ISMV F
Secific Primers اختصاصی	CAAATTCGCACACCATTTAAG	ISMV R

جدول ۳- مواد مورد استفاده برای تکثیر C-DNA ساخته شده در مرحله ی RT

Table 3- Materials used for amplification of C-DNA in RT step

واکنش‌گرها/Reactions	مقدار مورد نیاز (میکرو لیتر)/Quantity
Premix	12/5
Reverse Primer	1
Forward Primer	1
Water	5/6
cDNA	4
Total	25

تعیین توالی ویروس
 قطعه‌های تکثیر شده ی جدایه ی مورد نظر از روی ژل یا محصول PCR استخراج و با استفاده از کیت Gel SV® System Wizard up-Clean خالص‌سازی و جهت تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال گردید. به منظور تایید کامل وجود جدایه های این ویروس و همچنین بررسی جایگاه تبارزایی آنها در مقایسه با جدایه‌های دنیا، توالی‌های حاصل با استفاده از ابزار NCBI BLAST در پایگاه (<http://www.ncbi.nlm.nih>) مشابهت یابی شد.

سپس به دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی یک چرخه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت سه دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه متشکل از دمای ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد به مدت یک دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه متشکل از دمای ۵۳ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد به مدت یک دقیقه انجام شد. در نهایت دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ده دقیقه به عنوان تکمیل پلیمریزاسیون، به کار رفت. محصولات PCR، در ژل آگارز یک درصد حاوی رنگ Green Viwer (پارس طوس- ایران) الکتروفورز گردید



شکل ۱- پیچیدگی برگ، موزاییک برگ و کلروز مشاهده شده در گیاه زعفران آلوده با ویروس ISMV
Figure 1- Leaf curl, leaf mosaic and chlorosis caused by ISMV virus on saffron plant

نتایج

بررسی علائم ISMV روی گیاه زعفران

در گیاهان زعفران جمع آوری شده علائم متفاوتی شامل کوتولگی بوته، موزاییک شدن برگها، پیچیدگی برگ، گلبرگ سوزنی و زردی مشاهده شد. در نمونه های زعفران جمع آوری شده از مناطق گفته شده و حتی در یک مزرعه مشخص زعفران، تنوع علائم در نمونه های آلوده مشاهده گردید (شکل ۱).

تعیین توالی پروتئین پوششی جدایه های ویروس

به منظور مطالعات تبارزایی، پنج جدایه از ویروس موزاییک شدید زنبق که از مزارع زعفران شهرستان های شهرستان های بیرجند، تربت حیدریه، خوسف، فیض آباد و قاین جمع آوری شده بود، تعیین توالی گردید،

مقایسه توالی های حاصل با سایر توالی ها در پایگاه بلاست، نشان از آلودگی پنج جدایه تعیین توالی شده در این تحقیق، به ویروس موزاییک شدید زنبق داشت (جدول ۴).

بررسی های تبارزایی

درخت تبارزایی بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی به طول ۹۱۷ نوکلئوتید که به خوبی خوانش شده، رسم شد (شکل ۲). بررسی تبارزایی جدایه ایرانی ویروس موزاییک شدید زنبق و ۱۷ جدایه ای موجود در بانک ژن با روش Maximum likelihood و نرم افزار MegaX به عنوان بهترین روش انجام شد. همچنین مقایسه ماتریکس تشابه و نو ترکیبی به ترتیب با دو نرم افزار SDTV و RdP صورت گرفت. مشخصات جدایه-

های بانک ژن مورد استفاده در این تحقیق در جدول اطلاعات تبارزایی (جدول ۵) ذکر شد.

زیرگروه اول شامل جدایه‌های Ir2، KT998898، Ir1، Ir3، FJ481099، MK616337، Ir4، Ir5، KT998899 است. جدایه‌های Ir1، Ir2، Ir3، Ir4، Ir5 از ایران و میزبان آن‌ها گیاه زعفران است. جدایه‌های Ir5، Ir4، Ir3، Ir2، Ir1، KT998899، KT998898 از کشور چین و میزبان آن‌ها *Iris tectorum* می‌باشد. جدایه‌ی FJ481099 از کشور چین و از روی زنبق چینی و جدایه‌ی MK616337 از کشور یمن و از گیاه *I. albicans* گزارش شده است. زیرشاخه‌ی دوم شامل AF034839 از کشور هلند و میزبان آن گونه‌های مختلف زنبق، AJ549755 از کشور هند و میزبان آن *I. hollandica* و X75939 از کشور کره و میزبان آن گونه‌های مختلف زنبق هستند. زیرشاخه‌ی سوم شامل جدایه‌ی ایرانی KJ878662 است که از روی گونه‌های مختلف زنبق گزارش شده است. زیرشاخه‌ی چهارم شامل AB079649 که از کشور چین گزارش شده و

میزبان آن گیاه *Ornithogalum thyrsoides* می‌باشد. زیرشاخه‌ی پنجم شامل AB000472 که از کشور چین و گیاهانی که پیاز و کورم دارند میزبان آن هستند. DQ519034 از کشور هند و میزبان آن سیر است. زیرشاخه‌ی ششم شامل DQ436918 و همچنین DQ436919 است که هر دو جدایه از کشور نیوزلند و از روی گیاه *I. wedgewood* گزارش و ثبت شده اند. شاخه‌ی دوم شامل دو جدایه‌ی KY190218 و KY190219 که میزبان هر دو *I. germanica* و از کشور مکزیک گزارش شده است. جدایه‌های این تحقیق همگی نزدیک به جدایه‌های ثبت شده از کشور چین هستند (شکل ۲). ماتریکس تشابه رسم شده با نرم افزار SDTV نشان داد که بیش‌ترین شباهت بین جدایه‌های ایرانی (Ir1 و Ir4) و جدایه‌ی KT998899 که ویروس موزاییک شدید زنبق از کشور چین با درصد شباهت ۹۸٪ و همین‌طور کم‌ترین تشابه بین جدایه‌ی ایرانی Ir5 و DQ436919 که جدایه‌ی از کشور نیوزلند با سطح تشابه ۵۶٪ است، می‌باشد (شکل ۳).

جدول ۴- جدایه‌های ایرانی ISMV جدا شده از گیاه زعفران که در این تحقیق تعیین توالی شدند.

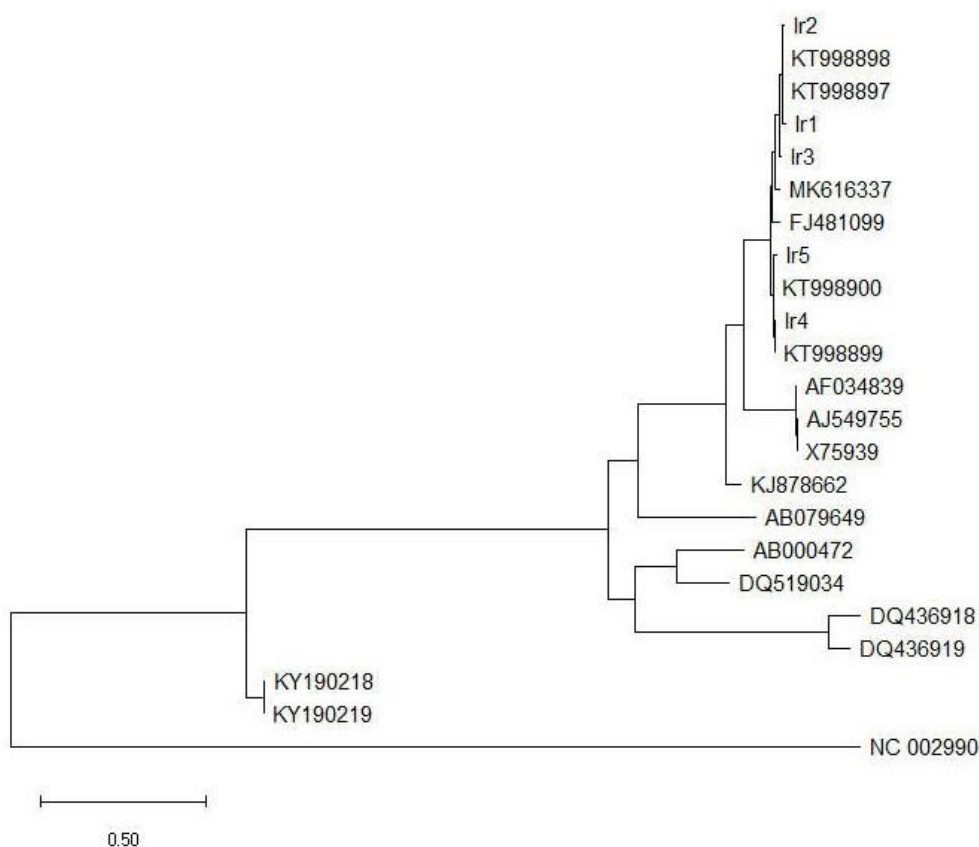
Table 4- Sequenced Iranian isolates of ISMV isolated from saffron

تاریخ نمونه برداری Date sampling	محل نمونه برداری Geographical sampling	نام جدایه Isolate name	ردیف
2019/11/18	بیرجند- روستای نوفرست Birjand- Noforest village	Ir1	1
2019/12/06	خوسف Khusf	Ir2	2
2019/11/19	تربت حیدریه- روستای بوریا Torbatheydariyeh- Booriya	Ir3	3
2019/11/24	فیض آباد- روستای خیرآباد Feyzabad- kheirabad	Ir4	4
2019/11/17	قائن- روستای تیغاب Ghayen- Thighab	Ir5	5

جدول ۵- اطلاعات جدایه های بانک ژن مورد استفاده در درخت فیلوژنی

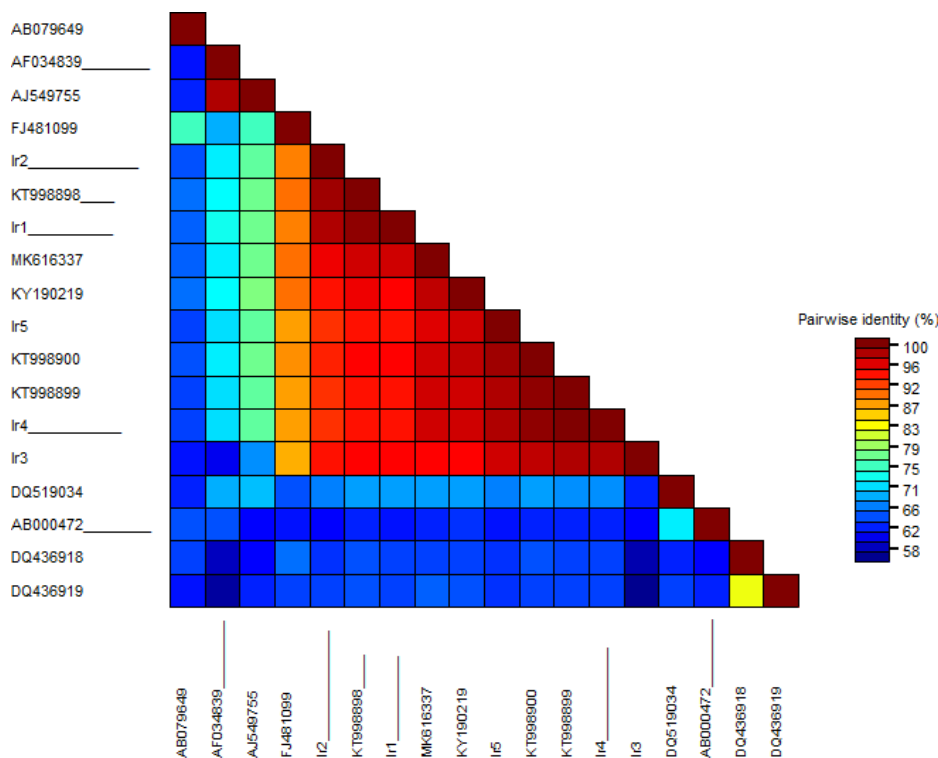
Table 5- Information of gene bank isolates used in phylogenetic tree

کشور Country	میزبان Host	Accession Number	نام ایزوله ی ویروس Virus isolate	ردیف
Netherlands	<i>Iris sp.</i>	X75939	<i>Iris severe mosaic virus</i>	1
Yemen	<i>Iris albicans</i>	MK616337	<i>Iris severe mosaic virus</i>	2
China	<i>Chinese iris</i>	FJ481099	<i>Iris severe mosaic virus</i>	3
China	<i>Iris tectorum</i>	KT998897	<i>Iris severe mosaic virus</i>	4
China	<i>Iris tectorum</i>	KT998898	<i>Iris severe mosaic virus</i>	5
China	<i>Iris tectorum</i>	KT998899	<i>Iris severe mosaic virus</i>	6
China	<i>Iris tectorum</i>	KT998900	<i>Iris severe mosaic virus</i>	7
India	<i>Iris hollandica</i>	AJ549755	<i>Iris severe mosaic virus</i>	8
Korea	<i>Iris sp.</i>	AF034839	<i>Iris severe mosaic virus</i>	9
Iran	<i>Iris sp.</i>	KJ878662	<i>Iris severe mosaic virus</i>	10
Japan	<i>Allium plants</i>	AB000472	<i>Onion yellow dwarf virus</i>	11
China	<i>Ornithogalum thyrsoides</i>	AB079649	<i>Ornithogalum mosaic virus</i>	12
Newzealand	<i>Iris wedgewood</i>	DQ436918	<i>Iris mild mosaic virus</i>	13
Newzealand	<i>Iris wedgewood</i>	DQ436919	<i>Iris mild mosaic virus</i>	14
Mexico	<i>Iris germanica</i>	KY190218	<i>Iris sever mosaic virus</i>	15
Mexico	<i>Iris germanica</i>	KY190219	<i>Iris sever mosaic virus</i>	16
India	<i>Garlic</i>	DQ519034	<i>Onion yellow dwarf virus</i>	17
china	<i>Barley</i>	NC_002990	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	18



شکل ۲- درخت تبارزایی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس موزائیک شدید زنبق مربوط به پنج جدایه زعفران و جدایه‌های موجود در بانک ژن. با استفاده از نرم افزار MEGAX و روش Maximum likelihood و بوت استرپ ۱۰۰۰ به عنوان بهترین روش رسم شد. ویروس *Barley yellow mosaic virus (BYMV)* به عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است.

Figure 2- The phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of the coat protein genes of *Iris sever mosaic virus* isolates related to five saffron and isolates in the gene bank. Using Mega X and maximum likelihood methods. *Barley yellow mosaic virus* (BYMV) is considered as an out group.



شکل ۳- مقایسه درصد همولوژی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی جدایه ایرانی و جدایه‌های موجود در بانک ژن به روش Clustal W با برنامه‌ی SDTv.

Figure 3- Comparison of nucleotide homology percentage of enveloping protein of Iranian isolate and isolates in gene bank by Clustal W method with SDTv program.

نتیجه‌گیری

گیاهان پیازدار و زینتی خسارت‌های فراوانی ایجاد میکنند. اگر چه اعضای این جنس در جنبه‌های بیولوژی و مولکولی بسیار مورد مطالعه واقع شده‌اند اما تحقیقات جامع در خصوص تعیین توالی گونه‌هایی نظیر ویروس موزاییک زنبق در جهان بسیار اندک است. لذا تعیین توالی ژن پوشش پروتئینی به عنوان مهم‌ترین ژن در فیلوژنی ویروس‌های این خانواده مورد توجه قرار گرفت. براساس بررسی‌های تبارزایی و درخت فیلوژنی رسم شده بر مبنای این ژن، جدایه‌های ایرانی در گروه یک نزدیک به جدایه‌های چین و در شاخه‌ی اول طبقه بندی گردیدند. نتایج این تحقیق مشابه با نتایج سایر محققان بود و نشان داد جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های چین از اجداد مشترک ویروسی مشتق شده‌اند (Nateghi et al., Nishigawa et al., 2021).

(2015).

در این تحقیق از میان تعداد ۱۳۰ نمونه برگ گیاه زعفران که از مزارع استان‌های خراسان جنوبی و رضوی جمع شده بود، ۵ نمونه آلوده به ویروس موزاییک شدید زنبق بودند. در مناطق و شهرستان‌های متفاوت این دو استان، در میزان آلودگی در میان نمونه‌های برداشت شده در این تحقیق، تفاوت مشاهده شد که علل این تفاوت می‌تواند تغییرات اکولوژیکی، وجود یا عدم وجود منابع اولیه‌ی نگهدارنده‌ی ویروس که از جمله‌ی آن علف‌های هرز موجود در مزارع زعفران و همچنین فعالیت ناقلین هستند، اشاره کرد. پوتی ویروس‌ها با شته و رابطه ناپایا منتقل می‌شوند و سبب ایجاد علائم شدید در گیاهان می‌گردند. ویروس موزاییک شدید زنبق که در این جنس واقع شده، روی

جدایه های ویروس ندارد و یک جدایه میزبان های متعددی را آلوده می کند، بنابراین وجود و حضور علف های هرز خصوصا علف های هرز پیاز دار و میزبان این ویروس به عنوان منابع واسطه به ورود و توسعه ویروس کمک می نمایند. بنابراین مدیریت علف های هرز به عنوان یک روش پیشگیری از این بیماری توصیه می‌گردد (Pearson et al., 2009).

این تحقیق اولین گزارش از وجود ویروس موزاییک شدید زنبق از روی گیاه زعفران در ایران است.

همچنین جایگاه *D-A-G* که در اغلب توالی های پوشش پروتئینی به عنوان فاکتور مهم در انتقال با شته نقش دارد در جدایه های ایرانی این تحقیق نیز مشاهده شد که نشاندهنده انتقال این ویروس با شته است (Li et al., 2016).

. در این گروه تعدادی از جدایه های ویروسی، از روی سایر گیاهانی که تکثیر آن‌ها با کورم و پیاز صورت می‌گیرد، نیز گزارش شده اند که این نشان‌دهنده‌ی این مطلب است که تنوع میزبانی، تاثیری بر بیماریزایی

منابع

- Abrishami, M.H. 2004. Saffron: from the past to the present. *Encyclopedia of production, trade and use*. Amirkabir Publishing Co. (In Persian with English summary).
- Ahmadi, A. 2013. Important medicinal plants of Iran. Torbat Heydariyeh University Press, 169- 173. (In Persian).
- Caiola, M. G., and Canin, A. 2010. Looking for saffron (*Crocus sativus* L.) Parent's. *Functional Plant Science and Biotechnology*. Global Science Books.
- Ebrahimzade, H., Rajabian, T., Karimian, R., and Abrishami, P. 2006. Iranian saffron: with a research look. Etelaat publisher. (In Persian with English summary).
- Ghorbanpoor, M., Yuosefy Javan, I. 2016. A review of medicinal properties and side effects of saffron (*Crocus sativus* L.), The first conference on aromatic and spicy herbs, Gonbad Kavus university. (In Persian).
- Farokhvand, S., Hosseini, S. A & Aminifard, M. H. 2019. Serological and molecular detection of Tomato spotted wilt virus in some weed of saffron fields. *Journal of saffron research.*, 6(2):167-177. (In Persian).
- Heydari, M., Hosseini, A. & Duri, R. (2018). Detection and Phylogenetic Analysis of Turnip mosaic virus of Saffron (*Crocus sativus*) in Iran. *App.Res. in Plant Protec*, 17-28. (In Persian).
- <http://www.ncbi.nlm.nih>
- Heydari, M., Hosseini, S. A. & Duri, R. 2018. Serological and molecular detection of TuMV on *Globachia laevigata* in saffron fields. *Journal of saffron research.*, 5(2):191-200. (In Persian).
- Inouye N, Mitsuhata K (1978) Turnip mosaic virus isolated from Iris. *Nogaku Kenkyu*, 57, 1–16(in Japanese).
- Karbassi, A. 2016. Economic and social analysis of saffron cultivation in Torbat Heydariyeh city. 2th conference of perspective of Torbat Heydariyeh region on the horizon in 1404, Torbat Heydarie, Iran. (In Persian).
- koochaki, A., Tabrizi, L., Jahani, M., & Mohammad Abadi, A. A. (2012). An evaluation of the effect of saffron (*CrocussativusL.*) corm planting rate and pattern on the crop's performance. *Iranian J of Hortic. Scie.* 42, 379-391. (In Persian).
- Kulshrestha S, Hallan V, Raikhy G, Kumar A, Ram R, Garg ID, Zaidi AA (2004) Molecular characterization of an Iris severe mosaic virus isolate from India. *Acta Virol*, 48, 65–67.
- Li Y, Deng C, Shang Q, Zhao X, Liu X, Zhou Q. 2016. The first complete genome sequence of Iris severe mosaic virus. *Arch Virol*, 161, 1069–1072.
- Muhire, B. M., Varsani, A. & Martin, D. P. (2014). SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS one*, 9, 1-8.
- Muhtashami, T. 2018. Factors Affecting Excessive Nitrogen Fertilizer Use in Saffron Cultivation: (Case Study: Torbat Heydarieh County). *Journal of saffron research.*, 6(1):127-140. (In Persian).
- Nateqi, M., Habibi, M. K., Dizadji, A., & Parizad, S. (2015). Detection and molecular characterization of the Iris severe mosaic virus-Ir isolate from Iran. *J. Plant Protec Res.* 11(2), 22-30.
- Nishigawa, N., Tukoda, R., Yushida, T, et al. (2021). Complete genome sequence of

- Iris severe mosaic virus isolated in Japan. Microbiol, 8 (15): 3-19.*
- Park WM, Lee SS, Park SH, Ryu KH (2000) Sequence analysis of the coat protein gene of a Korean isolate of *Iris severe mosaic virus* from *Iris* plant. *Plant Pathol*, 6, 36-42.
- Pearson, N., Cohen, P., Covell, S.J., et al. 2009. A survey of viruses of flower bulbs in New Zealand. *Australian Plant Pathol*, 38, 305-309.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30, 2725-2729.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids res*, 22, 4673-4680.
- Van der Vlugt C.I.M., Langeveld S.A., Goldbach R.W. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of 3'-terminal region of *Iris severe mosaic virus* RNA. *Arch of Virol*, 136, 397-406.
- Winterhalter, P., and Stranbinger, M. 2000. Saffron renewed interests in an ancient spice. *Food Rev. Int*, 39-59.
- Yan SJ, Qin ZD, Jin LL, Chen JS (2010) A new isolate of *Iris severe mosaic virus* causing yellow mosaic in *Iris ensata* Thunb. *J Nanosci Nanotechnol*, 726-730.

Journal of Saffron Research (semi-annual)

Vol.9, No.2, Fall & Winter, 2021-2022

p. 323-334

<http://dx.doi.org/10.22077/JSR.2021.4239.1157>



University of Birjand

Original Article:

Molecular Detection and Investigation of Irish Severe Mosaic Virus in Saffron, Fields of Razavi and South Khorasan

Masoome Tvoosi¹, Seyyedeh Atefeh Hosseini^{*2}

1- M.Sc. Graduate Students of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.

2- Associate Professor of Plant pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.

** Corresponding author Email: ahosseini@birjand.ac.ir*

Received 29 March 2021; Accepted 17 June 2021

Abstract

Saffron (*Crocus sativus*) is related to Iridaceae family and is one of the most important products in Iran. Recently, different viral diseases were detected on it. Iris severe mosaic virus is detected on some ornamental plants in Iran but has not been reported on saffron. In order to detect this virus, we collected 130 samples with yellowing, stunning, mosaic symptoms on saffron leaves and they were tested by PCR and specific primers. Finally fragments with 917 bp were amplified in 5 samples. Samples were cloned or more investigations in Macrogen company of Korea. Investigation of phylogeny according to coat protein showed that 5 Iranian isolates were separated in two groups near to Chinese isolates. Investigation in this survey showed that different groups were separated according their geographical distribution. Recombinant investigation showed that in none of Iranian isolates there is no recombination. This research is the first report of this virus and first molecular and phylogeny investigation in saffron fields of South and Razavi Khorasan.

Keywords: Coat protein, Genome, Specific primers, Sequencing.