



ردیابی سرولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک شلغم (*TuMV*) در علف هرز ناخنک (*Goldbachia laevigata*) در مزارع زعفران

مریم حیدری^۱، سیده عاطفه حسینی^۲ و راضیه دری^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲- استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۳- دانشجوی دکترا بیماری شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* نویسنده مسئول: [E-mail: ahosseini@birjand.ac.ir](mailto:ahosseini@birjand.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۰۹

چکیده

ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus; TuMV*) از خانواده پوتی‌ویریده و جنس پوتی‌ویروس، دارای وسیع‌ترین دامنه میزبانی در بین ویروس‌های این جنس است. علف‌های هرز به عنوان منابع نگهدارنده ویروس نقش مهمی در همه‌گیری آن روی گیاه اصلی دارند. به منظور ردیابی و بررسی حضور *TuMV*، ۴۴ گونه علف هرز مربوط به هشت خانواده در بهار ۱۳۹۶ از مزارع زعفران شهرستان‌های قائن، فردوس، سرایان و بیرجند جمع‌آوری گردید. ردیابی اولیه ویروس در نمونه‌ها، با آزمون الایزا و *RT-PCR* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت و نمونه‌ای که در الایزا و *PCR* مثبت بود، تعیین توالی گردید. در بین ۴۴ علف‌هرز، تنها نمونه مربوط به علف‌هرز ناخنک (*Goldbachia laevigata*) در آزمون الایزا مثبت بود که در *RT-PCR* نیز قطعه‌ای به طول ۸۶۴ جفت باز مربوط به توالی کامل پروتئین پوششی تکثیر نمود. در درخت تبارزایی حاصل از این جدایه (*KHo.IR*) در مقایسه با ۲۹ جدایه موجود در بانک جهانی ژن، چهار گروه تشکیل شد که جدایه ایرانی در گروه *Basal BR* قرار گرفت. بررسی یکسانی نوکلئوتیدی این جدایه با ۲۹ جدایه بانک جهانی ژن، نشان داد که بیشترین تشابه بین جدایه مورد مطالعه با جدایه ایتالیا (*AB093600*) به میزان ۹۳/۶ درصد و کمترین شباهت با جدایه‌ای از کانادا (*D10927*) برابر با ۸۷/۶ درصد می‌باشد. بنابر نتایج، علف هرز ناخنک به عنوان گیاه نگهدارنده *TuMV* در مزارع زعفران معرفی گردید. تحقیق حاضر اولین بررسی سرولوژیکی و مولکولی *TuMV* در علف‌های هرز مزارع زعفران در ایران می‌باشد.

کلمات کلیدی: پوشش پروتئینی، تبارزایی، زعفران، علف‌هرز ناخنک.

مقدمه

گیاه زعفران (*Crucis sativus*) از جنبه‌های گوناگون نظیر درآمدزایی و توسعه صادرات غیرنفتی، بهره‌برداری خوب و مناسب از آب، کمک به اشتغال روستاییان و جلوگیری از مهاجرت از مناطق زعفران‌کاری ایران و بخصوص در جنوب خراسان اهمیت قابل‌توجهی دارد. زعفران با سطح زیر کشت ۷۳۱۱۹ هکتار، یکی از گیاهان باارزش دارویی استان‌های خراسان‌های رضوی و جنوبی می‌باشد (Kafi et al., 2006).

یکی از بزرگترین مشکلات مزارع زعفران وجود علف‌های هرز است؛ به طوری‌که از طریق رقابت برای جذب آب، مواد غذایی، نور و نفوذ به داخل بنه‌ها برای گیاه زعفران مزاحمت ایجاد نموده و می‌توانند عملکرد را به طور معنی‌داری کاهش دهند (Ghorbani et al., 2008). آلوده شدن علف‌های هرز به ویروس‌های گیاهی علاوه بر خسارت مستقیمی که به محصول وارد می‌کند، می‌تواند عامل بقا و انتشار ویروس‌های گیاهی نیز باشد.

اکثر ویروس‌ها دارای میزبان وحشی بوده که منابعی را جهت آلودگی گیاهان زراعی موجود در مزرعه فراهم می‌کنند. آلودگی این علف‌های هرز به عنوان منابع و کانون‌های اولیه آلودگی حائز اهمیت است. انتشار ویروس از علف‌های هرز به داخل مزارع به وسیله ناقلین صورت می‌گیرد و علف‌های هرز می‌توانند عامل بقا ویروس از فصلی به فصل دیگر باشند؛ در بین ویروس‌های گیاهی ویروس‌های جنس پوتی‌ویروس، گونه ویروس موزاییک شلغم دارای دامنه میزبانی بالایی می‌باشند (Silva et al., 2012).

ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus*; *TuMV*) یکی از اعضاء جنس پوتی ویروس (*Potyvirus*) از خانواده *Potyviridae* بوده و اولین بار توسط تاملینسون در سال ۱۹۷۰ میلادی گزارش و توصیف شد. *TuMV* مربوط به ویروس‌های بالا خانواده *Picornal-Like* می‌باشد که گیاهان و جانوران را آلوده می‌کند. این ویروس، دارای پیکره رشته‌ای شکل بوده و ۷۰۰-۷۵۰ نانومتر طول دارد. ژنوم *RNA* تک رشته مثبت بوده و به طول ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید است. ژنوم در انتهای ۳' و ۵' دارای یک *ORF* است که به یک پلی‌پروتئین بزرگ ترجمه شده و بعد از ترجمه به چندین پروتئین که با پروتئازهای کد شده ویروسی هیدرولیز می‌گردند، تبدیل

می‌شود (Riechman et al., 1992; Adams et al., 2012).

پوشش پروتئینی که در انتهای ۳' ژنوم قرار دارد، در بسیاری از گونه‌ها تنوع ژنتیکی دارد و در ارتباطات تبارزایی در جمعیت پوتی‌ویروس‌ها استفاده می‌شود (Ohshima et al., 2007). این ویروس توسط تعداد زیادی شته از جمله *Brevicoryne brassicae*، *Lipaphis gossypii* و *Myzus persicae* به روش ناپایا منتقل می‌شود (Ghorbani et al., 2008). *TuMV* بالاترین دامنه میزبانی را در بین پوتی‌ویروس‌ها داشت؛ به طوری‌که بیش از ۳۰۰ گیاه تک‌لپه و دولپه و مربوط به ۱۵۶ جنس و ۴۳ خانواده شامل گیاهان زراعی و علف‌های هرز را آلوده می‌سازد (Ohshima et al., 2002; Nayuda, 2013). تحقیقات نشان داده که *TuMV* ابتدا از علف‌های هرز روی محصولات *Brassicaceae* آمده است (Nguyen et al., 2013). این ویروس در ایران از میزبان‌های متعددی نظیر سبزیجات، محصولات زراعی، گیاهان زینتی و علف هرز گزارش شده است (Shahraeen et al., 2003; Farzadfar et al., 2009).

TuMV روی علف‌های هرز *Arctium lappa* و *Sinapis arvensis* در تهران و علف‌های هرز خردل کاذب در مزارع کلزا استان خراسان رضوی ردیابی شده است (Valusi, 2017; Sabokkhoz et al., 2012). چهار ژنوتیپ بر مبنای پوشش پروتئینی آن گزارش شده است که شامل *Basal B*، *Asian-BR*، *World-B* و *Basal AR* می‌باشد و در تحقیقات پیشین روی جدایه‌های ایرانی مربوط به شلغم و ترب، در دو ژنوتیپ *Asian BR* و *Basal B* قرار گرفتند (Farzadfar & Pourrahim, 2014).

تحقیق حاضر به شناسایی و بررسی سرولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک شلغم، در علف‌های هرز مزارع زعفران پرداخت که به دلیل سطح زیر کشت بالای این گیاه در استان خراسان جنوبی و اهمیت علف‌های هرز به عنوان منابع نگهدارنده ویروس، بسیار مهم است.

مواد و روش‌ها

بازدید از مزارع زعفران و جمع‌آوری نمونه‌ها

موزاییکی برگ، زیگزاگی و بدشکلی شدن برگ‌ها یا فاقد هیچ علائم ویروسی بودند. نوع علف‌های هرز، تعداد و محل نمونه برداری در جدول ۱ آورده شده است.

در فروردین و اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۶ از علف‌های هرز مزارع زعفران استان خراسان جنوبی در شهرستان‌های قاین، سرایان، فردوس و بیرجند نمونه‌برداری صورت گرفت. علف‌های هرز دارای علائم بیماری‌های ویروسی نظیر

جدول ۱. مشخصات علف‌های هرز جمع‌آوری شده از مزارع زعفران

Table 1. Characterization of collected weeds from saffron fields

محل نمونه‌برداری Sampling region	تعداد Number	خانواده Family	نام عمومی Common name	نام علمی Scientific name
قاین Ghaen	5	شب‌بوئیان Brassicaceae	ناخنک	<i>Goldbachia laevigata</i>
قاین و سرایان Ghaen and Sarayan	2	میخکیان Caryophyllaceae	پیچک صحرایی Convolvulus	<i>arvensis Convolvulus</i>
قاین و سرایان Ghaen and Sarayan	9	میخکیان Caryophyllaceae	گندمک Common chickweed	<i>sp. Holosteum</i>
قاین Ghaen	2	شب‌بوئیان Brassicaceae	شاهی وحشی Hoary cress	<i>Cardaria draba</i>
قاین Ghaen	1	شاه‌تره‌ئیان Fumariaceae	شاه‌تره Fumitory	<i>Fumaria officinalis</i>
فردوس و سرایان Ferdows and Sarayan	4	شب‌بوئیان Brassicaceae	جلنگو Blue mustard	<i>Coriostora tenella</i>
بیرجند قاین و فردوس Birjand, Ghaen and Ferdows	6	غلات Poaceae	جو موشی Mediterranean barley	<i>Hordeum murinum</i>
بیرجند، سرایان و فردوس Birjand, Sarayan and Ferdows	7	هفت‌بندیان Polygonaceae	علف هفت‌بند Swamp smartweed	<i>Polygonum avicular</i>
قاین، فردوس و سرایان Ghaen, Ferdows, Sarayan	4	شب‌بوئیان Brassicaceae	درشتوک African Rocket	<i>Malcolmia africana</i>
بیرجند (چاه‌زینی) Birjand (Chah zini)	3	چغندیان Chenopodiaceae	سلمه Common lambsquarters	<i>Chenopodium album</i>
بیرجند (چاه‌زینی) Birjand (Chah zini)	1	بقولات Fabaceae	یونجه Alfalfa	<i>Melilitus indicus</i>

تشتک به فاصله هر ۱۵ دقیقه حداکثر تا ۶۰ دقیقه پس از اضافه کردن سوپسترا از لحاظ تغییر رنگ چاهک‌ها بررسی شد میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر در دستگاه تشتک‌خوان مدل Anthos 2000 (ساخت کشور اتریش) مورد سنجش قرار گرفت. نمونه‌ها در صورتی مثبت در نظر گرفته شد که جذب نوری چاهک‌های تیمار شده با نمونه مورد نظر بالاتر از سه برابر میانگین جذب نوری چاهک تیمار شده با شاهد منفی بود.

آزمون سرولوژیکی الیزا

در تحقیق حاضر نمونه‌های مشکوک به آلودگی با TuMV با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس (DSMZ آلمان) و با آزمون ساندویچ دوطرفه الیزا^۱ (DAS-ELISA) مورد شناسایی قرار گرفتند. رقت مورد استفاده برای آنتی‌بادی پوششی و کانجوگیت یک به هزار بود (Clark & Adams, 1977).

1- Enzyme linked immunosorbent assay-double antibody sandwich

Green Viewer (پارس‌طوس-ایران) الکتروفورز گردید.

تعیین توالی و مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی تکثیر شده با جدایه‌های مختلف و رسم درخت تبارزایی

قطعه تکثیر شده جدایه مورد نظر برای تعیین توالی به شرکت *Macrogen* (کره جنوبی) فرستاده شد. توالی نواحی تکثیر شده ابتدا با برنامه *Chromas version 2.13* بازبینی و سپس با نرم‌افزار بلاست در پایگاه اطلاعاتی *NCBI* با ترادف‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت.

رسم درخت فیلوژنی به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای *MEGA6* (Tamura et al., 2013) انجام شد. درخت فیلوژنی با روش *Maximum Likelihood* و *Bootstrap* 1000 ترسیم گردید. ماتریکس تشابه با نرم‌افزار *MegAlign* رسم شد.

نتایج و بحث

آزمون الایزا

در ۴۴ نمونه علف هرز جمع‌آوری شده از استان خراسان جنوبی، تنها گونه ناخنک با آنتی‌بادی اختصاصی *TuMV* واکنش مثبت نشان داد. این علف هرز در مزارع نمونه برداری شده بسیار غالب بود، اما علائم مشخص ویروسی نداشت (شکل ۱). در هیچ یک از علف‌های هرز دارای علائم ویروسی، *TuMV* ردیابی نگردید که دلیل آن احتمالاً آلودگی این گیاهان به ویروس‌ها یا عواملی غیر از *TuMV* می‌باشد.

استخراج RNA کل و آزمون نسخه برداری معکوس -

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR)

به منظور استخراج RNA ویروس روش *CTAB* تغییر یافته استفاده شد (Chang, 1993). با این روش، RNA از ۴۴ نمونه علف هرز مورد بررسی استخراج و آزمون *RT-PCR* با آغازگرهای با توالی آغازگر مستقیم 5'-CAAGCAATCTTTGAGGATTAT-3' و آغازگر معکوس 5'-TATTTCCATAAGCGAGAATA-3' که به ترتیب در جایگاه‌های ۸۷۲۶-۸۷۰۵ و ۹۶۹۰-۹۶۶۹ قرار گرفت، انجام شد (Sanchez et al., 2003). برای ساخت DNA مکمل، ازای هر نمونه ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر معکوس (۱۵ پیکومول) و شش میکرولیتر آب آمپولی اضافه شد، سپس به هر لوله پنج میکرولیتر از RNA استخراج شده اضافه شد، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن‌ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سپس یک دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. سپس چهار میکرولیتر بافر، دو میکرولیتر از *dNTP* و نیم میکرولیتر آنزیم *RT* (هزار یونیت) (*RevertAid Reverse Transcriptase, Fermentase*) به هر لوله اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. به منظور تکثیر ژن پروتئین پوششی از *PCR* به صورت زیر استفاده گردید. به ازای هر نمونه مقادیر ۱۲/۵ میکرولیتر از *Premix* (*2X PCR Master mix Red*)، یک میکرولیتر آغازگر معکوس، یک میکرولیتر از آغازگر مستقیم و همچنین ۶/۵ میکرولیتر آب آمپولی اضافه شد. سپس ۲۱ میکرولیتر به لوله‌های کوچک انتقال داده و دو میکرولیتر از *cDNA* هر جدایه به لوله مورد نظر انتقال داده شد. سپس با برنامه حرارتی یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه متشکل از دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای ۵۵/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه واکنش *PCR* انجام شد. نهایتاً دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه به عنوان تکمیل پلیمریزاسیون، به کار رفت. محصولات *PCR* به طول ۹۸۰ جفت باز، در ژل آگارز یک درصد حاوی رنگ *DNA*



شکل ۱. علف هرز ناخنک آلوده به *TuMV* جمع‌آوری شده از مزارع زعفران استان خراسان جنوبی
Fig. 1. Infected *Goldbachia laevigata* by *TuMV* collected from saffron fields of South Khorasan

جایگاه آن تعیین شد (شکل ۲). ماتریکس تشابه با نرم‌افزار *Megalign* رسم گردید (شکل ۳).

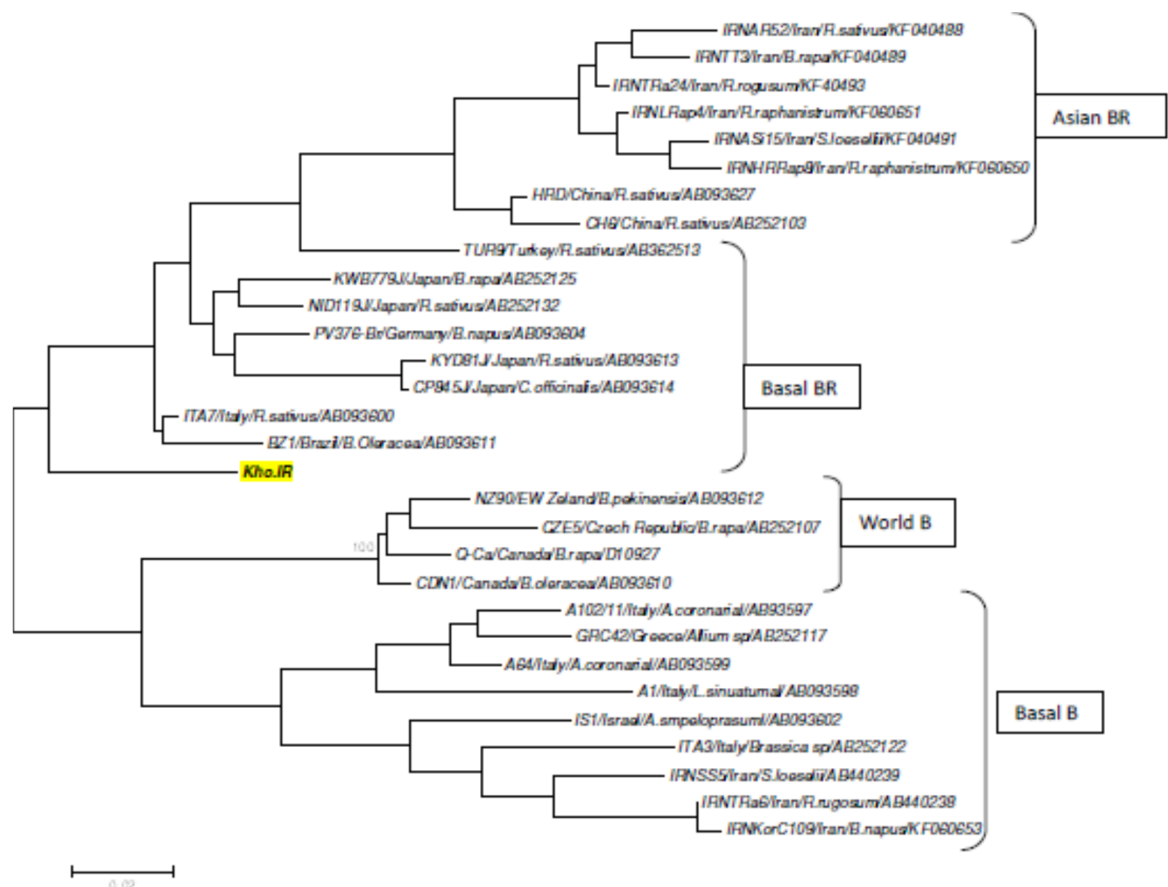
در درخت فیلوژنی حاصل از مقایسه این جدایه با جدایه‌های موجود در بانک ژن بر مبنای ترادف ژن پروتئین پوششی، چهار گروه اصلی تشکیل شد که مشابه نتایج پیشین بود (Farzad Far et al., 2014). در گروه *Asian BR* جدایه‌هایی از ایران، چین و ترکیه قرار گرفتند، در گروه *Basal BR* جدایه‌هایی از ژاپن، آلمان، ایتالیا و برزیل همراه با جدایه مورد مطالعه در این تحقیق قرار گرفت. در گروه *World B* جدایه‌هایی از نیوزلند، چک و کانادا و در گروه *Basal B* جدایه‌هایی از ایتالیا، یونان و چند جدایه ایرانی قرار گرفتند. مقایسه ترادف پروتئین پوششی این جدایه با جدایه‌های دنیا نشان داد که جدایه مذکور بیشترین شباهت را به جدایه‌ای از ایتالیا به میزان ۹۳/۶ درصد و کمترین را با جدایه‌ای از کشور کانادا به میزان ۸۷ درصد (*D10927*) داشت. شباهت این جدایه با جدایه‌های ایرانی در تحقیقات پیشین بین ۸۸/۴ - ۸۹/۶ درصد بود (شکل ۳).

نتایج RT-PCR

با توجه به اینکه ویروس موزائیک شلغم در مزارع زعفران استان خراسان جنوبی شناسایی شده است (مقاله در دست چاپ)، اما هیچ بررسی در مورد علف‌های هرز میزبان این ویروس (به عنوان یکی از مکان‌های بقا ویروس) موجود نمی‌باشد. لذا با توجه به مشاهده علائم ویروسی در این گیاهان، اقدام به جمع‌آوری علف‌های هرز مشکوک گردید. نتایج حاصل از آزمون *RT-PCR* منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۸۶۴ جفت باز شد و الکتروفورز محصول آن آلودگی نمونه علف هرز ناخنک را به ویروس موزائیک شلغم تایید کرد.

تجزیه و تحلیل تبارزایی

ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی قطعه ۸۶۴ جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی جدایه‌ای که از علف هرز شاخ گاو جدا شده بود، ابتدا با نرم‌افزار *BLAST n* بررسی و تایید و به نام *Kho.IR* نامگذاری گردید. سپس درخت تبارزایی این جدایه، همراه با ۲۹ جدایه موجود در بانک ژن، بر مبنای پروتئین پوششی، با نرم‌افزار *Mega 6* رسم و



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس موزائیک شلغم مربوط به یک جدایه علف هرز (*Kho.ir*) و جدایه‌های موجود در بانک ژن

در جدایه‌های دنیا، نام جدایه، کشور، میزبان و شماره دسترسی آمده است.

Fig. 2. Phylogenetic tree obtained from the alignment of nucleotide sequences of the Coat protein of TuMV from one Iranian isolates of weed

For each sequence the name of isolate, country of origin, host and accession No. are indicated.

ویروس، بیانگر این مطلب است که وقوع گروه ژنوتیپی جدیدی در ایران محتمل است (Valuzi, 2017). علف هرزی که در این تحقیق به عنوان میزبان واسط معرفی می‌گردد، در مزارع زعفران شایع بوده و همچنین از نظر دارویی دارای خواص اعتدال‌دهنده اخلاط و مقوی بدن و رقت خون شده و در تنظیم ضربان قلب و درمان افسردگی مفید است (Pouyan, 2002).

گیاه زعفران دارای اهمیت اقتصادی بسیار بالا بوده و نقش مهمی در اقتصاد استان خراسان جنوبی بازی می‌کند. بنابراین، بررسی عوامل خسارت‌زای آن حائز اهمیت است. یکی از این عوامل، ویروس‌ها می‌باشند که این تحقیق به شناسایی میزبان‌های وحشی آن‌ها به عنوان میزبان واسط پرداخته است. علف هرز ناخنک برای اولین بار به عنوان

در یک مطالعه دیگر، در استان خراسان رضوی، با استفاده از آزمون RT-PCR و تعیین ترادف بخشی از ژنوم ویروس، علف هرز خردل وحشی به عنوان میزبان *TuMV* در مزارع کلزا شناسایی شده است. در بررسی تبارزایی، این جدایه در گروه *Basal B* قرار گرفت (Sabokkhiz et al., 2012). اخیراً *TuMV* با روش سرولوژی و با تعیین توالی انتهای ۳' ژنوم ویروس در دو علف هرز *Arctium lappa* و *Sinapis arvensis* در تهران گزارش گردید. در بررسی تبارزایی، جدایه‌های این تحقیق در گروه *Basal BR* که مشابه با نتایج جدایه این تحقیق می‌باشد تا پیش از این جدایه‌های ایران در گروه‌های *Asian BR* و *Basal B* قرار داشتند، قرارگیری جدایه‌های مربوط به علف‌های هرز در گروه *Basal BR* برای اولین بار در جمعیت جدایه‌های این

می‌شود که ویروس تغییر یافته بر روی علف هرز میزبان خود، سازگاری کمتری داشته و به این جهت ویروس‌ها در علف‌های هرز غلظت پایینی داشته و ردیابی آن مشکل است یا اینکه در علف‌های هرز بدون علائم ایجاد آلودگی می‌نمایند. این امر می‌تواند دلیل عدم ردیابی ویروس در سایر علف‌های هرز مزارع زعفران باشد (Farzadfar et al., 2009).

نتیجه‌گیری کلی

ویروس‌ها از عوامل کاهنده عملکرد زعفران بوده و علف‌های هرز خودرو به عنوان منابع نگهدارنده ویروس در زمانیکه گیاه زعفران غیر فعال است، نقش مهمی ایفا می‌کنند. تحقیق حاضر به بررسی میزبان‌های واسط ویروس موزاییک شلغم در مزارع زعفران استان خراسان جنوبی پرداخته است. از بین علف‌های هرز نمونه برداری شده علف هرز ناخنک به عنوان میزبان وحشی ویروس موزاییک شلغم شناسایی گردید که قطعاً نقش مهمی در اپیدمیولوژی ویروس داشته و بنابراین کنترل و پیشگیری آن حائز اهمیت است.

میزبان TuMV در مزارع زعفران معرفی می‌گردد و قطعاً اپیدمیولوژی ویروس موزاییک شلغم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، کنترل علف‌های هرز غیرمستقیم بر آلودگی ویروسی اثرگذار است، اما هیچ مدرکی در رابطه با کنترل علف‌های هرز به تنهایی جهت راهبرد مدیریتی مؤثر در کنترل ویروس‌ها وجود ندارد.

علاوه بر این، به کارگیری برنامه‌های مدیریتی در مزارع زعفران که علف‌های هرز، به میزان زیادی در آن‌ها در سراسر سال وجود دارند، بسیار مشکل و گران‌قیمت است. البته در مناطقی که تعداد محدودی از علف‌های هرز شناخته شده، ممکن است حذف علف‌های هرز مربوطه موثر باشد.

علف‌های هرز ویژه‌ای که به عنوان میزبان مناسب شته‌ها شناخته می‌شوند، با سمپاشی با حشره‌کش مانع از انتقال شته‌ها روی گیاه اصلی منتقل می‌گردند. بنابراین، آموزش کشاورزان جهت مدیریت علف‌های هرز در مزارع و یا اطراف آنها ضروری است (Gilbertson et al., 2011). تحقیقات تبارزایی نشان داد که TuMV آلوده‌کننده محصولات زراعی، از اجداد TuMV آلوده‌کننده علف‌های هرز منشا می‌گیرد و با تغییراتی که در ویروس جهت سازگاری با محصول اصلی کشت شده رخ می‌دهد، سبب

		Percent Identity																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
Divergence	1	■	92.0	97.2	90.1	91.7	90.5	90.2	89.7	90.0	89.9	89.8	88.6	88.6	89.1	96.7	90.8	89.6	89.9	88.6	91.7	91.8	89.8	86.0	86.6	86.2	86.7	86.0	86.8	91.3	88.7	1	AB93597
	2	8.7	■	93.3	87.7	90.4	88.4	88.4	87.3	87.9	87.5	87.6	86.7	86.6	87.0	92.5	89.4	87.1	87.9	87.3	90.4	90.9	88.2	83.7	85.1	84.5	84.6	83.8	84.8	89.9	87.7	2	AB093598
	3	2.8	7.1	■	89.1	92.0	89.9	90.8	88.7	90.8	89.1	89.2	88.5	88.5	89.6	96.8	90.4	88.7	89.1	88.1	91.5	92.1	90.1	85.8	86.7	86.3	86.6	85.8	86.7	91.0	89.0	3	AB093599
	4	10.8	13.5	12.1	■	88.6	96.9	91.6	97.8	91.3	94.8	95.2	93.3	93.5	91.0	89.1	89.8	96.1	96.9	94.7	89.3	88.9	90.7	91.0	91.3	90.9	91.7	91.2	91.7	88.9	93.6	4	AB093600
	5	9.0	10.3	8.7	12.7	■	89.2	88.3	88.2	88.4	89.3	89.4	88.2	88.4	87.7	91.2	92.7	88.2	88.9	87.6	92.2	93.5	87.9	85.9	86.3	86.2	86.6	86.0	86.6	91.7	91.4	5	AB093602
	6	10.5	12.7	11.2	3.2	12.0	■	90.4	95.6	90.9	95.4	95.4	93.5	93.6	90.2	89.2	90.4	96.2	96.8	94.1	89.6	89.3	89.9	91.2	91.4	91.0	91.8	91.3	91.8	89.1	92.2	6	AB093604
	7	10.7	12.9	10.0	9.1	13.1	10.6	■	91.2	97.7	89.2	89.7	90.5	89.9	96.6	90.0	88.1	91.2	90.4	90.2	88.7	88.5	98.0	88.1	87.9	87.9	88.2	87.6	88.2	88.3	88.3	7	AB093610
	8	11.4	14.1	12.5	2.2	13.2	4.5	9.6	■	91.4	94.0	94.4	93.6	93.5	90.6	88.6	89.4	95.5	96.1	93.8	89.1	88.6	91.2	90.7	90.7	90.6	91.4	90.8	91.2	88.6	92.4	8	AB093611
	9	11.0	13.3	10.1	9.5	13.0	9.9	2.4	9.3	■	90.0	90.5	90.6	90.2	96.4	89.8	88.7	91.4	90.7	89.8	88.6	88.9	97.5	87.7	87.8	87.6	88.1	87.3	87.9	88.2	87.9	9	EW
	10	11.1	13.8	12.1	5.4	11.8	4.8	12.0	6.3	11.0	■	99.4	92.0	92.3	89.6	88.4	90.0	94.1	94.5	92.8	89.3	88.6	88.5	89.7	89.9	89.3	90.1	89.6	90.1	88.9	90.5	10	AB093613
	11	11.3	13.7	12.0	5.1	11.7	4.8	11.4	6.0	10.4	0.6	■	92.4	92.8	89.8	88.3	90.1	94.5	94.8	93.0	89.6	88.7	89.0	90.1	90.4	89.8	90.6	90.0	90.6	89.1	90.7	11	AB093614
	12	12.7	14.9	13.1	7.1	13.3	7.0	10.4	6.8	10.3	8.7	8.1	■	98.4	90.2	88.2	88.6	93.1	93.5	93.1	88.4	88.5	90.4	95.4	95.5	95.4	95.9	95.3	95.6	87.9	89.0	12	AB093627
	13	12.7	15.0	13.1	6.9	12.9	6.8	11.1	6.9	10.7	8.2	7.7	1.6	■	89.9	87.6	88.3	92.7	93.7	93.0	88.5	88.2	89.3	94.8	95.1	94.6	95.2	94.7	94.8	88.1	89.4	13	AB252103
	14	12.2	14.4	11.7	9.7	13.8	10.7	3.6	10.3	3.7	11.5	11.3	10.7	11.1	■	88.9	88.2	90.4	90.0	90.0	88.5	88.2	96.0	87.6	87.7	87.7	87.9	87.4	87.8	88.1	87.7	14	Czech
	15	3.5	8.1	3.3	12.1	9.7	12.0	11.0	12.7	11.3	13.0	13.1	13.3	14.0	12.4	■	90.6	88.1	88.4	88.1	91.6	91.3	89.3	85.4	85.6	85.5	85.6	85.1	85.9	91.4	88.9	15	Allium
	16	10.1	11.4	10.6	11.2	8.0	10.6	13.4	11.6	12.5	11.0	10.8	12.7	13.1	13.2	10.3	■	89.7	89.8	90.5	93.7	93.0	88.3	86.1	86.3	86.5	86.2	85.8	86.6	93.2	89.2	16	Brassica
	17	11.6	14.3	12.6	4.1	13.3	3.9	9.6	4.7	9.4	6.2	5.8	7.4	7.9	10.6	13.4	11.4	■	96.9	93.6	89.2	88.7	90.7	90.8	91.0	90.6	91.4	90.9	91.4	88.7	91.0	17	AB252125
	18	11.2	13.3	12.1	3.2	12.4	3.3	10.6	4.1	10.2	5.8	5.5	7.0	6.7	11.0	13.0	11.3	3.2	■	94.0	89.8	89.1	89.9	91.2	91.3	90.9	91.8	91.3	91.7	89.3	91.8	18	AB252132
	19	12.8	14.2	13.5	5.6	14.1	6.2	10.7	6.6	11.3	7.7	7.5	7.4	7.5	11.0	13.5	10.4	6.8	6.3	■	89.8	89.3	90.0	91.2	91.5	91.0	91.5	90.8	91.7	89.3	90.2	19	AB362513
	20	9.0	10.3	9.2	11.8	8.5	11.6	12.5	12.1	12.7	11.8	11.6	13.0	12.8	12.8	9.1	6.8	12.0	11.3	11.3	■	95.2	88.5	85.6	85.8	86.3	85.9	85.5	86.2	99.5	89.1	20	AB440238
	21	8.8	9.6	8.6	12.4	7.0	11.8	12.8	12.7	12.4	12.7	12.6	12.8	13.2	13.3	9.5	7.6	12.5	12.1	11.9	5.1	■	88.9	85.3	85.9	86.2	86.2	85.6	86.6	94.7	88.6	21	AB440239
	22	11.3	13.2	10.9	10.2	13.5	11.1	2.0	9.6	2.6	12.8	12.3	10.5	11.8	4.2	11.9	13.1	10.2	11.2	11.0	12.8	12.4	■	87.6	87.7	87.5	87.9	87.1	87.8	88.1	87.6	22	D10927
	23	16.2	19.0	16.7	9.8	16.3	9.7	13.5	10.2	13.9	11.4	10.9	4.8	5.5	14.1	17.0	16.0	10.1	9.7	9.7	16.6	17.1	14.1	■	97.2	96.6	97.6	97.6	97.2	85.2	89.2	23	KF040488
	24	15.4	17.0	15.2	9.5	15.7	9.4	13.6	10.2	13.8	11.2	10.6	4.7	5.2	13.9	16.7	15.7	9.8	9.5	9.3	16.5	16.3	13.9	2.8	■	97.2	98.0	97.1	97.5	85.3	89.7	24	KF040489
	25	15.9	17.9	16.0	9.9	15.8	9.8	13.6	10.3	14.0	11.9	11.3	4.8	5.7	13.9	16.8	15.5	10.3	9.9	9.8	15.7	15.8	14.2	3.6	2.8	■	97.1	98.3	98.2	85.9	88.4	25	KF040491
	26	15.3	17.7	15.5	9.0	15.4	8.9	13.3	9.4	13.5	10.9	10.3	4.3	5.1	13.6	16.7	15.8	9.4	8.6	9.3	16.3	15.8	13.6	2.5	2.0	3.0	■	97.7	98.5	85.4	89.2	26	KF040493
	27	16.2	18.8	16.7	9.7	16.2	9.6	14.0	10.1	14.5	11.6	11.0	5.0	5.6	14.4	17.5	16.3	9.9	9.5	10.1	16.8	16.6	14.6	2.5	3.0	1.8	2.4	■	97.8	85.1	88.4	27	KF060650
	28	15.1	17.4	15.3	9.0	15.4	8.9	13.1	9.6	13.6	10.9	10.3	4.6	5.5	13.7	16.4	15.4	9.4	9.0	9.0	15.9	15.4	13.7	2.8	2.6	1.9	1.5	2.2	■	85.8	89.0	28	KF060651
	29	9.5	10.9	9.8	12.4	9.0	12.1	13.1	12.7	13.3	12.4	12.1	13.5	13.4	13.4	9.4	7.3	12.5	11.8	11.9	0.5	5.6	13.4	17.2	17.1	16.3	16.9	17.4	16.5	■	88.6	29	KF060653
	30	11.9	12.8	11.6	6.2	8.7	7.8	12.4	7.5	12.9	9.8	9.6	11.6	11.0	13.2	11.7	11.3	9.2	8.2	10.1	11.5	12.0	13.3	11.3	10.8	12.3	11.3	12.2	11.6	12.0	■	30	IRAN

شکل ۳. مقایسه درصد تشابه نوکلئوتیدی ژن پوشش پروتئینی جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های دنیا ترسیم شده به روش

Megalign با برنامه Clustal W

Fig. 3. Homology matrix of coat protein for one Iranian isolate of TuMV compared some isolates from Gene Bank using Clustal W by MegAlgin

منابع

- Adams, M.J., Zerbini, F.M., French, R., Rabenstein, F., Stenger, D.C., and Valkonen, J., 2012. Family Potyviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carsten E.B., and Lefkowitz, E.J. (Eds.) *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*.
- Behdani, M., and Fallahi, H.R., 2015. *Saffron Technical Knowledge based on Research Approaches*. University of Birjand Publication. 411 p. [in Persian].
- Berger, P.H., Adams, M.J., Barnett, O.W., Brunt, A.A., Hammond, J., Hill, J.H., Jordan, R.L., Kashiwazaki, S., Rybicki, E., Spence, N., Stenger, D.C., Ohki, S.T., Uyeda, I., van Zaayen, A., Valkonen, J., and Vetten, H.J., 2005. Potyviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (Eds.). *Virus taxonomy: eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 819–841.
- Chang, A., 1993. Modified CTAB RNA extraction method. *Plant Molecular Biology reporter*, 11, 113-116
- Clark, M.F., and Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 474–483.
- Farzadfar, S., Ohshima, K., Pourrahim, R., Golnaraghi, A.R., Jalali, S., and Ahoonmanesh, A., 2005. Occurrence of Turnip mosaic virus on ornamental crops in Iran. *Plant Pathol.* 54, 261.
- Farzadfar, S., Ohshima, K., Pourrahim, R., Golnaraghi, A.R., Jalali, S., and Ahoonmanesh, A., 2005. Occurrence of Turnip mosaic virus on ornamental crops in Iran. *Plant Pathol.* 54:261.
- Farzadfar, S., and Pourrahim, R., 2014. Characterization of Turnip mosaic virus from the Asian-BR population in Iran. *J. Phytopathol.* 162, 824–828.
- Farzadfar, S., Tomitaka, Y., Ikematsu, M., Golnaraghi, A.R., Pourrahim, R., and Ohshima, K., 2009. Molecular characterization of Turnip mosaic virus isolates from Brassicaceae weeds. *Eur. J. Plant Pathol.* 124: 45-55.
- Farzadfar, S., Tomitaka, Y., Ikematsu, M., Golnaraghi, A.R., Pourrahim, R., and Ohshima, K., 2009. Molecular characterization of Turnip mosaic virus isolates from Brassicaceae weeds. *Europe. J. Plant Pathol.* 124, 45–55.
- Farzadfar, S., Tomitaka, Y., Ikematsu, M., Golnaraghi, A.R., Pourrahim, R., and Ohshima, K., 2009. Molecular characterization of Turnip mosaic virus isolates from Brassicaceae weeds. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 45–55.
- Ghorbani, R., Rashed Mohasel, M.H., Makarian, H., and Rastgoo, M., 2008. Effect of sheep grazing on weed control in saffron fields. *Proceeding of The Second International Symposium of Saffron Biology and Technology, Mashhad, Iran.* [in Persian].
- Gilbertson, R.L., Rojas, M., and Natwick, E., 2011. Development of integrated pest management (IPM) strategies for whitefly (*Bemisia tabaci*)-transmissible geminiviruses. Pp. 323-356, In: WMO Thompson (Ed.), *The Whitefly, Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants*, Springer Science, New York.
- Kafi, M., Koocheki, A., and Rashed Mohassel, M.H., 2006. *Saffron (Crocus sativus): Production and Processing*. Science Publishers.
- Nayudu, M.V., 2013. Turnip mosaic Potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLoS One* 8, e55336
- Ohshima, K., Tomitaka, Y., Wood, J.T., Minematsu, Y., Kajiyama, H., Tomimura, K., and Gibbs, A. J., 2007. Patterns of recombination in Turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. *J. Gen. Virol.* 88, 298-315.
- Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., and Tan, Z., 2002. Molecular evolution of Turnip mosaic virus; evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen. Virol.* 83, 1511–1521.

- Pouyan, M., 2002. *Medicinal Plants of South Khorasan*. Fekr-e Bekr Publication, Iran. 112 pp. [in Persian].
- Riechmann, J.L., 1992. *Highlights and prospects of potyvirus molecular biology*. *J. Gen. Virol.* 73, 1–16.
- Sabokkhiz, M.A., Jafarpour, B, Shahriari Ahmadi, F. and Tarighi, S., 2012. *Identification of Turnip mosaic virus isolated from canola in northeast area of Iran*. *Afr. J. Biotech.* 11, 14553-14560.
- Shahraeen, N., Farzadfar, S., and Lesemann, D.E., 2003. *Incidence of viruses infecting winter oilseed rape (Brassica napus ssp. oleifera) in Iran*. *J. Phytopathol.* 151, 614-616.
- Sanchez, F., Wang, X., Jenner, C.E., Walsh, J.A., and Ponz, F., 2003. *Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus*. *Virus Res.* 94, 33-43.
- Silva, SJC., Castillo-Urquiza, G.P., Hora-Júnior, B.T., Assunção, IP., Lima, GSA., Pio-Ribeiro, G., Mizubuti, ESG., and Zerbini, F.M., 2012. *Species diversity, phylogeny and genetic variability of Begomo virus populations infecting leguminous weeds in Northeastern Brazil*. *Plant Pathol.* 61, 457-467.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S., 2013. *MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Valusi, H., Golnaraghi, A., and Aminabad, L., 2017. *Serological and molecular identification of Turnip mosaic virus in some wild plants in Iran*. *Aust. Plant Dis.* 12(3), 1-6.



Serological and Molecular Detections of Turnip Mosaic Virus on *Goldbachia laevigata* in Saffron Fields

Maryam Heydary¹, Seyyedeh Atefeh Hosseini^{2*} and Razieh dory³

1- Master student of Plant Pathology of Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Birjand

2- Assistant professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Birjand

3- Ph.D student of Plant Pathology, Department of plant protection, Faculty of Agriculture, University of Mashhad

**Corresponding Author E-mail: ahosseini@birjand.ac.ir*

Received 20 June 2017; Accepted 30 December 2017

Abstract

*Turnip mosaic virus is a member of family Potyviridae, genus Potyvirus, have the widest host range in Potyviruses. Weeds are reservoir plants for viruses and have an important role in this epidemiology. In order to identify the wild hosts of TuMV in saffron fields, 44 samples were collected during April 2017 from Ghaen, Ferdows, Sarayan and Birjand cities of South Khorasan province. TuMV were detected by ELISA and RT-PCR. Positive samples were sequenced and then analyzed by Phylogenetic software. Among 44 samples, *Goldbachia laevigata* was positive in ELISA and this isolate (KHo.IR) was amplified 864 bp of Coat protein gene using RT-PCR. In phylogenetic tree of KHo.IR and 29 isolates of gene bank, four groups were formed that KHo.IR was in Group Basal BR. Homology matrix of KHo.IR and 29 gene bank isolates showed that the closest gene bank isolate was from Italy with 93.6% homologies and the furthest isolate was from Canada with 87.6% homologies. According to the results, *Goldbachia laevigata* serves as a reservoir plant of TuMV in saffron fields. This is the first survey of TuMV on weeds of Iranian saffron fields.*

Key words: Coat protein, *Goldbachia laevigata*, Phylogeny, Saffron.