

## ردیابی و بررسی تبارزایی ویروس موزائیک شلغم (*Turnip mosaic virus*) در گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) در ایران

مریم حیدری<sup>۱</sup>، سیده عاطفه حسینی<sup>۲\*</sup> و راضیه دری<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.

۲- استادیار بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.

۳- کارشناس مرکز تحقیقات زیست محیطی خراسان جنوبی.

\*مسئول مکاتبه: [ahosseini@birjand.ac.ir](mailto:ahosseini@birjand.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۲

### چکیده

ویروس موزائیک شلغم (*Turnip mosaic virus*; TuMV) یکی از اعضای جنس پوتی‌ویروس می‌باشد که وسیع‌ترین دامنه‌ی میزبانی را در بین پوتی‌ویروس‌ها دارد. به منظور ردیابی و شناسایی این ویروس، در ماه‌های آبان و آذر سال ۱۳۹۵ از مزارع زعفران دارای علائم استان خراسان جنوبی و شهرستان‌های قاین، خوسف و بیرجند تعداد ۱۷۵ نمونه برداشت گردید. ردیابی اولیه‌ی ویروس با آزمون الایزا صورت گرفت که طی آن آلودگی نمونه‌ها ۱۰/۸۵ درصد برآورد شد. سپس RNA کل استخراج و در آزمون RT-PCR با آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی TuMV، قطعه‌ای به طول تقریبی ۹۸۰ جفت باز تکثیر و تعداد ۹ جدایه تعیین توالی شد. بررسی تبارزایی ۹ جدایه‌ی ایرانی با جدایه‌های موجود در بانک ژن بر مبنای توالی کامل ژن پروتئین پوششی، نشان داد که شش جدایه در گروه Asian BR همراه با جدایه‌هایی از چین، ترکیه و ایران قرار می‌گیرند. در صورتیکه سه جدایه‌ی دیگر این تحقیق در کنار سایر جدایه‌های ایرانی این ویروس، در گروه World B نزدیک به جدایه‌هایی از کانادا و نیوزلند قرار می‌گیرند. بیشترین شباهت بین جدایه SKK10 از ایران با جدایه‌ی ایرانی IRNTT3 به میزان ۹۸/۹۶ درصد و کمترین بین جدایه‌ی ایرانی SKK10 با AB 093598 از ایتالیا به میزان ۸۴/۵ درصد می‌باشد. از آنجا که جدایه‌های ایرانی این ویروس روی گیاه زعفران در دو گروه کاملاً مجزا قرار دارند، بنابراین از اجداد متفاوتی منشا گرفته‌اند. تحقیق حاضر اولین بررسی ویروس مذکور روی گیاه زعفران در ایران است.

**واژه‌های کلیدی:** ایران، ویروس موزائیک شلغم، پوتی ویروس، زعفران.

### مقدمه

کشت این محصول بوده است. ویروس موزائیک شلغم یکی از اعضای جنس پوتی ویروس از خانواده‌ی پوتی ویریده بوده و اولین بار توسط تاملینسون در سال ۱۹۷۰ گزارش و توصیف شده است (اشیما و همکاران ۲۰۰۲). پیکره‌های رشته‌ای این ویروس (به طول ۷۲۰ نانومتر) دارای یک قطعه RNA تک رشته‌ای مثبت، به طول ۹۸۳۰ الی ۹۸۳۳ نوکلئوتید و با دو انتهای 5'-Vpg و 3'-Poly(A) می‌باشد. این ژنوم دارای یک چارچوب خواندنی باز<sup>۱</sup> است که ابتدا

زعفران با نام علمی (*Crocus sativus* L.) از تیره‌ی زنبقیان (Iridaceae) گیاهی علفی، چندساله، بدون ریشه و پیازدار می‌باشد و از محصولات مهم اقتصادی کشور است اهمیت اقتصادی و اجتماعی زعفران به عنوان گرانترین ادویه جهان، جایگاه منحصر به فردی در میان محصولات صنعتی و صادراتی ایران به آن داده است. خراسان جنوبی مرکز اصلی پرورش زعفران ایران است و در سال گذشته (۱۳۹۴) بیش از ۱۵ هزار هکتار از اراضی کشاورزی، زیر

<sup>۱</sup>Open reading frame; ORF

لوده نمی‌کنند (اشیما و همکاران ۲۰۰۲). از طرف دیگر بررسی‌های تبارزایی بر مبنای ژن پروتئین پوششی نشان داد که جدایه‌های ویروس در چهار گروه جغرافیایی که شامل B Basal، Basal-BR، Asian-BR و world-B می‌باشند، طبقه‌بندی می‌شوند (تومیتاکا و اشیما ۲۰۰۶). پروتئین پوششی<sup>۱</sup> که رمز کننده‌ی یکی از محصولات پروتئینی مهم این ویروس می‌باشد، در طبقه بندی جدایه های مختلف، مطالعات تبارزایی و همچنین در تعیین تفاوت درون گونه ای یا بین گونه ای آنها بسیار حائز اهمیت است (تومیمورا و همکاران ۲۰۰۴، تومیتاکا و اشیما ۲۰۰۶). فرزادفر و همکاران (۲۰۰۹) ویروس مذکور را در شلغم، تربچه، کلزا و علف‌های هرز شناسایی و ژن پروتئین پوششی آن را تعیین توالی کردند. بررسی تبارزایی این جدایه ها بر اساس توالی کامل ژن پروتئین پوششی نشان داد که جدایه های ایرانی در گروه Basal-B و Asian-BR قرار می‌گیرند (فرزاد فر و پوررحیم ۲۰۱۴). گیاه زعفران از محصولات استراتژیک استان خراسان جنوبی است و شناسایی عوامل خسارت‌زای آن حائز اهمیت است. از طرف دیگر، ویروس موزاییک شلغم دامنه‌ی میزبانی وسیعی دارد. تحقیق حاضر برای اولین بار در ایران به ردیابی این ویروس، شناسایی مولکولی و بررسی تبارزایی آن در مزارع زعفران استان خراسان جنوبی می‌پردازد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه برداری و ردیابی ویروس

در ماه‌های آبان و آذر سال ۱۳۹۵ از مزارع زعفران استان خراسان جنوبی (شهرستان‌های قاین، خوسف و بیرجند) نمونه‌برداری صورت گرفت. این مزارع دارای علائم بیماری‌های ویروسی نظیر موزاییک برگ، زیگزاگی شدن برگ‌ها و گل، کلروز، ابلقی و بدشکلی بودند. نمونه‌های زعفران جهت بررسی در شرایط خنک به آزمایشگاه انتقال یافت. ردیابی ابتدایی ویروس موزاییک

به یک پلی پروتئین به طول ۳۱۶۳ و یا ۳۱۶۴ اسید آمینه ترجمه شده و سپس توسط پروتئین‌های ویروسی به حداقل ۱۰ پروتئین شکسته می‌شود (نگوین و همکاران ۲۰۱۳، تومیمورا و همکاران ۲۰۰۴). ویروس موزاییک شلغم بالاترین دامنه‌ی میزبانی را در بین پوتی ویروس‌ها دارد و به عنوان یکی از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده کننده‌ی محصولات زراعی و زینتی در ۲۸ کشور جهان در مناطق معتدل و گرمسیر در آفریقا، آسیا، شمال و جنوب آمریکا شناخته شده است (اوشیما و همکاران ۲۰۰۷). ویروس موزاییک شلغم همانند سایر اعضای جنس پوتی ویروس در طبیعت توسط تعداد زیادی گونه شته به روش ناپایا منتقل می‌شود (قربانی و همکاران ۱۳۸۶، حاج قاسم و والس ۲۰۰۸، وانگ و پیرون ۱۹۹۹). در ایران نخستین بار، ویروس موزاییک شلغم توسط ایزدپناه از استان فارس گزارش شد (ایزد پناه ۱۳۶۱). این ویروس در اصفهان نیز توسط بهار و همکاران از گیاه شب بو گزارش گردید. قربانی و همکاران در سال (۱۳۸۶) آلودگی ویروس موزاییک شلغم را از گیاه کلزا در شیراز، ساری و ورامین گزارش کردند. ویروس موزاییک شلغم در ایران از گیاهان زینتی شب بوی خیری (*Cheiranthus cheiri*)، گونه‌ای گل داوودی (*Chrysanthemum sp.*)، گل حنا (*Impatiens balsamina*)، اطلسی (*Petunia hybrida*)، آهار (*Zinnia elegans*) و همچنین چند گونه علف هرز از تیره چلیپائی‌ان گزارش شده است (فرزاد فر و همکاران ۲۰۰۵). سبک خیز و همکاران در سال ۱۳۹۴، ویروس مذکور را با روش‌های مولکولی از مزارع استان خراسان رضوی بر روی گیاه خردل کاذب ردیابی کردند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که جدایه‌های این ویروس بر اساس میزبان و توالی ژن پروتئین پوششی در چهار پاتوتیپ قرار می‌گیرند. پاتوتیپ [BR] که کلم و ترب را آلوده می‌کنند، [B(R)] جدایه‌هایی که کلم را به صورت سیستمیک آلوده نموده ولی بندرت ترب را آلوده می‌کنند، [B] جدایه‌هایی که اغلب کلم‌ها را آلوده، اما ترب را آلوده نمی‌کند و [B(B)] جدایه‌هایی که گیاهان کلم را گاهی و با تاخیر آلوده می‌کنند اما ترب را

<sup>1</sup>Double antibody sandwich-ELISA (DAS-ELISA)

تسوالی آغازگرهای مسس—تقیم -5'  
 5'-3'CAAGCAATCTTTGAGGATTAT و معکوس-5'  
 3'-TATTTCCCATAAGCGAGAATA می باشند که به  
 ترتیب در جایگاه‌های ۸۷۲۶-۸۷۰۵ و ۹۶۶۹-۹۶۹۰ قرار  
 گرفتند (سانچز و همکاران ۲۰۰۳). برای ساخت DNA  
 مکمل در یک لوله، به ازای هر نمونه ۲/۵ میکرولیتر از  
 آغازگر معکوس (۱۵ پیکومول) و شش میکرولیتر آب مقطر  
 استریل اضافه شد، سپس به هر لوله‌ی کوچک ۸/۵  
 میکرولیتر مخلوط و پنج میکرولیتر از RNA استخراج شده  
 اضافه شد، به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۶۰ درجه‌ی  
 سانتیگراد و سپس یک دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. سپس  
 چهار میکرولیتر بافر، دو میکرولیتر از dNTP (۱۰ میلی  
 مولار) و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (1000u) (RevertAid  
 Reverse Transcriptase, Fermentase) به هر لوله اضافه  
 گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتیگراد  
 و سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد در دستگاه  
 ترموسایکلر قرار گرفت. به منظور تکثیر ژن پروتئین  
 پوششی از PCR به صورت زیر استفاده گردید. در لوله به  
 ازای هر نمونه مقادیر ۱۲/۵ میکرولیتر از Premix (2X PCR  
 Master mix Red)، ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس (۱۰  
 پیکومول)، یک میکرولیتر از آغازگر مستقیم (۱۰ پیکومول)  
 و همچنین ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد.  
 سپس ۲۱ میکرولیتر به لوله‌های کوچک انتقال داده شد و  
 چهار میکرولیتر از cDNA هر جدایه به لوله مورد نظر  
 انتقال داده شد. سپس به دستگاه ترموسایکلر با برنامه  
 حرارتی یک چرخه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به  
 مدت چهار دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه متشکل از دمای  
 ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای ۵۵/۵  
 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه‌ی  
 سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام شد. در نهایت  
 دمای ۷۲ درجه‌ی 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

شلغم با آزمون سرولوژیکی الایزای ساندویچی<sup>۱</sup> و آنتی  
 سرم‌های پلی کلونال تهیه شده از شرکت DSMZ آلمان  
 انجام شد (کلارک و آدامز ۱۹۷۷). شاهد مثبت از شرکت  
 Bioreba تهیه گردید. نمونه‌های دارای سه برابر جذب شاهد  
 منفی با دستگاه الایزاخوان مدل EL800 (Biotek Instrument-آمریکا) و با طول موج ۴۰۵ نانومتر ارزیابی و به  
 عنوان نمونه‌ی مثبت در نظر گرفته شدند.

### مطالعات گلخانه‌ای

تمامی ۹ نمونه‌ی مثبت در آزمون پی‌سی‌آر به منظور  
 بررسی بیولوژیکی جدایه‌های این ویروس در شرایط  
 گلخانه‌ای، روی گیاهان محک شامل توتون (*Nicotiana*  
*N. tabacum cv. Whiteburley* و *tabacum cv. Samsun*) و  
 سلمه‌تره (*Chenopodium quinoa*) بررسی شدند. به منظور  
 کشت گیاهان، گلدانها از ترکیب مساوی پیت، پرلیت و  
 خاک آماده شدند. گیاهان کشت شده در شرایط گلخانه  
 در مرحله‌ی ۳-۵ برگگی با جدایه‌های ویروس به روش  
 مکانیکی و با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و pH  
 برابر با هفت، مایه‌زنی گردید. این گیاهان در شرایط  
 گلخانه، در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت نور،  
 نگهداری و هر روز آبیاری شدند و با محلول هوگلند به  
 منظور رشد بهتر محلول‌پاشی گردیدند. علائم روی گیاهان  
 مایه‌زنی شده، پس از دو هفته بررسی گردید.

### شناسایی ویروس با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس

به منظور استخراج RNA کل، از روش CTAB  
 تغییر یافته استفاده شد (چانگ و همکاران ۱۹۹۳). با این  
 روش RNA کل از ۹ نمونه‌ی مثبت در آزمون الایزا  
 استخراج گردید. سپس آزمون واکنش زنجیره‌ای  
 پلیمرز با نسخه‌برداری معکوس<sup>۲</sup> با آغازگرهای  
 اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس انجام شد.

<sup>1</sup>Coat Protein, CP

<sup>2</sup>Reverse transcription-polymerase chain reaction; (RT-PCR)

علائم ایجاد شده توسط ویروس فوق در جدایه‌های منتخب و مثبت در آزمون PCR، بر روی گیاهان محک در شرایط گلخانه، ابتدا بصورت موزائیک خفیف و سپس موزائیک شدید، زردی و کلروز ظاهر شد. بوته‌های آلوده به ویروس دارای رشد کم نسبت به بوته‌های سالم بودند و علائم کوتولگی در آنها مشهود گردید (شکل ۱).

### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، همسانه‌سازی و تعیین ترادف

به منظور شناسایی مولکولی ویروس موزائیک شلغم در نمونه‌های مثبت در آزمون الیزا، از یک جفت آغازگر اختصاصی پروتئین پوششی استفاده و قطعه‌ای به طول ۹۸۰ جفت باز در نه نمونه تکثیر گردید. به منظور مطالعات تبارزایی، تمامی این نه جدایه از ویروس موزائیک شلغم که از مزارع زعفران شهرستان‌های قاین و بیرجند جمع‌آوری شده بود، تعیین توالی گردید، مقایسه‌ی توالی‌های حاصل با سایر توالی‌ها در پایگاه بلاست، نشان از آلودگی تمامی جدایه‌های تعیین توالی شده در این تحقیق، به ویروس موزائیک شلغم داشت.

### د) آنالیزهای تبارزایی و نوترکیبی

درخت تبارزایی بر اساس ژن پروتئین پوششی به طول ۸۶۴ نوکلئوتید و ۲۸۸ اسید آمینه مربوط به ۹ جدایه‌ی ایرانی ویروس موزائیک شلغم جدا شده از گیاه زعفران (جدول ۲) و ۳۰ جدایه‌ی موجود در بانک ژن ترسیم شد. در این درخت تبارزایی، توالی‌ها در چهار گروه مشخص که در تحقیقات پیشین گروه‌بندی شده بودند، قرار گرفتند (اشیما ۲۰۰۷) (شکل ۲). این چهار گروه شامل Asian BR، Basal BR، World-B و Basal B می‌باشند. شش جدایه‌ی این تحقیق در گروه Asian-BR و سه جدایه در گروه World B واقع شدند. در گروه Asian BR دو زیر گروه دیده می‌شود که در یک زیر گروه جدایه‌هایی از ایران با رتبه‌های KF040493، KF040488 و KF040489 چین با رتبه‌های KF060651، KF040491، KF060650، AB093627 و AB252103، شش جدایه‌ی ویروس مذکور

DNA Green Viewer (پارس‌توس - ایران) الکتروفورز گردید.

### تعیین توالی و بررسی های تبارزایی

برای تعیین توالی ناحیه‌ی پوشش پروتئینی، محصول PCR تعداد ۹ جدایه از استان خراسان جنوبی، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند. محصولات PCR موردنظر، از روی ژل بریده شدند و با استفاده از کیت SV Gel Clean-up System Wizard® خالص‌سازی و جهت تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال گردیدند. توالی‌های بدست آمده به شکل فایل‌های با فرمت Fasta و Text آماده شد. به منظور تایید کامل وجود جدایه‌های این ویروس و همچنین بررسی جایگاه تبارزایی آنها در مقایسه با جدایه‌های دنیا، توالی‌های حاصل با استفاده از ابزار BLAST در پایگاه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih>) مشابهت‌یابی شد. پس از تعیین میزان همولوژی، قطعه‌ی مربوط به ژن پروتئین پوششی کامل، توسط نرم افزار Bioedit هم‌ردیف‌سازی و به منظور بررسی رابطه‌ی تبارزایی جدایه‌های مورد مطالعه، درخت مربوط به آن با روش Maximum likelihood توسط نرم افزار MEGA 6 (تامورا ۲۰۱۳) ترسیم شد. سپس مجموعه‌ی داده‌های هم‌ردیف شده برای مقایسه‌ی درصد همولوژی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای با دو برنامه MegAlign (کلولی و آرنولد ۱۹۹۶) و SDTv 1.2 (موهیره و همکاران ۲۰۱۴) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی وقوع نوترکیبی در جدایه‌های این تحقیق از نرم افزار RDP4 استفاده گردید (مارتین و همکاران ۲۰۱۵).

### نتایج

#### ردیابی ویروس با روش الیزا

آلودگی ۱۷۹ نمونه‌ی جمع‌آوری شده زعفران به ویروس موزائیک شلغم در استان خراسان جنوبی در آزمون DAS-ELISA برابر ۱۰/۸۵ درصد برآورد شد (جدول ۲).

#### مطالعات گلخانه‌ای

حضور دارند، بنابراین بسیاری از این گیاهان و علف های هرز تیره Brassicacea می توانند به عنوان منبع آلودگی بوده و با فعالیت ناقلین در طی تابستان و پاییز، ویروس را بر روی گیاه زعفران انتقال دهند. همچنین فعالیت ناقل شته ای در مناطق مختلف، روی میزان آلودگی و موفقیت آن اثر گذار است. در بررسی تبارزایی صورت گرفته بر مبنی توالی پروتئین پوششی جدایه های ایرانی مربوط به زعفران و جدایه های دنیا چهار گروه تشکیل شد که جدایه های ایرانی در گروه های Asian BR و World B قرار گرفتند (شکل ۲). تامیمورا و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که جدایه هائی که منشأ این ویروس می باشند در گروه Basal B که شامل جدایه های اروپا و آسیا است، قرار می گیرند و احتمالاً منشأ این ویروس از مناطق اروپای جنوبی و آسیای صغیر و میانه است. گروه Asian BR اغلب دارای جدایه های نوترکیب است (تان و همکاران ۲۰۰۴)، ولی اخیراً ۹ جدایه غیر نوترکیب از ایران (فرزاد فر و همکاران ۲۰۱۴) و چین (اشیما ۲۰۰۷) نیز در آن قرار گرفته اند که مشخص می کند این گروه اجداد مشخصی ندارد و نسبت به گروه Basal جدیدتر بوده و محدود به جدایه های غرب آسیا می باشند. در این تحقیق، از بین ۹ جدایه ایرانی، تعداد شش جدایه مربوط به مناطق خوسف و بیرجند در گروه Asian BR قرار گرفتند و با سایر جدایه های ایرانی این گروه ۹۸ درصد شباهت، در سطح نوکلئوتیدی نشان دادند که بنابر نتایج فرزاد فر و پوررحیم (۲۰۱۴) و با استفاده از نرم افزار RDP4 این شباهت بالا، نشان از غیر نوترکیب بودن این شش جدایه دارد. سبک خیز و همکاران در سال ۱۳۹۴ در بررسی تبارزایی یک جدایه از گیاه خردل وحشی در مزارع کلزا نشان دادند که این جدایه در گروه Basal B قرار می گیرد. سه جدایه های ایرانی دیگر موجود در بانک ژن نیز در گروه Basal B واقع شدند (فرزاد فر و پوررحیم ۲۰۰۹). در تحقیق حاضر هیچ جدایه مربوط به زعفران، در این گروه واقع نشد. سه جدایه ایرانی دیگر بررسی شده در این تحقیق، در گروه world B و نزدیک به جدایه هایی از نیوزلند و کانادا قرار گرفتند که

جدا شده از مزارع زعفران شهرستان های بیرجند و خوسف قرار گرفتند، در زیرگروه دیگر جدایه ای از ترکیه با رس شماره AB093604 قرار گرفت. در گروه World B جدایه هایی از نیوزلند، کانادا، چک و سه جدایه مربوط به شهرستان قائن بررسی شده در این تحقیق قرار گرفتند (شکل ۲). هیچ یک از جدایه های ایرانی این تحقیق در گروه های Basal B و Basal BR قرار نگرفتند. ماتریکس تشابه در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با نرم افزار MegAlign نشان داد که بیشترین شباهت بین جدایه SKK10 از ایران با جدایه ایرانی IRNTT3 (موجود در بانک ژن) به میزان ۹۸/۹۶ و کمترین تشابه بین جدایه ایرانی SKK10 با AB093598 از ایتالیا به میزان ۸۴/۵ درصد می باشد. بررسی های انجام شده با استفاده از ماتریکس تشابه بین جدایه های ایرانی با یکدیگر نشان داد که بیشترین شباهت در سطح نوکلئوتیدی بین SHG27 و SHG32 به میزان ۹۷ درصد بود. این دو جدایه هر دو مربوط به منطقه ی قاین بوده و در بررسی تبارزایی در گروه World B قرار گرفتند. کمترین شباهت نیز بین SKG59 با SKK16 به میزان ۸۷/۳ درصد دیده شد که مربوط به دو منطقه دور از هم در استان خراسان جنوبی بوده و در تبارزایی نیز در دو گروه مجزا قرار گرفتند. به دلیل تعداد زیاد نمونه تنها نتایج ماتریکس تشابه با نرم افزار SDTV نمایش داده شد (شکل ۴). مقایسه ی اسید آمینه جدایه های مورد بررسی در این تحقیق با بانک ژن با نرم افزار Bioedit و همردیف سازی آنها انجام شد، که نتایج بیانگر جایگزینی تعدادی اسید آمینه در جدایه های ایرانی در مقایسه با دنیا است.

#### بحث

در این تحقیق به ردیابی و بررسی تبارزایی ویروس موزاییک شلغم در مزارع زعفران استان خراسان جنوبی و پراکنش نسبی آن پرداخته شد. در مناطق و شهرستان های متفاوت استان، تفاوت در میزان آلودگی مشاهده گردید که می تواند به علت تغییرات اکولوژیک و وجود یا عدم وجود منابع اولیه ی نگهدارنده ویروس باشد. در خراسان جنوبی محصولات تیره Brassicacea در بهار کشت شده و تا پاییز

جدایه SKG59 در جایگاه ۱۹۸ جایگزینی Q با D دیده می شود. تفاوت در منطقه‌ی جغرافیایی نیز در قرار گیری سه جدایه قائن در یک گروه و مجزا از جدایه های بیرجند و خوسف موثر بوده است. همچنین در گروه World B جدایه‌های نوترکیبی از نیوزلند و کانادا قرار دارند که ظاهراً از جدایه‌های قدیمی مربوط به کشورهای آلمان و انگلیس بوده که به این منطقه مهاجرت کرده و نوظهور می باشند (یاساکا و همکاران ۲۰۱۵). این ظهور جدید نه تنها در ویروس های گیاهی بلکه در ویروس های حیوانی نیز دیده می شود (مونچی و همکاران ۲۰۰۲). بنابراین بروز نوترکیبی در دو جدایه ایرانی این تحقیق، در حین سازگاری با میزبان جدید وجود دارد. بر اساس نتایج حاصل، بررسی آلودگی طبیعی و خصوصیات مولکولی این ویروس برای اولین بار بر روی گیاه زعفران بررسی شده است.

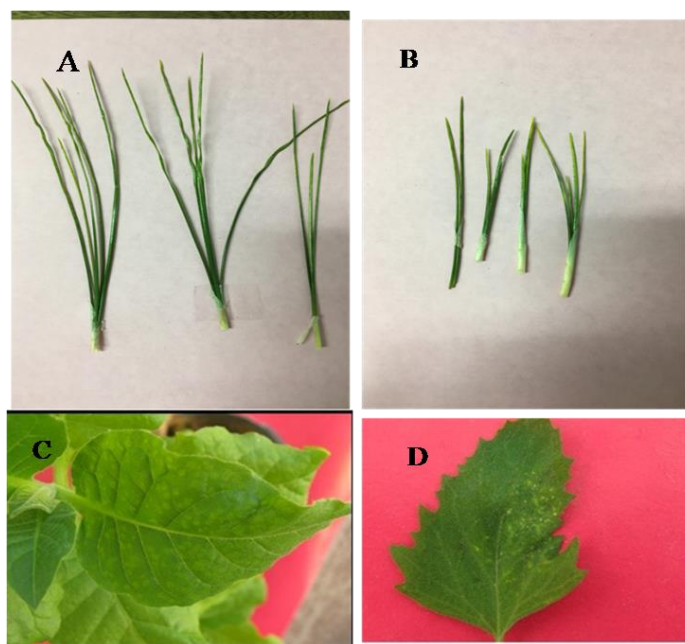
این نتایج، متفاوت از سایر جدایه‌ی ایرانی مطالعه شده در تحقیقات پیشین بوده است. دلیل جدا شدن سه جدایه این تحقیق و موقعیت آن ها در این گروه می تواند به دلیل تغییرات صورت گرفته در سطح آمینو اسیدی و نوترکیبی این جدایه ها باشد. از طرف دیگر دامنه‌ی میزبانی وسیع نشان از تکامل و تغییر پذیری ویروس با انجام نوترکیبی دارد که نقش زیادی در تکامل و سازگاری ویروس بازی می کند (کرک ماز و همکاران ۲۰۰۸). آنالیزهای صورت گرفته با نرم افزار RDP4 در تحقیق حاضر، موید این مطلب و وجود نوترکیبی در دو جدایه‌ی قرار گرفته در گروه World B شامل SKG32 و SKG27 می باشد (شکل ۳). مقایسه‌ی توالی اسید آمینه جدایه های ایرانی با ۳۰ جدایه‌ی موجود در بانک ژن، نیز بیانگر بروز تغییراتی در سطح اسید آمینه‌ای است که بیشتر در جدایه‌های شهرستان قائن قرار گرفته در گروه World B دیده شده است. بعنوان مثال در جدایه SHG27 در جایگاه ۱۴۱ جایگزینی T با I یا در

جدول ۱- جدایه های ایرانی ویروس موزایک شلغم جدا شده از گیاه زعفران که در تحقیق حاضر تعیین توالی شدند.

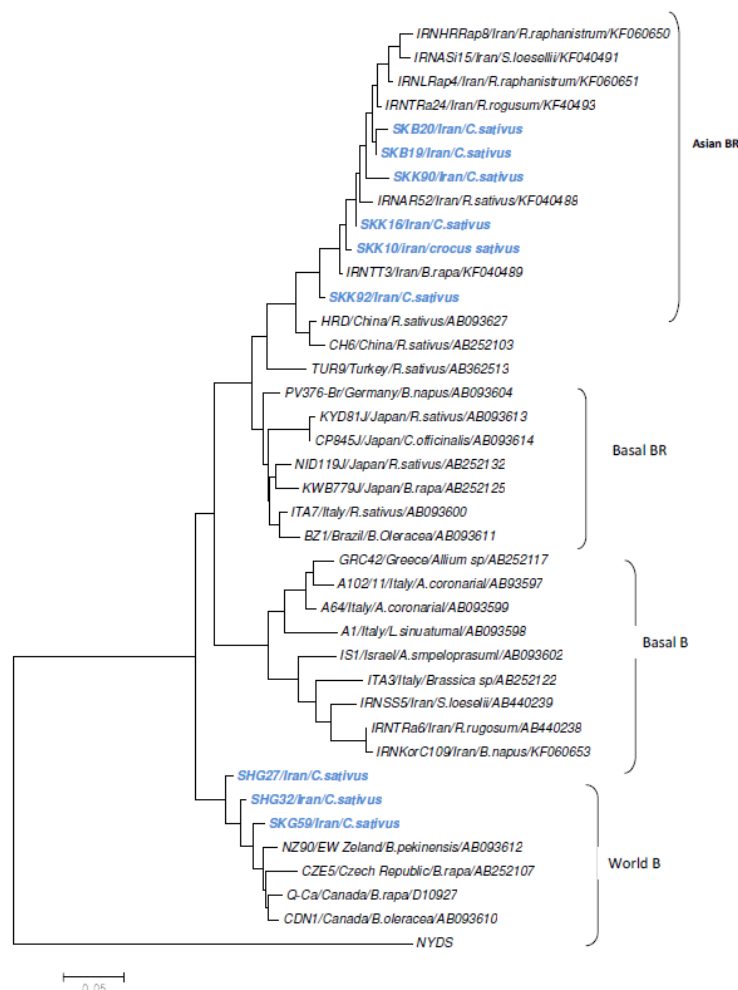
شماره	نام جدایه	محل نمونه برداری-میزبان
۱	SHG27	قائن-زعفران
۲	SHG32	قائن-زعفران
۳	SKG59	قائن-زعفران
۴	SKB20	بیرجند-زعفران
۵	SKB19	بیرجند-زعفران
۶	SKK90	خوسف-زعفران
۷	SKK16	خوسف-زعفران
۸	SKK10	خوسف-زعفران
۹	SKK92	خوسف-زعفران

جدول ۲- مناطق نمونه برداری، تعداد نمونه و درصد آلودگی در نمونه‌های زعفران بررسی شده با آزمون الیزا.

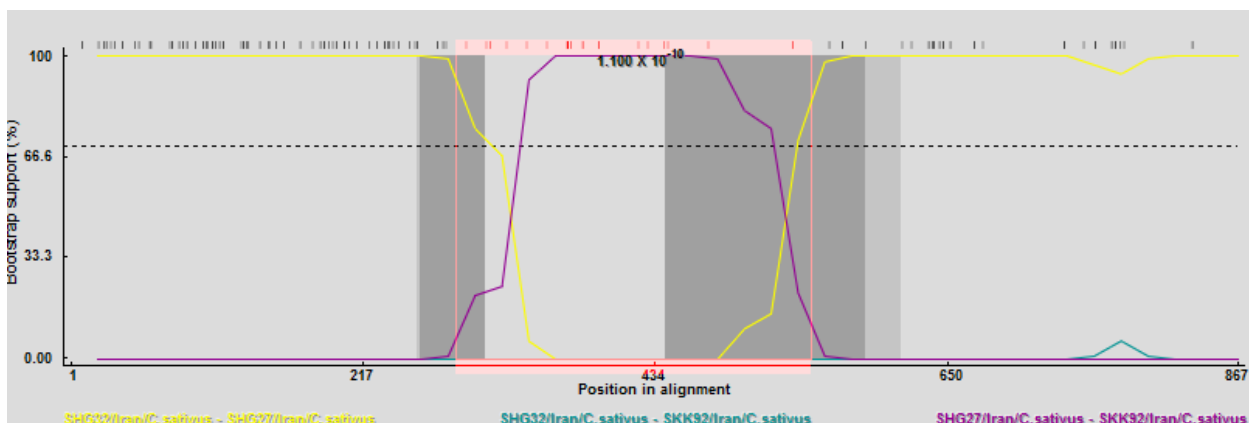
محل جمع آوری (شهرستان)	تعداد نمونه جمع آوری شده	تعداد نمونه مثبت	درصد آلودگی در نمونه های جمع آوری شده
خوسف (روستای گل)	۶۴	۶	۹/۳۷
خوسف (روستای فریز)	۲۴	۳	۱۲/۵
قاین (روستای دهشک)	۲۴	۲	۸/۳
قاین (روستای تبلو)	۹	۲	۲۲/۲
بیرجند	۲۰	۳	۱۵
قاین (منطقه ابوالخیری)	۱۴	۱	۷/۱
قاین (منطقه دبر)	۲۰	۲	۱۰
جمع کل	۱۷۵	۱۹	۱۰/۸۵



شکل ۱- A و B: مربوط به علائم ویروس موزاییک شلغم بر روی گیاه زعفران جمع آوری شده از مزارع استان خراسان جنوبی C: گیاه *Nicotiana tabacum cv. samsun* آلوده به ویروس موزاییک شلغم در گلخانه D: نمونه *Chenopodium quinoa* آلوده به ویروس در گلخانه.



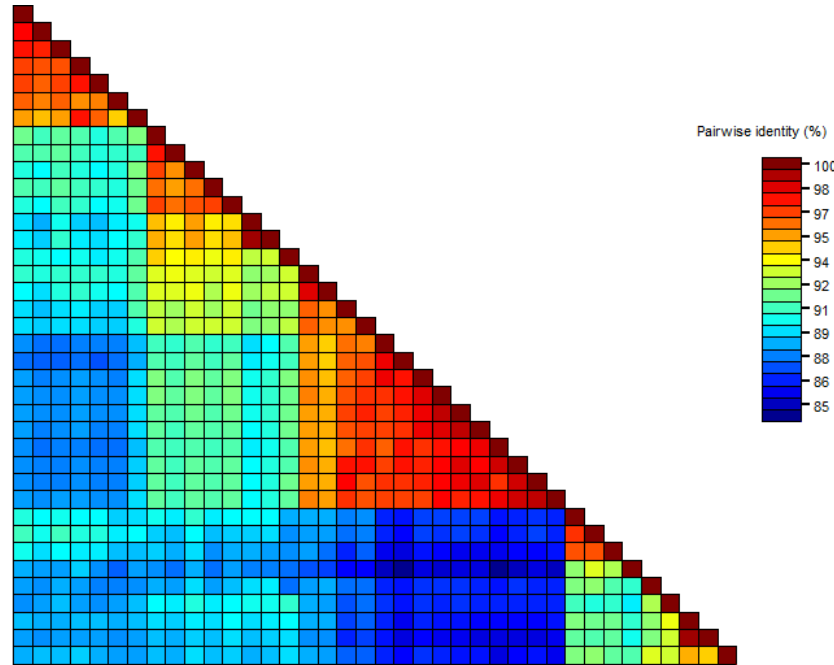
شکل ۲ - درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه های ویروس موزائیک شلغم مربوط به ۹ جدایه ی زعفران و جدایه های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA6 و روش Maximum likelihood. ویروس *Narcissus yellow strip virus* (NYSV) به عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است. جدایه های ایرانی تعیین ترادف شده این تحقیق بصورت پر رنگ و با رنگ آبی نشان داده شده است.



شکل ۳- وقوع نوترکیبی در جدایه های SHG27 و SHG32 که با رنگ بنفش مشخص و با نرم افزار RDP4 ترسیم شده است.



CDN1\_Canada\_B.oleracea\_AB093610  
 QCa\_Canada\_B.rapa\_D10927  
 NZ90\_EW\_Zeland\_B.pekinensis\_AB093612  
 SHG32\_Iran\_C.sativus  
 SKG59\_Iran\_C.sativus  
 CZE5\_Czech\_Republic\_B.rapa\_AB252107  
 SHG27\_Iran\_C.sativus  
 ITA7\_Italy\_R.sativus\_AB093600  
 BZ1\_Brazil\_B.Oleracea\_AB093611  
 PV376Br\_Germany\_B.napus\_AB093604  
 KWB779J\_Japan\_B.rapa\_AB252125  
 NID119J\_Japan\_R.sativus\_AB252132  
 KYD81J\_Japan\_R.sativus\_AB093613  
 CP845J\_Japan\_C.officinalis\_AB093614  
 TUR9\_Turkey\_R.sativus\_AB362513  
 HRD\_China\_R.sativus\_AB093627  
 CH6\_China\_R.sativus\_AB252103  
 SKK92\_Iran\_C.sativus  
 SKK90\_Iran\_C.sativus  
 IRNAS15\_Iran\_S.loesellii\_KF040491  
 IRNHRrap8\_Iran\_R.raphanistrum\_KF060650  
 IRNLRap4\_Iran\_R.raphanistrum\_KF060651  
 IRNTRa24\_Iran\_R.rogusum\_KF40493  
 SKB19\_Iran\_C.sativus  
 SKB20\_Iran\_C.sativus  
 IRNAR52\_Iran\_R.sativus\_KF040488  
 SKK16\_Iran\_C.sativus  
 IRNTT3\_Iran\_B.rapa\_KF040489  
 SKK10\_Iran\_crocus\_sativus  
 AB93597  
 A64\_Italy\_A.coronaria\_AB093599  
 GRC42\_Greece\_Allium\_sp\_AB252117  
 A1\_Italy\_L.sinuatum\_AB093598  
 IS1\_Israel\_A.smpeloprasum\_AB093602  
 ITA3\_Italy\_Brassica\_sp\_AB252122  
 IRNTRa6\_Iran\_R.rugosum\_AB440238  
 IRNKorC109\_Iran\_B.napus\_KF060653  
 IRNSS5\_Iran\_S.loesellii\_AB440239



CDN1\_Canada\_B.oleracea\_AB093610  
 QCa\_Canada\_B.rapa\_D10927  
 NZ90\_EW\_Zeland\_B.pekinensis\_AB093612  
 SHG32\_Iran\_C.sativus  
 SKG59\_Iran\_C.sativus  
 CZE5\_Czech\_Republic\_B.rapa\_AB252107  
 SHG27\_Iran\_C.sativus  
 ITA7\_Italy\_R.sativus\_AB093600  
 BZ1\_Brazil\_B.Oleracea\_AB093611  
 PV376Br\_Germany\_B.napus\_AB093604  
 KWB779J\_Japan\_B.rapa\_AB252125  
 NID119J\_Japan\_R.sativus\_AB252132  
 KYD81J\_Japan\_R.sativus\_AB093613  
 CP845J\_Japan\_C.officinalis\_AB093614  
 TUR9\_Turkey\_R.sativus\_AB362513  
 HRD\_China\_R.sativus\_AB093627  
 CH6\_China\_R.sativus\_AB252103  
 SKK92\_Iran\_C.sativus  
 SKK90\_Iran\_C.sativus  
 IRNAS15\_Iran\_S.loesellii\_KF040491  
 IRNHRrap8\_Iran\_R.raphanistrum\_KF060650  
 IRNLRap4\_Iran\_R.raphanistrum\_KF060651  
 IRNTRa24\_Iran\_R.rogusum\_KF40493  
 SKB19\_Iran\_C.sativus  
 SKB20\_Iran\_C.sativus  
 IRNAR52\_Iran\_R.sativus\_KF040488  
 SKK16\_Iran\_C.sativus  
 IRNTT3\_Iran\_B.rapa\_KF040489  
 SKK10\_Iran\_crocus\_sativus  
 AB93597  
 A64\_Italy\_A.coronaria\_AB093599  
 GRC42\_Greece\_Allium\_sp\_AB252117  
 A1\_Italy\_L.sinuatum\_AB093598  
 IS1\_Israel\_A.smpeloprasum\_AB093602  
 ITA3\_Italy\_Brassica\_sp\_AB252122  
 IRNTRa6\_Iran\_R.rugosum\_AB440238  
 IRNKorC109\_Iran\_B.napus\_KF060653  
 IRNSS5\_Iran\_S.loesellii\_AB440239

شکل ۴- مقایسه درصد هومولوژی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی ۹ جدایه‌ی ایرانی با جدایه‌های دنیا که به روش Clustal W با برنامه SDTv ترسیم شده است.

## منابع

- ایزدپناه ک، ۱۳۶۱. لیست مشروح بیماری های ویروسی و شبه ویروسی گیاهان در استان فارس، دانشگاه شیراز. صفحه ۱۸۸.
- سبک خیز م ع، جعفرپور ب، شهریاری احمدی ف ا. طریقی س و صفرنژاد م ر، ۱۳۹۴. شناسایی ویروس موزاییک شلغم در خردل کاذب از ایران. حفاظت گیاهان، جلد ۲۹. شماره ۲. صفحه های ۲۳۱ تا ۲۳۷.
- قربانی ش، شهرآئین ن، دهقانپور ح، سهندی او پوررحیم ر، ۱۳۸۶. تشخیص سرولوژیکی و خالص سازی ویروس موزائیک شلغم (TuMV) از گیاه کلزا. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۰، صفحه های ۶۱ تا ۷۱.
- Chang A. 1993. Modified CTAB RNA extraction method. Plant Molecular Biology reporter, 11: 113-116
- Clark MF and Adams AN, 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34:475-483.
- Clewley JP and Arnold C, 1996. Sequence Data Analysis Guidebook Series: Methods in Molecular Biology, 70: 119-129.
- Farzadfar S, Ohshima K, Pourrahim R, Golnaraghi A, Sajedi S and Ahoonmanesh A, 2005. Reservoir weed hosts for *Turnip mosaic virus* in Iran. Plant Disease, 89: 339.
- Farzadfar S, Tomitaka Y, Ikematsu M, Golnaraghi AR, Pourrahim R, Ohshima K. 2009. Molecular characterization of *Turnip mosaic virus* isolates from Brassicaceae weeds. European Journal of Plant Pathology, 124:45-55.
- Farzadfar SH and Pourrahim R, 2014. Characterization of *Turnip mosaic virus* from the Asian-BR Population in Iran. Plant Virus Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), P.O.Box 19395-1454 Tehran, Iran. Journal of Phytopathology.
- Haj Kassem A, and Walsh J, 2008. Characterising resistance to Turnip mosaic virus (TuMV) in turnip (*Brassica rapa rapa*). Arabian Journal of Plant Protection, 26: 168-172.
- Hughes SL, Green SK, Lydiate DJ and Walsh JA, 2002. Resistance to Turnip mosaic virus in *Brassica rapa* and *B. napus* and the analysis of genetic inheritance in selected lines. Plant Pathology, 51:567-573.
- Korkmaz S, Tomitaka Y, Onder S and Ohshima K, 2008. Occurrence and molecular characterization of Turkish isolates of Turnip mosaic virus. Plant Pathology, 57:1155-1162.
- Martin D, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B, 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. Virus Evolution, 1:5-10.
- Monci FS, Nchez Campos S, Navas Castillo J and Moriones E, 2002. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. Virology, 303: 317-326.
- Muhire BM, Varsani A and Darren PM, 2014. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. Plos 1. 9(9)

- Nguyen HD, Tomitaka Y, Ho S, Duchene S, Vetten HJ, Lesemann D, Walsh JA, Gibbs AJ and Ohshima K, 2013. Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLoS One*, 8 (2): E55336.4.
- Ohshima K, Yamaguchi Y and Hirota R, 2002. Molecular evolution of Turnip mosaic virus; evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, 83:1511–1521.
- Ohshima K, Tomitaka Y, Wood JT, Minematsu Y, Kajiyama H, Tomimura K and Gibbs A J, 2007. Patterns of recombination in Turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. *Journal of General Virology*, 88: 298-315.
- Sanchez F, Wang X, Jenner CE, Walsh JA and Ponz F, 2003. Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Research*. 94: 33-43.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tan Z, Wada Y, Chen J and Ohshima K, 2004. Inter- and intralineage recombinants are common in natural populations of Turnip mosaic virus. *Journal of General Virology*, 85: 2683–96
- Tomimura K, Spak J, Katis N, Jenner CE, Walsh JA and Gibbs AJ, 2004. Comparisons of the genetic structure of populations of Turnip mosaic virus in West and East Eurasia. *Virology*, 330: 408-423.
- Tomitaka Y and Ohshima K, 2006. A phylogeographical study of the Turnip mosaic virus population in East Asia reveals an ‘emergent’ lineage in Japan. *Molecular Ecology*, 15: 4437-4457.
- Wang RY and Pirone TP, 1999. Purification and characterization of Turnip mosaic virus helper component protein. *Phytopathology*, 89:564-567.
- Yasaka R, Ohba K, Schwinghamer M, Fletcher J, Ochoa-Corona F, Thomas J, Ho S., Gibbs A, and Ohshima K. 2015. Phylodynamic evidence of the migration of turnip mosaic potyvirus from Europe to Australia and New Zealand. *Journal of General Virology*, 96, 701–713

## Detection and Phylogenetic Analysis of *Turnip mosaic virus* on Saffron (*Crocus sativus*) in Iran

M Hedari<sup>1</sup>, SA Hosseini<sup>2\*</sup> and R Douri<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MSc. Student, Plant Patology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand.

<sup>2</sup>Assistant professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Birjand

<sup>3</sup>Environment Research Center, Soth Kharsan Povince.

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

Received: 2 March 2017

Accepted: 6 November 2017

### Abstract

Turnip mosaic virus is a member of the genus *Potyvirus* in the family *Potyviridae* and has the broadest host range in the family. In order to detect and characterize local isolates of TuMV, 175 saffron samples were collected from Birjand, Khosf and Ghaen in South Khorasan between October and November 2016. Infections with TuMV were detected by ELISA in 10.85 percent of samples. Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR with the virus coat protein (CP) specific primers. As a result, full-length CP gene (980 bp) was amplified from nine samples and sequenced. Phylogenetic analysis of these isolates and 30 GenBank TuMV isolates showed that six Iranian isolates fell in Asian BR group with other isolates from Iran, China and Turkey. Three Iranian isolates fell in World B group with the isolates from Canada and new Zealand. Homology matrix showed the highest similarity between SKK10 and IRNTT3 and the lowest between SKK10 and AB093598 from Italy (98.96 and 87.2%, respectively). The phylogenetic analysis showed that TuMV isolates from saffron plant in Iran were classified in different groups; therefore, they may have derived from different ancestors. This is the first investigation of TuMV on saffron in Iran

**Keywords:** Iran, Turnip mosaic virus, Potyvirus, Saffron.