



Original Article

Detection and Molecular Investigation of *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) in Saffron Fields in Boshruyeh City

Alireza Hammami¹, Seyyedeh Atefeh Hosseini^{*2}, Mehdi Jahani³

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

2 & 3- Associate Professors of Plant pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.

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

Received 20 June 2023; Accepted 24 January 2024

Extended Abstract

Introduction: Saffron (*Crocus sativus* L.) is a crucial crop in Iran, celebrated for its medicinal and economic value. Thriving in arid regions, it's a perennial herb with corms used in food and pharmaceuticals. As the world's priciest spice, it significantly impacts Iran's exports and industries, with a history in traditional medicine dating back 3000 years. Over 90% of global saffron comes from Iran, primarily Khorasan Razavi province (78%) and Khorasan Jonubi province (17%). Saffron is also grown in Fars, Isfahan, and Hamadan.

Boshrouyeh County in Khorasan Jonubi boasts saffron cultivation on 1,307 hectares in 2020-2021, yielding about 3.4695 tons, generating 70 billion Tomans. Regarding plant viruses, the *Cucumber mosaic virus* (CMV) is a significant threat, affecting various plants globally, including cucumbers, tomatoes, and more. In Iran, CMV has been reported in crops like bananas and melons, causing up to 20% yield loss.

This study focuses on CMV in saffron plants in Boshrouyeh County, using molecular methods for precise assessment due to its impact on saffron cultivation.

Materials and Methods: In the autumn of 2022, a survey was conducted in saffron fields to assess virus symptoms like mosaic, stunting, yellowing, wrinkling, and leaf deformities. A total of 148 samples were collected, dried, and stored for analysis. RNA was extracted from young plant leaves using a non-column RNA extraction kit. Specific

viral protein coat primers were used for cDNA synthesis, followed by PCR amplification. The PCR reaction involved denaturation at 94°C for 2 minutes, followed by 40 cycles at 94°C for 40 seconds, 52°C for 30 seconds, and 72°C for 2 minutes, with a final extension at 72°C for 5 minutes. Electrophoresis confirmed three samples were infected with CMV. The amplified viral sequences were extracted and sequenced by a specialized company in South Korea. Sequence similarity was verified using BLAST tools on the NCBI database to confirm the presence of these virus strains and assess their genetic relatedness to global strains.

Results and Discussion: In collected plant samples, various symptoms such as curling, leaf complexity, leaf mosaic, yellowing, and discoloration were observed. To conduct phylogenetic studies, three isolates of Cucumber mosaic virus (CMV) from saffron fields in Raghe and Boshrouyeh were sequenced. Sequence comparisons using BLAST revealed all three isolates shared similarity with CMV. A phylogenetic tree based on the 657-nucleotide coat protein gene sequence was constructed. Analysis with MegaX software compared Iranian isolates with 17 gene bank isolates. The resulting tree contained twelve branches, with Iranian isolates showing the highest similarity to Syrian and Greek isolates. Specifically, Kho1 had the most significant similarity with 100% to ToCMV5-1 from Syria and 98% to PoCMV9-11, also from Syria. Kho2 had the highest similarity of 98% with CMV-GRcl1 from Greece. Kho3 showed 99% similarity to ToCMV5-1 and 99% to Kho1, both from different regions. These findings highlight the genetic diversity of CMV in saffron plants.

Conclusion: In this study, saffron fields in Boshrouyeh County were found to be infected with Cucumber mosaic virus (CMV) using a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) test with a specific CMV primer. Out of 148 saffron samples showing viral disease symptoms, three were confirmed to be infected with CMV, as evidenced by the successful amplification of a 657 base pair fragment using CMV-specific primers. Genetic diversity was assessed based on the sequence of the coat protein of Iranian CMV strains and other strains available in the BLAST database. The results revealed the formation of twelve distinct branches, with Iranian strains falling within the first branch of the first group. The closest strains to Iranian ones were CMV-GRcl1 and ToCMV5-1 from Greece and Syria, respectively. The highest similarity was observed between two Iranian strains, Kho2 from Boshrouyeh and Kho3 from Raqqah, indicating geographical location did not play a significant role in viral classification.

While CMV infection in saffron had been reported using serological methods, this study emphasized the need for molecular identification and protein analysis. Notably, this research represents the first report of CMV presence in saffron fields in South Khorasan.

Conflict of Interest: The author declare no potential conflict of interest related to this research.

Keywords: Beshrueh city, Coat protein gene, Polymerase chain reaction, Sequencing, saffron, Specific primer.



نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)

جلد یازدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۲

شماره صفحه: ۳۱۴-۳۲۷

doi <http://dx.doi.org/10.22077/JSR.2024.6504.1216>

مقاله پژوهشی

ردیابی مولکولی ویروس موزاییک خیار (CMV) در مزارع زعفران شهرستان بشرویه

علیرضا حمامی^۱، سیده عاطفه حسینی^{۲*}، مهدی جهانی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی و باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران.

۲ و ۳- دانشیاران بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی و باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران.

*نویسنده مسئول: Email: ahosseini@birjand.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۴

چکیده

زعفران با نام علمی (*Crocus sativus* L.) از خانواده زنبقیان (*Iridaceae*) یکی از گیاهان زراعی مهم ایران است که از نظر اقتصادی و دارویی ارزش دارد. به منظور شناسایی ویروس موزاییک خیار روی زعفران، ۱۴۸ نمونه دارای علائم زردی، کوتولگی، موزاییک و پیچیدگی برگ از مزارع زعفران شهرستان بشرویه طی آبان و آذر ماه سال ۱۴۰۱ جمع‌آوری گردید. آلودگی سه نمونه جمع‌آوری شده به ویروس موزاییک خیار با استفاده از آزمون زنجیره ای پلیمرز و با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس که قطعه ای به طول ۶۵۷ جفت باز را تکثیر میکنند تایید شد. نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. بررسی‌های تبارزایی بر مبنای توالی ژن پروتئین پوششی ویروس با نرم‌افزارهای مرتبط به منظور تعیین جایگاه ویروس، انجام گردید. سه جدایه شناسایی شده از ویروس موزاییک خیار و سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن در دو گروه تبارزایی و نزدیک به جدایه‌های یونان و کره جنوبی قرار گرفتند. این تحقیق اولین گزارش از وقوع این ویروس در مزارع زعفران شهرستان بشرویه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آغازگر اختصاصی، توالی یابی، زعفران، ژن پروتئین پوششی، شهرستان بشرویه، واکنش زنجیره ای پلیمرز.

مقدمه

بیماری گردند، وجود دارد (Moonsar et al, 2003). ویروس موزاییک خیار (Cucumber mosaic virus, CMV) متعلق به جنس Cucumovirus و در خانواده Bromoviridae قرار دارد. اولین بار این ویروس در سال ۱۹۱۶ به عنوان ویروس بیماری‌زای گیاهی معرفی شده است (Doolittle, 1916). این ویروس پراکنش جهانی دارد و در مناطق بارانی و گرمسیری (Garcia-Arenal & Palukaitis, 2009) در قالب جدایه‌های مختلف و متعدد در طبیعت یافت می‌شود و وسیع‌ترین دامنه میزبانی را در مقایسه با سایر ویروس‌ها دارد. این ویروس قادر است ۱۲۰۰ گونه در بیش از ۱۰۰ خانواده گیاهی را آلوده سازد (Jacquemon, 2012) و در طبیعت به وسیله بذر و با کمک حدود ۶۰ گونه شته منتشر می‌شود. در جهان این ویروس روی خیار، تنباکو، گوجه‌فرنگی، لوبیا چشم بلبلی و کدو (Garcia-Arenal & Palukaitis, 2009) و انواع سبزیجات و گیاهان زینتی گزارش شده است. همچنین این ویروس در ایران از روی میزبان‌های مختلفی مانند موز، نعنای، اسفناج، باقلا، کدو، کدوئیان، گوجه‌فرنگی، شلغم، گلایل، خربزه، بارهنگ کبیر (Abtahi, 2016) و زیتون گزارش شده است. علائم ایجاد شده توسط این ویروس روی میزبان بسته به جدایه‌ی ویروس متفاوت است و به صورت لکه‌های سبز تیره و روشن به شکل موزاییک، کوتولگی، نخ‌شدن برگ‌ها، زردی عمومی و زردی و نکروز موضعی دیده می‌شود (Jacquemon, 2003; Palukaitis & Garcia-Arenal, 2012). خسارت این ویروس از نظر اقتصادی مهم است زیرا ثابت شده است که CMV باعث کاهش ۱۰٪ الی ۲۰٪ عملکرد گیاه میزبان خود در مزرعه می‌شود (Zitter & Murphy, 2009). ویروس CMV ژنوم RNA مثبت، تک رشته‌ای و چند بخشی دارد. ژنوم این ویروس دارای سه بخش شامل RNA 1، RNA 2 و RNA 3 است و پنج پروتئین تولید می‌کند. RNA1، پروتئین بزرگ a1 را تولید می‌کند که وزنی حدود ۱۱۱ کیلودالتون را دارا می‌باشد و نقش آن در همانندسازی ویروس است. RNA2، پروتئین بزرگ a2 با وزنی حدود ۹۷ کیلو دالتون را تولید می‌کند که نقش آنزیم پلیمرز را به عهده دارد. همچنین این بخش یک پروتئین کوچکتر b2 با وزنی حدود ۱۱ کیلو دالتون را نیز تولید می‌کند که نقش سرکوب خاموشی ژن در

زعفران با نام علمی (*Crocus sativus* L.) متعلق به خانواده زنبق (Iridaceae) یکی از گیاهان زراعی مهم در ایران است که ارزش دارویی و اقتصادی ویژه‌ای دارد (Forakinejad, 2008). این گیاه علفی، چند ساله و دارای پیاز یا بنه است که در نواحی خشک و نیمه خشک کشت می‌شود و در صنایع غذایی و دارویی کاربرد دارد. زعفران به عنوان گران‌ترین ادویه جهان، نقش مهمی در محصولات صادراتی و صنعتی ایران دارد. این گیاه در طب سنتی کاربردهای دارویی فراوان دارد (Hosseinzade & Moodi, 2022). سابقه‌ی کاشت زعفران در ایران به بیش از ۳۰۰۰ سال پیش بازمی‌گردد. بیش از ۹۰ درصد زعفران دنیا در ایران تولید می‌شود (Kafi et al, 2015; Koocheki & Seyyedi, 2015). از مجموع سطح زیر کاشت زعفران در کشور، حدود ۶۹۰۰۰ هکتار معادل ۷۸ درصد آن متعلق به استان خراسان رضوی و سپس استان خراسان جنوبی در رتبه بعدی با سطح زیر کاشت ۱۵۰۰۰ هکتار معادل ۱۷ درصد قرار می‌گیرد (Kochaki et al, 2016). علاوه بر استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی، گیاه زعفران در استان‌های فارس، اصفهان و همدان نیز کشت می‌شوند (Karbasi et al, 2016). شهرستان بشرویه با وسعت ۷۹۹۴ کیلومترمربع در شمال غربی استان خراسان جنوبی واقع شده است. این شهرستان از شمال به شهرستان بردسکن، از شرق به فردوس و بجستان و از جنوب و غرب به شهرستان طبس محدود می‌شود (Bargi et al, 2013). زعفران یکی از محصولات مهم کشت شده در سطح شهرستان است، طبق آخرین آمار جهاد کشاورزی شهرستان، سطح زیر کاشت زعفران در سال ۱۳۹۹ معادل ۱۳۰۷ هکتار بوده که میزان زعفران تولیدی طبق همان آمار ۳،۴۶۹۵ تن و درآمد کلی حاصل از برداشت زعفران معادل حدود ۷۰ میلیارد تومان است و از نظر تولید ششمین تولیدکننده زعفران در استان است (Agricultural Jihad Organization of South Khorasan Province, n. d.). در ویروس‌ها تغییرات ژنتیکی زیادی اتفاق می‌افتد و همین امر باعث ایجاد واریانتهایی می‌شود که بر مقاومت گیاهان غلبه کرده و روی میزبان سازگار گردند، به این دلیل امکان تکامل و ظهور واریانتهای جدید ویروسی که بر مقاومت گیاهان میزبان غلبه کرده و سبب شیوع

معکوس بعلاوه ۵ میکرولیتر از RNA استخراج شده مخلوط شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرارداد شده. سپس به مدت یک دقیقه درون ظرف یخ خرد شده قرار گرفت و سپس در هر میکرولیتر ۳/۵ میکرولیتر از بافر RT، ۲ میکرولیتر dNTPs و ۱ میکرولیتر Thermo-Resistance RT تولید شرکت پارس توس با شماره کاتالوگ C101031 اضافه شده و نمونه ها به مدت یک ساعت و در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و سپس ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. (McPherson, 2006)

تکثیر ژن پروتئین پوششی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز

برای تکثیر کل ژن پروتئین پوششی ویروس در هر میکروتیوب هر کدام از واکنشگرهای ذکر شده در جدول ۳ به مقدار تعیین شده با هم مخلوط شدند. واکنشگرها از کیت PCR شرکت پارس توس با شماره کاتالوگ C101082 تهیه شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با برنامه دمایی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و سپس در یک چرخه ۴۰ سیکلی شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۲ درجه سلسیوس و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، انجام شد و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به عنوان تکمیل پلیمریزاسیون انجام شد. پس از آن نتیجه آزمون با انجام الکتروفورز در ژل آگاروز یک درصد چک شد. ژل آگارز حدود یک ساعت در ولتاژ ۸۰ وان شد و پس از آن با استفاده از دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفته و آلودگی سه نمونه به CMV نشان داده شد.

تعیین توالی ویروس

قطعات تکثیر شده‌ی جدایه مورد نظر از روی ژل یا محصول PCR استخراج شده و با استفاده از کیت Gel System Wizard up-Clean SV® شرکت Promega با شماره کاتالوگ A9281 جداسازی و جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. به منظور تایید کامل وجود جدایه‌های این ویروس و بررسی جایگاه تبارزایی آن‌ها در مقایسه با بقیه جدایه‌های دنیا، توالی‌های بدست آمده با استفاده از ابزار BLAST در پایگاه NCBI شباهت سنجی شد.

گیاهان میزبان را دارد. RNA3 نیز دو بخشی است که بخش اول آن پروتئین حرکتی (MP) را تولید می‌کند و بخش دوم آن ناحیه‌ی ۳'، پروتئین پوششی ویروس (CP) را تنظیم می‌کند. با توجه به اهمیت بیماری‌های ویروسی زعفران و گزارش دو مورد از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی در منطقه خراسان جنوبی شامل ویروس موزاییک شلغم (Turnip mosaic virus, TuMV) (Heydari et al, 2018) و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (Tomato spotted wilt virus, TSWV) (Farokhvand et al, 2019) و از طرفی به دلیل مشاهده علائم موزاییک و پیچیدگی هدف از انجام این تحقیق بررسی آلودگی گیاهان زعفران شهرستان بشرویه به ویروس موزاییک خیار می‌باشد. لازم به ذکر است که در پژوهش‌های قبلی وجود ویروس موزاییک خیار با استفاده از روش‌های سرولوژی اثبات شده بود (Parizad & et al, 2017) اما به دلیل دقیق‌تر بودن روش‌های مولکولی و نیز بررسی‌های عمیق‌تر این پژوهش انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در پاییز سال ۱۴۰۱ از مزارع زعفران سطح شهرستان بازدید به عمل آمد و نمونه برداری از گیاهان دارای علائم ویروسی نظیر موزاییک، کوتولگی، زردی، چروکیدگی و بدشکلی برگ‌ها، جمع‌آوری گردید و در سایر موارد که علائمی در مزرعه مشاهده نشد به صورت زیگزگی در طول مزرعه حرکت و نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب شد. در کل تعداد ۱۴۸ نمونه جمع‌آوری گردید که این نمونه‌ها برای نگهداری طولانی مدت خشک شده و در فریزر قرار گرفتند. (جدول ۱).

استخراج آر ان ای کل

استخراج RNA از برگ‌های تازه و جوان گیاه با استفاده از کیت استخراج RNA غیر ستونی شرکت دنازیست با شماره کاتالوگ S-1010-50 و مطابق دستورالعمل قید شده در کیت استخراج انجام گرفت.

روش نسخه برداری معکوس

برای سنتز cDNA (رشته‌ی مکمل) در این تحقیق از آغازگرهای اختصاصی پروتئین پوششی ویروس موزاییک خیار استفاده شد (جدول ۲)، در هر میکروتیوب ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲/۵ میکرولیتر از آغازگر

جدول ۱. مکان‌های نمونه برداری از مزارع زعفران به منظور شناسایی ویروس موزاییک خیار.

Table 1. Sampling locations of saffron fields to identify cucumber mosaic virus.

تعداد نمونه Number	تاریخ نمونه برداری Sampling date	مزرعه Field	محل نمونه برداری Sampling sites
7	5	عباس صادقی Abbas Sadeghi	سرنند Sorond
	2	حسن الهی Hasan elahi	
6	6	عباس مهدی زاده Abbas mahdizade	نیگو Neygu
	5	نوری Nori	
18	5	خلیلیان Khalilian	کرنند Korond
	5	اکبری Akbari	
	3	علی محمدی Ali mohammadi	
18	5	نصیرایی Nasirai	
	5	نجد Najd	رقه Raqqeh
	8	حسن نیازی Hasan Niazi	
23	12	حمیدزاده - زمین ۱ Hamidzade - field1	
	6	حمیدزاده - زمین ۲ Hamidzade - field2	ارسک Eresk
5	5	ناظمی Zazemi	
	5	هراتی Harati	
22	5	عباس رحمانی Abbas Rahmani	
	5	مقیمیان Moghimian	
	12	عامری Ameri	
12	5	احمد عادل - زمین ۱ Ahmad Adel - field1	
	7	احمد عادل - زمین ۲ Ahmad Adel - field2	بشرویه Boshruyeh
37	5	اشراقی Eshrahgi	
	5	اسدی مقدم - زمین ۱ Asadimighadam - field1	
	5	اسدی مقدم - زمین ۲ Asadimighadam - field2	
	7	رضایی Rezaei	
	8	علی عادل Ali Adel	
7	هادی نژاد Hadinejad		

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای اختصاصی ویروس CMV استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای تکثیر کل ژن پروتئین پوششی.

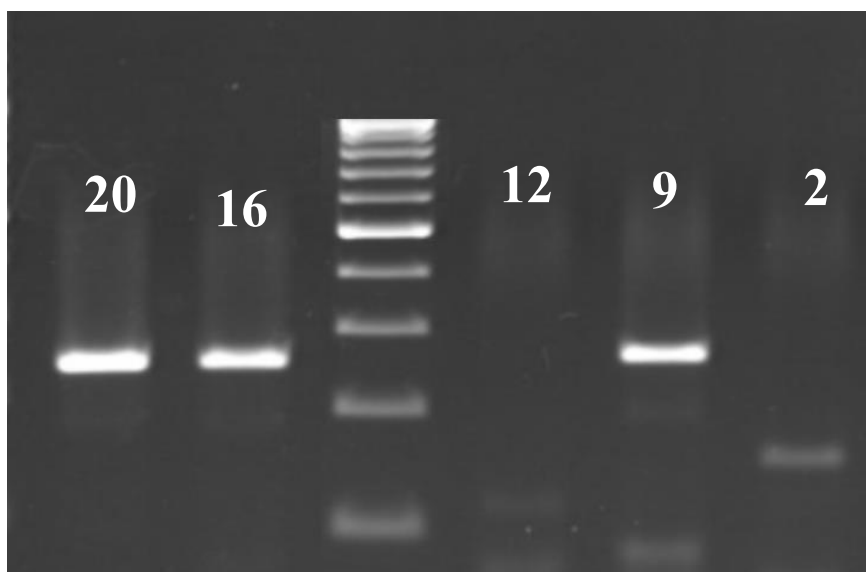
Table 2. Characteristics of specific primers of CMV virus used in polymerase chain reaction to amplify the entire coat protein gene.

ترادف Sequence	نام آغازگر Primer name
5' GCTTCTCCGCGAG 3'	CMVCP _r
5' GCCGTAAGCTGGATGGAC 3'	CMVCP _f

جدول ۳. مواد لازم cDNA در واکنش PCR.

Table 3. Necessary materials for cDNA amplification in PCR reaction.

واکنشگرها/Reactions	مقدار مورد نیاز (میکرو لیتر)/Quantity
Taq Premix	10
Reverse Primer	1
Forward Primer	1
cDNA	4
Water	4
Total	20



شکل ۱. نقوش الکتروفورزی حاصل از ژل که به سه نمونه ۹-۱۶-۲۰ مثبت بود. شماره ۹ از مزرعه رقه - نصیرایی، شماره ۱۶ از مزرعه بشرویه - مقیمیان و شماره ۲۰ از مزرعه رقه - حسن نیازی.

Fig 1. Electrophoresis patterns obtained from the gel that was positive for three samples 9-16-20. No. 9 from Raqqa - Nasiraei field, No. 16 from Beshroieh - Moghimian field and No. 20 from Raqqa - Hassan Niazi field.



شکل ۲. علائم روی گیاه بالا چپ از رقه مزرعه حسن نیازی، بالا راست از بشرویه مزرعه مقیمیان و پایین از رقه مزرعه نصیرایی.

Fig 2-. The upper left is from Hasan Niazi farm, the upper right is from Moghimian farm, and the bottom is from Nasirai farm.

تعیین توالی پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس
جهت انجام مطالعات تبارزایی، سه جدایه از ویروس موزاییک خیار که از مزارع زعفران رقه و بشرویه جمع آوری شده بود، تعیین توالی شدند. مقایسه توالی‌های به دست آمده با سایر توالی‌ها در پایگاه BLAST، نشان از آلودگی هر سه جدایه تعیین توالی شده در این تحقیق، به ویروس موزاییک خیار داشت. (جدول ۴).

نتایج و بحث

بررسی علائم CMV روی زعفران

در نمونه گیاهان جمع آوری شده علائم متفاوتی نظیر کوتولگی، پیچیدگی برگ‌ها، موزاییکی شدن برگ، زردی و رنگ پریدگی برگ‌ها مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ۴ - جدایه‌های ایرانی ویروس موزاییک خیار جدا شده از گیاه زعفران که طی این پژوهش تعیین توالی شدند.

نام جدایه Isolate name	محل نمونه برداری sampling place	تاریخ نمونه برداری Sampling Date
Kho1	رقه - مزرعه نصیرایی Raqqeh - Nasirai fileld	2022/11/13
Kho2	بشرویه - مزرعه مقیمیان Boshruyeh - Moghimian field	2022/11/17
Kho3	رقه - مزرعه حسن نیازی Raqqeh - Hasan Niazi fileld	2022/11/13

بررسی‌های تبارزایی

بعلاوه از طرف دیگر کمترین میزان شباهت این جدایه با جدایه 10Tahaa در میزبان وانیل (*Vanilla tahitensi*) از کشور فرانسه با سطح تشابه ۹۱ درصد می‌باشد. جدایه Kho2 بیشترین شباهت را با سطح تشابه ۹۸٪ با جدایه ی CMV-GRcl1 از کشور فرانسه دارد. همچنین این جدایه مانند جدایه قبل کمترین میزان شباهت را با جدایه Co3 با درصد تشابه ۹۴ درصد دارد. همچنین با جدایه Kho3 شباهتی ۹۹٪ دارد که از مزارع و مناطق کاملاً متفاوتی استخراج شده اند. مجدداً از طرف دیگر کمترین میزان شباهت این جدایه با جدایه 10Tahaa با سطح تشابه ۹۱ درصد می‌باشد. در نهایت جدایه Kho3 نیز بیشترین شباهت را در سطح نوکلئوتیدی با سطح تشابه ۱۰۰٪ با جدایه ToCMV5-1 دارد. همچنین با جدایه Kho1 نیز سطح تشابه ۹۹ درصدی دارد. در مقام بعد این جدایه شباهت نزدیکی به جدایه های CMV-GRcl1 و Kho2 دارد. همچنین این جدایه مانند جدایه-های قبلی ترین میزان شباهت را با جدایه Co3 با سطح تشابه ۹۴ درصد دارد. مجدداً این جدایه نیز از طرف دیگر کمترین حد میزان شباهت با جدایه 10Tahaa با سطح تشابه ۹۱ درصد را دارد (شکل ۳).

نتایج حاصل از مطالعه جدایه‌های ویروس CMV در این تحقیق نشان می‌دهند که جدایه‌های موجود در ایران (Kho1، Kho2 و Kho3) بیشترین شباهت را با جدایه‌های از کشورهای سوریه و یونان دارند. این شباهت‌ها ممکن است به دلیل ویژگی‌های مشترک زعفران در این کشورها و انتقال ویروس‌ها از یک کشور به کشور دیگر باشد. علاوه بر این، شباهت‌های بیشتری با جدایه‌های خاص از کشورهای دیگر مانند سوریه و یونان نشان می‌دهد که ویروس‌ها احتمالاً از این مناطق وارد ایران شده‌اند و این تأثیرات تبادلات ژنتیکی و ارتباطات بین‌المللی است. احتمالاً وجود این اطلاعات نشان دهنده پراکنش جدایه‌های ویروس CMV در مناطق مختلف جهان و تأثیرات متفاوت میزبان‌ها و محیط زیست بر ویروس‌ها است. همچنین، احتمالاً تفاوت‌های ژنتیکی و تاریخی تکاملی مختلف در این جدایه‌ها وارد تفاوت‌های شباهت در سطح نوکلئوتیدی می‌شود. این نتایج نشان می‌دهند که یکی از نمونه‌ها با جدایه فرانسه (CMV-GRcl1) بیشترین شباهت را دارد، احتمالاً به دلیل تشابه ژنتیکی بالا و ویژگی‌های مشترک با این جدایه از کشور فرانسه. در مقابل، نمونه دیگر با جدایه فرانسه

درخت تبارزایی بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی ویروس با طول ۶۵۷ نوکلئوتید، رسم شد (شکل ۲). بررسی تبارزایی جدایه‌های ایرانی ویروس موزاییکی خیار و ۱۷ جدایه‌ی موجود در بانک ژن با نرم افزار MegaX به عنوان بهترین روش موجود انجام شد. ماتریکس تشابه نیز با نرم افزار SDTV ترسیم شد. مشخصات جدایه‌های بانک ژن مورد استفاده در این تحقیق در جدول اطلاعات تبارزایی ذکر شده است (جدول ۵).

درخت تبارزایی حاصل شده شامل دوازده شاخه بود. شاخه اول شامل دو گروه بود که گروه اول این شاخه خود به دو زیرگروه تقسیم شد. زیرگروه اول شامل جدایه‌های Kho1، Kho2، PoCMV9-11، ToCMV5-1، Kho3 می‌باشد. جدایه‌های Kho1، Kho2 و Kho3 ایرانی و مربوط به پژوهش حاضر می‌باشند و از روی نمونه‌های زعفران جدا شده‌اند. جدایه‌های PoCMV9-11 و ToCMV5-1 از کشور سوریه هستند و به ترتیب میزبان آن‌ها گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) و سیب-زمینی (*Solanum tuberosum*) می‌باشد. زیرگروه دوم شامل جدایه CMV-GRcl1 از کشور یونان و روی میزبان هندوانه (*Citrullus lanatus*) است. گروه دوم از شاخه اول شامل جدایه Lily1 از کشور هند و روی میزبانی از سرده سوسن (*Lilium cv. Nove Cento*) یافت شده است. شاخه دوم دو زیرگروه شامل جدایه Kyushu-6 از کشور ژاپن روی میزبان سویا (*Glycine soja*) و جدایه Co3 از کشور کره جنوبی و روی میزبان گل روز آسیایی (*Commelina communis*) است. شاخه سوم شامل جدایه SNK از کشور تایلند روی میزبان خیار (*Cucumis sativas*) است. شاخه چهارم شامل جدایه Tarat-21 از کشور مالزی روی میزبان فلفل سیاه (*Piper nigrum L.*) است. همینطور شاخه‌های پنجم تا دوازدهم که اطلاعات آنها به تفسیر در جدول و شکل ذکر شده است (شکل ۲).

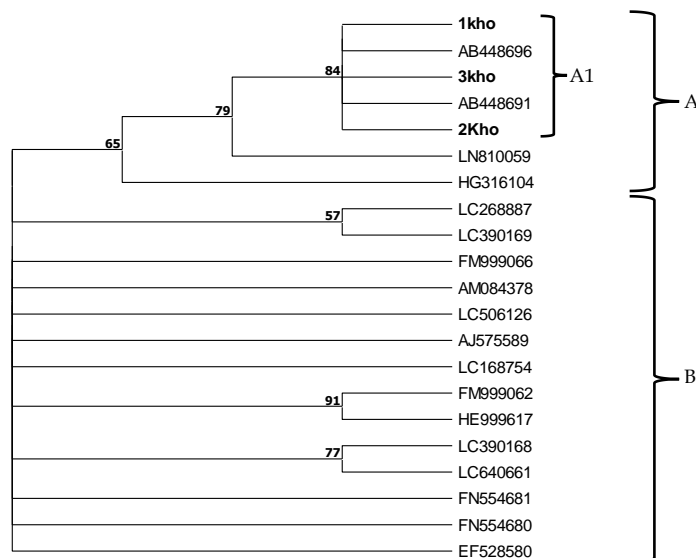
اطلاعات بدست آمده نشان داد جدایه‌های این تحقیق بیشترین شباهت را با جدایه‌های ثبت شده از کشورهای سوریه و یونان دارند. بررسی ماتریس تشابه رسم شده با نرم افزار SDTV نشان داد که جدایه Kho1 بیشترین شباهت را در سطح نوکلئوتیدی با سطح تشابه صد درصد با جدایه‌ی ToCMV5-1 از سوریه و پس از آن با سطح تشابه ۹۸ درصد با جدایه‌ی PoCMV9-11 از سوریه دارد. همچنین این جدایه دارای کمترین میزان شباهت با جدایه Co3 از کره جنوبی با سطح تشابه ۹۴٪ می‌باشد.

در کل، این مقایسه‌ها نشان می‌دهند که ویروس‌های CMV دارای تنوع ژنتیکی بالا هستند که تحت تأثیر محیط‌های مختلف و تاریخچه تکاملی، میزبان‌ها و تعاملات میان‌گونه‌ای قرار گرفته‌اند. (10Tahaa) کمترین شباهت را دارد، ممکن است به دلیل وجود تفاوت‌های ژنتیکی معنی‌دار با این جدایه از کشور فرانسه باشد. این تفاوت‌ها ممکن است ناشی از تکامل جدایه‌ها در محیط‌ها و میزبان‌های متفاوت یا تأثیرات تعاملات میان‌گونه‌ای باشد.

جدول ۵. اطلاعات جدایه‌های موجود در درخت تبارزایی.

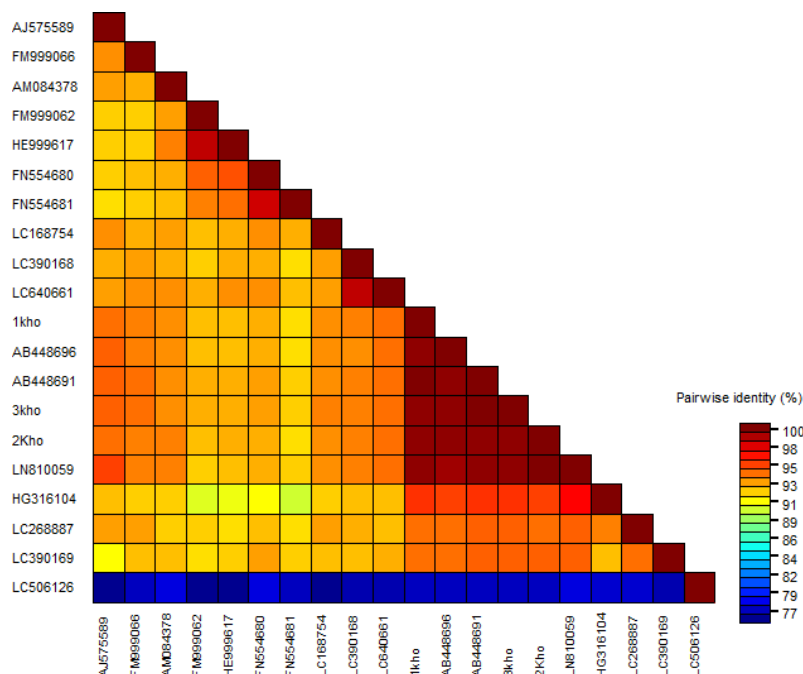
Table 5. Information of the isolates in the phylogenetic tree.

کشور	میزبان	تعداد بازها	Accession number	نام جدایه ویروس
Country	Host	basepairs		Virus isolate
China:Zhejiang"	<i>Brassica juncea</i>	657 bp	AJ575589	ZJZC-CMV
French Polynesia	<i>Commelina diffusa</i>	651 bp	FN554680	09Raiatea
French Polynesia	<i>Vanilla tahitensis</i>	651 bp	FN554681	10Tahaa
Greece:Lesvos	<i>Citrullus lanatus</i>	614 bp	LN810059	CMV-GRcl1
India:Palampur	<i>Lilium cv. Nove Cento</i>	657 bp	HG316104	Lily1
Indonesia	<i>Piper sarmentosum</i>	657 bp	LC168754	karuk1
Japan	<i>Glycine soja</i>	657 bp	LC268887	Kyushu-6
Malaysia	<i>Piper nigrum L.</i>	615 bp	AM084378	21-Tarat
South Korea	<i>Lactuca sativa</i>	657 bp	LC640661	LSG
South Korea:Chungju	<i>Commelina communis</i>	657 bp	LC390169	Co3
South Korea:Gangwon Province, Yeongwol	<i>Cnidium officinale</i>	657 bp	LC506126	GW-YW
Syria: Aleppo	<i>Solanum tuberosum</i>	657 bp	AB448696	PoCMV9-11
Syria: Hama	<i>Nicotiana tabacum</i>	657 bp	AB448691	ToCMV5-1
Thailand:Central region	<i>Cucumis sp.</i>	678 bp	FM999062	HC-56
Thailand:Sakol Nakhon	<i>Cucumis sativas</i>	694 bp	FM999066	SNK
Thailand:Sakol Nakhon	<i>Cucumis sativas</i>	657 bp	LC390168	SNK
Viet Nam:Tay Ninh province	<i>Nicotiana tabacum</i>	657 bp	HE999617	VN-Tayninh



شکل ۳. درخت تبارزایی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ویروس موزاییک خیار از سه 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. نمونه LC506126 از کره جنوبی به عنوان برون‌گروه در نظر گرفته شده است.

Fig 3. Pedigree tree based on nucleotide synonyms of coat protein gene of cucumber mosaic virus isolates from three saffron isolates and isolates available in gene bank. Using MEGAX software and Maximum likelihood method and bootstrap 1000 was drawn as the best method. Sample LC506126 from South Korea is considered as outgroup.



شکل ۴. مقایسه درصد شباهت پروتئین پوششی در سطح نوکلئوتیدی پروتئین پوششی جدایه ایرانی و جدایه‌های موجود در بانک ژن به روش Clustal W با برنامه‌ی SDTv.

Fig 4. Comparison of the similarity percentage of coat protein at the nucleotide level of the coat protein of Iranian isolate and the isolates available in gene bank using Clustal W method with SDTv program.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق آلودگی مزارع زعفران شهرستان بشرویه به ویروس موزاییک خیار با استفاده از آزمون زنجیره ای پلی مرز و با استفاده از آغازگر اختصاصی CMV به اثبات رسید. از بین ۱۴۸ نمونه زعفران دارای علائم بیماری های ویروسی آلودگی در ۳ نمونه به اثبات رسید که تکثیر قطعه ای به طول ۶۵۷ جفت باز با آغازگرهای اختصاصی CMV با روش RT-PCR، آلودگی این نمونه ها به ویروس موزاییک خیار را تأیید کرد. در بررسی تبارزایی صورت گرفته بر مبنای توالی پوشش پروتئینی جدایه های ایرانی مربوط به زعفران و دیگر جدایه های پایگاه BLAST دوارده شاخه تشکیل شد که جدایه های ایرانی در زیرگروه اول از گروه اول شاخه اول قرار گرفتند. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد نزدیک ترین جدایه

ها به جدایه های ایرانی دو جدایه CMV-GRcl1 و ToCMV5-1 از کشورهای یونان و سوریه داشتند. همچنین بیشترین شباهت بین جدایه های ایرانی بین دو جدایه Kho2 از بشرویه در مزرعه مقیمیان و Kho3 از رقه در مزرعه نیازی دیده شد. بررسی تبارزایی جدایه‌ها، نشان داد که مکان جغرافیایی نمونه‌برداری نقش بارزی در طبقه‌بندی این ویروس ندارد. زیرا دو جدایه از دو منطقه متفاوت شبیه هم بودند.

گرچه ویروس موزاییک خیار با استفاده از روش های سرولوژی قبلاً گزارش شده بود (Parizad et al, 2017) اما لزوم شناسایی مولکولی و بررسی پروتئینی پوششی آن مورد توجه قرار گرفت. این تحقیق اولین گزارش از وجود ویروس موزاییک خیار روی مزارع زعفران در خراسان جنوبی است.

منابع

- Abtahi, F. (2016). The first report of cucumber mosaic virus in Plantago Major. National Conference of Medicinal Plants, Shahrood. [In Persian].
- Agricultural Jihad Organization of South Khorasan Province (2018). Databases. <http://kj-agrijahad.ir/dbagri/>
- Bargi, M., Hosseinzadeh, S., and Khaneh Bad, M. (2013). Investigating the geotourism capabilities of the Beshroieh desert. In the first Quaternary Conference of Iran. [In Persian].
- Doolittle, S.P. (1916). A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, 6 (2), 145-147.
- 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].
- Forakinejad, Z. (2008). Saffron, red gold of Iran. *Journal of Teaching Biology*, 22 (2), 62.
- Garcia-Arenal, F., & Palukaitis, P. (2009). Cucumber mosaic virus. *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*, 171, 1-6.
- Heydari, M., Hosseini, A. & Duri, R. (2018 a). Detection and Phylogenetic Analysis of Turnip mosaic virus of Saffron (*Crocus sativus*) in Iran. *Applied Researches in Plant Protection*, 2(5) 17-28. [In Persian].
- Heydari, M., Hosseini, S. A. & Duri, R. (2018 b). Serological and molecular detection of TuMV on *Globachia laevigata* in saffron fields. *Journal of saffron research.*, 5 (2), 191-200. [In Persian].
- Hosseinzadeh, M. H., Moudi, M. (2022). Overview of Effective Saffron Compounds and Its Reactions on Neurodegenerative Diseases of Nervous System. *Journal of Saffron Research*, 10 (2). 258-275. [In Persian].
- Jacquemond, M. (2012). Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, 84, 439-504.
- Kafi, M., Rashed Mohssel, M. H., Koocheki, A., & Mollafilabi, A. (2002). Saffron and production technology and processing. Ferdowsi University of Mashhad Publication, Mashhad, Iran.
- Kochaki, A., Karbasi, A., and Sidi, S.M. (2016). Investigating some reasons for the decline in saffron yield during the last 30 years. *Scientific Research of Saffron Agriculture and Technology*, 5 (2), 107-122. [In Persian].
- Koocheki, A., & Seyyedi, S. M. (2015). Phonological stages and formation of replacement corms of saffron (*Crocus sativus* L.) during growing period. *Journal of saffron research*, 3 (2), 134-154.
- McPherson, M. J., & Moller, S. G. (2006). PCR (The Basics (Garland Science)). Routledge. ISBN 13: 9781859960172
- Palukaitis, P., & Garcia-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62, 241-323.
- Parizad, S., Dizadji, A., Habibi, M. K., Winter, S., Kalantari, S., Garcia-Arenal, F., & Ayllón, M. A. (2017). Prevalence of saffron latent virus (SaLV), a new Potyvirus species, in saffron fields of Iran. *Journal of Plant Pathology*, 99(3).

Zitter, T. A., & Murphy, J. F. (2009). Cucumber mosaic. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094. PH-1-2009-0518-01.

COPYRIGHTS

© 2023-2024 by the authors. Published by University of Birjand – Saffron Research Group. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

