

شناسایی و بررسی برخی از ویژگی‌های ویروس آلوده‌کننده زعفران (*Crocus sativus*) در ایران

شیرین پرزاد^۱، اکبر دیزجی^{۲*}، مینا کوهی حبیبی^۳، غلامحسین مصاحبی محمدی^۴، سیامک کلانتری^۵، فاطمه ایزدپناه^۶،
فرناندو گارسیا آرنال^۶ و اشتفان وینتر^۷

۱ و ۲. دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳ و ۴. دانشیار و دانشجوی سابق گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۵. مرکز بیوتکنولوژی و ژنومیکس گیاهان، دانشگاه پلی تکنیک مادرید، مادرید، اسپانیا

۶. کلکسیون آلمانی میکرو ارگانیسم‌ها و کشت سلولی DSMZ، برانشوايگ، آلمان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۳)

چکیده

پس از نمونه‌برداری تصادفی از برگ‌ها و بنه‌های گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) از شش استان کشور در سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۴، شمار ۶۴۱ از ۸۹۰ نمونه با آنتی‌بادی‌های عمومی جنس پوتی‌ویروس و همان‌طور با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس موزایک معمولی لوبیا (BCMV) در آزمون الیزا واکنش مثبت نشان داد. وزن مولکولی پروتئین پوششی (CP) چند جدایه مورد بررسی پوتی‌ویروس زعفران با استفاده از آزمون وسترن بلات ۳۵ کیلو دالتون محاسبه شد. پس از استخراج آران.ا. کل از گیاهان آلوده، سه قطعه منقطع از ژنوم (مربوط به انتهای ۳' ژنوم و بخشی از نواحی CI و HC-Pro) تکثیر شد. پروتئین پوششی (CP) پوتی‌ویروس زعفران بر پایه توالی نوکلئوتیدی بیشترین یکسانی را (۷۴ درصد) با *Ceratobium mosaic virus* و *Telasma mosaic virus* و بر پایه توالی ترجمه اسید آمینه‌ای بیشترین یکسانی را (۷۸/۸ درصد) با *Bean common mosaic necrosis virus* داشت. به‌رغم رابطه سرم‌شناختی (سرولوژیکی) بالای این پوتی‌ویروس با BCMV و خویشاوندی تبارزایی (فیلوژنتیکی) با زیرگروه BCMV بر پایه ناحیه CP، میزان یکسانی توالی نوکلئوتیدی و ترجمه اسید آمینه‌ای پروتئین پوششی آن کمتر از آستانه تعیین حدود و گستره گونه در جنس پوتی‌ویروس است. لذا به احتمال زیاد پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران گونه جدیدی از جنس پوتی‌ویروس بوده که اظهار نظر قطعی مستلزم تعیین توالی کل ژنوم آن است.

واژه‌های کلیدی: الیزا، پروتئین پوششی، پوتی‌ویروس، زعفران (*Crocus sativus* L.).

Identification and partial characterization of the virus infecting saffron (*Crocus sativus*) in Iran

Shirin Parizad¹, Akbar Dizadji^{2*}, Mina Koohi Habibi³, Gholam Hossein Mosahebi Mohammadi³,
Siamak Kalantari⁴, Fatemeh Izadpanah⁵, Fernando Garcia-Arenal⁶ and Stephan Winter⁷

1, 2, 3. Ph.D. Student, Associate Professor and Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4, 5. Associate Professor and Former M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

6. Centro de Biotecnología y Genómica de plantas (UPM-INIA), Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain

7. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany

(Received: Sep. 18, 2016 - Accepted: Dec. 13, 2016)

ABSTRACT

Following the random sampling of saffron (*Crocus sativus* L.) leaves and corms from six provinces of Iran, during growing seasons of 2011-2015, a total of 890 leaf tissue samples were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests. The results revealed that 641 samples showed positive reaction only with *Potyvirus* genus specific and exactly with *Bean common mosaic virus* (BCMV) specific antibodies. The molecular mass of several isolates of the virus coat protein (CP) was estimated as 35 kDa by western blotting. Following total RNA extraction from virus infected samples, three discontinuous fragments (corresponding to genomic 3', partial CI and HC-Pro regions) were amplified. The CP region of the virus infecting saffron has the highest nucleotide identity with *Ceratobium mosaic virus* (CerMV) and *Telasma mosaic virus* (TelMV) (74%) and the highest deduced amino acid identity with *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMN) (78.8%). Despite the high serological relationship with BCMV and a close phylogenetic relationship with BCMV subgroup based on CP region, the identity values are less than described species demarcation criteria for *Potyvirus* family. Overall, it seems that the saffron infecting *Potyvirus* is a new species of *Potyvirus* genus but the definitive statement requires sequencing the entire genome of the virus.

Keywords: Coat protein, ELISA, *Potyvirus*, saffron (*Crocus sativus* L.).

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) از خانواده زنبقیان، به عنوان یکی از مهم ترین محصولات کشاورزی و گران بها ترین ادویه جهان است که توجه روزافزون به ویژگی های زعفران از جمله ویژگی های ضد سرطانی، ضد افسردگی و ضد آلزایمری آن موجب افزایش توجه دانشمندان به این گونه گیاهی در جهت بهبود کیفیت و کمیت تولید آن شده است (Grilli Caiola & Faoro, 2011).

در دهه های اخیر تغییر پذیری فراساختاری مرتبط با آلودگی پوتی ویروسی (اندامک های همراه فرفره ای شکل) در کلاله، خامه و برگ های زعفران زراعی و *Crocus cartwrightianus* (گونه وحشی و نیای احتمالی زعفران) یافت شده است. با توجه به مشاهده نشدن علائم بیماری در این گیاهان، می توان استدلال کرد آلودگی های پنهان ویروسی در *Crocus* spp. به طور گسترده ای انتشار یافته است. وجود آلودگی پنهان پوتی ویروسی در *C. cartwrightianus* (نیای احتمالی زعفران زراعی) نیز نشان دهنده قدمت آلودگی *Crocus* spp. به ویروس بوده و احتمال دارد سویه (استرین) های ملایم در طی تکامل همراه میزبان-بیمارگر انتخاب شده اند (Grilli Caiola & Faoro, 2011). از دلایل احتمالی انتشار آلودگی های پنهان پوتی ویروسی در *Crocus* spp. انتقال پوتی ویروس ها از راه شته و اندام های تکثیری (بنه) است. افزون بر آن ویژگی های ریخت شناختی (مورفولوژیکی) گل های زعفران موجب می شود مشاهده علائمی مانند کوتولگی یا شکستگی رنگ گلبرگ و ارتباط دادن آن ها به آلودگی های پوتی ویروسی کار دشواری باشد و همه این مسائل موجب انتشار آلودگی پوتی ویروسی در زعفران شده است (Grilli Caiola & Faoro, 2011). تاکنون در چند بررسی مربوط به آلودگی های ویروسی در جنس *Crocus* ویروس هایی از جمله ویروس موزاییک زرد لوبیا^۱ (BYMV) (Russo et al., 1979;)، ویروس موزاییک شلغم^۲ (TuMV) (Chen & Chen, 2000; Grilli Caiola, 1982; Pisi and Bellardi, 1990)، ویروس

موزاییک شدید زنبق^۳ (ISMV) (Brunt & Phillips, 1979) و ویروس جنجنگ توتون^۴ (TRV) (Van Slogtem, 1958) ردیابی شده است. در سال ۲۰۰۵ نتایج به دست آمده از بررسی های مولکولی گویای ردیابی ISMV، BYMV، TRV، ویروس بافت مردگی (نکروز) توتون^۵ (TNV) و ویروس موزاییک نرگس^۶ (NMV) از چند کولتیوار *Crocus* spp. با علائم کوتولگی، زردی، بافت مردگی و شکستگی رنگ گلبرگ بود (Miglino et al., 2005).

جنس پوتی ویروس، بزرگ ترین جنس ویروس های گیاهی، دارای ژنوم آر.ان.ا تک رشته ای مثبت با طول حدود ۱۰ کیلوباز و پیکره به صورت رشته ای خمش پذیر و به طول ۷۲۰-۸۵۰ نانومتر می باشد (Hull, 2002). بیان ژنوم پوتی ویروس ها به صورت یک پلی پروتئین است که در پی آن توسط پروتئینازهای ویروسی (P1، HC-Pro، NIa) به بیشینه ۱۰ پروتئین بالغ شکسته می شود (CP، NIb، NIa-Pro، VPg، 6K1، CI، 6K2، P3، HC-Pro و P1)، که برای چرخه آلودگی لازم هستند (Lapierre & Singoret, 2004). این ویروس ها در سیتوپلاسم یاخته میزبان اندامک های همراه فرفره ماندی تولید می کنند که از ویژگی های مهم آرایه بندی (تاکسونومیک) این ویروس ها است (Urcuqui-Inchima et al., 2001). متأسفانه با وجود تحقیقات و بررسی های انجام شده روی جنبه های مختلف زیستی (بیولوژیکی)، بوم شناختی (اکولوژی) و ژنتیک زعفران، تا به حال بررسی های معدودی در زمینه عامل های بیماری زای زعفران به ویژه ویروس های آلوده کننده این گیاه در سطح جهان انجام شده است. بررسی های اولیه توسط پریراد و همکاران (منتشر نشده) برای نخستین بار نشان دهنده آلودگی گیاهان زعفران به پوتی ویروس در ایران بود. در این تحقیق افزون بر مطالعه پراکنش این ویروس در مناطق عمده کشت زعفران در کشور، برخی از ویژگی های زیستی و مولکولی این ویروس ردیابی شده بررسی شد.

3. *Iris sever mosaic virus*
4. *Tobacco rattle virus*
5. *Tobacco necrosis virus*
6. *Narcissus mosaic virus*

1. *Bean yellow mosaic virus*
2. *Turnip mosaic virus*

گلخانه (در مجموع ۸۹۰ نمونه) به پوتی‌ویروس با آزمون Antigen Coated-Plate Enzyme (ACP-ELISA) (Joisson *et al.*,) (Linked Immunosorbent Assay) (1992) و با استفاده از آنتی‌بادی‌های تک همسانه‌ای جنس پوتی‌ویروس (دریافت‌شده از مؤسسه DSMZ آلمان) بررسی شدند. نمونه‌هایی که در آزمون ACP-ELISA واکنش مثبت نشان داده بودند با آنتی‌بادی اختصاصی گونه‌های مختلف و رایج جنس پوتی‌ویروس (جدول ۱) و به روش DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977) ارزیابی شدند. همچنین آلودگی احتمالی نمونه‌ها با چندگونه دیگر (غیر پوتی‌ویروس، جدول ۱) به روش DAS-ELISA بررسی شد. میزان جذب نوری در این آزمون در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA-Reader اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایی با میزان جذب بیش از سه برابر جذب نمونه سالم، به‌عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و کشت بنه‌های زعفران

در بازدیدهای به‌عمل‌آمده از کشتزارهای زعفران استان‌های تهران، اصفهان، فارس، آذربایجان شرقی و خراسان جنوبی و رضوی در سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۴، بوته‌های زعفران از نظر داشتن علائم احتمالی مربوط به آلودگی ویروسی بررسی و در مجموع شمار ۷۹۰ نمونه برگ و ۱۰۰ نمونه بنه گیاهی به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری شد. بنه‌ها پس از انتقال به گلخانه در دمای ۱۷ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند.

ارزیابی آلودگی نمونه‌های زعفران به ویروس‌های مختلف

آلودگی احتمالی نمونه‌های برگ و مزرعه‌ای و نیز نمونه‌های برگ بوته‌های زعفران رشد کرده در شرایط

جدول ۱. آنتی‌سرم‌های مورد استفاده در بررسی مقدماتی آلودگی ویروسی زعفران

Table 1. List of antibodies used in this study for preliminary assays of saffron viral infection

| Virus | Assay | Antibody code |
|--|-----------|----------------|
| <i>Alfalfa mosaic virus (AMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0779 |
| <i>Bean common mosaic virus (BCMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0242 |
| <i>Bean common necrosis mosaic virus (BCMVN)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0239 |
| <i>Bean yellow mosaic virus (BYMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0471 |
| <i>Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0417 |
| <i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0929 |
| Genus Potyvirus | ACP-ELISA | DSMZ-AS-0573/1 |
| <i>Lettuce mosaic virus (LMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0886 |
| <i>Potato virus Y (PVY)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0137 |
| <i>Soybean mosaic virus (SMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0543 |
| <i>Tobacco etch virus (TEV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0138 |
| <i>Tobacco necrosis virus (TNV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0070 |
| <i>Tobacco rattle virus (TRV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0208 |
| <i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0580 |
| <i>Turnip mosaic virus (TuMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0132 |
| <i>Watermelon mosaic virus (WMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0203 |
| <i>Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)</i> | DAS-ELISA | DSMZ-AS-0234 |

پوتی‌ویروس و در پی آن با آنتی‌بادی اختصاصی BCMV واکنش مثبت نشان داده بودند انتخاب و با روش مکانیکی روی گیاهان محک مایه‌زنی و در شرایط مناسب در گلخانه نگهداری شدند. گیاهان محک مورد استفاده برای مایه‌زنی شامل *Gomphrena globosa*، *Chenopodium amaranticolor*، *Phaseolus vulgaris*، *Cucumis sativus*، *C. quinoa*

تعیین دامنه میزبانی در شرایط گلخانه

به‌منظور بررسی انتقال مکانیکی پوتی‌ویروس زعفران، بر پایه نتایج آزمون الایزا دو جدایه از هر استان (جدایه‌های Ir-Kh1 و Ir-Kh2 به ترتیب از تربت‌حیدریه و فردوس استان خراسان، Ir-T1 و Ir-T2 از روستای یقه استان تهران، Ir-F1 و Ir-F2 از استهبان استان فارس و Ir-I1 و Ir-I2 از میمه استان اصفهان) که با آنتی‌بادی جنس

خالص‌سازی نسبی (Mini purification) ویروس جدایی‌یافته Ir-Kh1 استفاده شد. از بافت برگ گیاه آلوده به پوتی‌ویروس نیز به‌عنوان شاهد منفی در خالص‌سازی نسبی استفاده شد. ۲ گرم از بافت تازه نمونه‌ها در ۱۵ میلی‌لیتر بافر سیترات سدیم ۰/۱ مولار، pH ۶/۵ حاوی ۰/۲۵ درصد ۲-مرکاپتواتانول، ۰/۱ درصد NA-DIECA و ۱ درصد PVP عصاره‌گیری و پس از عبور از پارچه ململ چندلایه، به مدت بیست دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. روشن‌بین با ۴ میلی‌لیتر محلول ۳۳ درصد Triton X-100 در آب مقطر مخلوط و روی بالشتک محلول ۲۰ درصد سوکروز در بافر عصاره‌گیری به مدت سه ساعت و با سرعت ۲۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. آماده‌های پروتئین کل و آماده نیمه خالص ویروس به همراه نشانگر پروتئینی (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Fisher Scientific, USA) در ژل ناپیوسته ۵ درصد متراکم‌کننده و ۱۲ درصد جداکننده پلی‌اکریل آمید استفاده شدند. پس از جداسازی پروتئین‌ها و انتقال باندهای پروتئینی به غشای سلولزی، از آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای BCMV (DSMZ-AS-0242) برای ردیابی ویروس استفاده شد. ردیابی باند پروتئین پوششی ویروس واکنش داده با آنتی‌سرم توسط اضافه کردن همزمان ۷۵ میلی‌گرم Nitro blue tetrazolium chloride (NBT) در ۱ میلی‌لیتر دی‌متیل فرمامید و ۵۰ میلی‌گرم 5-bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt (BCIP) در ۱ میلی‌لیتر دی‌متیل فرمامید در ۱۰ میلی‌لیتر بافر آلکالین فسفاتاز pH ۹/۵ صورت گرفت. بر پایه حرکت نسبی پروتئین‌های نشانگر و لگاریتم وزن مولکولی آن‌ها، خط رگرسیونی ترسیم و توده مولکولی پروتئین پوششی پوتی‌ویروس زعفران تعیین شد (Fried & Crothers, 1981).

استخراج آر.ان.ا. کل و نسخه‌برداری معکوس-واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (RT-PCR) به‌منظور تعیین توالی بخش‌هایی از ژنوم پوتی‌ویروس زعفران پنج جدایی‌یافته Ir-Kh1, Ir-Kh2, Ir-T1, Ir-I1 و Ir-F1 انتخاب شدند. آر.ان.ا. کل از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت

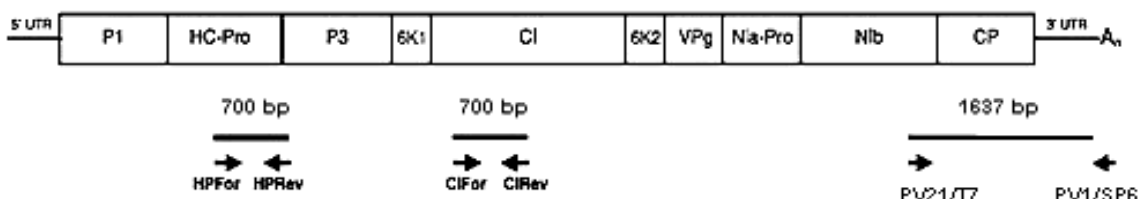
Nicotiana glauca, *Vigna unguiculata*, *Pisum sativum*, *N. tabacum* cv. *tabacum* cv. White Burley, *N. debneyi*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, Samsun, *Datura stramonium*, *N. rustica*, *N. benthamiana*, *Vicia faba* و *Cicer arietinum*, *D. metel* برای مایه‌زنی این گیاهان از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH ۷) همراه با ۲/۳ میلی‌مول NaDIECA (Natrium diethyldithiocarbamate) و پودر زغال فعال استفاده شد.

خالص‌سازی نسبی ویروس، الکتروفورز عمودی پروتئین در ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE) و آزمون وسترن بلات

برای بررسی بهتر ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی و تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران از روش الکتروفورز عمودی پروتئین‌ها در ژل پلی‌اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-LEAMMLI, 1970; SAMBROOK & RUSSEL,) (PAGE TOWBIN *et al.*, 1979;) و آزمون وسترن بلات (Sambrook *et al.*, 1989) استفاده شد. بدین منظور جدایی‌های Ir-Kh1, Ir-Kh2, Ir-T1, Ir-T2, Ir-I2 و Ir-F2 به همراه دو نمونه عاری از پوتی‌ویروس (شاهد منفی، H1 و H2) انتخاب و به همراه آماده نیمه خالص جدایی‌ای از ویروس بررسی شدند. برای استخراج پروتئین کل، عصاره‌گیری از ۰/۱ گرم نمونه‌های برگ با استفاده از بافر استخراج (حاوی ۵۰ میلی‌مول تریس اسیدی، ۵ میلی‌مول اسید بوریک، ۵ درصد گلیسرول در آب مقطر که به هنگام استفاده ۱/۵ درصد پلی‌ونیل‌پیرولیدون (PVP) (MW 40000) و ۰/۱ درصد ۲-مرکاپتواتانول به آن اضافه شد) انجام و درون لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به مدت سی دقیقه در یخچال قرار داده شدند. سپس ۳۰ میکرولیتر از مایع رویی به لوله جدید منتقل و حجم یکسان از بافر دو بار لملی (2x Lamml buffer) به آن اضافه شد. نمونه‌ها به همراه پروتئین‌های استاندارد از پیش رنگ‌آمیزی شده (Benchmark™) به مدت پنج دقیقه در آب در حال جوشیدن قرار و پس از آن بی‌درنگ به درون ظرف حاوی یخ انتقال داده شدند. برای

در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت سه تا پنج دقیقه قرار گرفت و پس از قرار دادن لوله‌ها روی یخ، ۱۰۰ واحد آنزیم نسخه بردار معکوس M-MuLV RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo) (Lithuania Scientific, به هر یک از لوله‌ها اضافه و در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت قرار داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در واکنش‌هایی با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (شامل ۵ میکرولیتر دی.ان.ا. مکمل ساخته (سنتز) شده، ۱۴/۶ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲/۵ میکرولیتر PCR-buffer 10X، ۰/۲ میلی‌مول dNTPs، ۳ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۲ پیکومول از هر آغازگر مستقیم و معکوس و ۲/۵ واحد آنزیم SmartTaq DNA Polymerase (Sinaclon, Iran) انجام گرفت. برای مشاهده قطعه‌های تکثیرشده، الکتروفورز در ژل آگاروز ۱ درصد در بافر TBE (-Tris) Borate-EDTA استفاده شد.

برگی زعفران‌های آلوده به ویروس با استفاده از کیت (RNeasy plant mini kit, Qiagen, Germany) و بنابر دستورکار شرکت سازنده استخراج شد. برای تکثیر سه ناحیه ناپیوسته از ژنوم جدایه‌های مورد بررسی پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران از جفت آغازگر عمومی مربوط به انتهای ۳' ژنوم (در برگ‌برنده نواحی 3'UTR، CP و بخشی از Nib) و جفت آغازگرهای متناظر با تکثیر بخشی از نواحی CI و HC-Pro ژنوم پوتی‌ویروس‌ها استفاده شد (شکل ۱، جدول ۲). در همه واکنش‌ها، ساخت دی.ان.ا. مکمل با ۵ میکرولیتر آر.ان.ا. کل، ۶/۵ میکرولیتر آب دیونیزه سترون (استریل)، ۴ میکرولیتر RT-buffer 5X، ۰/۷۵ میلی‌مول dNTPs، ۰/۵ میلی‌مول DTT، ۵ پیکومول آغازگر معکوس و ۲۰ واحد RiboLock RNase inhibitor (Thermo Scientific, Lithuania) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Palm cycler, CG1-96, Cobett research, Australia) صورت گرفت. واکنش‌ها



شکل ۱. موقعیت آغازگرهای عمومی متناظر با ژنوم پوتی‌ویروس‌ها مورد استفاده برای تکثیر سه ناحیه ژنومی ناپیوسته پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران

Figure 1. Position of universal primers corresponding to the potyviruses genome used for amplification of three interrupted regions of saffron infecting *Potyvirus* genome

جدول ۲. جفت آغازگرهای عمومی مورد استفاده، مربوط به تکثیر بخش‌هایی از ژنوم پوتی‌ویروس‌ها

Table 2. Universal primer pairs used in this study for partial amplification of potyviruses genome

| Primer pair | Sequence (5'-3') | Position on the genome | Annealing temperature (°C) | Reference |
|-------------|---|------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| PV1/SP6 | GATTTAGGTGACACTATAGAATTTTTTTTTTTTTTTT | 3'UTR , CP, Nib | 58 | Mackenzie <i>et al.</i> , 1998 |
| PV21/T7 | TAATACGACTCACTATAGGGNAAYAAAYAGYGGNCARCC | 3'UTR , CP, Nib | | Mackenzie <i>et al.</i> , 1998 |
| CIFor | GGIVVIGTIGGIWSIGGIAARTCIAC | CI | 40 | Ha <i>et al.</i> , 2008 |
| CIRev | ACICCRTTYTCDATDATRTTIGTIGC | CI | | Ha <i>et al.</i> , 2008 |
| HPFor | TGYGAYAAAYCARYTIGAYIIIAAYG | HC-Pro | 40 | Ha <i>et al.</i> , 2008 |
| HPRev | GAICCRWAIGARTCIAIIACRTG | HC-Pro | | Ha <i>et al.</i> , 2008 |

I=inosine, Y=C/T, R=G/A, W=A/T, V=A/C/G, S=C/G, D=A/G/T, N=A/T/C/G

همسانه‌سازی قطعه‌های تکثیرشده و تعیین توالی نوکلئوتیدی

پس از الکتروفورز افقی محصول واکنش‌های PCR، قطعه‌های تکثیرشده از ژل آگاروز استخراج و پس از الحاق به حامل pTG19-T PCR cloning vector (دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین)، تراریزش به درون یاخته‌های مستعد *Escherichia coli* سویه DH5 α صورت گرفت. همسانه‌های نو ترکیب در محیط کشت LB (Luria-Bertani medium) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت‌شده و در نهایت پلاسمیدهای نو ترکیب به روش لیز قلیایی (Sambrook & Russel, 2001) استخراج و برای تعیین توالی دو طرفه به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شدند.

تحلیل توالی نوکلئوتیدی قطعه‌های افزایش‌شده

توالی نوکلئوتیدی قطعه‌های تکثیرشده ژنوم ویروس آلوده‌کننده زعفران و ترجمه اسید آمینه‌ای نواحی کدکننده متناظر با توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم‌افزار Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) مقایسه شد. بر پایه نتایج این مقایسه، ویروس‌های مشابه انتخاب و هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی نوکلئوتیدی قطعه‌های تکثیرشده ژنوم ویروس آلوده‌کننده زعفران و ترجمه اسید آمینه‌ای نواحی کدکننده متناظر با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) انجام گرفت. بهترین مدل جانمایی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای در هم‌ترازها با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 تعیین و درخت تبارزایی (فیلوژنی) بر پایه توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنومی کدکننده CP و ترجمه اسید آمینه‌ای متناظر با روش maximum likelihood و ۱۰۰۰ تکرار رسم شد. ویروس موزاییک گندم (TrMV) نیز به‌عنوان برون گروه استفاده شد.

نتایج و بحث

آزمون‌های سرولوژیکی نمونه‌های زعفران در بازدیدهای مکرر از کشتزارهای زعفران استان‌های

تهران، اصفهان، فارس، آذربایجان شرقی و خراسان جنوبی و رضوی، علایم شبه‌ویروسی در بوته‌ها مشاهده نشد. پس از نمونه‌برداری تصادفی از برگ‌ها و بنه‌های گیاهان زعفران، در مجموع ۸۹۰ نمونه برگی مورد بررسی سرم‌شناختی (سرولوژیکی) قرار گرفتند. در بررسی آلودگی نمونه‌ها به ویروس‌های مختلف با آزمون الیزا هیچ واکنش مثبتی دال بر آلودگی نمونه‌ها به ویروس موزاییک خیار^۲، ویروس موزاییک یونجه^۳ و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی^۴ به دست نیامد، در حالی که ۶۴۱ نمونه جمع‌آوری‌شده از استان‌های مختلف با آنتی‌سرم جنس پوتی‌ویروس واکنش مثبت نشان دادند. در نتایج آزمون الیزای این شمار نمونه (۶۴۱ عدد) با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی یازده گونه پوتی‌ویروس، همه نمونه‌ها فقط با آنتی‌سرم اختصاصی BCMV واکنش مثبت نشان دادند (جدول ۳).

بررسی دامنه میزبانی آزمایشگاهی و علایم ناشی از مایه‌زنی روی گیاهان محک

گیاهان محک مایه‌زنی‌شده با هشت جدایه پوتی‌ویروس زعفران به‌طور مرتب از نظر بروز علائم بازدید و انتقال ویروس به آن‌ها با آزمون الیزا بررسی شد. بر اساس نتایج، تاکنون انتقال مکانیکی این ویروس به گیاهان محک ناموفق بوده است، البته آزمایش‌های بیشتری در این خصوص در حال انجام می‌باشد.

تعیین وزن مولکولی پروتئین پوششی ویروس

پس از الکتروفورز آموده‌های پروتئین کل و نیمه خالص ویروس از بافت برگ گیاهان آلوده و غیر آلوده به پوتی‌ویروس در ژل پلی‌اکریل‌آمید، تفاوت عمده‌ای بین آموده‌ها مشاهده نشد که این امر نشان داد روش خالص‌سازی نسبی باعث حذف چشمگیری از پروتئین‌های گیاهی نشده بود. پس از انتقال پروتئین‌ها به غشای سلولزی و رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید، نبود باند پروتئینی در ژل گویای انتقال کامل همه

2. *Cucumber mosaic virus*

3. *Alfalfa mosaic virus*

4. *Tomato spotted wilt virus*

1. *Triticum mosaic virus*

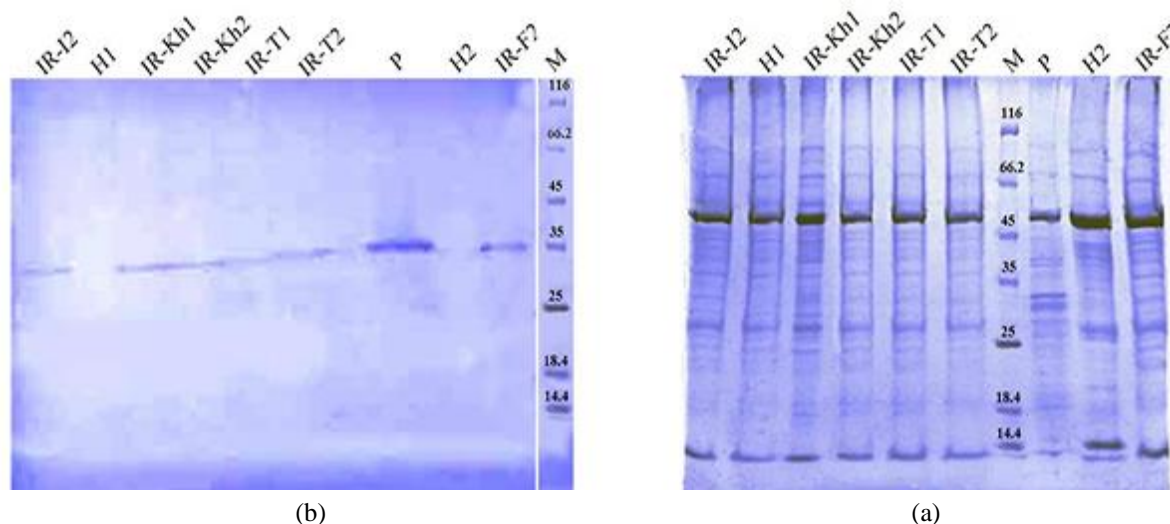
از باند ظاهر شده در آموده پروتئین کل گیاه آلوده بود. این نتیجه گویای تغلیظ پیکره‌های ویروسی در فرآیند خالص‌سازی نسبی، به‌رغم کم بودن حجم بافت گیاهی بود (شکل ۲). بر پایه خط رگرسیون بین حرکت نسبی و لگاریتم وزن مولکولی پروتئین‌های نشانگر، وزن مولکولی پروتئین پوششی پوتی ویروس زعفران حدود ۳۵ کیلودالتون برآورد شد.

پروتئین‌ها به غشا بود. در آزمون وسترن بلات یک باند پروتئینی در آموده پروتئین کل و نیمه‌خالص گیاهان آلوده به جدایه‌های Ir-Kh1، Ir-Kh2، Ir-T1، Ir-T2، Ir-I2 و Ir-F2 با آنتی‌سرم اختصاصی BCMV واکنش نشان داد درحالی‌که هیچ واکنش مثبتی در آموده‌های گیاهان سالم مشاهده نشد. باند مربوط به پروتئین پوششی ویروس در آموده نیمه‌خالص به‌مراتب قوی‌تر

جدول ۳. درصد آلودگی نمونه‌های زعفران مناطق مختلف ایران به پوتی ویروس زعفران

Table 3. Infection rate of saffron samples originated from different locations of Iran with detected virus

| Sampling region | Number of samples | Number of infected samples | Infection rate (%) |
|-------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------|
| Isfahan | 150 | 85 | 56.6 |
| East Azarbayjan | 30 | 22 | - |
| Alborz | 30 | 24 | - |
| Razavi & South Khorasan | 650 | 487 | 75 |
| Fars | 30 | 23 | - |



شکل ۲. آزمون SDS-PAGE (الف) و وسترن بلات (ب) آموده نیمه خالص ویروس (P)، آموده‌های پروتئین کل برگ زعفران آلوده به جدایه‌های Ir-I2، Ir-Kh1، Ir-Kh2، Ir-T1، Ir-T2، Ir-F2 ویروس و گیاهان زعفران سالم (H1 و H2). M، نشانگر پروتئینی

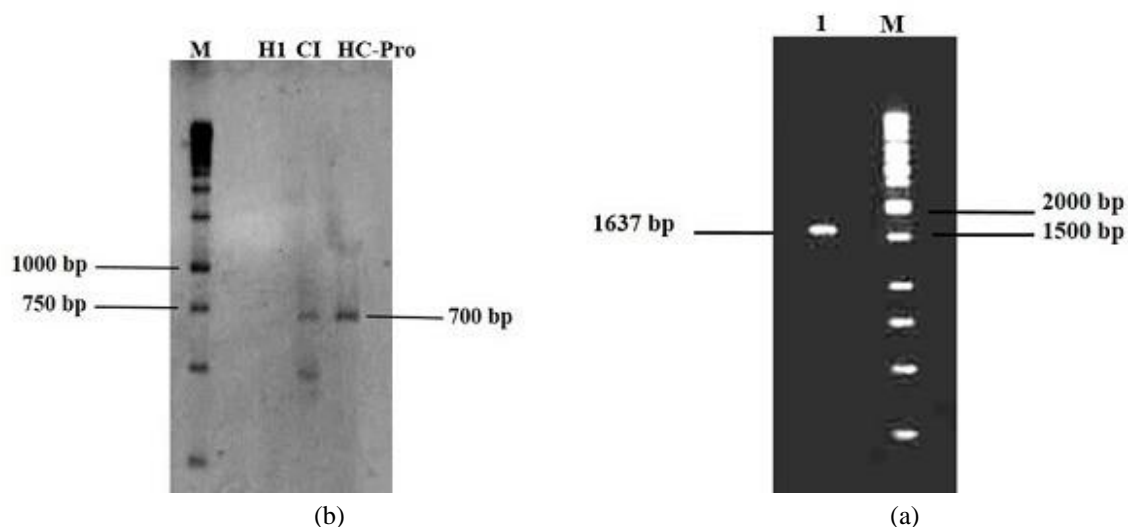
(Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Fisher Scientific, USA)

Figure 2. SDS PAGE (A) and western blot (B) of partial purified virus (P) and extracted total protein from virus infected saffron plants (Ir-I2, Ir-Kh1, Ir-Kh2, Ir-T1, Ir-T2, Ir-F2) and healthy saffron plants (H1, H2). M: (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Fisher Scientific, USA)

جفت‌بازی، مربوط به 3'UTR (۲۲۷ نوکلئوتید)، پروتئین پوششی (۸۲۲ نوکلئوتید) و بخشی از NIB (۵۸۸ نوکلئوتید) و دو قطعه دیگر به طول ۷۰۰ جفت‌باز متناظر با بخشی از نواحی CI و HC-Pro بود درحالی‌که در آموده آران.ا کل استخراج شده از گیاه سالم هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد (شکل ۳).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR)

به‌منظور تعیین ویژگی‌های مولکولی پوتی ویروس آلوده‌کننده زعفران، سه قطعه ناپیوسته از ژنوم پنج جدایه پوتی ویروس زعفران با استفاده از آموده آران.ا کل استخراج شده از گیاهان آلوده تکثیر شد. این قطعه‌ها با اندازه مورد انتظار شامل قطعه‌ای ۱۶۳۷



شکل ۳. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) آماده‌آران کل زعفران آلوده به ویروس با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی جنس پوتی‌ویروس (الف) و جفت آغازگر مربوط به بخشی از ناحیه CI و HC-Pro (ب). HI: گیاه سالم، M: نشانگر دی.ان.ا. ۱ کیلو بازی (Gene Ruler TM, SM0313, 1Kb DNA Ladder, MBI Fermentas, Germany)

Figure 3. RT-PCR product of virus infected saffron total RNA using *Potyvirus* specific primer pair (A) and primer pairs corresponding to the partial CI and HC-Pro regions. M: 1Kb DNA Ladder (Gene Ruler TM, SM0313, 1Kb DNA Ladder, MBI Fermentas, Germany).

تحلیل توالی نوکلئوتیدی

نتایج به دست آمده از مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی تکثیر شده از ژنوم ویروس جدا شده از زعفران با توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به دیگر ویروس‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Blastn نشان داد که این ویروس با پوتی‌ویروس‌ها بیشترین شباهت را دارد. نتیجه هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی نوکلئوتیدی قطعه‌های تکثیر شده ژنوم ویروس آلوده‌کننده زعفران و ترجمه اسید آمینه‌ای نواحی کدکننده متناظر پوتی‌ویروس‌ها در جدول‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. محل برش Nib/CP پوتی‌ویروس زعفران توالی اسید آمینه‌ای VLLQ/S دارد که توالی همسان با توالی متناظر در اغلب اعضای جنس پوتی‌ویروس است (Adams *et al.*, 2005b). مقایسه این توالی پنج اسید آمینه‌ای با چهار ویروس مرتبط نشان داد که تفاوت در اسید آمینه دوم وجود دارد، به این حالت که برخلاف پوتی‌ویروس زعفران، این توالی در *Ceratobium mosaic virus* (CerMV)، BCMNV و *Telosma mosaic virus* (TelMV) به صورت

VSLQ/S بوده در حالی که BCMV توالی VHLQ/S در این ناحیه دارد. بر پایه نتایج هم‌ردیف‌سازی چندگانه ناحیه کدکننده پروتئین پوششی پوتی‌ویروس زعفران با توالی مشابه‌ترین پوتی‌ویروس‌ها و با استفاده از نرم‌افزار LALIGN (Huang & Miller, 1991)، بیشترین یکسانی توالی نوکلئوتیدی ویروس زعفران با CerMV و TelMV (۷۴ درصد) و ترجمه اسید آمینه‌ای با BCMNV (۷۸/۸ درصد) تعیین شد که توالی ژنی مربوط به CerMV در بانک ژن به صورت توالی غیر کامل (جزئی) است و هیچ توالی کاملی از آن در دسترس نیست. با توجه به معیارهای مولکولی تعیین حدود و گستره گونه در تیره پوتی‌ویریده (Adams *et al.*, 2005a)، یکسانی کمتر از ۷۶ و ۸۲ درصدی توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ناحیه پروتئین پوششی نشان‌دهنده ماهیت آن‌ها به عنوان گونه جداگانه است. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که بیشترین یکسانی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ناحیه CP پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران کمتر از آستانه تعیین شده برای جدایه‌های مربوط به یک گونه است.

در خوشه زیرگروه BCMV همراه با BCMV و BCMNV قرار گرفت. بر پایه نتایج این تحقیق، پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران رابطه سرم‌شناختی بالایی با BCMV دارد به طوری که در آزمون‌های سرم‌شناختی با آنتی‌سرم اختصاصی این گونه واکنش بسیار خوبی نشان می‌دهد، همچنین بر پایه توالی پروتئین پوششی نیز در زیرگروه BCMV قرار می‌گیرد ولی میزان یکسانی توالی این ناحیه کمتر از آستانه تعیین شده برای جدایه‌های مربوط به یک گونه از جنس پوتی‌ویروس است. لذا بر پایه این نتایج، احتمال زیاد می‌رود پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران گونه جدیدی از جنس پوتی‌ویروس باشد. لیکن تعیین جایگاه آرایه‌بندی دقیق این پوتی‌ویروس مستلزم بررسی‌های بیشتر، به ویژه تعیین توالی کل ژنوم آن است.

همچنین به منظور تعیین روابط تبارزایی این ویروس با دیگر گونه‌های جنس پوتی‌ویروس، مدل general time-reversible (GTR+G+I) (Tavaré, 1986) در هم‌ترازهای نوکلئوتیدی و Jones-taylor-Thornton (JTT+G) (Jones *et al.*, 1992) در هم‌ترازهای اسیدآمینهای به‌عنوان بهترین مدل جانمایی تعیین و درخت تبارزایی بر پایه توالی ناحیه کدکننده پروتئین پوششی پوتی‌ویروس زعفران و توالی متناظر در دیگر پوتی‌ویروس‌های مرتبط با این ویروس با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 رسم شد (شکل‌های ۴ و ۵). در درخت تبارزایی نوکلئوتیدی رسم شده، پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران در خوشه زیرگروه BCMV از جنس پوتی‌ویروس در کنار *East Asian passiflora virus* (EAPV) و TelMV و در درخت تبارزایی اسیدآمینهای

جدول ۴. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و ترجمه اسیدآمینهای بخش‌هایی از ژنوم پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران با پوتی‌ویروس‌های مرتبط Table 4. Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequences of saffron infecting *Potyvirus* partial genome with closely related potyviruses

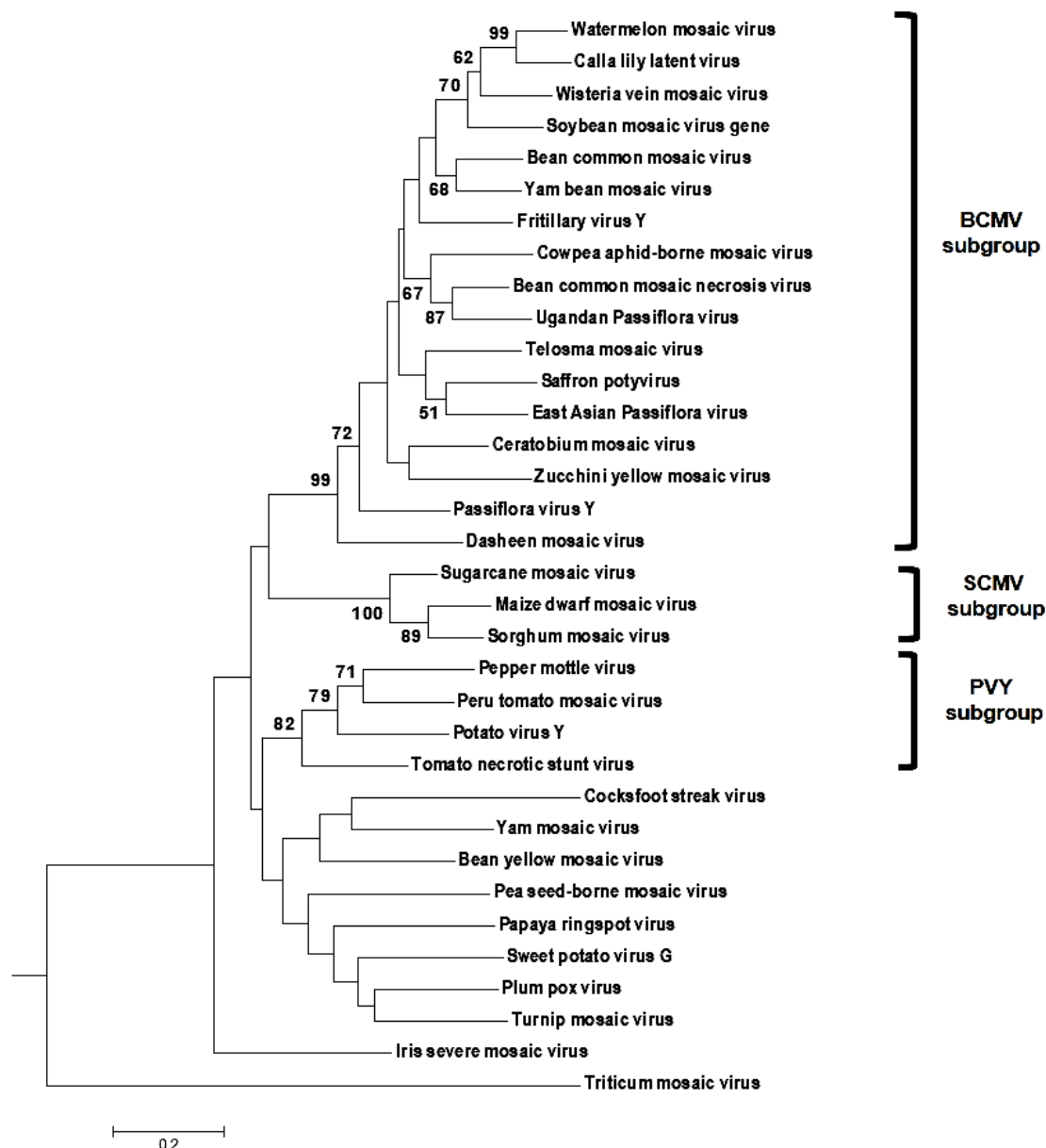
| Region of <i>Potyvirus</i> infecting saffron genome | Nucleotide identity | | Amino acid identity | |
|---|---------------------|------------|---------------------|------------|
| | Virus | Percentage | Virus | Percentage |
| 3' UTR, CP, Nib | SMV | 71.4 | - | - |
| CP | CerMV/EAPV | 74.8 | BCMNV | 78.8 |
| Partial Nib | TelMV | 73.8 | TelMV | 78.6 |
| CI | BCMNV | 77.4 | SMV | 86.6 |
| HC-Pro | SMV | 76.9 | WMV | 87.8 |

جدول ۵. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و ترجمه اسیدآمینهای ناحیه پروتئین پوششی پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران بر پایه هم

ردیف‌سازی دوگانه با توالی متناظر پوتی‌ویروس‌های مشابه، با استفاده از نرم‌افزار LALIGN

Table 5. Comparison between the nucleotide and deduced amino acid sequences saffron infecting *Potyvirus* coat protein region with related potyviruses based on two alignment using LALIGN program

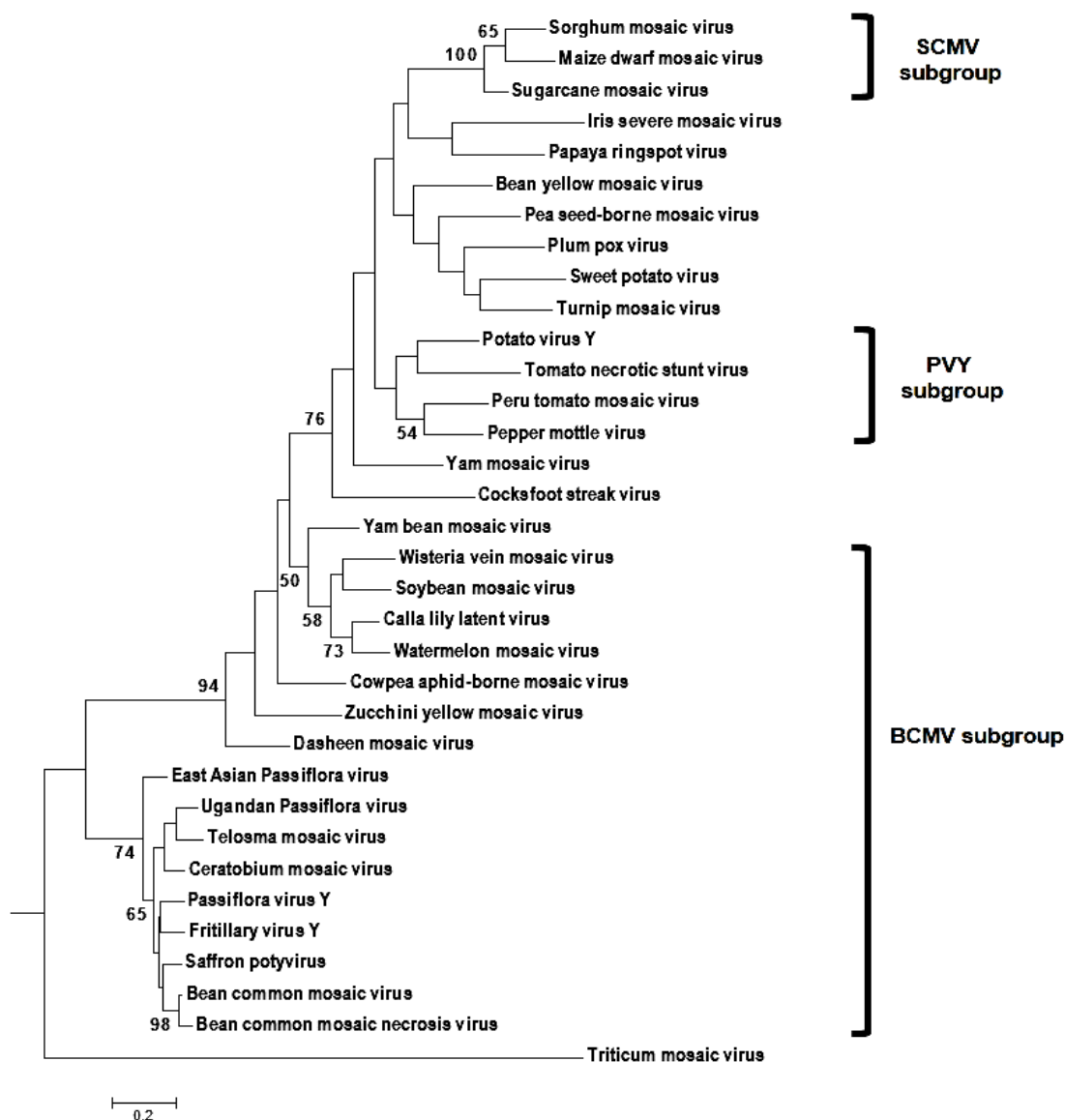
| Virus | Nucleotide identity (%) | Deduced amino acid identity (%) |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| BCMNV | 72.5 | 78.8 |
| BCMNV | 72.6 | 74.9 |
| CerMV | 74 | 76.6 |
| CLLV | 71.8 | 75.9 |
| EAPV | 73 | 72.8 |
| FVY | 73.1 | 77.1 |
| PasVY | 73.5 | 78 |
| SMV | 72.9 | 78.4 |
| TelMV | 74 | 77.2 |
| Uganadan passiflora virus | 73.9 | 76.3 |
| WMV | 72.2 | 73.6 |
| WVMV | 73.7 | 73.9 |
| YMV | 73.6 | 74.2 |



شکل ۴. درخت تبارزایی بر پایه توالی نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده پروتئین پوششی ویروس آلوده کننده زعفران و توالی متناظر دیگر پوتی ویروس های نزدیک به این ویروس با استفاده از نرم افزار MEGA6 و مدل GTR+G+I به روش maximum likelihood و هزار تکرار. ویروس موزاییک گندم به عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است.

Figure 4. Phylogenetic tree of saffron infecting *Potyvirus* genome and other closely related potyviruses based on CP nucleotide sequence reconstructed using MEGA6 and GTR+G+I model based on analysis with 1000 bootstrap replications. *Triticum mosaic virus* was considered as outgroup.

BCMNV: *Bean common mosaic necrosis virus* (AB735585.1); BCMV: *Bean common mosaic virus* (KC478389.1); BYMV: *Bean yellow mosaic virus* (JX173278.1); CLLV: *Calla lily latent virus* (EF105299.1); CABMV: *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (KM597165.1); CerMV: *Ceratobium mosaic virus* (AF022443.1); CSV: *Cocksfoot streak virus* (EU119422.1); DsMV: *Dasheen mosaic virus* (KJ786965.1); EAPV: *East Asian passiflora virus* (KP114136.1); FVY: *Fritillary virus Y* (AM039800.1); ISMV: *Iris severe mosaic virus* (NC029076.1); MDMV: *Maize dwarf mosaic virus* (JQ280313.1); PRSV: *Papaya ringspot virus* (AY027810.2); *Passiflora virus Y* (PasVY) (JF427599.1); PPV: *Plum pox virus* (KC020125.1); PSbMV: *Pea seed-borne mosaic virus* (AJ252242.1); PTV: *Peru tomato mosaic virus* (NC004573.1); PepMoV: *Pepper mottle virus* (EU586127.1); PVY: *Potato virus Y* (KF770835.1); SMV: *Soybean mosaic virus* (LC037232.1); SCMV: *Sugarcane mosaic virus* (JX188385.1); SPFMV: *Sweet potato feathery mottle virus* (KP115623.1); SrMV: *Surghum mosaic virus* (KM025044.1); TeMV: *Telosma mosaic virus* (DQ851493.1); ToNstV: *Tomato necrotic stunt virus* (JQ314463.1); TrMV: *Triticum mosaic virus* (NC012799.1); TuMV: *Turnip mosaic virus* (AY134473.2); *Ugandan Passiflora virus* (FJ896003.1); WMV: *Watermelon mosaic virus* (KP164988.1); WVMV: *Wisteria vein mosaic virus* (AY656816.1); YMV: *Yam mosaic virus* (NC004752.1); YBMV: *Yam bean mosaic virus*, (JN190431.1); ZYMV: *Zucchini yellow mosaic virus* (KF976712.1)



شکل ۵. درخت تبارزایی بر پایه توالی ترجمه اسید آمینه‌های پروتئین پوششی ویروس آلوده‌کننده زعفران و توالی متناظر دیگر پوتی‌ویروس‌های نزدیک به این ویروس با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و مدل JTT+G به روش maximum likelihood و هزار تکرار. ویروس موزاییک گندم به‌عنوان برون‌گروه در نظر گرفته شده است.

Figure 5. Phylogenetic tree of saffron infecting *Potyvirus* genome and other closely related potyviruses based on CP amino acid sequence reconstructed using MEGA6 and GTR+G+I model based on analysis with 1000 bootstrap replications. *Triticum mosaic virus* was considered as outgroup.

BCMV: Bean common mosaic virus (CAA78912.1); BCMNV: Bean common mosaic necrosis virus (BAM34499.1); BYMV: Bean yellow mosaic virus (JX173278.1); CLLV: Calla lily latent virus (EF105299.1); CABMV: Cowpea aphid-borne mosaic virus (KM597165.1); CerMV: Ceratobium mosaic virus (AAC59614.1); CSV: Cocksfoot streak virus (EU119422.1); DsMV: Dasheen mosaic virus (KJ786965.1); EAPV: East Asian passiflora virus (BAD83868.1); FVY: Fritillary virus Y (YP001974445.1); ISMV: Iris severe mosaic virus (NC029076.1); MDMV: Maize dwarf mosaic virus (JQ280313.1); PRSV: Papaya ringspot virus (AY027810.2); Passiflora virus Y (PasVY) (ADZ45595.1); PPV: Plum pox virus (KC020125.1); PSbMV: Pea seed-borne mosaic virus (AJ252242.1); PTV: Peru tomato mosaic virus (NC004573.1); PepMoV: Pepper mottle virus (EU586127.1); PVY: Potato virus Y (KF770835.1); SMV: Soybean mosaic virus (LC037232.1); SCMV: Sugarcane mosaic virus (JX188385.1); SPMV: Sweet potato feathery mottle virus (KP115623.1); StMV: Sorghum mosaic virus (KM025044.1); TeMV: Telosma mosaic virus (YP001816835.1); ToNStV: Tomato necrotic stunt virus (JQ314463.1); TrMV: Triticum mosaic virus (YP002956096.1); TuMV: Turnip mosaic virus (AY134473.2); Ugandan Passiflora virus (ACZ43795.1); WMV: Watermelon mosaic virus (KP164988.1); WVMV: Wisteria vein mosaic virus (AY656816.1); YMV: Yam mosaic virus (NC004752.1); YBMV: Yam bean mosaic virus (JN190431.1); ZYMV: Zucchini yellow mosaic virus (KF976712.1).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پوتی‌ویروس ردیابی شده از زعفران، با درصد بالای آلودگی، ویروس غالب در مناطق عمده زعفران‌کاری است. در بررسی‌های سرم‌شناختی انجام شده در آزمون الایزا این ویروس تنها با آنتی‌سرم اختصاصی ویروس موزایک معمولی لوبیا (BCMV) واکنش مثبت نشان داد و وزن مولکولی پروتئین پوششی این ویروس در ژل پلی‌اکریل‌آمید و آزمون وسترن بلات ۳۵ کیلودالتون برآورد شد که در دامنه وزن مولکولی اعضای جنس پوتی‌ویروس (۳۰ تا ۴۷ کیلودالتون (King et al., 2011)) قرار می‌گیرد. انتقال مکانیکی ویروس روی چندین گونه گیاه محک تاکنون موفق نبوده است. در نهایت با توجه به تحلیل‌های مولکولی و تبارزایی بر پایه توالی نوکلئوتیدی ناحیه کدکننده پروتئین پوششی، این ویروس در زیرگروه BCMV از جنس پوتی‌ویروس قرار گرفت ولی میزان یکسانی توالی نوکلئوتیدی و ترجمه اسیدآمینه‌ای متناظر این ناحیه کمتر از آستانه تعیین شده برای جدایه‌های مربوط به یک گونه از جنس پوتی‌ویروس است. بر پایه این نتایج، پوتی‌ویروس آلوده‌کننده زعفران

به احتمال زیاد گونه جدیدی از جنس پوتی‌ویروس است لیکن تعیین جایگاه آرایه‌بندی دقیق این پوتی‌ویروس مستلزم بررسی‌های بیشتری در زمینه ویژگی‌های زیستی، انتقال‌پذیری با شته‌ها و به‌ویژه تعیین توالی نوکلئوتیدی کل ژنوم آن است. با توجه به درصد بالای آلودگی در کشتزارهای زعفران استان‌های مورد بازدید، این ویروس می‌تواند به‌عنوان یک هشدار جدی برای این محصول ارزشمند کشور باشد. اگرچه تاکنون تأثیر آلودگی زعفران به این ویروس روی محصول زعفران بررسی نشده، لیکن انجام آن بسیار ضروری است. ممکن است با فراهم شدن شرایط بهتر به‌ویژه از نظر فعالیت شته‌های ناقل و یا ظهور سویه‌های مهاجم‌تر ویروس (در اثر وقوع تغییر ژنتیکی ژنوم ویروس)، آلودگی زعفران به این ویروس به آستانه خطر رسیده و منجر به آسیب‌های غیرقابل پیش‌بینی شود. همچنین بررسی دامنه میزبانی طبیعی این ویروس ضروری است.

سیاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (<http://rtms.insf.org>), طرح تحقیقاتی مصوب ۹۳۰۲۱۲۵۳ انجام شده است.

REFERENCES

1. Adams, M. J., Antoniw J. F. & Fauquet C. M. (2005a). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology*, 150 (3), 459-479.
2. Adams, M. J., Antoniw, J. F. & Beaudoin, F. (2005b). Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Molecular Plant Pathology*, 6, 471-487.
3. Brunt, A. A. & Phillips, S. (1979). Viruses of bulb crops. *Crocus tomasinianus* and *Narcissus* spp. *Annual Report of the Glasshouse Crops Horticultural Research Institute*, 130-131.
4. Chen, C. C., Chang, C. A., Tsai, H. T. & Hsu, H. T. (2004). Identification of a *Potyvirus* causing latent infection in calla lilies. *Plant Disease*, 88, 1046.
5. Chen, J. & Chen, J. S. (2000). Occurrence and control of mosaic disease (*Turnip mosaic virus*) in saffron (*Crocus sativus*). *Zhejiang Nongye Kexue*, 3, 132-135.
6. Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977). Characteristics of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
7. Fried, M. & Crothers, D.M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 9, 6505-6525.
8. Grilli Caiola, M. & Faoro, F. (2011). Latent virus infections in *Crocus sativus* and *Crocus cartwrightianus*. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 175-182.
9. Grilli Caiola, M. (1982). Virus-like particles in cells of saffron flowers. *Phytopathology Zeitschrift*, 105, 92-95.
10. Ha, C., Coombs, S., Reville, P. A., Harding, R. M., Vu, M. & Dale, J. L. (2008). Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. *Archives of Virology*, 15, 25-36.
11. Huang, X. & Miller W. (1991). A time-efficient linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics*, 12, 337-357.
12. Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology* (4th ed.), New York, USA. Academic Press. 1001 pp.

13. Jensen, S. G., Long-Davidson, B. & Seip, L. (1986). Size variation among proteins induced by sugarcane mosaic viruses in plant tissue. *Phytopathology*, 76, 528-532.
14. JiShuang, C. (2000). Occurrence and control of mosaic disease (*Turnip mosaic virus*) in saffron (*Crocus sativus*). *Journal Zhejiang Nongye Kexue*, 3, 132-135.
15. Joisson, C., Dubs, M. C., Briand, J. P., Van Regenmortel, M., H. (1992). Detection of potyviruses with antisera to synthetic peptides. *Research in Virology*, 143 (3), 167-178.
16. Jones, D. T., Taylor, W. R., Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8, 275-282.
17. King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. and Lefkowitz, E. J. (2011). *Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego. Elsevier, 1327 pp.
18. Lapiere, H. & Singnoret, P. A. (2004). *Viruses and virus disease of Poaceae (Gramineae)*. USA. Science publishers.
19. Leammli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Journal of Nature*, 227, 680-685.
20. Mackenzie, A. M., Nolan, M., Wei, K. J., Clements, M. A., Gowanlock, D., Wallace, B. J. & Gibbs, A. J. (1998). *Ceratobium mosaic potyvirus*: another virus from orchids. *Archives of Virology*, 143, 903-914.
21. Miglino, R., Jodlowska, A. & van Schadewijk, A. R. (2005). First report of *Narcissus mosaic virus* infecting *Crocus* spp. cultivars in the Netherlands. *Plant Disease*. 89 (3), 342.
22. Ochwo-Ssemakula, M., Sengooba, T., Hakiza, J. J., Adipala, E., Edema, R., Redinbaugh, M. G., Aritua, V. & Winter. S. (2012). Characterization and distribution of a potyvirus associated with passion fruit woodiness disease in Uganda. *Plant Disease*, 96, 659-665.
23. Pisi, A. & Bellardi, G. (1990). Ultrastructural study of cytoplasmic inclusions in plants infected with Potyviruses. *Journal of Phytopathology*, 130, 114-118.
24. Russo, M., Martelli, G. P., Cresti, M. & Ciampolini, F. (1979). *Bean yellow mosaic virus* in saffron. *Phytopathologia Mediterranea*, 18, 189-191.
25. Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2100 pp.
26. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1626 pp.
27. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
28. Tavaré, S. (1986). Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences (PDF). Lectures on Mathematics in the Life Sciences. *American Mathematical Society*, 17: 57-86.
29. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1997). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Academic Science USA*, 76, 4350-4354.
30. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L. & Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74, 157-175.
31. Van Slogtern, D. H. M. (1958). Rattle virus as a cause of diseases in flower bulbs, and the possibility of controlling infection by soil disinfectants. *Tijdschr PIZiekt*, 64, 5-6.