

Identification and Molecular Characterization of Saffron Yellow Mosaic Virus in South and Razavi Khorasan Province

1. Seyyede Atefeh Hosseini*^{ORCID}: Associated professor of Plant pathology, Department of plant protection, Faculty of Agriculture, University of Birjand
2. Akram Tavakoli Bardaskan^{ORCID}: Ph.D Student of Plant Pathology, Department of plant Protection. Faculty of Agriculture, University of Birjand
3. Philippe Roumagnac^{ORCID}: Researcher at CIRAD, Montpellier, France

*Corresponding Author's Email Address: ahosseini@birjand.ac.ir

Article Type:

Original Research

How to Cite: Hosseini, S. A., Tavakoli Bardaskan, A., & Roumagnac, P. (2025). Identification and Molecular Characterization of Saffron Yellow Mosaic Virus in South and Razavi Khorasan Province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 61(1-2), 67-82.

DOI: 10.22034/IJPP.2026.2021878.503

Abstract:

Saffron (*Crocus sativus* L.) is one of Iran's most valuable crops, both economically and culturally. It is vegetatively propagated through corms and is affected by viral infections that reduce its yield and quality. In this study, to investigate the viral infection status of saffron and molecularly identify saffron yellow mosaic virus (SYMV; *Potyvirus crocitesellati*), 51 saffron leaf samples were collected from fields in South Khorasan and Razavi Khorasan Provinces in 2024. Virion-associated nucleic acid (VANA) was extracted, followed by sequencing using 454 pyrosequencing technology. Metagenomic analysis revealed that viruses belonging to the genus *Potyvirus*, particularly SYMV, were the most prevalent in Iranian saffron populations. RT-PCR assays using potyvirus-specific primers confirmed the presence of SYMV in four regions: Qaen, Ferdows, Birjand, and Torbat Heydariyeh. The complete genome sequence of an Iranian isolate (Ir-Ferdows) was determined to be 8,547 nucleotides in length, and a phylogenetic tree was constructed using the Maximum Likelihood method. The results obtained from phylogenetic analysis (Figure 2) and the pairwise nucleotide sequence comparison matrix (Figure 3) showed that all 20 Iranian SYMV isolates (including the isolate from this study and 19 reference isolates from GenBank) formed a compact and distinct cluster with 100% bootstrap support and exhibited 97–100% nucleotide sequence identity. The isolate of Turnip mosaic virus (TuMV), used as an outgroup, showed a considerable evolutionary distance from this cluster, confirming the complete distinction between the two species. The genomic sequence of the Iranian isolate was deposited in the GenBank database under accession number PZ048999. Observed symptoms in infected plants included yellowing, mosaic patterns, and leaf curling. This study provides the first definitive evidence of SYMV presence in South Khorasan Province and its detection in Razavi Khorasan Province. The findings highlight the importance of continuous monitoring, development of specific diagnostic tools, and vector management strategies to prevent the spread of emerging saffron viruses.

Keywords: *Crocus sativus*, Saffron yellow mosaic virus, *Potyvirus*, VANA, Phylogenetics



© 2025 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Extended Abstract

Introduction

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a perennial geophyte from the Iridaceae family, propagated vegetatively by corms and highly valued for its dried stigmas, which constitute the world's most expensive spice. Yield and quality of saffron are threatened by multiple biotic factors, among which viral diseases play a significant but often underestimated role. Viruses can alter the content of secondary metabolites such as polyphenols, flavonoids, alkaloids, and terpenes, thereby affecting both the medicinal properties and the commercial quality of saffron. To date, more than 20 virus species from eight families (including Alphaflexiviridae, Betaflexiviridae, Potyviridae, and Tombusviridae) have been reported in saffron worldwide. Among these, potyviruses (genus Potyvirus, family Potyviridae) are particularly important due to their wide host range, economic impact, and efficient non-persistent transmission by aphids. In recent years, high-throughput sequencing (HTS) technologies have enabled the discovery of several novel viruses in Iranian saffron fields, including *Saffron dwarf virus* (SaDV), *Saffron latent virus* (SaLV), *Saffron Iran virus* (SaIR), and most recently *Saffron yellow mosaic virus* (SYMV). SYMV was first described by Tavoosi et al. (2023) from infected saffron plants in Iran. Its complete genome (9,557 nt) encodes a large polyprotein (3,097 aa) and a small PIPO ORF. Phylogenetically, SYMV forms a distinct cluster near *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) and *Clitoria yellow vein virus* (CYVV), but its low nucleotide identity with these species supports its classification as a novel potyvirus. Conserved motifs such as RITC and PTK in HC-Pro and NAG in the coat protein suggest that SYMV is naturally transmitted by aphids. Mixed infections involving SYMV, *Turnip mosaic virus* (TuMV), and SaLV have been observed in up to 47% of tested samples, indicating complex viral dynamics in Iranian saffron fields. The present study aimed to perform a molecular identification of *Saffron yellow mosaic virus* (SYMV) in

saffron (*Crocus sativus* L.) in Iran, and to investigate its infection status, geographical distribution, and phylogenetic characteristics in the provinces of Razavi Khorasan and South Khorasan. The results are expected to improve our understanding of the host range and distribution pattern of SYMV in Iran and to provide a scientific basis for developing effective management strategies against viral diseases in saffron.

Methods and Materials

A total of 51 saffron leaf samples were randomly collected in spring 2024 from cities in Razavi Khorasan (Torbat Heydarie, n=10) and South Khorasan (Ferdows, n=10; Ghaen, n=19; Birjand, n=12), regardless of the presence of visible symptoms. Samples were dried with CaCl₂ and stored at 4°C until processing. For virus discovery, a virion-associated nucleic acid (VANA)-based 454 pyrosequencing approach was employed. VANA captures all encapsidated nucleic acids (both RNA and DNA viruses). After virion-associated nucleic acid extraction from all 51 samples, amplification was performed using Large (Klenow) Fragment DNA Polymerase (Promega). The pooled DNA products were purified with Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and sequenced using GS FLX Titanium reagents on a 454 platform. Raw reads were demultiplexed, trimmed for quality with Cutadapt, and subjected to BLASTN and BLASTX searches against GenBank. Open reading frames (ORFs) were predicted using ORF Finder.

The occurrence of a virus was defined as detection of at least one VANA read with high similarity (e-value < 0.001) to that viral group. To confirm SYMV presence, total RNA was extracted from 35–40 mg of dried leaf tissue using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). RT-PCR was performed using the potyvirus-specific degenerate primers Oligo1N/Oligo2N. Positive amplicons were purified, sequenced by the Sanger method, and compared via BLASTN. The complete genome of one SYMV isolate from Ferdows was amplified and cloned following the protocols of Palanga et al. (2016) and Tavoosi et al. (2023).

The presence of conserved aphid-transmission motifs (RITC, PTK in HC-Pro; NAG in CP) indicates that SYMV is likely transmitted non-persistently by aphids. This feature, combined with the wide host range of aphid vectors, may explain the rapid dissemination of SYMV across saffron-growing areas. Therefore, vector management through aphid monitoring and integrated pest management should be a key component of disease control strategies.

Observed symptoms ranged from mild mosaic to severe yellowing and leaf deformation, but mixed infections and environmental factors precluded assigning specific symptoms solely to SYMV. This underscores the importance of precise molecular methods (RT-PCR, metagenomics) for accurate virus diagnosis. The VANA/HTS approach proved highly effective for discovering emerging viruses like SYMV without prior knowledge, and it can be adopted for national-scale virus surveillance in saffron.

The findings have critical implications for management. Given the high prevalence of SYMV in the main saffron-producing provinces of Iran (Razavi and South Khorasan), the following strategies are urgently needed: (1) production of virus-free corms via tissue culture; (2) regular field monitoring using sensitive molecular assays; (3) management of aphid vectors; (4) quarantine regulations to prevent movement of infected corms; and (5) farmer education on viral disease impact. In conclusion, this study reports the first confirmed occurrence of SYMV in South Khorasan and expands its known distribution in Razavi Khorasan. The high genetic stability combined with wide geographic spread indicates successful establishment of SYMV in Iranian saffron fields and a high potential for significant economic damage. These results provide a scientific framework for designing and implementing effective viral disease management programs for this strategic crop.

Sanger sequencing was used to verify the full genome sequence. Multiple sequence alignment was done with MUSCLE 3.7, and sequence comparisons were performed with DNAMAN and Geneious software. A maximum-likelihood (ML) phylogenetic tree was

constructed in MEGA X with 1,000 bootstrap replicates. Recombination signals were investigated using RDP v4.13, with only events detected by at least four methods ($P \leq 0.05$) considered valid.

Results and Discussion

High-quality VANA reads, after removal of duplicates and low-quality sequences, were assembled and subjected to BLAST analysis. The results showed that saffron samples from all surveyed regions in Razavi and South Khorasan provinces were infected with SYMV. The Ferdows isolate (Ferdows-SYMV.IR) exhibited the highest nucleotide identity (97–100%) with the reference SYMV isolate (GenBank accession OK632024) previously reported by Tavoosi et al. (2023).

Symptomatology of the collected plants revealed a spectrum of viral symptoms, including mild mosaic, yellowing, yellow dwarfing, yellow mosaic, pronounced mosaic, and also symptomless plants (Figure 1). However, because most SYMV-infected plants were co-infected with other potyviruses, it was impossible to attribute specific symptoms exclusively to SYMV.

RT-PCR using potyvirus-specific primers amplified fragments that, after sequencing, showed 97–100% nucleotide identity with SYMV (OK632024). SYMV was confirmed in samples from Ghaen, Ferdows, Birjand, and Torbat Heydarie. The complete genome of the Ferdows isolate was determined to be 8,917 nt. Overlapping regions covering the HC-Pro, CI, NIa-Vpg, NIa-Pro, NIb, and CP genes were amplified and Sanger-sequenced. The Sanger-derived sequences showed >99% identity with the Illumina data, confirming high accuracy.

Phylogenetic analysis (Figure 2) revealed two main clusters. Cluster I, strongly supported by bootstrap values, contained all Iranian SYMV isolates: 17 new isolates (accessions PV831687–PV831703), the Ferdows isolate, and the reference SYMV (OK632024). This cluster was compact and distinct, indicating very high genetic similarity (97–100% intra-group nucleotide identity, Figure 3). Cluster II comprised outgroup potyviruses, including three BYMV

isolates from Australia (HG970850, HG970854, HG970855), two CYVV isolates from Germany (MW848532, MN399730), one Watermelon mosaic virus isolate from the USA (DQ641248), and Tobacco mosaic virus (PV831705) as an outgroup. The nucleotide identity between Iranian SYMV isolates and BYMV was at most 84%, and with CYVV ranged from 68 to 77%, well below the species demarcation threshold for potyviruses. Despite geographic separation, all 17 new Iranian isolates clustered tightly with the Ferdows and reference isolates, demonstrating remarkable genetic stability of SYMV populations in eastern Iran. Notably, this study confirms for the first time the presence of SYMV in South Khorasan province.

This study provides the first comprehensive evidence of SYMV distribution in South Khorasan and confirms its presence in Razavi Khorasan. Using a VANA-based metagenomic approach verified by RT-PCR, SYMV was detected in all four sampled regions (Ghaen, Ferdows, Birjand, Torbat Heydarie). The most striking finding is the high genetic stability of SYMV populations in eastern Iran. All 17 new isolates plus the Ferdows and reference isolates shared 97–100% nucleotide identity and formed a dense phylogenetic cluster. This level of identity exceeds the potyvirus species demarcation threshold and suggests a common, relatively recent introduction of SYMV into Iranian saffron fields, followed by rapid spread—likely via infected corms. The absence of significant genetic variation among geographically distant isolates supports this hypothesis.

Phylogenetic and pairwise identity analyses unequivocally place SYMV in a distinct cluster separate from close relatives BYMV (max 84% identity) and CYVV (68–77% identity), reconfirming its status as a novel potyvirus species.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

Ethical Considerations

All ethical principles and standards were fully observed in the conduct of this research.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to all those who contributed to the various stages of this study.

شناسایی و بررسی مولکولی ویروس موزایک زرد زعفران در استان های خراسان جنوبی و رضوی

۱. سیده عاطفه حسینی*^{id}: دانشیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲. اکرم توکلی بردسکن^{id}: دانشجوی دکترا، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۳. فیلیپ قوماک^{id}: محقق مرکز تحقیقات کشاورزی سیراد، فرانسه

*پست الکترونیک نویسنده مسئول: ahosseini@birjand.ac.ir

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۲ آبان ۱۴۰۴

تاریخ بازنگری: ۹ اردیبهشت ۱۴۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۸ اردیبهشت ۱۴۰۵

زعفران (*Crocus sativus* L.) یکی از باارزش‌ترین محصولات اقتصادی و فرهنگی ایران است که به‌صورت رویشی از طریق بنه تکثیر می‌شود و عملکرد و کیفیت آن تحت تأثیر آلودگی‌های ویروسی قرار می‌گیرد. در این پژوهش، به‌منظور بررسی وضعیت آلودگی ویروسی زعفران و شناسایی مولکولی ویروس موزایک زرد زعفران (*Saffron yellow mosaic virus*)، تعداد ۵۱ نمونه برگ زعفران از مزارع استان‌های خراسان جنوبی و رضوی در سال ۱۴۰۳ جمع‌آوری شد. استخراج اسید نوکلئیک وابسته به ویرون با روش VANA و توالی‌یابی با فناوری ۴۵۴ پیروسکوئینسینگ انجام گرفت. نتایج تحلیل متاژنومیک نشان داد که ویروس‌های جنس *Potyvirus*، به‌ویژه *SYM*، غالب‌ترین ویروس‌ها در جمعیت‌های زعفران ایران هستند. آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی این جنس، حضور *SYM* را در چهار جدایه متعلق به مناطق قائن، فردوس، بیرجند و تربت‌حیدریه تأیید کرد. توالی کامل ژنوم یک جدایه ایرانی (*Ir-Ferdows*) به طول ۸۵۴۷ نوکلئوتید تعیین و درخت تبارزایی با روش حداکثر درست‌نمایی (*Maximum Likelihood*) ترسیم شد. نتایج حاصل از درخت تبارزایی (شکل ۲) و ماتریس مقایسه زوجی توالی نوکلئوتیدی (شکل ۳) نشان داد که تمامی ۲۰ جدایه ایرانی *SYM* (شامل جدایه این مطالعه و ۱۹ جدایه مرجع از بانک ژن) در یک خوشه فشرده و مجزا با حمایت بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد قرار گرفته و دارای شباهت نوکلئوتیدی ۹۷ تا ۱۰۰ درصد هستند. جدایه مربوط به ویروس موزایک شلغم (*Turnip mosaic virus*, TuMV) به عنوان برون‌گروه، فاصله تکاملی قابل توجهی از این خوشه نشان داد که تمایز کامل دو گونه را تأیید می‌کند. توالی ژنومی جدایه ایرانی با شماره دسترسی PZ۰۴۸۹۹۹ در بانک ژن جهانی ثبت شد. علائم مشاهده‌شده در گیاهان آلوده شامل زردی، موزایک و پیچیدگی برگ‌ها بود. این یافته‌ها برای نخستین‌بار حضور قطعی *SYM* را در استان خراسان جنوبی و همچنین ردیابی آن را در استان خراسان رضوی تأیید می‌کند. نتایج این مطالعه بر لزوم پایش مستمر، توسعه روش‌های تشخیص اختصاصی و مدیریت ناقلین برای جلوگیری از گسترش ویروس‌های نوظهور زعفران تأکید دارد.

کلیدواژگان: زعفران، ویروس موزایک زرد زعفران، پوتی ویروس، وانا، فیلوژنتیک

نحوه استناددهی: حسینی، سیده عاطفه، توکلی بردسکن، اکرم، و قوماک، فیلیپ. (۱۴۰۴). شناسایی و بررسی مولکولی ویروس موزایک زرد زعفران در استان های خراسان جنوبی و رضوی. بیماری‌های گیاهی، ۶۱(۱-۲)، ۶۷-۸۲.

DOI:

10.22034/IJPP.2026.2021878.503



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۴ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY 4.0) صورت گرفته است.

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چندساله از خانواده Iridaceae است که به صورت رویشی از طریق بنه (corm) تکثیر می‌شود و ادویه با ارزش زعفران از کلالة آن به دست می‌آید (Fernández, 2004; Renau- Morata et al., 2013). کاهش عملکرد زعفران ناشی از عوامل متعددی مانند کیفیت خاک، شرایط اقلیمی، بیماری‌های قارچی و آلودگی‌های ویروسی است (Bazoobandi et al., 2020; Shahnoushi et al., 2020). در میان این عوامل، ویروس‌ها نقش مهمی در کاهش کمی و کیفی محصول ایفا می‌کنند و می‌توانند ترکیب متابولیت‌های ثانویه نظیر پلی فنول‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ویتامین‌ها و ترپن‌ها را تغییر دهند. این تغییرات بر خواص دارویی و کیفیت ادویه نهایی اثر می‌گذارد؛ از این رو شناسایی و کنترل ویروس‌های زعفران از اهمیت زیادی برخوردار است.

تا کنون بیش از ۲۰ گونه ویروس متعلق به هشت خانواده مختلف شامل Alphaflexiviridae، Betaflexiviridae، Botourmiaviridae، Solemoviridae، Potyviridae، Phenuiviridae، Geminiviridae و Tombusviridae از گیاه زعفران در کشورهای مختلف گزارش شده‌اند (Parizad et al., 2018; Russo et al., 1979; Samuitiené & Navalinskiené, 2008; Tavoosi et al., 2023; Zheng et al., 2018). از مهمترین ویروس‌های شناخته شده می‌توان به ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV)، ویروس موزاییک تربچه (*Turnip mosaic virus*, TuMV)، ویروس موزاییک آرابیدوسیس (*Arabis mosaic virus*, ArMV)، ویروس موزاییک نرگس (*Narcissus mosaic virus*, NMV)، ویروس پنهان زعفران (*Saffron latent virus*, SaLV) و ویروس جفجغه‌ای تنباکو (*Tobacco rattle virus*, TRV) اشاره کرد (Miglino et al., 2005; Parizad et al., 2017).

از میان این ویروس‌ها، گروه پوتی‌ویروس‌ها به دلیل گستره میزبانی وسیع، اهمیت اقتصادی فراوان و قابلیت انتقال توسط شته‌ها از مهمترین عوامل بیماری‌زای زعفران محسوب می‌شوند (Jones & Naidu, 2019). جنس *Potyvirus* بزرگترین جنس در خانواده Potyviridae است و بیش از ۲۰۰ گونه را در بر می‌گیرد که محصولات متنوعی نظیر حبوبات، سبزیجات و گیاهان زینتی را آلوده می‌کنند (Wylie et al., 2017). این ویروس‌ها دارای ذرات انعطاف‌پذیر با طول تقریبی ۷۵۰ نانومتر و قطر ۱۲ نانومتر هستند و ژنوم آن‌ها از RNA تک‌ رشته‌ای با قطبیت مثبت به طول حدود ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید تشکیل شده است. ژنوم پوتی‌ویروس‌ها یک پلی‌پروتئین بزرگ را رمزگذاری می‌کند که توسط پروتئازهای ویروسی به ۱۰ پروتئین عملکردی تقسیم می‌شود (Revers & García, 2015).

در سال‌های اخیر، با بهره‌گیری از فناوری‌های توالی‌یابی با توان بالا (HTS) و روش‌های بیوانفورماتیکی، مجموعه‌ای از ویروس‌های جدید در مزارع زعفران ایران شناسایی شده‌اند که از جمله می‌توان به ویروس کوتولگی زعفران (*Saffron dwarf virus*, SaDV)، ویروس پنهان زعفران (*Saffron latent virus*, SaLV)، ویروس زعفران ایران (*Saffron Iran virus*, SaIR) و ویروس موزاییک زرد زعفران (*Saffron yellow mosaic virus*, SYMV) اشاره کرد (Tavoosi et al., 2023; Valouzi et al., 2025). در میان این موارد، ویروس (*Saffron yellow mosaic virus*, SYMV) برای نخستین بار از نمونه‌های زعفران آلوده در ایران شناسایی و توصیف شد. توالی کامل ژنوم آن شامل ۹۵۵۷ نوکلئوتید است که در بانک ژن با شماره دسترسی OK632024 به ثبت رسیده است (Tavoosi et al., 2023). از نظر تبارزایی، SYMV در گروه مجزا اما نزدیک به ویروس‌های (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) و (*Clitoria yellow vein virus*, CYVV) قرار گرفت. بررسی توالی ژنتیکی این ویروس بیانگر تفاوت قابل توجه آن با گونه‌های مذکور بود و بنابراین به عنوان گونه‌ای جدید در جنس *Potyvirus*

در مجموع، شناسایی و توصیف (*Saffron yellow mosaic virus*, SYMV) نقطه عطفی در درک تنوع ویروس‌های زعفران محسوب می‌شود. این یافته‌ها نه تنها به روشن‌تر شدن ویروس‌های زعفران کمک کرده‌اند، بلکه اهمیت استفاده از فناوری‌های ژنومی نوین در پایش، پیشگیری و کنترل بیماری‌های ویروسی محصولات با ارزش اقتصادی بالا مانند زعفران را برجسته می‌سازند (Czotter et al., 2018; Gaafar & Ziebell, 2020).

روش VANA با توانایی شناسایی همزمان ویروس‌های DNA و RNA در پایش ویروس‌های زعفران به کار گرفته شد و همراه با توالی‌یابی با فناوری HTS و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، امکان شناسایی ویروس‌های مختلف و بازسازی ژنوم‌های آن‌ها را فراهم کرد.

بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، شناسایی مولکولی ویروس موزاییک زرد زعفران (*Saffron yellow mosaic virus*, SYMV) در گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) در ایران و بررسی وضعیت آلودگی و ویژگی‌های تبارزایی آن در استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی بود. نتایج این مطالعه می‌تواند در درک بهتر دامنه میزبانی و الگوی پراکنش SYMV در ایران و نیز تدوین راهکارهای مدیریتی مؤثر در کنترل بیماری‌های ویروسی زعفران نقش مهمی ایفا کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از گیاه

تعداد ۵۱ نمونه برگ زعفران به صورت تصادفی و بدون توجه به وجود علائم احتمالی بیماری از شهرهای استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی در بهار سال ۱۴۰۳ جمع‌آوری شد (جدول ۱). نمونه‌ها در حضور کلرید کلسیم (CaCl_2) خشک شدند و تا زمان استخراج اسید نوکلئیک وابسته به ویرون در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آزمایش‌های بعدی در مرکز تحقیقات سیراد فرانسه و آزمایشگاه ویروس‌شناسی انجام شد.

طبقه‌بندی می‌شود (Tavoosi et al., 2023). ژنوم SYMV شامل یک پلی‌پروتئین بزرگ با ۳۰۹۷ آمینو اسید و یک چارچوب خوانش باز کوچک (PIPO) است (Revers & García 2015). وجود موتیف‌های حفاظت‌شده نظیر RITC و PTK در ژن HC-Pro و NAG در ژن CP که برای انتقال ویروس توسط شته‌ها حیاتی هستند، نشان می‌دهد که شته‌ها احتمالاً ناقل طبیعی SYMV می‌باشند (Plisson et al., 2003; Wylie et al., 2002).

مطالعات تجربی نشان داده‌اند که این ویروس از طریق مایه‌زنی شیره آلوده به گیاه *Chenopodium quinoa* منتقل می‌شود و قادر است علائم موزاییکی و زردی مشخصی ایجاد کند. علاوه بر این، نتایج مطالعه طاووسی و همکاران نشان داد که حدود ۴۷٪ از نمونه‌های بررسی‌شده دارای آلودگی مخلوط ناشی از (*Saffron yellow mosaic virus*, SYMV) همراه با (*Turnip mosaic virus*, TuMV) و (*Saffron latent virus*, SaLV) بودند. این یافته‌ها بیانگر پیچیدگی بالای الگوهای آلودگی ویروسی در مزارع زعفران ایران است (Tavoosi et al., 2023). این آلودگی‌های مختلط نه تنها شدت علائم را تغییر می‌دهند، بلکه ممکن است الگوی انتقال توسط شته‌ها و حتی نرخ بازترکیب ژنتیکی را نیز تحت تأثیر قرار دهند (Mascia & Gallitelli, 2016).

با توجه به نقش کلیدی SYMV در کاهش عملکرد و کیفیت زعفران، شناسایی دقیق آن به عنوان گونه‌ای نوظهور از پوتی‌ویروس‌ها اهمیت زیادی دارد. ویروس‌های جدید می‌توانند از طریق بنه‌های آلوده در بین مزارع گسترش یابند و در غیاب برنامه‌های غربالگری، موجب اپیدمی‌های گسترده شوند (Tavoosi & Hosseini, 2022). از این رو، پایش منظم مزارع با استفاده از فناوری‌های توالی‌یابی پیشرفته، توسعه کیت‌های تشخیص مولکولی اختصاصی و کنترل ناقلین حشرات از جمله شته‌ها برای مدیریت مؤثر این ویروس ضروری است (Coetzee et al., 2010; Roossinck et al., 2015).

جدول ۱. فهرست نمونه‌های جمع‌آوری شده در سال ۱۴۰۳ از ایران.

Table 1. List of samples collected in Iran during 2022 and 2024.

Province	City and number (2024)
Razavi Khorasan	Torbat Heydarie: n=10
South khorasan	Ferdows: n=10
	Ghaen: n=19
	Birjand: n=12

شناسایی ویروس با روش VANA

برای بررسی آلودگی‌های ویروسی، ابتدا از روش VANA مبتنی بر توالی‌یابی ۴۵۴ پیروسکوئنسینگ (VANA-based 454) (pyrosequencing) استفاده شد. این روش تمام اسیدهای نوکلئیک پوشش‌دار شده (ویرون‌ها) را جداسازی می‌کند (Palanga et al., 2016). استخراج اسید نوکلئیک وابسته به ویرون در تمام نمونه‌های برداشت‌شده انجام شد.

واکنش تکثیر قطعات با استفاده از Large (Klenow) Fragment DNA Polymerase (ساخت شرکت Promega) انجام شد. محصولات DNA حاصل از ۵۱ نمونه زعفران با یکدیگر ترکیب و با استفاده از Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) خالص‌سازی شدند. توالی‌یابی این محصولات با روش ۴۵۴ پیروسکوئنسینگ و با استفاده از GS FLX Titanium reagents (Beckman Coulter Cogenics) انجام گرفت. خوانش‌های حاصل بر اساس شناسه‌های چندگانه (MID) تفکیک و پردازش شدند. خوانش‌های با کیفیت پایین با استفاده از نرم‌افزار Cutadapt حذف شدند و سپس با نرم‌افزارهای BLASTN و BLASTX با توالی‌های موجود در بانک ژن (GenBank) مقایسه شدند. چارچوب‌های خوانش باز (ORF) نیز با استفاده از ORF Finder در NCBI شناسایی گردید.

وقوع ویروس‌ها و استخراج اسید نوکلئیک و واکنش RT-PCR

وقوع یک گروه ویروسی بر اساس تعداد گیاهان زعفران (از ۵۱ نمونه) تعریف شد که حداقل یک خوانش VANA با شباهت بالا ($e\text{-value} < 10^{-5}$)

0.001) به آن گروه ویروسی داشتند. نمونه‌هایی که با روش VANA پردازش و ردیابی شده بودند، با آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند تا حضور ویروس موزاییک زرد زعفران (*Saffron yellow mosaic virus*, SYMV) تأیید و تجزیه و تحلیل شود.

RNA کل از حدود ۳۵ تا ۴۰ میلی‌گرم از برگ‌های خشک‌شده با کلرید کلسیم، با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®, Germany) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. به‌منظور تأیید حضور ویروس‌های شناسایی‌شده در مرحله غربالگری متاژنومیک، واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی Oligo1N/Oligo2N که به‌طور اختصاصی برای اعضای جنس *Potyvirus* طراحی شده‌اند، انجام گرفت. نتایج RT-PCR نشان داد که این ویروس در چهار نمونه مربوط به شهرستان‌های قائن، فردوس، تربت حیدریه و بیرجند شناسایی شد. در ادامه، از یکی از نمونه‌های آلوده مربوط به شهرستان فردوس، ژنوم کامل ویروس موزاییک زرد زعفران (SYMV) با استفاده از روش گزارش‌شده توسط طاووسی و همکاران (Tavoosi et al., 2023) تکثیر و تعیین توالی گردید.

توالی‌یابی و تحلیل توالی‌ها

برای تعیین توالی ژنوم جدایه فردوس، ابتدا قطعات ژنومی همپوشان (overlapping fragments) به روش Palanga و همکاران (Palanga et al., 2016) تکثیر و کلون شدند. سپس جهت اطمینان از صحت توالی، نواحی مربوط به ژن‌های HC-Pro، CI، Nla-Vpg، Nla-Pro، Nla و CP با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده بر اساس روش طاووسی و

همکاران (Tavoosi et al., 2023) مجدداً تکثیر شده و در پلاسمید pGEM®-T کلون گردیدند. تعیین توالی این کلون‌ها با روش سانگر (Sanger sequencing) انجام شد. توالی‌های حاصل با نرم‌افزار DNAMAN مونتاژ و با استفاده از BLASTN و BLASTX جستجو شدند. هم‌ترازی توالی‌ها با MUSCLE 3.7 انجام گرفت. نهایتاً توالی‌های به‌دست‌آمده از دو روش مذکور با نرم‌افزار Geneious مقایسه و توالی کامل و صحیح ژنوم ویروس تعیین گردید.

تحلیل تبارزایی

تحلیل تبارزایی برای تعیین جایگاه تاکسونومیک ویروس انجام شد. درخت تبارزایی با روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) در نرم‌افزار MEGA X ساخته شد و ۱۰۰۰ تکرار بوت‌استرپ (bootstrap) برای اعتبارسنجی شاخه‌ها انجام گردید. شواهد بازترکیب با نرم‌افزار RDP v4.13 بررسی شد؛ سیگنال‌های بازترکیب زمانی معتبر شناخته شدند که حداقل با چهار روش و با سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ شناسایی می‌شدند و والدین فرضی در خوشه‌های فیلوژنتیک مجزایی قرار می‌گرفتند.

نتایج

نتایج VANA و شناسایی ویروس

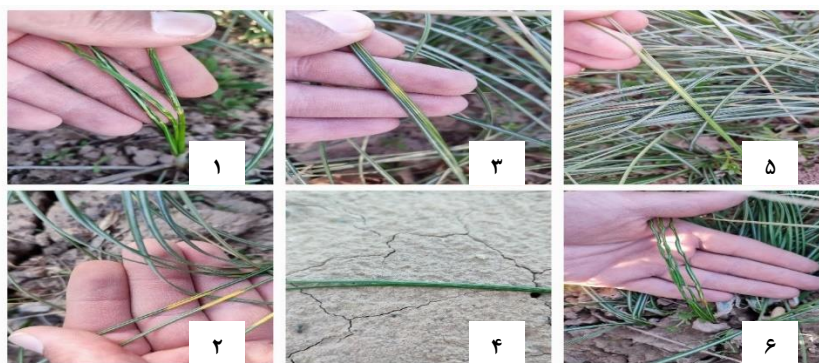
در رویکرد متاژنومیک مبتنی بر (Virion-Associated Nucleic Acid sequencing, VANA)، خوانش‌های با کیفیت بالا پس از حذف داده‌های تکراری، کوتاه و کم‌کیفیت با استفاده از نرم‌افزار Cutadapt و مونتاژ با برنامه CAP3 به‌دست آمدند. نتایج حاصل از تحلیل متاژنومیک نشان داد که نمونه‌های تصادفی زعفران جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف خراسان جنوبی و رضوی به ویروس موزاییک زرد زعفران (*Saffron yellow mosaic virus*, SYMV) آلوده بودند.

بر اساس نتایج جستجوهای BLASTN و BLASTX، توالی‌های به‌دست‌آمده بیشترین شباهت را با *Saffron yellow mosaic virus* (SYMV) نشان دادند، ویروسی که نخستین‌بار توسط طاووسی و همکاران (Tavoosi et al., 2023) از زعفران ایران گزارش شده بود. در این میان، توالی ژنومی جدایه فردوس با شماره دسترسی PZ048999 که از شهرستان فردوس در استان خراسان جنوبی به دست آمده بود، بالاترین میزان شباهت نوکلئوتیدی (در بازه ۹۷ تا ۱۰۰٪) را با جدایه مرجع SYMV با شماره دسترسی OK632024 داشت. این داده‌ها نشان می‌دهد که SYMV به‌عنوان یک گونه ویروسی جدید از جنس *Potyvirus* در مناطق زعفران‌خیز شرق ایران حضور دارد.

علائم‌شناسی گیاهان زعفران جمع‌آوری‌شده در خراسان رضوی و

جنوبی

گیاهان زعفران نمونه‌برداری‌شده از مزارع استان خراسان رضوی و جنوبی، طیفی از علائم ویروسی را نشان دادند که شامل موزاییک خفیف، زردی، کوتولگی زرد، زردی موزاییکی، موزاییک آشکار و همچنین گیاهان بدون علامت بود (شکل ۱). با این حال، از آنجا که بیشتر گیاهان زعفران آلوده به ویروس‌های جدید، به‌طور هم‌زمان به گونه‌هایی از جنس *Potyvirus* نیز آلوده بودند، امکان نسبت دادن علائم خاص به ویروس‌های منفرد وجود نداشت. به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فشار ویروسی بر جمعیت گیاهان زعفران در ایران نسبتاً بالا است. افزون بر این، وجود توالی‌های مرتبط با ویروس تازه ردیابی‌شده در این پژوهش بیانگر آن است که این توالی‌ها احتمالاً متعلق به ویروس فعالی می‌باشد که می‌تواند به‌طور بالقوه اثرات منفی بر رشد و عملکرد زعفران داشته باشد.



شکل ۱. علائم مشاهده شده در بوته های زعفران آلوده به ویروس موزاییک زرد زعفران (SYMV) در استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی. آلودگی در این نمونه ها از طریق آزمون RT-PCR و تعیین توالی به اثبات رسیده است. نمونه‌های شماره ۱ و ۶ شامل علائم بدشکلی و پیچیدگی برگ‌ها و نمونه‌های شماره ۲، ۳، ۴ و ۵ شامل علائم زردی برگ‌ها موزاییک و لکه‌های روشن و تیره روی برگ‌ها می‌باشند.

Figure 1. Symptoms of the Iranian isolate of saffron yellow mosaic virus (SYMV) in saffron fields of Razavi and South Khorasan provinces.

Infection in these samples was confirmed by RT-PCR and sequencing analysis. Samples No. 1 and 6 exhibited leaf deformation and twisting symptoms, while samples No. 2, 3, 4, and 5 showed leaf yellowing, mosaic patterns, and light and dark mottling on the leaves.

RT-PCR نتایج

به منظور تأیید حضور ویروس‌های شناسایی شده در مرحله غربالگری متاژنومیک، واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی Oligo1N/Oligo2N، ویژه اعضای جنس *Potyvirus*، انجام شد. محصولات RT-PCR پس از خالص سازی، توالی یابی و سپس با استفاده از ابزار BLASTN مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج تحلیل توالی نشان داد که توالی‌های حاصل دارای بیشترین شباهت نوکلئوتیدی (در بازه ۹۷ تا ۱۰۰٪) با ویروس *Saffron yellow mosaic virus (SYMV)* ثبت شده در پایگاه GenBank با شماره دسترسی OK632024 هستند (Tavoosi et al., 2023). این نتایج حضور SYMV را در چهار منطقه قائن، فردوس، بیرجند و تربت حیدریه تأیید کرد.

نتایج RT-PCR

CP و Nib، Nla-Pro، Nla-Vpg از ژنوم این پوتی ویروس با استفاده از RT-PCR تکثیر و با روش سنگر تعیین توالی شدند. توالی‌های حاصل از روش سنگر و داده‌های به دست آمده از پلتفرم Illumina بیش از ۹۹٪ شباهت داشتند که نشان دهنده صحت و دقت بالای توالی‌های ویروسی به دست آمده بود.

تجزیه و تحلیل تبارزایی

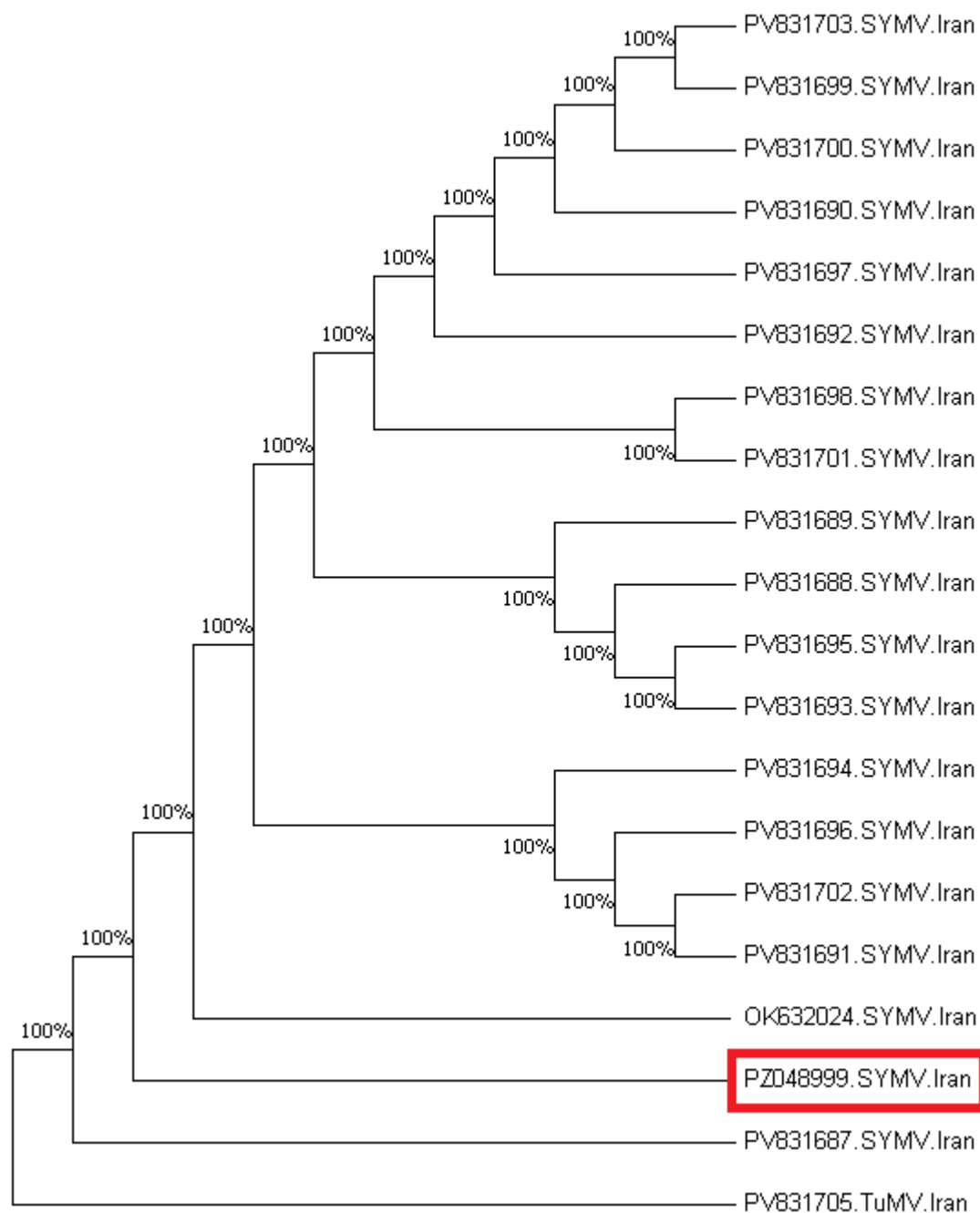
به منظور تعیین جایگاه تبارزایی جدایه‌های ایرانی ویروس موزاییک زرد زعفران (SYMV)، درخت تبارزایی بر اساس توالی کامل ژنوم با روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) در نرم افزار MEGA X رسم شد و اعتبار شاخه‌ها با ۱۰۰۰ تکرار بوت‌استرپ (bootstrap) ارزیابی گردید (شکل ۲). مشخصات ۲۰ جدایه مورد بررسی در این تحلیل، شامل جدایه ایرانی این مطالعه (Ir-Ferdows) و ۱۹ جدایه دیگر از ژن بانک، در جدول ۲ ارائه شده است.

در درخت حاصل، تمامی جدایه‌های ایرانی SYMV در یک خوشه مترام و مجزا با حمایت بوت‌استرپ ۱۰۰٪ قرار گرفتند. این خوشه به ترتیب شامل جدایه‌های PV831703، PV831699، PV831700، PV831690،

در این نمونه‌ها، علائم ظاهری شامل زردی، کوتولگی و موزاییک برگ‌ها مشاهده گردید که با نتایج مولکولی هم‌خوانی داشت. در ادامه، توالی کامل ژنوم جدایه فردوس (PZ048999) به طول ۸۵۴۷ جفت‌باز با روش RT-PCR تعیین توالی گردید. برای تأیید نتایج، نواحی هم‌پوشان ژن‌های CI، HC-Pro،

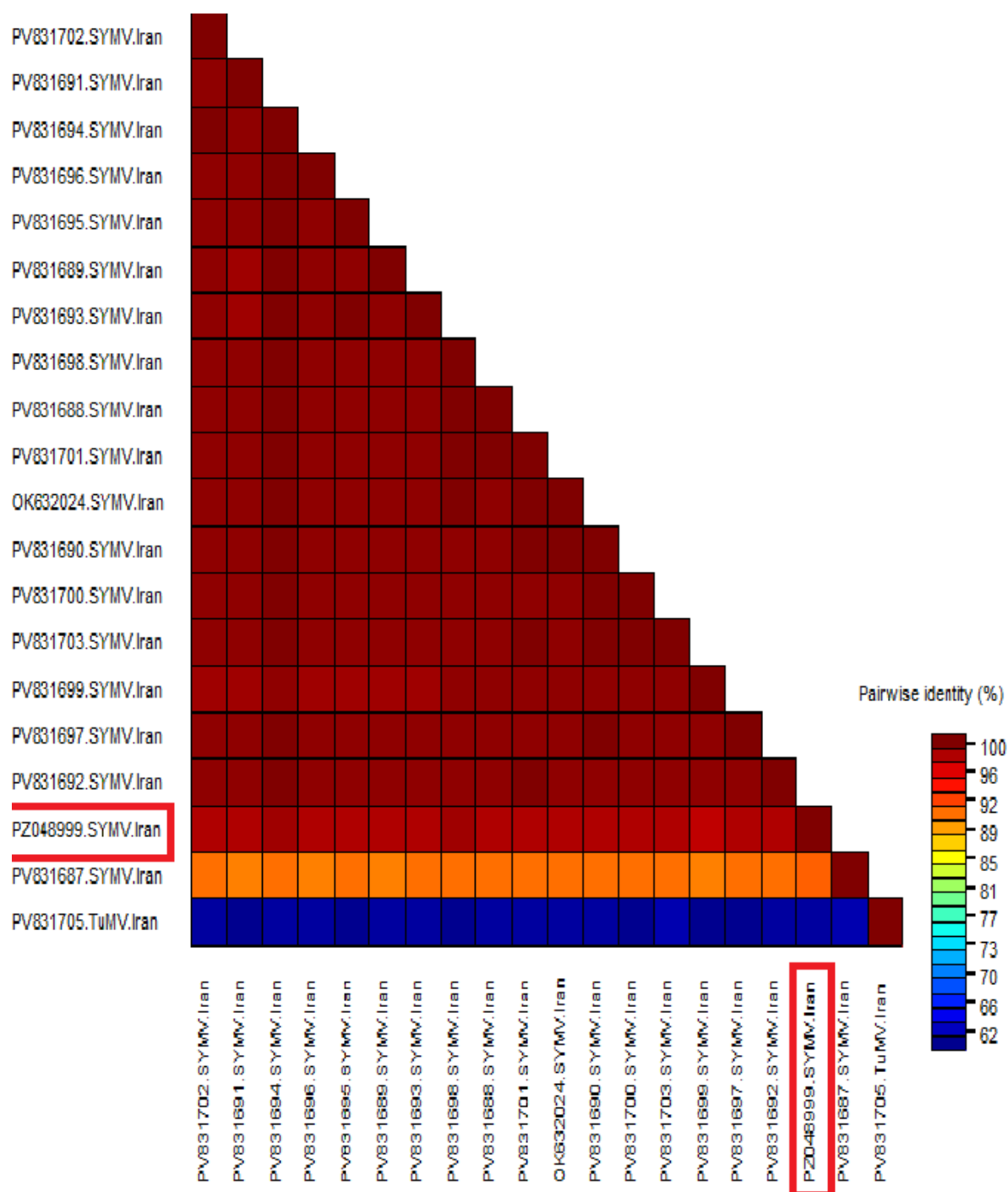
در این نمونه‌ها، علائم ظاهری شامل زردی، کوتولگی و موزاییک برگ‌ها مشاهده گردید که با نتایج مولکولی هم‌خوانی داشت. در ادامه، توالی کامل ژنوم جدایه فردوس (PZ048999) به طول ۸۵۴۷ جفت‌باز با روش RT-PCR تعیین توالی گردید. برای تأیید نتایج، نواحی هم‌پوشان ژن‌های CI، HC-Pro،

- PV831697, PV831692, PV831698, PV831701, PV831689, بر اساس داده‌های ماتریس، جدایه‌های PV831792, PV831691, PV831688, PV831695, PV831693, PV831694, PV831696, PV831689, PV831695, PV831694, PV831693, PV831696, PV831702, PV831691, OK632024 (جدایه مرجع)، PZ048999 (جدایه به‌دست‌آمده از فردوس) و PV831687 می‌باشد (جدول ۲). طول کوتاه شاخه‌های درون این خوشه، بیانگر شباهت ژنتیکی بسیار زیاد و تنوع اندک میان جدایه‌های ایرانی است که نشان‌دهنده ثبات بالای ژنوم SYMV در جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد.
- همچنین، جدایه PV831705 مربوط به ویروس موزائیک شلغم (Turnip mosaic virus, TuMV) با طول ژنوم ۹۶۴۴ جفت‌باز (جدول ۲) به عنوان برون‌گروه (outgroup) در درخت تبارزایی قرار گرفت. فاصله تکاملی قابل توجه این جدایه از خوشه SYMV، تمایز کامل این دو گونه را تأیید می‌کند و صحت گروه‌بندی انجام‌شده را نشان می‌دهد.
- به طور کلی، قرارگیری تمامی جدایه‌های ایرانی در یک خوشه واحد فشرده با حمایت آماری کامل، همراه با کوتاهی شاخه‌های درون‌خوشه‌ای، مؤید آن است که جمعیت SYMV در شرق ایران از یک منشأ مشترک بوده و تاکنون تنوع ژنتیکی قابل توجهی در این جمعیت ایجاد نشده است. این یافته‌ها برای نخستین‌بار حضور قطعی این ویروس را در استان خراسان جنوبی تأیید می‌کند، هرچند که ویروس در هر دو استان خراسان رضوی و خراسان جنوبی ردیابی شده است.
- نتایج حاصل از ماتریس مقایسه زوجی توالی نوکلئوتیدی ژنوم کامل (شکل ۳) نشان داد که تمامی جدایه‌های ایرانی SYMV (مشخصات آن‌ها در جدول ۲ آمده است) دارای شباهت درون‌گروهی بین ۹۷ تا ۱۰۰ درصد هستند. این میزان شباهت بالا، حاکی از تنوع ژنتیکی بسیار ناچیز در میان جدایه‌های جمعیت SYMV در مناطق مورد مطالعه می‌باشد.
- بر اساس داده‌های ماتریس، جدایه‌های PV831792, PV831691, PV831694, PV831695, PV831696, PV831689, PV831695, PV831694, PV831693, PV831696, PV831702, PV831691, OK632024 (جدایه مرجع)، PV831687 و PV831692, PV831699, PV831703, PV831700 (همگی با مشخصات کامل در جدول ۲ ثبت شده‌اند) در دامنه شباهت ۹۷ تا ۱۰۰ درصد با یکدیگر قرار دارند که تأییدکننده هویت ژنتیکی یکسان آن‌هاست. این نتایج با آرایش تبارزایی این جدایه‌ها در یک خوشه فشرده با حمایت بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد (شکل ۲) کاملاً همخوانی دارد.
- در مقایسه با برون‌گروه، جدایه PV831705 مربوط به ویروس موزائیک شلغم (Turnip mosaic virus, TuMV) (جدول ۲) شباهت نوکلئوتیدی قابل توجهی با جدایه‌های SYMV نشان نداد و به‌وضوح در خوشه‌ای جداگانه قرار گرفت که تمایز کامل این دو گونه را تأیید می‌کند.
- نکته قابل توجه اینکه، علیرغم پراکندگی جغرافیایی نمونه‌ها در استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی (و همچنین یک جدایه از افغانستان؛ جدول ۲)، تمامی جدایه‌های ایرانی SYMV در یک خوشه ژنتیکی متراکم با دامنه شباهت ۹۷ تا ۱۰۰ درصد جای گرفته‌اند. این امر بیانگر ثبات ژنتیکی بسیار بالای جمعیت SYMV در شرق ایران و احتمالاً منشأ مشترک و استقرار نسبتاً اخیر این ویروس در منطقه است.
- به‌طور کلی، یافته‌های حاصل از ماتریس شباهت نوکلئوتیدی، همراه با نتایج درخت تبارزایی، هویت مستقل و متمایز SYMV را به‌عنوان گونه‌ای جدید از جنس Potyvirus به‌وضوح تأیید می‌کند. همچنین این نتایج برای نخستین‌بار حضور قطعی و گسترده این ویروس را در مزارع زعفران استان خراسان جنوبی اثبات می‌نماید.



شکل ۲. درخت تبارزایی رسم شده بر اساس توالی کامل نوکلئوتیدی جدایه ایرانی شناسایی شده در این مطالعه با ۱۹ جدایه ثبت شده در GenBank با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی (ML) برای محاسبه Bootstrap از ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. ویروس *Turnip mosaic virus* از جنس پوتی ویروس به عنوان outgroup انتخاب گردید.

Figure 2. Phylogenetic tree constructed based on the complete nucleotide sequence of the Iranian isolate identified in this study along with 19 isolates registered in GenBank, using the Maximum Likelihood (ML) method. Bootstrap analysis was performed with 1000 replicates. *Turnip mosaic virus* in potyvirus genus is selected as outgroup.



شکل ۳. ماتریس مقایسه زوجی توالی نوکلئوتیدی ژنوم کامل جدایه ایرانی با ۱۹ جدایه انتخاب شده از GenBank با استفاده از نرم افزار SDT v1.2.

Figure 3. Pairwise nucleotide sequence comparison matrix of the complete genome of the Iranian isolate with 19 selected isolates from GenBank, using SDT v1.2 software.

جدول ۲. مشخصات جدایه‌ی ایرانی SYMV، توالی یابی شده در این تحقیق و ۱۹ جدایه منتخب SYMV از ژن‌بانک (NCBI)، جهت مقایسه ترادف

نوکلئوتیدی ژن و انجام آنالیزهای تبارزایی

Table 2. Characteristics of Iranian SYMV isolate identified in this research and 19 selected SYMV isolates from the World Gene Bank, in order to compare the nucleotide synonyms of the gene and perform genealogy analysis

host	Accession number	Isolate length	Country	Isolate name
Crocus sativus	PV831694	9410 bp	Iran	IR:R-Kho:Saf13:22
Crocus sativus	PV831698	9640 bp	Iran	IR:Yaz:Saf17:22
Crocus sativus	PV831701	9489 bp	Iran	IR:Sem:Saf20:22
Crocus sativus	PV831690	9526 bp	Iran	IR:Far:Saf8:22
Crocus sativus	PV831696	9540 bp	Iran	IR:S-Kho:Saf15:22
Crocus sativus	OK632024	9557 bp	Iran	IR
Crocus sativus	PV831695	9477 bp	Iran	IR:S-Kho:Saf14:22
Crocus sativus	PV831688	9596 bp	Iran	IR:E-Aze:Saf1:22
Crocus sativus	PV831697	9505 bp	Iran	IR:Ker:Saf16:22
Crocus sativus	PV831692	9415 bp	Iran	IR:Ker:Saf11:22
Crocus sativus	PV831693	9505 bp	Iran	IR:R-Kho:Saf12:22
Crocus sativus	PV831702	9326 bp	Iran	IR:Qom:Saf2:22
Crocus sativus	PV831700	9566 bp	Iran	IR:Ker:Saf19:22
Crocus sativus	PV831703	8931 bp	Iran	IR:Isf:Saf7:22
Crocus sativus	PV831689	9578 bp	Iran	IR:Yaz:Saf3:22
Crocus sativus	PV831691	9530 bp	Iran	IR:R-Kho:Saf10:22
Crocus sativus	PV831699	9618 bp	Iran	IR:S-Kho:Saf18:22
Crocus sativus	PV831687	9526 bp	Afghanistan	Af:Bam:Saf9:22
Crocus sativus	PV831705	9644 bp	Iran	IR:Isf:Saf7:22
Crocus sativus	PZ048999	8547 bp	Iran	Ir-Ferdows

بحث

یکی از مهم‌ترین یافته‌های این پژوهش، ثبات ژنتیکی بالای جمعیت SYMV در شرق ایران است. تمامی ۱۷ جدایه جدید این مطالعه (PV831687 تا PV831703) همراه با جدایه فردوس (PZ048999) و جدایه مرجع (OK632024)، در یک خوشه تبارزایی متراکم قرار گرفتند و شباهت نوکلئوتیدی ۹۷ تا ۱۰۰ درصدی با یکدیگر نشان دادند. این سطح از شباهت، که فراتر از آستانه تفکیک گونه‌ای در پوتی‌ویروس‌ها است، بیانگر آن است که جمعیت SYMV در ایران احتمالاً منشأ مشترکی داشته و به‌تازگی در حال گسترش در این مناطق است. عدم وجود تنوع ژنتیکی قابل‌توجه در میان جدایه‌های جغرافیایی متفاوت، می‌تواند به معرفی اخیر ویروس و انتقال سریع آن از طریق بنه‌های آلوده مرتبط باشد.

تحلیل تبارزایی (شکل ۲) نشان داد که تمامی جدایه‌های ایرانی SYMV

در یک خوشه فشرده و مجزا با حمایت بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد قرار دارند،

ویروس موزاییک زرد زعفران (*Saffron yellow mosaic virus*،

SYMV) به‌عنوان یکی از جدیدترین گونه‌های شناسایی‌شده از جنس

Potyvirus، اخیراً از مزارع زعفران ایران گزارش شده است (Tavoosi et

al., 2023). در مطالعه حاضر، با استفاده از رویکرد متاژنومیک مبتنی بر

VANA و تأیید با RT-PCR، حضور این ویروس در ۵۱ نمونه جمع‌آوری‌شده

از استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این پژوهش، حضور گسترده SYMV را در هر چهار منطقه

نمونه‌برداری‌شده (قائن، فردوس، بیرجند و تربت حیدریه) تأیید کرد و برای

نخستین‌بار حضور قطعی این ویروس را در استان خراسان جنوبی به اثبات

رساند.

یافته‌های این مطالعه پیامدهای مهمی برای مدیریت بیماری‌های ویروسی زعفران دارد. با توجه به شیوع بالای SYMV در مزارع خراسان جنوبی و رضوی که قطب اصلی تولید زعفران ایران محسوب می‌شوند، اجرای راهبردهای مدیریتی زیر ضروری است: (۱) تولید بنه‌های عاری از ویروس از طریق کشت بافت، (۲) پایش منظم مزارع با روش‌های مولکولی حساس، (۳) مدیریت ناقلین شته، (۴) اعمال مقررات قرنطینه‌ای برای جلوگیری از جابجایی بنه‌های آلوده، و (۵) آموزش کشاورزان در مورد اهمیت بیماری‌های ویروسی. در مجموع، این مطالعه نخستین گزارش جامع از حضور و پراکنش SYMV در استان خراسان جنوبی و تأیید حضور آن در خراسان رضوی است. ثبات ژنتیکی بالای جمعیت SYMV در ایران، همراه با پراکنش جغرافیایی وسیع آن، نشان‌دهنده استقرار موفق این ویروس در مزارع زعفران کشور و پتانسیل بالای آن برای ایجاد خسارت اقتصادی قابل توجه است. نتایج این مطالعه، چارچوبی علمی برای طراحی و اجرای برنامه‌های مدیریت مؤثر بیماری‌های ویروسی این محصول راهبردی ارائه می‌کند.

تعارض منافع

در انجام مطالعه حاضر، هیچ گونه تضاد منافع وجود ندارد.

موازین اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازین و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات سیراد فرانسه (CI RAD, France) به دلیل تأمین بودجه و امکانات لازم برای انجام این طرح تحقیقاتی بین‌المللی و نیز همکاری‌های علمی ارزشمند در طول اجرای پروژه، صمیمانه قدردانی می‌گردد. همچنین از دانشگاه بیرجند و تمامی همکاران و کارشناسان آزمایشگاه ویروس‌شناسی که در مراحل مختلف نمونه‌برداری، آزمایش‌های

در حالی که جدایه مربوط به ویروس موزاییک شلغم (Turnip mosaic virus, TuMV) با شماره دسترسی PV831705 به عنوان برون‌گروه، در فاصله تکاملی قابل توجهی از این خوشه جای گرفته است. نتایج ماتریس مقایسه زوجی توالی نوکلئوتیدی (شکل ۳) نیز عدم شباهت قابل توجه بین جدایه‌های SYMV و TuMV را تأیید کرد. این یافته‌ها، همراه با دامنه شباهت ۹۷ تا ۱۰۰ درصد در میان جدایه‌های ایرانی SYMV، هویت مستقل و متمایز این ویروس را به عنوان گونه‌ای جدید از جنس Potyvirus تأیید می‌کند. وجود موتیف‌های حفاظت‌شده RITC و PTK در پروتئین HC-Pro و موتیف NAG در پروتئین پوششی در ژنوم SYMV نشان می‌دهد که این ویروس قابلیت انتقال توسط شته‌ها را به صورت غیرمستمر دارا می‌باشد. این ویژگی، همراه با دامنه میزبانی وسیع شته‌های ناقل، می‌تواند یکی از عوامل اصلی گسترش سریع SYMV در مزارع زعفران باشد. بنابراین، مدیریت ناقلین از طریق پایش جمعیت شته‌ها و استفاده از روش‌های کنترل تلفیقی، باید به عنوان بخشی از راهبرد مدیریت بیماری در نظر گرفته شود.

علائم مشاهده‌شده در نمونه‌های آلوده به SYMV طیفی از موزاییک خفیف تا زردی شدید و پیچیدگی برگ‌ها را شامل می‌شد. با این حال، به دلیل حضور احتمالی آلودگی‌های مخلوط و همچنین تأثیر عوامل محیطی، نمی‌توان علائم خاصی را به طور انحصاری به SYMV نسبت داد. این موضوع بر اهمیت روش‌های مولکولی دقیق مانند RT-PCR و متاژنومیک در تشخیص ویروس‌ها تأکید می‌کند.

استفاده از روش VANA همراه با توالی‌یابی نسل جدید در این مطالعه، امکان شناسایی همزمان طیف وسیعی از ویروس‌ها را بدون نیاز به دانش قبلی فراهم کرد. این رویکرد به‌ویژه برای شناسایی ویروس‌های نوظهور مانند SYMV که تا پیش از این ناشناخته بودند، بسیار کارآمد است و می‌تواند در پایش‌های ملی ویروس‌های زعفران مورد استفاده قرار گیرد.

مولکولی و تحلیل داده‌ها یاری رساندند، سپاسگزاری می‌شود. این مقاله در

نتیجه طرح تحقیقاتی مشترک بین مرکز تحقیقات کشاورزی فرانسه و دانشگاه

بیرجند صورت گرفته است.

References

- Bazoobandi, M., Rahimi, H., & Karimi-Shahri, M. R. (2020). Saffron crop protection. In *Saffron* (pp. 169-185). Elsevier. [Link]
- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., & Burger, J. T. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400(2), 157-163. [Link]
- Czotter, N., Molnár, J., Szabó, E., Demian, E., Kontra, L., Baksa, I., Szittyá, G., Kocsis, L., Deák, T., Bisztray, G., Tusnády, G. E., Burgyán, J., & Varallyay, E. (2018). NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 9, 122. [Link]
- Fernández, J. A. (2004). Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Research in Developmental Plant Science*, 2, 127-159.
- Gaafar, Y. Z. A., & Ziebell, H. (2020). Comparative study on three viral enrichment approaches based on RNA extraction for plant virus/viroid detection using high-throughput sequencing. *PloS one*, 15(8), e0237951. [Link]
- Jones, R. A. C., & Naidu, R. A. (2019). Global dimensions of plant virus diseases: Current status and future perspectives. *Annual Review of Virology*, 6(1), 387-409. [Link]
- Mascia, T., & Gallitelli, D. (2016). Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Science*, 252, 176-192. [Link]
- Miglino, R., Jodłowska, A., & Van Schadewijk, A. R. (2005). First report of Narcissus mosaic virus infecting Crocus spp. cultivars in the Netherlands. *Plant Disease*, 89, 342. [Link]
- Palanga, E., Filloux, D., Martin, D. P., Fernandez, E., Gargani, D., Ferdinand, R., Zabré, J., Bouda, Z., Neya, J. B., Sawadogo, M., Traore, O., Peterschmitt, M., & Roumagnac, P. (2016). Metagenomic-based screening and molecular characterization of cowpea-infecting viruses in Burkina Faso. *PloS one*, 11(10), e0165188. [Link]
- Parizad, S., Dizadji, A., Koohi Habibi, M., Winter, S., Kalantari, S., Garcia-Arenal, F., & Ayllon, M. A. (2017). Prevalence of saffron latent virus (SaLV), a new Potyvirus species, in saffron fields of Iran. *Journal of Plant Pathology*, 99. [Link]
- Parizad, S., Dizadji, A., Koohi Habibi, M., Winter, S., Kalantari, S., Movi, S., García-Arenal, F., & Ayllon, M. A. (2018). Description and genetic variation of a distinct species of Potyvirus infecting saffron (*Crocus sativus* L.) plants in major production regions in Iran. *Annals of Applied Biology*, 173, 233-242. [Link]
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D., & Bron, P. (2003). Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 23753-23761. [Link]
- Renau-Morata, B., Moyá, L., Nebauer, S. G., Seguí-Simarro, J. M., Parra-Vega, V., Gómez, M. D., & Molina, R. V. (2013). The use of corms produced under storage at low temperatures as a source of explants for the in vitro propagation of saffron reduces contamination levels and increases multiplication rates. *Industrial Crops and Products*, 46, 97-104. [Link]
- Revers, F., & García, J. A. (2015). Molecular biology of potyviruses. *Advances in Virus Research*, 92, 101-199. [Link]
- Roossinck, M. J., Martin, D. P., & Roumagnac, P. (2015). Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery. *Phytopathology*, 105, 716-727. [Link]
- Russo, M., Martelli, G., Cresti, M., & Ciampolini, F. (1979). Bean yellow mosaic virus in saffron / Il virus del mosaico giallo del fagiolo in zafferano. *Phytopathologia Mediterranea*, 189-191.
- Samuitienė, M., & Navalinskienė, M. (2008). Occurrence of CMV in ornamental plants in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture*, 95, 135-143.
- Shahnoushi, N., Abolhassani, L., Kavakebi, V., Reed, M., & Saghaian, S. (2020). Economic analysis of saffron production. In *Saffron* (pp. 337-356). Elsevier. [Link]
- Tavoosi, M., & Hosseini, S. A. (2022). Molecular detection and investigation of Iris severe mosaic virus in saffron fields of Razavi and South Khorasan. *Journal of Saffron Research*, 9, 323-334. [Link]
- Tavoosi, M., Moradi, Z., & Mehrvar, M. (2023). Virome analysis of potyvirus populations infecting saffron in Iran: the discovery of a novel potyvirus. *European Journal of Plant Pathology*. [Link]
- Valouzi, H., Dizadji, A., Golnaraghi, A., Salami, S., Selmi, I., Fontdevila Pareta, N., Önder, S., & Massart, S. (2025). First detection of saffron dwarf virus, wheat dwarf virus, wheat dwarf virus-associated alphasatellite and a new putative potyvirus species in saffron in Iran. *New Disease Reports*, 51, 70022. [Link]
- Wylie, S. J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., Lopez-Moya, J. J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., Wang, A., & Zerbini, F. M. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *Journal of General Virology*, 98, 352-354. [Link]
- Wylie, S. J., Kueh, J., Welsh, B., Smith, L. J., Jones, M. G. K., & Jones, R. A. C. (2002). A non-aphid-transmissible isolate of bean yellow mosaic potyvirus has an altered NAG motif in its coat protein. *Archives of Virology*, 147(9), 1813-1820. [Link]
- Zheng, H. Y., Wu, X. Y., Han, K. L., Chen, Z. Q., Song, X. J., Peng, J. J., Lu, Y. W., Lin, L., Chen, J. P., & Yan, F. (2018). First report of Beet western yellows virus infecting *Crocus sativus* in China. *Plant Disease*, 102, 1471. [Link]