

مقایسه فیلوژنتیکی جدایه ایرانی ویروس خراشک حلقوی میخک با جدایه‌های دنیا بر اساس ترادف ژن پروتئین پوششی و ژن پروتئین حرکتی

مهناز آشنایی^{*۱} - بهروز جعفرپور^۲ - سعید ملک زاده سفارودی^۳ - زینب حیدری نیا^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۰۷

چکیده

ویروس خراشک حلقوی میخک (*Carnation etched ring virus, CERV*)، عضو جنس *Caulimovirus* و خانواده *Caulimoviridae* است. این ویروس به عنوان دومین ویروس میخک از نظر پراکنش در دنیا و تنها ویروس DNA دار گزارش شده از آن می‌باشد. بوته‌های آلوده به این ویروس از گلخانه چناران جمع‌آوری و با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای نواحی حفاظت شده از ژن پروتئین پوششی و ژن پروتئین حرکتی ویروس، به ترتیب قطعاتی در اندازه تقریبی ۱۵۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز تکثیر گردید. این جدایه به همراه دو جدایه موجود از این ویروس (هند و هلند) و نیز تعدادی از دیگر ترادف‌های کائولیموویروس‌ها در بانک ژن مقایسه و پس از هم‌ردیف‌سازی چندگانه درخت فیلوژنتیکی آن‌ها برای ژن پروتئین پوششی و ژن پروتئین حرکتی *CERV* با روش Neighbor joining و با استفاده از نرم افزار DNAMAN و MEGA5 ترسیم گردید. این آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که در مورد ژن پروتئین پوششی شباهت جدایه ایرانی در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب با جدایه هلند ۹۸/۹ و ۹۹/۳ درصد و با جدایه هند به ترتیب ۹۸/۳ و ۹۸/۶ درصد می‌باشد. همچنین در مورد ژن پروتئین حرکتی شباهت جدایه ایرانی در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با جدایه هلند به ترتیب ۹۷/۷ و ۹۹/۶ درصد و با جدایه هند به ترتیب ۹۶/۱ و ۹۸/۹ درصد نشان داده شد. این اولین گزارش از مطالعات مولکولی درباره ویروس خراشک حلقوی میخک در ایران است.

واژه‌های کلیدی: ویروس خراشک حلقوی میخک، آنالیز فیلوژنتیکی، *Dianthus caryophyllus*

مقدمه

آلوده کننده میخک بعد از ویروس ابلقی میخک محسوب می‌شود (۱۶). *CERV* نخستین بار در سال ۱۹۶۱ توسط هولینگ و استون (۵) توصیف شد. تاکنون تنها دو گزارش از توالی نوکلئوتیدی کامل این ویروس از هلند و هند در بانک ژن به ثبت رسیده است (۱۶). اولین و تنها گزارش ویروس خراشک حلقوی میخک در ایران در سال ۱۳۸۷ توسط حسین بیات از گلخانه‌های محلات انجام گرفت (۱). دامنه میزبانی ویروس محدود به تیره *Caryophyllaceae* بوده و هم‌پوشانی با دیگر گروه‌ها ندارد (۷). شته سبز هلو (*Myzus persicae*) به طریق ناپایا یا نیمه‌پایا باعث انتقال *CERV* می‌شود (۲، ۱۱ و ۱۶). ویروس خراشک حلقوی میخک، علائم خفیفی که شامل نقاط، خطوط و حلقه‌های نکروتیک است بر روی برگ‌های میخک ایجاد می‌کند (۱۸). پیکره ویروس گرد با تقارن ۲۰ وجهی، به قطر ۴۵ نانومتر بوده و حفاظ کپسیدی ویروس در ترکیب با چندین لایه است. ژنوم کامل ویروس ۷۹۳۲ نوکلئوتید طول داشته و محتوی CG ۳۶/۴ درصد است و هفت قالب خواندنی باز را کد می‌کند (۷). ORF I وظیفه کد کردن پروتئین حرکتی را به عهده داشته (۸) و

میخک (*Dianthus caryophyllus*) یکی از مهم‌ترین گل‌های شاخه بریده و جزء پنج گل نخست در جهان محسوب شده می‌شود (۱۷). اگرچه داده‌های آماری دقیق در دست نیست، ولی تخمین زده می‌شود که در سرتاسر جهان سطح زیر کشت میخک بین ۷۰۰۰-۶۰۰۰ هکتار باشد. میخک مستعد آلودگی به ۱۱ بیماری ویروسی بوده که شش تا از آن‌ها به طور تجاری دارای اهمیت هستند (۱۳). ویروس خراشک حلقوی میخک (*Carnation etched ring virus, CERV*) عضو جنس *Caulimovirus* و خانواده *Caulimoviridae* است (۶، ۹ و ۱۲). از نظر انتشار دومین ویروس

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*)- نویسنده مسئول: (Email: m.ashnayı64@gmail.com)
۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

بهترین کیفیت DNA استخراج شده در واکنش PCR استفاده شد. جفت آغازگرهای اختصاصی CPD/ CPU و MPD/ MPU که به ترتیب مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن کدکننده پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی ویروس بوده و توسط ریخی و همکاران (۱۶) بر اساس ترادف جدایه هلندی ویروس خراشک حلقوی میخک (رس شمار 1.XO4658) طراحی شده‌اند، مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری که شامل یک میکرولیتر از DNA به غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (به غلظت ۱۰ پیکومولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، یک میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدی فسفات‌ها (dNTPs) (۱۰ میکرو مولار) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5U/ μ l) (Fermentas) بود، انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر قطعه مربوط به پروتئین پوششی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۴ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰۰ ثانیه و یک مرحله نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در مورد تکثیر قطعه مربوط به پروتئین حرکتی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به استثناء دمای اتصال که ۵۵ درجه بود، عیناً با شرایط ذکر شده انجام پذیرفت. جهت انجام الکتروفورز افقی، از ژل آگارز ۱/۷ درصد و بافر TAE 1X استفاده گردید. محصول PCR مستقیماً همراه با آغازگرهای اختصاصی ویروس برای تعیین ترادف به شرکت MacroGen (کره جنوبی) ارسال گردید.

آنالیز فیلوژنتیک

نتایج حاصل از تعیین ترادف با استفاده از نرم افزار Bio Edit مورد بررسی قرار گرفتند. پس از اخذ توالی، از هر دو خوانش رفت و برگشت مربوط به هر قطعه، توالی نهایی با برنامه BLAST^۱ در پایگاه اطلاعاتی NCBI بررسی شد. آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس ژن CP و MP پس از هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های CERV با برخی از جدایه‌های موجود در بانک ژن (جدول ۲) با استفاده از نرم‌افزار Mega5 و به روش Neighbor joining، با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شد. سپس با استفاده از نرم افزار DNAMAN درصد شباهت در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی تعیین گردید.

ORF II نیز پروتئین انتقال دهنده شته را کد می‌کند. وجود موتیف IXG (که در آن X هر اسید آمینه‌ای می‌تواند باشد) در ORF II برای برهم کنش بین فاکتور انتقال دهنده شته و پیکره‌های ویروسی ضروری است (۱۴). ORF III مسئول تولید پروتئین متصل شونده به DNA است و احتمالاً به عنوان یک کوفاکتور در انتقال شته عمل کرده و به عبارتی در برهم کنش با ORF II است. پروتئین پوششی^۱ محصولی از ORF IV بوده که با دخالت یک اسپارتیک پروتئاز تولید می‌شود، این پروتئاز از موتیف‌های یک پروتئین چند وظیفه‌ای است که توسط ORF V تولید می‌شود. بیان پروتئین پوششی توسط IV ORF، به وسیله حضور یک ناحیه متصل شونده به RNA (zinc finger motif) با آرایش $CX_2CX_4HX_4C$ ، تحریک می‌شود (۱۶) و قبل از این ناحیه نیز یک ناحیه غنی از لیزین (محتوی ۴۷ درصد لیزین و ۴۱۷-۳۶۷ آمینواسید) وجود دارد (۱۰). ORF VI در تشکیل ماتریکس پروتئینی اندامک‌های درون سلولی و تأثیر بر دامنه میزبانی و گستردگی علائم نقش دارد. ORF VI حداقل ناحیه حفاظت شده را در بین دیگر ORF ها دارد و احتمال می‌رود که میزان تنوع در جدایه‌های ویروس در ارتباط با تشکیل اندامک‌های درون سلولی باشد (۶). با توجه به این که میخک جزء مهم‌ترین گل‌های زینتی شاخه‌بریده در استان‌های خراسان رضوی و شمالی محسوب شده و تاکنون مطالعه مولکولی بر روی این ویروس در ایران صورت نگرفته است، لذا در این تحقیق جدایه ایرانی ویروس خراشک حلقوی میخک جداسازی شده از گلخانه چناران با استفاده از آنالیز مولکولی ناحیه پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی مورد بررسی قرار گرفته و جایگاه تاکسونومیک آن در میان دیگر جدایه‌های این ویروس تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

منبع جدایه CERV

جدایه CERV جدا شده از گلخانه میخک چناران، پس از تایید آلودگی در آزمون الایزا DAS-ELISA با استفاده از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای این ویروس (DSMZ, Germany) و بر اساس روش کلارک و آدامز (۳) جهت انجام آزمایش‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA و واکنش PCR

استخراج DNA کل مطابق روش ژانگ و همکاران (۱۹) انجام گرفت. غلظت DNA استخراج شده در چگالی نوری ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ (cole parmer-USA) تعیین شده و

جدول ۱- ترادف آغازگرهای اختصاصی مربوط به ویروس CERV

منبع	ترادف آغازگر (۵' - ۳')	طول قطعات (جفت باز)	جهت	آغازگر
Raikhy and et al,2006	TCCCCCGGGGAATGAATAGAGAAGCTAT	۱۵۰۰	رفت	CERV-CPU
Raikhy and et al,2006	TCCCCCGGGGATCATTCCGATTCTTCAG		برگشت	CERV-CPD
Raikhy and et al,2006	TCCCCCGGGGAATGAATTCCTCTGTTGA	۱۰۰۰	رفت	CERV-MPU
Raikhy and et al,2006	TCCCCCGGGGATCATGATATATTGTTA		برگشت	CERV-MPD

جدول ۲- رس‌شمار، اسامی استرین‌ها و ویروس‌هایی از جنس کائولیموویروس که از آنها در آنالیز فیلوژنتیک استفاده شده است.

V	i	r	u	s	Isolate, Strain	Accession No.	Region of genome
C	a	r	n	a	n	X O 4 6 5 8	Complete genome
C	a	r	n	a	n	AJ853858	Complete genome
C	a	u	l	i	f	M90542	Complete genome
C	a	u	l	i	f	AF140604	Complete genome
C	a	u	l	i	f	M90541	Complete genome
C	a	u	l	i	f	M90543	Complete genome
C	a	u	l	i	f	X79465	Complete genome
F	i	g	w	a	r	NC-003554	Complete genome
D	a	h	l	i	a	EU090955	Coat protein
D	a	h	l	i	a	EU090952	Movement protein
S	t	r	a	w	b	NC-001725	Complete genome
M	i	r	a	b	i	NC-004036	Complete genome

مقایسه هم‌ردیف‌سازی چندگانه

هم‌ردیف‌سازی چندگانه در مورد هر دو ژن (ژن پروتئین پوششی و ژن پروتئین حرکتی) با استفاده از برنامه ClustalW برای توالی‌های نوکلئوتیدی و توالی‌های آمینواسیدی جدایه مورد بررسی (جدایه چناران) با سایر جدایه‌های مربوط به این ویروس (جدایه هلند و هند) و برخی دیگر از ویروس‌های جنس کائولیموویروس انجام گرفت. علاوه بر مقایسه توالی نوکلئوتیدی کدکننده بین جدایه‌های مختلف CERV با دیگر کائولیموویروس‌ها، مقایسه در سطح توالی‌های آمینواسیدی نیز انجام گرفت. مقایسه در سطح توالی‌های آمینواسیدی، نواحی حفاظت شده بیش‌تری را آشکار می‌نماید (۱۷).

شباهت توالی‌های CERV و مقایسه آن با دیگر کائولیموویروس‌ها

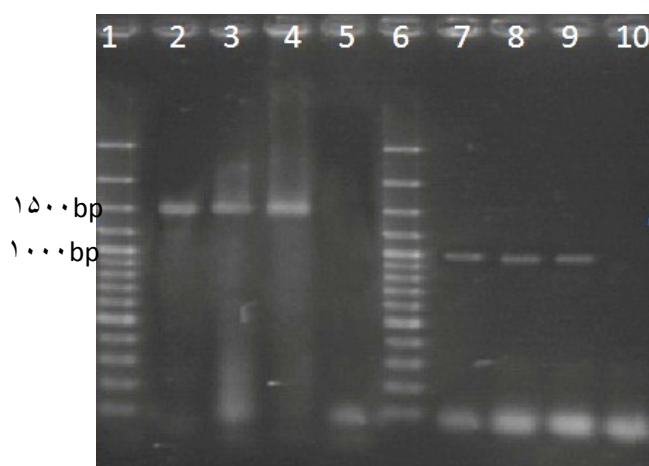
بخشی از ORF I (۸۵۷ bp) مربوط به ویروس CERV جدایه ایرانی (JF957839) به میزان ۹۷/۷ درصد شباهت با جدایه هلند و ۹۶/۱ درصد شباهت با جدایه هند در سطح نوکلئوتیدی نشان داد. زمانی که ORF I جدایه ایرانی با دیگر کائولیموویروس‌ها مقایسه شد، بیش‌ترین شباهت را در سطح آمینواسیدی با ویروس‌های CaMV، FMV و MimV نشان داد.

نتایج و بحث

در این بررسی شناسایی ویروس خراشک حلقوی میخک با استفاده از آزمون PCR با موفقیت صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی CPU/CPD و MPU/MPD قادر به شناسایی این ویروس (CERV) در عصاره گیاه آلوده بوده و کاملاً اختصاصی عمل کردند، به طوری که با وجود استخراج DNA کل از بافت گیاه، پرایمرهای مربوطه باعث تکثیر ترادف‌های مشابه در گیاه نشدند. عدم تکثیر هیچ قطعه‌ای در نمونه شاهد منفی (گیاه سالم)، مویید این مطلب نمی‌باشد. با استفاده از این آغازگرها در آزمون PCR قطعات مربوط به پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی ویروس به ترتیب در محدوده تقریبی ۱۵۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز به دست آمد. قطعات تکثیر شده در این روش با نتایج ریخی و همکاران (۱۷) مطابقت دارد (شکل ۱).

نتایج توالی‌یابی

پس از اخذ توالی، از هر دو خوانش رفت و برگشت مربوط به هر قطعه (ژن پروتئین پوششی و ژن پروتئین حرکتی) با استفاده از نرم افزار DNA Baser، دو توالی نهایی با رس‌شمارهای JF957838 و JF957839 به ترتیب مربوط به بخشی از ژن پروتئین پوششی به اندازه ۱۳۳۳bp و بخشی از ژن پروتئین حرکتی به اندازه ۸۵۷ bp در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسیدند.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ویروس CERV بر روی ژل آگارز ۱/۷ درصد با استفاده از جفت آغازگرهای CPU/CPD و MPU/MPD و مشاهده باند مربوط به ژن پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی ویروس به ترتیب در محدوده تقریبی ۱۵۰۰ bp و ۱۰۰۰ bp، ۱ و ۶- سایز مارکر ۱۰۰ bp (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, Fermentase)، ۲- شاهد مثبت، ۵ و ۱۰- شاهد منفی، ۳ و ۴- قطعات ژن پروتئین پوششی تکثیر شده مربوط به جدایه چناران و ۸ و ۹- قطعات ژن پروتئین حرکتی تکثیر شده مربوط به جدایه چناران

آمینواسیدی ژن MP، توالی‌های کوتاه مشابه، بین جدایه ایرانی CERV (JF957839) با دیگر جدایه‌های CERV (XO4658) و (AJ853858) و هم‌چنین برخی از *Caulimovirus* ها نظیر *CaMV*، *MiMV*، *FMV* مشاهده شد که حاکی از ارتباط نزدیک این ویروس‌ها با یکدیگر بود.

درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس آنالیز فیلوژنتیکی ژن MP و به روش Neighbour joining، سه گروه اصلی را تشکیل داد (شکل ۳). گروه I که شامل تمام جدایه‌های ویروس موزاییک گل کلم به همراه جدایه‌های CERV و گروه II که شامل ویروس‌های *DMV*، *MiMV* و *FMV* می‌باشد و *SVBV* به عنوان عضوی که بیش‌ترین متفاوت را در میان کاتولیموویروس‌ها دارد در گروه III قرار گرفت. در گروه I جدایه‌ی B-29 مربوط به *CaMV* بیش‌ترین نزدیکی را با جدایه‌های CERV نشان داد.

از آن‌جا که جدایه ایرانی (CERV-Ir) بیش‌ترین شباهت را در میان کاتولیموویروس‌ها با ویروس موزاییک گل کلم دارد، با این وجود تفاوت چندانی از نظر درصد شباهت بین پنج جدایه مورد بررسی ویروس موزاییک گل کلم با جدایه ایرانی CERV چه در سطح آمینواسیدی (۵۰/۹-۴۹/۸ درصد) و چه در سطح نوکلئوتیدی (۵۵/۴-۵۴/۱ درصد) مشاهده نشد (جدول ۳). دمین‌های حفاظت شده *GNLAYGKFMFTVY* در اکثر کاتولیموویروس‌ها وجود داشته و در حرکت سلول به سلول ویروس نقش دارد. در این دمین در جایگاه آمینواسید A ممکن است، آمینواسید C قرار گیرد (۱۴). از طرفی وجود این طرح حفاظت شده در ترادف آمینواسیدی جدایه ایرانی CERV خود تاییدی بر قرار گرفتن این ترادف در جنس *Caulimovirus* است (شکل ۲).

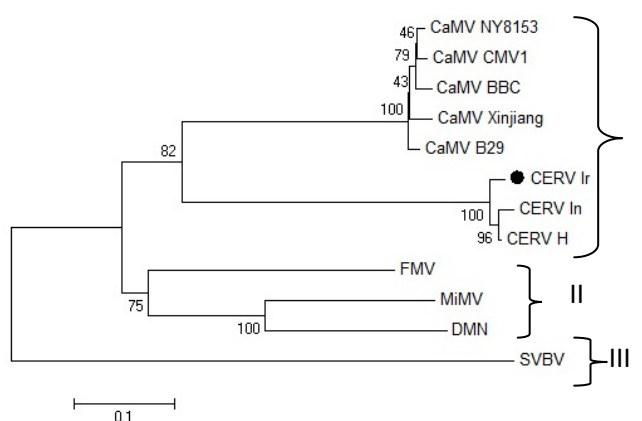
علاوه براین، پس از هم‌ردیف‌کردن چندگانه ترادف‌های

CERV_Ir	E I K K N L D K I R D E K V R S T I S D I H F G A I K V L I K A R F R E . G I N S P I K M A L I D D R I T . . D R Q D S I L G A A H G M L V Y G K F M F T V Y P R Y T T S
CERV_H	E I K K N L D K I R D E K V R S T I S D I H F G A I K V L I K A R F R E . G I N S P I K M A L I D D R I T . . D R Q D S I L G A A H G M L V Y G K F M F T V Y P R Y T T S
CERV_In	E I K K N L D K I R D E K V R S T I S D I H F G A I K V L I K A R F R E . G I N S P I K M A L I D D R I T . . D R Q D S I L G A A H G M L V Y G K F M F T V Y P R Y T T S
CaMV-xin	E I N K R L S S L K P . E V R K T M S I V H L G A V K I L L K A Q F R N . G I D T P I K I A L I D D R I N . . S R K D C L L G A A K G N L A Y G K F M F T V Y P R F G I S
CaMV_B29	E I N K R L S S L K P . E V R K T M S M V H L G A V K I L L K A Q F R N . G I D T P I K I A L I D D R I N . . S R K D C L L G A A K G N L A Y G K F M F T V Y P R F G I S
CaMV_BBC	E I N K R L S S L K P . E V R K T M S M V H L G A V K I L L K A Q F R N . G I D T P I K I A L I D D R I N . . S R R D C L L G A A K G N L A Y G K F M F T V Y P R F G V S
CaMV_CMV1	E I T K R L S S L K P . E V R K T M S M V H L G A V K I L L K A Q F R N . G I D T P I K I A L I D D R I N . . S R K D C L L G A A K G N L A Y G K F M F T V Y P R F G I S
CaMV-NY	E I N K R L S S L K P . E V R K T M S M V H L G A V K I L L K A Q F R N . G I D T P I K I A L I D D R I N . . S R R D C L L G A A K G N L A Y G K F M F T V Y P R F G I S
DMV_H	E V N K K L S K L K P . E L R K K I T T V H L G A V K I L V T A Q F Q S . G I D T P I K M A L I D M R I K . . T R K D C L L G A A K G N L C Y G K F M F T V Y P R F G V S
FMV	E I Q Q K L M K I D P . S V R S K I S M I H L G A V K I L L T A Q F R Q . G I D T S V K M A L I D D R I V . . N R K D S L L G A A R G N L A Y G K F M F T V Y P R F A L S
MiMV	E V E Q K L S K L K P . E L R K K I S I V H F G A I K I L I T A Q F . S H G I N S P I K M A L I D M R I K . . D R K D C L L G T A R G N L S H G K F M F T V Y P R F G V S
SVBV	E I E S K K R V L K P . E D R K K I D F I H I G S V K I M I K S T F R T . G I D S P I S V A L L D R F M K . . N A K D A V F G G V K G N L S Y G K L I F T T M P R I S V S

شکل ۲- بخشی از هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف‌های آمینواسیدی ژن پروتئین حرکتی جدایه‌های CERV با دیگر *Caulimovirus* ها که دمین حفاظت شده *GNLAYGKFMFTVY* را در سمت راست تصویر نشان می‌دهد.

جدول ۳- درصد شباهت آمینواسیدی (اعداد بالای قطر) و نوکلئوتیدی (اعداد زیر قطر) بین ترادف‌های ژن MP مربوط به جدایه‌های CERV با دیگر اعضای جنس کائولیموویروس

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	CERV-Ir	100	98.9	99.6	50.2	50.5	50.9	50.9	49.8	49.6	48.7	46.5	29.2
2	CERV-In	96.1	100	99.3	49.8	49.6	50.2	50.2	49.5	48.6	48.4	43.8	28.9
3	CERV-H	97.7	98.2	100	50.2	50.5	50.9	50.9	49.8	49.3	48.4	46.2	29.2
4	CaMV-CMV1	54.5	54.1	55.1	100	97.9	97.5	97.5	96.5	51.8	59.8	55.4	35.6
5	CaMV-NY8153	54.5	54.1	55.1	98.3	100	97.5	97.5	97.2	51.4	59.4	55.7	35.2
6	CaMV-Xinjiang	54.5	54.1	55.1	96.2	96.5	100	97.9	96.1	52.1	59.4	55.0	35.6
7	CaMV-B29	55.4	55.2	56.0	97.6	97.5	96.5	100	96.1	52.5	59.4	55.4	35.2
8	CaMV-BBC	54.1	53.8	54.7	97.3	97.7	95.7	96.5	100	51.1	60.1	54.6	35.2
9	MiMV	56.5	55.8	55.9	59.7	59.7	59.9	59.7	59.7	100	55.2	57.5	34.2
10	FMV	57.2	56.4	56.8	63.8	63.3	63.4	63.4	63.4	62.2	100	56.0	35.3
11	DMV	53.3	53.1	53.5	60.2	60.3	60.0	60.0	59.7	71.8	61.7	100	33.6
12	SVBV	48.0	47.3	48	47.6	47.6	47.8	48.0	48.0	48.7	49.9	47.8	100



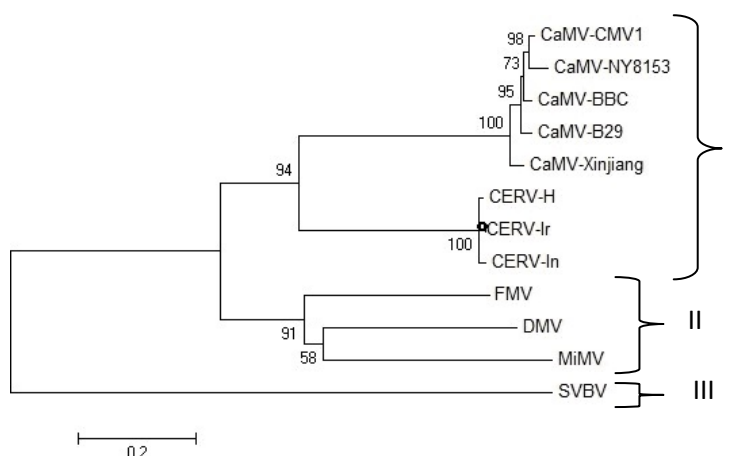
شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش Neighbour joining (bootstrap × 1000) بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین حرکتی CERV (جدایه‌ی توالی‌یابی شده با علامت • مشخص شده است، جهت نام گسترده هر ویروس به جدول ۳ و ۴ رجوع شود)

یافته‌های سایر محققین انطباق دارد (۱۰، ۱۵، ۱۷ و ۱۹). بر اساس ژن CP شباهت جدایه ایرانی ویروس خراشک حلقوی میخک (CERV-Ir) در سطح توالی آمینواسیدی با جدایه هند و هلند به ترتیب ۹۸/۶ و ۹۹/۳ درصد و در سطح توالی نوکلئوتیدی به ترتیب ۹۸/۳ و ۹۸/۹ درصد می‌باشد. هم‌چنین مقایسه با دیگر *Caulimovirus* ها نشان داد که جدایه ایرانی این ویروس شباهت ۵۳/۱-۵۱/۲ درصد با جدایه‌های CaMV در سطح توالی آمینواسیدی داشته و هم‌چنین بیش‌ترین درصد شباهت در سطح توالی نوکلئوتیدی را نیز به میزان ۵۶/۵-۵۵/۷ درصد در میان *Caulimovirus* ها با CaMV دارد (جدول ۴). آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس ژن CP نیز نتایج مشابه با آن‌چه قبلاً بحث شد، دربرداشت. به طوری که در این‌جا نیز اعضای جنس کائولیموویروس به سه گروه تقسیم شدند که گروه I هم‌چون قبل تشکیل دو زیر گروه متشکل از جدایه‌های CERV و CaMV را داد. جدایه‌های CERV بیش‌ترین شباهت را با جدایه Xinjiang ویروس موزاییک گل کلم نشان دادند (شکل ۵).

در ORF IV ویروس خراشک حلقوی میخک که پروتئین پوششی ویروس را کد می‌کند، می‌توان حضور RNA binding domain (موتیف zinc finger) را به صورت آرایش CX₂CX₄HX₄C مشاهده نمود که در آن X می‌تواند هر نوع اسید آمینه‌ای باشد و قبل از آن نیز ناحیه غنی از لیزین (محتوی ۴۷ درصد، آمینواسید ۴۱۷-۳۶۷) وجود دارد (۴). هم‌چنین در این ناحیه، دمین حفاظت شده EG/KHYANECP نیز وجود داشته که بخشی از توالی پروتئین پوششی ویروس بوده و شامل دمین متصل شونده به RNA است که همراه با یک موتیف سیستئین یا zinc finger motif پایدار است. این موتیف (HX₄C) در تمامی *Caulimovirus* ها به جز ویروس رگبرگ نواری توت‌فرنگی (*Strawberry vein banding virus*, SVBV) حفاظت شده است (۱۵). در هم‌ریف‌سازی توالی‌های آمینواسیدی مربوط به ژن CP (شکل ۴)، این دمین‌های حفاظت شده در بین جدایه‌های مختلف CERV (از جمله جدایه ایرانی) و دیگر کائولیموویروس‌ها (به جز موتیف HX₄C که در SVBV دیده نمی‌شود) مشاهده شد که با

CERV_Ir KKQKLLKRFNKKCCSTF...EKPVEYGGKPSYS...K...KKKYSKKYKPKYTKYKVR...KKKFFSPGKYFKPKDK...KSEKARYCPHGKKTQRCWVCNIEGHTANECPNRQT...
 CERV_H KKQKLLKRFNKKCCSTF...EKPVEYGGKPSYS...K...KKKYSKKYKPKYTKYKVR...KKKFFSPGKYFKPKDK...KSEKARYCPHGKKTQRCWVCNIEGHTANECPNRQT...
 CERV_In KKQKLLKRFNKKCCSTF...EKPVEYGGKPSYS...K...KKKYSKKYKPKYTKYKVR...EKKKFFSPGKYFKPKDK...KSEKARYCPHGKKTQRCWVCNIEGHTANECPNRQT...
 CaMV_CMV1 KKQKLLKRFNKKCCSIG...EASAEYGGKRTS...T...KRYHKRYKRYKRYKRYK...KKKFFSPGKYFKPKDK...KGSRQKYCPHGKKTQRCWVCNIEGHTANECPNRQS...
 CaMV_BBC KKQKLLKRFNKKCCSIG...EASAEYGGKRTS...K...KRYHKRYKRYKRYKRYK...KKKFFSPGKYFKPKDK...KGSRQKYCPHGKKTQRCWVCNIEGHTANECPNRQS...
 CaMV-xin KKQKLLKRFNKKCCSIG...EASAEYGGKRTS...K...KRYH.KRYKRYKRYKRYK...KKKFFSPGKYFKPKDK...KGSRQKYCPHGKKTQRCWVCNIEGHTANECPNRQS...
 caMV-B29 KKQKLLKRFNKKCCSIG...EASAEYGGKRTS...K...KRYH.KRYKRYKRYKRYK...KKKFFSPGKYFKPKDK...KGSRQKYCPHGKKTQRCWVCNIEGHTANECPNRQS...
 CaMV-NY KNEKLLKRFNKKCCSIG...EASAEYGGKRTS...T...KRYHKRYKRYKRYKRYK...KKKFFSPGKYFKPKDK...KGSRQKYCPHGKKTQRCWVCNIEGHTANECPNRQS...
 DMV NTTKQLKRFNKKCCNKY...KEPNVLIGTETSCKPN...Y...KKKSTRLPKRYKRYK...KKKFFSPGKYFKPKDK...KFP.KRYKRYKRYKRYK...KRYKRYKRYKRYK...
 FMV RTSKLLKRFNKKCCSKNSL...DPLVSPGORDTKKDF...K...KSSKYKAYKRYKRYK...KKKFFSPGKYFKPKDK...KRP.KRYKRYKRYKRYK...KRYKRYKRYKRYK...
 MiMV SKAQQLKRFNKKCCSKNSL...INDSENNQFGKNSP...Y...KRYKRYKRYKRYK...KKKFFSPGKYFKPKDK...KRP.KRYKRYKRYKRYK...KRYKRYKRYKRYK...
 SVBV LKIKKEIRRNKKCCPKFS...SPETVGGKPSYS...K...KQYKRYKRYKRYKRYK...KKKFFSPGKYFKPKDK...KRP.KRYKRYKRYKRYK...KRYKRYKRYKRYK...

شکل ۴- بخشی از هم ردیف‌سازی چندگانه ترادف‌های آمینواسیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های CERV با دیگر Caulimovirus که در آن دمین حفاظت شده zinc finger با آرایش CX2CX4HX4C و دمین مربوط به بخشی از پروتئین پوششی اتصال یافته با RNA را به صورت EG/KHYANECP در سمت راست تصویر نشان می‌دهد.



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش Neighbour joining (bootstrap × 1000) بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی CERV (جدایه توالی یابی شده با علامت • مشخص شده است، جهت نام گسترده هر ویروس به جدول ۳ و ۴ رجوع شود).

جدول ۴- درصد شباهت آمینواسیدی (اعداد بالای قطر) و نوکلئوتیدی (اعداد زیر قطر) بین ترادف‌های ژن CP مربوط به جدایه‌های CERV با دیگر اعضای جنس کائولیموویروس

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	CERV-Ir	100	98.6	99.3	52.8	51.6	51.2	52.9	53.1	41.5	30.6	37.7	36.5
2	CERV-In	98.3	100	98.8	51.8	50.6	50.2	51.9	52.1	41.3	30.1	37.7	36.5
3	CERV-H	98.9	98.3	100	52.5	51.4	51.0	52.6	52.9	41.3	30.6	37.7	36.5
4	CaMV-CMV1	56.2	56.5	56.2	100	96.0	95.3	97.4	97.7	39.8	32.2	43.9	36.9
5	CaMV-NY8153	55.7	55.7	55.8	96.2	100	93.9	95.3	95.1	38.4	31.2	43.6	35.6
6	CaMV-Xinjiang	56.1	56.4	56.1	93.3	92.4	100	95.8	95.6	38.8	31.6	43.9	36.1
7	CaMV-B29	56.4	56.8	56.4	95.8	94.4	93.7	100	97.4	39.3	31.9	44.5	36.6
8	CaMV-BBC	56.5	56.7	56.4	96.5	94.9	94.2	95.8	100	39.1	32.2	43.9	36.2
9	DMV-H	35.3	35.3	35.3	39.8	40.2	41.8	39.8	41.4	100	29.8	41.0	38.9
10	SVBV	48.9	49.0	49.3	48.0	48.1	49.0	48.7	48.2	37.8	100	31.1	30.1
11	FMV	51.2	51.2	51.4	53.2	53.3	53.3	52.8	52.8	38.6	51.8	100	43.8
12	MiMV	51.4	51.3	51.3	52.7	52.9	52.8	53.1	52.6	37.8	46.7	59.9	100

جدول ۵- تغییرات آمینواسیدی در موقعیت‌های مختلف دو ژن پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی جدایه‌های CERV که از هلند، هند و ایران گزارش شده‌اند.

Gene	Position in gene	CERV_In*	CERV_H*	CERV_Ir*
Movement protein	108	Arginine	Lysine	Lysine
	279	Isoleucine	Threonine	Threonine
	281	Serine	Serine	Arginine
	35	Leucine	Glutamic acid	Glutamic acid
	39	Aspartic acid	Glutamic acid	Glutamic acid
	67	Glutamic acid	Glycine	Glutamic acid
Coat protein	106	Isoleucine	Tyrosine	Tyrosine
	113	Isoleucine	Tyrosine	Tyrosine
	209	Serine	Serine	Asparagine
	252	Serine	Serine	Arginine
	272	Proline	Aspartic acid	Aspartic acid
	388	Glutamic acid	Lysine	Lysine

*In :India ; H :Holand ; Ir :Iran

داد که در مورد ژن پروتئین پوششی، شباهت جدایه ایرانی ویروس خراشک حلقوی میخک (CERV-Ir) در میان کائولیموویروس‌های مختلف به میزان ۵۶/۵ - ۳۵/۳ درصد در سطح نوکلئوتیدی و ۵۳/۱ - ۳۰/۶ درصد در سطح توالی آمینواسیدی می‌باشد. در مورد ژن پروتئین حرکتی این ارقام به ترتیب ۲۹/۲ - ۵۰/۹ درصد در سطح توالی آمینواسیدی و ۴۸ - ۵۷/۲ درصد در سطح توالی نوکلئوتیدی گزارش شد. از جمله مطالعات آتی که در ادامه تحقیق حاضر می‌تواند انجام شود، شامل تعیین مقاومت ارقام تجاری میخک نسبت به این ویروس، تکثیر ژنوم کامل جدایه ایرانی ویروس و تهیه infectious clone و تعیین عملکرد ناشناخته برخی نواحی حفاظت شده بر روی ژنوم ویروس می‌باشد.

هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف‌های مربوط به توالی‌های آمینواسیدی مربوط به ژن MP و CP در مورد هر سه جدایه CERV با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN انجام شده و موتیف‌ها و دمن‌های حفاظتی در هر دو ژن تعیین شده و اسیدهای آمینه متفاوت بر اساس موقعیت آن‌ها بر روی هر ژن مشخص گردید (جدول ۵). در این تغییرات آمینواسیدی تبدیل آمینواسیدهای قطبی به غیرقطبی یا عکس رخ می‌دهد که جهت تشخیص اثر کاربردی آن‌ها نیاز به بررسی‌های بیش‌تر هست.

مطالعه حاضر که اولین مطالعه مولکولی بر روی این ویروس در ایران می‌باشد، به هدف شناسایی، بر روی دو ناحیه نسبتاً حفاظت شده ویروس (ژن پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی) متمرکز شده و نشان

منابع

- ۱- بیات ح. ۱۳۸۷. شناسایی سرولوژیکی و بررسی پراکنش برخی ویروس‌های میخک در گلخانه‌های تولید میخک شهرستان محلات خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه بوعلی سینا همدان. صفحه ۵۳۶.
- 2- Buchen-Osmond C. 2006. *Carnation etched ring virus*: Description. CMI/AAB USA. Available at <http://www.ictvdb.org/ICTVdB/00.015.0.01.003.htm> (visited 7 November 2010).
- 3- Clark M.F., and Adams N.A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *General Virology*, 34: 475-483.
- 4- Covey S.N., and Hull R. 1992. *Genetic engineering with double strand DNA viruses*. p. 217. In Wilson T. M. A. and Davies J. W (ed). *Genetic engineering with plant viruses*. part 7. CRC, Boca Raton.
- 5- Hollings M., and Stone O. M. 1961. *Carnation etched ring*: a preliminary report on an undescribed disease. p. 94-95. In report of the glasshouse crop research institute.
- 6- Hull R., and Donson J. 1981. Physical mapping of the DNAs of Carnation etched ring and Figwort mosaic viruses. *Gene Virology*, 60: 125-134.
- 7- Hull R., Sadler J., and Longstaff M. 1986. The sequence of *Carnation etched ring virus* DNA: comparison with *Cauliflower mosaic virus* and retroviruses. *European Molecular Biology Organization*, 5: 3083- 3090.
- 8- Kim K.S., Martin E.M., and Lee K.W. 1999. Cell-to-cell movement of plant viruses: ultrastructural aspects. *Plant Pathology*, 15: 193-198.
- 9- Kuluev B.R., Knyazev A.V., and Chemeris A.V. 2008. Activity of Promoters of *Carnation etched ring virus* and *Dahlia mosaic virus* in tobacco protoplast and transgenic plants, *Russian Journal of Plant Physiology*, 55: 687-693.
- 10- Lawson R.H., and Civerolo E.L. 1978. *Carnation etched ring virus*: purification, stability of inclusions, and properties of nucleic acid. *Phytopathology*, 68: 181- 188.

- 11- MC Ritchie J.J. 1980. *Carnation etched ring virus*, Plant Pathology circular No, 211. www.doacs.state.fl.us, Visited: 2010/7/23.
- 12- Pahalawatta V., Druffel K.L., Wyatt S.D., Eastwell K.C., and Pappu H.R. 2008. Genome structure and organization of a member of a novel and distinct species of the genus *Caulimovirus* associated with dahlia mosaic. Archives of Virology, 153:733-738.
- 13- Pallas V., Sanchez-Navarro J.A., Canizares M.C., and Cano E.A. 1999. A new test for detecting carnation viruses. Floraculture Int, 9: 32-34.
- 14- Puppa H.R., Druffel K.L., Miglino R., Van Schadewijk A.R. 2008. Nucleotide sequence and genome organization of a member of a new and distinct Caulimovirus species from dahlia. Archives virology, 153: 2145-2148.
- 15- Puppu H.R., and Druffel K.L. 2009. Use of conserved genomic regions and degenerate primers in a PCR-based assay for the detection of members of the genus *Caulimovirus*. Virological Methods, 157: 102-104.
- 16- Raikhy G., Hallan V., Kulshrestha S., Ram R., and Zaidi A.A. 2006. Complete nucleotide sequence of an Indian isolate of *Carnation etched ring virus* and its homology with other caulimoviruses. Current Science, 90:176- 187.
- 17- Raikhy G., Hallan V., Kulshrestha S., and Zaidia A.A. 2007. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Carnation etched ring virus* expressed in bacterial system : Production & use in immunodiagnosis. Phytopathology, 155:616-622.
- 18- Sanchez-Navarro J.A., Canizares M.C., Cano E.A., and Pallas V. 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. Virological Methods, 82: 167-175.
- 19- Zhang Y- P., Uyemoto J.K., and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. Virology Method, 71: 45-50.