



بررسی ویروس ابلقی میخک (CarMV) و آنالیز ژنومی یک جدایه ایرانی این ویروس (FUM2)

بهرز جعفرپور^{۱*} - محمدعلی سبک‌خیز^۲ - ماهرخ فلاحتی رستگار^۳ - سمیرا پاکباز^۴

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۸

چکیده

طی فصلهای زمستان و بهار سالهای ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷، از گلخانه‌های اطراف مشهد و چناران تعداد ۴۵۰ نمونه از گیاهان میخک که برگ‌های آنها دارای علائم رنگ‌پریدگی، ابلقی و بدشکلی بود، جمع‌آوری شد. با استفاده از آزمون ساندویچ دو طرفه الایزا نمونه‌های آلوده مشخص گردید. RNA کل گیاه با استفاده از محلول RNXTM (-Plus) از نمونه‌های جمع‌آوری شده استخراج گردید. کیت AccuPower RT Pre Mix Kit به همراه پرایمر اختصاصی برگشت هر دو قطعه مورد هدف جهت ساخت رشته cDNA ویروسی به کار رفت. واکنش PCR نیز با استفاده از کیت PCR PreMix Accupower انجام شد. واکنش RT-PCR دو قطعه از ژنوم ویروس را به اندازه‌های تقریبی ۱۰۳۷ bp و ۶۷۶ bp تکثیر کرد که جهت تعیین توالی محصولات PCR؛ مورد استفاده قرار گرفتند. توالی نوکلئوتیدی ۳ ژن از قطعه ۶۷۶ bp جدایه FUM2 با توالی نوکلئوتیدی ۲۳ جدایه از سایر نقاط دنیا با کمک نرم‌افزار BioEdit و در ClustalW2 مقایسه و درخت فیلوژنتیکی رسم شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی جدایه ایرانی FUM2 در مقایسه با جدایه‌های موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه مذکور در گروه I و در زیر گروه IA قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: ویروس ابلقی میخک (CarMV)، FUM2، RT-PCR، درخت فیلوژنتیکی، تعیین توالی، ایران

مقدمه

۲۷ KDa می‌شود (p27)، اما با استراتژی پیوسته‌خوانی این کدون (Read through) و رسیدن به کدون خاتمه دیگر (UAA)، پروتئینی به اندازه ۸۶ KDa به وجود می‌آید (p86). این دو پروتئین که از ORFهای ۱ و ۲ به وجود می‌آیند، نقش پلیمرز ویروسی را دارند. سایر ORFها از طریق RNAی زیرژنومی (Subgenomic) کد می‌شوند. محصول ORF3، ۷ KDa بوده (p7) و در حرکت سلول به سلول ویروس نقش دارد. محصول ORF4، ۹ KDa بوده (p9) و در انتشار سیستمیک ویروس نقش دارد. در این ویروس مانند سایر اعضاء جنس *Carmovirus* کمپلکسی از دو پروتئین در حرکت آنها نقش دارد که تشکیل بلوک دو ژنی را می‌دهد (Block "Double-gene") که دو ORF کوچک داخلی همپوشان (ORFهای ۳ و ۴) کد کننده این پروتئینها هستند و در حرکت سلول به سلول ویروس نقش دارد. محصول ORF4، ۳۸ KDa بوده که پروتئین پوششی ویروس است. در انتهای "۵ ژنوم یک کلاهک (Cap) وجود دارد و در انتهای "۳ ساختمان خاصی وجود ندارد (شکل ۱) (۱، ۴، ۵، ۶). دامنه میزبانی این ویروس احتمالاً محدود به خانواده گیاهی میخک (Caryophyllaceae) است، دارای انتشار جهانی بوده و در هر جا که گل میخک پرورش داده می‌شود، وجود دارد. با

ویروس ابلقی میخک (CarMV) اولین بار توسط کاسانیس (Kassanis) در سال ۱۹۵۵ از انگلستان و از جنس *Dianthus spp.* گزارش شد (۱). این ویروس عضو تیپ جنس *Carmovirus* در خانواده *Tombusviridae* است که دارای ذرات ایزومتریک به قطر حدود ۳۰ nm و یک قطعه RNA تک رشته‌ای خطی مثبت می‌باشد. سایر اعضای این خانواده شامل جنس‌های *Tombusvirus*، *Avenavirus*، *Aureusvirus*، *Dianthovirus*، *Machlomovirus*، *Necrovirus* و *Panicovirus* می‌باشد. کارموویروسها کوچکترین ژنوم را در میان ویروسهای با ژنوم ssRNA مثبت دارند. ژنوم RNAی این ویروس دارای پنج ORF می‌باشد. یک توالی پیشرو (Leader sequence) در انتهای ۵ به اندازه ۶۹ نوکلئوتید و قبل از اولین AUG وجود دارد. یک کدون خاتمه UAG باعث تولید یک پروتئین

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب استاد، کارشناس آموزشی، استاد و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد (*- نویسنده مسئول: (Email: jafarpour226@yahoo.com

نیتروفیل فسفات) به کار برده شد. پس از حدود ۰/۵ الی ۲ ساعت از اضافه کردن سوبسترا، نمونه‌ها به صورت چشمی و با استفاده از دستگاه الایزاخوان-ELISA Reader, Avareness, Stat fax (2100 در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. در همه آزمون‌ها از شاهد مثبت نیز استفاده می شد.

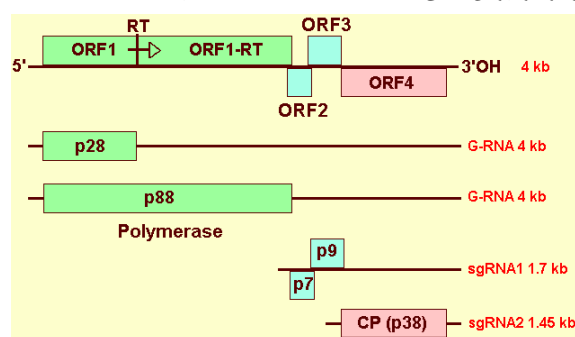
استخراج rRNA کلی، سنتز cDNA و انجام واکنش PCR RNATM (-Plus) از مخلول DAS- (سینازن ایران) از نمونه‌هایی که آلودگی آنها در آزمون DAS-ELISA به اثبات رسیده بود استخراج شد. کیت AccuPower RT Pre Mix Kit (Bioneer Inc. Korea) به همراه پرایمر اختصاصی برگشت هر دو قطعه جهت ساخت رشته cDNA ویروسی به کار رفت. واکنش RT در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و غلظت ۱۰ pmol از پرایمر برگشت و ۳ میکرولیتر (۰/۱ μg) از RNATM استخراج شده انجام شد. این واکنش سپس با دمای °C ۹۴ به مدت یک ساعت و غیر فعال سازی آنزیم در دمای °C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه ادامه یافت. واکنش PCR نیز با استفاده از کیت Accupower PCR PreMix (Bioneer, Korea) و غلظت ۲۰ ng dDNA و همچنین ۱۰ pmol از هر پرایمر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر Biometra Tpersonal (Germany) و با برنامه حرارتی یک چرخه °C ۹۴ به مدت ۴ دقیقه به عنوان واسرشته سازی آغازین و به دنبال آن ۳۹ چرخه متشکل از °C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، °C ۵۰ به مدت ۱ دقیقه، °C ۷۲ به مدت ۷۰ ثانیه و همچنین °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه به عنوان تکمیل پلیمریزاسیون انجام گردید. پس از پایان واکنش PCR محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ تهیه شده در بافر TBE ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج با دستگاه UV ترانس لومیناتور مشاهده شد. در تمام واکنش‌های RT-PCR از شاهد منفی (گیاهان سالم میخک) و شاهد مثبت نیز RNA استخراج شد و مورد استفاده قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی در جدول ۱ آمده است.

تعیین توالی نوکلئوتیدی فرآورده‌های PCR

جهت تعیین توالی محصولات PCR؛ دو نمونه برای تعیین توالی انتخاب شد و به شرکت MWG Biotech (Germany) فرستاده شد. توالی نوکلئوتیدی ژنهای مختلف ویروسی در سایت بانک اطلاعاتی جهانی (NCBI) بلاست شدند و صحت انجام توالی مورد تایید قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی ۳ ژن (P9, P7, CP) از قطعه ۶۷۶ bp جدایه FUM2 با توالی نوکلئوتیدی ۲۳ جدایه از سایر نقاط دنیا با کمک نرم افزار BioEdit (Fullversion 7.0.9.1) و همچنین در ClustalW2 مقایسه شد و درخت فیلوژنتیکی با نرم افزار MEGA 3.1 رسم شد.

بذر منتقل نمی‌شود و هیچ ناقل بیولوژیکی برای آن شناخته نشده است. انتقال به صورت مکانیکی (تماس گیاه آلوده با سالم) و همچنین از طریق پیوند انجام می‌شود. ویروس را می‌توان در ساقه، برگ، گل و ریشه گل میخک ردیابی نمود (۱). در ایران این ویروس برای اولین بار توسط مشیری و دانش در طی سالهای ۱۹۷۷، ۱۹۷۹ و ۱۹۸۲ از اصفهان گزارش شده است (۳).

در این بررسی توالی نوکلئوتیدی دو قطعه از ژنوم (مشتمل بر ۴ ژن) یک جدایه ایرانی این ویروس مشخص شد و با توالی نوکلئوتیدی سایر جدایه‌های دنیا (موجود در بانک اطلاعات ژنومی (NCBI) مقایسه گردید. این دو قطعه ژنومی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش RT-PCR تکثیر گردید. تعیین توالی این دو قطعه ژنومی وجود ویروس ابلقی میخک را در منطقه اثبات کرد.



شکل ۱- ساختار ژنومی و استراتژی بیان ژنهای ویروس ابلقی میخک (CarMV) (۱)

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه‌های آلوده و شناسایی ویروس با روش DAS-ELISA

در طی فصل‌های زمستان و بهار سالهای ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷، از گلخانه‌های اطراف مشهد و چناران تعداد ۴۵۰ نمونه از گیاهان میخک که برگهای آنها دارای علائم ابلقی، رنگ‌پریدگی و بدشکلی بود (شکل ۲)، جمع آوری و جهت بررسی وجود ویروس، به آزمایشگاه منتقل گردید (جدول ۲). به منظور شناسایی و ردیابی ویروس ابلقی میخک (CarMV) از آزمون ساندویچ دو طرفه الایزا (DAS-ELISA) و آنتی‌بادیهای اختصاصی ویروس (DSMZ-آلمان) مطابق روش شرح داده شده کلارک و آدامز (۱۹۷۷) استفاده شد (۲). در این آزمون ابتدا چاهکهای پلیتهای پلی استیرن با IgG اختصاصی ویروس پوشش داده شد و به دنبال آن عصاره برگهای نمونه‌های مورد نظر به چاهکها اضافه شد. سپس IgG متصل شده به آنزیم آلکالین فسفاتاز (IgG-AP) جهت به دام اندازی ویروس در بین دو لایه آنتی‌بادی، استفاده شد. برای ایجاد تغییر رنگ در نمونه‌های دارای ویروس، سوبسترای آنزیم آلکالین فسفاتاز (پی-ی-



شکل ۲- علائم ویروس ابلقی میخک (CarMV) در برگهای گیاهان میخک که علائم بدشکلی و رنگ پریدگی را نشان می دهند.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر cDNA جدایه ایرانی CarMV (FUM2) (۶)

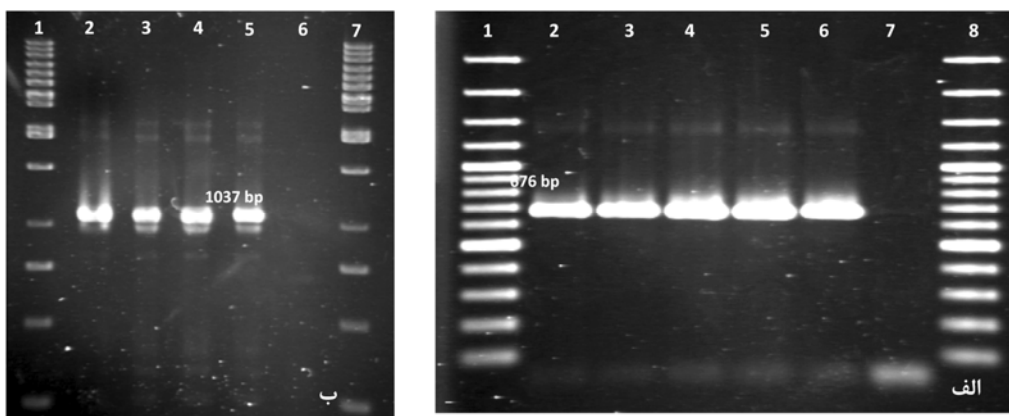
Primer	Sequence	Product size	Gene (ORF)
CarMV1UP	5'-CGC AGA TCT GGG TAAGCT GGC GGG C-3'	1-1037 nt; cDNA1	RNA Polymerase
CarMV1DN	5'-AAT CAG CTG ACT AGC TCC TTG TTG C-3'		
CarMV3UP	5'-AGG GGG CCC CAG TGT GAA GCG GCA-3'	2304-2979 nt; cDNA3	P7, P9 and CP
CarMV3DN	5'-CCC AAG CTT GGG ATA ACA CCC GTG-3'		

DNA Ladder (Fermentas) تکثیر کرد (شکل ۳). همانطور که عنوان شد دو قطعه تکثیر شده شامل ۴ ژن ویروسی بود؛ قطعه ۱۰۳۷bp حاوی پلیمرز ویروسی (p86) و قطعه ۶۷۶ bp حاوی دو ژن پروتئین حرکتی (بلوک دو ژنی؛ p7 در حدود ۲۰۰ bp و p9 در حدود ۳۰۰ bp) و بخشی از پروتئین پوششی (p38) بود؛ که توالی اینها در بانک اطلاعات ژنومی NCBI با شماره‌های پذیرش (Accession Numbers) GU229739 برای ژنهای p7، p9 و قسمتی از ژن پروتئین پوششی (p38) و همچنین GU229740 برای ژن p86 به ثبت رسیده است.

نتایج و بحث

ویروس ابلقی میخک با وجود دارا بودن ژنوم بسیار کوچکش یک ویروس بسیار خسارت‌زا می‌باشد. نتایج آزمون DAS-ELISA نشان داد که اکثر نمونه‌های جمع‌آوری شده آلوده به ویروس ابلقی میخک بودند و گسترش وسیع آن در گلخانه‌های منطقه مورد بررسی را می‌توان انتقال از طریق قلمه‌ها و همچنین به‌صورت مکانیکی ذکر کرد (جدول ۲).

RT-PCR دو قطعه از ژنوم ویروس را به اندازه‌های تقریبی ۱۰۳۷ و ۶۷۶ bp با استفاده از GeneRuler™ 100 bp Plus



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR (۱۰۳۷ bp و ۶۷۶ bp).

(الف) باند ۶۷۶bp مربوط به ویروس؛ خط ۱ و خط ۸ مربوط به GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) می‌باشد (۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۲۰۰، ۱۰۰۰، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰ bp)

خط ۷: شاهد منفی، خط ۱ الی ۶ جدایه‌های مختلف ویروس.

(ب) باند ۱۰۳۷bp مربوط به ویروس؛ خط ۱ و خط ۷ مربوط به GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) می‌باشد؛ خط ۶: شاهد منفی، خط ۱ الی ۵ جدایه‌های مختلف ویروس.

جدول ۳- نام جدایه‌های به کار رفته در مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه ایرانی با سایر جدایه‌های دنیا و مقایسه آنها در ClastaW2 در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدها

نام جدایه	شماره پذیرش جدایه در NCBI	درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی	درصد تشابه در سطح آمینواسید
Shanghai, China	AF192772	۹۷	۹۴
Valencia, SPAIN	AJ304989	۹۷	۹۴
isolate Aus, Australia,	AJ309492	۹۷	۹۴
isolate Col., Colombia	AJ309493	۹۷	۹۴
isolate fr. France	AJ309494	۹۷	۹۴
isolate jap. Japan	AJ309495	۹۷	۹۳
isolate nl-1. Netherlands	AJ309496	۹۷	۹۵
isolate nl-2. Netherlands	AJ309497	۹۷	۹۶
isolate isr-1. Israel	AJ309498	۹۶	۹۱
isolate it-1. Italy	AJ309499	۹۷	۹۵
isolate isr-2. Israel	AJ309501	۹۷	۹۶
isolate China	X02986	۹۸	۹۷
isolate it-2. Italy	AJ309502	۹۷	۹۵
isolate sp-1. Valencia, SPAIN	AJ309503	۹۶	۹۳
isolate sp-2. Valencia, SPAIN	AJ309504	۹۷	۹۵
isolate sp-3. Valencia, SPAIN	AJ309505	۹۷	۹۵
isolate sp-4. Valencia, SPAIN	AJ309506	۹۷	۹۵
isolate sp-1. Valencia, SPAIN	AJ309508	۹۷	۹۴
isolate sp-m. Valencia, SPAIN	AJ309509	۹۷	۹۵
isolate sp-s. Valencia, SPAIN	AJ309510	۹۶	۹۲
isolate usa-1. USA	AJ309511	۹۶	۹۳
isolate usa-2. USA	AJ309512	۹۶	۹۳
isolate Indian	AJ811998	۹۷	۹۴

درصد تشابه را نشان می‌دهد و پس از آن با جدایه هلندی (AJ309497) می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی جدایه FUM2 حدود ۹۷ درصد تشابه با جدایه چینی (AF192772)، جدایه اسپانیایی (AJ304989)، جدایه استرالیایی (AJ309492)، جدایه کلمبیایی (AJ309493)، جدایه فرانسوی (AJ309494)، جدایه ژاپنی (AJ309495) و دو جدایه هلندی (AJ309496 و AJ309497) دارد. سایر اطلاعات را در جدول ۳ می‌توان به تفصیل مشاهده کرد. یادآور می‌شود که درصد تشابه در سطح آمینواسیدی ایزوله ایرانی با جدایه چینی (X02986) بیشترین (۹۷ درصد) است ولی با وجود اینکه تشابه ۹۷ درصدی در سطح نوکلئوتیدی بین جدایه ایرانی و ۸ جدایه ذکر شده فوق وجود دارد ولی تشابه جدایه ایرانی با این جدایه‌ها در سطح آمینواسیدی بسیار متنوع است که علت این امر را می‌توان

جدول ۲- مناطق نمونه برداری و وضعیت پراکنش ویروس در این مناطق

مناطق	تعداد نمونه	تعداد نمونه جمع آوری شده	منطقه نمونه برداری
	۱۰۲	۲۱۳	مشهد و حومه
	۱۲۷	۲۳۷	چناران

توالی نوکلئوتیدی جدایه ایرانی FUM2 بیشترین تشابه را با جدایه چینی این ویروس (X02986) با ۹۸ درصد تشابه دارد. این در حالیکه که با دیگر جدایه چینی و همچنین دو جدایه دیگر آسیایی (هند و ژاپن) ۹۷ درصد تشابه دارد. تشابه در سطح آمینواسیدی در جدایه چینی (X02986) ۹۷ درصد بود که بیشترین

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی جدایه ایرانی FUM2 در مقایسه با جدایه‌های موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه مذکور در گروه I و در زیر گروه A قرار می‌گیرد.

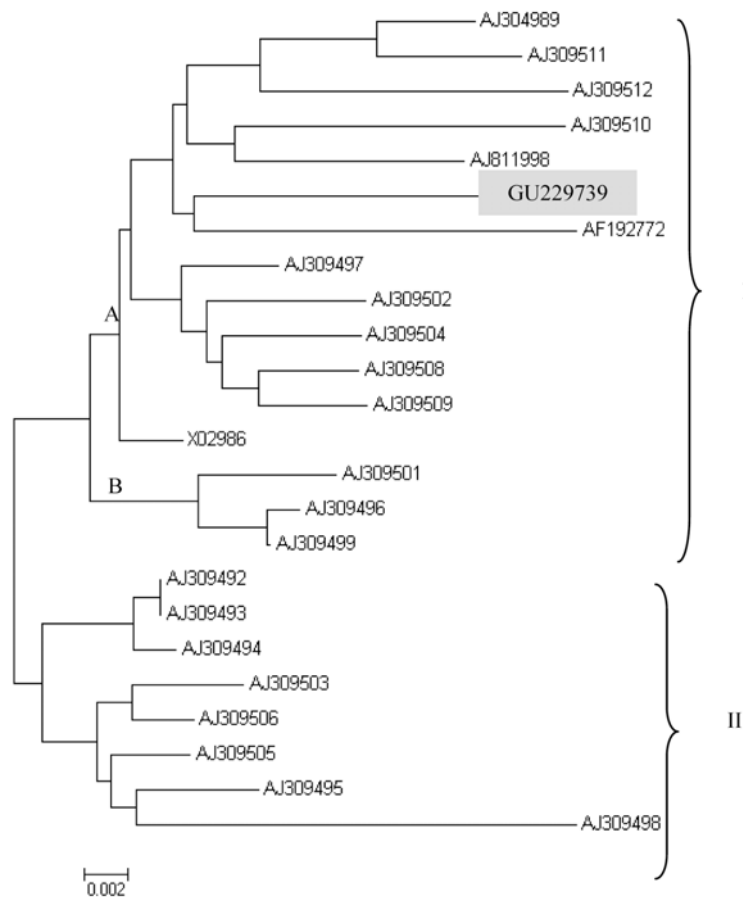
سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که هزینه‌های این تحقیق را فراهم نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

این طور ذکر کرد که جایگزینی یک نوکلئوتید می‌تواند باعث تغییر یک رمز اسید آمینه شود. همچنین ذکر این نکته لازم است که ایزوله FUM2 کمترین تشابه را هم در سطح نوکلئوتیدی و هم در سطح آمینواسیدی با جدایه اسرائیلی (AJ309498) دارد.

بیشترین ناحیه حفظ شده در توالی نوکلئوتیدی در ژن پروتئین پوششی این ویروس است.

روش Neighbor-joining نرم‌افزار MEGA 3.1 جهت رسم درخت فیلوژنتیکی براساس سه ژن ویروسی استفاده شد (شکل ۴). جدول ۲ جدایه‌های به کار رفته در این درخت را به همراه مقایسه آنها در ClustalW2 در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدها نشان می‌دهد.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس ابلقی میخک (CarMV) بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژنهای ویروسی p7، p9 و p38.

- 1- Brunt A.A. and Martelli G.P. 2008. Carnation mottle virus in Description of Plant Viruses online in: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=420>
- 2- Clark M.F, and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- 3- Farzadfar S., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. (2002). Plant viruses of IRAN. Saman press. 205 pp.
- 4- Garcia A.C, Marcos A., Pallaas J. and Nchez-Pina M. 2001. Influence of the plant growing conditions on the translocation routes and systemic infection of carnation mottle virus in *Chenopodium quinoa* plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 229-238.
- 5- Marcos J.F., Vilar M., Rez-Payaa E.P., and Pallaas V. 1999. In Vivo Detection, RNA-Binding Properties and Characterization of the RNA-Binding Domain of the p7 Putative Movement Protein from Carnation Mottle Carmovirus (CarMV). *Virology* 255: 354-365.
- 6- Raikhy, G.V. Hallan, S., Kulshrestha, Ram R. and Zaidi A.A. 2006. Multiplex PCR and genome analysis of Carnation mottle virus Indian isolate. *Current Science* 90: 74-82.
- 7- Sa ´nchez-Navarro J.A., Can izares M.C., Cano E.A. and Pallas V. 1999. Simultaneous detection of five carnation viruses by non-isotopic molecular hybridization. *Journal of Virological Methods* 82: 167-175.
- 8- Vilar, M., Saur, A., Marcos, J.F., Mingarro, I, and Perez-Paya E. 2005. Transient Structural Ordering of the RNA Binding Domain of Carnation Mottle Virus p7 Movement Protein Modulates Nucleic Acid Binding. *ChemBioChem*, 6, 1391 – 1396.
- 9- Gosalvez-Bernal, B. Garcia-Castillo S., Pallas, V., Sanchez-Pina, M.A. 2006. Distribution of carnation viruses in the shoot tip: Exclusion from the shoot apical meristem. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69, 43-51.