

آنالیز فیلوژنتیکی و تعیین ترادف ژن اینکلوزن بادی دو جدایه ایرانی ویروس خراشک حلقوی میخک (*Carnation etched ring virus*)

مهناز آشنائی*^۱، بهروز جعفرپور^۲، سعید ملک زاده شفاوردی^۳

^۱ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۳ استادیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۵/۱۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۲۴

چکیده

ویروس خراشک حلقوی میخک (*Carnation etched ring virus*, CERV)، عضو جنس *Caulimovirus* و خانواده *Caulimoviridae* است. این ویروس به عنوان دومین ویروس مهم میخک پس از ویروس ابلقی میخک محسوب می شود. به منظور شناسایی ویروس مذکور، در طی بازدید از گلخانه های میخک استانهای خراسان رضوی (مشهد) و مرکزی (محللات)، نمونه های مشکوک به آلودگی جمع آوری گردید. تشخیص اولیه CERV با استفاده از آزمون سرولوژیکی الایزای غیر مستقیم صورت گرفت. استخراج DNA از برگهای تازه نمونه های آلوده، با استفاده از بافر CTAB انجام شد. در آزمون PCR پس از به کار بردن جفت آغازگرهای اختصاصی قطعه ای به اندازه ۱۵۰۰ جفت باز، واقع در ناحیه اینکلوزن بادی تکثیر شد. ترادف های بدست آمده، همراه با تعدادی از ترادف های کائولیموویروس های موجود در بانک ژن مقایسه شد. دندروگرام با استفاده از ترادف ژن اینکلوزن بادی با نرم افزار MEGA5 و به روش Neighbor joining ترسیم گردید. نتایج حاصل از آنالیزهای فیلوژنی نشان داد که جدایه محللات بیشترین نزدیکی را با جدایه هند (AJ853858) به میزان ۹۹/۴٪ دارد. از طرفی شباهت دو ایزوله ایرانی به یکدیگر ۹۲/۲٪ و با سایر جدایه های موجود در بانک ژن بین ۹۰ تا ۹۹/۴٪ است. در بررسی تغییرات آمینواسیدی جدایه ها، بیشترین تغییرات در جدایه هلند مشاهده گردید. اگرچه تفاوت قابل ملاحظه ای به میزان ۹۲/۹-۶۰/۶٪ در سطح توالی های آمینواسیدی مربوط به ناحیه اینکلوزن بادی در بین کائولیموویروس ها وجود داشت.

واژه های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، واکنش زنجیره ای پلیمرز، ویروس خراشک حلقوی میخک.

مقدمه

در (Hearon, 1980; Buchen-osmond, 2006) و در کائولیموویروس ها این ساختارها لوله ای شکل می باشند (Chenault & Melcher, 1994). گاه اندازه این ویروپلاسم ها تا ۴/۵ میکرومتر می رسد و با افزایش سن آلودگی بزرگتر می شوند. وجود این ماتریکس با تراکم الکترونی بالا حاصل فعالیت ریپوزومی می باشد (Lawson & Hearon, 1980). اغلب فرم های ابتدایی تر آنها شامل نواحی کوچک با تراکم الکترونی بالا و حاشیه مشخص بوده که همراه با ریپوزوم ها و پیکره های ویروسی هستند، حال آن که اینکلوزن بادی های ویروس خراشک حلقوی میخک بیشتر شامل پیکره های ویروسی بوده و کمتر شامل ماتریکس تیره می باشد (Rubio-Huertos & Castro, 1972). تجزیه و تحلیل رایانه ای نشان داده که ششمین ORF برای کد کردن پروتئین های بزرگتر از ۱۰ کیلو دالتون توسط رشته مثبت ژنوم ویروس بکار می رود (Raikhy et al., 2006). ORF VI حداقل ناحیه حفاظت شده را (۳۷-۵٪ مشابهت در سطح آمینواسید) در بین دیگر ORF ها دارد و احتمال می رود که میزان تنوع در جدایه های ویروس در ارتباط با تشکیل اینکلوزن بادی ها باشد (Hull & Donson, 1981). همچنین احتمال می رود یک آنالوژی بین ژن ORF VI در *Caulimovirus* با برخی ویروس های جانوری بر روی میزبان، وجود داشته باشد (Sanger et al., 1991).

ویروس خراشک حلقوی میخک (*Carnation etched ring virus, CERV*)، عضو جنس *Caulimovirus* می باشد. عضو تپ این جنس ویروس موزاییک گل کلم است. ویروس های جنس کائولیموویروس دارای پیکره ایزومتریکی به قطر ۴۰-۵۰ نانومتر با ضریب رسوب S ۲۰۰-۲۵۰ هستند و شامل یک ملکول DNA دو رشته ای به وزن 5×10^6 دالتون (بطول ۷/۸-۸ کیلو جفت باز) که ۱۷٪ از وزن پیکره را شامل می شود. از دیگر مشخصات این جنس تولید اندامک های درون سیتوپلاسمی است که بطور مشخص نوعی پروتئین کد شده توسط ویروس می باشد. این اندامک ها در بافت های آلوده تولید شده و اغلب شامل پیکره های ویروس می باشند (Raikhy et al., 2006; Fujisawa et al., 1971). ژنوم کامل ویروس خراشک حلقوی میخک به طول ۷۹۳۲ نوکلئوتید و محتوی CG ۳۶/۴٪ بوده و هفت قالب خواندنی باز را کد می کند (Hull et al., 1986). ORF VI در تشکیل ماتریکس پروتئینی اندامک-های درون سلولی^۱ و تاثیر بر دامنه میزبانی و گسترده گی علائم نقش دارد. این اینکلوزن بادی ها همان ویروپلاسم^۲ هستند که شامل پیکره های بالغ ویروس بوده که در ماتریکسی با تراکم الکترونی بالا قرار گرفته اند (Lawson &

¹ Inclusion body, IB

² Viroplasm

جهت شناسایی سرولوژیکی ویروس از آزمون الایزای غیر مستقیم^۱ استفاده گردید.

آزمون الایزای غیر مستقیم

جهت بررسی وجود ویروس در نمونه ها آزمون سرولوژیکی Indirect-ELISA به روش (Martin, 1990) با استفاده از آنتی سرم چند همسانه ای CERV (تهیه شده از موسسه DSMZ, آلمان) انجام شد. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الایزا خوان (ELISA Reader, AWARENESS Tech. Inc.,) (Stat fax-2100 USA) و در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) و با استفاده از فرمول $\bar{x} + 3SD$ آستانه جذب گیاهان سالم تعیین گردیده و ارقام بالاتر از این مقدار به عنوان نمونه آلوده مشخص گردید. در این فرمول \bar{x} میانگین جذب شاهد های منفی بوده و SD انحراف معیار استاندارد بین جذب نوری آن چاهک است.

شناسایی مولکولی ویروس با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز^۲

پس از تایید آلودگی نمونه ها در آزمون الایزای غیرمستقیم، ابتدا دی.ان.ای کل گیاه استخراج و به عنوان DNA الگو مورد استفاده

این ویروس در ایران تا کنون از استان های مرکزی، خراسان رضوی و شمالی گزارش شده است (Ashnayi et al., 2012; Bayat, 2008). تنها دو گزارش از توالی نوکلئوتیدی کامل این ویروس از هلند و هند در بانک ژن به ثبت رسیده است (Raikhy et al., 2006). از آنجا که تا کنون مطالعه ای در مورد بررسی تنوع در جدایه های ایرانی این ویروس و مقایسه آن با دیگر جدایه ها انجام نشده است، لذا در مقاله حاضر تلاش ما در جهت تعیین میزان شباهت در بخشی از ترادف مربوط به ژن تولیدکننده اینکلوزن بادی و مقایسه تفاوت های آمینواسیدی در این ناحیه از چهار جدایه ویروس می باشد.

مواد و روش ها

نمونه برداری و شناسایی ویروس ها

طی بازدید از گلخانه های میخک استان های خراسان رضوی (چناران) و مرکزی (محلات) در پاییز و زمستان سال ۱۳۸۹، نمونه برداری از گیاهان میخک که دارای علائمی نظیر نقاط یا خطوط نکروز، کلروز و ابلقی بودند، انجام شد. نمونه ها در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به منظور ماندگاری طولانی مدت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

¹ Indirect-Enzyme linked immunosorbent assay (Indirect-ELISA)

² Polymerase chain reaction, PCR

documentation مشاهده شد. محصول PCR جهت تعیین ترادف به شرکت Macrogen (کره جنوبی) ارسال و با دستگاه Automatic Sequencer ABI 3730XL تعیین ترادف گردید.

آنالیز توالی

نتایج حاصل از تعیین ترادف با استفاده از نرم افزار DNA Baser مورد بررسی قرار گرفتند. توالی نهایی با برنامه BLAST³ در پایگاه اطلاعاتی NCBI بررسی شد. آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس ژن اینکلوزن بادی (IB) پس از هم ردیف‌سازی چندگانه⁴ توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های CERV با برخی جدایه‌های موجود در بانک ژن (جدول ۲) با استفاده از نرم‌افزار Mega5 نسخه β و به روش Neighbor joining، با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شد. سپس با استفاده از نرم افزار DNAMAN درصد شباهت در سطح توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به همراه ماتریس فاصله تعیین گردید.

قرار گرفت. استخراج DNA به روش ژانگ و همکاران و با استفاده از بافر¹ CTAB (Zhang et al., 1998) با اندکی تغییرات انجام شد.

برای تشخیص CERV در آزمون PCR، از یک جفت آغازگر اختصاصی IBD/ IBU (جدول ۱) که مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن کدکننده اینکلوزن بادی بودند، استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری 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 (10X)، یک میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدتری فسفات‌ها (dNTPs) (۱۰ میلی مولار) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم *Taq DNA Polymerase* (جنت بایو²، کره) با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۱۲۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۴ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه و یک مرحله نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه بود. محصول PCR، در ژل آگارز ۱/۵ درصد و بافر TAE 1X، در حضور نشانگر Gene Ruler™ (100bp DNA Ladder, Fermentase) الکتروفورز شد و نتایج با دستگاه Gel

³ Basic Local Alingment Search Tool

⁴ Multiple sequence alignment

¹ Cetyltrimethyl ammonium bromide

² Genet bio

جدول ۱- ترادف آغازگرها جهت تکثیر ژن کدکننده اینکلوزن بادی ویروس CERV

Table 1- Sequences of primers used for amplification of inclusion body gene of CERV.

منبع Reference	ترادف آغازگر (۵'-۳')	جهت Direction	آغازگر Primer
Raikhy <i>et al.</i> , 2006	TCCCCGGGGGAATGGAACGTCATGAACA	رفت Forward	CERV-IBU
Raikhy <i>et al.</i> , 2006	TCCCCGGGGGATTATTCAGAGTCTGATA	برگشت Reverse	CERV-IBD

جدول ۲- شماره دسترسی، اسامی جدایه هایی از ویروس های *Caulimoviridae* و ناحیه ی ژنوم در GenBank

Table 2- Accession number, strains of virus from *Caulimoviridae* and region of genome deposited in GenBank.

ویروس virus	جدایه Isolate	شماره دسترسی Accession No.	ناحیه ژنوم Region of genome
Carnation etched ring virus (CERV)	Netherland	NC-003498	Complete genome
Carnation etched ring virus (CERV)	India	AJ853858	Complete genome
Cauliflower mosaic virus (CaMV)	BBC	M90542	Complete genome
Cauliflower mosaic virus (CaMV)	Xinjang	AF140604	Complete genome
Cauliflower mosaic virus (CaMV)	NY8153	M90541	Complete genome
Cauliflower mosaic virus (CaMV)	CMV	M90543	Complete genome
Cauliflower mosaic virus (CaMV)	B29	X79465	Complete genome
Figwort mosaic virus(FMV)	Unknown	NC-003554	Complete genome
Dahlia mosaic virus (DMV)	Unknown	AY291588	Coat protein
Dahlia mosaic virus (DMV)	Holand	EU090955	Coat protein
Dahlia mosaic virus (DMV)	Holand	EU090952	Movement protein
Dahlia mosaic virus (DMV)	D10	HQ416675	Movement protein
Strawberry vein banding virus (SVBV)	Unknown	NC-001725	Complete genome
(Mirabilis mosaic virus (MiMV)	Unknown	NC-004036	Complete genome
Blueberry red rigspot virus (BbRSV)	Unknown	NC-003138	Complete genome
Cestrum yellow leaf curling virus (CYLCV)	Unknown	NC-004324	Complete genome
Peanut chlorotic streak virus (PCSV)	Unknown	NC-001634	Complete genome

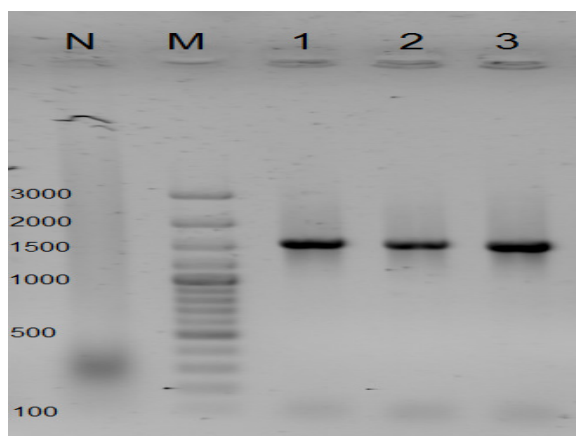
نتایج و بحث

شناسایی ویروس در آزمون الایزای غیر مستقیم از بین نمونه های مثبت در دو منطقه که از نظر جغرافیایی و آب و هوایی کاملاً متمایز بودند، دو نمونه با بیشترین غلظت ویروس ($OD=2.5$)، به عنوان نماینده ای از دو منطقه (استان خراسان رضوی و مرکزی) جهت انجام مطالعات تکمیلی انتخاب شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

به منظور شناسایی سریع و دقیق علاوه بر روش سرولوژیکی، از واکنش زنجیره ای پلیمرز استفاده گردید. DNA کل از نمونه های آلوده به ویروس، استخراج شده و با استفاده از آغازگرهای IBU و IBU (جدول ۱) قطعه ای در حدود ۱۵۰۰ bp

مربوط به ژن کدکننده اینکلوژن بادی در جدایه های دارای آلودگی از محلات (CERV-M) و چناران (CERV-Ch) تکثیر گردید که با نتایج ریخی و همکاران (Raikhy *et al.*, 2006) یکسان بود (شکل ۱). شناسایی ویروس خراشک حلقوی میخک با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز با موفقیت صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی در IBU/IBD قادر به شناسایی ویروس CERV در عصاره گیاه آلوده بوده و کاملاً اختصاصی عمل کردند، بطوری که با وجود استخراج DNA کل از بافت گیاه، پرایمرهای مربوطه باعث تکثیر ترادف های مشابه در گیاه نشدند. عدم تکثیر هیچ قطعه ای در نمونه شاهد منفی، این مطلب را تایید کرد



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ و مشاهده باندهای در محدوده تقریبی ۱۵۰۰bp مربوط به ژن کدکننده اینکلوژن بادی ویروس CERV، M-سایز مارکر ۱۰۰bp N- شاهد منفی، ۱- جدایه محلات، ۲- جدایه چناران، ۳- شاهد مثبت.

Figure 1- Gel electrophoresis of PCR products in agarose gel (1.5%) showing amplification of ~1.5 kb for inclusion body (IB) gene of CERV. Lane M, 100bp marker, lane N, negative control, lane 1, Mahallat isolate, lane 2, Chenaran isolate, lane 3, positive control.

آنالیز فیلوژنتیکی

پس از اخذ توالی، از هر دو خوانش رفت و برگشت مربوط به هر جدایه با استفاده از نرم افزار DNA Baser، دو توالی نهایی با شماره های دسترسی JX442756 و JX430793 به ترتیب مربوط به بخشی از ژن کد کننده اینکلوزن بادی در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسیدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه با استفاده از برنامه ClastalW، به ترتیب برای توالی‌های نوکلئوتیدی

و توالی‌های آمینواسیدی جدایه های مورد بررسی (جدایه چناران و محلات) با سایر جدایه‌های مربوط به این ویروس (جدایه هلند و هند) و برخی دیگر از ویروس‌های خانواده *Caulimoviridae* انجام گرفت (جدول ۲). علاوه بر مقایسه توالی نوکلئوتیدی (nt) کدکننده بین جدایه‌های مختلف CERV با هم و با دیگر کائولیموویروس‌ها، مقایسه در سطح توالی‌های آمینواسیدی (aa) نیز انجام گرفت (جدول ۳).

جدول ۳- درصد شباهت نوکلئوتیدی (اعداد بالای قطر) و آمینواسیدی (اعداد زیر قطر) بین ترادف‌های ژن اینکلوزن بادی مربوط به جدایه‌های ایرانی CERV با دیگر کائولیموویروس‌ها.

Table 3- Percent nucleotide (above diagonal) and amino acid (below diagonal) sequence similarities between inclusion body gene of different caulimoviruses inclusive of Iranian isolate.

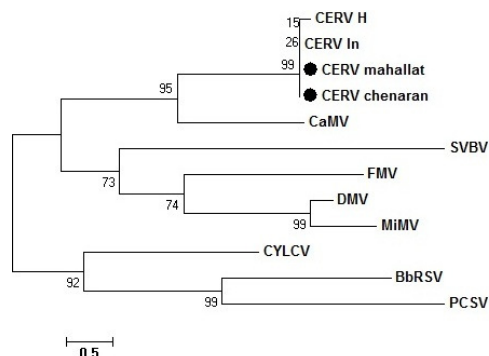
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BbRSV	x	33.5	35.9	34.8	35.8	35.6	46.7	30.1	30.7	33.2	53.2	32.3
CaMV	9.5	x	52.6	51.9	52.4	52.4	31.2	39.9	40	40.9	31.3	37.5
CERV-Mahallat	10.9	30.4	x	90.4	99.4	99.2	30.7	41.1	40.2	41.9	33.7	41.5
CERV-Holland	11.6	30.4	93.8	x	90.4	90	30.7	40.7	40.7	41.1	33.5	41.3
CERV-India	10.9	30.4	100	93.8	x	99.1	30.5	40.9	39.8	41.9	33.3	40.9
CERV-Chenaran	10.9	30.4	98.4	92.2	98.4	x	30.7	41.3	40.4	42.5	32.9	41.3
CYLCV	22.1	5.6	9.3	10.1	9.3	9.3	x	27.7	29.2	30.9	44	27.1
DMV	11.2	15.3	23.4	23.4	23.4	24.2	12.8	x	47	63.2	28.7	43.4
FMV	18.4	18.5	18.7	20.3	18.7	19.5	11.2	21.8	x	48.2	31.1	42.2
MiMV	10.4	14.5	18.5	19.4	18.5	19.4	9.6	50.4	21	x	28.7	42.6
PCSV	18.3	7.9	11.6	12.4	11.6	12.4	17.4	11.2	8.8	7.2	x	33.5
SVBV	7.9	13.6	16.1	14.5	16.1	16.9	7.9	17.6	13.6	18.4	7.1	x

به میزان ۹۲/۲٪ شباهت در سطح نوکلئوتیدی و ۹۸/۴٪ شباهت در سطح آمینواسیدی با یکدیگر

ترادف مربوط به این ژن در دو جدایه ایرانی این ویروس (JX442756 و JX430793)

(ORF VI) این مقدار تنها ۷/۱-۳۰/۴٪ می باشد که این مطلب با نتایج (Raikhy et al., 2006; Hull & Donson, 1981) مطابقت دارد. آنالیز فیلوژنتیکی براساس ژن اینکلوزن بادی (IB) پس از هم ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های CERV با برخی از ویروس‌های *Caulimoviridae* با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 و به روش Neighbour joining با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی Bootstrap انجام شد (شکل ۲). درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده، دو گروه اصلی را تشکیل داد. گروه I شامل تمام ویروس‌های جنس *Caulimovirus* بوده و گروه II شامل ویروس‌های جنس *Soymovirus* می‌باشد. در میان گروه I ویروس موزایک گل کلم (*Cauliflower mosaic virus, CaMV*) بیشترین نزدیکی را با جدایه‌های CERV نشان دادند که با نتایج ریخی و همکاران (Raikhy et al., 2006) مطابقت دارد. از بین دو جدایه ایرانی ویروس، جدایه محلات بیشترین شباهت را (۱۰۰٪ شباهت در سطح آمینواسیدی و ۹۹/۴٪ شباهت در سطح نوکلئوتیدی) با جدایه هند نشان داد و احتمال آن می رود که این جدایه از کشور هند منشاء گرفته باشد. همچنین در بین جدایه های ویروس، بیشترین تغییرات آمینواسیدی و کمترین شباهت در جدایه هلند مشاهده گردید.

نشان دادند. جدایه های ایرانی به میزان ۹۰/۴-۹۰٪ (در سطح نوکلئوتیدی) و ۹۳/۸-۹۲/۲٪ (در سطح آمینواسیدی) با جدایه هلند و به میزان ۹۹/۴-۹۹/۱٪ (در سطح نوکلئوتیدی) و ۱۰۰-۹۸/۴٪ (در سطح آمینواسیدی) با جدایه هند شباهت نشان دادند. زمانی که ORF VI جدایه های ویروس CERV با دیگر *Caulimovirus* مقایسه شد، بیشترین شباهت را در دو سطح آمینواسیدی (۳۰/۴٪) و نوکلئوتیدی (۵۲/۴-۵۱/۹٪) با ویروس موزایک گل کلم (*Cauliflower mosaic virus, CaMV*) نشان دادند. مقایسه *Caulimovirus* های مختلف با یکدیگر نشان داد که بیشترین میزان شباهت در هر دو سطح (آمینواسیدی و نوکلئوتیدی) بین دو ویروس DMV و MiMV (به ترتیب ۵۰/۴٪ و ۶۳/۲٪) وجود دارد. همچنین کمترین میزان تشابه آمینواسیدی به مقدار ۱۳/۶٪ بین SVBV و CaMV و نیز SVBV و FMV نشان داده شد. نتایج مطالعات قبلی (Ashnayi et al., 2010) بر روی نواحی حفاظت شده از ژنوم ویروس نظیر ژن پروتئین پوششی و ژن پروتئین حرکتی نشان داد که در این نواحی میزان مشابهت بین کائولیموویروس ها خصوصا در سطح آمینواسیدی رقم قابل ملاحظه ای (۶۰/۱-۵۳/۱٪) بوده، حال آنکه در ژن کدکننده اینکلوزن بادی



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن کدکننده اینکلوزن بادی CERV، با استفاده از نرم افزار MEGA 5 به روش Neighbor joining (bootstrap- × 1000) (جدایه های توالی یابی شده با علامت ● مشخص شده اند و جهت نام گسترده هر ویروس به جدول ۲ رجوع شود).

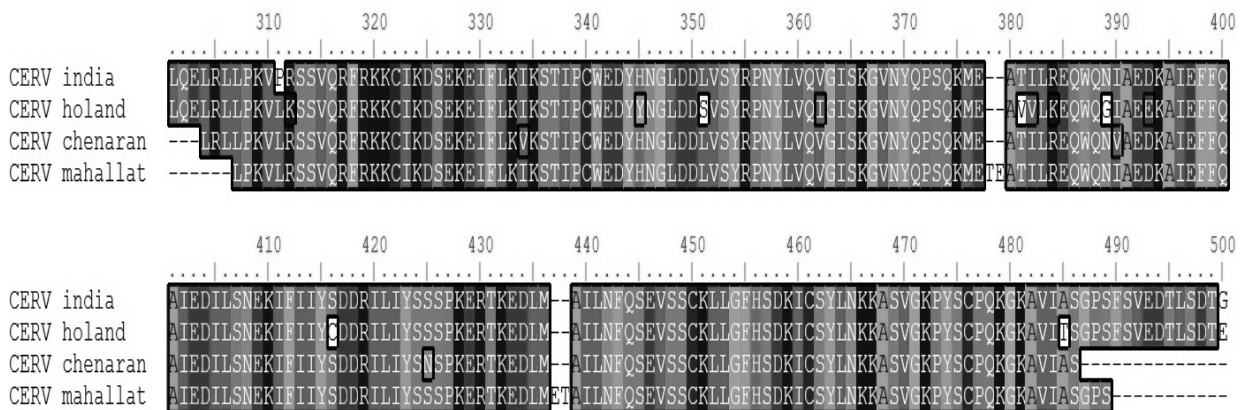
Figure 2- Phylogenetic tree drawn on the basis of nucleotide sequence of inclusion body gene of CERV, by using MEGA 5 software, neighbor-joining method (bootstrap 1000) (The isolates which have been sequenced have been marked with ● and for extent virus names refer to table 2).

می شود (Nassaj et al., 2006; Raikhy et al., 2010; Hoseini & Shamsbakhsh, 2010). بطوری که وقوع دو موتاسیون از نوع insertion در دو موقعیت از جدایه محلات ویروس CERV قابل تشخیص است (شکل ۳). اولین موقعیت بصورت (E^۳ T^۴) در موقعیت ۳۷۷ و ۳۷۸ ژن و دومین موقعیت بصورت (ET) در فاصله ۴۳۷ و ۴۳۸ ژن مشخص شد.

هم ترازوی چندگانه بین توالی آمینواسیدی جدایه های ایرانی با دو جدایه هند و هلند، نشان دهنده تغییراتی در موقعیت های خاصی از ژن اینکلوزن بادی بوده و نشان می دهد در بین جدایه های CERV بیشترین تغییرات آمینواسیدی مربوط به جدایه هلند و کمترین این تغییرات مربوط به جدایه هند می باشد (جدول ۴). وجود این تغییرات آمینواسیدی احتمالاً بدلیل وقوع موتاسیون در توالی نوکلئوتیدی می باشد، که البته گاهی این موتاسیون بصورت حذف یا افزودن یک یا چند نوکلئوتید بوده، که چنانچه مضربی از سه نوکلئوتید باشد، قاب خواندنی دست نخورده مانده و یک یا چند اسید آمینه افزوده^۱ یا حذف^۲

³ Glutamic acid
⁴ Threonine

¹ Insertion
² Deletion



شکل ۳- هم ردیف‌سازی چندگانه ترادف‌های آمینواسیدی ژن اینکلوزن بادی جدایه‌های CERV که توسط نرم افزار Bioedit ترسیم شده است.

Figure 3- Multiple alignment of amino acid sequences drawn on the basis of inclusion body gene of isolates of CERV by Bioedit software.

پوشش پروتئینی جدایه های CERV وجود دارد، این در حالی است که در مطالعه حاضر ژن کدکننده اینکلوزن بادی، حفاظت شدگی پایینی در ترادف این ژن آشکار کرد که این مطلب با نتایج ریخی و همکاران (Raikhy et al., 2006) مطابقت نشان داد.

مطالعه حاضر که اولین مطالعه مولکولی بر روی تنوع این ویروس در ایران می‌باشد، به هدف بررسی، بر روی بخشی از ژن کدکننده اینکلوزن بادی که باعث تنوع در این گروه می‌شود، انجام گرفت. مطالعات قبلی (Ashnayi et al., 2010) نشان داد که حفاظت شدگی بالایی در ناحیه

جدول ۴- تغییرات آمینواسیدی در موقعیت‌های مختلف ژن کدکننده اینکلوزن بادی از جدایه های CERV گزارش شده از ایران، هند و هلند (اسیدآمینوهای متفاوت در هر موقعیت با حروف سیاه مشخص شده است).

Table 4- Changes in amino acid at different positions of inclusion body gene encoded by CERV isolates reported from Iran, India and Holland (Different amino acids in any position have been showed in bold).

موقعیت روی ژن Position in gene	CERV_India	CERV_Holland	CERV_Chenaran	CERV_Mahallat
311	Proline پرولین	Leucine لوسین	Leucine لوسین	Leucine لوسین
312	Arginine آرژنین	Lysine لیزین	Lysine لیزین	Lysine لیزین
334	Isoleucine ایزولوسین	Isoleucine ایزولوسین	Tyrosine تیروزین	Isoleucine ایزولوسین
345	Histidine هیستیدین	Tryptophan تریپتوفان	Histidine هیستیدین	Histidine هیستیدین
351	Leucine لوسین	Serine سرین	Leucine لوسین	Leucine لوسین
362	Tyrosine تیروزین	Isoleucine ایزولوسین	Tyrosine تیروزین	Tyrosine تیروزین
378	-----	-----	-----	Threonine ترئونین
379	-----	-----	-----	Glutamic acid گلوتامیک اسید
381	Threonine ترئونین	Tyrosine تیروزین	Threonine ترئونین	Threonine ترئونین
382	Isoleucine ایزولوسین	Tyrosine تیروزین	Isoleucine ایزولوسین	Isoleucine ایزولوسین
384	Arginine آرژنین	Lysine لیزین	Arginine آرژنین	Arginine آرژنین
389	Asparagine آسپاراژین	Glycine گلیسین	Asparagine آسپاراژین	Asparagine آسپاراژین
390	Isoleucine ایزولوسین	Isoleucine ایزولوسین	Tyrosine تیروزین	Isoleucine ایزولوسین
393	Aspartic acid آسپارتیک اسید	Glutamic acid گلوتامیک اسید	Aspartic acid آسپارتیک اسید	Aspartic acid آسپارتیک اسید
416	Serine سرین	Cysteine سیستئین	Serine سرین	Serine سرین
425	Serine سرین	Serine سرین	Asparagine آسپاراژین	Serine سرین
437	-----	-----	-----	Glutamic acid گلوتامیک اسید
438	-----	-----	-----	Threonine ترئونین
481	Alanine آلانین	Threonine ترئونین	Alanine آلانین	Alanine آلانین

- Ashnayi M, Jafarpour B, Malekzadeh Shafaroudi S, Mirshamsi A (2010). Nucleotide sequence comparison of the coat protein gene and movement protein gene of Khorasan isolate of *carnation etched ring virus* with the other isolate of Genbank. proc. Of 19th Iranian plant protection congress. Volume II, July- Aug. 31-3, 2010. Tehran, Iran. pp, 744.
- Ashnayi M, Jafarpour B, Malekzadeh Shafaroudi S, Mirshamsi A, Heydarinia Z (2012). Detection of *Carnation etched ring virus* in greenhouses of Khorasan Razavi and Northern Khorasan provinces by ELISA and PCR. Journal of plant protection 26: 171-177.
- Bayat H (2008). Serological detection and prevalence of some carnation viruses in greenhouses of carnation in mahallat. proc. Of 18th Iranian plant protection congress. Volume II, Aug. 24-27, 2008. Hamedan, Iran. pp, 536.
- Buchen-Osmond C (2006). *Carnation etched ring virus*. Retrieved November 7, 2010. from <http://www.ictvdb.org/ICTVdB/00.015.0.01.003.htm>.
- Chenault K D, Melcher U (1994). Phylogenetic relationships reveal recombination among isolates of *cauliflower mosaic virus*. Journal of Molecular Evolution 39: 496-505.
- Fujisawa I, Rubio-Huertos M, Matsui C (1971). Incorporation of thymidine-H into *Carnation etched ring virus*. Plant Pathology 61: 681- 684.
- Hull R, Sadler J, 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.
- Hull R, Donson J (1981). Physical mapping of the DNAs of *Carnation etched ring* and *Figwort mosaic viruses*. Gene Virology 60: 125-134.
- Lawson R. H, Hearon S (1980). *Carnation etched ring virus* inclusion: serology and ultrastructure of alkaline-treated inclusions. Plant Pathology 70:327- 332.
- Martin R R (1990). Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens, In: ELISA methods for plant viruses. The American phytopathological society, USA.
- Nassaj Hoseini M, Shamsbakhsh M (2010). Phylogenetic analysis methods. Haghshenass publication, Rasht, pp, 5.
- Raikhy G, Hallan V, Kulshrestha S, Ram R, Zaidi A A (2006). Complete nucleotide sequence of an Indian isolate of *Carnation etched ring virus* and its homology with other caulimoviruses. Journal of Research Articles 90:176- 187.
- Rubio- Huertos M, Castro S (1972). Electron microscopy of the formation of *Carnation etched ring virus* intracellular inclusion bodies. Gene Virology 15: 257- 260.
- Sanger M, Daubert S, Goodman R (1991). The regions of sequence variation in *caulimovirus* gene VI. Journal of virology 182: 830-834.
- Zhang Y P, Uyemoto J K, 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.

Phylogenetic analysis and sequencing of inclusion body gene of two Iranian isolates of *Carnation etched ring virus*

Ashnayi M.^{*1}, Jafarpour B.², Malekzadeh-Shafaroudi S.³

^{1,2} MSc. Student and Professor, Department of Plant Protection, College of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively.

³ Assistant Professor, Department of Biotechnology and plant breeding, College of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

Abstract

Carnation etched ring virus (CERV) is a member of family *caulimoviridae*, caulimovirus genus. The virus is the second important virus after *Carnation mottle virus* to infect carnation. In order to investigate the presence of this virus in greenhouses carnation plants of Khorasan Razavi (Mashhad) and Markazi (Mahallat) provinces samples which have been showed the symptoms were collected. Primary identification of CERV tested by Indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Total DNA was extracted from fresh young leaf tissue by CTAB buffer. Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out using specific primers and fragments of 1500 bp were amplified by PCR. Comparisons were made between these isolates and related sequences of other caulimoviruses available in Genbank. The phylogenetic tree of inclusion body (IB) gene of CERV was drawn, by MEGA5 software using Neighbor joining method. The results showed that the maximum similarity of Mahallat isolate was 99.4% to Indian isolate (AJ853858). Comparison of nucleotide sequences was shown the homology of two Iranian isolates together (92.2%) and with the other isolates (90-99.4%). Maximum amino acid changes were indicated in Holland isolate. Although there was a significant difference (60.6-92.9%) in amino acid level between the sequences of the IB region of different caulimovirus.

Keywords: *Phylogenetic analysis, Polymerase chain reaction, Carnation etched ring virus.*

* Corresponding Author: Ashnayi M.

Tel: 09155515142

E-mail: m.ashnayi64@gmail.com