

## ردیابی ویروس خراشک حلقوی میخک در گلخانه‌های استان‌های خراسان رضوی و شمالی با الایزا و پی‌سی آر

مهناز آشنایی<sup>۱\*</sup> - بهروز جعفرپور<sup>۲</sup> - سعید ملک زاده شفارودی<sup>۳</sup> - امین میرشمسی کاخکی<sup>۴</sup> - زینب حیدری‌نیا<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱۲

### چکیده

به منظور شناسایی ویروس خراشک حلقوی میخک (*Carnation etched ring virus, CERV*) در پاییز ۱۳۸۸ از گلخانه‌های موجود در استان‌های خراسان رضوی و شمالی بازدید و ۲۵۰ نمونه شامل میخک (*Dianthus caryophyllus*)، قرنفل (*Dianthus barbatus*) و علف‌های هرز دارای علائم ویروسی جمع‌آوری گردید. آلودگی نمونه‌ها با آزمون سرولوژیکی (Double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) با استفاده از آنتی سرم چندهمسانه‌ای اختصاصی تعیین گردید. نتایج حاصل نشان داد که آلودگی به ویروس مذکور در مناطق نمونه برداری ۲۱/۶ درصد می باشد. جهت تکثیر و نگهداری، ویروس روی گیاهان محک *Saponaria vaccaria cv.* و *Silen armeria*، *Pink beauty* و *Dianthus caryophyllus cv. Joker* مایه‌زنی مکانیکی شد. در آزمون ردیابی CERV با استفاده از روش PCR پس از بکاربردن جفت آغازگرهای اختصاصی برای نواحی حفاظت شده از ژن پروتئین پوششی و ژن پروتئین حرکتی ویروس خراشک حلقوی میخک، به ترتیب قطعاتی به اندازه تقریبی ۱۵۰۰ و ۱۰۰۰ جفت بازی تکثیر شدند. این اولین تایید از وجود ویروس خراشک حلقوی میخک در استان‌های خراسان رضوی و شمالی می باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس خراشک حلقوی میخک، *Caulimovirus*، PCR

### مقدمه

وزن تازه محصول است (۳۰). علائم این ویروس بر روی میخک بستگی به درجه حرارت و طول دوره روشنایی متفاوت بوده و شامل حلقه‌ها، لکه‌ها و نقاط بافت مرده می‌باشد. اگرچه علائم ممکن است فصلی به نظر برسد، لیکن در سایر فصول عموماً ویروس به‌صورت بدون علامت<sup>۸</sup> بر روی میزبان بسر می‌برد (۸، ۱۹، ۲۸). همچنین علائم این ویروس ممکن است در اثر آلودگی مخلوط به ویروس ابلقی میخک و یا پیکره‌های ویروسی ناشناخته‌ای به قطر ۲۵ و ۲۹ نانومتر، تشدید شود (۱۹). دامنه میزبانی ویروس محدود به تیره میخک است (۱۴، ۲۲).

ویروس خراشک حلقوی میخک عضو جنس *Caulimovirus* و خانواده *Caulimoviridae* است (۲۳، ۱۴، ۱۶، ۲، ۳). پیکره ویروس ایزومتریکی و به قطر ۴۵ نانومتر بوده (۵، ۱۴) و تولید اندامک‌های درون سلولی سیتوپلاسمی می‌نماید (۷، ۴، ۲۷). اسید نوکلئیک ویروس یک مولکول DNA دو رشته‌ای (dsDNA)<sup>۹</sup> و عموماً به فرم خطی (۷)، به طول ۷۹۲۴ نوکلئوتید و محتوی CG

ویروس خراشک حلقوی میخک (CERV) اولین بار در سال ۱۹۶۱ توسط هولینگ و استون<sup>۶</sup> توصیف شد (۱۲). این ویروس انتشار جهانی داشته (۱۸) و تاکنون دو جدایه<sup>۷</sup> از هلند و هند از این ویروس شناسایی شده است (۱۵، ۲۵). در ایران CERV برای اولین بار توسط حسین بیات در سال ۱۳۸۷ از گلخانه‌های محلات گزارش گردید (۱). ویروس خراشک حلقوی میخک پس از ویروس ابلقی میخک بیشترین اهمیت را بر روی میخک داشته (۱۸، ۲۶) و مسئول کیفیت پایین گل‌های شاخه بریده از نظر اندازه، قدرت تولید و بعلاوه خسارت به محصول از نظر کاهش جوانه‌های جانبی و تعداد گل و نیز

۱، ۲ و ۵- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

\*- نویسنده مسئول: (Email : [m\\_ashnayi@yahoo.com](mailto:m_ashnayi@yahoo.com))

۳ و ۴- استادیاران گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

8-Symptomless  
9- Double stranded DNA

6- Holling and Stone  
7- Isolate

استاندارد و اسپری بوده و در این میان تنها ارقام برخی از میخک‌های دارای تیپ رشدی استاندارد مشخص بودند که این ارقام تجاری شامل *Salamanca*، *Eskimo mogr*®، *Mondeo kgr*®، *Prado Aquila*، *Farida Ivgr*®، *Tempo Ivgr*®، *kgr*®، *Rendez-vous Ivgr*®، *White charlotte Ivgr*®، *kgr*®، *Bright rendez-vous Ivgr*® و *Ivonne orange bogr*® بودند. تعداد نمونه‌برداری‌های انجام شده که بر اساس مشاهده علائم صورت گرفت، در مناطق مختلف متفاوت بود. جهت بررسی وجود ویروس در نمونه‌ها آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA به روش کلارک و آدامز<sup>(۶)</sup> با استفاده از آنتی سرم چند همسانه‌ای CERV (تهیه شده از موسسه DSMZ، آلمان) انجام شد. نتایج بر اساس تغییر رنگ حفرات با استفاده از دستگاه الیزا خون و در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به میزان جذب برگ سالم (کنترل منفی) و با استفاده از فرمول  $3\bar{x}$  آستانه جذب گیاهان سالم تعیین گردیده و ارقام بالاتر از این مقدار به عنوان نمونه آلوده مشخص و درصد آلودگی مناطق مختلف تعیین گردید. در این فرمول  $x$  میانگین جذب شاهد‌های منفی می باشد.

#### نگهداری و تکثیر ویروس

جهت نگهداری و تکثیر CERV از مایه‌زنی مکانیکی عصاره آلوده به ویروس با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار بر روی گیاهان محک *Silen*، *Saponaria vaccaria* cv. *Pink beauty*، *Dianthus caryophyllus* cv. *Joker*، *armeria* (Chiltern seeds- England) در مرحله ۴-۶ برگی استفاده شد.

#### شناسایی مولکولی ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز<sup>۶</sup>

نمونه‌هایی که در آزمون الیزا مثبت ارزیابی شدند برای استخراج DNA طبق روش ژانگ و همکاران (۳۱) مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت DNA استخراج شده در OD ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ (cole parmer-USA) تعیین شده و بهترین کیفیت DNA استخراج شده در واکنش PCR استفاده شد. در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز از جفت آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن کدکننده پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی ویروس که از روی ترادف جدایه هلندی ویروس خراشک حلقوی میخک (رس شمار XO4658.1) توسط ریخی و همکاران (۲۵) طراحی شده بودند، استفاده گردید (جدول ۱).

۳۶/۶ درصد (۱۵، ۲۳) و شامل شش چهارچوب باز خواندنی<sup>۱</sup> است که ORF I وظیفه کدکردن پروتئین حرکتی را به عهده داشته و ORF II باعث تولید پروتئین انتقال دهنده شته می‌شود. ORF III مسئول تولید DNA باند شده با پروتئین است که احتمالاً به‌عنوان یک کوفاکتور در انتقال شته<sup>۲</sup> عمل می‌کند. پروتئین پوششی یکی از محصولات ORF IV است که با دخالت یک آسپاراتیک پروتئاز<sup>۳</sup> تولید می‌شود، این پروتئاز یک پروتئین چند وظیفه‌ای است که توسط ORF V تولید می‌شود (۲۳). آسپاراتیک پروتئاز جزء یکی از شش گروه آنزیم‌های پروتئازی است که عمل آن تجزیه‌کردن پروتئین از محل باندهای پپتیدی می‌باشد. این آنزیم دارای دو ناحیه کاملاً حفاظت شده آسپاراتات<sup>۴</sup> در ناحیه فعال خود بوده و عموماً در pH اسیدی فعال می‌باشد. ORF VI در تشکیل ماتریکس پروتئینی اندامک‌های درون سلولی و تاثیر بر دامنه میزبانی و گسترش علائم نقش دارد (۲۵). CERV در ارتباط سرولوژیک بسیار نزدیک با ویروس موزاییک گل کلم بوده (۲۷، ۱۴) و از طریق انتقال مکانیکی، قلمه و توسط شته سبز هلو (*Myzus persica*) (۲۰، ۵، ۲۵) به‌طریق ناپایا (۲۵) یا نیمه پایا (۵) قابل انتقال است.

میخک یکی از مهم‌ترین گل‌های شاخه بریده در بین پنج گل مهم در دنیا محسوب شده (۳۰، ۲، ۱۸) و تخمین زده شده که سطح زیر کشت آن بین ۶۰۰۰ تا ۷۰۰۰ هکتار در سرتاسر جهان باشد (۱۸). با توجه به سطح زیر کشت وسیع میخک، اهمیت اقتصادی آن، خسارت شدید ویروس خراشک حلقوی میخک خصوصاً بر روی چند رقم حساس (۲۶، ۹) و عدم شناسایی مولکولی این ویروس در ایران، در تحقیق حاضر ضمن تشخیص سرولوژیکی، به بررسی مولکولی ویروس CERV در دو ناحیه نسبتاً حفاظت شده (۲۵، ۲۴)؛ یعنی ژن پروتئین پوششی و ژن پروتئین حرکتی ویروس پرداخته است.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌برداری و ردیابی ویروس در نمونه‌ها با روش الیزا

برای شناسایی CERV در پاییز و زمستان سال ۱۳۸۸ از گلخانه‌های میخک و قرنفل استان‌های خراسان رضوی (مشهد، نیشابور، سبزوار، چناران) و شمالی (بجنورد و شیروان) از گیاهان میخک، قرنفل و علف‌های هرز مجاور آن‌ها که دارای علائمی نظیر نقاط یا خطوط نکروز، کلروز، ابلقی و یا حتی بدون علائم بودند، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شدند. لازم به توضیح است که نمونه‌های میخک از دو تیپ رشدی

- 1- Open reading frame, ORF
- 2- Aphid transmission
- 3- Aspartic protease
- 4- Aspartate

5- Clark and Adams  
6- Polymerase Chain Reaction

جدول ۱- توالی و موقعیت آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده

اندازه تقریبی قطعه (bp)	موقعیت قطعه تکثیری بر اساس NC- 003498.1	ترادف آغازگر ۳'→۵'	جهت	آغازگر
bp ۱۰۰۰	۹۸۹-۳۰	TCCCCGGGGGAATGAATTCCTCTGTGTA	رفت	MPU
		TCCCCGGGGGATCATGATATATTGTTTA	برگشت	MPD
۱۵۰۰ bp	۳۳۵۶-۱۸۷۲	TCCCCGGGGGAATGAATAGAGAAGCTAT	رفت	CPU
		TCCCCGGGGGATCATTCCGATTCTTCAG	برگشت	CPD

طی نمونه‌برداری‌های انجام شده از گلخانه‌های هر دو استان خراسان رضوی و شمالی، تعداد ۵۴ نمونه (۴۸ نمونه میخک و ۶ نمونه قرنفل) از ۲۵۰ نمونه مورد آزمون، آلوده به ویروس خراشک حلقوی میخک تشخیص داده شد. آلودگی به ویروس مذکور در هر دو استان و بر روی هر دو میزبان (میخک و قرنفل) با آزمون‌های الایزا و پی سی آر مورد تایید قرار گرفت. درصد آلودگی به ویروس خراشک حلقوی در استان خراسان رضوی ۳۰/۹۸ درصد و در استان خراسان شمالی ۹/۲۵ درصد و در مجموع در هر دو استان ۲۱/۶ درصد تخمین زده شد. از این میان بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به شهرستان‌های مشهد و چناران با ۳۶/۲ درصد و نیشابور با ۵/۸ درصد بود. جهت تعیین دامنه میزبانی از علف‌های هرز رشد یافته در گلخانه‌های آلوده میخک که دارای علائم ویروسی بودند، نمونه‌برداری انجام گرفت. علف‌های هرز شامل پیچک صحرايي، پنیرک، سلمه تره، تاج خروس، کاهوی وحشی، ترشک و علف هفت بند بوده که به ترتیب مربوط به خانواده‌های *Malvaceae*، *Convolvulaceae*، *Asteraceae* و *Amaranthaceae*، *Chenopodiaceae* و *Polygonaceae* هستند.

آزمون PCR با استفاده از کیت (AccuPower PCR PreMix Kit, Bioneer- South Korea) در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل یک میکرولیتر DNA به غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، یک میکرولیتر از هریک از آغازگرها به غلظت ۱۰ پیکومول و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. برنامه دمایی PCR به وسیله دستگاه ترموسایکلر (USA) Biometra مطابق جدول شماره ۲ و ۳ صورت گرفت. محصولات PCR مربوط به هر دو ژن ویروس در ژل آگاروز ۱٪ در بافر TAE IX و با ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت ۸۰ دقیقه الکتروفورز گردید و آنگاه پس از رنگ‌آمیزی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم برمایید به غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر رنگ‌آمیزی شده و سپس در آب مقطر به مدت ۵ دقیقه رنگ‌بری انجام شد. ژل بر روی صفحه UV Transilluminator بررسی و با دستگاه (Syngene- UK) Gel documentation عکس‌برداری شد.

## نتایج و بحث

### بررسی میزان آلودگی ویروس

جدول ۲- زمان و دمای لازم برای آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای CPU/CPD

ردیف	مرحله	دما	زمان (بر حسب ثانیه)	تکرار سیکل
۱	واسرشت سازی اولیه	۹۴°C	۱۲۰	۱
۲	واسرشت سازی (Denaturing)	۹۴°C	۳۰	۳۴
۳	اتصال (Annealing)	۵۳°C	۶۰	
۴	بسط (Extention)	۷۲°C	۱۰۰	
۵	مرحله تکمیل پلیمریزاسیون	۷۲°C	۶۰۰	۱

جدول ۳- زمان و دمای لازم به منظور انجام مراحل PCR با استفاده از آغازگرهای MPU/MPD

ردیف	مرحله	دما	زمان (بر حسب ثانیه)	تکرار سیکل
۱	واسرشت سازی اولیه	۹۴°C	۱۲۰	۱
۲	واسرشت سازی (Denaturing)	۹۴°C	۳۰	۳۷
۳	اتصال (Annealing)	۵۵°C	۶۰	
۴	بسط (Extention)	۷۲°C	۱۰۰	
۵	مرحله تکمیل پلیمریزاسیون	۷۲°C	۶۰۰	۱

نتایج نشان داد که هیچ کدام از علف‌های هرز مذکور، در آزمون الایزا مثبت ارزیابی نشدند، که این مسئله با نتایج هال و دانسون (۱۴) مطابق بوده و نشان می‌دهد که دامنه میزبانی CERV محدود به خانواده میخکیان (*Caryophyllaceae*) می‌باشد.

در بین نمونه‌های مورد بررسی ارقام میخک تنها در ۳۶ نمونه مربوط به تیپ رشدی استاندارد مشخص شد، در بقیه به دلیل عدم آگاهی گلخانه‌دار، عدم ظهور گل در زمان نمونه‌برداری، رقم آن محرز نگردید. لیکن در بین ارقام مختلف نمونه‌برداری شده بیشترین آلودگی مربوط به رقم<sup>®</sup> Salamanca kgr بود که در گلخانه نیز علائم ظاهری آلودگی به ویروس در این رقم بارزتر از سایر ارقام بود. لازم به ذکر است که تا کنون مطالعه جامعی بر روی بررسی حساسیت ارقام تجاری میخک به CERV صورت نگرفته و تنها طبق بررسی ها کارت (۹) واریته "Joker" به عنوان حساس‌ترین رقم میخک به CERV عنوان شده است (۱۰).

در مورد علت پایین بودن آلودگی به ویروس خراشک حلقوی میخک در گلخانه‌های شیروان می‌توان از عواملی نظیر نوع گلخانه (هیدروپونیک یا مدرن) که بر جمعیت شته ناقل ویروس موثر می‌باشد، ارقام میخک و محل تهیه پایه‌های مادری میخک نام برد که از مهم‌ترین فاکتورهای موثر بر میزان آلودگی، در کنار شرایط محیطی حاکم بر گلخانه می‌باشند.

### بررسی خصوصیات بیولوژیکی ویروس

از تلقیح مکانیکی CERV با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار بر روی گیاهان محک *Saponaria vaccaria* cv. Pink *Dianthus caryophyllus* ، *Silen armeria* .beauty در مرحله ۴-۶ برگی، که جهت نگهداری و تکثیر ویروس استفاده شد (۲۸) پس از گذشت ۳ هفته از برگ‌های بالاتر از دو برگ تلقیح شده که دارای علائم بودند، نمونه تهیه و آلودگی آنها در آزمون PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی پروتئین پوششی، محرز شد.

علائم ظاهر شده بر روی گیاهان محک پس از تایید آلودگی با سایر منابع مطابقت داشت، به طوری که در گیاه محک *Silen armeria* ۱۴-۱۰ روز پس از مایه زنی با ویروس، علائم سیستمیک بصورت کلروز و نقاط زردرنگ، خصوصاً در برگ‌های جوان مشاهده گردید. نتایج حاصل از این مشاهدات با نتایج ها کارت (۸) در اثر آلودگی همزمان CERV با ویروس ابلقی میخک (شکل ۱- الف) مطابقت داشت. همچنین ظهور نقاط نکروز و سبزد (شکل ۱- ب) بر روی برگ‌های بالاتر از برگ‌های مایه‌زنی شده، همراه با پیچیدگی دو برگ بالاتر از برگ‌های تلقیح شده (شکل ۱- ج) در *Beauty Saponaria vaccaria* cv. Pink مشخص شد. ظهور نقوش

حلقوی یا خطی کلروتیک و گاه نکروتیک در *Dianthus caryophyllus* cv. Joker (شکل ۱- د) با علائم توصیف شده توسط هولینگ و استون (۱۲) و نیز هیرون و لاوسون (۱۱) مطابقت داشت. تمامی علائم ذکر شده در منابع در گیاهان مایه‌زنی شده مشخص نگردید، مثلاً ظهور حلقه‌های قرمز رنگ در گیاه *Saponaria vaccaria* cv. Pink Beauty مشاهده نشد، زیرا همچنان که طی تحقیقات هیرون و لاوسون (۱۱) گزارش شده است، این گیاه پس از آلودگی به CERV رنجی از علائم را نشان می‌دهد و ظهور و گسترش لکه‌های موضعی قرمز رنگ تنها در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و روشنایی فلورسنت ۲۲۵۹۶ لوکس برای ۱۶-۱۴ ساعت در روز به وقوع می‌پیوندد، به طوری که در درجه حرارت بیش از ۳۲ درجه سانتی‌گراد و روشنایی فلورسنت ۳۰۰۰۰ لوکس این لکه‌های قرمز ظاهر نمی‌شوند. از آنجا که تامین چنین شرایطی در گلخانه میسر نبود، لذا این تیپ علائم نیز ظاهر نشدند. مشاهده علائم متنوع در این گیاه پس از آلودگی ویروسی، احتمالاً به دلیل تنوع جمعیت‌های ژنتیکی گیاه، شرایط محیطی و یا وقوع تنوع<sup>۱</sup> می‌باشد. از سوی دیگر نمی‌توان ظهور این چنین علائم بر روی گیاهان محک را تنها به دلیل CERV دانست، بلکه احتمال آلودگی همزمان این ویروس با سایر ویروس‌ها خصوصاً با ویروس ابلقی میخک (*Carnation mottle virus*, CarMV) وجود دارد، همان‌طور که توسط سانچز-ناوارو<sup>۲</sup> عنوان شده است (۲۹). ها کارت نیز نشان داد که واریته "Joker" میخک، در اثر آلودگی به این دو ویروس، علائم تشدید کننده<sup>۳</sup> را نشان می‌دهد (۹).

همچنین استفاده از گیاه محک *Silen armeria* محدودیت‌هایی دارد، از جمله این که، این گیاه، یک گیاه روز بلند است که دارای مرحله رویشی نسبتاً کوتاهی است و در طی ماه‌های تابستان تولید ساقه گل دهنده می‌نماید و همین باعث می‌شود که مدت زمان حفظ ویروس در گلخانه روی این گیاه کوتاه باشد. از جانب دیگر مشاهدات ما در گلخانه نشان داد که شناسایی و تکثیر ویروس در ماه‌هایی با روزهای بلند، رضایت‌بخش‌تر است که این مشاهدات با نتایج ها کارت (۹) منطبق است.

آزمون DAS-ELISA در مورد برخی نمونه‌های مایه‌زنی شده با ویروس، کافی نبوده، لذا در واکنش PCR مربوط به همین نمونه‌ها با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی، قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۲) احتمال می‌رود که در اثر نبود یا تغییر شرایط مطلوب نظیر دما و میزان شدت روشنایی، غلظت

- 1- Variation
- 2- Sanchez- Navarro
- 3- Synergism

شناسایی این ویروس در عصاره گیاه آلوده بوده و کاملاً اختصاصی عمل کردند، به طوری که باعث تکثیر ترادف‌های مشابه در گیاه نشدند. عدم تکثیر هیچ قطعه‌ای در نمونه شاهد منفی، این مطلب را تایید می‌کند. 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 (۲۵) یکسان بود (شکل ۲). برای بررسی دقیق تر کلونینگ و توالی یابی ژن پروتئین پوششی و پروتئین حرکتی ویروس از چندین جدایه خراسان و مقایسه آن‌ها با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن، ضروری به نظر می‌رسد.

ویروس پس از مایه‌زنی در بافت گیاه کاهش یافته است، حال آنکه در روش PCR که نسبت به الایزا دارای حساسیت بیشتری است (۱۹)، ویروس در گیاه محک شناسایی شد.

#### واکنش زنجیره ای پلی مرز

استخراج DNA از نمونه‌های آلوده به ویروس CERV به روش ژانگ و همکاران (۳۱) انجام شد. بهترین کیفیت DNA استخراج شده تعیین شده (2-1.7=OD260/280) و در واکنش PCR استفاده شد. از آنجا که در روش ژانگ و همکاران Total DNA از بافت گیاه استخراج گردید، نشان می‌دهد آغازگرهای اختصاصی CPU/CPD و MPU/MPD برای CERV قادر به

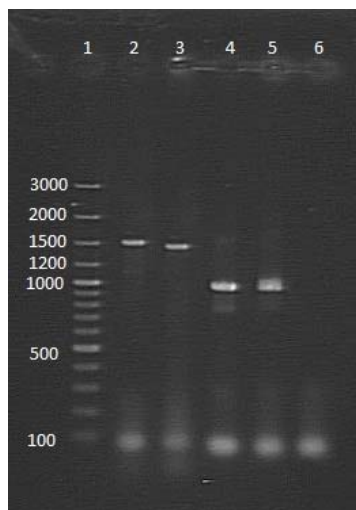


شکل ۱- الف: ظهور نقاط سبزرده در برگ‌های جوان *Silen armeria*

شکل ۱- ب: نقاط نکروز و سبزرده در *Saponaria vaccaria cv. Pink Beauty*

شکل ۱- ج: پیچیدگی دو برگ بالاتر از برگ‌های تلقیح شده در *Saponaria vaccaria cv. Pink Beauty*

شکل ۱- د: نقوش حلقوی و خطی کلروتیک در *Dianthus caryophyllus cv. Joker*



شکل ۲- 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 ۱۵۰۰bp و ۱۰۰۰bp، ۱- مارکر ۱۰۰۰bp، ۲ و ۴- ایزوله جدا شده از چناران ۳ و ۵- ایزوله جدا شده از شیروان ۶- شاهد منفی

## 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.
- ۲- جعفرپور ب. ۱۳۷۴. روش‌های تشخیص ویروس‌های گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۲۰۷ صفحه.
- ۳- جعفرپور ب و جعفرپور ب. ۱۳۸۲. ویروس شناسی گیاهی کاربردی (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۶۴ صفحه.
- ۴- ماتیوس آر. ای. اف. ۱۳۸۱. مبانی ویروس شناسی گیاهی. ترجمه ر. پورحجیم، ش. فرزادفر و ع. گلنراقی. انتشارات سامان پیشه گر. ۴۵۷ صفحه.
- 5- 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).
- 6- Clark M. F. and Adams N. A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbant assay for the detection of plant viruses. *General Virology* 34: 475-483.
- 7- Fujisawa I., Rubio-Huertos M., and Matsui C. 1971. Incorporation of thymidine-H into *Carnation etched ring virus*. *Phytopathology* 61: 681- 684.
- 8- Gosalvez-Bernal B., Garcia-castillo S., Pallas V. and 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.
- 9- Hakkaart F. A. 1968. *Silen armeria*, a test plant for *Carnation etched ring virus*. *Plant Pathology* 74: 150-158.
- 10- Hakkaart F. A., and Jordanova J. 1968. Heat treatment experiments with carnations for the elimination of carnation mottle and etched ring viruses. *Plant Pathology* 74: 146-149.
- 11- Hearon S. S., and Lawson R. H. 1981. Effect of light intensity, photoperiod, and temperature on symptom expression and virus ultrastructure in *Saponaria vaccaria* infected with *Carnation etched ring virus*. *Phytopathology* 71: 645-652.
- 12- Hollings M., and Stone O. M. 1961. *Carnation etched ring*: a preliminary report on an undescribed disease. p. 94-95.
- 13- Hsu H. T and Lawson R. H. 1985. Comparison of mouse monoclonal antibodies and polyclonal antibodies of chicken egg yolk and rabbit for assay of *Carnation etched ring virus*. *Phytopathology* 75: 778-783.
- 14- Hull R., and Donson J. 1981. Physical mapping of the DNAs of *Carnation etched ring* and *Figwort mosaic* viruses. *Gene Virology* 60: 125-134.
- 15- 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.
- 16- Kuluev B. R., Knyazev A. V., and Chemeris A. V. 2007. Activity of Promoters of *Carnation etched ring virus* and *Dahlia mosaic virus* in tobacco protoplast and transgenic plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 763-770.
- 17- Lawson R. H., and Civerolo E. L. 1977. *Carnation etched ring virus*: purification , stability of inclusions, and properties of nucleic acid. *Phytopathology* 68: 181- 188.

- 18- Lawson R. H., and Hearon S. 1980. *Carnation etched ring virus* inclusion: serology and ultrastructure of alkaline-treated inclusions. *Phytopathology* 70:327- 332.
- 19- Lawson R. H. 2005. *Carnation etched ring virus*. This is revised version of DPV 39. Available at <http://www.DPV.com> (visited 11 October 2010)
- 20- Markham P. G., and Hull R. 1985. *Cauliflower mosaic virus* aphid transmission facilitated by transmission factors from other caulimoviruses. *General Virology* 66: 921-923.
- 21- Matsura S., Hoshino S. and Harunobu K. 2006 .Verbena as a trap crop to suppress thrips-transmitted Tomato spotted wilt virus in chrysanthemum. *General Plant Pathology* 72: 180-185.
- 22- McRitchie J. J. 1980. *Carnation etched ring virus*. *Plant Pathology* 211. Available at <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/pathology/pathcirc/pp211.pdf>
- 23- Pahalawatta V., Druffel K. L., Wyatt S. D., Eastwell K. C., and Pappu, H. R. 2007. 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.
- 24- Puppa 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.
- 25- 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. *Journal of Research Articles*, 90:176- 187.
- 26- Raikhy G., Hallan V., Kulshrestha S., and Zaidia 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.
- 27- Rubio- Huertos M., and Castro S. 1972. Electron microscopy of the formation of *Carnation etched ring virus* intracellular inclusion bodies. *Gene Virology* 15: 257- 260.
- 28- 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.
- 29- Sanchez-Navarro J. A., Canizares M. C., Cano E. A., and Pallas V. 2007. Plant tissue distribution and chemical inactivation of six carnation viruses. *Crop Protection* 26: 1049-1054.
- 30- Singh H. P., Hallan V., Raikhy G., Kulshrestha S., Sharma M. L., Ram R., Garg I. D., and Zaidi A. A. 2005. Characterization of an Indian isolate of *Carnation mottle virus* infecting carnations. *Current Science* 88: 594- 60.
- 31- 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.