دانشکدهٔ کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته‌ی بیماری شناسی گیاهی

عنوان

تولید کپسید پروتئینی ویروس موزائیک خیار در باکتری *E. coli* به منظور تولید آنتی بادی نوترکیب

استاد راهنما

دکتر نعمت سخندان بشیر

استاد مشاور

دکتر محمد سعید حجازی

پژوهشگر

پرویز پیرنیاکان

شهریورماه ۸۸ شماره ۱۰۸

بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم صراط الذين أنعمت عليهم غير المغضوب عليهم ولا الضالين

نام خانوادگی دانشجو: پیرنیاکان نام: پرویز

عنوان پایان نامه:

تولید کپسید پروتئینی ویروس موزائیک خیار در باکتری *E. coli* به منظور تولید آنتی بادی نوترکیب

استاد راهنما: دکتر نعمت سخندان بشیر

استاد مشاور: دکتر محمد سعید حجازی

مقطع تحصیلی:کارشناسی ارشد رشته: مهندسی گیاهپزشکی گرایش: بیماری شناسی گیاهی

دانشگاه: تبریز دانشکده: کشاورزی تاریخ فارغ التحصیلی: ۸۸/۶/۲۸ تعدادصفحه:۹۵

کلیدواژه ها: ویروس موزائیک خیار، کپسید پروتئینی، بیان ژن، آنتی بادی.

چکیده :

ویروس موزاییک خیار (CMV) *Cucumber mosaic cucumovirus* از خانوادهٔ Bromoviridae یکی از مهمترین ویروس‌های بیمارگر کدوییان می‌باشد. جنس *Cucumovirus* از خانوادهٔ Bromoviridae دارای سه عضو، ویروس موزائیک خیار (CMV)، ویروس بی بذری گوجه فرنگی (TAV) و ویروس کوتولگی بادام زمینی (PSV) می‌باشد. CMV با پراکنش جهانی، وسیع ترین دامنه میزبانی را در بین ویروس های گیاهی داشته که در مزارع ایران نیز شیوع دارد و باعث کاهش راندمان محصول تا بیش از یک سوم می شود. استرین های ویروس موزائیک خیار در دو گروه بزرگ (I و II) قرار می گیرند که بر اساس اطلاعات سرولوژیکی، هیبریداسیون، توالی نوکلئوتید و اطلاعات پروتئین پوششی توصیف می-شوند. این دو گروه در حدود ۷۵٪ توالی نوکلئوتیدی با همدیگر مشابهت نشان می دهند، این در حالیست که این استرینها در همان زیر گروه ۹۷٪–۹۹٪ در توالی نوکلئوتیدی مشابهت دارند. این ویروس ها دارای ژنوم چند بخشی شامل سه قطعه آر. ان. ای تک رشته ای و آر. ان. ای های زیر ژنومی می باشند.RNA1 بعنوان بزرگترین قطعه بوده و دارای ۳۳۵۷ نوکلئوتید و پروتئین 1a را کد می کند. RNA2 حاوی ۳۰۵۰ نوکلئوتید و پروتئین 2a را کد می کند. پروتئین های 1aو 2a برای همانند سازی آر. ان. ای ویروسی ضروری هستند. RNA3 حاوی حدود ۲۲۰۰ نوکلئوتید و دارای دو سیسترون می باشد پروتئین 3a توسط ORF قرار گرفته در مجاورت ′۵ رمز می شود این پروتئین برای حرکت سلول به سلول در میزبان مورد نیاز است. دومین ORF موجود درRNA3، پروتئین پوششی (۲٤kDa) را کد می‌کند که در طرف ′۳

مولکول RNA3 قرار گرفته واز طریق RNA4 زیر ژنومی کد می شود. هدف این تحقیق بیان ژن پروتئین پوششی ویروس موزائیک خیار در باکتری *Escherichia coli* بدون نیاز به خالص سازی ویروس بود. تولید پادتن نوترکیب، نیاز به خالص سازی ویروس را که مستلزم وجود الترا سانتریفوژ است، مرتفع می-سازد. به منظور تولید پروتئین‌پوششی نوترکیب، قاب خواندنی شمارهٔ چهار (RNA4)، RNA سوم ویروس که پروتئین پوششی را رمزگردانی می کند به کمک دو آغازگر اختصاصی از روی cDNA کامل ویروس توسط PCR تکثیر و به حامل همسانه سازی (pTZ57R/T) متصل و در باکتری *E. coli* DH5 کلون شدند باکتری های ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب برروی محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین، IPTGو X-Gal غربال شدند و پلاسمید از آنها به روش لیز آلکالینی استخراج گردید. پلاسمید های استخراج شده با آنزیم های *Bam*HIو *Sac* I با محل اثر در دو طرف محل اتصال دی ان ای خارجی برش داده شدند، قطعه‌ی مورد نظر افزایش و به حامل بیان (pET22b(+ اتصال داده شد بود. پس از بیان پروتئین پوششی CMV در *E. coli* Rosseta اندازه‌ی آن در SDS-PAGE بررسی شد. وزن مولکولی این پروتئین در حدود ٢٤ کیلو دالتون که منهای تعداد اسیدآمینه های افزوده شده توسط حامل، با اندازه‌ی پروتئین پوششی CMV مطابقت داشت.

تقد یم به بی‌مدعی ترین

فداکارترین و بزرگوارترین انسان‌های عالم

پدر بزرگوار و فداکار

و

مادر مهربان و صبورم

تقدیر و تشکر

به نام خدایی که همه چیز از آن اوست، حتی سپاس و ستایش او که در تمام مراحل زندگی از لطف و رحمتش برخوردار بودم، پس پیشانی بر آستان عبودیتش می‌نهم و با ذره ذره وجودم خداوند را سپاس می‌گویم که این توان را به من عطا فرمود تا این دورهٔ تحصیلی را با موفقیت به پایان برسانم. بی شک تهیه این مجموعه بدون کمک و راهنمایی‌های اساتید بزرگوار و دوستان عزیزم ممکن نبود، لذا بر خود لازم می‌دانم:

از تلاش‌های استاد راهنمای بزرگوار و گرانقدر **آقای دکتر نعمت سخندان بشیر** که راهنما و مشوق بنده در انجام، تهیه و تکمیل این پایان‌نامه بودند، نهایت سپاسگزاری و قدردانی را داشته باشم. از استاد مشاور **آقای دکتر محمد سعید حجازی**، استاد فرزانه و گرانقدر که در طول تهیه این پایان‌نامه از راهنمایی‌شان بهره‌مند شده‌ام نهایت امتنان و تشکر را دارم. از جناب **آقای دکتر بهرام باغبان** که زحمت داوری پایان‌نامه را پذیرفته بودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنم. همچنین از مدیریت محترم گروه جناب **آقای دکتر غلامرضا نیکنام** و **دیگر اساتید گروه گیاهپزشکی** کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

از دوستان و همکلاسی‌های عزیزم آقایان محمد حاجی زاده، شاهین نوری نژاد، قربان مهتابی، فیروز جعفری، وحید نصرالله زادهٔ–اصل، داود کولیوند، مرتضی کامرانی، علیرضا پاشایی، علی چناری، رسول اکبری، علی قیاسی و خانمها افسانه دلپسند، اعظم هوشمند، سوسن جعفریان، آیسان قاسم زاده و دیگر دوستان گرامی که در تهیه و تدوین پایان‌نامه مرا یاری نمودند نهایت قدردانی و تشکر را دارم.

از خانواده گرامی‌ام به خصوص پدر و مادرم، که همیشه به لحاظ مادی و معنوی یاری‌رسان من بوده‌اند، نهایت قدردانی و سپاس را دارم و دستان مادر عزیزم را می‌بوسم و به روح پدر بزرگوارم درود می فرستم و از برادران عزیزم که در تمامی مراحل تحصیل یار و همکار اینجانب بوده‌اند، سپاسگزارم. این پایان‌نامه را به خانوادهٔ عزیزم تقدیم می‌نمایم.

پیرنیاکان

مهر ماه ۱۳۸۸

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و بررسی منابع ۱
۱- مقدمه و بررسی منابع ۲
۱-۱ مقدمه ۲
۱-۲- خانوادهٔ کدوییان(Cucurbitaceae) ٤
۱-۳- مشخصات ویروس موزائیک خیار ٥
۱-۳-۱- رده بندی ٥
۱-۳-۲- تاریخچهٔ شناسایی ویروس موزاییک خیار ٥
۱-۳-۳- علایم بیماری ٦
۱-۳-٤-میزبانهای تکثیری و پراکنش جغرافیایی ۷
۱-۳-٥-انتقال ۷
۱-۳-٦- ارتباط با سلولها وبافتها ۸
۱-۲-۷- جدایه های ویروس موزاییک خیار ۸
۱-٤- ساختار ژنومی وپروتئین های رمز شده ۹
۱-٥- مشخصات فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی CMV ۱۱
۱-٦- روش های ردیابی و سنجش ویروس ها ۱۲
۱-٦-۱- روش های متکی بر خصوصیات اسید نوکلئیک ویروس ۱۲
۱-٦-۲- روش های متکی بر خصوصیات پروتئین های ویروس ۱۳
۱-٦-۲-۱- پادگن ۱٤
۱-٦-۲-۲- پادتن ۱٥
۱-۷- تولید پادتن های چندهمسانه ای ۱٥
۱-۸- فناوری دی ان ای نوترکیب و پروتئینهای نوترکیب ۱٦
۱-۸-۱- روشهای وارد کردن قطعه ی مورد نظر به داخل یک حامل ۱۷
۱-۸-۱-۱- ایجاد جایگاه‌های برش آنزیمی ۱۷
۱-۸-۱-۲- حامل‌های T-A ۱۸
۱-۹- راههای وارد کردن حامل به داخل میزبان باکتریایی ۱۹
۱-۹-۱- ترانسفورماسیون ۱۹
۱-۹-۲- شوک حرارتی ۲۰
۱-۹-۳- الکتروپوراسیون ۲۰
۱-۹-٤- تفنگ ژنی ۲۰
۱-۱۰- غربال کلونی های ترانسفورم شده ۲۰

۱-۱۱- حامل های همسانه سازی ژن ۲۱
۱-۱۲- سیستم های بیان کننده ی مورد استفاده در تولید پروتئین های نوترکیب ۲۳
۱-۱۲-۱- سیستم بیان *E. coli* ۲٤
۱-۱۲-۲- حامل های بیان ژن ۲٥
۱-۱۳- برخی از استفاده های بیان ژن در باکتری در مطالعات ویروس شناسی (گیاهی) ۲۹
فصل دوم: مواد و روشها ۳۱
۲-۱- منبع ویروسی ۳۳
۲-۲- انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (پی سی آر) و بررسی نتایج آن ۳۳
۲-۳- همسانه سازی ۳٦
۲-۳-۱- اتصال محصولات پی سی آر به حامل همسانه سازی ۳٦
۲-۳-۲- سویه باکتری ۳۷
۲-۳-۳- تهیه سلولهای رقیب ۳۸
۲-۳-٤- ترانسفورماسیون سلولهای رقیب ۳۹
۲-۳-٥- غربال و انتخاب کلونی های ترانسفورم شده ٤۰
۲-٤- استخراج و آنالیز پلاسمید از کشت کلونی های ترانسفورم شده ٤۱
۲-٥- قرار دادن ژن پوشش پروتئینی ویروس CMV در وکتور pET-22b ٤۲
۲-٥-۱- استخراج قطعات ژنومی مورد نظر از ژل ٤۳
۲-٥-۲- خالص سازی قطعات دی ان ای از ژل ٤٤
۲-٥-۳- اتصال قطعات دی‌ان‌ای خالص سازی شده از ژل به حامل ٤٥
۲-٥-٤- میزبان باکتریایی ٤٦
۲-٥-٥- تهیه ی سلولهای رقیب و ترانسفورماسیون میزبان بیان ژن ٤٦
۲-٥-٦- غربال و انتخاب کلونی های واجد دی ان ای نوترکیب ٤۷
۲-٦-کشت و نگهداری باکتریها ٤۸
۲-۷- خالص سازی و تک کلون کردن کلونی های ترانسفورم شده ٤۸
۲-۸- بیان ژن نوترکیب پوشش پروتئینی CMV ٤۹
۲-۹- استخراج پروتئین از باکتری ٤۹
۲-۱۰- الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات ٥۰
۲-۱۰-۱- ژل پایینی (جدا کننده) ٥۰
۲-۱۰-۲- ژل بالایی (متراکم کننده) ٥۱
۲-۱۰-۳- رنگ آمیزی و رنگ زدائی ژل ٥۲
۲-۱۱- الایزا ٥۳
۲-۱۱-۱ انجام الایزا برای بررسی وجود خاصیت پادگنی پروتئین تولید شده ٥۳
۲-۱۱-۲- مراحل انجام TAS-ELISA ٥٤
فصل سوم: نتایج وبحث ٥٥

۳-۱- اثبات وجود ژن پوشش پروتئینی CMV در پلاسمید pTZ57R/T ۵۷
۳-۲- نتایج پی سی آر بر روی نمونه های ۳۳۷CP ۵۸
۳-۳- بررسی استخراج قطعات ژنومی مورد نظر از ژل ٦۰
۳-٤- نتایج اتصال محصول پی سی آر به حامل بیان پس از استخراج از ژل ٦۱
۳-۵- نتایج اتصال محصول پی سی آر به حامل همسانه سازی ٦۲
۳-٦- الکتروفورز پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده ٦۳
۳-۷- نتایج حاکی از آزمایش تعیین جهت قرارگیری قطعه مورد نظر در پلاسمید pTZ57R/T ٦٤
۳-۸- برش پلاسمیدpTZ57R/T استخراج شده از کلونی شماره هشت جدایه ۳۳۷CP..... ٦۵
۳-۹- استخراج قطعات مورد نظر دی ان ای از ژل..... ٦٦
۳-۱۰- نتایج اتصال ژن پروتئین پوششی CMV به حامل بیان ٦۷
۳-۱۱- بهینه سازی ترانسفورماسیون حامل بیان اتصال یافته با دی ان ای مورد نظر در باکتری *E.coli* سویه Rosseta ٦۸
۳-۱۲- نتایج حاصل از استخراج پلاسمید بیان و برش با آنزیم های محدودگر..... ٦۹
۳-۱٤- بررسی بیان ژن پوشش پروتئین ویروس CMV در سویه Rosseta از باکتری *E. coli* حاوی پلاسمید pET22b(+)CMVCP با استفاده از SDS-PAGE. ۷۲
۳-۱۵- بررسی نتایج آزمون الایزا..... ۷٤
۳-۱٦- بحث ۷۵
۳-۱۷- دستاوردها..... ۷۹
۳-۱۸- پیشنهادات..... ۸۰
منابع مورد استفاده ۸۱
ضمیمه ۸۹

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱- مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- مقدمه

گیاهان خانواده کدوییان با محصولات مورد استفاده مهم نظیر خیار، طالبی، هندوانه و کدو با اهمیت اقتصادی فراوان به طور وسیعی در شمال غرب کشور کشت می شوند. این گیاهان مورد حمله ویروس های زیادی قرار می گیرند که کوکوموویروس ها از مهمترین ویروس های آلوده کننده این گیاهان می باشند. جنس کوکوموویروسها متعلق به خانواده بروموویریده بوده و دارای سه عضو ویروس موزاییک خیار(CMV) به عنوان گونه مشخص این جنس، ویروس بی بذری گوجه فرنگی (TAV) و ویروس کوتولگی بادام زمینی (PSV) است که هر سه قادر به ایجاد بیماری روی کدوییان میباشند تمامی این ویروس ها شباهت هایی از لحاظ پیکرهٔ ویروسی،انتقال توسط ناقل و ساختار ژنومی دارند. بطوریکه ۵۵-۴۲ درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی باهم دارند ولی از لحاظ سرولوژیکی دارای تفاوت هایی هستند که این ویروس هارا از یکدیگر متمایز می سازد (Choi *et al*., 1999).

ویروس موزاییک خیار دارای ژنوم چند بخشی شامل آران ای تک رشته ای و آران ای های زیر ژنومی می باشد. CMV با پراکنش جهانی، وسیع ترین دامنه میزبانی را در بین ویروس های گیاهی داشته طبق تازه ترین تحقیقات، تعداد گونه های میزبان CMV بیش از۱۲۰۰ گونهٔ گیاهی در بیش از ۱۰۰ خانواده گیاهی بیان شده است. این ویروس در مزارع ایران نیز شیوع دارد و باعث کاهش راندمان محصول تا بیش از یک سوم می شود. ویروس موزاییک خیار دارای جدایه های زیادی است که بر طبق خصوصیات مختلف در دو زیر گروه طبقه بندی می شوند. روش‌های سرولوژیکی از متداولترین روش‌های سنجش و ردیابی ویروس‌های بیمارگر گیاهی به‌شمار می‌روند که لازمه ی

استفاده از این فنون تهیه ی پادتن علیه ویروس می باشد. از طرف دیگر برای نیل به این هدف، وجود پیکره‌های کاملاً خالص ویروسی ضروری می‌باشد (Matthews, 1991). خالص سازی ویروس با استفاده از اولتراسانتریفوژ، بدلیل هزینه بسیار بالای آن، از دست دادن مقداری از خاصیت آلوده‌کنندگی ویروس در مدت زمان کوتاه در دمای اتاق، همراهی پروتئین های غیر ویروسی (Matthewst 1991)، غلظت کم بعضی از ویروس ها در شیره‌ی گیاهی، ناپایداری در طی مراحل خالص‌سازی، عدم وجود گیاه محک برای بعضی از ویروس‌ها و مشکلات ا نتقال ویروس به گیاه تکثیری، (Abu-Javad, *et al.*, 2004) چندان مورد توجه نیست. بنابراین باید از روش های جایگزین، یعنی تولید پروتئین پوششی نوترکیب بجای ذرات ویروسی و یا تهیه تک همسانه ای، که برای تهیه آنها نیازی به خلوصیت بالای آموده ویروسی نیست، استفاده کرد.

بنابراین باید از روش‌های جایگزین، یعنی تولید پروتئین پوششی نوترکیب بجای ذرّات ویروسی و یا تهیه ی پادتن‌های تک‌همسانه‌ای، که برای تهیه ی آنها نیازی به خلوصیت بالای آموده ی ویروسی وجود ندارد، استفاده کرد (Matthews, 1991). ولی بایستی توجه داشت که تولید پادتن‌های تک‌همسانه‌ای نسبت به تولید پادتن‌های چندهمسانه‌ای مشکل، زمان‌بر و نسبتاً پرهزینه است. بعلاوه، پادتن‌های تک‌همسانه‌ای بدلیل اختصاصیت بسیار زیاد ممکن است نسبت به تغییرات ساختمانی پادگن که در اثر اتصال به سطح جامد و یا تحت شرایط دیگر در خلال سنجش بوجود می‌آید، بسیار حساس باشند. بنابراین گرچه پادتن‌های تک‌همسانه‌ای یک ابزار مناسب در بیشتر جنبه‌های تحقیقات ویروس‌های گیاهی محسوب می‌شوند، ولی بعید به نظر می‌رسد که در تمام زمینه‌ها جایگزین پادتن‌های چندهمسانه‌ای گردند (Matthews, 1991). از سوی دیگر تولید پروتئین های نوترکیب در سطح وسیع، بصورت یک روش استاندارد در آمده و از آنها در زمینه های مختلف مثل ایمیونولوژی،

مطالعات بیوشیمیایی، بررسی ساختار سه بعدی پروتئین ها، فناوری زیستی و درمانی استفاده می شود (Schumann, *et al.*, 2004). ضمناً با توجه به تلاشهای انجام یافته، تولید پروتئین پوششی نوترکیبِ دارای خاصیت ایمیوژنیکی (برانگیخته سازی سیستم ایمنی بدن مهره دار) برابر با پروتئین طبیعی مشابه و یا مرجح بر آن، بهترین روش برای تهیه ی پادتن علیه ویروس می باشد. بنابراین، در این پروژه، از بیان ژن پروتئین پوششی این ویروس در حامل همسانه سازی (pTZ57R/T) و سویه DH5α باکتری *Escherichia coli* و انتقال آن به حامل بیان (pET-22b) و سویه ی باکتریایی *E. coli* Rosseta جهت بیان آن می باشد تا بتوان در تهیه پادتن چند همسانه ای از آن استفاده کرد.

۱-۲- خانوادهٔ کدوییان (Cucurbitaceae)

گیاهان متعلق به خانوادهٔ کدوییان (Cucurbitaceae) یکی از مهمترین خانواده های گیاهی مورد مصرف انسان میباشند خانواده کدوییان به دو زیر خانوادهٔ Zanonioideae و Cucurbitoideae تقسیم میشوند وچند محصول مهم کشت شده از کدوییان در زیر خانوادهٔ Cucurbitoideae قرار دارند که شامل جنسهای زیر می باشند. خیار (*Cucumis sativus*)، طالبی (*Cucumis melo*)، هندوانه (*Citrullus unatus* Mastsum) گونه های کدو (*Cucurbita* spp.) این گیاهان از نظر اقتصادی دارای اهمیت فراوانی هستند و با تولید سالانه بیش از ٦٠ میلیون تن در حدود ١٤در صد تولید جهانی سبزیجات را به خود اختصاص داده اند در این بین هندوانه مقام سوم، خیار مقام پنجم، طالبی مقام هفتم وکدوها مقام هشتم را در بین سایر سبزیجات دارا هستند (پیوست،١٣٨٠). بر اساس گزارش سازمان خواروبارجهانی (FAO) در سال ٢٠٠٢ کشورهای چین، ترکیه، ایران وآمریکا به ترتیب عمده ترین تولید کنندگان کدوییان در دنیا می باشندو در این بین ایران مقام دوم را در تولید خیار داشته است (Robinson and Decker-Walters,1997). کدوییان از جمله گیاهان بسیار حساس به ویروسها

می باشند که مورد حملهٔ بیش از ۳۰ ویروس قرار می گیرند. وکوکوموویروس ها از مهمترین ویروسهای آلوده کنندهٔ کدوییان می باشند.

در ایران نیز خسارت بیماری حاصل ازCMV زیاد است. بطوریکه منوچهری (۱۳٤۷) در مزارع خیار میزان کاهش محصول خیار را تا یک سوم برآورد کرده است (به نقل از بهداد، ۱۳۷۵).

۱-۳- مشخصات ویروس موزائیک خیار

۱-۳-۱- رده بندی

بر اساس آخرین گزارش کمیته بین المللی رده بندی ویروس ها یا ICTV، جنس*Cucumovirus* به همراه جنس های *Alfamovirus* ، *Bromovirus* ، *Ilarvirus*و *Oleovirus* در خانواده Bromoviridae طبقه بندی می شوند.

۱-۳-۲- تاریخچهٔ شناسایی ویروس موزاییک خیار

ویروس موزاییک خیار (CMV) اولین بار در سال ۱۹۱٦به عنوان عامل ایجاد کنندهٔ موزائیک بر روی خیار و هندوانه ازایالت میشیگان آمریکا گزارش گردید. دولیتل (۱۹۱٦) برای اولین بار به توصیف مشخصات این ویروس پرداخت (به نقل از Roossinck,2001). پس از آن گزارشات مختلف از بروز بیماری در سراسر آمریکا، اروپا، آفریقا وسپس از سراسر جهان بدست آمد (Price,1934). مگی (۱۹۳۰) بیماری ناشی ازCMV را روی درختان موز گزارش نمود که باعث زردی درختان می شد واعلام نمود که بیماری کلروز موز توسط ویروس موزاییک خیار ایجاد می‌شود (به نقل از Singh *et al* ,1995). ویروس موزاییک خیار یکی از مهمترین عوامل بیماری زای برروی گیاهان جالیزی در ایران است و احتمالا از سالهای خیلی دور در ایران وجود داشته، تا اینکه در سال

۱۳٤۳ که منوچهری نمونه هایی از گیاهان آلوده را جمع آوری و به شرح آنها پرداخته است. .دانش اولین محقق در ایران بود که به بررسی سویه های ویروس موزاییک خیار از مناطق مختلف ایران پرداخته و توانسته ٦ سویه را از ایران گزارش نماید.

۱-۳-۳- علایم بیماری

CMV عضو نمونهٔ کوکوموویروسها به عنوان عضو نمونه این جنس اکثرا گیاهان بالغ را آلوده می‌سازد وکمتر اتفاق می افتد که به گیاهچه حمله کند واگر اتفاق بیفتد بوته را از بین خواهد برد. علایم بروی خیار (*Cucumis sativus*) جوانه ها بندرت در طول هفته های اول رشد آلوده می شوند و علایم مشخصی در چند روز اول آلودگی مشاهده نمی شود، ولی پس از آنکه سن گیاه در حدود ٦ هفته شد علایم مشخصی ظاهر می شوند.چهار یا پنج روز بعد از تلقیح علایم پیسک، بد شکلی، چین وچروک و موزائیک گسترده در برگها دیده می شوندو لبه های برگ شروع به پیچش به سمت پایین می کنند. در مورد خیار حالت برگ تاولی بندرت دیده می شوند و برگها اغلب دارای موزائیک هستند (Ferreira and Boley,1992). فاصلهٔ میان گرههای ساقه کوتاه ودم برگها نیز کوتاه می شوند. گیاهان آلوده گل و میوهٔ کمتری تولید می کنند.در میوه های تولید شده پس از تلقیح ویروس، نواحی سفید یا سبز رنگ پریده ظاهر می شوند که با نواحی سبز تیره ترکیب شده اند میوه های تولید شده در مراحل انتهایی آلودگی بد شکل بوده دارای نواحی بر جسته به رنگ خاکستری سفید همراه با نواحی نا منظم سبز رنگ می باشند. نواحی سبز تیره ممکن است پیشرفت کنند ومیوه ظاهر زگیل دار و مزهٔتلخی پیدا کند (Agrios,1978).

۱-۳-٤- میزبانهای تکثیری و پراکنش جغرافیایی

توتون *N. tobacum* و *N. glutinosa* و همچنین گونه های کدو، بهترین منبع برای تکثیر اکثر جدایه های CMV بوده و برای نگهداری و خالص سازی آن مناسب می باشند. ویروس موزاییک خیار (CMV) ویروسی با دامنه میزبانی وسیع است که پراکنش جهانی داشته ودر اکثر نواحی با آب وهوای گرمسیری ومعتدله وجود دارد. ویروس بی بذری گوجه فرنگی و ویروس کوتولگی بادام زمینی پراکنش کمتری نسبت به CMV دارند.

۱-۳-۵-انتقال

CMV توسط بیش از ۸۰ گونه شته متعلق به ۳۳ جنس از خانواده Aphididae و راستهٔ homoptera از گیاهی به گیاهی دیگر قابل انتقال است انتقال سریع و آسان CMV توسط شته ها از مهمترین عامل پراکنش این ویروس می باشد شایع ترین گونه های ناقل CMV شامل شته پنبه(شته جالیز)، شته سبز هلو و شته نخود فرنگی و شته اقاقی می باشد. گزارشاتی دال بر انتقال CMV به هنگام تغذیه سوسکهای خیار از گیاهان آلوده وجود دارد. ویروس موزاییک خیار توسط شته ها بطریق ناپایا از گیاهی به گیاه دیگر به آسانی قابل انتقال هستند. از خصوصیات انتقال ناپایا سرعت انتقال ویروس می باشد که در عرض چند ثانیه تا چند دقیقه عمل اخذ و انتقال ویروس انجام می‌گیرد. همچنین دورهٔ نهفتگی در ناقل وجود ندارد و نیز پس از پوست اندازی ویروس از بین می‌رود. اخذ و انتقال ویروس در عرض ۵ تا ۱۰ ثانیه تغذیه از گیاه میزبان انجام می گیرد. توانایی انتقال CMV پس از دو دقیقه رو به زوال می گذارد و معمولا در عرض چهارساعت از بین می‌رود .

انتقال CMV با بذر در بیش از ۲۰ گونه گیاهی گزارش شده است. کارآیی میزان انتقال با بذر در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت بوده و این کارآیی از ۱ تا ۵۰ درصد متغیر می باشد CMV بیشتر در

گونه های علف هرز بذر زاد است و این امر در اپیدمیولوژی ویروس از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. ویروس موزاییک خیار (CMV) به صورت مکانیکی، تماس دست و ابزار آلات کشاورزی و همچنین توسط گیاهان انگل نظیر سس به آسانی از گیاهی به گیاه دیگر قابل انتقال است.

۱-۳-٦- ارتباط با سلولها وبافتها

پیکره های CMV در همهٔ بخش های گیاه یافت می شوند وبه صورت پراکنده در سیتوپلاسم سلولها وجود دارند. پیکره های ویروس با آنکه در سیتوپلاسم، هسته و واکوئل دیده شده اند ولی در میتوکندری وکلروپلاست یافت نمی شوند. پیکره های ویروس موزاییک خیار به سختی با میکروسکپ الکترونی در بافتهای گیاهی قابل مشاهده هستند. برای اینکه پیکره ها از لحاظ اندازه و شکل ظاهری بسیار شبیه ریبوزوم ها می باشند.

۱-۲-۷- جدایه های ویروس موزاییک خیار

جدایه های CMV بر اساس خصوصیات مختلف نظیر روابط سرولوژیکی، نقشه پپتیدی پروتئین پوششی، هیبریداسیون اسید نوکلئیک و تشابه توالی نوکلئوتیدی در زیر گروه Iو II طبقه بندی شده‌اند. تحقیقات انجام یافته بروی گیاهان آلوده به جمعیت CMV در حالت طبیعی نشان داده که اکثر جدایه های ردیابی شدهٔ CMV در زیر گروه I قرار داشته اند و حتی گزارش شده که بیش از ۸۰ درصد جدایه متعلق به زیر گروه I است. تفاوت مشخصی در دامنهٔ میزبانی جدایه های متعلق به دو زیر گروه وجود ندارد ولی این دو زیر گروه از چند جهت قابل تمایزند؛ از جمله اینکه جدایه های متعلق به دو زیر گروه از لحاظ خصوصیات سرولوژیک متفاوتند.

۱-٤- ساختار ژنومی وپروتئین های رمز شده

ساختار ژنومی ویروس موزاییک خیار (شکل۱-۱) ازسه قطعه آر.ان.ای تک رشته ای با قطبیت مثبت (RNA1، RNA2، RNA3) و دو، آر.ان.ای زیر ژنومی (RNA4 ، RNA4A) تشکیل شده است.

قطعهٔ RNA1 تک ژنی بوده ودارای یک چهارچوب خواندنی (ORF) است. RNA1 جدایهٔ CMV-Fny شامل۳۳۵۷ نوکلئوتید می باشد که پروتئین 1aبه وزن مولکولی ۱۱۰ کیلو دالتون را رمز می کند، پروتئین 1a فعالیت متیل ترانسفرازی و آر.ان.ای هلیکازی دارد و جزء ضروری در همانندسازی ویروس به حساب می آید. قطعهٔ RNA2 دو ژنی بوده ودارای دو ORF است. این آر.ان.ای شامل ۳۰۵۰ نوکلئوتید می باشد که پروتئین 2a به وزن مولکولی ۹۷ کیلو دالتون را رمز می‌کند که مستقیما از RNA2 رمز می شود. در ویروس موزاییک خیار علاوه بر پروتئین 2a، قطعهٔ RNA2، پروتئین 2b به وزن مولکولی ۱۵-۱۱ کیلو دالتون را نیز رمز می کند که از RNA4A که دارای ٦٨٩ نوکلئوتید بوده و یک آر.ان.ای زیر ژنومی حاصل از RNA2 است، بوجود می آید.

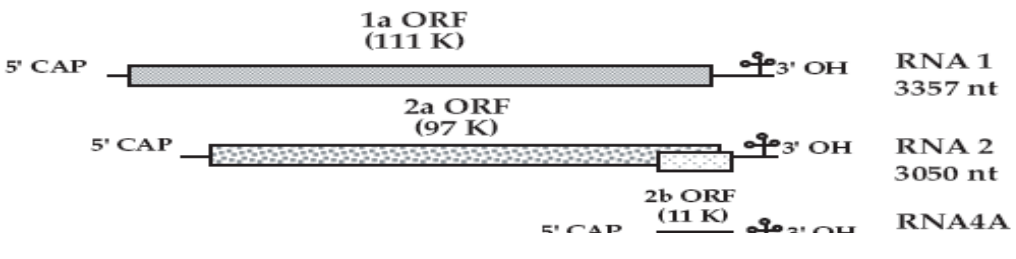
پروتئین 2a دارای توالی اسید آمینه ای حفاظت شدهٔ GDD است وبه عنوان پلی مراز ویروسی در همانند سازی ویروس نقش دارد. ژن رمز کنندهٔ پروتئین 2b در CMV کشف شده است و در انتهای ′۳ قطعهٔ RNA2 به صورت هم پوشان ولی خارج از چهار چوب خواندنی ژن رمز کنندهٔ پروتئین 2a قرار گرفته است. پروتئین 2b برای انتقال ویروس در مسافت های طولانی (از طریق آوند های آبکش) مورد نیاز است. این پروتئین همچنین به عنوان عامل موثر در شدت بیماری زائی جدایه های CMV معرفی شده است.

قطعهٔ RNA3 نیز دو ژنی بوده ودارای دو ORF می باشد. این آر.ان.ای شامل ۲۲۱٦ نوکلئوتید است و پروتئین 3a به وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون توسط ORF قرار گرفته در مجاورت ′۵ رمز می‌شود. قطعهٔ RNA3 همچنین پروتئین 3b به وزن مولکولی ۲٤/۵ کیلو دالتون را رمز می کند که این

پروتئین از RNA4 که دارای ۱۰۳۱ نوکلئوتید است و آر.ان.ای زیر ژنومی حاصل از RNA3 میباشد، رمز می‌گردد. پروتئین 3b به عنوان پروتئین پوششی در بسته بندی آر.ان.ای ویروسی نقش دارد.

مثل اغلب ویروس ها پروتئین 3a که پروتئین حرکتی نیز نامیده می شود برای حرکت سلول به سلول ویروس در میزبان مورد نیاز است. در CMV علاوه بر پروتئین حرکتی پروتئین پوششی (3b) نیز در حرکت سلول به سلول مورد نیاز می باشد. شادی و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که پروتئین حرکتی برای حرکت در مسافتهای طولانی ویروس در کدوئیان نیز ضروری است. نشان داده شده است که پروتئین پوششی کوکوموویروس ها همچنین در حرکت ویروس در مسافتهای طولانی و به طور اختصاصی در یک گیاه میزبان مشخص نقش دارد.

علاوه بر آر.ان.ای ژنومی و زیر ژنومی بعضی جدایه های CMV دارای آر.ان.ای ماهواره ای (SatRNA) نیز می باشند. آر.ان.ای ماهواره ای یک مولکول آر.ان.ای کوچک تک رشته ای است که حدود۴۰۰-۳۴۰ نوکلئوتید دارد. این آر.ان.ای کوچک هیچ چهار چوب خواندنی ORF برای رمز هیچ پروتئینی ندارد. آر.ان.ای ماهواره ای CMV تشابه چندانی با ژنوم ویروس ندارد و برای همانند سازی و انتقال خود کاملا به ژنوم ویروس کمک کننده (HV) یا CMV وابسته است. در بعضی ازمیزبانهای گیاهی آر ان ای ماهواره ا ی می تواند همانندسازی، بیماری زایی و ظهور علایم ویروس را تحت تاثیر قرار دهد.



شکل ۱-۱- ساختار ژنومی CMV (ICTV, 2002).

۱-۵- مشخصات فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی CMV

ویروس موزاییک خیار (CMV) دارای ذرات ویروسی چند وجهی به قطر ۲۹ نانومتر و بدون غلاف هستند. عدد مثلثی شدن (T) برابر ۳ می باشد وپیکره ها از ۱۸۰ زیر واحد پروتئینی تشکیل شده اند. نسبت جذب نوری در حدود ۱/۷ و نقطه خنثی سازی (ایزو الکتریک) آن درpH حدود۵/۵ می باشد.

ویروس در شیرهٔ گیاهی تقریبا ناپایدار بوده ودمای غیر فعال شدن (TIP) آن۷۰-۵۵ درجه سانتیگراد است مدت بقای ویروس در آزمایشگاه (LIV) کوتاه است و در مدت چند ساعت یا چند روز (کمتر از ۱۰روز) از دست می رود. آخرین رقتی که اگر عصارهٔ استخراج شده از گیاه به آن حد رقیق گردد هنوز قدرت آلوده کنندگی خود را حفظ می کند (DEP) ۰۰۱/ است. پیکره های CMV دارای ۸۲ درصد پروتئین هستند که پروتئین پوششی از یک نوع بوده وبه وزن مولکولی۲٤۲٤۷ دالتون می باشد. این پیکره ها دارای ۱۸درصد اسید نوکلئیک وفاقد لیپید هستند.