دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

فراوانی ویروس‌های پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند و بیان پروتئین پوششی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند

توسط:
آمنه عنابستانی

اساتید راهنما:

دکتر کرامت اله ایزدپناه

دکتر سید علی اکبر بهجت نیا

تابستان ۱۳۹۱

بسم الله الرحمن الرحيم

به نام خدا

اظهارنامه

اینجانب آمنه عنابستانی دانشجوی رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی اظهار می‌کنم که این پایان‌نامه حاصل پژوهش خودم بوده و در جاهایی از منابع دیگران استفاده کرده‌ام، نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته‌ام. همچنین اظهار می‌کنم که تحقیق و موضوع پایان‌نامه‌ام تکراری نیست و تعهد می‌نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاوردهای آن را منتشر ننموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق با آیین‌نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: آمنه عنابستانی

تاریخ و امضا: ۱۳۹۲/۴/۹

به نام خدا

فراوانی ویروس‌های پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند و بیان پروتئین پوششی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند

به وسیله‌ی:
آمنه عنابستانی

پایان نامه
ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه شیراز به عنوان بخشی
از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:
بیماری‌شناسی گیاهی

از دانشگاه شیراز
شیراز
جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی توسط کمیته پایان نامه با درجه : عالی

دکتر کرامت اله ایزد پناه، استاد بخش گیاهپزشکی (استاد راهنما) .....

دکتر سید علی اکبر بهجت نیا، دانشیار بخش گیاهپزشکی (استاد راهنما) .....

دکتر حبیب اله حمزه زرقانی، استادیار بخش گیاهپزشکی .....

دکتر علیرضا افشاریفر، دانشیار بخش گیاهپزشکی .....

مرداد ماه ۱۳۹۱

تقدیم

به پدرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم

و به مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر

و به همسرم، اسطوره زندگیم، پناه خستگیم و امید بودنم.

سپاسگذاری

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزی‌مان ساخت. از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می‌کند و سلامت امانت‌هایی را که به دستش سپرده‌اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب " من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر اللّه عزّ و جلّ" :از اساتید راهنمای عزیزم جناب آقای دکتر ایزدپناه و جناب آقای دکتر بهجت‌نیا که شاگردی در محضر ایشان برایم افتخار بزرگی بوده است، صمیمانه سپاسگزارم. از جناب آقای دکتر افشاری‌فر و جناب آقای دکتر حمزه‌زرقانی که عنوان مشاور اینجانب را داشته‌اند و از رهنمون‌های ایشان بهره جسته‌ام کمال تشکر را دارم. از دوستان و هم-کلاسی‌های خود و همکاران مرکز تحقیقات بیماری‌های ویروسی گیاهان که همواره سبب دلگرمی اینجانب بوده‌اند قدردانی می‌نمایم.

نام : آمنه **نام خانوادگی: عنابستانی**
مقطع تحصیلی:کارشناسی ارشد **رشته وگرایش: بیماری شناسی گیاهی**
استادراهنما: دکتر کرامت اله ایزدپناه و دکتر **تاریخ دفاع: ۹۱/۵/۱**
سید علی اکبر بهجت نیا

چکیده

فراوانی ویروس‌های پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند و بیان پروتئین پوششی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته چغندرقند

یک جدایه از ویروس پیچیدگی شدید بوته‌ی چغندرقند (BSCTV-IR) و ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند (BCTIRV) به عنوان عوامل پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند و گیاهان دولپه‌ای در ایران شناخته شده‌اند. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های این دو ویروس در طی فصل‌های زراعی ۸۹-۸۸ و ۹۰-۸۹ نمونه‌برداری از مزارع چغندرقند، گوجه‌فرنگی، فلفل، لوبیا، شلغم، تربچه و بادمجان پنج استان خراسان رضوی، فارس، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد و بوشهر صورت گرفت. پس از استخراج دی‌ان‌ای از بافت گیاه، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BSCTV-IR وBCTIRV، تکثیر کننده‌ی قسمتی از ژن مربوط به پروتئین پوششی، انجام شد. محصول PCR هر ویروس پس از خالص‌سازی تعیین ترادف گردید. پس از تجزیه و تحلیل ترادف‌ها و رسم درخت‌های تبارزایی، نتایج به دست آمده نشانگر واگرایی جدایه‌های BCTIRV بر اساس مکان جغرافیایی بود در حالی که جدایه‌های BSCTV-IR چنین حالتی را نشان نمی‌دادند، همچنین تنوع میزبانی بر تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها تاثیر گذار نبود. BSCTV-IR دارای دامنه‌ی میزبانی وسیع‌تری نسبت به BCTIRV بوده و میانگین آلودگی BSCTV-IR در چغندرقند کمتر از BCTIRV بود اما در گیاهان دیگر از جمله فلفل، گوجه‌فرنگی و علف‌های هرز میانگین آلودگی BSCTV-IR بیشتر بود. به منظور بررسی فراوانی دو ویروس در سه استان خراسان رضوی، فارس و بوشهر داده‌های به دست آمده از آزمون PCR با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه‌ی واریانس ناپارامتری براساس رتبه‌ی مزارع چغندرقند آلوده در منطقه‌ی بحرآباد از شهرستان جوین و در شهرستان نیشابور واقع در استان خراسان رضوی نشان داد که آلودگی به BCTIRV در این مناطق فراوان‌تر از آلودگی به BSCTV-IR می‌باشد در حالی‌که در شهرستان چناران فراوانی BSCTV-IR به طور بسیار معنی‌داری بیشتر از BCTIRV بود. بررسی‌های مشابه نشان داد که در شهرستان اقلیدو مرودشت از استان فارس تفاوت معنی‌دار در فراوانی دو ویروس دیده نمی‌شود. در استان بوشهر به علت عدم ردیابی BCTIRV در این استان نیاز به بررسی فراوانی دو ویروس وجود نداشت. این بررسی‌ها همچنان نشان داد در مزارع با سنین کمتر، BCTIRV فراوانتر از BSCTV-IR و در مزارع با سنین بیشتر BSCTV-IR فراوانتر از BCTIRV بوده است. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً BCTIRV در مزارع زودتر از BSCTV-IR ایجاد آلودگی می‌کند و به غلظت بالاتری می‌رسد، چون در شرایط مشابه باند حاصل از تکثیر ژن پروتئین پوششی BCTIRV قوی‌تر از BSCTV-IR بود. در بخش دیگری از این مطالعه به منظور بیان پروتئین پوششی BCTIRV، تکثیر چارچوب خوانش V1 به وسیله‌ی یک جفت آغازگر اختصاصی BCTIRV صورت پذیرفت. قطعه‌ی ۷۴۹ جفت بازی تکثیر یافته پس از خالص‌سازی، در ناقل بیان pQE30 همسانه‌سازی شد. پلاسمید نوترکیب به سلول‌های باکتری *E.coli* سویه‌ی M15 منتقل گردید و سلول‌های باکتری تراریخت شده توسط IPTG القا شدند. بررسی بیان پروتئین از طریق الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید حاوی SDS یک نوار پروتئین با وزن مولکولی ۳۰-۲۶ کیلو دالتون را مشخص نمود که با وزن تخمین زده شده برای محصول ژن مورد نظر تطابق داشت. آزمون آنالیز لکه‌گذاری پروتئین (وسترن بلات) با استفاده از anti-His به عنوان پادتن، صحت بیان پروتئین مورد نظر را تصدیق نمود. از پروتئین ترکیبی بیان شده می‌توان در تولید آنتی‌سرم نوترکیب برای استفاده در آزمایش‌های مولکولی و سرولوژیکی به منظور ردیابی عامل بیماری در سطح مزرعه بهره برد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه ..... **أ**

فصل دوم : مروری بر تحقیقات انجام شده **۴**

۲-۱ مشخصات عمومی تیره‌ی *Geminiviridae* **۴**

۲-۲ طبقه بندی تیره‌ی *Geminiviridae* **۵**

۲-۲-۱ جنس *Begomovirus* **۵**

۲-۲-۲ جنس *Mastrevirus* **۶**

۲-۲-۳ جنس *Topocuvirus* **۶**

۲-۲-۴ جنس *Curtovirus* **۷**

۲-۳ استراتژی همانندسازی جمینی‌ویروس‌ها **۱۳**

۲-۴ بیان ژن‌های پروتئینی جمینی‌ویروس‌ها و دیگر ویروس‌ها **۱۴**

۲-۵ سیستم QIAgene **۱۷**

۲-۶ بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند **۲۰**

۲-۶-۱ تاریخچه‌ی بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند **۲۰**

۲-۶-۲ علایم بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند **۲۰**

۲-۶-۳ دامنه‌ی میزبانی بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند **۲۱**

۲-۶-۴ خصوصیات فیزیکوشیمیایی **۲۱**

۲-۶-۵ نحوه‌ی انتقال بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند **۲۲**

۲-۶-۶ کنترل بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند **۲۳**

۲-۷ تحقیقات انجام شده در ایران **۲۵**

فصل سوم : مواد و روش‌ها ۲۷

۳-۱ بررسی تنوع ژنتیکی موجود در بین عوامل ایجادکننده‌ی بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند ۲۷

۳-۱-۱ نمونه‌برداری ۲۷

۳-۱-۲ استخراج دی‌ان‌ا از بافت گیاهی ۲۷

۳-۱-۳ آزمون زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۲۸

۳-۱-۴ تکثیرژنوم کامل جدایه‌ی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند ۳۰

۳-۱-۵ تهیه ژل و انجام الکتروفورز برای بررسی نتایج آزمون PCR ۳۱

۳-۱-۶ خالص‌سازی محصول PCR ۳۱

۳-۱-۷ تعیین ترادف ۳۲

۳-۱-۸ آنالیز ترادف‌ها ۳۲

۳-۲ محاسبه فراوانی دو ویروس BCTIRV و BSCTV-IR ۳۳

۳-۲-۱ نمونه‌برداری ۳۳

۳-۲-۲ ردیابی دو ویروس BCTIRV و BSCTV-IR در نمونه‌های جمع‌آوری شده ۳۶

۳-۳ بیان پروتئین پوششی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند ۳۶

۳-۳-۱ محیط کشت‌های موردنیاز برای همسانه‌سازی ۳۶

۳-۳-۲ طراحی آغازگر ۳۶

۳-۳-۳ تکثیر ژن پروتئین پوششی (V1) ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند ۳۷

۳-۳-۴ خالص‌سازی محصول PCR ۳۷

۳-۳-۵ هضم آنزیمی ژن پروتئین پوششی BCTIRV ۳۸

۳-۳-۶ تهیه‌ی سلول‌های مستعد (Competentcells) ۳۸

۳-۳-۷ همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی BCTIRV در ناقل pTZ57R/T ۳۹

۳-۳-۹ استخراج دی‌ان‌ای پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش جوشاندن ۴۰

۳-۳-۱۰ استخراج دی‌ان‌ای پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از Plasmid extraction kit . ۴۱

۳-۳-۱۱ بررسی وجود ژن V1 در پلاسمیدهای نوترکیب ۴۱

۳-۳-۱۲ خالص‌سازی چارچوب خوانش V1 از سازه‌ی نوترکیب pTZ57-V1 ..... ۴۱
۳-۳-۱۳ همسانه‌سازی چارچوب خوانش V1 در ناقل بیان pQE30 و تراریخت کردن سلول‌های *E.coli* سویه‌ی M15 با سازه‌ی نوترکیب ۴۲
۳-۳-۱۴ بیان پروتئین پوششی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند ۴۲
۳-۳-۱۵ الکتروفورز عمودی ژل پلی‌آکریل آمید حاوی SDS به روش Laemmeli ۴۳
۳-۳-۱۶ تجزیه‌ی لکه گذاری پروتئین(وسترن بلات) ۴۴

فصل چهارم : نتایج ۴۶
۳-۱ شناسایی BSCTV-IR و BCTIRV در میزبان‌های مختلف بر اساس علائم و ردیابی ویروس با استفاده از روش‌های مولکولی ۴۶
۳-۲ بررسی تنوع مولکولی در بین جدایه‌های ویروس پیچیدگی شدید بوته‌ی چغندرقند و ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند در ایران ۵۴
۳-۳ خصوصیات مولکولی ژنوم کامل جدایه‌ی خراسان رضوی BCTIRV(BCTIRV-Kh) ۶۲
۳-۴ پراکنش و فراوانی BSCTV-IR و BCTIRV در مناطق مختلف ایران ۶۶
۳-۴-۱ بررسی پراکنش وتعیین برخی میزبان‌های BCTIRV و BSCTV-IR ۶۷
۳-۵ بیان پروتئین پوششی جدایه‌ی خراسان رضوی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند ۷۴
۳-۵-۱ تکثیر ژن پروتئین پوششی BCTIRV ۷۴
۳-۵-۲ همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی BCTIRV و هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب ۷۴
۳-۵-۳ بیان پروتئین پوششی BCTIRV و تأثیر زمان القا بر راندمان بیان ۷۶
۳-۵-۴ بررسی صحت بیان پروتئین ترکیبی His-BCTIRV-V1 بااستفاده از روش لکه گذاری پروتئین (وسترن بلات) ۷۸

فصل پنجم : بحث و نتیجه‌گیری ۷۹

۵-۱ عوامل ایجادکننده‌ی بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند و برخی میزبان‌های آن‌ها در ایران ۷۹
۵-۲ تنوع ژنتیکی موجود در بین جدایه‌های BSCTV-IR و BCTIRV در ایران ۸۰
۵-۳ وضعیت تاکسونومیکی BCTIRV-Khorasan ۸۱
۵-۴ پراکنش و فراوانی دو ویروس BSCTV-IR و BCTIRV ۸۳
۵-۵ بیان پروتئین پوششی جدایه‌ی خراسان رضوی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند ۸۵

فهرست منابع ۸۶

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱ سازمان ژنومی کورتوویروس‌ها..... ۱۲

شکل۲-۲: طرح شماتیک سازه‌ی بیان QIAgene. PT7..... ۱۷

شکل ۱-۳: نحوه‌ی بیان پروتئین هدف..... ۱۹

شکل ۳-۱ مناطق نمونه برداری شده در استان خراسان رضوی..... ۳۴

شکل ۳-۲ مناطق نمونه برداری شده در استان بوشهر..... ۳۵

شکل ۳-۳ مناطق نمونه برداری شده در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد..... ۳۵

شکل ۴-۱ علائم بارز بیماری پیچیدگی بوته چغندرقند در گیاه چغندرقند..... ۴۷

شکل۴-۲ علائم بیماری پیچیدگی بوته درگوجه فرنگی..... ۴۹

شکل ۴-۳ علائم بیماری پیچیدگی بوته در فلفل..... ۵۰

شکل ۴-۴ نقوش الکتروفورزی محصولات PCR شامل بخشی از پروتئین پوششی تکثیر شده BSCTV-IR.. ۵۲

شکل ۴-۵ نقوش الکتروفورزی محصولات PCR شامل بخشی از پروتئین پوششی BCTIRV..... ۵۳

شکل۴-۶ دندروگرام رابطه‌ی جدایه‌های ویروس پیچیدگی شدید بوته‌ی چغندرقند جمع‌آوری شده از میزبان‌ها و مناطق مختلف ایران..... ۵۶

شکل ۴-۷ دندروگرام رابطه‌ی جدایه‌های ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند استان خراسان رضوی BSCTV-IR..... ۵۷

شکل ۴-۸ دندروگرام رابطه‌ی جدایه‌های ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند استان کرمانشاه..... ۵۸

شکل ۴-۹ دندروگرام رابطه‌ی جدایه‌های ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند استان فارس..... ۵۹

شکل ۴-۱۰ دندروگرام رابطه‌ی جدایه‌های ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند استان کهگیلویه و بویراحمد..... ۶۰

شکل ۴-۱۱ دندروگرام رابطه‌ی جدایه‌های ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند با سایر جدایه‌های این ویروس و سایر گونه‌های جنس *Curtovirus*..... ۶۱

شکل ۴-۱۲ سازمان ژنوم BCTIRV-Khorasan..... ۶۳

شکل ۴-۱۳ نقشه‌ی پراکنش جغرافیایی ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند (BCTIRV)، ویروس پیچیدگی شدید بوته‌ی چغندرقند (BSCTV-IR) و آلودگی‌های مخلوط این دو ویروس در ایران..... ۶۹

شکل ۴-۱۴ نمایش درصد آلودگی به BCTIRV..... ۷۰

شکل ۴- ۱۵ نمایش درصد آلودگی به BSCTV-IR..... ۷۰

شکل۴-۱۶ فراوانی دو ویروس BSTIRV و BSCTV در گیاهان چغندرقند از استان خراسان..... ۷۱

شکل ۴-۱۷ فراوانی دو ویروس BSTIRV و BSCTV در گیاهان چغندرقند مناطق اقلید و مرودشت استان فارس..... ۷۲

شکل ۴-۱۸ مقایسه‌ی فراوانی دو ویروس BSTIRV و BSCTV-IR در گیاهان چغندرقند و گوجه‌فرنگی از استان فارس..... ۷۳

شکل ۴-۱۹ مقایسه‌ی فراوانی دو ویروس BSTIRV و BSCTV-IR در گیاهان چغندرقند و گوجه‌فرنگی از استان خراسان رضوی..... ۷۳

شکل ۴-۲۰ قطعه‌ی ۷۵۰ جفت‌بازی تکثیر یافته مربوط به چارچوب خوانش کدکننده‌ی پروتئین پوششی BCTIRV..... ۷۴

شکل ۴-۲۱ نقوش الکتروفورزی هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57-V1 و pQE30-V1 با آنزیم‌های برشی *Hin*dIII/*Bam*HI..... ۷۵

شکل ۴-۲۲ الکتروفورزعمودی پروتئین کل استخراج شده ازسویه‌ی M15 باکتری *E.coli*..... ۷۷

شکل۴-۲۳ نتیجه‌ی آزمون وسترن‌بلات پروتئین کل سلول‌های باکتری *E.coli* تراریخت شده با پلاسمید نوترکیب pQE30-BCTIRV V1 با استفاده از پادتن anti-His (anti-His antibody, Qiagen)..... ۷۸

فهرست جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول ۳-۱ نوع و مقدار مواد مورد استفاده در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۲۸

جدول ۳-۲ آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ی ۴۹۵ جفت بازی پروتئین پوششی BSCTV-IR..... ۲۹

جدول ۳-۳ آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ی ۶۷۲ جفت بازی از پروتئین پوششی BCTIRV..... ۲۹

جدول ۳-۴ آغازگرهای عمومی مورد استفاده برای تکثیر قسمتی از ژن کدکننده‌ی پروتئین پوششی کورتوویروس‌ها ۲۹

جدول۳-۵ سیکل دمایی واکنش PCR برای آغازگرهای جدول ۳-۲ ..... ۲۹

جدول۳-۶ سیکل دمایی واکنش PCR برای آغازگرهای جدول ۳-۳ ..... ۳۰

جدول ۳-۷ آغازگرهای موجود بر روی رشته مکمل، مورد استفاده برای تکثیر ژنوم کامل BCTIRV ۳۰

جدول ۳-۸ آغازگرهای موجود بر روی رشته ویروسی، مورد استفاده برای تکثیر ژنوم کامل BCTIRV..... ۳۱

جدول ۳-۹ مشخصات کورتوویروس‌های مورد استفاده در درخت‌های تبارزایی ۳۳

جدول ۳-۱۰ خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن پروتئین پوششی BCTIRV ۳۷

جدول ۳-۱۱ سیکل دمایی واکنش PCR برای تکثیر پروتئین پوششی BCTIRV ۳۷

جدول ۳-۱۲ مواد مورد نیاز جهت هضم آنزیمی ژن پروتئین پوششی BCTIRV با آنزیم *Bam*HI..... ۳۸

جدول ۳-۱۳ مواد مورد نیاز جهت هضم آنزیمی ژن پروتئین پوششی BCTIRV با آنزیم *Hind*III..... ۳۸

جدول ۳-۱۴ مواد مورد نیاز جهت واکنش چسباندن چارچوب خوانش V1 ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند به pTZ57R/T ۳۹

جدول ۴-۱ نتایج بررسی نمونه‌های گیاهی از نظر آلودگی به BCTIRV و BSCTV-IR از مناطق مختلف کشور ۴۸

جدول ۴-۲ اندازه‌ی ژنوم و جایگاه دقیق چارچوب‌های خوانش جدایه‌ی خراسان ویروس ایرانی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند (BCTIRV-Khorasan) ۶۳

جدول ۴-۳ درصد تشابه (محورافقی) و درصد اختلاف (محورعمودی) ژنوم کامل جدایه‌ی خراسان رضوی BCTIRV با دیگر جدایه‌های بانک ژن ۶۴

جدول ۴-۴ درصد تشابه (محورافقی) و درصد اختلاف (محورعمودی) چارچوب خوانش V1 جدایه خراسان رضوی BCTIRV با دیگر جدایه‌های بانک ژن..... ۶۴

جدول ۴-۵ درصد تشابه (محورافقی) و درصد اختلاف (محورعمودی) چارچوب خوانش V2 جدایه خراسان رضوی BCTIRV با دیگر جدایه‌های بانک ژن ۶۵

جدول ۴-۶ درصد تشابه (محورافقی) و درصد اختلاف (محورعمودی) چارچوب خوانش V3 جدایه خراسان رضوی BCTIRV با دیگر جدایه‌های بانک ژن ۶۵

جدول ۴-۷ درصد تشابه (محورافقی) و درصد اختلاف (محورعمودی) چارچوب خوانش C1 جدایه خراسان رضوی BCTIRV با دیگر جدایه‌های بانک ژن ۶۶

جدول ۴-۸ درصد تشابه (محورافقی) و در صداختلاف (محورعمودی) چارچوب خوانش C2 جدایه خراسان رضوی BCTIRV با دیگر جدایه‌های بانک ژن ۶۶

جدول ۴-۹ نوع و تعداد گیاهان مورد بررسی و آلوده به BSCTV-IR و BCTIRV در مناطق و گیاهان مختلف ۶۸

جدول ۴- ۱۰ مقایسه‌ی درصد آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از میزبان‌های BCTIRV و BSCTV-IR در این مطالعه ۷۱

جدول ۵-۱ میزبانان طبیعی BSCTV-IR و BCTIRV ۸۰

فصل اول : مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) گیاهی دولپه و دو ساله از تیره‌ی Chenopodiaceae است که اهمیت اقتصادی آن به دلیل خاصیت منحصر به فرد آن در تولید مقادیر زیاد قند می‌باشد (Whitney and Duffus, 1986). سطح زیر کشت این گیاه در ایران بر طبق آمارهای وزارت جهاد کشاورزی در سال ۸۸-۱۳۸۷ حدود ۵۶ هزار هکتار برآورد شده است. از جمله مهمترین استان‌های زیر کشت این محصول آذربایجان غربی، فارس، کرمانشاه، سمنان، خراسان و اردبیل است که در این بین استان خراسان رضوی با ۳۵/۳۴ درصد بیشترین سطح را به خود اختصاص داده است (آمارنامه کشاورزی، محصولات زراعی سال ۸۸-۱۳۸۷).

بیماری‌های بسیاری این محصول را تحت تاثیر قرار می‌دهد از جمله، بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند (curly top disease) که از مهمترین بیماری‌های ویروسی محدود کننده‌ی کشت آن به حساب می‌آید. وجود این بیماری در ایران اولین بار در سال ۱۳۴۶ گزارش شد (ایزدپناه، ۱۳۴۶؛ Gibson,1967). بنا بر گزارش ایزدپناه در سال‌های پیش از ۱۳۴۶ این بیماری ندرتاً در مزارع چغندرقند استان فارس یافت می‌شد، اما در آن سال شدت بیماری چنان بوده که برخی از مزارع تا ۹۰ درصد و حتی بیشتر دچار آلودگی شده‌اند (ایزدپناه، ۱۳۴۶). از آن زمان تاکنون چندین بار زراعت چغندرقند کشور به وسیله‌ی این بیماری مورد تهدید واقع شده است. این بیماری در مدت کوتاهی به سرعت در یک منطقه پخش می‌شود و این به دلیل کوتاه بودن دوره‌ی تولید مثل زنجرک ناقل و توانایی تغذیه‌ی زنجرک از گونه‌های متنوع گیاهی است (Magyarosy and Duffus, 1977)، همچنین دامنه‌ی میزبانی وسیع و فراوانی زنجرک ناقل مدیریت بیماری را مشکل ساخته است (Creamer *et al*., 1996).

از جمله علایم بیماری پیچیدگی بوته چغندرقند لوله شدن برگ‌های جوان داخل بوته به سمت بالا است. رگبرگ‌های فرعی متورم شده و روی آن‌ها در سطح زیرین برگ‌ها برآمدگی-هایی به وجود می‌آید و برجستگی‌های ۱ تا ۲ میلی‌متری تشکیل می‌گردد. گاهی در سطح زیرین برگ‌های آلوده روی رگبرگ اصلی قطرات چسبنده و شفافی دیده می شود که پس از چندی سیاه رنگ شده و تشکیل یک لایه را می‌دهد. در برش عرضیِ ریشه‌ی چغندر آلوده حلقه‌های متحدالمرکزی به رنگ تیره دیده می‌شود که در برش طولی این دوایر به صورت نوارهای طولی مشاهده می‌گردد (Bennett, 1971).

عامل بیماری به طور کلی توسط چندین گونه متعلق به تیره‌ی *Geminiviridae* و جنس *Curtovirus* از جمله *Beet curly top virus* (BCTV)، *Beet severe curly topvirus* (BSCTV)، *Beet mild curly top virus* (BMCTV)، *Spinach curly top virus* (SCTV)

و *Pepper curly top virus* (PCTV) (Stanly *et al*., 2005; Brown*et al*., 2012) *Beetcurly top Iran virus* (BCTIRV) (Bolok Yazdi *et al*.,2008; Brown*et al*.,2012) ایجاد می‌شود. میزبان‌های این ویروس‌ها شامل ۳۰۰ گونه از ۴۴ تیره‌ی گیاهی است که مهمترین آن‌ها چغندرقند، فلفل و گوجه فرنگی می‌باشد (Bennett, 1971).

این ویروس‌ها دارای ژنوم دی‌ان‌ای تک‌لای حلقوی می‌باشند که در دو پیکره‌ی بیست وجهی ناقص چسبیده به هم (دو قلو) قرار گرفته است. این ویروس‌ها در هسته‌ی سلول گیاه میزبان از طریق تولید دی‌ان‌ای دولای حد واسط همانندسازی می‌کنند. این دی‌ان‌ایِ یک بخشی شامل دو رشته‌ی ژنومی و مکمل می‌باشد که سه چارچوب خوانش V1، V2و V3 روی رشته‌ی ژنومی و چهار چارچوب خوانش دیگر یعنی C1، C2، C3و C4 بر روی رشته‌ی مکمل قرار دارد (Rojas *et al*., 2005; Brown*etal*., 2012). البته گونه‌ی جدید BCTIRV فاقد چارچوب‌های ژنی C3و C4 است (Bolok Yazdi *et al*., 2008).

ویروس‌های پیچیدگی بوته‌ی چغندر محدود به آوند آبکشی بوده و انتقال مکانیکی آن‌ها به راحتی صورت نمی‌گیرد. انتقال آن‌ها از طریق بذر نیز امکان‌پذیر نمی‌باشد اما به طور موثری توسط زنجرک‌های برگی از جمله *Circulifer tenellus* و یا *C.haematoceps* منتقل می‌شوند. در سال‌های اخیر اپیدمی شدید بیماری پیچیدگی بوته در بسیاری از نقاط ایران مشاهده شده است و آلودگی ۱۰۰٪ در مزرعه یک امر عادی به حساب می‌آید. این بیماری در حال حاضر علاوه بر فارس در استان‌های تهران، یزد، اصفهان ، کرمان، بوشهر و خراسان نیز دارای اهمیت اقتصادی می‌باشد (Bolok Yazdi*et al*., 2008).

برای مدیریتِ یک بیماری خاص از جمله بیماری پیچیدگی بوته چغندرقند ابتدا نیاز به شناخت عامل و یا عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری است و باید اطلاعاتی درباره‌ی روش بیماری-زایی، دامنه‌ی میزبانی، ناقل، نحوه‌ی بقای عامل بیماری در صورت نبود میزبان، استرین‌ها و واریانت‌های غالب در مزرعه در اختیار باشد تا بتوان با کمک این اطلاعات راهکاری مناسب برای مقابله با آن در نظر گرفت.

در ارتباط با ویروس‌های ایجاد کننده‌ی پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند در ایران هنوز ابهاماتی وجود دارد به عنوان مثال این که ویروس غالب در مزارع چغندرکاری ایران کدام گونه از گونه-های ایجاد کننده‌ی بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندر است؟ دیگر این که دامنه‌ی میزبانی و خسارت این ویروس‌ها به دیگر محصولات زراعی به طور کامل مشخص نشده است. بر اساس تحقیقات متعدد میزبانان وحشی و بعضی از گیاهان زراعی نقش مهمی در پایداری این ویروس و زنجره‌ی ناقل آن دارند، شناسایی این گیاهان می‌تواند کمک موثری در کاهش آلودگی به این ویروس باشد. از این نظر طی این مطالعه نسبت به تعیین فراوانی ویروس‌های ایجاد کننده‌ی بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندر در چغندرقند و گوجه فرنگی‌کاری‌های استان‌های خراسان،

فارس، بوشهر و کهگیلویه و بویراحمد، تنوع ژنتیکی این ویروس‌ها از طریق تعیین ترادف نوکلئوتیدی آن‌ها و تفاوت در دامنه میزبانی آن‌ها اقدام می‌شود.

از طرف دیگر برای مدیریت بهتر بیماری پیچیدگی بوته‌ی چغندرقند، نیاز به روشی ساده برای شناسایی و تشخیص عامل بیماری از سایر عوامل وجود دارد که در صورت تولید آنتی‌سرم نوترکیب با استفاده از پروتئین بیان شده در سیستم باکتریایی و استخراج آن می‌توان روشی ساده برای شناسایی این عامل از طریق آزمون الیزا فراهم کرد. بدین منظور در بخش دیگر این تحقیق نسبت به همسانه سازی ژن مرتبط با پروتئین پوششی BCTIRV در یک ناقل و بیان این پروتئین در سیستم باکتریایی *Escherichia coli* اقدام خواهد شد.

فصل دوم : مروری بر تحقیقات انجام شده

۲-۱ مشخصات عمومی تیره‌ی *Geminiviridae*

امروزه جمینی‌ویروس‌ها با سرعت بسیار زیادی به یکی از مهمترین بیمارگرهای گیاهی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری تبدیل شده‌اند. این پدیده به علت پدیدار شدن سویه‌های جدید این ویروس‌ها، فراوانی و تنوع در بیوتیپ‌های ناقل آن‌ها، مقاومت ناقلین به حشره‌کش‌ها و گرم شدن زمین در سال‌های اخیر می‌باشد (Seal *et al*., 2006). از طرف دیگر ژنوم دی‌ان‌ای کوچک آن‌ها و اتکای زیاد به ماشین بیوسنتز میزبان، این ویروس‌ها را به عنوان سیستم‌های مدل برای مطالعه‌ی همانندسازی دی‌ان‌ای و بیان ژن ایده‌آل می‌سازد. جمینی‌ویروس‌ها همچنین دارای پتانسیل قابل توجهی به عنوان ناقلین برای بیان ژن‌های خارجی در گیاهان دارند. بنابراین به علت ایجاد بیماری‌های گیاهی مهم توسط این ویروس‌ها، بیولوژی مولکولی گیاه و بیوتکنولوژی گیاهی، جای تعجب ندارد اگر این ویروس‌ها موضوع تحقیقات گسترده در سطح جهانی باشند (Bisaro, 1996).

جمینی ویروس‌ها در سال ۱۹۷۸ توسط کمیته بین‌المللی تاکسونومی ویروس‌ها بر اساس مورفولوژی منحصر به فرد ویریون و ویژگی دی‌ان‌ای تک لا توصیف شدند (Matthews, 1979).این تیره شامل ویروس‌های ایزومتریک به قطر ۲۰ نانومتر است که پیکره‌های آن‌ها اغلب به صورت دوقلو به هم چسبیده‌اند. هر جزء پیکره دارای ۱۱۰ زیرواحد از پروتئین پوششی سازمان یافته در ۲۲ کپسومر است. نام جمینی‌ویروس نخستین بار توسط Harrison و همکارانش در سال ۱۹۷۷ به منظور توصیف پیکره‌های کوچک ۲۰ وجهی دوقلوی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. دی‌ان‌ای جمینی‌ویروس‌ها کوچکترین مولکول‌های نوکلئیک اسید در بین ویروس‌هایی است که به صورت خودگردان همانندسازی می‌کنند. جمینی‌ویروس‌ها دارای ژنوم یک یا دو بخشی به صورت دی‌ان‌ای تک لای حلقوی هستند که اندازه هر کدام ۳-۲/۵ کیلو باز می‌باشد. (Harrison, 1985; Hanley-Bowdoin *et al*., 1999; Zhang*et al*., 2001;Rojas *et al*., 2005; Brown *et al*., 2012). ناقلین طبیعی این ویروس‌ها سفیدبالک، زنجرک‌های برگی یا یک گونه زنجرک درختی می‌باشند. همچنین دامنه‌ی میزبانی اعضای این تیره شامل گیاهان تک لپه و دو لپه است (Harrison, 1985).