دانشکده علوم کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

(بیماری‌شناسی گیاهی)

عنوان:

از:

مریم ارمندپور

استادان راهنما:

دکتر سید علی الهی نیا و دکتر رضا پوررحیم

آذر ۱۳۹۰

تقدیم به بی‌بهانه ترین دلیل‌های زندگیم:

پدر دلسوز و گرانقدر و مادر عزیزم، خواهر و برادر مهربانم و همسر بردبارم که همیشه حامیان من بوده‌اند و در جهت رشد و تعالی من برای نیل به بهترین‌های زندگی‌ام بی دریغانه تلاش نموده‌اند.

تقدیم به آنان که دعای خیرشان بدرقه ی راهم بود. تقدیم به آنان که در راه کسب علم و معرفت برای من آنچه در توان داشتند انجام دادند. تقدیم به آنان که مشوق راه دانشم بودند و تقدیم به آنان که در رهگذر عمر یاری گر و دلگرمی من بودند.

خدایا به من دانشی عطا فرما تا بدانم عقل، راه نیست بلکه چراغ راه است و

هر چند چراغی بدست داشته باشم تا نروم به مقصد نرسم.

دانشکده علوم کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان:

ردیابی و تعیین پراکنش سه ویروس مهم موزاییک یونجه، موزاییک زرد لوبیا و موزاییک خیار بیماریزای شبدر در استان گیلان

از:

مریم ارمندپور

استادان راهنما:

دکتر سید علی الهی نیا و دکتر رضا پوررحیم

آذر ۱۳۹۰

سپاس خدای را که بر نعمت و رحمت بیکرانش توان شکر نیست

اکنون که با لطف و عنایت خداوند متعال و تلاش و راهنمایی‌های اساتید محترم، تحقیق خود را به پایان رسانیده‌ام بر خود لازم می‌دانم مراتب سپاس و تقدیر خود را نسبت به صاحبنظران و بزرگوارانی که با پیشنهادات و هدایت‌های خود همواره راهنما و سبب دلگرمی من در تمام طول مسیر بودند داشته باشم.

در ابتدا از پدر و مادر عزیزم که همواره حامی و مشوق من در جهت قراگیری علم و دانش بوده‌اند و همچنین همسر بردبارم که سبب دلگرمی من بودند، سپاسگزارم.

با تقدیم سپاس فراوان از اساتید راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر رضا پور رحیم و دکتر سید علی الهی نیا که خالصانه با تمام وجود جهت انجام هر چه بهتر تحقیق فوق راهنمایی‌ام نمودند و بی‌دریغانه با صبر و شکیبایی یاور و راهنما من بودند و برای بالا بردن تجارب و دانش من نقش بسیار ارزنده‌ای ایفا نمودند صمیمانه سپاسگزارم و از خداوند منان سلامت و موفقیت روزافزون برایشان آرزو می‌نمایم.

از اساتید مدعو جناب آقای دکتر احمد روحی بخش و سرکار خانم دکتر صدیقه موسی نژاد بخاطر قبول زحمت بازخوانی پایان نامه و ذکر رهنمودها و نقطه نظرات ارزنده‌اشان بی نهایت سپاسگزارم.

از سرکار خانم دکتر شیرین فرزادفر که به همراه همسر محترمشان جنای آقای دکتر پور رحیم که بی دریغانه در انجام هر چه بهتر این پروژه یاری‌گر من بودند کمال سپاسگزاری را دارم و برایشان آرزوی سلامت و سعادت را خواستارم.

از مدیریت محترم گروه گیاهپزشکی جناب آقای دکتر محمد قدمیاری و دیگر اعضای گروه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

همچنین بر خود لازم می‌دانم از جناب آقای مهندس رحیمیان که در امر نمونه‌برداری زحمت هماهنگی آن را بر عهده داشتند کمال تقدیر و تشکر را نمایم.

از تمامی اعضای موسسه گیاهپزشکی کشور، کمال تشکر و سپاس را دارم.

از کلیه اساتید محترم گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان که در تمامی دوران تحصیل افتخار شاگردی-اشان را داشته‌ام کمال تشکر و سپاس را دارم.

از تمامی همکلاسی‌های مهربانم که در طی این دوران مرا همراهی نمودند سپاسگزارم و آرزوی موفقیت روز افزونشان را از پروردگار خواستارم.

ردیابی و تعیین پراکنش ویروس موزاییک یونجه، موزاییک زرد لوبیا و ویروس موزاییک خیار بیماریزای شبدر در استان گیلان

مریم ارمندپور

در ایران محصولات علوفه‌ای از جمله انواع شبدر (*Trifolium* spp.) از اهمیت اقتصادی قابل توجهی برخوردار بوده و در اغلب مناطق به ویژه در استان گیلان مورد کشت و کار قرار می‌گیرند. سطح کشت این محصول در کل کشورحدود ۷۸۰۰۰ هکتار و مقدار تولید آن ۱/٦ میلیون تن در سال می‌باشد. سطح کشت انواع شبدر در استان گیلان ۷۵۸ هکتار و مقدار تولید آن ٤۳۰۰ تن در سال می‌باشد.

از جمله عوامل بیماریزای انواع شبدر، می‌توان به عوامل ویروسی اشاره نمود که علاوه بر کاهش عملکرد، موجب کاهش کیفیت علوفه تولیدی نیز می‌شوند. شناسایی بیماری‌های ویروسی و تعیین پراکنش و فراوانی آنها یکی از اولین و مهمترین گام‌ها در راستای مدیریت خسارت این بیماری‌ها محسوب می‌شود. در خصوص ردیابی و تعیین فراوانی و پراکنش بیماری‌های ویروسی شایع در مزارع شبدر استان گیلان تا قبل از این تحقیق هیچ بررسی و مطالعه‌ای به عمل نیامده بود. در این تحقیق، تعداد ۱۰ مزرعه شبدر در چهار شهرستان آستانه، فومن، لاهیجان و ماسال از استان گیلان مورد بازدید قرار گرفته و مجموعا ۵۷۱ نمونه شامل (۱۳۵ نمونه علائم‌دار و ٤۳٦ نمونه تصادفی) جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر آلودگی به چهار ویروس مهم موزائیک یونجه، موزائیک معمولی لوبیا، موزائیک زرد لوبیا و موزائیک خیار به روش آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA و به کمک آنتی‌بادی اختصاصی (شرکت بیوربا – سوئیس) مورد ارزیابی قرار گرفتند. مهمترین علائم همراه با ۷٤ نمونه علائم‌دار دارای واکنش مثبت در آزمون الایزا، شامل موزائیک و پیسک (۳۸/۸ درصد)، پیچیدگی و بدشکلی‌های برگی (۲۰/۹ درصد)، زردی و سبزردی (۲۸/۳ درصد) و کاهش رشد یا کوتولگی (۱۱/۹درصد) بود. بر اساس نتایج آزمون الایزا در بین ۱۳۵ نمونه علائم‌دار، فراوانی آلودگی‌های ویروسی مورد بررسی بترتیب عبارت از BYMV (۲۰/۷ درصد)، AMV (۱۸/۵درصد)، CMV (۱۱/۸ درصد) و BCMV (۳/۷ درصد) بود. همچنین درصد آلودگی به ویروس-های مورد بررسی در بین ٤۳٦ نمونه تصادفی نشان داد که AMV با ۱٦/۳ درصد بیشترین و پس از آن BYMV (۱٤/٤ درصد)، CMV (۱۲/۱ درصد) و BCMV (۳/٤ درصد) قرار گرفتند. در بین مزارع شبدر مورد بررسی و نمونه های تصادفی جمع آوری شده، شهرستان لاهیجان با ٤۸/۷ درصد دارای بیشترین میزان آلودگی ویروسی بوده و مزارع شبدر شهرستان‌های آستانه، فومن و ماسال بترتیب با ٤۷/۵، ٤٦/۳ و ٤٤/۲ درصد در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. در این بررسی تعداد ٦۱ نمونه علائم‌دار با هیچیک از آنتی‌بادی‌های فوق واکنش مثبت نداشتند. این نتایج نشان‌دهنده احتمال وقوع دیگر عوامل ویروسی یا عوامل شبه ویروسی در نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. از بین این نمونه‌ها، چهارده نمونه انتخاب و از نظر آلودگی به ویروس موزائیک آرابیس و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی مورد آزمون الایزا قرار گفتند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون، دو نمونه (جمع‌آوری شده از لاهیجان) با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ArMV و تعداد سه نمونه (یک نمونه از لاهیجان و دو نمونه از آستانه) با آنتی‌بادی اختصاصی TSWV واکنش مثبت داشتند. به منظور تایید نتایج حاصل از آزمون الایزا تعدادی از جدایه‌های ویروسی انتخاب شده و دامنه‌میزبانی آنها مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعات تایید کننده نتایج بدست آمده از آزمون‌های سرولوژیکی الایزا بود. همچنین با توجه به فراوانی نسبی دو ویروس BYMV و AMV، ردیابی مولکولی این دو ویروس به کمک آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش رونوشت برداری برگردان مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. با استفاده از واکنش آر.تی.پی.سی.آر و بکمک آغازگرهای اختصاصی، در مورد ویروس AMV قطعه دی.ان.ای بطول حدود ٦۷۰ جفت باز و در مورد ویروس BYMV قطعه دی.ان.ای بطول حدود ۹۰۰ جفت باز تکثیر شد. هر دو این قطعات مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی ویروس‌های مذکور بودند. همچنین به منظور کاهش هزینه‌های آزمون، امکان ردیابی توام هر دو ویروس AMV و BYMV بطور همزمان در یک نمونه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Duplex PCR) مورد بهینه سازی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که دو ویروس BYMV و AMV از مهمترین ویروس‌های آلوده کننده شبدر در مزارع شبدر استان گیلان می-

باشند. همچنین این اولین گزارش از حضور آلودگی به سه ویروس BYMV، CMV و TSWV در مزارع شبدر استان گیلان و نیز گزارش وقوع دو ویروس BCMV و ArMV برای اولین بار از مزارع شبدر کشور می‌باشد.

کلمات کلیدی: شبدر، گیلان، پراکنش، ویروس موزائیک یونجه، ویروس موزائیک خیار، ویروس موزائیک معمولی لوبیا، ویروس موزائیک زرد لوبیا، ویروس موزائیک آرابیس، ویروس پژمردگی لکه‌دارگوجه فرنگی

ردیابی و تعیین پراکنش ویروس موزاییک یونجه، موزاییک زرد لوبیا و ویروس موزاییک خیار بیماریزای شبدر در استان گیلان

مریم ارمندپور

در ایران محصولات علوفه‌ای از جمله انواع شبدر (*Trifolium* spp.) از اهمیت اقتصادی قابل توجهی برخوردار بوده و در اغلب مناطق به ویژه در استان گیلان مورد کشت و کار قرار می‌گیرند. سطح کشت این محصول در کل کشورحدود ۷۸۰۰۰ هکتار و مقدار تولید آن ۱/٦ میلیون تن در سال می‌باشد. سطح کشت انواع شبدر در استان گیلان ۷۵۸ هکتار و مقدار تولید آن ٤۳۰۰ تن در سال می‌باشد.

از جمله عوامل بیماریزای انواع شبدر، می‌توان به عوامل ویروسی اشاره نمود که علاوه بر کاهش عملکرد، موجب کاهش کیفیت علوفه تولیدی نیز می‌شوند. شناسایی بیماری‌های ویروسی و تعیین پراکنش و فراوانی آنها یکی از اولین و مهمترین گام‌ها در راستای مدیریت خسارت این بیماری‌ها محسوب می‌شود. در خصوص ردیابی و تعیین فراوانی و پراکنش بیماری‌های ویروسی شایع در مزارع شبدر استان گیلان تا قبل از این تحقیق هیچ بررسی و مطالعه‌ای به عمل نیامده بود. در این تحقیق، تعداد ۱۰ مزرعه شبدر در چهار شهرستان آستانه، فومن، لاهیجان و ماسال از استان گیلان مورد بازدید قرار گرفته و مجموعا ۵۷۱ نمونه شامل (۱۳۵ نمونه علائم‌دار و ٤۳٦ نمونه تصادفی) جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر آلودگی به چهار ویروس مهم موزائیک یونجه، موزائیک معمولی لوبیا، موزائیک زرد لوبیا و موزائیک خیار به روش آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA و به کمک آنتی‌بادی اختصاصی (شرکت بیوربا – سوئیس) مورد ارزیابی قرار گرفتند. مهمترین علائم همراه با ۷٤ نمونه علائم‌دار دارای واکنش مثبت در آزمون الایزا، شامل موزائیک و پیسک (۳۸/۸ درصد)، پیچیدگی و بدشکلی‌های برگی (۲۰/۹ درصد)، زردی و سبزردی (۲۸/۳ درصد) و کاهش رشد یا کوتولگی (۱۱/۹درصد) بود. بر اساس نتایج آزمون الایزا در بین ۱۳۵ نمونه علائم‌دار، فراوانی آلودگی‌های ویروسی مورد بررسی بترتیب عبارت از BYMV (۲۰/۷ درصد)، AMV (۱۸/۵درصد)، CMV (۱۱/۸ درصد) و BCMV (۳/۷ درصد) بود. همچنین درصد آلودگی به ویروس-های مورد بررسی در بین ٤۳٦ نمونه تصادفی نشان داد که AMV با ۱٦/۳ درصد بیشترین و پس از آن BYMV (۱٤/٤ درصد)، CMV (۱۲/۱ درصد) و BCMV (۳/٤ درصد) قرار گرفتند. در بین مزارع شبدر مورد بررسی و نمونه های تصادفی جمع آوری شده، شهرستان لاهیجان با ٤۸/۷ درصد دارای بیشترین میزان آلودگی ویروسی بوده و مزارع شبدر شهرستان‌های آستانه، فومن و ماسال بترتیب با ٤۷/۵، ٤٦/۳ و ٤٤/۲ درصد در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. در این بررسی تعداد ٦۱ نمونه علائم‌دار با هیچیک از آنتی‌بادی‌های فوق واکنش مثبت نداشتند. این نتایج نشان‌دهنده احتمال وقوع دیگر عوامل ویروسی یا عوامل شبه ویروسی در نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. از بین این نمونه‌ها، چهارده نمونه انتخاب و از نظر آلودگی به ویروس موزائیک آرابیس و ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی مورد آزمون الایزا قرار گفتند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون، دو نمونه (جمع‌آوری شده از لاهیجان) با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ArMV و تعداد سه نمونه (یک نمونه از لاهیجان و دو نمونه از آستانه) با آنتی‌بادی اختصاصی TSWV واکنش مثبت داشتند. به منظور تایید نتایج حاصل از آزمون الایزا تعدادی از جدایه‌های ویروسی انتخاب شده و دامنه‌میزبانی آنها مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعات تایید کننده نتایج بدست آمده از آزمون‌های سرولوژیکی الایزا بود. همچنین با توجه به فراوانی نسبی دو ویروس BYMV و AMV، ردیابی مولکولی این دو ویروس به کمک آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش رونوشت برداری برگردان مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. با استفاده از واکنش آر.تی.پی.سی.آر و بکمک آغازگرهای اختصاصی، در مورد ویروس AMV قطعه دی.ان.ای بطول حدود ٦۷۰ جفت باز و در مورد ویروس BYMV قطعه دی.ان.ای بطول حدود ۹۰۰ جفت باز تکثیر شد. هر دو این قطعات مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی ویروس‌های مذکور بودند. همچنین به منظور کاهش هزینه‌های آزمون، امکان ردیابی توام هر دو ویروس AMV و BYMV بطور همزمان در یک نمونه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Duplex PCR) مورد بهینه سازی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که دو ویروس BYMV و AMV از مهمترین ویروس‌های آلوده کننده شبدر در مزارع شبدر استان گیلان می-

باشند. همچنین این اولین گزارش از حضور آلودگی به سه ویروس BYMV، CMV و TSWV در مزارع شبدر استان گیلان و نیز گزارش وقوع دو ویروس BCMV و ArMV برای اولین بار از مزارع شبدر کشور می‌باشد.

کلمات کلیدی: شبدر، گیلان، پراکنش، ویروس موزائیک یونجه، ویروس موزائیک خیار، ویروس موزائیک معمولی لوبیا، ویروس موزائیک زرد لوبیا، ویروس موزائیک آرابیس، ویروس پژمردگی لکه‌دارگوجه فرنگی

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	ر
چکیده انگلیسی	ژ
مقدمه	۲
فصل اول: کلیات و مرور منابع	
۱-۱-سطح زیر کشت نباتات علوفه‌ای کشور	۵
۱-۲-تاریخچه و شناخت گیاه شبدر (گیاهشناسی)	۵
۱-۳-انواع شبدر	٦
۱-۳-۱-شبدر برسیم	٦
۱-۳-۲-شبدر ایرانی	۷
۱-۳-۳-شبدر زیر زمینی	۷
۱-۳-٤-شبدر سفید	۸
۱-۳-۵-شبدر قرمز	۸
۱-۳-٦-شبدر پنجه کلاغی	۸
۱-٤-سطح زیر کشت شبدر در ایران و جهان	۹
۱-۵-بیماری‌های ویروسی انواع شبدر	۱۰
۱-۵-۱-ویروس موزاییک یونجه AMV	۱۱
۱-۵-۲-شناسایی گونه‌های میزبان حساس و علائم در ویروس AMV	۱٤
۱-۵-۳-دامنه میزبان طبیعی و علائم ایجاد شده توسط ویروس موزاییک یونجه	۱۵
۱-۵-٤-گونه‌های میزبان حساس به ویروس موزاییک یونجه	۱٦
۱-٦-ویروس موزاییک زردی شبدر CLYMV	۱۸
۱-۷-ویروس کوتولگی بادام زمینی PSV	۱۹

۱-۸-ویروس زردی رگبرگ شبدرCLYVV	۱۹
۱-۹-ویروس موزاییک معمولی لوبیا BCMV	۲۰
۱-۱۰-ویروس موزاییک زرد لوبیا BYMV	۲۱
۱-۱۱-ویروس موزاییک خیار CMV	۲۳
۱-۱۱-۱-علائم ویروس موزاییک خیار در سایر میزبان‌ها	۲٦
۱-۱۲-ویروس موزاییک شبدر سفید WCLMV	۲۷
۱-۱۳-ویروس لکه حلقوی توتون TRSV	۲۸
۱-۱٤-ویروس نواری توتون TSV	۲۸
۱-۱۵-ویروس موزاییک آرابیسArMV	۲۸
۱-۱٦-ویروس لکه پژمردگی گوجه فرنگیTSWV	۳۰
فصل دوم: مواد و روش‌ها	
۲-۱-جمع آوری نمونه‌های برگی	۳۵
۲-۲-آزمون الایزا	۳٦
۲-۲-۱-تهیه بافرها	۳٦
۲-۲-۲-آماده سازی نمونه‌ها	۳۸
۲-۲-۲-۱-مرحله اول- پوشش دادن چاهک‌های بشقابک‌های الایزا با IgG	۳۸
۲-۲-۲-۲-مرحله دوم- ریختن آنتی ژن در چاهک‌های بشقابک	۳۸
۲-۲-۲-۳-مرحله سوم-ریختن آنتی بادی متصل به آنزیم (IgG-Conjugate)	۳۸
۲-۲-۲-٤-مرحله چهارم- ریختن سوبسترا	۳۹
۲-۳-ارزیابی نتایج الایزا	۳۹
۲-٤-آماده‌سازی گیاهان محک	۳۹
۲-۵-مایه‌زنی گیاهان محک	۳۹
۲-٦-انتخاب، جداسازی و نگهداری جدایه‌های ویروسی	٤۰

۲-۷-بررسی دامنه میزبانی جدایه‌های ویروسی	٤٠
۲-۸-ردیابی ویروس‌های AMV و BYMV بکمک روش مولکولی PCR	٤٢
۲-۸-۱-استخراج RNA (Extraction RNA)	٤٢
۲-۸-۲-تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی AMV	٤٣
۲-۸-۲-۱-مرحله رونوشت‌برداری برگردان (Reverse Transcription)	٤٣
۲-۸-۲-۲-مرحله پی سی آر (Polymerase Chain Reaction)	٤٤
۲-۸-۳- تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی BYMV	٤٥
۲-۸-۳-۱- مرحله رونوشت‌برداری برگردان (Reverse Transcription)	٤٥
۲-۸-۳-۲- مرحله پی سی آر (Polymerase Chain Reaction)	٤٦
۲-۹-ردیابی همزمان دو ویروس AMV و BYMV بکمک واکنش پی سی آر(Duplex PCR)	٤٨
۲-۱۰-ارزیابی قطعات دی. ان. ای حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز	٤٨
۲-۱۰-۱-تهیه بافر TBE (PH.8)	٤٨
۲-۱۰-۲-تهیه ژل آگارز۱٪	٤٨
۲-۱۰-۳-تهیه نمونه‌ها	٤٩
۲-۱۰-٤-راندن نمونه‌ها روی ژل آگارز	٤٩
فصل سوم: نتایج	
۳-۱-بررسی و مشاهدات مزرعه‌ای	٥١
۳-۲-وضعیت آلودگی‌های ویروسی در نمونه‌های علائم‌دار	٥٤
۳-۳-بررسی آلودگی‌های ویروسی در نمونه‌های تصادفی	٥٨
۳-٤- بررسی دامنه میزبانی	٦١
۳-٤-۱-جدایه‌های ویروس موزاییک یونجه	٦٢
۳-٤-۲-جدایه‌های ویروس موزاییک زرد لوبیا	٦٤
۳-٤-۳-جدایه‌های ویروس موزاییک معمولی لوبیا	٦٥

۳-٤-٤-جدایه‌های ویروس موزاییک خیار	٦٦
۳-٤-٥-جدایه‌های ویروس موزاییک آرابیس	٦٩
۳-٤-٦-جدایه‌های ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگی	۷۱
۳-٥-ردیابی ویروس‌هایAMV و BYMV بکمک روشRT-PCR	٦٩
۳-٦-ردیابی همزمان ویروس‌های AMV و BYMV به کمک روش Duplex PCR	۷۳
بحث	۷٥
نتیجه گیری	۸۱
پیشنهادات	۸۲
منابع و ماخذ	۸٤

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱-طبقه‌بندی گیاه شبدر ۶

جدول ۱-۲-ارزش غذایی شبدر برسیم در مقایسه با یونجه ۷

جدول ۱-۳-برآورد سطح، تولید و عملکرد شبدر به تفکیک استان در سال زراعی ۱۳۸۷-۸۸ ۱۰

جدول۱-۴-دامنه میزبان طبیعی و علائم AMV ۱۵

جدول ۱-۵-گونه‌های میزبان حساس به AMV ۱۶

جدول ۲-۱-مناطق و تعداد مزارع و نمونه‌های علائم‌دار وتصادفی جمع آوری شده شبدر در استان گیلان ۳۶

جدول۲-۲-لیست گیاهان محک و سن مایه‌زنی مورد استفارده جهت مطالعه دامنه میزبانی و سن مایه زنی ۴۲

جدول۲-۳-توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی AMV ۴۵

جدول۲-۴-توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششیBYMV ۴۵

جدول ۳-۱-مناطق و تعداد مزارع و نمونه‌های علائم‌دار وتصادفی جمع آوری شده شبدر در استان گیلان ۵۱

جدول۳-۲-عوامل ویروسی و درصد فراوانی آنها در نمونه‌های علائم‌دار ۵۵

جدول۳-۳- داده‌های مربوط به آلودگی همزمان با دو ویروس در نمونه‌های علائم‌دار و بررسی درصد آلودگی ۵۷

جدول۳-۴- عوامل ویروسی و درصد فراوانی آنها در نمونه‌های تصادفی ۵۹

جدول۳-۵- داده‌های مربوط به آلودگی همزمان با دو ویروس در نمونه‌های تصادفی و بررسی درصد آلودگی ۶۰

جدول۳-۶- علائم ایجاد شده در گیاهان محک توسط چهار ویروس آلوده کننده شبدر در گلخانه ۷۲

عنوان **صفحه**

نمودار۳-۱-عوامل ویروسی و درصد فراوانی آنها در نمونه‌های علائم‌دار مورد بررسی ۵۵

نمودار۳-۲-درصد آلودگی همزمان با دو ویروس در نمونه‌های علائم‌دار مورد بررسی ۵۸

نمودار۳-۳- عوامل ویروسی و درصد فراوانی آنها در نمونه‌های تصادفی مورد بررسی ٦۱

نمودار۳-٤- درصد آلودگی همزمان با دو ویروس در نمونه‌های تصادفی مورد بررسی ٦۱

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱-پیکره‌های باسیلی شکل ویروس موزاییک یونجه AMV ۱۲

شکل۱-۲-ژنوم ویروس موزاییک یونجه ۱۲

شکل۱-۳-تصویر شماتیک از پیکره رشته‌ای پوتی‌ویروس‌ها ۲۱

شکل۱-۴-تصویر سازمان ژنومی پوتی ویروس‌ها ۲۱

شکل۱-۵-پیکره‌های پلی هیدرال ویروس موزاییک خیار ۲۶

شکل۱-۶-ژنوم ویروس موزاییک خیارCMV ۲۶

شکل۱-۷-ساختار پیکره ویروس موزاییک آرابیسArMV ۲۹

شکل۱-۸-ساختار ژنومی آرابیس موزاییک ویروس ۲۹

شکل۱-۹-پیکره پلی هیدرال TSWV همراه با غلاف لیپو پروتئینی ۳۲

شکل۱-۱۰-سازمان ژنومی و استراتژی بیان ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه فرنگیTSWV ۳۳

شکل۳-۱-نقشه استان گیلان و مناطق نمونه‌برداری شبدر ۵۲

شکل۳-۲-علائم کلروز، بدشکلی، چین خوردگی، ابلقی و نکروز برگ شبدر مشکوک به آلودگی همزمان به چند بیماری ویروسی در مزرعه ۵۳

شکل۳-۳-نمونه شبدر آلوده به ویروسAMV و BYMV در مزرعه ۵۳

شکل۳-۴-نمونه‌های شبدر با علائم مشکوک به بیماری ویروسی شامل روشن شدن رگبرگ در مزرعه ۵۴

شکل۳-۵-ایجاد لکه های موضعی نکروز در لوبیا چیتی توسط AMV ۶۲

شکل ۳-۶-ایجاد لکه های موضعی نکروز در لوبیا چشم بلبلی توسط AMV ۶۳

شکل۳-۷-رگ نواری، موزائیک و عدم تقارن برگ در اثر آلودگی به ویروس AMV در لوبیا ۶۳

شکل۳-۸-علائم موزائیک سیستمیک روی توتون وایت بارلی مایه زنی شده با AMV ۶۴

شکل۳-۹-آلودگی گیاه لوبیا به ویروس موزاییک زرد لوبیا و علائم پیسک روی برگ ۶۵

شکل۳-۱۰-ایجاد علائم سیستمیک موزائیک روی باقلا در اثر آلودگی به ویروس BYMV ۶۵

شکل۳-۱۱-عدم تقارن برگ لوبیا در اثر آلودگی ویروسی و آلوده بهBCMV ۶۶

شکل۳-۱۱-علائم موزائیک در اثر آلودگی ویروسی و آلوده بهBCMV ۶۶

شکل۳-۱۲-علائم لکه های موضعی نکروزه در لوبیا چشم بلبلی مایه زنی شده باCMV ۶۷

شکل۳-۱۴-علائم موزائیک و باریک شدن پهنک برگ در اثر آلودگی ویروسی به CMV در گوجه فرنگی ۶۸

شکل۳-۱۵-علائم موزائیک و بدشکلی مختصر پهنک برگ در خیار(راست) و کدو(چپ) در اثر مایه زنی با جدایه شبدر CMV ۶۹

شکل۳-۱۶-علائم موزائیک و بدشکلی در برگ‌های جوان گیاه توتون رقم سامسون مایه زنی شده با جدایه شبدر CMV ۶۹

شکل۳-۱۷-لکه های نکروز در برگ‌های سلمک مایه زنی شده با جدایه ArMV ۷۰

شکل۳-۱۸-لکه های سبزرد و موزائیک خفیف در خیار آلوده با جدایه ArMV ۷۰

شکل۳-۱۹-لکه های نکروزه در برگ‌های لوبیا چشم بلبلی مایه زنی شده با جدایه شبدر TSWV ۷۱

شکل۳-۲۰-لکه های نکروزه در برگ‌های گل اطلسی مایه زنی شده با جدایه شبدر TSWV ۷۱

شکل۳-۲۱-موزائیک و بدشکلی برگ ها در توتون روستیکای آلوده با TSWV ۷۲

شکل۳-۲۲-نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی AMV و BYMV ۷۳

شکل۳-۲۳- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات Duplex-PCR مربوط به تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششیAMV و BYMV با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۷۴

مقدمه

نیامداران (بقولات، حبوبات) یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی در دنیا می باشند. شبدر و یونجه در بین گیاهان علوفه‌ای دارای جایگاه کلیدی و برجسته ای بوده و در سیستم‌های کشاورزی پایدار با آب و هوای معتدله سازگاری نشان می‌دهند [حیدری شریف آبادی و دری، ۱۳۸۰]. نقش گیاهان علوفه‌ای درتعلیف دام و در نتیجه تامین نیاز غذایی انسان به فراورده‌های دامی، از اهمیت غیر قابل انکاری برخوردار است. با این وجود متاسفانه در کشور ما به تولید و مدیریت گیاهان علوفه‌ای، در مقایسه با سایر محصولات زراعی، کمتر توجه شده است و به این ترتیب عدم توجه لازم به افزایش کمی و کیفی علوفه، موجب کمبود گوشت و مواد لبنی و پایین آمدن کیفیت آنها شده است [مدیر شانه چی، ۱۳۷۹]. این گروه از گیاهان دارای اهمیت بسیار فراوانی می‌باشند که از جمله آنها می‌توان به افزایش نیتروژن چمنزارها به ویژه در سیستم های چرای آزاد دام‌ها، ارزش غذایی زیاد و اثر مفید آنها بر ساختار خاک اشاره کرد. این مزایا در طول چند سال اخیر به طور گسترده‌ای مورد توجه محققان قرار گرفته است. گونه‌هایی از جنس *Medicago*، *Vicia*، *Trifolium* و *Melilotus* دامنه وسیعی از سازگاری اکولوژیکی دارند. لگوم‌های علوفه‌ای از لحاظ ارزش غذایی برای دام‌ها اهمیت دارند. به طور کلی این محصولات برای نشخوارکنندگان به صورت چرای آزاد در مراتع یا به صورت سیلو و همچنین علوفه خشک قابل استفاده هستند. لگوم‌ها از نظر ارزش غذایی [1] و نیز ارزش خوراکی[2] نسبت به گراس‌ها دارای ارزش بیشتری هستند. این مزیت باعث افزایش مصرف علوفه‌ای آنها شده است. فیبر کمتر و تراکم بالای پروتئین و مواد معدنی موجود در آنها منجر به افزایش فرایندهای هضم و جذب می‌شود [حیدری شریف آبادی و دری، ۱۳۸۰]. در ایران محصولات علوفه‌ای از جمله انواع شبدر یکی از مهم‌ترین محصولات علوفه‌ای خانواده لگومینه در اغلب مناطق به ویژه در استان گیلان می‌باشد. سطح کشت این محصول در کل کشور حدود ۷۸۰۰۰ هکتار و مقدار تولید آن ۱/۶ میلیون تن در سال می‌باشند. سطح کشت انواع شبدر در استان گیلان ۷۵۸ هکتار و مقدار تولید آن در سال ۴۳۰۰ تن در سال می‌باشد. عمده ارقام مورد کشت در این استان شامل رقم برسیم، لاکی و قرمز می‌باشد [آمار نامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۸] . کشت انواع شبدر در ایران را عوامل محدود کننده‌ی زیادی از جمله عوامل بیماری‌زا تهدید می‌کند. از جمله عوامل بیماری‌زای انواع شبدر، می‌توان به عوامل ویروسی اشاره نمود که علاوه بر کاهش عملکرد، موجب کاهش کیفیت علوفه تولیدی نیز می‌شوند [مدیرشانه چی، ۱۳۷۹].

تعیین گسترش و خسارت، شناسایی ناقلین بالقوه عوامل ویروسی، شناسایی سایرمیزبان‌های زراعی و غیر زراعی در مزارع گیاهان علوفه‌ای از جمله شبدر برای تعیین روش‌های مناسب کنترل و کاهش خسارت به محصول و پیشگیری از انتقال و بروز اپیدمی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

---

[1] . *Nutritive valu*e

[2] . *Feeding valu*e