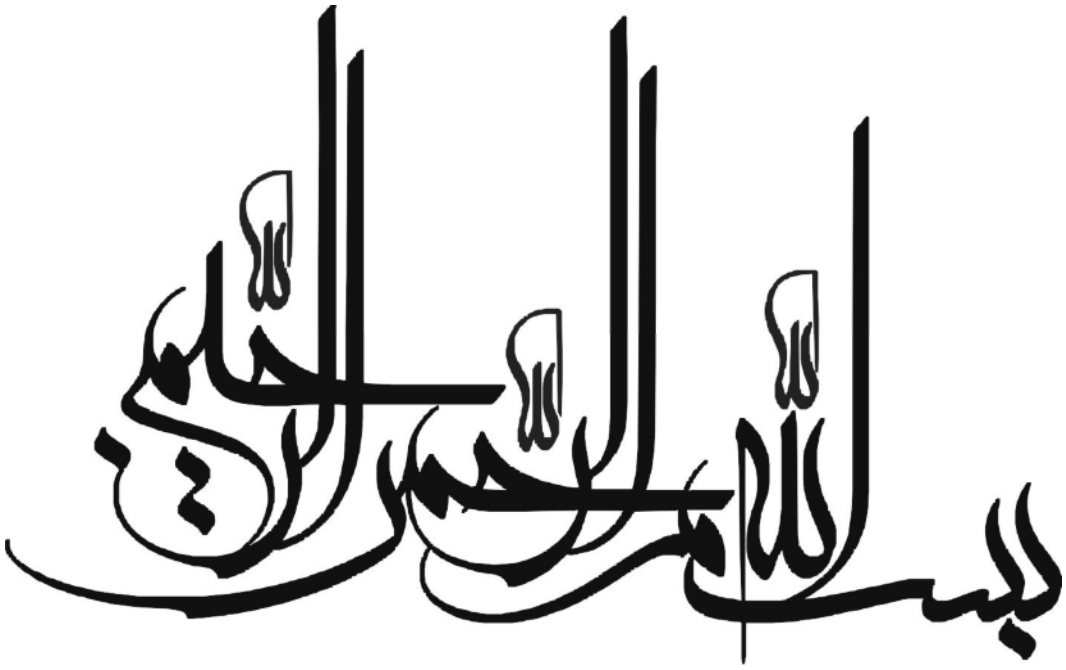
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

بررسی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه ایرانی ویروس V سیب زمینی

استاد راهنما:
دکتر حسین معصومی

استادان مشاور:
دکتر جهانگیر حیدرنژاد
دکتر اکبر حسینی پور

مولف:
فاطمه شمس الدین سعید

شهریورماه ۱۳۸۸

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشد به

گروه گیاهپزشکی

دانشکده کشاورزی

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچ گونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمی شود.

دانشجو: فاطمه شمس الدین سعید

استاد راهنما: دکتر حسین معصومی

استاد مشاور اول: دکتر جهانگیر حیدرنژاد

استاد مشاور دوم: دکتر اکبر حسینی پور

داور: دکتر غلامرضا شریفی

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی یا نماینده دانشکده: دکتر محمدحسن فولادی

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

تقدیم به:

یکتا پروردگار جهان و بزرگ آموزگار هستی

تقدیم به:

خورشید پر فروغ زندگی ام الهه بی بدیل صبر، تلاش و ایثار مادر عزیـزم او کـه زیستن، مقاومت، فداکاری، بخشش و محبت را به من آموخـت، لحظـه بـه لحظـه زندگیم آکنده از محبت های بی دریغ اوست.

تقدیم به:

پدر بزرگوارم که همچون آفتابی گذرگاه زندگیم را روشن نمـوده و در راه رشـد و تعالی من از هیچ لطفی دریغ نورزیده و همواره مشوق من در تحمل سـختی هـا است.

شبنمی ناچیز نثار این دو دریای بیکران محبت.

تقدیم به:

خواهران و برادران عزیزم: آنانکه همیشه و همه حال بی ریـاترین محبـت هـا را نثارم کردند.

تقدیم به:

اولین و مهربانترین آموزگارانم آنانکه الفبای عشق را چه زیبا برایم هجی کردند.

سپاس گذاری:

پروردگارا، تو را سپاس که مرا در این مسیر قرار دادی و در هیچ زمان تنهایم نگذاشتی و به من آموختی که همانا پس از هر سختی آسایشی است.

با تشکر از استاد راهنمایم جناب آقای دکتر معصومی که شخصیت و منش ایشان را به عنوان الگوی پشتکار، فعالیت و مهربانی همیشه در خاطر خواهم داشت. در طول این دوره همواره حمایت های بی شائبهء ایشان در به ثمر رسیدن این پایان نامه نقش ارزنده ای داشت.

با تشکر از استاد مشاوره هایم جناب آقای دکتر حسینی و آقای دکتر حیدر نژاد که همواره از هیچ کوششی در کمک به اینجانب دریغ ننمودند.

با تشکر از جناب آقای دکترشریفی که داوری این پایان نامه را به عهده گرفتند.

ارج می نهم همدلی دوست مهربانم خانم یوسف زاده که لحظه ای در این مسیر صعب همراهی مهربانانه اش را از من دریغ ننمود.

از دوستان عزیزم خانم ها و آقایان : شمشیری، شهدائی، مظفری، علوی ، محمدی، کیوانی، منگلی، خراسانی، ترابی، کاکوئی،احمدی، عامری، رضوی، ومداحیان صمیمانه تشکر می نمایم.

با تشکر از خانم ها و آقایان: احمدی، حبیبی، کمشکی، مهیا بادی.

در پایان از تمامی کسانی که صمیمانه برای اینجانب زحمت کشیدند و ممکن است نام آنها را فراموش کرده باشم بی نهایت سپاسگزارم.

چکیده:

ویروس V سیب زمینی (**PVV**) *Potato Virus V* ازخانواده پوتی ویریده وجنس پوتی ویروس می باشد. پیکره های آن شامل یک کپسید باتقارن شش وجهی و رشته ای خمش پذیر با طول ۷۶۰ نانومتر است. ویروس V سیب زمینی دارای ژنوم RNA تک لا، مثبت وتک رشته ای که حاوی۹۸۵۱ نوکلئوتید می باشد. ژنوم این ویروس دارای یک قاب خواندنی بزرگ (ORF) بوده، که قسمت های اصلی ژنوم آن به ترتیب عبارتند از ۱- Viral Protein genome (VPg) که درتماس باانتهای ´۵ می باشد. ۲- منطقه ترجمه نشده (Non translated region) غنی از اوراسیل وآدنین می باشد. ۳- یک قاب خواندنی بزرگ متشکل از۹۲۰۱ که به یک پلی پروتئین بزرگ در حدود ۳۰۶۷ اسیدآمینه ترجمه می شود. ۴ - منطقه ترجمه نشده (´3 NTR) که به انتهای پلی A ختم می شود. در مطالعه ای که به منظور بررسی پراکندگی ویروس V سیب زمینی در طول سال های زراعی ۱۳۸٦ تا ۱۳۸۷ از مزارع سیب زمینی استان های کرمان و همدان انجام گرفت. تعداد ۳۶۰ نمونه گیاهی دارای علائم ویروسی از مزارع سیب زمینی استان های فوق الذکر جمع آوری شد. جهت تأیید آلودگی نمونه ها از آزمون های الایزا استفاده گردید. نتایج به دست آمده از این آزمون ها بیانگر گسترش بسیار محدود PVV در مزارع سیب زمینی در این دو استان می باشد. به طوریکه در استان کرمان تنها سه نمونه آلوده بهPVV به دست آمد. جهت بررسی دامنه میزبانی جدایه مورد نظر، از گیاهان آزمون متعلق به خانواده های *Chenopodiaceae*, *Amarantaceae* و *Solanaceae* استفاده گردید. از بین گیاهان مورد استفاده، تنها *N. tabacum* cv.Whiteburley و *Nicotiana debneyi* پس از گذشت ۳۰ -٤۵ روز علائم ویروسی را نشان دادند. در حالیکه گیاهان آزمون از سایر خانواده ها هیچ گونه علائمی نسبت به این ویروس نشان ندادند. نتایج آزمون الایزا نیز موید این مطلب می باشد. علائم PVV بر روی توتون های مایه زنی شده رقم *Nicotiana debneyi* در گلخانه به صورت رگبرگ نواری و در رقم *N. tabacum* cv. Whiteburley به صورت رگبرگ روشنی و موزاییک دیده شد. از آنجایکه این تحقیق اولین گزارش از وجود PVV در مزارع سیب زمینی ایران می باشد، بر همین اساس در مورد ویروس V سیب زمینی در کشور ما تا پیش از این تحقیق، هیچ گونه مطالعه بیولوژیکی و مولکولی انجام نگرفته است. لذا اهداف اصلی این تحقیق، علاوه بر مطالعه بیولوژیکی، بررسی ژنوم کامل ویروس

PVV و مقایسه جدایه ایرانی این ویروس با جدایه های گزارش شده در دنیا می باشد. بر این اساس جدایه مجزا شده از مزارع سیب زمینی منطقه لاله زارکرمان به منظور مطالعه ژنوم کامل ویروس انتخاب گردید. به منظور تکثیر ژنوم کامل ویروس تعداد ۱۱ آغازگر بر اساس جدایه DV42 طراحی گردید. پس از عمل RT-PCR ، همسانه سازی، تعیین توالی ژنوم این ویروس، درخت فیلوژنیک به منظور مقایسه جدایه ایرانی و جدایه های گزارش شده در بانک ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN Version4.02 (Lynnon Biosoft.1994-98) رسم گردید. در تمامی موارد درصد همولوژی، ترادف نوکلئوتیدی و اسید های آمینه نیز محاسبه گردید. به دلیل اینکه تنها یک ژنوم کامل در بانک ژن موجود می باشد، لذا به ناچار ژن های تکثیر شده جدایه ایرانی PVV (به جز ژن CP) با ژنوم مذکور مقایسه و درصد ترادف نوکلئوتیدی جهت ژن های NIb ، NIa، 6k1، VPg، CI، P3 به ترتیب ۹۲/۸، ۹۴، ۹۴/۸، ۹۱/۵، ۹۳ و۹۳/۶ بدست آمد. درصد ترادف اسید آمینه ها ی ژن های Nib ، NIa، 6k1، VPg، CI، P3 نیز به ترتیب ۹۴/۲، ۹۵/۲، ۱۰۰، ۹۳/۶، ۹۸/۵ و ۹۷/۲ محاسبه گردید. در مورد CP به دلیل وجود تعدادی از جدایه های موجود در بانک جهانی ژن، مقایسه ای بین CP جدایه ایرانی و جدایه های موجود در بانک ژن صورت گرفت. براساس این نتایج، بیشترین درصد تشابه مربوط به توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی جدایه ایرانی PVV و جدایه های Swedish ، Soumi و 506Dutchگزارش شده از کشور های سوئد، فلاند و هلند به ترتیب میزان ۹۶/۸، ۹۶/۷ و ۹۶/۶درصد می باشد و کمترین میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی بین جدایه ایرانی با جدایه ای از کشور پرو (PA1.1) به میزان ۸۹/۶ درصد تعیین گردید. بیشترین درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی در بین جدایه های جهانی، مربوط به جدایه PA1 از کشور پرو واقع در گروه I و جدایه ای دیگر از همین کشور PA1.1 به میزان ۹۹/۹ درصد می باشد. همچنین کمترین میزان تشابه توالی نوکلئوتیدی بین جدایه های جهانی ، بین جدایه انگلیس M97UK وRingeriks از نوروژ با جدایه دیگری از کشور پرو(PA1) به میزان ۸۹/۵ درصدبدست آمد. برطبق نتایج به دست آمده، بیشترین درصد تشابه اسیدآمینه های ژن پروتئین پوششی بین جدایه ایرانی PVV و جدایه Swedish گزارش شده از کشور های سوئد به میزان ۹۸/۸ درصد می باشد. همچنین بیشترین تشابه اسیدآمینه های ژن پروتئین پوششی در بین جدایه های جهانی، مربوط به جدایه PA1 از کشور پرو و جدایه ای دیگر از همین کشور PA1.1 به میزان ۹۹/۶ درصد می باشد. کمترین

میزان تشابه اسیدآمینه های ژن پروتئین پوششی بین جدایه ایرانی با جدایه ای از کشور پرو (PA1.1) به میزان ۹۵/۵ درصد تعیین گردید. همچنین کمترین میزان تشابه اسیدآمینه های ژن پروتئین پوششی بین جدایه های جهانی ، مربوط به جدایه M97UK از (انگلیس)، DV42 از (اروپا) و 506Dutch از(هلند) با جدایه دیگری از کشور پرو(PA1) به میزان ۹۴/۴ درصد می باشد. درخت فیلوژنیک بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی رسم گردید. نتایج حاصله بیانگر آن است که جدایه های PVV موجود در بانک ژن به دو گروه I و II تقسیم می گردند. در گروه I تنها دو جدایه از کشور پرو(PA1 و PA1.1) قرار گرفتند که با Bootstrap ٪۱۰۰ از گروه II که شامل اکثریت جدایه های گزارش شده از دنیا میباشد ، متمایز گردیدند. گروه II نیز خود به زیر گروههای بیشتری تقسیم گردید که جدایه ایرانی PVV در زیر گروه II به صورت یک زیر شاخه مجزا قرار می گیرد. نتایج به دست آمده بیانگر آن است که درصد مشابهت ترادف های نوکلئوتیدی قطعه پروتئین پوششی بین جدایه های گزارش از مناطق مختلف دنیا بالا می باشد. همچنین میزان درصد مشابهت ترادف نوکلئوتیدی قطعه پروتئین پوششی بین جدایه گزارش شده از ایران با جدایه گزارش شده از سوئد به میزان ۹۶/۸ درصد می باشد. این نتایج بیانگر آن است که به طور کلی PVV در مزارع سیب زمینی ایران از گسترش محدودی برخوردار بوده و درصد مشابهت ژن های متعدد این ویروس با تنها جدایه گزارش شده در دنیا نیز در سطح بالائی می باشد. بر این اساس می توان نتیجه گرفت که احتمالا آلودگی مزارع سیب زمینی ایران نسبت به PVV مربوط به ورود این ویروس به همراه غده های آلوده سیب زمینی از کشورهای اروپائی می باشد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول- مقدمه

۱-۱- گیاهشناسی سیب زمینی ۱

۱-۲- سیب زمینی در جهان ۱

۱-۳- سیب زمینی در ایران ۲

۱-۴- مهمترین مناطق کشت سیب زمینی در ایران ۲

۱-۵- ارزش غذایی سیب زمینی ۳

۱-۶- بیماریهای سیب زمینی ۳

۱-۶-۱- بیماری های ویروسی سیب زمینی ۳

۱-۶-۱-۱- تاریخچه، انتشار و اهمیت بیماری های ویروسی سیب زمینی در جهان و ایران ۳

۱-۶-۱-۲- ویروس لوله ای شدن برگ سیب زمینی:(Potato leaf roll virus : PLRV) ۴

۱-۶-۱-۳- ویروس A سیب زمینی: (Potato virus A: PVA) ۴

۱-۶-۱-۴- ویروس X سیب زمینی : (Potato virus X: PVX) ۵

۱-۷- روش های مهم کنترل بیماری های ویروسی ۶

۱-۷-۱ – مقدمه ۶

۱-۷-۲- از بین بردن منبع آلودگی ۶

۱-۷-۲-۱- از بین بردن علف های هرز و سایر میزبان های واسط ۶

۱-۷-۲-۲- حذف گیاهان بیمار ۶

۱-۷-۲-۳- کشت درمحل های مجزا ۷

۱-۷-۳- اجتناب از منبع آلودگی ۷

۱-۷-۳-۱- بهداشت محصول ۷

۱-۷-۳-۲- استفاده از اندام های عاری از ویروس ۷

۱-۷-۴- اجتناب از ناقل ۸

۱-۷-۴-۱- تغییر تاریخ کاشت ۸
۱-۷-۴-۲- کنترل شیمیایی ناقلین ۸
۱-۷-۴-۳- موانع و مالچ های منعکس کننده ۸
۱-۷-۵- حرارت درمانی ۸
۱-۷-۶- حذف ویروس با کشت بافت ۹
۱-۷-۷- استفاده از ارقام مقاوم ۹

فصل دوم ــ بررسی منابع

۲-۱- خانواده *Potyviridae* ۱۰
۲-۲- عملکرد ژنها در خانواده *Potyviridae* ۱۱
۲-۲-۱- پروتئین P1 ۱۱
۲-۲-۲- Helper component protein(HC-Pro) ۱۱
۲-۲-۳- P3 ۱۲
۲-۲-۴- Cylindrical inclusion protein (CI) ۱۳
۲-۲-۵- 6K proteins ۱۳
۲-۲-۶- Genome – linked viral protein (VPg) ۱۳
۲-۲-۷- Small nuclear inclusion protein (NIa) ۱۴
۲-۲-۸- Large nuclear inclusion protein(NIb) ۱۴
۲-۲-۹- Coat protein (CP) ۱۵
۲-۳ - ویروس V سیب زمینی درجهان ۱۵
۲-۴- ویروس V سیب زمینی درایران ۱۶
۲-۵- مشخصات ویروس V سیب زمینی ۱۶
۲-۶- خصوصیات فیزیکی وفیزیکو شیمیایی PVV ۱۸
۲-۷- رابطه سرولوژیکی ویروس V سیب زمینی با سایر ویروس ها ۱۹
۲-۸- دامنه میزبانی PVV ۱۹
۲-۸ -۱ میز بانهای تشخیصی PVV ۱۹
۲-۸ -۲ میزبان های تکثیری ۲۰
۲-۸-۳ میز بانهای تشخیصی ۲۰

۲-۹- نژادهای PVV ۲۰
۲-۱۰- انتقال PVV ۲۰
۲-۱۰-۱- انتقال مکانیکی ۲۰
۲-۱۰-۲- انتقال توسط شته ۲۰
۲-۱۰-۳- انتقال توسط بذر ۲۱

فصل سوم ـ مواد و روشها

۳-۱- نمونه برداری از مزارع ۲۲
۳-۱-۱ - نمونه برداری از مزارع سیب زمینی ۲۲
۳-۲ - آزمون الایزا (ELISA) ۲۲
۳-۲-۱- آزمون الایزای ساندویچ دو طرفه DAS-ELISA ۲۳
۳-۲-۲- آزمون الایزای غیر مستقیم (Indirect ELISA) ۲۴
۳-۳-۳- بافرهای مورد استفاده در آزمونهای ELISA ۲۶
۳-۴- مطالعات گلخانه ای ۲۸
۳-۴-۱-بافر فسفات ۰/۰۱ مولار pH=۷ ۳۰
۳-۵- تعیین دامنه میزبانی PVV ۳۱
۳-۶- خالص سازی PVV ۳۱
۳-۶-۱- تهیه بافر فسفات ۰/۵ مولار pH=۷ ۳۲
۳-۶-۲- تعیین غلظت آموده خالص شده PVV ۳۳
۳-۶-۳- تهیه آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای برعلیه PVV ۳۳
۳-۶-۴- جذب آنتی سرم(Cross absorbtion) ۳۴
۳-۶-۵- تعیین عیار آنتی سرم تهیه شده بر ضد PVV ۳۵
۳-۷-۱- استخراج توده RNA با استفاده از کیت ۳۷
۳-۷-۲- مرحله سنتز cDNA ۳۸
۳-۷-۳- آغازگرهای مورد استفاده جهت شناسایی ویروس V سیب زمینی در این تحقیق ۴۱
۳-۷- ۴: چرخه های آزمون PCR: ۴۲
۳-۸- الکتروفورز محصول PCR ۴۵
۳-۹- استفاده از 5′/3′ RACE Kit, 2nd Generation جهت تکثیر دو انتهای ژنوم ۴۶

۳-۹-۱- مراحل تکثیر انتهای ´۳ ژنوم ۴۶
۳-۱۰- مراحل انجام همسانه سازی ۴۹
۳-۱۰-۱-۲- کشت باکتری *Escherichia coli* روی محیط کشت جامد ۴۹
۳-۱۰-۱-۳- کشت باکتری *E.coli* در محیط مایع C-medium ۵۰
۳-۱۰-۱-۴-تهیه سلولهای مستعد (Component Cell) باکتری *E.coli* ۵۰
۳-۱۰-۱-۵-انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری *E.coli* ۵۲
۳-۱۰-۱-۶ تهیه سلول های مستعد از باکتری(*E.coli*(*DH5α*) ۵۲
۳-۱۰-۱-۷ انتقال DNA نوترکیب به میزبان(*E .coli*(*DH5a*) ۵۳
۳-۱۰-۱-۸-انجام واکنش PCR با استفاده از پرگنه های سفید رنگ ۵۶
۳-۱۰-۱-۹- استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری توسط High Pure Plasmid Isolation Kit کمپانی(Roche) ۵۷
۳-۱۰-۱-۱۰- استخراج پلاسمید نوترکیب با استفاده ازکیت AccuPrep®Plasmid extraction Kit, Bioneer, Korea ۵۸
۳-۱۰-۱-۱۱استخراج با روش (A home made kit for plasmid DNA mini –preparation) ۶۰
۳-۱۰-۱-۱۲- هضم آنزیمی پلاسمید (Digestion) ۶۳
۳-۱۰-۱-۱۳ انجام الکتروفورز جهت بررسی صحت انجام عمل هضم آنزیمی پلاسمید و همسانه سازی ۶۴
۳-۱۰-۱-۱٤ نگهداری باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب ۶۴
۳-۱۰-۱-۱۵ آماده سازی نمونه ها به منظورتعیین توالی نوکلئوتیدی ژن های نژاد های PVV ۶۵
۳-۱۰-۱-۱۶ تعیین ترادف قطعات ژنی تکثیر شده در PVV و مقایسه آن با سایر جدایه های موجود در بانک ژنی ۶۵

فصل چهارم _ نتیجه بحث

۱-٤- شناسایی وتعیین پراکنش PVV درمناطقی ازایران ۶۷

۲-٤-تعیین دامنه میزبانی PVV ۶۷

۳-۴- آزمایش انتقال با بذر ۷۰

۴ -۴- استخراج Total RNA و آزمون RT-PCR ۷۰

۶-۴- همسانه سازی جدایه های PVV ۷۴

فصل پنجم _ بحث

۱-۵- بحث ۸۰

ضمائم

ضمیمه۱ ۹۲

ضمیمه۲ ۹۴

ضمیمه۳ ۹۸

ضمیمه۴ ۹۸

ضمیمه۵ ۹۹

ضمیمه۶ ۱۰۰

ضمیمه۷ ۱۰۱

ضمیمه۸ ۱۰۲

ضمیمه۹ ۱۰۲

ضمیمه۱۰ ۱۰۳

ضمیمه۱۱ ۱۰۴

ضمیمه۱۲ ۱۰۵

ضمیمه۱۳ ۱۰۶

ضمیمه۱۴ ۱۰۶
منابع ۱۰۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- مهمترین ویروس های آلوده کننده سیب زمینی ۵

جدول۱-۲ واکنش گیاهان آزمون نسبت به PVV ۱۹

جدول۱-۳ گیاهان محک مورد استفاده به منظور شناسایی و تکثیر نژاد هایPVV ۳۱

جدول ۲-۳- مواد لازم جهت تهیه cDNA در مرحله RT ۳۹

جدول ۳-۳ فهرست آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی قسمتهای مختلف ژنوم PVV ۴۱

جدول۳-۵- زمان و دمای لازم به منظور انجام مراحل مختلف PCR با استفاده ازآغازگرهای PVV10-R و PVV10 ۴۲

جدول۳-۶- زمان و دمای لازم به منظور انجام مراحل مختلف PCR با استفاده از آغازگرهای PVVR32 وPVVF32 ۴۲

جدول۳-۷- زمان و دمای لازم به منظور انجام مراحل مختلف PCR با استفاده از آغازگرهای PVVR21 وPVVF21 ۴۳

جدول۳-۸- زمان و دمای لازم به منظور انجام مراحل مختلف PCR با استفاده از آغازگرهای PVVR85 و PVVF85 ۴۳

جدول۳-۹- زمان و دمای لازم به منظور انجام مراحل مختلف PCR با استفاده از آغازگرهای PVVR90 و PVVF90 ۴۳

جدول۳-۱۰- زمان و دمای لازم به منظور انجام مراحل مختلف PCR با استفاده از آغازگرهای PVV110-R و PVV110-F ۴۴

جدول۳-۱۱- زمان و دمای لازم به منظور انجام مراحل مختلف PCR با استفاده از آغازگرهای PVVR130 و PVVF130 ۴۴

جدول۳-۱۲- زمان و دمای لازم به منظور انجام مراحل مختلف PCR با استفاده از آغازگرهای PVVR18 و PVVF22 ۴۴

جدول ۱۳-۳ مواد مورد نیاز و مقدار آن به منظور ساخت cDNA در ناحیه ´۳ ژنوم ویروس PVV با استفاده از Oligo dT-anchor primer ۴۷

جدول ۱۴-۳- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور انجام PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر در ناحیه ´۳ ژنوم ویروس PVV ۴۸

جدول ۱۵-۳- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور انجام PCR کنترل مربوط به RNA آماده در کیت ۴۸

جدول ۳-۱۶- مواد موردنیاز جهت Ligation ۴۹

جدول۳-۱۷- مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیترمحیط کشت جامد ۵۰

جدول۳-۱۸ مواد تشکیل دهنده بافر SOB ۵۵

جدول ۳-۱۹ مواد تشکیل دهنده برای ۵۰ میلی لیتر بافرTFBI ۵۵

جدول ۳-۲۰مواد تشکیل دهنده برای ۲۰ میلی لیتر بافرTFBII ۵۶

جدول-۳-۲۱-مواد مورد نیاز جهت عمل هضم آنزیمی ۶۴

جدول ۱-٤: گیاهان آزمون مورد استفاده به منظور شناسایی و تکثیر نژاد ایرانی PVV ۶۸

جدول ۱-۵ : ۹ ایزوله به کار برده شده در تحقیقات انجام شده در اروپا تا سال ۲۰۰۱ ۸۱

جدول ۲-۵ جدایه های مورد بررسی PVV موجود در بانک ژن جهت مقایسه و رسم دندروگرام و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه ایرانی این ویروس ۸۸

جدول ۳-۵ مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی ژن های جدایه ایرانیPVV و تنها جدایه موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN ۹۰

جدول ٤-۵ مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدآمینه ژن های جدایه ایرانیPVV و تنها جدایه موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN. ۹۰

جدول۵-۵ مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی(در قسمت پایین) و درصد همولوژی ترادف اسیدآمینه(در بالا) ژن پروتئین پوششی جدایه ایرانیPVV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN. حروف مخفف و کدهای (Accession numbers) مورد استفاده برای ویروس ها و جدایه های جهانی و ایرانیPVV در جداول(۲-۵) ذکر گردیده است. ۹۱

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۴ علائم رگبرگ نواری توسط PVV بر روی گیاه توتون رقم *Nicotiana debneyi* ۶۹

شکل ۲-۴ علائم موزاییک توسط PVV بر روی گیاه توتون رقم *N tabacum* cv. Whiteburley ۶۹

شکل ۳-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-22F و PVV-18R و تشکیل باند ۸۲۰ جفت بازی در ژل آگارز ۷۱

شکل ۴-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-10F و PVV-10R و تشکیل باند ۹۶۷ جفت بازی در ژل آگارز ۷۱

شکل ۵-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-110F و PVV-110R و تشکیل باند ۱۴۳۵ جفت بازی در ژل آگارز. ۷۱

شکل ۶-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-400R و PVV-400F و تشکیل باند ۱۳۲ جفت بازی در ژل آگارز. ۷۲

شکل ۷-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-32R و PVV-32F و تشکیل باند ۸۹۷ جفت بازی در ژل آگارز. ۷۲

شکل ۸-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-85R و PVV-85F و تشکیل باند ۸۰۸ جفت بازی در ژل آگارز. ۷۲

شکل ۹-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-21R و PVV-21F و تشکیل باند ۷۸۹ جفت بازی در ژل آگارز. ۷۳

شکل ۱۰-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-AR و تشکیل باند ۱۳۲ جفت بازی در درژل آگارز. ۷۳

شکل ۱۱-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-90R و PVV-90F تشکیل باند ۷۱۵ جفت بازی در ژل آگارز. ۷۳
شکل ۱۲-۴ الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای PVV-130R و PVV-130F وتشکیل باند ۷۲۸ جفت بازی در ژل آگارز. ۷۴

شکل۱۳-۴- پرگنه سفید و آبی برروی محیط کشت LB بعد از حدود ۲۴ ساعت از عمل ترانسفرماسیون. بعضی از پرگنه های سفید ممکن است حاوی پلاسمید نوترکیبی باشند که قطعه مورد نظر در آن قرار گرفته است. ۷۴

شکل ١٤-٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه ژن پروتئین پوششی حاصل از پرایمر PVV-18R و PVV-22F جدایه PVV هضم شده با آنزیم های *Pst*I و *Ecor*I و تشکیل باند ۸۲۰ جفت بازی درون ژل آگارز. ۷۶

شکل ١٥-٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه حاصل ازپرایمر PVV-10F و PVV-10R جدایه PVV هضم شده با آنزیم های *Pst*I و *Ecor*I و تشکیل باند ۹٦۷ جفت بازی درون ژل آگارز. ۷۶

شکل ١٦-٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه حاصل ازپرایمر PVV-110F و PVV-110R جدایه PVV هضم شده با آنزیم های *Pst*I و *Ecor*I و تشکیل باند ١٤٣٥ جفت بازی درون ژل آگارز. ۷۷

شکل ۱۷- ٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه حاصل ازپرایمر PVV-130F و PVV-130R جدایه PVV هضم شده با آنزیم های *Pst*I و *Ecor*I و تشکیل باند ۷۲۸ جفت بازی درون ژل آگارز. ۷۷

شکل ۱۸-٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه حاصل ازپرایمر PVV-400F و PVV-400R جدایه PVV هضم شده با آنزیم های *Pst*I و *Ecor*I و تشکیل باند ۵۲۷ جفت بازی درون ژل آگارز. ۷۷

شکل ۱۹-٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه حاصل ازپرایمر PVV-21F و PVV-21R جدایه PVV هضم شده با آنزیم های *Pst*I و *Ecor*I و تشکیل باند ۷۹۸ جفت بازی درون ژل آگارز. ۷۸

شکل ۲۰-٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه حاصل ازپرایمر PVV-32F وPVV-32R جدایه PVV هضم شده با آنـزیم هـای *Pst*I و *Ecor*I و تـشکیل بانـد ۸۹۷ جفـت بـازی درون ژل آگارز. ۷۸

شکل ۲۱- ٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه حاصل ازپرایمر PVV-85F وPVV-85R جدایه PVV هضم شده با آنـزیم هـای *Pst*I و *Ecor*I و تـشکیل بانـد ۸۰۸ جفـت بـازی درون ژل آگارز. ۷۸

شکل ۲۲-٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه حاصل ازپرایمـر PVV-90F وPVV-90R جدایه PVV هضم شده با آنـزیم هـای *Pst*I و *Ecor*I و تـشکیل بانـد ۷۱۵ جفـت بـازی درون ژل آگارز. ۷۹

شکل۲۳-٤ الکتروفورز پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه حاصل ازپرایمـر PVV-AR جدایـه PVV هضم شده با آنزیم های *Pst*I و *Ecor*I و تشکیل باند ۱۳۲ جفت بازی درون ژل آگارز. ۷۹

شکل۱-۵ موقعیت آغاز گرها یی که به منظور تکثیر ژنوم کامل ۸۴

شکل ۲-۵ درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از توالی ژن CP جدایـه ایرانـی PVV و سـایر جدایـه های موجود در بانک جهانی ژن(جدول ۲-۵) با استفاده از نرم افزارDNAMAN . جدایه ای از Potato virus Y (PVY) به نامS74813 به عنوان Outgroup انتخاب گردیده است ۸۹

۱-۱- گیاهشناسی سیب زمینی

سیب زمینی گیاهی است یکساله از خانواده *Solanaceae* که به طریقه غیرجنسی با تولید غده و به روش جنسی با تولید بذر حقیقی تکثیر می گردد. ساقه آن منشعب و کرکدار است، ارتفاع این گیاه به ۳۰ تا ۶۰ سانتیمتر می رسد. برگ های آن کمی کرکدار و هر برگ مرکب دارای ۴ برگچه یا بیشتر می باشد. رنگ گل ها متفاوت است ولی بیشتر به رنگ سفید، سرخ، کبود و ارغوانی دیده می شود. غوزه سیب زمینی در نتیجه لقاح تخمدان به وجود می آید. غوزه قبل از رسیدن سبز و بعد از آن زرد رنگ می باشد. هر غوزه سیب زمینی دارای ۲۰۰ عدد یا تعداد بیشتری بذر می باشد. ریزوم ها که از ساقه های زیرزمینی گیاه به وجود می آیند، غالباً از نظر طول متفاوت بوده و طول آن ها بین ۵ تا ۱۰ سانتی متر است. غده ها در انتهای ریزوم ها رشد می کنند و غده ها در حقیقت ساقه های تغییر شکل یافته هستند. هر چشم روی غده دارای سه یا بیشتر جوانه دارد و زمانیکه سیب زمینی کشت می شود و یا در انبار جوانه می زند، از این جوانه ها گیاهان جدید به وجود می آیند (۱۳۸۵ ،خواجه پور).

۱-۲- سیب زمینی در جهان

سیب زمینی مهمترین منبع دولپه ای در تغذیه انسان است. در کشورهای صنعتی بیشترین تولید در مناطق معتدله، متمرکز می باشد. تقریباً یک سوم این محصول در کشورهای در حال توسعه عمدتاً در کشورهای موجود در آسیا تولید می شود(۱۳۸۵ ،خواجه پور). در طول دهه گذشته، کل مساحت زیر کشت سیب زمینی در جهان از جمله در اروپای غربی اندکی کاهش یافته، اما در کشورهای آسیایی با اقتصاد متمرکز نسبتاً ثابت مانده و در کشورهای در حال توسعه به استثنای آمریکای لاتین به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. بیشترین افزایش تولید این محصول در