

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

٣٠٤

بسم الله الرحمن الرحيم

خصوصیات ویروس لکه حلقوی مرکبات در استان فارس

توسط:

محسن یاسایی

پایان نامه

ارائه شده به دانشکده تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیتهای
تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته

بیماری شناسی گیاهی

از

دانشگاه شیراز

شیراز، ایران

۸۴۲۹

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه : عالی
امضاء اعضاء کمیته پایان نامه :

دکتر کرامت اله ایزدپناه

دکتر کرامت اله ایزدپناه، استاد بخش گیاهپزشکی (رئیس کمیته)

دکتر حشمت اله رحیمیان

دکتر حشمت اله رحیمیان، استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران

دکتر ضیاء الدین بنی هاشمی

دکتر ضیاء الدین بنی هاشمی، استاد بخش گیاهپزشکی

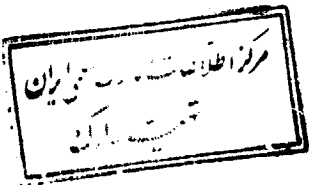
دکتر علی رضا افشاریفر

دکتر علی رضا افشاریفر، استادیار بخش گیاهپزشکی

۱۳۷۸

شهریور ماه ۱۳۷۸

۳۱۰۲۴



تقدیم به پدر و مادرم

سپاسگزاری

کسب فیض از اساتید فرهیخته در طول دوره های کارشناسی و کارشناسی ارشد همواره مایه مباهات اینجانب است. سپاس از زحمات بی دریغ و راهنمایی های ارزشمند استاد گرامی، جناب آقای دکتر کرامت اله ایزد پناه نا ممکن بوده، بی شک از منش و خصایص اخلاقی و جایگاه علمی ایشان بعنوان الگویی شایسته می توان یاد کرد. همچنین مراتب امتنان خود را از اساتید مشاور این پایان نامه، آقایان دکتر حشمت اله رحیمیان، دکتر ضیاء الدین بنی هاشمی و دکتر علیرضا افشاریفر که هر یک با ارائه طریق، مصدر راهگشایی های ارزنده ای بوده اند ابراز می دارم. از دوستان گرامی آقایان مهندس اکبر دیزجی، مهندس امیر مساح، مهندس وحید شفیع، مهندس علی پاک نیت، مهندس علیرضا اسماعیل زاده که در طول انجام این پایان نامه کمک های شایانی داشته اند، سپاسگزارم.

زحمات کارکنان بخش گیاهپزشکی و مرکز پژوهش بیماری های ویروسی غلات بخصوص آقای ناصر رضائیان بواسطه تا مین کلیه امکانات و ملزومات، شایسته قدر دانی می باشد. همچنین لازم میدانم از خانم مهر انگیز شیرازی بخاطر تهیه عکس ها سپاسگزاری نمایم.

قسمت عمده ای از هزینه های این پایان نامه از طرح بیماری های ویروسی غلات تامین گردیده است. بدینوسیله از مجریان طرح قدردانی میگردد.

چکیده

خصوصیات ویروس لکه حلقوی مرکبات در استان فارس

توسط

محسن یاسایی

علائم بیماری لکه حلقوی شامل نقاط، خطوط، هاشورها و لکه های حلقوی سبزرده با اندازه های متنوع بر روی برگ های درختان پرتقال و لیموترش در تعدادی از باغ های منطقه خفر (۱۰۰ کیلومتری جنوب شرقی شیراز) مشاهده گردید. در اکثر درختان پرتقال دارای علائم برگگی، نواحی فلسی شده خفیف بر روی پوست تنه و در تعدادی از آنها حالت های شدید جدا شدگی و پیچ خوردگی پوست تنه و شاخه های اصلی مشاهده شد. انجام پیوند بر روی نهال های بذری نارنج و ترنج منجر به بروز علائم برگگی لکه حلقوی، ۲-۳ ماه پس از پیوند گردید.

برگ های درختان پرتقال و لیموترش آلوده باغی واجد علائم لکه حلقوی، بعنوان بافت اولیه جهت خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت. یک صد گرم بافت برگگی به کمک ازت مایع به پودر تبدیل، با ۶ حجم بافر تریس اسید کلریدریک ۰/۱ مولار pH ۷/۶ حاوی ۰/۵ درصد دو-مرکاپتواتانول پس از ۳۰ دقیقه عصاره گیری وانجام زلال سازی، با استفاده از دو دور PEG رسوب گیری و در ۴ میلی لیتر بافر حل گردید (آموده S). در مواردی آموده S پس از رسوب با اولتراسانتریفوز، در مقدار اندکی بافر حل شد (آموده P). از آموده S که طیف جذبی آن معرف ماهیت نوکلئوپروتئینی بود جهت تهیه آنتی سرم استفاده گردید. آزمون نشست دو طرفه در ژل آگار حاوی SDS، با آنتی سرم بدست آمده، وجود یک بانده اختصاصی در مقابل چاهک های آلوده را نشان داد. در آزمون ELISA رقت های ۱/۳۰ گاماگلوبولین

وگاماگلوبولین متصل به آنزیم مناسب تشخیص داده شد. آزمون های DIBA، ایمونوالکتروفورز و راکت ایمونوالکتروفورز نشانگر وجود رابطه اختصاصی آنتی بادی تهیه شده با آموده های آلوده بود. آزمون تلفیق سرولوژی و الکترون میکروسکوپی با استفاده از آنتی سرم های تهیه شده علیه جدایه های ایرانی و هندی لکه حلقوی، پیکره های رشته ای نازک و خمش پذیر جدا و به هم چسبیده ای را در آموده نیمه خالص (S) پرتقال و لیموترش آلوده نشان داد. الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE با استفاده از آموده های نیمه خالص (S) پرتقال و لیموترش آلوده، وجود دو باند پروتئینی به وزن های ۲۰۶۰۰-۱۹۶۰۰ و ۳۴۴۰۰-۳۳۶۰۰ دالتون و با استفاده از آموده های خام پرتقال و لیموترش باغی، پایه های ترنج و نارنج پیوندی و پیوندک پرتقال دو باند به اندازه های ۱۹۵۰۰-۱۸۵۰۰ و ۳۱۹۰۰-۳۰۳۰۰ دالتون را نشان داد. الکتروفورز نوکلئیک اسید با استفاده از آموده P نشانگر وجود یک باند به وزن $4/3 \times 10^6$ دالتون بود.

تلاش جهت انتقال مکانیکی عامل مولد لکه حلقوی مرکبات به تعدادی از گیاهان علفی با وجود بکارگیری تمهیدات مختلف با موفقیت همراه نبود. نتایج آزمون زنجیره ای پلی مرز (RT-PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پسرورزهای A و B و لکه حلقوی و نیز آزمون های سرولوژیکی با آنتی سرم ایرانی و نمونه هایی از پسرورز و لکه حلقوی آمریکا منفی بود. انجام آزمون های بدام اندازی پیکره ها (trapping) و DIBA نوعی رابطه سرولوژیکی بین جدایه ایرانی و هندی را نشان داد.

فهرست مطالب

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
یازده	فهرست جدول ها
دوازده	فهرست شکل ها
۱	فصل اول - مقدمه
۴	فصل دوم - مروری بر تحقیقات انجام شده
۴	۱-۲- پژوهش های داخلی
۵	۲-۲- تحقیقات خارج از کشور
۵	۱-۲-۲- تاریخچه
۶	۲-۲-۲- گروه (کمپلکس) پسوروز
۸	۳-۲-۲- علائم عمومی بیماری های گروه پسوروز
۸	۱-۳-۲-۲- علائم برگ های جوان
۹	۲-۳-۲-۲- علائم برگ های رسیده
۹	۳-۳-۲-۲- علائم پوست و چوب
۱۱	۴-۲-۲- اثرات فیزیولوژیک
۱۱	۵-۲-۲- اعضاء گروه پسوروز (psorosis complex)
۱۲	۱-۵-۲-۲- پسوروز A
۱۳	۲-۵-۲-۲- پسوروز B
۱۴	۳-۵-۲-۲- لکه حلقوی مرکبات (citrus ringspot)
۱۵	۴-۵-۲-۲- سایر اعضاء احتمالی گروه پسوروز
۱۶	۶-۲-۲- ارتباط اعضاء گروه پسوروز

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۱۸	۷-۲-۲- ماهیت عامل بیماری
۱۸	۱-۷-۲-۲- ساختمان پیکره های ویروس
۲۱	۲-۷-۲-۲- پروتئین پوششی
۲۲	۳-۷-۲-۲- ژنوم ویروس عامل بیماری
۲۳	۸-۲-۲- روش های انتقال
۲۳	۱-۸-۲-۲- اپیدمیولوژی و انتقال طبیعی بیماری
۲۴	۱-۱-۸-۲-۲- ناقل حشره ای
۲۵	۲-۱-۸-۲-۲- انتقال بذری
۲۵	۳-۱-۸-۲-۲- سایر روش ها
۲۶	۲-۸-۲-۲- انتقال آزمایشگاهی
۲۶	۱-۲-۸-۲-۲- انتقال پیوندی
۲۷	۲-۲-۸-۲-۲- انتقال مکانیکی
۲۸	۳-۲-۸-۲-۲- انتقال با سس
۲۸	۹-۲-۲- دامنه میزبانی
۲۹	۱۰-۲-۲- موقعیت تاکسونومیکی ویروس عامل بیماری
۳۰	۱-۱۰-۲-۲- اسپیروویروس (Spirovirus)
۳۵	۲-۱۰-۲-۲- افیوویروس (Ophiovirus)
۳۵	۱۱-۲-۲- پراکندگی جغرافیایی بیماری پسوروز- لکه حلقوی
۳۶	۱۲-۲-۲- روش های تشخیص بیماری
۳۸	۱۳-۲-۲- مبارزه
۴۰	فصل سوم - مواد و روش های تحقیق
۴۰	۱-۳- منبع ویروس
۴۰	۲-۳- خالص سازی
۴۲	۳-۳- اسپکتروفوتومتری

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۴۲	۴-۳- انتقال مکانیکی
۴۴	۵-۳- سرولوژی
۴۴	۳-۵-۱- تهیه آنتی سرم
۴۵	۳-۵-۲- آزمون نشت دو طرفه در ژل آگار
۴۵	۳-۵-۳- آزمون (enzyme-linked) ELISA (immunosorbent assay)
۴۶	۳-۵-۳-۱- جذب آنتی سرم
۴۶	۳-۵-۳-۲- جداسازی گاماگلوبولین (IgG)
۴۷	۳-۵-۳-۳- اتصال گاماگلوبولین به آنزیم (enzyme) (antibody conjugate, EAC)
۴۷	۳-۵-۳-۴- تعیین غلظت مناسب گاماگلوبولین و گاماگلوبولین متصل به آنزیم در آزمون DAS-ELISA
۴۹	۳-۵-۴- ایمونوالکترون میکروسکوپی
۵۰	۳-۵-۵- ایمونوالکتروفورز
۵۰	۳-۵-۶- راکت ایمونوالکتروفورز
۵۱	۳-۵-۷- آزمون DIBA
۵۲	۳-۶- بررسی نقوش الکتروفورزی عامل مولد لکه حلقوی
۵۲	۳-۶-۱- بافرها و محلول های مورد استفاده
۵۳	۳-۶-۲- تهیه نمونه ها
۵۴	۳-۶-۳- تهیه ژل
۵۵	۳-۶-۴- قرار دادن نمونه ها
۵۶	۳-۶-۵- رنگ آمیزی ژل
۵۶	۳-۶-۶- مقایسه الگوهای الکتروفورزی آماده ها
۵۶	۳-۷- الکتروفورز نوکلئیک اسید

صفحه

عنوان

- ۵۶ ۱-۷-۳- بافر ها و محلول های مورد استفاده
۵۷ ۲-۷-۳- تهیه آماده ها، ژل و تنظیمات
۵۸ ۸-۳- مقایسه جدایه ایرانی با جدایه های خارج از کشور

۵۹ **فصل چهارم - نتایج**

- ۵۹ ۱-۴- شرح علائم
۶۸ ۲-۴- انتقال پیوندی
۶۸ ۳-۴- خالص سازی
۷۵ ۴-۴- انتقال مکانیکی
۷۵ ۵-۴- سرولوژی
۷۵ ۱-۵-۴- آزمون نشت دو طرفه در ژل آگار
۷۸ ۲-۵-۴- آزمون ELISA
۸۰ ۳-۵-۴- ایمونوالکترون میکروسکوپی
۸۰ ۴-۵-۴- ایمونوالکتروفورز
۸۰ ۵-۵-۴- راکت ایمونوالکتروفورز
۸۶ ۶-۵-۴- آزمون DIBA
۸۶ ۶-۴- نقوش الکتروفورز پروتئین
۹۴ ۷-۴- الکتروفورز نوکلئیک اسید
۹۴ ۸-۴- مقایسه با پسروروز و لکه حلقوی مرکبات سایر کشورها

۹۷ **فصل پنجم - بحث**

- ۹۷ ۱-۵- علائم شناسی بیماری
۹۸ ۲-۵- ماهیت عامل بیماری
۹۹ ۳-۵- انتقال مکانیکی

صفحه

عنوان

۱۰۰

۴-۵- خالص سازی

۱۰۰

۵-۵- ارتباط با جدایه های خارج از کشور

۱۰۱

۵-۶- نتیجه گیری کلی

۱۰۳

منابع

صفحه چکیده و عنوان به زبان انگلیسی

فهرست جدول ها

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۳۱	جدول ۱-۲- دامنه میزبانی علفی جدایه های مختلف عامل لکه حلقوی- پسرورز
۷۴	جدول ۱-۴- شاخص الیزا و میزان جذب نور ماوراء بنفش (۲۶۰ نانومتر) بخش های ستون شیب چگالی سولفات سزیوم
۷۸	جدول ۲-۴- مقایسه میزان جذب نوری رقت های مختلف گاماگلوبولین و گاماگلوبولین متصل به آنزیم (EAC) (بعد از یک ساعت)
۷۹	جدول ۳-۴- میزان جذب نور (شاخص الیزا) نمونه های مختلف مرکبات با آنتی سرم تهیه شده علیه جدایه ایرانی لکه حلقوی

فهرست شکل ها

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
	شکل ۳-۱- طرز قرار گرفتن رقت های گاماگلوبولین و گاماگلوبولین متصل به آنزیم (EAC) و آنتی ژن در چاهک های میکروپلیت در روش DAS-ELISA
۴۸	
	شکل ۴-۱- علائم برگری شامل نواحی و خطوط سبزرده مشخص و واضح به شکل حلقه هایی به اندازه های مختلف در پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی
۶۰	
	شکل ۴-۲- خطوط و هاشورهای پخش و پراکنده در پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی
۶۱	
	شکل ۴-۳- زردی و حالت پیسه ای در پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی
۶۲	
	شکل ۴-۴- علائم برگری در پرتقال مبتلا به بیماری لکه حلقوی شامل شیارها و خطوط موازی با رگبرگ های فرعی
۶۳	
	شکل ۴-۵- طرح ها و لکه های نکروتیک در اواخر فصل رویش در پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی
۶۴	
	شکل ۴-۶- نواحی پوسته ای شده خفیف بر روی تنه و شاخه های اصلی پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی
۶۵	
	شکل ۴-۷- نواحی پوسته ای شده شدید (تشکیل فلس های پوستی) در تنه و شاخه های پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی
۶۶	
	شکل ۴-۸- نواحی پوسته ای شده شدید به همراه برگستگی پوست در تنه پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی
۶۷	

- شکل ۴-۹- خطوط پخش و هاشورهای نا منظم و حلقه ها سبزرده
 ۶۹ در لیمو ترش آلوده به بیماری لکه حلقوی
- شکل ۴-۱۰- لکه ها، هاشورها و خطوط نا منظم سبزرده دائمی در
 برگ های رسیده ترنج پیوند شده با قطعات ساقه
 ۷۰ پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی ۳ ماه پس از پیوند
- شکل ۴-۱۱- رگبرگ نواری محو شونده در برگ های نارنج پیوند
 شده با قطعات ساقه پرتقال آلوده به بیماری لکه
 ۷۱ حلقوی ۲ ماه پس از پیوند
- شکل ۴-۱۲- نواحی دارای الگوهای سبزرده موزائیکی (پیکان) در
 شاخه های سبز نهال بذری ترنج، پیوند شده با
 قطعات ساقه پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی ۳ ماه
 ۷۲ پس از پیوند
- شکل ۴-۱۳- طیف جذبی آموده آلوده S در طول موج های ۲۲۰-
 ۷۳ ۳۰۰ نانومتر
- شکل ۴-۱۴- بروز نواحی برنزه و زرد پخش در برگ های C.
quinoa مایه زنی شده با برگ های درختان سالم و
 ۷۶ آلوده لیمو ترش
- شکل ۴-۱۵- آزمون نشت دو طرفه در ژل آگار با آنتی سرم تهیه
 شده علیه عامل لکه حلقوی مرکبات (AS) و آموده
 های نیمه خالص پرتقال و لیمو ترش آلوده (SI) و
 لیمو ترش سالم (SH). آنتی سرم با آموده نیمه خالص
 لیمو ترش سالم جذب شده است. چاهک های بدون
 ۷۷ علامت خالی هستند
- شکل ۴-۱۶- الکترون میکروگراف آموده نیمه خالص (S) برگ های
 لیمو ترش آلوده به بیماری لکه حلقوی. پیکان های

عنوان

صفحه

- بزرگ و کوچک به ترتیب نشانگر پیکره های رشته ای
خمش پذیر و ساختمان های حاصل از به هم
چسبیدگی پیکره ها می باشد. خط مقیاس معادل
۲۰۰ نانومتر است
- ۸۱
- شکل ۴-۱۷ - الکترون میکروگراف آماده نیمه خالص (S) برگ های
پرتقال آلوده به بیماری لکه حلقوی. پیکان های بزرگ
و کوچک به ترتیب نشانگر پیکره های رشته ای
خمش پذیر و ساختمان های حاصل از به هم
چسبیدگی پیکره ها می باشد. خط مقیاس معادل
۲۰۰ نانومتر است
- ۸۲
- شکل ۴-۱۸ - الکترون میکروگراف آماده نیمه خالص (S) برگ های
لیمو ترش آلوده به بیماری لکه حلقوی. پیکان نشانگر
پیکره رشته ای خمش پذیر می باشد. خط مقیاس
معادل ۷۰ نانومتر است
- ۸۳
- شکل ۴-۱۹ - خط رسوب (پیکان) در آزمون ایمونوالکتروفورز با
استفاده از آماده نیمه خالص آلوده (SI) و آماده نیمه
خالص سالم (SH). AS = آنتی سرم جذب شده با
آماده نیمه خالص سالم لیمو ترش (SH)
- ۸۴
- شکل ۴-۲۰ - آزمون راکت ایمونوالکتروفورز نشان دهنده وجود
دندانه اضافی (پیکان) در آماده نیمه خالص آلوده SI
SH = آماده نیمه خالص لیمو ترش سالم
- ۸۵
- شکل ۴-۲۱ - آزمون DIBA نشان دهنده تغییر رنگ تیره تر در
محل قرار گرفتن آماده های آلوده پرتقال (SWOI) و
لیمو ترش (KLI) با آنتی سرم های ایرانی و هندی.
KLH = عصاره خام لیمو ترش سالم
- ۸۷