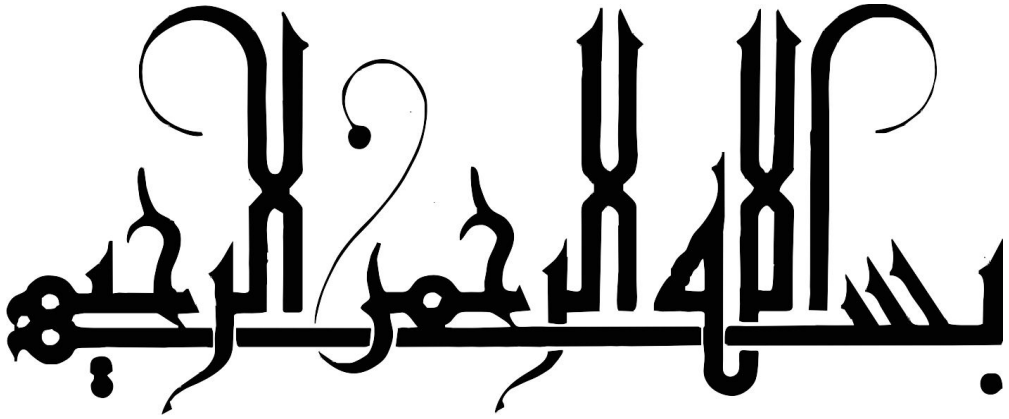

دانشکده کشاورزی

رسالۀ دوره دکتری رشته بیماری شناسی گیاهی

گرایش ویروس شناسی

آنالیز فیلوژنتیکی جدایه های ویروس کوتولگی زرد کدوییان و ارزیابی مقاومت توده های بومی و امکان ایجاد مقاومت مشتق از بیمارگر نسبت به آن در خربزه

طیبه کشاورز

استاد راهنما:

دکتر مسعود شمس بخش

اساتید مشاور:

دکترکرامت اله ایزد پناه **دکتر محمد علی ملبوبی**

تیر ۱۳۹۲

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم طیبه کشاورزرساله ۱۸ واحدی خود را با عنوان : آنالیز فیلوژنتیکی جدایه های ویروس کوتولگی زرد کـدوییان و ارزیابی مقاومت توده های بومی و امکان ایجاد مقاومت مشتق از بیمارگر نسبت به آن در خربزه
در تاریخ ۹۲/۴/۱۲ ارائه کردند.
اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آن را برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	**دکتر مسعود شمس بخش**	**دانشیار**	
۲- استاد راهنمای دوم	-	-	
۳- استاد مشاور اول	**دکتر کرامت اله ایزدپناه**	**استاد**	
۴- استاد مشاور دوم	**دکتر محمد علی ملبوبی**	**دانشیار**	
۵- استاد ناظر	**دکتر غلامحسین مصاحبی**	**دانشیار**	
۶- استاد ناظر	**دکتر واهه میناسیان**	**استاد**	
۷- استاد ناظر	**دکتر ابراهیم پورجم**	**دانشیار**	
۸- استاد ناظر	**دکتر ابراهیم محمدی گل تپه**	**استاد**	
۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	**دکتر ناصر صفایی**	**دانشیار**	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: **با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:**

ماده ۱- حق نشر و تکثیر رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب طیبه کشاورز دانشجوی رشته.بیماری شناسی گیاهی ورودی سال تحصیلی ۸۷-۱۳۸۶ مقطع دکتری دانشکده کشاورزی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمنا نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا: طیبه کشاورز

تاریخ: ۱۳۹۲/۴/۱۲

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته **بیماری‌شناسی گیاهی** است که در سال **۱۳۹۲** دانشکده **کشاورزی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی آقای **دکتر مسعود شمس‌بخش** و مشاوره‌ی آقای **دکتر کرامت اله ایزدپناه** و آقای **دکتر محمد علی ملبوبی** از آن دفاع شده است. »

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶- اینجانب **طیبه کشاورز** دانشجوی رشته‌ی **بیماری‌شناسی گیاهی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: طیبه کشاورز

تاریخ و امضاء:

تقدیم به:

دخترم روشا

امید بخش جانم که آسایش او آرامش من است

تشکر و قدردانی

پس از حمد و سپاس خداوند که با عنایت بی دریغش این خدمت ناچیز را سامان بخشید بر خود لازم می دانم از زحمات جناب آقای دکتر مسعود شمس بخش که همواره با حسن خلق، صعه صدر و نکته سنجی مرا در پیشبرد مراحل انجام این پژوهش راهنمایی فرمودند صمیمانه تشکر وقدر دانی نمایم.

از جناب آقای دکتر کرامت اله ایزدپناه که آموخته های علمی خود را مدیون زحمات بی دریغ ایشان می باشم تشکر و قدر دانی می کنم. ازجناب آقای دکتر محمد علی ملبوبی که انجام این پژوهش بدون راهنمایی های ارزنده ایشان امکان پذیر نبود کمال تشکر را دارم.

در پایان ازکسانی که خالصانه از آرامش و آسایش خود دست کشیدند و مرا در این راه یاری کردند بویژه همسرم و خواهرم صمیمانه تشکر می کنم.

چکیده:
بیماری‌های زردی ناشی از ویروس‌های قابل انتقال با سفیدبالک در مزارع کشت کدوییان و گلخانه اهمیت زیادی داشته و به کدوییان مناطق وسیعی از جهان خسارت زیادی وارد می‌کنند. دو کراینی‌ویروس قابل انتقال با سفید بالک CYSDV و CCYV از عوامل ایجاد کننده زردی در کدوییان هستند. اگرچه CYSDV از استان بوشهر گزارش شده، اطلاعات جامعی از وجود آن در سایر مناطق کشت کدوییان ایران وجود ندارد. از این رو در این تحقیق پراکنش جغرافیایی و تنوع ژنتیکی این ویروس تعیین شد. علاوه بر این وقوع سایر ویروس‌های عامل زردی بررسی شد. با استفاده از آزمون انتقال ، RT-PCR و تعیین توالی، CCYV در برخی مناطق کشت کدوییان در ایران تشخیص داده شد و رابطه مولکولی این ویروس با CYSDV و سایر کراینی ویروس ها بررسی شد. همچنین در این تحقیق واکنش برخی توده‌های بومی خربزه به CYSDV مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به منابع نادر مقاومت به CYSDV در خربزه و خیار در این مطالعه بیان موضعی سازه‌های ایجاد کننده ساختارهای سنجاق سری جهت القاء مقاومت در خربزه و خیار مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این تحقیق ۳۶۶ نمونه شامل خربزه ، خیار ، خیار چنبر و کدو دارای علائم ویروس کوتولگی زرد کدوییان از ۱۰ استان، با استفاده ازآزمون غیرمستقیم ELISA با آنتی‌بادی CYSDV مورد ارزیابی قرار گرفتند و آلودگی نمونه ها توسط آزمون RT-PCR تایید شد. نتایج نشان دهنده آلودگی ۳۰۹ نمونه از ۳۶۶ نمونه به CYSDV بود. این ویروس در بسیاری مناطق جنوبی و مرکزی ایران شناسایی شد.

توالی ژن رمز کننده پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی CYSDV تعیین و آنالیز فیلوژنتیکی انجام شد. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش نزدیک ترین همسایه (neighbor joining) نشان داد که جدایه‌های ایرانی تشکیل یک خوشه داده و در زیر گروه شرقی قرا می گیرند. زیر گروه شرقی CYSDV به دو زیر شاخه مجزا شامل جدایه‌های ایران وجدایه‌های عربستان تفسیم شدند. تشابه میان جدایه‌های ایرانی بیش از ۹۹ درصد بود. میانگین فاصله ژنتیکی جدایه‌های ایران ۰/۰۰۸ و ۰/۰۰۴ به ترتیب در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بود و مقایسه توالی CYSDV CP نشان دهنده مقدار متغیری از d_N-d_S بین ۲/۷۵- تا ۱/۰۴ بود. مقدار d_N-d_S در اکثر موقعیت‌ها منفی بود که نشان دهنده نقش انتخاب منفی در تکامل پروتئین پوششی CYSDV بود. آنالیز فیلوژنتیکی نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین جدایه‌های بود.

استفاده از آغازگر اختصاصی CCYV در آزمون RT-PCR منجر به تکثیر قطعه مورد انتظار در نمونه‌های ایوانکی و برخی نمونه‌های ورامین و بوشهر شد. این اولین گزارش از وقوع آلودگی CCYV در ایران است. توالی ژن رمز کننده پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی CCYV تعیین و آنالیز فیلوژنتیکی انجام شد. میانگین فاصله ژنتیکی جدایه‌های CCYV تمام مناطق جهان بر اساس توالی آمینواسیدی CP ۰/۰۵۵ بود. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش نزدیک ترین همسایه (neighbor joining) نشان داد که جدایه‌های CCYV در دو گروه قرار می‌گیرند، گروه I شامل جدایه‌های چین، لبنان، ژاپن، سودان و تایوان و گروه II شامل جدایه‌های ایران. در بین جدایه‌های ایران، جدایه ایوانکی از سایر جدایه‌ها متفاوت بود و در گروهی مجزا از جدایه‌های بوشهر و ورامین قرار گرفت. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس توالی آمینو اسیدی پروتئین پوششی به روش

نزدیک ترین همسایه (neighbor joining) نشان داد که جدایه‌های CCYV رابطه نزدیک با LCV دارند و CCYV، CYSDV، LCV و BnYDV در یک گروه قرار گرفتند در حالی که BPYV که عامل بیماری زردی در کدوییان بوده و علایم مشابه CCYV و CYSDV در گیاهان تیره کدو ایجاد می‌کند در گروه دیگری قرار گرفت. بکارگیری واریته‌های مقاوم بهترین راه مدیریت خسارت ناشی از ویروس‌ها است. در تحقیق حاضر واکنش ۲۵ توده بومی خربزه و طالبی (*Cucumis melo*) جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران تحت شرایط مایه‌زنی کنترل شده به جدایه بوشهر CYSDV ارزیابی شدند. مایه زنی بوته‌ها در مرحله سه برگی توسط سفید بالک *Bemisia tabaci* حامل ویروس انجام و واکنش نمونه‌های فوق بر اساس میانگین شدت شاخص بیماری ۸ هفته پس از مایه‌زنی، زمان ظهور علایم (درصد آلودگی ۲۰ روز پس از مایه زنی) و میانگین جذب در آزمون الیزا ۸ هفته پس از مایه زنی مورد ارزیابی قرار گرفت. تنها دو نمونه چروک زرد و تیل زرد تاخیر در ظهور علایم، شاخص شدت بیماری پایین و میزان جذب پایین در آزمون الیزا نشان دادند و بر این اساس مقاوم به ویروس و متحمل به بیماری قلمداد شدند.

در این تحقیق برای بررسی امکان ایجاد مقاومت از طریق مقاومت پاتوژن زاد (مقاومت ناشی از خاموشی آر ان ای) ازORF1b که ژن رمز کننده RdRP و ORF3 که کد کننده مهار کننده خاموشی آر ان ای (VSR) می‌باشد سه سازه مورد استفاده قرار گرفت. در سازه C1 که به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت هیچ ترادفی از CYSDV وجود نداشت. سازه C2 بخشی از ترادف‌های RdRP و VSR ویروس کوتولگی زرد کدوییان در جهت سنس، سازه C3 بخشی از ترادف‌های RdRP و VSR به صورت سنس- اینترون- آنتی سنس داشت. سازه ها به نحوی طراحی شدند که محصول ترانویسی سازه C2 به صورت mRNA تک رشته ای و محصول ترانویسی سازه C3 ام آر ان ایی خواهد بود که ساختار سنجاق سری تشکیل می‌دهد. این سازه ها ابتدا در حامل HANNNIBAL ساخته شد و سپس به حامل pFGC5941 که یک حامل برای بیان ژن در گیاه است منتقل شد . در مورد C3 علاوه بر این به حامل pART27 نیز منتقل شد. این سازه ها در گیاه با استفاده از روش تراریختی موضعی (تزریق اگروباکتری با سر نگ به بافت برگ) مورد ارزیابی قرار گرفتند. ارزیابی بر اساس ظهور علایم و میانگین جذب در آزمون الیزا ۴ هفته پس از مایه زنی انجام شد. آلودگی ۱۰۰ در صدی پس از مایه زنی ویروس با استفاده از سفید بالک (*B. tabaci*) در گیاهان تزریق شده با هر سه سازه مشاهده شد. اگرچه در برخی گیاهان تزریق شده با سازه C3 مقدار جذب در آزمون الیزا مقداری کمتر از سایر گیاهان بود با اینحال در آزمون آماری اختلاف معنی داری بین سازه‌های مختلف مشاهده نشد. بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش به نظر می رسد بیان موضعی بخشی از متوقف کننده خاموشی آر ان ای (VSR) در کنار بخشی از ژن RdRP تاثیری در ایجاد مقاومت به ویروس نداشت.

واژه‌های کلیدی: ویروس کوتولگی زرد کدوییان، آنالیز فیاوژنتیکی، مقاومت، خاموشی آر ان ای، ویروس زردی کلروتیک کدوییان.

فهرست مطالب

فهرست علائم اختصاری
فهرست جدولها
فهرست شکلها
فصل اول -مقدمه ۱
فصل دوم-مروری بر پژوهش‌های پیشین ۵
۲-۱- گیاه شناسی و اهمیت کدوییان ۶
۲-۲- بیماری‌های ویروسی کدوییان ۸
۲-۳- کلستروویروس‌ها ۹
۲-۴- Criniviruses ۱۰
۲-۴-۱- ویروس زردی کلروتیک کدوییان ۱۱
۲-۴-۲- ویروس کوتولگی زرد کدوییان ۱۲
۲-۴-۲-۱- مناطق انتشار ۱۳
۲-۴-۲- ۲- علایم ۱۳
۲-۴-۲-۳- مورفولوژی پیکره ۱۴
۲-۴-۲-۴- دامنه میزبانی ۱۵
۲-۴-۲-۵- انتقال ۱۵
۲-۴-۲-۶- روش‌های ردیابی ویروس ۱۶
۲-۴-۲-۶-۱-روش‌های مولکولی ۱۶
۲-۴-۲-۶-۲- روش‌های سرولوژیک ۱۷
۲-۴-۲-۷- تنوع ژنتیکی ویروس ۱۸
۲-۴-۲-۸- تعیین ترادف ژنوم CYSDV ۱۹

۲-۵- استراتژی‌های کنترل ۲۰
۲-۵-۱- کنترل ناقل ۲۰
۲-۵-۱-۱- کنترل شیمیای ناقل ۲۱
۲-۵-۱-۲- کنترل بیولوژیکی ناقل ۲۲
۲-۵-۲- کنترل زراعی ۲۳
۲-۵-۳- ارقام مقاوم ۲۴
۲-۵-۴-مقاومت ناشی از دگرپادی(Cross- Protection mediated resistance) ۲۶
۲-۵-۵-مقاومت مشتق از بیمارگر((Pathogen derived resistance (PDR) ۲۷
۲-۵-۵-۱- مقاومت بر پایه پروتئین پوششی (Coat protein mediated resistance) ۲۸
۲-۵-۵-۲- مقاومت ناشی از رپلیکاز ((Replicase mediated resistance (Rep-MR)) ۲۹
۲-۵-۵-۳- مقاومت ناشی از بیان پروتئین حرکتی (Movement protein mediated resistance) ۳۰
۲-۵-۵-۴- مقاومت ناشی از اسید نوکلئیک (Nucleic acid mediated resistance) ۳۰
۲-۶- خاموشی ژن پس از ترانویسی (Post –transcriptional gene silencing) ۳۱
۲-۶-۱- مراحل خاموشی آر ان ای ۳۲
۲-۶-۱-۱-شروع خاموشی ۳۲
۲-۶-۱-۲- تولید آر ان ای‌های کوچک (Small RNAs) ۳۳
۲-۶-۱-۲-۱- دایسر ۳۷
۲-۶-۱-۳- تشکیل کمپلس مؤثر ۳۸
۲-۶-۱-۳-۱- پروتئین‌های Argonaute ۳۹
۲-۶-۱-۴- تکثیر و انتقال سیگنال‌های خاموشی ۳۹
۲-۶-۱-۵- سایر پروتئین‌های مورد نیاز در خاموشی آر ان ای ۴۱

۲-۶-۱-۶- سایر فعالیت‌های مرتبط با خاموشی آر ان ای..... ۴۱
۲-۶-۱-۶-۱- متیله شدن..... ۴۱
۲-۶-۲- القای خاموشی ژن توسط ویروس (Virus induced gene silencing, VIGS) ۴۲
۲-۶-۳- مهارکننده‌های ویروسی خاموشی آر ان ای (Viral supressor of RNA silencing, VSRs) ۴۳
۲-۶-۴- اثر نوع سازه در کارایی خاموشی آر ان ای..... ۴۴
۲-۶-۵- کاربرد خاموشی آر ان ای در مقاومت به ویروس..... ۴۵
۲-۷- بیماری‌های ویروسی در کدوییان در ایران ۴۷
فصل سوم - مواد و روش ها
۳-۱- تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی ویروس کوتولگی زرد کدوییان و ویروس زردی کلروتیک کدوییان ۵۰
۳-۱-۱- نمونه برداری از مناطق عمده کشت کدوییان در ایران ۵۰
۳-۱-۲- آزمون الیزا ۵۰
۳-۱-۳- انتقال CCYV به خیار توسط B. tabaci ۵۱
۳-۱-۴- واکنش زنجیره ای پلیمراز به طریق نسخه برداری معکوس (RT-PCR) ۵۱
۳-۱-۴-۱- استخراج آر ان ای کل از گیاه..... ۵۱
۳-۱-۴-۲- سنتز cDNA..... ۵۱
۳-۱-۴-۳- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۵۲
۳-۱-۵- همسانه سازی ژن رمز کننده پروتئین پوششی در ناقل pTZ57R/T ۵۵
۳-۱-۵-۱- Colony PCR ۵۵
۳-۱-۵-۲- هضم آنزیمی پلاسمید..... ۵۶
۳-۱-۶- تعیین ترادف ژن پروتئین پوششی جدایه‌های ایرانی ویروس کوتولگی زرد کدوییان و زردی کلروتیک کدوییان ۵۵

۳-۱-۷- آنالیز فیلوژنتیکی ۵۶
۳-۱-۸- پیش بینی اپی توپ‌های موجود در CP (Epitopes prediction) ۵۸
۳-۲- ارزیابی واکنش توده‌های بومی خربزه و طالبی به ویروس ۵۸
۳-۲-۱- انتخاب توده‌های بومی ۵۸
۳-۲-۲- منبع ویروس ۵۸
۳-۲-۳- تهیه کلنی سفید بالک عاری از ویروس ۵۹
۳-۲-۴- مایه زنی گیاهان با ویروس ۵۹
۳-۲-۵- تعیین شاخص شدت بیماری ۶۱
۳-۲-۶- تعیین تراکم جمعیت سفید بالک ۶۱
۳-۲-۷- ارزیابی آلودگی به ویروس بر اساس آزمون الیزا ۶۱
۳-۲-۸- ارزیابی آلودگی به ویروس با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز به طریق نسخه برداری معکوس (RT-PCR) ۶۱
۳-۲-۹- آنالیز داده‌ها ۶۲
۳-۳- ارزیابی اثر سازه‌های القاء کننده خاموشی بر روی واکنش خیار و خربزه به ویروس کوتولگی زرد کدوییان ۶۲
۳-۳-۱-سویه‌های باکتریایی ۶۲
۳-۳-۲- پلاسمید ۶۲
۳-۳-۳-محیط کشت باکتریایی ۶۳
۳-۳-۴-طراحی سازه ژنی جهت القاء خاموشی آر ان ای ۶۴
۳-۳-۵- آغازگرهای مورد استفاده ۶۵
۳-۳-۶- تکثیر قطعات ۶۶

۳-۳-۷- خالص سازی قطعات دی ان ای از ژل آگاروز ۶۶
۳-۳-۸- هضم آنزیمی..... ۶۶
۳-۳-۹- فسفات زدایی انتهای چسبنده حامل pART27 هضم شده..... ۶۷
۳-۳-۱۰- واکنش Ligation ۶۷
۳-۳-۱۱-تهیه سلول‌های مستعد..... ۶۸
۳-۳-۱۱-۱- تهیه سلول‌های مستعد (competent cell) از باکتری E. coli α DH5 با استفاده از کلرید کلسیم ۶۸
۳-۳-۱۱-۲- تهیه سلول‌های مستعد از باکتری آگروباکتریوم (A. tumefaciens) سویه LBA4404 جهت الکتروپوریشن ۶۹
۳-۳-۱۲- تراریخت سازی سلولهای مستعد..... ۷۰
۳-۳-۱۲-۱- تراریخت سازی باکتری E. coli α DH5 به روش شوک حرارتی ۷۰
۳-۳-۱۲-۲- تراریخت سازی باکتری اگروباکتریوم(A. tumefaciens) سویه LBA4404 به روش الکتروپوریشن ۷۰
۳-۳-۱۳- استخراج پلاسمید..... ۷۱
۳-۳-۱۳-۱- استخراج پلاسمید به روش mini preparation ۷۱
۳-۳-۱۳-۲- استخراج پلاسمید با استفاده از GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit..... ۷۱
۳-۳-۱۴-بیان موقت و بررسی اثر ساختارهای ژنی بر مقاومت ۷۱
۳-۳-۱۴-۱- مواد گیاهی ۷۱
۳-۳-۱۴-۲- تراریخت سازی موضعی گیاه با استفاده از آگروباکتریوم ۷۲
۳-۳-۱۴-۳- مایه زنی گیاهان با ویروس ۷۲
۳-۳-۱۴-۴- ارزیابی آلودگی به ویروس بر اساس آزمون الیزا ۷۲

۳-۳-۱۴-۵- آنالیز داده‌ها ۷۳

فصل چهارم- نتایج

۴-۱- تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی ویروس کوتولگی زرد کدوییان..... ۷۵

۴-۱-۱-نمونه برداری..... ۷۵

۴-۱-۲-آزمون الیزا ۷۵

۴-۱-۳- انتقال ویروس به خیار توسط B. tabaci..... ۷۵

۴-۱-۴- واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۷۵

۴-۱-۵- همسانه سازی ۸۰

۴-۱-۶-آنالیز داده‌های حاصل از تعیین ترادفCYSDV ۸۲

۴-۱-۶-۱- فشارهای تکاملی (Evolutionary constrain) بر ژن کد کننده پروتئین پوششی CYSDV

..... ۸۴

۴-۱-۷-آنالیز داده‌های حاصل از تعیین ترادف CCYV..... ۸۸

۴-۱-۷-۱- فشارهای تکاملی (Evolutionary constrain) بر ژن کد کننده پروتئین پوششی CCYV. ۸۹

۴-۱-۸- رابطه مولکولی جدایه‌های CYSDV و CCYV با یکدیگر وسایر کرایینی ویروس‌ها..... ۹۱

۴-۱-۹- Epitopes prediction ۹۴

۴-۲- ارزیابی واکنش توده‌های بومی خربزه و طالبی به ویروس ۹۴

۴-۲-۱- زمان بروز علایم..... ۹۴

۴-۲-۲- تعیین شاخص شدت بیماری (Disease severity index)..... ۹۶

۴-۲-۳- ارزیابی غلظت نسبی ویروس بر اساس میزان جذب آزمون الیزا..... ۹۸

۴-۲-۴- بررسی تراکم جمعیت سفید بالک ۱۰۰

۴-۲-۵- ارزیابی آلودگی به ویروس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به طریق نسخه برداری معکوس ۱۰۱
۴-۳- ارزیابی اثر سازه‌های القاء کننده خاموشی بر روی واکنش خربزه و خیار به ویروس ۱۰۱
۴-۳-۱- طراحی سازه‌های ژنی برای القاء خاموشی ژن علیه CYSDV ۱۰۱
۴-۳-۲- تایید حامل pKANNIBAL ۱۰۲
۴-۳-۳- تایید حامل pFGC5941 ..... ۱۰۲
۴-۳-۴- طراحی و ساخت سازه C1 ..... ۱۰۵
۴-۳-۵- طراحی و ساخت سازه C2 ..... ۱۰۷
۴-۳-۶- طراحی و ساخت سازه C3 ..... ۱۱۰
۴-۳-۷- ارزیابی اثر سازه‌های با قابلیت القا خاموشی بر مقاومت به CYSDV ۱۱۹
فصل پنجم - بحث
۵-۱- تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی ویروس کوتولگی زرد کدوییان و ویروس زردی کلروتیک کدوییان و مقایسه آنها با سایر کرینی ویروس‌ها ۱۲۴
۵-۲- ارزیابی واکنش توده‌های بومی خربزه و طالبی به ویروس ۱۲۹
۴-۳- ارزیابی اثر سازه‌های القاء کننده خاموشی بر روی واکنش خیار و خربزه به ویروس کوتولگی زرد کدوییان ۱۳۲
پیشنهادها: ۱۳۵
فهرست منابع ۱۳۵

علائم اختصاری

AGO	Argonaute
AMV	Alfalfa mosaic virus
AYV	Abutilon yellows virus
BPYV	Beet pseudo yellows virus
BYMV	Bean yellow mosaic virus
CABYV	Cucurbit aphid-born yellows virus
CCYV	Cucurbit chlorotic yellows virus
cDNA	Complementary DNA
CFMMV	Cucumber fruit motlle mosaic virus
CGMMV	Cucumber green mottle mosaic virus
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
ClYVV	Clover yellow vein virus
CMV	Cucumner mosaic virus
CP	Coat protein
Cpd	Coat protein duplicate
CPMR	Coat protein mediated resistance
CTV	Citrus tristeza virus
CVYV	Cucumber vein yellowing virus
CYSDV	Cucurbit yellow stunting disorder virus
CYVV	Cuumber yellow vein virus
DCL	Dicer-like proteins
DIBA	Dot blot immune binding assay
DIG	Dioxigenin

ds RNA	Double strand RNA
DVCV	Diodea vein chlorosis virus
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent assay
GFP	Green fluorescent protein
HC-Pro	Helper- component protein
HSP70	Heat shock protein 70
IgG	immuonoglubulin G
LCV	Lettuce chlorosis virus
LIYV	Lettuce infectious yellows virus
miRISC	miRNA– dependent – RNA induced-silencing complex
miRNA	micro RNA
MNSV	Melon necrotic spot virus
nat-siRNA	Natural antisense transcript siRNA
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffer salin
PDR	Pathogen derived resistance
PEBV	Pea early browing virus
PeMV	Pepper motlle virus
PIWI	P-element induced wimpy testis
PMV	Pea mosaic virus
PRSV-W	Papaya ringspot virus-watermelon
PTGS	Post transcriptional gene silencing
PVX	Potyato virus X

PVY	Potato virus Y
PYVV	Potato yellow vein virus
QTL	Quantitative trait loci
RdDM	RNA-directed DNA methylation
RdRP	RNA dependent RNA polymerase
Rep-MR	Replicase mediated resistance
RITS	RNA-induced transcriptional silencing complex
RLC	RISC loading complex
RT-PCR	Revers -transcription polymerase chain rection
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
siRISC	Si-RNA – dependent – RNA induced-silencing complex
SiRNA	Short interfering RNA
SPCSV	Sweet potato chlorotic stunt virus
SPFM	Sweet potalo feathery motlle virus
SqLCV	Squash leaf curl virus
SqMV	Squash mosaic virus
SSCP	Single strand conformation polymorphism
ta-siRNA	Trans-acting siRNA
TBIA	Tissue blot immunoassay
TBSV	Tomato bushy stunt virus
TEV	Tobacco etch virus
TICV	Tomato infectious chlorosis virus
TMV	Tobacco mosic virus
ToCV	Tomato chlorosis virus

ToMV	Tomato mosaic virus
VIGS	Virus induced gene silencing
VSR	Viral suppressor of silencing (
WCSV	Watermelon chlorotic stunt virus
WMV	Watermelon mosaic virus
ZYMV	Zucchini yellow mosaic virus

فهرست جداول

جدول ۳-۱: مواد لازم در هر واکنش RT..... ۵۳

جدول۳-۲: لیست آغازگرهای مورد استفاده در RT-PCR..... ۵۳

جدول ۳-۳: مواد لازم در هر واکنش۲۵ میکرولیتری PCR ۵۴

جدول ۳-۴: چرخه گرمایی مورد استفاده در PCR ۵۴

جدول ۳-۵: مواد مورد نیاز برای عمل ligation محصول PCR در ناقل pTZ57R/T ۵۵

جدول ۳-۶: مواد مورد نیاز برای برش پلاسمید pTZ57R/T با آنزیم EcoRI ۵۶

جدول ۳-۷- نام محلی، محل جمع آوری و شماره توده‌های خربزه و طالبی ایرانی مورد استفاده در این مطالعه ۶۰

جدول ۳-۸: غلظت محلول‌های مادری و غلظت استفاده شده از آنتی بیوتیک‌ها در محیط کشت ۶۴

جدول۳-۹: لیست آغازگرهای مورد استفاده در PCR جهت تکثیر قطعه آنتی سنس ۶۵

جدول ۳-۱۰: چرخه گرمایی استفاده شده در PCR..... ۶۶

جدول ۳-۱۱: مواد مورد نیاز برای عمل فسفات زدایی pART27..... ۶۷

جدول ۳-۱۲: مواد مورد نیاز برای عمل ligation..... ۶۸