دانشکده کشاورزی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد در رشته‌ی
مهندسی کشاورزی بیماری شناسی گیاهی

اثر دما بر خصوصیات بیولوژیک ویروس های موزائیک جنوبی مرغ و موزائیک کوتولگی ذرت و تعیین ترادف ژنوم کامل ویروس موزائیک جنوبی مرغ

به کوشش

یاسر بی نیاز

استاد راهنما

دکتر کرامت‌اله ایزدپناه

اسفند ماه ۱۳۹۳

بسم الله الرحمن الرحیم

به نام خدا

اظـهـارنـامـه

اینجانب یاسر بی نیاز (۹۱۳۳۶۶۷) دانشجوی رشـته‌ی کشـاورزی گـرایش بیمـاری-شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی اظهار می‌کنم که این پایان‌نامـه حاصـل پـژوهش خودم بوده و در جاهایی کـه از منـابع دیگـران اسـتفاده کـرده‌ام، نشـانی دقیـق و مشخصات آن را نوشته‌ام. همچنین اظهار می‌کنم که تحقیق و موضـوع پایـان‌نامـه‌ام تکراری نیست و تعهد می‌نمایم که بدون مجوز دانشگاه دسـتاوردهای آن را منتشـر ننموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطـابق آیین‌نامـه مالکیـت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: یاسر بی نیاز

تاریخ و امضاء: ۱۳۹۳/۱۲/۲۰

به نام خدا

اثر دما بر خصوصیات بیولوژیک ویروس های موزائیک جنوبی مرغ و موزائیک کوتولگی ذرت و تعیین ترادف ژنوم کامل ویروس موزائیک جنوبی مرغ

به کوشش
یاسر بی‌نیاز

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

دانشگاه شیراز
شیراز
جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی کمیته پایان نامه، با درجه: عالی

دکتر کرامت‌اله ایزدپناه، استاد بخش گیاهپزشکی (استاد راهنما) ..... .
دکتر علیرضا افشاریفر، دانشیار بخش گیاهپزشکی (استاد مشاور) ..... .
دکتر محمود معصومی، استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی فارس (استاد مشاور) ..... .
دکتر سید علی اکبر بهجت‌نیا، دانشیار بخش گیاهپزشکی (داور متخصص داخلی) ..... .

اسفند ماه ۱۳۹۳

سپاسگزاری

الهی هر که تو را شناخت و علم مهر تو افراخت هر چه غیر از تو بود بینداخت. سپاس خدای منان را که به من توفیق قدم نهادن در راه پر خیر و برکت کسب علم عطا فرمود. در اینجا بر خود لازم می‌دانم که قدردان زحمات عزیزانی باشم که مرا در این مهم یاری نمودند. زحمات فراوان و ارزشمند استاد ارجمند، جناب آقای دکتر کرامت‌اله ایزدپناه، که علاوه بر علم، درس اخلاق و بزرگواری به من آموختند به هیچ وجه قابل جبران نیست و شاگردی ایشان یکی از بزرگترین افتخارات زندگیم خواهد بود. و همچنین از استاد ارجمند ، جناب آقای دکتر علیرضا افشاریفر که دلسوزانه مرا در تمامی مراحل این پژوهش یاری کردند، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم. سپاسگزار استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمود معصومی که بزرگوارانه و با نهایت صبر و بردباری راه تحقیق را به من نشان دادند و در تمام مراحل پایان‌نامه همراهیم نمودند، می‌باشم. از اساتید گرانقدر آقایان دکتر سید علی اکبر بهجت نیا و دکتر حمزه زرقانی تشکر می‌نمایم. از سایر اساتید محترم بخش گیاهپزشکی، جناب آقایان دکتر بنی هاشمی ، دکتر تقوی، دکتر کارگر بیده، دکتر مستوفی‌زاده قلمفرسا، دکتر آل-عصفور، دکتر اکرمی و دکتر عالیچی که در طی مدت تحصیلم از آموزش‌های موثر آنها بهره برده‌ام، کمال تشکر را دارم. سزاوار است تا از زحمات بی دریغ جناب مهندس محمد صادق صادقی کارشناس محترم مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی کمال تشکر را داشته باشم. یاد و خاطره دوستانی که در این دوره به من یاری رسانده‌اند، دوستان و همکلاسی‌ها که در این کوتاه، مجال پرداختن به آنها نیست، همیشه در خاطره‌ام زنده خواهد ماند و از همکاری و همراهی ایشان قدردانی می‌نمایم. از کمک‌های بی شائبه مسئولین و کارکنان مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی و بخش گیاهپزشکی آقایان ذوالفقاری، کاظمی،پورسعادت، زارع، بیاتی و خانم‌ها داوودی، دهشتکار،قطبی، معقولی و سعادتی سپاسگزارم

در پایان از خانواده‌ام صمیمانه تشکر می‌نمایم و از خدای بزرگ سلامتی و سعادت همه جانبه آنان را خواستارم.

چکیده

اثر دما بر خصوصیات بیولوژیک ویروس های موزائیک جنوبی مرغ و موزائیک کوتولگی ذرت و تعیین ترادف ژنوم کامل ویروس موزائیک جنوبی مرغ

به کوشش

یاسر بی‌نیاز

نزدیکی بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus, BgSMV) با ویروس خسارت‌زای موزائیک کوتولگی ذرت (MDMV) و همچنین پراکنش وسیع آن در مناطق جنوبی ایران از دلایل اصلی این پژوهش می‌باشد. در این پژوهش ضمن سنجش تاثیر تغییرات دمایی بر روی میزان آلودگی و شدت بیماری هر دو ویروس، ترادف کامل ژنوم BgSMV تعیین شده و قابلیت ایجاد آلودگی آن در قیاق مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌های صورت گرفته جهت بررسی قابلیت ایجاد آلودگی در قیاق نشان داد گیاه قیاق در مایه زنی مکانیکی با درصد خیلی پایین، به BgSMV آلوده می‌شود. نتایج آزمون تغییرات دمایی نشان داد شدت بیماری موزائیک جنوبی مرغ با افزایش دما روند صعودی دارد و اثر این ویروس در کاهش شاخص‌های رشد گیاه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بیشتر از دماهای ۳۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد است. شدت بیماری MDMV نیز با بالا رفتن دما افزایش یافت. ترادف کامل نوکلئوتیدی ویروس موزاییک جنوبی مرغ تعیین گردید. طول ژنوم BgSMV بجز دنباله Poly A در انتهای ′۳، ۹۵۸۹ نوکلئوتید است که شامل ۱۳۹ نوکلئوتید ناحیه ترجمه نشدنی ′ ۵ ، ۲۳۴ نوکلئوتید ناحیه ترجمه نشدنی ′ ۳ و یک چارچوب خوانش باز است که پلی پروتئینی با ۳۰۷۲ آمینواسید را رمزگذاری می کند. آنالیز فاصله ژنتیکی بین ترادف کامل ژنوم BgSMV با پوتی ویروس‌های غلات نشان داد که این فاصله با جدایه‌های MDMV به طور میانگین ۱۴/۴ درصد، با ویروس موزائیک قیاق (JGMV) ۴۴ درصد، با ویروس موزائیک نیشکر (SCMV) به طور میانگین ۳۰/۳ درصد ، با ویروس موزائیک ایرانی قیاق (IJMV) ۳۱/۲ درصد، با ویروس موزائیک سورگوم (SrMV) به طور میانگین ۲۸/۲ درصد و با ویروس موزائیک ارزن (PenMV) به طور میانگین ۳۱/۳ درصد می-باشد. آنالیز ترادف آمینواسیدی پلی پروتئین BgSMV نشان داد که فاصله ژنتیکی BgSMV با جدایه‌های MDMV ، SrMV ، SCMV، IJMV، PenMV و JGMV به ترتیب ۷/۹، ۲۲/۷، ۲۵/۰، ۲۷/۸ و ۴۹/۵ می-باشد. هم ردیف‌سازی چندگانه بر اساس ترادف ژنوم کامل و همچنین ترادف آمینواسیدی پلی پروتئین مشخص نمود BgSMV و MDMV در بین پوتی‌ویروس‌های غلات بیشترین قرابت را با هم دارند.

واژه‌های کلیدی: تغییرات دمایی، شدت بیماری، قیاق، پوتی‌ویروس‌های غلات

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول ۱

مقدمه ۲

۱-۱. مقدمه ۲

فصل دوم ۴

مروری بر پژوهش‌های پیشین ۵

۲-۱. مطالعه ویروس‌ها در گیاهان وحشی ۵

۲-۲. خطر ویروس‌های نوظهور ۷

۲ـ۳. پوتی ویروس‌ها ۸

۲-۳-۱. سازمان ژنومی پوتی‌ویروس‌ها ۹

۲-۳-۲. حرکت سلول به سلول ۱۳

۲-۳-۳. حرکت سیستمیک ۱۳

۲-۴. طبقه‌بندی اعضای جنس پوتی ویروس ۱۴

۲-۵. پوتی ویروس‌های غلات ۱۶

۲-۵-۱. ویروس موزائیک کوتولگی ذرت ۱۸

۲-۵-۲. ویروس موزائیک جنوبی مرغ ۱۹

فصل سوم ۲۱

مواد و روش ها ۲۲

عنوان **صفحه**

۳-۱. منبع ویروس ۲۲

۳-۲. تکثیر و نگهداری ویروس در گلخانه ۲۲

۳-۳. شناسایی ویروس با آزمون PCR ۲۳

۳-۳-۲. واکنش ترانویسی معکوس (RT) ۲۴

۳-۳-۴. انجام الکتروفورز برای بررسی نتایج PCR ۲۶

۳-۴. آزمایش شدت بیماری BgSMV و MDMV تحت تیمارهای دمایی مختلف ۲۶

۳-۴-۱. کاشت و مایه زنی گیاهان ۲۶

۳-۴-۲. آزمون تغییرات دمایی ۲۷

۳-۴-۳. آزمون الیزای غیر مستقیم ۲۸

۳-۴-۴. تجزیه و تحلیل آماری ۲۹

۳-۵. بررسی قابلیت ایجاد آلودگی BgSMV در قیاق ۲۹

۳-۶. تعیین ترادف ژنوم کامل BgSMV ۳۰

۳-۶-۱. خالص سازی محصول واکنش PCR ۳۱

۳-۶-۲. همسانه سازی (Cloning) ۳۱

۳-۶-۳. وارد کردن DNA به پلاسمید (Ligation) ۳۱

۳-۶-۴. انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری ۳۲

۳-۶-۵. انتخـاب همسانه‌ها ۳۳

۳-۶-۶. استخراج پلاسمید ۳۳

۳-۶-۷. بررسی محصول همسانه‌سازی شده ۳۴

عنوان **صفحه**

۳-۷. تعیین ترادف و مقایسه با بانک ژن ۳۴

فصل چهارم ۳۶

نتایج ۳۷

۴-۱-۱. دوره کمون ۳۷

۴-۱-۲ . وقوع آلودگی ۳۷

۴-۱-۳. شدت بیماری ۳۹

۴-۱-۴. شاخص‌های رشد گیاه ۴۰

۴-۱-۵. سنجش کمی ۴۳

۴-۲. بررسی قابلیت ایجاد آلودگی BgSMV در قیاق ۴۶

۴-۳-۱. تعیین ترادف ژنوم کامل BgSMV ۴۸

۴-۳-۲. تجزیه و تحلیل تبارزایی BgSMV و پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس ترادف کامل ژنوم ۴۹

۴-۳-۳. تجزیه و تحلیل تبارزایی BgSMV و پوتیویروسهای غلات بر اساس ترادف آمینواسیدی ۵۱

۴-۳-۴. تجزیه و تحلیل تبارزایی بر اساس ترادف کامل ژنوم BgSMV و سایر پوتی-ویروس‌های غلات با استفاده از نرم افزار SimPlot ۶۰

فصل پنجم ۶۵

بحث و نتیجه گیری ۶۶

منابع ۷۲

پیوست

چکیده و صفحه عنوان به زبان انگلیسی

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- آستانه‌ی تشابه نوکلئوتیدی (nucleotide identity threshold) بر حسب درصد به عنوان مرز تفاوت جنس های مختلف تیره‌ی *Potyviridae*..... ۱۶

جدول۳-۱- مواد لازم برای انجام واکنش ترانویسی معکوس..... ۲۴

جدول ۳-۲- مواد لازم در واکنش PCR ۲۵

جدول ۳-۳- آغازگرهای اختصاصی PCR برای تکثیر بخشی از ژنـوم MDMV و BgSMV ۲۵

جدول ۳-۴- چرخه دمایی PCR برای آغازگرهای جدول ۳-۳ ..... ۲۶

جدول ۳-۵- آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین ترادف ژنوم BgSMV ۲۷

جدول ۳-۶- مواد لازم جهت تکثیر قطعات با طول بلند در واکنش PCR ۳۱

جدول ۳-۷- مواد مورد استفاده در واکنش ligation ۳۲

جدول ۳ـ۸ ـ رس شمار ژنوم کامل ویروس‌های مختلف موجود در GenBank و محل وقوع آن‌ها ۳۵

جدول ۴ـ۱ـ تجزیه واریانس اثر ویروس و دما بر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC)..... ۳۹

جدول ۴ـ۲ـ تجزیه واریانس اثر ویروس و دما بر ارتفاع گیاه ۴۱

جدول ۴ـ۳ـ تجزیه واریانس اثر ویروس و دما بر وزن گیاه ۴۲

جدول ۴ـ۴ـ میزان جذب عصاره گیاهان مایه‌زنی شده با BgSMV در آزمون الیزا ۴۴

جدول ۴ـ۵ـ میزان جذب عصاره گیاهان مایه‌زنی شده با MDMV در آزمون الیزا.....۴۵

جدول ۴ـ۶ـ تجزیه واریانس میزان جذب آزمون الیزا در نمونه‌های آلوده به BgSMV ۴۶

جدول ٤ـ۷ـ تجزیه واریانس میزان جذب آزمون الیزا در نمونه‌های آلوده به MDMV.....۴۷

جدول ۴ـ۸ـ درصد فاصله ژنتیکی (p- distance) بین گروه‌های مختلف پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس ترادف کامل ژنوم..... ۵۰

جدول ۴ـ۹ـدرصد فاصله ژنتیکی (p-distance) بین گروه‌های مختلف پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس ترادف آمینو اسیدی ۵۰

جدول ٤ـ۱۰ـ مقایسه فاصله ژنتیکی (genetic distance) BgSMV با جدایه‌های MDMV موجود در بانک ژن بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل ۵۷

جدول ۴ـ۱۱ـ مقایسه فاصله ژنتیکی (genetic distance) BgSMV با جدایه‌های MDMV موجود در بانک ژن بر اساس ترادف آمینو اسیدی پلی‌پروتئین ویروس..... ۵۸

جدول ۴ـ۱۲ ـ سایت‌های برشی پلی پروتئین BgSMV و تعدادی از پوتی ویروس‌های غلات.....۵۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲ـ۱ـ موقعیت پروتئبن‌ها در پلی پروتئین اعضای جنس *Potyvirus* ۱۲
شکل ۴ـ۱ـ روند ظهور علائم و میزان وقوع آلودگی در گیاهان مایه زنی شده با BgSMV..... ۳۸
شکل ۴ـ۲ـ روند ظهور علائم و میزان وقوع آلودگی در گیاهان مایه زنی شده با MDMV ۳۸
شکل ۴ـ۳ـ شدت بیماری دو ویروس MDMV و BgSMV در دماهای مختلف بر اساس سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) ۴۰
شکل ۴ـ۴ـ اثر ویروس و دما بر ارتفاع گیاه ۴۲
شکل ۴ـ۵ـ اثر ویروس و دما بر وزن گیاه ۴۳
شکل ۴ـ۶ـ علائم آلودگی درگیاه قیاق ۴۷
شکل ۴ـ ۷ـ نقوش الکتروفورزی محصولات PCR مربوط به گیاهان قیاق مایه زنی شده با BgSMV ۴۸
شکل ۴-۸ نقوش الکتروفورزی محصولات PCR مربوط به BgSMV و MDMV ۵۱
شکل ۴ـ۹ـ الگوی الکتروفورزی محصول PCR مربوط به جفت آغازگر BgGap1F/BgGap1R ۵۲
شکل ۴ـ۱۰ـ الگوی الکتروفورزی محصول PCR مربوط به جفت آغازگر BgGIIIf/BgGIIIr ۵۲
شکل ۴ـ۱۱ـ الگوی الکتروفورزی محصول PCR مربوط به جفت آغازگر BgGap2F/BgGap2R ۵۳
شکل ۴ـ۱۲ـ الگوی الکتروفورزی محصول PCR مربوط به جفت آغازگر NIb2F-MDMV/BgGapVR .. ۵۳
شکل ۴ـ۱۳ـ الگوی الکتروفورزی محصول PCR مربوط به جفت آغازگر BgGIIIf/NIb3R-MDMV ۵۴
شکل ۴ـ۱۴ ـ دندروگرام رابطه BgSMV با پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس آنالیز تبارزایی ترادف نوکلئوتیدی ژنوم کامل ویروس..... ۵۵
شکل ۴ـ۱۵ ـ دندروگرام رابطه BgSMV با پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس آنالیز تبارزایی ترادف آمینواسیدی پلی‌پروتئین ویروس ۵۶
شکل ۴ـ۱۶ـ تشابه ترادف نوکلئوتیدی BgSMV با پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس نرم افزار SimPlot ۶۱
شکل ۴ـ۱۷ـ تشابه ترادف نوکلئوتیدی MDMV با پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس نرم افزار SimPlot ۶۱
شکل ۴ـ۱۸ـ تشابه ترادف نوکلئوتیدی IJMV با پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس نرم افزار SimPlot ۶۲
شکل ۴ـ۱۹ـ تشابه ترادف نوکلئوتیدی JGMV با پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس نرم افزار SimPlot ۶۲
شکل ۴ـ۲۰ـ تشابه ترادف نوکلئوتیدی PenMV با پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس نرم افزار SimPlot ۶۳
شکل ۴ـ۲۱ـ تشابه ترادف نوکلئوتیدی SCMV با پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس نرم افزار SimPlot ۶۳
شکل ۴ـ۲۲ـ تشابه ترادف نوکلئوتیدی SrMV با پوتی‌ویروس‌های غلات بر اساس نرم افزار SimPlot..... ۶۴

فصل اول

مقدمه

۱-۱. مقدمه

پوتی ویروس‌ها همراه با اعضای هفت جنس دیگر که در خانواده *Potyviridae* طبقه بندی شده‌اند از لحاظ کشاورزی، اقتصادی و بیولوژیکی بسیار مهم می‌باشند. در گذشته شباهت مورفولوژیک، دامنه میزبانی، نحوه انتقال و ویژگی‌های فیزیکی و فیزیکوشیمیایی آن‌ها موجب شد تا پوتی ویروس‌های آلوده کننده گیاهان تیره گرامینه را در گونه ویروس موزائیک نیشکر(SCMV) یا دو گونه SCMV و ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (MDMV) قرار دهند (Louie and Knocke, 1975). سپس در سال ۱۹۹۲ شوکلا و همکاران چهار ویروس SCMV، MDMV، ویروس موزائیک سورگوم (SrMV) و ویروس موزائیک قیاق (JGMV) را بعنوان پوتی‌ویروس‌های آلوده کننده غلات معرفی نمودند (Shukla *et al.*, 1992). علاوه بر اینها ویروس موزائیک ارزن (PeMV) از شمال چین، Zea mosaic virus (ZeMV) از اسرائیل، ویروس موزائیک ایرانی قیاق (IJMV)، ویروس موزائیک جنوبی مرغ (BgSMV) و ویروس علف دانه قناری نی مانند (RCGMV) از ایران جزو این گروه می‌باشند (Masumi *et al.*, 2011).

ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (Maize dwarf mosaic virus, MDMV) به جنس *Potyvirus* تعلق دارد و یکی از گسترده ترین ویروس‌های آلوده کننده ذرت و سورگوم در سراسر جهان است (Ford *et al.*, 1989). MDMV اولین بار در سال ۱۹۶۵ توسط ویلیامز و الکساندر از جنوب ایالت اوهایو در آمریکا گزارش شد(Williams and Alexander, 1965). شوکلا و همکاران در سال ۱۹۸۹ آنرا به عنوان یک عضو مستقل از جنس *Potyvirus* مورد تائید قرار دادند (Shukla *et al.*, 1989). ذرت و سورگوم از میزبانان طبیعی MDMV می-باشند. این ویروس در همه مناطقی که ذرت و سورگوم کشت می‌شود وجود دارد (Ford *et al.*, 1989). MDMV در ایران از اصفهان و بصورت گسترده از شمال ایران (مازندران و گلستان) گزارش شده است (معصومی و همکاران، ۱۳۸۲). قیاق یک گیاه دائمی منبع ویروس می‌باشد (Toler, 1985). MDMV در آزمایشگاه به طور مکانیکی و در طبیعت با بیش از ۵۰ گونه شته بصورت ناپایا منتقل می‌شود. در ذرت انتقال محدود این ویروس با بذر نیزگزارش شده است (Ford *et al.*, 1989).

ویروس موزائیک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus , BgSMV) پوتی‌ویروس دیگری است که ابتدا از روی مرغ در منطقه جیرفت گزارش شد. سپس وجود این ویروس در تمام مناطق جنوبی ایران مانند استان‌های بوشهر، خوزستان، کرمان و جنوب فارس مورد تایید قرار گرفت (معصومی و ایزدپناه، ۱۳۸۱). BgSMV عامل اصلی ایجاد کننده موزائیک در گیاه رشدی (*Eleusine compressa*) است که در استان بوشهر تحت عنوان ویروس موزائیک رشدی معرفی شده بود (قاسمی و ایزدپناه، ۱۳۷۷). بر اساس مطالعات مولکولی این ویروس با MDMV، ویروس موزائیک سورگوم و SCMV بیشترین قرابت را دارد (معصومی و ایزدپناه، ۱۳۸۱). نتایج حاصل از بررسی سرولوژیک، مولکولی، دامنه میزبانی و ناقل نشان داده است که MDMV و BgSMV بسیار به هم شبیه هستند با وجود این BgSMV به دلیل داشتن یک قطعه ۹۰ نوکلئوتیدی اضافی در مقایسه با MDMV در ناحیه ' ۵ ژن پروتئین پوششی، عدم انتقال با شته *Rhopalosiphum maidis* و آلوده نکردن قیاق با MDMV متفاوت می‌باشد (قاسمی و ایزدپناه، ۱۳۷۷; معصومی و ایزدپناه، ۱۳۷۷، ۱۳۷۹، ۱۳۸۱; Zare *et al.*, 2005; Masumi *et al.*, 2011). تنوع و تغییر پذیری در ژنوم ویروس‌ها به دلیل جداسازی جغرافیایی و شرایط مختلف اقلیمی در بین جمعیت‌های مختلف بوجود می‌آید. شاید به همین دلیل باشد که MDMV با وجود قرابت نزدیک به ویروس موزائیک جنوبی مرغ در مناطق شمالی و مرکزی ایران گزارش شده است و مقاومت آن به گرما به اندازه BgSMV نیست (Masumi *et al.*, 2011؛ راه‌پیماسروستانی، ۱۳۹۱). وجود تغییرات و شرایط محیطی متفاوت شناخت ژنوتیپ‌های غالب را مشکل نموده است.

هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر تغییرات دمایی بر شدت بیماری BgSMV و MDMV در گیاه رشدی، به منظور مقایسه بیولوژیک و همچنین امکان پیش بینی اثر تغییرات اقلیمی بر هر دو ویروس بود. علاوه بر این تعیین ترادف کامل ژنوم BgSMV، مقایسه ژنوم آن با MDMV و سایر پوتی‌ویروس‌ها و بررسی قابلیت ایجاد آلودگی در قیاق بوسیله BgSMV از اهداف این پژوهش بود.

فصل دوم

مروری بر پژوهش‌های پیشین

۲-۱. مطالعه ویروس‌ها در گیاهان وحشی

ویروس‌های گیاهی در ارتباط نزدیک خود با میزبان گیاهی و یا ناقل به طور گسترده در طبیعت وجود دارند. دانش ما درباره‌ی ویروس‌های آلوده کننده‌ی موجودات بر روی زمین از جمله گیاهان بسیار محدود است. تعیین ترادف نمونه‌های محیطی نشان می‌دهد که تخمین-های موجود در رابطه با شمار گونه‌های ویروسی بسیار پایین است (Breitbart and Rohwer, 2005). علاوه بر اطلاعات کمی که در مورد تنوع ویروس‌ها، اثر آلودگی‌های مخلوط و یا الگوی زمانی تجمع ویروس در گیاهان وجود دارد، گسترش دانش ما از ویروس‌ها هم به دلیل مسائل علمی و هم از لحاظ اجتماعی (مانند خطر ویروس‌های نوظهور) امری ضروری است. می‌بایست درک ما از برهمکنش ویروس و میزبان افزایش یابد. به طور معمول ویروس‌ها به عنوان انگل مطالعه شده‌اند. اما همیشه این چنین نیست.

ویروس‌های گیاهی بیشتر در میزبانان زراعی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تحقیق درباره ویروس‌های موجود در گیاهان غیر زراعی مانند گونه‌های وحشی و علف‌های هرز بسیار کمتر بوده است و تنها به عنوان میزبان واسط ویروس‌های خسارت‌زای گیاهان زراعی مطالعه شده اند. مطالعه ویروس‌های گیاهی در طبیعت دلایل دیگری نیز می تواند داشته باشد از آن جمله می-توان مطالعه تاثیر ویروس ها در ایجاد ترکیبات آلی فرار توسط گیاه را نام برد. پژوهش انجام شده بر روی کدوی آلوده به CMV نشان داد که شته‌ها ابتدا به گیاه جلب و سپس از روی آن متفرق می‌شوند (Mauck *et al.*, 2010). درک بیشتر این موضوع نیازمند مطالعات تطبیقی در آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه است (Castle *et al.*, 1998; Eigenbrode *et al.*, 2002). توجه به اثر برهمکنش ویروس – گیاه در بدن حیوانات اهلی بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال شیوع ویروس از طریق گیاهان آلوده می‌تواند سلامت دام را تحت تاثیر قرار دهد. در این مطالعه مشخص شد ویروس موزائیک یونجه (Alfalfa mosaic virus) موجب افزایش

سطح coumestrol در بافت گیاه می‌شود که اختلالات باروری در دام ایجاد می‌کند. فعل و انفعالات زیست محیطی در میان ویروس‌ها و بین ویروس و سایر میکروب‌ها نیزکمتر مورد توجه قرار گرفته است. گیاهان اغلب به بیش از یک ویروس آلوده می‌شوند همین طور به قارچ و باکتری، اما کمتر عواقب اکولوژیک این موجودات بررسی شده است. در این زمینه به مطالعات یکپارچه مولکولی و اکولوژیک نیاز داریم (Melcher *et al.*, 2008). به علاوه از آنجایی که آلودگی ویروس‌ها می‌تواند خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و ساختاری گیاه را تغییر می-دهد پتانسیل بالای برای ایجاد تنوع فنوتیپی درجمعیت‌های گیاهی نیز دارد. برهمین اساس ممکن است گیاهان پاسخ‌های متفاوتی به محدودیت یا فراوانی منابع یا دیگر تنش‌های غیر زیستی بروز دهند. در مواردی گزارش شده است که آلودگی به ویروس موجب افزایش تحمل گیاه نسبت به درجه دمای بالا یا به خشکی شده است (Márquez *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008). احتمالا این امکان برای گیاه فراهم می‌شود تا در شرایط استرس زا و کمبود منابع خود را مدیریت کند. برای مثال ویروس‌ها موجب کاهش فتوسنتز می‌شوند و این موضوع می‌تواند در مورد گیاهانی که در سایه قرار دارند مفید باشد (Osmond *et al.*, 1990).

در کنار موارد ذکر شده، اهمیت پیش بینی اثر تغییرات اقلیمی و پیامدهای آن در تولید مواد غذایی موجب گرایش محققان به مطالعه ویروس‌ها در گیاهان وحشی شده است. با توجه به تغییرات مکانی و زمانی در آب و هوا، زمین در حال گرم شدن است. این امر پیامدهای عمده‌ای در تولید مواد غذایی جهان بر جای می‌گذارد. به احتمال زیاد پویایی و اپیدمی ویروس‌های گیاهی و خسارتی را که موجب می‌شوند تحت تاثیر تبعات مستقیم تغییرات اقلیمی مانند تغییر الگوی بارش، افزایش درجه حرارت و سرعت بیشتر باد قرار می‌گیرد و به طور غیر مستقیم بوسیله‌ی فاکتورهایی مانند محصولات جایگزین شده و تغییر پراکنش و فعالیت ناقلین شکل می‌یابد. احتمالاً در نتیجه‌ی این تغییرات محدوده‌ی جغرافیایی، فراوانی نسبی عوامل

بیماریزا، نرخ شیوع، مقاومت میزبان به بیمارگر، فیزیولوژی برهمکنش میزبان و بیمارگر، نرخ تکامل، سازگاری با میزبان و اثر بخشی اقدامات مدیریتی تغییر یافته و اپیدمی‌های خسارتزا افزایش می‌یابند. این درحالی است که اثرات ناشی از گرمایش زمین از جمله کمبود منابع آب، باعث کاهش تولید در برخی مناطق می‌شود و با افزایش جمعیت، چالش تامین غذا ابعاد بزرگتری پیدا می‌کند. بنابراین ضرورت دارد سایر عوامل محدود کننده در تولید محصولات کشاورزی از جمله بیماری‌های گیاهی کنترل گردند.(Jones, 2009).

۲-۲. خطر ویروس‌های نوظهور

از زمان‌های دور گیاهان وحشی اهلی شده و به صورت تک کشتی مورد استفاده قرار گرفتند. بیمارگرهای گیاهی نیز در تکامل همراه با جوامع گیاهی وجود داشتند. این تکامل همراه گیاهان وحشی و بیمارگرها، آن‌ها را شکل داده است. اهلی سازی گیاهان وحشی حدود ۱۰ تا ۱۵ هزار سال قبل یا بیشتر صورت گرفته است. انتقال و گسترش عمده‌ی انسان مدرن از حدود ۸۰۰۰ سال قبل شروع شد این رویداد باعث پراکندگی گیاهان از محل پیدایش خود به سایر مناطق دور دست گردید (Harlan 1965 1971,1981 ;Lovisolo *et al.*, 2003). در طول دوره‌ی اهلی سازی ، گیاهان زراعی بوسیله‌ی ویروس‌های موجود در اجداد وحشی خود مورد حمله قرار گرفتند. پس از آن ویروس‌ها با میزبان خود سازگار شدند. فرآیند سازگاری با توجه به پیچیده‌تر شدن شیوه‌های مورد استفاده در کشت گیاهان ادامه یافت. به دلیل فعالیت-های انسانی سرعت این تکامل طی ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ سال گذشته به خصوص طی ۱۰۰ سال اخیر شتاب گرفته است. این موضوع موجب بی ثباتی در گیاهان، ناقلین و ویروس ها شده است پویایی ویروس‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار داده و در پاسخ به آن احتمالاً سرعت تکامل ویروس‌ها افزایش یافته است. مقررات ضعیف قرنطینه گیاهی به دلیل قوانین سازمان تجارت جهانی نیز به این امر کمک نموده است (Bos, 1992;Webster *et al.*, 2007). مدارک و شواهد

نشان می‌دهد تغییر در پوشش‌های گیاهی بوسیله فعالیت‌های انسانی می‌تواند توزیع و پویایی ویروس‌های گیاهی را دگرگون سازد. فعالیت‌های انسانی به طور فزاینده‌ای ساختار جمعیت‌ها و خصوصیات ژنتیکی بسیاری از موجودات را تحت تاثیر قرار داده است. تغییرات وسیع در کره-زمین و شیوه‌ی کشاورزی موجب تنوع ویروس‌ها و گسترش آن‌ها به مناطق جدید شده است. رویکرد جدید زمانی ویرانگر است که گونه‌های مادری این ویروس‌ها محصولات میزبان را به خوبی آلوده می‌کنند. به طور مشابه حمله به میزبان جدید در جوامع طبیعی پتانسیل تغییر دینامیک ویروس و ناقل و افزایش فشار ویروس بر گونه‌های مرتعی و گیاهان وابسته را دارد. در نتیجه می‌تواند توزیع گونه‌ها و خواص اکوسیستم را تغییر دهد. تغییر در ترکیب اتمسفر و آب و هوا بخش نهفته اکوسیستم است. اثر تغییرات اقلیمی بر ناقلین حشره‌ای ممکن است اپیدمی-های ویروسی را افزایش دهد. این تغییرات احتمالاً باعث کاهش دفاع بوته، افزایش نرخ تغذیه، افزایش بیش از حد توانایی زمستانگذرانی، بهار زودرس و گسترش محدوده جغرافیایی حشره می‌شوند. افزایش رسوب نیتروژن ناشی از فعالیت‌های انسانی نیز می‌تواند پویایی ویروس‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. افزایش درجه حرارت بر روی توزیع ، تولید مثل و بقای بند پایان گیاهخوار اثر می‌گذارد. اما درک ما از اثر دما بر روی ویروس‌های گیاهی که با ناقلین منتقل می‌شوند محدود است (Jones, 2009, 2014).

۲ـ۳. پوتی ویروس‌ها

پوتی ویروس‌ها در گیاهان زراعی از سراسر جهان گزارش شده‌اند مطالعات متاژنومیکس اخیر، نشان دهنده وفور این ویروس‌ها در طبیعت است (Roossinck, 2012)، کمیته بین المللی تاکسونومی ویروس‌ها *Potyviridae* را به عنوان دومین خانواده ویروس‌های گیاهی بعد از *Geminiviridae* به رسمیت شناخته است. خانواده *Potyviridae* در گیاهان وحشی بعد از خانواده‌های *Partitiviridae* و *Totiviridae* سومین خانواده بزرگ می‌باشد (Roossinck, 2012).

ژنوم پوتی ویروس‌ها از یک قطعه آر ان ای تک لای مثبت تشکیل شده و در انتهای ′۳ ژنوم، دارای دنباله‌ی پلی آدنین (poly A) است. در انتهای ′۵، پروتئین ویروسی متصل به ژنوم (VPg) وجود دارد. یکی از ویژگی‌های مهم پوتی ویروس‌ها این است که ۱۰ پروتئین از ۱۱ پروتئین کد شده توسط آن‌ها از یک پیش ساز پلی پروتئین مشتق می‌شود (Rajamäki *et al*., 2004). پروتئین یازدهم، P3N-PIPO به طور جداگانه از یک چارچوب خوانش (ORF) کوچک بوجود می‌آید (Chung *et al*., 2008). پروتئین مرکب این ویروس‌ها بوسیله آنزیم‌های پروتئاز کد شده توسط ویروس به ۹ تا ۱۰ پروتئین کوچکتر تبدیل می‌شود. پروتئین پوششی که ژنوم ویروس را پوشش می‌دهد، پروتئین کمکی که در انتقال ویروس توسط شته نقش دارد، پروتئین اندامک ویژه هسته‌ای کوچک (NIa) که شامل یک پروتئاز و VPg می‌باشد، پروتئین اندامک بزرگ هسته‌ای (NIb) که یک پلی‌مراز است و CI یا اندامک سیتوپلاسمی فرفره مانند که در انتقال سلول به سلول و احتمالا در تکثیر ویروس نقش دارد از آن جمله‌اند (Carrington and Hull, 2002 ; Dougherty, 1988). آنالیزهای فیلوژنتیکی توالی پروتئین‌های جنس *Potyvirus*، رابطه تکاملی نزدیک آن‌ها با راسته *Picornavirales* را نشان می‌دهد (Koonin and Dolja, 1993). راسته *Picornavirales* شامل بسیاری از ویروس‌های آلوده کننده‌ی انسان با سازمان ژنومی و گاهی پروتئین‌های رپلیکاز مشابه می‌باشد و تشابهات سازمان ژنومی نشان می‌دهد که پوتی ویروس‌ها و *Picornavirales* احتمالاً دارای جد مشترکی می باشند (Lee and Lucas, 2001; Mushegian and Koonin, 1993).

۲-۳-۱. سازمان ژنومی پوتی‌ویروس‌ها

ژنوم اعضای جنس *Potyvirus* شامل ژن‌های کدکننده‌ی P1، HC-Pro، P3، P3N-PIPO، 6K1، CI، 6K2، NIa، NIb و CP است. شکل شماره‌ی ۲-۱ نشان دهنده سازمان ژنومی پوتی ویروس‌هاست.

P1 protein: پروتئین P1 توسط انتهای ′۵ ژنوم کد می‌شود و پروتئینازی از نوع پروتئینازهای سرین است که در برش پلی‌پروتئین نقش دارد و به عنوان یک فاکتور کمک کننده در همانند سازی ژنوم عمل می‌کند (Verchot and Carrington, 1995). انتهای آمینی P1 از لحاظ اندازه و ترادف بسیار متغیر است. شواهد نشان می‌دهد P1 در آلودگی پوتی ویروس