بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

دانشکده‌ی کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد

رشته‌ی مهندسی کشاورزی- بیماری‌شناسی گیاهی

بررسی برخی از ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک خیار (CMV) جدا شده از اسفناج در استان کرمان

استاد راهنما

دکتر احمد حسینی

استاد مشاور

دکتر ثمین حسینی

نگارنده

ایوب پورحسن خیاوی

اسفند ۹۱

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

دانشکده‌ی کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد رشته‌ی

مهندسی کشاورزی – بیماری شناسی گیاهی

بررسی برخی از ویژگی های بیولوژیکی و مولکولی ویروس موزاییک خیار (CMV) جدا شده از اسفناج در استان کرمان

ایوب پورحسن خیاوی

در تاریخ ۹۱/۱۲/۲۰ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی... به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر سید احمد حسینی	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۲- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر ثمین حسینی	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۳- استاد داور داخل گروه	دکتر حسین علایی	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۴- استاد داور داخل گروه	دکتر پژمان خدایگان	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۵ – نماینده‌ی تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد یونسی	با مرتبه‌ی علمی استادیار

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

تمامی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های حاصل از پژوهش موضوع این پایان‌نامه، متعلق به دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان است.

تقدیر و تشکر

«من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق»

تشکر می کنم:

- از اساتید راهنما و مشاور ارجمندم آقای دکتر **احمد حسینی** و خانم دکتر **ثمین حسینی** که با نکته‌های دلاویز و گفته‌های بلند، صحیفه‌های سخن را علم پرور نمودند و همواره راهنما و راه‌گشای نگارنده در اتمام پایان نامه بوده‌اند.

- از داوران محترم آقایان دکتر حسین علایی و دکتر پژمان خدایگان که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را تقبل کردند.

با درود فراوان به پدر و مادر بزرگوارم، خواهران و برادران عزیز، دلسوز و مهربانم که آرامش روحی و آسایش فکری مرا فراهم نمودند تا با حمایت‌های همه جانبه در محیطی مطلوب، مراتب تحصیلی و نیز پایان نامه درسی را به اتمام برسانم، سپاسگزاری می‌نمایم.

و در پایان از همکلاسی‌ها و دوستان عزیزم که من را در اجرای این پایان نامه یاری نمودند خالصانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

تقدیم به:

پدر و مادر دلسوز و مهربانم

به پاس تعبیر عظیم و انسانی‌شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب‌های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می‌گراید

و به پاس محبت‌های بی‌دریغشان که هرگز فروکش نمی‌کند

چکیده

اسفناج (*Spinacia oleracea L.*) یکی از مهم‌ترین سبزی‌های برگی است که به صورت تازه و یا فرآوری شده مصرف می‌شود و به دلیل داشتن خواص دارویی و مواد غذایی فراوان به صورت گسترده در دنیا کشت و مصرف می‌شود. گیاه اسفناج همواره تحت تاثیر بیمارگرهای مختلف قارچی، باکتریایی و ویروسی قرار می‌گیرد. در نمونه‌برداری‌های صورت گرفته از مزارع منطقه داوران شهرستان رفسنجان در سال ۱۳۹۰، مجموعاً ۱۷۷ نمونه از گیاهان اسفناج مشکوک به آلودگی ویروسی با علایم زردی، چروکیدگی، بد شکلی و سبز زردی جمع آوری گردید. با استفاده از روش داس الیزا آلودگی ۷۷ نمونه و در مجموع ۴۳/۵ درصد از بوته‌های اسفناج دارای علایم ویروسی به ویروس موزاییک خیار (CMV) مشخص گردید. نتایج آزمون مذکور همچنین نشان داد که هیچ‌کدام از نمونه‌های اسفناج، به ویروس‌های BCMV، TSWV، AMV، PVY و ویروس‌های جنس *Potyvirus* آلوده نبوده‌اند. نتایج حاصل از بررسی ۳۳ نمونه از علف‌های هرز جمع آوری شده از اطراف مزارع اسفناج نشان داد که به غیر از اسفناج‌های خودرو که به‌صورت علف هرز اطراف مزارع اسفناج رشد می‌کنند هیچ کدام از این نمونه‌ها به CMV آلوده نبودند. از میان جدایه‌های جمع‌آوری شده CMV، یک جدایه‌ی تحت عنوان SpK انتخاب و در گیاه اسفناج تکثیر گردید. آزمون تعیین دامنه میزبانی جدایه‌ی SpK، بر روی تعداد ۲۸ گونه گیاهی انجام و مشخص شد که این جدایه دارای دامنه‌ی میزبانی محدودی می‌باشد و ویروس فقط در ۱۱ گونه موفق به تکثیر شده است. آزمون بذربردی نشان داد که از ۲۰۰ بذر تهیه شده از کشاورزان منطقه، پنج نهال‌بذر (۲/۵ ٪) به ویروس CMV آلوده بودند. شته *Aphis gossypii* جدایه‌ی SpK را با کارایی ۸۰ درصد منتقل کرد. استخراج RNA کل این جدایه با استفاده از محلول تجاری RNX-Plus، با موفقیت انجام شد. آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به RNAهای اقماری ویروس CMV نشان داد که جدایه‌ی SpK فاقد RNA اقماری می‌باشد. استفاده از جفت پرایمر CMVCPf و CMVCPr در آزمون RT-PCR منجر به تکثیر یک قطعه ۸۷۰ جفت بازی شامل ژن پروتئین پوششی و نواحی غیر کد کننده دو طرف آن در RNA3 جدایه‌ی SpK گردید در حالی‌که با استفاده از جفت پرایمر CMV Primer 1 و CMV Primer در آزمون IC-RT-PCR یک قطعه‌ی حدودا ۵۰۱ جفت بازی تکثیر شد. آزمون RFLP بر روی قطعات تکثیر شده با استفاده از آنزیم‌های برشی (*Hpa*II) *Msp*I ، (*Hae*III) *Bsu*RI و *Eco*RI انجام شد. نتایج آزمون‌های مولکولی RT-PCR، IC-RT-PCR، RFLP، توالی‌یابی ژن CP و رسم درخت فیلوژنی علاوه بر تایید مولکولی وجود CMV در گیاه اسفناج ، نشان داد جدایه‌ی SpK متعلق به زیر گروه II ویروس موزاییک خیار می‌باشد. پژوهش حاضر اولین مطالعه مولکولی و بیولوژیکی بر روی ویروس موزاییک خیار جدا شده از اسفناج از ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسفناج، ویروس موزاییک خیار، RT-PCR، IC-RT-PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول:مقدمه ۱

فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های پیشین ۴

۲-۱- تاریخچه‌ی ویروس موزاییک خیار ۴

۲-۲- جایگاه ویروس موزاییک خیار در طبقه‌بندی ویروس‌های گیاهی ۶

۲-۳- ویژگی‌های ویروس موزاییک خیار ۷

۲-۳-۱- ویژگی‌های فیزیکی CMV ۷

۲-۳-۲- ساختار ژنوم CMV ۸

۲-۳-۳- پروتئین‌های کد شده توسط ژنوم اصلی ویروس CMV ۹

۲-۴- دامنه‌ی میزبانی CMV ۱۲

۲-۴-۱- گیاهان آزمون و تکثیری ویروس موزاییک خیار ۱۲

۲-۵- روش‌های انتقال ویروس موزاییک خیار ۱۳

۲-۵-۱- انتقال از طریق شته ۱۳

۲-۵-۲- انتقال با قارچ‌ها ۱۴

۲-۵-۳- انتقال با بذر ۱۴

۲-۶- نژادهای ویروس موزاییک خیار ۱۵

۲-۷- طبقه‌بندی ویروس موزاییک خیار ۱۶

۲-۷-۱- طبقه‌بندی سرولوژیکی CMV ۱۶

۲-۷-۲- طبقه‌بندی مولکولی نژادهای CMV ۱۹

۲-۹-ویروس‌ها و RNAهای اقماری در ویروس‌های گیاهی ۲۱

۲-۹-۱-RNA های اقماری در ویروس‌های گیاهی ۲۱

۲-۹-۲-RNAهای اقماری CMV ۲۲

۲-۹-۳-تاثیر RNAهای اقماری بر روی علایم بیماری ناشی از ویروس همراه ۲۴

۲-۱۰-روش‌های کنترل ویروس موزاییک خیار ۲۴

۲-۱۰-۱- مبارزه با ناقل ۲۴

۲-۱۰-۲-مبارزه با علف‌های هرز ۲۵
۲-۱۰-۳-بهداشت زراعی ۲۵
۲-۱۰-۴-استفاده از ارقام مقاوم ۲۵
۲-۱۰-۵-حفاظت تقاطعی ۲۶
۲-۱۰-۶-ایجاد مقاومت در گیاه با استفاده از ژن CP ویروس ۲۶
۲-۱۰-۷-استفاده از RNAهای اقماری برای حفاظت گیاهان در برابر ویروس‌ها ۲۷
فصل سوم: مواد و روش‌ها ۲۹
۳-۱- نمونه‌برداری از مزارع اسفناج ۲۹
۳-۲- شناسایی ویروس ۳۲
۳-۲-۱-آزمون داس الیزا(DAS-ELISA) ۳۳
۳-۲-۲- آزمون ای‌سی‌پی الیزا (ACP-ELISA) ۳۴
۳-۲-۳-آزمون TPIA ۳۵
۳-۳-بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی ویروس ۳۵
۳-۳-۱- خالص سازی بیولوژیکی جدایه‌های مورد بررسی ۳۵
۳-۳-۲- تکثیر و نگه‌داری ویروس در شرایط گلخانه ۳۶
۳-۳-۳-تعیین دامنه‌ی میزبانی ۳۶
۳-۳-۴- بررسی میزان بذرزادی ۳۶
۳-۳-۵- انتقال ویروس با شته ۳۷
۳-۴- بررسی ویژگیهای مولکولی جدایه‌های مورد بررسی ۳۸
۳-۴-۱- استخراج RNA کل از جدایه های مورد بررسی ۳۸
۳-۴-۲- تکثیر ناحیه‌ی CP ویروس CMV ۳۹
۳-۴-۳- IC-RT-PCR (Immunocapture RT-PCR) ۴۰
۳-۴-۴- آزمون RT-PCR برای بررسی وجود RNAهای اقماری ۴۲
۳-۴-۴- بررسی محصول واکنش PCR ۴۳
۳-۴-۵- بررسی تفاوت طول ناشی از هضم قطعات (RFLP) ۴۴
۳-۴-۶-توالی یابی جدایه‌های مورد بررسی ۴۴
فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۶
۴-۱-شناسایی ویروس‌های آلوده کننده‌ی اسفناج ۴۶

۴-۲-تکثیر جدایه‌ی مورد بررسی در شرایط گلخانه ۴۷
۴-۳- بررسی آلودگی علف‌های هرز به CMV..... ۴۸
۴-۴-بررسی دامنه‌ی میزبانی ۴۸
۴-۵- بررسی میزان بذرزادی..... ۵۳
۴-۶-انتقال با شته ۵۳
۴-۷-آزمون RT-PCR برای تکثیر ناحیه‌ی CP ویروس CMV..... ۵۳
۴-۸-آزمون IC-RT-PCR..... ۵۴
۴-۹-آزمون RT-PCR برای RNAهای اقماری ۵۵
۴-۱۰- آزمون RFLP..... ۵۶
۴-۱۱-تجزیه و تحلیل ترادف‌های بدست آمده ۵۷
۴-۱۲- مقایسه‌ی ترادف‌های حاصل با نواحی متناظر در سایر ویروس‌ها ۶۰
۴-۱۳- بحث..... ۷۴
فصل پنجم ۸۲
نتیجه‌گیری کلی ۸۲
پیشنهادها..... ۸۳
منابع ۸۴

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- اندازه ژنوم RNAها و موقعیت هر یک از ORFها در ویروس موزاییک خیار ۹
جدول ۲-۲- طبقه‌بندی تعدادی از نژاد مختلف CMV بر اساس خصوصیات سرولوژیکی ۱۸
جدول ۲-۳-مقایسه طول زنجیره نوکلئوتیدی RNAها و وزن مولکولی پروتئین‌های کد شده توسط آن‌ها در دو نژاد Fny و Q. ۲۰
جدول ۳-۲- مقادیر مصرفی مواد در RT-PCR ۳۹
جدول ۳-۳- مقادیر مصرفی مواد در IC-RT-PCR ۴۰
جدول ۳-۴- مواد لازم برای ساخت محصول IC-PCR و RT-PCR ۴۱
جدول ۳-۵- برنامه حرارتی IC-PCR و RT-PCR ۴۲
جدول ۳-۶-سیکل حرارتی PCR برای RNAهای اقماری ۴۳
جدول ۳-۷- علامت اختصاری و رس شمار جدایه‌هایی که در مقایسه های آمینواسیدی و نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفته اند. ۴۵
جدول ۴-۱- نتایج حاصل از آزمون دامنه‌ی میزبانی ۵۰
جدول ۴-۲- مقایسه‌ی ترادف نوکلئوتیدی قسمتی از RNA3 ویروس CMV جدایه‌ی SpK شامل CP و نواحی اطراف. ۷۰
جدول ۴-۳- مقایسه‌ی ترادف اسیدآمینه‌ی ژن CP جدایه‌ی SpK با نژادهای مختلف CMV ۷۱

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱- مزرعه اسفناج در منطقه‌ی داوران ۳۰
شکل ۳-۲- اسفناج‌های دارای علایم ویروسی جمع‌آوری شده از منطقه داوران ۳۰
شکل ۳-۳- علایم ویروسی بر روی اسفناج‌های خودرو اطراف مزارع در منطقه داوران ۳۱
شکل ۳-۴- برخی از علف‌های هرز جمع‌آوری شده از مزارع اسفناج ۳۲
شکل ۳-۵- قرار دادن بذرهای تهیه شده در پتری دیش برای انجام آزمون بذرزادی ۳۷
شکل ۴-۱- آزمون TPIA برای تشخیص آلودگی گیاهان یک ماه بعد از مایه‌زنی. ۴۷
شکل ۴-۲- علایم ایجاد شده بر روی اسفناج به وسیله‌ی جدایه‌ی SpK جدا شده از مزارع منطقه‌ی داوران ۴۸
شکل ۴-۳- لکه‌های موضعی ایجاد شده بر روی گیاهان ۵۱
شکل ۴-۴- زردی و موزاییک ملایم بر روی توتون ۵۲
شکل ۴-۵- رگبرگ روشنی ملایم در کدو مسمایی توسط جدایه‌ی SpK ۵۲
شکل ۴-۶- الگوی الکتروفورزی RNAی کل استخراج شده از گیاه اسفناج آلوده ۵۳
شکل۴-۷- نقوش الکتروفورزی مربوط به آزمون RT-PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ ۵۴
شکل ۴-۸- نقوش الکتروفورزی مربوط به آزمون IC-RT-PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ ٪ ۵۵
شکل۴-۹- نقوش الکتروفورزی مربوط به آزمون RNAهای اقماری با استفاده از ژل آگارز ۱ ٪ ۵۶
شکل ۴-۱۰- نقوش الکتروفورزی مربوط به آزمون RFLP با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ ٪ ۵۷
شکل ۴-۱۱- طرح شماتیک موقعیت قطعات تعیین ترادف شده‌ی حاصل از آزمون RT-PCR ۵۸
شکل ۴-۱۲- ترادف نوکلئوتیدی قسمتی ازRNA3 ویروس موزاییک خیار جدا شده از اسفناج در استان کرمان. ۵۸
شکل ۴-۱۳- موقعیت ORF پروتئین پوششی در قطعه‌ی تعیین ترادف شده از جدایه‌ی SpK. ۵۹
شکل ۴-۱۴- هم ردیف‌سازی چندگانه‌ی ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌ی SpK ۶۱
شکل ۴-۱۵- هم ردیف‌سازی چندگانه‌ی ترادف اسیدآمینه‌ای جدایه‌ی SpK ۶۸
شکل ۴-۱۶- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش Neighbor-joining (NJ) ۷۲
شکل ۴-۱۷- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش Neighbor-joining (NJ) ۷۳

فصل اول

مقدمه

اسفناج (Spinach) با نام علمی *Spinacia oleracea* L.، از تیره‌ی کنوپودیاسه[1]، گیاهی است دیپلوییید، در اغلب ژنوتیپ‌ها دو پایه[2]، یکساله و روز بلند، دارای ساقه‌ی راست به ارتفاع نیم متر که برگ‌های آن در ارقام مختلف دارای فرم و رنگ متفاوتی است. گل‌های اسفناج به رنگ سبز کم رنگ می‌باشد. دو نوع اسفناج وجود دارد که به نام‌های پاییزه و بهاره (انگلیسی) معروفند. اسفناج به خاطر داشتن مواد غذایی فراوان به‌صورت گسترده در دنیا کشت می‌شود و دارای خواص دارویی بسیار زیادی است(کاوازو[3] و همکاران، ۲۰۰۳). اسفناج که بومی آسیای مرکزی و به احتمال زیاد ایران است به علت دارا بودن املاح معدنی، پروتئین، ویتامین‌های A، B، C، آنتی اکسیدان‌ها و بیشترین پتانسیل جذب رادیکال‌های اکسیژن در بین سبزی‌ها، از اهمیت زیادی برخوردار است (Arshi, 2000; Balkaya *et al*., 2005; Bunea *et al*., 2008; Prohens and Nuez, 2008). این گیاه که مقاومت بالایی نسبت به سرما دارد، دارای مقادیر زیادی ویتامین B، آهن، ید، لسیتین، کلروفیل، کاروتن، اسید اگزالیک و اسید ارسنیک است (Swiader *et al*., 1992). اسفناج از مهم‌ترین سبزی‌های برگی

[1] Chenopodiaceae
[2] Dioecious
[3] Kawazu

است که به صورت تازه و یا فرآوری شده مصرف می‌شود (روباتزکی و یاماگوچی[1]، ۱۹۹۷). ویژگی‌های خاص این گیاه از جمله تعداد کم کروموزوم، دو پایه بودن، وجود کروموزوم‌های جنسی و کوتاه بودن دوره رشد و نمو موجب شده است تا به‌عنوان یک گیاه مدل در مطالعات ژنتیکی و مولکولی تعیین جنسیت مورد استفاده قرار گیرد (Sasaki *et al*., 1989). در حال حاضر توده‌های زیادی از این گیاه به صورت اهلی و وحشی در کشور وجود دارد که ممکن است بعضی، دارای ژن‌های مقاومت به بیمارگرها و آفات گیاهی باشند. شناسایی این ژنوتیپ‌ها و تلاقی بین آنها که برای به‌نژادگردان فوق‌العاده حائز اهمیت است، می‌تواند منجر به معرفی رقم‌های اصلاح شده با قابلیت تولید عملکرد بالا و مقاومت به عوامل خسارت‌زای گیاهی گردد (Kuchuck, 1979). در بررسی انجام شده توسط اسدی و حسن‌دخت (۲۰۰۷) پراکندگی اسفناج بومی در نقاط مختلف ایران تعیین شده است.

گیاه اسفناج همواره تحت تاثیر بیمارگرهای مختلفی قرار می‌گیرد. مهم‌ترین بیماری‌های خسارت‌زا به اسفناج عبارت‌اند از: لکه برگی باکتریایی (*Pseudomonas syringae*)، آنتراکنوز (*Colletotrichum dematium* f.sp. *spinacia*)، لکه برگی کلادوسپوریومی (*Cladosporium variabile*)، لکه برگی استمفیلومی (*Stemphilium botryosum*)، پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه (*Fusarium oxysporum, Pythium apbanidermatum, P. irregulare, Rhizoctonia solani*)، پوسیدگی فوزاریومی (*Fusarium oxysporum* f.sp. *spinacia*)، سفیدک دروغی (*Peronospora farinose* f.sp. *spinacia*)، پوسیدگی ورتیسیلیومی (*Verticillium dahliae*) و زنگ سفید (*Albugo ecidentalis*) و ویروس‌ها (Koike *et al*., 2006).

از مهم‌ترین ویروس‌های خسارت زننده به اسفناج می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: *Beet curly top virus*، *Beet western yellow virus*، *Lettuce specklies mottle virus*، *Beet mosaic virus*، *Tobacco mosaic virus*، *Broad bean wilt virus* و *Cucumber mosaic virus* (Francki *et al*., 1979 and Kaper *et al*., 1981) که باعث کاهش ۴۷-۲۳٪ محصول این گیاه می‌شوند (Correll *et al*., 1994; Wilson, 1985). ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) عضو تیپ جنس *Cucumovirus* و از خانواده‌ی *Bromoviridae*، ویروسی با دامنه‌ی میزبانی وسیع است که می‌تواند بیش از ۱۰۰۰ گونه‌ی گیاهی در ۸۵ خانواده و ۳۶۵ جنس را آلوده کند (Palukaitis *et al*., 1992; Roossinck *et al*., 1999; Lin *et al*., 2003; Madhubala *et al*., 2005). این ویروس روی

[1] Rubatzky and Yamagucki

میزبان‌های مختلف علایم متفاوت ایجاد می‌کند و باعث موزاییک، کوتولگی و کاهش محصول در خیار، موزاییک، کوتولگی، کاهش اندازه برگ و سرخسی شدن برگ[1] در گوجه‌فرنگی، نکروز انتهایی برگ‌ها در نخود، کوتولگی سویا، لکه حلقوی زنبق و کلروز در موز می‌شود. ویروس موزاییک خیار (CMV) در اسفناج باعث کلروز و کوتولگی شدید، جلوگیری از رشد جوانه‌ها، موزاییک و بدشکلی برگ‌های جوان و در نتیجه خسارت کمی و کیفی محصول می‌شود (Francki *et al*., 1979; Kaper, 1982; Yang *et al*., 1997).

در نمونه‌برداری‌های انجام شده بر روی تعدادی از محصولات صیفی و سبزی در منطقه داوران (شهرستان رفسنجان) استان کرمان در سال زراعی ۹۰-۸۹، گیاهان اسفناج با علایم موزاییک و بد شکلی شدید مشاهده گردیدند. بررسی‌های اولیه با آزمون الیزا رابطه‌ی عامل بیماری با ویروس موزاییک خیار را نشان داد. با وجود گزارش این ویروس توسط کایزر[2] و همکاران در سال ۱۹۷۱ بر روی اسفناج در منطقه کرج، تاکنون هیچ نوع مطالعه‌ای بر روی بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی این ویروس در ایران انجام نگرفته است. از سال ۱۹۷۱ تاکنون این ویروس از مناطق دیگر ایران جداسازی و گزارش نشده است. تحقیق حاضر تلاشی برای بررسی برخی از ویژگی‌های بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی جدایه‌ی جدا شده از اسفناج در این منطقه از استان کرمان می‌باشد.

[1] Fernleaf
[2] Kaiser

فصل دوم
مروری بر پژوهش‌های پیشین

۲-۱- تاریخچه‌ی ویروس موزاییک خیار

ویروس موزاییک خیار[1](CMV) اولین‌بار در سال ۱۹۱۶، به‌عنوان عامل بیماری موزاییک در بوته‌های هندوانه و خیار ایالت میشیگان و خیار نیویورک آمریکا گزارش شد (به نقل از Palukaitis *et al*., 1992). این بیماری به‌زودی از سایر نقاط آمریکا، اروپا، آفریقا و دیگر نواحی جهان به‌ویژه از مناطق معتدله شناسایی و به اسامی مختلف نامگذاری شد. مشخص شده است که این ویروس عامل بیش از ۴۰ بیماری مختلف گیاهی است که در گذشته به عوامل دیگر نسبت داده می‌شدند (Roossinck, 2001).

تاکنون اپیدمی‌های خطرناک و مختلفی توسط این ویروس ایجاد شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به نکروز حاد و نابود کننده‌ی گوجه‌فرنگی در ژاپن (Yoshida *et al*., 1984)، ایتالیا (Gallitelli *et al*., 1988 and Kaper *et al*., 1990) و اسپانیا (Jorda *et al*., 1992)، موزاییک شدید گوجه‌فرنگی در چین (Kearney *et al*., 1992)، سفید شدن برگ‌های گوجه‌فرنگی در نیویورک، موزاییک حبوبات در جنوب‌شرقی آمریکا، موزاییک خربزه در کالیفرنیا، موزاییک گیاهان گلخانه‌ای در اروپا (Palukaitis *et al*., 1992) و نخی شدن برگ‌های گیاه لوبیا گرگی[2] در استرالیا (Jones and Proudlove, 1991) اشاره کرد.

[1] *Cucumber mosaic virus*
[2] Lupine

تاکنون چندین نژاد ویروس موزاییک خیار از ایران گزارش شده است که اکثرا خسارت شدیدی به کدوییان و حبوبات می‌زنند. منوچهری در سال ۱۳۴۲ برای اولین‌بار CMV را به‌عنوان عامل بیماری موزاییک خیار و کدو از حومه‌ی شیراز گزارش نمود (به نقل از ایزدپناه ۱۳۶۱). مصباحی (۱۳۴۶) CMV را به‌عنوان عامل عقیم شدن نخود در منطقه کرج و ورامین معرفی کردند. دانش اولین محققی در ایران است که به‌طور کلاسیک روی شناسایی نژادهای ویروس موزاییک خیار تحقیقاتی انجام داد و با استفاده از گیاهان آزمون، شش نژاد مختلف از این ویروس را در ایران شناسایی و گزارش نمود (به نقل از ایزدپناه ۱۳۶۱). ایزدپناه در سال ۱۹۷۰ چند نژاد از این ویروس را از اطراف شیراز گزارش نمود و آن‌ها را یکی از عوامل بیماری‌زای ایجاد کننده‌ی موزاییک در استان فارس معرفی کرد (به نقل از رحیمیان ۱۹۷۵). کایزر و همکاران (۱۹۷۱) جدایه‌های مختلف این ویروس را از روی چندین گیاه متفاوت در مناطق مختلف ایران شناسایی کردند. رحیمیان (۱۹۷۵) نژادهای این ویروس را در استان فارس به‌طور وسیع مورد مطالعه قرار داد. وی هشت نژاد مختلف این ویروس را بر اساس علایم گزارش نمود و آن‌ها را بر اساس خصوصیات بیولوژیکی به چهار گروه تقسیم‌بندی نموده و نشان داد که در روش سرولوژیکی نشت دو طرفه آگار، یکی از هشت نژاد تفکیک‌پذیر است. هابیلی و الهی‌نیا (۱۳۵۸) چند میزبان طبیعی ویروس موزاییک خیار از استان خوزستان را معرفی کردند. الهی‌نیا (۱۳۶۱) با بررسی دامنه‌ی میزبانی و آزمون نشت در آگار، نژاد جدیدی از این ویروس را از روی طالبی گزارش نمود.

پرویزی (۱۳۶۸) یک جدایه‌ی این ویروس را از روی گیاهان جالیزی، از طریق آزمون سرولوژیک نشت دوطرفه آگار، تشخیص داد. ارزنی و آهومنش (۱۳۶۸) از روی گیاهان جالیزی استان اصفهان و کوهی دهکردی (۱۳۷۱) از روی توتون در استان مازندران این ویروس را گزارش کردند. علوی در سال ۱۳۷۲ جدایه‌های مختلف این ویروس را بر اساس علایم و آزمون نشت در آگار، از مناطق کشت گوجه‌فرنگی شناسایی کرد و فضعلی و همکاران در سال ۱۳۷۴ دو نژاد جدا شده از گوجه‌فرنگی را بر اساس خصوصیات بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی از یکدیگر تفکیک کردند (فضعلی و همکاران، ۱۳۷۴).

سبک‌خیز و همکاران (۱۳۸۲) در بررسی‌هایی که در سال ۱۳۸۰ به منظور شناسایی CMV انجام دادند، نمونه‌هایی از برگ‌های بوته‌های گوجه‌فرنگی، خیار و سایر کدوییان که علایم زردی، موزاییک، بدشکلی و بندکفشی شدن برگ را نشان می‌دادند را جمع‌آوری نموده و با استفاده از آزمون DAS-ELISA[1] میزان پراکنش این ویروس را در مزارع شمال استان خراسان رضوی و خراسان شمالی مورد

[1] Double antibody sandwich- ELISA

ارزیابی قرار دادند. در این بررسی، جهت شناسایی دقیق ویروس از آزمون RT-PCR[1] استفاده گردید ولی تحقیقی برای مشخص نمودن زیرگروه‌های CMV و پراکندگی آن‌ها در نمونه‌های جمع آوری شده انجام نگرفت.

سمیعی و همکاران (۱۳۸۳) از گلخانه‌های استان‌های گلستان، گیلان، مازندران و خراسان و شعبانیان و همکاران (۱۳۸۳) از گلخانه‌های خیار درختی منطقه‌ی جیرفت ویروس موزاییک خیار را گزارش نمودند.

معصومی و همکاران (۱۳۸۸) به‌منظور بررسی موقعیت فیلوژنتیکی ویروس موزاییک خیار، در گیاهان فلفل و ریحان شهرستان کرمان و مقایسه‌ی آن‌ها با جدایه‌های گزارش شده از دنیا، از یک جفت آغازگر اختصاصی ژن پروتئین پوششی استفاده کردند. از نظر ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی این دو جدایه ایرانی (فلفل و ریحان) به میزان ۹۹ درصد به هم شباهت داشتند و هر دو جدایه در زیر گروه IB قرار گرفتند. حسین‌زاده و همکاران در بین سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۰۹ تعداد ۹۳۵ نمونه گیاهی مشکوک به آلودگی ویروسی را از روی ۱۰ گونه‌ی گیاهی مختلف در استان‌های گلستان و مازندران جدا نموده و با آزمون DAS-ELISA به بررسی آن‌ها پرداختند. در مجموع ۲۷۵ نمونه‌ی گیاهی آلوده به CMV، ۱۹۸ نمونه آلوده به زیر گروه I، ۹۸ نمونه‌ی آلوده به زیر گروه II و ۴۵ نمونه‌ی آلوده به هر دو زیر گروه I و II بودند (Hosseinzade *et al*., 2012).

۲-۲- جایگاه ویروس موزاییک خیار در طبقه‌بندی ویروس‌های گیاهی

ویروس موزاییک خیار عضو تیپ جنس *Cucumovirus* است. جنس *Cucumovirus* در سال ۱۹۷۱ به‌عنوان یک گروه ویروسی مستقل نامگذاری و معرفی گردید (Harrison *et al*., 1971). ویروس‌های CMV، TAV (*Tomato aspermy virus*)، PSV (*Peanut stunt virus*) و GMMV (*Gay feather mild mottle virus*) از اعضای قطعی این جنس ویروسی می‌باشند (ICTV).

جنس *Cucumovirus* به همراه پنج جنس ویروسی *Alfamovirus*، *Anulavirus*، *Bromovirus*، *Ilarvirus* و *Oleavirus* در خانواده Bromoviridae قرار می‌گیرد. خانواده Bromoviridae به همراه ۷۲ خانواده‌ی ویروسی دیگر جز ویروس‌های بدون راسته مشخص[2] می‌باشند. اگرچه تاکنون برای این خانواده ویروسی، بالا خانواده‌ای[3] در نظر گرفته نشده است ولی اغلب پیشنهاد شده است که در بالا خانواده‌ی Alphavirus-like یا Sindbisvirus-like قرار بگیرند. در تمام جنس‌های این خانواده هر چهار قالب

[1] Reverse transcriptase- PCR
[2] Unassigned family
[3] Superfamily

خواندنی باز (ORF)[1] برای پروتئین‌های 1a، 2a، 3a و پروتئین پوششی(CP) وجود دارد در حالی که ORF پروتئین 2b فقط در جنس‌های *Cucumovirus* و *Ilarvirus* مشاهده شده است (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003).

۲-۳- ویژگی‌های ویروس موزاییک خیار

۲-۳-۱- ویژگی‌های فیزیکی CMV

ویروس‌های جنس *Cucumovirus* دارای سه پیکره با تقارن بیست وجهی[2] به قطر ۲۸-۳۰ نانومتر هستند (Edeardson and Christie, 1991; Matthews, 1991; Palukaitis; Garcia-Arenal, 2003). قطر داخلی این پیکره‌ها نیز ۱۶/۵ نانومتر گزارش شده است (Francki *et al*., 1985). نسبت جذب اشعه‌ی ماوراء بنفش این ویروس در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر ۱/۶۵ تعیین شده است (Francki *et al*., 1979). پیکره‌ی این ویروس بسیار شبیه ریبوزوم سلول‌های گیاهی است و در سیتوپلاسم، هسته و واکوئل‌ها دیده می‌شوند اما در میتوکندری و کلروپلاست حضور ندارند. گاهی پیکره‌های ویروس CMV در واکوئل‌ها جمع شده و در سلول‌های میزبان اینکلوژن بادی‌های بدون شکل (در برخی موارد کریستالی) ایجاد می کند (Francki *et al*., 1979; Kaper and Watherworth, 1981).

مطالعات میکروسکوپ الکترونی با رنگ آمیزی منفی و اطلاعات فیزیکی و شیمیایی نشان دادند که هر پیکره‌ی ویروس‌های جنس کوکوموویروس از ۱۸۰ زیر واحد[3] پروتئینی با وزن مولکولی یکسان ۲۴ تا ۲۶ کیلو دالتونی تشکیل شده است. وزن مولکولی پیکره CMV برابر با ۲۵/۳ کیلودالتون است. این زیر واحدها به صورت دسته‌های هگزامر و پنتامر با تقارن T=۳ قرار گرفته‌اند. پیکره‌های CMV از لحاظ ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی شبیه سایر اعضای جنس *Cucumovirus* است و بدین سبب نمی‌توان آن‌ها را از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی از یکدیگر تشخیص داد (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003). تفاوت پیکره‌های CMV و TAV از هم، تفاوت در میزان پایداری‌شان بعد از قرارگیری در معرض یون‌های منگنز می‌باشد (Habili and Francki, 1974).

[1] Open reading frame
[2] Icosahedral particles
[3] Subunit