

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

1.9.70

۸۷/۱/۱۰۴۸ ۸۳
۸۸/۱/۱۷



دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

بررسی خصوصیات بیولوژیکی و ویژگی های ژنوم جدایه های ایرانی
ویروس موزایک کدو

استاد راهنما:

دکتر حسین معصومی

استادان مشاور:

دکتر جهانگیر حیدرنژاد

دکتر اکبر حسینی پور

مؤلف:

نجمه شمشیری

شهریورماه ۱۳۸۷

ب

۱۰۹۷۵۷

کتابخانه مرکزی
دانشگاه شیراز

۸۸/۱/۱۷



دانشگاه شیراز

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: نجمه شمشیری

استاد راهنما: دکتر حسین معصومی

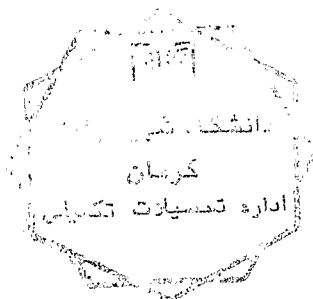
استاد مشاور اول: دکتر جهانگیر حیدر نژاد

استاد مشاور دوم: دکتر اکبر حسینی پور

داور: دکتر غلامعباس محمدی

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

حق چاپ محفوظ و مخصوص دانشگاه است.



تقدیم به:

یکتا پروردگار جهان و بزرگ آموزگار هستی

تقدیم به:

روان پاک مهندس علیرضا افضلی پور و بانو فاخره صبا

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم که دعای آنها سرمایه زندگی ام است.

تقدیم به:

خواهر مهربانم که همیشه و در همه حال بی ریاترین محبت ها را نثارم کرد.

تقدیم به:

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

سپاس گزاری:

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

برترین سپاس را تقدیم استاد ارجمندم جناب آقای دکتر معصومی می نمایم. پندار، گفتار و کردار نیک ایشان در وصول به این مقصود پیوسته چون چراغی فرارویم بود. بی گمان شاگردی این استاد فرزانه برای همیشه مایه فخر و مباهات من خواهد بود.

از اساتید مشاور بزرگوارم جناب آقای دکتر حیدر نژاد و جناب آقای دکتر حسینی پور که در طول این مدت مرا همفکری و همراهی نمودند، سپاسگزارم.

با تشکر از جناب آقای دکتر محمدی که زحمت داوری پایان نامه را به عهده گرفتند.

از اساتید محترم دوران تحصیل آقایان پروفسور شهیدی، دکتر احمدی، دکتر تکلوزاده، مهندس شعبانیان، مهندس خیراندیش و خانم‌ها مهندس لسانی، مهندس عقیقی، مهندس لری، مهندس لطیفی و مهندس ابراهیمی و خانم‌ها احمدی و حبیبی سپاسگزارم.

ارج می نهم همدلی دو خواهر مهربانم خانم‌ها شهدایی و ابراهیمی را که لحظه ای در این مسیر صعب همراهی مهربانانه شان را از من دریغ نداشتند.

از دوستان عزیزم خانم‌ها شمس الدین سعید، یوسف زاده، علوی، مظفری، شجاعی، سلاجقه، شریفی (مریم)، سالاری، حسینی، شریفی (فاطمه)، آرام، فاضلی، خراسانی، منگلی، کیوانی، محمدی، جعفری نژاد و بهارلوئی صمیمانه تشکر می نمایم.

چکیده:

یکی از ویروس های آلوده کننده کدوئیان ویروس موزاییک کدو یا *Squash mosaic virus* (SqMV) است. این ویروس از خانواده *Comoviridae* و جنس *Comovirus* می باشد. پیکره ها ایزومتریک و ژنوم آن به صورت دو قطعه آر.ان.ای تک لای مثبت (B-RNA, M-RNA) هستند. دو پیکره B و M هر یک حاوی یک رشته آر.ان.ای و پیکره T خالی از ژنوم است. SqMV دارای دو عدد پروتئین پوششی می باشد که هر دو توسط M-RNA کد می شوند. در مطالعه ای که به منظور شناسایی و تعیین پراکنش این ویروس در مناطقی از ایران طی ماههای خرداد لغایت مهر ۸۵ انجام گردید، تعداد ۱۶۱ نمونه گیاهی از مزارع کدوئیان استان های بوشهر، یزد، آذر بایجان شرقی، خراسان رضوی و همدان بر مبنای علائم جمع آوری شد. به منظور تأیید آلودگی نمونه ها از آزمون های الایزا استفاده گردید. در مجموع از ۱۶۱ نمونه تنها ۸ نمونه به ویروس موزاییک کدو (۱ نمونه از یزد و ۷ نمونه از خراسان رضوی) آلوده بودند که نشان دهنده گسترش بسیار محدود این ویروس در کشور می باشد. با توجه به اینکه تا کنون هیچ گونه مطالعه ای در مورد وضعیت مولکولی ویروس موزاییک کدو در ایران انجام نشده و همچنین در سطح جهانی هم تعداد معدودی گزارش از ژنوم این ویروس ثبت شده است، هدف اصلی این تحقیق، مطالعه ژنوم کامل ویروس و مقایسه جدایه های ایرانی با جدایه های گزارش شده در دنیا، می باشد. به این منظور چهار جدایه به ترتیب یک جدایه از یزد (YAZ-YAZ)، یک جدایه از تایباد استان خراسان رضوی (KHO-TAY)، و دو جدایه از تربت جام استان خراسان رضوی (KHO-TOR 1, KHO-TOR 2) انتخاب شدند. در جدایه های یزد و تایباد هر دو RNA (RNA-1, RNA-2) و در جدایه های تربت جام هر دو قطعه ژن پروتئین پوششی ویروس تکثیر و همسانه سازی گردیدند. جهت بررسی دامنه میزبانی چهار جدایه مورد نظر، از گیاهان آزمون متعلق به چهار خانواده *Cucurbitaceae*, *Chenopodiaceae*, *Leguminosae* و *Solonaceae* استفاده گردید. نتایج نشان داد جدایه های ایرانی به دست آمده تنها قادر به آلودگی گیاهان خانواده *Cucurbitaceae* به استثنای هندوانه هستند. نتایج آزمون الایزا هم مؤید این مطلب بود. علائم SqMV بر روی کدوئیان مایه زنی شده در گلخانه به صورت موزاییک، دندانان دار شدن حاشیه برگ ها، لکه های زرد بر روی برگ ها و خصوصاً در مورد طالبی، علائم به صورت رگبرگ نواری شدید دیده شد. از روی RNA-1 ویروس موزاییک کدو ۵ پروتئین کد می شوند که ترتیب قرارگیری ژن های کد کننده این پروتئین ها از سمت ۵' به ۳' ژنوم به ترتیب زیر می باشد: VPg, Helicase, Protease cofacto, RdRp و Protease. به منظور تکثیر طول کامل RNA-1 ابتدا از روی RNA-1 جدایه ژاپنی که به طور کامل تعیین ترادف شده است، تعداد ۷ پرایمر طراحی گردید. برخی از این پرایمرها قادر به تکثیر قطعه مورد نظر نبودند. به همین دلیل، بعد از تکثیر و همسانه سازی و همچنین تعیین ترادف سایر قطعات با توجه به دو قطعه قرار گرفته در دو طرف ناحیه تکثیر نشده، پرایمر جدید طراحی می شد. بعد از تکثیر قطعات مختلف نام برده شده، با در کنار هم قرار دادن آنها و حذف نواحی دارای همپوشانی طول کامل RNA-1 حاصل شد. همچنین در بانک ژن از روی جدایه ژاپنی محل آغاز و پایان ساخت هر پروتئین مشخص

گردید و به این ترتیب ترادف نوکلئوتیدی هریک از ژن ها به طور جداگانه به دست آمد. با استفاده از نرم افزار DNAMAN هر یک از ژن ها به رشته پروتئینی ترجمه گردید و سپس با استفاده از همین نرم افزار، درخت فیلوژنتیکی به منظور مقایسه جدایه های ایرانی و جدایه های موجود در بانک ژن برای هر یک از ژن ها به طور جداگانه و برای RNA-1 به صورت کلی ترسیم شد. در تمامی موارد درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای هم محاسبه گردید. درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن Protease cofactor و ژن VPg جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن بیانگر تشابه دو جدایه ایرانی با جدایه ژاپنی است، به گونه ای که در یک زیر گروه جداگانه قرار می گیرند و به ترتیب با Bootstrap ۶۴ و ۸۹ درصد از جدایه چینی مجزا می شوند. از نظر ترادف نوکلئوتیدی ژن Protease cofactor هر دو جدایه ایرانی به میزان ۸۸/۸ درصد با جدایه ژاپنی و از نظر ترادف اسید آمینه بیشترین تشابه به میزان ۹۶/۸ درصد بین جدایه ژاپنی و جدایه یزد می باشد. از نظر ترادف نوکلئوتیدی ژن VPg بیشترین تشابه بین جدایه های ایرانی و جهانی، بین جدایه ژاپنی و جدایه تایباد به میزان ۹۲/۹٪ می باشد. ترادف اسید آمینه پروتئین این ژن بیانگر تشابه صد در صدی تمامی جدایه ها است.

دو درخت فیلوژنتیک رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن های Helicase و Protease با یکدیگر تشابه دارند. در مورد هر دو ژن، دو جدایه ایرانی در یک زیر گروه و جدایه های جهانی در یک زیر گروه مجزا قرار می گیرند. درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه دو جدایه ایرانی به ترتیب ۹۶/۸ و ۹۹/۲ درصد برای ژن Helicase و ۹۷/۹ و ۱۰۰ درصد برای ژن Protease می باشد.

ژن های RNA dependent RNA polymerase (RdRp) و LCP در طبقه بندی جنس *Comovirus* نقش مهمی دارند، به گونه ای که اعضای مختلف این جنس بایستی از نظر ترادف اسیدهای آمینه پروتئین این دو ژن، بیش از ۷۵٪ تشابه داشته باشند. علاوه بر دو جدایه ژاپنی و چینی موجود در بانک جهانی ژن که شامل ترادف کامل RNA-1 می باشند، یک جدایه از آمریکا و یک جدایه از یونان هم وجود دارند که تنها ژن RdRp در آنها تعیین ترادف شده است. درخت فیلوژنتیک برای این ژن با استفاده از تمامی این جدایه ها ترسیم شد. بر مبنای این درخت جدایه های SqMV در دو گروه جداگانه I و II قرار می گیرند. گروه I شامل دو زیر گروه A (جدایه های ژاپن و یونان) و زیر گروه B (جدایه های چین و آمریکا) می باشد. جدایه های ایرانی در زیر گروه II قرار می گیرند. بیشترین تشابه بین جدایه های ایرانی و جهانی از نظر ترادف نوکلئوتیدی و ترادف اسید آمینه این ژن به ترتیب بین جدایه یزد و ژاپن به میزان ۸۹/۴٪ و بین جدایه یونان و هر دو جدایه ایرانی به میزان ۹۸/۸٪ می باشد. همچنین کمترین تشابه بین جدایه های ایرانی و جهانی از نظر ترادف نوکلئوتیدی و ترادف اسید آمینه این ژن به ترتیب بین KHO-TAY و R-SqMV به میزان ۸۶/۴٪ و بین جدایه چینی و هر دو جدایه ایرانی به میزان ۹۷/۱٪ می باشد.

به طور کلی از نظر ترادف نوکلئوتیدی کامل RNA-1 جدایه ایرانی یزد با همولوژی ۸۸/۳٪ با جدایه ژاپن و جدایه ایرانی تایباد با همولوژی ۸۷/۱٪ با جدایه چین شباهت دارند. از نظر ترادف اسید آمینه کامل RNA-1 نیز هر دو جدایه ایرانی بیشتر به جدایه کشور ژاپن شباهت دارند.

از روی RNA-2 ویروس موزاییک کدو سه پروتئین کد می شوند که ترتیب قرار گیری ژن های کد کننده این پروتئین ها از سمت ۵' به ۳' ژنوم به ترتیب زیر می باشد: Large Movement Protein، Coat Protein و Small Coat Protein. بر اساس درخت فیلوژنتیک ترسیم شده برای ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین حرکتی، جدایه های ایرانی در گروه I قرار می گیرند که با Bootstrap ۹۴٪ از جدایه های جهانی که در گروه II قرار می گیرند، مجزا می شوند. در میان جدایه های جهانی نیز جدایه های ژاپن و Kimble در زیر گروه A و جدایه های چین و Arizona در زیر گروه B قرار می گیرند.

درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین حرکتی بیانگر تشابه بالای دو جدایه ایرانی (۹۸/۲٪) می باشد. همچنین درصد همولوژی ترادف اسید آمینه پروتئین حرکتی جدایه های ایرانی به میزان ۹۹/۴٪ تعیین شده است. بیشترین و کمترین میزان تشابه بین جدایه های ایرانی و جهانی از نظر ترادف اسید آمینه این ژن به ترتیب بین جدایه های تایباد با Kimble و ژاپن به میزان ۹۸/۱٪ و یزد با آریزونا به میزان ۹۶/۱٪ می باشد. درخت فیلوژنتیک ترسیم شده برای ترادف نوکلئوتیدی قطعات بزرگ و کوچک ژن پروتئین پوششی به هم شبیه می باشد به گونه ای که جدایه های جهانی در یک گروه و جدایه های ایرانی در یک گروه جداگانه قرار می گیرند. تفاوت عمده در ارتباط جدایه های ایرانی با یکدیگر است. بر اساس درخت فیلوژنتیک ترسیم شده برای ترادف نوکلئوتیدی قطعه بزرگ ژن پروتئین پوششی جدایه های KHO-TOR 2 و YAZ-YAZ به یکدیگر شبیه بوده که با Bootstrap ۶۰ درصد از جدایه KHO-TAY مجزا می شوند. این جدایه نیز با Bootstrap ۸۲ درصد از جدایه KHO-TOR 1 تفکیک می شود. در حالی که بر اساس درخت فیلوژنتیک ترسیم شده برای ترادف نوکلئوتیدی قطعه کوچک ژن پروتئین پوششی، جدایه های KHO-TOR 1 و KHO-TOR 2 به هم شبیه بوده و با Bootstrap ۶۱ درصد از جدایه های KHO-TAY و YAZ-YAZ جدا می شوند.

به طور کلی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی کامل RNA-2 و بر خلاف مناطق مشترک جداسازی جدایه ها، جدایه های چین و آریزونا در یک زیر گروه مجزا قرار گرفته و با Bootstrap ۱۰۰ درصد از جدایه های ژاپن و Kimble جدا می شوند. دو جدایه ایرانی نیز در یک گروه جداگانه قرار می گیرند. بیشترین درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی کامل RNA-2 بین جدایه KHO-TAY و Y-SqMV به میزان ۸۴/۲٪ است. همچنین بیشترین درصد همولوژی بین جدایه های جهانی بین جدایه های چین و آریزونا به میزان ۹۹٪ می باشد. بیشترین درصد همولوژی ترادف اسید آمینه RNA-2 بین جدایه های Kimble و KHO-TAY به میزان ۹۶/۸ درصد و در بین جدایه های جهانی، بین جدایه های آریزونا و چین به میزان ۹۹/۱ درصد می باشد. درصد همولوژی ترادف اسید های آمینه RNA-2 و ترادف نوکلئوتیدی جدایه های ایرانی به ترتیب ۹۹/۷ و ۹۸/۸ درصد می باشد.

فصل اول: مقدمه

- ۲-۱-۱- کدوئیان.....
- ۲-۱-۱-۱- مشخصات گیاه شناسی.....
- ۲-۱-۱-۲- اهمیت غذایی و اقتصادی کدوئیان.....
- ۳-۱-۱-۳- اکولوژی تیره کدوئیان.....
- ۴-۱-۲- انواع کدو.....
- ۴-۱-۲-۱- تاریخچه و مشخصات گیاه شناسی.....
- ۴-۱-۲-۱-۱- کدو تنبل (*Cucurbita maxima*).....
- ۴-۱-۲-۱-۲- کدو مسمایی یا خورشیدی (*Cucurbita pepo*).....
- ۵-۱-۲-۱-۳- کدو حلوائی (*Cucurbita moschata*).....
- ۵-۱-۲-۲- شرایط آب و هوایی مورد نیاز.....
- ۵-۱-۳- خیار (*Cucumis sativus L.*).....
- ۵-۱-۳-۱- منشا و اهمیت اقتصادی.....
- ۶-۱-۳-۲- مشخصات گیاه شناسی.....
- ۶-۱-۳-۳- شرایط آب و هوایی مورد نیاز.....
- ۷-۱-۴- خربزه و طالبی (*Cucumis melo L.*).....
- ۷-۱-۴-۱- اصل و قدمت.....
- ۷-۱-۴-۲- مشخصات گیاه شناسی.....
- ۸-۱-۴-۳- شرایط آب و هوایی مورد نیاز.....
- ۸-۱-۵- هندوانه.....
- ۸-۱-۵-۱- منشا و مناطق مورد کشت.....
- ۹-۱-۵-۲- مشخصات گیاه شناسی.....
- ۹-۱-۵-۳- شرایط آب و هوایی مورد نیاز.....
- ۱۰-۱-۶- اهداف تحقیق.....

فصل دوم: بررسی منابع

- ۱۴-۲-۱- نگاهی به وضعیت ویروس های آلوده کننده کدوئیان در دنیا.....
- ۱۷-۲-۲- نگاهی به وضعیت ویروس های کدوئیان در ایران.....
- ۱۸-۲-۳- ویروس موزاییک کدو در جهان.....
- ۲۰-۲-۴- ویروس موزاییک کدو در ایران.....
- ۲۰-۲-۵- خانواده *Comoviridae*.....

۲۱	Comovirus جنس ۲-۵-۱
۲۲	Fabavirus جنس ۲-۵-۲
۲۲	Nepovirus جنس ۲-۵-۳
۲۲	۲-۶- ساختار ژنوم ویروس موزاییک کدو
۲۳	۲-۷- وقایع بعد از حضور ویروس در گیاه
۲۴	۲-۸- همانند سازی و ترجمه
۲۵	۲-۹- سازماندهی ژنوم
۲۵	۲-۹-۱- پروتئین های کدشده توسط B-RNA
۲۶	۲-۹-۲- پروتئین های کدشده توسط M-RNA
۲۶	۲-۹-۳- موقعیت نواحی برش
۲۶	۲-۱۰- خصوصیات فیزیکی SqMV
۲۷	۲-۱۱- علائم ایجاد شده توسط SqMV بر روی گیاهان
۲۹	۲-۱۲- گروه های سرولوژیکی
۲۹	۲-۱۳- رابطه سرولوژیکی SqMV با ویروس های دیگر
۳۰	۲-۱۴- دامنه میزبانی
۳۰	۲-۱۴-۱- میزبان های تشخیصی
۳۰	۲-۱۴-۲- میزبان تکثیری
۳۰	۲-۱۴-۳- میزبان مولد لکه موضعی
۳۱	۲-۱۵- روشهای انتقال
۳۱	۲-۱۵-۱- انتقال مکانیکی
۳۱	۲-۱۵-۲- انتقال با بندر
۳۲	۲-۱۵-۳- انتقال به وسیله ناقلین حشره ای
۳۳	۲-۱۶- مطالعات مولکولی
۳۵	۲-۱۷- آلودگی گیاه
۳۵	۲-۱۸- استفاده از گیاهان ترانسژنیک برای مقابله با SqMV
فصل سوم: مواد و روش ها		
۴۰	۳-۱- نمونه برداری
۴۰	۳-۲- آزمون الایزا (ELISA) Enzyme-linked immunosorbent assay
۴۱	۳-۲-۱- مراحل روش ساندویچ دو طرفه
۴۳	۳-۲-۲- مراحل انجام آزمون الایزای غیر مستقیم
۴۴	۳-۲-۳- بافرهای مورد استفاده در آزمون های ELISA

۴۶	۳-۳- تعیین دامنه میزبانی ویروس
۴۸	۳-۴- استخراج Total RNA
۴۹	۳-۵- آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز به روش نسخه برداری معکوس
۵۱	۳-۶- مواد تشکیل دهنده بافر PCR
۵۱	۳-۷- مواد تشکیل دهنده dNTPs
۵۲	۳-۸- آغازگرهای مورد استفاده
۵۳	۳-۹- الکتروفورز افقی
۵۴	۳-۹-۱- مواد تشکیل دهنده بافر TBE(2x)
۵۴	۳-۹-۲- مواد تشکیل دهنده 6x loading dye
۵۴	۳-۹-۳- آماده سازی نشانگر مولکولی
	۳-۱۰- خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت Purification Kit, Bioneer, AccuPrep@PCR
۵۵	Korea
۵۶	۳-۱۱- استفاده از RACE Kit, 2nd Generation 5'3' جهت تکثیر دو انتهای ژنوم
۵۶	۳-۱۱-۱- مراحل تکثیر انتهای ۳' ژنوم
۵۸	۳-۱۱-۲- مراحل تکثیر انتهای ۵' ژنوم
۶۴	۳-۱۲- مراحل انجام همسانه سازی
۶۴	۳-۱۲-۱- قرار دادن قطعه دی. ان. ای درون ناقل
۶۵	۳-۱۲-۲- کشت باکتری <i>E. coli</i> روی محیط کشت جامد LB بدون آنتی بیوتیک
۶۶	۳-۱۲-۳- کشت باکتری <i>E. coli</i> در محیط کشت مایع C-medium
۶۶	۳-۱۲-۴- انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری <i>E. coli</i>
۶۸	۳-۱۲-۵- آماده سازی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک
۶۸	۳-۱۲-۶- انتخاب پرگنه های حاوی پلاسمید نوترکیب
۶۹	۳-۱۲-۷- کشت پرگنه های انتخابی در محیط کشت مایع LB
۶۹	۳-۱۲-۸- آماده سازی محیط کشت مایع LB
۶۹	۳-۱۲-۹- استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری
	۳-۱۲-۹-۱- استخراج پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche, Germany
۷۰	۳-۱۱-۹-۲- استخراج پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت AccuPrep@Plasmid extraction Kit, Bioneer, Korea
۷۱	۳-۱۲-۱- هضم آنزیمی پلاسمید
۷۳	۳-۱۳- نگهداری باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

- ۱۴-۳- آماده سازی نمونه ها برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی..... ۷۴
- ۱۵-۳- تعیین ترادف قطعات ژنی تکثیر شده در جدایه های SqMV و مقایسه آن با سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن..... ۷۴

فصل چهارم: نتایج و بحث

- ۱-۴- شناسایی و تعیین پراکنش SqMV در مناطقی از ایران..... ۷۶
- ۲-۴- تعیین دامنه میزبانی SqMV..... ۷۸
- ۳-۴- بررسی علائم SqMV بر روی گیاهان مایه زنی شده خانواده *Cucurbitaceae*..... ۸۲
- ۴-۴- آزمایش انتقال با بندر..... ۸۲
- ۵-۴- استخراج Total RNA و آزمون RT-PCR..... ۸۳
- ۶-۴- همسانه سازی جدایه های SqMV..... ۸۵
- ۷-۴- بحث..... ۹۸
- ضمیمه ۱..... ۱۱۱
- ضمیمه ۲..... ۱۱۳
- ضمیمه ۳..... ۱۱۵
- ضمیمه ۴..... ۱۱۶
- ضمیمه ۵..... ۱۱۷
- ضمیمه ۶..... ۱۲۱
- ضمیمه ۷..... ۱۲۴
- ضمیمه ۸..... ۱۳۴

فصل پنجم: منابع

- منابع..... ۱۴۳

فهرست جداول

جدول ۱-۱- میزان مواد غذایی موجود در محصولات مختلف کدوئیان در ۱۰۰ گرم بافت گیاهی.....	۳
جدول ۱-۲- فهرست برخی از ویروس های آلوده کننده کدوئیان.....	۱۱
جدول ۲-۱- علائم ناشی از SMV روی سه گونه از کدوئیان.....	۲۸
جدول ۲-۲- مقایسه پنج جدایه SqMV از آمریکا از نظر بیماری زایی.....	۲۸
جدول ۲-۳- درصد تشابه آمینو اسیدی پروتئین های پوششی چهار عضو جنس <i>Comovirus</i>	۳۴
جدول ۲-۴- فهرست زمانی گزارش های ویروس های کدوئیان که احتمالاً با SqMV مرتبط هستند.....	۳۶
جدول ۳-۱- نام گیاهانی که برای تعیین دامنه میزبانی و شناسایی ویروس موزائیک کدو (SqMV) در آزمایشگاه استفاده شدند.....	۴۷
جدول ۳-۲- مواد مورد نیاز برای ساخت cDNA.....	۵۰
جدول ۳-۳- مواد لازم جهت انجام PCR.....	۵۱
جدول ۳-۴- فهرست آغازگرهای مورد استفاده به منظور تکثیر قطعات مختلف RNA-1.....	۵۲
جدول ۳-۵- فهرست آغازگرهای مورد استفاده به منظور تکثیر قطعات مختلف RNA-2.....	۵۳
جدول ۳-۶- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور ساخت cDNA ناحیه ۳' ژنوم با استفاده از Oligo dT- anchor primer.....	۵۷
جدول ۳-۷- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور انجام PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر در ناحیه ۳'.....	۵۷
جدول ۳-۸- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور انجام PCR کنترل مربوط به RNA آماده در کیت.....	۵۸
جدول ۳-۹- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور ساخت cDNA ناحیه ۵' ژنوم.....	۶۰
جدول ۳-۱۰- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور اضافه کردن دم پلی A به cDNA.....	۶۰
جدول ۳-۱۱- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور انجام اولین PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر در ناحیه ۵' ژنوم.....	۶۱
جدول ۳-۱۲- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور انجام Nested PCR.....	۶۱
جدول ۳-۱۳- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور انجام اولین PCR کنترل (Control of first-strand).....	۶۲

- جدول ۱۴-۳- مواد مورد نیاز و مقدار آنها به منظور انجام دومین PCR کنترل
 ۶۲.....(Control PCR Amplification of the dA-tailed First-strand cDNA)
 جدول ۱۵-۳- فهرست آغازگرهای طراحی شده به منظور تکثیر انتهای ۳' و ۵' رشته RNA-1 که بر مبنای
 ژنوم جدایه های ایرانی طراحی شده اند..... ۶۳
 جدول ۱۶-۳- فهرست آغازگرهای طراحی شده به منظور تکثیر انتهای ۳' و ۵' رشته RNA-2 که بر مبنای
 ژنوم جدایه های ایرانی طراحی شده اند..... ۶۳
 جدول ۱۷-۳- مواد مورد نیاز و مقدار آن ها برای انجام واکنش Ligation..... ۶۴
 جدول ۱۸-۳- مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت جامد LB..... ۶۵
 جدول ۱۹-۳- مواد مورد نیاز و مقدار لازم به منظور انجام عمل هضم آنزیمی..... ۷۳
 جدول ۱-۴- مناطق نمونه برداری شده به منظور شناسایی و تعیین پراکنش ویروس موزائیک کدو
 (SqMV) طی ماه های خرداد لغایت مهر ۸۵..... ۷۷
 جدول ۲-۴- میزان آلودگی مزارع کدوئیان پنج استان کشور به ویروس های متداول کدوئیان..... ۷۷
 جدول ۳-۴- جدایه های مورد بررسی SqMV موجود در بانک ژن جهت مقایسه و رسم دندروگرام و
 تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه های ایرانی این ویروس..... ۸۷
 جدول ۴-۴- جدایه های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق همراه با حروف مخفف مورد استفاده..... ۸۷

فهرست اشکال

- شکل ۱-۴- علائم موزائیک بر روی کدوی رقم خوی مایه زنی شده با جدایه یزد..... ۷۹
 شکل ۲-۴- موزائیک و دندانه دار شدن حاشیه برگ ها بر روی کدوی رقم خوی مایه زنی شده با جدایه
 تایباد..... ۷۹
 شکل ۳-۴- موزائیک در کدوی رقم خوی مایه زنی شده با جدایه تربت جام..... ۸۰
 شکل ۴-۴- رگبرگ نواری در طالبی رقم گرد ایرانی مایه زنی شده با جدایه یزد..... ۸۰
 شکل ۵-۴- موزائیک و رگبرگ نواری بر روی طالبی رقم گرد ایرانی مایه زنی شده با جدایه تربت
 جام..... ۸۰
 شکل ۶-۴- علائم SqMV جدایه تایباد بر روی طالبی رقم گرد ایرانی..... ۸۱
 شکل ۷-۴- موزائیک خفیف بر روی خیار رقم Peto Seed مایه زنی شده با جدایه یزد..... ۸۱
 شکل ۸-۴- رگبرگ نواری بر روی خربزه رقم Asgrown مایه زنی شده با جدایه تایباد..... ۸۱
 شکل ۹-۴- الکتروفورز محصول PCR (قطعه بزرگ ژن پروتئین پوششی) تکثیر شده با آغازگرهای
 SqMV-R و SqMV-F در ژل آگارز..... ۸۳

- شکل ۱۰-۴- الکتروفورز محصول PCR (ژن RNA dependent RNA polymerase) تکثیر شده با آغازگرهای SqMV-R و SqMV-F در ژل آگارز..... ۸۴
- شکل ۱۱-۴- الکتروفورز محصول PCR (قطعه کوچک ژن پروتئین پوششی) تکثیر شده با آغازگرهای SqMV-R و SqMV-F در ژل آگارز..... ۸۴
- شکل ۱۲-۴- الکتروفورز پلاسمید نو ترکیب حاوی قطعه بزرگ ژن پروتئین پوششی جدایه های SqMV هضم شده با آنزیم های *Ecor1* و *Pst1* درون ژل آگارز..... ۸۶
- شکل ۱۳-۴- پرگنه سفید و آبی بر روی محیط کشت LB..... ۸۶
- شکل ۱۴-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین حرکتی (MP) جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۸۸
- شکل ۱۵-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین حرکتی (MP) جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۸۸
- شکل ۱۶-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه پروتئین حرکتی (MP) جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۸۸
- شکل ۱۷-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی قطعه بزرگ ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۸۹
- شکل ۱۸-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی قطعه بزرگ ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۸۹
- شکل ۱۹-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه قطعه بزرگ پروتئین پوششی جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۸۹
- شکل ۲۰-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی قطعه کوچک ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۰
- شکل ۲۱-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی قطعه کوچک ژن پروتئین پوششی جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۰
- شکل ۲۲-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه قطعه کوچک پروتئین پوششی جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۰
- شکل ۲۳-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی RNA-2 جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۱

- شکل ۲۴-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی RNA-2 جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۱
- شکل ۲۵-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه پلی پروتئین RNA-2 جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۱
- شکل ۲۶-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن Protease cofactor جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۲
- شکل ۲۷-۴-مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی ژن Protease cofactor جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۲
- شکل ۲۸-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه پروتئین Protease cofactor جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۲
- شکل ۲۹-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن Helicase جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۳
- شکل ۳۰-۴-مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی ژن Helicase جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۳
- شکل ۳۱-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه پروتئین Helicase جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۳
- شکل ۳۲-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن VPg جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۴
- شکل ۳۳-۴-مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی ژن VPg جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۴
- شکل ۳۴-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه پروتئین VPg جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۴
- شکل ۳۵-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن Protease جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۵
- شکل ۳۶-۴-مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی ژن Protease جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۵
- شکل ۳۷-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه پروتئین Protease جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۵
- شکل ۳۸-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن RdRp جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN..... ۹۶

- شکل ۳۹-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی ژن RdRp جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN ۹۶
- شکل ۴۰-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه پروتئین RdRp جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN ۹۶
- شکل ۴۱-۴: درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی RNA-1 جدایه های ایرانی SqMV و سایر جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN ۹۷
- شکل ۴۲-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف نوکلئوتیدی RNA-1 جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN ۹۷
- شکل ۴۳-۴- مقایسه درصد همولوژی ترادف اسیدهای آمینه پلی پروتئین RNA-1 جدایه های ایرانی SqMV و جدایه های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN ۹۷
- شکل ۴۴-۴- نقشه ژنومی RNA-1 ویروس موزاییک کدو ۱۰۲
- شکل ۴۵-۴- موقعیت پرایمر های طراحی شده به منظور تکثیر RNA-1 ویروس موزاییک کدو ۱۰۳
- شکل ۴۶-۴- نقشه ژنومی RNA-2 ویروس موزاییک کدو ۱۰۶
- شکل ۴۷-۴- موقعیت پرایمر های طراحی شده به منظور تکثیر RNA-2 ویروس موزاییک کدو ۱۰۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کدوئیان

۱-۱-۱- مشخصات گیاه شناسی

تیره کدو جزء گیاهان عالی و از رده دو لپه ای ها می باشند و شامل گیاهان علفی و غالباً پیچان و یا دارای اندامک های پیچک مانندند. برخی از گیاهان این تیره غده دار، به ندرت بوته های درختچه مانند و یا درختانی با ساقه و تنه گوشتی و احیاناً خاردار هستند. برگ ها منفرد، ساده، دمبرگ دار، کامل و یا دارای پهنک چند بخشی با اشکال متفاوتند. گل ها تک جنس، منظم و متقارن و یا نامتقارن و دارای تخمدان زیرین هستند. میوه به صورت سته ای است که غالباً بسیار بزرگ می شود مانند کدو، هندوانه، خربزه. برون بر میوه همیشه چرمی و گاهی مانند کدو قلیانی، چوبی است. میان بر میوه معمولاً بسیار ضخیم، گوشتی و خوشمزه می باشد. دانه ها بسیار فراوانند و روی جدار درونی و بخش مرکزی حفره میوه درون مایع ژله مانند ای که آن را پر می کند قرار دارند. بسیاری از گیاهان این تیره میوه خوراکی دارند، یعنی میان بر آنها گوشتی و قابل استفاده است (قهرمان، ۱۳۷۳).

۱-۱-۲- اهمیت غذایی و اقتصادی کدوئیان

بسیاری از گیاهان تیره کدو خواص دارویی داشته و عده ای از آنها خوراکی هستند. این گیاهان از نظر اقتصادی دارای اهمیت فراوانی هستند که با تولید سالانه بیش از ۶۰ میلیون تن حدود ۱۴٪ تولید جهانی سبزیجات را به خود اختصاص داده اند. در این بین به ترتیب هندوانه مقام سوم، خیار مقام پنجم، طالبی مقام هفتم و انواع کدو مقام هشتم را در بین سایر سبزیجات دارا هستند. کدوئیان

که به آنها جالیز گفته می شود دارای ۹۰ جنس و ۷۵۰ گونه اند که همگی طالب آب و هوای گرم می باشند (قهرمان، ۱۳۷۳ و پیوست ۱۳۸۴).

جدول ۱-۱- میزان مواد غذایی موجود در محصولات مختلف کدوئیان در ۱۰۰ گرم بافت

گیاهی (طباطبائی، ۱۳۶۵)

محصول	انرژی (کالری)	پروتئین (گرم)	چربی (گرم)	کلسیم (میلیگرم)	فسفر (میلیگرم)	آهن (میلیگرم)	ویتامین A (واحد.۹)	تیامین	ریبوفلاوین	نیاسین	آسکوربیک
خیار	۲۲	۱/۴	۰/۲	۳۶	۲۳	۰/۷	۶۶۰	۰/۰۷	۰/۱	۰/۵	۱۴
طالبی	۲۰	۰/۶	۰/۲	۱۷	۱۶	۰/۴	۳۴۲۰	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۵	۳۳
کدو مسماهی	۱۶	۰/۶	۰/۱	۱۵	۵	۰/۴	۲۶۰	۰/۰۵	۰/۰۹	۰/۸	۱۷
هندوانه	۲۸	۰/۵	۰/۲	۱۲	۷	۰/۴	۵۹۰	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۲	۶

۳-۱-۱- اکولوژی تیره کدوئیان

گیاهان این تیره در هر نوع آب و هوایی از گرمسیری و نیمه گرمسیری تا آب و هوای مناطق خشک و استپی و آب و هوای مدیترانه ای و نیز معتدل و مرطوب به خوبی می رویند. در آب و هوای بسیار خشک نیاز به آبیاری دارند و بهترین آب و هوا برای آنها آب و هوای نیمه گرم مدیترانه ای است. این گیاهان بطور کلی نور پسند هستند. از نظر شرایط خاک کم نیاز هستند و در اکثر خاک های آبرفتی بستر رودخانه ها و حتی به طور دیم نیز کشت می شوند. به مواد آلی نیاز کمی دارند و با ریشه های عمیق خود می توانند از آب ذخیره شده در لایه های پائین خاک استفاده نمایند. گونه های این تیره در برابر آفات و بیماری ها نسبتا حساس هستند و به بوته میری و سایر بیماری های قارچی و ویروسی آلوده می شوند (طباطبائی، ۱۳۶۵).