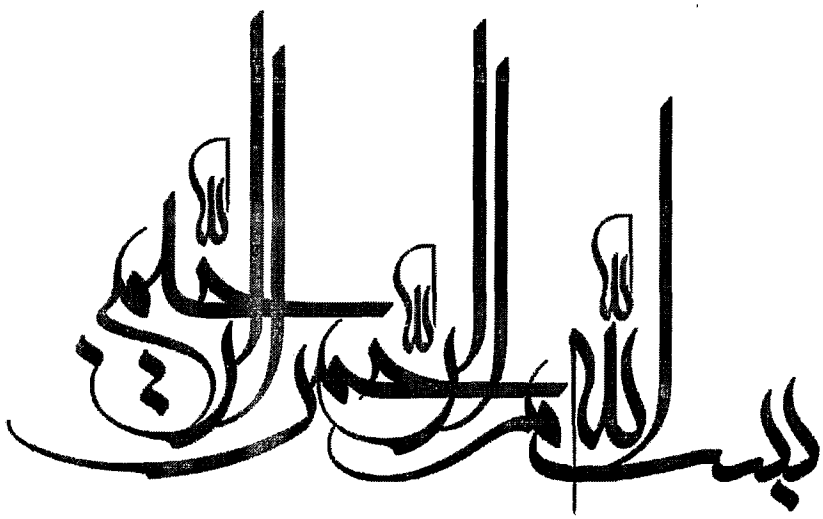

١١٤٠١٩٩

دانشکده کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

بیان پروتئین پوششی و پروتئین غیرساختمانی NS4 ویروس نوارک ایرانی گندم در باکتری *Escherichia coli* و تعیین ترادف ناحیه ۳' قطعه شماره یک ژنوم

استاد راهنما:

دکتر جهانگیر حیدرنژاد

استادان مشاور:

پروفسور کرامت الله ایزدپناه

دکتر غلامرضا شریفی

مؤلف:

ساره شهدائی

۱۳۸۸/۴/۲۱

مرکز اطلاعات مدارک علمی ...
تهیه مدارک

شهریورماه ۱۳۸۷

۱۱۴۸۹۹

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: ساره شهدائی

استاد راهنما: دکتر جهانگیر حیدرنژاد

استاد مشاور اول: دکتر کرامت الله ایزدپناه

استاد مشاور دوم: دکتر غلامرضا شریفی

داور: دکتر حسین معصومی

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

حق چاپ محفوظ و مخصوص دانشگاه است.

دانشگاه شهید
کرمان
اداره تحصیلات تکمیلی

خداوند بی نهایت است و لا مکان و بی زمان

اما به قدر فهم تو کوچک می شود

و به قدر نیاز تو فرود می آید

و به قدر آرزوی تو گسترده می شود

و به قدر ایمان تو کارگشا می شود

خداوند همه چیز می شود همه کس را ...

تقدیم به پدرم و مادرم،

شادی ام و آرامشم؛ به شما که بی دلیل عشق می ورزید و عشق می آموزید و بی مهابا حتی در بیابان وحشت، پشتیبانم شدید تا درشت ترین قطرات باران علم را از آن خود کنم.

با عشقی بی پایان به شما که خود هم آغاز، هم طریق و هم پایان راه زندگی ام هستید.

و

تقدیم به زیباترین تندیس صداقت و مهر،

همسر صبورم

مصطفی

سپاس بیکران از استاد عالیقدر جناب آقای دکتر حیدرنژاد
که پندار، گفتار و کردار نیکشان در وصول به این مقصود پیوسته چون چراغی فراورویم بود.

از اساتید مشاور بزرگوارم جناب آقای پروفسور ایزدپناه در دانشگاه شیراز و جناب آقای دکتر شریفی که در طول این مدت مرا همفکری و همراهی نمودند، سپاسگزارم.

با تشکر از جناب آقای دکترمعصومی که زحمت داوری پایان نامه را به عهده گرفتند و در دوران تحصیل نیز همواره از علم و منش بزرگوارانه ایشان بهره بردم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر گلچین که در طول انجام پروژه، صمیمانه مددرسانم بودند کمال تشکر و امتنان را دارم.

با تشکر از جناب آقای مهندس شعبانیان، که همواره راهنمای من در انجام کارهای آزمایشگاهی بوده و از هیچ کمکی دریغ نکردند.

با تشکر از خانم ها و آقایان احمدی، حبیبی، کمشکی و سایر پرسنل بخش گیاهپزشکی.

ارج می نهم همدلی دوستان و همراهان عزیزم خانم ها و آقایان شمشیری، ابراهیمی، فاضلی، یوسف زاده، شمس الدین سعید، علوی، مظفری، شجاعی، شریفی، بلوک یزدی، سلاجقه، سالاری، حسینی، پورامینی، آرام، خراسانی، منگلی، کیوانی، محمدی، بهارلوئی، خیری نسب و همه عزیزانی که ممکن است نامشان را فراموش کرده باشم.

چکیده

ویروس نوارک ایرانی گندم (Iranian wheat stripe virus, IWSV) عضو غیر قطعی جنس تنوئی ویروس است که در سال ۱۹۸۹ از ایران (شیراز) گزارش شد. این ویروس در طبیعت به صورت پایا و تکثیری توسط زنجرک *Unkanodes tanasijevici* از خانواده *Delphacidae* منتقل می شود ولی همانند سایر تنوئی ویروس ها با روش مکانیکی و بذر منتقل نمی شود. ژنوم ویروس نوارک ایرانی گندم حاوی چهار قطعه آر. ان. ای می باشد که قطعات دوم، سوم و چهارم آن آمبی سنس هستند و قطعه اول تاکنون فقط بر روی ژل آگاروز دیده شده است. پیش از این کل طول قطعات دوم، سوم و چهارم این ویروس تعیین ترادف شده است که تقریباً شبیه سایر تنوئی ویروس ها به ویژه ویروس برگ سفید برنج و ویروس برگ سفید اکینوکلوآ می باشد. علیرغم دامنه میزبانی وسیع IWSV در شرایط آزمایشگاهی، تا کنون فقط آلودگی طبیعی گندم و برنج به این ویروس مشخص گردیده است و در مناطق برنج کاری اطراف شیراز یکی از ویروس های مهم این محصول به شمار می رود. بواسطه خصوصیات متفاوت شامل روابط سرولوژیکی، ترادف نوکلئوتیدی، دامنه میزبانی و نوع ناقل، ویروس نوارک ایرانی گندم بعنوان یک گونه جدید در جنس *Tenuivirus* پیشنهاد شده است. در تنوئی ویروس ها پروتئین پوششی (CP) و پروتئین غیرساختمانی (NS4) بسیار ایمینوژن بوده و آنتی بادی های تهیه شده بر علیه آنها برای ردیابی ویروس در طبیعت و بررسی وظایف این ژن ها مورد استفاده قرار می گیرد. به منظور تهیه آنتی بادی بر علیه این دو پروتئین، زنجرک های آلوده در سنین مختلف پس از جمع آوری از مزارع برنج دشتک استان فارس به گلدان های گندم رقم روشن منتقل شدند. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پروتئین پوششی و پروتئین غیرساختمانی NS4 تکثیر و همسانه سازی شدند. سپس ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن های مذکور با ترادف های مشابه گندم موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار DNAMAN مقایسه شدند. بر این اساس مشخص شد که درصد یکسان بودن ترادف نوکلئوتیدی در جدایه های گندم وبرنج برای دو ژن یکسان و به میزان ۹۹/۶ درصد می باشد. بامقایسه ترادف دو ژن CP و NS4 ویروس جدا شده از روی برنج و سه ویروس عامل برگ سفیدی در سه گیاه برنج، اکینوکلوآ و یوروکلوآ در قاره امریکا بار دیگر مشخص شد که IWSV با سه ویروس مذکور رابطه نزدیکی دارد. بر اساس اطلاعات موجود به نظر می رسد که منشأ IWSV از برنج باشد.

به منظور دسترسی به ترادف نوکلئوتیدی انتهای '۳ قطعه اول IWSV با استفاده از آغازگرهای دژنره یک ترادف حدوداً ۶۰۰ جفت بازی تکثیر و همسانه سازی شد. بعد از ترجمه این قطعه، ترادف ۱۴۶ اسید آمینه مربوط به پروتئین آر. ان. ای پلیمراز با ترادف های مشابه مربوط به سایر تنوئی ویروس ها مقایسه گردید. نتایج حاصل نشان داد که آنزیم آر. ان. ای پلیمراز مربوط به IWSV بیشترین شباهت را با UHBV به میزان

۷۹/۶ دارد. این نتایج یکبار دیگر شباهت IWSV را با ویروس های عامل بیماری برگ سفیدی در قاره امریکا تأیید می کند.علاوه بر این، مشابه با سایر تنوئی ویروس ها این قطعه نیز دارای قطبیت منفی است.
جهت بیان ژن و تهیه پروتئین های غیرساختمانی و پوششی ژن های CP و NS4 پس از همسانه سازی به ناقل pET 28a انتقال یافتند. پلاسمیدهای نوترکیب به سلول های باکتریایی *Escherichia coli* جدایه BL21 DE3 منتقل و به منظور مطالعه حضور پروتئین های مورد نظر پس از القای بیان، پروتئین های محلول استخراج شدند. جهت آنالیز نمونه ها (شامل سلول های رویی و ته نشین شده)، از دو تکنیک SDS-PAGE و وسترن بلات استفاده گردید. نتایج حاصل از الکتروفورز به روش SDS-PSGE دو باند را در موقعیت های ۴۰/۹ و ۲۳ کیلودالتون نشان داد که منطبق با وزن مولکولی محصولات بالقوه ای است که توسط دو ژن تولید می شوند.به منظور اثبات ماهیت پروتئین های استخراج شده با بکار بردن پادتن چند همسانه ای اختصاصی در تکنیک وسترن بلات، در محل هایی که دو پروتئین ویروس لکه برداری شده بود، رنگ صورتی ظاهر شد. جهت مطالعات بعدی، لازم است روش های دیگری برای استخراج پروتئین مورد مطالعه قرار گیرد.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مشخصات گیاه شناسی گندم..... ۲

۱-۲- اصل و قدمت گندم..... ۴

۱-۳- اهمیت اقتصادی و ارزش غذایی گندم..... ۵

۱-۴- آفات و بیماری های گندم..... ۶

۱-۵- اهمیت اجرای پروژه..... ۸

فصل دوم: مروری بر تحقیقات گذشته

۲-۱- مروری بر وضعیت تنوئی ویروس ها در جهان..... ۱۱

۲-۱-۱- تاریخچه پیدایش و پراکنش جغرافیایی تنوئی ویروس ها..... ۱۱

۲-۱-۲- تاکسونومی تنوئی ویروس ها..... ۱۴

۲-۱-۳- مورفولوژی..... ۱۴

۲-۱-۴- خصوصیات فیزیکو شیمیایی تنوئی ویروس ها..... ۱۵

۲-۱-۵- علائم..... ۱۶

۲-۱-۶- دامنه میزبانی..... ۱۷

۲-۱-۷- انتقال..... ۱۸

۲-۱-۸- ژنوم تنوئی ویروس ها..... ۱۹

۲-۱-۹- واکنش متقابل میزبان و ویروس..... ۲۸

۲-۱-۱۰- تنوع ژنتیکی..... ۲۹

۲-۱-۱۱- ارتباطات سرولوژیکی..... ۳۰

۲-۱-۱۲- کنترل..... ۳۱

۲-۱-۱۳- گیاهان ترانس ژنیک..... ۳۲

۲-۱-۱۴- روابط فیلوژنتیکی..... ۳۳

۲-۲- ویروس نوارک ایرانی گندم..... ۳۶

۲-۲-۱- تاریخچه..... ۳۶

۲-۲-۲- مورفولوژی و خصوصیات فیزیکی..... ۳۶

۲-۲-۳- علائم..... ۳۷

۲-۲-۴- دامنه میزبانی..... ۳۷

۲-۲-۵- ناقل و ارتباط آن با ویروس..... ۳۸
۲-۲-۶- ارتباطات سرولوژیکی..... ۳۹
۲-۲-۷- ساختار ژنوم..... ۴۰
۲-۲-۸- روابط فیلوژنتیکی..... ۴۴

فصل سوم: مواد و روش ها
۳-۱- منبع ویروس..... ۴۶
۳-۲- استخراج Total RNA..... ۴۷
۳-۲-۱ استخراج آر.ان. ای با استفاده از کیت High Pure Viral RNA, Roche, Germany..... ۴۷
۳-۲-۲- آغازگرهای مورد استفاده..... ۴۸
۳-۲-۳ آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز به روش نسخه برداری معکوس-Reverse transcription polymerase chain reaction) RT-PCR..... ۴۸
۳-۲-۳-۱- مواد تشکیل دهنده بافر PCR..... ۵۱
۳-۲-۳-۲- مواد تشکیل دهنده dNTPs..... ۵۱
۳-۲-۳-۳- برنامه واکنش PCR..... ۵۱
۳-۳- الکتروفورز افقی..... ۵۲
۳-۳-۱- مواد تشکیل دهنده بافر TBE(2x)..... ۵۳
۳-۳-۲- مواد تشکیل دهنده 6x Loading dye..... ۵۳
۳-۳-۳- آماده سازی نشانگر مولکولی..... ۵۳
۳-۴- خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت AccuPrep®PCR Purification Kit, Bioneer, Korea..... ۵۴
۳-۵- استخراج محصول PCR و پلاسمید از ژل با استفاده از کیت QIAquick gel..... ۵۵
۳-۶- مراحل انجام همسانه سازی..... ۵۶
۳-۶-۱- قرار دادن قطعه دی. ان. ای درون ناقل..... ۵۶
۳-۶-۲- کشت باکتری *Escherichia coli* روی محیط کشت جامد LB..... ۵۷
۳-۶-۳- کشت باکتری *E.coli* در محیط کشت مایع C-medium..... ۵۸
۳-۶-۴- انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری *E. coli*..... ۵۸

۳-۶-۵- آماده سازی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک..... ۶۰
۳-۶-۶- انتخاب پرگنه های حاوی پلاسمید نوترکیب..... ۶۰
۶-۳-۷- کشت پرگنه های انتخابی در محیط کشت مایع LB ۶۰
۳-۶-۸- آماده سازی محیط کشت مایعLB ۶۱
۳-۶-۹- استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری..... ۶۱
۳-۶-۹-۱- استخراج پلاسمید نوترکیب بااستفاده ازکیت High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche, Germany..... ۶۱
۳-۶-۹-۲- استخراج پلاسمید نوترکیب بااستفاده ازکیت AccuPrep®Plasmid extraction Kit, Bioneer, Korea..... ۶۳
۳-۶-۱۰- هضم آنزیمی پلاسمید..... ۶۴
۳-۶-۱۱- نگهداری باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب..... ۶۵
۳-۷- آماده سازی نمونه ها برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی..... ۶۵
۳-۸- تعیین ترادف قطعات ژنی تکثیر شده در IWSV و مقایسه آن با جدایه گندم و سایر گونه های تنوئی ویروس موجود در بانک جهانی ژن..... ۶۵
۳-۹- تهیه سلول های مستعد *E. coli* با استفاده از کلرید کلسیم..... ۶۶
۳-۹-۱- ترانسفورماسیون سلول های مستعد *E. coli* به کمک شوک حرارتی..... ۶۷
۳-۱۰- القای بیان پروتئین در *E. coli* (Protein expression)..... ۶۸
۳-۱۱- استخراج پروتئین های موجود در بخش سیتوپلاسمی..... ۶۹
۳-۱۱-۱- استخراج پروتئین با Lysozyme solution threatment ۶۹
۳-۱۱-۲- استخراج پروتئین با BugBuster nuclease treatment ۷۰
۳-۱۲- تعیین جرم مولکولی پروتئین پوششی (NCP) و پروتئین عمده غیر ساختمانی (NS4) با استفاده از روش (SDS-PAGE)..... ۷۲
۳-۱۲-۱- محلول های مورد نیاز برای تهیه ژل پلی آکریل آمید..... ۷۲
۳-۱۲-۲- تهیه ژل..... ۷۴
۳-۱۲-۳- آماده کردن ژل..... ۷۵
۳-۱۲-۴- آشکار سازی (Gel staining) پروتئین ها در ژل SDS-PAGE..... ۷۶
۳-۱۳- شناسایی پروتئین پوششی و پروتئین عمده غیر ساختمانی با استفاده از آزمون وسترن بلات (Western blot)..... ۷۷

فهرست مطالب

۳-۱۳-۱- مواد لازم برای تهیه بافر انتقال..... ۷۸

۳-۱۳-۲- بافر فسفات نمکی Phosphate buffered saline (PBS) ۷۸

۳-۱۳-۳- بافر شستشو Phosphate buffer saline-Tween (PBS-T) ۷۹

۳-۱۳-۴- محلول سوبستریت..... ۷۹

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- پرورش زنجرک های حاوی IWSV و شناسایی این ویروس..... ۸۱

۴-۲- استخراج Total RNA و آزمون PCR..... ۸۴

۴-۳- تعیین ترادف قسمت '۳ قطعه RNA1 ویروس نوارک ایرانی گندم..... ۸۵

۴-۴- همسانه سازی و تعیین ترادف قطعات مختلف IWSV..... ۸۶

۴-۵- مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ژن های CP و NS4 در جدایه های گندم و برنج..... ۹۲

۴-۶- مقایسه ترادف نوکلئوتیدی قسمت ناحیه انتهای '۳ قطعه RNA1 ویروس نوارک ایرانی گندم..... ۹۲

۴-۷- همسانه سازی و تعیین ترادف ژن های مربوط به پروتئین های عمده غیرساختمانی و پوششی IWSV با استفاده از پلاسمید pET 28a..... ۹۲

۴-۸- بیان پروتئین عمده غیرساختمانی و پروتئین پوششی..... ۹۶

۴-۹- ردیابی IWSV با استفاده از تکنیک وسترن بلات..... ۹۹

فصل پنجم: بحث

۵-۱- بحث..... ۱۰۵

۵-۲- تحقیقات بعدی..... ۱۱۶

فصل ششم: منابع

منابع..... ۱۱۸

فهرست جداول

جدول ۱-۱- مواد غذایی موجود در دانه گندم به درصد.....۶
جدول ۱-۲- مواد موجود در آندوسپرم دانه گندم به درصد.....۶
جدول ۱-۳- مهم ترین ویروس های آلوده کننده گندم.....۷
جدول۲-۱- ناقلین گونه های مختلف جنس تنوئی ویروس و درصد انتقال هر کدام با تخم.....۱۹
جدول ۲-۲- آر. ان. ای های ژنومی گونه های مختلف جنس تنوئی ویروس ۲۴
جدول ۳-۱- فهرست آغازگرهای مورد استفاده به منظور تکثیر قطعات مختلف.....۴۸
جدول ۳-۲- مواد مورد نیاز برای ساختن cDNA.....۴۹
جدول ۳-۳- مواد لازم برای PCR جهت تکثیر ژن پروتئین پوششی و پروتئین عمده
غیرساختمانی.....۵۰
جدول ۳-۴- مواد لازم برایPCR جهت تکثیر قطعه ۶۰۰ تایی ۵۱
جدول ۳-۵- مواد مورد نیاز و مقدا رآن ها برای انجام واکنش Ligation با پلاسمید
pTZ57R/T.....۵۶
جدول ۳-۶- مواد مورد نیاز و مقدا رآن ها برای انجام واکنش Ligation با پلاسمید
pET28a.....۵۷
جدول ۳-۷- مواد مورد نیاز جهت تهیه ۱۰۰میلی لیترمحیط کشت جامد LB.....۵۸
جدول ۳-۸- مواد موردنیازومقدارآن هابرای انجام هضم آنزیمی در پلاسمید pTZ57R/T.....۶۴
جدول ۳-۹- مواد موردنیازومقدارآن هابرای انجام هضم آنزیمی در پلاسمید pET28a.....۶۴
جدول ۴-۱- کد (Accession number) و نام پروتئین مربوط به آن در جدایه ها یا ویروس های
مورد استفاده در آنالیزهای فیلوژنتیکی انجام شده در تحقیق حاضر.....۱۰۳

فهرست اشکال

شکل ۲-۱- پیکره های رشته ای و مارپیچ ویروس برگ سفید برنج..... ۱۵
شکل۲-۲- طرح شماتیک استراتژی کد کردن ژنوم ویروس برگ سفید برنج (RHBV) و ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی (TSWV)..... ۳۴
شکل۲-۳- مقایسه ترادف نوکلئوتیدی در دو انتهای '۳ و '۵ دو جنس *Tenuivirus* و *Phlebovirus*..... ۳۵
شکل ۲-۴- طرح شماتیک ORF های واقع در رشته های (v) و مکمل (vc) قطعات دوم، سوم و چهارم و پروتئین های مربوطه در ویروس نوارک ایرانی گندم ۴۰
شکل ۴-۱- پوره (راست) و حشره ماده (چپ) زنجرک *Unkanodes tanasijevici* آلوده به ویروس نوارک ایرانی گندم (IWSV)..... ۸۲
شکل ۴-۲- نوارهای سبز تیره در زمینه سبز کمرنگ در برگ گندم آلوده به ویروس نوارک ایرانی گندم..... ۸۲
شکل ۴-۳- نوارهای سبز تیره در زمینه سبز کم رنگ در برگ گندم آلوده به ویروس نوارک ایرانی گندم (IWSV)..... ۸۳
شکل ۴-۴- کوتولگی شدید و سفیدی برگ گندم در اثر ابتلا به ویروس نوارک ایرانی گندم (IWSV)..... ۸۳
شکل ۴-۵- نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژ نهای پروتئین پوششی (CP) و پروتئین غیرساختمانی (NS4) ویروس نوارک ایرانی گندم درژل آگاروز یک درصد..... ۸۴
شکل ۴-۶- باند حاصل از الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره IWSV-600/IWSV در ژل آگارز یک درصد..... ۸۵
شکل ۴-۷- باند حاصل از الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره IWSV1-516F/IWSV در ژل آگارز یک درصد..... ۸۶
شکل۴-۸-پرگنه سفید و آبی برروی محیط کشت LB..... ۸۷
شکل ۴-۹- باند حاصل ازالکتروفورزمحصول به دست آمده ازعمل هضم آنزیمی با آنزیم های *Eco*RI و *Pst*I روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده..... ۸۸
شکل ۴-۱۰- باند حاصل از الکتروفورز محصول به دست آمده از عمل هضم آنزیمی با آنزیم های *Eco*R1 و *Pst*1 روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده..... ۸۹
شکل ۴-۱۱- باند حاصل از الکتروفورز محصول به دست آمده از عمل هضم آنزیمی با آنزیم های *Eco*R1 و *Pst*1 روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده..... ۹۰

فهرست اشکال

شکل ۴-۱۲- باند حاصل از الکتروفورز محصول به دست آمده از عمل هضم آنزیمی با آنزیم های *EcoR1* و *Pst1* روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده..... ۹۱
شکل ۴-۱۳- نقشه پلاسمید pET28a..... ۹۳
شکل ۴-۱۴- توالی بخشی از وکتور pET28a..... ۹۴
شکل ۴-۱۵- باند حاصل ازالکتروفورزمحصول به دست آمده ازعمل هضم آنزیمی با آنزیم های *SalI* و *BamHI* روی پلاسمید نوترکیب استخراج شدها..... ۹۵
شکل ۴-۱۶- باند حاصل ازالکتروفورزمحصول به دست آمده ازعمل هضم آنزیمی با آنزیم های *SalI* و *BamHI* روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده..... ۹۶
شکل۴-۱۷- نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه های پروتئین عمده غیرساختمانی بر روی ژل پلی آکریلامید..... ۹۷
شکل۴-۱۸- نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه پروتئین پوششی بر روی ژل پلی آکریلامید.... ۹۸
۴-۹- ردیابی IWSV با استفاده از تکنیک وسترن بلات..... ۹۹
شکل ۴-۱۹- نتایج حاصل از ردیابی نمونه های پروتئینی با استفاده از تکنیک وسترن بلات... ۹۹
شکل۴-۲۰- مقایسه شباهت (homology) ترادف نوکلئوتیدی ژن CP در دو جدایه گندم (IWSV-W) وبرنج (IWSV-R)..... ۱۰۰
شکل۴-۲۱- مقایسه شباهت (homology) ترادف نوکلئوتیدی ژن NS4 در دو جدایه گندم (IWSV-W) و برنج (IWSV-R)..... ۱۰۰
شکل۴-۲۲- مقایسه شباهت (homology) ترادف آمینواسیدی ژن CP در دو جدایه گندم (IWSV-W) وبرنج (IWSV-R)..... ۱۰۱
شکل۴-۲۳- مقایسه شباهت (homology) ترادف آمینواسیدی ژن NS4 در دو جدایه گندم (IWSV-W) وبرنج (IWSV-R)..... ۱۰۱
شکل ۴-۲۴- مقایسه درصد شباهت (homology) ترادف آمینواسیدی (راست) و نوکلئوتیدی (چپ) قطعه ۶۰۰ تایی انتهای '۳ قطعه RNA1..... ۱۰۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مشخصات گیاه شناسی گندم

گندم *(Triticum aestivum* L.*)* گیاهی علفی و یک ساله متعلق به خانواده گندمیان *(Poaceae)* است که به عنوان غله دانه ریز از سطح دریا تا ارتفاع بیش از ۳۰۰۰ متر کشت می شود. این گیاه با خاک های رس- لوم زهکش دار و با محیط های خشک یا نیمه خشک مناطق معتدل بهترین سازش را دارد. ارتفاع بوته های گندم ممکن است به بیش از دو متر برسد؛ اما ارتفاع بیشتر انواع زراعی آن حدود یک متر است. ریشه گیاه بالغ افشان و عمق آن ۲-۱ متر است. گیاه گندم نیز مانند بسیاری از گندمیان دیگر به شکل کولئوپتیل (Coleoptile) دارای ریشه های بذری از بذر خارج می شود. سپس از طوقه هایی که معمولاً درست زیر سطح خاک تشکیل شده است، پنجه ها و ریشه ها می رویند. طوقه مجموعه ای فشرده از گره هاست که وقتی میانگره ای رشد می کند و ساقه ماشوره ای را به وجود می آورد از هم جدا می شوند. میانگره بالایی ساقه ماشوره ای، دم گل آذین سنبله یا خوشه را حمل می کند. برگ های گندم در گره های ساقه تشکیل می شوند. آرایش برگ ها متناوب است و برگ یک پهنک دارای رگبرگ های موازی و غلاف چسبیده به ساقه دارد. خوشه یا سنبله در بالای گیاه و در مدت آخرین مراحل دراز شدن ساقه خارج می شود اما در نوک ساقه، که ابتدا به وسیله برگ های مجاور سطح خاک غلاف شده است، تشکیل می شود. تجمع بالاترین گروه گره های ساقه ای که روی خوشه تشکیل می شوند محور سنبله را تشکیل می دهد که قسمت های گل و بذر روی آن متمایز می شوند. هر گره روی محور سنبله یک سنبلک به وجود می آورد که دارای شش تا گلچه در داخل پوشه است. هر گلچه پس از باروری دانه ای تولید می کند که انتهای رویانی آن چسبیده است و در انتهای آن یک دسته سلول اپیدرمی (epidermal) مو مانند سخت قرار گرفته است. گندم نوعاً گیاهی خود گشن است.

دگرگشنی در شرایط مزرعه معمولاً کمتر از دو درصد تمام گلچه ها را در بر می گیرد (وایز، ۱۳۷۶).

گیاه گندم به انواع مختلفی تقسیم می شود. گندم خوشه سفید، قرمز، سیاه، سخت و نرم، غلافی (دارای جلد یا غلاف)، معمولی (با ساقه توخالی و دانه های برهنه)، گندم شیشه، پروانه و رنگ دانه های آن سفید، نخودی، قهوه ای یا قرمز می باشد (اخوت، ۱۳۸۳). معمولاً گندم ها را به دو دسته کلی گندم بهاره و گندم پاییزه تقسیم بندی می کنند. این دو نوع علاوه بر آن که دانه های شان از نظر رنگ ، بافت ، شکل و ... باهم فرق دارد شرایط رشد و نمو آنها نیز با هم متفاوت است. این دو نوع گندم را در دو زمان مختلف در سال کشت می نمایند. دانه گندم ، دارای شیاری است که در طول دانه قرار می گیرد. عمق این شیار در گندم های پاییزه زیاد و در گندم های بهاره کم است. طرفین این شیار در گندم های بهاره گرد و در گندم های پاییزه گوشه‌دار می باشد. گندم بهاره در اوایل بهار کاشته می شود. پس از جوانه زدن ، گیاه جوان در بهار و اوایل تابستان رشد نموده و محصول آن را تا اواخر تابستان برداشت می کنند. گندم بهاره را معمولاً در نواحی ای کشت می کنند که گندم پاییزه نمی‌تواند در برابر سرمای سخت زمستانی آن مناطق ، مقاومت نماید. البته میزان محصول دهی گندم پاییزه از بهاره بیشتر است. معمولاً پس از تهیه بذر و زمانی که دمای خاک به یک درجه سانتیگراد بالای صفر رسید، گندم بهاره را می کارند. اگر شرایط اب و هوایی اجازه دهد می توان گندم را زودتر هم کاشت تا دوره رشد آن طولانی‌تر شده و میزان محصول دهی آن بیشتر شود. گندم پاییزه برای آن که به مرحله گلدهی برسد، باید به مدت طولانی در معرض هوای سرد قرار گیرد. اگر گندم پاییزه را در بهار بکارند، چون دوره سرما را پشت سر نمی گذارد، نمی تواند گل اذین خوبی تشکیل دهد. این نوع گندم در نیم کره شمالی ، در فصل

پاییز موقعی که دمای خاک از ۱۳ درجه سانتیگراد کمتر باشد کشت می شود. ابتدا بذر گندم پاییزه جوانه می زند. سپس در فصل زمستان ، گیاه به صورت گیاه جوان کوچکی باقی می ماند و با آغاز فصل بهار ، مجدداً رشد و نمو خود را آغاز می کند. معمولاً در یکی از ماه های خرداد ، تیر یا نهایتاً مرداد ، دانه می رسد و آماده برداشت می شود. گندمهای پاییزه به نسبت گندم های بهاره ریشه‌های عمیق‌تر و پرپشت‌تری دارند که تا ۲۰۰ سانتیمتر در خاک نفوذ می‌کنند. این امر ناشی از آن است که گندم های پاییزه فصل رشد طولانی‌تری دارند (http://fa.wikipedia.org).

۱-۲- اصل و قدمت گندم

این گیاه حدود ۱۲ تا ۱۷ هزار سال قبل از میلاد در خاورمیانه کشت می شده است و حدود ۱۰ تا ۱۵ هزار سال قبل از میلاد نیز در آسیا وجود داشته است. به طور دقیق مرکز اصلی گندم های اولیه که شامل *Tirticum monococcum* و *T. dicoccum* می باشند از سوریه و فلسطین بوده که از این دو منطقه به مصر و بین النهرین و سپس ایران و از طریق ایران به هندوستان، ترکستان، چین و روسیه و سرانجام اروپا منتقل و از طریق اروپا به سایر نقاط جهان برده شده است. برخی از گیاه شناسان مرکز اولیه گندم را از مصر می دانند زیرا معتقدند که مقداری از دانه های گندم در مقبره مصریان قدیم و در کنار رود نیل به دست آمده است (خدابنده، ۱۳۷۹). یکی از دلایل قدمت این گیاه با ارزش، اشاره های مکرر قرآن مجید به آن است ؛ چنانچه در آیات سوره یوسف (ع) در جواب پادشاه مصر و پیشگوئی و تدبیر شگفت انگیز آن حضرت بیان گردیده و با توجه به آن به اهمیت دقت در خلقت گندم می توان پی برد (اخوت، ۱۳۸۳).