دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

تنوع ژنتیکی ویروس موزائیک جنوبی مرغ در جنوب ایران

توسط:

فریده فرح بخش

استاد راهنما:

دکتر علیرضا افشاریفر

شهریور ماه ۱۳۸۸

بسم الله الرحمن الرحيم

به نام خدا

اظهارنامه

اینجانب فریده فرح بخش (۸۵۰۶۱۸) دانشجوی رشته ی گیاهپزشکی گرایش بیماری شناسی گیاهی دانشکده ی کشاورزی اظهارمی کنم که این پایان نامه حاصل پژوهش خودم بوده و در جاهایی که از منابع دیگران استفاده کرده ام، نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته ام. همچنین اظهار می کنم که تحقیق و موضوع پایان نامه ام تکراری نیست و تعهد می نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاوردهای آن را منتشر ننموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق با آیین نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام ونام خانوادگی: فریده فرح بخش

تاریخ و امضا:

۸۸/۱۰/۱۴

به نام خدا

تنوع ژنتیکی ویروس موزائیک جنوبی مرغ در جنوب ایران

به وسیله‌ی

فریده فرح بخش

پایان نامه
ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی
از فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی

بیماری شناسی گیاهی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی

دکتر علیرضا افشاریفر، دانشیار بخش گیاهپزشکی (رئیس کمیته).....

دکتر کرامت اله ایزدپناه، استاد بخش گیاهپزشکی .....

دکتر محمود معصومی، استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی فارس.....

دکتر سید علی اکبر بهجت نیا، استادیار بخش گیاهپزشکی.....

شهریور ۱۳۸۸

تقدیم به ساحت مقدس حضرت ولی عصر (عج)

که زمین تشنه عدالت اوست

تقدیم به روح پدر بزرگوارم

و مادر عزیزم

که وجودم همواره برایشان رنج و سختی بود و وجودشان برایم همه مهر

تقدیم به دو خواهر و برادرم

که پیروزی و سعادتشان آرزوی من است

و تقدیم به

استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر علیرضا افشاریفر

که موفقیتشان لذت بزرگ زندگی من است

سپاسگزاری

خدای را سپاس که ثنا شایسته اوست، هم او که ما را یاری نمود تا در گمراهی‌های دنیا مسیر درست را بشناسیم و در این مسیر راهنمایانی صدیق بر ما گمارد و درهای علم را به ربوبیت و پروردگارش بر ما گشود و بر اخلاص در توحید و یگانگی اش راهنماییمان فرمود و از شک و دودلی در امر خود دورمان ساخت.

مراتب امتنان و سپاس خویش را به محضر استاد ارجمندم جناب آقای دکتر علیرضا افشاریفر که این پژوهش مرهون زحمات، راهنمایی ها، تلاش‌های بیدریغ و همراهی صمیمانه ایشان است، تقدیم می دارم و همچنین از زحمات استاد ارجمندم جناب آقای دکتر کرامت اله ایزدپناه که راه تحصیل را به من نشان دادند و ساختار فکر علمی و پژوهشی من را پایه گذاری کردند و اندیشه علمی من را هدایت نمودند، تشکر می‌کنم. مدیون و سپاسگزار استاد ارجمندم جناب آقای دکتر محمود معصومی که بزرگوارانه و با نهایت صبر و بردباری راه تحقیق را به من نشان دادند و در تمام مراحل انجام پایان نامه همراهیم نمودند، می‌باشم. از استاد گرامیم جناب اقای دکتر سید علی اکبر بهجت نیا که پیوسته راهنمایم بودند تشکر می‌کنم. مدیون و سپاسگزار سایر اساتید محترم بخش جناب آقایان دکتر بنی هاشمی، دکتر تقوی، دکتر حمزه زرقانی، دکتر فاطمی، دکتر کارگربیده، دکتر مستوفی زاده قلمفرسا، دکترنیازی، دکتر جواهری، دکتر عالیچی، دکتر نواب، آقای مهندس اسدی و خانم مهندس پروین هستم و از اینکه به عنوان شاگرد در محضر این اساتید بوده ام خدا را شکر می-کنم.

از خانواده ام که عاشقانه و صادقانه تلاش کرده اند تا با آرامش درس بخوانم صمیمانه تشکر می کنم و از خدای بزرگ آرزوی سلامتی، سعادت همه جانبه برای آنها، خواستارم.

از جناب آقای مهندس امیررضا توکلی ریاست محترم مرکز تحقیقات کشاورزی داراب بخاطر مساعدت در انجام پایان نامه تشکر می‌نمایم. از جناب آقای مهندس محمد صادق صادقی کارشناس محترم مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی کمال امتنان را دارم. از دوستان خوبم خانم‌ها مجذوب ابدالی، فتاحی، مختاری، شیرزادی نژاد، عالم زاده، خلیل زاده، علوی نژاد، پاکدل، نعمتی، حسین پور، ایزدیان، حسنی، برزگر، صفایی، طاهری، آثاری و آقایان باقریان، عمید مطلق، چارگانی، رومی، صیام پور، الماسی، یاسایی، زکی عقل و پاک نیت که با همکاری و ایجاد جوی دوستانه مرا همراهی نمودند، قدردانی می نمایم. خاطره همکاریها و همفکریهای دوستان عزیزم در طی این مدت همیشه در ذهن من خواهد بود.

از کمک های بی شائبه مسئولین و کارکنان مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی و بخش گیاهپزشکی خانم‌ها مبرهن، داوودی، دهشتکار، کشاورز، حیدری، صالح زاده، سعادتی و آقایان رحمانی، ذوالفقاری، کاظمی، پورسعادت و رضائیان نهایت سپاسگزاری را می نمایم.

هزینه های مربوط به این تحقیق از محل اعتبارات بخش ویروس شناسی تامین شده که بدین وسیله قدردانی می گردد.

چکیده

تنوع ژنتیکی ویروس موزائیک جنوبی مرغ در جنوب ایران

به وسیله‌ی

فریده فرح بخش

گیاهان مرغ دارای علائم موزائیک از مناطق جنوبی کشور شامل جیرفت، برازجان، بوشهر، رامهرمز، اندیمشک، شوشتر و بهبهان جمع آوری و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس موزائیک جنوبی مرغ (BgSMV)، ناحیه ٔ۳ ژنوم آن‌ها با روش RT-PCR تکثیر و همسانه سازی گردید. سپس ترادف قسمتی از ژنوم شامل بخشی از ناحیه NIb، کل CP و 3′-UTR تعیین گردید. با بررسی ترادف‌های بدست آمده جدایه‌های مختلف BgSMV جایگاه برشی رایج و طرح‌های حفاظت شده ناحیه CP در جنس پوتی ویروس مشخص گردید که نشان دهنده‌ی صحت ترادف و خویشاوندی آن با گونه‌های جنس پوتی ویروس بود. ناحیه CP-UTR این جدایه‌ها همراه با تعدادی از ترادف‌های پوتی ویروس‌های غلات شامل ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (Maize dwarf mosaic virus, MDMV)، ویروس موزائیک سورگوم (Sorghum mosaic virus، SrMV)، ویروس موزائیک قیاق (Johnson grass mosaic virus, JGMV)، ویروس موزائیک ایرانی قیاق (Iranian Johnson grass mosaic virus, IJMV)، و ویروس موزائیک نیشکر (Sugarcane mosaic virus, SCMV) موجود در GenBank مقایسه و پس از انجام همردیف سازی چندگانه، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی شدند. در درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مقایسه در ۶ گروه مجزا قرار گرفتند که شامل BgSMV، MDMV، SCMV، JGMV، IJMV و SrMV بود. در بین پوتی ویروس‌ها، BgSMV بیشترین تشابه را با MDMV داشت. تفاوت مهم بین این دو ویروس وجود ۹۰ نوکلئوتید بیشتر در ناحیه ٔ۵ ژن CP تمام جدایه‌های ویروس موزائیک جنوبی مرغ بود. این جدایه‌ها از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی و امینواسیدی نزدیک به صد در صد تشابه داشتند و هیچگونه تشابهی بین این ترادف با ترادف‌های موجود در GenBank وجود نداشت. میانگین درصد تشابه نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR بین جدایه‌های BgSMV، ۹۸/۱ درصد بدست آمد که نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین جدایه‌ها می‌باشد. وجود تنوع ژنتیکی پایین بین جدایه‌ها را می‌توان با فرم تکثیر غیرجنسی مرغ در ارتباط دانست. با مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR ویروس BgSMV با سایر پوتی ویروس‌های غلات، مشخص شد که این ویروس با MDMV بخصوص در ناحیه مرکزی ژن CP بیشترین مشابهت را دارد و پس از این ویروس بترتیب با IJMV و SCMV بیشترین تشابه را دارد. علیرغم وجود تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی بالای BgSMV با MDMV، با توجه به تفاوت‌های اساسی دو ویروس، از نظر دامنه میزبانی، سرولوژی و وجود ترادف اضافه در ناحیه ٔ۵ ژن CP، BgSMV به عنوان گونه ای مجزا و نزدیک به MDMV در جنس پوتی ویروس در نظر گرفته می‌شود.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱
فصل دوم : مروری بر پژوهشهای پیشین ۳
۲-۱- تیره *Potyvirideae* ۳
۲-۱-۱- جنس *Rymovirus* ۴
۲-۱-۲- جنس *Bymovirus* ۵
۲-۱-۳- جنس *Ipomovirus* ۵
۲-۱-۴- جنس *Macluravirus* ۵
۲-۱-۵- جنس *Tritomovirus* ۶
۲-۱-۶- جنس *Potyvirus* ۶
۲-۲- سازمان ژنوم پوتی ویروسها ۸
۲-۳- علفهای هرز و نقش آنها در بقای ویروسهای گیاهی ۱۱
۲-۴- علفهای هرز میزبان پوتی ویروسها ۱۳
۲-۵- معیارهای تمایز پوتی ویروسها ۱۵
۲-۵-۱- دامنه میزبانی و علائم شناسی ۱۵
۲-۵-۲- اندامکهای ویژه درون سلولی ۱۶
۲-۵-۳- سرولوژی ۱۶
۲-۵-۴- دگرپادی ۱۷
۲-۵-۵- استفاده از خصوصیات مولکولی ۱۸
۲-۶- روابط *Potyviridae* با بقیه گروهها ۲۱
۲-۷- استفاده از پوتی ویروسها به عنوان حامل (Vector) در انتقال ژن ۲۲
۲-۸- پوتی ویروسهای غلات ۲۳
۲-۹- پوتی ویروسهای گیاهان تیره غلات در ایران ۲۵
فصل سوم: مواد و روشها ۲۸
۳-۱- منبع ویروس ۲۸
۳-۲- آزمون RT-PCR ۲۸
۳-۲-۱- استخراج آر.ان.ای ویروس ۲۸
۳-۲-۲- به دام اندازی آر.ان.ای ویروس ۲۹
۳-۲-۳- واکنش ترانویسی معکوس (Reverse Transcription, RT) ۲۹
۳-۲-۴- آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۳۰

عنوان صفحه

۳-۲-۶- خالص سازی محصول آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز ۳۳
۳-۳- همسانه سازی (Cloning) ۳۳
۳-۳-۱- وارد کردن محصولPCR به پلاسمید ناقل (Ligation1) ۳۳
۳-۳-۲- انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری (Transformation) ۳٤
۳-۳-۳- انتخاب همسانه ها ۳۵
۳-۳-۴- استخراج دی. ان. ای پلاسمیدهای نو ترکیب ۳۵
۳-۳-۵- بررسی محصول همسانه سازی شده ۳۶
۳-۳-۶- استفاده از PCR ۳۶
۳-۳-۷- هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب ۳۶
۳-۳-۸- تعیین ترادف و مقایسه با بانک ژن ۳۷
۳-۳-۹- آنالیز ترادفها و ترسیم دندروگرام ۳۷
۳-۴- انتقال با شته ۳۸
فصل چهارم : نتایج ۳۹
۴-۱- نمونه برداری ۳۹
۴-۲- مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR ۴۰
۴-۲-۱- RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ٤۰
۴-۲- ۲- همسانه سازی ۴۰
۴-۳- ترادف نوکلئوتیدی ۴۶
۴-۴- تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ۴۶
ناحیه CP-UTR ژنوم ویروس BgSMV با اعضای مختلف پوتی ویروس‌های غلات
۴-۵- تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی بر اساس ترادف آمینواسیدی ۴۷
ناحیه CP ژنوم ویروس BgSMV با اعضای مختلف پوتی ویروس‌های غلات
۴-۶- تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ۴۸
ناحیه CP-UTR ژنوم ویروس BgSMV با اعضای مختلف پوتی ویروس‌های
غلات با استفاده از نرم افزار SimPlot
۴-۷- ژن پروتئین پوششیBgSMV ۴۸
۴-۸-بررسی انتقال با شته ۵۹
فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری ۶۰
منابع ۶۷

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

۲-۱- آستانه تشابه نوکلئوتیدی (nucleotide identity threshold) بر حسب..... ۲۱
درصد به عنوان مرز تفاوت جنس های مختلف تیره *Potyviridae*
(بر اساس پیشنهاد Adams *et al*., 2005)

۳-۱ - مواد لازم در واکنش ترانویسی معکوس (RT)..... ۳۱

۳-۲-مواد لازم در واکنش PCR. ۳۱

۳-۳- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش RT-PCR..... ۳۱

۳-۴- چرخه دمایی آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز برای آغازگرهای جدول ۳-۳..... ۳۲

۳-۵- نوع و مواد لازم برای وارد کردن cDNA به پلاسمید ناقل (Ligation)..... ۳۵

۳-۶- مواد لازم برای هضم آنزیمی پلاسمید حاوی قطعه DNA محصول PCR..... ۳۷

۳-۷- رس شمار و منشا ویروس‌های مختلف که در GenBank در مقایسه‌های..... ۳۹
نوکلئوتیدی و آمینواسیدی استفاده شد

۴-۱- نتایج تعیین ترادف نواحی مختلف جدایه‌های BgSMV بر حسب تعداد نوکلئوتید..... ۴۱

۴-۲- درصد تشابه (similarity) با گونه‌های مختلف پوتی ویروس‌های غلات..... ۵۱
بر اساس ناحیه CP-UTR در سطح نوکلئوتیدی

۴-۳- درصد تشابه (similarity) جدایه‌های مختلف BgSMV با یکدیگر بر اساس..... ۵۲
ناحیه CP-UTR در سطح نوکلئوتیدی

۴-۴- درصد تشابه (similarity) با گونه‌های مختلف پوتی ویروس‌های غلات بر..... ۵۲
اساس ناحیه CP-UTR در سطح آمینواسیدی

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

۲-۱- سازمان ژنوم پوتی ویروس‌ها و موقعیت ژن‌های ویروس در پلی پروتئین..... ۱۲

۴-۱- علائم موزائیک در مرغ آلوده به ویروس موزائیک جنوبی مرغ..... ۴۱

۴-۲ الف- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR تکثیر شده با جفت..... ۴۳
آغازگر اختصاصیMDR3 / MDF3 و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۲ ب- نتایج حاصل از تیمار پلاسمید با آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *PstI* با..... ۴۳
جفت آغازگر MDf3/MDr3 و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۳ الف- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR تکثیر شده با جفت..... ۴۴
آغازگر MDf3/MDr1 و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۳-ب- نتایج حاصل از تیمار پلاسمید با آنزیم‌های برشی *EcoR*I و PstI ۴۴
مربوط به جفت آغازگر MDF3/ MDR1 و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۴ الف- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR تکثیر شده با جفت..... ۴۵
آغازگرBJPf1/ BJPr1b و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۴ ب- نتایج حاصل از تیمار پلاسمید با آنزیم‌های برشی *EcoR*I و *Pst*I مربوط..... ۴۵
به جفت آغازگر BJPf1/BJPr1b و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۵ الف- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR تکثیر شده با جفت ۴۶
آغازگر BJPf1/BJPr2 و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۵ ب- نتایج حاصل از تیمار پلاسمید با آنزیم‌های برشی *EcoR*I و *Pst*I مربوط..... ۴۶
به جفت آغازگر BJPf1/BJPr2 و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۶ الف- نقوش الکتروفورزی محصولات RT-PCR تکثیر شده با جفت آغازگر..... ۴۷
BJPf2/NIT و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۶ ب- نتایج حاصل از تیمار پلاسمید با آنزیم‌های برشی *EcoR*I و PstI ۴۷
مربوط جفت آغازگر BJPf2/NIT و باندهای حاصل در ژل الکتروفورز

۴-۷- مقایسه چند ردیفی ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR جدایه‌های..... ۵۴
BgSMV با تعدادی جدایه‌های MDMV موجود در بانک ژن

۴-۸- مقایسه چند ردیفی ترادف آمینواسیدی جدایه‌های BgSMV..... ۵۶
با تعدادی از پوتی ویروس‌های غلات موجود در بانک ژن

عنوان صفحه

۴-۹- رابطه BgSMV با اعضای مختلف جنس Potyvirus غلات بر اساس.....۵۷
ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR که با روش Neighbour-joining با
برنامه CLUSTAL X ترسیم شده است
۴-۱۰- رابطه BgSMV با اعضای مختلف جنس Potyvirus غلات ۵۸
بر اساس ترادف آمینواسیدی ناحیه CP که با روش Neighbour-joining
با برنامه CLUSTAL X ترسیم شده است
۴-۱۱- رابطه BgSMV با پوتی ویروس‌های غلات بر اساس ترادف نوکلئوتیدی.....۵۹
ناحیه CP-UTR که با نرم افزار SimPlot ترسیم شده است.
۴-۱۲ - رابطه IJMV با پوتی ویروس‌های غلات بر اساس ترادف نوکلئوتیدی.....۵۹
ناحیه CP-UTR که با نرم افزار SimPlot ترسیم شده است
۴-۱۳ - رابطه JGMV با پوتی ویروس‌های غلات بر اساس ترادف نوکلئوتیدی.....۶۰
ناحیه CP-UTR که با نرم افزار SimPlot ترسیم شده است
۴-۱۴ - رابطه MDMV با پوتی ویروس‌های غلات بر اساس ترادف نوکلئوتیدی.....۶۰
ناحیه CP-UTR که با نرم افزار SimPlot ترسیم شده است
۴-۱۵ - رابطه SCMV با پوتی ویروس‌های غلات بر اساس ترادف نوکلئوتیدی.....۶۱
ناحیه CP-UTR که با نرم افزار SimPlot ترسیم شده است
۴-۱۶ - رابطه SrMV با پوتی ویروس‌های غلات بر اساس ترادف نوکلئوتیدی.....۶۱
ناحیه CP-UTR که با نرم افزار SimPlot ترسیم شده است
شکل ۴-۱۷- موقعیت سایت برشی و موتیف‌های حفاظت شده ۶۲
ژن پروتئین پوششی جدایه جیرفت

فصل اول
مقدمه

گیاهان غیر زراعی تیره غلات به ویژه گونه های چند ساله، میزبان تعداد زیادی از ویروس‌های گیاهی هستند که برخی از آنها اهمیت اقتصادی داشته و برخی نیز می توانند بطور بالقوه اهمیت داشته باشند. منبع بسیاری از بیماری‌های ویروسی در غلات، گیاهان غیرزراعی این خانواده هستند که توأم با ویروسها در دوران تاریخی طولانی تکامل تطبیقی داشته اند. شاید از قدمت کشت گیاهان زراعی بیش از ده هزار سال نمی‌گذرد. بسیاری از بیماری‌های ویروسی نیز در نتیجه بکار گیری گیاهان غیر زراعی و اهلی کردن آن‌ها توسط بشر از حدود ۱۵۰۰ سال قبل از میلاد شیوع یافته اند (Buddenhagen 1983). لذا مطالعه ویروس‌های موجود در علف‌های هرز می‌تواند نقش مهمی در کنترل ویروس‌های بیماریزای غلات داشته باشد (Buddenhagen 1983). در مورد ویروس‌هایی که انتقال ناپایا دارند، به دلیل عدم پایداری در بدن ناقلین، بدون دسترسی و تغذیه مجدد ناقل از یک منبع آلودگی، ویروس بطور مداوم انتقال نمی‌یابد (Thresh 1974). در نتیجه گسترش سریع ویروس‌های ناپایا بستگی به وجود منابع آلودگی در داخل یا نزدیکی مزارع دارد. توزیع چنین منابع آلودگی اولیه تعیین کننده چگونگی گسترش بعدی ویروس می‌باشد (Thresh 1974). به دلیل کوتاه بودن عمر اکثر گیاهان زراعی، وجود گیاهان وحشی برای بقاء اغلب ویروس‌ها، یک ضرورت اساسی و حتمی است. با توجه به این خصوصیات، گیاهان وحشی یا علف‌های هرز بخصوص علف‌های هرز چند ساله، اهمیت خاصی در بیواکولوژی ویروس‌های گیاهی دارند (Bos 1981).

مرغ یا Bermuda grass (*Cynodon* spp.)، علفی است چند ساله، پایا، ریزوم دار، از تیره *Poaceae* که بطور گسترده در تمام دنیا در اکثر شرایط اقلیمی انتشار دارد. این گیاه می‌تواند به عنوان میزبان واسط برای ویروس‌های غلات و همچنین پناهگاه زمستانی این ویروس‌ها عمل کند. در ایران گونه *C. dactylon* بطور گسترده ای در تمامی ایران انتشار دارد (Rechinger 1970). *C. dactylon* گیاهی است مقاوم به خشکی، متحمل به شرایط قلیایی و خاک‌های با تهویه کم و متحمل به درجه حرارت پایین و تا حدودی زیر صفر می‌باشد (Gould 1968). علیرغم اهمیتی که در مورد این گیاه برشمرده شد، گزارش‌های زیادی در مورد بیماری‌های ویروسی مرغ وجود ندارد و مطالعات صورت گرفته در این زمینه محدود است.

برای اولین بار علائم موزائیک در علف هرز مرغ (*C. dactylon*) توسط معصومی و ایزدپناه (۱۳۷۷) گزارش شد. این علائم ابتدا در شیراز و سپس در سایر مناطق کشور مشاهده

گردید. تحقیقات صورت گرفته نشان داده که عوامل مولد موزائیک مرغ در دو گروه جداگانه قرار می‌گیرند. یک گروه شامل جدایه‌های جنوب ایران (جیرفت، بوشهر و اهواز) که به Bermuda grass Jiroft virus (BJV) موسوم شدند (معصومی و ایزدپناه ۱۳۷۹) و جدایه‌های سایر مناطق کشور که در گروه دیگر به نام Bermuda grass mosaic virus, BgMV قرار داده شدند (Zare *et al*., 2005). ویروس موزائیک در رشدی در منطقه برازجان نیز که قبلاً به عنوان سویه‌ای از ویروس موزائیک نیشکر متفاوت از سایر جدایه‌ها گزارش شده بود (قاسمی و ایزدپناه ۱۳۷۹) در گروه BJV قرار گرفت (معصومی و ایزدپناه ۱۳۷۹). نام BJV بعدها به ویروس موزائیک جنوبی مرغ (Bermuda grass southern mosaic virus, BgSMV) تغییر یافت (معصومی و ایزدپناه ۱۳۷۹). این ویروس با BgMV رابطه سرولوژیکی ندارد، ولی با سایر پوتی ویروس‌ها از جمله MDMV و IJMV رابطه دارد (معصومی و ایزدپناه ۱۳۷۹). مقایسه ترادف ناحیه میانی CP نشان داد که BgSMV با (MDMV, Maize dwarf mosaic virus) ، (SrMV Sorghum mosaic virus) و (SCMV, Sugarcane mosaic virus) بیشترین قرابت را دارد (معصومی و ایزدپناه ۱۳۸۰).

BgMV بر اساس مشابهت از نظر ویژگی‌های علائم شناسی، مورفولوژی و انتقال با پوتی ویروس‌ها تشابه دارد . این ویروس فاقد رابطه سرولوژیک با پوتی ویروس‌های غلات است (Hosseini and Izadpanah 2005). اگرچه تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که BgMV با Spartina mottle virus (SpMV) قرابت سرولوژیکی و فیلوژنتیکی دارد (حسینی مکاتبات شخصی)، اما برای تعیین دقیق جایگاه تاکسونومیکی آن مطالعات بیشتری باید صورت گیرد.

با توجه به کشت روز افزون غلات بخصوص ذرت و سورگوم و اهمیت این محصولات برای زندگی بشر، وجود پوتی ویروس‌های غلات در مناطق کشت این محصولات خطر بالقوه‌ای محسوب می‌شود . از این رو شناسایی دقیق این ویروس‌ها، روابط و منابع آلودگی آن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. ویروس‌های مورد مطالعه دارای میزبان‌های مهم اقتصادی مانند برخی ارقام سورگوم و ذرت هستند. از طرفی عواملی مانند وجود قیاق و مرغ به عنوان منبع دائمی پوتی ویروس‌های غلات با گسترش وسیع، وجود ناقلین فعال این ویروس‌ها و برنامه‌های توسعه کشت ذرت و نیشکر می توانند در انتشار ویروس‌های زیانبار در منطقه و امکان بالقوه خسارت به این گیاهان موثر باشند. در نتیجه ضرورت تحقیقات گسترده‌تر برای شناسایی بیشتر این جدایه‌ها احساس می‌شود. بدون شک دقت در معرفی ارقام گیاهان زراعی مقاوم و کنترل مرغ‌های آلوده حوالی مزارع و نیز انتخاب تاریخ‌های کاشت مناسب می‌تواند در این جهت اهمیت داشته باشد.

هدف از این تحقیق، تعیین تنوع ژنتیکی ویروس موزائیک جنوبی مرغ در مناطق جنوبی کشور و بررسی انتقال ویروس با شته *Rhopalosiphum maidis* می باشد.

فصل دوم
مروری بر پژوهش‌های پیشین

۲-۱- تیره *Potyvirideae*

تیره *Potyvirideae* بزرگترین و از نظر اقتصادی مهم ترین تیره ویروس‌های گیاهی (Brunt *et al*., 1996) و شامل حدود ۲۰۰ عضو (۳۰ درصد ویروس‌های گیاهی شناخته شده) است (Berger *et al*., 2005) که در محصولات زراعی، باغی، زینتی و مرتعی خسارات قابل توجهی ایجاد می‌کنند (Revers and Candresse 2004a) و بسیاری از آن‌ها از پاتوژن‌های مهم محصولات زراعی محسوب می‌شوند (Gibbs *et al*., 2003).

جایگاه تیره *Potyvirideae* به همراه تیره‌های *Picornaviridae*، *Nepoviridae* و *Comoviridae* در زیر گروه ویروس‌های شبیه *Picornavirus* (Picorna-like viruses) می-باشد.

به دلیل اهمیت *Potyviridae*، اعضای آن بصورت بسیار وسیعی مطالعه شده اند. ویروس‌های این تیره تاکنون بر اساس نوع ناقل، دامنه میزبانی، علائم، سرولوژی، الگوی هضم پروتئازی، مورفولوژی، وجود اندامک‌های ویژه درون سلولی (Inclusion bodies)، ساختار ژنوم و نحوه بیان آن طبقه بندی شده اند (van Regenmortel *et al*., 2000). در این تیره مفهوم جنس و گونه بخوبی جا افتاده است و به عنوان سیستم اصلی طبقه بندی پیشنهاد شده است (Barnett 1991; Ward and Shukla 1991).

این تیره در ابتدا بر اساس نوع ناقل ۴ جنس *Bymovirus*، *Potyvirus* ، *Ipomovirus* و*Rymovirus* را شامل می‌شد. سپس با آنالیز ترادف انتهای ′۳ ویروس های شته برد Narcissus latent virus (NLV) و Maclura mosaic virus (MaMV) مشخص شد که این ویروس‌ها تشابه محدودی با اعضای جنس *Potyvirus* شته‌برد داشته و بنابراین به جنس جدید *Macluravirus* منتقل شدند. از سویی Wheat streak mosaic virus (WSMV) و Brome streak mosaic virus (BStMV) که در *Rymovirus* قرار داده شده بودند، به جنس جدید *Tritimovirus* منتقل شدند (Hema *et al*., 2002; Mayo 1999; Stenger *et al*., 1998).

در حال حاضر این تیره شامل شش جنس قطعی است. بزرگترین جنس این تیره *Potyvirus* است که حاوی بیش از ۱۰۰ گونه قطعی می‌باشد. سایر جنس‌های این تیره *Ipomovirus*، *Bymovirus*، *Rymovirus*، *Macluravirus* و *Tritimovirus* می‌باشند (Adams

et al., 2005). این ۶ جنس بیش از ۱۹۰ گونه گیاهی، از جمله ۲۰ گونه از تیره *Poaceae* را آلوده می کنند (Lapierre and Signoret 2004).

علاوه بر این گونه‌هایی در این تیره گزارش شده اند که به هیچ یک از این جنس‌ها نسبت داده نشده اند و ممکن است به عنوان جنس های جدیدی پیشنهاد گردند و یا امکان دارد که برخی از آن‌ها به پوتی ویروس ها و یا تریتیموویروس ها تعلق داشته باشند (Revers and Candresse 2004a). Sugarcane streak mosaic virus نیز که شباهت اندکی با اعضای دو جنس *Ipomovirus* و *Tritimovirus* دارد، ممکن است به جنس جدیدی از این خانواده تعلق داشته باشد (Hema *et al*., 2002). Spartina mottle virus که شباهت اندکی با اعضای دو جنس *Rymovirus* و *Potyvirus* دارد نیز احتمالاً باید به جنس جدیدی در این خانواده منتقل شود.

همه اعضای این خانواده پیکره رشته ای دارند و به وسیله‌ی ناقلین منتقل می‌شوند (Hollings and Brunt 1981 a,b).

با پیشرفت تکنولوژی، تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژنوم و ترادف آمینواسیدی پروتئین‌های ویروس و در صورت موجود نبودن آن، ژن کدکننده پروتئین پوششی به عنوان معیار طبقه بندی ویروس‌های تیره *Potyviridae* مورد توجه قرار گرفته است (Ward and Shukla 1991). با وجود این روابط فیلوژنتیکی و طبقه بندی ویروس‌های تیره *Potyviridae* هنوز مورد بحث و بررسی است (Hall *et al*., 1998).

۲-۱-۱- جنس *Rymovirus*

Rymo از نام گونه تیپ Ryegrass mosaic virus (RGMV) گرفته شده است. اعضای این گروه دارای پیکره‌ی رشته ای خمش پذیر و حاوی یک مولکول آر.ان.ای تک لا می-باشند. طول پیکره آن‌ها ۷۲۰ – ۶۸۰ نانومتر و عرض آن‌ها ۱۵-۱۱ نانومتر است. اندامک درون سلولی استوانه ای در سیتوپلاسم سلول های آلوده یافت می شود. اعضای این جنس با کنه‌های تیره *Eriophyidae* منتقل می‌شوند و محدود به غلات هستند. در حال حاضر ۳ گونه قطعی، ۱ گونه تیپ به اضافه دو گونه Hordeum mosaic virus (HoMV) و Agropyron mosaic virus(AgMV) در این جنس وجود دارد و کنه اریوفید *Abacarus hystrix* انتقال دهنده دو گونه RGMV و AgMV است. این جنس دارای یک عضو غیر قطعی Spartina mottle virus (SpMV) است، که احتمالاً به این جنس تعلق ندارد و متعلق به جنس جدیدی در تیره *Potyviridae* است (Gotz *et al*., 2002).

۲-۱-۲- جنس *Bymovirus*

این گروه شامل ویروس‌های رشته ای آر.ان. ای دار خاک برد است. نام این جنس از گونه تیپ Barley yellow mosaic virus (BaYMV) گرفته شده است. گونه تیپ و۵ گونه دیگر اعضای جنس *Bymovirus* را تشکیل می دهند.

ژنوم این ویروس‌ها دو بخشی است (دو قطعه آر.ان. ای تک لا دارند). دو نوع پیکره ویروس تنها دارای یک پروتئین پوششی هستند. طول پیکره بزرگتر حدود ۶۰۰-۵۰۰ نانومتر و پیکره کوچکتر ۳۰۰-۲۵۰ نانومتر می‌باشد. دامنه میزبانی این ویروس‌ها محدود به غلات است و در طبیعت با قارچ *Polymyxa graminis* منتقل می‌شوند (van Regenmortel *et al*., 2000). این ویروس‌ها در سیتوپلاسم تولید اندامک های ویژه درون سلولی فرفره ای یا (استوانه ای) می کنند. گونه های این جنس عبارتند از:

Barley yellow mosaic virus ، (WYMV) Wheat yellow mosaic virus ، (BaYMV)، Barley mild mosaic ، (WSSMV) Wheat Spindel streak mosaic virus ، (BaMMV)virus Oat mosaic virus و (RNMV) Rice necrosis mosaic virus (OMV) (Kashiwasaki 2004, Namba *et al*., 1998, Monger *et al*., 2001, Sohn *et al*. 1994).

۲-۱-۳- جنس *Ipomovirus*

این جنس دارای پیکره رشته ای خمش پذیر با طول ۹۰۰-۸۵۰ nm و ژنوم آر.ان.ای تک لای مثبت است. اندامک‌های درون سلولی فرفره ای شکل در سیتوپلاسم سلول‌های آلوده میزبان یافت می شود. اعضای این گروه با سفید بالک (*Bemisia tabaci*) منتقل می‌شوند و انتقال به طریقه مکانیکی نیز در این گروه دیده شده است.

گونه‌های قطعی شامل Sweet potato mild mottle virus (SPMMV) (گونه تیپ این جنس) و گونه Cucumber vein yellowing virus (CYYV) می باشد. همچنین دو گونه‌ی غیر قطعی نیز در این جنس وجود دارد Sweet potato yellow dwarf virus (SPYDV) و Cassava brown streak virus (CaBSV) (Lecoq *et al*., 2000; Mukasa *et al*., 2003).

۲-۱-۴- جنس *Macluravirus*

گونه تیپ این جنس Maclura mosaic virus (MacMV) است. اعضای این جنس دارای پیکره های رشته ای خمش پذیر با طول ۶۷۲ نانومتر و عرض ۱۶-۱۳ نانومتر و حاوی آر.ان.ای رشته ای مثبت تک لا هستند. گونه‌های این جنس بصورت ناپایا با شته‌ها منتقل می‌شوند ولی از نظر ترادف نوکلئوتیدی با پوتی ویروس‌ها تفاوت زیادی دارند. علاوه بر MacMV به عنوان گونه تیپ، گونه Narcissus latent virus (NLV) نیز در این جنس قرار می‌گیرد (Stenger *et al*., 1998; van Regenmortel *et al*., 2000).

۲-۱-۵- جنس *Tritomovirus*

منشاء اسم از میزبان ویروس Wheat streak mosaic virus (WSMV) یعنی *Triticum aestivum* است.

اعضای این گروه دارای پیکره رشته ای خمش پذیر با طول ۷۰۰-۶۹۰ نانومتر و عرض ۱۵-۱۱ نانومتر می‌باشند. ویروس های این گروه دارای آر.ان.ای تک لای مثبت اند و در طول آلودگی تولید اندامک‌های ویژه درون سلولی فرفره مانند می کنند (Fauquet and Mayo 1999; Mayo 1999; van Regenmortel *et al*., 2000).

این جنس از لحاظ اندازه پیکره و انتقال شبیه اعضای جنس *Rymovirus* است، ولی از نظر ترادف نوکلئوتیدی به اعضای جنس *Ipomovirus* شباهت دارد (Stenger *et al*., 1998). در این جنس تنها دو گونه وجود دارد که شامل ویروس موزائیک رگه ای گندم (WSMV) به عنوان گونه تیپ و Brome streak mosaic virus (BStMV) می‌باشد (Rabenstein *et al*., 2001; Choi *et al*., 2001).

۲-۱-۶- جنس *Potyvirus*

جنس *Potyvirus* حاوی تعداد زیادی ویروس مهم از لحاظ اقتصادی مثل Potato virus Y (PVY)، Bean yellow mosaic virus (BYMV) می‌باشد. پوتی ویروس‌ها گیاهان تک لپه ای و دو لپه ای در مناطق آب و هوایی مختلف را آلوده می‌کنند. با توجه به اهمیت اقتصادی اعضای جنس *Potyvirus* مطالعات وسیع تری در سطح جهان بر روی آن‌ها انجام شده است. امروزه ترادف کامل یا ناقص ژنوم تعداد زیادی از پوتی ویروس‌ها تعیین شده و اطلاعات مربوط به آن‌ها در بانک ژن در دسترس می‌باشد. به علاوه تعدادی شبه پوتی ویروس-های جدید تشخیص داده شده اند (Revers and Candresse 2004a).

پیکره پوتی ویروس‌ها رشته ای خمش پذیر شامل یک مولکول آر.ان.ای تک لاست. طول پیکره پوتی ویروس‌ها ۹۰۰-۶۸۰ و عرض آن‌ها ۱۱ نانومتر است. پیکره‌ها دارای تقارن مارپیچی با خیز ۳/۵-۳/۳ نانومتر بوده و چگالی شناور آن‌ها در کلرید سزیوم ۱/۳۱ g/cm^3 می‌باشد. این ویروس‌ها در سیتوپلاسم میزبان، اندامک‌های همراه ویژه درون سلولی فرفره مانند یا طومار مانند تولید می‌کنند که از ویژگی‌های تاکسونومیکی مهم پوتی ویروس‌هاست. به علاوه اندامک‌های دیگری نیز در هسته تولید می‌کنند (Ford *et al*., 1989; Hollings and Brunt 1981 a,b; Hull 2002; Shukla and Ward 1988).

ژنوم پوتی ویروس‌ها از یک قطعه آر.ان.ای تک لای مثبت تشکیل شده که حدود ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید (Revers *et al*., 1999) و تنها یک چارچوب ژنی (ORF) دارد. حاصل ترجمه این چارچوب ژنی، یک پروتئین مرکب بزرگ شامل ۳۰۰۰-۲۰۰۰ آمینواسید می‌باشد. در دو انتهای این ORF نواحی ترجمه نشونده (UTR) قرار دارد (Revers *et al*., 1999). به انتهای ′۵ ژنوم پروتئین VPg و به انتهای ′۳ آن، دنباله پلی A با پیوند کووالانسی متصل شده است (Allison *et al*., 1986; Carrington and Dougherty 1987; Dinant *et al*., 1991). پروتئین مرکب با سه آنزیم پروتئاز (سرین، سیستئین و شبه سرین) کد شده توسط ویروس به ۹ تا ۱۰ پروتئین کوچکتر تبدیل می‌شود (Hull 2002). پروتئین پوششی که ژنوم ویروس را پوشش می‌دهد، پروتئین کمکی که در انتقال ویروس توسط شته نقش دارد و پروتئین اندامک ویژه هسته ای که یک پروتئاز می‌باشد، از زیر واحدهای این پروتئین مرکب هستند که نقش قطعی آن‌ها مشخص شده است (Berger and Pirone 1986; Thornbury and Pirone 1983). CI یا اندامک ویژه سیتوپلاسمی در انتقال سلول به سلول نقش دارد. احتمال می‌رود که پروتئین اندامک سیتوپلاسمی در تکثیر ویروس نیز نقش داشته باشد. NIb یک آر.ان.ای پلیمراز و NIa یک پروتئیناز می‌باشد (Carrington and Dougherty 1988; Hull 2002). ژنوم اعضای جنس *Potyvirus* شامل ژن‌های کدکننده P1، HC-PRO، P3، 6K1، CI، 6K2، NIa، NIb و CP است. پروتئین‌هایی که توسط نیمه آمینی کد می‌شوند، در حرکت ویروس دخالت دارند و آن‌هایی که در نیمه کربوکسیلی ژنوم هستند، در تکثیر ژنوم نقش دارند (Urcuqui-Inchima *et al*., 2001).

پوتی‌ویروس‌ها به روش مکانیکی به سایر گیاهان میزبان قابل انتقال هستند. انتقال از طریق بذر نیز در برخی از اعضای این جنس گزارش گردیده است (Revers and Candresse 2004a). این ویروس‌ها به طور طبیعی توسط شته‌ها به صورت ناپایا انتقال می‌یابند (White 1999). در انتقال ویروس با شته، پروتئین پوششی و پروتئین کمکی (helper component) که توسط ژنوم ویروس کد می‌شوند، نقش اساسی دارند (Atreya *et al*., 1995).

یک طرح آمینواسیدی حفاظت شده Asp-Ala-Gly (DAG) که نزدیک به انتهای آمینی CP قرار دارد، برای انتقال با شته ضروری است (Berger and Pirone 1986). مطالعات صورت گرفته در مورد Tobacco vein mottling virus (TVMV) نشان داده است که

جابجایی یا حذف این موتیف و یا جداشدن انتهای آمینی باعث کاهش یا از دست رفتن توانایی انتقال می‌شود (Salamon and Bernardit 1995). در مورد بعضی از پوتی ویروس‌ها که با شته انتقال می‌یابند به جای موتیف DAG موتیف‌های دیگری مانند DAS در Pea seed born mosaic virus (PSBMV)، DAL در Plum pox virus (PPV) (Lopez-Moya *et al*., 1999)، DAA در Peanut mottle virus (PeMoV) و DVG در ZeMV و IJMV وجود دارد (معصومی، اطلاعات منتشر نشده، Seifers *et al*., 2000).

بسیاری از گونه‌های پوتی‌ویروس‌ها از لحاظ دامنه میزبانی در طبیعت محدودند، اما دارای دامنه میزبانی آزمایشگاهی نسبتاً وسیع هستند. برخی از پوتی ویروس‌ها محدود به تیره *Poaceae* هستند و عده کمی از پوتی ویروس‌ها مانند PVY و BYMV دارای دامنه میزبانی گسترده‌ای در طبیعت و نیز میزبان‌های آزمایشگاهی می‌باشند (Gotz and Maiss 2002; Gough and Shukla 1993; Shukla *et al*., 1992).

پوتی ویروس‌ها را بر اساس نوع میزبان به دو گروه monocotpotyvirus و dicotpotyvirus تقسیم می نمایند. اغلب پوتی ویروس‌ها دارای میزبان دولپه ای بوده و تنها عده کمی از آن‌ها گیاهان تک لپه ای را آلوده می کنند (Gotz and Maiss 2002; Gough and Shukla 1993; Shukla *et al*., 1992).

آنالیزهای فیلوژنتیکی توالی پروتئین‌های جنس *Potyvirus*، رابطه تکاملی نزدیک آن‌ها با ویروس‌های شبه پیکورنا را نشان می‌دهد (Koonin and Dolja 1993). بالاخانواده‌ی ویروس‌های شبه پیکورنا شامل بسیاری از ویروس‌های آلوده کننده انسان با سازمان ژنومی و گاهی پروتئین‌های رپلیکاز مشابه می‌باشد و تشابهات سازمان ژنومی نشان می‌دهد که پوتی ویروس‌ها و پیکورنا ویروس‌ها احتمالاً دارای جد مشترکی می باشند (Lee and Lucas 2001; Mushegian and Koonin 1993).

۲-۲- سازمان ژنوم پوتی ویروس‌ها

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

Coat protein (CP) : ژنوم پوتی ویروس‌ها توسط حدود ۲۰۰۰ مولکول زیر واحد CP احاطه شده است. این پروتئین شناخته شده ترین ژن در پوتی ویروس‌هاست و برای اهداف تاکسونومیکی و تعیین تنوع ژنتیکی به کار می‌رود. بسیاری از پوتی ویروس‌ها بر اساس ترادف ژن پروتئین پوششی گروه بندی می‌شوند (Higgins *et al*., 1998; Fuji *et al*, 2003). ژن CP پوتی ویروس‌ها از لحاظ ترادف و اندازه ناحیه N-terminal متفاوت است. انتهای آمینی CP حاوی اپی توپ‌های اختصاصی ویروس است و در برهمکنش‌های ویروس- میزبان- ناقل نقش