جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

پراکنش ویروس موزائیک خیار (CMV) مبتنی بر روشهای سرولوژی و مولکولی درمزارع و گلخانه هاي کشت کدوئیان و گوجه فرنگي در مناطقی از ایران

*مهدي شعبانیان[1]، ** حسین معصومي[1و2] ،ساغر سلاجقه[1]، حیدرنژاد جهانگیر[1]،حسیني پور اکبر[1] و سعید شیبانی[1]
1- بخش گیاهپزشکي، دانشکده کشاورزي، دانشگاه شهید باهنر کرمان
2- پژوهشکده بیوتکنولوژي علوم محیطي، مرکز بین المللي علوم تکنولوژي پیشرفته و علوم محیطي کرمان

خلاصه

جهت شناسایي،میزان پراکندگي و حساسیت ارقام مختلف کدوئیان و گوجه فرنگي کشت شده در مزارع وگلخانه هاي کشور نسبت به CMV، از مزارع و گلخانه هاي گوجه فرنگي و کدوئیان در تعدادي از استانهاي کشور بازدید و نمونه برداري به عمل آمد. نمونه ها ابتدا از نظر آلودگي به ویروس موزاییک خیار (CMV)*Cucumber mosaic virus* با استفاده از آزمون الایزا و آنتي سرم CMV مورد بررسي قرار گرفتند.تعدادي از نمونه هاي آلوده نیز در آزمون PCR با استفاده از آغازگرهاي اختصاصيCMV بررسي شدند. میزان آلودگي مزارع و گلخانه هاي کدوئیان نسبت به ویرس CMV به ترتیب برابر با 35/1 و21/4 در صد معین گردید. از نمونه هاي بررسي شده گوجه فرنگي موجود در داخل یا خارج گلخانه ها نیز 26/4 در صد آنها به این ویروس آلوده بودند.علائم در بوته هاي آلوده شامل موزاییک، ابلقي، زردي، بند کفشي و بد شکلي برگ و میوه گیاهان بود. در آزمون PCR از نمونه هاي آلوده قطعه اي به طول 950 bp ساخته شد که مربوط به ژن پروتئین پوششي این ویروس میباشد.

واژه هاي کلیدي: ویروس موزاییک خیار، الایزا، PCR

Serological and molecular detection and determination of *Cucumber mosaic virus* in some parts of Iran.

***Shaabanian, M[1], **Massumi, H[1&2], Salajeghe, S[1], Hosseini Pour, A[1]. Heydarnejad, J[1] and Sheibani, S[1].**
1. Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2. Department of environmental science. International center for sciences high technology and environmental science.

Abstract

Curcurbits and tomato species grown in glasshouses and farms in agricultural regions of Iran, were surveyed for the relative incidence of *Cucumber mosaic virus* (CMV), during September 2002 to April 2003. Cucurbit and tomato samples showing symptoms from different varieties were analyzed by indirect ELISA (I-ELISA). The result showed wide distribution of CMV in various parts of the Iran. cucurbits were found to be infected by CMV in greenhouse-grown and farms 21.4 and 35.1% respectively. The virus was also detected in 26.4% of tomato samples. CMV induced systemic infection in *Nicotiana tabacum* L.cv. Samsun, *N. clevelandii* Gray, *N. glutinosa* and *N. tabacum* L.cv. Turkish and produced chlorotic local lesion in *Datura stramonium* A 950 bp band was detected in RT-PCR for positive samples.

مقدمه

ویروس موزاییک خیار از ویروس هاي مهم کدوئیان و گوجه فرنگي است. در ایران این ویروس براي اولین بار توسط دانش در سال 1357 از استان تهران و چند استان دیگر گزارش شده است. سپس سایر محققان آن را از مناطق دیگرگزارش نموده اند(Rahimian *et al.*, 1987). این ویروس داراي دامنه میزباني وسیعي در بین گیاهان مختلف است به نحوي که تا کنون آلودگي آن بر روي 1000 گونه متعلق به 100 خانواده گیاهی دو لپه و تک لپه گزارش گردیده است. علف هاي هرز خانوادهاي مختلف نیز به عنوان منبع آلودگي و انتشار این ویروس میباشند. همچنین بیش از86 گونه شته به روش ناپایا این ویروس را منتقل میکنند
(Edwardson *et al.*, 1986).CMV گونه تیپ جنس*Cucumovirus* از خانواده*Bromoviridae* است و پیکره هاي آن چند وجهي، و به قطر 28-30 نانومتر بوده و ژنوم آن شامل سه قطعهRNA ي تک رشته اي مثبت مي باشد. همچنین در برخي از نژادهاي آن داراي یک قطعه زیر ژنومي RNA4 نیز وجود دارد. تعدادي از نژادهاي CMVداراي یک RNA ي وابسته (satRNA) نیز میباشند(Gallitelli, 2000).

تابه امروز نژادهاي فراواني در مورد این ویروس گزارش شده است. نژادهاي ویروس CMV بر اساس مشخصات سرولوژیک، بیولوژیک و مولکولي به دو زیر گروه S-I و S-II تقسیم شده اند. اخیرا زیر گروه S-I بر اساس ترادف ژنوم به دو زیر گروه S-IB (ایزوله هاي آسیایي) و S-IA (سایر ایزوله ها) تقسیم شده اند. طبق بررسي انجام شده این دو زیر گروه از لحاظ الگوي الکتروفورزي ژن پروتئین پوششی در ژل آگارز با استفاده از روش PCR-RFLP داراي

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تفاوت قابل ملاحظه اي هستند(Choi *et al*., 1999). در تحقيق حاضر با هدف تعيين پراكندگي اين ويروس در مزارع و گلخانه هاي زير كشت كدوئيان و گوجه فرنگي، نمونه هايي از مناطق مختلف كشور جمع آوري و با روشهاي سرولوژيک و PCR مبتني بر ژن پروتئين پوششي بررسي شدند.

مواد وروشها

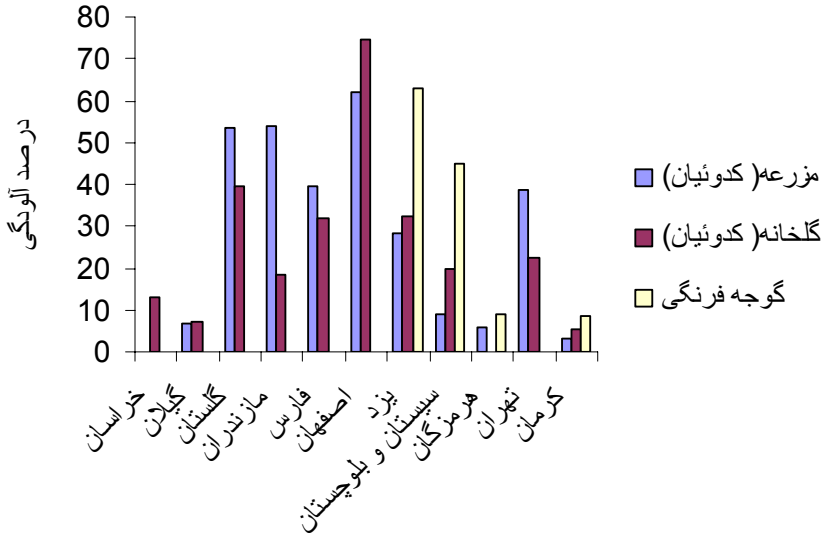
براي تعيين دامنه پراكنش CMV در طي سالهاي 1381 تا 1383 ازمزارع گوجه فرنگي دراستان هاي سيستان و بلوچستان ، يزد، كرمان و هرمزگان وهمچنين از مزارع وگلخانه هاي كدوئيان اين مناطق و نيز استانهاي خراسان،گلستان،مازندران،فارس،اصفهان و تهران بازديد و نمونه برداري شد. احتمال آلودگي اين نمونه ها به ويروس CMV با استفاده از روش الايزاي غير مستقيم بررسي گرديد. در بررسي هاي گلخانه اي از ارقام مختلف توتون ،تاتوره وكدو مسمائي استفاده شد. خالص سازي بيولوژيكي ويروس از طريق مايه كوبي مكانيكي گياه سلمه تره *(Chenopodium quinoa)* و با استفاده از بافر فسفات 0/01 مولار pH=7 انجام گرفت. جهت تكثير ويروس از گياه *(Nicotiana glutinosa)*،استفاده شد و ايزوله هاي تكثير شده درواكنش زنجيره اي پليمراز مورد بررسي قرار گرفتند. جهت انجام PCR از يک جفت آغازگر مربوط به ژن پروتئين پوششي استفاده گرديد
(Choi *et al*.,1999). جهت انجام RT-PCR ابتدا RNA ويروس با استفاده از كيت
High pure viral nucleic acid kit ساخت كمپاني Roche استخراج گرديد و سپس با استفاده از آنزيم M-MuLV در دماي 42 درجه سانتيگراد به مدت 60 دقيقه ساخت cDNA صورت گرفت. سپس PCR با استفاده از دستگاه ترموسايكلر Techne مدل TC312 و با استفاده از برنامه دمايي شامل 40 چرخه با دماهاي 94، 46 و 72 درجه سانتيگراد هر كدام به مدت 60 ثانيه و سپس به مدت 10 دقيقه در 72 درجه سانتيگراد گسترش نهايي انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز يک درصد و با استفاده از بافر TBE مورد بررسي قرار گرفت
(Sambrok *et al*.,1989).

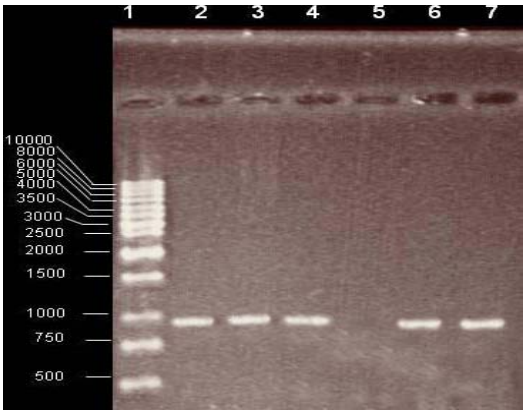
نتايج و بحث

در نتيجه مايه كوبي ويروس CMV بر روي توتون هاي *(Nicotiana tabacum L.cv. Samsun)*، *(N. clevelandii* Gray) و (*N.tabacum* L.cv. Turkish), *(N.glutinosa)* بر روي اين ارقام علائمي از قبيل موزائيک شديد، بدشكلي برگ و زردي ايجاد شد . اين ويروس بر روي تاتوره .(*Datura stramonium* L) ابتدا لكه هاي كلروتيک ايجاد نموده و پس از چند روز به صورت سيستميک در آمد. در مورد آلودگي مزارع و گلخانه هاي كدوئيان بيشترين ميزان آلودگي دراستان اصفهان مشاهده گرديد و بالا ترين ميزان آلودگي بر روي گوجه فرنگي مربوط به استان يزد مي باشد(شكل1). علائم اين بيماري در كدوئيان آلوده و گوجه فرنگي شامل موزائيک، بندكفشي شدن برگها، ابلقي، زردي و بدشكلي ميوه ها بود.در مجموع 6 ايزوله، يكي مربوط به گوجه فرنگي، سه ايزوله از خيار و دو ايزوله از كدو جداسازي گرديد. بررسي دامنه ميزباني اين ايزوله ها نشان داد كه اختلاف چنداني از لحاظ بيولوژيكي در بين آنها وجود ندارد. تعدادي از اين ايزوله ها با آزمونPCR نيز بررسي شدند. با استفاده از آغازگرهاي اختصاصي CMV قطعه اي در حدود950 جفت باز مربوط به ژن پروتئين پوششي ويروس تكثير شد(شكل2).

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شکل1:میزان آلودگی مزارع و گلخانه های گوجه فرنگی و کدوئیان نسبت به ویروس موزائیک خیار





شکل(2)- الکتروفورز محصول تکثیر شده RT-PCR تکثیر شده با آغاز گرهای ذکر شده به منظور تشخیص نمونه های آلوده به CMV 1- نشانگراندازه DNA، 2 و 3 کدوی آلوده، 4 گوجه فرنگی آلوده ، 6 و 7 خیار آلوده و 5 بوته سالم.

منابع

1. Choi, S. K., Choi, J. K. and Park, W. M. 1999. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus- specific single pair of primers. Journal of Virological Methods 83: 67-73.
2. Edwardson, J.R.and Christie, R.G. 1986. Cucumoviruses.Page 143-215 in:Viruses Infecting Forage Legumes J.R. Edwardson and R.G. Christie, eds. Monograph 14, IFAS, University of Florida, Gainesville.
3.Gallitelli, D. 2000. The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. Virus Research 71:9-21.
4. Rahimian, H., Izadpanah, K. 1987. Identity and prevalence of mosaic inducing cucurbit viruses in Shiraz, Iran.Phytopathology. 92:305-312.
5- Sambrook, J., Fristch, E. F., and Maniatis, T. 1989 Molecular cloning; a laboratory manual second edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.