نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، ص. ۳۵۴-۳۴۸

Journal of Plant Protection
Vol. 26, No. 4, Winter 2013, P. 348-354

بررسی سرولوژیکی و مولکولی ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی (TSWV) در استان خراسان رضوی

سکینه شوشتری[1*]- بهروز جعفرپور[2]- ماهرخ فلاحتی رستگار[3]

تاریخ دریافت:۱۳۸۹/۲/۷
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۲/۲۷

چکیده

به منظور بررسی ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی (*Tomato Spotted Wilt Virus*(TSWV در سال های زراعی ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ از مزارع استان خراسان رضوی (شهرستان های مشهد، نیشابور، قوچان، کاشمر، تربت حیدریه، فریمان، رشتخوار، تخت جلگه) تعداد ۶۳۶ نمونه گوجه فرنگی جمع آوری شد. نمونه هایی که دارای علایم رنگ پریدگی، بافت مردگی و لکه های حلقوی بودند جمع شده و در شرایط خنک به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه به منظور ارزیابی وجود ویروس در نمونه های مشکوک، آزمون سرولوژیکی TAS-ELISA انجام شد و نمونه های آلوده به ویروس که در آزمون الایزا مشخص شدند به ۳ رقم توتون *Nicotiana rustica* ، *Nicotiana clevelandii* و *Nicotiana tabacum var Samson* مایه زنی گردیدند و پس از ظهور علائم با آزمون TAS-ELISA آزمایش شدند. در شناسایی مولکولی نمونه های آلوده به ویروس با استفاده از محلول RNX™(-plus) استخراج RNA صورت گرفت و با استفاده از آغازگر اختصاصی در واکنش RT-PCR قطعه ای در محدوده باندی ۲۷۶bp تکثیر یافت. نتایج حاصل از آزمون TAS-ELISA و RT-PCR وجود ویروس را در مزارع گوجه فرنگی استان خراسان رضوی به اثبات رساند. در آزمون مایه زنی مکانیکی ویروس مورد مطالعه تنها در توتون *Nicotiana tabacum var Samson* (تغییر شکل برگ ها و ابلقی) علائم مشخص بیماری را نشان داد.

واژه های کلیدی: مایه زنی مکانیکی، ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی، RT-PCR

مقدمه

ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی (TSWV) اولین بار در سال ۱۹۱۹ از استرالیا روی گوجه فرنگی توسط بریتل بلنک گزارش شد (۱۳). ویروسی بودن بیماری در سال ۱۹۳۰ توسط ساموئل و همکاران (۲۳) گزارش شد و در همین سال توسط ساموئل و همکاران (۲۷) مشخص شد که ویروس مذکور توسط تریپس منتقل می شود. اولین گزارش علمی در مورد وجود TSWV در ایران توسط بنانج و همکاران (۱) در سال ۱۳۷۵ روی گوجه فرنگی ارائه گردید.

ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی (TSWV) در جنس توسپو ویروس *Tospovirus* در خانواده Bunyaviridae قرار دارد (۱۵). پیکره ویروس ایزومتریک (spherical) بوده و به قطر ۱۱۰-۸۰ نانومتر است (۱۴). اطراف پیکره ویروس غشاء لیپیدی است که از سلول میزبان مشتق گردیده (۲۵) و توسط ۲ گلیکو پروتئین G_1 (۷۸ kDa) و G_2 (۵۸ kDa) احاطه گشته (۱۶)، زائده های سطحی میخ مانند بوده و از دو گلیکو پروتئین G_1 وG_2 تشکیل شده که در یک لیپید دو لایه به ضخامت ۱۰-۵ نانومتر قرار گرفته اند (۱۶).

در تمام اعضای خانواده Bunyaviridae ژنوم سه قسمتی (۲۲) و دارای ژنوم تک رشته ای RNA [4] هستند (۲۶) آنالیز توالی نشان داده است که RNA بزرگ (LRNA) رشته منفی (negative) و RNA متوسط (MRNA) وRNAکوچک (SRNA) ، ambisence هستند (۲۴). این ویروس باعث ایجاد بیماری در بیش از ۸۰۰ گونه گیاهی در ۷۰ خانواده از گیاهان تک لپه و دو لپه می‌شود (۲۳). میزبان های مهم زراعی شامل سیب زمینی، گوجه فرنگی، فلفل دلمه ای، توتون و بسیاری گیاهان زینتی از جمله بگونیا، داوودی، سیکلامن، گل حنا، کوکب و بسیاری از علف های هرز هستند (۱۶).

۱و۲و۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادان گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: shooshtaryh@yahoo.com)

4- Single-stranded RNA

علائم در برگ ها شامل برنزه شدن، رشد یک طرفه، پیچیدگی، تغییر شکل برگ ها و ایجاد لکه های قهوه ای مایل به سیاه است (۱۰). گیاه بالغ کوتاه مانده و بر روی ساقه نوارهای ارغوانی یا سیاه دیده می شود. جوانه ها و برگ های جوان در اثر آلودگی می افتند. در مراحل بعدی آلودگی موزائیک، ابلقی و تغییر شکل در برگ ها ممکن است گسترش یابد (۲۸). گیاهان آلوده امکان دارد تولید میوه نکنند و در صورتی که گیاهان بعد از میوه دهی آلوده شوند میوه هایی با نقاط گرد رنگ پریده یا بافت مرده ایجاد می شود (۴).

TSWV در طبیعت بوسیله تریپس ها (thrips) انتقال می یابد (۶). ویروس به وسیله تریپسها به روش گردشی – تکثیری (Propagative-circulative) منتقل می شود (۱۵). *Frankliniella occidentalis* و *Thrips tabaci* مهمترین ناقلین TSWV در طبیعت هستند (۵). تریپس های بالغ نمی توانند ویروس را از گیاهان آلوده دریافت کنند که این ناشی از حضور یک مانع پیشرفته در روده میانی آنها است (۷). تنها پوره ها هستند که می‌توانند ویروس را از گیاه آلوده کسب نمایند (۲۳) و برخی بر این عقیده اند که تنها پوره های سن یک این قابلیت را دارا هستند (۸). مطالعات نشان می دهد که TSWV بوسیله بذر قابل انتقال نیست (۹) و همچنین بوسیله دانه گرده نیز قابلیت انتقال ندارد (۱۲).

روش های شناسایی ویروس TSWV که تا به حال مورد بررسی قرار گرفته شامل ۴ روش میکروسکوپ الکترونی، استفاده از گیاهان محک، روش های سرولوژیکی وروش های مولکولی است. مهمترین روش سرولوژیکی آزمون الایزا[1] (ELISA) است (۱۷). از گیاهان محک برای اثبات بیماری زایی، نگهداری ویروس و بررسی علایم ویروس بهره برده می شود مهمترین گیاهان محک شامل توتون های *Nicotiana rustica*، *N. bentamiana*، *N. tabacum var Samsun* (۱۷) *N.glutinosa* (۲)، *N. clevelandii* همچنین گیاهان محک دیگری از قبیل خیار، اطلسی (۱۷)، گل حنا (۲۱) و لادن (۱۷) نیز در شناسایی این ویروس مورد استفاده قرار می گیرند. از روش های مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR (Polymerase Chain Reaction) را می‌توان نام برد. تکنیک PCR شامل سیکل های تکرار شده ای است که در آن به کمک یکسری آغازگر و با کمک آنزیم از روی یک DNA الگو عمل همانند سازی انجام می شود (۳). روش RT-PCR نسبت به الایزا ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ مرتبه حساسیت بیشتری دارد (۲۰).

مواد و روش ها

به منظور شناسایی و بررسی ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی (TSWV) نمونه برداری از مزارع استان خراسان رضوی در تابستان و پاییز سال های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ صورت گرفت که مجموعاً تعداد۶۳۶ نمونه گوجه فرنگی از مزارع استان (شهرستان های مشهد، نیشابور، قوچان، تربت حیدریه، فریمان، کاشمر، رشتخوار و تخت جلگه) که دارای علایم مشکوک بودند را شامل می شد. نمونه های جمع آوری شده دارای علایمی نظیر لکه های حلقوی، کوتولگی، موزائیک و بافت مردگی بودند که بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور شناسایی ویروس مورد نظر در نمونه های جمع آوری شده، آزمون TAS-ELISA[2] به وسیله آنتی سرم های خریداری شده از شرکت DSMZ آلمان به روش کلارک و آدامز ۱۹۷۷، مورد آزمایش قرار گرفتندکه این آزمون شامل مراحل اصلی ۱- افزودن ایمنوگلوبولین ۲- افزودن آنتی ژن ۳- افزودن مونوکلونال ۴- افزودن آنتی بادی اختصاصی ۵- افزودن سوبسترا است (۱۱).

برای تلقیح گیاهان محک بافر تلقیح مورد استفاده براساس بافر تلقیح ماندال و همکاران (۱۹)، ۲۰۰۱ شامل بافر فسفات پتاسیم (شامل KH_2PO_4 و K_2HPO_4) ۰/۰۱ مولار با pH=۷ ، محتوی آنتی اکسیدان های سولفیت سدیم (Na_2SO_3) ۰/۲ ٪ و ۲- مرکاپتواتانول ۰/۰۱ مولار تهیه شد.

جهت بالا رفتن راندمان مایه زنی گیاهان ۲۴ ساعت قبل از مایه زنی توسط کشیده شدن سایه بان سقف گلخانه در سایه قرار داده شدند و به خوبی آبیاری گشتند. نمونه های آلوده به ویروس با ۲ میلی لیتر بافر تلقیح سرد و در هاون چینی که داخل تشتک حاوی یخ قرار داده شده بود عصاره گیری شدند. سپس بر روی برگ ها و در داخل هاون از ساینده کربوراندوم پاشیده شد تا نفوذ ویروس را تسریع کند و عصاره ها به طور جداگانه با استفاده از انگشت سبابه بر روی برگ مایه زنی گردیدند. باید دقت کرد که یک دست زیر برگ قرار داده شود و با انگشت دست دیگر به آرامی از ناحیه دمبرگ به طرف نوک برگ بکشیم (به موازات رگبرگ ها به خصوص رگبرگ مرکزی). ۳- ۲ دقیقه بعد از مایه زنی برگ ها برای حذف کربوراندوم اضافه شستشو داده شدند. مایه زنی در ساعات خنک روز در قبل از ظهر و یا درهنگام غروب صورت گرفت. گیاهان مایه زنی شده در شرایط گلخانه نگهداری شدند و مرتب آبیاری گردیدند و بازدید گیاهان برای ثبت چگونگی پیشرفت کار هر روز صورت گرفت.

به منظور شناسایی مولکولی ویروس RNA استخراج گردید و سپس cDNA سنتز شد و بعد از این مرحله RT-PCR صورت

1- Enzyme-linked immunosorbent assay

2- Three-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay

گرفت. استخراج RNA با استفاده از محلول RNX™(-plus) شرکت تجاری سیناژن ایران انجام شد.

جدول۱- گیاهان محک مایه زنی شده با ویروس و سن مایه زنی آنها

گیاه محک	نحوه کاشت	سن نشاء	سن مایه زنی
Nicotiana tabacum var Samson	خزانه	۴-۲ برگی	۶-۴ برگی
Nicotiana rustica	خزانه	۴-۲ برگی	۶-۴ برگی
Nicotiana clevelandii	خزانه	۴-۲ برگی	۶-۴ برگی

مراحل انجام استخراج با استفاده از محلول(plus)RNX™

مرحله هموژنیزه کردن (یکنواخت کردن) : حدود ۱۰۰-۵۰ میلی گرم بافت گیاهی توسط ازت مایع در هاون استریل سرد پودر شده سپس یک میلی لیتر از محلول RNX™(plus) به بافت پودر شده اضافه شد و با دسته هاون مخلوط گردید تا مایع قهوه ای رنگی حاصل گشت. توسط سمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون داخل هاون به میکروتیوب های استریل انتقال یافت. میکروتیوبها برای چند لحظه ورتکس شدند تا محلولی هموژن بدست آمد، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند.

مرحله استخراج RNA : ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به هریک از نمونه ها اضافه شد. به مدت ۱۵ ثانیه نمونه ها سرو ته شدند تا به خوبی مخلوط شوند. در این مر حله ورتکس لازم نبود. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴درجه سانتی گراد روی یخ نگهداری شدند. سپس نمونه ها به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۴ درجه با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. بعد از انجام سانتریفیوژ ۳ فاز تشکیل شد. فاز پایینی رنگی و شامل فنل و کلروفرم بود. فاز میانی شامل پروتئین و DNA و فاز روئی که رنگی نبود شامل RNA بود در این مرحله فاز روئی حدود ۵۰ درصد از حجم آغازین آن توسط سمپلر کشیده شد و به میکرو تیوب استریل جدید منتقل گردید.

مرحله رسوب RNA : یک حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد به یک حجم مساوی از فاز روئی مرحله قبل اضافه شد. نمونه ها برای مدتی سر و ته گردیدند تا به خوبی مخلوط شوند. نمونه ها به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس آن ها به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.

مرحله شستشوی RNA : فاز روئی حذف و سپس ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵٪ که با آب دیپسی تهیه شده بود اضافه گردید سپس نمونه ها برای چند لحظه سروته شدند. رسوب حاصل در اتانول به مدت ۸ دقیقه در دمای C °۴در دور rpm ۷۵۰۰ سانتریفیوژ گشته فاز روئی را حذف و اجازه دادیم که رسوب در دمای اتاق خشک شود. در این مرحله لازم نیست تا رسوب کاملاً خشک شود فقط تا زمانی که بوی اتانول از بین برود.

رسوب را در ۳۰ میکرولیتر DEPC حل نموده و برای کمک به حل شدن رسوب در DEPC نمونه ها به مدت ۱۰دقیقه در بن ماری در دمای C °۴۰ قرار گرفتند. سپس نمونه های آماده شده در فریزر در دمای C °۲۰- قرار داده شدند. به منظور ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، ۳ میکرولیتر از RNA به همراه ۱ میکرولیتر از بافر رنگ بر روی ژل آگاروز ۱٪ در ولتاژ ثابت ۱۱۰ ولت به مدت ۱۵ دقیقه الکتروفورز گردید.

جهت ردیابی دقیق ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی (TSWV) از جفت پرایمر مشتق شده از L-RNA استفاده شد (۲۱) در جدول ۲ مشخصات آغازگر آورده شده است.

روش کار با کیت Accupower ™RT Premix

۳ میکرولیتر از RNA ی مورد نظر و ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (Reverse) با غلظت ۱۵ پیکومول و یا به جای پرایمر برگشت ۱ میکرولیتر از Oligo dT در یک میکروتیوپ استریل ریخته شد.

جهت مخلوط شدن مواد، میکروتیوپ ها در دستگاه اسپین قرار داده شدند. میکروتیوپ ها به مدت ۵ دقیقه در حرارت C °۷۰ در دستگاه ترموسایکلر اینکوبه شدند. پس از گذشت زمان ذکر شده میکروتیوپ ها به مدت ۵ دقیقه در درون یخ قرار داده شدند.

سپس مواد داخل میکروتیوپ ها به میکروتیوپ های مخصوص کیت Accupower ™RT Premix منتقل شدند سپس تا حجم ۲۰ میکرولیتر به کیت ها آب مقطر تزریقاتی اضافه شد.

جدول۲- ترادف آغازگر اختصاصی ویروس TSWV

آغازگر	جهت	ترادف آغازگر'۳→'۵	موقعیت	اندازه قطعه (bp)
L_1TSWV-R	برگشت	AATTGCCTTGCAACCAATTC	L-RNA	۲۷۶ bp
L_2TSWV-F	رفت	ATCAGTCGAAATGGTCGGCA		

سنتز cDNA طبق روش موجود در کیت Accupower ™RT Premix انجام شد.

میکروتیوپ ها در دستگاه اسپین قرار داده شدند تا کمی یکنواخت گردند سپس در دستگاه ترموسایکلر طبق برنامه ۴۲ درجه سانتی گراد ۱ ساعت برای سنتز cDNA و۹۴ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه برای غیر فعال سازی Rnase ها قرار گرفتند

– میکروتیوپ ها را از دستگاه خارج کرده و در فریزر در دمای °C ۲۰- نگهداری شدند.

تکرار زنجیره وار واکنش پلیمراز باعث سنتز رشته های DNA جدید از روی رشته الگو می شود.

برای تکثیر cDNA از دو روش استفاده شد:

۱ – کیت Accupower ^{TM}RT Premix شرکت Bioneer

۲ – روش دستی

روش کار با کیت های PCR

در ابتدا محیط کار با الکل کاملاً ضدعفونی سطحی گردید.

میکروتیوب PCR که حاوی مواد ذکر شده است جهت آزمایش انتخاب و نامگذاری شدند و سپس ۵ میکرولیتر از cDNA مورد نظر داخل کیت ها ریخته شد.

۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگر های رفت و برگشت اختصاصی با غلظت ۱۰ پیکومول داخل کیت اضافه شدند.

۱۲ میکرولیتر آب مقطر تزریقاتی به میکروتیوب ها اضافه شد تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر برسد.

میکروتیوب ها در دستگاه اسپین قرار داده شدند تا مواد به خوبی مخلوط گردد و مواد به دیواره میکروتیوب نچسبد.

میکروتیوب ها در داخل دستگاه ترموسایکلر، که قبلاً برنامه مورد نظر به آن ها داده شده بود، قرار داده شدند (جدول ۳). پس از پایان کار میکروتیوب ها به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد انتقال یافتند.

جدول ۳- مراحل آزمون PCR

ردیف	مرحله	دما	زمان	تکرار سیکل
۱	واسرشت سازی اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت سازی (Denaturing)	۹۴°C	۱ دقیقه	۳۸
۳	اتصال (Annealing)	۵۰°C	۱ دقیقه	
۴	بسط (Extention)	۷۲°C	۱ دقیقه	
۵	مرحله تکمیل پلیمریزاسیون	۷۲°C	۱۰ دقیقه	۱

روش دستی PCR : با توجه به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، غلظت مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره ای پلیمراز تعیین گردید که در جدول ۴ آورده شده است.

جدول٤- واکنش گر های مورد نیاز در انجام آزمون PCR

واکنش گر	حجم نهایی (میکرولیتر)
بافر 10X - PCR	۲/۵
پرایمر رفت – ۱۰ pmol	۱
پرایمر برگشت – ۱۰ pmol	۱
۵۰ Mm –$MgCL_2$	۱/۵
۱۰ Mm – dNTPs	۰/۵
cDNA	۵
dd H_2O	۱۳/۲
۵ u – Taq Polymerase	۰/۳

مواد فوق با یکدیگر در حجم های قید شده در درون میکروتیوب استریل مخلوط شدند و با یک اسپین مختصر در درون دستگاه ترموسایکلر با برنامه ای که قبلاً ذکر شد قرار داده شدند.

الکتروفورز ژل آگاروز (Agarose gel electrophoresis)

برای تهیه ژل آگاروز ۱/۷٪ ، میزان ۰/۳۴ گرم آگاروز را در ۲۰ میلی لیتر محلول TBE 1X مخلوط کرده. ۴ میکرولیتر از محصولPCR با ۲ میکرولیتر از بافر رنگ مخلوط گردید و به کمک سمپلر در درون چاهک ها ریخته شد. و در چاهک های کناری نشانگر ۱۰۰ جفت بازی تهیه شده از شرکت سیناژن، قرار گرفت. ولتاژ۷۵ ولت تنظیم گردید و پس از گذشت ۱/۵ ساعت، وقتی که رنگ آبی برموفنل بلو به ۲ سانتی متری انتهای ژل رسید جریان قطع گردید و ژل از دستگاه خارج شد. جهت رنگ آمیزی ژل ابتدا ژل به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم برماید و بر روی شیکر قرار گرفت و سپس با آب مقطر به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد تا رنگ های اضافی از سطح ژل حذف شود. سپس به منظور مشاهده باند، ژل بر روی صفحه UV Transilluminator بررسی و با دستگاه Geldocumentation عکسبرداری شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمون الایزا نشان داد که از مجموع ۶۳۶ نمونه گوجه فرنگی جمع آوری شده از مزارع استان خراسان رضوی تنها تعداد ۱۸ نمونه گوجه فرنگی (مشهد ۵ نمونه، تربت حیدریه ۷ نمونه، تخت جلگه ۵ نمونه، رشتخوار ۱ نمونه) به این ویروس آلوده بودند (رنگ زرد چاهک الایزا در مقایسه با چاهک های شاهد نشان دهنده وجود ویروس بود). این ویروس بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه

گرمسیری بنا به گفته کورملینک، ۲۰۰۵ رواج دارد که نتایج حاصل از نمونه برداری های ما هم به این گفته اذعان دارد. تخت جلگه و تربت حیدریه که دارای بیشترین آلودگی در بین نواحی نمونه برداری شده هستند، مناطقی گرمسیر بوده و تقریباً خشک هستند.

علایم گیاهان محک مایه زنی شده با برگ های تازه آلوده به TSWV از قرار *Nicotiana tabacum var Samson* : بدشکلی در برگ ها و موزائیک، *N. rustica* : بدون آلودگی، *N.clevelandii* : بدون آلودگی (شکل ۱). گیاه محک *Nicotiana tabacum var Samson* بعد از مایه زنی با برگ‌های تازه علائم بدشکلی در برگ ها و موزائیک را نشان داد که با نتایج کورملینک ۲۰۰۵ مطابقت دارد.

الکتروفورز ژل آگاروز قابل اعتمادترین روش ارزیابی کیفیت RNA بوده و امکان ارزیابی سریع کیفیت RNA را به روش چشمی فراهم نمود. به منظور ارزیابی کیفیت، RNA استخراج شده بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید (شکل ۲).

در مورد استخراج RNA ، همانند تلقیح مکانیکی مشاهده شد که استخراج هایی که با برگ هایی که با ازت مایع منجمد شده و در فریزر نگهداری می شدند، اصلاً غلظت مناسبی از RNA را به ما نشان ندادند در صورتی که استخراج های با برگ های تازه باند مناسبی از RNA را تشکیل دادند.

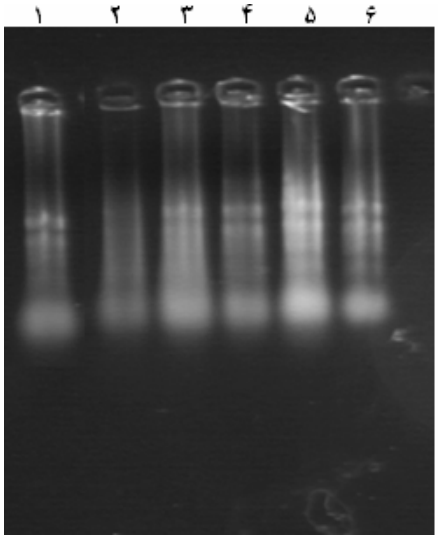
پس با استناد به نتایج حاصل از مایه زنی مکانیکی و نتایج حاصل از استخراج RNA از برگ های با ازت منجمد شده و نگهداری شده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد به این نتیجه می‌رسیم که پایداری این ویروس در شرایط فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد بسیار کم است و برای نگهداری این ویروس، مایه زنی مکانیکی و استفاده از فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد پیشنهاد می شود.

به منظور شناسایی ویروس TSWV پس از استخراج RNA کل گیاه، cDNA سنتز شد و با استفاده از cDNA سنتز شده و آغازگر های اختصاصی در واکنش PCR، DNA تکثیر یافت. برای ارزیابی کیفیت محصول تکثیر یافته در چاهک های ژل آگاروز تزریق گردیدند. به منظور ارزیابی کیفیت محصولات PCR از ژل آگاروز ۱/۷٪ استفاده شد و در یکی از چاهک ها از نشانگر DNA ، ۱۰۰ جفت بازی بهره بردیم. با توجه به شکل ۳ شناسایی ویروس TSWV با روش مولکولی بر ما ثابت گردید و با استفاده از روش‌های مولکولی و سرولوژیکی وجود ویروس در استان خراسان رضوی به اثبات رسید.

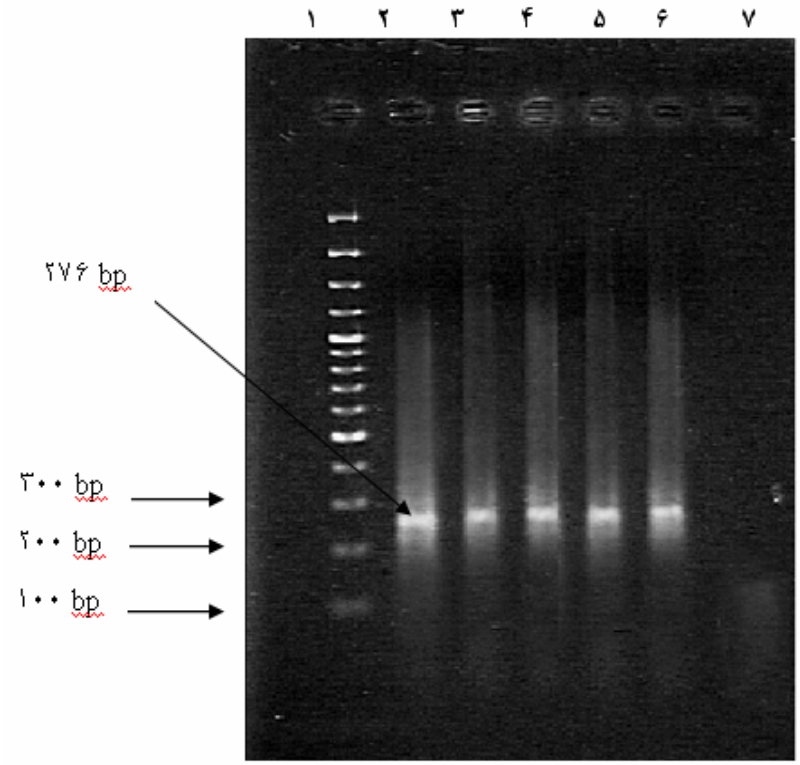
سپاسگزاری

بر خود لازم می دانم از اساتید گرانقدرم آقای دکتر جعفرپور ، خانم دکتر فلاحتی رستگار که مرا در اجرای این پایان نامه یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم و همچنین از آقای دکتر ملک زاده ، آقای دکتر کاووسی ، آقای مهندس سبک خیز ، آقای مهندس قبولی و خانم بوستانی و دوستانم خانم ها رفیع زاده، الوانی، ربیعی و آشنایی و آقایان مکرم و اشرفی به خاطر مساعدت هایشان بی نهایت سپاسگزارم .

شکل ۱-علایم ویروس TSWV بر روی *Nicotiana tabacum var Samson* مایه زنی شده با برگ های آلوده به ویروس



شکل ۲- نمونه های RNA استخراج شده از نمونه های گوجه فرنگی و توتون آلوده به ویروس TSWV بر روی ژل آگاروز



شکل۳- ارزیابی کیفیت محصول PCR ویروس TSWV بر روی ژل ۱/۷٪ آگاروز و مشاهده باند اختصاصی ویروس در منطقه ۲۷٦ bp . چاهک ۱ نشانگر DNA و چاهک ۷ شاهد منفی و بقیه چاهک ها نمونه های آلوده به ویروس است.

منابع

۱- بنانج ک.، آهومنش ع. و شهر آئین ن. ۱۳۷۵ . جداسازی و تعیین خصوصیات ویروس پژمردگی گوجه فرنگی از مزارع ورامین . مجله بیماری های گیاهی، جلد ۳۲ (شماره های ۲-۱)، صفحات ۴۲ تا ۴۵.

۲- بنانج ک.، آهومنش ع.، لرمن دی.ای.، شهریاری د . و شهرآئین ن. ۱۳۷۷ . جداسازی و تعیین خصوصیات ویروس پژمردگی گوجه فرنگی از مزارع گوجه فرنگی ورامین . مجله بیماری های گیاهی، جلد ۳۴ (شماره های ۲-۱)، صفحات ۱۰۷ تا ۱۱۶.

۳- شاه حسینی م. ۱۳۸۴. واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR . ناشر دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر – شهریار/شهر قدس . ۱۶۵ صفحه.

4- Adkins S., Zitter T. and Momol T. 2005 . Tospoviruses (family Bunyaviridae , Genus Tospovirus). Institute of food and agriculture sciences university of florida . www.edis.ifas.ufl.edu/pp134.

5- Angle J.S., Bridges C.D. and Cherry J. 2005 . Tospoviruses in solanaceae and others crops in the coastal plain of Georgia. The university of Georgia collage of agricultral and environmental sciences report number 704 . ISSN 0072-128 .40pp.

6- Arambura J., Riudavets J., Arno J., Lavina A. and Moviones E. 1997 . The proportion of viruliferous individuals in field population of Frankliniella occidentalis : implication for Tomato Spotted Wilt Virus epidemics in tomato . European journal of plant pathology 103 : 623-629 .

7- Boonham N., Smith P., Walsh K., Tame J., Morris J., Spenee N., Bennison J. and Barker L. 2001 . The detection of Tomato Spotted Wilt Virus in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (Taq Man) .Virological method 101 : 37-48.

8- Broughton S., Jones R. and Coutts B. 2004 . Management of thrips and Tomato Spotted Wilt Virus . Department of agriculture and food . www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported-assent/content/pw/inspp/hort/fn069-2004.pdf

9- Broughton S. and Spafford H. 2007. Lettuce leaf national vegetable industry center newsletter . Department of agriculture and food. www.agric.nsw.gov.au

10- Cerkauskas R. 2005. Tomato Spotted Wilt Virus . The word vegetable center.

www.avrdc.org/pdf/tomato
11- Clark M.F. and Adams A.N. 1977 . characteristics of the microplate method of enzyme-linked immuno sorbant assay for the detection of plant viruses . Jornal of General Virology 34:475-483.
12- Dougall S.Mc. and Tesoriero L. 2007 . Western flower thrips and Tomato spotted wilt virus . www.dpi.nsw.gov.au
13- Edmunds B. and Pottorff L.P. 1990. Greenhouse plant viruses (Tomato Spotted Wilt Virus / Impatiens necrotic spot virus) . Colorado state university extension . www.ext.colostate.edu.pubs/garden/02947.html
14- Kikkert M., Poelwijk F.V., Storms M., Kassies W., Bloksma H., Lent J.V., Kormelink R. and Goldbach R. 1997. A protoplast system for studying Tomato Spotted Wilt Virus infection . Journal of General Virology 78 :1755-1763.
15- Kim J.H., Choi G.S., Kim J.S. and Choi J.K. 2004 . Charactrrization of Tomato Spotted Wilt Virus from Paprika in Korea . Journal of Plant Pathology 20: 297-301.
16- Knippenberg I.V., Goldbach R. and Kormelink R. 2002 . Purified Tomato Spotted Wilt Virus particles support both genome replication and transcription in vitro . Virology 303 : 278-286 .
17- Kormelink R. 2005. Tomato Spotted Wilt Virus . This is revised version of DPV 39 . www.DPV.com
18- Lommel S.A., Mccain A.H. and Morris T.J. 1982 . Evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses . Phytopathology 72 : 1018-1022.
19- Mandal B., Pappu H.R. and Culbreath A.K. 2001 . Factor affecting mechanical transmission of Tomato Spotted Wilt Virus to peanut (*Arachis hypogaea*) . Plant disease 85 : 1259-1263
20- Matsuura S., Hoshino S., Hayashi H., Kohguchi T., Hagiwara K. and Omura T. 2002 . Effect of latant infection of stock plant and abundance of thrips on the occurrence of Tomato Spotted Wilt Virus in chrysanthemum fields. General plant pathology 68 :99-102.
21- Morris J. 2004. Protocol for the diagnosis of quarantine organisms Tomato Spotted Wilt Virus , Impatiens necrotic spot virus and Watermelon silver mottle virus .OEPP/EPPO Bulletin 34 : 271-279 .
22- Moyer J., German T., Sherwood J. and Ullman D. 1999 . An update on Tomato Spotted Wilt Virus and related Tospoviruses . American Phytopathological Society . www.apsnet.org
23- Nascimento L.C., Pensuk V., Costa N.P., Deom C.M. and Sherwood J. 2006 . Evalution of peanut genotypes for resistance to Tomato Spotted Wilt Virus by mechanical and thrips inoculation . Pesq. Agropec . bras , Brasilia 41 : 937-942.
24- Okuda M. and Hanada K. 2001 . RT-PCR for detecting five distinct tospoviruses species using degenerate primers and dsRNA template . Virological method 96 : 149-156
25- Sin S.H. 2004. Genetic determination for thrips transmission of Tomato Spotted Wilt Virus . Ph.D Thesis . A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University .114pp.
26- Swift C. 2008. Tomato Spotted Wilt Virus . Area Extension Agent, Horticulture Colorado State Extension . www.coopext.colostate.edu/tra/plants/tswit.html
27- Tsompana M. 2004 . Molecular evalution and population genetics of Tomato Spotted Wilt Virus . Ph.D Thesis . A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University. 211pp
28- Zitter T.A., Daughtrey M.L. and Sanderson J.P. 1989 . Vegetable crops Tomato Spotted Wilt Virus . www.vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets