نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ص. ۳۵-۳۰

Journal of Plant Protection
Vol. 25, No. 1, Spring 2011, P. 30-35

ردیابی ویروس S سیب‌زمینی (PVS) با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و آزمون اختصاصی RT-PCR در استان‌های خراسان رضوی و همدان

سمیرا پاکباز[1*]- بهروز جعفرپور[2]- ماهرخ فلاحتی رستگار [3]

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۲۰

چکیده

ویروس S سیب‌زمینی متعلق به جنس *Carlavirus* و خانواده *Flexiviridae* می‌باشد که دارای ذرات رشته‌ای خمیده به ابعاد ۱۲ ×۶۵۰ نانومتر و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای مثبت می‌باشد. این ویروس از متداول‌ترین ویروس‌هایی است که تمام واریته‌های سیب‌زمینی موجود در دنیا را آلوده می‌کند. گونه‌های حساس به PVS در سه خانواده Solanaceae، Chenopodiaceae و Amaranthaceae یافت می‌شوند. این ویروس از طریق مایه‌زنی مکانیکی و همچنین توسط شته سبز هلو *Myzus persicae* به صورت ناپایا منتقل می‌شود. به منظور ردیابی ویروس در منطقه، از حدود ۵۰ مزرعه استان‌های خراسان رضوی و همدان، تعداد ۵۵۵ نمونه از غده‌های گیاهانی که علایمی نظیر موزاییک، لکه‌های نکروتیک، فرورفتگی جزئی رگبرگ، رگوز، تموج حاشیه برگ، پژمردگی و کوتولگی را نشان می‌دادند، جمع‌آوری شدند. سپس غده‌ها جهت گذراندن دوره خواب در دمای ۴°C قرار گرفتند. پس از جوانه‌زنی، با استفاده از آنتی‌سرم پلی‌کلونال، اختصاصی PVS در آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA، غده‌های آلوده به این ویروس شناسایی شدند. عصاره تعدادی از نمونه‌هایی که در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شدند، بر روی گیاهان آزمون شامل *Chenopodium quinoa* و *Chenopodium amaranticolor* (لکه‌های کلروتیک روی برگ)، *Nicotiana debneyi* (موزاییک)، *N. tabacum var. xanthi* (مصون)، *Lycopersicon esculentum* (موزاییک) مایه زنی شد. نتایج آزمون الایزا نشان داد که تعداد ۶۹ نمونه به این ویروس آلوده بوده‌اند. به منظور تأیید نتایج الایزا در نمونه‌های آلوده از روش RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن کد کننده پروتئین پوششی ویروس استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی PVS-F و PVS-R، قطعه‌ای به طول ۱۱۱۸ جفت باز مربوط به ژن پروتئین پوششی ویروس را تکثیر نمودند.

واژه‌های کلیدی: الایزا، ویروس S سیب زمینی، RT-PCR

مقدمه

سیب‌زمینی یکی از مهم‌ترین محصولات غذایی جهان است و ارزش عمده‌ای در تغذیه انسان دارد. از نظر میزان تولید رتبه پنجم را در جهان بعد از گندم، ذرت، برنج و جو به خود اختصاص داده است. ویروس S سیب‌زمینی (PVS) تا اوایل سال‌های ۱۹۵۰ به علت ایجاد علایم بسیار خفیف و همچنین ارتباط نزدیک با سایر ویروس-های سیب‌زمینی شناخته نشده بود (۲). این ویروس برای اولین بار از هلند توسط دی برایان ابوتر (۹) در *Solanum tuberosum* گزارش شد. PVS نه از طریق علایم حاصل از آن، بلکه توسط روش‌های سرولوژیکی در حین تلاش برای تولید آنتی‌سرم ویروس A سیب‌زمینی (PVA) کشف شد (۲، ۱۳). ویروس S سیب‌زمینی (PVS) در سراسر دنیا، در هر کجا که سیب‌زمینی کشت می‌شود، وجود دارد (۲) و یکی از متداول‌ترین ویروس‌هایی است که سیب‌زمینی را آلوده می‌کند (۲۰). این ویروس تقریباً تمام واریته‌های سیب‌زمینی موجود در دنیا را آلوده نموده است (۶) و بسیاری از ارقام قدیمی به میزان ۱۰۰ درصد به این ویروس آلودگی نشان داده‌اند (۱۳). تا به حال در ایران این ویروس از منطقه اصفهان توسط دانش و همکاران (۳) گزارش شده است و نیز جعفرپور در سال ۱۳۶۸ با استفاده از آزمون الایزا درصد آلودگی مزارع اطراف مشهد را به این ویروس ۵۸ درصد گزارش نموده است (۱). همچنین در سال ۱۳۸۴ این ویروس در استان‌های کرمان و فارس ردیابی و تعیین پراکنش گردید. در این تحقیق پراکنش ویروس S سیب زمینی (PVS) به

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادان گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: Samira.pakbaz@yahoo.com)

ترتیب ۳۰/۴ و ۳۰/۷ درصد گزارش شد (۵). در سال ۲۰۰۲، پاسیک و همکاران توالی کامل ژنوم PVS را تعیین نمودند و سپس در سال ۲۰۰۵ متوسیک و همکاران ژنوم کامل سه جدایه از ویروس S سیب زمینی به نام‌های Leona، Vitava و Kobra را کلون و توالی‌یابی کردند (۱۸). در سال ۱۳۸۶، پوررحیم و همکاران بخشی از توالی ژن پروتئین پوششی و نیز پروتئین ۱۱ کیلو دالتونی جدایه‌ای از این ویروس را که از مزارع استان اصفهان جمع‌آوری شده بود، تعیین و در بانک ژن ثبت کردند (۲۴).

ویروس S سیب زمینی (PVS) متعلق به جنس *Carlavirus* و خانواده *Flexiviridae* می‌باشد (۱۷). ذرات PVS رشته‌هایی راست تا نسبتاً خمیده (۱۵، ۲۷)، یا میله‌ای نخی شکل (۲)، به ابعاد تقریبی ۱۲ ×۶۵۰ نانومتر (۱۳، ۱۵، ۱۶) هستند. بررسی الکترون میکروسکوپی برگ‌های سیب‌زمینی آلوده به PVS، وجود پیکره‌های میله‌ای خمش‌پذیر را در بافت‌های آلوده نشان می‌دهد (۸). ژنوم شامل یک RNA تک رشته‌ای و خطی مثبت است که انتهای '۳ آن دارای دم PolyA می‌باشد (۱۶، ۱۷، ۱۹) و انتهای '۵ ژنوم ویروس فاقد Vpg است (۲۰). ژنوم توسط یک پروتئین پوششی ۳۴ کیلو دالتونی احاطه شده است. RNA ویروس از دو قسمت ۲/۵ و ۱/۵ kb تشکیل شده است که ناحیه کوچکتر برای پروتئین پوششی و پروتئین ۱۱ کیلو دالتون کد می‌کند (۱۷). در توالی انتهای '۵ ژنوم نژاد PVS^A، ۲۶۱ نوکلئوتید و در انتهای '۳ ژنوم، ۳۵۵۳ نوکلئوتید شناسایی شده است. انتهای '۳ شامل شش ORF بوده که ORF ۴۲ کیلو دالتونی، بزرگترین ORF بوده و دو محصول پروتئینی را تولید می‌کند (۱۶، ۲۰). ORF ۱۱ کیلو دالتونی انتهای '۳ ژنوم ویروس، به غیر از گروه کارلاویروس در سایر گروه‌های ویروسی مشاهده نمی‌شود (۱۶). گیاهان آلوده به این ویروس اغلب فاقد علایم هستند، ولی برخی سویه‌های این ویروس می‌توانند سبب ایجاد علایم در ارقام معینی از سیب‌زمینی شوند (۲، ۱۳). ایجاد لکه‌های نکروتیک در سطوح فوقانی برگ (۲، ۴)، رگبرگ نواری (۱۴)، فرورفتگی جزئی رگبرگ، رگوز برگ‌ها (۲، ۱۵، ۲۰)، زردی مختصر و تموج حاشیه برگ (۲۷)، ابلقی (۲، ۱۳)، پژمردگی گیاهان مسن (۲) و کوتولگی (۱۳، ۱۵) از علایم این ویروس می‌باشند. تنها علایم بیماری در غده‌ها کاهش اندازه آن است که تقلیل محصولی حدود ۲۰-۱۰ درصد را سبب می‌شود (۲). سیب‌زمینی تنها میزبان طبیعی PVS است (۳) و گونه‌های حساس به PVS فقط در سه خانواده Solanaceae و Chenopodiaeae و Amaranthaceae یافت می‌شوند (۸).

برای این ویروس دو نژاد مشخص شده است: نژاد Andean (PVS-An یا PVS^A) و نژاد معمولی یا Type (PVS-یا PVS^O Ty) (۶، ۲۰). گسترش PVS^A در مزرعه معمولاً سریع‌تر از نژاد PVS^O است و این به دلیل غلظت بالاتر ویروس در گیاه و همچنین قابلیت انتقال این نژاد توسط شته *Myzus persicae* و *Aulacorthum solani* می‌باشد (۱۱). این نژاد به وسیله شته‌ها به روش ناپایا به گیاهان اعضاء خانواده Solanaceae و Chenopodiaceae منتقل می‌شود (۱۶)، همچنین از طریق غده‌ها نیز انتقال می‌یابد (۲۱). در مزرعه گسترش آلودگی بیشتر از طریق مکانیکی صورت می‌گیرد تا از طریق شته‌ها (۱۷). فاستر و متوسیک در بررسی‌های خود روی تعدادی از جدایه‌های ویروس PVS، پیشنهاد دادند که عمده تفاوت‌ها بین ژنوم PVS^A و PVS^O به ناحیه ژن‌های پروتئین k ۷ و k ۱۱ مربوط می‌شود (۱۸). مقایسه آنالیز توالی‌های انتهای '۳ نژاد PVS^A و PVS^O شباهت‌های زیادی را در ناحیه پروتئین پوششی (۹۳٪) نشان می‌دهد. تفاوت در قسمت‌هایی از اسیدهای آمینه توالی‌های این دو نژاد نیز احتمالاً به تفاوت در علایم و قابلیت انتقال با شته‌ها مربوط می‌شود (۱۲،۱۷).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و تعیین آلودگی نمونه‌ها به PVS

در تابستان و اوایل پاییز سال ۱۳۸۶ پس از بازدید از مزارع سیب‌زمینی استان‌های خراسان‌رضوی (شهرستان‌های مشهد، قوچان، چناران، فریمان، نیشابور، تربت‌جام، تربت‌حیدریه) و همدان (شهرستان‌های همدان، اسدآباد، کبودراهنگ، رزن، بهار) نمونه‌های مشکوک به آلودگی و دارای علایم جمع‌آوری و پس از ثبت مشخصات در پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل گردیدند. غده های جمع‌آوری شده جهت گذراندن دوره خواب و جوانه‌زنی، به مدت ۸-۶ هفته در دمای ۴ درجه سانتی-گراد و سپس ۶-۴ هفته در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تشخیص نمونه‌های آلوده از سالم به روش ساندویچ دو طرفه الایزا (DAS-ELISA)[1] مطابق روش کلارک و آدامز (۷) با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی و پلی‌کلونال تهیه شده از شرکت DSMZ آلمان انجام پذیرفت. در این آزمون جهت عصاره‌گیری، از جوانه‌های غده‌های سیب‌زمینی استفاده شد.

مایه‌زنی مکانیکی

کلیه نمونه‌هایی که آلودگی آن‌ها در آزمون الایزا مثبت ارزیابی شد، به منظور تکثیر و نگهداری ویروس در گلخانه کاشته شدند. جهت بررسی علایم بیماری بر روی گیاهان آزمون و همچنین برای حفظ ویروس در گیاهان تکثیری، گیاهان آزمون شامل *C. ،Chenopodium quinoa ،Lycopersicon esculentum*

1- Double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay

N. tabacum var. amaranticolor، *Nicotiana debneyi* و *xanthi* در مرحله ۶-۴ برگی با عصاره برگ های سیب‌زمینی آلوده به ویروس PVS تلقیح گردیدند. برای این منظور از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار، pH,۷/۴ و مقدار کمی پودر کربوراندوم استفاده شد (۱۰، ۱۱ و ۱۸).

استخراج RNA

جهت استخراج RNA و ردیابی مولکولی، حتی الامکان از برگ‌های جوان بوته‌های سیب‌زمینی آلوده (دارای واکنش مثبت در آزمون الایزا) که در گلخانه کاشته شده بودند، استفاده شد. استخراج به روش فنل-کلروفرم با استفاده از روش وانگ و گابریل (۲۰۰۲) و وادسورس و همکاران (۱۹۸۸) با اندکی تغییرات انجام شد (۲۵، ۲۶).

ابتدا ۰/۱ گرم از بافت برگ را درون هاون چینی استریل با اضافه کردن ازت مایع کاملاً پودر کرده و سریعاً به میکروتیوب‌های ۱/۵ منتقل می‌کنیم. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (گلایسین ۰/۱ مولار، کلرید سدیم ۰/۱ مولار، EDTA ۰/۰۱ مولار و SDS ۰/۱ درصد، pH,۹)، ۲۵۰ میکرولیتر فنل و ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه کرده و ۱۵ ثانیه ورتکس می‌کنیم. سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ و سپس فاز شفاف رویی به میکروتیوب جدید منتقل می‌شود. مجدداً به آن فنل- کلروفرم افزوده، ورتکس و سانتریفیوژ می‌کنیم. بعد از انتقال فاز رویی، دو برابر حجم آن اتانول ۷۰٪ و سرد اضافه کرده و به آرامی میکروتیوب‌ها را تکان می‌دهیم. سپس با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و فاز رویی را حذف می‌کنیم. مجدداً رسوب حاصل را با یک میلی لیتر اتانول سرد شستشو داده و ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. فاز رویی حذف و رسوب حاصل خشک گردید. سپس ۴۰-۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل عاری از RNase به آن اضافه و رسوب در آن حل گردید.

سنتز cDNA (مرحله نسخه‌برداری معکوس)[1]

به منظور سنتز cDNA طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاس[2] عمل شد. ابتدا ۳ میکرولیتر RNA الگو را با ۱/۵ میکرولیتر آغازگر اختصاصی برگشت با غلظت ۵ پیکومول و ۸ میکرولیتر آب مقطر تزریقاتی استریل مخلوط و به منظور واسرشت‌سازی در دمای $70^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه در دستگاه PCR قرار داده شد و بلافاصله بر روی یخ سرد گردید. سپس به آن ۴ میکرولیتر 5XReaction Buffer ، ۲ میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی‌مولار dNTPs، ۲۰ واحد (۰/۵ میکرولیتر) Ribonuclease inhibitor اضافه شد. پس از آن به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور در دمای $37^{\circ}C$ قرار داده شد. سپس به آن ۲۰۰ واحد (۱ میکرولیتر) آنزیم Reverse (M-MLV) Transcriptase افزوده شد. میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر شرکت آلمانی بیومترا[3] با برنامه حرارتی $42^{\circ}C$ به مدت ۶۰ دقیقه و $70^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه و سپس $4^{\circ}C$ به منظور خنک شدن قرار داده شدند. cDNA حاصل در $-20^{\circ}C$ نگهداری شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز[4] (PCR)

جهت ردیابی دقیق ویروس PVS در نمونه‌های سیب‌زمینی، از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن کد کننده پروتئین پوششی استفاده شد (جدول۱) (۲۳).

شرایط و مواد تشکیل دهنده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به شرح زیر بود:

۱ میکرولیتر DNA الگو (cDNA)، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت با غلظت ۵ پیکومول، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱/۲۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی-مولار، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک‌پلیمراز[5] با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر. حجم نهایی مخلوط را با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر می‌رسانیم.

برنامه دمایی دستگاه PCR شامل ۳ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$، سپس ۳۵ سیکل با برنامه ۳۰ ثانیه در $94^{\circ}C$ و ۳۰ ثانیه در $57/5^{\circ}C$، ۴۵ ثانیه در $72^{\circ}C$ و یک سیکل انتهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ و درجه حرارت $4^{\circ}C$ به منظور خنک شدن در نظر گرفته شد. این برنامه در دستگاه ترموسایکلر شرکت آلمانی بیومترا انجام شد.

به منظور مشاهده محصولات PCR، ۳ میکرولیتر از محصول هر نمونه به همراه ۲ میکرولیتر بافر رنگ[6] درچاهک‌های ژل آگاروز ۱/۵ ٪ تزریق شد. همچنین الکتروفورز ژل عمودی نیز به منظور مشاهده بهتر فرآورده‌های PCR به صورت غیرواسرشتی انجام گرفت. برای این منظور از ژل پلی اکریل آمید ۵٪ استفاده شد. به منظور رنگ-آمیزی ژل از روش دکتر اشمیت که روش تغییر یافته شوماتر و همکاران (۱۹۸۶) می باشد استفاده شد (۲۸).

نتیجه و بحث

بوته‌های سیب‌زمینی آلوده در گلخانه، علایم ویروس PVS مانند

1-Reverse Transcription
2 -Fermentas

3- Biometra
4- Polymerase Chain Reaction
5-Taq DNA polymerase
6- Loading buffer

ایجاد لکه‌های نکروتیک در سطوح فوقانی برگ، کلروز خفیف، تموج حاشیه برگ‌ها، موزاییک، فرورفتگی جزئی رگبرگ، پژمردگی وکوتولگی را در سطح اندام‌های هوایی نشان دادند که با علایم گزارش شده از این ویروس توسط دلبای و جونز در سال ۱۹۸۷ مطابقت داشت (۱۰) (شکل۱: الف- ب). در مایه‌زنی مکانیکی PVSبه برگ‌های *Chenopodium quinoa*، لکه‌های موضعی کلروتیک به قطر ۳ -۲ میلی‌متر در سطح فوقانی برگ به‌وجود آمد و بعد از مدتی این لکه‌ها حالت نکروتیک و گاهی نیز سیستمیک به خود گرفتند (شکل ۱: ج). این علایم مشابه گزارش نژاد Andean ویروس S سیب زمینی از *Solanum tuberosum* توسط فلچر[1] در سال ۱۹۹۶ از نیوزیلند بود. در این مطالعه از دو جدایه استفاده شده بود: جدایه PVS^{A}-NZ که روی *Chenopodium quinoa* بعد از ۲-۱ هفته علایم سیستمیک و ابلقی ایجاد می‌کرد و جدایه -PVS^{A} MC که علایم موضعی ایجاد می‌کرد (۱۱). با مایه‌زنی مکانیکی PVS به برگ‌های *Chenopodium amaranticolor*، حدود ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی نقاط ریز کلروتیک و نکروتیک به صورت موضعی در برگ‌های پیرتر پدیدار شد، پس از مدتی علایم بد شکلی نیز در برگ‌های مایه‌زنی شده دیده شد که مشابه نتایج آزمایشات دیباکس و همکاران در سال ۱۹۷۰ بود (۸). در برگ‌های گوجه فرنگی حدود ۲۰ روز بعد از مایه زنی لکه‌های کلروتیک ظاهر شد. در*Nicotiana debneyi* پس از حدود دو هفته علایم به صورت موزاییک بین رگبرگی و به طور سیستمیک ظاهر شد و در نهایت منجر به نکروز برگ‌ها گردید. این علایم دقیقاً مشابه نتایج دلبای و جونز در سال ۱۹۸۷بود (۱۰) *Nicotiana tabacum var. xanthi* نسبت به ویروس PVS مصون عمل کرده و هیچ گونه علایمی نشان نداد.

بر اساس آزمون الایزا از مجموع ۵۵۵ نمونه جمع‌آوری شده، ۶۹ نمونه آلوده به PVS تشخیص داده شد. همچنین آلودگی این نمونه‌ها با استفاده از روش مولکولی RT-PCR نیز تأیید شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی ویروس S سیب زمینی (PVS)، توانست قطعه‌ای به طول ۱۱۱۸ جفت باز را تکثیر نماید، در حالی‌که هیچ باندی از نمونه‌های سالم و شاهد منفی حاصل نشد (شکل۲). نتیجه به دست آمده در این تحقیق، با نتایج آزمایشات پیمان و زی در سال ۲۰۰۶ مطابقت داشت، پیمان و زی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده مبتنی بر ترادف نوکلئوتیدی ژن کد کننده پروتئین پوششی ویروس S سیب زمینی (PVS)، توانستند قطعه‌ای به طول ۲۷۵ جفت باز (در ناحیه ۵۹۱-۳۱۶ از ژن پروتئین پوششی PVS) را تکثیر کنند (۲۲). همچنین پوررحیم و همکاران در سال ۱۳۸۶، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن پروتئین پوششی و پروتئین ۱۱ کیلو دالتونی PVS، توانستند قطعه‌ای به طول ۱۱۲۱ جفت باز را در جدایه Iran-ES (جمع‌آوری شده از مزارع استان اصفهان) تکثیر کنند (۲۴).

نتایج حاصل از هر دو آزمون الایزا و RT-PCR گسترش PVS را در اکثر مزارع سیب‌زمینی کاری دو استان خراسان‌رضوی و همدان نشان داد. همچنین نمونه‌هایی که در آزمون الایزا آلودگی آنها در حد بسیار کم و مشکوک به آلودگی به نظر می‌رسیدند، از طریق روش RT-PCR نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. این روش، آلودگی را در نمونه‌های مشکوک کاملاً تأیید نمود. در نتیجه در مقایسه این دو روش تشخیصی، روش مولکولی RT-PCR حساس‌تر و دقیق‌تر عمل می‌کند که این نتیجه با تحقیقات قبلی که توسط هنری و همکاران ۱۹۹۲ انجام شد مطابقت دارد.

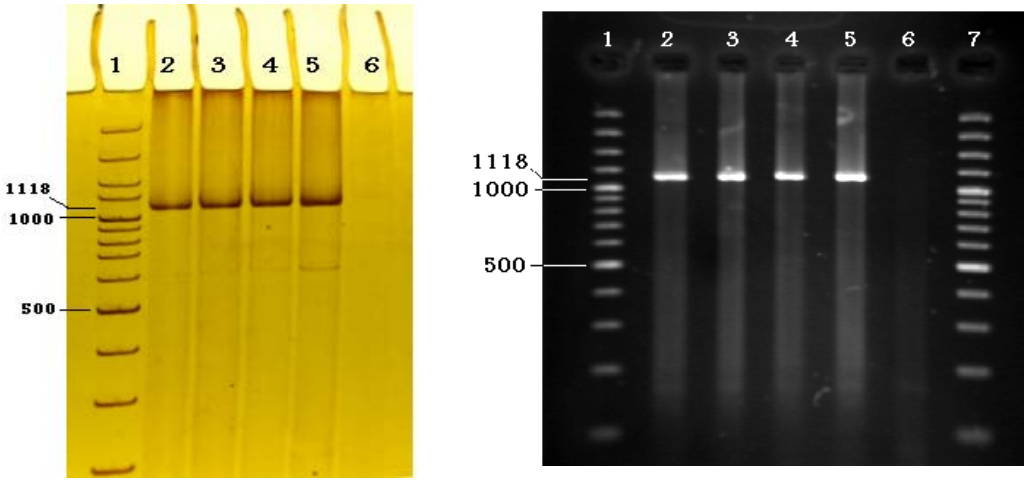
جدول۱- ترادف آغازگرهای اختصاصی مربوط به ویروس PVS (۲۳)

آغازگر	جهت	ترادف آغازگر (´۳-´۵)	موقعیت	اندازه قطعه(bp)
PVS CP-F	رفت[2]	TGG GGA ATC AGT CCG GCT GGT C	۷۰۸۲-۷۱۰۳	۱۱۱۸
PVS CP-R	برگشت[3]	AAC TGG ACC TGC GCT TAG GCT	۸۱۷۹-۸۱۹۹	

1-Fletcher
2 -Forward
3- Reverse

الف ب ج

شکل۱- الف- کلروز خفیف و لکه‌های نکروتیک در سطح فوقانی برگ‌های سیب‌زمینی‌های آلوده به PVS در گلخانه، ب-تموج حاشیه برگ‌های سیب‌زمینی، ج- علایم PVS روی برگ‌های مایه‌زنی شده *Chenopodium quinoa* به صورت لکه‌های موضعی کلروتیک به قطر ۳-۲ میلی‌متر در سطح فوقانی برگ



الف ب

شکل۲- الف- نتیجه الکتروفورز محصول تکثیر شده RT-PCR بر روی ژل آگاروز ۱.۵ ٪ : ستون ۱ و ۷ نشانگر bp ۱۰۰، ستون های ۵-۲ قطعه تکثیر شده در محدوده ۱۱۱۸ جفت باز، ستون ٦ شاهد منفی، ب- نتیجه الکتروفورز محصول تکثیر شده RT-PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۵%: ستون ۱ نشانگر bp ۱۰۰، ستون‌های ۵-۲ قطعه تکثیر شده در محدوده ۱۱۱۸ جفت باز، ستون ٦ شاهد منفی

منابع

۱- جعفرپور ب. ۱۳۶۸. شناسایی ویروس‌های اس و ایکس سیب‌زمینی در مشهد. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۶۶ صفحه.

۲- جعفرپور ب. ۱۳۷۰. بیماری‌های سیب‌زمینی. تألیف ریچ. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۸۳ صفحه.

۳- دانش د.، سلیمانیان ص.، فیلسوف ف.، و دهقان م. ۱۳۷۱. فراوانی چهار ویروس بیماری‌زای سیب‌زمینی در مزرعه آزمایشی فریدن اصفهان. بیماری‌های گیاهی، جلد بیست و هشتم. ۹-۱ صفحه.

۴- روشندل س.، طاهری ع.، بابایی ق. و مرشدی ع. ۱۳۸۵. مدیریت سلامت سیب‌زمینی. تألیف راندال سی. راو. انتشارات هادیان. ۴۴۷ صفحه.

۵- سالاری خ.، معصومی ح.، شعبانیان م.، حیدرنژاد ج. و حسینی پور ا. ۱۳۸۵. بررسی پراکندگی و شناسایی سرولوژیکی و مولکولی ویروس S سیب‌زمینی (PVS) در مزارع سیب‌زمینی استان‌های کرمان و فارس. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، پردیس دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی کرج.

6- Cerovska N., and Filigarova M. 1995. Specific detection of the Andean strain of potato virus s by monoclonal antibodies. Annals of Applied Biology, 127(1): 87-93.

7- Clark M. F., and Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General virology 34: 475-483.

8- De Bokx J. A. 1970. Reactions of various plant species to inoculation with potato virus s. Neth. Journal of Plant pathology 76: 70-78.

9- De Bruyn Ouboter M. P. 1952. Proc. 1st Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 1951: 83.

10- Dolby, C. A., and Jones, R. A. C. 1987. Occurrence of the Andean strain of potato virus S in imported potato material and its effects on potato cultivars. Journal of Plant Pathology 36: 381-388.

11- Fletcher J. D. 1996. Potato virus S^A- characteristics of on isolate from New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 24: 335-339.

12- Foster G. D., and Mills P. R. 1990. Detection of strains of potato virus S by nucleic acid spot hybridization (NASH). Potato Research 33: 487-495.

13- Hooker W. J. 1983. Compendium of potato viruses. The APS press.125 pp.

14- Khurana S. M. P. 1985. Potato viruses and virus-like diseases, detection, diagnosis, identification and characterization. Journal of Plant virology 65: 189-221.

15- Kiratiya-angul K., waimala P., and Deema N. 1992. Purification and antiserum production of potato virus s (PVS). SAPPRAD 1: 246-248.

16- Mathews R. E. F. 1993. Diagnosis of plant virus disease. CRC press. 403 pp.

17- Matousek J., Schubert J., Dedic, P., and Ptacek J. 2000. A broad variability of potato virus S (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reveres transcriptase-polymerase chain reaction. Journal of Plant Pathology 22: 29-37.

18- Matousek J., Schubert J., Ptacek J., Kozlova P., and Dedic P. 2005. Complete nucleotide sequence and molecular probing of potato virus S genome. Acta virologica 49: 195-205.

19- Monis J., and de zoeten G. A. 1990. Characterization and translation studies of potato virus s RNA. Phytopathology 80: 441-445.

20- Mulholland V. 2005. Immunocapture-polymerase chain reaction in immunochemical protocols, 3 rd edition. Human press, Totowa, USA. Pp: 281-290.

21- Oruetxebarria I., Kekarainen T., Spetz C., and Valkonen J.P.T. 2000. Molecular characterization of Potato virus V genomes from Europe indicates limited spatiotemporal strain differentiation. Phytopathology 90:437-444.

22- Peiman M., and Xie C. 2006. Development and evaluation of a multiplex RT-PCR for detecting main viruses and a viroid of potato. Acta virologica 50: 129-133.

23- Peiman M., Xie, C. 2006. Sensitive detection of potato viruses, PVX, PLRV and PVS, by RT-PCR in potato leaf and tuber. Australasian Plant Disease 1: 41-46.

24- Pourrahim, R., Farzadfar, S., Golnaraghi, A. R. and Ahoonmanesh, A. 2007. Characterization of PVS isolated from potato in Esfahan province. In press. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF397750.1).

25- Wadswarth, G. J., Redibaugh, M. G., and Scandalios, J. G. 1988. A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA Blot Analysis. Analytical Biochemistry 172: 279–283.

26- Wang R. Y., and Ghabrial S. A. 2002. Effect of aphid behavior on efficiency of transmission of soybean mosaic virus by the soybean-cloning aphid, Aphis glycines. Plant Disease 86: 1260-1264.

27- Wisler G. C., Liu H. Y. and Duffus J. E. 1994. Beet necrotic yellow vein virus and its relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. Plant Disease. 78:995–1001.

28- Yazarlou A., Jafarpour B., Falahati Rastegar M and Javadmanesh A. 2008. Molecular detection of potato spindle tuber viroid in Razavi and Northern Khorasan procinces. Pakistan Journal of Biological Sciences 11(12): 1642-1645.