

تعیین دامنه میزبانی، خالص سازی فیزیوشیمیایی و بررسی سرولوژیکی ویروس S سیبزمینی در شمال خراسان

محمد رضا حسین زاده* - بهروز جعفر پور - ماهرخ فلاحتی رستگارا

تاریخ دریافت: ۸۲/۳/۱۳

تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۸

چکیده

در بررسی که به منظور یافتن ویروس S سیبزمینی در مزارع سیبزمینی شمال خراسان صورت گرفت، تعدادی غده بطور انتخابی از چندین مزرعه سیبزمینی در اطراف بجنورد از بوته‌هایی که علائم موزائیک^۱، روگوز^۲، فرورفتگی رگبرگ‌ها، ریزبرگی و تموج حاشیه برگ‌ها را داشتند جمع‌آوری شد. هم‌چنین تعدادی غده نیز بطور تصادفی از مزارع سیبزمینی اطراف شهرهای مشهد، چناران، قوچان، فاروج و شیروان گردآوری گردید. غده‌های جمع‌آوری شده تا سپری شدن دوره خواب در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس در شرایط گلخانه کشت داده شدند. براساس واکنش گیاهان محک افتراقی، تعداد کمی از بوته‌های سیبزمینی به PVS آلودگی نشان داده و عصاره یکی از بوته‌های آلوده در مطالعات دامنه میزبانی گیاهان *Nicotiana debneyi* و *Domin* و *Lycopersicum esculentum* L. cv. early urbana 111 را بطور سیستمیک آلوده نمود. این جدایه بر روی گیاهان *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn و *C. quinoa* Wild علائم موضعی کلروتیک ایجاد نمود ولی در *Datura stramonium* L., *Nicotiana tabacum* L. cv. xanthi, *Petunia hybrida* Vilm, *Gompherena globosa* L. هیچ‌گونه علائمی ایجاد نکرد. ایزوله مورد نظر بعد از خالص‌سازی بیولوژیک روی *C. quinoa* در *N. debneyi* تکثیر داده شد و خالص‌سازی آن طبق روش پیشنهادی (Hammond & Laqwson, 1988) با مقداری تغییرات انجام گرفت. آنگاه در برابر آلوده نسبتاً خالص ویروس، آنتی سرم تهیه گردید. از آزمون‌های نشئت دو طرفه در آگار^۳ و الیزا^۴ جهت تشخیص سرولوژیکی ویروس استفاده شد. بررسی میکروسکوپ الکترونی پیکره‌های رشته‌ای سالم ویروس به ابعاد ۶۲۱×۹ نانومتر را در آلوده نسبتاً خالص نشان داد (۵۷۰۰×). جهت تعیین میزان آلودگی مزارع سیبزمینی اطراف بجنورد مجموعاً ۲۰۰ بوته بطور تصادفی نمونه‌برداری شده و از آزمون DAS-ELISA، جهت تشخیص ویروس استفاده شد. براساس نتایج این آزمون درصد آلودگی به PVS در منطقه بجنورد ۱۵/۵٪ تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: ویروس S سیب زمینی، خالص سازی، آنتی سرم، الایزا، میکروسکوپ الکترونی

مقدمه

انسان است. این محصول در جهان از نظر اهمیت در مقام پنجم و بعد از محصولات نظیر گندم، برنج، ذرت و جو قرار دارد. مبدأ سیب‌زمینی کوهستان‌های آند در آمریکای جنوبی است که در آنجا از دیرباز به عنوان یک محصول مهم غذایی مطرح بوده است (۲ و ۶). حدود ۳۰ بیماری ویروسی سیب‌زمینی شناسایی شده است (۲). ویروس S سیب‌زمینی یکی از متداولترین ویروس‌هایی است که سیب‌زمینی را

سیب‌زمینی یکی از مهمترین گیاهان دو لپه‌ای در تغذیه

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، اساتید گروه پزشکی دانشکده

کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* - نویسنده مسئول

Email: mohhssz@yahoo.com

2 - Mosaic
3 - Rugose
4 - Double diffusion agar
5 - Enzyme-linked immunosorbent assay

عصاره گیاهی^۴ (LIV) در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد ۳-۴ روز می‌باشد. دامنه میزبانی PVS محدود می‌باشد و گونه‌های گیاهی حساس اساساً به گیاهان خانواده‌های Chenopodiaceae و Solanaceae تعلق دارند (۲۲) و سیب‌زمینی تنها میزبان طبیعی آن بشمار می‌رود (۲). این ویروس به روش مکانیکی با تماس برگ‌های گیاهان سالم و آلوده سیب‌زمینی در گلخانه و مزرعه، از طریق غده‌های آلوده، توسط لباس، دست‌ها و چاقوی آلوده منتقل می‌شود. هر چند، مهمترین روش انتقال آلودگی ویروس بوسیله غده‌های بذری است (۲، ۱۵ و ۱۶). نژاد Andean این ویروس (PVS-An) به کمک شته به طریق ناپایا منتقل می‌شود در حالیکه شته‌ها قادر به انتقال نژاد معمولی ویروس (Type-Strain) نمی‌باشد (۱۹). خوشبختانه بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی از طریق بذر حقیقی گیاه منتقل نمی‌شوند (۲). در ایران این ویروس از منطقه اصفهان توسط دانش و همکاران (۱۳۷۱) (۵) و از منطقه مشهد توسط جعفرپور (۱۳۶۸) (۳) گزارش شده است. در این مطالعه ضمن شناسایی مجدد ویروس، تعیین دامنه میزبانی ویروس، خالص‌سازی، تهیه آنتی‌سرم و بررسی‌های سرولوژیکی ویروس انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در اوایل خرداد ماه ۱۳۷۵ در چهار مزرعه از مزارع سیب‌زمینی واقع در اطراف بجنورد که در آنها ارقام دراگا و آلفا کاشته شده بود، تعداد چهل بوته که علائم بیماری ویروسی نظیر موزائیک، روگوز سطح برگ‌ها، فرورفتگی رگبرگ‌ها، ریزبرگی و تموج حاشیه برگ‌ها را نشان می‌دادند تعیین و علامت گذاری شدند. در هنگام برداشت دو غده از هر بوته در پاکت کاغذی قرار داده شد و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل و جهت سپری شدن

ماده ژنتیکی کارلا ویروس‌ها متشکل از یک RNA تک رشته‌ای مثبت به طول ۷-۷/۸ کیلو باز است (۲۰). انتهای ۳' RNA ویروس پلی‌آدنیله (PolyA) می‌باشد و انتهای ۵' ژنوم ویروس فاقد Vpg^۱ است (۱۹). درجه حرارت بی‌اثر شدن TIP^۲ در مدت ۱۰ دقیقه ۵۵-۶۰ درجه سانتیگراد، آخرین حد رقت^۳ (DEP) بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۰۱ و پایداری در

1 - Viral protein linked to genom

2 - Thermal inactivation point.

3 - Dilution end point.

4 - Longivity in vitro

کشیده شد. از هر گیاه محک دو بوته برای این کار در نظر گرفته شد. پنج دقیقه پس از مایه زنی سطح برگ های مایه زنی شده این گیاهان بوسیله آب معمولی شستشو داده شد. آنگاه تاریخ مایه زنی و شماره بوته سیب زمینی برای هر گلدان ثبت و مشخص گردید. مایه زنی ها معمولا در اوقات خنک روز، صبح یا نزدیک غروب آفتاب صورت می گرفت. بوته های مایه زنی شده هر روز مورد بررسی قرار گرفته و زمان ظهور و نوع علائم ثبت می گردید. جهت خالص سازی بیولوژیکی یکی از لکه های موضعی کلروتیک ریز ظاهر شده روی برگ های سلمه *C. quinoa* Wild. با ۳ مرتبه مایه زنی متوالی استفاده گردید. جهت نگهداری جدا شده ویروس از گیاه *N. debneyi* که بطور سیستمیک به این ویروس آلوده می شود استفاده شد.

مطالعه دامنه میزبانی

به منظور بررسی دامنه میزبانی، جدا شده ویروس S سیب زمینی، پس از خالص سازی بیولوژیکی، علاوه بر گیاهان محک افتراقی به گیاهان میزبان دیگری به همان روشی که شرح داده شد، مایه زنی گردید. بوته های مایه زنی شده هر روز مورد بررسی قرار گرفته و زمان ظهور علائم ثبت می گردید.

خالص سازی فیزیوشیمیایی ویروس

خالص سازی جدایه ویروس S سیب زمینی براساس روش لوسون و هاموند با تغییراتی چند صورت گرفت. چهار هفته پس از مایه زنی گیاهچه های *N. debneyi*، ۱۲۵ گرم از برگ هایی که علائم سیستمیک نشان می دادند جمع آوری و بعد از حذف رگبرگ اصلی در مخلوط کن با چهار حجم بافر عصاره گیری (بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار، pH ۸/۲، حاوی ۰/۵ درصد سولفیت سدیم) به مدت ۵ دقیقه کاملا خرد و هموژنیزه گردید. سپس عصاره حاصل از پارچه ململ

به منظور جداسازی ایزوله ویروس، گیاهان محک افتراقی این ویروس در شرایط گلخانه به صورت خزانه در خاک مخلوط شده از خاک زراعی معمولی - خاک برگ پوسیده - ماسه و کود پوسیده دامی به نسبت های ۱:۱:۳:۱ کاشته شد. کلیه گیاهان مورد آزمایش در گلخانه در زمستان در دمای متوسط 15 ± 5 درجه سانتیگراد و در تابستان در دمای 20 ± 8 درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

گیاهان محک افتراقی مورد استفاده شامل *Datura stramonium* L. *Ch. quinoa* Wild, *N. debneyi* Domin و *Ch. amaranticolor* Costa & Reyn بودند. بذور این گیاهان بطور جداگانه در گلدان هایی به قطر ۲۰ سانتیمتر کشت شدند. از آنجا که ویروس S سیب زمینی به راحتی به روش مکانیکی قابل انتقال است، بعد از گذشت یک ماه از کشت غده های آلوده به PVS، زمانی که طول بوته های سیب زمینی به ۱۵-۱۰ سانتیمتر رسید از عصاره برگ های آلوده برای مایه زنی استفاده گردید. برای این منظور ۵-۴ برگ آلوده از بوته ها جمع آوری شد و پس از توزین به نسبت ۱:۴ با بافر مایه زنی (بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار، pH ۸/۲، حاوی ۰/۵ درصد سولفیت سدیم) بطور جداگانه درون هاون چینی عصاره گیری گردید. عصاره های صاف شده بطور جداگانه به کمک انگشت اشاره به آرامی روی سطح برگ گیاهان محک در مرحله ۵-۴ برگی که قبلا با مختصری پودر کاربوراندوم ۳۰۰ مش پوشیده شده بود،

به منظور خارج کردن ساکارز باقیمانده سوسپانسیون بدست آمده داخل لوله‌های دیالیز که قبلاً آماده شده بود، ریخته شد و در حضور بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۸ به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد به کمک همزن مغناطیسی دیالیز گردید.

جهت اسپکتروفتومتری و تعیین غلظت ویروس از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu, uv- 160A, Japan) استفاده شد و میزان جذب در طول موج‌های ۲۲۰-۳۴۰ نانومتر تعیین گردید. بدین ترتیب با تعیین میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر، و در نظر گرفتن میزان دقیق رقیق‌سازی آماده و ضریب خاموشی $EC=3$ (مربوط به ویروس) غلظت ویروس در آماده محاسبه گردید.

تهیه آنتی‌سرم

به منظور انجام آزمون‌های سرولوژیکی در ابتدا آنتی‌سرم ویروس تهیه گردید. برای این منظور ۰/۵ میلی‌لیتر آماده خالص ویروس با ۰/۵ میلی‌لیتر روغن $F.C.A^3$ (Sigma Chemical Co.) به مدت ۲-۳ دقیقه خوب مخلوط شد تا به صورت امولسیون در آید، سپس امولسیون حاصل با سرنگ ۵ میلی‌لیتر در ماهیچه پای خرگوش نیوزیلندی ۳ ماهه تزریق گردید. در مجموع ۳ تزریق به فاصله یک هفته از هم انجام شد. در تزریق‌های دوم و سوم از روغن $F.I.A^4$ استفاده شد.

2 - Infectivity test

3 - Freund's complete adjuvant

4 - Freund's incomplete adjuvant

1 - Supernatant

۴، ۱۳، ۱۷)

آزمون الیزا طبق روش Clark & Adams (۹) انجام گردید. ایمونوگلوبولین G (IgG)، ایمونوگلوبولین G متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (کونژوگه) و شاهد مثبت ویروس از منبع خارجی تأمین گردیدند. این آزمون به روش DAS-ELISA انجام شد (۹). نتایج این آزمون بر اساس تغییر رنگ حفرات از بیرنگ تا زرد مایل به نارنجی به طور چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین عیار آنتی سرم

جهت تعیین عیار آنتی سرم از آزمون نشت دو طرفه در آگار با الگوی خطی استفاده گردید. این الگو متشکل از شش جفت چاهک موازی به قطر ۷ میلی متر با فاصله ۳ میلی متر از هم بود. الگوی مورد نظر در دو عدد پتری یکبار مصرف تهیه گردید و مجموعاً ۱۲ جفت چاهک در نظر گرفته شد. از رقت‌های $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{1024}$ آنتی سرم داخل سرم فیزیولوژیک و سوسپانسیون نسبتاً خالص ویروس با غلظت $2/5 \text{ mg/ml}$ به عنوان آنتی ژن استفاده گردید.

تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی از پیکره‌های ویروس

برای این منظور از سوسپانسیون نسبتاً خالص ویروس استفاده شد. پولکک مشبک (گرید^۱) پوشش داده شده با کربن و ۰/۳۵ فرموار مورد استفاده قرار گرفت. آماده نسبتاً خالص ویروس با اورانیل استات یک درصد رنگ آمیزی و سپس با میکروسکوپ الکترونی نوع TEM (Philips 301, Netherlands) و با بزرگ‌نمایی $57000 \times$ در بخش ویروس‌شناسی مؤسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی توسط آقای دکتر شهرآئین عکس میکروسکوپ الکترونی تهیه شد.

دو هفته بعد از آخرین تزریق از قلب حیوان خونگیری به عمل آمد. خون گرفته شده به مدت ۶۰ - ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد سپس بوسیله یک میله شیشه‌ای باریک لخته حاصل از دیواره لوله جدا و برای یک شب در یخچال نگهداری شد. آنگاه سرم رویی به آرامی برداشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از این مرحله ۰/۰۲ درصد آزید سدیم به آن اضافه شده و آنتی سرم تهیه شده در لوله‌های اپندروف به فریزر انتقال یافت. لازم به ذکر است که یک هفته قبل از شروع تزریقات از رگ پای خرگوش مقداری خون گرفته شد و سرم آن به طریق فوق جدا شد تا از آن به عنوان سرم نرمال در آزمایشات سرولوژیکی استفاده شود (۳، ۷، ۱۱ و ۲۳).

جهت انجام آزمایشهای سرولوژیکی ابتدا آنتی سرم مورد استفاده با عصاره گیاه سالم *N. debneyi* به منظور جذب آنتی سرمهای میزبانی و ارتقاء خلوص آن تیمار گردید.

آزمونهای سرولوژیکی

از آزمایشهای سرولوژیکی نشت دو طرفه در آگار و الیزا برای شناسایی ویروس استفاده گردید. جهت انجام آزمون نشت دو طرفه در آگار مقادیر ۰/۸ گرم آگارز، ۰/۲ گرم نیترات سدیم و ۰/۸ گرم NaCl با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر ۱۰۰ درجه سانتیگراد کم کم مخلوط و به کمک حرارت کاملاً حل گردید و پس از اضافه کردن آزید سدیم به میزان ۰/۲ گرمای در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتیگراد، ژل مذاب به داخل پترهای یکبار مصرف به قطر ۷/۵ سانتی متر به میزان ۱۲ میلی لیتر به ازاء هر پتری ریخته شد. از الگوی دایره‌ای متشکل از ۶ چاهک کناری و یک چاهک مرکزی به قطر ۷ میلی لیتر استفاده گردید. بعد از افزودن آنتی ژن به چاهک‌های کناری و آنتی سرم به چاهکهای مرکزی و قرار دادن آنها در محفظه مرطوب بعد از ۷۲-۱۶ ساعت ارزیابی نتایج با توجه به واکنش‌های انجام شده صورت گرفت (۱)،

نتایج و بحث

بررسی اتیولوژیکی بیماری: برای شناسایی ویروس S سیب زمینی در مرحله اول از نوع علائم و واکنش گیاهان محک افتراقی ویروس استفاده گردید. واکنش گیاهان محک افتراقی پس از مایه زنی به وسیله عصاره یکی از بوته های سیب زمینی دارای علائم ویروس کشت شده در گلخانه به شرح زیر می باشد:

- سلمه قرمز *Ch. amaranticolor*: ۱۲ روز بعد از مایه زنی لکه های موضعی کلروتیک به قطر یک میلی متر ظاهر گردید (شکل ۱)

- سلمه تره *Ch. quinoa*: ۵ روز بعد از مایه زنی لکه های موضعی کلروتیک به قطر ۲-۳ میلی متر ظاهر گردید (شکل ۲)

- توتون *N. debneyi*: ۱۲ روز پس از مایه زنی ابتدا علائم روشن رگبرگها و سپس بعد از ۲-۳ روز علائم تورم

سطح برگها و موزائیک ابلقی ظاهر گردید (شکل ۳)

- تاتوره *D. stramonium*: هیچگونه علائمی ظاهر نشد. با تلقیح برگشتی عصاره برگ تاتوره بر روی سلمه تره و سلمه قرمز نیز هیچگونه علائمی بروز نکرد. عدم آلودگی تاتوره مؤید وجود ویروس S سیب زمینی در عصاره برگ سیب زمینی آلوده بود. با بررسی نوع علائم ظاهر شده در این چهار میزبان افتراقی، بوته سیب زمینی آلوده به PVS تشخیص داده شد.

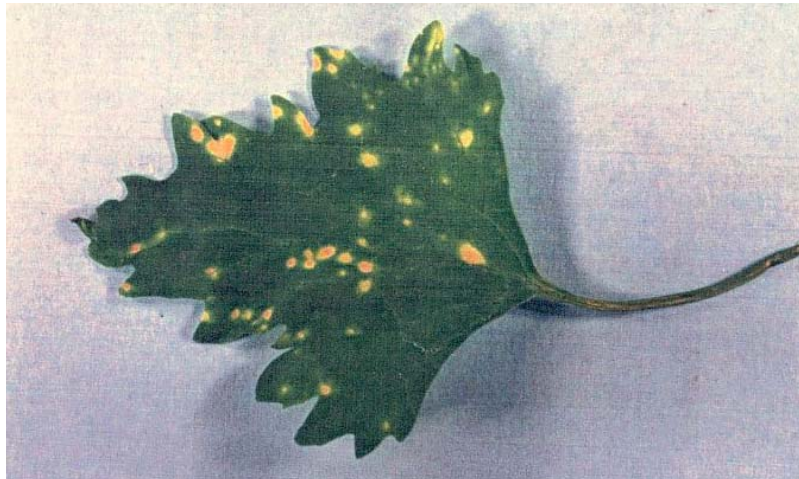
مطالعه دامنه میزبانی

نوع واکنش سایر میزبانهای این ویروس به شرح زیر مشاهده گردید:

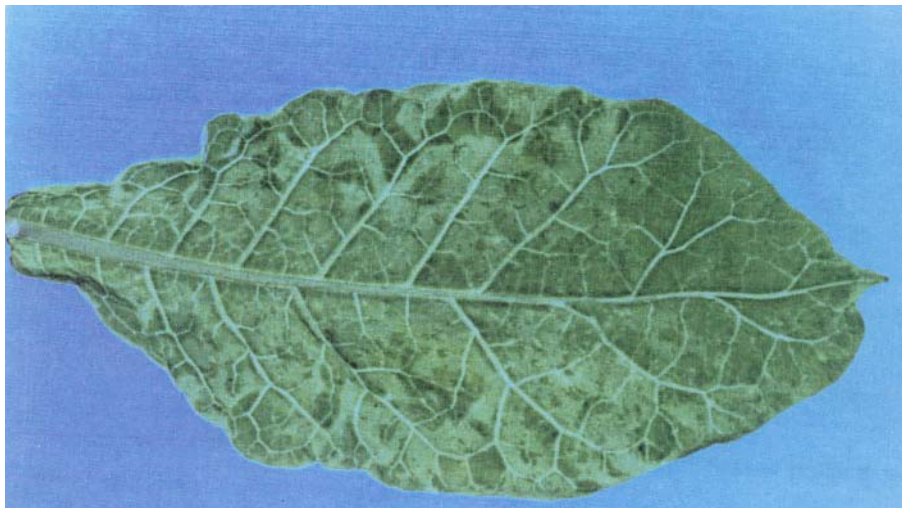
- توتون *N. tabacum* L. cv. Xanthi: هیچگونه علائمی ظاهر نشد.



(شکل ۱) لکه های موضعی کلروتیک روی برگهای *Ch. amaranticolor* مایه زنی شده با جدا شده بجنورد

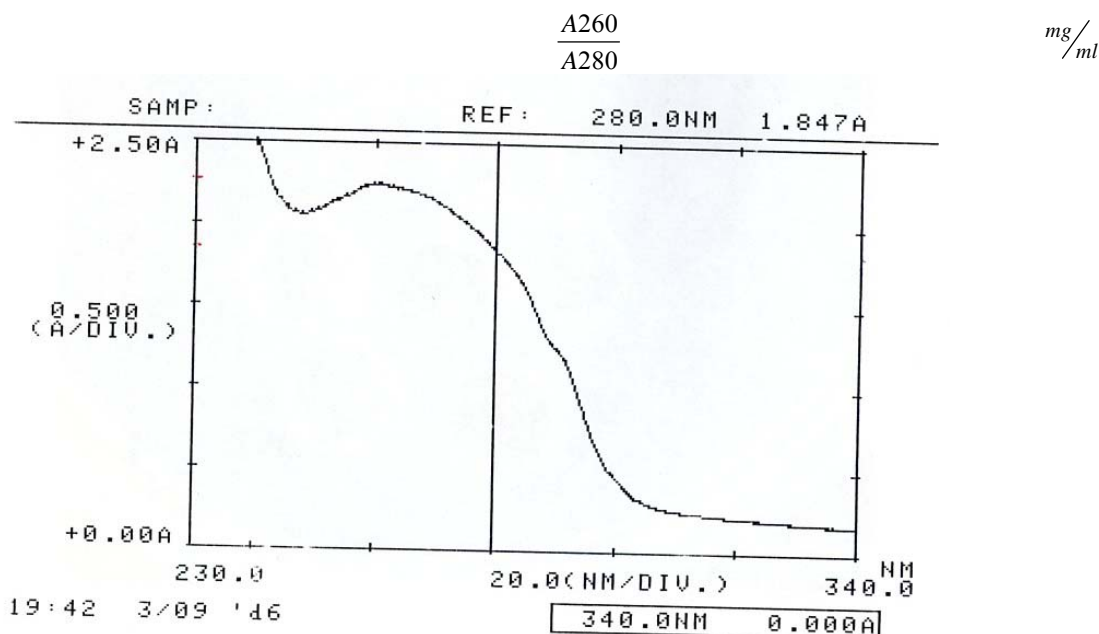


(شکل ۲) لکه های موضعی کلروتیک روی برگهای *Ch. quinoa* مایه زنی شده با جدا شده بجنورد



(شکل ۳) علائم موزائیک ابلقی و روشن شدن رگبرگهای *Nicotiana debneyi* مایه زنی شده با جدا شده بجنورد

- ظاهر نشد.
- عوامل مختلفی نظیر رقم میزبان، تیپ بیماریزای عامل بیماری، شرایط محیطی و نژاد ویروس در بروز علائم دخیل هستند. نوع واکنش گیاهان در مطالعات دامنه میزبانی با نتایج تحقیقات محققان مختلف مطابقت دارد (۲۲ و ۱۰).
- خالص سازی فیزیکو - شیمیایی ویروس بعد از انجام آخرین دور سانتریفوژ افتراقی، سوسپانسیون کدوری از ویرس نسبتاً خالص بدست آمد. نتیجه مایه زنی آموده نسبتاً خالص شده PVS روی *C. quinoa* بیانگر حفظ قدرت آلودگی عامل بیماری تا آخرین مرحله خالص سازی فیزیکی بود زیرا
- گل تکمه ای *Gomphrena globosa* L.: هیچگونه علائمی ظاهر نشد.
- گوجه فرنگی *Lycopersicon esculentum* L. cv. Early arbana III: ۱۴ روز پس از مایه زنی علائم موزائیک ابلقی ظاهر گردید.
- لوبیا *Phaseolus vulgaris* L. var. red kidney: هیچگونه علائمی ظاهر نشد.
- اطلسی *Petunia hybrida* Vilm.: هیچگونه علائمی ظاهر نشد.
- فلفل *Capsicum frutescens* L.: هیچگونه علائمی



(شکل ۴) منحنی مربوط به طیف جذبی سوسپانسیون ویروس بین طول موج های ۲۳۰ - ۳۴۰ نانومتر

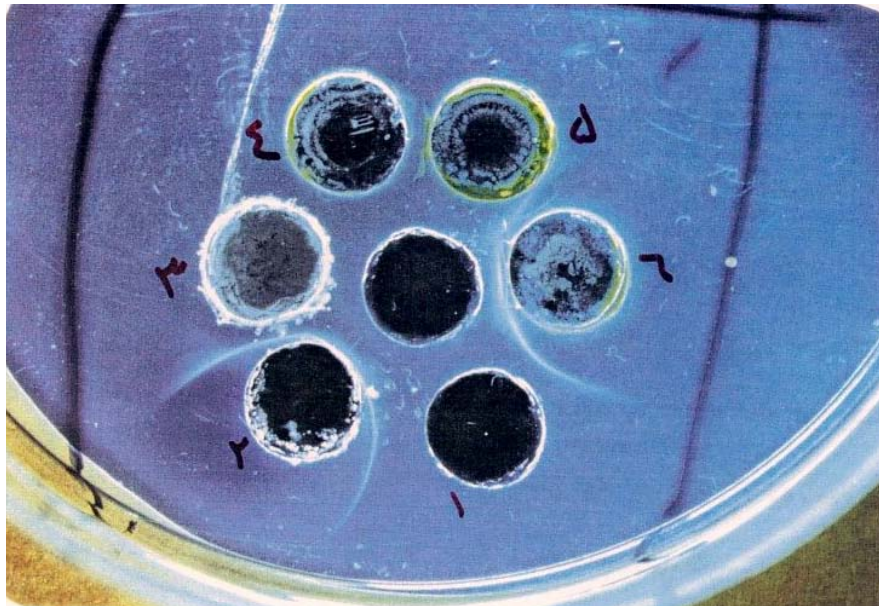
سرولوژی

آنتی سرم تیمار نشده اولیه در آزمون نشت دو طرفه در آگار با عصاره گیاه آلوده *N. debneyi* و همچنین سوسپانسیون نسبتاً خالص ویروس واکنش مثبت نشان داد. در حالیکه با عصاره سالم گیاهان *C. quinoa*، *N. debneyi* هم چنین با فرهای عصاره گیری و رقیق سازی ویروس هیچگونه واکنشی نشان نداد. همین نتایج با آنتی سرم تیمار شده با عصاره گیاه سالم *N. debneyi* نیز بدست آمد. سرم نرمال با هیچکدام از نمونه ها واکنش نشان نداد (شکل ۵). نتایج آزمون الیزا بطور چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون حفرات محتوی ویروس بعد از اضافه نمودن سوبستره آنزیم آلکالین فسفاتاز به رنگ زرد تغییر رنگ می دهند. با استفاده از این آزمون پراکنش ویروس در منطقه

بجنورد تعیین گردید. از ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده ۳۱ نمونه (۱۵/۵٪) به PVS آلودگی داشتند. این ویروس نسبت به سایر ویروسهای سیب زمینی شیوع کمتری دارد و یکی از دلایل آن عدم انتقال آن با شته می باشد.

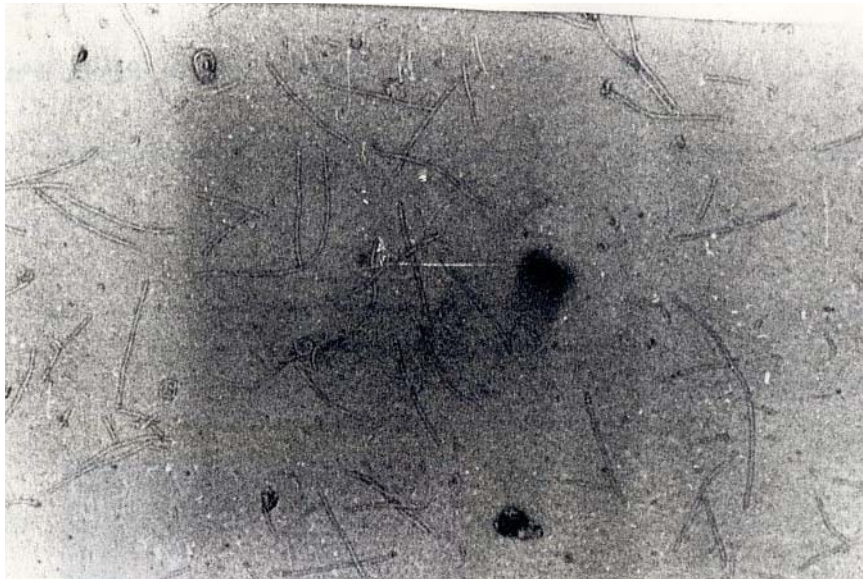
تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی از پیکره های ویروس

عکس میکروسکوپ الکترونی پیکره های سالم ویروس را به ابعاد ۹×۶۲۱ نانو متر نشان داد (شکل ۶). اندازه ابعاد ویروس با گزارشهای محققان مختلف (۱۴، ۱۷، ۲۲ و ۱۸) کاملاً مطابقت دارد. تعداد زیادی از پیکره های ویروس دچار شکستگی شده و اندازه آنها کمتر از ابعاد واقعی است.



(شکل ۵) آزمون نشئت دوطرفه در آگار:

- ۱- بافر رقیق سازی ۲- آماده نسبتا خالص ویروس ۳- بافر عصاره گیری
۴- عصاره گیاه سالم *N. debneyi* ۵- عصاره گیاه آلوده *N. debneyi*



شکل ۶. عکس میکروسکوپ الکترونی از پیکره های ویروس (بزرگنمایی $\times 57000$)

تشکر و قدردانی:

S.M.Paul دکتر استرالیای جنوبی، CSIRO آدلاید، هندوستان
Khurana از مرکز تحقیقات سیب زمینی، شیملا، هندوستان
بخاطر ارسال بروز گیاهان محک صمیمانه سپاسگزاری
می نمایند.

نگارندگان از پروفیسور Sven Erik Albrechtsen از
مؤسسه بیماری شناسی بذر کشورهای در حال توسعه،
کوپنهاگ، دانمارک، دکتر نورالدین هایلی از مؤسسه

هم‌چنین از جناب آقای دکتر نوح شهرآئین، بخش
ویروس‌شناسی مؤسسه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی
و بخاطر تهیه عکس میکروسکوپ الکترونی از پیکره‌های
ویروس سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- ۱-جعفرپور، ب. ۱۳۷۰. روش‌های تشخیص ویروس‌های گیاهی. تألیف هیل. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۲۰۷ص.
- ۲-جعفرپور، ب. ۱۳۷۰. بیماری‌های سیب‌زمینی، تألیف ریچ، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ص ۲۸۳.
- ۳-جعفرپور، ب. ۱۳۶۸. شناسایی ویروس‌های S و X سیب‌زمینی در مشهد. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۱۶۶.
- ۴-حسینی مهربان، ا. ۱۳۷۶. بررسی موزائیک کاهو و تعیین پراکنش آن در منطقه مشهد، پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۸۶.
- ۵-دانش، د. سلیمانان، ص. فیلسوف، ف. و دهقان، م. ۱۳۷۱. فراوانی چهار ویروس بیماری‌زای سیب‌زمینی در مزرعه آزمایشی فریدن اصفهان، بیماری‌های گیاهی، جلد بیست و هشتم. ۱-۹ ص.
- ۶-رضایی، ع. و سلطانی، ا. ۱۳۷۵. زراعت سیب‌زمینی، تألیف بوکا، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱۷۹ص
- ۷-طیبی، د. ۱۳۷۶. شناسایی آلرژن‌های موجود در گرده زعفران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ص ۱۲۰.
8. Brandes, J., Wetter, C., Bagnall, R.H., and Larson, R.H. 1959. Size and shape of the particles of Potato virus S, Potato virus M. and Carnation latent virus. *Phytopathology* 49: 443-446 P.
9. Clark, M.F., and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme - linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. G. Virol.* 34: 475- 483 P.
10. De Bokx, J. A. 1970. Reactions of various plant species to inoculation with potato virus S. *Neth. J. Pl. Path.* 76: 70-78 P.
11. Foster, G.D. and Mills, P. R. 1990. Evidence for the role of subgenomic RNA in the production of Potato virus S coat protein during in vitro translation. *J. G. virol.* 71: 1247 – 1249 p.
12. Franc, G.D., and Bantari, E.E. 1984. The transmission of Potato virus S by The cutting knife and retention time of infectious PVS on common surfaces. *American Potato Journal* 61: 253 – 260P.
13. Hampton, R., Ball, E., and Deboer, S. 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens.
14. A laboratory Manual. The APS Press. 389 PP.
15. Hooker, W. J. 1983. Compendium of Potato diseases. The APS press 125 PP.
16. Khalil, E. 1982. Detection and spread of potato virus S. (Abstract). *DAI- B 42/ 108*, P.3052.
17. Khurana, S.M.P. 1985. Potato viruses and virus - like diseases, detection, diagnosis, identification and Characterization. 189- 221p. In: B.M. Gpta, B.P. Singh, H.N. Verma, and K.M. Strivastava (Eds). *Perspectives in Plant virology*. Vol. I. Print House (India).
18. Kiratiya- angul, K., Waimala, P., and Deema, N. 1992. Purification and antiserum production of potato virus S (PVS) *SAPPRAD* 1:246-248 P
19. Mackenzie, D.j., Tremaine, J.H., and Stace- Smith, R. 1989. Organization and interviral homologies of the 3- terminal portion of potato virus S. RNA. *J. G. Virol.* 70:1053-1063 p.
20. Monis, J. and Dezoeten, G.A. 1990. Characterization and translation studies of potato virus S RNA. *Phytopathology* 80: 441- 445 p.
21. Monis, J., and De Zoeten, G. A. 1990. Molecular cloning and physical mapping of potato virus S complementary DNA. *Phytopathology* 80: 446 – 450 P.
22. Morelli, J.K., and Vayda, M.E. 1996. Mechanical wounding of Potato tubers induce replication of potato virus. s. (Abstract). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 33- 47 P.

23. Wetter, C. 1971. Potato viruses. S.C.M.I/ A.A.B Descriptions of plant viruses 241 – 243 P.
24. Wright, N.S. 1981. A Strategy for PVX and PVS control on seed farms. (Abs). American Potato Journal 58: 525 P.

Host- range studies ,physicochemical purification and serology of potato virus S (PVS) in Northern Khorasan Province.

H.R.Hosseinzadeh*-B.Jafarpour-M.Falahati Rastegar¹

Abstract

During a survey for detection of PVS in potato fields in Northern Khorasan province, some tubers from the plants which have been already marked and showing mosaic, rugosity, undulation on leaf margins, little leaf and slightly vein deepening, were collected in Bodjnurd region, Also, some tubers from potato fields of Mashhad, Chenaran, Ghoochan, Faruj and Shirvan regions were randomly collected. These tubers maintained in 4⁰C until their dormancy broken, and then grown at greenhouse conditions. On the base of reaction of differential hosts a few plants have been infected with PVS. In host range studies infected sap from one of potato plants, infected *Nicotiana debneyi* Domin. and *Lycopersicon esculentum* L.cv. early urbana 111 Systematically, It also developed chlorotic local lesions on *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn. And *C. quinoa* Wild as well, but *Datura stramonium* L., *Phaseolus vulgaris* L. var. red kidney. and *Capsicum frutescens* L. did not show any symptoms in this study. The virus indentified as PVS on the basis of differential host reactions. The isolate was propagated on *N. debneyi* and purification was carried out according to Hammond & Lawson procedure (1988) with some modification. The antiserum was provided against partially purified virus. Serological tests including double diffusion in agar and ELISA were performed. Electron microscopy showed intact filamentous particle of virus measuring 629 nm (57000x). To determine infection percent of PVS in Bodjnurd region, 200 plants were randomly collected and ELISA tests have been used. The results showed the infection rate of 15.5 percent in Bodjnurd region.

Key words: potato Virus S , purification, Antiserum ELISA, Electron microscopy.

* - Corresponding author Email: mohhssz@yahoo.com

1- Contribution from College of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad