مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۱۶-۹

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p.9-16

شناسایی و تعیین پراکنش ویروس A سیب زمینی در استانهای خراسان شمالی و رضوی با استفاده از آزمونهای سرولوژیکی و مولکولی

مریم سادات نقیب زاده[1*] - بهروز جعفرپور[2] - ماهرخ فلاحتی رستگار[3]

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۲
تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۰/۲۲

چکیده

به منظور شناسایی این ویروس در بهار و تابستان ۱۳۸۴ ازمناطق عمده سیب‌زمینی‌کاری استانهای خراسان شمالی و رضوی نمونه برداری صورت گرفت . نمونه های برگی که علائم موزائیک خفیف، پیچیدگی و براق‌شدن برگها را نشان می دادند، جمع آوری شده و در محفظه یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. تعدادی غده نیز جمع‌آوری گردید که بعد از گذراندن دوره خواب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سردخانه، در پاکتهای کاغذی در محیط آزمایشگاه جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. آلودگی نمونه‌های فوق با استفاده از آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA و آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن پروتئین پوششی (CP) در واکنش RT-PCR انجام گردید. استخراج RNA از نمونه‌های آلوده با استفاده از روش رسوب با PEG_{6000} انجام گردید و به دنبال آن آزمون RT جهت ساخت cDNA و پس از آن آزمون PCR انجام شد. الکتروفورز محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد، قطعه تکثیر شده bp ۱۱۰۰ مربوط به ژن کامل CP را در تمام نمونه‌های مورد آزمایش نشان داد. وجود ناحیه تکثیر شده مزبور در نمونه‌های آلوده نشان از آلودگی به PVA در مناطق بررسی‌شده دارد. تعیین دامنه میزبانی ویروس نیز در شرایط گلخانه بر روی سه گونه گیاهی شامل توتون (*Nicotiana abacum* var *samsun*)، توتون (*Nicotiana tabacum* var *Turkish*)، گوجه‌فرنگی (*Lycopersicum esculentum*) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین پراکنش این ویروس نمونه برداری تصادفی از مزارع حومه شهرستانهای مشهد، چناران ،قوچان، شیروان، بجنورد، فاروج، تربت حیدریه، تربت جام، فریمان، کاشمر، اسفراین و نیشابور به عمل آمد و سپس با استفاده از آزمون DAS-ELISA میزان پراکنش این ویروس در مناطق ذکر شده بررسی گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که مزارع حومه کاشمر آلوده به این ویروس می باشند و در مزارع سایر شهرستانها آلودگی مشاهده نگردید. این اولین گزارش از وجود ویروس A سیب زمینی در استانهای خراسان شمالی و رضوی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : ویروس A سیب‌زمینی، شناسایی، دامنه میزبانی، DAS-ELISA، RT-PCR

مقدمه

ویروس A سیب‌زمینی (PVA) اولین بار در سال ۱۹۳۲ توسط Murphy وMckay گزارش شد. میزبان اصلی آن سیب‌زمینی می باشد اما می‌تواند دیگر گونه‌های سولاناسه را نیز آلوده کند (۳). این بیماری در سال ۱۳۴۵ توسط کریمی از ایران گزارش شده است و در اروپا و آمریکای شمالی انتشار گسترده‌ای دارد. PVA یکی از اعضای جنس *Potyvirus* است و دارای ذرات میله‌ای خمش‌پذیر به طول ۷۳۰ و قطر ۱۵ نانومتر و ژنوم آن یک مولکول RNA خطی تک لا مثبت (ssRNA +) می‌باشد (۱). این ویروس اسامی مترادف زیادی مانند Potato virus P وPotato mild mosaic virus دارد. دمای بی اثرشدن ویروس ۵۲-۴۲ درجه سانتی گراد، آخرین حد رقت 10^{-1}، و پایداری در شرایط آزمایشگاه ۱۸-۱۲ ساعت است (۷). علائم آن روی برگها شامل موزائیک خفیف و پیچیدگی مختصر برگهای آلوده می‌باشد.حاشیه برگچه‌ها ممکن است موجدار شود و برگهای آلوده به طور کلی در نور آفتاب براق به نظر می‌رسند (۸). علائم روی غده به صورت مختصر کاهشی در اندازه‌ی آنها می باشد. شدت ظهور علائم بیشتر به شرایط آب و هوایی، رقم سیب‌زمینی و نژاد ویروس بستگی دارد (۴،۲). از گونه‌های *Lycopersicum* spp، *Datura* spp، *Nicotiana* spp در تشخیص این ویروس استفاده می شود. میزبان تکثیری ویروس *N.tabacum* cv .*samsun* می‌باشد. انتقال ویروس از طریق غده‌ها و همچنین به وسیله عصاره گیاهی و شته ها می‌باشد (۳). کاشت غده‌های بذری عاری از PVA، کندن و از بین بردن

۱- مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان
(* - نویسنده مسئول: Email: maryam _ naghib2003@yahoo.com)
۲ و ۳- اساتید گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

گیاهان آلوده به محض تشخیص آنها در مزرعه و کنترل شته‌ها از جمله راه‌های کنترل این ویروس می باشد. (۶). با توجه به سطح زیر کشت سیب‌زمینی و با اهمیت‌بودن این محصول در استان خراسان انجام پژوهشی جامع به منظور شناسایی و تعیین پراکنش این ویروس در استان خراسان و همچنین ارائه روش‌های پیشگیری بر اساس تعیین وضعیت آلودگی در نواحی مختلف استان لازم بود.

(جدول۱)- نحوه کاشت گیاهان محک ،مرحله مایه زنی وسن نشاء

گیاه محک	نام فارسی	نحوه کاشت	سن نشاء	مرحله مایه زنی
Nicotiana abacum var *samsun*	توتون	نشاء	۴-۳ برگی	۶-۵ برگی
Nicotiana tabacum var *turkish*	توتون	نشاء	۴-۳ برگی	۶-۵ برگی
Lycopersicum esculentum	گوجه‌فرنگی	نشاء	۶-۵ برگی	۸-۷ برگی

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها- به منظور شناسایی ویروس A سیب زمینی در تابستان و پاییز۱۳۸۴ نمونه‌برداری از مزارع مشهد، چناران، قوچان،شیروان، بجنورد، تربت‌حیدریه، تربت‌جام، فریمان، کاشمر، اسفراین و نیشابور به عمل آمد. نمونه‌برداری به صورت کاملاً انتخابی و از گیاهانی که دارای علایم مشکوک به ویروس A سیب‌زمینی شامل موزائیک خفیف، پیچیدگی مختصر برگهای آلوده و براق شدن آنها بودند، انجام شد. نمونه‌های مورد نظر جهت انجام آزمون سرولوژیکی الایزا و آزمون RT-PCR به آزمایشگاه منتقل گردیدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی و تعیین پراکنش ویروس A سیب‌زمینی- جهت ردیابی ویروس در نمونه‌های جمع آوری شده از آزمون الایزا استفاده گردید. جهت تعیین پراکنش ویروس در مناطق مورد بررسی از روش مشاهده علایم و برآورد تخمینی استفاده گردید. به این منظور به طور تصادفی، قسمتهای مختلف مزرعه مورد مشاهده قرار گرفته و درصد گیاهان آلوده به PVA نسبت به کل نمونه‌ها با استفاده از آزمون الایزا محاسبه گردید.

بررسی دامنه میزبانی ویروس در شرایط گلخانه- جهت بررسی دامنه میزبانی ویروس در شرایط گلخانه، از روش مایه‌زنی ویروس به روش انتقال مکانیکی به سه گونه گیاهی (جدول ۱) استفاده گردید. برای این منظور از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH= ۷/۴ شامل KH_2PO_4 و K_2HPO_4 و ۱ درصد (نسبت وزن به حجم) پودر کربوراندوم ۶۰۰ مش استفاده گردید. مشاهدات دقیق جهت بررسی علایم و تغییرات ایجاد شده در گیاهان مورد بررسی انجام گرفت. جهت تأیید دامنه میزبانی ویروس، کلیه گیاهان مایه‌زنی شده توسط آزمون الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند (۹،۱۲).

تکثیر و نگهداری ویروس- به منظور تکثیر و نگهداری ویروس از گیاه تکثیری مناسب ویروس، توتون(*Nicotiana tabacum* var *samsun*) استفاده گردید. به منظور نگهداری دراز مدت جدایه‌های ویروس از روش خشک نمودن برگها با استفاده از خلأ و سرما استفاده گردید. ابتدا برگها به قطعات کوچک تقسیم شدند، سپس این قطعات در لوله‌های آزمایشی که از قبل تمیز و اتوکلاو شده بودند، منتقل گردید و توسط دستگاه فریز درایر (Freeze dryer) به مدت ۱۲ ساعت خشک شدند. لوله ها قبل از آزمایش های مربوطه در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و ذخیره گردید.

آزمون الایزا- جهت آزمون الایزا از آنتی‌سرمهای اهدایی، مؤسسه DSMZ آلمان، موسسه SASA در کشور اسکاتلند و مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی در کشور پرو استفاده شد. رقت آنتی‌سرم و کانجوگیت مورد استفاده جهت آزمون الایزا در این تحقیق به ترتیب برابر با ۱:۱۰۰۰ و ۱:۴۰۰۰بود. آزمون داس الایزا مطابق با روش Clark and Adams انجام شد (۵).

استخراج RNA- برای استخراج RNA کل از روش رسوب ریز با PEG_{6000} استفاده گردید (۱۰). به منظور استخراج، ابتدا ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بافت تازه برگ را با ازت مایع به صورت پودر درآورده و با ۲ حجم فنل و ۲ حجم بافر TNE (pH ۷/۵، ۱۰۰mM Tris/HCl، ۱۰ mM EDTA، ۲٪ SDS، ۲٪ ۲-Mercaptoethanol) کاملاً مخلوط نموده و در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد. به مایع رویی یک حجم فنل و یک حجم کلروفرم اضافه نموده و عمل سانتریفوژ تکرار شد. به فاز رویی حاصل از این مرحله دو حجم کلروفرم اضافه نموده و پس از سانتریفوژ، مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل گردید. ۱۰۰ میکرولیتر فاز مایع رویی با ۱۵/۰۹ میکرولیتر PEG_{6000} ۵۰٪ و ۱۰/۶۹ میکرولیتر NaCl ۵ مولار کاملاً مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در یخ نگهداری شد. پس از سانتریفوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm، رسوب حاصل با ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. این مرحله با حجم ۱۰۰ میکرولیتر اتانول تکرار شد. به منظور از بین رفتن فنل رسوب حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. رسوب حاصل در ۲۰ میکرولیتر بافر TE حل و جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. ضمناً به منظور تعیین کیفیت آر.ان.آی های کل استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ استفاده گردید.

واکنش RT-PCR- برای انجام این واکنش از آغازگرهای ارسالی توسط دکتر Jim Crosslin از آمریکا که برای تکثیر ژن

پروتئین پوششی (CP) ویروس، طراحی شده بود استفاده شد. توالی این آغازگرها به صورت زیر هستند:

Forward: 5´ccc-tga-cag-ttg-aaa-cat-aa 3´
Reverse: 5´gta-ctg-aac-tgg-aaa-agt-act 3´

سنتز cDNA از RNA ویروس (مرحله نسخه‌برداری معکوس)- به منظور سنتز cDNA طبق دستورالعمل شرکت Fermentas عمل شد. ابتدا ۲ میکرولیتر RNA الگو با ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse مخلوط گردید و با آب مقطر تزریقاتی استریل حجم محلول به ۱۳ میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوب حاوی مواد فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار گرفت و سپس به منظور خنک‌شدن بر روی یخ قرار داده شد. متعاقباً ۴ میکرولیتر 5x reaction buffer و۲ میکرولیتر 10 mM dNTPmix به آن اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. مقدار ۲۰۰ واحد آنزیم RT معادل یک میکرولیتر به میکروتیوب اضافه و سپس میکروتیوب در دستگاه ترموسایکلر (شرکت آلمانی Biometra) با برنامهٔ حرارتی ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و درجهٔ حرارت ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به منظور توقف واکنش و درجهٔ نهایی ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به منظور خنک‌شدن قرار داده شد. cDNA حاصل سپس دردمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری و ذخیره گردید (۱۱).

تکثیر با واکنش زنجیره ای پلیمراز – پس از اضافه نمودن مواد مورد نیاز برای واکنش (۳ میکرولیتر cDNA، ۰/۲۵ میکرولیتر *Taq* polymerase، ۱ میکرولیتر آغازگر Reverse، ۱ میکرولیتر آغازگر Forward ، ۱/۲۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر 10 mM dNTPmix، ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR Buffer، ۱۵/۵میکرولیتر آب دیونیزه استریل)، در میکروتیوب، در دستگاه ترموسایکلر با برنامهٔ حرارتی زیر قرار داده شد: ۴ دقیقه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل، (۱ دقیقه در ۹۲ درجهٔ سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۶۲ درجهٔ سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد)، ۶ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد. فرآوردهٔ حاصل از PCR در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

الکتروفورز افقی فرآورده‌های PCR- جهت انجام الکتروفورز افقی، از ژل آگاروز ۱/۵ درصد و بافر 1x TBE (Tris Boric acid EDTA) استفاده گردید. مقدار فرآوردهٔ تزریق‌شده در هر چاهک ۸ µl و مقدار بافر بارگذاری در هر چاهک ۲ µl بود. نشانگر اندازه DNA به عنوان وزن مولکولی استاندارد و به میزان۲ µl در چاهک مربوطه تزریق شد. عمل الکتروفورز با شدت جریان ثابت و اختلاف پتانسیل ثابت ۷۵ ولت، به مدت ۲ ساعت انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید از آن عکس تهیه شد.

نتایج

شناسایی و تعیین پراکنش ویروس A سیب‌زمینی – نتایج این تحقیق، وجود ویروس A سیب‌زمینی را در استانهای خراسان شمالی و رضوی مورد تأیید قرار می‌دهد. نمونه‌های آلوده که با روشهای انجام شده در این تحقیق شناسایی شدند متعلق به منطقه کوه‌سرخ کاشمر بود. در سایر مناطق نمونه‌برداری شده، نمونه‌های مورد آزمایش، آلودگی به ویروس A سیب‌زمینی را نشان ندادند (جدول ۲). گیاهان آلوده حاصل از غده‌ها در گلخانه و نمونه‌های برگی آلوده عموماً دارای علایم موزائیک، پیچیدگی مختصر، موجدار شدن و لوله شدن حاشیه برگها و براق شدن آنها بوده است (شکلهای ۱و ۲).

(شکل ۱)- علائم موزاییک بر روی برگهای سیب‌زمینی حاصل از غده‌های آلوده به PVA کشت شده در گلخانه

(شکل ۲)- علائم موزاییک خفیف در برگهای آلوده سیب‌زمینی به PVA در مزرعه

(جدول۲)- نتایج شناسایی ویروس A سیب‌زمینی در مناطق مختلف استانهای خراسان شمالی و رضوی

شهرستان	مناطق نمونه‌برداری	وجود آلودگی	تعداد نمونه‌های مورد بررسی	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد آلودگی
مشهد	حومه	-	۵۰	۰	۰
	شاندیز	-			
چناران	حومه	-	۵۰	۰	۰
	روستای سرآسیاب	-			
	روستای نصرآباد	-			
	روستای حکیم آباد	-			
قوچان	حومه	-	۵۰	۰	۰
	روستای شغل‌آباد	-			
	روستای یوسف‌آباد	-			
شیروان	حومه	-	۱۰۰	۰	۰
	روستای اکبرآباد	-			
بجنورد	حومه	--	۵۰	۰	۰
تربت حیدریه	جلگه رخ	-	۱۵۰	۰	۰
	رباط سفید	-			
	روستای سرهنگ	-			
	روستای فتح‌آباد	-			
	روستای فدیهه	-			
تربت جام	روستای کاریز نو	-	۹۰	۰	۰
	روستای ابدال‌آباد	-			
فریمان	حومه	-	۹۰	۰	۰
	روستای فرهادگرد	-			
کاشمر	کوه‌سرخ	+	۶۰	۳۰	۵۰
	روستای تولا	-			
	روستای تک‌بانو	-			
اسفراین	حومه	-	۵۰	۰	۰
نیشابور	ده‌سرخ	-	۳۰	۰	۰
	شریف‌آباد	-			
	قاسم‌آباد	-			
	نظرآباد	-			
	امین‌آباد	-			
	گنبددراز	-			

واکنش گیاهان مورد بررسی در برابر مایه‌زنی ویروس A سیب‌زمینی

۱- توتون (*Nicotiana tabacum* var *samsun*)

بعد از ۱۸ تا ۲۰ روز از مایه زنی ویروس، علایم به صورت روشن شدن رگبرگها ظاهر شد و علایم دیگری مشاهده نشد (شکل۳).

۲- توتون (*Nicotiana tabacum* var *turkish*)

پس از حدود ۲ هفته از مایه زنی ویروس، علایم به صورت موزاییک و لکه های پراکنده در روی برگها ظاهر شد (شکل۴).

۳- گوجه فرنگی (*Lycopersicum esculentum*)

پس از ۲۰ تا ۳۰ روز از مایه زنی ویروس، علایم به صورت موزاییک و لکه های پراکنده در روی برگها ظاهر شد (شکل ۵)

(شکل ۳)- روشن شدن رگبرگها در توتون *Nicotiana tabacum* var *samsun* بر اثر مایه زنی با ویروس A سیب زمینی

(شکل ٤)- موزاییک و لکه‌های پراکنده در توتون *Nicotiana tabacum* var *turkish* بر اثر مایه زنی به ویروس A سیب زمینی

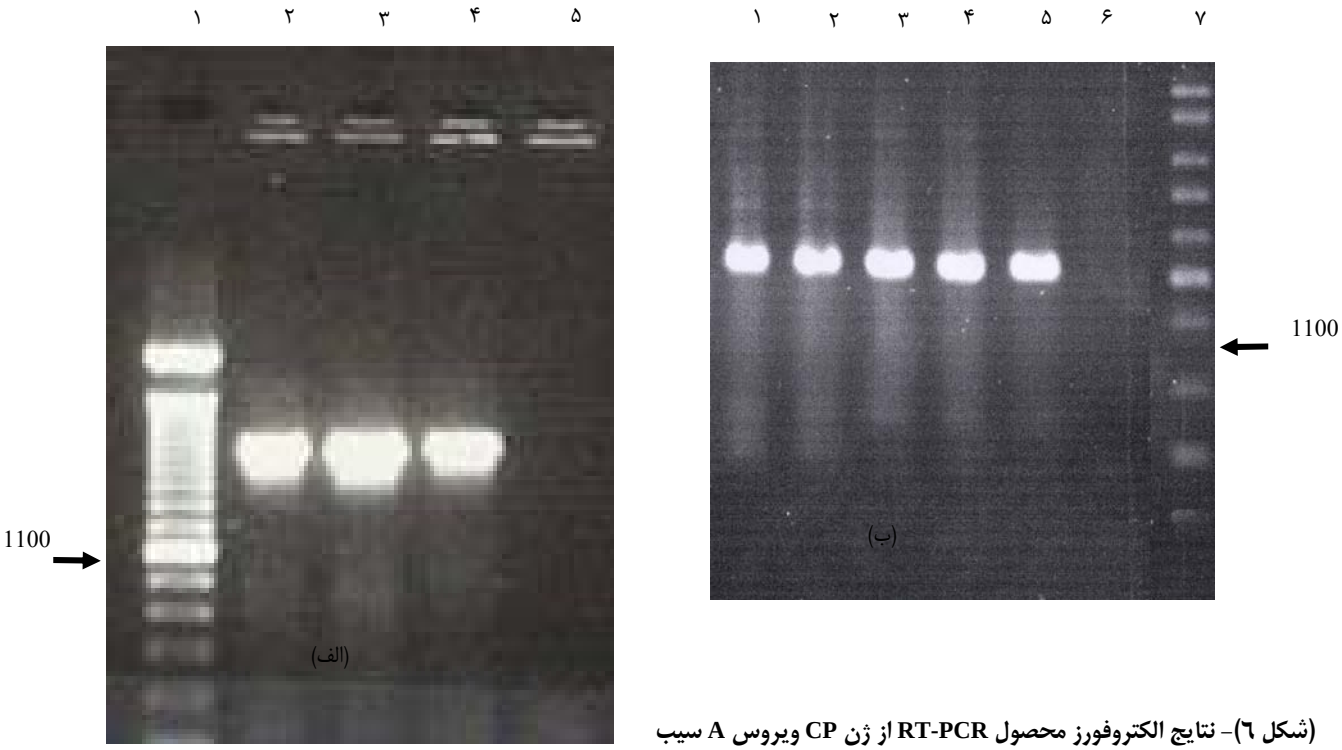
(شکل ٥)- علائم موزاییک و لکه‌های پراکنده در گوجه فرنگی ناشی از آلودگی توسط ویروس A سیب زمینی

آزمون الایزا

در آزمون DAS-ELISA نتایج مربوط به هریک از پلیت ها براساس تغییر رنگ حفرات از بی‌رنگ تا زرد پررنگ با شاهد مثبت و منفی مقایسه شد همچنین با استفاده از دستگاه الایزاخوان (Stat Fax 2100)، میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر برای هر یک از حفرات پلیت تعیین گردید و بدین ترتیب نتایج بررسی چشمی تغییر رنگ حفرات هر پلیت مورد تأیید قرار گرفت.

آزمون RT-PCR

به منظور تشخیص و شناسایی ویروس A سیب‌زمینی با استفاده از این روش، از بعضی نمونه‌هایی که آلودگی آنها توسط آزمون الایزا اثبات شده بود، استفاده گردید. RNA استخراج شده از این نمونه‌ها پس از سنتز cDNA و بسط نتایج آن توسط واکنش PCR ، بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد تزریق شد. همچنین در هر ژل یک چاهک به عنوان شاهد منفی نیز در نظر گرفته شد. باند ویروس A سیب زمینی با سایز bp ۱۱۰۰ در مقایسه با اندازه نشانگر مشاهده گردید. این باند در شکل ۶ مشاهده می‌شود.



(شکل ٦)- نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR از ژن CP ویروس A سیب زمینی
در نمونه های مختلف در ژل آگاروز ۱/۵ درصد
الف: ۱- سایز مارکر bp ۱۰۰ ۲، ۳ و ٤- نمونه‌های آلوده به PVA ٥- کنترل منفی
ب: ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ نمونه‌های آلوده به PVA ٦- کنترل منفی ۷- سایز مارکر bp ۱۰۰

بحث

بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق و با استفاده از روشهای DAS-ELISA و RT-PCR و همچنین با مشاهده علایم موزاییک، پیچیدگی مختصر، موجدار شدن و لوله شدن حاشیه برگها و براق شدن آنها وجود این ویروس در مناطق سیب‌زمینی‌کاری استانهای خراسان رضوی و شمالی کاملاً مشخص گردید. نتایج حاصل از آزمون RT-PCR منجر به تکثیر باند مورد انتظار گردید. علاوه بر این صحت نتایج حاصل از آزمون داس الایزا با توجه به ارزیابی چشمی نتایج و تأیید آن به وسیله دستگاه الایزاخوان مشخص گردید. در این تحقیق از میان ۸۲۰ نمونه مورد آزمایش ۳۰ نمونه آلوده به PVA بودند که منطقه کوه‌سرخ کاشمر با ۵۰ درصد آلودگی بالاترین میزان آلودگی در استانهای خراسان شمالی و رضوی را نشان داد. علایم ایجاد شده توسط PVA روی گیاهان محک نیز با علایم گزارش شده در منابع مطابقت داشت (۳). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که خوشبختانه پایین بودن شدت آلودگی ویروس A سیب‌زمینی در استانهای خراسان شمالی و رضوی تا حدی است که نیازی را به اعمال کنترل این ویروس برای اکثر این مناطق ایجاب نمی‌کند. با توجه به میزان آلودگی بالای منطقه کوه‌سرخ کاشمر و همچنین با توجه به تکثیر غده‌های حاصل از سالهای قبل و عدم رعایت بهداشت زراعی در مناطق سیب‌زمینی کاری کوه‌سرخ، این منطقه را می‌توان به عنوان منبع مهمی در پایداری و انتشار ویروس به سایر مناطق اطراف در نظر گرفت و اعمال مدیریت و کنترل PVA در این منطقه ضروری می‌باشد. در نتیجه بر اساس مشاهدات فوق می‌توان اعمال یک مدیریت صحیح و موفق زراعی را به عنوان یکی از مهمترین ابزارهای کنترل ویروس A سیب‌زمینی معرفی کرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دکتر روبرت برنز از موسسه SASA در اسکاتلند، دکتر شون فولدر از موسسه DSMZ آلمان به خاطر ارسال معرفهای آزمون الایزا و دکتر کروسلین از آمریکا به خاطر ارسال آغازگرهای اختصاصی آزمون RT-PCR تشکر و قدردانی می شود.

منابع

۱- جعفرپور ب. ۱۳۷۰. روشهای تشخیص ویروسهای گیاهی. تالیف هیل. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- رجبی ا. ۱۳۷۹. بیماریهای سیب‌زمینی. تالیف د.جی.هوکر. مرکز نشر دانشگاهی.

3- Bartels R. 1971. Potato virus A. No. 54 in Descriptions of Plant Viruses. Common Mycol. Inst., Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.

4- Cerovska N., Filigarova M., Branisova H., Zak P., and Dedic P. 1991. Some factors influencing purification of potato virus A. Virology, 35:469-471.

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

6- DeBokx J.A. 1972. Viruses of potatoes and seed-potato production. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. 233 pp.

7- Hull R. 2002. Mathews plant virology.4th edition. Academic press. 1001pp.

8- McMorran J.P., and Allen T.C. 1998. Maintenance, symptoms and distribution of potato viruses X, S, M, A potato tissue culture plantlets. American Potato Journal, 60:138-143.

9- Salimkan M., Hoque M.I., Sarker. R.H., and H.P. Muehlbach. 2003. Detection of important plant viruses in invirto regenerated potato plants by double antibody sandwich method of ELISA. Plant Tissue Culture, 13:21-22.

10- Schmitz A. 2003. Untersuchungen zum Pathogenitatsmechanismus von viroid RNA. Thesis, Heinrich Heine Universitat Dusseldorf, Germany.

11- Singh, R.P and M. Singh. 1998. Specific detection of potato virus A in dormant tubers by reverse- transcription polymerase chain reaction. Plant Disease, 82:230-234.

12- Verhoeven J.T.J., and Roenhorst J.W. 2003. Detection of a broad range of potato viruses in a single assay by mechanical inoculation of herbaceous test plants. OEPP/EPPO Bulletin, 33:305- 311.

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p.9-16

مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۱۶-۹

Identification and determination of distribution of potato virus A in Northern and Razavi Khorasan provinces using serological and molecular methods

M. Naghibzadeh* **- B. Jafarpour - M. Falahati Rastegar**[1]

Abstract

Potato virus A (PVA) is one of the members of genus potyvirus. PVA particles are straight to slightly flexuous rods and contain of single stranded RNA. In the spring and summer of 2005, sampling accomplished to determine potato virus A from potato fields in Northern and Razavi Khorasan provinces. Samples with mosaic, shining and rolling of leaves carried in ice chamber to Laboratory for identification and further studies. Some tubers were also collected. After tubers passed dormancy period at 4ºC they were transferred to laboratory to germinate. To detect PVA in collected samples, bioassays, serological and molecular methods such as ELISA and RT-PCR were used. Total RNA was extracted from infected samples by using PEG_{6000} precipitation method and cDNA was constructed. PCR was performed with specific primers from coat protein region. After electrophoresis on 1.5% agarose, the band of 1100 bp was detected. This amplified region was specific for CP PVA. Host range study of the virus was investigated in greenhouse on three species of host plant. To investigate distribution of the virus, the samples were collected randomly from potato fields located at Mashhad, Chenaran, Shirvan, Ghoochan, Faroodje, Bojnourd, Fariman, Kashmar, Esfarayen, Neishabour, Torbat Jam and Torbat-e-Heydariyeh and tested by DAS-ELISA method. Fields of Kashmar were infected with PVA in different proportions but no infections were observed in other tested fields of the region. This is the first report from existence of PVA in Northern and Razavi Khorasan provinces

Key words : Potato virus A, Identification, Host rang, DAS-ELISA, RT-PCR

(* - Corresponding author Email: maryam_naghib2003@yahoo.com)
1- Contribution from Damghan Azad University and College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad