شیوه نامه استفاده از کیت های تشخیصی در مراکز تایید کننده سلامت گیاهان

مقدمه:

بیماری های گیاهی به صورت معمول باعث ایجاد علایمی بر روی میزبان خود میشوند که می تواند در شناسایی عامل بیماری کمک به سزایی بنماید. در بسیاری از موارد شناسایی بیماری گیاهی از روی علایم حاصله بسار مشکل و یا غیر ممکن می باشد. به همین دلیل استفاده از ابزار مناسب تشخیص در این جهت راهگشا می باشد. کیت های تشخیصی به صورت مجموعه ای از مواد مورد نیاز که برای تشخیص یک بیماری گیاهی مورد نیاز می باشد در حجم ها و غلظت های پیشنهادی توسط شرکت های تهیه کننده در اختیار مصرف کننده قرار داده می شود. با توجه به نوع کیت های تشخیصی، کاربران استفاده کننده از این کیت ها می تواند شامل محققین، دانشجویان، کلینیک های گیاه پزشکی، آزمایشگاه های مرجع تشخیص، واحد های نظارتی تولید محصولات کشاورزی، کشاورزان و باغداران و همچنین بازرسان قرنطینه در مبادی ورود و خروج مواد گیاهی باشد. با توجه به اینکه در بسیاری از موارد افراد استفاده کننده از کیت های تشخیصی فاقد تخصص های ویژه آزمایشگاهی می باشند، اولین اصل در تولید این نوع فرآورده ها دقت بالا و سهولت استفاده از آن می باشد. استفاده از کیت های تشخیصی به صورت عام ابتدا در مورد بیمارگر های انسانی و در بخش پزشکی بوده است چرا که در این بخش به دلیل کاربرد بیشتر و ارزش اقتصادی بالاتر در مقایسه با بخش کشاورزی امکان توسعه بیشتری وجود دارد. با توسعه این علم در حوزه پزشکی و با توجه به کارآیی بالای آن در مدیریت بیماری های گیاهی و حوزه قرنطینه، تولید، توسعه و تجاری سازی کیت های تشخیصی در زمینه بیماری های گیاهی بعدا مورد توجه قرار گرفت.

بیماری‌های گیاهی باعث کاهش کمیت و کیفیت تولید و خسارت های فراوان اقتصادی در بخش کشاورزی می‌شود. بنابراین شناخت سریع علایم و تشخیص بیماری ها در کنترل و مدیریت آنها بسیار حایز اهمیت می‌باشد. بیماری‌های گیاهان در اثر عوامل مختلفی مانند باکتری ها، فیتوپلاسماها، قارچ ها، نماتدها و ویروس‌ها به‌وجود می‌آیند. بیماری‌های هر منطقه بسته به شرایط اقلیمی، نوع خاک و ارقام مورد استفاده، متفاوت است. برخی بیماری ها در صورت عدم کنترل، اپیدمی شده و در همه مناطق منتشر می شوند. بنابراین تشخیص سریع بیماری‌های گیاهی بسیار ضروری است که برای نظارت بر زمین‌های بزرگ، مزایای زیادی دارد. اطلاعات اولیه از سلامتی محصول و تشخیص بیماری می‌تواند از طریق استراتژی‌های مدیریتی مناسب از قبیل کنترل آفت‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها و مواد شیمیایی خاک، بهره‌وری را تسهیل نماید.

با این وجود، بسیاری از بیماری‌ها در مراحل اولیه بیماری علایم واضحی ندارند و شناسایی آن‌ها با چشم غیرمسلح به‌سختی صورت می‌پذیرد، بنابراین جهت شناسایی آن‌ها باید از روش‌های دقیق‌تر و سریع‌تری مانند ماشین بینایی و استفاده از تکنیک‌های پردازش تصویر در شرایطی که اطلاعات باید به صورت چشمی و با تکرار بدست آورده شود، استفاده نمود تا بتوان در امر تولید نهال سالم پیشرفت‌هایی کسب نمود.

یکی از اهداف تولیدات گیاهی، افزایش تولیدات سالم، با کمیت، کیفیت و بهره‌وری بالا، افزایش صفات بهینه گیاه از نظر فیزیولوژی تغذیه، فراهم آوردن منابع تکثیری سالم به منظور در اختیار نهادن پیوندک و نهال سالم به تولید کنندگان، افزایش طول عمر و مقاومت درخت در برابر تنش های زنده و غیرزنده ، کنترل و پیشگیری از انتشار بیماری های خطرناک از طریق استفاده از مواد گیاهی سالم و کاهش ریسک ورود بیماری‌های قرنطینه ای می‌باشد. تمام شرکت‌های فنآوری زیستی که در تولیدات کشاورزی کار می‌کنند، روش‌های خود را با هدف تهیه گیاه سالم به کار می‌برند.

وجود عوامل بیماری‌زا و باغات قدیمی و غیر اقتصادی، کم بودن منابع تکثیری سالم در کشور، کاهش رشد، عملکرد و کیفیت محصولات، توقف باردهی و زوال درختان و در نهایت زیان‌های اقتصادی فراوان در باغ‌ها، از ضرورت‌های تولید نهال سالم و اصیل و استاندارد در کشور می‌باشد.

هرگونه ضعـــف و آلودگی در نهالستان ، موجب کاهش رشـــد، ضعیف و رنجورشدن درختان شده و در نتیجه باغدار بعد از چندین ســـال صرف وقـــت و هزینه، با یک بـــاغ ضعیف، رنجور و با نقصـــان تولید و ضرر مالی روبرو می‌شود. بنابراین، مهم‌تریـــن کار باغداران، این اســـت که نهال مرغـــوب و متناســـب با شـــرایط محیطـــی باغ که دارای شناسنامه سلامت نهال باشد تهیه کنند. این نهال‌ها را باید از نهالستان‌های اصلی و مورد تأیید وزارت جهاد کشاورزی تهیه نمایند که یکی از ارکان اساسی احداث باغ و تولید تجاری میوه، استفاده از نهال پیوندی مرغوب و سالم و قوی از ارقام شناخته میوه است که مورد تأیید کمیته فنی نهال در هر استان باشد.

برای احداث باغ مادری درختان میوه، تهیه و تأمین مواد گیاهی سالم و اصیل از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. باغات مادری تولید کننده اندام های تکثیری سالم و اصیل برای نهالستان ها خواهند بود . بنابراین، اهمیت جایگاه باغات مادری در فرایند تولید نهال گواهی شده کمتر از جایگاه مواد پایه نیست.

انتخاب گیاه مادری برای تهیه پیوندک، حفظ و نگهداری منابع سالم تأمین پیوندک و اصلاح و جایگزینی باغات قدیمی با ارقام اصلاح شده و سالم، یکی از مراحل مهم تولید نهال سالم بوده، بنابراین گیاه مادری باید از یک منبع مورد اعتماد و سالم انتخاب شود . قدم های متحول و پیشرفته در سال‌های اخیر در زمینه بیوتکنولوژی امکانات وسیعی را در زمینه تولید نهال سالم، به‌خصوص در مبحث کشت بافت به وجود آورده است.

کلشت نهال های سالم و عاری از بیماری های مسری، خصوصاً بیماری های ویروسی و شبه ویروسی، اولین شرط داشتن باغات سالم است. عاری بودن نهال تولید شده از آفات و بیماری‌ها خصوصاً بیماری‌های ویروسی و فیتوپلاسمایی، از جمله فاکتورهایی است که به هنگام گواهی نهال، بسیار مهم می باشد. بنابراین شناخت آفات و بیماری‌های هر گیاه و انجام آزمون‌های لازم به‌منظور تشخیص سلامت نهال ضروری است.

با این وجود، مهم ترین پیش نیاز در امر گواهی سلامت، معرفی و استفاده از روش های تشخیصی دقیق و حساس می‌باشد. بنابراین تشخیص بیماری علاوه بر مشاهدات دقیق علایم بیماری در باغات و نهالستان ها، نیازمند شناسایی صحیح بیماگر با آزمون‌های لازم تشخیصی نیز می‌باشد.

پس از ظهور علایم بیماری، حضور بیماری در گیاهان با استفاده از تکنیک‌های تشخیص بیماری از جمله روش‌های سرولوژیکی مانند الایزا و روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (پی سی آر)، قابل بررسی است. ولی با این وجود، این روش ها وقت گیر و پرهزینه می‌باشند، بنابراین نیاز به یک روش سریع، حساس و انتخابی برای تشخیص بیماری‌ها احساس می‌شود. در واقع روش ه‌ای مولکولی به دلیل زمان بر بودن، نیاز به کار فشرده و مهارت زیاد به ویژه درطول آماده سازی نمونه (جمع آوری و استخراج) نمی‌توانند برای پردازش تعداد زیادی از نمونه های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین به دلیل شیوع برخی بیماری‌های گیاهی، دستیابی به روش های تشخیصی و درمان به موقع آن از اهمیت زیادی برخوردار است . بنابراین با توجه به اینکه روش های جدید، آسان، سریع، اغلب ارزان و قابل اعتماد در مراحل ابتدای آلودگی قبل از ظهور علایم هستند، از این رو، اجازه تشخیص آلودگی اولیه عوامل بیماری زا را زمانیکه علایم مشخص نیستند و تنها در چند گیاه وجود دارند، می دهد که به این دلیل در تولید نهال سالم و قرنطینه گیاهی، نقش دارند.

علاوه بر این، روش‌های سرولوژیکی است که در در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی داشته است، از ابزارهای اولیه ، دقیق و بسیار موثر در تشخیص بیماری های گیا هان می‌باشد. این روش ها در تشخیص بیماری‌های گیاهی به ویژه بیماری‌های ویروسی و بالاخص در تشخیص انبوه گیاهان در مطالعات مزرعه‌ای و اپیدمیولوژیکی، کاربرد وسیعی دارد.

کیت‌های سرولوژیکی برای تشخیص ویروس های گیاهی شامل آنتی بادی ویروس مورد نظر و نمونه گیاه سالم به عنوان کنترل منفی و گیاه آلوده به عنوان کنترل مثبت می باشد. کیت‌های الایزا به‌دلیل هزینه‌های پایین تجهیزات خود در مقایسه با روش های تشخیصی دیگر، به‌طور گسترده در دسترس هستند. این روش دارای قابلیت اطمینان خوب است، اگرچه نتایج منفی کاذب هم امکان پذیر است . با این وجود، الایزا وقت گیر بوده و دارای پتانسیل پایین برای جداسازی است.

علاوه بر این، کیت‌های تشخیصی در حوزه درمان بیماری های گیاهی مانند تشخیص عوامل بیماری زای گیاهی (جاروک لیموترش، رایزومونیای چغندر قند، گرینینگ مرکبات و تریستیزای مرکبات) مبتنی بر آنتی بادی‌های مونوکلونال نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

با این وجود، استفاده از کیت های تشخیصی در تشخیص بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی مواد گیاهی شامل نهال، بذر، غده و گیاهان باغی و زراعی در نهالستان‌ها و مبادی ورودی و خروجی نهال، نقش مهمی در حل مشکلات تشخیصی در کشور دارد.

مهمترین استراتژی مدیریت دراز مدت آفات و بیماری ها، انتخاب و کاشت نهال سالم است . کشاورزی ما زمانی برای حضور در عرصه جهانی حرف دارد که باغات میوه با رعایت کامل اصـول فنی و به کارگیری فنون جدید باغبانی و کاشت نهال های سالم و واریته های اصلاح شـــده احداث و مدیریت شوند. احداث باغ سالم، یکنواخت و اقتصادی با انتخاب نهال سالم و اصیل امکان پذیر می‌شود. یک نهال سالم باید اصالت ژنتیکی داشته باشد تا میوه بدست آمده از آن خوشرنگ، خوش طعم و بازارپسند باشد.

تولید نهال سالم، نیاز به دانش فنی بالا و امکانات و تجهیزات مخصوصی دارد. بدیهی است که تولید نهال‌های با کیفیت بالای باغبانی و سلامتی کامل، نیاز به سرمایه گذاری و هزینه بالایی دارد ولی با توجه به اهمیت این امر، هر گونه سرمایه گذاری و هزینه نمودن در این کار، توجیه اقتصادی داشته و ضامن پایداری و اقتصادی بودن تولید است.

تولید نهال سالم در بیشتر کشورهای جهان در جهت مدیریت بیماری های درختان میوه خصوصاً بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی توسط دولت‌ها و کشاورزان کاملاً پذیرفته شده است. این فرآیند بایستی آنقدر ادامه یابد که در تمامی کشورها و برای همه گیاهانی که تکثیر رو یشی دارند استفاده شود تا بتواند سطح آلودگی به بیماری‌ها مخصوصاً بیماری‌های ویروسی را کاهش دهد . پدید آمدن تکنیک های جدید ملکولی و سرولوژیکی برای تشخیص این بیماریها سبب پیشرفت های زیادی در این زمینه شده است و استفاده از این تکنیک ها که بسیار دقیق، سریع و تا حدودی ارزان قیمت هستند سبب تسهیل فرآیند سالم سازی و تولید نهال سالم شده است.

در واقع احداث باغ، نوعی سرمایه گذاری است، پس با انتخاب نهال سالم و اصیل و رعایت نکات فنی در احداث باغ، درآمد بیشتری را کسب کرده و دوره برگشت سرمایه خود را کوتاهتر کنیم.

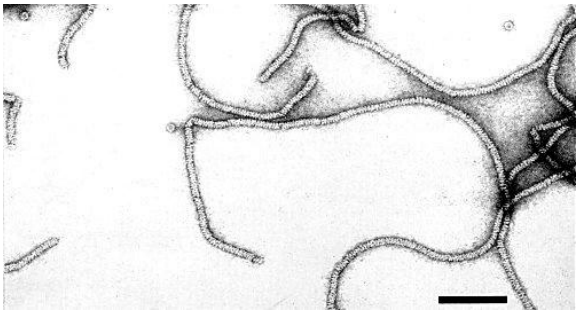
نیاز به افزایش تولید محصول همگام با افزایش جمعیت اجتناب ناپذیر است، مدیریت صحیح در احداث و نگهداری باغ که منجر به افزایش کیفیت و کمیت محصول می شود می‌تواند باعث افزایش صادرات غیرنفتی کشور و ارتقاء سطح اقتصادی منطقه و کشور شود. تبدیل باغ‌های غیر اقتصادی درجه دو و سه، به باغ های درجه یک، افزایش بهره‌وری تولید و توسعه باغ‌ها، نیازمند تولید نهال سالم، اصیل و استاندارد، ارقام مطلوب، پرمحصول و عاری از هر گونه آلودگی است. چرا که احداث باغ یک سرمایه‌گذاری بلند مدت بوده و باغداران برای احداث باغ هزینه سنگینی را متحمل می‌شوند.

بیماری های درختان دانه دار

Pomefriut diseases

ویروس لکه برگی کلروتیک سیب (*Apple chlorotic leaf spot virus*)

ویروس لکه برگی کلروتیک سیب (ACLSV)، گونه تیپ جنس *Trichovirus* از خانواده *Betaflexiviridae* به شمار می رود. این ویروس دارای پیکره رشته ای به ابعاد آن 720×12nm و ژنوم از نوع RNA تک رشته مثبت به طول حدود $7/5\times10^3$ نوکلوتید با پوششی به وزن 22 کیلو دالتون می باشد.



اگرچه ACLSV در سالهای اخیر در بسیاری از نقاط دنیا در اغلب درختان میوه شامل سیب، هلو، گلابی، آلو، گیلاس و زردآلو پراکنده شده است، اما علائم بسیار متنوعی در درختان میوه حساس ایجاد می کند. در ژاپن این ویروس از مهمترین ویروس های درختی در سیب است که باعث نکروز پوست و آبله ای شدن ساقه پایه های واریته ای از سیب شده (*Malus prunifolia* var. ringo) و به زوال درختان سیب پیوند شده روی این پایه می انجامد. این ویروس می تواند باعث بیماریهای جدی در درختان میوه هسته دار از جمله شکافته شدن پوست آلو، آبله دروغی در آلو، ماتل آفتاب سوخته سبز تیره در هلو و بدشکلی شدید میوه و برگ شده و ناسازگاری پیوندک و پایه را در برخی ارقام زردآلو موجب شود.

اگرچه گسترش این ویروس در باغات ردیابی شده ولی همچنان ناقل آن نامشخص است. پیوند بر روی گیاهان چوبی حساس و تست های سرولوژیکی نظیر ELISA برای ردیابی ACLSV استفاده شده اند. اما هردوی این روشها به دلیل وقت گیر بودن و نیز مشابه سایر ویروس های آلاینده درختان و مشکلاتی نظیر غلظت پایین و ناچیز ویروس طی فصل زراعی و تنوع جدایه های ویروس نتایج گاهاً ضد و نقیض را به دنبال داشته اند.

توسعه روش RT-PCR برای ردیابی ACLSV حساسیت و سرعت روشهای ردیابی این ویروس را ارتقا بخشیده و بر مشکلات ذکر شده در بالا فائق آمده است . همچنین توالی های نوکلئوتیدی کامل این ویروس نیز در مورد برخی جدایه ها ثبت شده است . همولوژی توالی بین جدایه های مورد بررسی از 82-76 درصد ثبت شده است.

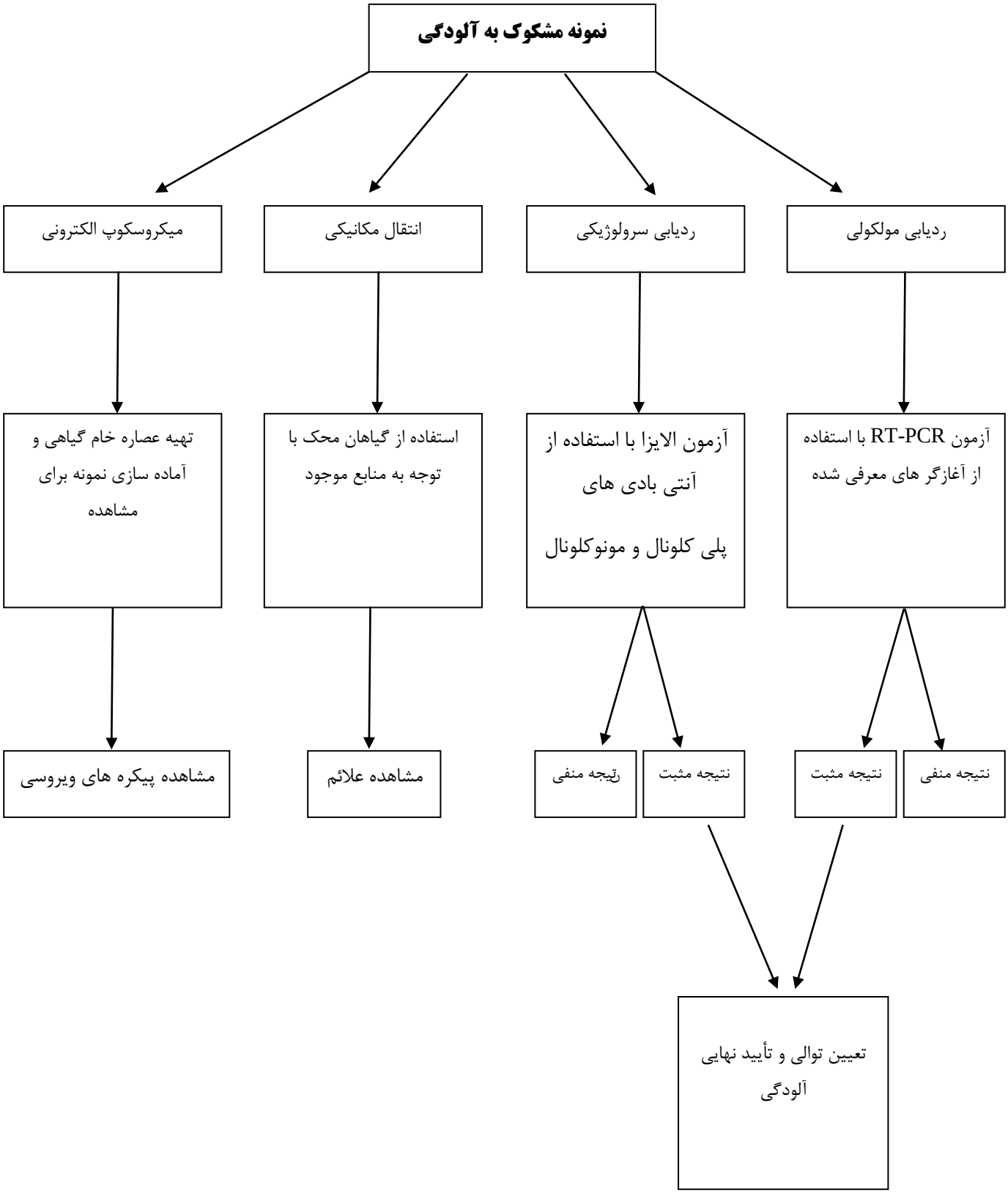
ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

به این منظور استفاده از نهال های هلو رقم GF305 یا سیب *Malus platycarpa* توصیه شده است. هر چند این روش با معایبی نظیر زمان بر بودن، نیاز به تجهیزات گلخانه ای و نیروی کارگری مواجه است.

روش سرولوژیکی

روشهای سرولوژیکی با کیت های تشخیصی سرولوژیکی ACSLV با استفاده از آنتی بادی چند همسانه ای که توسط شرکت Bioreba تولید و عرضه شده است، امکانپذیر می باشد . لازم به ذکر است که با توجه به غلظت پایین ویروس در فصل تابستان ، تنها سه ماه بهار مناسب ترین زمان نمونه برداری و انجام تست سرولوژیکی است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

روش مولکولی

RT-PCR و IC-RT-PCR خصوصاً در زمانی که تیتر ویروس پایین باشد، یکی از روشهای مناسب ردیابی ACLSV به شمار می رود و به این ترتیب نه تنها نیاز به استخراج RNA نخواهد بود بلکه اثرات عوامل بازدارنده نیز حذف می شود.

تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی ACLSV معرفی شده است که در ذیل به یک نمونه از رایج ترین آنها اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
A52	CAGACCCTTATTGAAGTCGAA	358	Candresse *et al*., 1995
A53	GGCAACCCTGGAACAGA		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (One step RT-PCR)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	Tris HCl 10 mM KCl 50 mM Igepal 0.08%
MgCl2	1/5 mM
Forward primer	0/8 µM
Reverse primer	0/8 µM
dNTPs	400 µM
Taq DNA polymerase	1 U
RNA	µg1
MLVreverse transcriptase	0/8U
RNase inhibitor	0/8U
Nuclease free water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
60 دقیقه	42	ساخت cDNA	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	35
45 ثانیه	55	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	

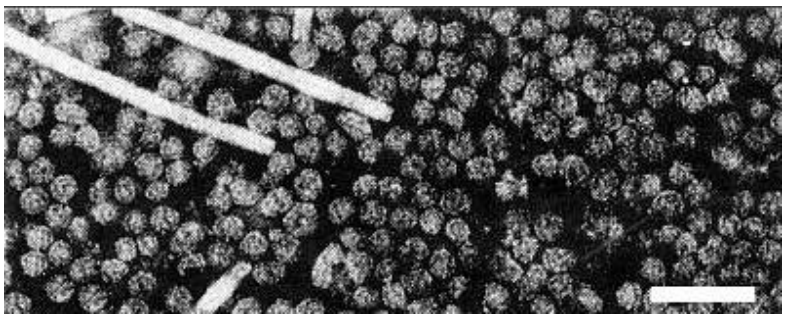
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. www.bioreba.ch
2. Candresse, T., M. Lanneau, F. Revers, N. Grasseau, G. Macquaire, S. German, T. Malinowski and J. Dunez. 1995. An immuno-capture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the *apple chlorotic leaf spot virus*. Acta Hort. 386: 136-147.
3. Ulubas, C. and Ertunc, F. 2005. *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* (ACLSV) Status in Turkey and Sensitive Detection Using Advanced Techniques. Turk J Agric For. 29: 251-257.

ویروس موزائیک سیب (*Apple mosaic virus*)

ویروس موزائیک سیب (ApMV) ویروسی از جنس *Ilarvirus* و خانواده *Bromoviridae* دارای پیکره های شبه ایزومتریک می باشد. این ویروس در خانواده Rosaceae به صورت جهانی وجود دارد و در ایران نیز از استان تهران گزارش شده است . گیاهان میزبان این ویروس سیب، بادام، زردآلو، گیلاس، شاه توت، انگورفرنگی، رازک، شاه بلوط هندی، فندق، تمشک، درخت غان، رز، برخی گیاهان علفی و توت فرنگی می باشند.



اغلب گیاهان جنس Rubus آلوده در آمریکای شمالی بدون علائم هستند اما تعدادی از گیاهان *R.idaeus* در آلمان خال های زرد مشخص یا الگوهای خطی نشان می دهند . ایجاد علائم موزاییک شدید سیستمیک در سیب، نقوش برگ بلوطی و لکه حلقوی روی درختان فندق از علائم ابتلا به این ویروس است . علائم در ابتدای فصل رشد مشهود بوده اما ممکن است با گذشت زمان و بالارفتن دما تا حدودی محو شوند.

غالب ویروسهای این جنس بذرزاد بوده بعضی ازآنها نظیر ویروس لکه حلقوی درختان میوه هسته دار و تاحدودی ApMV از طریق دانه گرده منتقل می شوند ، اگرچه هیچ گزارشی از انتقال بذری یا ازطریق دانه گرده در مورد ویروس موزائیک سیب در جنس *Rubus* وجود ندارد. این ویروس ازطریق مکانیکی توسط عصاره درختان آلوده به گونه های علفی به سختی قابل انتقال بوده و وجود یک آنتی اکسیدانت در محیط عصاره گیری ضروری است. ApMV ناقل طبیعی ندارد ولی از طریق انتقال اندام های آلوده گیاهی از منطقه ای به منطقه دیگر جابه جا می شود . این ویروس همچنین از طریق تماس ریشه درختان آلوده به سالم منتقل می شود. از طریق سس قابلیت انتقال نداشته ولی از طریق پیوند منتقل می شود.

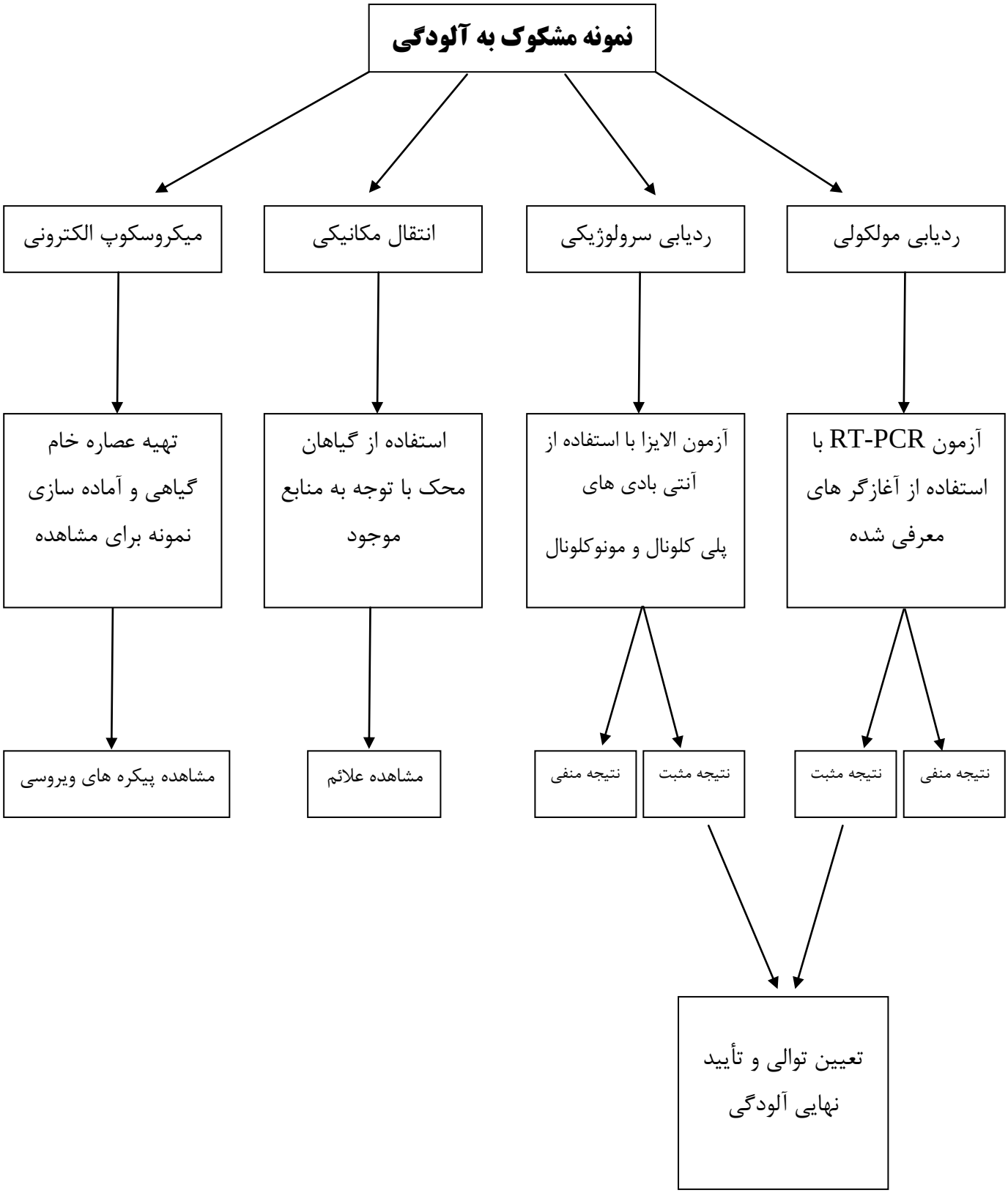
ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

از آنجایی که اغلب گیاهان آلوده فاقد علائم می باشند مایه زنی مکانیکی عصاره به گیاهان محک علفی ضروری است. pH بافر استخراج بایستی بین 8 تا 9 بوده و حاوی یک آنتی اکسیدان باشد. بسیاری از جدایه های این ویروس دارای خصوصیات سرولوژیکی متفاوت بوده و علائم متفاوتی را در گیاهان محک ایجاد می کنند.

روش سرولوژیکی

یکی از روشهای تشخیص قطعی ویروس از طریق سرولوژیکی است . همانند ویروس نهفته تمشک سیاه، ویروس موزائیک سیب به طور نامنظم و غیر یکنواخت در برخی از میزبان ها پخش می شود و در نتیجه نمونه مورد بررسی بایستی از چندین نقطه گیاه تهیه شود . همچنین بعضی از جدایه ها ی این ویروس با ویروس لکه حلقوی نکروتیک درختان میوه هسته دار از نظر سرولوژیکی مرتبط هستند. کیت های تشخیصی



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

سرولوژیکی ApMV با استفاده از آنتی بادی های چند همسانه ای بر اساس آزمون الایزای مستقیم و غیر مستقیم توسط شرکت های Bioreba، Agdia و Loewe تولید و به بازار معرفی شده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی مولکولی ApMV معرفی شده است که در ذیل به سه نمونه از آنها اشاره می شود. همچنین کیت کامل ردیابی مولکولی آن توسط شرکت Loewe تولید شده است (Complete RNA PCR Reaction Kit).

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول قطعه (bp)	منبع
Sense	ATC CGA GTG AAC AGT CTA TCC TCT AA	262	Menzel *et al*., 2002
Anti sense	GTA ACT CAC TCG TTA TCA CGA ACAA		
Sense	TCA ACA TGG TCT GCA AGT AC	680	Lee *et al*., 1998
Anti sense	CTA ATC GCA CCA TCA TAA TT		
Sense	GGC CAT TAG CGA CGA TTA GTC	820	petrzikee and lenz, 2002
Anti sense	ATG CTT TAG TTT CCT CTC GG		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (One step RT-PCR)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	0/6 µM
Forward primer	0/2 µM
Reverse primer	0/2 µM
dNTPs	1/5 mM
Taq DNA polymerase	1 U
MMLV-RT	8U
RNA	2 µl
RNase inhibitor	1/2U
Nuclease free water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش (Menzel *et al*., 2002)

تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	ساخت cDNA	42	30 دقیقه
1	واسرشته سازی اولیه	95	15 دقیقه
34	واسرشته سازی	94	30 ثانیه
	اتصال آغازگر	62	30 ثانیه
	گسترش	72	1 دقیقه
1	گسترش نهایی	72	7 دقیقه

شرایط واکنش (Lee *et al*., 1998)

تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	ساخت cDNA	42	30 دقیقه
1	واسرشته سازی اولیه	95	15 دقیقه
34	واسرشته سازی	94	30 ثانیه
	اتصال آغازگر	54	30 ثانیه
	گسترش	72	1 دقیقه
1	گسترش نهایی	72	7 دقیقه

شرایط واکنش (petrzikee and lenz, 2002)

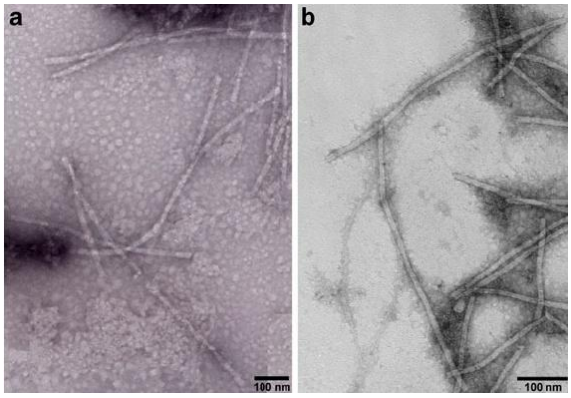
تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	ساخت cDNA	42	30 دقیقه
1	واسرشته سازی اولیه	95	15 دقیقه
34	واسرشته سازی	94	30 ثانیه
	اتصال آغازگر	50	30 ثانیه
	گسترش	72	1 دقیقه
1	گسترش نهایی	72	7 دقیقه

منابع

1. Ertunc F, Topkaya S, Sezer A. Distribution and molecular detection of *Apple mosaic virus* in apple and hazelnut in Turkey. 2014; 13: 3144- 3149.
2. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
3. Lee, CH., Kim, CS., Choi, SK. and Ryu, HK. 1998. RT-PCR detection of *Apple mosaic virus* in cultivated apple. Direct submission to NCBI. Korea university, Korea.
4. Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co amplification of plant mRNA as internal control. J Virol Methods. 2002; 99: 81-92.
5. OEPP/EPPO. 1996.Data sheets on quarantine pests. No 149, *Apple mosaic ilarvirus* in *Rubus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.*
6. Petrzik, K. and Lenz, O. 2002. Remarkable variability of *Apple mosaic virus* capsid protein gene after nucleotide position 141. Arch. Virol. 147: 1275-1285.
7. www.agdia.com
8. www.bioreba.ch
9. www.loewe-info.com

ویروس ساقه شیاری سیب (*Apple stem grooving virus*)

ویروس ساقه شیاری سیب (ASGV) عضو تیپ جنس *Capillovirus* و از خانواده *Flexiviridae* دارای پیکره رشته ای به ابعاد 70-60 نانومتر طول و قطر12 نانومتر بوده وژنوم از نوع RNA تک رشته مثبت به طول حدود 6496 نوکلئوتید بادم PolyA در انتهای '3می باشد.



ASGV به طور گسترده در درختان میوه خانواده *Rosaceae* نظیر سیب، گلابی، گلابی ژاپنی، زردآلو و گیلاس مشاهده می شود. ویروس برگ رشته ای مرکبات (CTLV) نیز امروزه به عنوان جدایه ای از ASGV شناخته شده است به این ترتیب دامنه میزبانی ASGVشامل مرکبات و سوسن نیز می باشد.

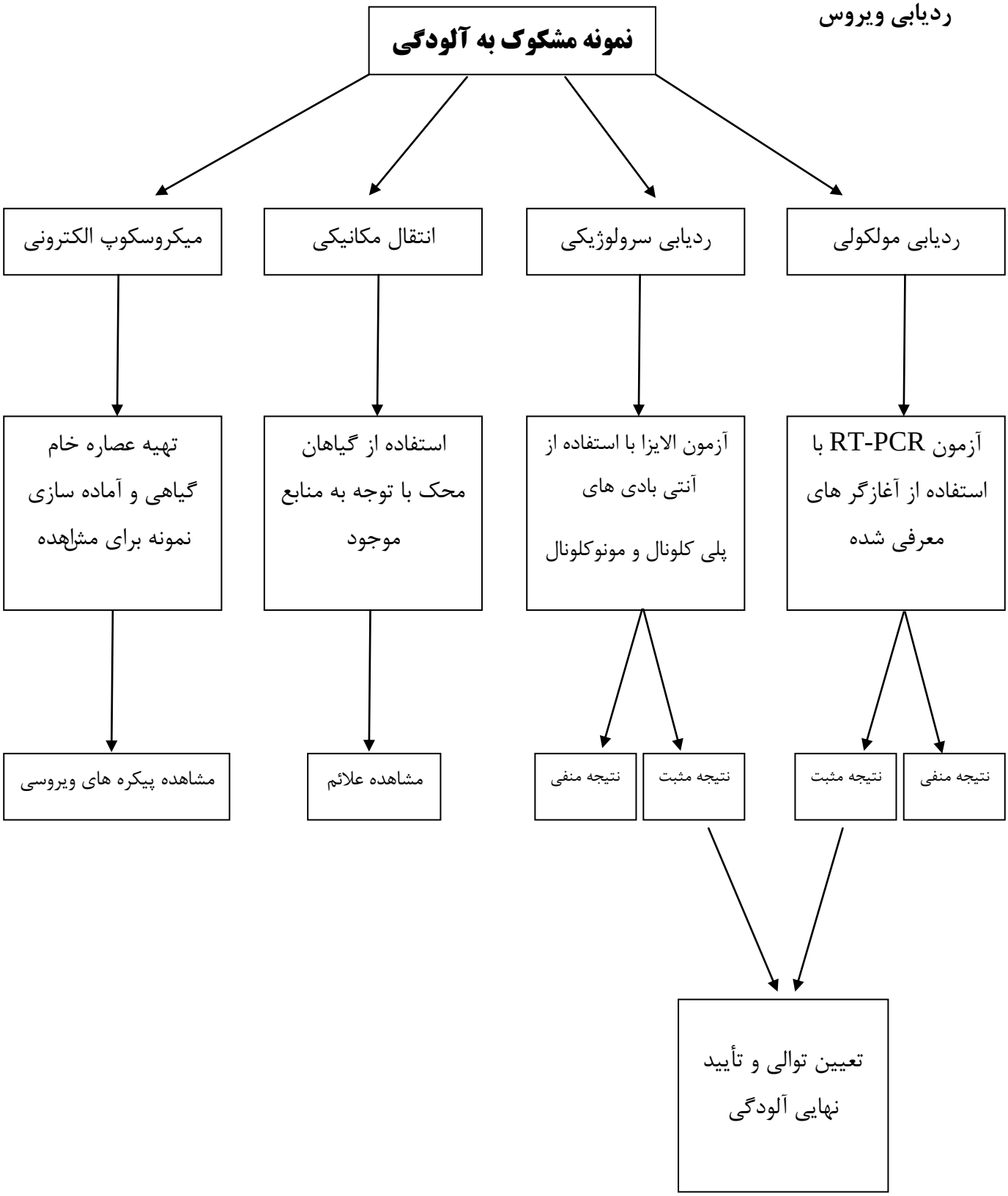
این ویروس در بسیاری از کشورهای دنیا در اروپا، آسیا، آفریقا، آمریکا و اقیانوسیه گزارش شده است.ASGV ویروسی قرنطینه ای برای ایران است و لذا اندام های وارداتی بایستی از نظر عاری بودن به این ویروس مورد بررسی قرار گیرد.

ویروس ساقه شیاری سیب عامل زوال و بیماری نکروزه شدن محل اتصال پیوندک در برخی از ارقام سیب است.این بیماری که از مهمترین بیماری های سیب در ژاپن به شمار می رود، غالباً در میزبان سیب بدون علائم بوده و آلودگی به ASGV همراه با سایر ویروس های آلوده کننده درختان میوه دا نه دار که در باغات سیب رایج است باعث کاهش شدید عملکرد می شود .تحقیقات انجام شده در زمینه اهمیت اقتصادی این ویروس نشان داده است که حتی در صورتی که علائم به صورت نهفته در ارقام تجاری سیب باشد، کاهش 23/4 درصدی رشد و 13/7 درصدی قطر تنه را در پی خواهد داشت .از علائم آلودگی با این ویروس می

توان به زوال اندام هوایی و شامل ریزبرگی ، زردی تدریجی، ریزش نابهنگام برگ ها، شکوفه دهی زیاد غیرطبیعی در ابتدا ی ظهور علائم، کاهش سبزینگی و کوچک شدن میوه ها ناشی از پیوند پیوندک آلوده روی برخی پایه ها ی سیب طی یک تا دو سال اشاره کرد در حالی که پیوندک روی پایه ای متحمل به بیماری علائمی را نشان نخواهد داد.

ویروس از یک درخت به درخت دیگر ازطریق پیوند منتقل شده و یک دوره انکوباسیون 15-14 ماهه دارد اما انتقال به گیاهان علفی از طریق مکانیکی امکان پذیر است و انتقال از گیاهان علفی به در ختان چوبی از طریق پیوند مجاورتی و شیاری صورت می گیرد . موارد نادری از پیوند ریشه و انتقال از طریق آن بین درختان سالم و آلوده گزارش شده است . انتقال از طریق بذر نیز در دو گیاه , *Malus platycarpa* *Chenopodium quinoa* گزارش شده است. از آنجایی که ناقلی برای این ویروس شناخته شده است استفاده از اندام های تکثیری عاری از ویروس توصیه می شود . بیماری ساقه شیاری سیب گاهی با ساقه آبله ای سیب و زوال ویرجینیا کراب اشتباه می شود.

ساقه آبله ای باعث تورم و صاف شدن غلاف جوانه در ناحیه اتصال پایه و پیوندک در رقم ویرجینیا کراب نمی شود و هیچ خط قهوه ای بافت نکروزه ای بالای محل اتصال ایجاد نمی شود و همچنین زوال ویرجینیا کراب باعث کلروز برگی و مرگ گیاه می شود از علائم آلودگی با ASGV نیست.ASGV از نظر سرولوژیکی بسیار نزدیک به ویروس برگ رشته ای مرکبات است و بررسی های بیولوژیکی سرولوژیکی، ساختار ژنوم و تعیین توالی هردو را یکی می داند.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

تست بیولوژیکی

ویروس اغلب به صورت نهفته بوده و علائم مشخصی را روی اغلب کولتیوارهای تجاری سیب و گلابی نشان نمی دهد، اما می تواند منجر به بروز علائم روی برخی گیاهان محک شود . با برداشتن پوست نزدیک محل پیوند، شیارهای بلند روی ساقه چوبی گیاهان محکی مثل *Malus sylvestris* cv Virginia crab مشاهده می شود. همچنین اغلب یک خط قهوه ای نیز در بافت این گیاه بلافاصله بالای ناحیه پیوند دیده می شود و به همین دلیل گاهی با نام بیماری ویروس خط قهوه ای نامیده می شود . استرین E36 این ویروس منجر به تورم در قاعده پیوندک می شود. استرین C-431 تنها منجر به شیاری شدن ساقه شده و علائم خط قهوه ای ایجاد نمی کند.گونه های زیر نیز به عنوان میزبان های آزمایشی ویروس گزارش شده اند:

Tetragonia tetragonioides

Torenia fournieri

Vigna unguiculata

روش سرولوژیکی

روشهای آزمایشگاهی نظیر RT-PCR , ELISA برای ردیابی این ویروس بخوبی توسعه یافته اند . معمولاً درختان چوبی حاوی مقادیر بسیار بالایی از ترکیباتی نظیر پلی فنل ها و پلی ساکاریدها هستند که که مقادیر این ترکیبات در بافت های مختلف و در زمان های مختلف متفاوت بوده و به نظر می رسد در حساسیت روشهای ردیابی اثرگذار است.

روشهای سرولوژیکی نظیر الایزای مستقیم یا غیرمستقیم با استفاده از کیت های تشخیصی سرولوژیکی ASGV با استفاده از آنتی بادی های چند همسانه ای شرکت های Bioreba و Loewe از مهمترین روش های ردیابی ویروس به شمار می رود. استفاده از برگهای جوان و گلبرگ های سیب برای ردیابی توسط الایزا استفاده شده اند. دو تکنیک DIBA وTIBA نیز برای ردیابی این ویروس معرفی شده اند.

روش مولکولی

در بررسی های صورت گرفته با دو روش الایزا و RT-PCR، روش مولکولی RT-PCR توانسته ویروس را در همه بافت های مورد بررسی اعم از پوست جوانه های در حال خواب، گلبرگ ها و برگها از ژانویه تا اواسط ژوئن ردیابی کند در حالی که برگها در طی گلدهی در ماه می مناسبترین با فت برای ردیابی ویروس توسط هر دو روش بوده است. برگهای جمع آوری شده در ماه های تابستان (ژوئن، جولای و آگوست) یا بافت های دیگر نظیر پوست، جوانه های در حال خواب و گلبرگ ها در ردیابی با الایزا قابل اعتماد نبوده اند.

درخصوص روش های مولکولی نیز روش هایی نظیرRT-PCR وIC-RT-PCRمعرفی شده اند.تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی ASGV معرفی شده است که در ذیل به دو نمونه از آنها اشاره می شود

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
C6396	CTGCAAGACCGCGACCAATTT	524	Serghini *et al*., 1990
H5873	CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC		
ASGV-U	CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC	499	James, 1999
ASGV-2	GGAATTTCACACGCACTCTAACCCTCC		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (James, 1999)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	1/25 mM
Forward primer	10 pmol
Reverse primer	10 pmol
dNTPs	0/2 mM
Taq DNA polymerase	2/5 U
cDNA	1 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش (James, 1999)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
45 ثانیه	94	واسرشته سازی	34
1 دقیقه	55	اتصال آغازگر	
2 دقیقه	72	گسترش	
5 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (Serghini *et al*., 1990)

با استفاده از کیت آزمایشگاهی One step RT-PCR kit, Qiagen

شرایط واکنش (Serghini *et al*., 1990)

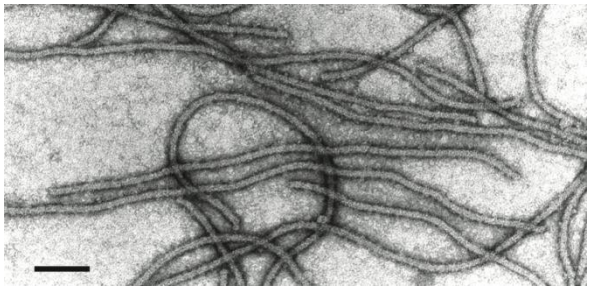
مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
30 دقیقه	50	ساخت cDNA	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	34
45 ثانیه	54	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
7 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Cheraghian, A., 2016. *Apple stem grooving virus*, A Guide for Diagnosis & Detection of Quarantine Pests. Plant protection organization of Iran.
2. James. D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of *Apple stem grooving virus* by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. J. Virol. Methods, 83: 1–9.
3. Serghini, M. A.; Fuchs, M.; Pinck. M.; Reinboit, J.; Walter, B.; Pinck, L.; 1990: RNA2 of grapevine fanleaf virus: Sequence analysis and coat protein cistron location. J. Gen. Virol. 71, 1433-1441.
4. www.bioreba.ch
5. www.loewe-info.com

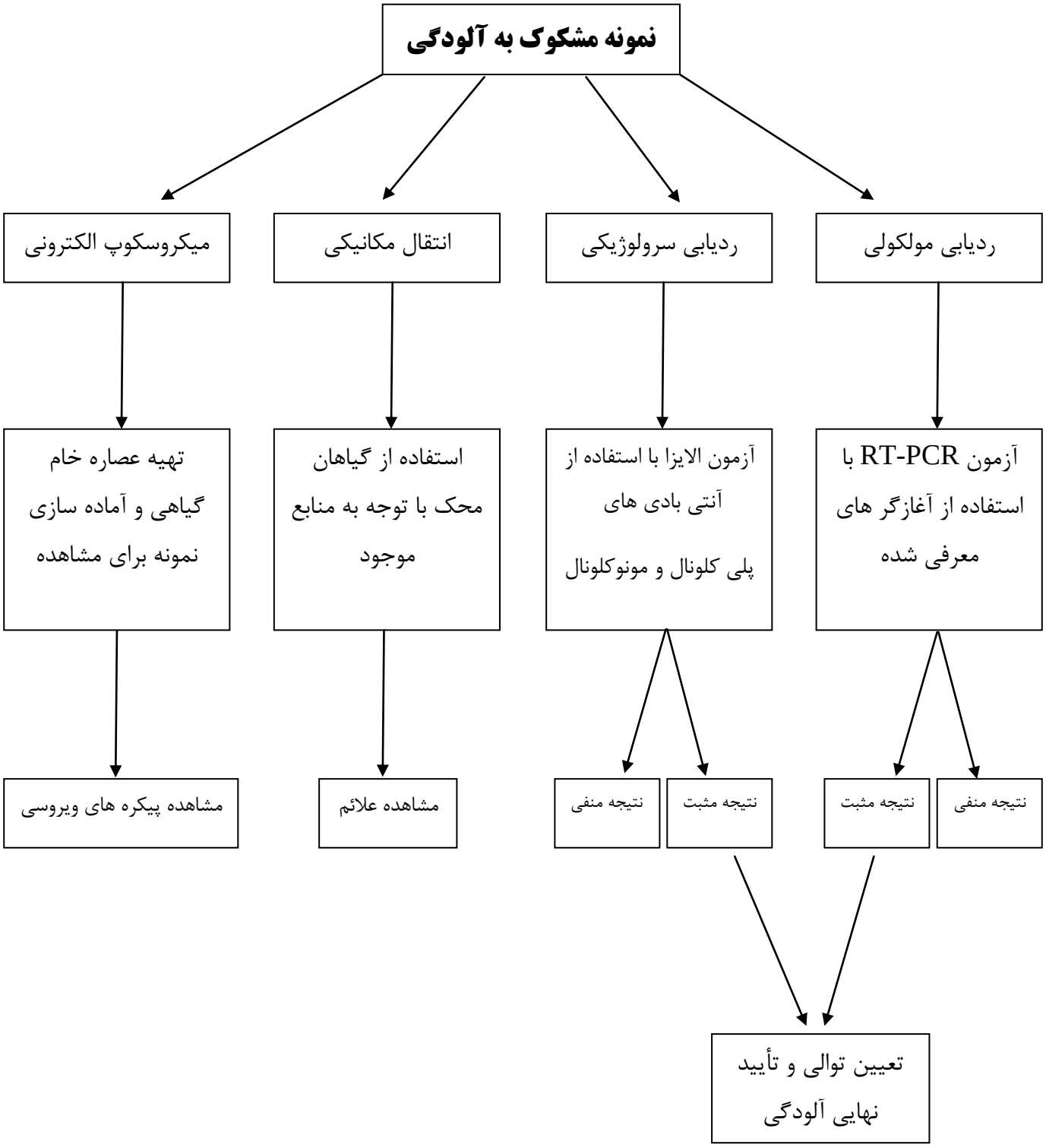
ویروس ساقه آبله ای سیب (*Apple stem pitting virus*)

ویروس ساقه آبله ای سیب (ASPV) ویروسی از جنس *Foveavirus* و خانواده *Flexiviridae* دارای پیکره رشته ای به طول 800 نانومتر و عرض 15-12 نانومتر و ژنوم از نوع RNA تک رشته مثبت به طول تقریبی 9332 نوکلئوتید بوده که در انتهای '3 خود دارای دم Poly A می باشد.



ASPV در اغلب کولتیوارهای سیب تجاری فاقد علایم می باشد . این ویروس در بسیاری از نقاط دنیا که به کشت سیب، گلابی و به اختصاص دارد ، اغلب همراه با ویروس ساقه شیاری سیب ASGV گسترش یافته است. ASPV ممکن است باعث علایم تیپیک نظیر پیچیدگی برگ به سمت پایین، زوال و ساقه آبله ای روی برخی کولتیوارهای سیب حساس شود و باعث بیماری های متفاوتی نظیر رگبرگ زردی و میوه سنگریزه ای در گلابی می شود.

از آنجایی که ASPV فاقد ناقل طبیعی است مهمترین وسیله انتقال ویروس از طریق پیوند و نقل و انتقال اندام های گیاهی آلوده از قبیل پایه و پیوند آلوده است . انتقال از طریق اتصال ریشه ها نیز گزارش شده است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

در صورتی که پیوند ک آلوده روی پایه سیب حساس SPY227 پیوند زده شود علایم پیچیدگی برگ به سمت پایین، زوال و ساقه آبله ای بروز می کند . همچنین علایم ساقه آبله ای روی پایه Virginia crab هم بروز می کند.

روش سرولوژیکی

روشهای سرولوژیکی نظیر الایزای مستقیم یا غیرمستقیم با استفاده از کیت های تشخیص ی سرولوژیکی ApMV با استفاده از آنتی بادی های تک همسانه ای شرکت های Bioreba از مهمترین روش های ردیابی ویروس به شمار می رود.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش RT-PCR است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی ApMV معرفی شده است که در ذیل به سه نمونه از آنها اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول قطعه (bp)	منبع
Sense	ATGTC TGGAA CCTC ATGTGCAA	370	Menzel *et al*, 2002
Anti sense	TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA		
C8849	TGCCTCAAAGTGTACAGT	316	Jelkmann,1994
H8534	CGCCAAGAAATGCCACAGC		
Asp-c	CTCTTGAACCAGCCTGATGGC	264	Jelkmann and keim- konrad , 1997
Asp-A	ATAGCCGCCCCGGTTAGGTT		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (Jelkmann and keim- konrad , 1997)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	1/25 mM
Forward primer	10 pmol
Reverse primer	10 pmol
dNTPs	0/2 mM
Taq DNA polymerase	2/5 U
cDNA	1 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش (Jelkmann and keim- konrad , 1997)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
45 ثانیه	94	واسرشته سازی	34
1 دقیقه	55	اتصال آغازگر	
2 دقیقه	72	گسترش	
5 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (Jelkmann,1994)

با استفاده از کیت آزمایشگاهی One step RT-PCR kit, Qiagen

شرایط واکنش (Jelkmann,1994)

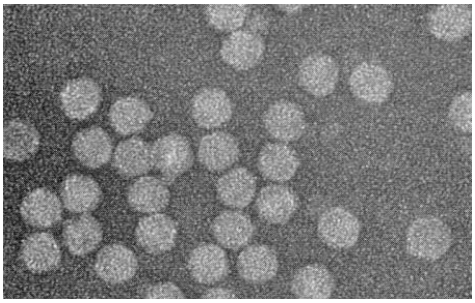
مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
30 دقیقه	50	ساخت cDNA	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	34
45 ثانیه	54	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
7 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Jelkmann, W. and Keim-Konrad, R. 1997. Immuno-captive polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of *Apple stem pitting virus*. J. Phytopathol., 145: 499–503.
2. Jelkmann,W. 1994: Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex-and carlaviruses.J.Gen.Virol.,75,1535.
3. Menzel W., Jelkmann W. and Maiss, M. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods, 99, 81–92.
4. www.bioreba.ch

ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (*Tomato ringspot virus*)

ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV) ویروسی از جنس *Nepovirus* و خانواده *Comoviridae* است. این ویروس دارای پیکره ایزومتریک با حاشیه زاویه دار و البته ناپایدار حاوی یک RNA تک رشته بوده و حدود 28 نانومتر قطر دارد.



این ویروس که بعضاً با نام TomRSV نیز نامیده می شود به طورطبیعی در بسیاری از درختان چوبی و گیاهان زینتی دیده می شود و همچنین میزبانهای علفی شامل تمشک، *Rubuslaciniatus*، انگور، سیب، هلو، گیلاس و سایر هسته داران ، انگور فرنگی، توت فرنگی، گل ادریسی، گلایول، شمعدانی و *Fraxinusamericana* نیز از میزبان های دیگر آن به شمار می روند.

دامنه میزبانی آزمایشی این ویروس نیز بسیار گسترده است و گونه هایی متعلق به بیش از 35 خانواده تک لپه و دولپه ای نسبت به ToRSV حساس هستند. بسیاری از علف های هرز نظیر گل قاصدک نیز می توانند به عنوان ذخیره گاه ویروس عمل کنند. علف قناری نیز به عنوان میزبانی بدون علائم معرفی شده است.

ToRSVدر حال حاضر در بسیاری از کشورهای اروپایی (بلغارستان، آلمان، ایتالیا، اسلواکی، اسلوونی، ترکیه، روسیه و سوئد)، آمریکای شمالی (کانادا و آمریکا)، آمریکای مرکزی (پورتوریکو)، آمریکای جنوبی (شیلی و پرو)، آسیا (چین، ژاپن، روسیه، تایوان و ترکیه) و اقیانوسیه (استرالیا و نیوزلند) گزارش شده است. در ایران نیز از استان های مختلف نظیر گلستان، خوزستان، لرستان، مازندران، اردبیل و آذربایجان غربی ردیابی شده است.

انتقال ا ین ویروس از طریق دانه گرده تنها در مورد شمعدانی گزارش شده و از طریق بذر نیز گاهی در تمشک، گوجه فرنگی، توتون و انگور و بیشتر در گل فندقی ، توت فرنگی، شمعدانی و سویا رقم Lincolnگزارش شده‌است. انتقال توسط سس نیز موفقیت آمیز نبوده است. ToRSVبیشتر از طریق پیوند و انتقال عصاره گیاه آلوده به گیاهان علفی قابل انتقال است. پیوند ریشه نیز ممکن است در انتقال این ویروس نقش داشته باشد ولی مهمترین ناقل این ویروس نماتدها خصوصاً *xiphinemaamericanum*است، هرچند لیستی از نماتدهای دخیل در این پدیده پیشنهاد شده است.

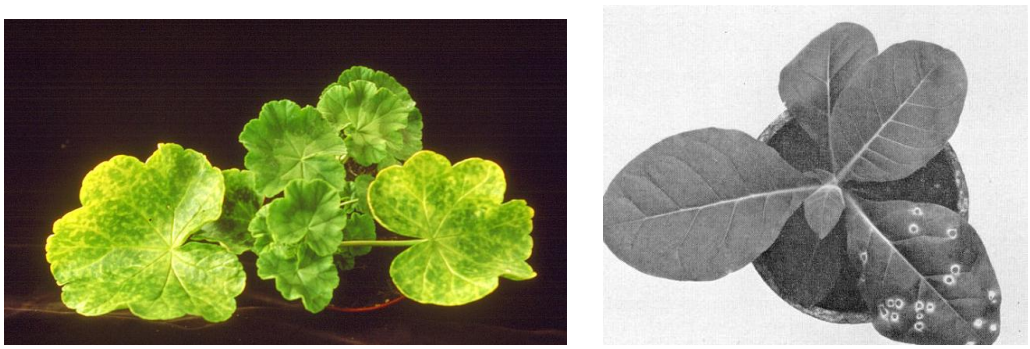
این نماتدها در مرحله لاروی سن 3 و نماتد بالغ قادر به انتقال ویروس بوده و گیرش ویروس و نیز انتقال آن به گیاه سالم هرکدام حدود یک ساعت طول می کشد. *X.americanum* دوره زندگی یکساله داشته و برای مدت طولانی در خاک یخ زده و نیز رطوبت بالا یا پایین دوام نمی آورد و دمای بهینه برا ی تولید مثل آن 24-20 است.

علائم بیماری بسیار متغیر است. طی آلودگی به این ویروس میزان محصول و اندازه میوه ها کاهش می یابد. لکه های حلقوی کلروز روی برگ گیاهان جوان ایجاد شده و با گذشت چندسال نقوش برگی کمی قابل مشاهده خواهد بود ولی برگهای ایجاد شده روی شاخه ه ای جدید بدشکلی و ریزش زودهنگام را نشان خواهند داد. تا سال سوم آلودگی 80-10 درصد شاخه های بارده خواهند مرد . در مورد انگور تشخیص بیماری در ابتدای فصل بسیار دشوار است مگر اینکه درخت ها به شدت آلوده شوند که در این زمان جوانه های سرمازده و ضعیف، لکه ها ی حلقوی و ماتل روی برگ و نیز کاهش اندازه برگ ها و کم شدن فاصله میانگره ها مشاهده می شود . اندازه خوشه های میوه کاهش یافته و بسیاری از حبه ها از بین می روند . با برداشتن پوست تنه و ساقه درختان آلوده بافت آبکش اسفنجی شده و ضخیم با فرورفتگی های متعدد نکروتیک دیده می شود.

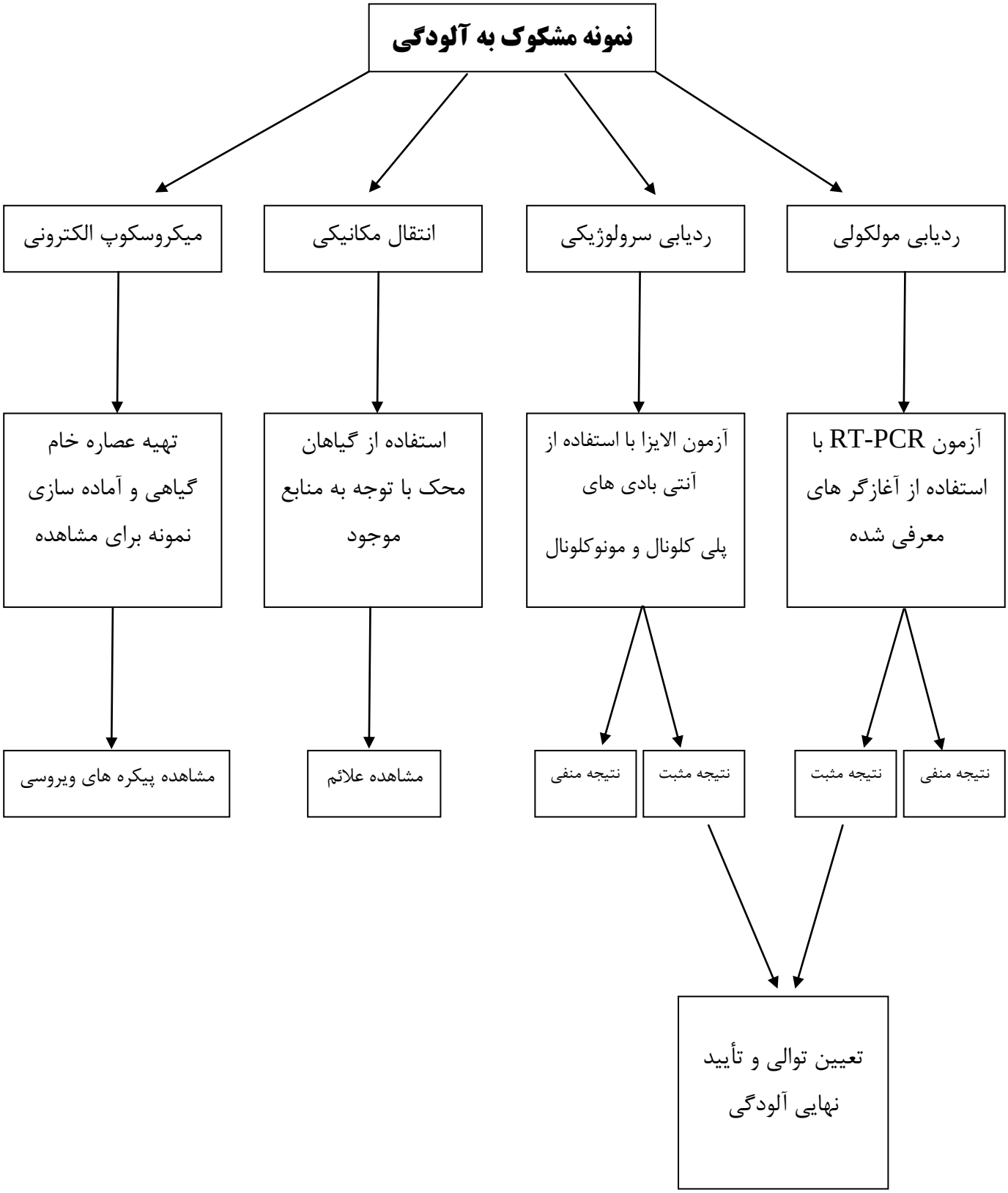
در گوجه فرنگی مزرعه ای علائم نکروز و پیچیدگی مشخص انتهایی یک یا چندشاخه مشهود است . قسمت قاعده ای برگ های جوان تر قهوه ای شده ، حلقه های نکروز و خطوط موجی روی آن پدیدار می شود و حلقه ها و خطوط نکروزه روی برگچه های برگ های نکروزه و بافت ساقه اطراف آنها شکل می گیرد.

اگر میوه ها در مراحل اولیه آلوده شوند به رنگ روشن، خاکستری تا قهوه ای درآمده چوب پنبه ای شده و حلقه ها یا بخشی از حلقه های سطحی و به دنبال آن متحدالمرکز روی آنها ظاهر می شود

در هلو نیز لکه های با حاشیه نامشخص، دوکی شکل، سبزکمرنگ تا زرد روشن در نا حیه رگبرگ اصلی و رگبرگ های کناری برگ ایجاد می شود. جوانه ها نیز برگ های کوچک و اغلب بدشکل با یا بدون ماتل به رنگ زرد روشن ایجاد کرده که نهایتاً از بین می روند. هیچ علائم مشخصی روی گل شناسایی نشده اما میوه ها ممکن است کوتوله و بدشکل شوند. برخی از سویه های ویروس می توانند علائم آبله ای شدن ساقه را در هلو و سایر گونه های هسته داران ایجاد کند.



علائم آلودگی به ToRSV روی گیاه توتون (سمت راست) و گیاه شمعدانی (سمت چپ)



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

انتقال مکانیکی به گونه های علفی می تواند در ردیابی ویروس موثر باشد.*Chenopodiumamaranticolor* و *C.quinoa* زخم های موضعی کلروتیک کوچک و نکروز انتهایی نشان می دهند .خیار لکه های کلروتیک موضعی، کلروز سیستمیک و ماتل نشان می دهد . میزبان های د یگر علفی نظیر توتون، اطلسی و لوبیای معمولی و لوبیاچشم بلبلی هم برای این منظور استفاده می شوند . برای ردیابی ToRSVروی بادام، گیلاس، هلو و آلو گیاهان محک چوبی نظیر هلوی رقم آلبرتا یا رقم GF305و یا *tomentosa* IR 473/1, IR474/1*Prunus* می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

روش سرولوژیکی

روشهای سرولوژیکی نظیر الایزای مستقیم یا غیرمستقیم مشابه سایر ویروس ها از کارآمد ترین روش های ردیابی این ویروس به شمار می رود. کیت های تشخیصی سرولوژیکی ToRSV با استفاده از آنتی بادی های چند همسانه ای توسط شرکت های Bioreba، Agdia، DSMZ و Loewe و همچنین کیت تشخیص سریع آن توسط شرکت Loewe به بازار معرفی شده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی ToRSV معرفی شده است که در ذیل به دو نمونه از آنها اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
ToRSV-U1	GGACGCGTTTGGTCGTTATGATTC	499	ستاری و همکاران، 1391
ToRSV-D1	CGAGCCCTGGAAAAAACGCAATAA		
U1	GACGAAGTTATCAATGGCAGC	499	Griesbach, 1995
D1	TCCGTCCAATCACGCGAAT		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (ستاری و همکاران، 1391)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	2 mM
Forward primer	10 pmol
Reverse primer	10 pmol
dNTPs	0/2 mM
Taq DNA polymerase	3 U
cDNA	2 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش (ستاری و همکاران، 1391)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
4 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
1 دقیقه	94	واسرشته سازی	35
50 ثانیه	54	اتصال آغازگر	
50 ثانیه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (Griesbach, 1995)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	According to instruction
MgCl2	1/5 mM
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
dNTPs	According to instruction
Taq DNA polymerase	1 U
cDNA	2 µl
Sterile water	تا حجم 75 µl

شرایط واکنش (Griesbach, 1995)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
4 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
1 دقیقه	94	واسرشته سازی	35-40
2 دقیقه	55-60	اتصال آغازگر	
2 دقیقه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. ستاری، م.، رخشنده رو، ف. و مظفری، ج. 1391. شناسایی و تعیین پراکنش ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV) دربا غ های درختان میوه استان های گلستان و فارس . مجله دانش گیاهپزشکی ایران. دوره 43، شماره 2، 378-167.
2. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
3. Griesbach, J.A., 1995. Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction. Plant Dis. 79:1054-1056.
4. OEPPO/EPPO, 2001. EPPO Standards PM 3/32, tomato ringspot virus in fruit tree and grapevine – inspection and test methods. OEPPO/EPPO Bulletin 21:245-250.

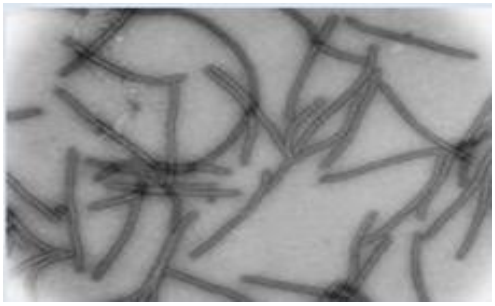
5. www.agdia.com
6. www.bioreba.ch
7. www.dsmz.de
8. www.loewe-info.com

بیماریهای درختان هسته دار

Stone fruit diseases

ویروس آبله آلو (*Plum pox virus*)

ویروس آبله آلو (PPV) ویروسی از جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* دارای پیکره رشته ای در حدود 700*11 نانومتر بوده که از یک RNA تک رشته در حدود 10000 نوکلئوتید با دم Poly A در انتهای '3 و vpg در انتهای '5 تشکیل شده است.



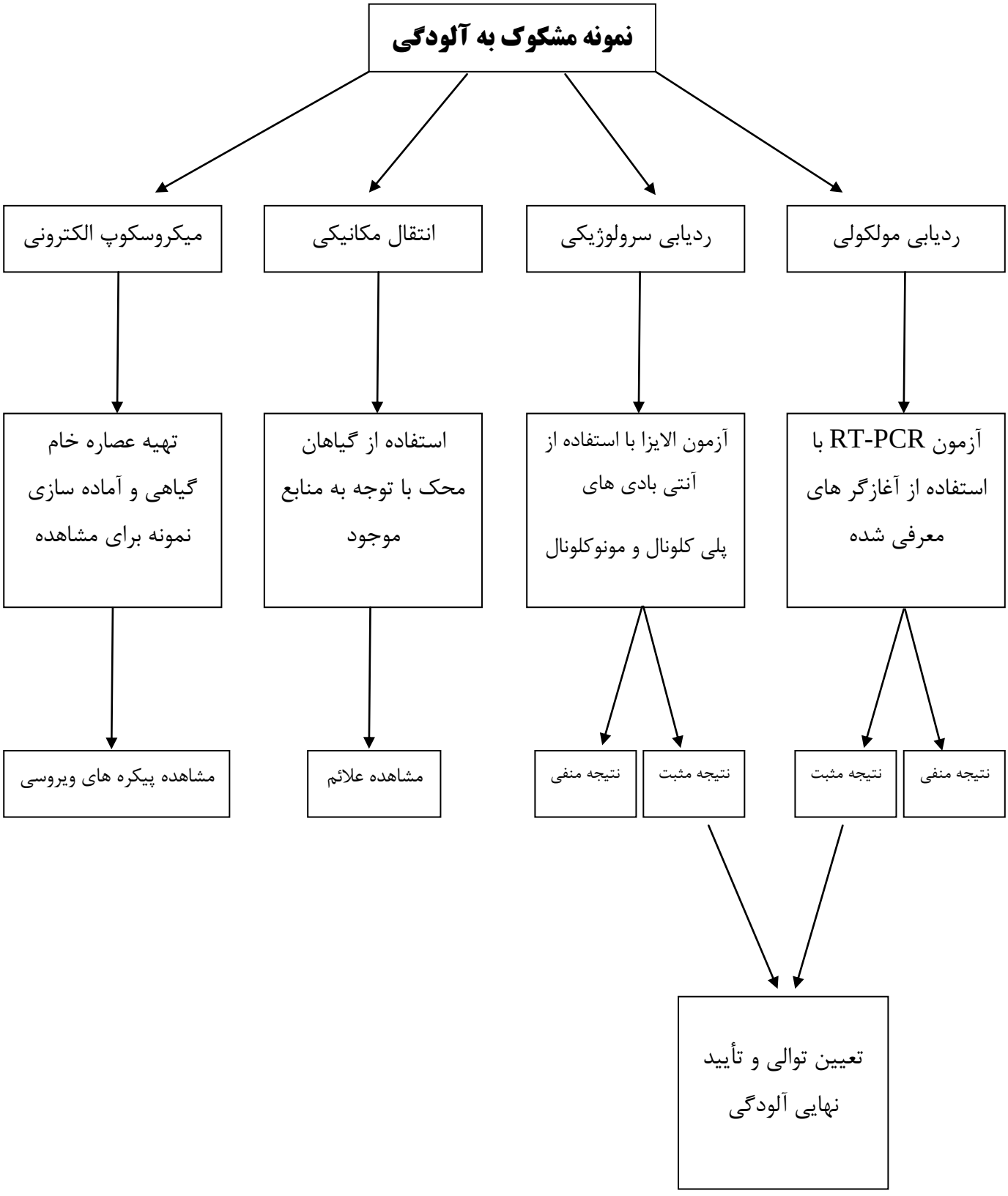
تاکنون آلودگی به PPV از بیساری از کشور های دنیا در اروپا، آسیا، آفریقا و آمریکا گزارش شده است و در ایران نیز ویروس آبله آلو از استان های آذربایجان شرقی، خراسان رضوی، مازندران، اردبیل و تهران ردیابی شده است. در شرایط طبیعی PPV به سادگی گونه های درختان میوه متعلق به جنس *Prunus* را که به عنوان پایه یا ارقام تجاری استفاده می شوند، آلوده می سازد که از آن جمله می توان به زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلوی اروپایی (*P. domestica*)، آلوی ژاپنی (*P. salicina*)، هلو (*P. persicae*)، *P. cerasifera* و *P. mariana* اشاره کرد. آلبالو (*P. cerasus*) و گیلاس (*P. avium*) و بادام (*P. dulcis*) نیز گاهی آلوده می شوند. همچین ویروس اغلب گونه های وحشی یا زینتی جنس *Prunus* را نظیر *P. besseyi*، *P. insititia*، *P. tomentosa*، *P. triloba* و *P. spinosa* آلوده می کند.

علائم ممکن است روی برگها، گلبرگها، میوه ها و حتی هسته میوه ظاهر شود. علائم خصوصاً روی برگها در بهار شفاف و واضح هستند. تغییر رنگ به سمت سبز روشن، لکه های کلروتیک، نوارها یا حلقه ها، شفاف شدن رگبرگها یا زردی و حتی بد شکلی برگها نیز روی می دهد . علائم روی گلبرگ برخی ارقام هلو نیز به صورت تغییر رنگ بروز می کند. میوه های آلوده لکه های کلروتیک یا حلقه ها و خطوط زرد کمرنگ نشان می دهند. میوه ها ممکن است بد شکل شده و یا شکل نا منظمی پیدا کرده و دارای نقاط نکروزه و قهوه ای

می شوند. میوه های بیمار ممکن است از داخل قهوه ای شده و کیفیت آنها کاهش یابد. در برخی موارد میوه های بیمار قبل از بلوغ از درخت ریزش می کنند. در مجموع واریته های زودرس نسبت به بروز علائم در مقایسه با ارقام دیررس بسیار حساس تر می باشند. هسته های زردآلو های بیمار حلقه ها یا لکه های رنگ پریده نشان می دهند.

حداقل 20 نوع شته در انتقال ویروس آبله آلو نقش دارند که از آن جمله می توان به *Aphis fabae*، *A. spiraecola*، *A. gossypii*، *Myzus persicae* و *Brachyaudus persicae* اشاره کرد. PPV به برخی از میزبانهای علفی از طریق عصاره منتقل می شود ولی بذرزاد نیست.

تاکنون نه استرین از این ویروس شامل M، D، Rec، EA، C، W، T، CR و Penn از سراسر دنیا گزارش شده است که برخی از آنها تفاوت هایی را در کارایی انتقال با شته و دیگر خصوصیات نشان می دهند



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

علائم در گیاهان محک به شرح ذیل می باشد:

P. persicae cv. GF305 با علائم روشن شدن رگبرگ ها و پیچیدگی برگها

P. tomentosa با علائم ماتل کلروتیک، زردی رگبرگ، بدشکلی برگها و لکه های نکروزه

P. Marianna cv. GF8.1 با علائم لکه های کلروتیک

P. insititia cv. St. Julien no. 2 با علائم حلقه ها و لکه های کلروتیک

P. domestica K4 هیبرید فوق حساس با علائم ماتل برگ همراه با سبز رنگ پریده، لکه های نکروز برگی و نکروز انتهای شاخه و زوال تدریجی بسته به جدایه ویروسی

C. foetidum با لکه های کلروز، کلرونکروز و یا نکروز بسته به جدایه ویروسی و عدم آلودگی سیستمیک (بهترین میزبان برای لکه موضعی)

N. benthamiana با علائم کوتولگی، موزاییک کلروتیک با نقاط و لکه های سبز تیره

N. clevelandii یا هیبرید *N. glutinosa* با *N. clevelandii* با علائم لکه های موضعی نکروز یا کلروز، ماتل کلروتیک سیستمیک

P. sativum با علائم موزاییک سبز روشن و ماتل کلروز

روش سرولوژیکی

روشهای سرولوژیکی نظیر الایزای مستقیم یا غیرمستقیم مشابه سایر ویروس ها از رایج ترین روش های ردیابی این ویروس به شمار می رود . کیت های تشخیصی سرولوژیکی PPV با استفاده از آنتی بادی های

تک و چند همسانه ای توسط شرکت های Bioreba، Agdia، DSMZ و Loewe و همچنین ایمونواستریپ های تشخیص سریع آن توسط شرکت های Bioreba و Agdia به بازار معرفی شده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی PPV استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) و IC-RT-PCR است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی ویروس آبله آلو معرفی شده است که در ذیل به چند نمونه از آنها اشاره می شود . همچنین کیت تشخیص مولکولی آن (Complete RNA PCR Reaction Kit) توسط شرکت Loewe معرفی و روانه بازار شده است.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع	توضیحات
P1	ACCGAGACCACTACACTCCC	243	Wetzel *et al*., 1992	آغازگر عمومی
P2	CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA			
P1	ACCGAGACCACTACACTCCC	198	Wetzel *et al*., 1992	ردیابی استرین M
PM	CTTCAACAACGCCTGTGCGT			
P1	ACCGAGACCACTACACTCCC	198	Wetzel *et al*., 1992	ردیابی استرین D
PD	CTTCAACGACACCCGTACGG			

مواد واکنش

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2 (25 mM)	1/5 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
dNTPs (25 mM)	1/25 µl
Taq DNA polymerase	1 U
cDNA	2 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش

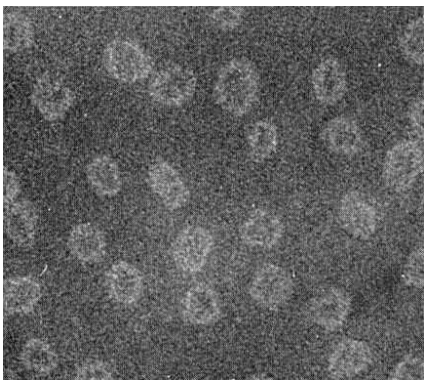
مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
45 دقیقه	42	ساخت cDNA	1
2 دقیقه	92	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	92	واسرشته سازی	40
30 ثانیه	60	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. شیرازی، م.، صفرنژاد، م.ر.، رخشنده رو، ف. و زمانی زاده، ح.ر. 1394. ردیابی و تعیین خصوصیات مولکولی ژن پروتئین پوششی سه جدایه ایرانی ویروس آبله آلو (*Plum pox virus*). مجله آفات و بیماری های گیاهی. جلد 83. شماره 1. 62-51.
2. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
3. OEPP/EPPO. 2004. Normes OEPP/EPPO Standards. Bulletin OEPP/EPPO, No. 34: 247–256.
4. Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. and Dunez, J. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain–reaction method for plum pox potyvirus detection. J. Virol. Methods, 39, 27–37.
5. www.agdia.com
6. www.bioreba.ch
7. www.dsmz.de
8. www.loewe-info.com

ویروس کوتولگی هسته داران (*Prune dwarf virus*)

ویروس کوتولگی هسته داران (PDV)، ویروسی از جنس *Ilarvirus* و خانواده *Bromoviridae* دارای یک ژنوم سه بخشی و پیکره گرد تا باسیلی شکل به قطر 23-22 نانومتراست.



این ویروس در بین گونه های درختان میوه هسته دار به طور گسترده ای در سراسر دنیا گسترده شده است و ازمیزبان های اصلی آن می توان به بادام تلخ، زردآلو، گیلاس، آلوی میروبالان، آلبالو، آلو، بادام شیرین، آلوی محلب، هلو، آلوی ژاپنی و آلوی سیاه اشاره کرد و از میزبان های وحشی آن گوجه وحشی، گیلاس خوشه ای و گونه های زالزالک می باشند.

از علائم ناشی از این ویروس می توان به ماتل و زردی، نقوش خطی در برگ و لکه های قرمز رنگ روی میوه گیلاس،زردی برگ و کوتولگی در هلو، ماتل و خطوط کلروتیک یا لکه های حلقوی در آلو و تغییر شکل و لکه های حلقوی رنگ پریده در آلوی محلب اشاره کرد. اگر چه ویروس در درختان آلوده پراکنده شده است اما علایم ممکن است محدود به یک شاخه یا بخشی از درخت باشد . حالت Blind wood هم معمولاً در درختان 25 ساله و بالاتر دیده می شود. تولید میوه کاهش یافته و میوه های تشکیل شده که عمدتاً در حاشیه خارجی درخت تشکیل می شود و معمولاً بزرگتر و سفت تر از میوه های رشد یافته درون تاج درخت است.

وجود ویروس در گرده درختانی نظیر گیلاس، بادام، آلو و زردآلو گزارش شده است. دانه و گرده دو راه اصلی انتقال طبیعی PDV خصوصاً در گیلاس، آلبالو و آلوی محلب به شمار می روند . این ویروس همچنین از طریق پیوند و انتقال مکانیکی نیز منتقل می شود ولی از طریق تماس بین دو گیاه قابلیت انتقال ندارد.

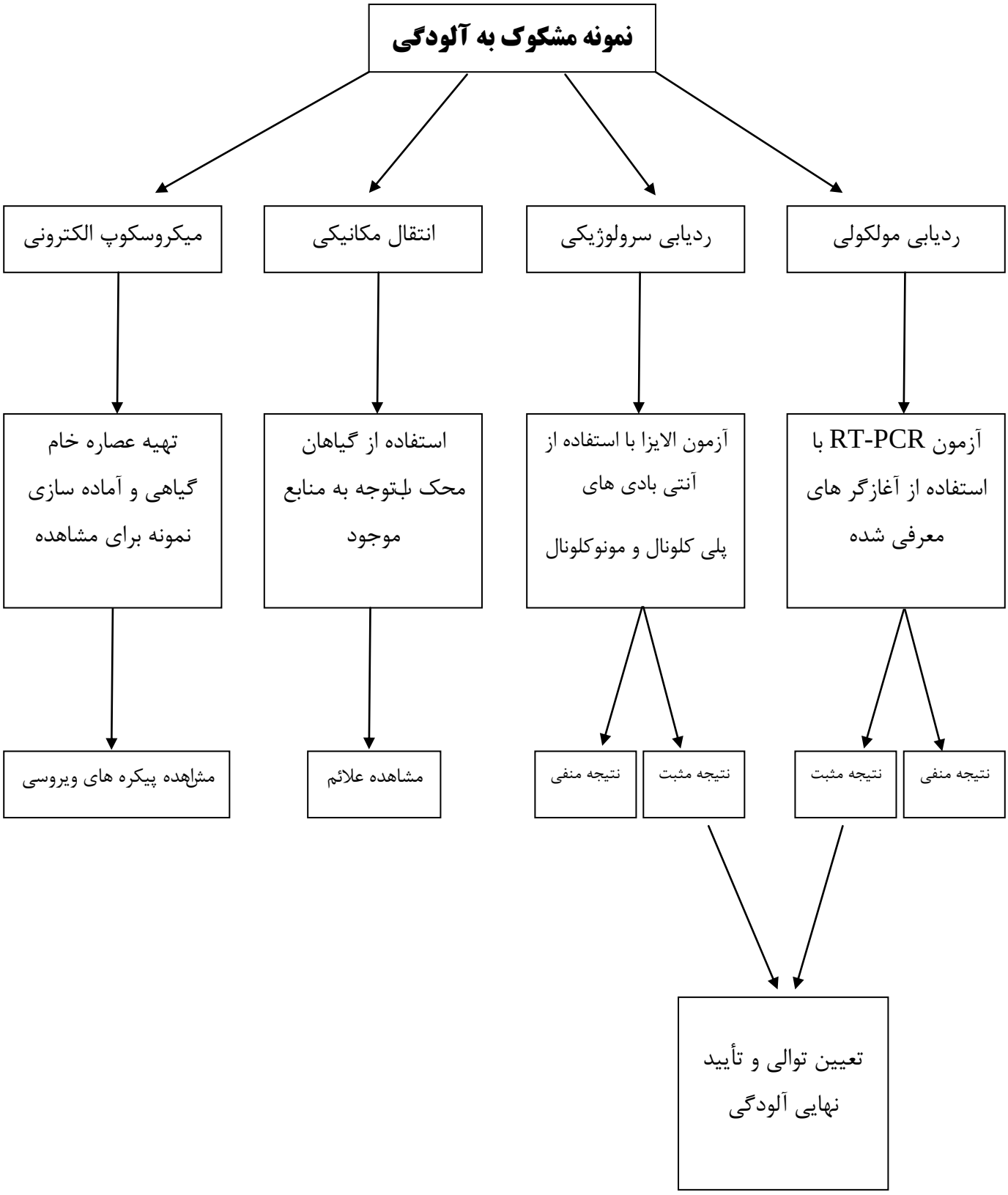
ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

از گونه های تشخیصی این ویروس می توان به *Cucumis sativus*، *Cucurbita maxima* cv. Buttercup، *Sesbania exaltata*، *Crotalaria spectabilis*، *Momordica balsamina*، *Tithonia speciosa* و *Prunus serrulata* cv. Shirofugen اشاره کرد.

روش سرولوژیکی

روشهای سرولوژیکی نظیر الایزای مستقیم یا غیرمستقیم با استفاده از کیت های تشخیصی سرولوژیکی PDV با آنتی بادی های چند همسانه ای معرفی شده توسط شرکت های Bioreba، Agdia و Loewe از رایج ترین روش های تشخیصی ویروس کوتولگی هسته داران به شمار می رود . همچنین کیت تشخیص سریع آن توسط شرکت Loewe به بازار معرفی شده است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

روش مولکولی

تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی مولکولی PDV بر اساس روش مولکولی RT-PCR معرفی شده است که در ذیل به دو نمونه از آنها اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول قطعه (bp)	منبع
Forward	TAG TGC AGG TTA ACC AAA AGG AT	172	Youssef *et al*., 2002
Reverse	ATG GAT GGG ATG GAT AAA ATA AT		
PDV v2	CCGGATTG ATATCTCGTACCGAG	622	Osman *et al*., 2012
PDV c	TAGTGCAGGTTAACCAAAAGGAT		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (Youssef *et al*., 2002)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	5 µl
MgCl2 (25 mM)	3 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
dNTPs(10 mM)	1 µl
Ampli *Taq* Gold DNA polymerase	2/5U
cDNA	5 µl
Sterile water	تا حجم 50 µl

شرایط واکنش (Youssef *et al*., 2002)

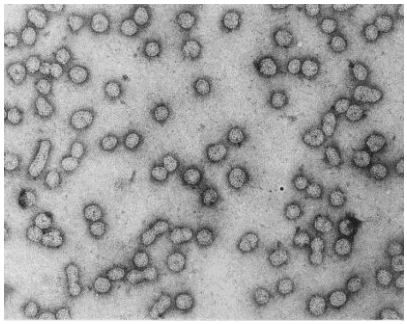
مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
13 دقیقه	95	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	30
30 ثانیه	62	اتصال آغازگر	
45 ثانیه	72	گسترش	
7 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Osman F., Al Rwahnih M., Golino D., Pitman T., Cordero F., Preece J.E., Rowhani A., 2012a. Evaluation of the phytosanitary status of the Prunus species in the National Clonal Germplasm Repository in California: survey of viruses and viroids. Journal of Plant Pathology 94: 249-253.
2. www.dpvweb.net
3. Youssef, S.A., Shalaby, A.A., Mazyad, H.M. and Hadidi, A. 2002. Detection and identification of *Prune dwarf virus* and *Plum pox virus* by standard and multiolex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA). Journal of Plant Pathology, 84 (2): 113-119.
4. www.agdia.com
5. www.bioreba.ch
6. www.loewe-info.com

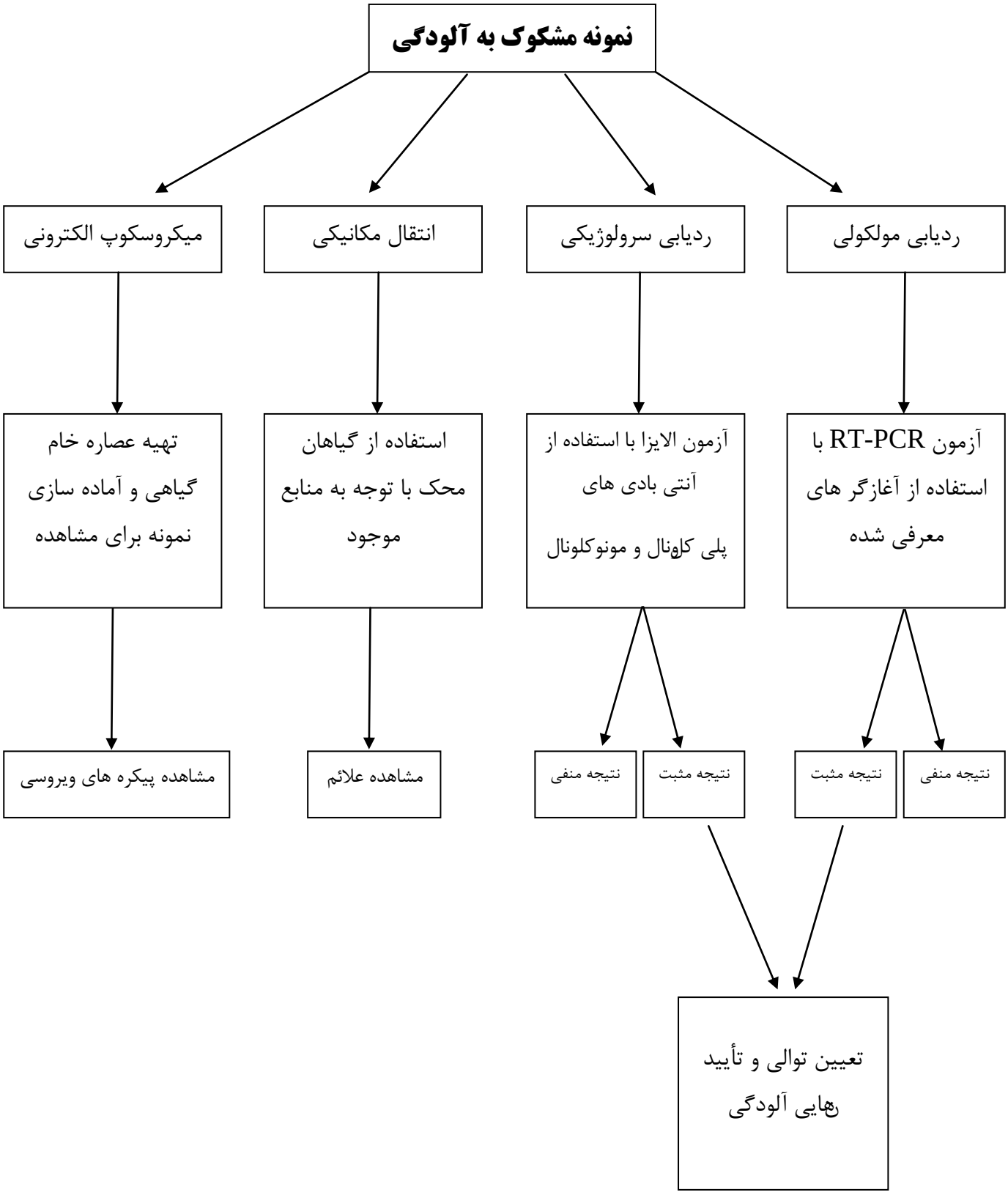
ویروس لکه حلقوی نکروتیک هسته داران (*Prunus necrotic ringspot virus*)

ویروس لکه حلقوی نکروتیک هسته داران (PNRSV)، ویروسی از جنس *Ilarvirus* و خانواده *Bromoviridae* با پیکره ایزومتریک به قطر تقریبی 23 نانومتر و ژنوم از نوع RNA می باشد.



علائم بیماری شامل ایجاد لکه های حلقوی نکروزه در بسیاری از گونه های جنس *prunus* است که اغلب به دنبال آن علائم از بین می رود. در گیلاس موجب موزاییک روگوز، علائم کالیکو در بادام و موزایی ک در رز می شود و در گیاه رازک بدون علائم بوده یا با موزاییک نواری و حلقوی ه مراه است. برخی از سروتیپ ها و استرین های ویروس نقوش خطی در آلو ایجاد می کنند.

PNRSV دامنه میزبانی نسبتاً گسترده ای در بین گیاهان دولپه ای داشته (21خانواده) و ناقل حشره ای برای آن معرفی نشده است ولی گزارشاتی از انتقال توسط نماتد *Longidorus macrosoma* و کنه *Vasates fockeui* وجود دارد. این ویروس قابلیت انتقال مکانیکی نیز دارد هرچند پایداری پیکره های آن پایین است. یکی دیگر از راه های انتقال PNRSV انتقال توسط دانه گرده و بذر می باشد . این ویروس در ایران از مناطق مختلف از جمله دشت مغان گزارش شده است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

علائم در گیاهان محک به شرح ذیل می باشد:

خیار: زخم های اولیه کلروتیک، مرگ سیستمیک جوانه انتهایی و به دنبال آن کوتولگی شدید و توقف رشد جوانه های جانبی

Momordica balsamina: زخم های اولیه نکروتیک که گاهی نکروز سیستیک می شود.

Cyamopsis teragonoloba: زخم های موضعی بزرگ و تیره و نکروز رگبرگی سیستمیک

از گونه های تکثیری ویروس لکه حلقوی نکروتیک هسته داران می توان به هلو، آلوی محلب و پروانش اشاره کرد.

روش سرولوژیکی

این ویروس رابطه سرولوژیکی نزدیکی با ویروس نقش خطی آلوی دانمارکی و همچنین ارتباط سرولوژیکی کمتری با ویروس موزاییک رز و ویروس موزاییک سیب دارد که منجر به نقش خطی در آلو می شوند و گاهی اوقات حضور آن همراه با ویروس کوتولگی هسته داران (PDV) است، اگر چه هیچ ارتباط سرولوژیکی با هم ندارند.

استفاده از کیت های تشخیصی سرولوژیکی PNRSV بر اساس الایزا با استفاده از آنتی بادی های چند همسانه ای تولید شده توسط شرکت های Bioreba، Agdia، DSMZ و Loewe از رایج ترین روش های تشخیصی این ویروس به شمار می رود.

روش مولکولی

استفاده از روش های مولکولی نظیر واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با استفاده از آغازگر های اختصاصی جهت ردیابی PNRSV یکی از مهمترین و کارآمد ترین روش های تشخیصی به شمار می روند.

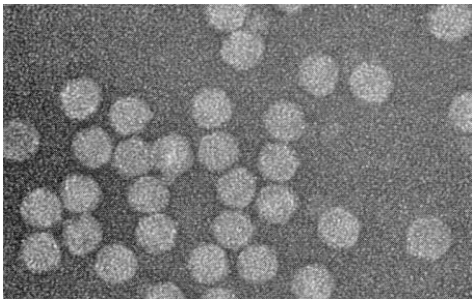
نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
PNRSV1425 F	GACTTCACGACCACTCTCCCTC	380	Osman *et al*., 2012
PNRSV1805 R	CTAGATCTCAAGCAGGTCTTCATCG		

منابع

1. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
2. Osman, F., Al Rwahnih, M., Golino, D., Pitman, T., Cordero, F., Preece, J.E., Rowhani, A., 2012. Evaluation of the phytosanitary status of the Prunus species in the National Clonal Germplasm Repository in California: survey of viruses and viroids. Journal of Plant Pathology, 94: 249-253.
3. www.agdia.com
4. www.bioreba.ch
5. www.dpvweb.net
6. www.dsmz.de
7. www.loewe-info.com

ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (*Tomato ringspot virus*)

ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV) ویروسی از جنس *Nepovirus* و خانواده *Comoviridae* است. این ویروس دارای پیکره ایزومتریک با حاشیه زاویه دار و البته ناپایدار حاوی یک RNA تک رشته بوده و حدود 28 نانومتر قطر دارد.



این ویروس که بعضاً با نام TomRSV نیز نامیده می شود به طورطبیعی در بسیاری از درختان چوبی و گیاهان زینتی دیده می شود و همچنین میزبانهای علفی شامل تمشک، *Rubuslaciniatus*، انگور، سیب، هلو، گیلاس و سایر هسته داران ، انگور فرنگی، توت فرنگی، گل ادریسی، گلایول ، شمعدانی و *Fraxinusamericana* نیز از میزبان های دیگر آن به شمار می روند.

دامنه میزبانی آزمایشی این ویروس نیز بسیار گسترده است و گونه هایی متعلق به بیش از 35 خانواده تک لپه و دولپه ای نسبت به ToRSV حساس هستند. بسیاری از علف های هرز نظیر گل قاصدک نیز می توانند به عنوان ذخیره گاه ویروس عمل کنند. علف قناری نیز به عنوان میزبانی بدون علائم معرفی شده است.

ToRSVدر حال حاضر در بسیاری از کشورهای اروپایی (بلغارستان، آلمان، ایتالیا، اسلواکی، اسلوونی، ترکیه، روسیه و سوئد)، آمریکای شمالی (کانادا و آمریکا)، آمریکای مرکزی (پورتوریکو)، آمریکای جنوبی (شیلی و پرو)، آسیا (چین، ژاپن، روسیه، تایوان و ترکیه) و اقیانوسیه (استرالیا و نیوزلند) گزارش شده است. در ایران نیز از استان های مختلف نظیر گلستان، خوزستان، لرستان، مازندران، اردبیل و آذربایجان غربی ردیابی شده است.

انتقال این ویر وس از طریق دانه گرده تنها در مورد شمعدانی گزارش شده و از طریق بذر نیز گاهی در تمشک، گوجه فرنگی، توتون و انگور و بیشتر در گل فندقی ، توت فرنگی، شمعدانی و سویا رقم Lincolnگزارش شده‌است. انتقال توسط سس نیز موفقیت آمیز نبوده است. ToRSVبیشتر از طریق پیوند و انتقال عصاره گیاه آلوده به گیاهان علفی قابل انتقال است. پیوند ریشه نیز ممکن است در انتقال این ویروس نقش داشته باشد ولی مهمترین ناقل این ویروس نماتدها خصوصاً *xiphinemaamericanum*است، هرچند لیستی از نماتدهای دخیل در این پدیده پیشنهاد شده است.

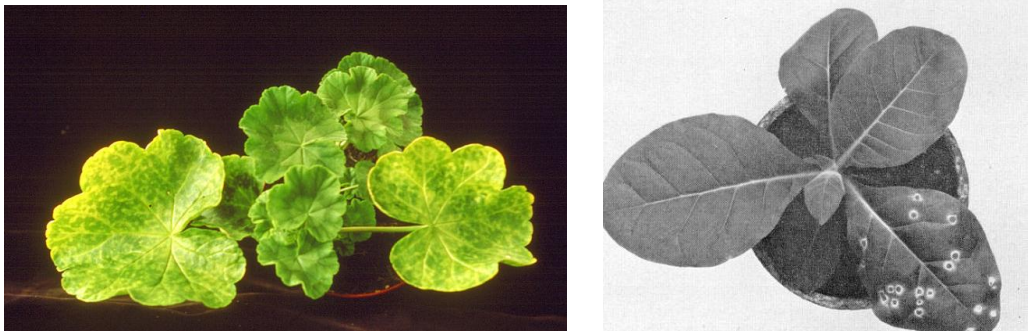
این نماتدها در مرحله لاروی سن 3 و نماتد بالغ قادر به انتقال ویروس بوده و گیرش ویروس و نیز انتقال آن به گیاه سالم هرکدام حدود یک ساعت طول می کشد. *X.americanum* دوره زندگی یکساله داشته و برای مدت طولانی در خاک یخ زده و نیز رطوبت بالا یا پایین دوام نمی آورد و دمای بهینه برای تولی د مثل آن 24-20 است.

علائم بیماری بسیار متغیر است. طی آلودگی به این ویروس میزان محصول و اندازه میوه ها کاهش می یابد. لکه های حلقوی کلروز روی برگ گیاهان جوان ایجاد شده و با گذشت چندسال نقوش برگی کمی قابل مشاهده خواهد بود ولی برگهای ایجاد شده روی شاخه های جدی د بدشکلی و ریزش زودهنگام را نشان خواهند داد. تا سال سوم آلودگی 80-10 درصد شاخه های بارده خواهند مرد . در مورد انگور تشخیص بیماری در ابتدای فصل بسیار دشوار است مگر اینکه درخت ها به شدت آلوده شوند که در این زمان جوانه های سرمازده و ضعیف، لکه ها ی حلقوی و ماتل روی برگ و نیز کاهش اندازه برگ ها و کم شدن فاصله میانگره ها مشاهده می شود . اندازه خوشه های میوه کاهش یافته و بسیاری از حبه ها از بین می روند . با برداشتن پوست تنه و ساقه درختان آلوده بافت آبکش اسفنجی شده و ضخیم با فرورفتگی های متعدد نکروتیک دیده می شود.

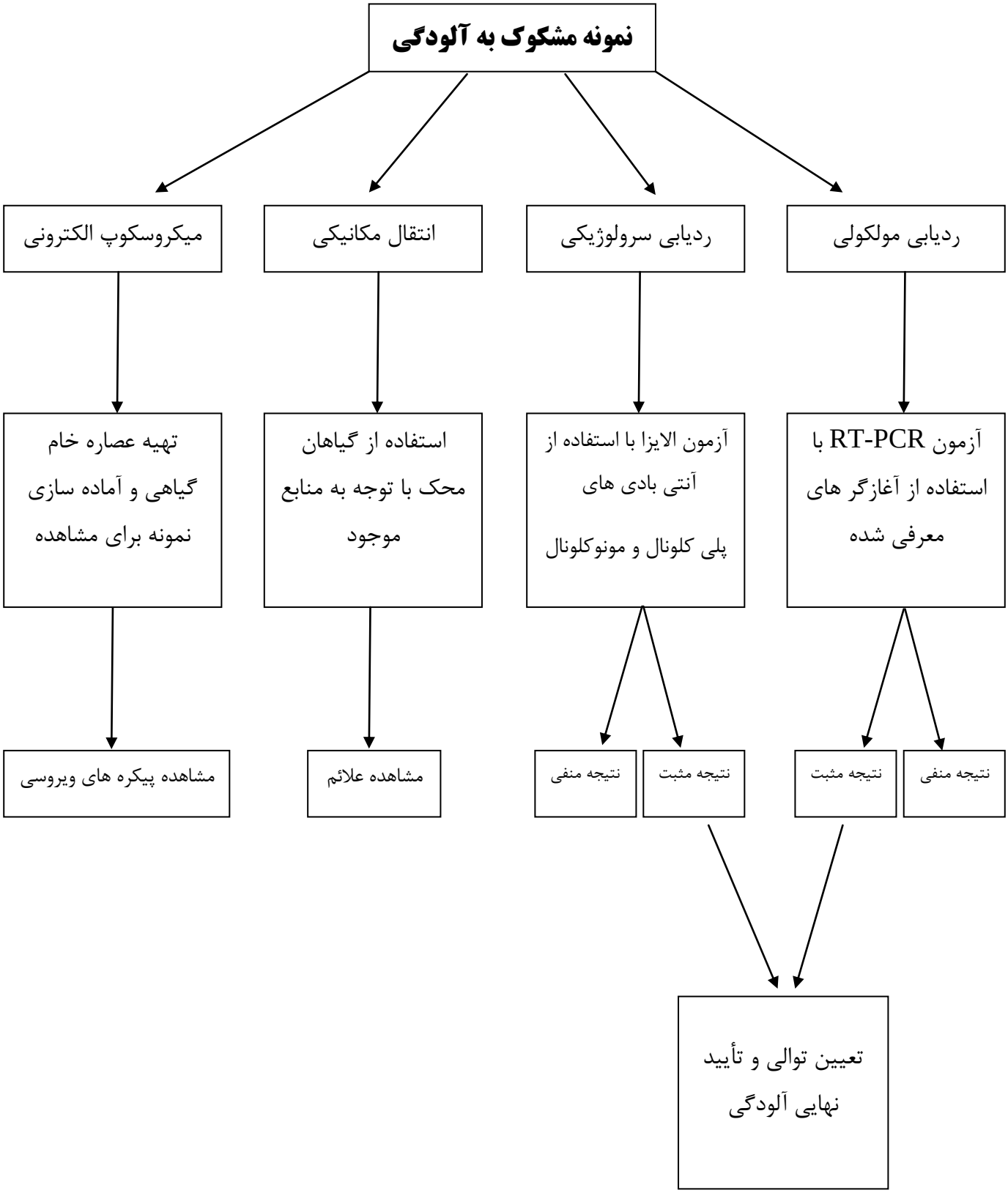
در گوجه فرنگی مزرعه ای علائم نکروز و پیچیدگی مشخص انتهایی یک یا چندشاخه مشهود است . قسمت قاعده ای برگ های جوان تر قهوه ای شده ، حلقه های نکروز و خطوط موجی روی آن پدیدار می شود و حلقه ها و خطوط نکروزه روی برگچه های برگ های نکروزه و بافت ساقه اطراف آنها شکل می گیرد.

اگر میوه ها در مراحل اولیه آلوده شوند به رنگ روشن، خاکستری تا قهوه ای درآمده چوب پنبه ای شده و حلقه ها یا بخشی از حلقه های سطحی و به دنبال آن متحدالمرکز روی آنها ظاهر می شود

در هلو نیز لکه های با حاشیه نامشخص، دوکی شکل، سبزکمرنگ تا زرد روشن در ناحیه رگ برگ اصلی و رگبرگ های کناری برگ ایجاد می شود. جوانه ها نیز برگ های کوچک و اغلب بدشکل با یا بدون ماتل به رنگ زرد روشن ایجاد کرده که نهایتاً از بین می روند. هیچ علائم مشخصی روی گل شناسایی نشده اما میوه ها ممکن است کوتوله و بدشکل شوند. برخی از سویه های ویروس می توانند علائم آبله ای شدن ساقه را در هلو و سایر گونه های هسته داران ایجاد کند.



علائم آلودگی به ToRSV روی گیاه توتون (سمت راست) و گیاه شمعدانی (سمت چپ)



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

انتقال مکانیکی به گونه های علفی می تواند در ردیابی ویروس موثر باشد.*Chenopodiumamaranticolor* و *C.quinoa* زخم های موضعی کلروتیک کوچک و نکروز انتهایی نشان می دهند .خیار لکه های کلروتیک موضعی، کلروز سیستمیک و ماتل نشان می دهد . میزبان های دیگر علفی نظیر توتون، اطلسی و لوبیای معمولی و لوبیاچشم بلبلی هم برای این منظور استفاده می شوند . برای ردیابی ToRSVروی بادام، گیلاس، هلو و آلو گیاهان محک چوبی نظیر هلوی رقم آلبرتا یا رقم GF305و یا *tomentosa* IR 473/1, IR474/1*Prunus* می تواند مورد استفاده قرار گیرد

روش سرولوژیکی

روشهای سرولوژیکی نظیر الایزای مستقیم یا غیرمستقیم مشابه سایر ویروس ها از کارآمد ترین روش های ردیابی این ویروس به شمار می رود. کیت های تشخیصی سرولوژیکی ToRSV با استفاده از آنتی بادی های چند همسانه ای توسط شرکت های Bioreba، Agdia، DSMZ و Loewe و همچنین کیت تشخیص سریع آن توسط شرکت Loewe به بازار معرفی شده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی ToRSV معرفی شده است که در ذیل به دو نمونه از آنها اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
ToRSV-U1	GGACGCGTTTGGTCGTTATGATTC	499	ستاری و همکاران، 1391
ToRSV-D1	CGAGCCCTGGAAAAAACGCAATAA		
U1	GACGAAGTTATCAATGGCAGC	499	Griesbach, 1995
D1	TCCGTCCAATCACGCGAAT		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (ستاری و همکاران، 1391)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	2 mM
Forward primer	10 pmol
Reverse primer	10 pmol
dNTPs	0/2 mM
Taq DNA polymerase	3 U
cDNA	2 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش (ستاری و همکاران، 1391)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
4 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
1 دقیقه	94	واسرشته سازی	35
50 ثانیه	54	اتصال آغازگر	
50 ثانیه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز (Griesbach, 1995)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	According to instruction
MgCl2	1/5 mM
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
dNTPs	According to instruction
Taq DNA polymerase	1 U
cDNA	2 µl
Sterile water	تا حجم 75 µl

شرایط واکنش (Griesbach, 1995)

تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	واسرشته سازی اولیه	94	4 دقیقه
35-40	واسرشته سازی	94	1 دقیقه
	اتصال آغازگر	55-60	2 دقیقه
	گسترش	72	2 دقیقه
1	گسترش نهایی	72	10 دقیقه

منابع

1. ستاری، م.، رخشنده رو، ف. و مظفری، ج. 1391. شناسایی و تعیین پراکنش ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (ToRSV) دربا غ های درختان میوه استان های گلستان و فارس . مجله دانش گیاهپزشکی ایران. دوره 43، شماره 2، 378-167.
2. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
3. Griesbach, J.A., 1995. Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction. Plant Dis. 79:1054-1056.
4. OEPPO/EPPO, 2001. EPPO Standards PM 3/32, tomato ringspot virus in fruit tree and grapevine – inspection and test methods. OEPPO/EPPO Bulletin 21:245-250.
5. www.agdia.com
6. www.bioreba.ch

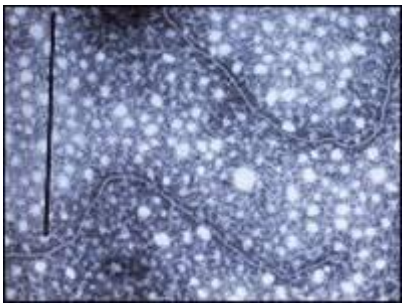
7. www.dsmz.de
8. www.loewe-info.com

بیماری های مرکبات

Citrus diseases

ویروس تریستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus*)

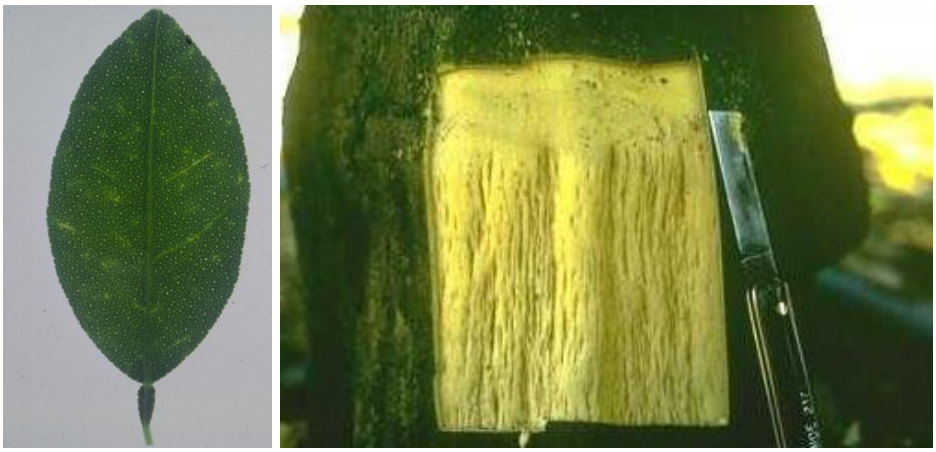
ویروس تریستزای مرکبات (CTV) که به نام ویروس زوال سریع مرکبات، ویروس زردی نهال مرکبات و ویروس ساقه آبله ای گریپ فروت و ویروس سرخشکیدگی لیمو نیز شناخته می شود، ویروسی از جنس *Closterovirus* وخانواده *Clostroviridae* دارای پیکره رشته ای بلند به طول 2000 و عرض 12 نانومتر و دارای ژنوم از نوع RNA تک رشته به طول تقریبی $6/5\times10^6$ است.



ویروس تریستزای مرکبات در سراسر نواحی گرمسیری کشت مرکبات گسترده شده است . در ایران نیز حضور این ویروس از مناطق شمالی و برخی مناطق جنوبی کشور گزارش شده است. CTV همه گونه ها، کولتیوارها و هیبریدهای مرکبات را آلوده می کند . همچنین برخی خویشاوندان مرکبات نیز نظیر *Pamburus*، *Fortunella* ، *Afraegle* و *Aeglopsis* نیز توسط این ویروس آلوده می شوند.

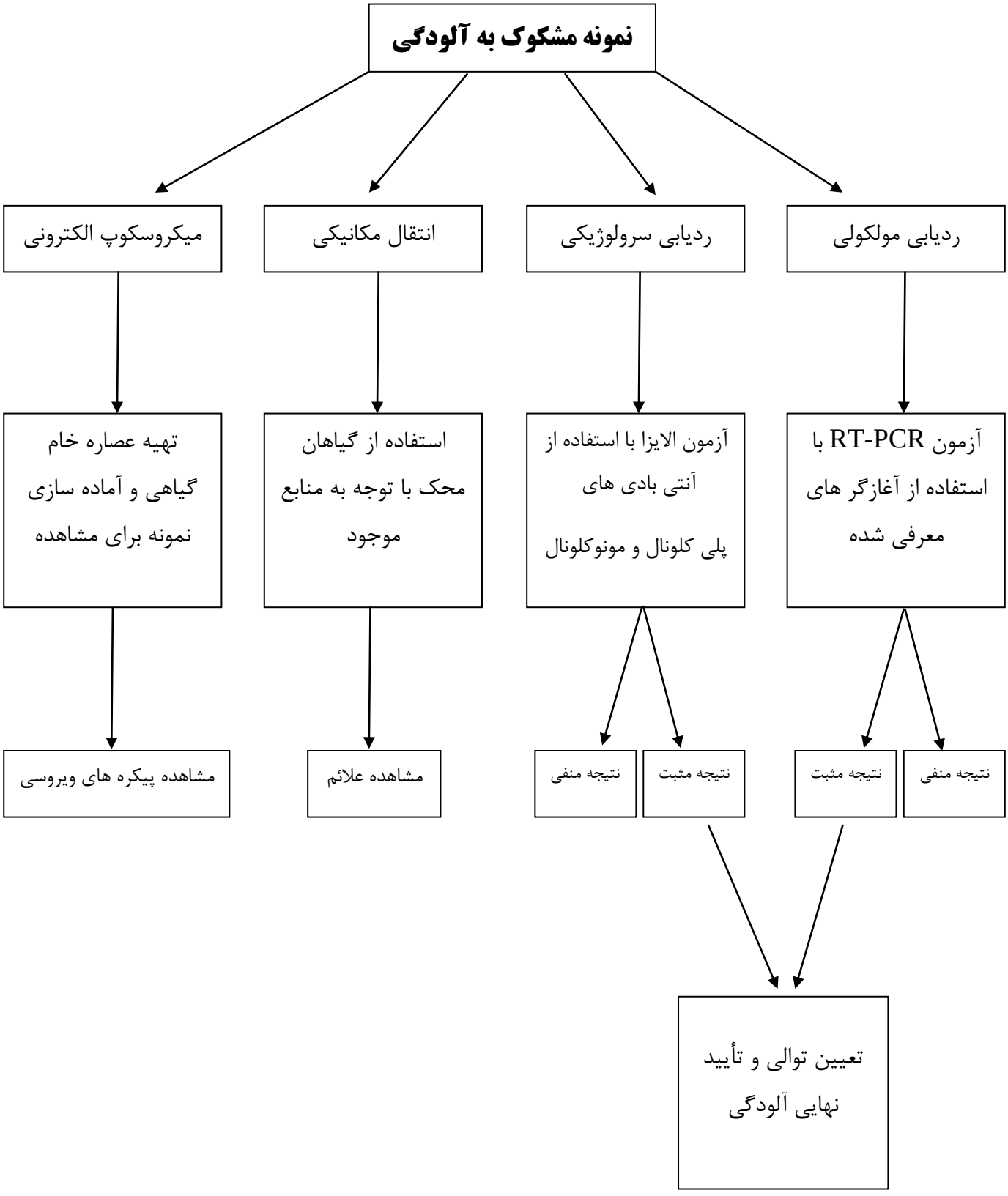
درختان پیوند شده روی پایه های نارنج معمولاً سرخشکیدگی سریع و خزان، کوتولگی و در بسیاری از موارد زوال کامل را نشان می دهند. این گونه علائم ناشی از ضعف سیستم ریشه به دلیل نکروز لوله های غربالی ناشی از ویروس در ناحیه زیر منطقه پیوند می باشد. سلول های ناحیه مغزی چوب، لیگنی شده و تولید علائم موسوم به آبله ای معکوس، شانه عسلی یا سوراخ می کند. به هر صورت این علائم اختصاصی تریستزا نبوده و توسط *Spiroplasma* هم ایجاد می شود. CTV همچنین ایجاد ساقه آبله ای، کوتولگی و کاهش رشد و عملکرد در کولتیوارهای حساس اغلب لیمو، گریپ فروت و گاهی پرتقال می شود حتی اگر این ارقام روی پایه های متحمل به تریستزا پیوند شده باشند. آلودگی کولتیوارها و شدت علائم به سویه ویروس

وابسته است برخی از سویه های شدید ممکن است موجب ساقه آبله ای در اغلب کولتیوارهای مرکبات شوند. میوه درختان آلوده (درختان در حال زوال پیوند شده روی نارنج یا درختان با علائم ساقه آبله ای شدید) میوه های کوچک و بی کیفیت تولید می کنند.



ناقلین شته ای از عوامل گسترش منطقه ای CTV بوده و اگر همراه با درختان مرکبات یا میوه باشند می توانند به عامل توسعه بین المللی CTV عمل کنند. تریستزا توسط چرخین گونه شته به طریقه نیمه پایا منتقل می شود *Toxoptera* مهمترین ناقل آن است. *Aphis gossypii* که در باغات مرکبات رایج نیست هم از کارآمدترین ناقلین CTV به شمار می رود. *Toxoptera aurantii* هم که در باغات مرکبات شایع است از کارایی کمتری برخوردارند. تکثیر مرکبات از طریق پیوندک های آلوده مهمترین وسیله انتقال تر یستزا به شمار می آیند.

سویه های مختلفی از CTV براساس تفاوت در بروز ملایم در میزبانهای مختلف، قابلیت انتقال باشته، الگوهای dSRNA، نقشه های پپتیدی و واکنش سرولوژیکی با آنتی بادی های تک همسانه ای توصیف شده اند.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

نهال های لیموترش برای تست های بیولوژیکی به عنوان محک استفاده می شوند . این درختان محک با جوانه ها یا قطعات پوست درختان مشکوک پیوند شده و در گلخانه های با دمای 25-18 درجه سانتیگراد نگهداری می شوند. گیاهان آلوده علائم رگبرگ روشنی خاص و ساقه آبله ای را طی 6-2 ماه بروز می دهند.

روش سرولوژیکی

CTV همچنین می تواند توسط روش الایزا مورد ردیابی قرار گیرد. آنتی بادی های تک همسانه ای و چند همسانه ای اختصاصی این ویروس به صورت تجاری برای این ویروس در دسترس بوده و در سراسر دنیا به صورت روتین برای ردیابی استفاده می شوند. کیت های تشخیص سرولوژیکی CTV توسط شرکت های Bioreba، Agdia، DSMZ و Loewe و همچنین ایمونو استریپ تشخیص سریع آن توسط شرکت Agdia به بازار معرفی شده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی CTV معرفی شده است که در ذیل به یک نمونه از رایج ترین آنها اشاره می شود. همچنین کیت کامل ردیابی مولکولی آن (Complete RNA PCR Reaction Kit) توسط شرکت Loewe تولید شده است.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
CTV1	ATGGACGACGAAACAAAGAA	672	Papayannis *et al*, 2007
CTV10	ATC AACGTGTGTTGAATTTCC		

مواد واکنش One step RT-PCR

نوع ماده	مقدار
Tris pH 8.8	10mM
KCl	50mM
Nonidet P-40	٪0/08
MgCl2	2mM
dNTPs	200µM
RNAguard	7/5 U
Forward primer	200nM
Reverse primer	200nM
Dream *Taq* DNA polymerase	1 U
RNA	2 mg
MuLV reverse transcriptase	7/5 U
Sterile water	تا 50µl

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
45 دقیقه	38	ساخت cDNA	
2 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	35
30 ثانیه	52	اتصال آغازگر	
45 ثانیه	72	گسترش	
5 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
2. OEPP/EPPO. 1990. Data sheets on quarantine pests. No. 93, Citrus tristeza virus. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.

3. Papayiannis L.C., Santos, C. Kyriakou, A. Kapari T. and Nolasco, G. 2007. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from Cyprus on the basis of the coat protein gene. Journal of Plant Pathology, 89, 291–295.
4. www.agdia.com
5. www.bioreba.ch
6. www.dsmz.de
7. www.loewe-info.com

ویروئید اگزوکورتیس مرکبات (*Citrus exocortis viroid*)

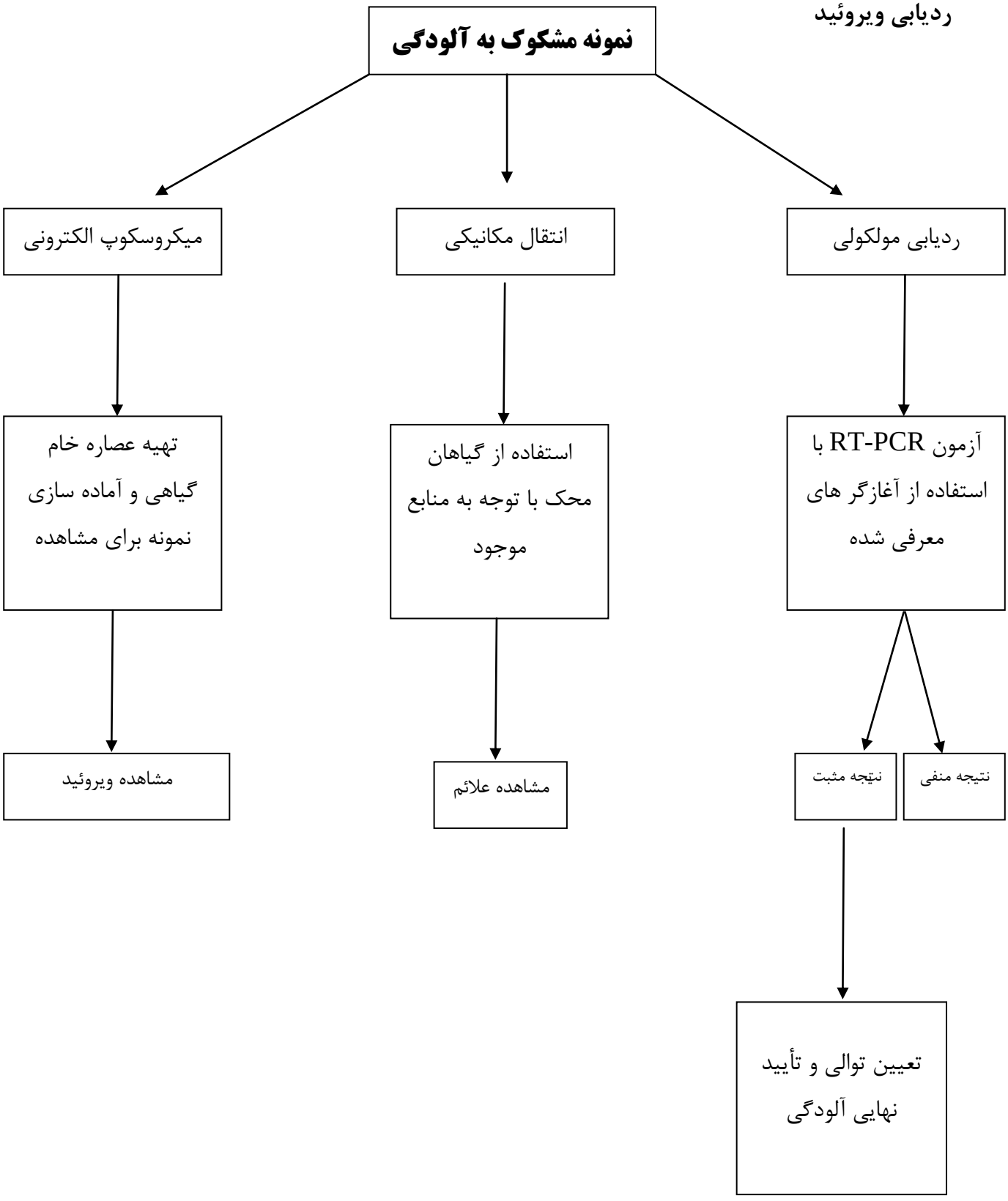
ویروئید اگزوکورتیس مرکبات (CEVd) ویروئیدی از جنس *Pospiviroid* از خانواده *Pospiviroidae* است که در واقع یک RNA تک رشته کوچک بدون پوشش پروتئینی می باشد.

این ویروئید در بسیاری از مناطق کشت مرکبات که پایه های حساس در آنجا کشت شده ، وجود دارد و پراکنش آن در آمریکای جنوبی و شمالی، شمال آفریقا، استرالیا و حوزه مدیترانه گزارش شده است و در ایران نیز از استان هایی نظیر مازندران و خوزستان ردیابی شده است.

عامل بیماری در مرکبات باعث جداشدن پوست، پوسته ای شدن و تکه تکه شدن پوست پایه های حساس می شود و از این رو واژه اگزوکورتیس که به معنای مرتبط بودن با پوست بیرونی است به این بیماری اطلاق می شود. درختان رشد یافته روی پایه های حساس کوتوله شده و عملکرد کاهش می یابد . در گونه های محک توقف رشد شدید و پیچیدگی برگ به سمت پایین نیز معمول است.

دامنه میزبانی شدیداً وابسته به خانواده مرکبات *Rutacea* است، اگر چه برخی از گونه های *solanaceae* (سیب زمینی و گوجه فرنگی و اطلسی) و Compositae (*Gynura saramentosa* و *G. aurantiaca*) نیز حساس هستند.

انتقال ویروئید توسط ناقل طبیعی و بذر گزارش نشده است و انتقال توسط پیوند و سس صورت می گیرد.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

تست بیولوژیکی

پرتقال پیوند شده روی نارنج سرو برگی بین یک تا دو سال پس از پیوند علائم معمول بیماری شامل جداشدن پوست، پوسته ای شدن و تکه تکه شدن پوست را نشان داده و سبزینگی درخت کاهش یافته و منجر به توقف رشد و کاه‌ش عملکرد می شود.

در بالنگ علائم اپی ناستی و روگوز در برگ ها، شکاف برداشتن و قهوه ای شدن سطح زیر ین رگبرگ ها و کوتولگی شدید 3 تا 6 هفته پس از پیوند یا مایه زنی مشاهده می شود.

در *Gynura aurantiaca* و گوجه فرنگی هم که یک گیاه محک علفی است علائم مشابه بالنگ است با این تفاوت که بین 3 تا 10 روز پس از مایه زنی علائم قابل مشاهده است.

روش سرولوژیکی

به دلیل نداشتن پوشش پروتئینی استفاده از روش های سرولوژیکی در ردیابی ویروئید ها کارایی ندارد.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین و مهمترین روش های ردیابی ویروئید ها استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با استفاده از آغازگر های اختصاصی است که در ذیل به یک جفت آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی CEVd اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
Sense	GGAAACCTGGAGGAAGTCG	369-375	Eiras *et al*., 2006
Anti sense	CCGGGGATCCCTGAAGGA		

شرایط واکنش

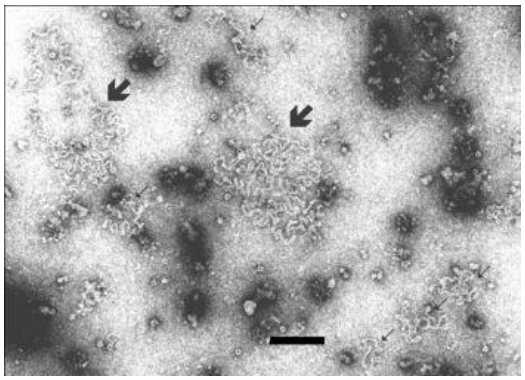
تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	واسرشته سازی اولیه	94	2 دقیقه
35	واسرشته سازی	94	40 ثانیه
	اتصال آغازگر	60	30 ثانیه
	گسترش	72	1 دقیقه
1	گسترش نهایی	72	10 دقیقه

منابع

1. Eiras, M., Targon, M.L.P.N., Fajardo, T.V.M., Flores, R. and Kitajima, E.W. 2006. *Citrus exocortis viroid* and *Hop Stunt viroid* Doubly Infecting Grapevines in Brazil. Fitopatol. Bras. 31(5): 440-446.
2. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
3. www.dpvweb.net

ویروس پسوروز مرکبات (*Citrus psorosis virus*)

ویروس پسوروز مرکبات (CPV) ویروسی از جنس *Ophiovirus* و خانواده *Ophioviridae* دارای پیکره شدیداً پیچ خورده، شبه مارپیچ و رشته ای حلقوی کوچک به طول تقریبی 760-690 نانومتر و قطر رشته 3 نانومتر می باشد که در برخی پیکره ها تا چهار برابر بزرگتر است. ژنوم ویروس از نوع RNA تک رشته سه بخشی بوده که هر کدام در یک پوشش پروتئینی جداگانه قرار گرفته اند.



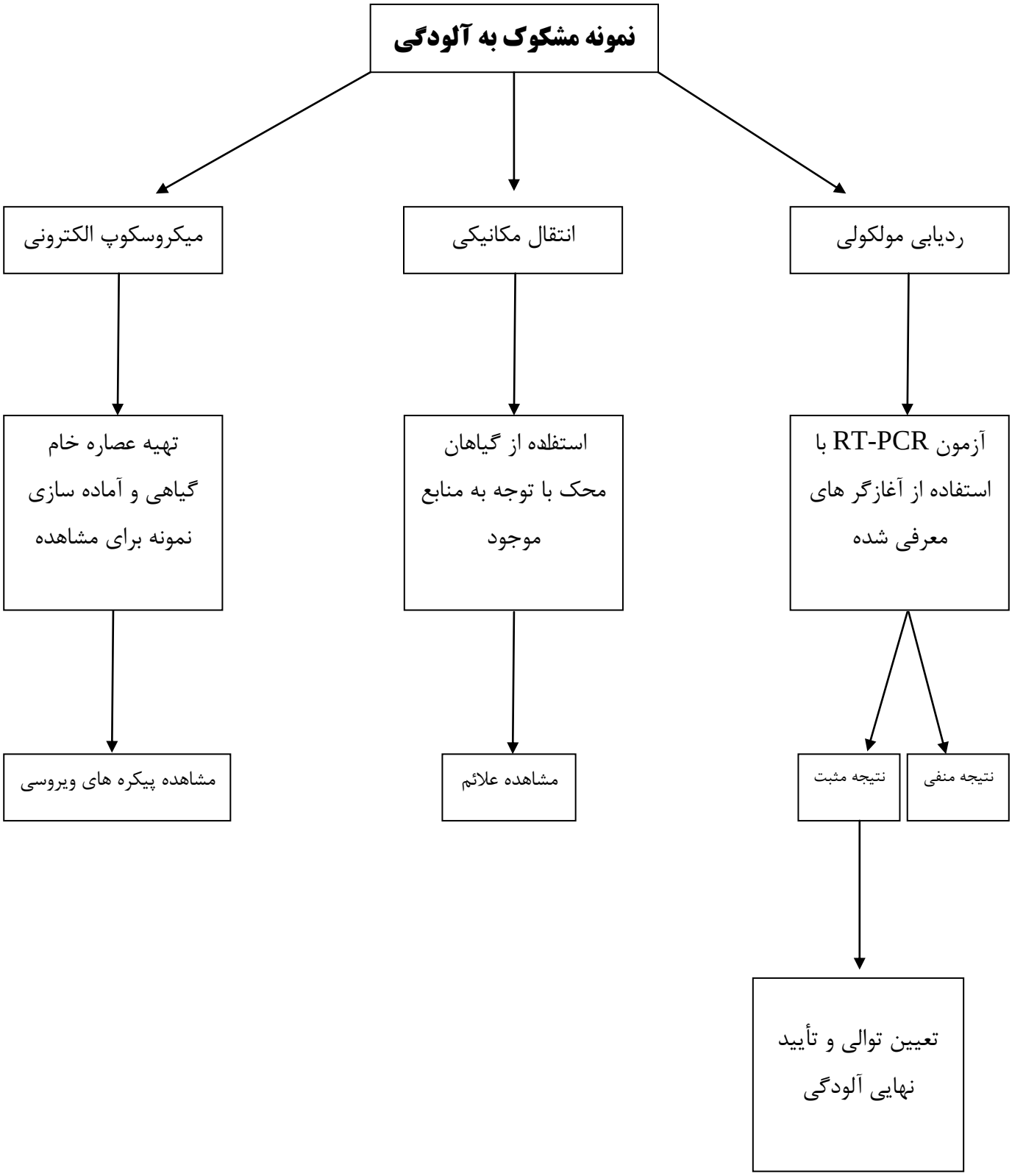
علائم پسوروز در اغلب مناطق کشت مرکبات در سراسر دنیا دیده شده اما با بررسی های بیولوژیکی ، سرولوژیکی و مولکولی حضور آن در آمریکای شمالی و جنوبی، آفریقای جنوبی و حوزه مدیترانه تأیید نشده است.

پوسته ای شدن پوست تنه و شاخه از مهمترین علائم پسوروز است . همچنین ممکن است تجمع صمغ در زیر ناحیه پوسته شده اتفاق افتاده و منجر به تغییر رنگ بافت آوند چوب و انسداد آوند شود . نقاط کلروتیک در برگهای جوان در بسیاری از هیبریدها و گونه های مرکبات که به صورت آزمایشی مایه زنی شده اند مشاهده شده است. تاکنون حداقل دو واریانت A و B برای این ویروس شناسایی شده است. درختان آلوده شده توسط واریانت B علائم لکه های کلروتیک در برگهای قدیمی با پوسته ای شدن همراه با ترشح صمغ در قسمت های پایینی درخت، لکه های حلقوی یا نامنظم اغلب فرورفته نشان می دهند که گاهی هم روی پوسته خارجی میوه دیده می شود. درختان تکثیر شده از طریق پیوند جوانه های آلوده به واریانت B به شدت کوتوله شده و بعد از 6-3 سال دچار مرگ می شوند. از دیگر علائم پسوروز واکنش موسوم به شوک

در درختان آلوده است که طی آن ریزش برگ همراه با نکروز شاخه در جست اول اتفاق افتاده و نقاط لکروتیک برگی در جست های بعدی رخ می دهد.

از میزبان های پسوروز می توان به پرتقال، نارنج، لیموشیرین، گریپ فروت و بسیاری دیگر از انواع مرکبات اشاره کرد.

انتقال از طریق ناقل طبیعی، بذر و دانه گرده گزارش نشده است ولی پسوروز A قابلیت انتقال با سس را دارد. همچنین پیوند و نقل و انتقال اندام های آلوده از مهمترین عوامل منتقل کننده پسوروز به شمار می روند. انتقال مکانیکی نیز تحت شرایط خاص به برخی گیاهان علفی گزارش شده است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

از گونه های تشخیصی این ویروس می توان به نهال پرتقال رقم Mme. vinous یا Pine apple با علائم شوک و نقاط کلروتیک در برگه‌ای جوان، *Chenopodium quinoa* با علائم زخم های موضعی کلروتیک و سپس نکروتیک پس از گذشت 10-4 روز و *Gomphrena globosa* (گل فندقی) با علائم زخم های موضعی نکروزه با هاله قرمز رنگ پس از گذشت 10 روز به دنبال آن نکروز سیستمیک اشاره کرد.

روش سرولوژیکی

تاکنون کیت های تشخیصی سرولوژیکی CPV توسط شرکت های تولید کننده این کیت ها نظیر Bioreba، Agdia، DSMZ و Loewe به بازار معرفی نشده است.

روش مولکولی

یکی از مطمئن ترین روش های ردیابی، استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی CPV معرفی شده است که در ذیل به دو نمونه از آنها اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول قطعه (bp)	منبع
CPV1	GCTTCCTGGAAAAGCTGATG	600	Barthe *et al*, 1998
CPV2	TCTGTTTTTGTCAACACACTCC		
Cons1	ACAAAGAAATTCCCTGCAAGGG	434	Kayim, 2010
Cons2	AAGTTTCTATCATTCTGAAACCC		

شرایط واکنش (Barthe *et al*, 1998)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
1 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	35
30 ثانیه	50	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
5 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

مواد واکنش (Kayim, 2010)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	3 mM
Forward primer	0/5µM
Reverse primer	0/5µM
dNTPs	200 µM
Taq DNA polymerase	1U
cDNA	0/5 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش (Kayim, 2010)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
1 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	35
30 ثانیه	50	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
5 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Barthe, G.A., Ceccardi, T.L., Mantunath, K.L. and K.S., Derrick. 1998. *Citrus psorosis virus*: Nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. Journal of general virology. Vol. 79 (6): 1531-1537.
2. Kayim, M. 2010. Biological and Molecular Detection of Citrus Psorosis Virus in Citrus in the Eastern Mediterrenean Region of Turkey. J. Plant Biochemistry & Biotechnology, Vol. 19(2), 259-262.
3. www.agdia.com
4. www.bioreba.ch
5. www.dpvweb.net
6. www.dsmz.de
7. www.loewe-info.com

بیماری میوه سبز مرکبات (Huanglongbing)

بیماری میوه سبز مرکبات (Huanglongbing, HLB) یا بیماری شاخه زرد (در زبان چینی به معنی بیماری اژدهای زرد) اولین بار در نواحی جنوبی چین در قرن نوزدهم میلادی معرفی شد و در طی چندسال در بسیاری از نواحی کشت مرکبات در آسیا و آفریقا و اخیراً آمریکا به عنوان مخربترین بیماری باکتریایی مرکبات توصیف شده است. HLB در بیش از 50 کشور در آسیا، آفریقا، اقیانوسیه و آمریکا وجود دارد اما به نظر می رسد کشورهای تولیدکننده مرکبات در حوزه مدیترانه هنوز آلوده به این بیماری نشده اند.

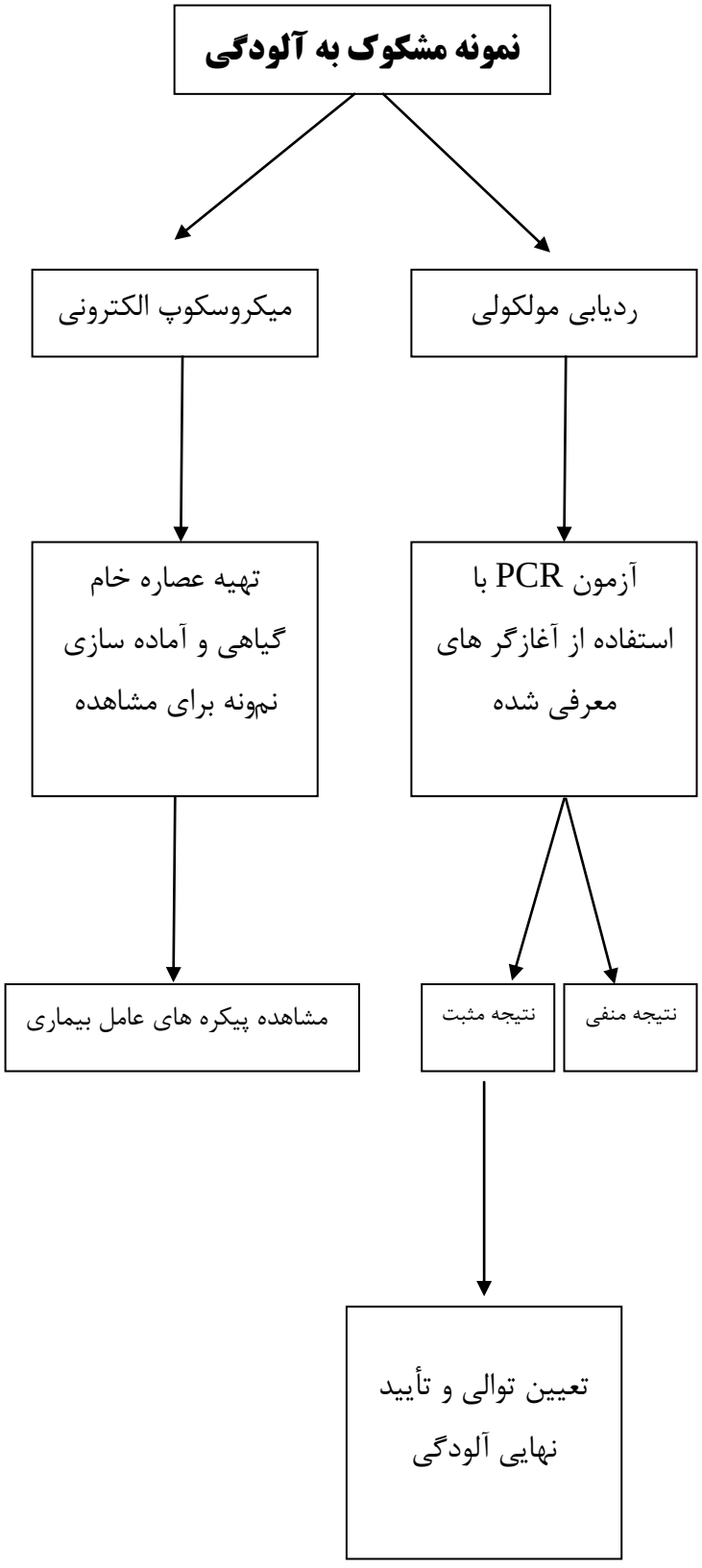
همه کولتیوارها و گونه های تجاری مرکبات بدون در نظر گرفتن نوع پایه نسبت به این بیماری حساس هستند. این بیماری با سه گونه باکتری های محدود به آوند آبکش که به *Candidatus* Liberibacter تعلق دارند، همراه بوده است. هرکدام از این گونه ها نام خود را از قاره ای که برای اولین بار از آنجا گزارش شده بود، گرفته اند. *Ca*. Liberibacter africanus به گرما حساس بوده و توسط پسیلی با نام *Trioza erytreae* که اغلب در آفریقا مشاهده می شود، منتقل می گردد . *Ca*. Liberibacter asiaticus و *Ca*. Liberibacter americanus توسط پسیل *Diaphorina citri* که بیشتر در آسیا و آمریکا یافت می شود منتقل می شود.گزارشاتی نیز از نقش دوپسیل *Cacopsilla citrisuga* و *Diaphorina communis* در انتقال عامل بیماری در چین وجود دارد. انتقال اندام های گیاهی آلوده نقش مهمی در انتشار این عامل بیماریزا داشته است. همچنین توسط سس (*Cuscuta campestris*) به گیاهان علفی انتقال می یابد.انتقال توسط بذر هنوز به اثبات نرسیده است هر چند گزارشاتی از ردیابی آن در بذر نهال مرکبات وجود دارد.

از نظر تاکسونومیکی این باکتری از خانواده *phyllobacteriaceae* وراسته *Rhizobiales* بوده و تاکنون در روی محیط کشت رشد داده نشده است.

علائم بیماری HLB می تواند روی اغلب گونه های مرکبات و خویشاوندان آنها مشاهده شود. علائم اصلی در برگها، شاخه ها و میوه ها ظاهر می شود. مراحل اولیه آلودگی از طریق ایجاد یک یا چند شاخه زرد در یک درخت خود را نشان می دهد. در برخی از درختان تنها یک شاخه زرد وجود دارد و با گذشت زمان این

شاخه به یک شاخه بزرگتر زرد تبدیل می شود. بسیاری از برگها علائم موسوم به ماتل لکه ای نشان می دهند که در دو طرف برگ حالت متقارن ندارد. اینها شاخص ترین علائم آلودگی به HLB در زمان وقوع بیماری هستند. این حالت عدم تقارن از کمبود موادغذایی که حالت متقارن دارد، قابل تفکیک است . تمام سطح پهنک برگ به طور غیریکنواختی زرد شده و حالت ضخیم و چربی به خود گرفته و رگبرگ های جانبی کشیده متورم و حالت کرکی پیدا می کنند . در مراحل پایانی بیما ری زردی کل تاج درخت را دربرگرفته، ریزش برگها و مرگ سرشاخه ها اتفاق می افتد.

HLB علائم بسیار مشخصی را در میوه ایجاد شده روی شاخه های زرد ایجاد می کند . میوه های آلوده کوچک، نامتقارن با خمیدگی محور میوه بوده و در زمان تغییررنگ میوه انتهای دم میوه زرد یا نارنجی شده در حالیکه طرف مقابل سبز می ماند و این حالت عکس فرم طبیعی تغییررنگ میوه است . همچنین هنگامی که میوه آلوده را برش عمودی زده دانه های ناقص قهوه ای تا سیاه کوچک مشابه بیماری استابورن مرکبات قابل مشاهده است و دستجات آوندی درون میوه و در ناحیه ساقه ای آن دارای رنگ قهوه ای مشخص است. گاهی اوقات پوست ناحیه آلبیدو در ناحیه ساقه ای ضخیم تر از ناحیه مقابل است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجی ره ای پلیمراز (PCR) است . تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی مولکولی عامل این بیماری معرفی شده است که در ذیل به یک نمونه از رایج ترین آنها اشاره می شود. همچنین شرکت Agdia کیت تشخیص سریعی را بر مبنای تکثیر DNA (Amplify RP®) برای ردیابی عامل میوه سبز مرکبات معرفی کرده است.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3'-5')	طول قطعه (bp)	منبع
A2	TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT	asiaticus: 703 africanus: 669	Hocquellet *et al*, 1999
J5	ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	2/5 mM
Forward primer (10µM)	1µl
Reverse primer (10µM)	1µl
dNTPs	0/2 mM each
Taq DNA polymerase	0/5 U
DNA	1 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش

تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	واسرشته سازی اولیه	94	3 دقیقه
35	واسرشته سازی	92	45 ثانیه
	اتصال آغازگر	62	45 ثانیه
	گسترش	72	1/5 دقیقه
1	گسترش نهایی	72	5 دقیقه

منابع

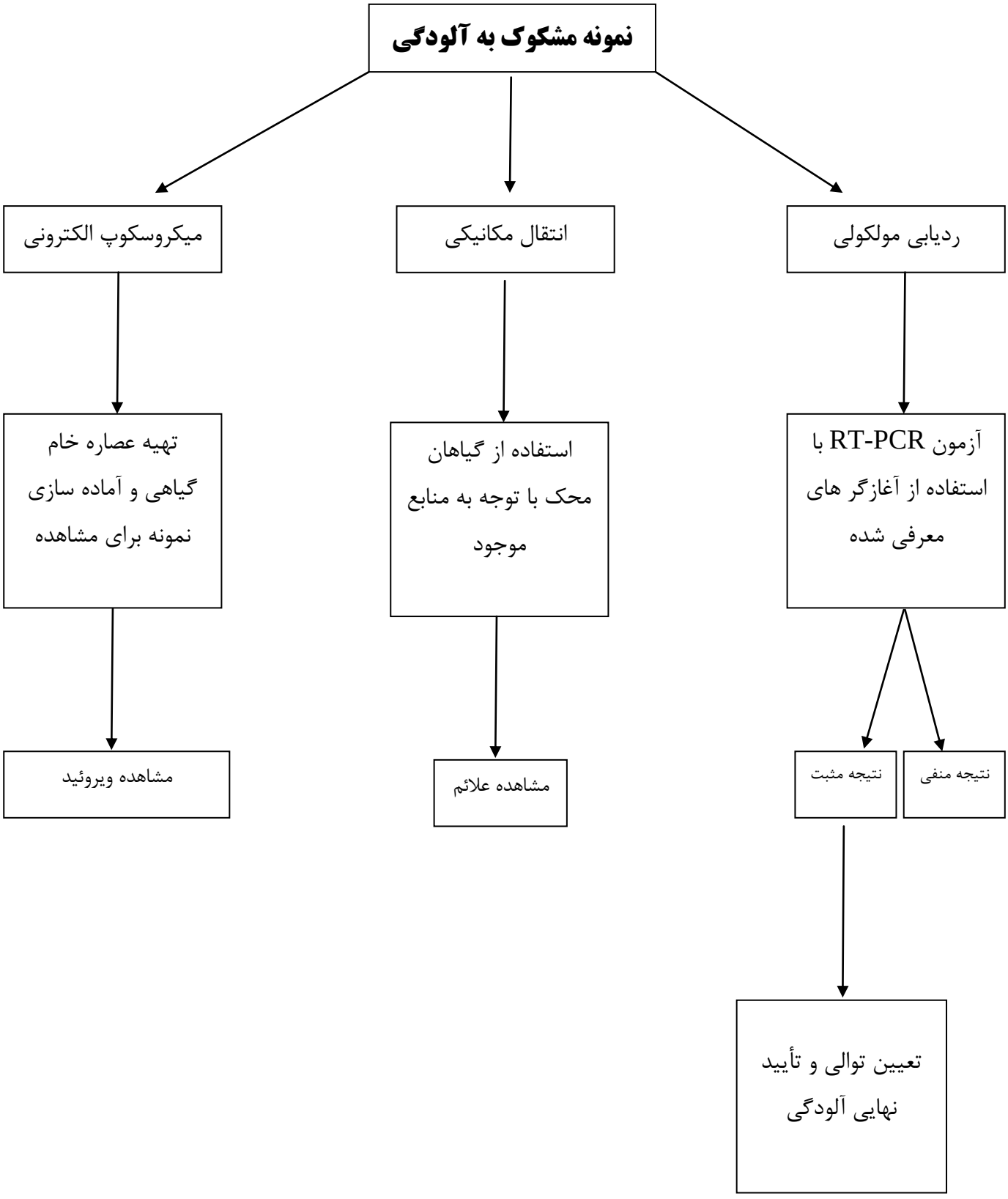
1. Hocquellet, A., Toorawa, P., Bov_e, J.M. and Garnier, M. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus* Liberobacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the b operon. Molecular and Cellular Probes, 13, 373–379.
2. OEPP/EPPO. 2014. PM 7/121 (1) '*Candidatus* Liberibacter africanus', '*Candidatus* Liberibacter americanus' and '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'. Bulletin OEPP/EPPO, No. 44 (3), 376–389.
3. www.agdia.com

ویروئید کوتولگی رازک (*Hop stunt viroid*)

ویروئید کوتولگی رازک (HSVd) ویروئیدی از جنس *Hostuviroid* خانواده *Pospiviroidae* شامل یک RNA تک رشته خطی یا حلقوی است که تقریباً در تمامی باغات رازک در نواحی شمالی منطقه Mainland ژاپن وجود دارد..

علایم در گیاه رازک شامل کوتولگی گیاه کوتاه شدن فاصله میانگره های شاخه اصلی و جانبی زردی و پیچیدگی برگهای بالایی است. ساقه اصلی گیاه رازک آلوده تنها حدود 50 سانتی متر ارتفاع دارد که این مقدار تنها 60٪ ارتفاع یک گیاه سالم است. عملکرد 50٪ کاهش می یابد. HSVd به عنوان عامل بیماری کوتولگی رازک شناخته شده است هرچند می تواند باعث بیماری رنگ پریدگی میوه خیار، زایلو پروزیس مرکبات، بیماری کچکسایی مرکبات، بیماری خال زدگی میوه آلو و هلو، و رشد مجدد زردآلو شود . HSVd همچنین با بیماری پوست صمغی مرکبات در پرتقال، بیماری رگبرگ کرکی زرد مرکبات و اختلال تکه تکه شدن پوست درخت لیموشیرین همراه است.

ویروئید کوتولگی رازک قابلیت انتقال با ناقل طبیعی، سس و دانه را نداشته و از طریق مکانیکی منتقل می شود. این ویروئید در مناطق مختلف دنیا شامل اروپا، آسیا، آفریقا آمریکای شمالی و جنوبی و اقیانوسیه پراکنده شده است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

تست بیولوژیکی

Benincasa hispida با علائم کوتولگی، موزائیک، پیچیدگی برگ و نکروز انتهایی و گاهاً مرگ گیاه) و *cucumis sativus* cv. suyo با علائم کوتولگی، رگبرگ روشنی، پیچیدگی برگ به سمت پایین بعد از 28-14 روز در دمای 32-25 درجه سانتی گراد از گیاهان محک مورد استفاده در تشخیص بیولوژیکی این ویروئید می باشد.

روش سرولوژیکی

به دلیل نداشتن پوشش پروتئینی استفاده از روش های سرولوژیکی در ردیابی ویروئید ها کارایی ندارد.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین و مهمترین روش های ردیابی ویروئید ها استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با استفاده از آغازگر های اختصاصی است که در ذیل به یک جفت آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی HSVd اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول قطعه (bp)	منبع
Sense	ACTCTTCTCAGAATCCAGCTAG	297-302	Eiras *et al*, 2006
Anti sense	TGCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGT		

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
2 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
40 ثانیه	94	واسرشته سازی	35
30 ثانیه	60	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

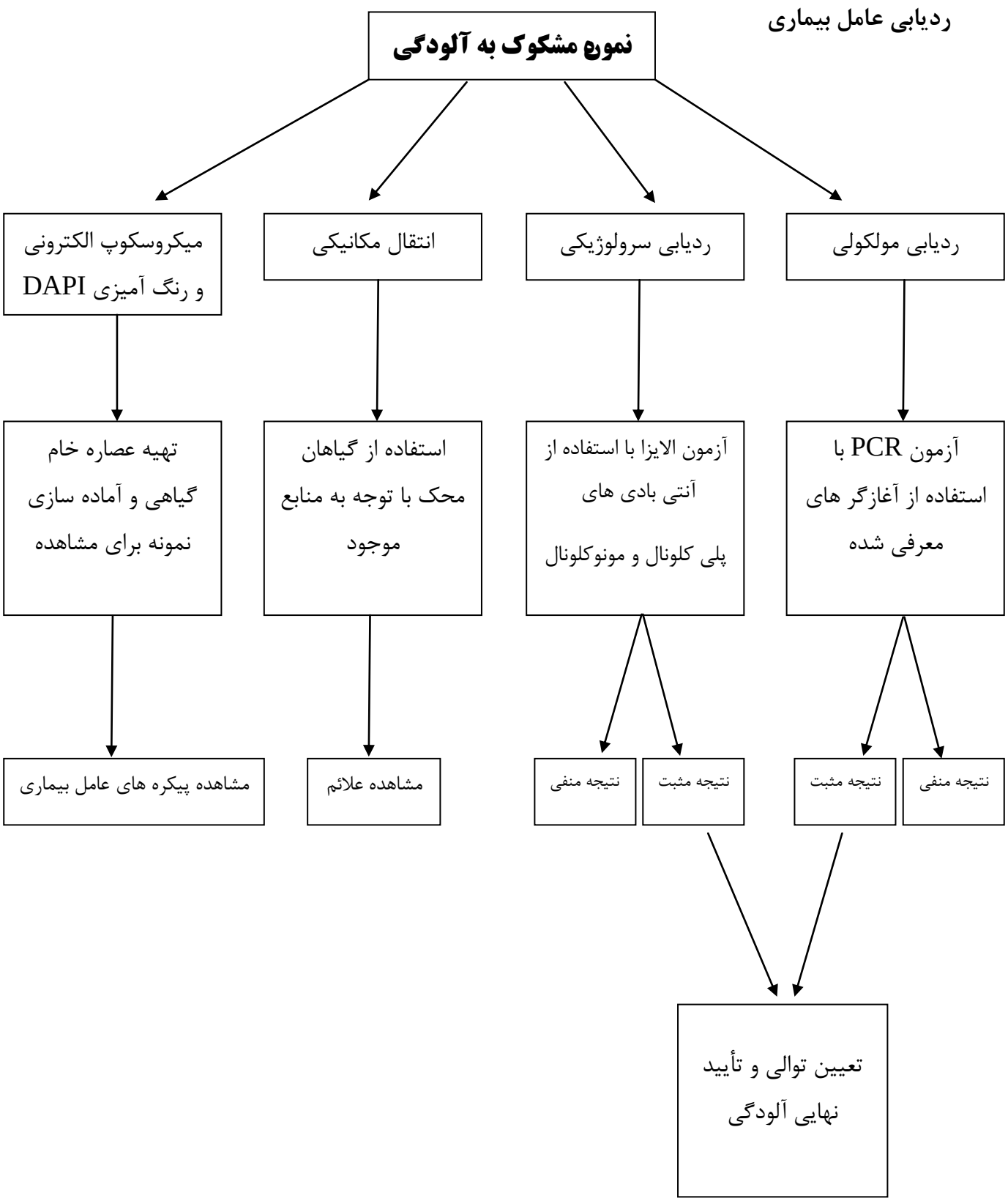
1. Eiras, M., Targon, M.L.P.N., Fajardo, T.V.M., Flores, R. and Kitajima, E.W. 2006. Citrus exocortis viroid and Hop Stunt viroid Doubly Infecting Grapevines in Brazil. Fitopatol. Bras. 31(5): 440-446.
2. www.dpvweb.net

بیماری جاروک لیمو ترش (Witches broom)

بیماری جاروک لیموترش مهمترین و مخربترین بیماری لیمو ترش در امارات عربی متحده، عمان و جنوب ایران است به طوری که بسیاری از باغات لیموی عمان و امارات به طور کامل نابود شده اند و در ایران نیز پس از اولین گزارش از حضور این بیماری در استان سیستان و بلوچستان در سال 1376 تاکنون بسیاری از باغات این استان و استان های مجاور شامل کرمان و هرمزگان و نیز جنوب فارس آلوده شده اند.

عامل بیماری Candidatus *Phytoplasma aurantifoliae* یک پروکاریوت فاقد دیواره سلولی و محدود به آوند آبکش بوده و چندین گونه از مرکبات را آلوده می کند . لیموترش مهمترین میزبان آن بوده و از دیگر میزبان ها می توان به لیمو شیرین، بالنگ و *Citrus limetta* اشاره کرد. اغلب پایه های تجاری مرکبات نظیر پرتقال، ماندارین، کلمانتین و گریپ فروت به طور طبیعی علائم بیماری را نشان نمی دهند و در شرایط آزمایشی نیز از طریق پیوند آلوده نمی شوند در حالی که سیترنج، نارنج سه برگی، لیموی یورکا، راف لمون و لیموی رانگپور از طریق پیوند آلوده شده اند.

بروز علائم جاروی جادوگر (سبزردی و ریز برگی همراه با فشردگی سر شاخه ها) مهمترین و بارزترین علائم بیماری است. از دیگر علائم نیز رشد شاخه های ثانویه ضعیف از جوانه های جانبی (به طور طبیعی این جوانه ها خفته اند)، کوتاه شدن میان گره ها، ریز شدن میوه ها، عدم تشکیل میوه روی شاخه های مبتلا به جاروک و شکافته شدن پوست شاخه هاست که این مورد آخر تنها توسط فیتوپلاسما ایجاد نمی شود . در مراحل پیشرفته بیماری برگ ها خشک، علائم جاروی جادوگر تشدید شده و درخت طی 4 تا 5 سال از بین می رود.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

رنگ آمیزی DAPI

رنگ آمیزی DAPI و مشاهده با میکروسکوپ فلورسانت یک روش ساده و غیر اختصاصی برای ردیابی و مشاهده فیتوپلاسما در بافت های آ لوده است . در این روش قطعات برگی پس از فیکس شدن در گلوتارآلدهید 5٪ تهیه شده در بافر فسفات 0/1 مولار دارای pH: 7.4 توسط دستگاه میکروتوم سرد به قطعات 30-15 میکرو متری برش خورده و بلافاصله به مدت ده دقیقه در محلول DAPI (یک میکروگرم در میلی لیتر) در دمای اتاق نگهداری شده و پس از شستشو با با فر فسفات 0/1 مولار برای مشاهده روی لام قرار داده می شود.

تست بیولوژیکی

انتقال توسط سس (*Cuscuta campestris*) از گیاه مرکبات آلوده به *Catharanthus roseus* منجر به بروز علائم جاروی جادوگر، ریز برگی و کوچک شدن و سبزی گلها می شود.

ردیابی سرولوژیکی

چندین آنتی بادی تک همسانه ای (7D5, 2H3, IE2 and 1D11)، برای ردیابی سرولوژیکی *P. aurantifoliae* توسط Bove و همکاران (Bove *et al*., 2000) معرفی شده است.

ردیابی مولکولی

یکی از رایج ترین و مؤثرترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی مولکولی عامل این بیماری معرفی شده است که در ذیل به یک نمونه از رایج ترین آنها اشاره می شود. همچنین شرکت Agdia کیت کامل تشخیص مولکولی آن را (Universal Phytoplasma nested PCR kit) معرفی کرده است.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	1800	Schneider *et al*., 1995
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	5 µl
MgCl2	1/5 mM
Forward primer	0/5 mM
Reverse primer	0/5 mM
dNTPs	0/2 mM each
Taq DNA polymerase	2/5 U
DNA	100ng
Sterile water	تا حجم 50 µl

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
2 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
1 دقیقه	94	واسرشته سازی	35
2 دقیقه	55	اتصال آغازگر	
3 دقیقه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Schneider, B., Seemuller, E., Smart, C. D. and Kirkpatrick, B. C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenetic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In: Razin, S. and Tulley, J. G. (Eds), Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology, Vol. I. New York, Academic Press. pp. 369-380.

2. OEPP/EPPO. 2014. PM 7/61 (1) Candidatus *Phytoplasma aurantifoliae*. Bulletin OEPP/EPPO, No. 36, 117–119.
3. www.agdia.com

بیماری های انجیر

Fig Diseases

ویروس موزاییک انجیر (*Fig mosaic virus*)

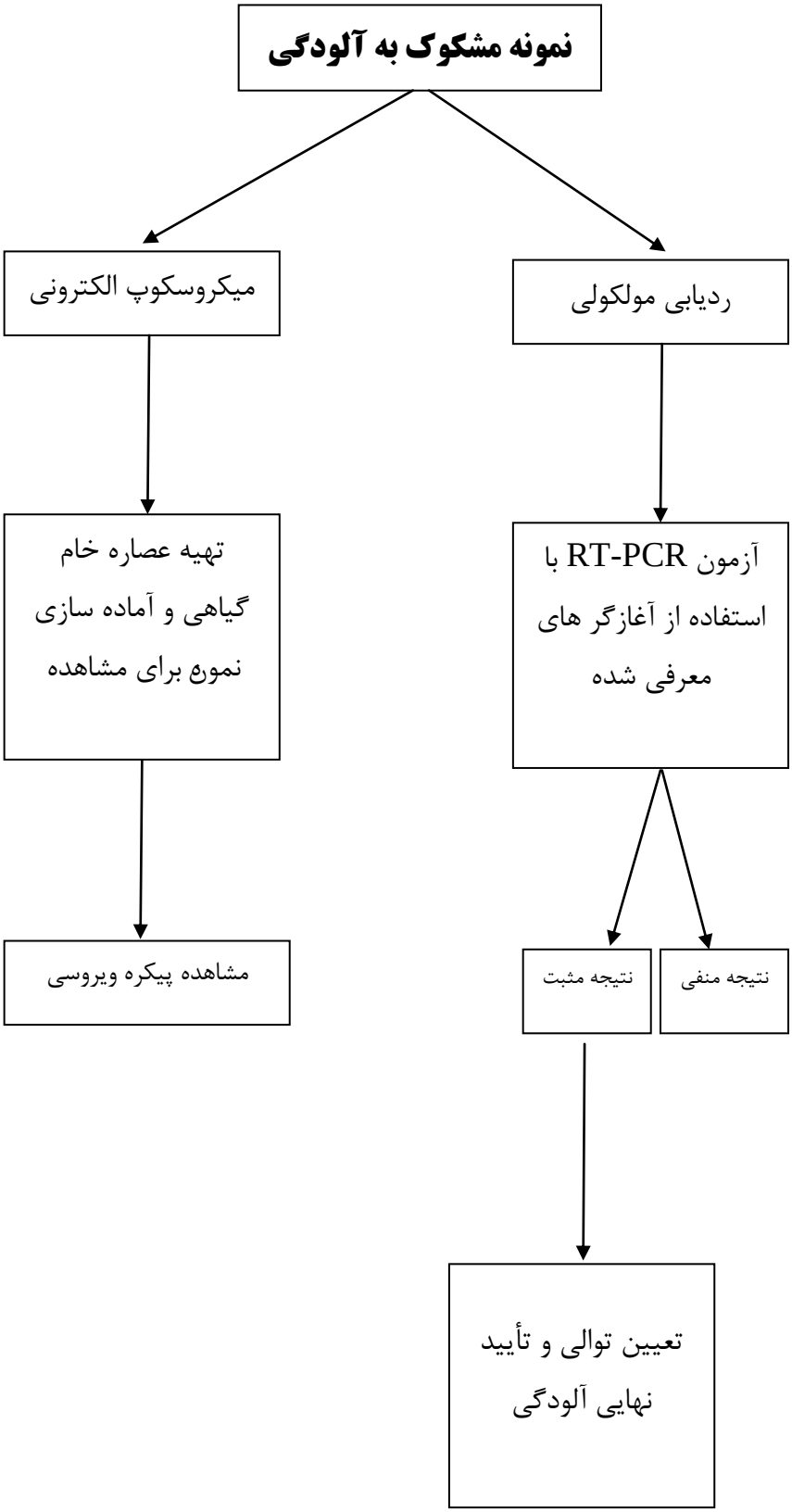
ویروس موزاییک انجیر (FMV) به عنوان یکی از اصلی ترین عوامل ایجاد بیماری موزاییک انجیر (FMD) شناخته شده ، هرچند اتیولوژی این بیماری هنوز به طور کامل شناخته نشده است . ویروس موزاییک انجیر متعلق به جنس *Emaravirus* بوده ودارای ژنوم از نوع RNA تک رشته منفی می باشد.FMV از طریق نقل و انتقال اندام های تکثیری و کنه اریوفید *Aceria ficus* منتقل می شود . FMV تنها ویروسی است که ارتباط آن با بیماری ویروسی موزاییک انجیر شناخته شده است.

مهمترین علامت بیماری بروز علائم موزاییک در برگ درختان آلوده است . در برخی درختان لکه های حلقوی کلروتیک نیز بروز می کند. مطالعات صورت گرفته در بافت های آوندی توسط میکروسکوپ الکترونی ساختارهایی گرد تا بیضوی به قطر 200-90 نانومتر محدود شده توسط غشای دولایه در سیتوپلاسم سلول های پارانشیم ردیابی شده است که تحت عنوان اجسام دارای غشای دولایه (DMB) نامگذاری شده اند. این اجسام جزء لاینفک انجیرهای بیمار می باشد.

ردیابی ویروس

روش سرولوژیکی

یکی از روشهای تشخیص قطعی ویروس از طریق سرولوژیکی است. تاکنونکیت های تشخیصی سرولوژیکی FMVبه صورت تجاریتولید و به بازار معرفی نشده است . البته فعالیت هایی به منظور تولید آنتی بادی این ویروس در کشور صورت گرفته است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. در ذیل به دو نمونه از آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی FMV اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3'-'5')	طول قطعه (bp)	منبع
EMARAVGP-as	CGTTTGTCTTGGATCACAGCAA	468	Walia *et al.*, 2009
EMARAVGP- s	GGGTACATATGCGTCATTCTTG		
E5-s	CGGTAGCAAATGGAATGAAA	302	Elbeaino *et al.*, 2009
E5-a	AAACACTGTTTTTGCGATTGG		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	1/5 mM
Forward primer (10µM)	0/5µl
Reverse primer (10µM)	0/5µl
dNTPs (10 mM)	0/5 µl
Taq DNA polymerase	5 U/µl
cDNA	2/5 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
4 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	35
45 ثانیه	54	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
7 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

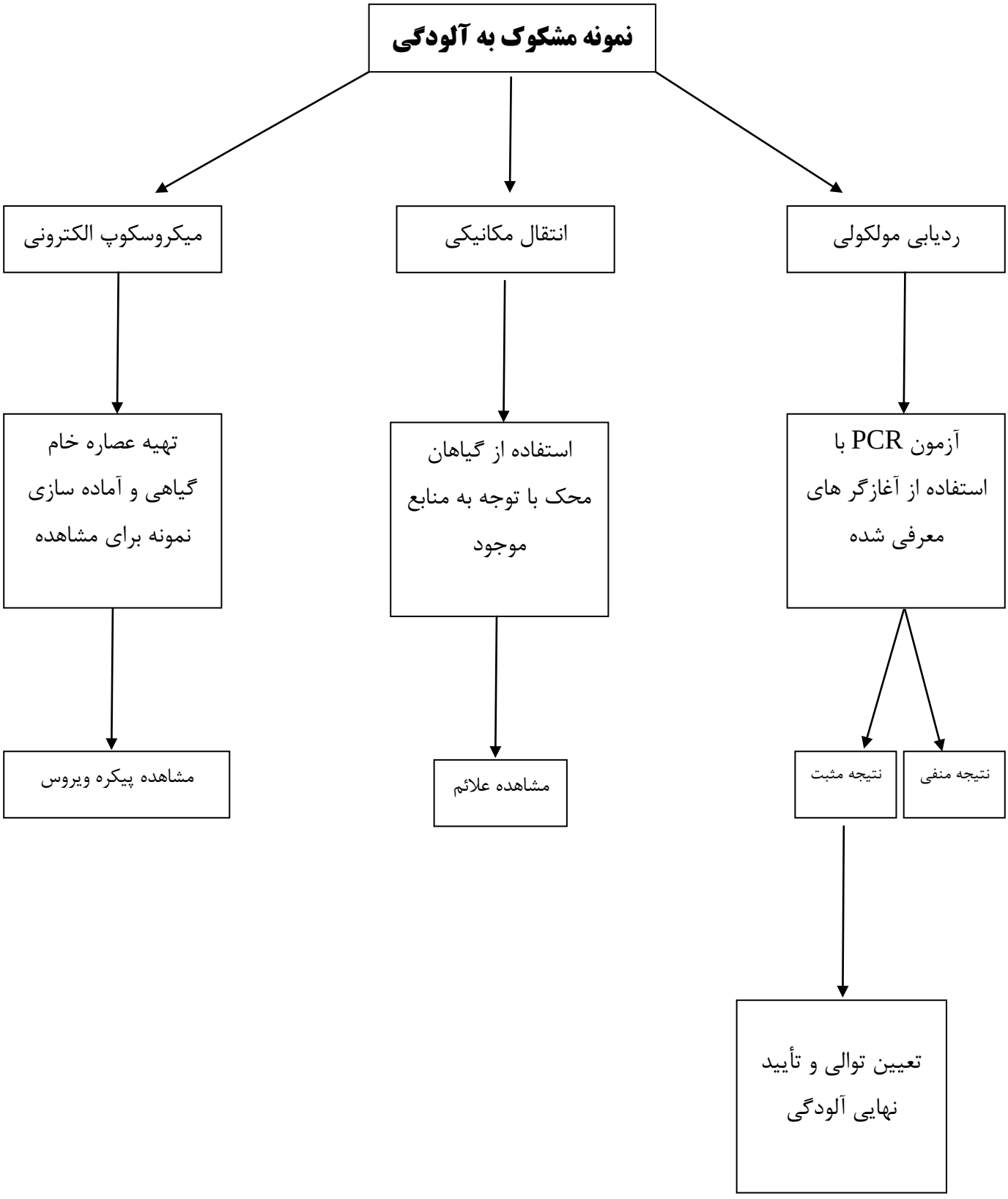
1. Elbeaino, T., Digiaro, M., Alabdullah, A., De Stradis, A., Minafra, A., Mielke, N., Castellano, M.A. and Martelli, G.P. 2009. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. J. Gen. Virol. 90:1281–1288.
2. Walia, J.J., Salem, N.M. and Falk, B.W. 2009. Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. Plant Dis. 93: 4–10.

بادناویروس 1 انجیر (*Fig badnavirus-1*)

یکی از عوامل دخیل در بیماری ویروسی موزائیک انجیر، *Fig badnavirus-1*، (FBV-1) است .FBV-1 به جنس*Badnavirus* و خانواده *Caulimoviridae* تعلق دارد. این ویروس دارای پیکره میله ای شکل بوده و ژنوم از نوع DNA دورشته ای دارد. طول کل ژنوم 7140 نوکلئوتید و دارای چهار ORF است. بادناویروس 1 از شیوع بالایی در انجیر برخوردار بوده و قابلیت انتقال مکانیکی به چندین گیاه علفی را نیز داراست و در میزبان های با علائم و بدون علائم دیده شده است.

این ویروس در ایران تاکنون از استان های تهران، البرز، همدان، گلستان، کرمانشاه، گیلان، لرستان، خراسان رضوی، یزد، کرمان و مازندران با وقوع بالا گزارش شده است.

FBV-1 توانایی وارد شدن به ژنوم میزبان را داشته و می تواند بدون ایجاد علائم باقی بماند اما شاخص ترین علائم مرتبط با آلودگی تکی آن که در بیشتر انجیر کاری های جهان مشاهده شده است بدشکلی و موزائیک خفیف برگهای جوان بوده است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

روش سرولوژیکی

یکی از روشهای تشخیص ویروس از طریق سرولوژیکی است. تاکنون کیت های تشخیصی سرولوژیکی آن به صورت تجاری تولید نشده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR است. در ذیل به یک نمونه از آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی FBV-1 اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5'-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
F	ATTGTCCTTTGTGTCTCCTAACA	1080	Laney *et al.*, 2012
R	TTGVVVTGATGACTCCTAAATCCA		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2 (50 mM)	1 µl
Forward primer (10µM)	1µl
Reverse primer (10µM)	1µl
dNTPs (2.5 mM)	10 µM
Taq DNA polymerase	0/25 µl
DNA (200 ng/µl)	1 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش

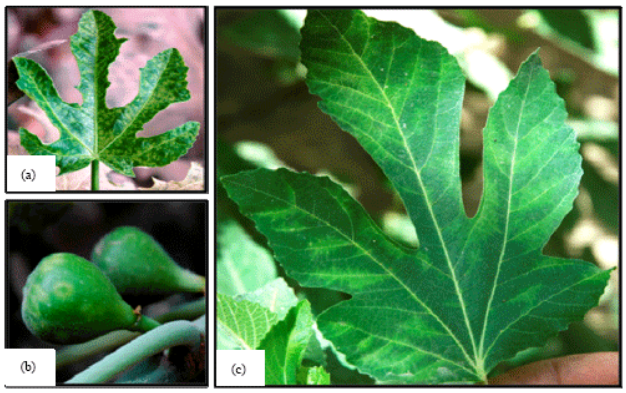
تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	واسرشته سازی اولیه	94	4 دقیقه
35	واسرشته سازی	94	1 دقیقه
	اتصال آغازگر	56	45 ثانیه
	گسترش	72	45 ثانیه
1	گسترش نهایی	72	5 دقیقه

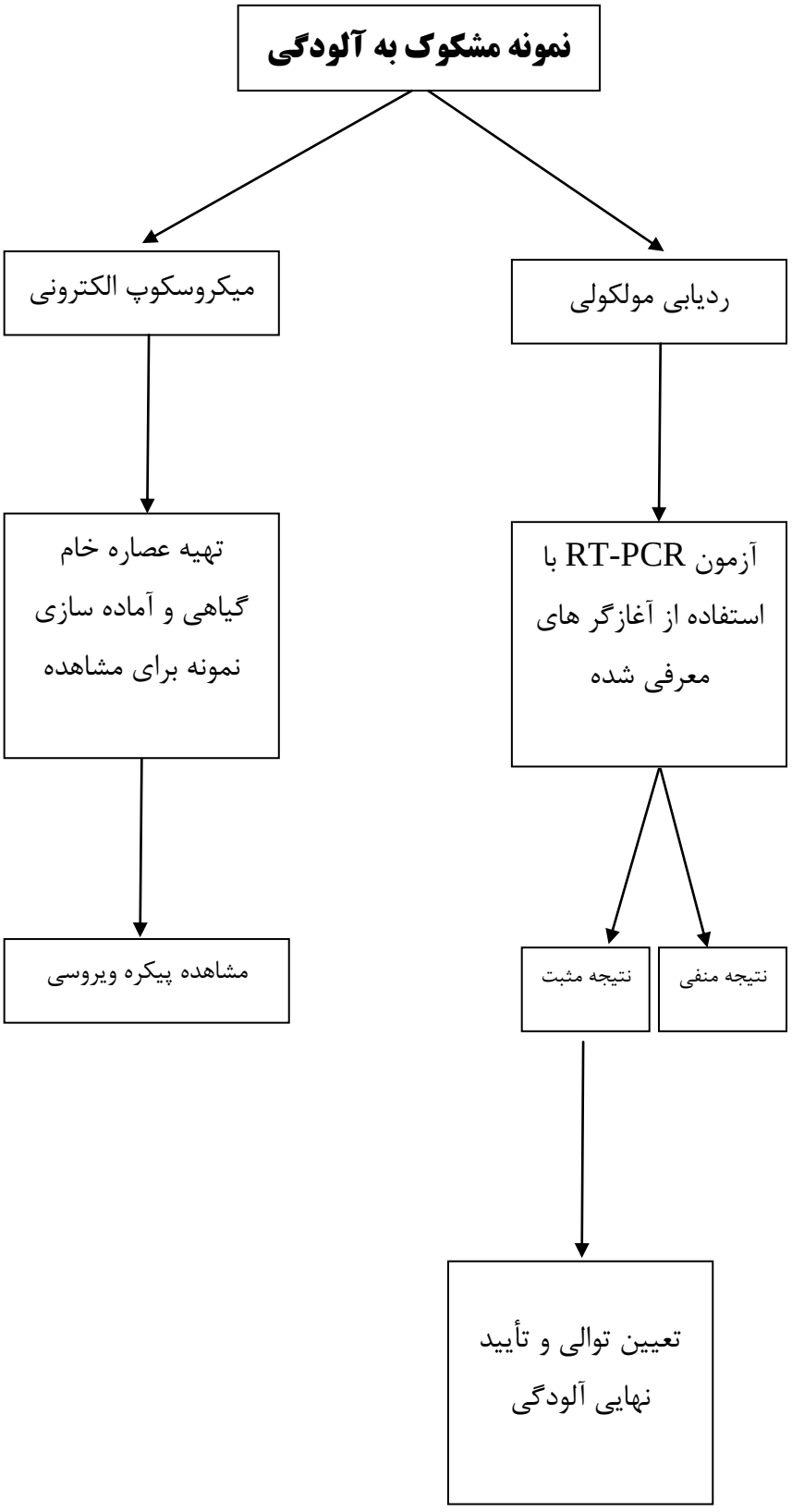
منابع

1. علیشیری، ا.، رخشنده رو، ف.، صالحی جوزانی، غ .ر. و شمس بخش، م . 1395. ردیابی و تعیین خصوصیات مولکولی جدایه های ایرانی Fig badnavirus-1 بر اساس ژن تولید کننده آنزیم پروتئاز. آفات و بیماری های گیاهی، جلد 84، شماره 1، 129-119.
2. Laney, A. G., Hassan, M. and Tzannetakis, I. E. 2012. An integrated badnavirus is prevalent in fig germplasm. Phytopathology, 102:1182-1189.

ویروس همراه با ماتل برگی انجیر- 1و2و3 (*Fig leaf mottle associated virus-1,2,3*)

سه ویروس همراه با ماتل برگی انجیر- 1و2و3 (FLMaV-1,2,3) متعلق به خانواده *Closteroviridae* می باشند و از کشورهایی در آسیا و آفریقا و اروپا از درختان انجیر دارای علایم ماتل و زردی گزارش شده اند . اولین بار در سالهای 2006 و 2007 از بخش هایی از ایتالیا و الجزایر گزارش شدند و به ترتیبFLMaV-1 و FLMaV-2 نام گرفتند. بررسی های صورت گرفته در جنوب ایتالیا و تونس نشان داد که این دو ویروس دامنه پراکنش وسیع تری دارند. در سال های اخیر ویروس دیگری نیز از ترکیه و شمال ایران با نام FLMaV-3 گزارش شده است. از آنجایی که اتیولوژی بیماری موزاییک انجیر به طور کامل شناسایی نشده است، نقش این ویروس ها در ایجاد بیماری و نحوه انتقال آنها به طور کامل مشخص نیست.





فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

روش سرولوژیکی

تاکنون کیت های تشخیصی سرولوژیکی برای این ویروس به صورت تجاری تولید و به بازار معرفی نشده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. در ذیل به سه نمونه از آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی این ویروس ها اشاره می شود.

ویروس قابل ردیابی	منبع	طول قطعه (**bp**)	توالی آغازگر (**'5-'3**)	نام آغازگر
FLMaV-1	Elbeaino *et al.*, 2006,2007	350	CGTGGCTGATGCAAAGTTTA	N17-s
			GTTAACGCATGCTTCCATGA	N17-a
FLMaV-2	Elbeaino *et al.*, 2006,2007	360	GAACAGTGCCTATCAGTTTGATTTG	F3-s
			TCCCACCTCCTGCGAAGCTAGAGAA	F3-a
FLMaV-3	Elci *et al.*, 2012	375	CTGTATCTGTCATTACCTCTTCGGG	FLMaV-3s
			ATGCTTCCTCGGCTGC	FLMaV-3as

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	**مقدار**
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2 (25 mM)	1 µl
Forward primer (10µM)	0/5µl
Reverse primer (10µM)	0/5µl
dNTPs (200 µM)	0/5 µl
Taq DNA polymerase	5 U/µl
cDNA	2 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
2 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	95	واسرشته سازی	35
30 ثانیه	55	اتصال آغازگر	
30 ثانیه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Elbeaino, T., Digiaro, M., De Stradis, A. and Martelli, G.P. 2006. Partial characterization of a closterovirus associated with a chlorotic mottling of fig. Journal of Plant Pathology, 88: 187-192.
2. Elbeaino, T., Digiaro, M., De Stradis, A. and Martelli, G.P. 2007.Identification of a second member of the family *Closteroviridae* in mosaic-diseased figs. *Journal of Plant Pathology,* 89: 119-124.
3. Elci, E., Serce, C.U., Gazel, M. and Caglayan, K. 2012. Molecular detection and comparative sequence analysis of viruses infecting Fig trees in Turkey. Journal of Phytopathology, 160: 418-423.

ویروس همراه با ماتل خفیف انجیر (*Fig mild mottle associated virus,* **FMMaV**)

در طی بررسی های صورت گرفته روی موزاییک انجیر در جنوب ایتالیا درختی از کولتیوار Dottato bianco مشاهده شد که ماتل خفیف و عدم بدشکلی برگ یا بدشکلی خفیف را نشان می داد. در واقع علائم ملایم تر از آن چیزی بودند که سایر درختان انجیر آلوده به موزاییک نشان می دادند بررسی های الکترومیکروسکوپی حضور پیکره های رشته ای بلندی را نشان داد که بسیار به ویریون کلسترو ویروس ها شبیه بود. تلاش برای تکثیر بخشی از ژنوم این ویروس جدید باستفاده از آغازگرهای اختصاصی دو ویروس مشابه آن FLMaV-1 FLMaV-2 , موفقیت آمیز نبود و به این ترتیب نام ویروس همراه با ماتل خفیف روی آن گذاشته شد . این ویروس قابلیت انتقال مکانیکی ندارد و از مناطق مختلفی در آسیا، آفریقا و اروپا گزارش شده است.

ردیابی ویروس

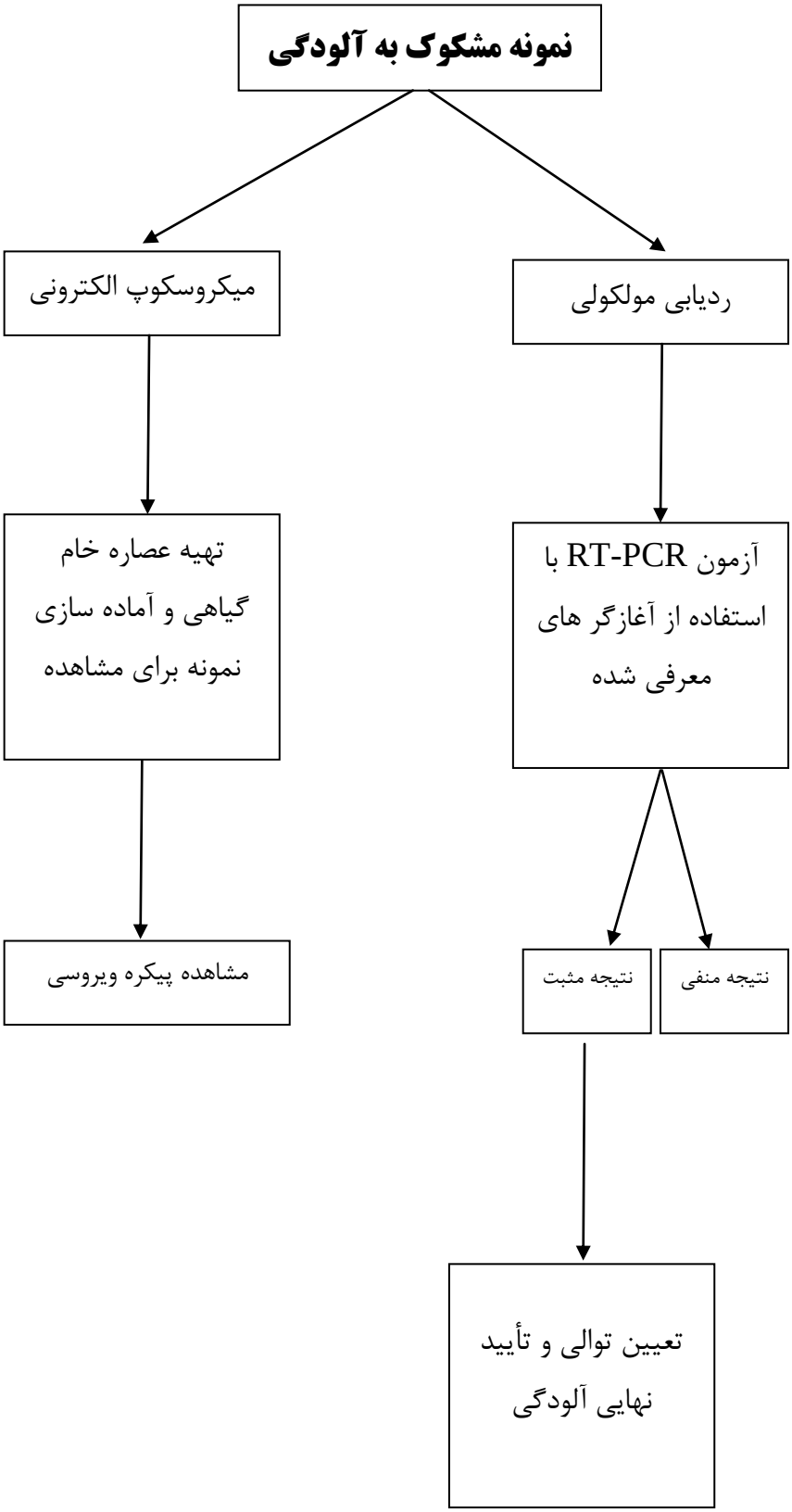
روش سرولوژیکی

یکی از روشهای تشخیص قطعی ویروس از طریق سرولوژیکی است. تاکنون کیت های تشخیصی سرولوژیکی FMMaV به صورت تجاری تولید و به بازار معرفی نشده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی مولکولی استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه بردار ی معکوس است (RT-PCR) است. در ذیل به یک نمونه از آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی FMMaV اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول قطعه (bp)	منبع
LM3s	AAGGGGAATCTACAAGGGTCG	311	Elbeaino *et al.*, 2010
LM3a	TATTACGCGCTTGAGGATTGC		



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	1/5 mM
Forward primer (10µM)	0/5µl
Reverse primer (10µM)	0/5µl
dNTPs (10 mM)	0/5 µl
Taq DNA polymerase	5 U/µl
cDNA	2/5 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
4 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	35
45 ثانیه	54	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
7 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

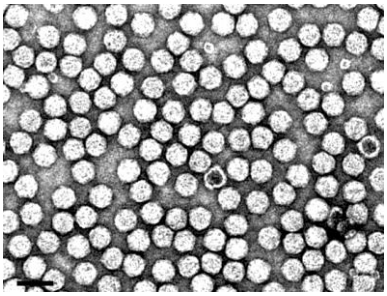
1. Elbeaino, T., Digiaro, M., Heinoun, K., De Stradis, A. and Martelli, G.P. 2010. Fig mild mottle-associated virus, a novel closterovirus infecting fig. Journal of Plant Pathology, 92: 165-172.

بیماری های مو

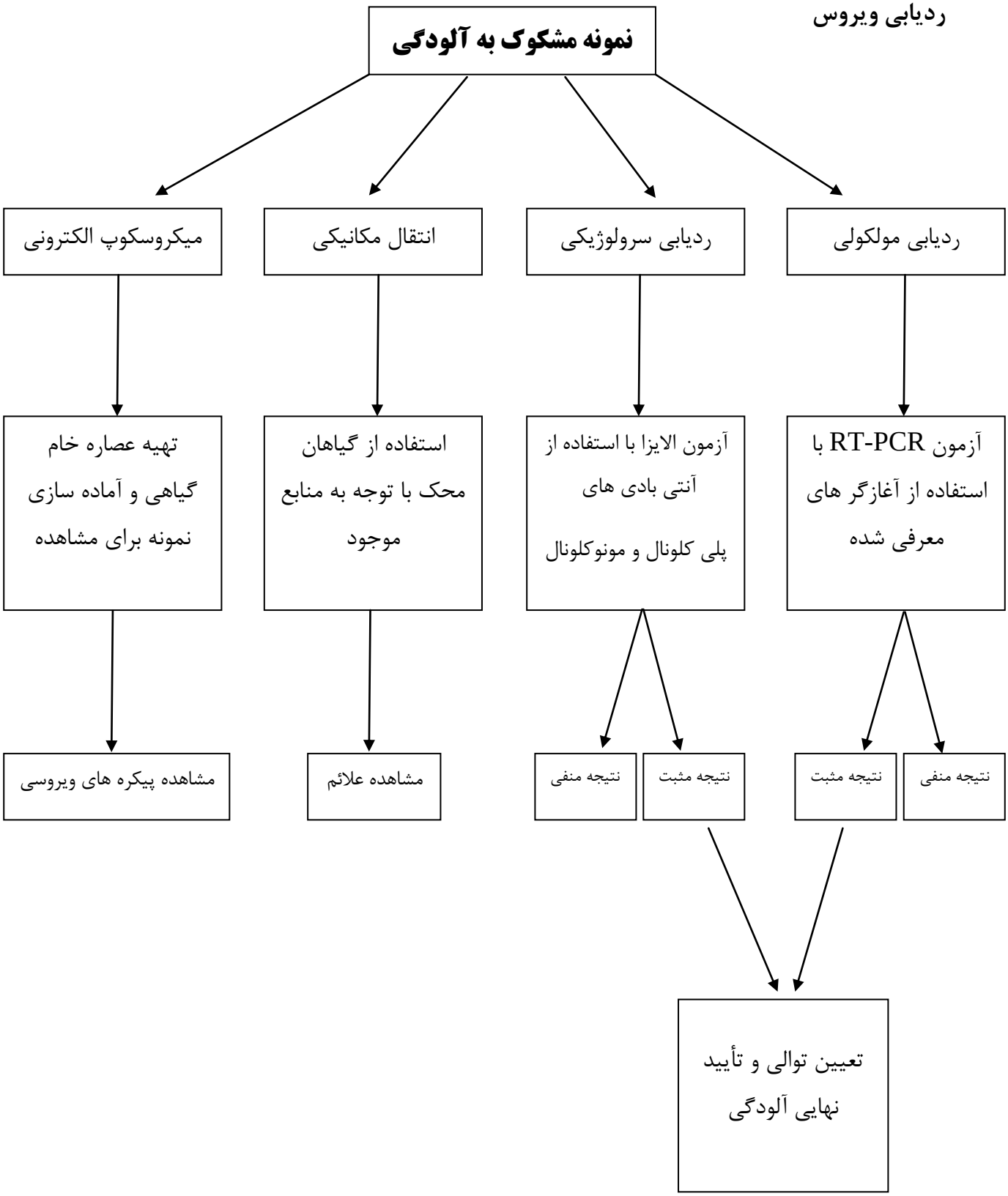
Grapevine diseases

ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fan leaf virus*)

ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) ویروسی از جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* است که دارای پیکره گرد با قطر حدود 30 نانومتر می باشد. ویروس دارای ژنوم دو بخشی از نوع RNA خطی تک رشته مثبت بوده که هر یک در یک پوشش جداگانه قرار گرفته اند.



این ویروس که عامل برگ بادبزنی و موزائیک در مو است در بسیاری از موکاری های دنیا گزارش شده و در ایران نیز از چندین استان نظیر آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و قزوین گزارش شده است . بیماری رگبرگ نواری معمولاً به دلیل استرینی خاص از این ویروس به صورت آلودگی توأم با ویروئید لکه زرد مو بروز می کند. بیماری برگ بادبزنی منجر به بدشکلی برگها (بازشدن حاشیه و پیچیدگی دمبرگ، برجستگی دندانه های حاشیه برگ، عدم تقارن برگ و رگبرگ های نامنظم) شده و نا برابر شدن فاصله میانگره ها ، رشد زیگزالی شاخه، شاخه دهی غیرطبیعی، کتابی و تخت شدن شاخه، ماتل، زردی، لکه حلقوی و نقوش خطی روی برگ از دیگر علائم بیماری می باشد. مو مهمترین میزبان طبیعی این ویروس است و برخی علفهای هرز نیز توسط آن آلوده می شوند. GFLV توسط نماتد *Xiphinema index* ، پیوند و گاهاً بذر منتقل می شود.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

تست بیولوژیکی

از گونه های تشخیصی این ویروس می توان به *Chenopodium quinoa*، *Chenopodium amaranticolor* ، *Gompherena globosa*، *Nicotiana benthamiana* و *Vitis rupestris* اشاره کرد.

روش سرولوژیکی

تاکنون کیت های تشخیصی سرولوژیکی GFLV بر پایه روش الایزا با استفاده از آنتی بادی های تک و چند همسانه ای توسط شرکت های تولید کننده این کیت ها نظیر Bioreba، Agdia، DSMZ و Loewe به بازار عرضه شده است. همچنین ایمونو استریپ تشخیص این ویروس نیز توسط شرکت Agdia معرفی شده است.

روش مولکولی

یکی از مطمئن ترین روش های ردیابی، استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی GFLV معرفی شده است که در ذیل به یک نمونه از آنها اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول قطعه (bp)	منبع
C2647	GTGAGAGGATTAGCTGGT	606	Fattouch *et al*., 2001
H2042	AGCACTCCTAAGGGCCGT		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

استفاده از کیت Access RT-PCR System, Promega

شرایط واکنش

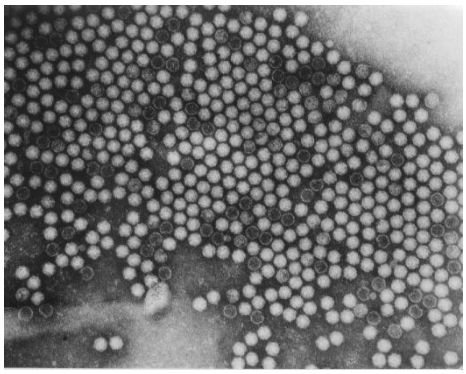
تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	واسرشته سازی اولیه	94	5 دقیقه
15	واسرشته سازی	94	50 ثانیه
	اتصال آغازگر	54	60 ثانیه
	گسترش	72	1 دقیقه
20	واسرشته سازی	94	50 ثانیه
	اتصال آغازگر	46	70 ثانیه
	گسترش	72	1 دقیقه
1	گسترش نهایی	72	10 دقیقه

منابع

1. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
2. Fattouch, S., M'hirsi, S., Acheche, H., Marrakchi, M. and Marzouki, N. 2001. RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for the detection of grapevine fanleaf virus in Tunisian grapevines. Plant Molecular Biology Reporter. 19: 235-244.
3. www.agdia.com
4. www.bioreba.ch
5. www.dpvweb.net
6. www.dsmz.de
7. www.loewe-info.com

ویروس موزاییک آرابیس (*Arabis mosaic virus*)

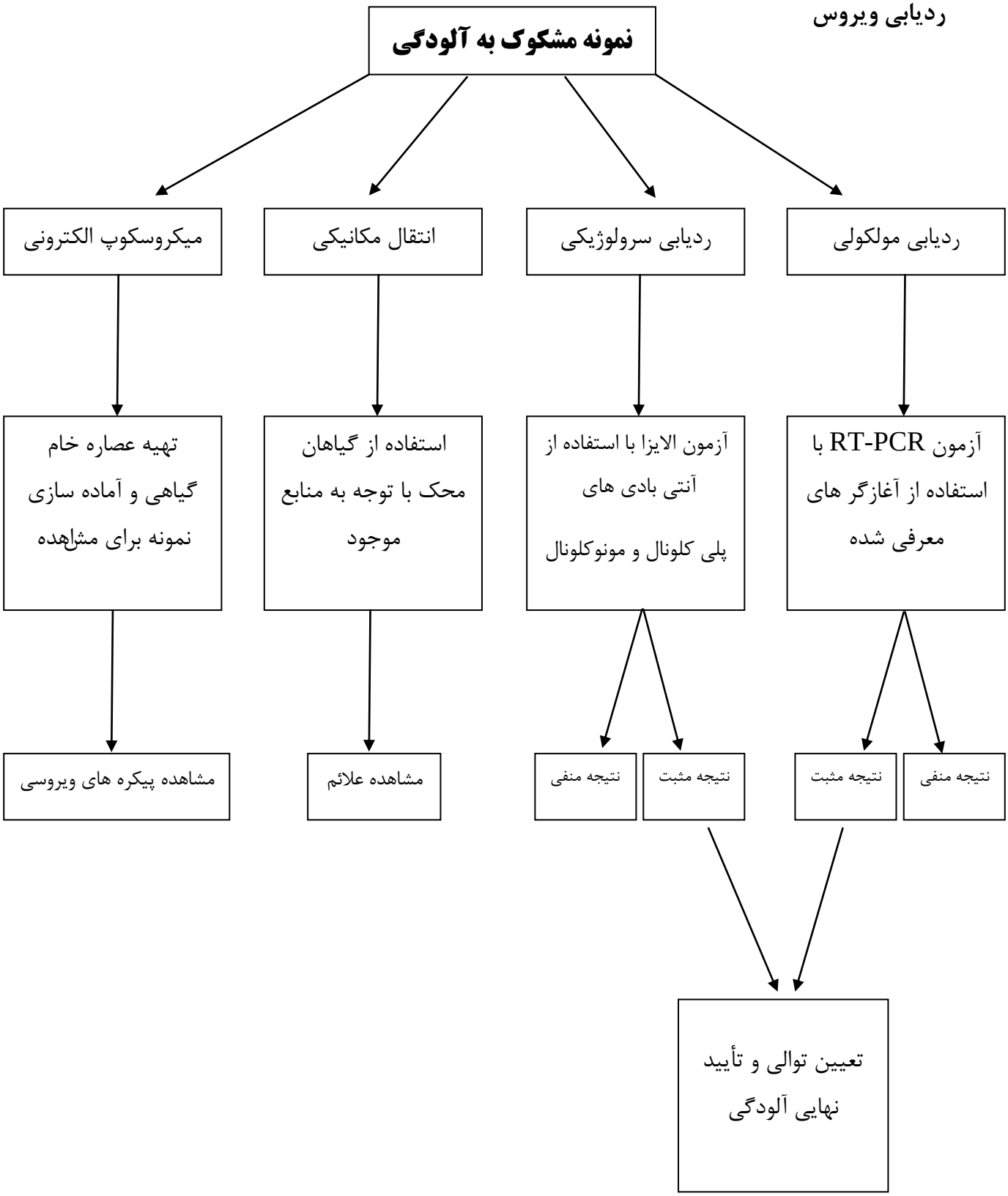
ویروس موزاییک آرابیس (ArMV) ویروسی از جنس *Nepovirus* و خانواده *Secoviridae* بوده که پیکره ای گرد با قطر حدود 30 نانومتر حاوی یک RNA تک رشته دارد.



به طورکلی این ویروس 93 گونه را در 28 خانواده دولپه ای آلوده می کند. علائم بیماری شامل کوتولگی زرد در تمشک، موزاییک و زردی دندانه دار در توت فرنگی، ماتل و کوتولگی در خیار، کوتولگی کلروتیک در کاهو، کوتولگی و نکروز در کرفس و زردی مشبک در یاس بوده و یکی از علل موزاییک ریواس به شمار می رود. از دیگر میزبان های این ویروس می توان به چغندر، رازک، خردل، نرگس، رز، آقطی، زیتون، برگ نو، شبدر سفید و انگور اشاره کرد.

انتقال ArMV از طریق دوگونه نماتد به نام *X. coxi , xiphinema diversicaudatum* صورت می گیرد .

همچنین این ویروس در 15 گونه شامل 12 خانواده گیاهی بذر زاد بوده و قابلیت انتقال با برخی گونه های سس را داراست.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

تست بیولوژیکی

از گونه های تشخیصی می توان به *Chenopodium quinoa*، *Chenopodium amaranticolor*، *Nicotiana tabacum* cv. white burley، *cucumis sativus*، *Petunia hybrida*، *Phaseolus vulgaris* cv. the prince اشاره کرد.

روش سرولوژیکی

کیت های تشخیصی سرولوژیکی ArMV بر پایه روش الایزای مستقیم و غیر مستقیم توسط شرکت های تولید کننده این کیت ها نظیر Bioreba، Agdia، DSMZ و Loewe به بازار معرفی شده است . همچنین ایمونو استریپ تشخیصی آن نیز توسط شرکت Agdia تولید شده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی، استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. تاکنون آغازگر های متعددی جهت ردیابی ArMV معرفی شده است که در ذیل به دو نمونه از آنها اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
AP1	AATACCCCGGGTGTTACATCG	420	Pantaleo *et al*, 2001
AP2	CATTAACTTAAGATGAAGGATTC		
F5	TTGGTTAGTGAATGGAACGG	503	Grieco *et al*, 2000
R5	CAAGCTATCTGGGCAAA		

شرایط واکنش (Pantaleo *et al*, 2001)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
1/5 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
1 دقیقه	94	واسرشته سازی	23
2 دقیقه	55	اتصال آغازگر	
3 دقیقه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

مواد واکنش (Grieco *et al*, 2000)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2 (25 mM)	2/2 µl
Forward primer (10µM)	1µl
Reverse primer (10µM)	1µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Taq DNA polymerase	1U
cDNA	2 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش (Grieco *et al*, 2000)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
5 دقیقه	95	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	35
30 ثانیه	62	اتصال آغازگر	
40 ثانیه	72	گسترش	
5 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V. and Martelli, G.P. 2000. Molecular detection of olive viruses. EPPO Bulletin; 30:469-73.
2. Pantaleo, V., Saponari, M, and Gallitelli, D. 2001. J. Plant pathol. 83(2): 143-146.
3. www.agdia.com
4. www.bioreba.ch
5. www.dpvweb.net
6. www.dsmz.de
7. www.loewe-info.com

ویروس همراه با لوله ای شدن برگ مو-3 (*Grapevine leaf roll associated virus-3*)

ویروس همراه با لوله ای شدن برگ مو- 3 (GLRaV-3) ویروسی از ج نس *Ampelovirus* از خانواده *Closteroviridae* بوده که دارای پیکره رشته ای به ابعاد 12×1800 نانومتر می باشد. ژنوم ویروس از نوع RNA تک رشته مثبت خطی و دارای دم پلی A در انتهای '3 و Cap در انتهای '5 است.

میزبان های این ویروس *Vitis vinifera* , *V. californica* و برخی هیبریدهای بین گونه ای انگور نظیر کنکورد و نیاگارا می باشند. به نظر می رسد دامنه میزبانی این ویروس تنها محدود به گونه های مختلف انگور باشد.

از علائم آلودگی به این ویروس می توان به قرمز شدن یا زردی برگها، تغییر رنگ برگها در تابستان از قاعده شاخه به طرف انتها، ضخیم شدن پهنک، شکنندگی برگ و پیچیدگی حاشیه برگ به سمت پایین اشاره کرد. همچنین شاخه ها به طور نامنظم و دیرهنگام بالغ می شوند . هرچند در برخی شرایط و در برخی میزبان ها علائم مشخصی ظاهر نمی شود.

این ویروس ناقل شته ای نداشته و چندین گونه از شپشک های خانواده *Pseudococcidae* این ویروس را به طریقه پایا منتقل می کنند. همچنین انتقال از طریق پیوند و سس نیز صورت می گیرد و انتقال مکانیکی ندارد.

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

چندین کولتیوار مختلف پوست قرمز *V. vinifera* به عنوان گیاه محک مورد استفاده قرار گرفته‌اند و همه آنها علائم تیپیک لوله ای و قرمز شدن برگ را چند ماه پس از پیوند نشان می دهند.

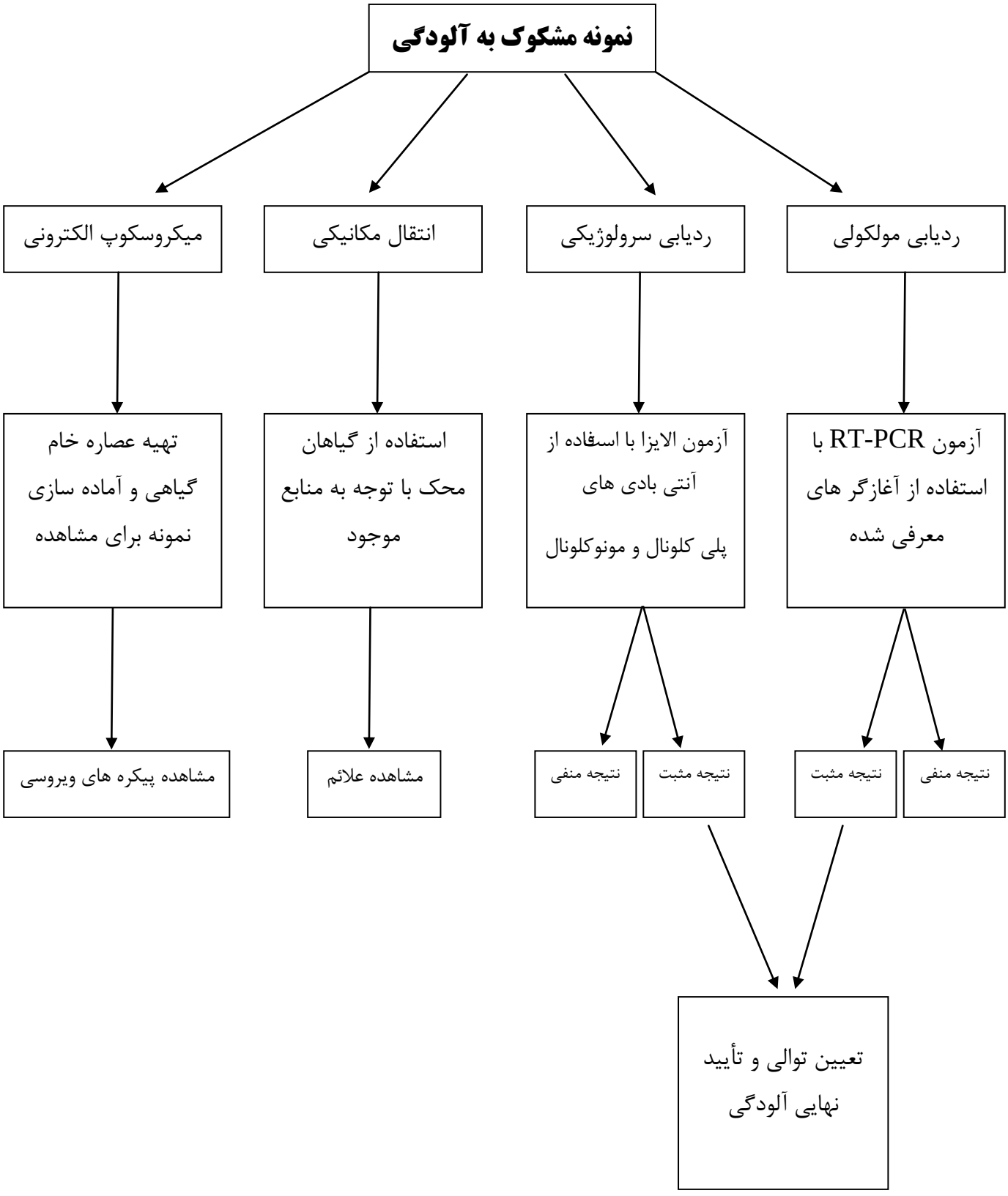
روش سرولوژیکی

کیت های تشخیصی سرولوژیکی GLRaV-3 بر پایه روش الایزای مستقیم و غیر مستقیم توسط شرکت های تولید کننده این کیت ها نظیر Bioreba، Agdia و Loewe به بازار معرفی شده است. همچنین ایمونو استریپ تشخیصی آن نیز توسط شرکت های Agdia و Bioreba تولید شده است.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین روش های ردیابی، استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس است (RT-PCR) است. در ذیل به دو نمونه از آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی GLRaV-3 اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
C547	ATTAACTTGACGGATGGCACGC	340	Minafra and Hadidi, 1994
H229	ATAAGCATTCGGGGATGGACC		



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

استفاده از کیت Access RT-PCR System, Promega

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
5 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
50 ثانیه	94	واسرشته سازی	15
60 ثانیه	54	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
50 ثانیه	94	واسرشته سازی	20
70 ثانیه	46	اتصال آغازگر	
1 دقیقه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

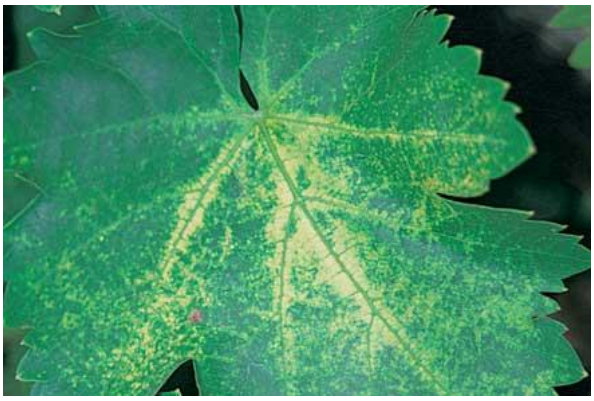
1. Minafra, A. and Hadidi, A. 1994. Sensitive detection of grapevirus A, B, or leafroll-associated virus III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. Journal of Virological Methods, 47: 175-188.
2. www.agdia.com
3. www.bioreba.ch
4. www.dpvweb.net
5. www.loewe-info.com

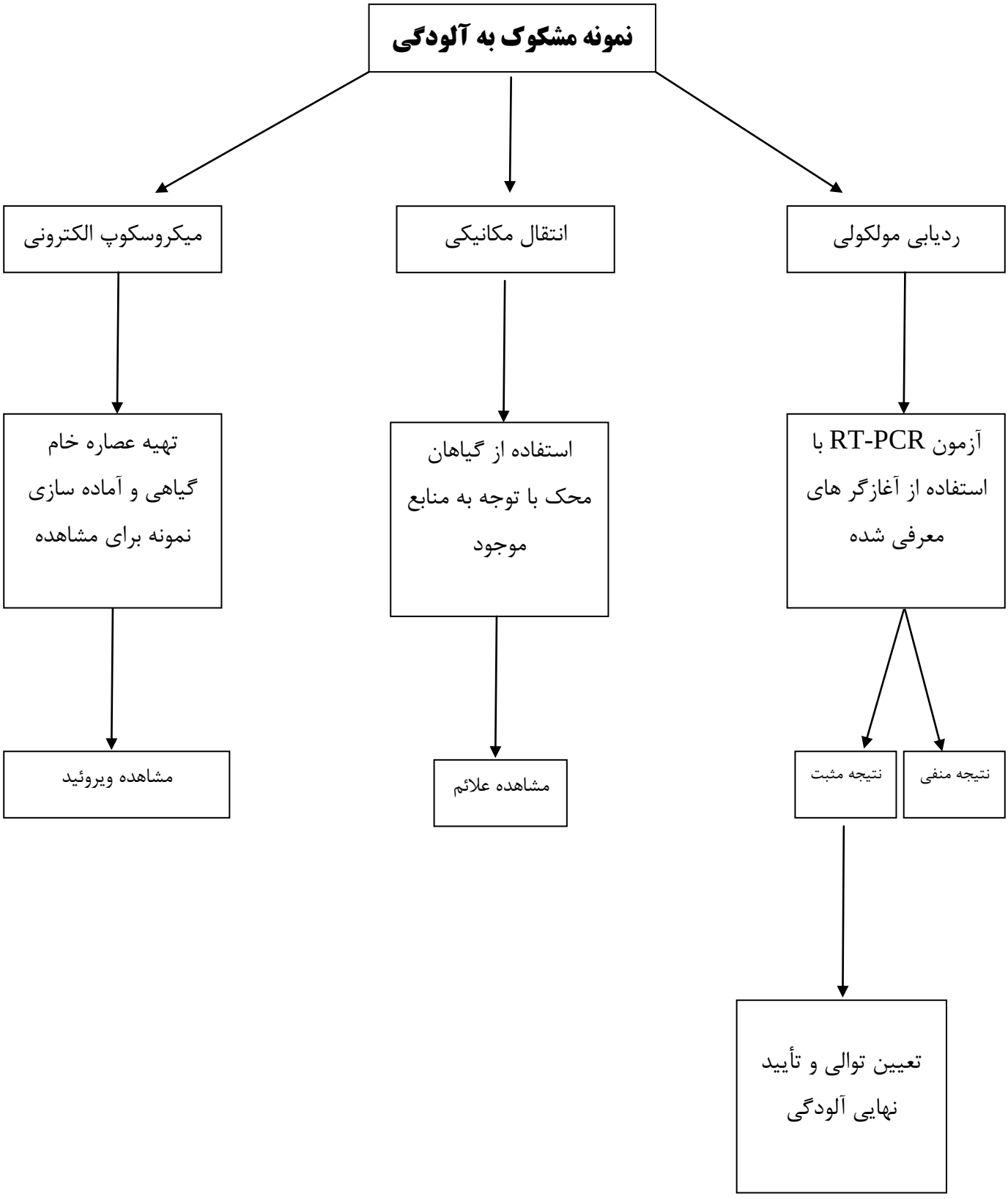
ویروئید های لکه زرد مو 1 و 2 (*Grapevine yellow speckle viroid-1,2*)

دو ویروئید لکه زرد مو 1 و 2 (GYSVd-1,2) به جنس *Apscaviroid* از خانواده *Pospiviroidae* تعلق داشته و GYSVd-1 دارای 368-367 نوکلئوتید و جدایه ایرانی GYSVd-2 دارای 362-361 نوکلئوتید است.

این دو ویروئید در اغلب تاکستان های دنیا شیوع دارند و اغلب همراه با هم و ویروئید کوتولگی رازک هستند. در ایران نیز در بررسی بعمل آمده در موکاری های استان فارس، شیوع بالایی داشته اند. تاکنون این ویروئیدها در ایران از استان های فارس، آذربایجان غربی و شرقی و اردبیل گزارش شده است.

علائم ناشی از آلودگی گیاه مو به این ویروئید ها شامل لکه های زرد رنگ در اطراف رگبرگ هاست که در حالت شدید بیماری برگ ها سفید می شوند. علائم بیماری با توجه به شرایط آب و هوایی، واریته گیاه و ژنوتیپ ویروئید متغیر است. حضور این دو ویروئید در درختان مو همیشه با علائم گفته شده در بالا همراه نیست. GYSVd-1 دارای تنوع ژنتیکی زیادی است و براساس ساختمان ثانویه ناحیه بیماریزایی به سه تیپ تقسیم می شود: در تیپ یک جدایه های بدون علائم و در تیپ دوم جدایه های دارای توانایی ایجاد علائم قرار دارند. تیپ سوم هم که در ایتالیا گزارش شده است، تفاوت زیادی از نظر علائم و ترادف با دوتای قبلی دارد. ویروئید GYSVd-2 دارای 73 درصد شباهت با GYSVd-1 است. بین این دو ویروئید، با ویروس برگ بادبزنی مو GFLV رابطه سنیرژیستی وجود دارد و در صورت بروز آلودگی توأم، تشدید علائم را در پی خواهد داشت و رگبرگ نواری ظاهر می شود.این دو ویروئید از طریق پیوند قابل انتقال می باشند.





فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

روش سرولوژیکی

به دلیل نداشتن پوشش پروتئینی استفاده از روش های سرولوژیکی در ردیابی ویروئید ها کارایی ندارد.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین و مهمترین روش های ردیابی ویروئید ها استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با استفاده از آغازگر های اختصاصی است که در ذیل به آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی این دو ویروئید اشاره می شود.

نام ویروئید قابل ردیابی	منبع	طول قطعه (bp)	توالی آغازگر ('3-'5)	نام آغازگر
GYSVd-1	Staub *et al*, 1995	367	GCGGGGGTTCCGGGGATTGC	GV1(-)
			TAAGAGGTCTCCGGATCTTCTTGA	GV2(+)
GYSVd-2	Zaki aghl and Izadpanah, 2010; wonchow who and Symons, 1997	-362 361	ACCGGCTTCGGAGATAGAAG	C3(-)
			TTGAGGCCCGGCGAAACGC	H1(+)

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

بهینه سازی شرایط واکنش با استفاده از PCR optimizing kit, Roche همراه با DMSO، گلیسرول و پرسولفات آمونیوم

شرایط واکنش (GYSVd-1)

تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	واسرشته سازی اولیه	95	1 دقیقه
35	واسرشته سازی	94	30 ثانیه
	اتصال آغازگر	60	30 ثانیه
	گسترش	72	1 دقیقه
1	گسترش نهایی	72	7 دقیقه

شرایط واکنش (GYSVd-2)

تعداد چرخه	نام مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	مدت
1	واسرشته سازی اولیه	95	1 دقیقه
35	واسرشته سازی	94	30 ثانیه
	اتصال آغازگر	55	30 ثانیه
	گسترش	72	1 دقیقه
1	گسترش نهایی	72	7 دقیقه

منابع

1. Staub, U., Polivka, H. and Gross, H. J. 1995. two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves rich in polyphenols and polysaccharides: Application for sensitive detection of grapevine viroids. J. Virol. Methods. 25: 209-218.
2. Wan Chow Wah, J. F. and Symons, R. H. 1997. A highly sensitive RT-PCR assay for the diagnosis of grapevine viroids in field and tissue culture samples. J. Virol. Methods. 63: 57-69.
3. Zaki aghl, M. and Izadpanah, K. 2010. Identification and partial molecular characterization of grapevine viroids in Fars province. Iran. J. Plant Path., Vol. 46, No. 3, 2010: 69-71

بیماری های سیب زمینی

Potato disease

ویروس وای سیب زمینی (*Potato virus Y*)

ویروس وای سیب زمینی (PVY) ویروسی از جنس *Potyvirus* و خانواده *Potyviridae* دارای پیکره رشته ای به طول 740-730 نانومتر و عرض 12-11 نانومتر می باشد. ژنوم ویروس از نوع RNA تک رشته است.

دامنه میزبانی ویروس اغلب منحصر به فرد گیاهان خانواده *Solanaceae* است هرچند بعضی اعضای خانواده *Legominosae* , *Amaranthaceae* , *Chenopodiacae* , *Compositae* نیز حساس هستند . ویروس وای سیب زمینی دارای پراکنش جهانی بوده و در ایران نیز از استان های مختلف نظیر گیلان، خراسان، آذربایجان، فارس، اصفهان همدان و خوزستان گزارش شده است.

علائم این بیماری عمدتاً شامل موزاییک یا موزاییک روگوز است، اگر چه علائم بسته به نوع سویه ویروس، میزبان و شرایط آب و هوایی بسیار متغیر است. از دیگر علائم بیماری می توان به ماتل شدید یا خفیف، مضرس شدن برگها، زردی و نکروز، ریزش برگهای میانی، کوتولگی و شکنندگی گیاهان آلوده و نکروز غده اشاره کرد. چهار استرین اصلی PVY^{O}, PVY^{C} , PVY^{N}, PVY^{NTN} از این ویروس گزارش شده است.

PVY توسط حداقل 25 گونه شته به طریقه ناپایا و مکانیکی منتقل می شود. گزارشی از بذرزدای آن وجود ندارد. از گونه های شته ناقل می توان به *Aphis fabae* ،*Myzus persicae* , *Macrosiphum euphorbiae* و چندین گونه دیگر اشاره کرد.

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

گونه های تشخیصی این ویروس شامل تاتوره، *Nicotiana tabacum* ،*N. glutinosa* ، *Tinantia erecta*، *Solanum tuberosum* ،*S. demissum* می باشد.

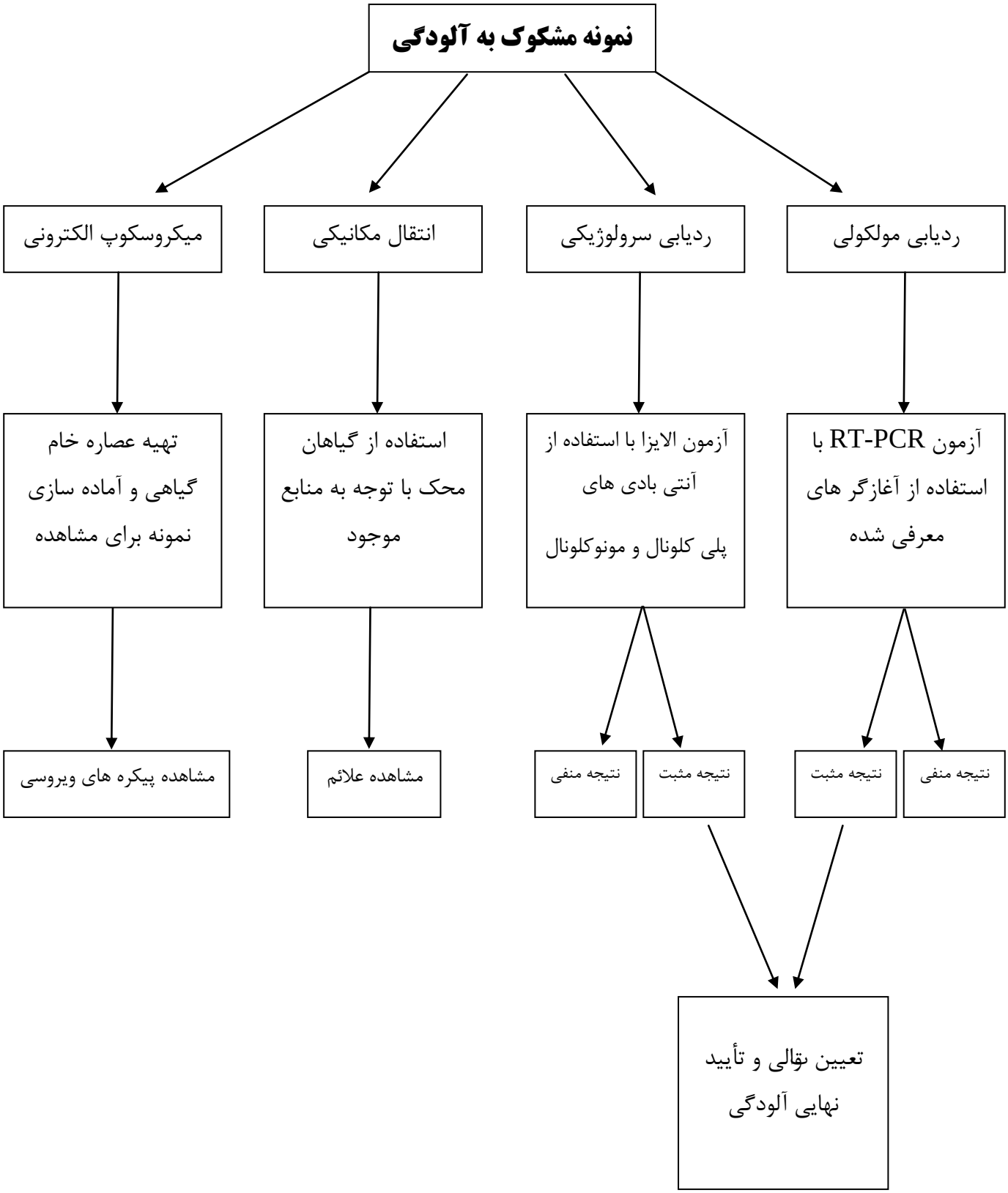
روش سرولوژیکی

کیت های تشخیصی سرولوژیکی PVY بر پایه روش الایزای مستقیم و غیر مستقیم توسط شرکت های تولید کننده این کیت ها نظیر Bioreba،DSMZ ،Agdia و Loewe به بازار معرفی شده است . همچنین ایمونو استریپ تشخیصی آن نیز توسط شرکت های Agdia و Bioreba تولید شده است .کیت تشخیص سریع (Fast kit) ویروس وای سیب زمینی نیز توسط شرکت Loewe عرضه شده است.

روش مولکولی

ردیابی PVY با واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با آغازگر های متعددی صورت گرفته است که در ذیل به یک نمونه از آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی آن اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول قطعه (bp)	منبع
PVY-P1	CAACTCCAGATGGAACAATTG	1000	zinati fakhrabad *et al*, 2012
PVY-P2	CCATTCATCACAGTTGC		



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	5 µl
MgCl2 (50 mM)	2 µl
Forward primer (10µM)	1µl
Reverse primer (10µM)	1µl
dNTPs (2.5 mM)	1 µl
Taq DNA polymerase	0/5 µl
cDNA	5 µl
Sterile water	تا حجم 50 µl

شرایط واکنش

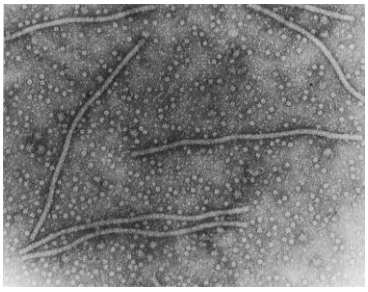
مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
5 دقیقه	95	واسرشته سازی اولیه	1
1 دقیقه	94	واسرشته سازی	35
1 دقیقه	55	اتصال آغازگر	
1/5 دقیقه	72	گسترش	
5 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
2. www.agdia.com
3. www.bioreba.ch
4. www.dpvweb.net
5. www.dsmz.de
6. www.loewe-info.com
7. Zinati fakhrabad, F., Ahmadikhah, A. and Nasrollahnejad, S. 2012. Identification and detection of Potato virus Y strains by molecular methods in tobacco fields of North Iran. International Research Journal of Applied and Basic Sciences. Vol., 3 (7), 1422-1428.

ویروس ایکس سیب زمینی (*Potato virus X*)

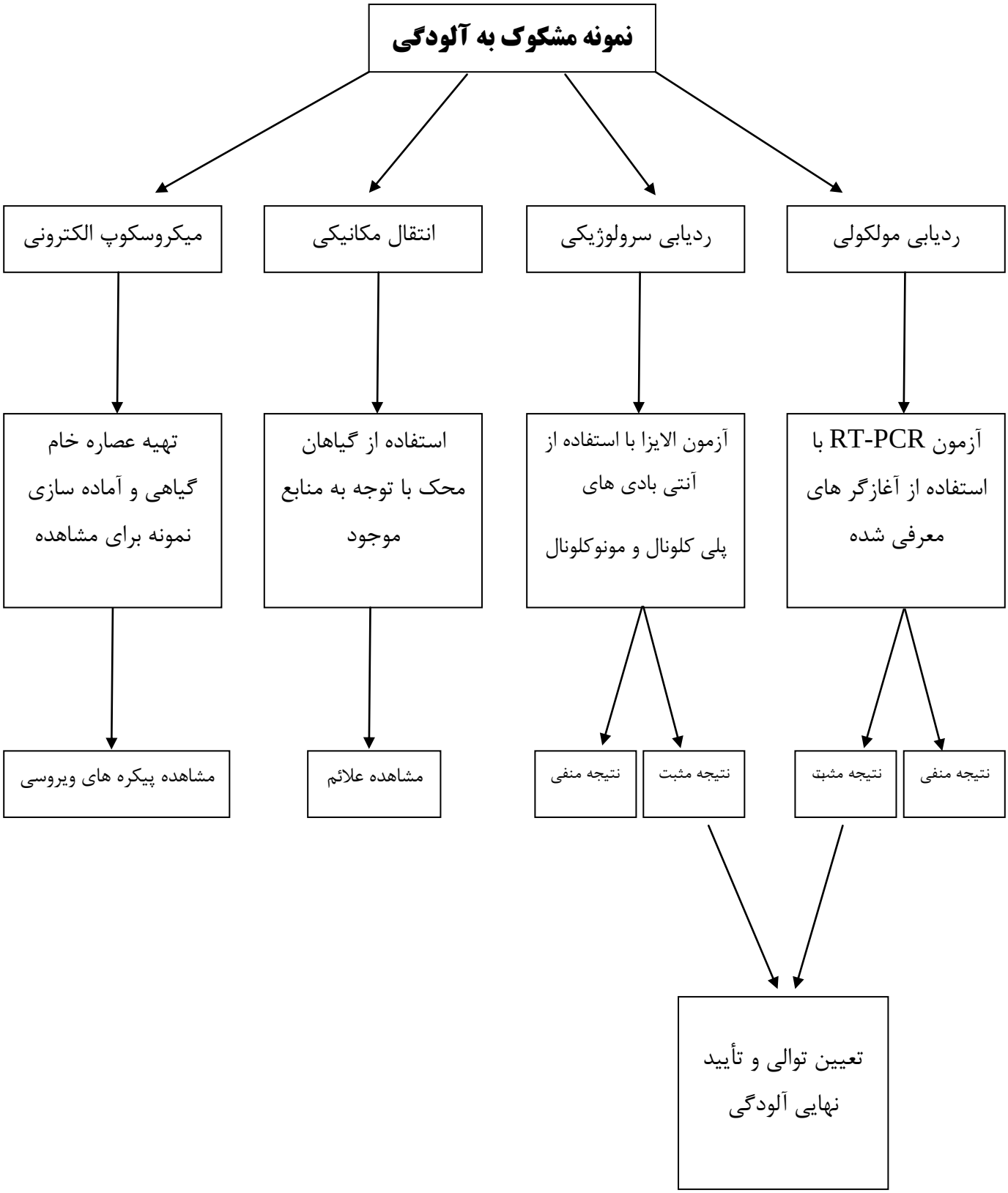
ویروس ایکس سیب زمینی (PVX) از جنس *Potexvirus* و خانواده *Alphaflexiviridae* دارای پیکره رشته ای با طول 515 نانومتر و عرض 13 نانومتر با RNA تک رشته می باشد.



این ویروس در اغلب مناطق کشت سیب زمینی وجود دارد و در ایران نیز از استان هایی نظیر مازندران، خراسان، آذربایجان، فارس، اصفهان و خوزستان گزارش شده است. علائم بیماری شامل موزاییک خفیف تا نکروز در سیب زمینی، موزاییک، کوتولگی خفیف در گوجه فرنگی و ماتل و لکه حلقوی نکروتیک در توتون است.

دامنه میزبانی این ویروس اغلب محدود بـه خانواده *Solanaceae* است اگرچه گیاهانی از خانواده های *Chenopodiaceae* و *Amaranthaceae* را هم آلوده می کند.

انتقال PVX بیشتر از طریق تماس دست و مکانیکی اتفاق می افتد ولی از سایر ناقلین آن دوگونه ملخ *Tettigonia viridissima* , *Melanoplus differentialis* و قارچ *endobioticum synchytrium* می باشند . انتقال از طریق بذر گزارش نشده است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

از گونه های تشخیصی این ویروس می توان به تاتوره و گونه های مختلف توتون و *Gompherena globosa* اشاره کرد.

روش سرولوژیکی

کیت های تشخیصی سرولوژیکی PVX بر پایه روش الایزای مستقیم و غیر مستقیم توسط شرکت های تولید کننده این کیت ها نظیر Agdia، DSMZ،Bioreba و Loewe به بازار معرفی شده است . همچنین ایمونو استریپ تشخیصی آن نیز توسط شرکت های Agdia و Bioreba تولید شده است .کیت تشخیص سریع (Fast kit) ویروس ایکس سیب زمینی نیز توسط شرکت Loewe عرضه شده است.

روش مولکولی

ردیابی PVX با واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با آغازگر های متعددی صورت گرفته است که در ذیل به دو نمونه از آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی آن اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
PPVXV1	GAYACNATGGCNCARGCNGCNTGG	300	Soliman *et al.*, 2000
PPVXC2	YTGCNGCRTTCATYTCNTC		
PVXF	TAGCACAACACAGGCCACAG	563	Nie and singh, 2001
PVXR	GGCAGCATTCATTTCAGCTC		

N=A,C,G,T Y=C,T R=A,G

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2 (25 mM)	2/5 µl
Forward primer (10µM)	1µl
Reverse primer (10µM)	1µl
dNTPs (2.5 mM)	2/5 µl
Taq DNA polymerase	0/2 µl
cDNA	2/5 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
2 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
1 دقیقه	94	واسرشته سازی	35
1 دقیقه	55	اتصال آغازگر	
2 دقیقه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

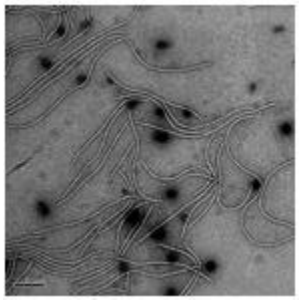
منابع

1. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
2. Nie, X. and Singh, R. P. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. Journal of Virological Methods, 91(1), 37-49.
3. Soliman, A.M., Shalaby, A.A., Barsoum, B.N., Mohamed, G.G., Nakhla, M.K., Mazyad, H.M. and Maxwell, D.P. 2000. Molecular characterization and RT-PCR-ELISA detection of a potato virus X (PVX) isolate from Egypt. Ann. Agric. Sci., 9: 1791-1804.
4. www.agdia.com
5. www.bioreba.ch

6. www.dpvweb.net
7. www.dsmz.de
8. www.loewe-info.com

ویروس ای سیب زمینی (*Potato virus A*)

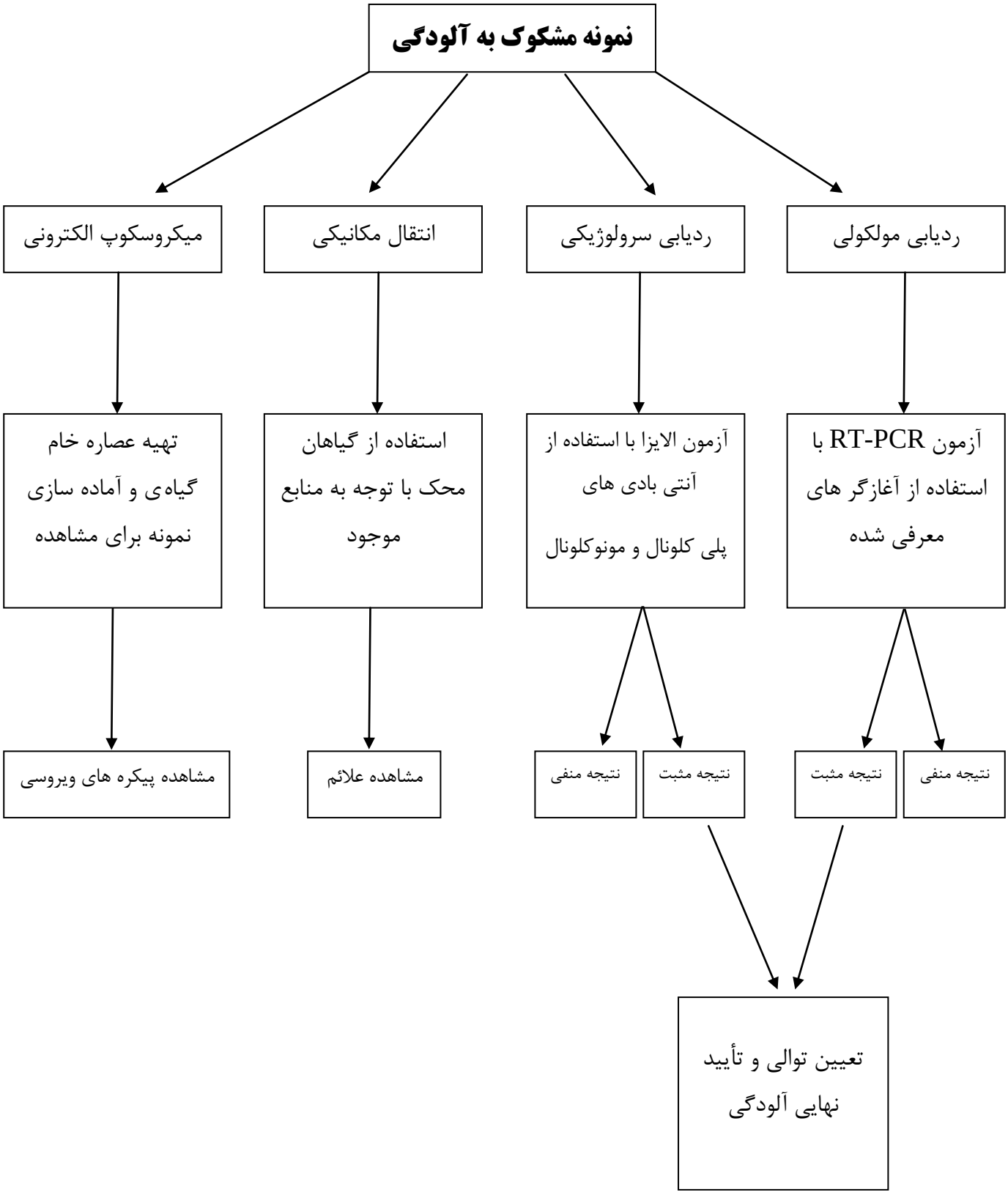
ویروس ای سیب زمینی (PVA) از جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* دارای پیکره رشته ای به طول 730 نانومتر و عرض 15 نانومتر با ژنوم از نوع RNA تک رشته می باشد.



PVA در اغلب مناطق کشت سیب زمینی شیوع دارد و در ایران نیز گزارشاتی از شیوع آن در استا ن های فارس، خراسان و آذربایجان وجود دارد. دامنه میزبانی آن محدود به خانواده *Solanaceae* است و تا 40٪ تولید سیب زمینی را کاهش می دهد.

برگهای گیاهان سیب زمینی آلوده علائم موزاییک خفیف، زبری سطح برگ و موج دار شدن حاشیه برگ را نشان می دهند بسته به شرایط ممکن است علائم خاصی نیز بروز نکند. در برخی ارقام فوق حساس نکروز انتهایی نیز بروز می کند.

انتقال ویروس توسط حداقل 7 گونه شته به طریق ناپایا صورت می گیرد که از مهمترین آنها *Myzus persicae*، *Aphis nasturtii* ، *Aphis franglae* می باشند. گزارشی از بذرزادی و انتقال توسط سس وجود ندارد. این ویروس به روش مکانیکی و از طریق عصاره گیاه آلوده نیز منتقل می شود.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

گونه های تشخیصی شامل *Nicotiana tabacum* cv. white burley و نیز رقم samsun *Lycopersicon* , *pimpinellifolium* ، *Nicandra physalodes* و برخی هیبریدهای سیب زمینی می باشد.

روش سرولوژیکی

کیت های تشخیصی سرولوژیکی PVA بر پایه روش الایزای مستقیم و غیر مستقیم توسط شرکت های تولید کننده این کیت ها نظیر Bioreba،DSMZ ،Agdia و Loewe به بازار معرفی شده است . همچنین ایمونو استریپ تشخیصی آن نیز توسط شرکت های Agdia و Bioreba تولید شده است.

روش مولکولی

ردیابی PVA با واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با آغازگر های متعددی صورت گرفته است که در ذیل به یک نمونه از آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی آن اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
PVA-F	GCTCCATACATAGCTGCTGAGTCAGC	1065	رمضانی اول ریانی و همکاران، 1386
PVA-R	CTCAAACTCACTGTTGCGAGG		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	5 µl
MgCl2	1/5 mM
Forward primer (10µM)	1µl
Reverse primer (10µM)	1µl
dNTPs	200 µM
Taq DNA polymerase	5U
cDNA	5µl
Sterile water	تا حجم 50µl

شرایط واکنش

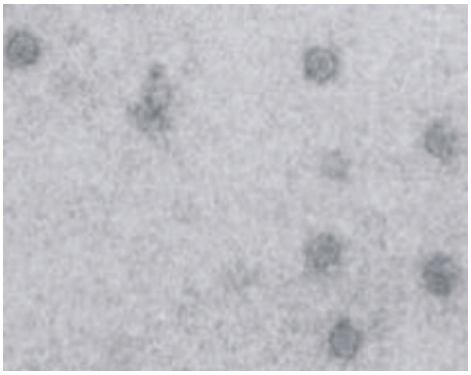
مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
3 دقیقه	95	واسرشته سازی اولیه	1
1 دقیقه	94	واسرشته سازی	35
1 دقیقه	55	اتصال آغازگر	
2 دقیقه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. رمضانی اول ریابی، ج.، معصومی، ح.، حیدرنژاد، ج.، حسینی پور، ا. و شعبانیان، م. 1386. تشخیص سرولوژیکی و مولکولی و تعیین فراوانی ویروس A سیب زمینی در مزارع استان کرمان . بیماریهای گیاهی، جلد 48،43-34.
2. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
3. www.agdia.com
4. www.bioreba.ch
5. www.dpvweb.net
6. www.dsmz.de
7. www.loewe-info.com

ویروس لوله ای شدن برگ سیب زمینی (*Potato leaf roll virus*)

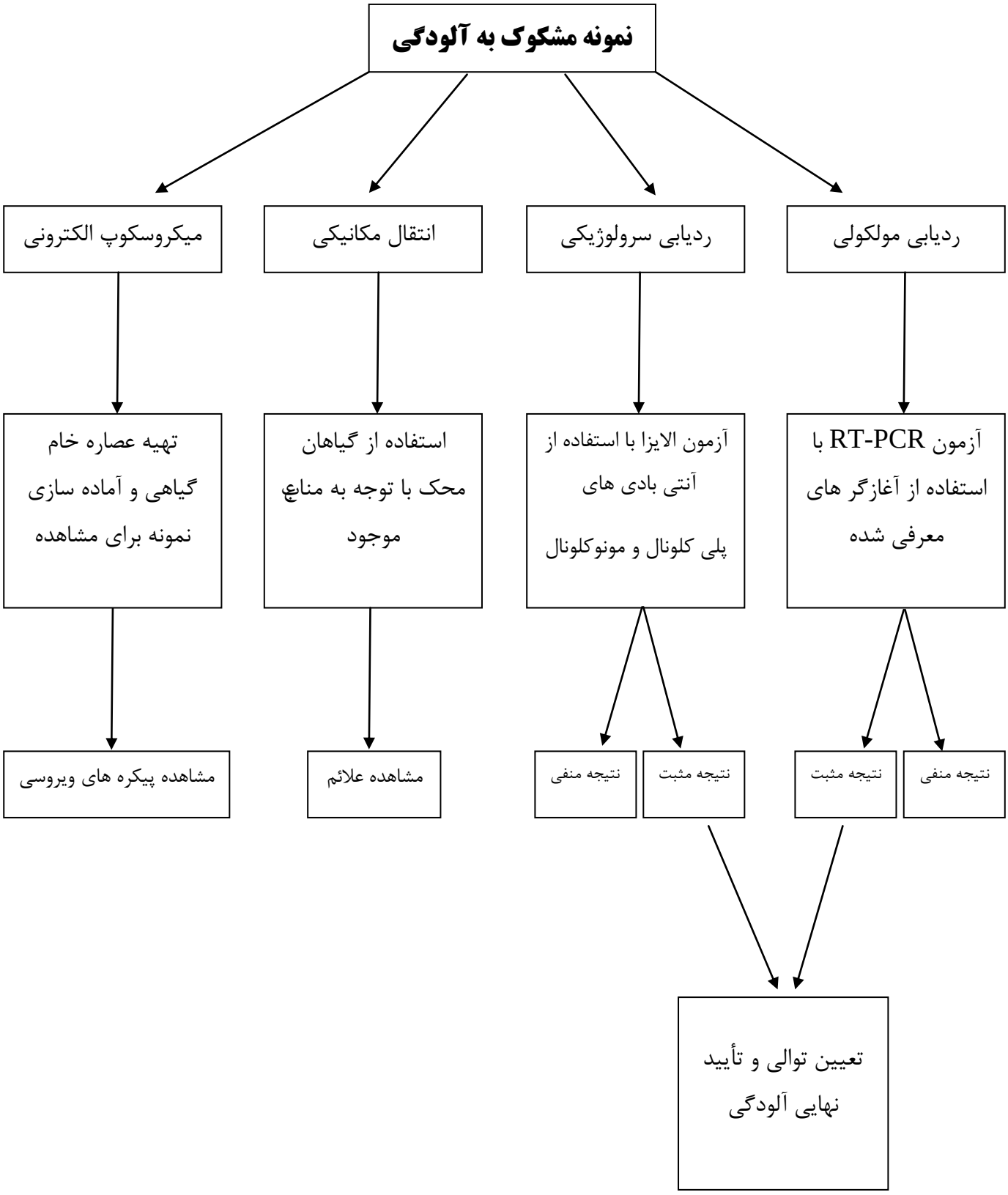
ویروس لوله ای شدن برگ سیب زمینی (PLRV) ویروسی از جنس *Polerovirus* و خانواده *Luteoviridae* است. این ویروس دارای پیکره گرد با قطر 24 نانومتر با ژنوم از نوع RNA تک رشته می باشد.



دامنه میزبانی ویروس شامل بیش از 20 گونه از خانواده *Solanaceae* است هرچند گیاهانی از خانواده های دیگر شامل *Cruciferea* , *Nolanaceae*, *Amaranthaceae* , *Portulaceae* را هم آلوده می کند.

PLRV یکی از مهمترین ویروس های آلوده کننده سیب زمینی در بسیاری از نقاط دنیاست و در ایران نیز از مناطق متعددی از جمله اصفهان، خراسان و خوزستان گزارش شده است. علائم بیماری شامل زردی در برخی از واریته ها و قرمز شدن برگ های انتهایی بوده که ممکن است برگها لوله ای شده و حالت ایستاده به خود بگیرند. گیاهان رشد یافته از غده های آلوده کوتوله شده و برگچه ها به سمت بالا لوله می شوند، حالت شکننده پیدا کرده و نکروز حاشیه ای مشاهده می شود.

انتقال ویروس از طریق شته ها خصوصاً *Myzus persicae* و درجه بعد *Macrosiphum euphorbiae* صورت می گیرد. گزارشی در مورد بذر زادی ویروس وجود نداشته و قابلیت انتقال مکانیکی هم دارد.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروس

تست بیولوژیکی

گونه های تشخیصی شامل تاتوره، فیزالیس، سیب زمینی و کلم چینی می باشد.

روش سرولوژیکی

کیت های تشخیصی سرولوژیکی PLRV بر پایه روش الایزای مستقیم و غیر مستقیم توسط شرکت های تولید کننده این کیت ها نظیر Bioreba،DSMZ ،Agdia و Loewe به بازار معرفی شده است . همچنین ایمونو استریپ تشخیصی آن نیز توسط شرکت های Agdia و Bioreba تولید شده است.

روش مولکولی

ردیابی PLRV با واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با آغازگر های متعددی صورت گرفته است که در ذیل به یک نمونه از آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی آن اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول قطعه (bp)	منبع
Forward	CGCGCTAACAGAGTTCAGCC	336	Almasi *et al*, 2013
Backward	GCAATGGGGGTCCAACTCAT		

مواد واکنش زنجیره ای پلیمراز

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2/5 µl
MgCl2	1/5 mM
Forward primer	20pmol
Reverse primer	20pmol
dNTPs	0/2 mM each
Taq DNA polymerase	0/625 U
cDNA	2 µl
Sterile water	تا حجم 25 µl

شرایط واکنش

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
3 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
1 دقیقه	94	واسرشته سازی	35
1 دقیقه	54	اتصال آغازگر	
2 دقیقه	72	گسترش	
10 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Almasi, M.A., Jafary, H., Moradi, A., Zand, N., Aghapour Ojaghkandi, M. and Aghaei, S. 2013. Detection of Coat Protein Gene of the Potato Leafroll Virus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. J. Plant Pathol. Microb, 4:1.
2. Farzadfar, SH., Golnaraghi, A.R. and Pourrahim, R. 2002. Plant viruses of Iran. Published by Saman co. 205 pages.
3. www.agdia.com
4. www.bioreba.ch
5. www.dpvweb.net
6. www.dsmz.de

7. www.loewe-info.com

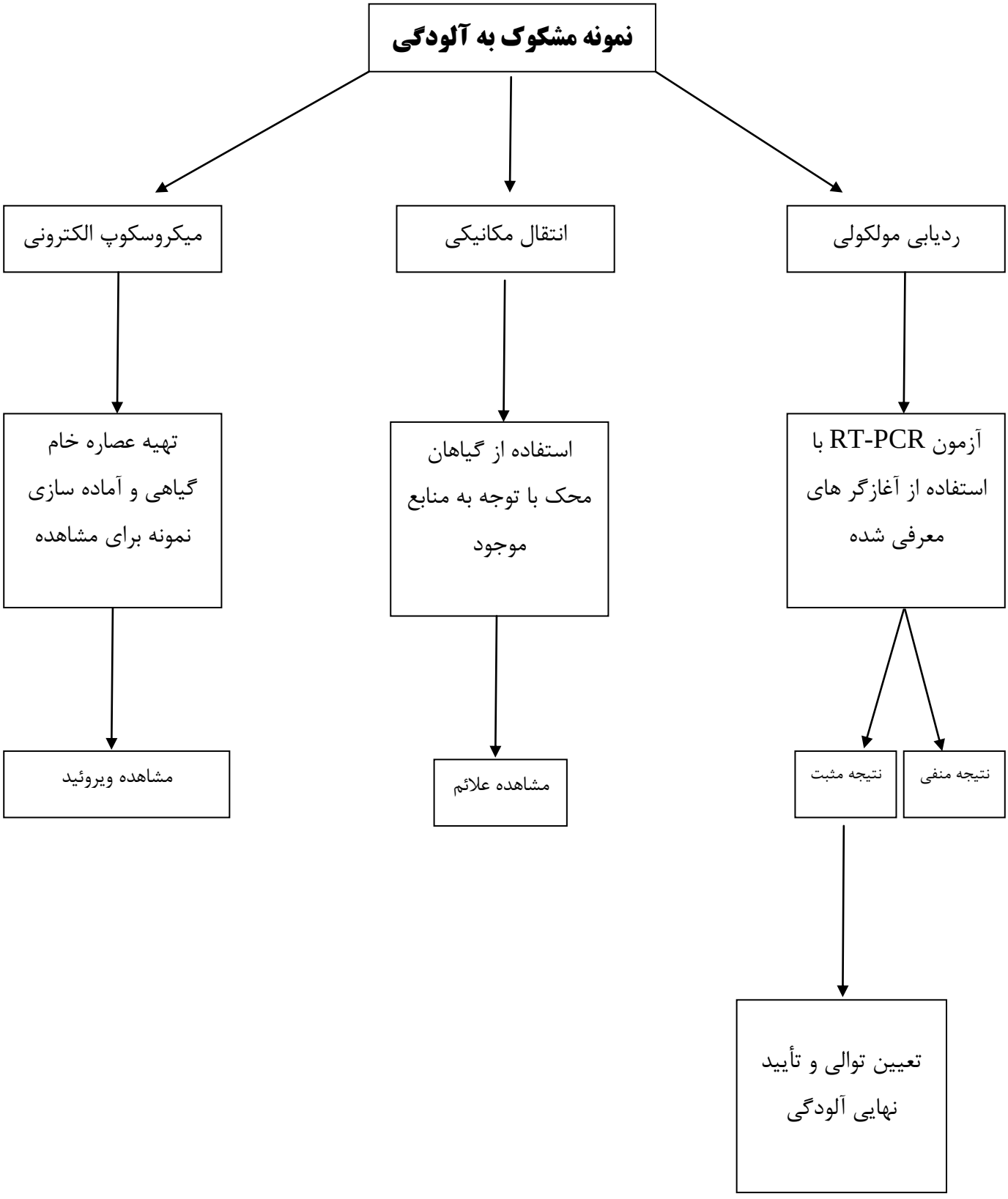
ویروئید غده دوکی سیب زمینی (*Potato spindle tuber viroid*)

ویروئید غده دوکی سیب زمینی (PSTVd) متعلق به جنس *Pospiviroid* و خانواده *Pospiviroidae* است . این ویروئید یک RNA تک رشته حلقوی کوچک بدون پوشش با ساختار ثانویه قابل توجه به طول 359 نوکلئوتید است. دامنه میزبانی طبیعی این ویروئید محدود است. میزبان های اولیه سیب زمینی و گوجه فرنگی هستند ولی گزارشاتی از ردیابی آن در آووکادو و Pepino نیز وجود دارد. دامنه میزبانی آزمایشی این ویروئید به 94 گونه از 31 خانواده می رسد.

این ویروئید در آفریقا (نیجریه)، آسیا (افغانستان، چین و هند) بخش هایی از اروپای شرقی شامل روسیه، آمریکای شمالی و مرکزی وجود دارد.

علائم بیماری بسته به استرین، کولتیوار و شرایط محیطی ممکن است از علائم شدید شامل کاهش اندازه گیاه، چرخش ساعت گرد و ایستاده برگ ها هنگامی که گیاه از بالا دیده می شود، سبز تیره و روگوز تا علائم خفیف و حتی بدون علامت خاصی متغیر است. غده ها ممکن است از نظر اندازه کوچک شده بدشکل، دوکی یا دمبلی شده و چشم های غده برجسته شوند.

PSTVd از طریق بذر منتقل می شود. همچنین انتقال مکانیکی از طریق ادوات کشاورزی نیز صورت می گیرد. آزمایشات صورت گرفته در خصوص گیرش و انتقال PSTVd توسط *Myzus persicae* از گیاه آلوده شده توسط PSTV و PLRV به طور توأم در درصد کوچکی از گیاهان موفقیت آمیز بوده است.



فلوچارت مراحل تشخیص بیماری

ردیابی ویروئید

روش سرولوژیکی

به دلیل نداشتن پوشش پروتئینی استفاده از روش های سرولوژیکی در ردیابی ویروئید ها کارایی ندارد.

روش مولکولی

یکی از رایج ترین و مهمترین روش های ردیابی ویر وئید ها استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) با استفاده از آغازگر های اختصاصی است که در ذیل به آغازگر های استفاده شده جهت ردیابی این ویروئید اشاره می شود.

نام آغازگر	توالی آغازگر ('3-'5)	طول قطعه (bp)	منبع
TG21(F)	TGTGGTTCACACCTGACCTCC	258	Constable and moran, 1996
CT20(R)	CTTCAGTTGTTTCCACCGGG		
DHL55(F)	GGGGAAACCTGGAGCGAAC	354	Hailstones *et al*., 2003
DLH56(R)	CCTGAAGCGCTCCTCCGAGC		
QFV6	CACCAGGACGCCCGCGCT	359	Yazarlou *et al*., 2008
RGV5	AAAGGTGGGAAGGAAAGAAGCCCACAGGAAGG		
Asltr	CCCTTAATGAGGACAGCCGG	359	Yazarlou *et al*., 2008
As2	CACCCCTCACGGGTCG		

مواد واکنش (Yazarlou *et al*., 2008)

نوع ماده	مقدار
PCR Buffer (10x)	2 µl
MgCl2	0/7 mM
Forward primer	20 pmol/ µl
Reverse primer	20 pmol/ µl
dNTPs	0/2 mM each
Taq DNA polymerase	1 U
cDNA	2 µl
Sterile water	تا حجم 20 µl

شرایط واکنش (Yazarlou *et al*., 2008)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
3 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	94	واسرشته سازی	35
30 ثانیه	69	اتصال آغازگر	
30 ثانیه	72	گسترش	
5 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

مواد واکنش one step RT-PCR (Hailstones *et al*., 2003 and Constable and moran, 1996)

نوع ماده	مقدار
Buffer (2x)	12/5 µl
Reverse transcriptase	0/25 µl
Forward primer	1/25 µl
Reverse primer	1/25 µl
Taq DNA polymerase	0/25 µl
RNA	2 µl
Nuclease free water	8/5 µl

شرایط واکنش (Hailstones *et al*., 2003 and Constable and moran, 1996)

مدت	دما (درجه سانتیگراد)	نام مرحله	تعداد چرخه
45 دقیقه	48	ساخت cDNA	1
2 دقیقه	94	واسرشته سازی اولیه	1
30 ثانیه	92	واسرشته سازی	35
30 ثانیه	55	اتصال آغازگر	
30 ثانیه	72	گسترش	
5 دقیقه	72	گسترش نهایی	1

منابع

1. Constable, F. and Moran, J. 1996. PCR protocols for the detection of *Chrysanthemum stunt* and *Potato spindle tuber viroids*. Final Report for the Horticultural Research and Development Corporation; project number PT 410. Department of Natural Resources and Environment, Victoria, Australia.

2. Hailstones, D.L., Tesoriero, L.A., Terras, M.A., Dephoff, C. 2003. Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. Australasian Plant Pathology, 32, 317-318.
3. Yazarlou, A., Jafarpour, B., Falahati Rastegar, M. and Javadmanesh, A. 2008. Molecular detection of potato spindle tuber viroid in Razavi and Northern Khorasan provinces. Pakistan Journal of Bioligical Sciences. 11 (12): 1642-1645.
4. www.dpvweb.net