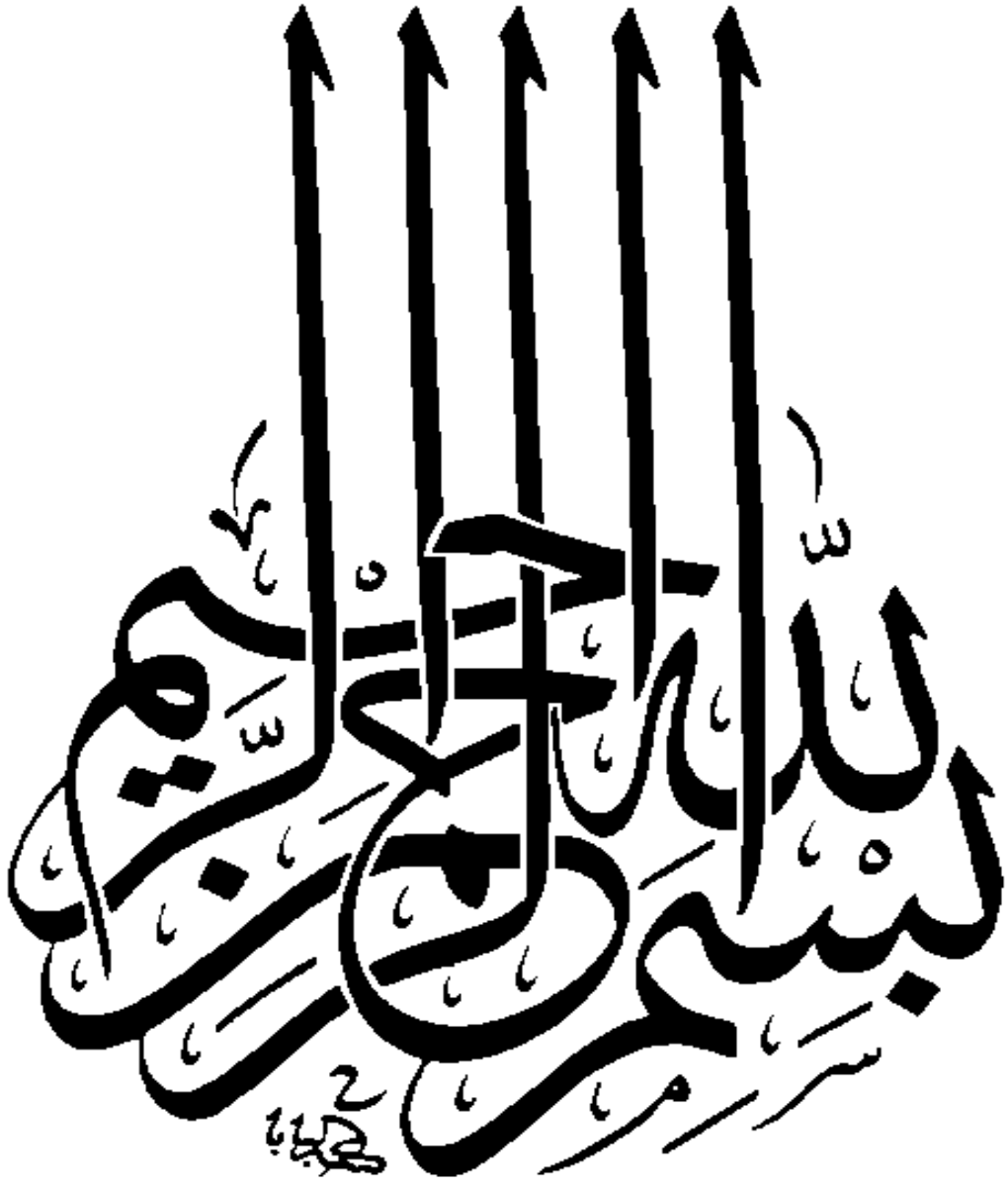
بسم الله الرحمن الرحيم

تایید اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیأت داوران نسخه ی نهائی پایان نامه خانم بهار یونسی تحت عنوان : ردیابی همزمان چند ویروس در گیاهان آلوده سیب زمینی با استفاده از روش **Multiplex RT-PCR** و مقایسه آن با آزمون سرولوژیکی اِلایزا. را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه ی علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر مسعود شمس بخش	استادیار	
۲- استاد مشاور	دکتر ناصر صفایی	استادیار	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر ابراهیم پورجم	دانشیار	
۴- اساتید ناظر: ۱-	دکتر ابراهیم پورجم	دانشیار	
۲-	دکتر رضا پوررحیم	استادیار	
۳-	-		

آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاستهای پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقالات مستخرج از پایان نامه/رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/رساله منتشر می شود نیز نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه/رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیات رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم الاجرا است.

بسمه تعالی

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیماری شناسی گیاهی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر مسعود شمس بخش و مشاوره جناب آقای دکتر ناصر صفایی از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب بهار یونسی دانشجوی رشته بیماری شناسی گیاهی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

بهار یونسی

۸۷/۷/۳۰

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

ردیابی همزمان چند ویروس در گیاهان آلوده سیب زمینی با استفاده از روش Multiplex RT-PCR و مقایسه آن با آزمون سرولوژیکی اِلایزا

نگارش

بهار یونسی

استاد راهنما:

دکتر مسعود شمس بخش

استاد مشاور:

دکتر ناصر صفایی

مهر ۱۳۸۷

تقدیم به ارزشمندترین نعمت های خداوند

پدر و مادر عزیزم

و هر آنکه به من آموخت

تشکر و قدردانی

پروردگارا تو را سپاس می گویم به خاطر هر آنچه که بخشیدی و اینک بار دیگر شکرگزار در گاهت می شوم به خاطر فرصتی که برای انجام این تحقیق به من عطا نمودی. اینک که با یاری خداوند پایان نامه خود را در مقطع کارشناسی ارشد به پایان رسانده ام، وظیفه خود می دانم که از کلیه عزیزانی که به هر نحوی مرا در انجام این پژوهش راهنمایی و کمک کردند، تشکر نمایم.

با نهایت احترام از استاد گرانقدر آقای دکتر مسعود شمس بخش که در امور پایان نامه با نظارت دقیق و مستمر مرا یاری و راهنمایی نموده و در دشواری های تحقیق مرا امید و یاری بخشیدند، تشکر می کنم.

از استاد دلسوز آقای دکتر ناصر صفایی که مسئولیت مشاوره این تحقیق را بر عهده داشتند، صمیمانه تشکر می کنم.

از اساتید محترم گروه بیماری شناسی گیاهی آقای دکتر عزیزاله علیزاده، آقای دکتر ابراهیم محمدی گل تپه و آقای دکتر ابراهیم پورجم که افتخار شاگردی ایشان را داشتم و از محضرشان بی نهایت بهره بردم کمال تشکر را دارم.

از استاد محترم آقای دکتر رضا پوررحیم که زحمت خواندن و داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند و همچنین در طول این پژوهش از راهنمایی ها و همکاری های ارزنده شان بهره بردم کمال تشکر را دارم.

از استاد محترم آقای دکتر ابراهیم پورجم که زحمت خواندن و داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند، کمال تشکر را دارم.

این تحقیق با همکاری مؤسسه ثبت و گواهی بذر استان تهران انجام گرفت. بدینوسیله از سرکار خانم مهندس فاطمه خلقتی بناء که در طول راه از هیچ کمکی در راستای پیشبرد پژوهش فروگذار ننمودند، تشکر و قدردانی می کنم.

از خانواده عزیزم که در فراز و نشیب زندگی و تحصیل تنها تکیه گاه و پشتیبان محکم من بودند و همواره راهنمای دلسوزم و آرامش بخش لحظات زندگیم هستند، تشکر می کنم و از خداوند متعال سلامتی آنها را خواستارم.

در نهایت از تمامی دوستان و همکلاسی های عزیزم که در طول دوره از لطف و مساعدتشان بهره بردم و در کنارشان روزهای زیبایی را تجربه کردم، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

چکیده

ویروس های Y (PVY)، X (PVX)، S (PVS) و پیچیدگی برگ سیب زمینی (PLRV) از مهم ترین ویروس های بیمارگر سیب زمینی به شمار می روند و به طور جدی باعث کاهش میزان و کیفیت محصول سیب زمینی می شوند. این ویروس ها از تمام مناطق مهم کشت سیب زمینی ایران گزارش شده اند. آلودگی به ویروس های یاد شده در سیب زمینی به جز ویروس Y و پیچیدگی برگ سیب زمینی معمولاً بدون علایم باقی می ماند. از این رو گیاهان سیب زمینی مزارع تولید غده بذری از لحاظ عاری بودن از ویروس های یاد شده و صدور گواهی سلامت بذر باید به طور منظم بررسی شوند. تا به حال آزمون اِلایزا به طور وسیعی برای ردیابی ویروس های یاد شده مورد استفاده قرار گرفته است، اما اغلب به دلیل غلظت پایین ویروس و وجود ترکیبات بازدارنده در عصاره گیاهان ردیابی ویروس ها به خوبی انجام نمی گیرد. بنابراین معرفی یک روش دقیق، حساس، کارآمد، قابل اعتماد، ارزان و سریع برای ردیابی همزمان ویروس های سیب زمینی ضروری است. در این تحقیق، روش Multiplex RT-PCR برای ردیابی همزمان ویروس های Y، X، S، پیچیدگی برگ سیب زمینی و کنترل داخلی استفاده شد. این روش با آزمون سرولوژیکی اِلایزا که روشی رایج برای ردیابی ویروس های سیب زمینی است، مقایسه شد. به همین منظور، RNA کل از برگ گیاهان سیب زمینی آلوده به ویروس با استفاده از بافر RNX-plus استخراج شد. سپس DNA مکمل برای ویروس های فوق و ژن 18S rRNA با استفاده از آغازگر اختصاصی معکوس به صورت جداگانه ساخته شد و واکنش Uniplex RT-PCR برای هر کدام از ویروس ها انجام گرفت. برای بهینه سازی واکنش Multiplex RT-PCR، RNA کل از مخلوط وزن های مساوی از بافت دو گیاه که هر کدام به دو ویروس آلوده بودند (PVY, PVX, PVS, PLRV) استخراج گردید. سپس، واکنش Multiplex RT-PCR با استفاده از پنج جفت آغازگر در یک واکنش انجام گرفت. در نهایت، پنج قطعه متفاوت (۱۴۵-۳۴۲ جفت باز) که اختصاصی ویروس ها و کنترل داخلی بودند به طور همزمان تکثیر شد و بر اساس وزن

مولکولی آنها تشخیص داده شدند. نتایج نشان داد Multiplex RT-PCR روشی مناسب در تشخیص گیاهان آلوده سیب زمینی به ویروس های Y، X، S و پیچیدگی برگ سیب زمینی است. حساسیت روش بهینه سازی شده Multiplex RT-PCR با روش تجاری DAS-ELISA در ردیابی ویروس های Y، S و پیچیدگی برگ سیب زمینی مقایسه شد. عصاره گیاه و RNA کل از بافت گیاهی آلوده استخراج شد و رقت های یک دهم آن به صورت پشت سر هم آماده شد و در هر دو روش Multiplex RT-PCR و اِلایزا برای ردیابی ویروس ها به کار رفت. نتایج نشان داد که حساسیت Multiplex RT-PCR صد برابر بیشتر از آزمون اِلایزا در ردیابی ویروس های Y، S و پیچیدگی برگ سیب زمینی می باشد و حساسیت Duplex RT-PCR ده هزار برابر بیشتر از آزمون اِلایزا در ردیابی ویروس Y سیب زمینی است. به علاوه اِلایزا اغلب به دلیل غلظت پایین ویروس و اثر بازدارندگی ترکیبات فنولی و پلی ساکاریدی موجود در عصاره گیاهان در ردیابی ویروس ها به خوبی عمل نمی کند. همچنین در اِلایزا امکان اعمال کنترل داخلی برای پرهیز از نتایج منفی کاذب وجود ندارد. در نتیجه روش مولکولی Multiplex RT-PCR، روشی حساس تر، مناسب تر، اختصاصی تر، ارزان تر و سریع تر از اِلایزا در ردیابی همزمان ویروس های یاد شده می باشد و برای ردیابی همزمان چند ویروس در مزارع سیب زمینی که با هدف تولید غده های بذری کشت شده اند، بسیار موثر است.

واژه های کلیدی: کنترل داخلی، ویروس های Y، X، S و ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی.

فهرست مطالب **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: بررسی منابع **۵**

۲-۱- خصوصیات گیاهشناسی سیب زمینی ۵

۲-۲- سابقه شناسائی ویروس های سیب زمینی ۶

۲-۳- خصوصیات ویروس های مهم سیب زمینی ۷

۲-۳-۱- ویروس Y سیب زمینی (*Potato potyvirus Y,* PVY) ۷

۲-۳-۲- ویروس X سیب زمینی (*Potato virus X*, PVX) ۱۳

۲-۳-۳- ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (*Potato leafroll virus*, PLRV) ۱۶

۲-۳-۴- ویروس S سیب زمینی (*Potato virus S,* PVS) ۲۰

۲-۴- روش های تشخیص و ردیابی ویروس ها ۲۲

۲-۵- روش های سرولوژیکی ۲۳

۲-۵-۱- انواع آنتی بادی ۲۳

۲-۵-۲- انواع اِلایزا ۲۵

۲-۶- تشخیص ویروس ها به وسیله RT-PCR ۲۶

۲-۷- نسخه برداری معکوس (Reverse transcription) ۲۷

۲-۸- واکنش های زنجیره ای پلیمراز چند تایی (Multiplex PCR) ۲۸

۲-۹- کنترل داخلی (Internal control) ۳۰

۲-۱۰- کاربرد روش Multiplex PCR در ردیابی ویروس های گیاهی ۳۲

۲-۱۱- مقایسه حساسیت دو روش Multiplex RT-PCR و ELISA در ردیابی ویروس های گیاهی ۳۹

فصل سوم: مواد و روش ها ۴۱

۳-۱- منابع ویروس ها ۴۱

۳-۲- روش انجام آزمون اِلایزا ۴۱

۳-۲-۱- مرحله پوشش دادن چاهک های بشقابک اِلایزا (Coating step) ۴۱
۳-۲-۲- تهیه عصاره گیاهی از غده ۴۲
۳-۲-۳- تهیه عصاره گیاهی از برگ ۴۲
۳-۲-۴- مرحله ریختن عصاره نمونه ها (Loading step) ۴۲
۳-۲-۵- مرحله ریختن آنتی بادی متصل به آنزیم ۴۳
۳-۲-۶- مرحله اضافه کردن سوبسترا ۴۳
۳-۳- استخراج RNA کامل از گیاهان آلوده ۴۴
۳-۴- آماده سازی آب تیمار شده با DEPC ۴۴
۳-۵- بررسی کمیت و کیفیت RNA کل استخراج شده ۴۵
۳-۵-۱- استفاده از بیوفتومتر ۴۵
۳-۵-۲- روش الکتروفورز ژل آگارز ۴۶
۳-۶- حذف RNase از ابزار و لوازم آزمایشگاه ۴۶
۳-۷- آزمون نسخه برداری معکوس (Reverse Transcription)- واکنش های زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction) ۴۷
۳-۸- مواد لازم برای واکنش نسخه برداری معکوس ۴۷
۳-۹- مواد لازم برای واکنش های زنجیره ای پلیمراز ۴۹
۳-۱۰- انجام واکنش نسخه برداری معکوس و تهیه cDNA ۵۰
۳-۱۱- انجام واکنش های زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۵۴
۳-۱۲- مقایسه حساسیت آزمون سرولوژیکی اِلایزا با روش مولکولی Multiplex RT-PCR درردیابی ویروس ها ۵۷
۳-۱۲-۱- ردیابی غلظت های مختلف ویروس ها با روش Multiplex-RT-PCR و Duplex RT-PCR ۵۷
۳-۱۲-۲- ردیابی غلظت های مختلف ویروس ها با روش اِلایزا ۵۹
۳-۱۳- کشت بافت گیاه سیب زمینی به منظور نگهداری منابع ویروسی ۶۰

۳-۱۳-۱- تهیه محیط کشت ۶۰
۳-۱۳-۲- مشخصات و مراحل ضدعفونی کردن ریز نمونه ها ۶۲
۳-۱۳-۳- استریل کردن ریز نمونه ها ۶۲
فصل چهارم: نتایج وبحث ۶۳
۴-۱- بررسی کمیت و کیفیت RNA کل استخراج شده ۶۳
۴-۱-۱- استفاده از بیوفتومتر ۶۳
۴-۱-۲- روش الکتروفورز ژل آگارز ۶۳
۴-۲- واکنش RT-PCR برای یک ویروس ۶۴
۴-۳- واکنش Multiplex RT-PCR ۶۵
۴-۴- مقایسه حساسیت واکنش بهینه سازی شده Duplex RT-PCR و DAS-ELISA ۶۸
۴-۵- مقایسه حساسیت واکنش بهینه سازی شده Multiplex RT-PCR و DAS-ELISA ۷۱
۴-۶- بحث ۷۶
مراجع ۸۱

فهرست جداول

جدول ۳-۱- توالی و موقعیت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق ۴۸

جدول ۳-۲- مواد لازم و مقدار هر یک از آنها برای تهیه cDNA در واکنش Uniplex-RT ۵۱

جدول ۳-۳- میزان RNA کل و آغازگرهای معکوس برای تهیه cDNA در واکنش Duplex-RT ۵۲

جدول ۳-۴- میزان RNA کل و آغازگرهای معکوس برای تهیه cDNA در واکنش Triplex-RT ۵۲

جدول ۳-۵- میزان RNA کل و آغازگرهای معکوس برای تهیه cDNA در واکنش Tetraplex-RT ۵۳

جدول ۳-۶- میزان RNA کل و آغازگرهای معکوس برای تهیه cDNA در واکنش Pentaplex-RT ۵۳

جدول ۳-۷- مواد لازم و مقدار هر یک از آنها برای تهیه محلول پایه PCR در واکنش Uniplex PCR ۵۵

جدول ۳-۸- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR در واکنش Multiplex ۵۶

جدول ۳-۹- مواد و غلظت مورد نیاز واکنش Multiplex PCR ۵۸

جدول ۳-۱۰- محیط کشت BT1FH (Free Hormone) ۶۱

جدول ۴-۱- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR در واکنش multiplex در ردیابی غلظت های مختلف ویروس ها ۶۸

جدول ۴-۲- نتایج ردیابی غلظت های ویروس Y سیب زمینی در آزمون DAS-ELISA و Duplex RT-PCR ۷۰

جدول ۴-۳- نتایج ردیابی غلظت های ویروس S سیب زمینی در آزمون DAS-ELISA و Multiplex RT-PCR ۷۲

جدول ۴-۴- نتایج ردیابی غلظت های ویروس Y سیب زمینی در آزمون DAS-ELISA و Multiplex RT-PCR ۷۳

جدول ۴-۵- نتایج ردیابی غلظت های ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی در آزمون DAS-ELISA و Multiplex RT-PCR ۷۴

جدول ۴-۶- مقایسه حساسیت ردیابی دو روش DAS-ELISA و Multiplex RT-PCR ۷۵

فهرست شکل ها

شکل۴-۱-RNA کل استخراج شده بااستفاده ازبافرRNX-plusتفکیک‌شده درژل‌آگارز ۰/۸درصد.....۶۴

شکل۴-۲- ردیابی چهار ویروس و18S rRNA از برگ های آلوده سیب زمینی به هر چهار ویروس توسط واکنش RT-PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی هر ویروس و 18SrRNA ۶۵

شکل ۴-۳- ردیابی ترکیب های مختلف ویروس های مورد بررسی و کنترل داخلی توسط روش Multiplex RT-PCR ۶۷

شکل ۴-۴- حساسیت روش Duplex RT-PCR در ردیابی رقت های مکرر ویروس Y سیب زمینی به همراه کنترل داخلی 18S rRNA ۶۹

شکل ۴-۵- حساسیت روش Multiplex RT-PCR در ردیابی رقت های مکرر ویروس هایY، S و پیچیدگی برگ سیب زمینی به همراه کنترل داخلی ۷۱

فصل اول

مقدمه

سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) یکی از محصولات زراعی مهم ایـران و جهـان مـی باشـد. بـر اساس گزارش FAO در سال ۲۰۰۷ سطح زیر کشت سیب زمینی در دنیا حدود ۱۹ میلیون هکتار و میزان تولید آن ۳۲۰ میلیون تن در سال مـی باشـد و کـشورهای چـین، روسـیه، هنـد و جمهـوری اوکراین به ترتیب با تولید ۷۲، ۳۵، ۲۶ و ۱۹ میلیون تن عمده ترین کشورهای تولیـد کننـده سـیب زمینی در دنیا می باشند. ایران با سطح زیر کشت ۱۶۳ هزار هکتار و تولید سـالانه ۴/۲ میلیـون تـن در سال مقام سوم را در آسیا و مقام دوازدهم را در دنیا به خود اختصاص داده است (Anonymous, 2007). حدود ۹۶/۶ درصد سطح زیر کشت این محصول در کشورمان به صورت زراعت آبی با تولیـد ۴۱۸۸۲۰۷ تن و بقیه به صورت دیم با تولید ۳۰۳۱۴/۶۴ تن می باشد. بیـشترین سـطح زیـر کـشت این محصول در استان های اردبیل، اصفهان، همدان، آذربایجان شرقی، فـارس و خراسـان قـرار دارد (بی نام، ۱۳۸۵).

سیب زمینی گیاهی حساس به آفات و بیماری هاست و هر ساله مقداری از این محصول توسط آفات و بیماری ها، از بین می رود و از این میان بیماری های ویروسی یکی از مهـم تـرین عوامـل کـاهش محصول به شمار می روند. بیماری های ویروسی به طور متوسط تا ٪۵۰ باعث کاهش محصول سیب زمینی می شوند (Beemster and de Bokx, 1987). تا بـه حـال ۳۵ ویـروس آلـوده کننـده سـیب زمینی از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است (Salazar, 1996). تعـدادی از ایـن ویـروس هـا دارای پراکنش جهانی بوده و خسارت شدیدی به محصول وارد می کنند، ماننـد ویـروس Y سـیب زمینـی (*Potato virus Y,* PVY) تـا ٪۸۰ (Beemster and de Bokx, 1987)، ویـروس X سـیب زمینـی (*Potato virus X,* PVX) تا ٪۱۰ (Loebenstein, 2001)، ویـروس پیچیـدگی بـرگ سـیب زمینـی (*Potato leafroll virus*, PLRV) متوسط ٪۳۳ تا حداکثر ٪۵۵ (Loebenstein, 2001)، ویروس M سیب زمینی (*Potato virus M*, PVM) و ویروس S سیب زمینی (*Potato virus S,* PVS) با ۱۰ تا ۲۰ درصد خسارت، از مهم ترین ویروس های سیب زمینی به شمار مـی رونـد (Beemster and de Bokx, 1987).

آلودگی مناطق مختلف کاشت سیب زمینی به این ویروس ها در ایران مطالعه و گزارش شده است؛ در منطقه کرمان میزان آلودگی به ویروس های Y، S و A سیب زمینی به ترتیب تا ٪۱۰/۸، ٪۰/۸۳ و ٪۱۵/۸ تعیین شده است (رمضانی و همکاران، ۱۳۸۳). ویروس Y سیب زمینی شایعترین ویروس مزارع سیب زمینی در استان های خراسان، گیلان و مازندران می باشد (مقصودی و همکاران،۱۳۸۳). بعلاوه این ویروس از استان های اصفهان و همدان نیز گزارش شده است (طوسی و همکاران، ۱۳۸۳). همچنین ویروس X سیب زمینی از استان های خراسان و اردبیل گزارش شده است (فروتنی و همکاران، ۱۳۸۳). در استان خوزستان آلودگی نمونه های جمع آوری شده به ویروس های Y، S، X، M، پیچیدگی برگ سیب زمینی و ویروس موزاییک یونجه (*Alfalfa mosaic virus,* AlMV) به ترتیب ٪۷۴، ٪۶۸، ٪۴۴، ٪۲۲، ٪۲۵ و ٪۱۱/۵ گزارش شده است. دیگر ویروس های گزارش شده از گیاه سیب زمینی در ایران عبارتند از؛ ویروس موزاییک یونجه گزارش شده از خوزستان (خاک ور و همکاران، ۱۳۸۴)، کرج، ورامین، همدان و دماوند (دانش و همکاران، ۱۳۶۵)، ویروس کوتولگی بادنجان (*Eggplant mottled dwarf virus*, EMDV)، گزارش شده از استان اصفهان (دانش وهمکاران، ۱۳۶۸) و استان تهران (فرزادفر وهمکاران، ۱۳۷۹) ویروس لکه حلقوی توتون (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) گزارش شده از استان اصفهان (زنگنه و دانش، ۱۳۶۲) و ویروس پژمردگی خالدار گوجه فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) گزارش شده از فیروزکوه (Pourrahim *et al.*, 2001). اخیراً انتشار و پراکندگی ویروس های مهم سیب زمینی از نقاط مهم کشت این محصول در ایران مطالعه و گزارش شده است (Pourrahim *et al.,* 2007). بر این اساس میزان آلودگی به ویروس های S، Y، A، X، M و پیچیدگی برگ سیب زمینی به ترتیب ٪۳۵/۹، ٪۳۴/۴، ٪۲۷، ٪۲۰/۸، ٪۹، ٪۱۳/۹ تعیین شده است. تمام مزارع سیب زمینی که در این تحقیق مطالعه شدند از ٪۲۸/۸ تا ٪۹۸/۶ آلودگی داشتند. بیشترین و کمترین آلودگی به این ویروس ها مربوط به استان های کرمان و اردبیل به ترتیب ٪۹۳/۲ و ٪۵۶/۷ می باشد. بیشترین حد

آلودگی مخلوط مربوط به ویـروس هـای PVS + PVX (۸/۶٪) و PVY + PVX (۷/۶٪) مـی باشـد (Pourrahim *et al.,* 2007).

بر خلاف اکثر عوامل بیماری زا، ویروس های سیب زمینی می توانند بدون ایجاد هر گونـه علایمـی در گیاه باعث خسارت شوند؛ در این حالت خسارت به صورت کاهش محسوس میزان تولید و قـدرت انبارداری محصول می باشد (de Bokx and van der Want, 1987). به همین دلیـل امکـان حـذف آنها توسط کشاورزان وجود ندارد و ایجاد یک سامانه جامع تولید بذر سـالم سـیب زمینـی در کـشور ضروری است. با توجه به تولید غده های بذری در داخل کشور، آلودگی منـاطق مختلـف و ضـرورت کنترل و صدور گواهی سلامت غده های بذری برای کاشت، معرفی یک روش دقیق، حساس، سـریع و ارزان برای ردیابی ویروس های سیب زمینی بسیار ضروری است.

روش های مورد استفاده در تشخیص ویروس ها شامل سنجش بیولوژیکی، میکروسـکوپ الکترونـی، روش های سرولوژیکی، هیبریداسیون اسید نوکلئیک و روش های مبتنی بر واکنش های زنجیـره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction, PCR) می باشد (Hull, 2002). روش های مولکـولی مثـل RT-PCR، هیبریداسیون اسید نوکلئیـک، real-time PCR و روش هـای سـرولوژیکی مثـل DAS-ELISA (double-antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay) در ردیـابی ویروس ها کاربرد دارند(Hull, 2002). تمام روش های گفته شده در یک زمان فقط قادر بـه ردیـابی یک ویروس هستند (Du et al., 2006). اخیراً روش microarray موفق به ردیابی همزمـان چنـدین ویروس شده است (Boonham *et al.,* 2007) اما به دلیل هزینه بالای این روش و نیاز به تجهیـزات و تخصص،microarray، روشی معمول برای تشخیص ویروس ها نمی باشد.

با توجه به میزان بالای آلودگی مزارع سیب زمینی ایران به ویروس های یاد شده، تولیـد غـده هـای بذری در کشور و ضرورت استفاده از بذر سالم، ردیابی سریع و همزمان ویروس های سیب زمینی در مزارع غده های بذری ضروری می باشد. از این رو هـدف از انجـام ایـن تحقیـق بهینـه سـازی روش Multiplex PCR برای تشخیص همزمان چند ویـروس رایـج (PVX, PVY, PLRV, PVS) مـزارع

سـیب زمینـی ایـران مـی باشـد. بـه عـلاوه در ایـن تحقیـق حـساسیت، سـرعت و دقـت دو روش Multiplex-PCR و ELISA در ردیابی ویروس های سیب زمینی مقایسه می شود.