بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

تشخیص همزمان ویروس‌های مهم سیب‌زمینی با استفاده روش multiplex RT-PCR

پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی

مهرداد مهاجر

استاد راهنما

دکتر امیر مساح

۱۳۹۳

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی آقای مهرداد مهاجر

تحت عنوان

تشخیص همزمان ویروس‌های مهم سیب‌زمینی با استفاده روش multiplex RT-PCR

در تاریخ ۹۳/۸/۱۱ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر امیر مساح
۲- استاد مشاور پایان نامه	دکترمسعود بهار
۳- استاد داور پایان نامه	دکتر بهرام شریف نبی
۵- استاد داور پایان نامه	دکتر سید بدرالدین ابراهیم طباطبایی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر محمد مهدی مجیدی

تشکر و قدر دانی:

نخست سپاس و ستایش از آن خداوندی است که بنده کوچکش را در دریای بیکران اندیشه، قطره‌ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه‌های ناب آموزگارانی بزرگ به تماشا نشیند. لذا اکنون که در سایه‌سار بنده نوازی هایش پایان‌نامه حاضر به انجام رسیده است، برخود لازم می دانم تا مراتب سپاس را از بزرگوارانی به جا آورم که اگر دست یاریگرشان نبود، هرگز این پایان‌نامه به انجام نمی‌رسید.

پدر و مادر عزیزم که در تمام لحظات زندگی حضور سبزشان سایبان امن زندگیم بوده است.

برادر و خواهر مهربانم که همیشه از حمایت‌های بی‌دریغشان بهره برده‌ام.

از استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر امیر مساح که زحمت راهنمایی این پایان‌نامه را بر عهده داشتند، کمال سپاس را دارم.

از استاد عالی‌قدرم جناب آقای دکتر مسعود بهار که زحمت مشاوره این پایان‌نامه را متحمل شدند، صمیمانه تشکر می کنم.

از جناب آقای دکتر شریف‌نبی و جناب آقای دکتر طباطبایی که زحمت بازخوانی و داوری این پایان‌نامه را بر عهده داشتند، سپاس‌گذارم. همچنین ازجناب آقای دکتر خواجه‌علی به خاطر یاری در انجام مراحل این تحقیق تشکر می‌کنم.

از کارشناس محترم آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی آقای مهندس پرهام حسینی و کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی آقای مهندس محمدی و همچنین آقای رحمتی و عزیزی کمال تشکر را دارم.

از دوستان عزیزم آقایان قبادی، میرزایی، آبخشت، راغبی، خضرپور، بوالحسنی، غلامی و خانم‌ها سلیمی، جوادی، محمدپور، حقیقی، چوپان‌نژاد، مجیدیان و دانشجویان کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی ورودی ۹۱ بی‌نهایت سپاس‌گذارم.

در پایان نیز از همه عزیزانی که در تمام مراحل انجام این تحقیق مرا یاری نمودند، کمال تشکر را دارم.

مهرداد مهاجر

پاییز ۹۳

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری های ناشی از پژوهش موضوع این

پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به

پدر بزرگوار و مادر مهربانم

آن دو فرشته ای که از خواسته هایشان گذشتند،

سختی ها را به جان خریدند و خود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده ام برسم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست ..... هشت
فهرست اشکال ..... یازده
فهرست جداول ..... دوازده
چکیده ۱
فصل اول:مقدمه و بررسی منابع ۲
مقدمه ۲
۱-۲- تاریخچه سیب زمینی ۳
۱-۳- گیاهشناسی سیب زمینی ۳
۱-۴- ارقام سیب زمینی ۳
۱-۵-سازگاری ۴
۱-۶- اهمیت محصول سیب زمینی ۴
۱-۷- آفت ها و علف های هرز سیب زمینی ۵
۱-۸- بیماری های سیب زمینی ۶
۱-۹- بیماری های ویروسی سیب زمینی ۷
۱-۱۰- خانواده *Potyviridae* ۸
۱-۱۰-۱- ویروس Y سیب زمینی (PVY) ۸
۱-۱۰-۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی PVY ۹
۱-۱۰-۳- سازمان ژنوم PVY ۹
۱-۱۰-۴- تشکیل اندام های ویژه(Inclusion body) ۱۰
۱-۱۰-۵- اپیدمیولوژی PVY ۱۰
۱-۱۰-۶- دامنه میزبانی(روی گیاهان محک) ۱۱
۱-۱۰-۷- نژادهای ویروس Y سیب زمینی ۱۱
۱-۱۰-۸- علایم ویروس Y سیب زمینی ۱۱
۱-۱۱- خانواده *Luteoviridae* ۱۲
۱-۱۱-۱- ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (PLRV) ۱۲
۱-۱۱-۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی PLRV ۱۲
۱-۱۱-۳- سازمان ژنوم PLRV ۱۲
۱-۱۱-۴- اپیدمیولوژی PLRV ۱۳
۱-۱۱-۵- دامنه میزبانی PLRV (روی گیاهان محک) ۱۴
۱-۱۱-۶- نژادهای PLRV ۱۴
۱-۱۱-۷- علایم بیماری PLRV ۱۵

۱-۱۲- خانواده *Betaflexiviridae* ۱۵
۱-۱۲-۱- ویروس اس سیب زمینی (PVS) ۱۶
۱-۱۲-۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی PVS ۱۶
۱-۱۲-۲- اپیدمیولوژی PVS ۱۷
۱-۱۲-۳- دامنه میزبانی PVS (روی گیاهان محک) ۱۷
۱-۱۲-۴- نژادهای PVS ۱۷
۱-۱۲-۵- علایم PVS ۱۷
۱-۱۳- خانواده *Bromoviridae* ۱۸
۱-۱۳-۱- ویروس موزاییک یونجه (AMV) ۱۸
۱-۱۳-۲- خصوصیات ویروس موزاییک یونجه ۱۹
۱-۱۳-۳- سازمان ویروس موزاییک یونجه ۱۹
۱-۱۳-۴- اپیدمیولوژی ویروس موزاییک یونجه ۲۰
۱-۱۳-۵- دامنه میزبانی ویروس موزاییک یونجه (روی گیاهان محک) ۲۱
۱-۱۳-۶- نژادهای ویروس موزاییک یونجه ۲۱
۱-۱۳-۷- علایم ویروس موزاییک یونجه ۲۱
۱-۱۴- روش های تشخیص ویروس های سیب زمینی ۲۵
۱-۱۵- ردیابی ویروس های سیب زمینی با استفاده از واکنش نسخه برداری معکوس و زنجیره پلی مراز (RT-PCR) ۲۶
۱-۱۶- روش duplex RT-PCR و multiplex RT-PCR ۲۷
۱-۱۷- اهداف تحقیق ۲۸
فصل دوم: مواد و روش ها ۳۰
۲-۱- نمونه برداری از مزارع سیب زمینی ۳۰
۲-۲- مواد گیاهی ۳۱
۲-۳- استخراج RNA کل گیاهی با استفاده از روش لیتیم کلراید ۳۱
۲-۳-۱- تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده ۳۲
۲-۴- واکنش رونویسی معکوس RT-PCR ۳۲
۲-۴-۱- آغازگرهای اختصاصی ۳۲
۲-۴-۲- مخلوط نوکلئوتیدی dNTP ۳۳
۲-۴-۳- بافر RT ۳۳
۲-۴-۴- آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (Reverse transcriptase) ۳۳
۲-۴-۵- کلرید منیزیم ۳۴
۲-۴-۶- بافر PCR ۳۴
۲-۴-۷- آنزیم *Taq* DNA Polymerase ۳۴
۲-۴-۸- *Taq* DNA Polymerase 2x Master Mix Red ۳۴
۲-۵- ساخت cDNA (نسخه برداری معکوس) ۳۴
۲-۶- واکنش PCR ۳۵

۲-۷- بررسی محصول RT-PCR ۳۸
۲-۸- آماده سازی محصول PCR جهت توالی یابی ویروس های مورد نظر ۳۹
۲-۹- آزمون multiplex RT-PCR ۳۹
۲-۹-۱- انتخاب جفت آغازگرها در آزمون multiplex RT-PCR ۳۹
۲-۹-۲- بهینه سازی مقدارها و غلظت های مواد مورد استفاده در multiplex RT-PCR ۳۹
۲-۹-۳- بهینه سازی برنامه دمایی multiplex RT-PCR ۴۰
۲-۹-۴- بهینه سازی آزمون duplex RT-PCR ۴۰
۲-۹-۵- بهینه سازی آزمون multiplex RT-PCR ۴۲
۲-۹-۶- آزمون multiplex RT-PCR ۴۳
۲-۱۰- اعتبارسنجی روش بهینه سازی شده multiplex RT-PCR ۴۵

فصل سوم: نتایج و بحث ۴۶
۳-۱- نمونه برداری از مزارع سیب زمینی ۴۶
۳-۲- ارزیابی استخراج RNA کل از نمونه‌های برگ آلوده به PVY، PLRV، PVS و AMV ۵۴
۳-۳- ردیابی PVY، PLRV، PVS، AMV و ژن کنترل داخلی ازنمونه‌های برگ با استفاده از واکنشRT-PCR ۵۴
۳-۴- بهینه‌سازی شرایط آزمون PCR ۵۵
۳-۵- بررسی توالی‌های PVY، PVS، AMV، PLRV با استفاده از جستجویBLAST ۵۶
۳-۶- ردیابی همزمان PVY، PLRV، PVS، AMV و ژن کنترل داخلی ازنمونه‌های برگ با استفاده از واکنش duplex RT-PCR و multiplex RT-PCR ۶۱
۳-۷- نتایج بهینه‌سازی شرایط آزمون duplex RT-PCR و multiplex RT-PCR ۶۳
۳-۷-۱- انتخاب آغازگرها ۶۳
۳-۷-۲- نتایج بهینه‌سازی شرایط دمای اتصال و دمای گسترش آغازگرها ۶۳
۳-۷-۴- نتایج بهینه‌سازی مقدارها و غلظت های مورد استفاده در آزمون multiplex RT-PCR ۶۴
۳-۸- نتایج اعتبارسنجی روش بهینه‌سازی شده multiplex RT-PCR ۶۵
فصل چهارم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۶۸
۴-۱ نتیجه‌گیری کلی ۶۸
۵-۲ پیشنهادات ۷۰
منابع ۷۴

فهرست اشکال

شکل۱- ۱-شمای کلی ژنوم ویروس Y سیب زمینی ۱۰
شکل۱- ۲- سازمان ژنوم در اعضای جنس *Polerovirus*..... ۱۳
شکل۱- ۳- سازمان ژنوم در اعضای جنس *Carlavirus*..... ۱۶
شکل۱- ۴- سازمان ژنوم در جنس‌های *Bromoviridae*..... ۲۰
شکل۱- ۵- طبیعت چند پیکره‌ای ویروس موزاییک یونجه..... ۲۰
شکل ۱-۶- علایم مربوط به PVY شامل موزاییک و ابلقی کلروتیک برگ های سیب زمینی..... ۲۳
شکل ۱-۷- علایم مربوط به AMV شامل لکه های زرد روشن (ابلقی)..... ۲۳
شکل ۱-۸- علایم مربوط به PLRV شامل زردی، کوتولگی و لوله ای شدن برگ های پایینی سیب زمینی..... ۲۴
شکل ۱-۹- علایم مربوط به PVS شامل کلروز خفیف و لکه های نکروتیک در سطح فوقانی برگ های سیب زمینی..... ۲۴
شکل ۳-۱- علایم شایع PVY شامل موزاییک و ابلقی کلروتیک..... ۴۸
شکل ۳-۲- علایم PVY در بوته های سیب‌زمینی شامل خطوط قهوه‌ای رنگ در امتداد رگبرگ ها، دمبرگ وساقه..... ۴۸
شکل ۳-۳- الف) علایم PLRV شامل زردی، کوتولگی و لوله ای شدن برگ های پایینی ب) علایم AMV شامل لکه های زرد روشن (ابلقی) د) علایم مربوط به PVS شامل موزاییک خفیف و زردی مختصر(علایم مخلوط با PVY و PLRV)..۴۹
شکل ۳-۴- نقوش الکتروفورزی RNA استخراج شده از چند نمونه سیب‌زمینی آلوده به PVY، PLRV، PVS و AMV با روش لیتیم کلراید بر روی ژل ۰/۷ درصد در بافر TAE..... ۵۴
شکل۳- ۵- نقوش الکتروفورزی محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE..... ۵۵
شکل۳-۶- نقوش الکتروفورزی بهینه‌سازی آزمون PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE الف) در دمای ۵۵ سلسیوس ب) در دمای ۵۶ درجه سلسیوس..... ۵۶
شکل۳- ۷-توالی قطعات تکثیرشده جفت آغازگرهای PVYCPcEcoRII/PVYCPvBamHI، PVS-R/PVS-F، PLRV-fkhR/PLRV-fkhF، AMV-R/AMVF..... ۵۷
شکل۳-۸- نتایج حاصل از بلاست توالی جدایه Fd27 آلوده به PVY..... ۵۹
شکل۳- ۹- نتایج حاصل از بلاست توالی جدایه Canada آلوده به PVS..... ۵۹
شکل۳- ۱۰- نتایج حاصل از بلاست توالی جدایه S4 آلوده به AMV..... ۶۰
شکل۳- ۱۱- نتایج حاصل از بلاست توالی جدایه Ab1 آلوده به PLRV..... ۶۰
شکل۳- ۱۲- نقوش الکتروفورزی محصول duplex RT-PCR و multiplex RT-PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE..... ۶۲
شکل۳- ۱۳- نقوش الکتروفورزی محصول multiplex RT-PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE..... ۶۲
شکل۳- ۱۴- نقوش الکتروفورزی محصول multiplex RT-PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE در غلظت های ۱) ۱/۵ میلی مولار ۲) ۲/۵ میلی مولار MgCl2..... ۶۴

شکل۳- ۱۵- نقوش الکتروفورزی محصول multiplex RT-PCR تعدادی نمونه جمع‌آوری شده بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE..... ۶۵

فهرست جداول

جدول ۲- ۱- مشخصات جفت آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR ۳۳

جدول ۲- ۲- مواد و مقادیر لازم در واکنش cDNA ۳۵

جدول ۲- ۳- مواد و مقادیر لازم در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از Taq DNA polymerase ۳۶

جدول ۲- ۴- مواد و مقادیرلازم در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از Master Mix ۳۶

جدول ۲- ۵- زمان و دمای لازم برای واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی PLRV-fkhR/PLRV-fkhF ۳۷

جدول ۲- ۶- زمان و دمای لازم برای واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی PVYCPc*Eco*RII/PVYCPv*Bam*HI ۳۷

جدول ۲- ۷- زمان و دمای لازم برای واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی PVS-R/PVS-F ۳۸

جدول ۲- ۸- دمای لازم برای واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی AMV-R/AMV-F ۳۸

جدول ۲- ۹- مواد و مقادیر لازم جهت ساخت cDNA در واکنش duplex RT-PCR برای ردیابی همزمان دو ویروس ۴۰

جدول۲-۱۰- مواد و مقادیرلازم در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از Master Mix برای ردیابی همزمان دو ویروس ۴۱

جدول۲- ۱۱- زمان و دمای لازم برای واکنش multiplex RT-PCR برای آغازگرهای اختصاصی (PVYCPc*Eco*RII/PVYCPv*Bam*HI، PLRV-fkhR/PLRV-fkhF، PVS-R/PVS-F، AMV-R/AMV-F) و ژن کنترل داخلی 18s rRNA ۴۱

جدول۲- ۱۲- مواد و مقادیر لازم جهت ساخت cDNA در واکنش بهینه‌سازی multiplex RT-PCR برای ردیابی همزمان چهار ویروس ۴۲

جدول۲- ۱۳- مواد و مقادیرلازم در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با Master Mix برای بهینه سازی ردیابی همزمان چهار ویروس (PVY، PLRV، PVS، AMV و ژن کنترل داخلی 18s rRNA ۴۳

جدول۲- ۱۴- مواد و مقادیر لازم جهت ساخت cDNA در واکنش multiplex RT-PCR برای ردیابی همزمان چهار ویروس ۴۴

جدول۲- ۱۵- مواد و مقادیرلازم در واکنش زنجیره ای پلی مراز با Master Mix برای ردیابی همزمان چهار ویروس (PVY، PLRV، PVS، AMV) و ژن کنترل داخلی 18s rRNA ۴۵

جدول۳- ۱- مشخصات نمونه های سیب زمینی با علایم ویروسی جمع‌آوری شده از استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری ۵۰

جدول۳- ۲- مشخصات نمونه‌های سیب زمینی با علایم ویروسی موجود در گلخانه دانشگاه صنعتی اصفهان. ۵۳

جدول ۳-۳ – مشخصات نمونه‌های انتخاب شده برای توالی‌یابی ۵۷

جدول ۳-۴- نتایج ارزیابی تعدادی نمونه سیب زمینی دارای علایم ویروسی با استفاده از آزمون multiplex RT-PCR ۶۶

چکیده

سیب‌زمینی با نام علمی (*Solanum tuberosum* L.)، از نظر اهمیت غذایی و اقتصادی بعد از محصولاتی چون گندم، برنج، ذرت و جو در رتبه پنجم قرار دارد. بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای سیب‌زمینی در جهان و ایران محسوب می‌شوند. ویروس‌های آلوده‌کننده سیب‌زمینی از جمله ویروس وای سیب‌زمینی، پیچیدگی برگ سیب‌زمینی ، اس سیب‌زمینی و موزاییک یونجه در مناطق مهم سیب‌زمینی‌کاری دنیا، خسارات شدید اقتصادی را وارد می‌کنند. استان اصفهان و چهارمحال و بختیاری از مناطق عمده کشت سیب‌زمینی در ایران به شمار می‌روند و ویروس‌های مزبور در این مزارع شیوع گسترده‌ای دارند. هر چند تاکنون روش‌های مختلفی برای تشخیص عوامل ویروسی سیب‌زمینی ارائه شده است، ولی امروزه روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به عنوان روشی حساس، سریع و آسان کارایی بسیار بالایی در تشخیص این ویروس‌ها دارد. ویژگی منحصر به فرد این روش در تشخیص همزمان چند ویروس (multiplex RT-PCR) باعث کاهش هزینه‌ها و زمان آزمایش می‌گردد. با توجه به بالا بودن میزان آلودگی مزارع سیب‌زمینی به ویروس در ایران و نیاز کشور به تولید غده‌های بذری سالم و عاری از ویروس‌ها، طراحی و بهینه‌سازی multiplex RT-PCR جهت ردیابی همزمان ویروس‌های مهم سیب‌زمینی از نیازهای ضروری آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و کلینیک-های تشخیص بیمار ی‌های گیاهی می‌باشد. به این منظور، در این تحقیق ردیابی همزمان PVY، PVS، PLRV و AMV از غده‌های سیب‌زمینی مزارع اصفهان و چهارمحال و بختیاری به روش multiplex RT-PCR مورد توجه قرار گرفت. نمونه‌برداری از مناطق سیب‌زمینی‌کاری استان اصفهان (چادگان، داران، دامنه، فریدن و فریدون‌شهر) و در استان چهارمحال و بختیاری (بروجن و فرادنبه) از بوته‌های سیب‌زمینی واجد علایم ویروسی موزاییک، پیچیدگی برگ، راست ایستادن بوته و لکه‌های زرد روشن(Calico) انجام گرفت. همچنین از نمونه‌های موجود در گلخانه دانشگاه صنعتی اصفهان نیز استفاده شد. استخراج Total RNA هر یک از نمونه‌ها به طور جداگانه از برگ گیاهان دارای علایم ویروسی طبق روش کانونتاپیپت و همکاران انجام شد. ساخت cDNA و انجام واکنش PCR به کمک آغازگرهای هر ویروس به صورت جداگانه، ترکیب دوتایی و مخلوط هر چهار ویروس انجام شد. بهینه‌سازی واکنش multiplex RT-PCR با اعمال تغییرات در غلظت آغازگرها، کلریدمنیزیم و دمای اتصال آغازگرها انجام شد. ردیابی همزمان PVY، PVS، PLRV و AMV همراه با 18s rRNA به عنوان کنترل داخلی ابتدا با استفاده از روش duplex RT-PCR به صورت دو به دو سپس با استفاده از روش multiplex RT-PCR به صورت چهارتایی با استفاده از جفت آغازگرهای (PVYCPc*Eco*RII/PVYCPv*Bam*HI، PLRV-fkhR/PLRV-fkhF، PVS-R/PVS-F و AMV-R/AMV-F) و آغازگر 18s rRNA-R/18s rRNA-F به عنوان کنترل داخلی به طور همزمان انجام شد. نتایج نشان داد که جفت آغازگر PVYCPc*Eco*RII/PVYCPv*Bam*HIباند ۸۰۱bp، جفت آغازگر PVS-R/PVS-F باند ۶۸۴bp، جفت آغازگر AMV-R/AMV-Fباند ۴۱۵bp، جفت آغازگر PLRV-fkhR/PLRV-fkhF باند ۳۳۶ bp و جفت آغازگر 18s rRNA-R/18s rRNA-F باند ۲۵۵ bp را به عنوان کنترل داخلی تکثیر کردند. همچنین با بهینه‌سازی و انجام تغییرات در مقدار غلظت کلریدمنیزیم، آغازگرها، زمان گسترش و دمای اتصال آغازگرها، چهار ویروس PVY، PVS ، PLRV و AMV به همراه 18s rRNA با موفقیت ردیابی شدند. به این ترتیب معلوم شد که می‌توان از روش بهینه‌سازی شده multiplex RT-PCR به عنوان روشی حساس، دقیق، سریع و قابل اعتماد در ردیابی همزمان ویروس‌های مهم سیب‌زمینی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سیب‌زمینی، multiplex RT-PCR، ویروس وای سیب‌زمینی، ویروس اس سیب‌زمینی، ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و ویروس موزاییک یونجه

فصل اول
مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- مقدمه

سیب‌زمینی به عنوان مهم‌ترین منبع غذایی به لحاظ اهمیت اقتصادی بعد از محصولاتی چون گندم، برنج، ذرت و جو در رتبه پنجم قرار دارد [۷]. سیب‌زمینی به سبب دارا بودن ویتامین‌ها و مواد معدنی در حد مطلوب و اسیدآمینه لیزین در پروتیین خود پس از تخم‌مرغ دومین منبع غذایی ساده در جهان می‌باشد [۱۹]. در ایران نیز این محصول به دلیل مقدار انرژی و پروتیین تولیدی بالا در واحد سطح جایگاه ویژه‌ای دارد [۷]. بر اساس آمار سازمان خواروبار و کشاورزی جهان (FAO)[۱] در سال۲۰۱۲، سطح زیر کشت این محصول در دنیا ۱۹ میلیون هکتار و در ایران ۱۸۰ هزار هکتار بوده است. عملکرد محصول در دنیا به طور متوسط ۱۸ تن در هکتار و در ایران به طور متوسط ۳۰ تن در هکتار می‌باشد که ایران مقام سوم را در آسیا و مقام دوازدهم را در دنیا به خود اختصاص داده است [۶۰ و ۶۱]. امروزه بهره‌گیری از روش‌های جدید به‌زراعی و مدیریت مبارزه با آفات و بیماری‌ها سبب گشته، در اقصی نقاط دنیا، همپای گسترش اراضی زیر کشت، تولید محصول سیب-زمینی در واحد سطح نیز رو به افزایش باشد [۱۳].

۱- Food and Agriculture Organization

۱-۲- تاریخچه سیب‌زمینی

سیب‌زمینی ظاهرا از سلسله کوه‌های آند در آمریکای‌جنوبی در منطقه پرو و بولیوی منشا گرفته است [۷]. سابقه کشت سیب‌زمینی در این منطقه به حدود ۷۰۰۰ سال پیش بر می‌گردد. سپس، این محصول به سایر نقاط قاره آمریکا راه یافت و از آنجا توسط جنگجویان اسپانیایی از آمریکای‌جنوبی به اسپانیا و سپس به ایتالیا وسایر نقاط اروپای مرکزی برده شد و به تدریج به صورت یک محصول غذایی اصلی در اروپا مخصوصا آلمان، روسیه و ایرلند درآمد [۱۵و۵۹]. سیب‌زمینی بر خلاف نظر بسیاری از پژوهشگران به وسیله سرجان ملکم وارد ایران نشده است، بلکه احتمالا از طریق روسیه به شمال ایران و از آنجا به نقاط دیگر کشور صادر گردید و در استان-های مختلف ایران کاشته شد. برخلاف اروپاییان که نسبت به ورود سیب‌زمینی و کشت آن تعصب و مخالفت شدید نشان دادند، در ایران از کاشت واستفاده از آن استقبال به عمل آمد و در عرض پنجاه سال، سیب‌زمینی به همراه گندم، مهمترین مواد غذایی ایرانیان را تشکیل دادند. در پی کاشت وسیع سیب‌زمینی در زمین‌های مرغوب ایران، نه تنها نیاز بازار ایران در دوره قاجاریه برطرف شد، بلکه در دوره پهلوی، سیب‌زمینی یکی از اقلام کشاورزی مناسب برای صادرات ایران شد [۲۱].

۱-۳- گیاه‌شناسی سیب‌زمینی

سیب‌زمینی با نام علمی (*Solanum tuberosum* L.)، متعلق به رده دولپه‌ای‌ها، زیررده *Asteidae*، راسته *Solanales* و تیره *Solanaceae* می‌باشد. این گیاه یک ساله آتوتتراپلویید با ۴۸ کروموزوم می‌باشد. برگ‌ها عموما مرکب، متناوب، متشکل از ۳ یا ۴ جفت برگچه تخم‌مرغی یا بیضی و یک برگچه انتهایی است که به صورت مارپیچ روی ساقه قرار گرفته‌اند. گل‌های کامل سیب‌زمینی به رنگ‌های سفید، قرمز، ارغوانی یا بنفش و بطور متراکمی با گل‌آذین گرزن در انتهای ساقه‌ها پدیدار می‌شوند. گل‌های آن پنج قسمتی شامل پنج گلبرگ و پنج کاسبرگ به هم چسبیده می‌باشد. تعداد پرچم‌ها پنج عدد که به هم متصل‌شده و یک لوله‌ی بساکی را ساخته‌اند و مادگی از وسط آن خارج شده است. میوه‌های آن کوچک، کروی، قرمز، سته و سمی است. غده سیب‌زمینی از تجمع موادغذایی در ناحیه انتهایی ساقه جانبی (استولون) سیب‌زمینی و رشد در این ناحیه به وجود می‌آید که حاوی نشاسته فروانی می‌باشد [۱۶].

۱-۴- ارقام سیب‌زمینی

ارقام سیب‌زمینی را می‌توان بر اساس خصوصیات گیاه‌شناسی، موارد استفاده و طول دوره رسیدگی گروه‌بندی نمود. ارقام از لحاظ کیفیت مصرفی برای مصرف خانگی، چیپس و سرخ‌کرده با یکدیگر تفاوت دارند. از لحاظ طول دوره رشد، ارقام به گروه‌های زودرس، میان‌رس و دیررس تقسیم می‌شوند. طول دوره رشد در ارقام زود رس ۹۰ تا ۱۲۰ روز، در ارقام میان‌رس ۱۲۰ تا ۱۵۰ روز و در ارقام دیررس ۱۵۰ تا ۱۸۰ روز می‌باشد. انتخاب

رقم مناسب برای هر ناحیه با توجه به بازارپسندی و موارد استفاده غده، بیماری‌های شایع، طول فصل رشد موثر موجود و زمان مناسب ارائه محصول به بازار انجام می‌گیرد. از مهم‌ترین ارقام خارجی که در ایران کشت می‌شود می‌توان به مارفونا، اگریا، پیکاسو، آریندا، رومینا، سانته، اشاره نمود [۱۸].

۱-۵- سازگاری

سیب‌زمینی در تمام نقاط جهان تا ارتفاع ۳۵۰۰ متری از سطح دریا و در محدوده عرض جغرافیایی ۶۵ درجه شمالی تا ۴۵ درجه جنوبی کشت می‌شود. کشت سیب‌زمینی در ایران نیز در تمام نواحی و تا ارتفاع ۲۵۰۰ متری از سطح دریا رایج است. با استفاده از تلفیق عرض جغرافیایی، ارتفاع از سطح دریا و وضعیت دما می‌توان تاریخ کاشت و فصل رشد مناسبی از پاییز تا اواسط بهار برای کاشت سیب‌زمینی در نظر گرفت [۶۰]. سیب‌زمینی محصولی سرمادوست است که در نواحی گرم در پاییز و در نواحی سرد در بهار کاشته می‌شود. بهترین رشد سیب‌زمینی در مناطقی حاصل می‌شود که میانگین دمای گرم‌ترین ماه فصل رشد حدود ۲۵ درجه سلسیوس یا کمتر باشد. غده‌ها در خاک‌های گرم‌تر از ۲۰ درجه سلسیوس رشدشان کند شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس کاملا متوقف می‌گردد، زیرا مصرف کربوهیدرات‌ها برای تنفس و رشد رویشی بیش از میزان تنفس است [۱، ۱۲۳و۱۴۲]. سیب‌زمینی در دمای ۲۰ درجه سلسیوس در روز و ۱۴ درجه سلسیوس در شب بهترین رشد را دارد و شب‌های خنک برای تجمع کربوهیدرات‌ها مطلوب است. این محصول به یخبندان نیز حساس است و اندام‌های رویشی در دمای ۲- درجه سلسیوس یا کمتر آسیب می‌بینند. سیب‌زمینی از نطر گل‌دهی روزبلند و از نظر غده-بندی گیاهی روزکوتاه به شمار می‌رود. خاک‌های عمیق و بارور با بافت متوسط و ساختمان خوب با زهکشی مناسب و pH حدود ۶ تا ۷/۵ و حتی تا حدودی کمتر از ۶ برای سیب‌زمینی مناسب است. سیب‌زمینی از گیاهان حساس به شوری خاک محسوب می‌شود [۹].

در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹، سطح برداشت سیب‌زمینی کشور حدود ۱۸۶ هزار هکتار برآورد شده که استان همدان با ۱۴ درصد سهم اراضی سیب‌زمینی کشور در مقام نخست قرار دارد. استان اردبیل با ۱۳ درصد، فارس با سهم ۹ درصد، زنجان با سهم ۸/۹ درصد، جنوب استان کرمان با ۷/۶ درصد و کردستان با ۷/۲ درصد از سطح برداشت سیب‌زمینی به ترتیب مقام‌های دوم تا ششم را به خود اخصاص داده‌اند. از نظر میزان تولید سیب‌زمینی، استان‌های همدان، اردبیل، زنجان، کردستان، فارس، آذربایجان‌شرقی، لرستان و اصفهان به ترتیب مقام‌های اول تا هشتم را دارا می‌باشد.[۴].

۱-۶- اهمیت محصول سیب‌زمینی

سیب‌زمینی به دلیل دارا بودن ویتامین‌های B، B1، C، تیامین، نیاسین، اسیدفولیک و تعداد زیادی اسیدآمینه لیزین از اهمیت تغذیه‌ای بالایی برخوردار است. به دلیل سازگاری سیب‌زمینی با شرایط آب و هوایی مختلف، کاشت آن در تمام دنیا مرسوم می‌باشد و بر همین اساس شاهد تقاضای روزافزون نسبت به این ماده غذایی هستیم. با توجه به حجم تقاضا و ارزش غذایی این محصول، مساحت قابل توجهی از اراضی کشور به کشت سیب‌زمینی

اختصاص یافته است [۵و ۱۵۵]. در اغلب کشورهایی که آب و هوای معتدل دارند به عنوان منبع غذایی اصلی کشت می‌شود. چین با تولید ۷۳/۵ میلیون تن، بزرگ‌ترین تولیدکننده و پس از آن روسیه با ۳۸/۶ میلیون تن، هند با ۲۳/۹ میلیون تن، ایالات متحده امریکا با ۱۹/۷ میلیون تن، اوکراین با ۱۹/۵ میلیون تن، از مهم‌ترین کشورهای تولیدکننده سیب‌زمینی در جهان به حساب می‌آیند [۶۰]. تولید سیب‌زمینی در طول سالیان زیاد دچار نوساناتی بوده که می‌توان به قحطی ایرلند در سال ۱۸۴۵ اشاره کرد که به دلیل بیماری بادزدگی سیب‌زمینی[۱] حدود یک میلیون نفر جان خود را از دست دادند و یک میلیون و نیم دیگر به ایالات متحده آمریکا و سایر کشورها مهاجرت نمودند [۶].

۱-۷- آفت‌ها و علف‌های هرز سیب‌زمینی

از عوامل مهم کاهش کمی و کیفی محصول سیب‌زمینی می‌توان به انواع آفات و علف‌های هرز اشاره کرد که با شناخت صحیح آن‌ها و به کارگیری روش‌های پیشگیری و کنترل موثر و به موقع از میزان خسارات وارده تا حد زیادی جلوگیری به عمل آورد [۶].

سیب‌زمینی مورد حمله آفات عمومی زیادی از جمله زنجرک چغندرقند[۲] و تریپس[۳] و بعضی از آفات اتفاقی سیب‌زمینی مثل شب‌پره زمستانه[۴] که به شدت خسارت‌زا است، کرم برگخوار چغندرقند[۵] (کارادینا)، پسیل[۶] و گاهی لارو سوسک‌های خانواده *Elateridae* و *Scarabidae* و مگس‌های سفید از خانواده *Alearodidae* قرار می‌گیرد. سوسک کلرادو[۷] و بید سیب‌زمینی[۸] دو آفت قرنطینه‌ای این محصول در ایران می‌باشد که متاسفانه انتشار بید سیب‌زمینی در حال گسترش است. تعدادی از حشرات نیز به طور بالقوه در مزارع سیب‌زمینی ناقل بیماری‌های گیاهی می‌باشند که مهم‌ترین آن‌ها شامل شته‌ها، بخصوص شته پنبه و جالیز[۹] و شته سبز هلو[۱۰] و زنجرک‌های ناقل مانند *Circulifer opacipennis* و *Macrosteles laevis* می‌باشند [۱۸].

۱- *Phytophthora infestans*

۲- *Empoasca decipiens* paoli

۳- *Thrips tabaci* lindeman

۴- *Agrotis* spp

۵- *Spodoptera exigua* Huebner

۶- *Trioza* sp

۷- *Leptionotarsa decemlineata* C.

۸- *Phthorimaeta operculella* Zell

۹- *Aphis gossypii* glover

۱۰- *Myzus persicae* Sulzer

از مهم‌ترین علف‌های هرز در مزارع سیب‌زمینی می‌توان بـه تـاج‌خـروس وحشـی[۱]، سـوروف[۲]، قیـاق[۳]،پیچـک صحرایی[۴]، خرفه[۵] و سلمه‌تره‌سفید[۶] اشاره کرد [۳].

۱-۸- بیماری‌های سیب‌زمینی

با توجه به اهمیت محصول سیب‌زمینی و حساس بودن این محصول به آفات و بیماری‌ها و سایر عوامـل تـنش‌زا که میزان تولید این محصول را به خطر می‌اندازد، نیاز به تحقیقات گسترده در زمینه کنترل این عوامل خسـارت‌زا را فراهم می‌سازد. بیماری‌های ایجاد شده در گیاه سیب‌زمینی معمولا ناشی از برهم‌کنش میزبان و عامل بیمـاری‌زا است که شامل باکتری، قارچ، ویروس، فایتوپلاسما و نماتود می‌باشد. تقریبا ۱۶۰ بیماری و عارضه در سیب‌زمینی گزارش شده است که حدود ۵۰ بیماری قارچی، ۳۰ بیماری ویروسی، ۶ بیماری باکتریایی و تعدادی هـم توسـط فایتوپلاسما و نماتود ایجاد می‌شوند. همچنین حدود ۵۰ عارضه غیرانگلی و یا ناشی از عوامل ناشناخته نیـز وجـود دارد که باعث کاهش محصول سیب‌زمینی می‌گردد [۲۶].

از عوامل مهم کاهش محصول سیب‌زمینی، وجود انواع بیماری‌هـای قـارچی مـی‌باشـد کـه عبارتنـداز: جـرب-پودری[۷]، پوسیدگی صورتی[۸]، بادزدگی[۹]، لکه موجی[۱۰]، شانکر ریزوکتونیایی[۱۱]، پوسیدگی خشک فوزاریومی[۱۲] و پژمردگی ورتیسیلیومی[۱۳].

باکتری‌هایی که سیب‌زمینی را مورد حمله قرار می‌دهند هر چند در مقایسه با سایر عوامـل بیمـاری‌زا تعدادشـان کم است ولی جزء پاتوژن‌های مهم به شمار می‌روند که می‌توان به پوسـیدگی قهـوه‌ای[۱۴]، پوسـیدگی حلقـوی[۱۵]،

۱- *Amerantus* spp

۲- *Echinochola crus* galli

۳- *Sorghum halepense*

۴- *Convulvulus* sp

۵- *Portulaca oleracea*

۶- *Chenopodium album*

۷- *Spongospora subterranean*

۸- *Phytophtora erythoseptica*

۹- *P. infestans*

۱۰- *Alternaria solani*

۱۱- *Rizoctonia solani*

۱۲- *Fusarium solani, F.roseum*

۱۳- *Verticillium albo-atrum, V. dahliae*

۱۴- *Ralstonia solanaceearum*

۱۵- *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

چشم صورتی[۱]، جرب معمولی[۲] و پوسیدگی نرم[۳] و ساق سیاه سیب‌زمینی[۴] اشاره کرد [۶و۱۳]. همچنین مهم‌ترین بیماری‌های فایتوپلاسمایی سیب‌زمینی Aster yellows, Stolbur و Witches' Broom می‌باشند [۷۶].

از مهم‌ترین نماتدها روی سیب‌زمینی می‌توان به نماتد سیست[۵]، نماتد زخم[۶] و نماتد مولد پوسیدگی غده[۷] اشاره نمود [۷۶].

بیماری ویروئیدی حائز اهمیت این محصول هم دوکی‌شدن غده سیب‌زمینی[۸] عنوان شده است [۶و۱۳].

۱-۹- بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی

بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای سیب‌زمینی در جهان و ایران می‌باشند. این عوامل بیماری‌زا اگرچه به ندرت کشنده‌اند، اما بنیه گیاه و عملکرد غده‌های بذری را کاهش می‌دهند و باعث کاهش تدریجی محصول می‌شوند [۲و۱۳]. گیاه سیب‌زمینی به دلایل مختلف بیشتر از گیاهان دیگر از ویروس‌ها صدمه می‌بیند. یک بار آلودگی برای یک بوته کافی است که تمام نسل‌های بعدی را نیز آلوده نماید، چون سیب‌زمینی از راه غده زیاد می‌شود و ویروس‌ها نیز به سادگی وارد غده می‌شوند.

ارقام سیب‌زمینی به طور طبیعی توسط ۵۰ ویروس آلوده می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتنداز: ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی[۹] (PLRV)، ویروس وای سیب‌زمینی[۱۰] (PVY)، ویروس اس سیب‌زمینی[۱۱] (PVS)، ویروس ایکس سیب‌زمینی[۱۲] (PVX)، ویروس ای سیب‌زمینی[۱۳] (PVA)، ویروس ام سیب‌زمینی[۱۴] (PVM)، ویروس موزاییک یونجه[۱۵] (AMV)، ویروس کوتولگی پیسه‌ای بادنجان[۱۶] (EMDV)، ویروس لکه‌حلقوی چوب

۱- *Pseudomonas fluorescens*

۲- *Stereptomyces scabis*

۳- *Pectobacterium carotovorum*

۴- *Pectobacterium atrospeticum*

۵- *Globodera rostochiensis*

۶- *Pratylenchus* spp.

۷- *Dithylenchus destructor*

۸- *Potato tuber spindle viroid*

۹- *Potato leaf roll virus*

۱۰- *Potato virus Y*

۱۱- *Potato virus S*

۱۲- *Potato virus X*

۱۳- *Potato virus A*

۱۴- *Potato virus M*

۱۵- *Alfalfa mosaic virus*

۱۶- *Eggplant mottle dwarf virus*

پنبه‌ای سیب‌زمینی[۱] (ویروس جغجغه‌ای توتون) (TRV)، ویروس سرجارویی سیب‌زمینی[۲] (PMTV) و ویروس پژمردگی لکه‌دار گوجه‌فرنگی[۳] (TSWV) [۴۷،۲۵،۱۰].

اولین گزارش از وجود بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی در ایران در سال ۱۳۳۰ توسط استیارت بلژیکی در اطراف تبریز ارائه شد [۲۰]. همچنین در سال ۱۳۴۷ بیماری ویروسی پیچیدگی برگ سیب‌زمینی همراه با چند ویروس دیگر همچون PVY، PVA و PVY توسط کریمی از ایران گزارش شد [۲۹]. طبق مطالعات انجام شده در ایران در سال ۱۳۸۶ با استفاده از روش ELISA درصد آلودگی سیب‌زمینی به ویروس PVS (۳۵/۹) درصد، PVY (۳۴/۴) درصد، PVA (۲۷) درصد، PVX (۲۰/۸) درصد، PLRV (۱۳/۹) درصد، PVM (۹) درصد، AMV(۷) درصد و EMDV (۵/۱) درصد گزارش شده است [۱۱۵].

۱-۱۰- خانواده *Potyviridae*

خانواده *Potyviridae* بزرگ‌ترین و مهم‌ترین خانواده ویروسی از نظر اهمیت اقتصادی می‌باشد. بعضی از اعضای این خانواده خسارت‌های شدیدی را به محصولات زراعی، باغی، زینتی و مراتع وارد می‌کنند [۲۶و۱۱۷]. بر اساس نهمین گزارش کمیته بین‌المللی تاکسونومی ویروس، اعضاء این خانواده شامل هفت جنس ویروسی *Potyvirus*، *Ipomovirus*، *Macluravirus*، *Rymovirus*، *Tritimovirus*، *Brambyvirus* و *Bymovirus* می‌باشند.

۱-۱۰-۱- ویروس Y سیب‌زمینی(PVY) *Potato virus Y*

ویروس Y سیب‌زمینی گونه تیپ جنس *Potyvirus* بوده و از لحاظ اقتصادی و گسترش مهم‌ترین ویروس بیماری‌زای سیب‌زمینی محسوب می‌شود [۸۰]. خسارت این ویروس بر حسب نوع نژاد ویروس در آلودگی اولیه تا ۸۰ درصد و در آلودگی ثانویه بین ۷۰-۱۵ درصد می‌باشد. این ویروس در آلودگی توام با PVX میزان همانندسازی ویروس X سیب‌زمینی را بالا برده و بدین‌ترتیب سبب افزایش خسارت این ویروس نیز می‌گردد [۴۵].

سیب‌زمینی، فلفل و توتون از خانواده بادمجانیان از مهم‌ترین میزبان‌های این ویروس محسوب می‌شوند [۱۰۳]. به علاوه بیش از ۶۰ گونه گیاهی مختلف دیگر از این خانواده و تعدادی از گونه‌های گیاهی خانواده‌های چغندریان[۴] و بقولات[۵] نیز میزبان این ویروس می‌باشند [۱۸].

۱- *Tobacco rattle virus*

۲- *Potato mop top virus*

۳- *Tomato spotted wilt virus*

۴- *Chenopodiaceae*

۵- *Fabaceae*