

ردیابی و شناسایی ویروس موزاییک یونجه (AMV) به وسیله آزمون تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه

محمد امین الماسی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۲۵)

Tracking and identification of *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV) by Loop mediated isothermal amplification assay

Mohammad Amin Almasi

Young Researchers and Elites Club, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

(Received: Jun. 24, 2016 - Accepted: Sep. 15, 2016)

Abstract

Alfalfa mosaic virus (AMV) causing a disease in Alfalfa (*Medicago sativa*) crop in Iran has been identified on the basis of determination of symptom expression and morphological properties. There are several techniques to detect the virus including serological test and molecular methods. Reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay is a novel technique for amplifying RNA under constant temperature, with high specificity, sensitivity, rapidity and efficiency that is used in this study for detection of *Alfalfa mosaic virus*. Leaf samples (100 samples) with symptoms similar to AMV were collected from Hamedan and Kurdistan provinces and were subjected to a serological test. All four RT-LAMP reaction primers (i.e. F3, B3, FIP and BIP) together with RT-PCR reaction primers were designed on the basis of the highly conserved sequence of coat protein (CP) gene. Total RNA was extracted and molecular reactions were carried out and finally was detected six positive samples. The advantages of this new method in compare to other methods include the high specificity, high sensitivity, high rapidity, high efficiency, safety, fascinatingly, no requirement of expensive and tools for amplification, no post-amplification treatment of the amplicons, visual detection and user friendly.

Keywords: DAS- ELISA, RT-PCR, RT-LAMP, *Alfalfa mosaic virus*

چکیده

ویروس موزاییک یونجه (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) در ایران که سبب بیماری در محصول یونجه (*Medicago sativa*) می‌شود، بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و بیان علایم شناسایی تشخیص داده می‌شود. روش‌های متعددی جهت تشخیص این ویروس وجود دارند که می‌توان به آزمون‌های سرولوژیک و روش‌های مولکولی اشاره کرد. آزمون نسخه‌برداری معکوس تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (revers transcription loop mediated isothermal amplification) روش جدیدی جهت تکثیر RNA تحت شرایط هم‌دمای، با اختصاصیت، حساسیت، سرعت و کارایی بالا است که در این پژوهش جهت تشخیص ویروس موزاییک یونجه به کار گرفته شد. به منظور انجام آزمون سرولوژیک، نمونه‌های برگ (۱۰۰ نمونه) با علائم مشابه به ویروس موزاییک یونجه از سطح استان‌های همدان و کردستان جمع‌آوری شدند. چهار آغازگر واکنش RT-LAMP (شامل F3, B3, FIP و BIP) به همراه آغازگرهای واکنش RT-PCR (شامل F و B) بر اساس توالی بسیار حفاظت شده‌ای از ژن پوشش پروتئین (CP) طراحی شدند. جهت انجام آزمون‌های مولکولی، RNA کل استخراج و واکنش‌های مولکولی انجام شدند و در نهایت شش نمونه مثبت تشخیص داده شد. از مزایای این روش جدید در مقایسه با سایر روش‌های پیشین می‌توان به اختصاصیت بالا، حساسیت بالا، سرعت بالا، کارایی بالا، ایمنی، سهولت، عدم نیاز به تجهیزات پرهزینه جهت تکثیر، عدم نیاز به کارهای تشخیصی بعد از تکثیر، تشخیص مشاهده‌ای و کاربردوستی آن اشاره کرد.

واژه‌های کلیدی: DAS-ELISA, RT-PCR, RT-LAMP, ویروس موزاییک یونجه.

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa*) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان علوفه‌ای روی کره زمین بوده که مرکز اولیه پیدایش آن ایران است (Massumi and Hosseini, 2007). این گیاه به عنوان بهترین گیاه علوفه‌ای، به طور نسبی مقاوم به سرما و گرما، متحمل به شوری و خشکی و آهک‌دوست است (Massumi et al., 2009). از بین ویروس‌های آلوده‌کننده این گیاه، *Alfalfa mosaic virus* (AMV) و *Bromoviridae Alfamovirus* یکی از مهمترین ویروس‌های خسارت‌زا به گیاهان علوفه‌ای به ویژه یونجه می‌باشد (Al-Suhaibani et al., 1974; Frosheiser, 2010). این ویروس برای اولین بار توسط Weimer در سال ۱۹۳۱ به عنوان عامل بیماری موزاییک یونجه گزارش شد (Massumi and Hosseini Pour, 2007). در ایران اولین بار در سال ۱۳۴۷ توسط منوچهری کاشانی، ویروس AMV از روی گیاه یونجه گزارش شد (Manouchehri-Kashani, 1968). این ویروس یکی از گسترده‌ترین دامنه‌های میزبانی را در بین ویروس‌های گیاهی دارا بوده و قادر به آلوده‌سازی بیش از ۶۰۰ گونه متعلق به ۷۰ خانواده گیاهی است (https://en.wikipedia.org/wiki/Alfalfa_mosaic_virus). چهار خانواده *Compositae*، *Umbelliferae*، *Leguminosae* و *Solanaceae* از اصلی‌ترین گونه‌های گیاهی میزبان این ویروس هستند (Ahoonmanesh et al., 1990; Hajimorad and Francki, 1988). به طور معمول علائم بیماری بر روی گیاهان مختلف متفاوت است. بر روی یونجه سبب موزاییک و تاوولی شدن، در نخود (*Pisum sativum*) سبب زردی برگ‌ها، در سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) سبب نکروزه شدن رگبرگ‌ها و غده‌ها و زرد و ابلقی

شدن برگ‌ها و در توتون (*Nicotina tabacum*) سبب بروز علائم مختلفی می‌شود (Ahoonmanesh et al., 1990; Massumi et al., 2012). چهارده گونه شته به خصوص شته سبز هلو (*Mysus persicae*) به صورت ناپایا از انتقال دهنده‌های این ویروس هستند. علاوه بر این انتقال توسط حداقل ۵ گونه سس، انتقال مکانیکی و نیز انتقال از طریق بذر و غده سیب‌زمینی نیز گزارش شده است (Barker et al., 1983; Bol, 1999; Schmelzer et al., 1973; Frosheiser, 1962; Zschau and Janke, 1969). در سال ۱۹۵۸ برای اولین بار طبیعت چند پیکره‌ای این ویروس مشاهده و سه پیکره به نام‌های M، B و T با پوشش پروتئینی یکسان تشخیص داده شدند (Hull, 1969). ژنوم این ویروس از نوع RNA تک رشته‌ای مثبت سه قسمتی با نام‌های RNA1، RNA2 و RNA3 است که به ترتیب پروتئین همانندسازی P1، پروتئین همانندسازی P2 و پروتئین حرکتی (MP) و پوششی (CP) را رمزگذاری می‌کند (Bol et al., 1971; Brederode et al., 1988; Hiruki, 1988). مطالعات توالی‌یابی انجام شده بروی ترادف نوکلئوتیدی ژن CP در نژادهای مختلف این ویروس نشان داد که ناحیه CP در بررسی فیلوژنتیکی از اهمیت خاصی برخوردار بوده و بیشترین ترادف‌های موجود در بانک ژن مربوط به این ناحیه است (Parrella et al., 2000). ویروس AMV از ویروس‌های بسیار معمول و شایع در زراعت یونجه و شیدر می‌باشد. به دلیل مجاورت کشت‌های یونجه و مزارع سیب‌زمینی، هر ساله موارد متعددی از وقوع آلودگی به ویروس موزاییک یونجه در مزارع سیب‌زمینی استان‌های کردستان و همدان مشاهده می‌گردد.

تکثیر اسیدنوکلئیک یکی از بزرگترین دستاوردهای قرن ۲۱ است. در طول چند دهه

گذشته، روش‌های تشخیصی بر پایه اسیدنوکلئیک برخی از چالش‌های پیش روی تشخیص بیماری‌ها را محدود کرده‌اند. برخی از این چالش‌ها در مواجهه با تشخیص بیماری‌های عفونی ناشی از ویروس‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا، زمان‌بر بودن کشت میکروب و همچنین خطر ابتلا به طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها در روش‌های ایمونوسرولوژیکی است (Hosseini *et al.*, 2000; Notomi *et al.*, 2014; *al.*). روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) که در دهه‌های گذشته بسیار مورد توجه دانشمندان علوم زیستی قرار گرفته است، روشی سریع و حساس است که می‌تواند تعداد نسخه‌های اندکی از DNA را تا سطحی که توسط ژل الکتروفورز قابل تشخیص است، تکثیر کند (Almasi *et al.*, 2015; Moradi *et al.*, 2012). گرچه این روش دارای مزیت‌های بسیاری است اما دارای محدودیت‌هایی است که از آن جمله می‌توان به استفاده از چرخه‌های حرارتی زیاد جهت تکثیر (زمان‌بر است)، نیاز به دستگاه ترموسایکلر (گران‌قیمت است) و نیاز به روش‌های آشکارسازی و تشخیص محصول تکثیر یافته (از مواد خطرناکی مانند اتیدوم بروماید استفاده می‌شود) اشاره کرد (Ahmadi *et al.*, 2012; Almasi, 2015; Nagamine *et al.*, 2002; Haghazari *et al.*, 2011; Moradi *et al.*, 2014). در طی ۱۰ سال گذشته، روش تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (-Loop Mediated Isothermal Amplification) که به اختصار به آن LAMP می‌گویند به علت سادگی، سرعت، کارایی بالا و اختصاصیت منحصر به فرد، به طور گسترده‌ای در آنالیز اسیدنوکلئیک به کار گرفته شده است (Fukuta *et al.*, 2004; Almasi *et al.*, 2008; Hirayama *et al.*, 2015; Inacio *et al.*, 2006). تجهیزات گران قیمت برای دستیابی به دقت بالا، مورد نیاز نیست و مراحل آن در مقایسه با PCR معمولی کمتر است (Almasi *et al.*, 2012a; Notomi *et al.*, 2000; Fukuta *et al.*, 2003). LAMP روشی ساده، سریع، اختصاصی و مقرون به صرفه برای تکثیر اسیدنوکلئیک است که امتیاز آن در اختیار شرکت Eiken کشور ژاپن است (Haghazari *et al.*, 2011; Horibe *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2006). متدولوژی این روش بر پایه استفاده از چهار آغازگر مختلف است که به طور اختصاصی شش ناحیه از ژن هدف را شناسایی می‌کنند و پیشروی فرآیند واکنش در یک دمای ثابت و پیوسته با استفاده از واکنش جایگزینی رشته صورت می‌گیرد (Notomi *et al.*, 2000). تکثیر و شناسایی ژن می‌تواند تنها در یک مرحله به وسیله حمام آب داغ مخلوط نمونه‌ها، آغازگرها، آنزیم و اجزای مورد عمل، در یک دمای ثابت ۶۰ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد کامل شود (Almasi, 2015). محصولات نهایی، DNAهای ساقه-حلقه با چندین تکرار معکوس از توالی هدف و ساختارهای کلم گل مانند با حلقه‌های چندگانه هستند (Fukuta *et al.*, 2003; Notomi *et al.*, 2000). روش LAMP می‌تواند رشته مکمل (cDNA) را از روی RNA الگو سنتز کند و با این روش RNA تکثیر و تشخیص داده شود که به این روش RT-LAMP می‌گویند. این روش، مشابه تکثیر DNA است با این تفاوت که آنزیم نسخه‌برداری معکوس به مخلوط واکنش نیز اضافه می‌شود (Almasi *et al.*, 2012b; Fukuta *et al.*, 2003). تاکنون روش‌های سرولوژیکی و مولکولی زیادی برای تشخیص ویروس AMV به کار گرفته شده‌اند که از آن جمله می‌توان به آزمون زیستی و میکروسکوپ الکترونی انتقالی (Xu and Nie, 2006)، روش‌های سرولوژیکی مبتنی بر پایزا (Moreira *et al.*, 2010; Zitikaite and Samuitiene, 2008) و روش‌های تشخیص مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) (Gillaspie *et al.*, 2006; AL-Saleh and Amer, 2013)، چندشکلی طولی قطعات برشی (RFLP) (Pesic and Hiruki, 1988) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس ایمنی‌سنجی (IC-RT-PCR) (Culal

2012a; Notomi *et al.*, 2000; Fukuta *et al.*, 2003). روش‌های تشخیصی بر پایه اسیدنوکلئیک برخی از چالش‌های پیش روی تشخیص بیماری‌ها را محدود کرده‌اند. برخی از این چالش‌ها در مواجهه با تشخیص بیماری‌های عفونی ناشی از ویروس‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا، زمان‌بر بودن کشت میکروب و همچنین خطر ابتلا به طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها در روش‌های ایمونوسرولوژیکی است (Hosseini *et al.*, 2000; Notomi *et al.*, 2014; *al.*). روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) که در دهه‌های گذشته بسیار مورد توجه دانشمندان علوم زیستی قرار گرفته است، روشی سریع و حساس است که می‌تواند تعداد نسخه‌های اندکی از DNA را تا سطحی که توسط ژل الکتروفورز قابل تشخیص است، تکثیر کند (Almasi *et al.*, 2015; Moradi *et al.*, 2012). گرچه این روش دارای مزیت‌های بسیاری است اما دارای محدودیت‌هایی است که از آن جمله می‌توان به استفاده از چرخه‌های حرارتی زیاد جهت تکثیر (زمان‌بر است)، نیاز به دستگاه ترموسایکلر (گران‌قیمت است) و نیاز به روش‌های آشکارسازی و تشخیص محصول تکثیر یافته (از مواد خطرناکی مانند اتیدوم بروماید استفاده می‌شود) اشاره کرد (Ahmadi *et al.*, 2012; Almasi, 2015; Nagamine *et al.*, 2002; Haghazari *et al.*, 2011; Moradi *et al.*, 2014). در طی ۱۰ سال گذشته، روش تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (-Loop Mediated Isothermal Amplification) که به اختصار به آن LAMP می‌گویند به علت سادگی، سرعت، کارایی بالا و اختصاصیت منحصر به فرد، به طور گسترده‌ای در آنالیز اسیدنوکلئیک به کار گرفته شده است (Fukuta *et al.*, 2004; Almasi *et al.*, 2008; Hirayama *et al.*, 2015; Inacio *et al.*, 2006). تجهیزات گران قیمت برای دستیابی به دقت بالا، مورد نیاز نیست و مراحل آن در مقایسه با PCR معمولی کمتر است (Almasi *et al.*, 2012a; Notomi *et al.*, 2000; Fukuta *et al.*, 2003).

چندهمسانه‌ای AMV (Bioreba, Suisse, No.140522, No.140512) به روش الایزای ساندویچی (DAS-ELISA) انجام شد (Clark and Adam, 1977). مقدار ۰/۱ گرم بافت برگ در هاون چینی با یک میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری، عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل تا زمان ریختن در چاهک‌های پلیت در یخچال نگهداری شد. ابتدا IgG موردنظر به نسبت توصیه شده توسط کمپانی سازنده (۱/۱۰۰۰) در بافر پوششی رقیق و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آن در چاهک‌های پلیت ریخته شد. پلیت به مدت دو الی چهار ساعت در گرم‌خانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت زمان لازم پلیت تخلیه و سه بار (هر بار به مدت سه دقیقه) با بافر شستشو شسته شد. سپس پلیت به‌طور کامل خشک شد و به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های گیاهی از قبل آماده شده شامل نمونه‌های شاهد مثبت (Bioreba, Suisse, No.140553)، شاهد منفی (Bioreba, Suisse, No.180043) و بافر عصاره‌گیری در چاهک‌ها و بدون تکرار ریخته شد. پلیت موردنظر به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. روز بعد پلیت به روش ذکر شده در قبل شسته و این بار پس از خشک کردن کامل پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای متصل شده به آنزیم آلکالین فسفاتاز رقیق شده در بافر Conjugate به چاهک‌ها اضافه و پس از آن پلیت به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار داده شد. پس از شستشو و خشک کردن پلیت همانند قبل مقدار ۶/۵ میلی‌گرم پارانیتروفنیل فسفات را که سوبسترای آنزیم آلکالین فسفاتاز است در ۶/۵ میلی‌لیتر بافر سوبسترا حل کرده و به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. برای مشاهده تغییر رنگ پلیت در گرم‌خانه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه تغییر رنگ چاهک‌ها با چشم غیرمسلح بررسی و مشاهده شد.

(Kilic and Yardimci, 2015) اشاره کرد. هر چند که روش LAMP در ایران و جهان برای شناسایی ویروس‌های زیادی مانند *Potato leafroll virus* (PLRV) (Ahmadi et al., 2012; Almasi et al., 2012a) (*Potato virus Y*, (PVY) (Almasi et al., 2012a) (*Curly top virus*, (and Dehadadi, 2013) (CTV) (Almasi et al., 2013a) (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Almasi et al., 2013b) (*Beet curly top virus*, (et al., 2013b) (BCTV) (Almasi et al., 2014) (*Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (Almasi, 2015) و (*Japanese yam mosaic virus* (JYMV) (Fukuta et al., 2003) به کار گرفته شده است اما از آنجایی که تاکنون کارایی این روش در شناسایی ویروس AMV بررسی نشده است، در این پژوهش برای اولین بار کارایی آن جهت تشخیص ویروس مذکور ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و انتخاب نمونه‌ها

به منظور شناسایی و بررسی ویروس موزاییک یونجه، طی سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ از مناطق اصلی کشت یونجه در استان‌های کردستان و همدان نمونه‌برداری به عمل آمد و برگ بوته‌های با علایمی مانند موزاییک، موزاییک زرد روشن (القی)، موزاییک خفیف، زردی، تاولی، بدشکلی و پیچیدگی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند (شکل ۱a). تعداد ۱۰۰ نمونه برگ در کیسه‌های پلاستیکی به طور جداگانه و با ذکر محل نمونه‌برداری جهت انجام آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

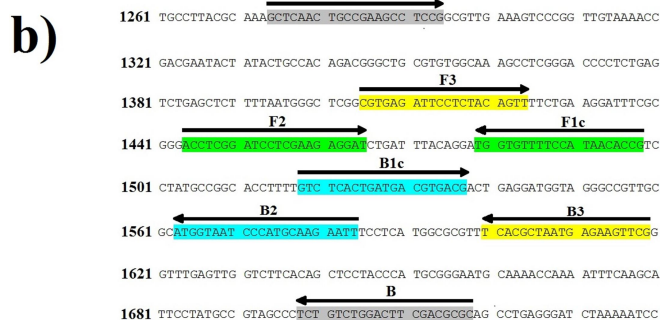
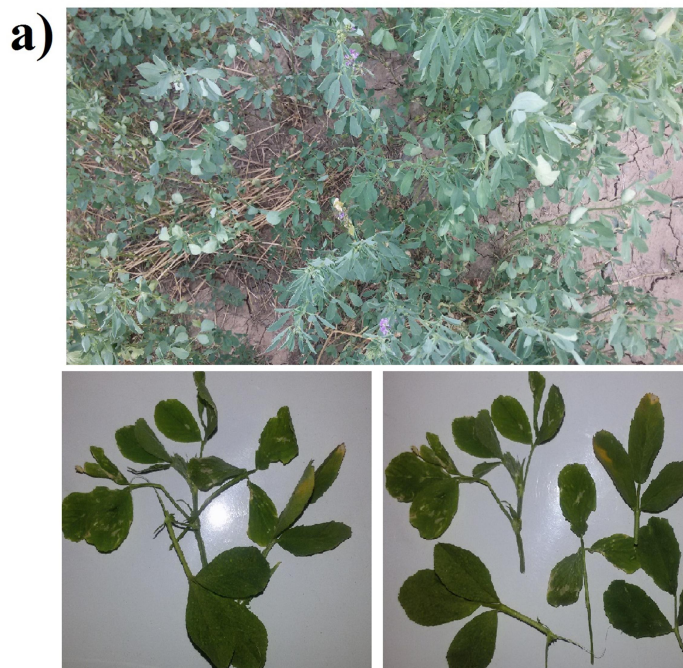
آزمون سرولوژیکی

به‌منظور شناسایی ویروس AMV، آزمون سرولوژیکی بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آنتی‌سرم

آب تیمار شده با DEPC (سیناژن، ایران) حل شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا قبل از استفاده قرار گرفت.

استخراج RNA کل از برگ‌های آلوده

از نمونه‌های برگ آلوده به ویروس که به روش الیزا شناسایی شده بودند، استخراج RNA کل انجام شد (Rowhani and Stace-Smith, 1979). در پایان مرحله استخراج، رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر



شکل (a). علائم بیماری بر روی برگ‌های جمع‌آوری شده؛

(b) شکل شماتیکی از موقعیت آغازگرهای استفاده شده برای تشخیص AMV.

PrimerExplorer V3 و (RT-PCR) (نرم افزار online ویژه جهت طراحی آغازگرهای RT-LAMP) صورت گرفت (جدول ۱). دمای ذوب (Tm)، پایداری انتهای هر آغازگر، میزان نوکلئوتیدهای گوانین و سیتوزین (GC) و ساختار

طراحی آغازگرها

طراحی آغازگرها جهت انجام آزمون‌های مولکولی بر اساس ژن پوشش پروتئینی (CP) ویروس موردنظر با شماره شناسایی Genbank: K02703.1 و با استفاده از نرم افزارهای Oligo 7 (جهت واکنش

برای سنتز DNA مورد استفاده قرار می‌گیرند. به همین دلیل در واکنش‌های LAMP غلظت آغازگرهای داخلی همیشه بیشتر از آغازگرهای خارجی در نظر گرفته می‌شود (Notomi *et al.*, 2000; Haghazari *et al.*, 2011; Nagamine *et al.*, 2002). در شکل ۱b موقعیت قرارگیری آغازگرهای طراحی شده بر روی ژن CP نشان داده شده است.

ثانویه، چهار فاکتور کلیدی در طراحی آغازگرهای واکنش LAMP هستند (Notomi *et al.*, 2000). در روش LAMP از دو آغازگر داخلی پیشرو (FIP) و پسرو (BIP) و نیز دو آغازگر خارجی پیشرو (F3) و پسرو (B3) برای انجام واکنش استفاده می‌شود (Nagamine *et al.*, 2002). در مرحله نخست واکنش، هر چهار آغازگر استفاده می‌شوند اما بعد در طی چرخه اصلی واکنش، تنها آغازگرهای داخلی

جدول ۱. آغازگرهای الیگونوکلوتیدی برای تکثیر ژن پوشش پروتئین ویروس AMV

Primer	Length of primer	Length of product	Sequence (5-3)
F	21 nt	445 bp	GCTCAACTGCCGAAGCCTCCG
B	21 nt		GCGCGTCGAAGTCCAGACAGA
F3	20 nt		CGTGAGATTCTCTACAGTT
B3	20 nt		CGAACTTCTCATTAGCGTGA
FIP (F1c and F2)	47 nt	Ladder-like	CGGTGTTATGGA AACACCATTTTACCTCGGATCCTCGAAGAGGAT
BIP (B1c and B2)	47 nt		GTCTCACTGATGACGTGACGTTTTTAATTCTTGCATGGGATTACCAT

آزمون RT-PCR (10x) PCR، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر پسرو (B)، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر پیشرو (F)، ۰/۲ میلی‌مولار cDNA، ۰/۰۱ میلی‌مولار آنزیم *Taq DNA* پلیمریز (سیناژن، ایران) به لوله و در دستگاه ترموسایکر مدل (Bio RAD, USA, No.170-8720) iCycler انجام شد. واسرشتی اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد انجام و PCR در طی ۳۰ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ساخت رشته ثانویه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انجام و در انتها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تکمیل ساخت رشته ثانویه انجام شد. جهت انجام الکتروفورز محصول، از ژل آگارز ۱ درصد و بافر (1X) TBE استفاده شد و سپس جهت بررسی، ژل در دستگاه Gel documentation مدل (Biometra, Germany) Bio-Doc قرار داده شد.

آزمون RT-PCR

تکثیر ژن CP نمونه‌های آلوده به ویروس که به روش الیزا شناسایی شده بودند با روش RT-PCR و با استفاده از جفت آغازگرهای طراحی شده انجام شد. جهت سنتز رشته cDNA ابتدا ۰/۲ میلی‌مولار RNA کل در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه قرار داده و بعد از اتمام، لوله‌ها بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد و واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۰۶ میلی‌مولار dNTP، ۰/۰۵ میلی‌مولار DDT، ۰/۰۲ میلی‌مولار RNasin (Fermentas, USA, No. EO0381)، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر پسرو (B)، ۰/۵ میلی‌مولار Buffer RT (5X) و ۰/۲ میلی‌مولار آنزیم *AMV* RT پلیمریز (Fermentas, USA, No.EP0641) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمریز پس از اضافه کردن مواد موردنیاز شامل ۰/۰۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۰۴ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۱ میلی‌مولار Buffer

حضور ویروس در آن‌ها، آزمون الایزا انجام شد و از بین ۱۰۰ نمونه آزمایش شده، ۶ نمونه مثبت (۶ درصد) که بر اساس شماره‌ای که از قبل اختصاص داده شده بود با نام‌های AMV7 (از شهر دهگلان در استان کردستان)، AMV18، AMV22، AMV26 و AMV38 (از شهر قروه در استان کردستان) و AMV53 (از شهر بهار در استان همدان) شناسایی شدند (شکل ۲a). مشاهدات چشمی با توجه به رنگ نمونه‌ها نشان‌دهنده غلظت بالای ویروس در آن‌ها بود و به علت وضوح بالای تغییر رنگ، عملاً نیازی به استفاده از دستگاه ELISA Reader نبود. روش الایزا یک آزمون سرولوژیک بر پایه اتصال آنتی‌بادی و آنتی‌ژن است که هزینه بالای تهیه آنتی‌سرم و زمان‌بر بودن از مشکلات این روش دقیق می‌باشند. شاید بتوان گفت یکی از برتری‌های این روش عدم نیاز به استخراج RNA است. در مورد انجام واکنش RT-PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی پسر (B) و پیشرو (F) منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۴۵ جفت باز شد (شکل ۲b). واکنش RT-LAMP با استفاده از RNA به عنوان الگو انجام شد و واکنش مثبت با خارج کردن لوله‌ها و دیدن کدورت حاصل شده تأیید شد (شکل ۲c). طبق بررسی انجام شده توسط Notomi و همکارانش، در واکنش LAMP مقدار ۱۰ میکروگرم یا بیشتر از DNA در ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش تولید می‌شود بنابراین، یون پیروفسفات تولید شده با منیزیم واکنش داده و رسوب ایجاد می‌کند که به دنبال آن کدورت مشاهده می‌شود. در حالی که عملکرد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در تولید DNA، ۰/۲ میکروگرم در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش است و در نتیجه میزان یون پیروفسفات به حدود ۰/۲ میلی‌مولار می‌رسد که در نتیجه قادر به تولید رسوب پیروفسفات منیزیم نیست و بنابراین در تکثیر DNA بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز هیچ رسوبی مشاهده نمی‌شود. به علاوه پیروفسفات در دمای بالا هیدرولیز می‌شود، به

آزمون RT-LAMP

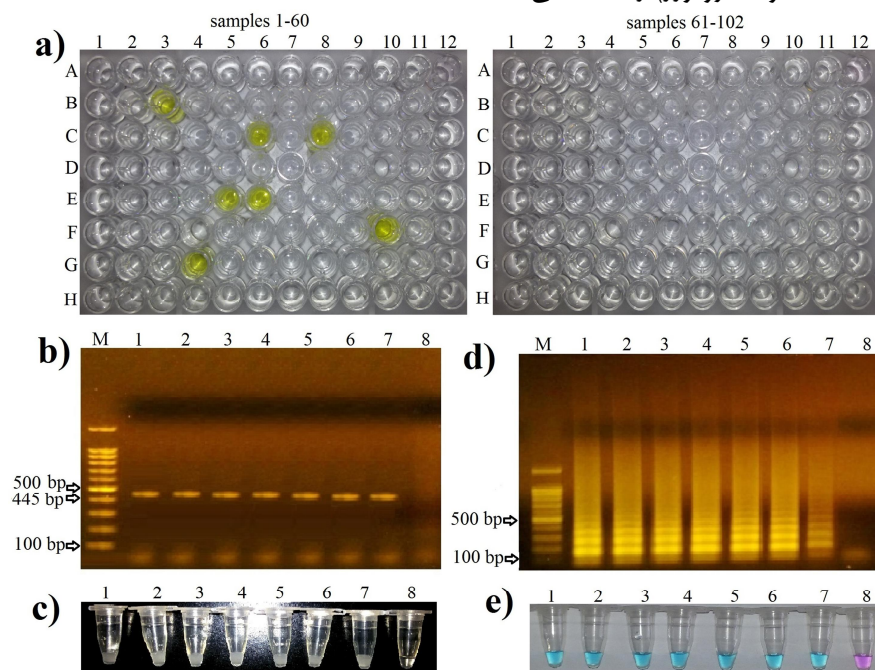
واکنش RT-LAMP به طور همزمان و یک مرحله‌ای با استفاده از RNA به عنوان الگو و در یک لوله انجام شد. ابتدا ۰/۲ میلی‌مولار RNA کل در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه قرار داده و بعد از اتمام، لوله‌ها بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد و واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۱ میلی‌مولار dNTP، ۰/۰۵ میلی‌مولار DDT، ۰/۰۲ میلی‌مولار RNasin، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر پسر (B)، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر پیشرو (F)، ۰/۵ میلی‌مولار Buffer RT (5X)، ۰/۲ میلی‌مولار آنزیم AMV RT پلیمرز، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر FIP، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر BIP، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر F3، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر B3، ۰/۰۸ میلی‌مولار بتاین، ۰/۰۴ میلی‌مولار MgSO₄، ۰/۱ میلی‌مولار Buffer Bst (10X) و ۰/۰۴ میلی‌مولار آنزیم Bst DNA پلیمرز (New England Biolabs, UK) و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در یک حمام آبگرم ادامه یافت. به محض اتمام واکنش لوله‌ها خارج گشت و کدورت حاصل از واکنش مثبت مشاهده شد. همچنین ۵ میکرولیتر از محصول در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با دستگاه Gel documentation مدل Bio-Doc (Biometra, Germany) بررسی شد. علاوه بر این جهت تأیید انجام واکنش RT-LAMP، مقدار ۰/۱ میلی‌مولار از رنگ هیدروکسی نفتول بلو (HNB) (Lemongreen, China) نیز استفاده شد، به این ترتیب که قبل از شروع واکنش مقدار ۰/۱ میلی‌مولار از این رنگ به مخلوط واکنش اضافه شد. بعد از اتمام واکنش، بررسی نتایج با چشم غیرمسلح که با تغییر رنگ در لوله‌ها همراه بود انجام شد.

نتایج و بحث

بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها، در اولین قدم جهت تشخیص نمونه‌های آلوده به ویروس و اطمینان از

که خود این مسئله سبب صرفه‌جویی در هزینه و زمان می‌شود که با نتایج مشابه مطابقت دارد (Notomi *et al.*, 2000; Nagamine *et al.*, 2002). همچنین با بردن محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد و الکتروفورز آن، الگوی نردبانی شکلی دیده شد که ناشی از تولید قطعات با اندازه‌های مختلف است (شکل ۲d).

همین دلیل در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به علت استفاده از دمای بالا جهت واسرشت‌سازی، پیروفسفات هیدرولیز می‌شود (Notomi *et al.*, 2000). همبستگی مثبتی بین سنتز DNA و کدورت وجود دارد. با افزایش سنتز DNA در واکنش LAMP، کدورت نیز به صورت خطی افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کدورت -سنجی، نیاز به استفاده از دستگاه‌های گران قیمت (مانند ژل داک، PCR و الکتروفورز) را حذف می‌کند



شکل ۲. (a) نتایج آزمون الایزا. چاهک 6E: نمونه شاهد مثبت، چاهک 6F: نمونه شاهد منفی، چاهک‌های 3B، 4G، 5E، 6C، 8C و 10F به ترتیب: نمونه‌های AMV7، AMV18، AMV22، AMV26، AMV38 و AMV53 هستند. (b) نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل آگارز محصولات RT-PCR (c) کدورت حاصل از تشکیل $MgSO_4$ (d) نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل آگارز محصولات RT-LAMP (e) نتایج حاصل از اضافه کردن رنگ HNB. خطوط و لوله‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ به ترتیب: نمونه‌های AMV7، AMV18، AMV22، AMV26، AMV38، AMV53، نمونه شاهد مثبت، نمونه شاهد منفی و M: مارکر ۱۰۰bp هستند.

آغازگرهای FIP و BIP برای ادامه واکنش لازم است و در صورت عدم اتصال حتی یکی از آغازگرها، ساختار حلقه‌ای ایجاد نشده و به دنبال آن واکنش LAMP نیز انجام نمی‌شود و در نهایت هیچگونه کدورت و الگوی نردبانی شکلی نیز مشاهده نمی‌شود (Notomi *et al.*, 2000; Haghazari *et al.*, 2011). همچنین از آنجایی که آغازگرها اختصاصی

علاوه بر این نتایج مثبت واکنش RT-LAMP با استفاده از رنگ هیدروکسی نفتول بلو (HNB) که با تغییر رنگ از بنفش به آبی آسمانی همراه بود مشاهده شد (شکل ۲e). تشخیص مشاهده‌ای و الکتروفورز، روش‌های تأیید مولکولی برای LAMP هستند زیرا در آغاز واکنش LAMP ایجاد ساختاری با دو حلقه در انتهای قطعه تولید شده بوسیله

Almasi *et al.*, 2013a-f; Alamsi *al.*, 2009; (Dehadadi, 2013 and ذکر شده برای این روش، باید گفت که این روش خالی از ایراد هم نیست و از معایب این روش می-توان به این موارد اشاره نمود: اولاً این روش فقط جنبه تشخیصی دارد، ثانیاً قطعه تکثیرشده قابلیت توالی‌یابی ندارد و جهت تکثیر آن نیاز به طراحی چندین آغازگر می‌باشد و ثالثاً ممکن است جدایه‌های ویروس قابل ردیابی نباشند (Suzuki *et al.*, 2006; Moradi *et al.*, 2014; Almasi *et al.*, 2014).

سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، مدیریت جهادکشاورزی استان کردستان و دانشگاه زنجان برای فراهم آوردن امکانات این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Ahmadi S, Almasi MA, Fatehi F, Struik PC, Moradi A (2012) Visual detection of *Potato leafroll virus* by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA with hydroxynaphthol blue dye. *J. phytopathol.* 161: 120-124.
- Ahoonmanesh A, Hajimorad MR, Ingham BJ, Francki RIB (1990) Indirect double antibody sandwich ELISA for detecting Alfalfa mosaic virus in aphids after short probes on infected plants. *J. Virol. Methods* 30: 271-282.
- Almasi MA, Moradi A, Nasiri J, Karami S, Nasiri M (2012a) Assessment of performance ability of three diagnostic methods for detection of Potato leafroll virus (PLRV) using different visualizing systems. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168: 770-784.
- Almasi MA, Haghazari A, Moradi A, Saberfar E (2012b) Different methods of RT-LAMP for detection of potato leaf roll virus (PLRV). *Gen. Engineer. Biosafety J.* 1: 1-8.
- Almasi MA, Dehabadi SH (2013) Colorimetric immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the *Potato virus Y*. *J. Plant Pathol. Microb.* 4: 188.
- Almasi MA, Aghapour-Ojaghkandi M, Aghaei S (2013a) Visual detection of *Curly top virus* by the colorimetric loop-mediated isothermal amplification. *J. Plant Pathol. Microb.* 4: 198.
- Almasi MA, Dehabadi SH, Eftekhari Z (2013b) Immunocapture loop mediated isothermal amplification for rapid detection of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) without DNA

هستند و با همدیگر در تولید محصول عمل می‌کنند، امکان تولید قطعات غیراختصاصی در این واکنش وجود نداشته و بنابراین تشخیص مشاهده‌ای و الگوی نردبانی تأییدی مطمئن در واکنش LAMP هستند (Nagamine *et al.*, 2002). به علاوه آنزیم مورد استفاده در این روش، *Bst* DNA پلیمرز با خاصیت جایگزینی رشته و مقاوم به حرارت (تا دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد) است که بدون نیاز به دمای واسرشت-سازی سبب جداسازی دو رشته DNA از همدیگر می‌گردد (Nagamine *et al.*, 2002).

در کل می‌توان گفت که روش LAMP از زمان پیدایش خود از سال ۲۰۰۰ توسط نوتومی (Notomi) به دلیل ویژگی‌های ممتاز خود از جمله سادگی، سرعت، ایمنی، اختصاصیت بالا، حساسیت بالا و هزینه پایین تاکنون توانسته از جایگاه برتری در مقایسه با دیگر روش‌های تشخیصی برخوردار شود (Hayashi *et al.*, 2007; Boubourakasa Obura *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2009;

- extraction. J. Plant Pathol. Microb. 4: 185.
- Almasi MA, Erfanmanesh M, Jafary H, Hosseinidehabadi SM (2013c) Visual detection of *Potato leafroll virus* by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA with the Genefinder™ dye. J. Virol. Methods. 192: 51-54.
- Almasi MA, Jafary H, Moradi A, Zand N, Ojaghkandi MA, Aghaei S (2013d) Detection of coat protein gene of the *Potato leafroll virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. J. Plant Pathol. Microb. 4: 156.
- Almasi MA, Moradi A, Ojaghkandi MA, Aghaei S (2013e) Development and application of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. J. Plant Pathol. Microb. 4: 177.
- Almasi MA, Ojaghkandi MA, Hemmatabadi A, Hamidi F, Aghaei S (2013f) Development of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the *Tomato yellow leaf curl virus*. J. Plant Pathol. Microb. 4: 153.
- Almasi MA, Hosseyni-Dehabadi SM, Aghapour-Ojaghkandi M (2014) Comparison and evaluation of three diagnostic methods for detection of *Beet curly top virus* in sugar beet using different visualizing systems. Appl. Biochem. Biotechnol. 173: 1836-1848.
- Almasi MA (2015) Establishment and Application of a Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Grapevine fanleaf virus*. Mol. Biol. 4: 5.
- Almasi MA, Aghapour-ojaghkandi M, Bagheri K, Ghazvini M, Hosseyni-dehabadi SM (2015) Comparison and evaluation of two diagnostic methods for detection of npt II and GUS genes in *Nicotiana tabacum*. Appl. Biochem. Biotechnol. 175: 3599-3616.
- AL-Saleh MA, Amer MA (2013) Biological and Molecular Variability of Alfalfa mosaic virus Affecting Alfalfa Crop in Riyadh Region. Plant Pathol. J. 29: 410-417.
- Al-Suhaibani NA (2010) Estimation yield and quality of Alfalfa and Clover for mixture cropping pattern at different seeding rates. Am. Eurasian J. Agri. Environ. Sci. 8: 189-196.
- Barker RF, Jarvis NP, Thompson DV, Loesch-Fries LS, Hall TC (1983) Complete nucleotide sequence of Alfalfa mosaic virus RNA 3. Nucleic Acids Res. 11: 2881-2891.
- Bol JF, van Vloten-Doting L, Jaspars EMJ (1971) A functional equivalence of top component a RNA and coat protein in the initiation of infection by Alfalfa mosaic virus. Virology 46: 73-85.
- Bol JF (1999) Alfalfa mosaic virus and ilarviruses: Involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. J. Gen. Virol. 80: 1089-1102.
- Brederode FT, Koper-Zwarthoff EC, Bol JF (1980) Complete nucleotide sequence of Alfalfa mosaic virus RNA 4. Nucleic Acids Res. 8: 2213-2223.
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- Culal Kilic H, Yardimci N (2015) Occurrence of Alfalfa Mosaic Virus (AMV) Infecting Bean Crop in Burdur Province, Turkey. Asian J. Agri. Food Sci. 3: 173-177.
- De Graaff M, Man In T Veld MR, Jaspars EM (1995) In vitro evidence that the coat protein of Alfalfa mosaic virus plays a direct role in the regulation of plus and minus RNA synthesis: Implications for the life cycle of alfalfa mosaic virus. Virology 208: 583-589.

- Frosheiser FL (1969) Variable influence of Alfalfa mosaic virus strains on growth and survival of alfalfa and on mechanical and aphid transmission. *Phytopathology* 59: 857-862.
- Frosheiser FL (1974) Alfalfa mosaic virus transmission to seed through alfalfa gametes and longevity in alfalfa seed. *Phytopathology* 64: 102-105.
- Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y (2003) Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch. Virol.* 148: 1713-1720.
- Fukuta S, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Hasegawa M, Hayashi I, Hashimoto M, Kanbe M (2004) Real-time loop-mediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms. *Eur. Food Res. Technol.* 218: 496-500.
- Gillaspie Jr AG, Barkley NA, Morris JB (2006) An unusual strain of Alfalfa Mosaic Virus detected in *Crotalaria* L. germplasm. *Plant Pathol. J.* 5: 397-400.
- Haghnazari A, Almasi MA, Hoseini SM (2011) LAMP and guide of primer design by PrimerExplorerV4 software. Azarkelk Press, Zanjan, Iran.
- Hajimorad MR, Francki RIB (1988) Alfalfa mosaic virus isolates from lucerne in South Australia: Biological variability and antigenic similarity. *Ann. Appl. Biol.* 113: 45-54.
- Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Watanabe K, Kojiya S, Notomi T, Minamihashi A (2006) Rapid sexing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenol.* 66: 1249-1256.
- Horibe D, Ochiai T, Shimada H, Tomonaga T, Nomura F, Gun M, Tanizawa T, Hayashi H (2006) Rapid detection of metastasis of gastric cancer using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Int. J. Cancer* 120: 1063-1069.
- Hosseini SF, Almasi MA, Kardi MT, Moghim S, Karbasizade V (2014) Molecular Detection of *Clostridium Difficile* in Patients with Diarrhea via LAMP Technique. *J. Mazandaran Univ. Med. Sci.* 24: 36-42.
- Hull R (1969) Alfalfa mosaic virus. *Adv. Virus Res.* 15: 365-433.
- Inacio J, Flores O, Spencer-Martins I (2008) Efficient identification of clinically relevant *Candida* yeast species by use of an assay combining panfungal loop-mediated isothermal DNA amplification with hybridization to species-specific oligonucleotide probes. *J. Clin. Microbiol.* 46: 713-720.
- Lee MF, Chen YH, Hsu HJ, Peng CF (2010) One-tube loop-mediated isothermal amplification combined with restriction endonuclease digestion and ELISA for colorimetric detection of resistance to isoniazid, ethambutol and streptomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Microbiol. Methods* 83: 53-58.
- Manouchehri-Kashani A (1968) Virus diseases of plants. Tehran University Press, Tehran, Iran.
- Massumi H, Hosseini Pour A (2007) Serological Characterization of Alfalfa Mosaic Virus in Alfalfa (*Medicago sativa*) in Some Regions of Iran. *J. Agri. Sci. Technol.* 9: 341-347.
- Massumi H, Shaabani M, Hosseini Pour A, Heydarnejad J, Rahimian H (2009) Incidence of Viruses Infecting Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Their Natural Hosts in the Southeast and Central Regions of Iran. *Plant Dis.* 93: 67-72.
- Massumi H, Maddahian M, Heydarnejad J, Hosseini Pour A, Farahmand A (2012) Incidence of Viruses Infecting Alfalfa in the Southeast and Central

- Regions of Iran. J. Agri. Sci. Technol. 14: 1141-1148.
- Moradi A, Nasiri J, Abdollahi H, Almasi M (2012) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Erwinia amylovora* based on chromosomal DNA. Eur. J. Plant Pathol. 133: 609-620.
- Moradi A, Almasi MA, Jafary H, Mercado-Blanco J (2014) A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assay for the specific detection of *Verticillium dahliae*. J. Appl. Microbiol. 116: 942-954.
- Moreira AG, Kitagima EW, Rezende JAM (2010) Identification and partial characterization of a *Carica papaya* infecting isolate of Alfalfa mosaic virus in Brazil. J. Gen. Plant Pathol. 76: 172-175.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T (2002) Accelerated reaction by loop mediated isothermal amplification using loop primers. Mol. Cell. Probes. 16: 223-229.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28 :e63.
- Parrella G, Lanave C, Marchouz G, Sialer MM, Di Franco A, Gallitelli D (2000) Evidence for two distinct subgroups of Alfalfa mosaic virus (AMV) from France and Italy and their relationships with other AMV strains (brief report). Arch. Virol. 145: 2659-2667.
- Pesic Z, Hiruki C (1988) Comparison of ELISA and dot-hybridization for detection of Alfalfa mosaic virus in alfalfa pollen. Can. J. Plant Pathol. 10: 116-122.
- Rowhani A, Stace-Smith R (1979) Purification and characterization of potato leafroll virus. Virology. 98: 45-54.
- Schmelzer K, Sghmidt HB, Beczner L (1973) Sponatne wirtspflanzen des luzernemosaik-virus. Biol. Zentralbl. 92: 211-227.
- Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Inagaki S, Matsumoto K, Kato K, Kudo K, Kojima S, Asano S (2006) Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. J. Virol. Methods. 132: 216-221.
- Xu H, Nie J (2006) Identification, Characterization, and Molecular Detection of Alfalfa mosaic virus in Potato. Phytopathology 96: 1237-1242.
- Zitikaite I, Samuitiene M (2008) Identification and some properties of Alfalfa mosaic alfamovirus isolated from naturally infected tomato crop. Biologija. 54: 83-88.
- Zschau K, Janke C (1962) Samenübertragung des luzernemosaikvirus an luzerne. NachrBl. Dtsch. PFLSchDienst. 16: 94-96.