ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷
صفحه ۲۹۹ - ۲۹۳

تشخیص مشاهده‌ای ویروس X سیب‌زمینی در آزمون IC-RT-LAMP با استفاده از رنگ HNB

Visual detection of *Potato Virus X* in IC-RT-LAMP assay by using HNB dye

محمد امین الماسی[*1]، ابوبکر مرادی[2]

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

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

Amin Almasi M[*1], Moradi A[2]

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

2- Graduated MSc Student, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aminalmasi66@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

سیب‌زمینی به‌وسیله ویروس‌های مختلفی آلوده می‌شود که می‌توانند عملکرد را کاهش دهند، ویروس X سیب‌زمینی (PVX) به لحاظ اقتصادی یکی از ویروس‌های مهم این محصول است. روش‌های متعددی شامل آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی جهت تشخیص این ویروس وجود دارند، اما این روش‌ها زمان‌بر بوده و نیازمند ابزارهای پیچیده‌ای هستند. هدف از این پژوهش، کاهش زمان مورد نیاز جهت تشخیص PVX با استفاده از روش IC-RT-LAMP بود. نمونه‌های برگی (۵۰ نمونه) با علایم مشابه به ویروس X سیب‌زمینی از سطح استان کردستان جمع‌آوری و برای آزمون سرولوژیکی (DAS-ELISA) به‌کارگرفته شدند. واکنش IC-RT-LAMP به‌صورت یک مرحله‌ای (بدون نیاز به استخراج RNA)، تحت شرایط هم‌دما انجام شد و نتایج به‌وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز و رنگ هیدروکسی‌نفتول‌بلو (HNB) ارزیابی شد. نتیجه مثبت استفاده از رنگ HNB تغییر رنگ مخلوط واکنش از بنفش به آبی آسمانی بود. از مزایای روش IC-RT-LAMP در مقایسه با سایر روش‌های پیشین می‌توان به اختصاصیت بالا، حساسیت بالا، سرعت بالا، کارآیی بالا، ایمنی، سهولت، عدم نیاز به تجهیزات پر هزینه جهت تکثیر، عدم نیاز به استخراج RNA، عدم نیاز به کارهای تشخیصی بعد از تکثیر، تشخیص مشاهده‌ای و کاربر دوستی آن اشاره کرد.

واژه‌های کلیدی

الایزا
IC-RT-LAMP
رنگ HNB
ویروس X سیب‌زمینی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.12.1]

مقدمه

در بین گیاهان دو لپه، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)، مهم‌ترین محصول زراعی بوده که در حال حاضر پس از گندم، برنج و ذرت در مرتبه چهارم جهانی قرار دارد (Neiderhauser 1993). طبق آخرین آمار سازمان فائو تا سال ۲۰۱٤ سطح زیرکشت سیب‌زمینی در ایران، ۱٦۰ هزار هکتار، تولید آن ٤۷۵۰ هزار تن و متوسط عملکرد ۲۹/۵ تن در هکتار بوده است (http://www.fao.org). سیب‌زمینی مورد تهدید عوامل بیماری‌زای متعددی از جمله ویروس‌ها قرار دارد به‌طوری که سالانه خسارت زیادی به این محصول وارد می‌کنند. ویروس X سیب‌زمینی (*Potato virus X*; PVX) که با نام‌های دیگری از جمله ویروس مخفی، ویروس ابلقی، ویروس سیب‌زمینی سالم، ویروس موزائیک بین رگبرگ و ویروس خطی جدید سیب‌زمینی نیز شناخته شده‌است، به جنس *Potexvirus* و خانواده Potyviridae تعلق دارد (Nienhaus and Stille 1965; Sonenberg et al. 1978). پیکره این ویروس نخی شکل خمش پذیر و ژنوم آن یک RNA سنس پیام رسان تک رشته‌ای خطی با اندازه ذرات حدود ۵۵۰ در ۱۲ نانومتر است که شامل سه قسمت سر ′5، دم‌پلی A و پنج چارچوب باز خواندن (ORF) می‌باشد (Huisman et al. 1988). گسترش جهانی این ویروس بر کسی پوشیده نیست و در اغلب کشورهای دنیا به‌همراه دیگر ویروس‌های سیب‌زمینی مشاهده شده‌است. در ایران نیز از اکثر مناطق کشور به‌خصوص استان‌های خراسان و اردبیل گزارش شده است (Fateri Rezvani et al. 2016). علایم آلودگی به این ویروس بر حسب رقم سیب‌زمینی و نژاد ویروس متغیر است و میزان خسارت نیز بین ۱۰ تا ۵۰ درصد گزارش شده‌است (Jeong et al. 2015). عامل بیماری‌زا بیش از ۲٤۰ گونه متعلق به ۱٦ خانواده گیاهی را آلوده می‌کند که اکثر آن‌ها متعلق به خانواده سولاناسه (*Solanaceae*) می‌باشند (Chapman et al. 1992; Boonham et al. 2002). این ویروس به آسانی به‌وسیله عصاره آلوده استخراج شده از غده‌ها یا برگ‌ها، چاقوی برش، تماس مکانیکی، وسایل زراعی و سمپاشی و نیز به‌وسیله اسپورهای قارچ عامل بیماری زگیل سیب‌زمینی (*Synchyrium endobioticum*) و بذور حقیقی گیاه سس (*Cuscuta campestris*) انتقال می‌یابد (Nienhaus and Stille 1965; Sonenberg et al. 1978). پژوهشگران توانسته‌اند با استفاده از بیان ژن‌های پوشش پروتئین، رپلیکاز و P25 این ویروس در سیب‌زمینی مقاومت خوبی را در برابر این بیماری ایجاد کنند (Longstaff et al. 1993; Ares et al. 1998; Bai et al. 2009). اخیراً تحقیقاتی برای ایجاد مقاومت به ویروس از طریق RNA silencing انجام شده‌است که سبب تجزیه RNA ویروس و ممانعت از همانندسازی آن می‌شود (Duan et al. 2012).

در طول چند دهه گذشته، پژوهشگران در تشخیص بیماری‌های عفونی ناشی از ویروس‌ها، با چالش‌هایی از جمله زمان‌بر بودن کشت میکروب و هم‌چنین خطر ابتلا به طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها مواجه بودند که سبب پیدایش روش‌های نوین بر پایه تکثیر اسیدنوکلئیک شد (Notomi et al. 2000; Moradi et al. 2012; Hosseini et al. 2014). Notomi et al. (2000) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ روش جدیدی را با نام تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (Loop-mediated Isothermal Amplification; LAMP) به دنیای مولکولی معرفی کردند که در آن اسیدنوکلئیک تحت شرایط هم‌دما (دمای ثابت) به مدت یک ساعت یا کمتر با استفاده از چهار آغازگر تکثیر یافت. به‌علت سادگی، سرعت، کارآیی بالا و اختصاصیت منحصربه‌فرد این روش، به‌طور گسترده‌ای مورد توجه پژوهشگران علوم زیستی قرار گرفت و هم اکنون امتیاز آن در اختیار شرکت ژاپنی Eiken است (Haghnazari et al. 2011). اگرچه روش LAMP در ایران و جهان برای شناسایی ویروس‌های مهم سیب‌زمینی مانند *Potato leafroll virus* (PLRV) (Ahmadi et al. 2012)، *Potato virus Y* (PVY) (Almasi and Dehadadi 2013) و *Potato virus X* (PVX) (Jeong et al. 2015) به‌کار گرفته شده‌است؛ اما از آنجایی که تاکنون کارآیی روش IC-RT-LAMP (Immunocapture reverse transcription LAMP) در شناسایی ویروس PVX بررسی نشده‌است، در این پژوهش برای اولین بار ارزیابی این روش بر پایه تشخیص مشاهده‌ای با رنگ هیدروکسی‌نفتول‌بلو (HNB) انجام شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.12.1]

مواد و روش‌ها

در نمونه‌برداری‌هایی که از اواخر فصل تابستان سال زراعی ۹۵-۱۳۹٤ از سطح مزارع سیب‌کاری استان کردستان صورت گرفت، تعداد ۵۰ نمونه برگی از گیاهان با علایم آلودگی ویروسی شامل نکروز، موزاییک، زردی و ابلقی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی به‌طور جداگانه و با ذکر شماره و محل نمونه‌برداری جهت انجام آزمون‌های سرولوژیکی و مولکولی تمیز و قطعه قطعه شد و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از آنجایی که آزمون IC-RT-LAMP ترکیب از دو روش الایزا (ELISA) و RT-LAMP بوده و در مرحله اول به مانند آزمون الایزا انجام می‌شود؛ در اینجا به‌منظور مقایسه هر دو روش و بررسی وجود آلودگی در نمونه‌ها، در ابتدا آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای PVX (Bioreba, Suisse, No.110415, No.110421) و بر اساس روش توصیفی Clark and Adam (1977) به‌صورت ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) انجام شد. در ابتدا مقدار ۰/۱ گرم از نمونه برگی در هاون چینی با یک میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری، عصاره‌گیری شد. سپس IgG موردنظر به نسبت توصیه شده توسط کمپانی سازنده (۱/۱۰۰۰) در بافر پوششی رقیق و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در چاهک‌های پلیت ریخته شد. پلیت به مدت چهار ساعت در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از آن تخلیه و سه بار (هر بار به مدت سه دقیقه) با بافر شستشو شسته شد. پس از خشک کردن کامل پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های شاهد مثبت (Bioreba, Suisse, No.110453)، شاهد منفی (Bioreba, Suisse, No.180043) و عصاره‌های نمونه‌های از قبل تهیه شده در چاهک‌ها ریخته شد. لازم به ذکر است به‌منظور جلوگیری از تبخیر در نمونه‌ها، چاهک‌های حواشی پلیت با آب استریل پر شد و روی پلیت با پوشش پلاستیکی استریل پوشیده 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، مقدار ٦/۵ میلی‌گرم پارانیتروفنیل فسفات را که سوبسترای آنزیم آلکالین فسفاتاز است در ٦/۵ 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 ٤۵ دقیقه تغییر رنگ چاهک‌ها با چشم غیرمسلح بررسی و مشاهده شد. طراحی آغازگرها جهت انجام آزمون‌های مولکولی بر اساس ژن پوشش پروتئینی (CP) ویروس موردنظر (با شماره شناسایی Genbank: GQ496608.1) و با استفاده از نرم‌افزار برخط PrimerExplorer V5 صورت گرفت (https://primerexplorer.jp/e). جدول ۱ مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای PVX را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود مجموعه‌ای از چهار آغازگر که شش ناحیه از ژن هدف را شناسایی می‌کنند، در واکنش IC-RT-LAMP فعالیت دارند. این آغازگرها عبارتند از دو آغازگر داخلی پیشرو (FIP) و پسرو (BIP) و نیز دو آغازگر خارجی پیشرو (F3) و پسرو (B3) که در آغازگرهای داخلی یک دنباله چهار نوکلئوتیدی (TTTT)، آغازگرهای F2 و F1c (در آغازگر FIP) و آغازگرهای B2 و B1c (در آغازگر BIP) را به‌هم متصل می‌کند.

جدول ۱- آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن پوشش پروتئین ویروس PVX

نام آغازگر	موقعیت بر روی ژن	طول آغازگر	توالی ′۵ به ′۳
F3	172-181	20 nt	AGATTGAGGCTATCTGGAAG
B3	364-383	20 nt	ATGCAAAATTGCCTAAGAGA
FIP (F1c and F2)	245-262 and 205-226	44 nt	CGCAGTGTCTGACTAAGTTTTTATGAAGGTG CCCACAGACACTA
BIP (B1c and B2)	286-305 and 317-338	46 nt	ACAGAAATGATAGACACAGGTTTTAGTCTG GCTCTGCTGATGCCGT

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.12.1]

جدول ۲- مقایسه دو آزمون الایزا و IC-RT-LAMP در تشخیص ویروس PVX

آزمون	روش تشخیص	ایمنی	نیاز به الکتروفورز	هزینه	کاربر دوستی	زمان
الایزا	مشاهده (تغییر رنگ)	بالا	ندارد	متوسط	متوسط	دو الی سه روز
IC-RT-LAMP	مشاهده (تغییر رنگ)	بالا	ندارد	متوسط	بسیار زیاد	یک روز (مرحله ۱)+ ۹۰ دقیقه (مرحله ۲)
IC-RT-LAMP	الکتروفورز	کم	دارد	بالا	زیاد	یک روز (مرحله ۱)+ ۹۰ دقیقه (مرحله ۲)+ ٦٠ دقیقه (الکتروفورز)

آزمون IC-RT-LAMP ترکیبی از دو روش الایزا (ELISA) و RT-LAMP است که در آن نیازی به استخراج اسیدنوکلئیک (RNA) نمی‌باشد. این آزمون شامل دو مرحله اصلی است. در مرحله اول مانند روش الایزا، ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر IgG موردنظر به چاهک‌های پلیت اضافه و به مدت چهار ساعت در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از شستشو و خشک کردن کامل پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های شاهد مثبت، شاهد منفی و عصاره‌های نمونه‌های جمع‌آوری شده در چاهک‌ها ریخته شد. پلیت موردنظر به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله دوم (روز بعد) پلیت شسته شده و این بار پس از خشک کردن کامل، مخلوطی از مواد در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر حاوی ۰/۰۸ میلی‌مولار dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۰۵ میلی‌مولار DDT، ۰/۰۲ میلی‌مولار RNasin (Fermentas, USA, No.EO0381)، ۰/۵ میلی‌مولار Buffer RT (5X)، ۲ واحد آنزیم *AMV* RT پلیمراز (Fermentas, USA, No.EP0641)، ۰/۰٦ میلی‌مولار آغازگر FIP، ۰/۰٦ میلی‌مولار آغازگر BIP، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر F3، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر B3، ۰/۰۵ میلی‌مولار بتایین، ۰/۰۵ میلی‌مولار $MgSO_4$، ۰/۱ میلی‌مولار رنگ HNB (Lemongreen, China)، ۰/۱ میلی‌مولار Buffer Bst(10X) و ٤ واحد آنزیم *Bst* DNA پلیمراز (New England Biolabs UK) به پلیت اضافه شد و در دمای ٦٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در یک بلوک حرارتی جهت انجام واکنش قرار داده شد. به محض اتمام واکنش تغییر رنگ حاصل از واکنش مثبت مشاهده شد. هم‌چنین پنج میکرولیتر از محصول در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و با دستگاه Gel documentation مدل Bio-Doc (Biometra Germany) بررسی شد. به‌منظور مقایسه و ارزیابی حساسیت دو آزمون الایزا و IC-RT-LAMP، رقت‌هایی (از 10^{-10} تا 10^{-1}) از عصاره یکی از نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده، تهیه شد و آزمون‌ها بر اساس آن انجام شد. هم‌چنین به‌منظور تعیین اختصاصیت روش‌های مذکور، هر دو آزمون با استفاده از ویروس‌های PLRV (Almasi et al. 2012b)، PVY (Almasi and Dehadadi 2013) و TYLCV (Almasi et al. 2013) نیز انجام شدند.

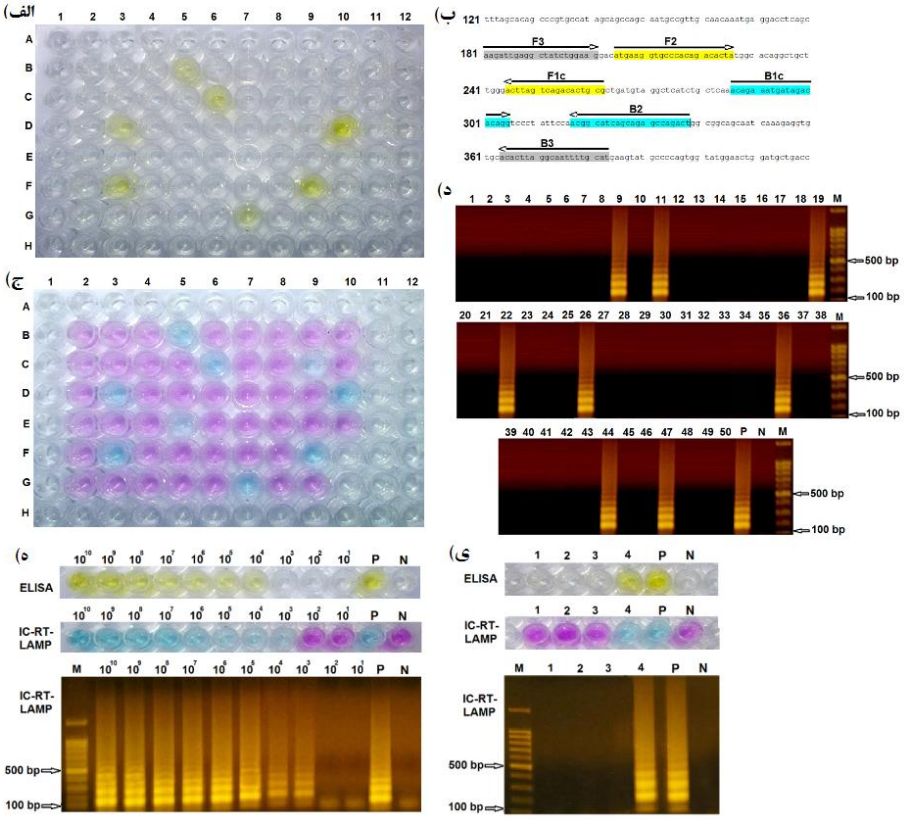
نتایج و بحث

در آزمون الایزا، آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع سیب‌زمینی استان کردستان به PVX مورد تأیید قرار گرفت. مشاهدات چشمی با توجه به رنگ نمونه‌ها نشان دهنده غلظت بالای ویروس در آن‌ها بود و به‌علت وضوح بالای تغییر رنگ، عملاً نیازی به استفاده از دستگاه ELISA Reader نبود. نتایج آزمون DAS-ELISA بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده نشان داد که از ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده تعداد ٦ نمونه (۱۲ درصد) به این ویروس آلوده بودند که بر اساس شماره‌ای که از قبل اختصاص داده شده بود با نام‌های PVX9 و PVX11 (از شهر قروه)، PVX19 (از شهر سنندج)، PVX26، PVX36 و PVX47 (از شهر دهگلان) نام‌گذاری شدند (شکل 1a). این نتایج نشان از گسترش ویروس در سطح استان در چند سال گذشته دارد و یکی از علل آن استفاده از غده‌های بذری آلوده به ویروس توسط کشاورزان منطقه می‌باشد. بعد از طراحی آغازگرها که موقعیت قرارگیری آن‌ها بر روی ژن هدف در شکل 1b نشان داده شده‌است، اقدام به انجام واکنش IC-RT-LAMP شد و واکنش مثبت با مشاهده تغییر رنگ از بنفش به آبی آسمانی تأیید شد (شکل 1c). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تشخیص مشاهده‌ای با استفاده از رنگ HNB،

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.12.1]

نیاز به استفاده از دستگاه‌های گران قیمت (مانند ژل داک و الکتروفورز) و مواد خطرناک (اتیدیوم بروماید) را حذف می‌کند که خود این مسئله سبب ایمنی، سهولت، صرفه‌جویی در هزینه و زمان می‌شود که با نتایج مشابه سایر پژوهشگران مطابقت دارد (Ahmadi et al. 2012). 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 ۱d). بر خلاف آزمون الایزا که در آن فقط ٦ نمونه مثبت شناسایی شد، در این روش از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده ۲ نمونه دیگر با نام‌های PVX22 و PVX44 (از شهر دهگلان) نیز شناسایی شد (١٦ درصد) که نشان‌دهنده حساسیت بیش‌تر روش IC-RT-LAMP در مقایسه با آزمون الایزا بود. هم‌چنان که نتایج دیگر پژوهشگران نیز نشان می‌دهد، دلیل این امر ناشی از ترکیب نمودن و بهره‌مندی از مزایای هر دو روش و در نتیجه بالا بردن میزان حساسیت می‌باشد (Almasi et al. 2012a; Almasi and Almasi 2016). جدول ۲ نتایج مقایسه و ارزیابی دو روش انجام شده در تشخیص PVX را نشان می‌دهد. علاوه بر این نتایج آزمون حساسیت با استفاده از تهیه رقت‌های مختلف از عصاره نمونه مثبت نشان داد که روش IC-RT-LAMP، ۱۰ برابر حساس‌تر از روش الایزا است (شکل ۲a)، با این وجود هر دو روش در تشخیص PVX به‌صورت اختصاصی عمل می‌کنند و اختصاصیت صددرصدی دارند (شکل ۲b).



شکل۱- الف) نتایج حاصل از تشخیص مشاهده‌ای آزمون الایزا، ب) موقعیت قرارگیری آغازگرهای طراحی شده بر روی ژن هدف (پوشش پروتئین)، ج) نتایج حاصل از تشخیص مشاهده‌ای واکنش IC-RT-LAMP، د) نتایج حاصل از الکتروفورز واکنش IC-RT-LAMP. چاهک‌های 3D، 3F، 5B، 5E، 6C، 7G، 9C و 9F به‌ترتیب: نمونه‌های PVX9، PVX11، PVX19، PVX22، PVX26، PVX36، PVX44 و PVX47، چاهک 10D و خط P: نمونه شاهد مثبت، چاهک 7E و خط N: نمونه شاهد منفی و هم‌چنین خط M: مارکر ۱۰۰bp هستند، ه) نتایج مقایسه حساسیت آزمون‌های مختلف در رقت‌های مختلف (از 10^{10} تا 10^{1})، ی) نتایج مقایسه اختصاصیت آزمون‌های مختلف. چاهک، خطوط و لوله‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ به‌ترتیب: نمونه‌های PLRV، PVY، TYLCV و PVX.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.12.1]

نتیجه‌گیری کلی

در کل می‌توان گفت که روش IC-RT-LAMP به‌دلیل ویژگی‌های ممتاز خود از جمله سادگی، سرعت، ایمنی، اختصاصیت بالا و حساسیت بالا تاکنون توانسته از جایگاه برتری در مقایسه با دیگر روش‌های تشخیصی برخوردار شود (Notomi et al. 2000; Moradi et al. 2012). با وجود تمامی مزایای ذکر شده برای این روش، باید گفت که این روش خالی از ایراد هم نیست و از معایب این روش می‌توان به این موارد اشاره نمود: اولاً این روش فقط جنبه تشخیصی دارد، ثانیاً هزینه تهیه آنتی بادی‌ها بالا می‌باشد و ثالثاً ممکن است جدایه‌های ویروس قابل ردیابی نباشند (Suzuki et al. 2006; Moradi et al. 2014).

منابع

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. Journal of Phytopathology 161:120-124.

Almasi MA, Almasi G (2016) Development and evaluation of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Beet necrotic yellow vein virus. Archives of Virology 162:495-500.

Almasi MA, Dehabadi SH (2013) Colorimetric immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the *Potato virus Y*. Journal of Plant Pathology and Microbiology 4:188.

Almasi MA, Dehabadi SH, Eftekhari Z (2013) Immunocapture loop mediated isothermal amplification for rapid detection of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) without DNA extraction. Journal of Plant Pathology and Microbiology 4:185.

Almasi MA, Haghnazari A, Moradi A, Saberfar E (2012a) Different methods of RT-LAMP for detection of *Potato leaf roll virus* (PLRV). Genetic Engineering and Biosafety Journal 1:1-8. (In Farsi).

Almasi MA, Moradi A, Nasiri J, Karami S, Nasiri M (2012b) Assessment of performance ability of three diagnostic methods for detection of *Potato leafroll virus* (PLRV) using different visualizing systems. Applied Biochemistry and Biotechnology 168: 770-784.

Ares X, Calamante G, Cabral S, Lodge J, Hemenway P, Beachy RN, Mentaberry A (1998) Transgenic plants expressing *Potato virus X* orf2 protein (P24) are resistant to *Tobacco mosaic virus* and other tobamoviruses. Journal of Virology 72:731-738.

Bai Y, Guo Z, Wang X, Bai D, Zhang W (2009) Generation of double-virus-resistant marker-free transgenic potato plants. Progress in Natural Science 19:543-548.

Boonham N, Walsh N, Perston K, North S, Smith J, Barker I (2002) The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVYO, PVYN and PVYC strains using RT-PCR. Journal of Virological Methods 102:103-112.

Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D (1992) *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. Plant Journal 2:549-557.

Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34: 475-483.

Duan CG, Wang CH, Guo HS (2012) Application of RNA silencing to plant disease resistance. Silence 3: 5.

Fateri Rezvani S, Pazhouhandeh M, Shirzad A, Lotfi A (2016) Production of potato resistant plant to PVX using an RNA silencing mechanism. Genetic Engineering and Biosafety Journal 5:1-14. (In Farsi).

Haghnazari A, Almasi MA, Hoseini SM (2011) LAMP and guide of primer design by PrimerExplorerV4 software. Azarkelk press, Zanjan, Iran. (In Farsi).

Hosseini SF, Almasi MA, Kardi MT, Moghim S, Karbasizade V (2014) Molecular detection of *Clostridium difficile* in patients with diarrhea via LAMP technique. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 24:36-42. (In Farsi).

Huisman MJ, Linthorst HJM, Bol JF, Cornelissen BJC (1988) The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. Journal of General Virology 69: 1789-1798.

Jeong J, Cho1 SY, Lee WH, Lee KJ, Ju HJ (2015) Development of a rapid detection method for *Potato virus X* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. The Plant Pathology Journal 31: 219-225.

Jeong J, Ju H, Noh J (2014) A review of detection methods for the plant viruses. Research in Plant Disease 20:173-181.

Longstaff M, Brigneti G, Boccard F, Chapman S, Baulcombe D (1993) Extreme resistance to *Potato virus X* infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. EMBO Journal 12: 379-86.

Moradi A, Almasi MA, Jafary H, Mercado-Blanco J (2014) A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assy for the specific detection of *Verticillium dahliae*. Journal of Applied Microbiology 116: 942-954.

Moradi A, Nasiri J, Abdollahi H, Almasi M (2012) Development and evaluation of a loopmediated isothermal amplification assay for detection of *Erwinia amylovora*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.12.1]

based on chromosomal DNA. European Journal of Plant Pathology 133:609-620.
Neiderhauser JS (1993) International cooperation and the role of the potato in feeding the world. American Potato Journal 70:385-403.
Nienhaus F, Stille B (1965) Ubertragung des katoffel-X-virus durch zoosporen von *Synchytrium endobioticum*. Phytopathology 54:335.
Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28:e63.
Sonenberg N, Shatkin AJ, Ricciardi RP, Rubin M, Goodman RM (1978) Analysis of terminal structures of RNA from *Potato virus X*. Nucleic Acids Research 5:2501-2512.
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. Journal of Virological Methods 132:216-221.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.12.1]