

بررسی پراکنش ویروس برگ بادبزنی مو در ایران با استفاده از روش‌های مایه‌زنی بر روی گیاهان محک، DAS-ELISA و IC-RT-PCR

سید علیرضا سلامی^{۱*}، علی عبادی^۲، مینا کوهی حبیبی^۳ و ذبیح الله زمانی^۴
۱، ۲، ۳، ۴. استادیار، استاد و دانشیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱ - تاریخ تصویب: ۹۰/۲/۶)

چکیده

بیماری برگ بادبزنی توسط ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus-GFLV*) ایجاد می‌شود و مخرب‌ترین بیماری ویروسی شناخته شده در گیاه مو است که هر سال باعث خسارت جبران‌ناپذیری در تاکستان‌ها می‌شود. منشأ *GFLV* به احتمال زیاد ایران قدیم بوده و لذا به منظور ممانعت از شیوع بیشتر آن، شناسایی دقیق این ویروس در نواحی انگورخیز ایران و همچنین مطالعه پیوسته الگوی پراکنش آن ضروری است. در این پژوهش پراکنش و میزان آلودگی نسبی به این ویروس مخرب در تاکستان‌ها و نهالستان‌های نواحی مختلف ایران مورد مطالعه قرار گرفت. در مجموع تعداد ۸۸۲ نمونه از شهرستان‌های ابهر، ارومیه، بوانات، جهرم، شیراز، کرج، میمند و نقده جمع‌آوری شدند. با استفاده از روش‌های تشخیصی مختلف شامل انتقال مکانیکی بر روی گیاهان محک، آزمون‌های سرولوژیک و مولکولی، آلودگی به *GFLV* در ۲۰۴ نمونه تأیید گردید. طی این پژوهش برای نخستین بار آلودگی به ویروس *GFLV* در خزانه‌کاری‌های کرج و تاکستان‌های شهرستان نقده گزارش شد. بیشترین میزان آلودگی در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده متعلق به شهرستان بوانات با ۶۳/۷ درصد بود. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان ابهر عاری از ویروس بودند. میزان آلودگی در سایر مناطق بین ۱/۸ تا ۴۳/۱ درصد متغیر بود. نتایج بیانگر گسترش پراکنده این ویروس در تاکستان‌های مناطق مختلف ایران می‌باشد که به نظر می‌رسد توسط قلمه و پیوندک آلوده گسترش یافته باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس برگ بادبزنی مو، آلودگی، تلقیح، موزائیک سیستمیک.

مقدمه

بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی هر سال موجب خسارات جبران‌ناپذیری به بخش کشاورزی می‌شوند. مو نیز که از مهمترین محصولات باغی است از این قاعده مستثنی نیست (Martelli, 1993). در این بین، بیماری برگ بادبزنی مو^۱ مهمترین و مخرب‌ترین بیماری

ویروسی مو در دنیا است (Raski *et al.*, 1983; Andret-Link *et al.*, 2004). ویروس برگ بادبزنی مو از جنس نپوویروس^۲ و از خانواده کوموویریده^۳ است (Harrison *et al.*, 1971; Ward, 1993). این ویروس، در صورت آلودگی شدید باعث کاهش تشکیل میوه و کاهش

2. *Nepovirus*
3. *Comoviridae*

1. *Grapevine fanleaf virus (GFLV)*

ویروس و گواهی شده، عدم وجود پست‌های قرنطینه‌ای و همچنین سهولت تکثیر مو توسط قلمه، احتمال آلودگی به این بیماری ویروسی در کشور بالا است. لذا شناسایی دقیق این ویروس در نواحی انگورخیز ایران و همچنین الگوی پراکنش آن به منظور ممانعت از شیوع بیشتر آن در تاکستان‌های جدید ضروری است. در این بررسی سعی شده است تا مناطق جدید پراکنش این بیماری ویروسی در ایران و همچنین میزان آلودگی به GFLV در آن نواحی تعیین گردد تا بتوان با تکیه بر اطلاعات حاصل، مدیریت دقیق‌تری را جهت کنترل بیماری و ممانعت از شیوع بیشتر آن اعمال کرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

مطالعه وجود GFLV و پراکنش آن در ۴۴ تاکستان و نهالستان در نواحی مختلف ایران همچون مناطق کرج، بوانات، شیراز، جهرم، میمند، ارومیه، نقده و ابهر انجام پذیرفت. در مجموع تعداد ۸۸۲ نمونه مشکوک به آلودگی با توجه به علائم ظاهری گزارش شده برای این ویروس همچون تیز شدن زوایای برگ و بدشکلی برگ‌ها، باز شدن سینوس دمبرگ، حالت موزائیک، رگ نواری زرد یا سبز زرد، کوتاهی میانگره‌ها و مضاعف شدن گره‌ها، تنک شدن خوشه‌ها و عدم یکنواختی در رسیدن حبه‌ها، طی اواسط تا اواخر تابستان ۱۳۸۵ جمع‌آوری شد. تعداد ۲-۳ شاخه از هر بوته انتخاب شد. قلمه‌های تهیه شده در در داخل کیسه پلاستیکی واجد مشخصاتی از قبیل تاریخ و مختصات محل نمونه‌برداری، نام رقم و نام مالک تاکستان یا نهالستان قرار گرفتند. قلمه‌ها به مدت سه ماه در دمای ۴°C قرار گرفتند و سپس در ماسه کشت شدند.

آزمون الیزا

در اوایل بهار، با استفاده از آزمون الیزا آلودگی به GFLV در ۸۸۲ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. مواد شیمیایی مورد نیاز برای آزمون الیزا از کمپانی سیگما تهیه گردید. آزمون DAS-ELISA مطابق دستورالعمل استاندارد و با استفاده از آنتی‌بادی AS-0205 (DSMZ) با دو تکرار انجام گرفت (Clark & Adams, 1977). نتیجه آزمون الیزا به صورت چشمی در فاصله ۱۵ تا ۶۰

عملکرد تا ۸۰ درصد می‌شود (Hinkle, 1995). انتقال این ویروس بطور طبیعی توسط نماتد *Xiphinema index* است با این حال بخشی از آلودگی و شیوع آن در نتیجه تکثیر با استفاده از قلمه، پیوندک و نهال‌های آلوده است (Hewitt et al., 1958). به احتمال زیاد منشأ این بیماری، ایران قدیم بوده و ویروس توسط مواد گیاهی آلوده به سایر نقاط انتقال یافته است (Hewitt et al., 1970; Zaki-Aghl & Izadpanah, 2003). اولین گزارش از شیوع بیماری در ایران مربوط به سال ۱۹۷۰ میلادی است (Vuittenez, 1970). Parvizi, (1988) Ghorbani, (1989) Pourrahim et al., (2000) Zaki-Aghl & Izadpanah (2003) Bashir & Hajizadeh, (2007) و Bashir et al. (2007a,b) نیز گزارش‌هایی را مبنی بر وجود آلودگی در تاکستان‌های نقاط مختلف ایران گزارش کردند. این گزارش‌ها بیانگر دامنه وسیع پراکندگی GFLV در تاکستان‌های مناطق مختلف ایران می‌باشد که به نظر می‌رسد توسط قلمه یا پیوندک آلوده در مناطق مختلف گسترش یافته باشند.

روش‌های شناسایی ویروس‌ها شامل تشخیص بر اساس علائم موجود در مزرعه (Leonhardt et al., 2000; Rumbos et al., 1998)، خصوصیات بیولوژیک از جمله انتقال مکانیکی عصاره به میزبان‌های علفی حساس (Hewitt et al., 1962; Rumbos et al., 2000)، پیوند روی گیاهان چوبی محک (Leonhardt et al., 1998)، بررسی میکروسکوپ الکترونی (Bovey et al., 1980)، روش‌های سرولوژیک همچون الیزا (Bovey et al., 1980; Huss et al., 1986)، مانند هیبریداسیون (Fuchs et al., 1991; Harald et al., 1996)، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR)، (Minafra & Hadidi, 1994; Rowhani et al., 1995; Zaki-Aghl & Izadpanah, 2003; Izadpanah et al., 2003) و IC-RT-PCR (Wetzel et al., 1992; Acheche et al., 1999; Nolasco et al., 1993; Fattouch et al., 2001) می‌باشند. هر یک از این شیوه‌ها مزایا و معایبی دارند و دقت تشخیص هر کدام از آنها متفاوت است. با توجه به سطح زیر کشت وسیع مو در کشور و احتمال منشأ گرفتن این ویروس از ایران و از طرف دیگر عدم استفاده کافی از نهال‌های عاری از

دمای 37°C قرار داده شدند و بعد از شستشوی آنها با بافر PBST، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی تهیه شده با بافر استخراج الیزا به درون آن اضافه گردید و تیوب‌ها یک شب در دمای 4°C قرار گرفتند. بعد از شستشوی مجدد با بافر PBST، مخلوط واکنش ساخت cDNA شامل ۰/۵ پیکومول آغازگر معکوس 912C، ۵۰۰ GFLV-C، ۱×RT buffer، ۰/۵ میلی‌مولار DTT، ۲۰ میکرومولار RNase inhibitor، dNTPs، ۲۰ واحد (Roche) به آن اضافه گردید و به مدت دو دقیقه در دمای 72°C در دستگاه ترموسایکلر (کمپانی بیوراد) قرار گرفت و سپس با کاهش دما به 42°C مقدار ۱۰۰ واحد آنزیم ترنسکریپتاز معکوس^۱ (Roche) به مخلوط واکنش اضافه شد. برای سنتز cDNA، دمای 42°C به مدت ۶۰ دقیقه در نظر گرفته شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱× PCR buffer، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl_2 ، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط dNTP (Roche)، ۰/۴ پیکومول هر یک از آغازگرهای GFLV-CP و 912C، پنج میکرولیتر cDNA و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (Roche) بود. شرایط دمایی به صورت یک سیکل دو دقیقه‌ای در دمای 94°C و ۳۵ سیکل شامل 94°C به مدت ۶۰ ثانیه در مرحله واسرشت‌سازی، 51°C به مدت ۴۵ ثانیه و 72°C به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت یک سیکل 72°C به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر انجام گردید.

ارزیابی محصول PCR در الکتروفورز ژل آگارز

محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۱/۲٪ در بافر × ۱TAE در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت الکتروفورز شد. اندازه قطعه یا باند نیز با استفاده از نشانگر DNA استاندارد یک کیلو جفت بازی (1 Kb DNA ladder) تعیین شد. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت و در نهایت در دستگاه ژل داک توسط نور ماوراء بنفش آشکارسازی شد و تصویر ژل تهیه گردید.

نتایج و بحث

علامی که در نمونه‌های جمع‌آوری شده از سطح ۴۴ تاکستان و نهالستان در نواحی مختلف ایران دیده

دقیقه بعد از افزودن محلول سوبسترا به چاهک‌ها، و با اندازه‌گیری میزان عددی جذب نوری هر یک از چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر در دستگاه الیزا خوان تعیین شد (Van Regenmortel & Dubs, 1993). نمونه‌هایی که O.D. آنها حداقل دو برابر میانگین O.D. نمونه کنترل منفی بود به عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شد.

تشخیص با استفاده از مایه‌زنی بر روی گیاهان محک

از هر ناحیه حداقل دو جدایه که در آزمون الیزا واکنش مثبت نشان داده بودند انتخاب و با سه تکرار بر روی گیاهان محک *Chenopodium amaranticolor*، *Gompherena globosa* و *C. quinoa* در مرحله چهار برگی مایه‌زنی شدند. بافر عصاره‌گیری، بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH ۷/۲ بود. جهت عصاره‌گیری مقدار یک گرم از بافت برگی مو و پنج میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری سرد استفاده شد. برگ‌های انتخابی برای مایه‌زنی با نوک مداد علامت گذاری شدند. برای مایه‌زنی ابتدا سطح برگ‌ها با مقدار اندکی آب خیس شد و پس از پاشیدن مقدار اندکی پودر کربوراند بر روی آنها، با استفاده از انگشت سبابه عصاره بر روی برگ‌ها مالیده شد. سپس برگ‌های مایه‌زنی شده با جریان ملایم آب شسته شدند. به عنوان شاهد چندین برگ سالم از همان گیاه بوسیله بافر فسفات تنها و پودر کربوراند مایه‌زنی شدند. مایه‌زنی گیاهان محک در شرایط دمایی خنک به دور از نور مستقیم آفتاب در هنگام صبح انجام شد و این گیاهان در دمای $22-24^{\circ}\text{C}$ و رطوبت نسبی ۶۰-۵۰ درصد نگهداری و به منظور مشاهده بروز علائم هر روز بازدید شدند.

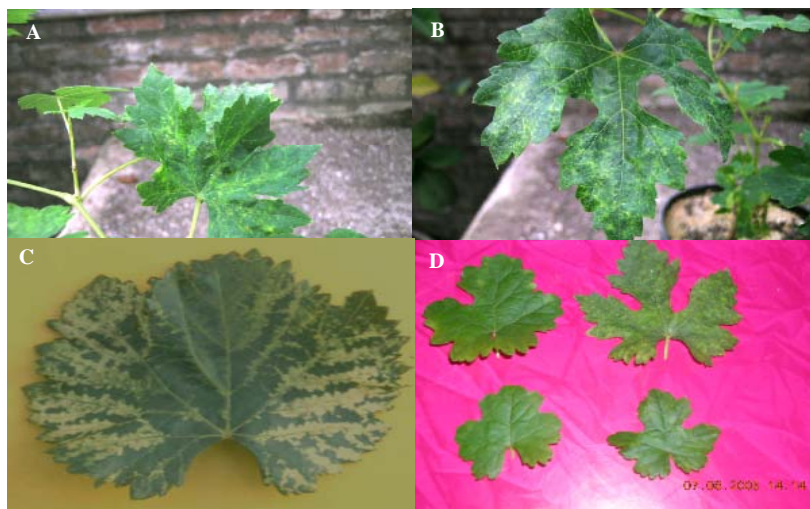
تشخیص ویروس با روش IC-RT-PCR

IC-RT-PCR با استفاده از آغازگر مستقیم 433V (5'-GAA CTG GCA AGC TGT CGT) GFLV-CP (AGA AC-3' 5'-) GFLV-CP 912C معکوس و آغازگر معکوس (GCT CAT GTC TCT CTG ACT TTG ACC-3' صورت گرفت (Izadpanah et al., 2003). در ابتدا آنتی‌بادی AS-0205 به نسبت توصیه شده در بافر پوششی رقیق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن درون تیوب‌های PCR استریل با حجم ۰/۲ میلی‌لیتر ریخته شد. سپس تیوب‌ها به مدت دو ساعت در انکوباتور در

1. M-MuLV Reverse Transcriptase

سیستمیک (شکل ۱-D) دیده شد. ظهور علائم متنوع مرتبط با GFLV همانند آنچه قبلاً گزارش شده بود، حاکی از وجود سویه‌های مختلف ویروس در تاکستان‌های ایران بود (Zaki-Aghl & Izadpanah, 2003).

شد عمدتاً شامل بدشکلی برگ‌ها و تیز بودن زوایای برگ بود (شکل ۱-A). در برخی از نمونه‌ها شواهدی از مضاعف شدن گره‌ها، لکه حلقوی (شکل ۱-B)، روشنی رگبرگ نواری (شکل ۱-C) و همچنین بروز موزائیک



شکل ۱- علائم آلودگی به سویه‌های مختلف ویروس برگ بادبزنی مو. (A) باز شدن سینوس دمبرگ و تغییر حالت برگ‌ها به شکل بادبزنی با حاشیه مضرس و نوک تیز همراه با علائم موزائیک خفیف، (B) علائم شدید لکه حلقوی زرد و فرورفتگی‌های عمیق لوب‌های برگ آلوده، (C) علائم رگ نواری در برگ‌های آلوده، (D) علائم موزائیک در برگ‌های آلوده.

شدن رگبرگ‌ها، بروز لکه‌های کلروتیک و بدشکلی برگ‌ها بود (شکل ۴). آزمون الیزا نیز توانست آلودگی به ویروس برگ بادبزنی را در گیاهان محک تلقیح شده با عصاره ویروس نشان دهد. شدت جذب در آزمون الیزا رابطه مستقیم با شدت علائم بروز کرده در نمونه‌ها داشت. متوسط میزان جذب نمونه‌های آلوده ۲/۴ برابر نمونه‌های سالم بود.

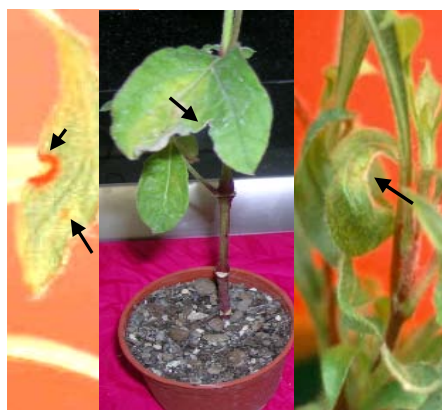


شکل ۲- علائم آلودگی به ویروس برگ بادبزنی مو در گیاه *Chenopodium amaranticolor* به صورت ظهور لکه‌های کلروتیک در برگ‌ها و توقف رشد گیاه، هفت روز پس از تلقیح عصاره برگ مو آلوده به ویروس.

مایه‌زنی جدایه‌های انتخابی منجر به بروز علائم آلودگی بر روی گیاهان *C. amaranticolor*، *G. globosa* و *C. quinoa* گردید. علائم آلودگی ۸-۷ روز پس از مایه‌زنی در دو میزبان تکثیری اول و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی در گیاه *C. quinoa* ظاهر شدند. Bashir *et al.* (2007b) از ۱۵ روز پس از مایه‌زنی برگ‌های *C. quinoa* علائم آلودگی به GFLV را مشاهده کردند. علائم روی *C. amaranticolor* عمدتاً به صورت ظهور لکه‌های خالدار زرد رنگ، تغییر فرم برگ‌ها بود (شکل ۲). برگ‌های مایه‌کوبی شده به یک طرف انحنای پیدا کردند و شکل طبیعی خود را از دست دادند. علائم آلودگی در گیاه *G. globosa* شامل کلروز سیستمیک و بطور عمده پیچیدگی برگ‌ها بود. نقاط کلروتیک پس از ۷-۸ روز به رنگ قرمز در آمدند و نقاط سبز روشن تا زرد رنگ بر روی برگ‌ها ظاهر شد. علاوه بر این در برخی از نمونه‌ها، برگ‌های مایه‌زنی شده با عصاره آلوده ویروس حالت بدشکلی به خود گرفتند و شکاف‌های عمیقی در برگ‌ها دیده شد (شکل ۳). علائم مشاهده شده روی گیاه *C. quinoa* (Izadpanah *et al.*, 2003) شامل شفاف

تعداد ۲۰۴ نمونه آلوده به ویروس برگ بادبزنی مو بودند. بیشترین میزان آلودگی در شهرستان بوانات با ۶۳/۷ درصد مشاهده گردید. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان ابهر عاری از ویروس بودند. میزان آلودگی در سایر مناطق بین ۱/۸ تا ۴۳/۱ درصد در نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته متغیر بود. گزارش‌های قبلی نیز بیانگر بالاترین میزان آلودگی در تاکستان‌های شهرستان بوانات بود (Zaki-Aghl & Izadpanah, 2003). همچنین بر اساس گزارش‌های سایر محققان، نواحی شمال غرب ایران نیز از مراکز بالقوه از نظر آلودگی به GFLV محسوب می‌شوند (Bashir & Hajizadeh, 2007; Bashir et al., 2007 a,b).

در برخی از نمونه‌ها اگر چه علائم ظاهری آلودگی به GFLV به ویژه حالت موزائیک و تیز شدن حاشیه برگ‌ها مشاهده شده بود اما پس از آزمون DAS-ELISA و تلقیح روی گیاهان محک شواهدی مبنی بر آلودگی بدست نیامد. در تعدادی از این نمونه‌های مشکوک، آلودگی ویروسی توسط IC-RT-PCR تأیید گردید اما در تعدادی دیگر اصلاً آلودگی محرز نشد. از طرف دیگر در برخی نمونه‌هایی که علائم ظاهری خاصی در آنها مشاهده نشد آلودگی توسط آزمون‌های DAS-ELISA و IC-RT-PCR تأیید گردید. این موضوع شاید در نتیجه ویژگی‌های خاص ویروس برگ بادبزنی مو و سایر ویروس‌های جنس نیپو و همچنین وابستگی این ویروس به شرایط محیطی خاص برای بروز علائم باشد. مشابه این موارد در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است (Zaki-Aghl & Izadpanah, 2003; Bashir et al., 2007b). چنین مشاهداتی موید این است که صرفاً اتکا به علائم ظاهری برای اطمینان از سلامت قلمه‌ها و گیاهان کافی نیست و ضرورتاً باید از تکنیک‌های تشخیصی با دقت بالا همچون RT-PCR و یا IC-RT-PCR برای تأیید سلامت گیاهان تکثیری بهره گرفته شود. در برخی از نمونه‌های واجد علائم ظاهری آلودگی به ویروس برگ بادبزنی مو، آلودگی ویروسی توسط هیچ یک از این روش‌ها تأیید نشد. احتمال دارد این علائم مربوط به آلودگی به ویروس‌های دیگر یا ویروئیدها، کمبودهای تغذیه‌ای و یا علف هرز کش‌هایی مانند 2,4-D باشد (Bashir et al., 2007b).



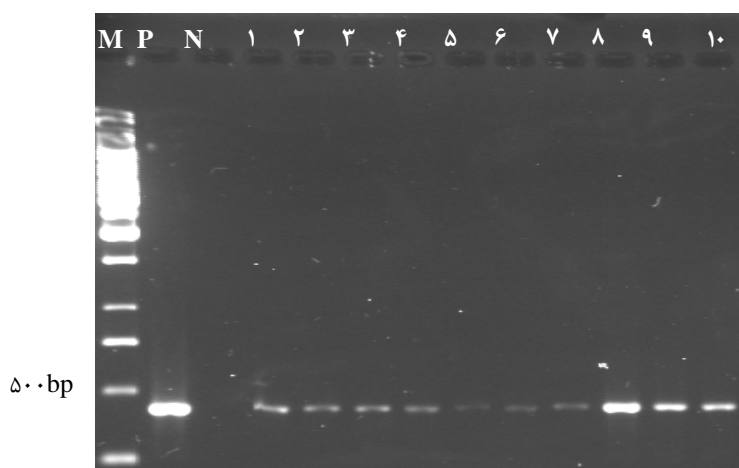
شکل ۳- علائم آلودگی به ویروس برگ بادبزنی مو در گیاه *Gomphrena globosa* به صورت پیچیدگی برگ‌ها، ظهور لکه‌های کلروتیک و قرمز رنگ و ایجاد شکاف‌های عمیق و حالت بدشکلی در برگ‌ها، هشت روز پس از تلقیح عصاره برگ مو آلوده به ویروس.



شکل ۴- علائم آلودگی به ویروس برگ بادبزنی مو در گیاه *Chenopodium quinoa* به صورت بدشکلی برگ‌ها، ظهور لکه‌های کلروتیک و شفاف شدن رگبرگ‌ها، ۱۲ روز پس از تلقیح با عصاره برگ مو آلوده به ویروس.

با استفاده از IC-RT-PCR و جفت پرایمرهای اختصاصی برای GFLV، وجود آلودگی در برخی نمونه‌هایی که با روش‌های قبلی قابل شناسایی نبودند به صورت ظهور باند در ناحیه ۴۸۰ جفت بازی مشخص شد (Izadpanah et al., 2003)، این در حالی بود که هیچ باندهایی در نمونه شاهد (کنترل منفی) مشاهده نگردید (شکل ۵).

بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، وجود آلودگی به ویروس برگ بادبزنی مو در تاکستان‌ها و برخی نهالستان‌های ایران تأیید شد. علاوه بر مراکز آلودگی که قبلاً گزارش شده بود آلودگی به این ویروس در نواحی جدید دیگر همچون شهرستان‌های کرج و نقده محرز گردید. بر اساس نتایج آزمون DAS-ELISA از بین ۸۸۲ نمونه جمع‌آوری شده از برخی نواحی ایران، در مجموع



شکل ۵- الکتروفورز محصول IC-RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ویروس برگ بادبزی مو (GFLV-CP 433V/912C). خط ۱-۱۰: نمونه‌های جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران. M: 1 Kb DNA ladder، P: نمونه مثبت، N: نمونه منفی.

2003; Bashir & Hajizadeh, 2007; Bashir *et al.*, 2007a,b). نواحی جدیدی از پراکنش این ویروس گسترش پراکنده و وسیع این ویروس در تاکستان‌های توسط قلمه یا پیوندک آلوده در مناطق مختلف گسترش یافته باشند. این گزارش از این لحاظ مهم و شاید نگران‌کننده باشد که تاکستان‌ها، سطح زیر کشت وسیعی را در کشور به خود اختصاص داده‌اند. از طرفی با توجه به احتمال منشأ گرفتن این ویروس از ایران، عدم ترویج صحیح و کافی برای استفاده از نهال‌های گواهی شده و عاری از بیماری، عدم وجود پست‌های قرنطینه‌ای در کشور و از همه مهمتر سهولت تکثیر مو توسط قلمه، احتمال آلودگی به این بیماری ویروسی و پراکنش بیشتر آن در نواحی جدید در کشور بالا است. بنابراین شناسایی دقیق نواحی آلوده در ایران و همچنین مشخص کردن میزان آلودگی و الگوی پراکنش این ویروس که از اهداف این پژوهش بوده است به منظور ممانعت از شیوع بیشتر آن در تاکستان‌های جدید ضروری است تا این امکان فراهم گردد که با تکیه بر اطلاعات حاصل، مدیریت دقیق‌تری را جهت کنترل این بیماری ویروسی و ممانعت از شیوع بیشتر آن اعمال کرد.

نتایج نشان داد IC-RT-PCR یک روش کارآمد برای تشخیص آلودگی به ویروس برگ بادبزی مو می‌باشد. این روش ترکیبی از تکنیک‌های RT-PCR و روش سرولوژیک الیزا است و در تحقیقات بسیاری به منظور شناسایی ویروس به کار گرفته شده و قابلیت آن ثابت شده است (Nolasco *et al.*, 1993; Fattouch *et al.*, 2001). مزیت این تکنیک نسبت به روش RT-PCR این است که با انجام این آزمون نیاز به استخراج RNA ویروس یا کل RNA گیاه که حساس و دشوار است نمی‌باشد و پیکره‌های ویروس که به یک لایه آنتی‌بادی اختصاصی متصل شده به جدار چاهک میکروپلیت یا لوله اپندورف جذب شده‌اند مستقیماً وارد واکنش ساخت cDNA می‌شوند. در مخلوط واکنش به دلیل ناپایداری پروتئین پوششی ویروس و با اعمال حرارت بالا، ژنوم ویروس از پوشش پروتئینی جدا شده و در محیط واکنش قرار می‌گیرد. دقت بالا در تشخیص ویروس و سهولت انجام IC-RT-PCR قبلاً گزارش شده است (Wetzel *et al.*, 1992; Acheche *et al.*, 1999).

در این پژوهش علاوه بر تأیید گزارشات قبلی در خصوص آلودگی برخی تاکستان‌های ایران به ویروس برگ بادبزی مو (Ghorbani, 1988; Parvizi, 1989; Pourrahim *et al.*, 2000; Zaki-Aghl & Izadpanah,

REFERENCES

1. Acheche, H., Fattouch, S., M'Hirsi, S., Marzouki, N. & Marrakchi, M. (1999). Use of optimized PCR methods for the detection of GLRaV3: A closterovirus associated with grapevine leafroll in Tunisian grapevine plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17, 31- 42.

2. Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C. & Fuchs, M. (2004). *Grapevine fanleaf virus*: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86, 183-195.
3. Bashir, N. S. & Hajizadeh, M. (2007). Survey for *Grapevine fanleaf virus* in vineyards of north-west Iran and genetic diversity of isolates. *Australian Plant Pathology*, 36, 46-52.
4. Bashir, N. S., Nikkhah, S. & Hajizadeh, M. (2007a). Distinct phylogenetic positions of *Grapevine fanleaf virus* isolates from Iran based on the movement protein gene. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 209-215.
5. Bashir, N. S., Zarghani, S. N. & Hejazi, M. S. (2007b). Diversity of *Grapevine fanleaf virus* isolates from Iran. *Virus Research*, 128, 144-148.
6. Bovey, R., Brugger, J. J. & Gugerli, P. (1980). Detection of *Grapevine fanleaf virus* in grapevine tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immuno electron microscopy (IEM). In: *Proceedings of the 7th Meeting ICVG*. Niagara Falls. Pp. 259-275.
7. Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
8. Fattouch, S., Mhirsi, S., Acheche, H., Marrakchi, M. & Marzouki, N. (2001). RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for the detection of *grapevine fanleaf virus* in Tunisian grapevines. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 235-244.
9. Fuchs, M., Pinck, M., Etienne, L., Pinck, L. & Walter, B. (1991). Characterization and detection of *grapevine fanleaf virus* by using cDNA probes. *Phytopathology*, 81, 559-565.
10. Ghorbani, S. (1988). Identification of *grapevine fanleaf virus* in Iran. In: *Proceedings of the 5th International Congress of Plant Pathology*, Kyoto, Japan: ISPP. 61.
11. Harald, P., Uwe, S. & Hans, J. G. (1996). Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: Novel grapevine yellow speckle viroid 1 mutant show alteration of hairpin I. *Journal of General Virology*, 77, 155-161.
12. Harrison, B. D., Finch, J. T., Gibbs, A. J., Hollings, M., Shepherd, R. J., Valenta, V. & Wetter, C. (1971). Sixteen groups of plant viruses. *Virology*, 45, 356-363.
13. Hewitt, W. B., Raski, D. J. & Goheen, A. C. (1958). Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology*, 48, 586-595.
14. Hewitt, W. B., Goheen, A. C., Raski, D. J. & Gooding, G. V. (1962). Studies on virus diseases of the grapevine in California. *Vitis*, 3, 57-83.
15. Hewitt, W. B., Martelli, G. P., Dias, H. F. & Taylor, R. H. (1970). *Grapevine fanleaf virus*. C. M. I/ A. A. B. Descriptions of Plant Viruses. No. 28.
16. Hinkle, R. P. (1995). Fanleaf, the unmentionable virus. *Wines and vines*, 76, 24-27.
17. Huss, B., Walter, B., Etienne, L. & Van-Regenmortel, M. H. V. (1986). *Grapevine fanleaf virus* detection in various organs using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vitis*, 25, 178-188.
18. Izadpanah, K., Zaki-Aghl, M., Zhang, Y., Daubert, P. S. D. & Rowhani, A. (2003). Bermuda grass as a potential reservoir host for *grapevine fanleaf virus*. *Plant Disease*, 87, 1179-1182.
19. Leonhardt, W., Wawrosch, C., Auer, A. & Kopp, B. (1998). Monitoring of virus diseases in Austrian grapevine varieties and virus elimination using *in vitro* thermotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52, 71-74.
20. Martelli, G. P. (1993). Graft-transmissible disease of grapevines. *Handbook for detection and diagnosis*. (Ed) G. P. Martelli, (p. 263) FAO. Roma.
21. Minafra, A. & Hadidi, A. (1994). Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll associated III from *viruliferous mealybugs* and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods*, 47, 175-188.
22. Nolasco, G., de Blas, C., Torres, V. & Ponz, F. (1993). A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods*, 47, 175-188.
23. Parvizi, R. (1989). Occurrence of grapevine fanleaf disease in vineyards of Ourmia. In: *Proceedings of the 9th Plant Protection Congress of Iran*, 9-14 Sep., Mashhad, Iran. p. 164. (In Farsi).
24. Pourrahim, R., Shahraeen, N., Farzadfar, Sh., Golnaraghi, A. R., Irani, H., Amani, H., Tanhamafi, Z. & Ahoonmanesh, A. (2000). Infection of grapevine gardens with *grapevine fanleaf virus* (GFLV) in Ourmia province of Iran. In: *Proceedings of the 1st National Conference of Grapes*, 16-18 Sep., Ghazvin, Iran. p. 16. (In Farsi).
25. Raski, D. J., Goheen, A. C., Lider, L. A. & Meredith, C. P. (1983). Strategies against *grapevine fanleaf virus* and its nematodevector. *Plant Disease*, 67, 335-339.
26. Rowhani, A., Maningas, M. A., Lile, L. S., Daubert, S. D. & Golino, D. (1995). Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions.

- Phytopathology*, 85, 347-352.
27. Rumbos, I. C., Avgelis, A. & Rumbos, A. I. (2000). Certification scheme for production of virus-free propagation material in Greece. In: Extracted abstracts, 13th Meeting ICVG. Adelaide. PP. 156-157.
 28. Van Regenmortel, M. H. & Dubs, M. C. (1993). Serological procedures. In: R. E. F. Matthews (Ed), *Diagnosis of plant virus diseases*. (pp. 159-214.) CRC Press.
 29. Vuittenez, A. (1970). Fanleaf of grape. In N. W. Frazier (Ed), *Virus disease of small fruit and grapevines*. (pp. 217-218.) University of California.
 30. Ward, C. W. (1993). Progress towards a higher taxonomy of viruses. *Research in Virology*, 114, 419-453.
 31. Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. & Dunez, J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39, 27-37.
 32. Zaki-Aghl, M. & Izadpanah, K. (2003). Serological and molecular identification of *grapevine fanleaf virus* in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 39, 161-171. (In Farsi).