

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

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

محمد امین الماسی^{*}، ابوبکر مرادی^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

Amin Almasi M^{*1}, Moradi A²

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 به وسیله 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 سرولوزیکی و مولکولی جهت تشخیص این ویروس وجود دارد، اما این روش‌ها زمان بر 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 بزرگی (۵۰ نمونه) با عالیم مشابه به ویروس X سیبزمینی از سطح استان کردستان جمع آوری و برای آزمون سرولوزیکی (DAS-ELISA) به کار گرفته شدند. واکنش IC-RT-LAMP به صورت یک مرحله‌ای (بدون نیاز به استخراج RNA)، تحت شرایط هم‌دمای انجام شد و نتایج به وسیله الکتروفورز بر روی ذل آکارز 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، کارآبی 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

مقدمه

(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 Longstaff et al. 1993; Ares et al. 1998; Bai et al. 2009 برآورده این بیماری ایجاد کنند (). 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 Notomi et al. 2000; Moradi et al. (2000) و Notomi et al. (2012; Hosseini et al. 2014) همکارانش در سال ۲۰۰۰ روش جدیدی را با نام تکثیر هم‌دمای Loop-mediated Isothermal Amplification؛ وابسته به حلقه (LAMP) به دنیای مولکولی معرفی کردند که در آن اسیدنوکلئیک تحت شرایط هم‌دمای (دمای ثابت) به مدت یک ساعت یا کمتر با استفاده از چهار آغازگر تکثیر یافت. به علت سادگی، سرعت، کارآیی بالا و اختصاصیت منحصر به فرد این روش، به طور 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 Potato virus باری شناسایی ویروس‌های مهم سیب‌زمینی مانند Potato virus (PLRV) leafroll virus Potato virus X (Almasi and Dehadadi 2013) (PVY) و Potato virus Y (Almasi and Dehadadi 2013) (PVX) (Jeong et al. 2015) (PVX) به کار گرفته شده‌است؛ اما از آنجایی که تاکنون کارآیی روش Immunocapture IC-RT-LAMP (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.

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 ۲۰۱۴ سطح زیرکشت سیب‌زمینی در ایران، ۱۶۰ هزار هکتار، تولید آن ۴۷۵۰ 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 به طوری 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 موzaيك بین رگبرگ و ویروس خطی جدید سیب‌زمینی نیز شناخته شده‌است، به جنس *Potexvirus* و خانواده Nienhaus and Stille 1965; Potyviridae تعلق دارد (Sonenberg et al. 1978). پیکره این ویروس نخی شکل خمس 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' ۵ دمپایی 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 به همراه دیگر ویروس‌های سیب‌زمینی مشاهده شده‌است. در ایران نیز از اکثر مناطق کشور به خصوص 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 ۲۴۰ گونه متعلق به ۱۶ خانواده گیاهی را آلوده می‌کند که اکثر آن‌ها متعلق به خانواده Solanaceae (Solanaceae) می‌باشند (Chapman et al. 1992; Chapman et al. 1992; Boonham et al. 2002). این ویروس به آسانی به وسیله عصاره آلوده استخراج شده از غده‌ها یا برگ‌ها، چاقوی برش، تماس مکانیکی، وسایل زراعی و سمپاشی و نیز به وسیله اسپورهای قارچ عامل بیماری زگیل سیب‌زمینی (*Synchyrium endobioticum*) و بذور حقیقی گیاه سس (*Cuscuta campestris*) انتقال می‌یابد.

مواد و روش‌ها

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 $\frac{6}{5}$ میلی‌گرم پارانیتروفنیل فسفات را که سوبسترای آنزیم آلکالین فسفاتاز است در $\frac{6}{5}$ 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 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 گرفت

جدول ۱ مشخصات آغازگرها

(<https://primerexplorer.jp/e/>). جدول ۱ مشخصات آغازگرها

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 نوکلوتیدی (TTTT)، آغازگرهای F2 و F1c (در آغازگر FIP) و آغازگرهای B2 و B1c (در آغازگر BIP) را بهم متصل می‌کند.

در نمونه‌برداری‌هایی که از اواخر فصل تابستان سال زراعی ۹۵-۹۴ 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 IC-RT-LAMP سانتی‌گراد نگهداری شدند. از آنجایی که آزمون RT-LAMP بوده و در مرحله اول به مانند آزمون الیزا (ELISA) و آزمون PVX (Bioreba, Suisse, No.110415, No.110421) توصیفی (Clark and Adam 1977) به صورت ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) انجام شد. در ابتدا مقدار $0/1$ گرم از نمونه برگی در هاون چینی با یک میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری، عصاره‌گیری شد. سپس IgG موردنظر به نسبت توصیه شده توسط کمپانی سازنده ($1/1000$) 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 Bioreba, Suisse, No.110453 میکرولیتر از نمونه‌های شاهد مشیت (No.180043)، شاهد منفی (Bioreba, Suisse, No.180043)، شاهد منفی (No.110453) و عصاره‌های نمونه‌های از قبل تهیه شده در چاهک‌ها ریخته شد. لازم به ذکر است به‌منظور جلوگیری از تبخیر در نمونه‌ها،

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	AGATTGAGGCTATCTGGAG
B3	364-383	20 nt	ATGCAAAATTGCCTAACAGAGA
FIP (F1c and F2)	245-262 and 205-226	44 nt	CGCAGTGTCTGACTAACAGTTTATGAAGGTG CCCACAGACACTA
BIP (B1c and B2)	286-305 and 317-338	46 nt	ACAGAAATGATAGACACAGGTTTAGTCTG GCTCTGCTGATGCCGT

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	متوجه	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) + ۶۰ دقیقه (الکتروفورز)

آزمون الایزا و IC-RT-LAMP، رقت‌هایی (از 10^1 تا 10^4) از عصاره یکی از نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده، تهیه شد و آزمون‌ها بر اساس آن انجام شد. همچنین به منظور تعیین اختصاصیت روش‌های مذکور، هر دو آزمون با استفاده از Almasi ویروس‌های PLRV (Almasi et al. 2012b) PYY (Almasi et al. 2013) و TYLCV (and Dehadadi 2013) نیز انجام شدند.

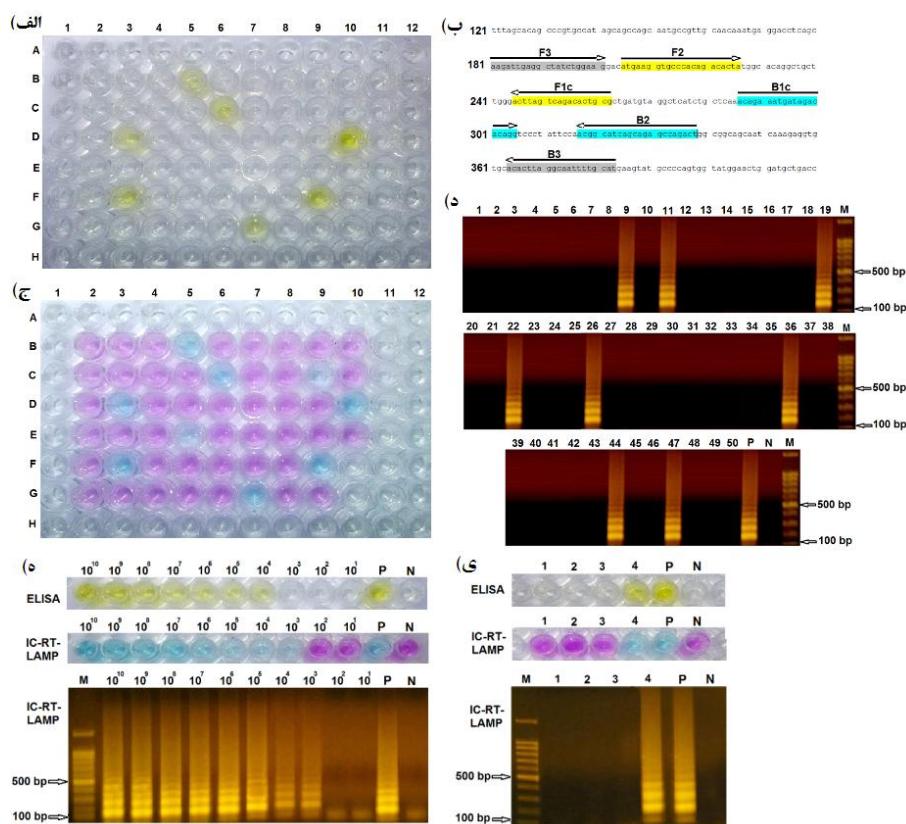
نتایج و بحث

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 به علت 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 ۶ 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 ستندج)، PVX26، PVX36 و PVX47 (از شهر دهگلان) نام‌گذاری شدند (شکل ۱a). 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 ۱b نشان داده است، اقدام به انجام واکنش IC-RT-LAMP شد و واکنش مثبت با مشاهده تغییر رنگ از بدنفس به آبی آسمانی تأیید شد (شکل ۱c). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تشخیص مشاهده‌ای با استفاده از رنگ HNB،

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 گرماخانه 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)، ۰/۰۵ میلی‌مولار RNasin (Fermentas, USA, No.EP0641)، ۰/۱ میلی‌مولار AMV RT (5X Buffer RT)، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر FIP، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر BIP، ۰/۰۵ میلی‌مولار آغازگر F3، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر B3، ۰/۰۵ میلی‌مولار بتایین، ۰/۰۵ میلی‌مولار MgSO₄، ۰/۱ میلی‌مولار رنگ HNB (Lemongreen, China) به پلیمراز Buffer Bst(10X) و ۴ واحد آنزیم Bst DNA (New England Biolabs UK) به پلیت اضافه شد و در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در یک بلوك 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 Biometra Gel documentation Bio-Doc مدل ۱۳۹۷ تابستان ۱۳۹۷

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 به صورت اختصاصی عمل می‌کنند و اختصاصیت صدرصدی دارند (شکل ۲b).

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). برخلاف آزمون الایزا که در آن فقط ۶ 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 (IC-RT- ۱۶ درصد) که نشان‌دهنده حساسیت پیش‌تر روش



شکل ۱-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 و 7G، 9C و 9F به ترتیب: نمونه‌های PVX9، PVX11، PVX19، PVX22، PVX26، PVX36، PVX44 و PVX47 چاهک D 10D و خط P نمونه شاهد مثبت، چاهک 7E و خط N نمونه شاهد منفی و هم‌چنین خط M مارکر ۱۰۰ bp هستند، ه) نتایج مقایسه حساسیت آزمون‌های مختلف در رفت‌های مختلف (از 10^{-1} تا 10^1 ، ی) نتایج مقایسه اختصاصیت آزمون‌های مختلف. چاهک، خطوط و لوله‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب: نمونه‌های TYLCV، PVY، PLRV و PVX.

روش، باید گفت که این روش خالی از ایراد هم نیست و از معاویت این روش می‌توان به این موارد اشاره نمود: اولاًً 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)

نتیجه‌گیری کلی

در کل می‌توان گفت که روش IC-RT-LAMP به دلیل ویژگی‌های ممتاز خود از جمله سادگی، سرعت، اینمنی، اختصاصیت بالا و حساسیت بالا تاکنون توانسته از جایگاه برتری در مقایسه با دیگر روش‌های تشخیصی برخوردار شود (Notomi et al. 2000;) . با وجود تمامی مزایای ذکر شده برای این (Moradi et al. 2012).

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 assay 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*.

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) Übertragung des Kartoffel-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.