

دستورالعمل فنی

دستورالعمل تشخیص بیماری ویروس (ToBRFV) عامل چروکیدگی قهوه‌ای گوجه‌فرنگی به روش الیزا



نویسندگان

سعید سهیلی وند

محمد رضا صفرنژاد

سید الشہید محمد
ابوالفتح محمد



نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: دستورالعمل تشخیص بیماری ویروس (ToBRFV) عامل چروکیدگی قهوه‌ای گوجه‌فرنگی به روش الایزا

نویسندگان: سعید سهیلی وند، محمدرضا صفرنژاد

ویراستار علمی:

ویراستاران ادبی:

تهیه شده در: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی و موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

شمارگان:

نوبت انتشار: اول

سال انتشار:

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است



شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی 67570 به تاریخ 1404/04/11 است



دستورالعمل تشخیص بیماری ویروس (ToBRFV) عامل چروکیدگی قهوه‌ای گوجه‌فرنگی به روش الایزا

نویسندگان

سعید سهیلی وند

محمدرضا صفرنژاد

فهرست مطالب

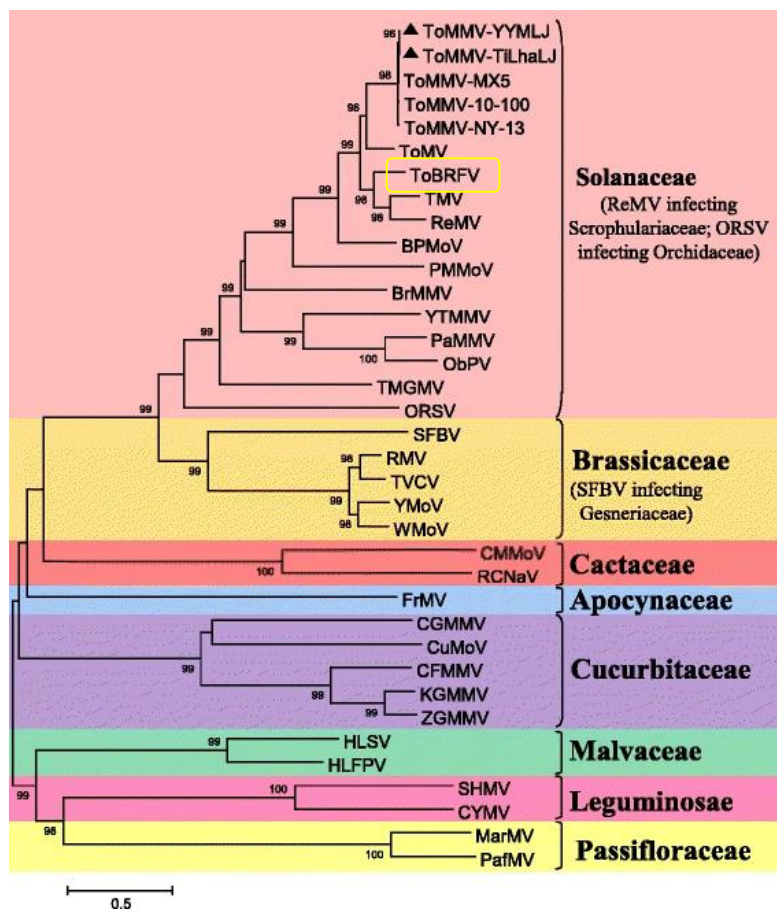
5	 مقدمه
7	 مشخصات ویروس ToBRFV
8	 علائم بیماری در گوجه‌فرنگی و روش‌های تشخیص ویروس
11	 تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی بر علیه پروتئین پوششی نوترکیب ویروس ToBRFV
11	 موارد استفاده از کیت الایزای تشخیص ToBRFV
12	 وسایل، مواد و ابزارهای مورد نیاز برای استفاده کردن از کیت تشخیص ToBRFV
13	 اجزای کیت الایزا جهت تشخیص ویروس ToBRFV
14	 شرایط نگهداری اجزای کیت و محلول‌های کیت ویروس ToBRFV
14	 دستور کار گام به گام کار با کیت الایزای تشخیص ویروس ToBRFV
16	 تفسیر نتایج آزمایش الایزا
17	 توصیه‌های مهم برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد
17	 منابع

مقدمه

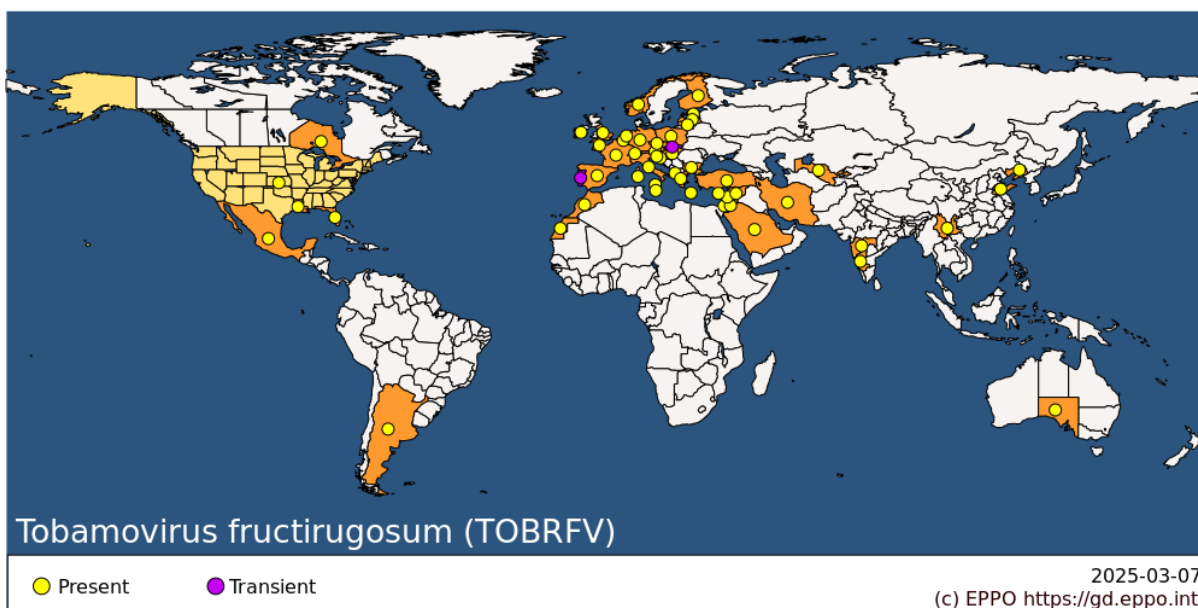
ویروس روگوز قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی (ToBRFV؛ خانواده Virgaviridae، جنس Tobamovirus، گونه *Tobamovirus fructirugosum*) یک گونه ویروس در حال ظهور است که به سرعت در بیش از 50 کشور در تمام قاره‌ها گسترش یافته است و یک تهدید قابل توجه برای تولید گوجه‌فرنگی و فلفل در سراسر جهان به شمار می‌آید. علاوه بر این حضور این ویروس در علف‌های هرز مانند *Chenopodium murale* و *Solanum nigrum* که به طور طبیعی در مزارع گوجه‌فرنگی رشد می‌کنند، گزارش شده است. در نتیجه، با توجه به ماهیت قابل انتقال آن با بذر و ناکارآمدی روش‌های مبتنی بر کشت و مدیریت تلفیقی، به نظر می‌رسد تشخیص دقیق، حساس، زود هنگام و سریع مواد گیاهی آلوده از جمله بذر و نهال در مزارع آلوده و به دنبال آن ریشه‌کنی منبع آلودگی موثرترین رویکرد برای کاهش انتقال آلودگی و کاهش تلفات قابل توجه محصول باشد. کیت الایزای حاضر، با توجه به این نیاز و بر پایه همکاری علمی مشترک بین پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی و موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، طراحی و ارائه شده است. مبنای این کیت بر روی آنتی‌بادی اختصاصی برای شناسایی و ردیابی ویروس روگوز قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی (ToBRFV) استوار است که قادر است به‌طور مؤثر و اختصاصی ویروس را تشخیص داده و نمونه‌های آلوده به ToBRFV را از نمونه‌های سالم گوجه‌فرنگی تمایز تشخیص دهد. دستورالعمل حاضر، علاوه بر معرفی بیماری چروکیدگی قهوه‌ای گوجه‌فرنگی، روش کار با کیت الایزای طراحی شده جهت تشخیص و ردیابی ویروس ToBRFV را، در قالب پروتکل‌های ارائه شده توضیح می‌دهد.

توباموویروس‌ها از جمله مهمترین ویروس‌های گیاهی هستند که سبب بروز خسارت اقتصادی قابل توجهی در انواع محصولات زراعی و زینتی می‌شوند. ویروس چروکیدگی قهوه‌ای میوه گوجه‌فرنگی (Tomato brown rugose fruit virus) از اعضای جنس توباموویروس بوده که در گوجه‌فرنگی خسارت فراوانی وارد می‌نماید (شکل 1).

این ویروس برای اولین بار در اردن در سال 2015 میلادی مشاهده و پس از مدت زمان کوتاهی از 10 کشور دنیا در قاره‌های آسیا (از جمله اردن، ترکیه و چین)، اروپا و آمریکا نیز گزارش شده است (شکل 2). ویروس ToBRFV از جمله ویروس‌های قرنطینه‌ای در کشور می‌باشد. انتقال این ویروس به همراه بذور آلوده به راحتی صورت گرفته و منجر به بروز خسارت در گلخانه و مزارع می‌شود. علاوه بر این، این ویروس قادر است گیاهان گوجه‌فرنگی با ژن‌های مقاومت مانند ژن‌های Tm-1، Tm-2/Tm-22 و L در گیاهان فلفل مقاوم به گونه‌های توباموویروس را آلوده کند. در نتیجه، ToBRFV یک خطر بزرگ برای تولید گوجه‌فرنگی و فلفل و حتی گیاهان زینتی در سطح جهان است که منجر به بدشکلی و تلفات قابل توجه محصول می‌شود (Caruso et al. 2022; Zhang et al., 2022; Dombrovsky et al., 2017; Luria et al., 2017;)



شکل 1. درخت فیلوژنتیکی جنس Tobamovirus (Li, et al., 2017)

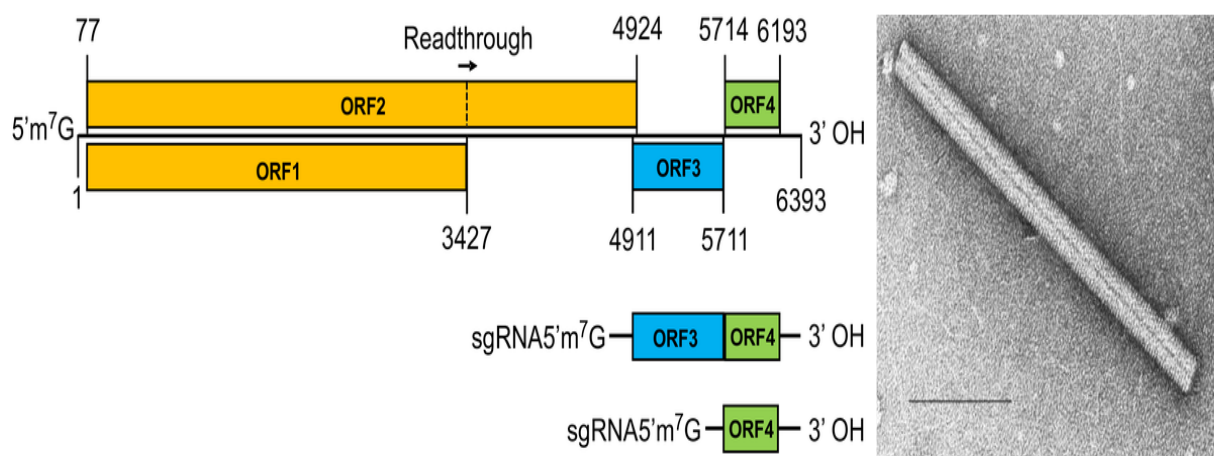


شکل 2. نقشه پراکنش حال حاضر ویروس ToBRFV در جهان

راه‌اندازی سیستم تشخیص سرولوژیک جهت تعیین عدم آلودگی بذور و گیاهان حاصل از آنها در خزانه و همچنین تولید و دسترسی به گیاهان مقاوم و پایش بیماری در مناطق مختلف ضروری است. متأسفانه هزینه بالای تهیه کیت‌های تشخیصی این ویروس از خارج کشور، باعث محدودیت در استفاده از روش‌های تشخیص سرولوژیک به عنوان راحت‌ترین روش شناسایی ویروس در نمونه‌های گیاهی آلوده است. علاوه بر این، محدودیت‌های موجود در بکارگیری سیستم خالص‌سازی ذرات ویروسی نیز وجود دارد. برای حل این موانع و برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی در داخل کشور، از تکنولوژی پروتئین نوترکیب برای تولید آنتی‌ژن (پروتئین پوششی ویروس ToBRFV) استفاده شده و نتیجه آن ارائه کیت بومی برای تشخیص و ردیابی ویروس ToBRFV در نمونه‌های گیاهی است.

مشخصات ویروس ToBRFV

ژنوم ToBRFV یک RNA تک رشته‌ای مثبت است که طول آن نزدیک به 6/4 کیلوبایت است (NCBI Reference Sequence: NC_028478.1). این ژنوم شامل چهار چارچوب خوانش باز (ORFs) Open Reading Frame است (شکل 3). ORF1a-1b پروتئین‌های مرتبط با تکثیر را رمزگذاری می‌کند که به ترتیب 126 و 183 کیلو دالتون وزن دارند. ORF2 یک پروتئین حرکتی (MP) با وزن 30 کیلو دالتون و ORF3 یک پروتئین پوششی (CP) با وزن 17.5 کیلو دالتون را رمزگذاری می‌کند. ذرات ToBRFV میله‌ای شکل هستند به سائز تقریباً 300×18 نانومتر، بسیار پایدار بوده و می‌توانند به راحتی از طریق روش‌های رایج به صورت مکانیکی منتقل شوند (شکل 3).



شکل 3. عکس میکروسکوپ الکترونی ویروس ToBRFV (سمت راست) و نقشه شماتیکی ژنومی ویروس ToBRFV (سمت چپ) (Zhang et al. 2022)

علائم بیماری در گوجه‌فرنگی و روش‌های تشخیص ویروس

ToBRFV پوشش بذر گیاه میزبان را آلوده می‌کند، اما در جنین وجود ندارد. می‌تواند از طریق بذرها منتقل شود و برای چندین سال روی بذر بقا داشته باشند (Salem et al., 2023; Dombrovsky et al., 2017). ToBRFV باعث ایجاد علائم متنوع بیماری در برگ‌های جوان می‌شود، از جمله آنها می‌توان به موزائیک خفیف تا شدید، باریکی، برآمدگی‌های سبز تیره و تغییر شکل برگ و علائم روی میوه‌ها شامل لکه‌های زرد یا تیره، تغییر شکل و روگوز قهوه‌ای اشاره کرد (شکل 4) (Caruso et al., 2022; Zhang et al., 2022; Oladokun et al., 2019). اولین گزارش ToBRFV در ایران در سال 2021 بوده (Ghorbani et al., 2021) و تاکنون ToBRFV در 9 استان ایران طی سال‌های 2021-2022 گزارش شده است (Bananej et al., 2023).



شکل 4. ظهور علائم متنوع بیماری در برگ‌های گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس ToBRFV (Batuman et al., 2020)

بیشترین خسارت اقتصادی ویروس در میوه مشهود است بر حسب استرین ویروس و شدت آلودگی و میزان حساسیت یا تحمل رقم در پاسخ به آن می‌تواند به اشکال گوناگونی بروز یابد (شکل‌های 5 و 6). با توجه به گسترش سریع و گسترده ToBRFV در سراسر جهان، ماهیت قابل انتقال آن با بذر و ناکارآمدی روش‌های مبتنی بر کشت و مدیریت تلفیقی، به نظر می‌رسد تشخیص دقیق، حساس، زود هنگام و سریع مواد گیاهی آلوده از جمله بذر و نهال و مزارع آلوده و به دنبال آن ریشه‌کنی منبع آلودگی موثرترین رویکرد برای کاهش انتقال آلودگی است (Zhang et al., 2023; Davino et al., 2022). تا به امروز، مطالعات زیادی بر روی تکنیک‌های تشخیص مولکولی برای تشخیص ToBRFV، مانند RT-PCR و RT-qPCR انجام شده است. علاوه بر این، کیت‌های مختلف double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS ELISA) برای تشخیص ToBRFV توسط چندین شرکت بین‌المللی، با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و یا مونوکلونال که قادر به تشخیص ToBRFV هستند، تولید شده است (Bernabe-Orts et al., 2022; Caruso et al., 2022; Alon et al., 2021).



شکل 5. اثرات مختلف بیماری در میوه گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس ToBRFV و افت کیفیت محصول (Batuman et al., 2020)



شکل 6. علائم ظاهری بیماری در میوه آلوده به ویروس ToBRFV با علائم ترک خوردگی بر روی میوه (سمت راست) و میوه سالم (سمت چپ) (<https://www.tomatonews.com>)

سیستم‌های تشخیص پروتئین یک فرآیند انقلابی برای تشخیص آنالیت‌های مختلف در طیف گسترده‌ای از نمونه‌ها هستند (Cerf et al., 2011; Garibotti et al., 2011). در دهه‌های اخیر، ساخت و بیان پروتئین‌های خالص از ژن‌های مختلف ویروسی، از جمله پروتئین حرکتی، پروتئین پوششی و غیره، با فناوری DNA نو ترکیب و مهندسی آنتی‌بادی امکان‌پذیر شده است (Kumari et al., 2001). تا به امروز، تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال با استفاده از پروتئین نو ترکیب پوششی علیه چندین توباموویروس از جمله ToMV، ویروس لکه‌دار خفیف فلفل (PMMoV)، و ویروس موزاییک ریبرگراس (RMV) (Mrkvova et al., 2020; Phatsaman et al., 2022) و تعدادی از ویروس‌های گیاهی مانند ویروس کوتوله زرد جو (Shams-bakhsh et al., 2004)، ویروس تریستزا مرکبات (CTV) (Amiri et al., 2013; Iracheta-Cardenas et al., 2008)، ویروس پیچ‌خوردگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (TYLCV) (Salimi et al., 2017; Elgaied et al., 2012)، ویروس زرد غربی چغندر (Lotfi et al., 2015)، ویروس پسرورز مرکبات (Salem et al., 2018) و ویروس رگ زرد نکروزه چغندر (BNYVV) (Karimzade et al., 2023) تولید شده است. با توجه به گزارشات اخیر ToBRFV در ایران و نوظهور بودن این بیماری، تشخیص سریع و شناسایی کانون‌های آلودگی برای مدیریت موثر و کارآمد در جلوگیری از انتشار آن از کانون‌های آلوده به نقاط دیگر کشور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. علاوه بر این ردیابی ویروس در مناطق مشکوک و بررسی میزان آلودگی از دیگر الزامات مدیریت بیماری است. بنابراین ارائه روش تشخیصی ارزان، بومی و قابل اعتماد بر پایه آزمون‌های سرولوژیکی از اهداف اصلی طراحی و ارائه این کیت است.

تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی بر علیه پروتئین پوششی نوترکیب ویروس ToBRFV

برای این منظور ابتدا تعیین آلودگی نمونه‌های گیاهی به ویروس از طریق آزمون‌های سرولوژیک و مولکولی انجام می‌شود. پرایمرهای اختصاصی براساس توالی ژن پروتئین پوششی طراحی گردیده و پس از تکثیر، قطعه جداسازی شده در ناقل همسانه‌سازی می‌شود. از روش‌های هضم آنزیمی و تعیین ترادف برای تایید جداسازی و همسانه‌سازی ژن در ناقل استفاده می‌گردد. برای تولید پروتئین پوششی، ابتدا ژن مربوطه در ناقل بیانی باکتریایی همسانه‌سازی و سپس بیان آن در میزبان باکتریایی به صورت متصل به توالی شش‌تایی هیستیدین صورت می‌گیرد. خالص‌سازی پروتئین پوششی نوترکیب بر اساس روش کروماتوگرافی تمایلی و میل ترکیبی پروتئین نوترکیب حاصله با ستون حاوی یون نیکل انجام می‌شود. کمیت و کیفیت پروتئین خالص بر اساس روش الکتروفورز پروتئین مورد بررسی و پروتئین نوترکیب تلخیص شده جهت ایمنی‌زایی به خرگوش تزریق می‌شود و پس از افزایش عیار آنتی‌سرم، خونگیری و جداسازی سرم خون انجام می‌شود. اختصاصیت آنتی‌بادی حاصله بر علیه نمونه‌های آلوده با روش‌های مختلف ایمونواسی مورد بررسی و در نهایت کیت آزمون الایزای مورد نظر برای تشخیص و غربال نمونه‌های مشکوک آلوده به ToBRFV تهیه و ارائه می‌شود.

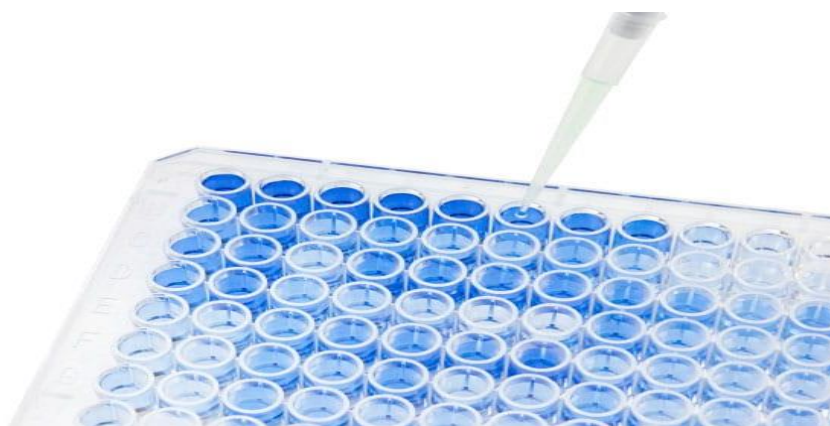
موارد استفاده از کیت الایزای تشخیص ToBRFV

کیت الایزای تشخیص بیماری ویروس چروکیدگی قهوه‌ای گوجه‌فرنگی (ToBRFV) یک کیت تخصصی بوده و قابلیت استفاده در موارد زیر است:

- کلینیک‌های گیاهپزشکی
- شرکت‌ها یا موسسات کنترل و گواهی بذر
- گلخانه‌داران (کشت‌های سنتی، هیدروپونیک و ایروپونیک)
- کشت و صنعت‌های کشاورزی
- ایستگاه‌های قرنطینه
- گمرک و پایانه‌های واردات و صادرات گوجه‌فرنگی و فلفل

وسایل، مواد و ابزارهای مورد نیاز برای استفاده از کیت الایزای تشخیص ToBRFV

1. سمپلرهای کالیبره ($10\ \mu\text{l} - 1000\ \mu\text{l}$)
2. سرسمپلرها
3. پلیت الایزا 96 چاهکی (شکل 7)
4. هاون چینی
5. شیرخشک (Skimmed milk)
6. دستگاه شیکر انکوباتور 37°C درجه
7. دستگاه ورتکس
8. ترازو
9. دستگاه الایزا ریدر با فیلتر 450 نانومتر



شکل 7. پلیت 96 چاهکی الایزا برای تشخیص و غربال نمونه‌های آلوده از سالم

اجزای کیت الایزا جهت تشخیص ویروس ToBRFV

1. نمونه کنترل مثبت
2. نمونه کنترل منفی
3. محلول بافر استخراج کربنات
4. محلول بافر رقیق‌سازی (Phosphate buffered saline) PBS
5. محلول بافر شستشو (PBST)
6. ویال آنتی‌بادی پوششی (Coating antibody) غلظت $5\mu\text{g/ml}$
7. ویال آنتی‌بادی کانجوگه شده با AP (Alkaline phosphatase) غلظت $5\mu\text{g/ml}$
8. محلول pNPP (1 - p-Nitrophenyl phosphate) به نسبت یک میلی گرم در میلی لیتر

چگونگی تهیه محلول‌ها و بافرها به شرح زیر خواهد بود. نیاز به یادآوری است که محلول‌ها و بافرها تازه تهیه شوند.

بافر استخراج کربنات (pH 9.6):

(Na_2CO_3 2/93 گرم بر لیتر، NaHCO_3 0/2 گرم بر لیتر، NaN_3)

بافر رقیق‌سازی PBS (pH 7.3):

(NaCl 137 میلی مولار، KCl 2/7 میلی مولار، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ 8/1 میلی مولار و KH_2PO_4 1/5 میلی مولار)

بافر شستشو (PBST):

0.05% Tween20 + PBS

محلول شیرخشک 2 درصد

100 میلی گرم شیرخشک در 5 میلی لیتر PBS

محلول pNPP (1 میلی گرم از pNPP در 1 میلی لیتر از محلول):

100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2

شرایط نگهداری اجزای کیت و محلول‌های کیت ویروس ToBRFV

1. ویال نمونه‌های کنترل مثبت، کنترل منفی، ویال آنتی‌بادی پوششی (Coating antibody) و ویال آنتی‌بادی کانجوگه شده با AP برای نگهداری طولانی مدت در فریزر 20- درجه سلسیوس نگهداری شود.

2. محلول‌های بافر استخراج (کربنات)، محلول بافر رقیق‌سازی، محلول بافر شستشو و محلول pNPP موجود در کیت برای استفاده محدود و کوتاه مدت چند روزه پس از تحویل کیت قابل مصرف هستند و به مرور زمان بدلیل ماهیت ذاتی آنها، خاصیت‌شان از بین خواهد رفت. برای بالا بردن مدت نگهداری این محلول‌ها پس از دریافت کیت در یخچال نگهداری شوند. به همین خاطر توصیه می‌شود برای بهره‌مندی حداکثر از کیت و انجام آزمون‌های بعدی، طبق دستورالعمل اقدام به تهیه تازه این بافرها شود.

دستور کار گام به گام با کیت الایزای تشخیص ویروس ToBRFV

1. به کمک پایپتور یک ماکرولیتتر از آنتی‌بادی پوششی را در 4 میلی‌لیتر بافر رقیق‌سازی حل نموده و مقدار 100 میکرولیتر از آن را به ته هر چاهک پلیت الایزا ریخته و درب پلیت را بر روی آن قرار داده و در دمای 4 درجه سلسیوس به مدت 12-16 ساعت نگهداری شود.

نکته 1: تعداد چاهک‌ها به اندازه دو برابر تعداد نمونه‌های مشکوک گیاهی بعلاوه چهار چاهک اضافی جهت بارگزاری کنترل مثبت آلوده و منفی سالم در نظر گرفته شود (دو چاهک برای هر نمونه‌ای در واقع 2 تکرار) و مقدار بافر حاوی آنتی‌بادی پوششی به اندازه تعداد چاهک‌ها ضربدر 100 میکرولیتر تهیه شود.

نکته 2: می‌توان برای تسریع در کار، به جای 12-16 ساعت نگهداری در 4 درجه سلسیوس، 4 ساعت در دمای اتاق نگهداری کرد. با این حال روش اول بیشتر توصیه می‌شود.

2. پس از گذشت مدت زمان ذکر شده محلول آنتی‌بادی اولیه از داخل چاهک‌ها جمع‌آوری شده و چاهک‌ها سه بار به وسیله محلول شستشو، کاملاً شسته شوند.

3. پس از شستشو، 200 میکرولیتر محلول شیرخشک دو درصد به هر کدام از چاهک‌ها به منظور مسدود کردن چاهک‌ها اضافه شود و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرمادهی شوند.

نکته 3: بدلیل آلودگی سریع محلول شیرخشک، بایستی در هر آزمون بصورت تازه تهیه و استفاده شود.

4. پس از تخلیه کامل محلول شیرخشک، پلیت‌ها سه بار به وسیله محلول شستشو، شسته شوند.

5. نمونه‌های گیاهی مشکوک از برگ گیاه انتخاب شده و در وزن‌های یکسان با استفاده از بافر استخراج از آنها سوسپانسیون تهیه شود. سپس به میزان 100 میکرولیتر، به پلیت‌های الایزای شسته شده اضافه، درب پلیت گذاشته شده و در دمای اتاق به مدت 2 ساعت انکوبه شوند.

نکته 4: دو تکرار از شاهد مثبت و منفی موجود در کیت بایستی در کنار نمونه‌های مشکوک در هر آزمون قرار داده شوند. برای این منظور 2 ماکرولیتر از هر نمونه شاهد مثبت و منفی را در 200 میکرولیتر بافر استخراج جداگانه حل کرده و 100 میکرولیتر از آنها، در هر یک از چاهک‌های مشخص شده برای شاهد‌ها ریخته شود.

نکته 5: توصیه اکید می‌شود از سوسپانسیون‌های تازه برای آزمون استفاده شود و نمونه گیاهی کاملاً در بافر استخراج له شده و یک سوسپانسیون یکنواخت از هر نمونه برای حداقل دو تکرار (حداقل 200 میکرولیتر) تهیه شود.

6. دوباره بعد از تخلیه سوسپانسیون نمونه‌های گیاهی و کنترل‌های آن، چاهک‌های پلیت‌ها، سه بار به وسیله محلول شستشو شسته شوند و همانند مرحله اول یک میکرولیتر از آنتی‌بادی کانژوگه شده با آلکالین فسفاتاز (AP) در یک میلی‌لیتر محلول بافر رقیق‌سازی حل شده و 100 میکرولیتر از آن درون هر چاهک ریخته، درب پلیت گذاشته شده و در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت یک ساعت گرماگذاری شود.

7. پس از جمع‌آوری محلول آنتی‌بادی کانژوگه شده با آلکالین فسفاتاز، برای بار آخر، پلیت‌ها سه بار به وسیله محلول شستشو، بطور کامل شسته شوند. پس از آن 100 میکرولیتر از محلول pNPP برای بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به هر چاهک اضافه شود و پس از تولید رنگ، OD واکنش در زمان‌های 15، 30 دقیقه در طول موج 405 نانومتر خوانده شود.

نکته 6: برای اثر بخشی بیشتر توصیه می‌شود محلول pNPP برای هر آزمون به صورت تازه تهیه شود.

تفسیر نتایج آزمایش الایزا

برای مشخص کردن وضعیت نمونه‌ها (مثبت، مشکوک و یا منفی) و بررسی درستی آزمون، باید در وهله اول نسبت میانگین دو شاهد مثبت به میانگین دو شاهد منفی بیشتر از سه و نیم (3/5) باشد. پس از آن از رابطه زیر وضعیت هر یک از نمونه‌ها (S/P) مشخص خواهد شد.

$$S/P = \frac{\text{Mean OD sample} - \text{Mean OD NC}}{\text{Mean OD PC} - \text{Mean OD NC}}$$

NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت

S/P	نتیجه آزمون نمونه
$S/P < 15$	منفی
$15 \leq S/P \leq 25$	مشکوک (غیر قابل تفسیر)
$25 \leq S/P$	مثبت

نقشه پلیت 96 تایی الایزا

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

توصیه‌های مهم برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد

1. توصیه می‌شود قبل از اجرای آزمون جایگاه و تکرار نمونه‌ها را بر روی نقشه پلیت 96 چاهکی الایزا مشخص نموده و برای کاهش خطا با استفاده از نقشه نمونه‌های گیاهی مشکوک را در چاهک‌های مشخص شده لود نمایید.
2. قبل از مصرف محتویات محلول‌ها، آنها را کاملاً تکان دهید و محتویات ویال‌ها را با پایپت کردن مکرر همگن کنید.
3. درب پلیت 96 چاهکی الایزا در مدت زمان اعمال تیمارهای زمانی، بایستی بسته باشد تا از تبخیر محلول‌ها جلوگیری به عمل آید.
4. قبل از قرائت نمونه‌ها با دستگاه الایزا ریدر، دستگاه مربوط روشن و آماده باشد تا زمان عمل آنزیم آلکالین فسفاتاز دقیق در آزمون لحاظ شود.
5. در صورت تمایل برای متوقف کردن واکنش آنزیم AP، می‌توان از محلول NaOH 2N به میزان 50 میکرولیتر برای هر چاهک استفاده کرد.

منابع

- Alon, D. M., Hak, H., Bornstein, M., Pines, G., & Spiegelman, Z. (2021). Differential detection of the tobamoviruses tomato mosaic virus (ToMV) and tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) using CRISPR-Cas12a. *Plants*, 10(6): 1256.
- Amiri Sadeghan, A., Shams-Bakhsh, M., & Yakhchali, B. (2013). Expression of Citrus tristeza virus coat protein gene in Escherichia coli. *Journal of Crop Protection*, 2(4): 387-393.
- Bananej, K., Keshavarz, T., da Silva, J. P. H., & Zerbini, F. M. (2024). Isolation and whole-genome sequencing of tomato brown rugose fruit virus from pepper in Iran. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(1): 49-55.
- Batuman, O., Yilmaz, S., Roberts, P. D., McAvoy, E., Hutton, S. F., Dey, K., & Adkins, S. (2020). Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV): A Potential Threat for Tomato Production in Florida: PP360, 12/2020. *EDIS*, 2020(6).

- Bernabe-Orts, J. M., Hernando, Y., & Aranda, M. A. (2022). Toward a CRISPR-based point-of-care test for tomato brown rugose fruit virus detection. *PhytoFrontiers*TM, 2(2), 92-100.
- Caruso, A. G., Bertacca, S., Parrella, G., Rizzo, R., Davino, S., & Panno, S. (2022). Tomato brown rugose fruit virus: A pathogen that is changing the tomato production worldwide. *Annals of Applied Biology*, 181(3): 258-274.
- Cerf, A., Alava, T., Barton, R. A., & Craighead, H. G. (2011). Transfer-printing of single dna molecule arrays on graphene for high-resolution electron imaging and analysis. *Nano letters*, 11(10): 4232-4238.
- Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Barone, S., & Panno, S. (2020). Tomato brown rugose fruit virus: Seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments. *Plants*, 9(11): 1615.
- Dombrovsky, A. & Smith E., (2017). Seed transmission of Tobamoviruses: Aspects of global disease distribution, Jimenez-Lopez, J. C. (Ed.). *Advances in Seed Biology*. BoD–Books on Demand, 12: 233-260.
- Elgaied, L., Salem, R., & Elmenofy, W. (2017). Expression of tomato yellow leaf curl virus coat protein using baculovirus expression system and evaluation of its utility as a viral antigen. *3 Biotech*, 7(4): 269.
- Garibotti, A. V., Pérez-Rentero, S., & Eritja, R. (2011). Functionalization and self-assembly of DNA bidimensional arrays. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9): 5641-5651.
- Ghorbani, A., Rostami, M., Seifi, S., & Izadpanah, K. (2021). First report of Tomato brown rugose fruit virus in greenhouse tomato in Iran. *New Disease Reports*, 44(2): e12040.
- Iracheta-Cárdenas, M., Sandoval-Alejos, B. D., Román-Calderón, M. E., Manjunath, K. L., Lee, R. F., & Rocha-Peña, M. A. (2008). Production of polyclonal antibodies to the recombinant coat protein of Citrus tristeza virus and their effectiveness for virus detection. *Journal of Phytopathology*, 156(4): 243-250.

- Karimzade, M., Safarnejad, M. R., Aminzadeh, S., Kazemzadeh-Beneh, H., Hemmati, F., & Shams-Bakhsh, M. (2023). Generation of specific antibody against recombinant major coat protein of beet necrotic yellow vein virus and its application for detection of rhizomania disease. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 56(1): 10-28.
- Kumari, S. G., Makkouk, K. M., Katul, L., & Vetten, H. J. (2001). Polyclonal antibodies to the bacterially expressed coat protein of Faba bean necrotic yellows virus. *Journal of Phytopathology*, 149(9): 543-550.
- Li, Y., Wang, Y., Hu, J., Xiao, L., Tan, G., Lan, P., ... & Li, F. (2017). The complete genome sequence, occurrence and host range of Tomato mottle mosaic virus Chinese isolate. *Virology journal*, 14, 1-9.
- Lotfi, A., Shams-Bakhsh, M., & Yakhchali, B. (2015). Production of polyclonal antiserum against beet western yellows virus coat protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Crop Protection*, 4(5): 739-746.
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., ... & Dombrovsky, A. (2017). A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PloS one*, 12(1): e0170429.
- Mrkvova, M., Hacčinsky, R., Gresíková, S., Kanukova, S., Barilla, J., Glasa, M., ... & Mihálik, D. (2022). Evaluation of new polyclonal antibody developed for serological diagnostics of tomato mosaic virus. *Viruses*, 14(6): 1331.
- Oladokun, J. O., Halabi, M. H., Barua, P., & Nath, P. D. (2019). Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. *Plant Pathology*, 68(9): 1579-1586.
- Phatsaman, T., Hongprayoon, R., & Wasee, S. (2020). Monoclonal antibody-based diagnostic assays for pepper mild mottle virus. *Journal of Plant Pathology*, 102: 327-333.
- Shams-bakhsh, M., & Symons, R. H. (2004). Cloning and expression of the coat protein gene of Barley yellow dwarf virus-PAV in *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2(2): 84-89.

- Salem, N. M., Jewehan, A., Aranda, M. A., & Fox, A. (2023). Tomato brown rugose fruit virus pandemic. *Annual review of phytopathology*, 61(1): 137-164.
- Salem, R., Arif, I. A., Salama, M., & Osman, G. E. (2018). Polyclonal antibodies against the recombinantly expressed coat protein of the Citrus psorosis virus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4): 733-738.
- Salimi, M., Shams-Bakhsh, M., & Safaie, N. (2012). Expression of the tomato yellow leaf curl virus movement protein gene in escherchia coli. *Trakia Journal of Sciences*, 10(3).
- Zhang, S., Griffiths, J. S., Marchand, G., Bernards, M. A., & Wang, A. (2022). Tomato brown rugose fruit virus: An emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide. *Molecular Plant Pathology*, 23(9): 1262-1277.