خالص سازی ،تهیه آنتی سرم و تشخیص سرولوژیکی ویروس‌های Y و X سیب زمینی جدا شده‌از مزارع سیب زمینی استان خوزستان

مسعود شمس بخش[1] ،رضا خاک ور[2]، رضا پوررحیم[3]

ویروس‌های PVY و PVX از مهمترین ویروس‌های بیماری زا در مزارع سیب‌زمینی دنیابه شمار می‌روند. هدف از این تحقیق ،خالص سازی این دو ویروس از گیاهان آلوده به منظور تهیه یک سیستم سرولوژیکی تشخیص سریع می‌باشد.بدین منظور ویروس‌های PVY و PVX ازبوته‌های آلوده مزارع سیب زمینی استان خوزستان جدا و در شرایط گلخانه در گیاه توتون سامسون *Nicotiana tabacum* L.cv. Samsun بطور جداگانه تکثیر شدند.پس از خالص سازی ویروسها،با تزریق آموده‌های (پرپاراسیون‌ها)خالص ویروس به خرگوش ،آنتی‌سرم تهیه شد. علاوه برکاربرد آنتی‌سرم‌های تهیه شده در آزمون‌های مختلف نشت در آگار، ملکول‌های گاماگلوبولین G(IgG)آنتی سرمهای بدست آمده نیزخالص شده و در آزمون‌های الایزا (ELISA) و دیبا(DIBA) به طریق غیرمستقیم بکاربرده شدند. نتایج بدست آمده‌نشان داد که سیستم‌های سرولوژیکی الایزا (ELISA) و دیبا(DIBA)تهیه شده دراین تحقیق آلودگی به دو ویروس PVY و PVX رابه خوبی درگیاهان سیب زمینی تشخیص می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: ویروس Y سیب زمینی ، ویروس X سیب زمینی، الایزا، دیبا

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲- مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- محقق بخش تحقیقات ویروس‌شناسی موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی تهران

دریافت: ۷۹/۷/۲ پذیرش :۸۰/۸/۲۸

مقدمه

ویروس‌های Y (Potato potyvirus Y, PVY) و X (Potato potexvirus X, PVX) سیب زمینی از مهمترین ویروس‌های بیماری‌زای سیب زمینی هستند که‌ازاکثرمناطق زیرکشت این محصول گزارش شده‌اند(۸). در شرایط مناسب برای فعالیت ویروس، PVY میتواند تا ۸۰ درصد وPVX تا ۵۰ درصد محصول سیب زمینی را کاهش دهند(۶). مساعدترین شرایط برای ایجاد خسارت توسط این دو ویروس ،آب و هوای خنک وابری است که منجر به بروز علائم مشخص بیماری ویروسی‌مانند موزائیک ،کوتولگی و چین وچروک شدن برگ می‌شود(۱۳). در صورتی که هوای منطقه آفتابی و دمای محیط بالاتر از ۲۴ درجه سانتی گراد باشدعلی‌رغم ادامه تکثیر ویروس در داخل گیاه و ایجاد خسارت ،بوته‌ها علائم ظاهری بروزنمی‌دهند(۱۲،۱۴). باتوجه به‌اینکه سیب زمینی از طریق غده تکثیر می‌شود،تشخیص و ردیابی ویروس‌ها در غده‌های سیب زمینی به منظور کنترل بیماری‌های ویروسی YوX ازاهمیت بالایی برخوردار است .آلودگی گیاه مادر به این دو ویروس نیزموجب آلوده شدن غده‌های حاصله می‌گردد. بنابراین شناسایی بوته‌های آلوده و حذف آنها نیزمی‌تواند به طور موثری از انتقال ویروس‌ها به نسل بعد جلوگیری کند(۱).

روش‌های سرولوژیکی را می‌توان برای شناسایی سریع و دقیق ویروس در بوته‌ها و ردیابی آنها در غده به کار برد. حساسیت ،دقت، سادگی، کم هزینه بودن و تشخیص تعدادزیادی نمونه دریک زمان محدود از جمله مزایای سیستم‌های شناسایی "الایزا"[1] و"دیبا"[2] است که امروزه از رایج‌ترین روش‌های شناسایی ویروس‌هامحسوب می‌شوند(۱). این سیستم‌ها هم اکنون به صورت کیت‌های[3] آماده توسط شرکت‌های تجاری به بازار عرضه می‌شوند و با افزایش روزافزون سطح زیر کشت محصول سیب زمینی ، استفاده از آنها در داخل کشور رو به افزایش است . با توجه به هزینه بالای تهیه این نوع کیت‌ها و وجود نژادها و جدایه‌های اختصاصی

1-enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA

2-dot immunobinding assay , DIBA

3-Kits

منطقه ،تولید این نوع سیستم‌ها در داخل کشور ضروری بنظر می‌رسد. برهمین اساس در این تحقیق سیستم‌های شناسایی الایزا و دیبا برای دو ویروس PVX و PVY با استفاده از آنتی سرم‌های تولید شده بر علیه جدایه‌هایی از این دو ویروس که از مزارع سیب زمینی استان خوزستان جداسازی شده بودند ،معرفی می‌گردد.

مواد و روشها

الف - منبع ویروس

بوته‌های سیب زمینی آلوده به PVY و PVX جمع آوری شده از مزارع استان خوزستان به عنوان منبع ویروس در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا آلودگی بوته‌ها به ویروس با استفاده از آزمون الایزا بررسی شد. سپس به منظور بدست آوردن جدایه‌های کاملا"خالص و حذف ویروس‌های احتمالی ،براساس نتایج آزمون الایزا نمونه‌های سیب زمینی که فقط به یکی از دو ویروس PVY یا PVX آلوده بودند،انتخاب شدند و عصاره آنها در بافرفسفات [1] ۰/۱مولار بااسیدیته ۷/۲ استخراج و پس از افزودن پودر کاربورالندم به طور جداگانه روی یک گیاه میزبان مناسب که تولید لکه موضعی می‌کرد، مایه زنی شد.برای انجام این کار جدایه‌های PVY روی‌گیاه سلمه‌تره[2] و جدایه‌های PVX روی گیاه گل دکمه‌ای[3] مایه زنی شدند. به منظور تکثیر و نگهداری ویروس‌ها بعد از ۱۴ روز، زخم‌های موضعی ایجاد شده باتیغ استریل جدا و با مقدار بسیار کمی بافرفسفات به طور جداگانه له گردیده و روی برگ‌های توتون سامسون [4] مایه زنی گردیدند.در طول آزمایش دمای گلخانه بین ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت حدود ۴۰ درصد ثابت نگه داشته شد.

1-KH_2PO_4 و K_2HPO_4

2-*Chenopodium quinoa* Wild.

3-*Gomphrena globosa* L.

4-*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun

ب - خالص سازی ویروس‌ها

بعد از آزمایش‌های مقدماتی روی روش‌های مختلف خالص سازی ، روش "مک دونالد و همکاران" (۱۱)باتغییراتی برای خالص سازی هر دو ویروس مناسب تشخیص داده شد. حدود یک صدگرم از بافت برگ‌های جوان توتون‌های آلوده(۲۵ روز بعد از مایه زنی PVY و ۱۵ روز بعد از مایه زنی PVX)برداشت شد و به نسبت یک به دو دربافر فسفات پتاسیم ۰/۵مولار، با pH برابر ۸/۲ که حاوی ۱٪ مرکاپتواتانول (ME - 2) و ۵۰ میلی مولار نمک سدیم ادتآ (اتیلن‌دی آمین تتراستیک اسید، Na۲EDTA) بود هموژنیزه و عصاره آن با فشار دادن در پارچه ململ دو لایه سترون گرفته شد.سپس مقدار $\frac{1}{4}$ حجم کلروفرم قطره قطره به عصاره در حال هم زدن اضافه گردید وعمل هم زدن ۱۵ دقیقه ادامه یافت. آنگاه مخلوط حاصل با نیروی ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از حذف فاز کلروفرم، فاز روئی روی شش میلی لیتر بالشک سوکروز ۳۰٪ در بافر پایه قرارداده شد و به مدت سه ساعت با نیروی ۷۵۰۰۰g سانتریفوژ گردید.رسوب حاصل ابتدا در ۳۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۵ مولار، با pH برابر ۸/۲ حل گردید سپس به میزان سه درصد ،تریتون ایکس - ۱۰۰ به آن اضافه و بمدت یک ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد بهم زده شد . محلول حاصل به مدت ده دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. به منظور رسوب دهی ویروس ، فاز مایع روئی به مدت ۷۵ دقیقه دیگربا نیروی برابر ۱۶۰۰۰۰g سانتریفوژ و رسوب بدست آمده در یک میلی لیتربافر فسفات ۰/۱ مولار با PH برابر ۷/۸ حل شد وآموده (پرپاراسیون) حاصل به آرامی روی ستون شیب چگالی سوکروز ۵۰-۱۰ ٪ اضافه شد و به مدت ۱۵۰ دقیقه با نیروی ۱۰۰۰۰۰g (با استفاده از گردان SW-40 بکمن) سانتریفوژ گردید.سپس ستون شیب چگالی سوکروز در دستگاه ISCO مورد بررسی قرار گرفت و لایه‌های حاوی ویروس جمع آوری شد. سپس با اضافه کردن بافر، آموده رقیق و به مدت یک ساعت با نیروی برابر ۱۶۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله در حجم کمی از بافر فسفات ۰/۱مولار و pH برابر۷/۸ حل و در یخچال نگهداری شد . جهت بررسی غلظت و خلوص ویروس‌های خالص شده، جذب نور هر یک از آموده‌هادر طول موج‌های بین مدل ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکترونفتومتر (مدل Pharmacia UV) اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت ویروسهای

خالص شده در آموده با استفاده از میزان جذب نور، در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ضریب‌های خاموشی[1] تعیین شده برای هر کدام از ویروس‌ها(۷و۹) با استفاده از فرمول‌های معمول محاسبه گردید.

ج - تهیه آنتی سرم

قبل از تزریق اولیه ،از خرگوش‌ها خونگیری و سرم نرمال به عنوان شاهد تهیه شد. سپس آنتی سرم‌های PVY و PVX بعد از دوبار تزریق عضلانی و دوبار تزریق زیرپوستی آموده خالص شده ویروس به خرگوش تهیه گشت .

تزریقات به فواصل یک هفته انجام گرفت و هر بار یک میلی گرم ویروس تزریق می‌گردید. برای هر تزریق، آموده خالص شده ویروس با حجم مساوی از روغن تقویت کننده[2] بصورت امولسیون درمی‌آمد. یک هفته بعد از آخرین تزریق ،خونگیری انجام گرفت. برای تعیین عیار آنتی سرم‌ها از آزمون «رسوب در قطرات ریز» به روش بال(۲) استفاده شد. نتایج بعد از دو ساعت بااسترئومیکروسکپ موردارزیابی قرار گرفت. به منظور خالص سازی IgG آنتی سرم‌ها تهیه شده، از روش بال و همکاران (۴) استفاده گردید.

د - سرولوژی

آزمون نشت در آگار با استفاده از روش توصیفی بال (۳) انجام گرفت. درآزمون نشت یک‌طرفه، قبل از پخش کردن آگار در ظروف پتری، هنگامی که دمای آن در حدود ۵۵ درجه سانتی گراد بود، یک میلی لیتر آنتی سرم تازه تهیه شده به ده میلی لیتر آگار اضافه گردید. آزمون نشت دو طرفه به دو طریق ، همراه با SDS و بدون SDS انجام گرفت. در آزمون نشت یک‌طرفه و نشت دو طرفه با SDS، عصاره گیاه آلوده و سالم به نسبت $\frac{۱}{۲۰}$ با SDS ده درصد مخلوط و سپس در چاهک‌های مختلف ریخته شد. نتایج پس از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت .

1-extinction coefficient

2-Freund's incomplete adjuvant

آنتی بادی متصل‌به آنزیم آلکالین فسفاتاز[1] (GAR) از شرکت سیگما[2] و قرص‌های پارانیتروفنیل فسفات به عنوان ماده زمینه[3] از شرکت سانوفی[4] فرانسه تهیه گردید. به منظور بررسی IgGهای تهیه شده در این تحقیق، IgG تهیه شده از شرکت بیوربا[5] سوئیس به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. کاغذ نیتروسلولز و مواد رنگ آمیزی مورد استفاده در آزمون دیبا شامل بروموکلروایندول فسفات (BCIP)، ان-ان دی متیل فورمائید[6] و نیتروبلوتترازولیوم (NBT) از شرکت بیوربا تهیه شد.

آزمون الایزا به طریق غیر مستقیم و براساس روش "باربارا و کلارک" (۵) انجام گرفت .جهت تعیین رقت مناسب IgG وGAR، برای هردو ویروس طی آزمایش‌های مختلف الایزا از سه رقت $\frac{1}{100}$، $\frac{1}{250}$ و $\frac{1}{1000}$ از IgG های تهیه شده و از چهار رقت $\frac{1}{250}$، $\frac{1}{500}$، $\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{2000}$ از GAR استفاده گردید. در تمام این آزمایش‌ها رقت IgG شاهد، براساس توصیه شرکت سازنده، $\frac{1}{1000}$ بوده است.آزمون دیبا براساس روش توصیفی «لیزاراگا و فرناندس» (۱۰) با اندکی تغییرات انجام گردید.

نتایج و بحث

الف - خالص سازی

آموده خالص شده PVY یک باند و آموده خالص شده PVX دو باند نزدیک به هم در ستون‌های سوکروز تشکیل دادندکه به کمک دستگاه ISCO (با جذب اشعه در طول موج ۲۵۴ نانومتر) قابل شناسایی بودند. بررسی‌های انجام شده با استفاده از آزمون الایزا نشان داد که هر دو باند PVX با آنتی‌سرم تهیه شده از شرکت بیوربا واکنش می‌دهند. این نتایج احتمالاً" نشان دهندهٔ نوعی شکستگی در اکثر پیکره‌های ویروس در یک نقطه خاص می‌باشد که منجر به وجود

1- Goat anti- rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated antiserum,

2-Sigma

3-Substrate

4- Sanofi

5-Bioreba

6-N,N dimethyl formamide

آمدن دو نوع پیکره می‌شود.

طیف جذبی آموده خالص شده هـر دو ویـروس PVY و PVX درناحیه ماوراء بنفش مشخصه ویروس‌هاست.

نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتربه ۲۸۰ نانومتردر آزمایش‌های مختلف برای هر دو ویروس بین ۱/۲ تا ۱/۶ متغیر بود که‌با مقادیر گزارش شده تـوسط مـحققین دیگـربرای ایـن دو ویـروس مطابقت دارد(۹و۷).

میزان ویروس خالص شده برای ویروس Y سیب زمینی ۷۳ میلی گـرم و ویـروس X سـیب زمینی ۴۳ میلی گرم بازاء یک کیلوگرم بافت برگ توتون آلوده تعیین گردید.

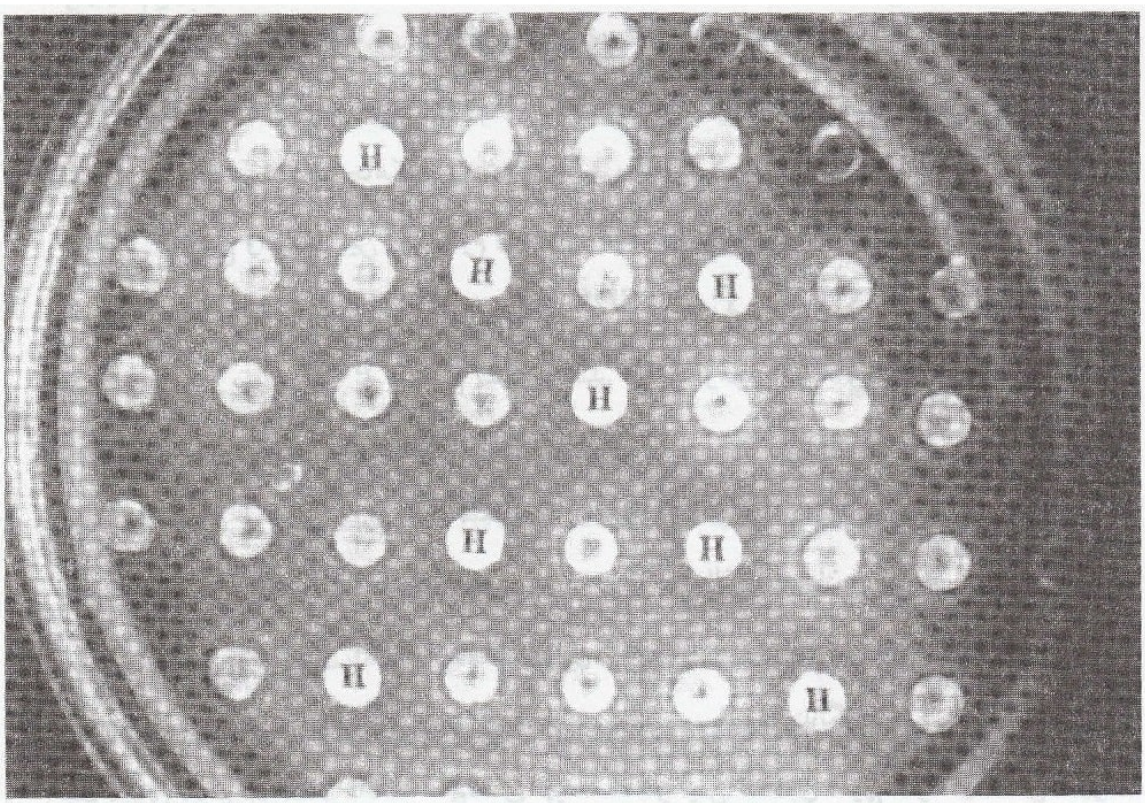
ب - سرولوژی

عیار آنتی سرم‌های تهیه شده در آزمایش رسوب در قطرات ریز ،۱۲۸ برای PVY و ۲۵۶ برای PVX تعیین گردید.آزمون نشت یک‌طرفه در آگار برای هر دو ویروس موفقیت‌آمیز بود و باعث تشکیل رسوب در اطراف چاهک‌هایی شدکه عصاره گیاه آلوده در آنها ریخته شده بود (شکل ۱) در حالی که هیچ واکنشی بین آنتی سرم و عصاره گیاه سالم مشاهده نگردید.

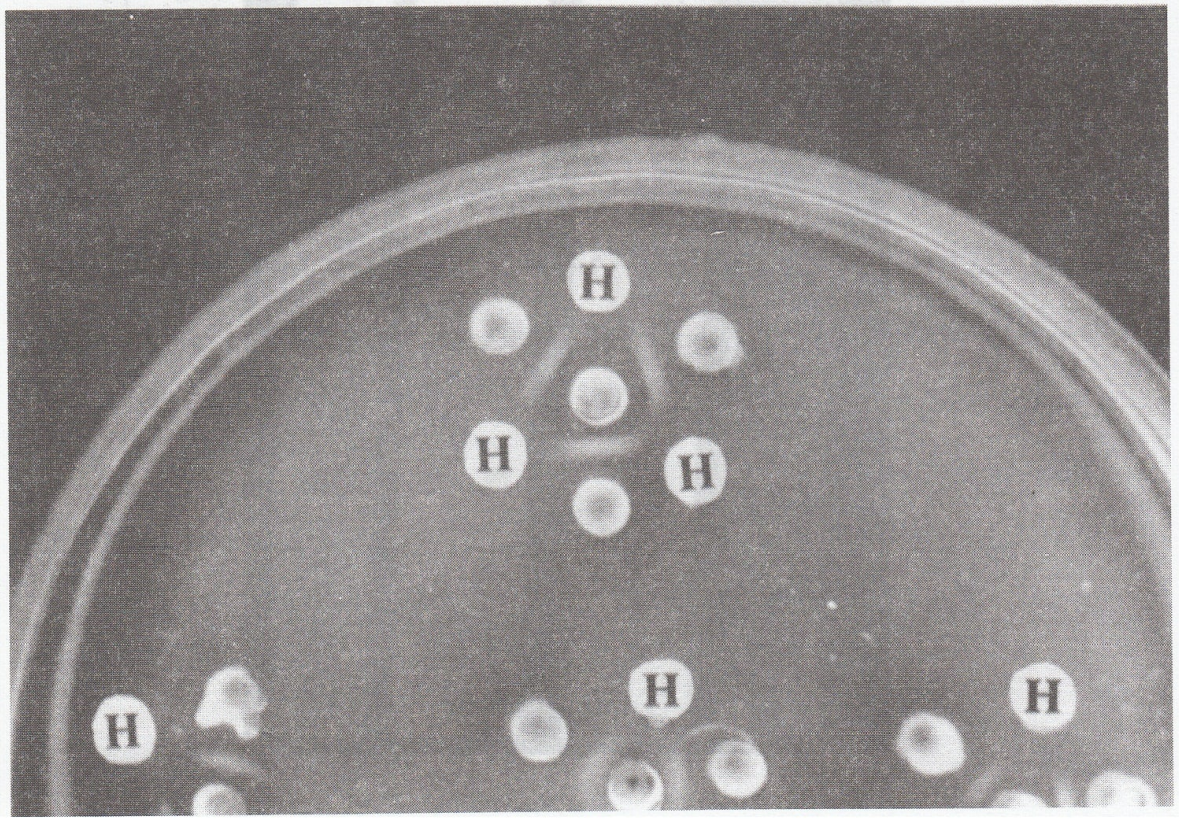
کاربرد آزمون نشت دو طرفه در آگار همراه با SDS در مورد ویروس PVX موفقیت‌آمیزبود، ولی در مورد ویروس PVY رسوبی تشکیل نشد. دراین آزمون آنتی سرم PVXبا عصاره گیاه آلوده دوباند رسوبی نزدیک به هم تشکیل داد(شکل۲).

آزمون نشت دو طرفه در آگار، بدون استفاده از SDS، در تکرارهای متعدد در مورد هیچکدام از ویروس‌های PVY وPVX نتیجه مطلوبی نداد. در آزمون الایزا، میزان جذب نور رقت $\frac{۱}{۱۰۰}$ برای PVY و $\frac{۱}{۲۵۰}$ برای PVX ازگاماگلوبولین تهیه شده در این بررسی تقریبا" معادل مقادیر جذب رقت $\frac{۱}{۱۰۰۰}$ گاماگلوبولین تهیه شده از شرکت بیوربا بود. میانگین جذب نور مربوط به نمونه‌های سالم نیز نشان داد که IgGهای تهیه شده در ایـن تـحقیق هـیچ گـونه واکـنش غـیر اختصاصی با عصاره گیاه سالم نداشت .

پایین‌ترین رقت عصاره گیاه‌آلوده، که آلودگی آن توسط آزمون دیباتشخیص داده شد، $\frac{۱}{۲۵۶}$ برای PVY و $\frac{۱}{۵۱۲}$ برای PVX بود. حساسیت این آزمون به حدی زیاد است که آلودگی را در حد چند نانوگرم ویروس می‌تواند تشخیص دهد. نتایج آزمون دیبا نیز تأئید نمود که گاماگلوبولین

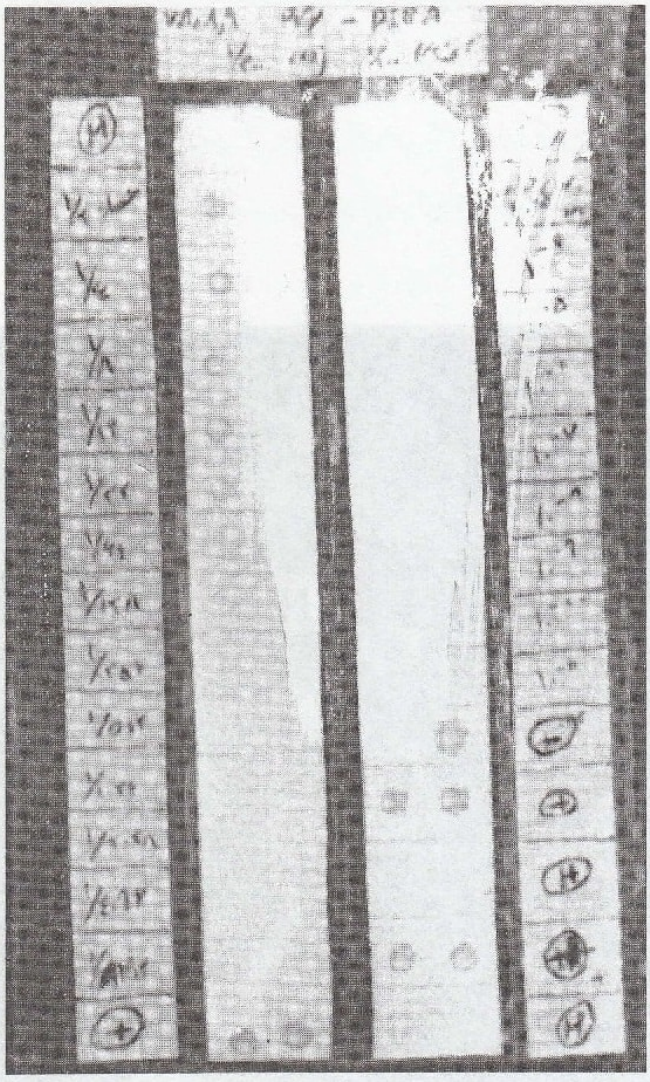


شکل ۱ - واکنش آنتی سرم تهیه شده علیه پیکره‌های ویروس Y سیب زمینی با عصاره گیاه آلوده به PVY و عصاره گیاه سالم (H) در آزمون یک‌طرفه در ژل آگار.



شکل ۲ - واکنش آنتی سرم تهیه شده علیه پیکره‌های ویروس X سیب زمینی با عصاره گیاه آلوده به PVX و عصاره گیاه سالم (H) در آزمون نشت دو طرفه در ژل آگار.

تهیه شده در این تحقیق هیچ گونه واکنش غیر اختصاصی با عصاره گیاه سالم نشان نمی‌داد(شکل ۳).



شکل ۳ - واکنش ایمنی سنجی نقطه‌ای میان آنتی سرم تهیه شده علیه پیکره‌های PVX با عصاره گیاه آلوده (چپ) و آموده خالص PVX (راست). لکه‌های تیره نشانگر واکنش مثبت می‌باشد.

نتایج آزمون‌های مختلف سرولوژی نشان داد که آزمون‌های نشت یک‌طرفه در آگار، الایزا و دیبابرای تشخیص هر دو ویروس قابل استفاده بوده، در حالیکه آزمون نشست دو طرفه درآگار بدلیل رشته‌ای بودن ویروس حتی با اضافه کردن SDS به عصاره گیاه آلوده فقط برای ویروس PVX پاسخ داد و برای تشخیص ویروس PVY مناسب نمی‌باشد.

نتایج حاصل از آزمون‌های نشت یک طرفه درآگار، الایزا و دیبا نشان می‌دهد که IgGهای تهیه شده در این تحقیق قادر به شناسایی دقیق ویروس‌های PVY و PVX در بوته‌آلوده سیب زمینی هستند. آزمون الایزا حساسیت بیشتری نسبت به نشت در آگار و آزمون دیبا حساسیت به مراتب بیشتری نسبت به الایزا برای هر دو ویروس داشت. بنابراین با توجه به دقت، حساسیت، کم هزینه بودن، مصرف کم آنتی سرم، صرفه جویی درزمان وتشخیص هم زمان تعداد زیادی نمونه ،آزمون دیبا جهت شناسایی ویروس‌های فوق پیشنهاد می‌گردد.

از سوی دیگر با توجه به محدودیتی که بدلیل هزینه بالای خرید کیت‌های تشخیص از خارج کشور وجود دارد، تولید و استفاده گسترده از سیستم‌های تشخیص تهیه شده در این تحقیق موجب پایین آمدن هزینه‌های تشخیص بیماری‌های ویروسی می‌گردد که در نهایت موجب کاهش میزان آلودگی مزارع سیب زمینی به این دو ویروس و افزایش عملکرد این محصول می‌شود.

REFERENCES : منابع:

1- AGRIOS , G. N. 1997. Plant Pathology (4th ed.) Academic Press. 814 pp.

2- BALL, E. M. 1990. Microprecipitin and micro - agglutination. pp. 153-160, In: R. Hampton , E. Ball and S. De Boer (eds.) Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens , A Laboratory Manual , APS Press. St. Paul, MN.

3- BALL, E. M. 1990. Agar gel diffusion . pp . 87 - 113, In: R. Hampton , E. Ball and S. De Boer (eds.) Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens , A Laboratory Manual , APS Press. St. Paul, MN.

4- BALL , E. M, HAMPTON , R. O. , De BOER , S. H. and SCHAAD , N. W. 1990 . Polyclonal antibody. pp. 33 - 54, In: R. Hampton , E. Ball and S. De Boer (eds.) Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens , A Laboratory Manual, APS Press. St. Paul, MN.

5- BARBARA, D. J. and CLARK , M. F. 1982. A simple indirect ELISA using F(ab)2 fragment of immunoglobulin. Journal of General Virology. 58:315 - 322.

6- BEEMSTER , A. B. R. and DE BOKX , J. A. 1987 . Survey of properties and symptoms. pp. 84-113, In: J. A. De Bokx and J. P. A Van Der Want (eds.) Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production. Pudoc ,Wageningen, the Netherland.

7- DE BOKX , J. A. and HUTTINGA , H. 1981. Potato virus Y. Descriptions of plant viruses. No. 242. CMI/AAB. Kew, Surrey,

England.

8- HOOKER, W. J. (ed.) 1990. Compendium of Potato Diseases. APS Press. St. Paul, MN. 125 PP.

9- KOENING, R. and LESEMANN, D. E. 1989 . Potato virus X Descriptions of plant viruses . No. 354. CMI/AAB. Kew, Surrey, England.

10- LIZARRAGA , C. and FERNANDEZ - NORTHCOTE, E. N. 1989 . Detection of potato viruses X and Y in sap extracts by a modified indirect enzyme -linked immunosorbent assay on nitrocellulose membrans (NCM - ELISA). Plant Disease. 73:11-14

11 Mc DONALD , J. G., BERERIDGE , I. J. and BANCRAFT , J. B. 1976 . Self -assembly of protein from a flexuous virus . Virology. 69 : 327 - 331 .

12- Mc DONALD, J. G. and KRISTJANSON , G. J. 1993. Properties of strains of potato virus Y in North America . Plant Disease. 77:89.

13- RICH, A. E. 1983. Potato Disease (2nd ed.) Academic Press. 282 pp.

14- SMITH , K. M . 1972. A Text Book of Plant Virus Diseaes. (3rd ed.) Academic Press. 618 pp.

Purification , antiserum preparation and serological identification of potato Y and X viruses isolated from potato fields of Khuzestan province

M. Shamsbakhsh[1], R. Khakvar[2], R. Pourrahim[3]

Key Words : potato Y virus , potato X virus , ELISA and DIBA

SUMMARY

The most important viruses of potato are potato viruses Y and X. The purpose of the present study was to purify PVY and PVX isolated from potato fields of Khuzestan province and to prepare an antiserum against each of them in order to develop a sensitive serological test for diagnosis of these viruses.

Potato Y and X viruses were isolated from potato fields in Khuzestan and propagated in *Nicotiana tabacum* cv. Samsun under greenhouse conditions . Both viruses were purified by a modification of the method of McDonald *et al.*,1976 . Rabbits were used to raise polyclonal antisera against each of the purified viruses.The produced antisera had a titer of 128 for PVY and 256 for PVX in microprecipitin test.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and dot immuno-binding assay (DIBA) systems were developed for both

1-Plant Protection Dept., Shahid Chamran Univ., Ahvaz, Iran

2-Plant Protection Dept., Tabriz Univ., Tabriz , Iran.

3-Plant Virology Dept., Plant Pests and Diseases Research Institute,Tehran,Iran.

viruses, were quite suitable for detecting viruses in infected plants. No reaction was obtained between the antisera and healthy potato sap.