

ارزیابی آزمون تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه در شناسایی ویروس موزاییک کاهو (LMV)

محمد امین الماسی، گلاویژ الماسی*

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۶/۳۰)

Evaluation of loop mediated isothermal amplification assay for identification of *Lettuce Mosaic Virus (LMV)*

Mohammad Amin Almasi, Galavizh Almasi*

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

(Received: Feb. 25, 2017 - Accepted: Sep. 21, 2017)

Abstract

The most common virus affecting lettuce (*Lactuca sativa* L.) in the field worldwide is *Lettuce mosaic virus (LMV)*, belonging to the family *Potyviridae*, genus *Potyvirus*. There are several techniques to detect LMV including serological and molecular assays, but these methods take a long time and requiring sophisticated tools. The aim of this study was to reduce the time required to detect LMV, using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique. Leaf samples (38 samples) with symptoms similar to LMV were collected from Kurdistan province and were subjected to a serological (DAS-ELISA) test and lastly, four samples were detected as the positive samples. Then, total RNA was extracted and one-step reverse transcription (RT)-LAMP was carried out under isothermal conditions and results were evaluated by agarose gel electrophoresis and hydroxynaphthol blue (HNB) dye. A positive result using the HNB dye was a color change in master-mix from the violet to sky blue. In addition, a novel immunocapture (IC)-RT-LAMP assay for rapid and easy detection (without RNA extraction) of LMV was developed here and its potential compared with other assays. The advantages of RT-LAMP method in compare to other methods include the high specificity, high sensitivity, high rapidity, high efficiency, safety, fascinatingly, no requirement of expensive and tools for amplification, no need to RNA extraction (in IC-RT-LAMP assay), no post-amplification treatment of the amplicons, visual detection and user friendly.

Keywords: DAS- ELISA, IC-RT-LAMP, *Lettuce mosaic virus*, RT-LAMP.

چکیده

شایع‌ترین ویروس تأثیرگذار بر کاهو در سراسر مزارع جهان، ویروس موزاییک کاهو (*Lettuce mosaic virus; LMV*) متعلق به خانواده *Potyviridae* و جنس *Potyvirus* 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 موردنیاز جهت تشخیص LMV با استفاده از روش تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (LAMP) بود. نمونه‌های برگی (۳۸ نمونه) با علائم مشابه به ویروس موزاییک کاهو از سطح استان کردستان جمع‌آوری و برای آزمون سرولوژیکی (DAS-ELISA) به‌کارگرفته شدند و در نهایت چهار نمونه مثبت تشخیص داده شد. سپس کل RNA استخراج و واکنش رونویسی معکوس LAMP به صورت یک مرحله‌ای، تحت شرایط هم‌دما انجام شد و نتایج به وسیله 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. علاوه بر این، در اینجا آزمون جدید IC-RT-LAMP جهت تشخیص سریع و آسان LMV (بدون نیاز به استخراج RNA) توسعه داده شد و کارایی آن با آزمون‌های دیگر مقایسه شد. از مزایای روش RT-LAMP در مقایسه با سایر روش‌های پیشین می‌توان به اختصاصیت بالا، حساسیت بالا، سرعت بالا، کارایی بالا، ایمنی، سهولت، عدم نیاز به تجهیزات پرهزینه جهت تکثیر، عدم نیاز به استخراج RNA (در آزمون IC-RT-LAMP)، عدم نیاز به کارهای تشخیصی بعد از تکثیر، تشخیص مشاهده‌ای و کاربرد دوستی آن اشاره کرد.

واژه‌های کلیدی: DAS-ELISA, IC-RT-LAMP, ویروس موزاییک کاهو, RT-LAMP.

مقدمه

کاهو (*Lactuca sativa* L.) به عنوان یکی از قدیمی‌ترین سبزیجات دنیا، گیاهی یک ساله و متعلق به خانواده *Asteraceae* می‌باشد که از حوالی اروپای ساحلی یا آسیای مرکزی به نقاط دیگر جهان منتقل شده است؛ با این وجود گروهی از پژوهشگران معتقدند که هندوستان مبدأ اصلی کاهو می‌باشد (Clewley & Arnold, 1997; Thompson *et al.*, 2002; Kristkova *et al.*, 2008). طبق آخرین آمار سازمان فائو تا سال ۲۰۱۳ سطح زیرکشت کاهو در ایران، ۱۷ هزار هکتار، تولید ۵۶۹ هزار تن و متوسط عملکرد ۳۳/۵ تن در هکتار بوده است (<http://www.fao.org>). از نظر ارزش غذایی، کاهو دارای ویتامین‌های آ، ب، ث و مواد دیگری مانند ید، آهن، فسفر، منیزیم، روی، منگنز و مس بوده و با هدف استخراج روغن از بذر و یا مصرف تازه‌خوری کشت آن صورت می‌گیرد (Drews *et al.*, 1997). این گیاه به دو گروه بزرگ تقسیم می‌شود؛ گروه اول، کاهو پیچ کلمی یا پرک (*capitata*) است که بیشتر در شرایط گلخانه‌ای به صورت کشت هیدروپونیک یا خاکی تولید می‌گردد و گروه دوم، کاهوهای برگ پهن می‌باشند که شامل کاهو برگ (*Crispa*) و کاهو پیچ معمولی (*Longifolia*) معروف به رومن بوده و در فضای باز کشت می‌گردند (Gonnella *et al.*, 2003). یکی از شایع‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های این گیاه، ویروس موزاییک کاهو (*Lettuce mosaic virus*; LMV) از خانواده *Potyviridae* و متعلق به جنس *Potyvirus* می‌باشد که برای اولین بار از فلوریدا گزارش شد (Jagger, 1921). این بیماری در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۴۳ توسط ارشاد از اطراف تهران و ورامین و سپس در شیراز و اصفهان (توسط دانش در سال ۱۳۵۶) و اکثر مناطق تحت کشت این گیاه در فارس (توسط ایزدپناه در سال ۱۳۶۱) گزارش گردید و در حال حاضر در اکثر نقاط ایران شیوع پیدا کرده است (<http://cnnovin.ir/index.php?route=product>)

(/product&product_id=152). این ویروس علاوه بر کاهو، حداقل به ۲۵ جنس از ۱۲ خانواده به عنوان مثال کاسنی (*Asteraceae*)، نخود (*Fabaceae*) و اسفناج (*Chenopodiaceae*) و غیره حمله کرده و خسارت می‌زند (Soleimani *et al.*, 2011). علایم بیماری بسته به نوع رقم، سن گیاه، تغییرات محیطی و زمان آلودگی متفاوت می‌باشد. در ارقام حساس حاشیه برگ‌ها ناهموار و بدشکل شده که در نهایت خشک می‌شوند. چنانچه گیاهانی از بذر آلوده تولید شوند، شدیداً کوتاه شده و برگ حقیقی اولیه آنها شکل نامنظمی همراه با علایم موزاییک پیدا می‌کند. گاهی رگبرگ‌ها روشن‌تر شده و لکه‌های قهوه‌ای در اطراف گلبرگ‌های کوچک ایجاد می‌شوند. اگر آلودگی در اواخر فصل رشد صورت گیرد، گیاه علایم آشکاری از خود نشان نمی‌دهد و تنها ممکن است برگ‌های مرکزی کوچک‌تر گردند. همچنین در دمای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد علایم آلودگی در گیاه مخفی می‌گردد (Bos *et al.*, 1994; Bruckart & Lorbeer, 1975; Candresse *et al.*, 2007). این ویروس به صورت ناپایا توسط برخی از شته‌ها که شته سبز هلو (*Myzus persicae*) از مهمترین ناقلین آن است، فرآیند انتقال بیماری را انجام می‌دهد (Ryder, 1970). همچنین این ویروس به میزان ۳ تا ۱۰ درصد از طریق مکانیکی (توسط بذر) منتقل می‌شود (Bannerot, 1969). پیکره این ویروس رشته‌ای انعطاف‌پذیر، به ابعاد ۷۵۰ × ۱۲ نانومتر و ژنوم آن RNA تک رشته‌ای مثبت (با تقریباً ۱۰ هزار نوکلئوتید) می‌باشد که شامل یک قالب باز خواندنی کدکننده یک پلی پروتئین بزرگ است (Redondo *et al.*, 2001; Krause-Sakate *et al.*, 2002). در رده‌بندی مهمترین عوامل بیماری‌زای گیاهی، ویروس‌ها به عنوان دومین عامل مهم بعد از قارچ‌ها قرار گرفته‌اند که زیان اقتصادی ناشی از آنها بیش از چند میلیارد دلار در سال تخمین زده شده است (Jeong *et al.*, 2014). تشخیص دقیق، اساس مدیریت بیماری‌های گیاهی و اولین گام در جهت

پوشش جغرافیایی این ویروس در جدایه تونس مورد بررسی قرار دادند (Pink *et al.*, 1992). Peypelut *et al.* (2004) به منظور تشخیص جدایه LMV- Most از آزمون RT-PCR استفاده کردند و برای اولین بار وقوع نوترکیبی در این جدایه را گزارش دادند (Peypelut *et al.*, 2004). Notomi *et al.* (2000) روش جدیدی را با نام تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (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 و به‌علت سادگی، سرعت، کارایی بالا و اختصاصیت منحصر به فرد، به‌طور گسترده‌ای مورد توجه پژوهشگران علوم زیستی قرار گرفت و هم‌اکنون امتیاز آن در اختیار شرکت ژاپنی Eiken است (Fukuta *et al.*, 2003; Almasi *et al.*, 2015). در این روش محصول اولیه تشکیل ساختار حلقه (loop) می‌دهد که اسیدنوکلئیک بی‌وقفه از روی این ساختار تکثیر می‌یابد و تشکیل ساختارها و قطعاتی با اندازه‌های مختلف می‌شود که پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز به صورت الگوی نردبانی شکل قابل مشاهده است (Jeong *et al.*, 2014). اگرچه روش LAMP در ایران و جهان برای شناسایی ویروس‌های زیادی مانند *Potato leafroll virus* (PLRV) (Ahmadi *et al.*, 2012b; Almasi *et al.*, 2012b)، *Potato virus Y* (PVY) (Almasi & Dehadadi, 2013)، *Curly top virus* (CTV) (Almasi *et al.*, 2013a)، *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Almasi *et al.*, 2013b)، *Beet curly top virus* (BCTV) (Almasi *et al.*, 2014)، *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (Almasi, 2015) و *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) (Fukuta *et al.*, 2003) به کار گرفته شده است؛ اما از آنجایی که تاکنون کارایی آن در شناسایی ویروس LMV بررسی نشده است، در این پژوهش برای اولین بار ارزیابی روش‌های RT-LAMP و IC-

پیش‌بینی کاهش محصول توسط آلودگی با عوامل بیماری‌زا است. به منظور تشخیص ویروس‌ها، روش‌هایی همچون مشاهده میکروسکوپی، آزمون‌های سرولوژیکی و روش‌های مولکولی به کار گرفته شده‌اند. سیستم تشخیص سرولوژیکی بر پایه اتصال آنتی‌بادی و آنتی‌ژن بنا نهاده شده که یکی از روش‌های معمول و رایج در اکثر آزمایشگاه‌ها است که از انواع آن می‌توان به روش ELISA، TBIA و QCMI اشاره کرد (Torrance, 1998). 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). روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) یکی از این روش‌های جدید است که علیرغم دارا بودن مزیت‌های فراوان با محدودیت‌هایی مانند زمان‌بر بودن، نیاز به تجهیزات گران‌قیمت، استفاده از مواد خطرناکی مانند اتیدوم بروماید و غیره روبرو می‌باشد (Nagamine *et al.*, 2002; Haghazari *et al.*, 2012; Moradi *et al.*, 2011; Ahmadi *et al.*, 2014; Almasi, 2015). در حال حاضر در آنالیزهای فیلوژنتیکی و تعیین تنوع ژنتیکی، از روش‌های مختلفی مانند علایم‌شناسی، دامنه میزبانی، روش‌های سرولوژیکی (DAS-ELISA, TAS-)، روش‌های مولکولی (ELISA, PTA-ELISA, RT-PCR, IC-RT-PCR, RFLP, northern blot) و مقایسه ترادف نوکلئوتیدی جهت تشخیص LMV استفاده شده است (Zerbini *et al.*, 1995; Sakate *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2012; Sharma & Jain, 2012). Pink *et al.* (1992) از روش‌های ELISA و RFLP به منظور تشخیص LMV استفاده کردند و توصیف تنوع زیستی و مولکولی را با انتخاب مجموعه‌ای از جدایه‌های LMV و با توجه به تنوع

مثبت (Bioreba, Suisse, No.160553)، شاهد منفی (Bioreba, Suisse, No.180043) و عصاره‌های نمونه‌های از قبل تهیه شده در چاهک‌ها ریخته شد. لازم به ذکر است به منظور 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 ۶/۵ میلی‌گرم پارانیتروفنیل فسفات را که سوپسترای آنزیم آلکالین فسفاتاز است در ۶/۵ میلی‌لیتر بافر سوپسترا 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 ۴۵ دقیقه تغییر رنگ چاهک‌ها با چشم غیرمسلح بررسی و مشاهده شد.

استخراج RNA کل از برگ‌های آلوده

به منظور ارزیابی روش مولکولی RT-LAMP در تشخیص ویروس LMV و مقایسه آن با روش الایزا، استخراج RNA کل از تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده به روش Rowhani & Stace-Smith (1979)، انجام شد. در پایان مرحله استخراج، رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (سیناژن، ایران) حل شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا قبل از استفاده قرار گرفت.

طراحی آغازگرها

طراحی آغازگرها جهت انجام آزمون‌های مولکولی بر

RT-LAMP بر پایه تشخیص مشاهده‌ای با رنگ هیدروکسی‌نفتول‌بلو (HNB) جهت تشخیص ویروس مذکور انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و انتخاب نمونه‌ها

در نمونه‌برداری‌هایی که از اواخر فصل بهار و اوایل فصل تابستان سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ از سطح مزارع کاهوکاری استان کردستان صورت گرفت، تعداد ۳۸ نمونه برگ از گیاهان با علائم آلودگی ویروسی شامل موزاییک، زردی، کوتولگی، کاهش رشد، بدشکلی و پیچیدگی برگ‌ها و عدم تولید تاج طبیعی 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.

آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA

جهت بررسی وجود آلودگی ویروسی در نمونه‌ها، آزمون الایزا (ELISA) با استفاده از آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای LMV (Bioreba, Suisse, No.160512, Clark No.160522) و بر اساس روش توصیفی Clark and Adam به روش ساندویچ دو طرفه آنتی‌بادی (DAS-ELISA) انجام شد. در ابتدا مقدار ۰/۱ گرم از نمونه برگ در هاون چینی با یک میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری، عصاره‌گیری و عصاره حاصل تا زمان ریختن در چاهک‌های پلیت در یخچال نگهداری شد. سپس IgG موردنظر به نسبت توصیه شده توسط کمپانی سازنده (۱/۱۰۰۰) در بافر پوششی رقیق و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر 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

(۱ تا ۱۵ واحد) و $MgSO_4$ (۰/۱ تا ۰/۱۵ میلی‌مولار) بهینه و انجام شد. پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش، واکنش RT-LAMP به‌طور همزمان و یک مرحله‌ای با استفاده از RNA به عنوان الگو و در یک لوله بر روی نمونه‌ها انجام شد. ابتدا ۰/۲ میلی‌مولار RNA کل در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه قرار داده و بعد از اتمام، لوله‌ها بلافاصله بر روی یخ قرار داده شد و واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۰۸ میلی‌مولار dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۰۵ میلی‌مولار DDT، ۰/۰۲ میلی‌مولار RNasin (Fermentas, USA, No.EO0381)، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر پسر (B)، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر پیشرو (F)، ۰/۵ میلی‌مولار Buffer RT (5X)، ۲ واحد آنزیم AMV RT پلیمرز (Fermentas, USA, No.EP0641)، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر FIP، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر BIP، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر F3، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر B3، ۰/۰۵ میلی‌مولار بتاین، ۰/۰۵ میلی‌مولار $MgSO_4$ ، ۰/۱ میلی‌مولار رنگ HNB (Lemongreen, China)، ۰/۱ میلی‌مولار Buffer Bst (10X) و ۴ واحد آنزیم Bst DNA پلیمرز (New England Biolabs, UK)، در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در یک بلوک حرارتی ادامه یافت. به محض اتمام واکنش لوله‌ها خارج گشت و تغییر رنگ حاصل از واکنش مثبت مشاهده شد. همچنین ۵ میکرولیتر از محصول در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با دستگاه Gel documentation مدل Bio-Doc (Biometra, Germany) بررسی شد.

اساس ژن پوشش پروتئینی (CP) ویروس موردنظر (با شماره شناسایی Genbank: U24669.1) و با استفاده از نرم افزار برخط PrimerExplorer V5 صورت گرفت (<https://primerexplorer.jp/e>). جدول ۱ مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای LMV را نشان می‌دهد.

همان‌طور که مشاهده می‌گردد مجموعه‌ای از چهار آغازگر که شش ناحیه از ژن هدف را شناسایی می‌کنند، در واکنش RT-LAMP فعالیت دارند. این آغازگرها عبارتند از دو آغازگر داخلی پیشرو (FIP) و پسر (BIP) و نیز دو آغازگر خارجی پیشرو (F3) و پسر (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 به هم متصل می‌کند. گاهی اوقات در برخی از موارد طراحی آغازگرها با استفاده از نرم افزار، امکان طراحی آغازگرهای حلقوی (LF و LB) نیز وجود دارد که این بستگی به طول قطعه انتخاب شده از ژن هدف و فاصله بقیه آغازگرها از همدیگر دارد (Haghnazari *et al.*, 2011; Nagamine *et al.*, 2002).

آزمون RT-LAMP

قبل از شروع واکنش، اقدام به بهینه‌سازی شرایط و برخی از مواد تأثیرگذار بر واکنش RT-LAMP با استفاده از نمونه شاهد مثبت گردید. به همین جهت واکنش در دما (۵۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان (۱۰ تا ۱۲۰ دقیقه) متفاوت و نیز غلظت‌های مختلفی از موادی مانند بتاین (۰/۰۵ تا ۱۰ میلی‌مولار)، dNTP (۰/۰۱ تا ۰/۱۵ میلی‌مولار)، آنزیم Bst DNA پلیمرز

جدول ۱. آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن پوشش پروتئین ویروس LMV

Primer	Position	Length	Sequence (5-3)
F3	197-220	24 nt	TTTAAACCTTGATCATTTGCTGGA
B3	425-448	24 nt	ATGGGTTTTAGAGCATATTCTACT
FIP (F1c and F2)	286-305 and 245-264	45 nt	GTCATTCTTAACCCCGTCGTTTTTTAT CGAACACACGTGCAACCC
BIP (B1c and B2)	328-347 and 375-384	45 nt	TGCAATTAATTCTTAACGGATTTTTCC ATTATATTCGGGGATGT

آزمون IC-RT-LAMP

با پوشش پلاستیکی استریل پوشیده شد. به محض اتمام واکنش تغییر رنگ حاصل از واکنش مثبت مشاهده شد. همچنین ۵ میکرولیتر از محصول در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و بررسی شد.

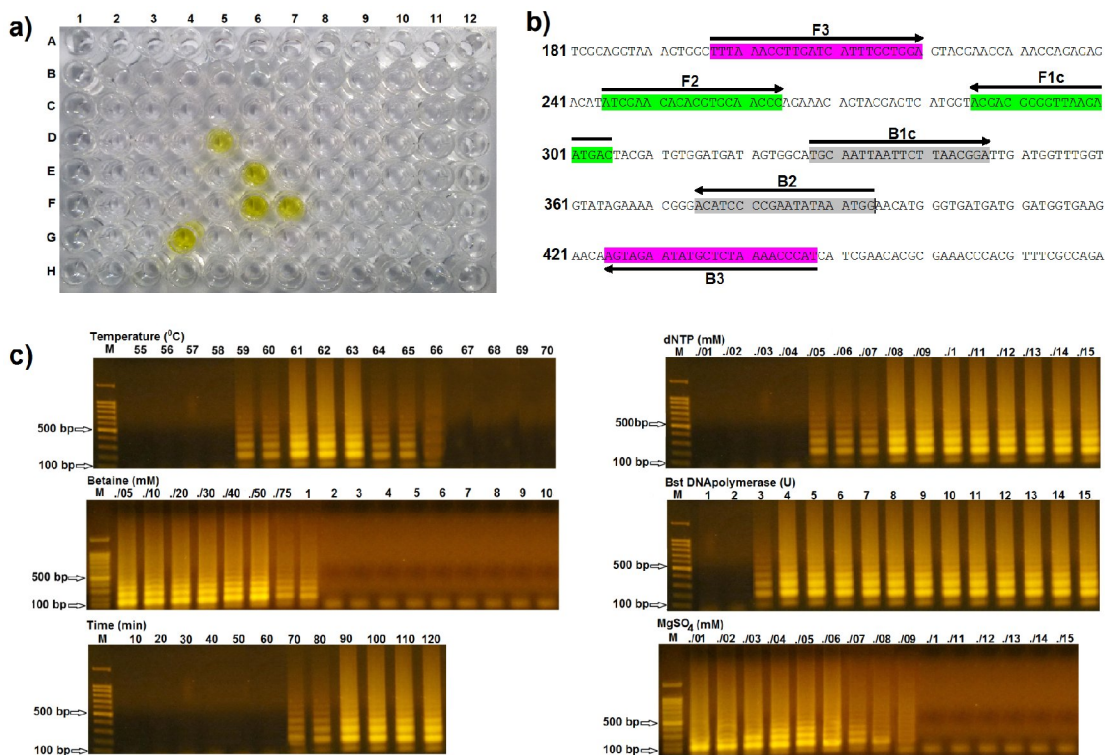
بررسی حساسیت و اختصاصیت آزمون‌ها

به منظور مقایسه و ارزیابی حساسیت آزمون‌های به کار گرفته شده در تشخیص LMV، رقت‌هایی (از 10^1 تا 10^7) از عصاره یکی از نمونه‌های مثبت تشخیص داده شده، تهیه شد و آزمون‌های DAS-ELISA، RT-LAMP و IC-RT-LAMP بر اساس آن انجام شد. همچنین به منظور تعیین اختصاصیت روش‌های مذکور، تمامی روش‌ها با ویروس‌های PLRV (Almasi *et al.*, 2012b)، PVY (Almasi & Dehadadi, 2013)، CTV (Almasi *et al.*, 2013a)، TYLCV (Almasi *et al.*, 2013b)، BCTV (Almasi *et al.*, 2014)، GFLV (Almasi, 2015)، AMV (Almasi, 2016) و BNYVV (Almasi & Almasi, 2016) نیز انجام شدند.

نتایج و بحث

در آزمون سرولوژیک الایزا، آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع کاهو استان کردستان به ویروس موزاییک کاهو 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 کاهو نشان داد که از ۳۸ نمونه جمع‌آوری شده تعداد ۴ نمونه ($10/5$ درصد) به این ویروس آلوده بودند که بر اساس شماره‌ای که از قبل اختصاص داده شده بود با نام‌های LMV18 (از شهر سنندج)، LMV21 (از شهر کامیاران)، LMV28 و LMV29 (از شهر سقز) نامگذاری شدند (شکل ۱a).

آزمون IC-RT-LAMP ترکیبی از دو روش الایزا (ELISA) و RT-LAMP است که در آن نیازی به استخراج اسید نوکلئیک (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 (Bioreba, Suisse, No.160553)، شاهد منفی (Bioreba, Suisse, No.180043) و عصاره‌های نمونه‌های جمع‌آوری شده در چاهک‌ها ریخته شد. پلیت موردنظر به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مرحله دوم (در روز بعد) مشابه روش RT-LAMP انجام می‌شود به این صورت که پلیت شسته شده و این بار پس از خشک کردن کامل، مخلوطی از مواد واکنش RT-LAMP در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر حاوی ۰/۰۸ میلی‌مولار dNTP (سیناژن، ایران)، ۰/۰۵ میلی‌مولار DDT، ۰/۰۲ میلی‌مولار RNasin (Fermentas, USA, No.E00381)، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر پسر (B)، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر پیشرو (F)، ۰/۵ میلی‌مولار Buffer RT (5X)، ۲ واحد آنزیم AMV RT پلیمراز (Fermentas, USA, No.EP0641)، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر FIP، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر BIP، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر F3، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر B3، ۰/۰۵ میلی‌مولار بتاین، ۰/۰۵ میلی‌مولار $MgSO_4$ ، ۰/۱ میلی‌مولار رنگ HNB (Lemongreen, China)، ۰/۱ میلی‌مولار Buffer Bst (10X) و ۴ واحد آنزیم Bst DNA پلیمراز (New England Biolabs, UK) به پلیت اضافه شد و در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در یک بلوک حرارتی جهت انجام واکنش قرار داده شد. به منظور جلوگیری از تبخیر در نمونه‌ها، چاهک‌های حواشی پلیت با آب استریل پر و روی پلیت



شکل ۱. (a) نتایج آزمون الایزا. چاهک 7F: نمونه شاهد مثبت، چاهک 7G: نمونه شاهد منفی، چاهک‌های 4G، 5D، 6E و 6F به ترتیب: نمونه‌های LMV18، LMV21، LMV28 و LMV29 هستند. (b) موقعیت قرارگیری آغازگرهای طراحی شده بر روی ژن هدف (پوشش پروتئین). (c) نتایج حاصل از بهینه سازی واکنش RT-LAMP: P: نمونه شاهد مثبت، N: نمونه شاهد منفی و M: مارکر ۱۰۰bp هستند.

بعد از طراحی آغازگرها که موقعیت قرارگیری آنها بر روی ژن هدف در شکل ۱b نشان داده شده است، اقدام به بهینه سازی واکنش شد. نتایج حاصل از چند در دمای ۵۹ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد تکثیر صورت می‌گیرد اما دمای بهینه برای انجام واکنش از ۶۱ تا ۶۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و الگوی نردبانی شکل بهتری دیده شد و از دمای ۶۴ تا ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مرور واکنش کمتر می‌شود تا اینکه در دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد و بالاتر واکنش متوقف می‌شود (شکل ۱c). این ویژگی ناشی از دمای فعالیت آنزیم *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA پلیمرز می‌باشد. دمای بهینه فعالیت آنزیم همواره بین ۶۰ تا ۶۳ درجه سانتی‌گراد گزارش شده

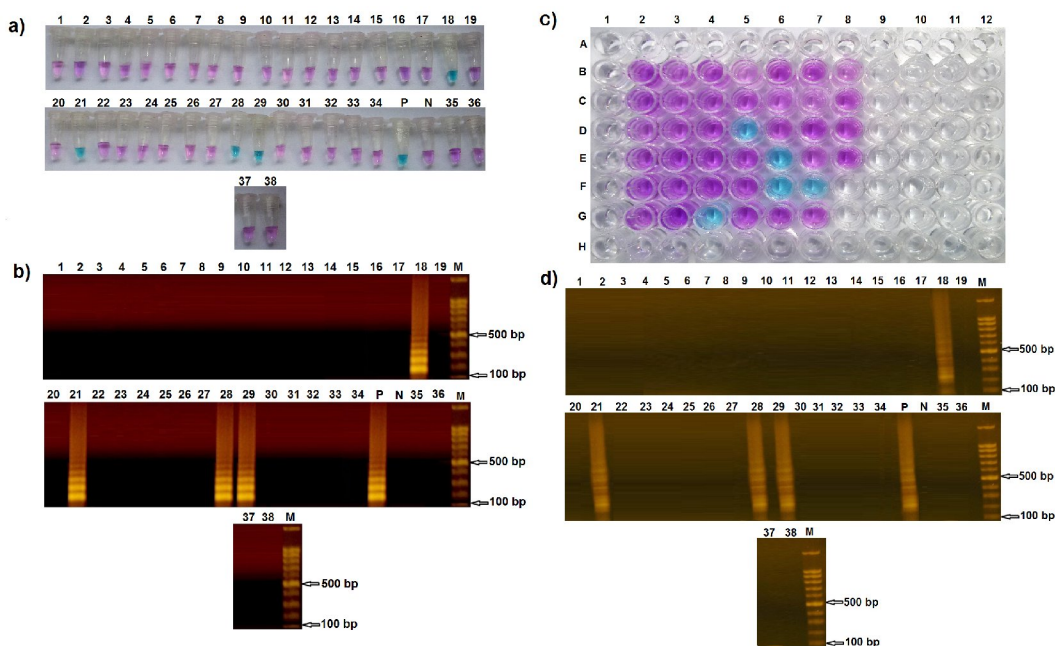
در بین مناطق نمونه‌برداری شده، بیشترین آلودگی مربوط به شهر سقز بود، با این وجود آلودگی در شهر سنندج و کامیاران نیز مشاهده گردید اما هیچ آلودگی به ویروس LMV در سایر مناطق نمونه‌برداری شده مشاهده نگردید. این نتایج نشان از گسترش ویروس در سطح استان در چند سال گذشته دارد و یکی از علل آن استفاده از بذور آلوده به ویروس توسط کشاورزان منطقه می‌باشد. در روش الایزا، علیرغم عدم نیاز به استخراج RNA و دقت بالای تشخیص که ناشی از اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن است، باید اشاره کرد که این روش دارای محدودیت‌هایی مانند هزینه بالای تهیه آنتی‌سرم، زمان‌بر بودن و نیاز به دقت بالا در انجام مراحل است.

و با همدیگر در تولید محصول عمل می‌کنند، امکان تولید قطعات غیراختصاصی در این واکنش وجود نداشته و بنابراین تشخیص مشاهده‌ای و الگوی نردبانی تأییدی مطمئن در واکنش RT-LAMP هستند (Nagamine *et al.*, 2002; Almasi *et al.*, 2013e). تنها سختی انجام روش RT-LAMP، نیاز به استخراج RNA می‌باشد، بنابراین پژوهشگران جهت غلبه بر آن اقدام به استفاده از مزیت روش الیزا (عدم نیاز به استخراج RNA) و ترکیب کردن دو روش الیزا و RT-LAMP کردند و روشی نوین با نام IC-RT-LAMP را ایجاد نمودند که در برگ‌برنده مزایای هر دو روش بود (Almasi & Dehabadi, 2013; Almasi *et al.*, 2013c; Almasi & Almasi, 2016). در پژوهش حاضر این روش جهت تشخیص ویروس LMV به‌کارگرفته شد و با دو روش قبلی مقایسه و ارزیابی گردید. همان‌طور که در شکل ۲c مشاهده می‌گردد، IC-RT-LAMP نیز مانند دو روش قبلی توانست به‌طور موفقیت‌آمیزی نمونه‌های آلوده به ویروس را شناسایی کند. جهت اطمینان از صحت واکنش، نتایج بر روی ژل آگارز نیز مشاهده و تأیید شد (شکل ۲d). در این روش به دلیل اینکه واکنش به صورت مستقیم و با استفاده از عصاره گیاهی انجام شده است، الگوی نردبانی در مقایسه با حالتی که استخراج RNA صورت می‌گیرد (RT-LAMP) کمی متفاوت‌تر می‌باشد. جدول ۲ نتایج مقایسه و ارزیابی هر سه روش انجام شده در تشخیص LMV را نشان می‌دهد.

نتایج آزمون حساسیت نشان داد که دو روش RT-LAMP و IC-RT-LAMP، ۱۰۰ برابر (۱۰^۲) حساس‌تر از روش DAS-ELISA هستند (شکل ۳a) ولی با این وجود هر سه روش در تشخیص LMV به صورت اختصاصی عمل می‌کنند و اختصاصیت صددرصدی دارند (شکل ۳b).

است و در دمای بالای ۶۵ درجه سانتی‌گراد آنزیم غیرفعال می‌شود (Notomi *et al.*, 2000; Boubourakasa *et al.*, 2009; Almasi *et al.*, 2013f). همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده غلظت بهینه مواد مؤثر در واکنش مانند بتایین، dNTP، MgSO₄ و آنزیم به‌ترتیب ۰/۰۵ میلی‌مولار، ۰/۰۸ میلی‌مولار، ۰/۰۵ میلی‌مولار و ۴ واحد به‌دست آمد (شکل ۱c). در رابطه با زمان واکنش مشخص شد که واکنش از زمان ۷۰ دقیقه شروع می‌شود ولی برای تکمیل فرآیند تکثیر نیاز به زمانی بالغ بر ۹۰ دقیقه است (شکل ۱c). علت این امر به یک مرحله‌ای بودن واکنش RT-LAMP برمی‌گردد. در این واکنش ۶۰ دقیقه اول صرف واکنش رونویسی معکوس (RT) می‌گردد که همراه با فعالیت آنزیم AMV RT پلیمرز است و ۳۰ دقیقه نهایی مربوط به انجام واکنش LAMP و فعالیت آنزیم Bst DNA پلیمرز می‌باشد. بعد از آزمون بهینه‌سازی، واکنش RT-LAMP با استفاده از RNA استخراجی تمامی نمونه‌ها به عنوان الگو انجام شد و واکنش مثبت با خارج کردن لوله‌ها و مشاهده تغییر رنگ از بنفش به آبی آسمانی تأیید شد (شکل ۲a). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تشخیص مشاهده‌ای با استفاده از رنگ HNB، نیاز به استفاده از دستگاه‌های گران قیمت (مانند ژل داگ و الکتروفورز) و مواد خطرناک (ایتیدیم 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; Almasi, 2016). 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 ۲b).

در این روش نیز مانند الیزا از بین ۳۸ نمونه جمع‌آوری شده ۴ نمونه مثبت شناسایی شد. از آنجایی که آغازگرهای طراحی شده اختصاصی هستند



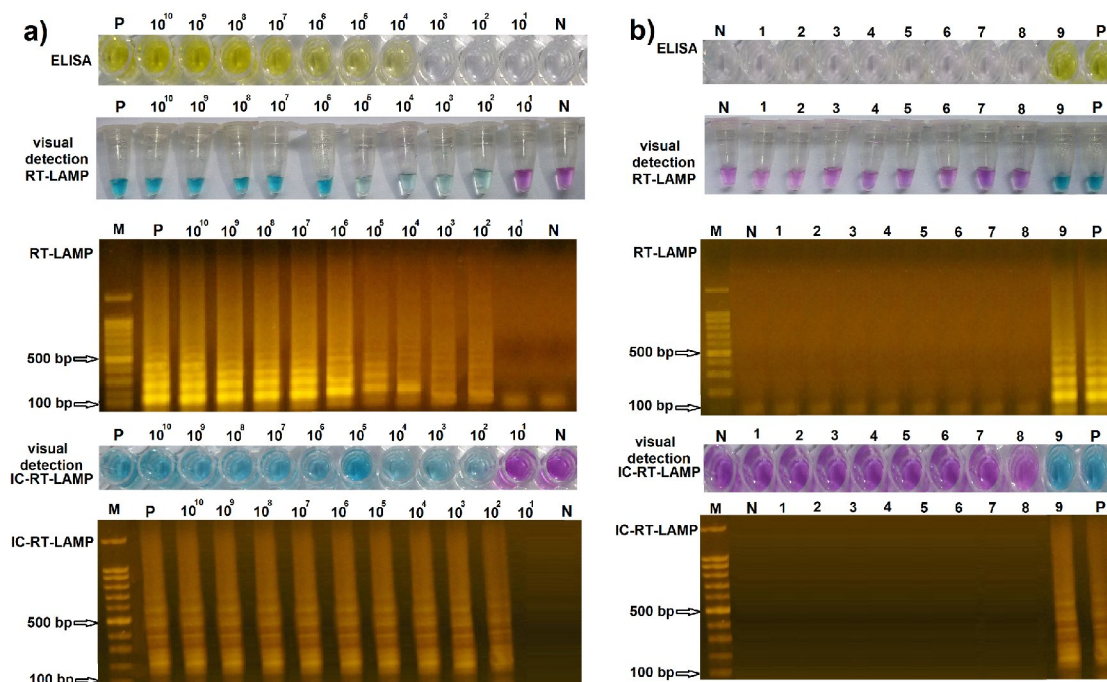
شکل ۲. نتایج حاصل از ارزیابی روش‌های مختلف آزمون LAMP (a) نتایج حاصل از اضافه کردن رنگ HNB در آزمون RT-LAMP (b) نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل آگارز در آزمون RT-LAMP (c) نتایج حاصل از اضافه کردن رنگ HNB در آزمون IC-RT-LAMP (d) نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل آگارز در آزمون IC-RT-LAMP. خطوط و لوله‌های ۱۸، ۲۱، ۲۸ و ۲۹ به ترتیب: نمونه‌های LMV18، LMV21، LMV28، LMV29 و P: نمونه شاهد مثبت، N: نمونه شاهد منفی، چاهک 7F: نمونه شاهد مثبت، چاهک 7G: نمونه شاهد منفی، چاهک‌های 4G، 5D، 6E و 6F به ترتیب: نمونه‌های LMV18، LMV21، LMV28 و LMV29، M: مارکر ۱۰۰ bp هستند.

جدول ۲. مقایسه آزمون‌های مختلف به‌کارگرفته شده در تشخیص ویروس LMV با همدیگر

Assay	Detection method	Safety	Apply UV ray	Apply detect instruments	Cost	User Friendly	Need to RNA extraction
DAS-ELISA	Visual	Yes	No	Yes	High	Low	No
RT-LAMP	Gel Electrophoresis	No	Yes	Yes	Low	high	Yes
IC-RT-LAMP	Gel Electrophoresis	No	Yes	Yes	High	Very high	No
Colorimetric RT-LAMP	Visual	Yes	No	No	Very low	high	Yes
Colorimetric IC-RT-LAMP	Visual	Yes	No	No	High	Very high	No

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 قطعه تکثیر شده قابلیت توالی‌یابی ندارد و جهت تکثیر آن نیاز به طراحی چندین آغازگر می‌باشد و ثالثاً ممکن است جدایه‌های ویروس قابل ردیابی نباشند (Suzuki *et al.*, 2006; Moradi *et al.*, 2013d).

در کل می‌توان گفت که روش LAMP به دلیل ویژگی‌های ممتاز خود از جمله سادگی، سرعت، ایمنی، اختصاصیت بالا، حساسیت بالا و هزینه پایین تاکنون توانسته از جایگاه برتری در مقایسه با دیگر روش‌های تشخیصی برخوردار شود (Boubourakasa *et al.*, 2009; Alamsi *et al.*, 2012a). با وجود تمامی مزایای ذکر شده برای این روش، باید گفت که این



شکل ۳. (a) نتایج مقایسه حساسیت آزمون‌های مختلف در رقت‌های مختلف (از 10^{10} تا 10^1) (b) نتایج مقایسه اختصاصیت آزمون‌های مختلف. چاهک، خطوط و لوله‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ به ترتیب: نمونه‌های AMV، GFLV، BCTV، TYLCV، CTV، PVY، PLRV، BNYVV و LMV. P: نمونه شاهد مثبت، N: نمونه شاهد منفی و همچنین M: مارکر ۱۰۰bp هستند.

جهادکشاورزی استان کردستان برای فراهم آوردن امکانات این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و مدیریت

REFERENCES

- 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. *J. Phytopathol.* 161: 120-124.
- Almasi MA (2015) Establishment and Application of a Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Grapevine fanleaf virus*. *Mol. Biol.* 4: 5.
- Almasi MA (2016) Tracking and identification of Alfalfa mosaic virus (AMV) by loop mediated isothermal amplification assay. *Crop Biotech.* 14: 73-84.
- Almasi MA, Aghapour-Ojaghkandi M, Aghaei S (2013) Visual detection of *Curly top virus* by the colorimetric loop-mediated isothermal amplification. *J. Plant Pathol. Microb.* 4: 198.
- Almasi MA, Aghapour-ojaghkandi M, Bagheri K, Ghazvini M, Hosseyni-dehabadi SM (2015) Comparison and evaluation of two diagnostic methods for detection of npt II and GUS genes in *Nicotiana tabacum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175: 3599-3616.
- 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. Arch. Virol. doi:10.1007/s00705-016-3116-0
- Almasi MA, Dehabadi SH (2013) Colorimetric immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the *Potato virus Y*. J. Plant Pathol. Microb. 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. J. Plant Pathol. Microb. 4: 185.
- Almasi MA, Erfanmanesh M, Jafary H, Hosseindehabadi SM (2013) Visual detection of *Potato leafroll virus* by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA with the Genefinder™ dye. J. Virol. Methods 192: 51-54.
- Almasi MA, Haghazari A, Moradi A, Saberfar E (2012) Different methods of RT-LAMP for detection of potato leaf roll virus (PLRV). Gen. Engineer. Biosafety J. 1: 1-8.
- Almasi MA, Hosseini-Dehabadi SM, Aghapour-Ojaghkandi M (2014) Comparison and evaluation of three diagnostic methods for detection of *Beet curly top virus* in sugar beet using different visualizing systems. Appl. Biochem. Biotechnol. 173: 1836-1848.
- Almasi MA, Jafary H, Moradi A, Zand N, Ojaghkandi MA, Aghaei S (2013) Detection of coat protein gene of the *Potato leafroll virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. J. Plant Pathol. Microb. 4: 156.
- Almasi MA, Moradi A, Nasiri J, Karami S, Nasiri M (2012) Assessment of performance ability of three diagnostic methods for detection of *Potato leafroll virus* (PLRV) using different visualizing systems. Appl. Biochem. Biotechnol. 168: 770-784.
- Almasi MA, Moradi A, Ojaghkandi MA, Aghaei S (2013) Development and application of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. J. Plant Pathol. Microb. 4: 177.
- Almasi MA, Ojaghkandi MA, Hemmatabadi A, Hamidi F, Aghaei S (2013) Development of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the *Tomato yellow leaf curl virus*. J. Plant Pathol. Microb. 4: 153.
- Bannerot H, Bouldard L, Marrou JE, Duteil M (1969) Study of the inheritance of tolerance to *Lettuce mosaic virus* in the variety Gallega de Invierno. Ann. Phytopathol. 1: 219-226.
- Bos L, Huijberts N, Cuperus C (1994) Further observation on variation of *Lettuce mosaic virus* in relation to lettuce (*Lactuca sativa*), and a discussion of resistance terminology. Eur. J. Plant Pathol. 100: 293-314.
- Bruckart WL, Lorbeer JW (1975) Recent occurrences of cucumber mosaic, lettuce mosaic and broadbean wilt viruses in lettuce and celery fields in New York. Plant Dis. Repr. 59: 203-206.
- Candresse T, Lot H, German-Retana S, Krause-Sakate R, Thomas J, Souche S, Delaunay T, Lanneau M, Le Gall O (2007) Analysis of the serological variability of *Lettuce mosaic virus* using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance technology. J. Gen. Virol. 88: 2605-2610.
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- Clewley JP, Arnold C (1977) The multiple alignment module of LASERGENE. Methods Mol. Bio. 70: 119-129.

- Dreus M, Schonhof I, Krumbein A (1997) Contents of minerals, vitamins and sugars in Iceberg lettuce (*Lactuca sativa* var capitata L.) grown in greenhouse, dependent on cultivar development stage. *Gartenbauwissenschaft*. 62: 65-72.
- Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y (2003) Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Arch. Virol*. 148: 1713-1720.
- Gonnella M, Conversa G, Santamarina P, Serio F (2003) Yield and quality of lettuce grown in floating system using different sowing density and plant spatial arrangements. *Acta Hort*. 614: 687-692.
- Haghnazari A, Almasi MA, Hoseini SM (2011) LAMP and guide of primer design by PrimerExplorerV4 software. Azarkelk press, Zanjan, Iran.
- Hosseini SF, Almasi MA, Kardi MT, Moghim S, Karbasizade V (2014) Molecular Detection of *Clostridium Difficile* in Patients with Diarrhea via LAMP Technique. *J. Mazandaran Univ. Med. Sci*. 24: 36-42.
- Jagger ICA (1921) A transmissible mosaic disease of lettuce. *J. Agric. Res*. 20: 741-737.
- Jeong J, Ju H, Noh J (2014) A review of detection methods for the plant viruses. *Res. Plant Dis*. 20: 173-181.
- Krause-Sakate R, Le Gall O, Fakhfakh H, Peypelut M, Marrakchi M, Varveri C, Pavan MA, Souche S, Lot H, Zerbini FM, Candresse T (2002) Molecular and biological characterization of *Lettuce mosaic virus* isolates reveals a distinct and widespread type of resistance breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology* 92: 563-572.
- Kristkova E, Dolezalova I, Lebeda A, Vinter V, Novotna A (2008) Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Hort. Sci*. 35: 113-129.
- 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*. *J. Appl. Microbiol*. 116: 942-954.
- Moradi A, Nasiri J, Abdollahi H, Almasi M (2012) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Erwinia amylovora* based on chromosomal DNA. *Eur. J. Plant Pathol*. 133: 609-620.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T (2002) Accelerated reaction by loop mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes*. 16: 223-229.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 28 :e63.
- Pereira LS, Chaves ALR, Azevedo Filho JA, Colariccio A (2012) *Lettuce mosaic virus* indexation in seeds and seedlings of lettuce genotypes. *Rev. bras. sementes* 34: 628-635.
- Peypelut M, Krause-Sakate R, Guiraud T, Pavan MA, Candresse T, Zerbini FM, Le Gall O (2004) Specific detection of lettuce mosaic virus isolates belonging to the "Most" type. *J. Virol. Methods* 121: 119-124.
- Pink DAC, Kostova D, Walkey DGA (1992) Differentiation of pathotypes of *Lettuce mosaic virus*. *Plant Pathol*. 41: 5-12.
- Redondo E, Krause-Sakate R, Yang SJ, Lot H, Le Gall O (2001) *Lettuce mosaic virus* pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol. Plant Microbe. Interact*. 14: 804-810.
- Rowhani A, Stace-Smith R (1979) Purification and characterization of potato leafroll virus. *Virology*. 98: 45-54.
- Ryder EJ (1970) Inheritance of resistance

- to common lettuce mosaic. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 95: 378-379.
- Sakate KR, Fakhfakh H, Peypelut M, Pavan MA, Zerbini FM, Marrakchi M, Candresse T, Le Gall O (2004) A naturally occurring recombinant isolate of *Lettuce mosaic virus*. Arch. Virol. 149: 191-197.
- Sharma P, Jain RK, Saha S, Kalia P (2013) First report of *Lettuce mosaic virus* infecting *Lactuca sativa* in India. Plant Dis. 97: 849.
- Soleimani P, Mossahebi GH, Koochi Habibi M (2011) Identification of some viruses causing mosaic on lettuce and characterization of *Lettuce mosaic virus* from Tehran Province in Iran. Afr. J. Agric. Res. 6: 3029-3035.
- 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. J. Virol. Methods 132: 216-221.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Curr. Protoc. Bioinformatics. doi: 10.1002/0471250953.bi0203s00
- Torrance L (1998) Developments in serological methods to detect and identify plant viruses. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 52: 27-32.
- Zerbini FMT, Koike S, Gilbertson R (1995) Biological and molecular characterization of *Lettuce mosaic potyvirus* isolates from the Salinas Valley of California. Phytopathology 85: 746-752.