نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹، ص ۳۹۰-۳۸۵

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 4, Winter 2011, p. 385-390

ردیابی و شناسایی نژاد PVY^{NTN} در مزارع سیب زمینی استان خراسان رضوی

سمیه مجدآبادی فراهانی[1*]- بهروز جعفرپور[2]- ماهرخ فلاحتی رستگار[3]- محمدعلی سبک خیز[4]

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۲۰

چکیده

نژاد PVY^{NTN} باعث ایجاد بیماری لکه حلقوی نکروتیک غده سیب زمینی (PTNRD) [5] می‌شود. این نژاد زیر گروه نژاد نکروز رگبرگ توتون PVY^{N} و حاصل نوترکیبی بین نژادهای PVY^{N} و PVYO می‌باشد که اغلب در زمان برداشت بدون علائم و غیر قابل شناسایی بصورت چشمی است. معمولاً علائم در زمان پس از برداشت در شرایط انبار نمایان می‌شوند و باعث کاهش کیفیت غده ها و قابلیت عرضه در بازار می‌شود. واکنش زنجیره ای پلیمراز نسخه برداری معکوس، (RT-PCR) ابزاری دقیق و قابل اعتماد برای تمایز و شناسایی نژاد PVY^{NTN}[6] در تائید علائم و ردیابی آلودگی در بافتهای بدون علائم محسوب می‌شود. به همین منظور در تابستان ۱۳۸۶ تعداد ۴۳۵ مونه از غده‌های مزارع استان خراسان رضوی به صورت تصادفی جمع آوری شد. غده ها بعد از گذراندن دوره خواب در دمای $4^{\circ}C$، به گلخانه در دمای $25^{\circ}C$. جهت جوانه زنی منتقل شدند سپس جوانه های هر غده با آزمون DAS-ELISA به کمک پادتن چند همسانه ای برای ردیابی ویروس Y سیب زمینی مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نتایج حاصل از آزمون الیزا نمونه های دارای بیشترین میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر انتخاب و در نهایت مشخص گردید که ۵۳ نمونه به PVY آلوده بودند. سپس با استفاده از محلول RNX™(-Plus)توده RNA کل ۴۰ گیاه آلوده به PVY استخراج و با کمک دوجفت آغازگر اختصاصی طراحی شده برای ناحیه ژن پروتئین پوششی CP، cDNA مربوطه ساخته و برای انجام آزمون RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های آلوده به PVY به همراه آغازگرهای MOR2 و MOR3 در محدودهٔ 569-BP و جدایه‌های متعلق به نژاد PVY^{NTN} به همراه آغازگرهای MOR1 و MOR2 درمحدوده 334-BP ایجاد باند نمودند.

واژه‌های کلیدی : PVY^{NTN} ، ELISA، RT-PCR

مقدمه

ویروس Y سیب زمینی (PVY) عضو تیپ جنس Potyvirus، متعلق به بزرگترین و مهمترین خانواده ویروسی Potyviridae و یکی از مخربترین ویروسهای سیب زمینی در سرتاسر جهان می‌باشد (۱، ۱۰ و ۱۴). دامنه میزبانی نسبتاً وسیع و متعلق به خانواده بادنجانیان شامل سیب زمینی، گوجه فرنگی، توتون، فلفل و بادمجان می‌باشد (۳،۴،۸،۹،۱۱،۱۲،۲۰ و ۲۵). این ویروس توسط شته به طریق ناپایا منتقل می‌شود (۸، ۲۴ و ۲۵). پیکرهٔ ویروس نخی شکل، خمش پذیر و ژنوم شامل یک مولکول RNA تک رشته، مثبت و اندازه آن Kb 10می باشد. در انتهایَ3 ژنوم دارای دنباله Poly A و در انتهایَ5 ژنوم به پروتئین Vpg به صورت کووالانت متصل است. RNA ویروس یک پلی پپتید بزرگ را کد می‌کند که از سه ناحیه توسط سه کد پروتئازی، شکسته می‌شود و ۹ محصول پروتئین را ایجاد می‌کند (۴،۸،۱۶،۱۷،۲۲ و ۲۴). ژنوم ویروس PVY از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار می‌باشد (۱، ۷ و ۱۶). معمولاً بر اساس آزمونهای بیولوژیکی شامل ایجاد علائم موضعی و سیستمیک بر روی *Nicotiana tabacum* و *Solanum tubrosum* و همچنین آزمونهای سرولوژی به نژادهای PVY^{O}، PVY^{N} و PVY^{C} تقسیم می‌گردد (۱۲،۱۷،۲۳ و ۲۴). توسعه روشهای مولکولی برای تمایز دقیق نژادهای PVY از سال ۱۹۸۰شروع شد که بر این اساس دو نژاد نوترکیب جدید به نامهای PVY^{NTN} ، PVY^{NW} ($PVY^{N:O}$) از دیگر نژادهای PVY متمایز می‌شدند (۸،۹،۱۱،۱۴ و ۱۷). نژادهای PVY^{N} و PVY^{O} بیشتر از سایرنژادها از سراسر جهان گزارش گردیده اند. نژاد معمولی[7] PVY^{O} باعث ایجاد علائم موزاییک و ابلقی در برگهای توتون و موزاییک خفیف تا شدید و ریزش برگها در گیاه سیب زمینی می‌شود. نژاد نکروز رگبرگ توتون[8] PVY^{N} باعث ایجاد

۱،۲،۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، استاد و کارشناس آموزشی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: somayeh.majd@gmail.com)

5 - Potato Tuber Necrosis Ringspot Diseases
6 - PVYNTN Strain of Potato virus Y
7 - Ordinary strain
8 - Tobacco necrosis strain

علائم نکروز رگبرگ در توتون، ابلقی خفیف و گاهی نکروز برگها در گیاه سیب زمینی می‌شود. نژاد لکه نواری منقوط[1] PVY^{C} باعث ایجاد علائم موزائیک، رگوز و نکروز در برخی ارقام سیب زمینی می‌شود (۲۲،۱۸،۱۶،۱۲،۱۱ و ۲۴). همانطور که گفته شد در دهه‌های اخیر نژادهای جدیدی از قبیل PVY^{NTN} و PVY^{N-W} گزارش شده اند که حاصل نو ترکیبی بین نژادهای PVY^{N} و PVY^{O} و دارای قطعاتی از ژنوم این دو نژاد می‌باشند. عمل نوترکیبی در سراسر ژنوم و یا در ناحیه ژن پروتئین پوششی CP ، HC-PRO، P۲K و Nia در انتهای '3 ژنوم و بیشتر در ناحیه ژن P1 در انتهای '5 صورت می‌گیرد (۱۹،۱۴،۱۲،۹،۸،۷،۳ و ۲۰). نژاد PVY^{N-W} نکروز سیستمیک در توتون و علائم برگی نسبتاً خفیفی در سیب زمینی، مشابه با نژاد PVY^{N} ایجاد می‌کند. ابتدا این نژاد در دهه اخیر از Wilga گزارش گردید. نژاد PVY^{N-W} در چند ناحیه از ژنوم با PVY^{N} اختلاف دارد (۴،۳ و ۲۴). نژاد PVY^{NTN} عامل بیماری لکه حلقوی نکروتیک غده سیب زمینی (PTNRD) اولین بار در سال ۱۹۸۴ از مجارستان[2] در اروپا و در حال حاضر از بسیاری از کشورها گزارش گردیده است (۱۷،۵ و ۲۶). طوسی در سال ۱۳۸۴ وجود این نژاد را به صورت زیر نژادی از ویروس PVY در ۵ نمونه از ایران گزارش نمود. حسینی نیز در سال ۱۳۸۷ جدایه‌های ایرانی ویروس PVY را گروه بندی و جدایه مربوط به نژاد PVY^{NTN} در یک گروه مجزا قرار داد (۱ و ۲). علائم نژاد PVY^{NTN} در برگ گیاه سیب زمینی شامل موزائیک و ابلقی شدن بوده و در غده باعث ایجاد حلقه‌های سطحی و بیرنگ می‌شوند که ابتدا برآمده وسپس فرورفته و نکروتیک می‌شوند. اغلب این علائم در زمان برداشت غیر قابل شناسایی و بدون علائم هستند ومعمولاً چند ماه پس از برداشت غده ها و در طول مدت انبار نمایان می‌شوند و باعث کاهش کیفیت و قابلیت عرضه در بازار شده و در نتیجه زیان اقتصادی بزرگی را موجب می‌شود (۲۲،۲۱،۱۹،۱۲،۹،۵ و ۲۶). ظهور و شدت علائم بستگی به شرایط آب هوایی از جمله دما و رطوبت و رقم سیب زمینی دارد ودر خیلی از موارد علی رغم وجود آلودگی، غده ها بدون علائم هستند و علائم فقط در غده‌های حساس ظاهر میگردد (۵ و ۲۳). بنابراین شناسایی دقیق و به موقع این نژاد قبل از کشت غده ها و در برنامه‌های گواهی سلامت بذر مهم و ضروری به نظر می‌رسد. واکنش زنجیره ای پلیمراز نسخه بردار معکوس (RT-PCR) ابزار بسیار قدرتمند، دقیق، قابل اعتماد و کارآمد به همراه توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای تمایز نژاد PVY^{NTN} از نژادهای دیگر و برای تائید علائم و ردیابی آلودگی در غده‌های بدون علائم می‌باشد (۱۵،۱۳،۱۲،۵ و ۱۸). سینگ و همکاران در سال ۱۹۹۸جدایه ای از PVY^{NTN} در آمریکای شمالی پیدا کردند که از طریق جهش بوجود آمده است و عمل نوترکیبی در آن دخالتی ندارد که اصطلاحاً به آن PVY^{NTN}-NA گفته می‌شود (۳ و ۱۴). با توجه به سطح بالای زیر کشت سیب زمینی در استان خراسان رضوی، این محصول از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد بدیهی است که شناسایی عوامل بیماری زا و مبارزه با این عوامل می‌تواند به تولید هر چه بیشتر این محصول بیانجامد و شناسایی نژاد PVY^{NTN} در تحقیق حاضر این هدف را دنبال می‌کند.

مواد و روش ها

نمونه برداری و آماده سازی نمونه ها

به منظور شناسایی نژاد PVY^{NTN} در تابستان۱۳۸۶ تعداد ۴۳۵ نمونه از غده‌های ۳۲مزرعه سیب زمینی واقع در شهرستانهای مشهد، چناران، قوچان، فریمان، نیشابور، تربت جام، تربت حیدریه به صورت تصادفی جمع آوری گردید. بدین صورت که در اقطار مزرعه حرکت وحدوداً از هر ۲ متر یک نمونه برمی داشتیم. نمونه ها درون پاکتهای کاغذی جداگانه با ثبت مشخصات قرار داده شدند و برای سپری شدن دوره خواب به مدت ۴ هفته در دمای $4\ ^{\circ}C$ نگهداری و سپس جهت جوانه زنی به گلخانه در دمای $25\ ^{\circ}C$ منتقل شدند و جوانه‌های هر غده برای انجام آزمون الیزا مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین آلودگی نمونه ها به ویروس PVY توسط آزمون DAS- ELISA

جهت تشخیص نمونه‌های آلوده به ویروس PVY از روش ساندویچ دو طرفه الیزا[3] (DAS- ELISA) مطابق روش کلارک و آدامز (۶) با اندکی تغییرات استفاده شد. برای این منظور از پادتن چند همسانه ای[4] بر علیه ویروس Y (PVY) موجود در عصارهٔ جوانه‌های جوانه‌های غده ها مورد استفاده قرار گرفت. در کلیه آزمون‌های انجام شده، حفراتی که تغییر رنگ آنها محسوس و نزدیک به شاهد مثبت بود، به عنوان نمونه آلوده تعیین گردید. این نتایج همچنین با دستگاه الیزاخوان[5] (Stat Fax ۲۱۰۰) خوانده و میزان جذب نور UV در طول موج ۴۰۵ نانومتر برای هر یک از حفرات پلیت قرائت شد و بدین ترتیب نتایج بررسی چشمی مورد تأئید قرار گرفت.

استخراج RNA کل گیاه

نمونه هایی که بیشترین میزان جذب را در دستگاه الیزا خوان نشان دادند برای استخراج RNA انتخاب شدند. جهت استخراج تودهٔ RNA کل گیاه از محلول تجاری (RNX™(-Plus (سیناژن –

1 - Stipple streak strain
2 – Hungary

3- Double antibody sandwich enzyme Linked immunosorbent assay
4- Polyclonal antibody
5 -ELISA Reader

ایران) استفاده شد. برای این منظور حدود ۱۰۰-۵۰ میلی گرم از بافت برگ یا غده ۴۰ گیاه سیب زمینی آلوده به PVY توسط ازت مایع در هاون استریل سرد پودر و با محلول RNX™(-plus) بصورت هموژنیزه درآمد و سپس با کمک کلروفرم، پروتئین و سایر مواد مداخله کننده حذف شدند و RNA با محلول ایزوپروپانول سرد رسوب داده شد. سپس نمونه‌های آماده شده در فریزر در دمای C ۲۰° - نگهداری شدند. جهت اطمینان از صحت استخراج RNA ، نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمراز نسخه بردار معکوس[1] (RT-PCR)

پس از استخراج RNA ویروس با استفاده از کیت Accu Power™ RT-Premix (شرکتBioner) اقدام به ساختن رشته DNA مکمل (cDNA) از روی RNA ویروسی گردید. ۳ میکرولیتر RNA با ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت MOR2 (5'- CAA ACC ATA AGC CCA TTC ATC - 3') مخلوط شد و مخلوط حاصل در دمای ۷۰°C به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید و سپس به تیوب‌های لیوفیلیزه RT منتقل گردیدند. واکنش ساخت cDNA درحجم نهایی ۲۰ µL و در دستگاه ترمو سایکلر (Biometra , Germany) طی برنامه حرارتی ۴۲° C به مدت ۱ ساعت و ۹۴°C درجه به مدت ۵ دقیقه انجام گردید.

واکنش PCR

تکثیر قطعه cDNA ساخته شده توسط آزمون RT با استفاده از کیت AccuPower PCR Premix (شرکتBioner) انجام گرفت. ۵ میکرولیتر از cDNA با ۱ میکرولیتر از آغازگر برگشت MOR2 و ۱ میکرولیتر از آغازگرهای رفت MOR1 (5'- AGG AGG AAG CAC TAA GAA G -3') و MOR3 (5'-GCA CCA AAT CAG GAG ATT CTA CT -3') هر کدام به صورت جداگانه مخلوط شدند بدین صورت که یکبار cDNA ساخته شده با ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت MOR2 و آغازگر رفت MOR1 و یکبار cDNA ساخته شده با ۱ میکرولیترآغازگر برگشت MOR2 و ۱ میکرولیتر آغازگر رفت MOR3 در تیوبهای PCR مخلوط شده و واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ µ L در دستگاه ترمو سایکلر (Biometra , Germany) با برنامه حرارتی ۹۴ درجه در ۴ دقیقه به عنوان واسرشته سازی آغازین و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل ۹۴°C در ۳۰ ثانیه، ۵۰° C در ۳۰ ثانیه، ۷۲°C در ۱ دقیقه و یک چرخه شامل ۷۲°C در ۱۰ دقیقه به عنوان تکمیل پلیمریزاسیون در دستگاه ترموسایکلر انجام گردید. محصول PCR در C ° ۲۰- نگهداری ویا بلافاصله در ژل آگارز ۱ درصد تحت ولتاژ ثابت ۷۵ به مدت ۷۵ دقیقه در حضور نشانگر 100bp[2] الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ، نتایج با دستگاه UV ترانسلومیناتور[3] مشاهده گردید.

نتایج و بحث

شناسایی اولیه ویروس با استفاده از آزمون DAS-ELISA

نتایج بدست آمده با آزمون الیزا، نشان داد که اکثر مزارع مورد بررسی در استان خراسان رضوی به ویروس Y سیب زمینی (PVY) آلوده هستند. طوریکه از مجموع ۴۳۵ نمونه جمع آوری شده از شهرستانهای مشهد، چناران، قوچان، فریمان، نیشابور، تربت جام و تربت حیدریه ۵۳ نمونه به PVY آلوده بودند (جدول۱). در بین این مناطق چناران بدون آلودگی، تربت جام بالاترین درصد آلودگی و قوچان پائین ترین درصد آلودگی را داشتند.

آزمون RT-PCR

از بین ۵۳ نمونه آلوده به PVY ، ۴۰ نمونه که چگالی نوری بیشتری را در دستگاه نشان دادند جهت استخراج RNA کل گیاهی استفاده شدند . انجام آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای MOR2 و MOR3 منجر به تکثیر قطعه 569 bp شد که این باند مربوط به ویروس Y و در همه نمونه هایی که با آزمون الیزا آلودگی آنها به PVY تأیید شده بود دیده شد (شکل های۱ و ۳). همچنین با استفاده از آغازگر برگشت MOR2 و آغازگر رفت MOR1 که برای شناسایی نژاد PVY^{NTN} طراحی شده بود، در آزمون RT-PCR منجر به تکثیر یک قطعه 334 bp در ۱۱ نمونه از ۴۰ نمونه مورد بررسی وجود داشت که این نشان از وجود نژاد PVY^{NTN} عامل بیماری لکه حلقوی نکروتیک غده سیب زمینی در مزارع استان خراسان رضوی می‌باشد (شکل های۲ و ۳). ۱۱ نمونه مورد نظر متعلق به شهرستانهای نیشابور، مشهد، فریمان هر کدام به ۲ نمونه آلوده، تربت جام به ۴ نمونه و تربت حیدریه به ۱ نمونه آلوده بودند. بنا برگزارش Lorenzen (۶) در ارقام حساس سیب زمینی آلوده به نژاد PVY^{NTN} علائم بیماری در انبار نمایان می شوند در صورتیکه در این تحقیق غده های آلوده به نژاد PVY^{NTN} بدون علائم بودند که یکی از دلایل این امر احتمال می‌رود به علت حساس نبودن غده ها ی مورد آزمایش در این آزمون در برابر ایجاد علائم باشد.

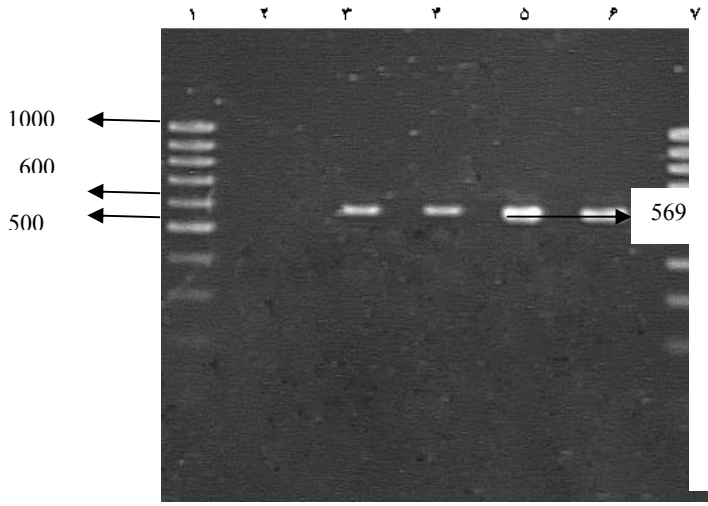
1- Revrse – transcriptase Polymerase chain reaction (RT-PCR)

2 - 100 bp DNA Ladder
3 -Transiluminator

جدول۱- تعداد نمونه آلوده و درصد آلودگی به PVY در هریک از مناطق نمونه برداری شده

مناطق نمونه برداری	مزارع نمونه برداری شده	تعداد نمونه جمع آوری شده	تعداد نمونه آلوده	درصدآلودگی
مشهد	حومه، طرق	۴۵	۷	۱۶
چناران	ماسی حضرتی ، رادکان	۲۰	۰	۰
قوچان	حومه ،علی زینل ،یوسف آباد	۳۳	۳	۶
تربت حیدریه	رباط سنگ ، اسد آباد ، سرهنگ ، قشرپاط،جلگه رخ	۱۰۱	۱۰	۱۰
تربت جام	حومه، کاریز نو ، ابدال آباد	۵۷	۱۳	۲۳
فریمان	حومه ،کته شمشیر ، فرهاد گرد، خیر آباد	۸۴	۱۱	۱۳
نیشابور	حومه، نظرآباد ،گنبد راز،ده سرخ، دیزباد سفلی	۷۵	۹	۱۲

تحقیق حاضر مشابه با آزمون انجام شده برای شناسایی نژاد PVY^{NTN} توسط Boonham (۵) می‌باشد و تکثیر قطعات DNA به اندازه‌های 569 bp مربوط به ویروس Y سیب زمینی (PVY) و 334 bp مربوط به نژاد PVY^{NTN} مطابق با اندازه‌های مورد انتظار در تحقیق Moravec (۱۲) برای شناسایی نژاد PVY^{NTN} می‌باشد. طبق گزارش Stefania (2006) برای تمایز و تفکیک نژادهای ویروس Y سیب زمینی از روشهای بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی استفاده میشود. استفاده از روشهای بیولوژیکی قابل اطمینان ولی بسیار زمان بر و به شرایط آب و هوایی، رقم میزبان و فاصله زمانی تلقیح بستگی دارد و علائم نژاد PVY^{NTN} نسبت به نژاد PVY^{N} روی گیاه محک توتون غیر قابل تشخیص می‌باشد. آزمون DAS-ELISA نیز با اینکه روش زمان بری نیست ولی نمونه‌های آلوده به نژاد PVY^{NTN} به پادتن تک همسانه ای PVY^{N} واکنش مثبت می دهند و با این حال برای تمایز بین نژادهای PVY^{NTN} و PVY^{N} این آزمون ناتوان است، اما آزمون RT-PCR برای تمایز و شناسایی نژاد PVY^{NTN} روشی دقیق، قابل اعتماد و سریع در تائید علائم واثبات آلودگی در بافتهای بدون علائم می باشد. در این تحقیق آزمون RT-PCR به همراه آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی نژاد PVY^{NTN} استفاده شد و مشخص گردید که آزمون RT-PCR ابزاری مطمئن برای ردیابی و اثبات آلودگی در بافتهای بدون علائم می باشد لذا از این روش میتوان در برنامه‌های تصدیق و گواهی از سلامت بذر استفاده نمود.

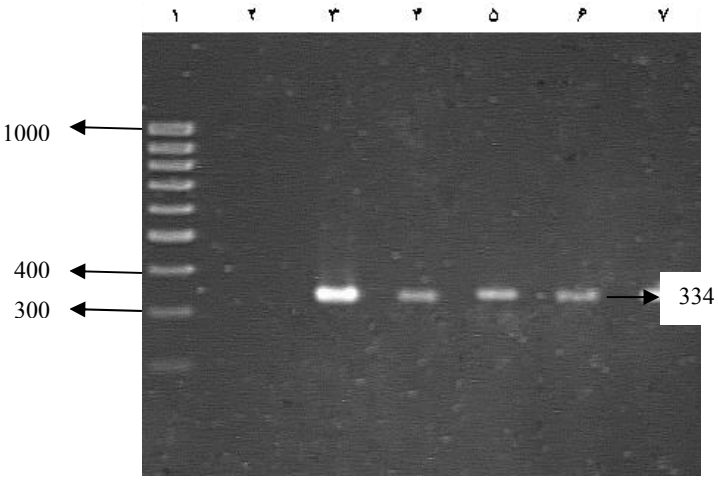


شکل ۱- الکتروفورز محصول RT-PCR با استفاده از آغازگرهای برگشت MOR2 و رفت MOR3 در ژل افقی اگارز 1 درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید

ستون ۱و۷: نشانگر DNA (100 bp DNA Ladder)

ستون۲: شاهد منفی (آب مقطر)

ستون ۳ تا ۶ : محصول PCR از نمونه‌های آلوده به ویروس Y و تکثیر باند در محدوده 569 bp مربوط به ویروس Y سیب زمینی

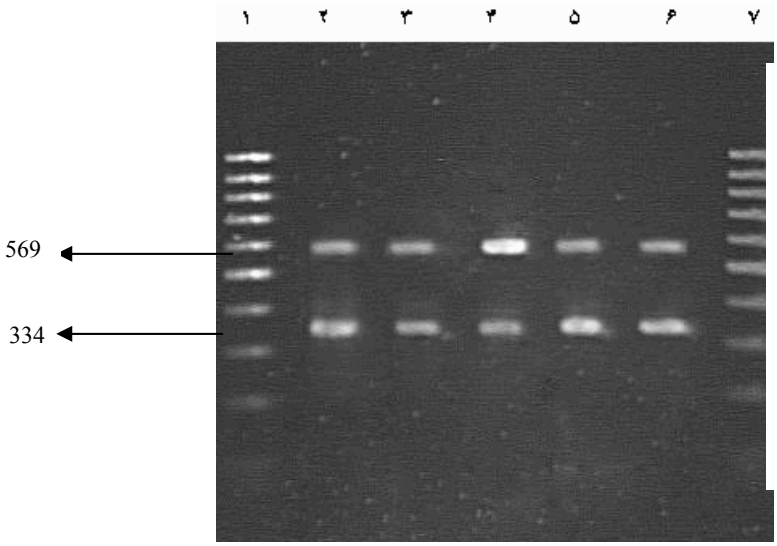


شکل ۲- الکتروفورز محصول RT-PCR با استفاده از آغازگرهای برگشت MOR2 و رفت MOR1 در ژل افقی اگارز 1 درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید

ستون۱: نشانگر DNA (100 bp DNA Ladder)

ستون ۲ : شاهد منفی (آب مقطر)

ستون ۳ تا ۷: محصول PCR از نمونه‌های آلوده به نژاد PVY^{NTN} و تکثیر باند در محدوده 334bp مربوط به نژاد PVY^{NTN} از ویروس Y سیب زمینی



شکل ۳- الکتروفورز محصولات RT-PCR مربوط به ویروس Y سیب زمینی و نژاد PVY^{NTN} در ژل افقی اگارز 1 درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید به صورت جداگانه Loaed شده اند.

ستون ۱و۷ : نشانگر DNA (100 bp DNA Ladder)

ستون ۲ تا ۶ : محصول PCR از نمونه‌های آلوده به ویروس Y و نژاد PVY^{NTN} که بصورت جداگانه در هرچاهک Load شده اند.

منابع

۱- حسینی ع.، معصومی ح.، حسینی پور ا.، حیدرنژاد ج.، و شعبانیان م.۱۳۸۷. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئاز ۱۴ جدایه ایرانی ویروس Y سیب زمینی . خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران .دانشگاه بوعلی سینا همدان، ۳-۶ شهریور، همدان. صفحه ۴۷۹.

۲- طوسی ن.، آهون منش ع.، پوررحیم ر.، و بهار م. ۱۳۸۴. گزارش وقوع زیرنژاد NTN ویروس وای سیب زمینی (Potato virus Y^{NTN}) در ایران. مجله بیماریهای گیاهی قسمت گزارش‌های کوتاه علمی جلد ۴۱ شماره ۴ سال ۱۳۸۴ صفحه ۷۱۱.

3- Bukovinszki A., Gotz R., Johansen E., Maiss E., Balazes E.2007. The role of the coat protein region in symptom formation on *Physalis floridana* varies between PVYstrains. Virus Research. 127: 122-125.

4- Baldauf P.M., Gray S.M., and Perry K.L. 2006. Biological and serological properties of *Potato virus Y* isolates in northeastern United States potato. Plant Dis. 90: 559-566.

5- Boonham N., Walsh K., Preston S., North J., Smith P., Barker I. 2002. The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*,and the accurate discrimination of PVY^{O} , PVY^{N} and PVY^{C} strains using RT-PCR. Journal of Virological Methods. 102: 103-112.

6- Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of general Virology. 34: 475-483.

7- Glais L., Tribodet M., Kerlan C. 2005. Specific detection of the PVY^{N-W} variant of *Potato virus Y*. Journal of Virological Methods. 125: 131-136.
8- Jacquot E., Tribodet M., Croizat F., Sinibaldi V., Kerlan C. 2005. A single nucleotide polymorphism-based technique for specific characterization of Y^{O} and Y^{N} isolates of Potato virus Y(PVY). Journal of Virological Methods. 125: 131-136.
9- Kogovsek P., Gow L., Novak M., Gruden K., Foster G.D., Boonham N., Ravnikar M.2008. Single-step RT real time PCR for sensitive detection and discrimination of virus Y isolates. Journal of Virological Methods. 141: 1-11.
10- Lorenzen J.H., Meacham T., Berger P.H., Shiel P.J., Crosslin J.M., Hamm P.B., Kopp H.2006. Whole genome characterization of *Potato virus Y* isolates collected in western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. Journal of General Virology. 1: 1055-1074.
11- Lorenzen J.H., Piche L.M., Gudmestad N.C., Meacham T., Shiel P. 2006. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. Plant Dis. 90: 935-94.
12- Moravec T., Cerovska N., Boonham N. 2003. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of *Potato virus Y* (PVY^{NTN}) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. Journal of Virological Methods.109: 63-68.
13- Nie X.2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of *Potato virus Y*.Plant Dis. 89: 605-610.
14- Nie X., Singh R.P.2003. Specific differentiation of recombinant $PVY^{N:O}$ and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR.Journal of Virological Methods. 113: 69-77
15- Nie X., Singh R.P.2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of *Potato virus Y* by uniplex and multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods. 104: 45-54.
16- Nie X., Singh R.P.2002. Probable geographical grouping of PVY^{N} and PVY^{NTN} based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY^{NTN}. Journal of Virological Methods.103: 145-156.
17- Rolland M., Glais L., Kerlan C., Jacquot E.2008. A multiple single nucleotide polymorphism interrogation assay for reliable Potato virus Y group variant characterization. Journal of Virological Methods.147: 108-117.
18- Rigotti S., Gugerli P.2007. Rapid identification of potato virus Y strains by one –step triplex RT-PCR. Journal of Virological Methods.140: 90-94.
19- Rosner A., Maslenin L.2005. Grouping of potato isolates of PVY based on the ۵-UTR nucleotide sequence. Phytopathal. Meditrr.44: 00-00.
20- Rosner A., Maslenin L.2004. The application of RNA transcript conformation in Resolving Mixed infection of PVY isolates. Journal of Plant Pathology.20: 308-312.
21- Rosner A., Maslenin L.2001. Differentiating PVY^{NTN} from PVY^{N} by annealing to reference RNA transcripts. Journal of Virological Methods.97: 125-131.
22- Schubert J., Fomitcheva V., Wisniewska J.S.2007. Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. Journal of Virological Methods.140: 66-74.
23- Szemes M.M., Klerks J., Heuvel V., Schoen C.D. 2002. Development of a multiplex AmpliDet RNA assay for simultaneous detection and typing of *Potato virus Y* isolates. Jornal of Virological Methods.100: 83-96.
24- Tribodet M., Glais L., Kerlan C., Jacqot E. 2005. Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY^{N} isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv.Xanthi. Journal of General Virology. 86: 2101-2105.
25- Walsh K., North J., Barker I., Boonham N. 2001. Detection of strains of *Potato virus Y* and their mixed infection using competitive fluorescent RT-PCR. Journal of Virological Methode. 91: 167-173.
26- Weilguny H., Singh R.P.1998. Separation of Slovenian isolates of PVY^{NTN} from the North American isolates of PVY^{N} by a 3 – primer PCR. Journal of Virological Methode. 71: 57-68.