نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۳۲۲-۳۱۵

Journal of Plant Protection
Vol. 32, No. 3, Fall 2018, P. 315-322

شناسایی مولکولی استرین C ویروس وای سیب زمینی (*Potato virus Y*) از گوجه‌فرنگی در استان مازندران

زهره مرادی[۱] - محسن مهرور[۲] - احسان نظیفی[۳*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۰۶

چکیده

ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y,* PVY) عضو تیپ جنس *Potyvirus*، یکی از مهم‌ترین عوامل بیمارگر در گیاهان خانواده سولاناسه می‌باشد. در سال زراعی ۱۳۹۲ تعداد ۳۸ نمونه مشکوک به آلودگی ویروسی از مزارع گوجه‌فرنگی استان مازندران جمع‌آوری و پس از بررسی با آغازگرهای دژنره پوتی‌ویروس‌ها، تعداد ۹ نمونه آلوده به پوتی‌ویروس تشخیص داده شدند. پس از همسانه‌سازی و توالی‌یابی نمونه‌های آلوده، چهار جدایه با علائم موزائیک، پیسکی و بدشکلی به عنوان PVY شناخته شدند که به دلیل شباهت بالا، دو جدایه به نام‌های GB و GRA انتخاب گردید. آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های ایرانی به همراه ۱۱۵ جدایه دیگر موجود در بانک ژن در ناحیه ژنی CI (Cylindrical inclusion) نشان داد که تمام جدایه‌های مقایسه شده در سه گروه اصلی (I، II، III) قرار گرفته و جدایه‌های ایرانی همراه با جدایه‌هایی از کشورهای ایتالیا، استرالیا، هلند، فرانسه، اسپانیا و اروگوئه که همگی از نژاد C می‌باشند در زیر گروه IF قرار می‌گیرند. جدایه‌های ایرانی PVY-GB و GRA- در زیرگروه IF یک sublineage جداگانه را تشکیل دادند و دارای بیشترین شباهت (۹۵/۷-۹۶/۵ درصد) با جدایه اسپانیا (LYE84.2) و کمترین شباهت (۸۰/۹-۸۱/۳ درصد) با جدایه ژاپن (T13) و کانادا (Tu_660) در سطح نوکلئوتیدی بودند. در سطح آمینواسیدی نیز جدایه‌های ایرانی بیشترین شباهت (۹۹/۱ درصد) را با جدایه اسپانیا (LYE84.2)، ایتالیا (Foggia) و اروگوئه (Tannat) و کمترین شباهت (۹۳/۴ درصد) را با جدایه ژاپن (T13) داشتند. همچنین تشابه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این دو جدایه با یکدیگر به ترتیب ۹۸/۴ و ۱۰۰ درصد تعیین گردید. این اولین گزارش از وجود نژاد PVY^C از گیاه گوجه‌فرنگی در استان مازندران و ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، ایران، پوتی‌ویروس، ژن CI

مقدمه

گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) از خانواده *Solanaceae*، یک محصول اقتصادی مهم است که در بسیاری از نقاط جهان کشت می‌شود و تولید سالانه آن در ایران حدود شش میلیون تن است (۹). PVY گونه تیپ جنس *Potyvirus* (تیره *Potyviridae*)، شایع‌ترین و مخرب‌ترین ویروس آلوده‌کننده مزارع بادنجانیان در سراسر جهان است (۲۸ و ۲۹) که سبب بیماری‌های مهمی در گوجه فرنگی، سیب زمینی، فلفل، توتون و دیگر گیاهان خانواده بادنجانیان می‌شود (۷، ۳۰ و ۳۱). پیکره این ویروس رشته‌ای، انعطاف پذیر، دارای طول ۷۴۰-۷۳۰ نانومتر و عرض ۱۲-۱۱ نانومتر است (۱۶). ژنوم از یک رشته RNA تک‌لای مثبت، به طول تقریبی ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید تشکیل شده است (۱۶، ۱۹ و ۲۳) که در انتهای ´۵ دارای VPg و انتهای ´۳ دارای دنباله poly A می‌باشد (۲). این ژنوم حاوی یک ORF[۴] واحد بزرگ است که کدکننده یک پلی پروتئین بزرگ می‌باشد و نیز یک ORF همپوشان کوچک (به نام PIPO[۵]) که در بین سیسترون P3 پلی پروتئین جاسازی شده و به صورت پروتئین ترکیبی P3N- PIPO بیان می‌شود. پلی پروتئین بزرگ (حاوی ۳۰۶۳-۳۰۶۱ آمینواسید) توسط سه پروتئیناز ویروسی در محل‌های خاص شکسته شده که نتیجه آن تولید ده پروتئین کوچک دارای نقش به نام‌های P1، HC- Pro، P3، 6K1، CI، 6K2، VPg، NIa-Pro، NIb و CP است (۶، ۱۶ و ۲۶). پروتئین CI بزرگترین محصول ژنی در پوتی ویروس‌هاست و به دلیل منحصر بفرد بودن در اعضای تیره *Potyviridae* دارای ارزش تاکسونومیکی بالایی است. PVY ابتدا در سال ۱۹۳۱ توسط اسمیت گزارش و به عنوان مجموعه‌ای از جدایه‌های ویروسی لحاظ گردید (۲۶ و ۳۲). این ویروس پراکنش جهانی دارد و خسارت اقتصادی سنگینی از طریق کاهش عملکرد و

۱ و ۲- دانش آموخته دکتری و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران
(*- نویسنده مسئول: (Email: E.Nazifi@umz.ac.ir
DOI: 10.22067/jpp.v32i3.63682

4- Open Reading Frame
5- Pretty Interesting *Potyviridae* ORF

کاهش کیفیت محصول ایجاد می‌نماید، خسارت آن بین ۱۰ تا ۱۰۰ درصد در سیب زمینی و دیگر گیاهان بادنجانیان گزارش شده است (۳۴). جدایه‌های PVY مطابق خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی‌شان به چندین استرین N، O، C، Z، E، NTN و N-Wi تقسیم می‌شوند (۳۱). شدت خسارت بیماری ناشی از ویروس بستگی به استرین ویروس، غلظت ویروس، تحمل میزبان، زمان آلودگی و فاکتورهای محیطی دارد (۳۴). این ویروس در طبیعت توسط بیش از ۴۰ گونه شته به صورت ناپایا منتقل شده (۸ و ۱۷) که موثرترین گونه از میان آن‌ها در سراسر جهان، شته سبز هلو (*Myzus persicae*) می‌باشد. ویروس بلافاصله پس از اکتساب توسط شته قابلیت انتقال یافته و فاقد دوره نهفتگی است (۳۴). PVY از مناطق مختلف ایران و از میزبان‌های گوناگون با روش‌های مختلف سرولوژیکی و مولکولی گزارش شده است (۱۰، ۱۱، ۱۴، ۲۰، ۲۱، ۲۴، ۲۷ و ۳۶). براساس دامنه میزبانی، تنوع علایم و خصوصیات سرولوژیکی تاکنون پنج نژاد به نام‌های PVY^O، PVY^N، PVY^{NTN}، PVY^C و PVY^Z در کشور شناخته شده‌اند (۱۴). همچنین با استفاده از روش‌های مولکولی، منطقه غیرکد شونده 3´–UTR و مناطق کدشونده P1 و CP (۱۴) و اخیرا نیز ژنوم کامل این ویروس تعیین توالی و آنالیز شده است (۲۵). PVY یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت زای گیاهان میزبانش از طریق کاهش شدید عملکرد محصول در نقاط مختلف کشور می‌باشد (۱۴و ۲۴). از اینرو شناسایی جدایه‌ها و نژادهای مختلف و بررسی تنوع ژنتیکی آنها برای شناخت تکامل و توسعه این ویروس مفید خواهد بود، که در نتیجه میتوان راهکارهای مناسبتری جهت طراحی استراتژی‌های مدیریت پایدار در برنامه‌های بلندمدت برای کنترل بیماری ناشی از این بیمارگر ارائه نمود. در این تحقیق جدایه های GB و GRA جدا شده از مزارع گوجه فرنگی استان مازندران با استفاده از آنالیز مولکولی ناحیه CI مورد بررسی قرار گرفته و جایگاه تاکسونومیکی آن‌ها در میان سویه‌های PVY تعیین گردید. بسیاری از محققین منطقه کدشونده CI را مناسب‌ترین گزینه برای اهداف تشخیصی، طبقه‌بندی و نیز برای مقایسه و تمایز گونه‌ها و سویه‌های پوتی‌ویروس‌ها زمانیکه توالی کامل ژنوم در دسترس نیست، می‌دانند (۱، ۱۲ و ۱۸).

مواد و روش‌ها

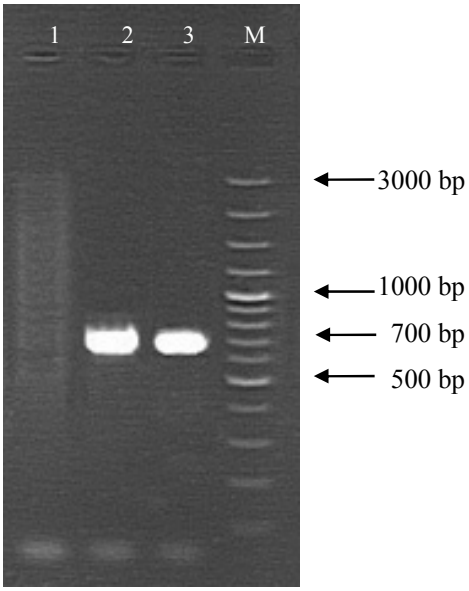
در تابستان سال ۱۳۹۲ تعداد ۳۸ نمونه با علائمی از قبیل موزائیک، زردی، پیسک[1]، بدشکلی و چین‌خوردگی یا موجی شدن[2] حاشیه برگ، از مزارع گوجه‌فرنگی استان مازندران جمع‌آوری شد. استخراج RNA از بافت گیاهی با استفاده از Total RNA isolation kit (دنازیست) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. جهت انجام واکنش‌های RT-PCR از یک جفت آغازگر دژنره پوتی ویروس‌ها (۱۲) منطبق بر ژن کد کننده پروتئین CI استفاده شد. با استفاده از RNA کل استخراج شده، آغازگر برگشت و آنزیم MMLV-Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, USA)، cDNA سنتز شد. آزمون PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری و با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت و آنزیم Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, USA)، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. پروفایل دمایی PCR شامل یک چرخه در دمای $94\ ^{\circ}C$ به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل دمای $94\ ^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه ، $52\ ^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و $72\ ^{\circ}C$ به مدت ۹۰ ثانیه و در آخر یک چرخه در دمای $72\ ^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات PCR در ناحیه مورد انتظار، پس از جداسازی از ژل و خالص‌سازی با استفاده از Qiaquick Gel Extraction Kit (کیاژن) به داخل ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T الحاق شدند. پلاسمیدهای نوترکیب، درون سلول‌های باکتریایی مستعد *Escherichia coli* سویه DH5α تراریخت شدند. همسانه‌های حاوی ژن مورد نظر از طریق Colony PCR با استفاده از آغازگرهای M13 شناسایی شدند. DNA پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت کیاژن استخراج شده و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی توالی‌یابی شدند. ترادف‌های حاصل، در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه BLASTn با ترادف‌های موجود در GenBankمقایسه شدند. پس از ادغام ترادف‌های حاصل از دو همسانه از قطعات مختلف، ترادف استنتاجی (Consensus sequence) با استفاده از نرم افزار Vector NTI 11 به دست آمد. مقایسه هم‌ردیف سازی چندگانه[3] توالی‌های نوکلئوتیدی بین جدایه-های شناسایی شده در این بررسی و سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن، با استفاده از برنامه ClustalW2 موجود در نرم‌افزارهای BioEdit v.7.2.5 و نیز MEGA6 (۳۳) انجام شد. ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA6 براساس روش Neighbor joining و با درجه اعتبار (bootstrap) ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید.

نتایج

از بین ۳۸ نمونه گیاهی جمع‌آوری شده ۹ نمونه در واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگر دژنره مربوط به ژن CI جنس پوتی-ویروس، به عنوان گیاهان آلوده به پوتی‌ویروس شناخته شدند. اندازه قطعات تکثیر شده ۶۸۰ جفت باز بود. پس از همسانه‌سازی، قطعات مورد نظر از دو جهت تعیین توالی شدند.

1-Mottling
2-Rugosity

3- Multiple alignment



شکل ۱- الکتروفورز محصول RT-PCR جدایه‌های PVY از گیاه گوجه‌فرنگی در ژل آگارز ۱ درصد در ناحیه ۶۸۰ جفت باز. ۱: کنترل منفی با گیاه سالم گوجه‌فرنگی. ۲: جدایه GB و ۳: جدایه GRA. M- مارکر دی.ان.ای ۱۰۰ جفت بازی (Thermo Scientific, USA)

Figure 1- Electrophoresis patterns of DNA fragments amplified by RT-PCR in 1% agarose gel related to two selected PVY isolates from tomato 1: healthy tomato plant extract as negative control. 2: GB and 3: GRA. M: 100 bp DNA marker (Thermo Scientific, USA)

با مقایسه ترادف‌های حاصل با اطلاعات موجود در بانک ژن در پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه BLASTn مشخص شد که قطعات همانندسازی شده در واکنش PCR در چهار نمونه مربوط به قسمتی از ژن پروتئین CI ویروس وای سیب‌زمینی است (شکل ۱). به دلیل شباهت جدایه‌ها، ترادف دو جدایه به نام‌های جدایه‌های GB (شهرستان بابلسر) و GRA (شهرستان قائمشهر) انتخاب و در بانک ژن به ترتیب با شماره دسترسی[1] KJ135781 و KJ135783 ثبت گردید. جدایه‌های آلوده دارای علائمی از قبیل موزائیک، پیسک، بدشکلی و چین‌خوردگی برگ‌ها بودند (شکل ۲).

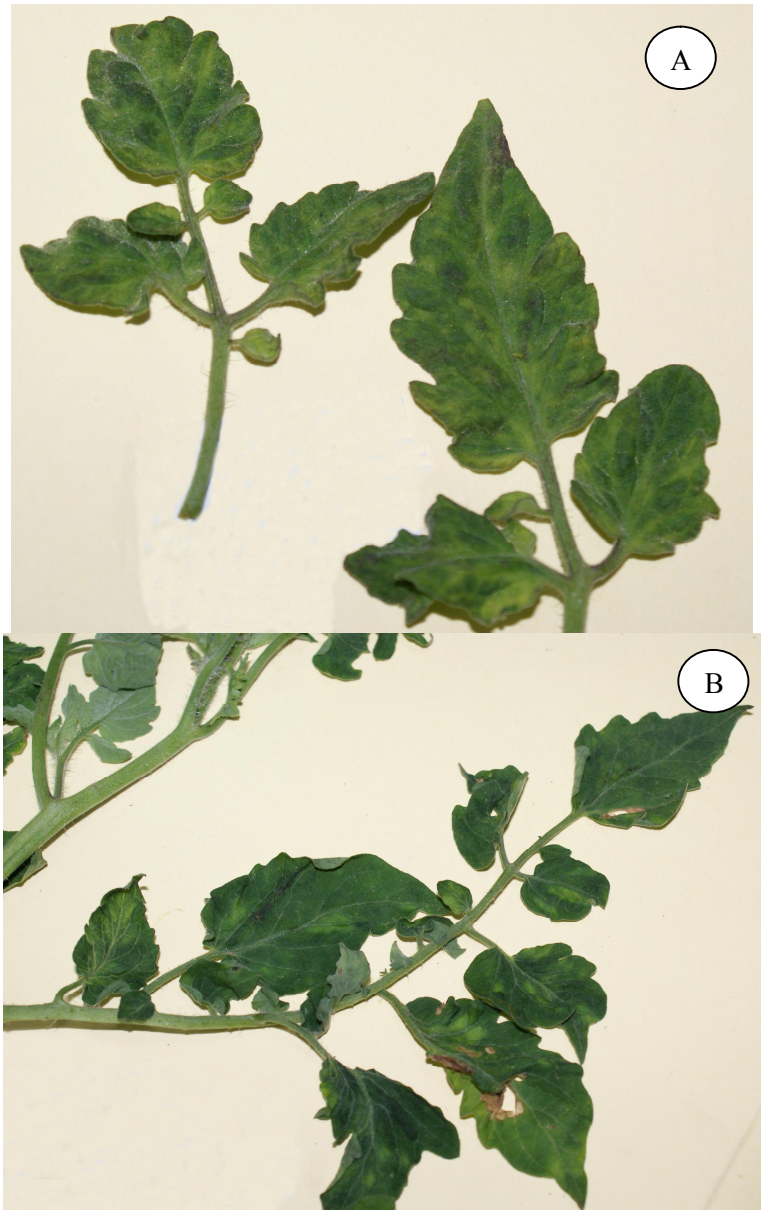
برای تعیین جایگاه تاکسونومیک جدایه‌های ایرانی، این جدایه‌ها با توالی‌های ۲۱۵ جدایه دیگر موجود در بانک ژن همردیف‌سازی و مقایسه شدند (اطلاعات نشان داده نشده است). ترادف‌های موجود از ناحیه ژنومی CI متناظر با ناحیه تعیین ترادف شده به اندازه حدود ۶۸۰ نوکلئوتید انتخاب و همردیف‌سازی شده بودند. از بین جدایه‌های مذکور، ۱۱۵ جدایه به عنوان نماینده انتخاب شده، با دو جدایه مورد بررسی در این تحقیق همردیف‌سازی و در یک درخت فیلوژنتیکی آنالیز شدند. PVA (*Potato virus A*) به عنوان عضو برون گروه (Outgroup) در نظر گرفته شد. دندروگرام حاصل از مطالعات تبارزائی (شکل ۳) نشان داد که ۱۱۷ جدایه مورد بررسی PVY در سه گروه اصلی جدا از هم قرار می‌گیرند (شکل ۳). گروه I با بیشترین تعداد طیف وسیعی از جدایه‌های اروپا، آمریکا، آسیا، استرالیا و آفریقا را در برگرفته است. این گروه خود به شش زیرگروه تقسیم می‌شود و دو جدایه ایرانی GB و GRA همراه با جدایه‌های nnp و Foggia (ایتالیا)، CN1 (استرالیا)، PRI-509 (هلند)، SON41 (فرانسه)، LYE84.2 (اسپانیا) و Tannat (اروگوئه) که همگی از نژاد C هستند در زیر گروه IF قرار گرفتند. گروه II شامل جدایه‌هایی از کشورهای کلمبیا، بلژیک، آمریکا، چین، ژاپن و کانادا است. در گروه III تنها یک جدایه Chile3 از کشور شیلی قرار گرفته است. مقایسه همردیف‌سازی چندگانه ترادف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی هر یک از جدایه‌های مذکور با سایر جدایه‌های موجود در دنیا نشان داد که در سطح نوکلئوتیدی جدایه GB بیشترین شباهت (۹۶/۵ درصد) را با جدایه LYE84.2 (از اسپانیا) و کمترین شباهت (۸۱/۳ درصد) را با جدایه‌های T13 (از ژاپن)، Tu_660 (کانادا)، ME162 (چین) و ID20 (آمریکا) دارد. جدایه GRA نیز بیشترین شباهت (۹۵/۷ درصد) را با جدایه LYE84.2 (از اسپانیا) و کمترین شباهت (۸۰/۹ درصد) را با جدایه‌های T13 (از ژاپن) و Tu_660 (کانادا) در سطح نوکلئوتیدی دارد. در سطح آمینواسیدی نیز جدایه‌های GB و GRA بیشترین شباهت (۹۹/۱ درصد) را با جدایه‌های LYE84.2 (اسپانیا)، Foggia (ایتالیا) و Tannat (اروگوئه) و کمترین شباهت (۹۳/۴

1- Accession number

درصد) را با جدایه T13 (ژاپن) داشتند. همچنین تشابه توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این دو جدایه با یکدیگر به ترتیب ۹۸/۴ و ۱۰۰ درصد بود. شباهت بالای آمینواسیدی بین جدایه‌ها بیانگر این است که جانشینی‌های نوکلئوتیدی در بین جدایه‌های این ویروس به صورت خاموش هستند چرا که باعث تغییرات کمتر آمینواسیدی شده و فشار انتخاب منفی روی ژن CI برای حفظ آمینواسید و حفظ ساختار پروتئین زیاد است. با توجه به دندروگرام رسم شده بین دندروگرام تبارزائی و شباهت نوکلئوتیدی جدایه‌ها هماهنگی وجود دارد.

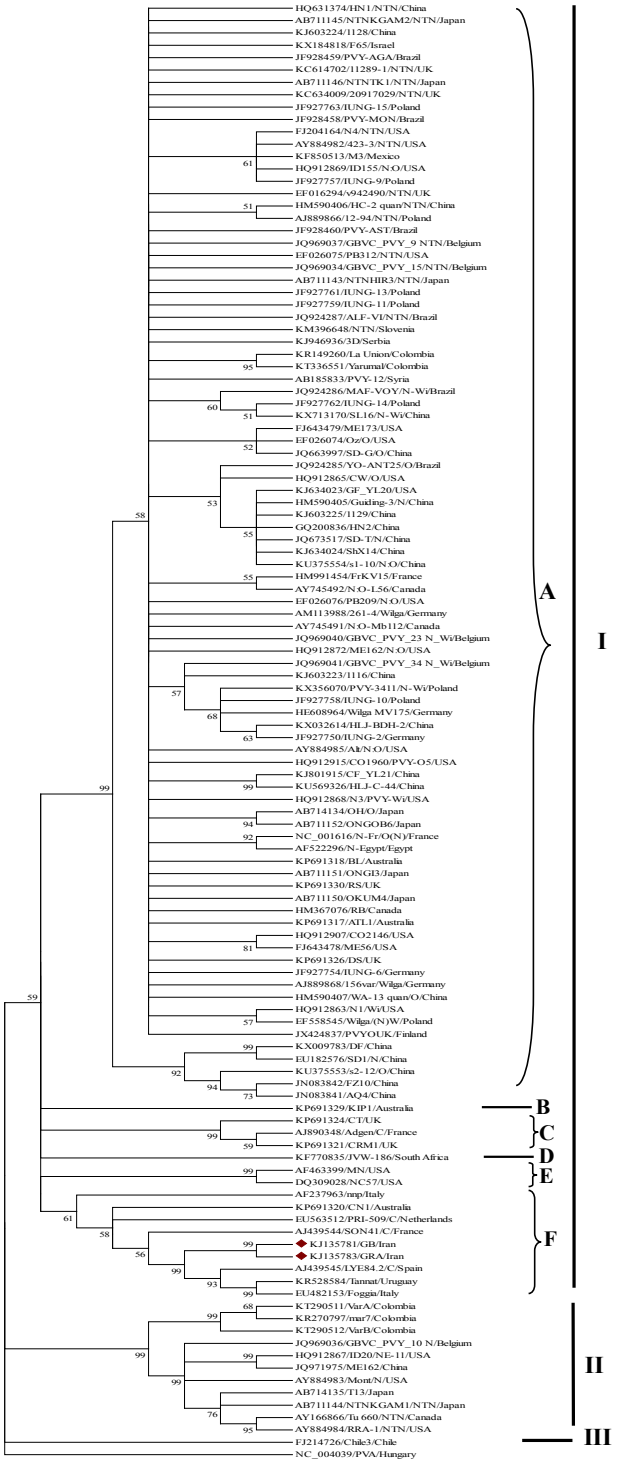
بحث

PVY یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیمارگرهای شناسایی شده از مزارع بادمجانیان در سراسر دنیا (۲۹) و ایران (۲۴) است. اهمیت آن به دلیل اقتصادی بودن، گستردگی وسیع و تاثیر مهمی که این ویروس روی کیفیت و کمیت محصولات دارد، می‌باشد. به منظور ایجاد ارقام مقاوم جهت کنترل خسارت ناشی از ویروس‌ها نیاز به آگاهی از سویه‌های ویروس‌های موجود در منطقه است.



شکل ۲- علائم موزائیک، چین‌خوردگی و بدشکلی در برگ گوجه‌فرنگی آلوده به جدایه PVY-GB (A) و جدایه PVY-GRA (B).

Figure 2- Symptoms of mosaic, rugosity and distortion on tomato leaves infected by PVY isolate GB (A) and isolate GRA (B)



شکل۳- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده حاصل از همردیف‌سازی ۶۸۰ نوکلئوتید از توالی‌های ژن CI در ۱۱۷ جدایه PVY با استفاده از روش Neighbor-joining در نرم افزار Mega 6. اعداد نمایانگر درصد bootstrap (براساس ۱۰۰۰ تکرار) هستند. جدایه‌ها روی درخت براساس شماره دسترسی/ نام جدایه/استرین/کشور منشا مشخص شده‌اند. جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه علامت‌دار شده‌اند. PVA (*Potato virus A*) به عنوان عضو برون گروه در نظر گرفته شده است.

Figure 2- Phylogenetic tree constructed from the alignment of 680 bp nucleotide sequences of CI gene of 117 PVY isolates using neighbor-joining method based on 1000 replicates. The numbers indicate bootstrap percentage. Isolates are indicated in the tree by the GenBank accession number/isolate name/strain relationship/the country of origin. Mazandaran isolates of PVY generated from this study are marked. PVA (*Potato virus A*) included as out-group.

استفاده از آغازگرهای دژنره نه تنها ردیابی سریع پوتی‌ویروس‌های زیادی را تسهیل کرده بلکه توالی‌یابی قسمتی از ژنوم برای اهداف تاکسونومیکی را نیز ممکن ساخته است. در این مطالعه، با استفاده از آغازگرهای دژنره مربوط به ژن کدکننده پروتئین CI که اختصاصی اعضای جنس پوتی‌ویروس است، پوتی-ویروس PVY در تعدادی از گیاهان گوجه‌فرنگی مشکوک به آلودگی، شناسایی شده و مورد توالی‌یابی قرار گرفت. هر دو جدایه تعیین توالی شده جزو نژاد C بودند. نژاد لکه نواری منقوط[1] (PVY^C) باعث ایجاد علایم موزائیک، روگوز و نکروز در برخی ارقام سیب‌زمینی شده (۷) و سبب بروز واکنش مقاومتی فوق حساسیت[2] در ارقام سیب‌زمینی دارای ژن مقاومت *Nc* می‌شود (۱۵). برخلاف دیگر نژادهای PVY، برخی جدایه‌های PVY^C قابل انتقال با شته نیستند (۴). مطابق نتایج این تحقیق جدایه‌های ایرانی به جدایه‌های اروپایی و یک جدایه از استرالیا و اروگوئه (در آمریکای جنوبی) نزدیکتر بودند، که مطابق با نتایج حسینی و همکاران (۱۴) و پوررحیم و همکاران (۲۵) است. منشا سیب‌زمینی به عنوان میزبان اصلی این ویروس از آمریکای جنوبی و مرکزی است و یک توضیح احتمالی برای چنین شباهت‌هایی این است که منشا بیشتر بذور سیب زمینی در ایران، غده‌های بذری وارد شده از اروپا است (نه از خاستگاه اصلی این گیاه یعنی آمریکای جنوبی)، از این‌رو این احتمال می‌رود که استرین‌های ایرانی PVY^C بطور بالقوه از نیاکان استرین‌های اروپایی PVY منشا گرفته باشند و در داخل کشور نیز از طریق شته‌های ناقل از گیاهان آلوده به سالم گسترش یافتند. این ویروس نژادهای مختلفی دارد و نژادهای PVY^O و PVY^N بیشتر از سایر نژادها از سراسر جهان گزارش گردیده‌اند. از سوی دیگر امکان نوترکیبی بین سویه‌ها وجود دارد که این موضوع می‌تواند منجر به ایجاد نژادها یا حتی پاتوتیپ‌های جدید با شدت ویرولانس بالاتر و سازگاری بیشتر شود. در دهه‌های اخیر نیز نژادهای جدیدی از قبیل PVY^{NTN} و PVY^{NW} گزارش شده‌اند که حاصل نوترکیبی بین نژادهای PVY^N و PVY^O بوده و دارای قطعاتی از ژنوم این دو نژاد می‌باشند (۵ و ۲۲). بنابراین راه اندازی و توسعه‌ی سیستم دقیق ردیابی و آگاهی از خصوصیات و تنوع بیمارگر و نژادهای وابسته در یک منطقه و اثر هم‌افزایی آن‌ها با دیگر بیمارگرها در مدیریت کنترل بیماری جهت کاهش خسارت ضروری است. مقاومت به PVY در میزبان‌ها در بسیاری از موارد پایین است (۳۴). از سوی دیگر از آنجا که ویروس در طبیعت توسط شته‌ها به صورت ناپایا منتقل می‌شود، کنترل مستقیم آن با مواد شیمیایی تاثیر چندانی ندارد، بنابراین کشت ارقام مقاوم مؤثرترین راه کنترل این ویروس می‌باشد. از آنجا این ویروس با ویروس‌های آلوده کننده دیگر مثل *Potato virus X*، *Potato virus S*، *Potato virus* M، *Potato virus A* و *Potato leaf roll virus* بیشتر به صورت همزمان با هم به صورت آلودگی مخلوط ظاهر می‌شوند (۳، ۱۳ و ۳۵) پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در زمینه آلودگی مخلوط و ارزیابی سهم هریک از این ویروس‌ها در ایجاد بیماری صورت گیرد. همچنین بررسی‌های بیشتری روی میزان ویرولانت بودن جدایه‌ها، توزیع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی آن‌ها جهت معرفی ارقام مقاوم با پایداری و کارآیی بیشتر با توجه اقلیم گرم و مرطوب شمال کشور صورت گیرد.

منابع

1- Adams M.J., Antoniw J.F., and Fauquet C.M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. Archives of Virology, 150:459–479.

2- Adams M.J., Zerbini F.M., French R., Rabenstein F., Stenger D.C., and Valkonen J.P.T. 2012. Family *Potyviridae*. p. 1069-1089. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (eds) Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Academic Press, San Diego, CA, USA.

3- Barker H., and Dale M.F.B. 2006. Natural resistance mechanisms of plants to viruses. Springer, Resistance to viruses in potato, p. 341–366.

4- Blanco-Urgoiti B., Tribodet M., Leclere S., Ponz F., Perez dé San Roman C., Legorburu F.J., and Kerlan, C. 1998. Characterization of potato potyvirus y isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. European Journal of Plant Pathology, 104:811-819.

5- Boonham N., Walsh K., Preston S., North J., Smith P., and 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- Cuevas J.M., Delaunay A., Visser J.C., Bellstedt D.U., Jacquot E., et al. 2012. Phylogeography and molecular evolution of *Potato virus Y*. PLoS ONE, 7(5): e37853.

7- De Bokx J.A., and Huttinga H. 1981. *Potato virus Y*: description of plant viruses. Kew, England: Common wealth Mycology Institute. Association of Applied Biology.

1- Stipple streak strain

2- Hypersensitivity

8- Edwardson J.R., and Christie R.G. 1997. Potyviruses. In: Florida Agricultural Experiment Station Monograph Series 18-II-Viruses infecting pepper and other solanaceous crops. Gainesville (FL): University of Florida. p. 424-524.
9- FAO. 2014. FAOSTAT-Agriculture, Production Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Databases.
10- Ghasemzadeh A., Sokhandanbashir N., and Khakvar R. 2012. Molecular detection of *Potato virus Y* using universal primers from Ardabil province. Journal of sustainable agriculture and production science, 22:67-80. (In Persian with English abstract)
11- Gholami S., Koohihabibi M., Bushehri A.A., and Naghavi M.R. 2007. Detection of *Potato virus Y* by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Iranian journal of agricultural sciences, 38:399-405. (In Persian)
12- Ha C., Coombsi S., Revill P.A., Harding R.M., Vu M., and Dale J.L. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Archives of Virology, 153:25-36.
13- Hameed A., Iqbal Z., Asad S., and Mansoor S. 2014. Detection of multiple potato viruses in the field suggests synergistic interactions among potato viruses in Pakistan. Plant Pathology Journal, 30(4):407–415.
14- Hosseini A., Massumi H., Heydarnejad J., Hossein pour A., and Varsani A. 2011. Characterisation of *Potato virus Y* isolates from Iran. Virus Genes, 42:128-140.
15- Jones R.A.C. 1990. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. Annals of Applied Biology, 117:93–105.
16- Kerlan C., and Moury B. 2008. *Potato virus Y*. p. 287-296. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, editors. Encyclopedia of Virology. Third Edition vol. 4. Elsevier; Oxford.
17- Lacroix C., Glais L., Kerlan C., Verrier J.L., and Jacquot E. 2010. Biological characterization of French *Potato virus Y* (PVY) isolates collected from PVY-susceptible or -resistant tobacco plants possessing the recessive resistance gene va. Plant Pathology, 59 (6):1133-1143.
18- Lee K.C., Wong S.M., Mahtani P.H., and Chng C.G. 1997. Sequence and phylogenetic analysis of the cytoplasmic inclusion protein gene of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*: its role in classification of the *Potyviridae*. Virus Genes, 14:41–53.
19- Lorenzen, J. H., Meacham, T., Berger, P. H., Shiel, P. J., Crosslin, J. M., Hamm, P. B., and Kopp, H. 2006. Whole genome characterization of *Potato virus Y* isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. Archives of Virology, 151:1055-1074.
20- Majdabadi Farahani S., Jafarpour B., Falahati Rastegar M., and Sabokkhiz M. 2011. Detection of (PVY^{NTN}) strain in potato fields of Khorasan Razavi province. Journal of plant protection, 24 (4): 385-390. (In Persian with English abstract)
21- Mostafae S., Mosahebi G., Koohihabibi M., and Ansari Dezfouli E. 2008. Study of biological and molecular characterization of pepper-PVY isolates. Iranian Journal of Virology, 1(4): 31-34.
22- Nie X., and 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.
23- Ogawa T., Nakagawa A., Hataya T., and Ohshima K. 2012. The genetic structure of populations of *Potato virus Y* in Japan; Based on the analysis of 2120 full genomic sequences. Journal of Phytopatholy, 160:661-673.
24- Pourrahim R., Farzadfar Sh., Golnaraghi A. R., and Ahoonmanesh A. 2007. Incidence and distribution of important viral pathogens in some Iranian potato fields. Plant Disease, 91:609-615.
25- Pourrahim R., and Farzadfar S. 2016. Population analysis of Iranian *Potato virus Y* isolates using complete genome sequence. The Plant Pathology Journal, 32(1):33-46.
26- Przybys M., Doroszewska T., and Berbec A. 2013. Point mutations in the viral genome-linked protein (VPg) of *Potato virus Y* probably correspond with ability to overcome resistance of tobacco. Journal of Food, Agriculture & Environment, 11(3&4):986-989.
27- Sadeghi M.S., Bejatnia S.A.A., Masumi M., and Izadpanah K. 2008. Characterization of a strain of *Potato virus Y* causing eggplant mosaic in southern Iran. Australasian Plant Pathology, 37(1):79-86.
28- Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., and Foster G. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 12:938–954.
29- Schubert J., Fomitcheva V., and Sztangret-Wi´sniewska J. 2007. Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. Journal of Virological Methods, 140:66 –74.
30- Shukla D.D., Ward C.W., and Brunt A.A. 1994. The *Potyviridae*. CAB International, Walling ford, UK. p. 74-112.
31- Singh R.P., Valkonen J.P.T., Gray S.M., Boonham N., Jones R.A.C., Kerlan C., and Schubert J. 2008. Discussion paper: the naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. Archives of Virology, 153:1–13.
32- Smith KM. 1931. Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group. Nature, 127:702.
33- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics

analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30:2725-2729.
34- Warren M., Cruger K., and Schoeman A.S. 2005. *Potato virus* Y (PYV) and *Potato leaf roll virus* (PLRV). PhD. thesis. Faculty of Natural and Agriculture Sciences, University of Pretoria.
35- Yardımc N., Çulal Kılıç H., and Demir Y. 2015. Detection of PVY, PVX, PVS, PVA, and PLRV on different potato varieties in Turkey using DAS-ELISA. Journal of Agriculture Science and Technology, 17:757-764.
36- Younesi B., Shams Bakhsh M., Safaie N., and Khelghatibana F. 2011. Simultaneous detection of several important viruses in naturally infected potato plants using multiplex RT-PCR in comparing with ELISA. Modern Genetics Journal, 6 (1):17-26. (In Persian with English abstract)