

شناسایی و بررسی فراوانی ویروسهای M و S سیبزمینی در برخی استانهای ایران

فاطمه طبسی نژاد^{1*} - بهروز جعفرپور² - حمید روحانی³ - محمد زکی عقل⁴ - محسن مهرور⁵

تاریخ دریافت: 1393/03/14

تاریخ پذیرش: 1393/07/15

چکیده

ویروسهای M سیبزمینی (*Potato virus M, PVM*) و S سیبزمینی (*Potato virus S, PVS*) متعلق به جنس *Carlavirus* از خانواده *Betaflexiviridae* می‌باشند. پیکره‌های این دو ویروس رشته‌ای و دارای یک قطعه آر.ان.ای تک لای مثبت به اندازه تقریبی 8/5 کیلو باز و شش چهارچوب ژنی است. برای تعیین فراوانی ویروسهای PVS و PVM از مزارع سیبزمینی مناطق مختلف ایران نمونه‌برداری شد. شناسایی گیاهان آلوده در آزمون الیزای مستقیم انجام و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طول کامل پروتئین پوششی ویروسهای M و S تکثیر شد. از 970 نمونه جمع‌آوری شده به ترتیب 10/5 و 17/1 درصد از نمونه‌ها آلوده به ویروس M سیبزمینی و ویروس S سیبزمینی بودند. بیشتر نمونه‌ها آلودگی مخلوط به هر دو ویروس را داشتند ولی فراوانی PVS بیشتر از PVM بود. در گیاهان محک مایه‌زنی شده با PVM علائم موزاییک خفیف و بدشکلی برگ و در گیاهان تلقیح شده با PVS علائم موزاییک، نکروز برگ و بدشکلی برگ مشاهده شد. ژن پروتئین پوششی ویروسهای M و S سیبزمینی به ترتیب 100- و 73/3 تا 96-70 درصد در سطح نوکلئوتیدی با جدایه‌های موجود در بانک ژن شباهت داشتند.

واژه‌های کلیدی: ویروس M سیبزمینی، ویروس S سیبزمینی، آزمون الیزا، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، درصد شباهت

مقدمه

زمینی است (11). علائم ویروس M سیبزمینی شامل موزاییک خفیف، ابلقی و زردی و پیچیدگی برگ و کوتولگی بوته است. در حالیکه این علائم در ویروس S سیبزمینی شدیدتر می‌باشد. شدت علائم به نژاد ویروس و حساسیت رقم سیبزمینی بستگی دارد. هر دو ویروس از طریق مکانیکی و بوسيله شته بصورت ناپایا منتقل می‌شوند (18 و 21).

ویروس M سیبزمینی اولین بار در سال 1923 توسط شولتز و فولسم (19) از آمریکا و ویروس S سیبزمینی برای اولین بار در هلند از روی سیبزمینی گزارش شد. این دو ویروس تقریباً از تمامی کشورهای دنیا گزارش شده اند (7، 13، 16 و 18). در ایران اولین بار جعفرپور و همکاران در سال 1368 (10) ویروس S سیبزمینی را از مزارع اطراف مشهد تنها با استفاده از روش الیزا شناسایی کردند. نقیب زاده و همکاران در سال 1387 (15) آلودگی همزمان دو ویروس A و M را در خراسان رضوی و شمالی بررسی کردند. پوررحیم و همکاران (16) دو ویروس M و S سیبزمینی را به همراه چند ویروس دیگر با استفاده از آزمون الیزا از مزارع سیبزمینی استان‌ها اردبیل، آذربایجان شرقی و غربی، همدان، زنجان، خراسان، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، فارس، تهران، هرمزگان و کرمان شناسایی کردند. با توجه به سطح زیر کشت سیبزمینی و اهمیت اقتصادی این محصول، در این تحقیق بررسی فراوانی این دو ویروس در مزارع

ویروسهای M سیبزمینی (*Potato virus M, PVM*) و S سیبزمینی (*Potato virus S, PVS*) متعلق به جنس *Carlavirus* از خانواده *Betaflexiviridae* می‌باشند (1، 2 و 3). پیکره‌های آن‌ها رشته‌ای شکل و دارای یک قطعه آر.ان.ای تک لای مثبت در حدود 8/5 کیلو باز هستند. ژنوم آن‌ها شش چهارچوب ژنی⁶ با کلاهک در انتهای 5' و دنباله پلی آدنوزین در انتهای 3' است (5، 6 و 8). اولین چهارچوب ژنی پروتئین پلیمرز ویروس به اندازه 223 کیلودالتون را کد می‌کند. چهارچوب‌های ژنی 2، 3 و 4 با یکدیگر همپوشانی داشته و تشکیل بلوک سه‌ژنی⁷ را می‌دهند، که نقش پروتئین حرکتی را دارند. چهارچوب‌های ژنی پنجم و ششم به ترتیب پروتئین پوششی به وزن 34 کیلودالتون و پروتئین سرکوبگر خاموشی ژن به وزن 11 کیلودالتون را کد می‌کنند (9، 12، 13، 14، 17 و 20). این دو ویروس گسترش جهانی داشته و میزبان اصلی آنها سیب

1، 2، 3 و 4 - به ترتیب دانشجوی دکتری، استادان و استادیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
* - نویسنده مسئول: (Email: Fatemeh_tabasinezhad@yahoo.com)

6- Open Reading Frame (ORF)

7- Triple gene block (TGB)

ایران بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

تعداد 970 نمونه برگه از مزارع سیب‌زمینی استان‌های همدان، فارس، کرمان، خراسان رضوی، خراسان شمالی و اصفهان جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری بصورت تصادفی یا از بوته‌های دارای علائم موزایک، زردی و پیچیدگی برگ و کوتولگی بوته انجام شد. از آزمون الایزای مستقیم (DAS-ELISA)¹ برای شناسایی نمونه‌های آلوده استفاده گردید (4). آنتی‌بادی اختصاصی و کنترل مثبت ویروس‌های PVS و PVM از شرکت DSMZ (آلمان) تهیه شد.

انتقال مکانیکی به گیاهان محک

انتقال ویروس‌های PVS و PVM به گیاهان محک با مایه‌زنی مکانیکی عصاره گیاه آلوده با استفاده از بافر فسفات 0/01 مولار با pH=7 بر روی گیاهان سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*)، گوجه فرنگی (*Lycopersicon escoletum*) و توتون (*Nicotiana glutinosa*) در مرحله 4-6 برگه انجام شد. گیاهان پس از مایه‌زنی به مدت 3 هفته در گلخانه نگهداری شدند.

شناسایی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

آر.ان.ای کل از نمونه‌هایی که آلودگی آنها توسط آزمون الایزا مشخص شده بود، با استفاده از کیت Accuzol, total RNA extraction kit (Bioneer) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. جفت آغازگرهای طراحی شده بر اساس ترادف کامل ژن پروتئین پوششی شامل PVS CP-F/PVM CP-R و PVS CP-F/PVS CP-R به ترتیب جهت شناسایی دو ویروس M و S سیب‌زمینی استفاده شد (جدول 1). ساخت cDNA با استفاده از آنزیم MMuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) انجام شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز با مخلوط کردن 4 میکرولیتر از رشته الگو با 1 میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (با غلظت 10 پیکومول)، 2/5 میکرولیتر بافر واکنش با غلظت 10 برابر، 1/25 میکرولیتر کلرید منیزیم (25 میلی مولار)، 0/5 میکرولیتر مخلوط dNTPs (10 میلی مولار) و 0/25 میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5 واحد در میکرولیتر) در حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام شد. پروفایل دمایی واکنش شامل 94 درجه سانتیگراد به مدت 3 دقیقه برای واسرشته سازی ابتدایی و بدنال آن 35 چرخه شامل 50 ثانیه در 94 درجه

سانتیگراد، 45 ثانیه در 54 درجه سانتیگراد و یک دقیقه در 72 درجه سانتیگراد و در نهایت به مدت 5 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد برای تکمیل پلیمریزاسیون بود.

محصول PCR در ژل آگاروز یک درصد حاوی DNA green (Pars tous) viewer الکتروفورز و باندهای حاصل با استفاده از دستگاه Gel documentation (Syngene-UK) عکسبرداری شد.

همسانه‌سازی و تعیین ترادف ژن پروتئین پوششی

ویروس‌های M و S سیب‌زمینی

قطعات حاصل از واکنش PCR با استفاده از کیت‌های Qiagen, Hilden,) QIAquick Gel Extraction Kit (Germany) و PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی شدند. سپس با استفاده از InsT/A clone PCR product cloning kit درون پلاسمید pTZ57R/T الحاق و در سویه DH5 α باکتری *Escherichia coli* همسانه‌سازی شدند. به منظور تشخیص پرگنه‌های نوترکیب، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی یا آغازگرهای عمومی M13 انجام شد.

پرگنه‌های نوترکیب حاوی قطعه مورد نظر در محیط کشت مایع LB² حاوی 100 میلی گرم بر میلی لیتر آمپی سیلین در دمای 37 درجه سانتیگراد کشت داده شدند. استخراج پلاسمید از سلول باکتری با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Prime Prep Plasmid DNA Isolation Kit (Genetbio) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام و جهت توالی‌یابی به کمپانی بیونیر ارسال شدند. ترادف حاصل با برنامه BLASTN در پایگاه اطلاعاتی NCBI با ترادفهای موجود در بانک ژن مقایسه شد.

نتایج و بحث

بررسی میزان آلودگی به ویروس‌های M و S

از مجموع 970 نمونه جمع‌آوری شده از مزارع سیب‌زمینی استان‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی، کرمان، اصفهان و همدان، به ترتیب 112 و 183 نمونه در آزمون الایزا به ویروس‌های M و S سیب‌زمینی آلوده تشخیص داده شدند (جدول 2). آلودگی در تمامی مناطق مورد بررسی با استفاده از آزمون پی سی آر نیز تأیید شد.

1- Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immune Sorbent Assay

2- Luria Bertani

جدول 1- ترادف آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن کد کننده پروتئین پوششی در ویروسهای M و S سیبزمینی

Table 1- specific primers, corresponding to a complete coat protein gene of PVM and PVS

آغازگر (Primer)	ترادف آغازگر (5'-3') (Primer sequence)	موقعیت روی ژنوم (Position on genome)	اندازه قطعه (Length of fragment)	منبع (Reference)
PVS CP-F	TGGGGAATCAGTCCGGCTGGTC	7082-7103	1118	(18)
PVS CP-R	AACTGGACCTGCGCTTAGGCT	8179-8199		
PVM CP-F	ATGGGAGATTCAACRAAGAA	7215-7234	915	(21)
PVM CP-R	CTTCATTTGTTATTCGACTT	8129-8112		

فراوانی ویروس‌های M و S سیبزمینی در جدول 2 ذکر شده است. بیشترین و کمترین آلودگی به ویروس M سیبزمینی به ترتیب در استان کرمان با 25 درصد آلودگی و استان همدان با 5 درصد آلودگی در نمونه‌های جمع‌آوری شده بود. استان کرمان با 42 درصد و خراسان رضوی با 14/9 درصد آلودگی بیشترین و کمترین تعداد نمونه‌های آلوده به ویروس S سیبزمینی را داشتند.

نتایج حاصل از شناسایی سرولوژیکی این دو ویروس نشان دهنده گسترش آن‌ها در تمامی مزارع سیبزمینی بود، که این نتیجه با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد (16 و 18). در نمونه‌های بررسی شده فراوانی PVS بیشتر از PVM بود و 8/7 درصد از نمونه‌های بررسی شده به‌طور همزمان به هر دو ویروس آلوده بودند. هر دو ویروس در مناطق سردسیر مانند خراسان شمالی و همدان از فراوانی کمتری نسبت به مناطق گرم‌تر برخوردار بودند. ویروس‌های PVS و PVM در مزرعه به‌وسیله شته‌ها به‌صورت ناپایا منتقل می‌شوند. با توجه به فراوانی بیشتر ویروس PVS در مزرعه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که انتقال این ویروس با راندمان بیشتری نسبت به PVM توسط شته ناقل انجام می‌شود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) آغازگرهای PVM CP-



شکل 1- علائم موزاییک خفیف و بدشکلی در برگ‌های جوان سیبزمینی مایه‌زنی شده با PVM (سمت راست)، موزاییک، نکروز شدید و بدشکلی برگ‌های جوان در گیاه سیبزمینی مایه‌زنی شده با PVS (سمت چپ)

Figure 1- Mild mosaic and malformation in potato plants were inoculated with PVM (right), mosaic, severe necrosis and malformation in young potato leaves inoculated by PVS (left)

جدول 2- نتایج حاصل از ردیابی ویروسهای M و S سیب زمینی در استانهای نمونه برداری شده در ایران (با استفاده از آزمون الایزا و PCR)

Table 2- The results of PVM and PVS detection in potato fields of Iran (with DAS-Elisa and PCR)

استان (Province)	منطقه (Region)	تعداد نمونه‌ها (Samples)	نمونه های آلوده به PVM (PVM infected samples)	نمونه های آلوده به PVS (PVS infected samples)	نمونه های آلوده به هر دو (PVM and PVS infected samples)
خراسان رضوی (Khorasan razavi)	قوچان (Ghuchan)	70	5 (7.1%)	7 (10%)	4 (5.7%)
	چناران (Chenaran)	40	5 (12.5%)	16 (40%)	4 (10%)
	فریمان (Fariman)	40	3 (7.5%)	8 (20%)	3 (7.5%)
	نیشابور (Neyshabour)	70	9 (12.8%)	21 (30%)	7 (10%)
	تربت جام (Torbatejam)	90	12 (13.3%)	9 (10%)	7 (7.8%)
	تربت حیدریه (Torbatehedyariye)	160	15 (9.4%)	13 (8.1%)	9 (5.6%)
	سبزوار (Sabzevar)	40	3 (7.5%)	2 (5%)	2 (5%)
		510	52 (10.2%)	76 (14.9%)	36 (7.1%)
خراسان شمالی (Northern Khorasan)	بجنورد (Bojnord)	40	6 (15%)	11 (27.5%)	5 (12.5%)
	فاروج (Farouj)	40	2 (5%)	4 (10%)	2 (5%)
		80	8 (10%)	15 (18.7%)	7 (8.7%)
اصفهان (Esfahan)	داران (Daran)	60	6 (10%)	10 (16.7%)	6 (10%)
	چادگان (Chadgan)	60	11 (18.3%)	8 (13.3%)	6 (10%)
	تیران (Tiran)	60	5 (8.3%)	16 (26.7%)	4 (6.6%)
		180	22 (12.2%)	34 (18.9%)	16 (8.9%)
کرمان (Kerman)	بردسیر (Bardsir)	100	25 (25%)	42 (42%)	20 (20%)
همدان (Hamedan)	بهار (Bahar)	100	5 (5%)	16 (16%)	5 (5%)
تعداد کل نمونه‌ها Total		970	112 (10.5%)	183 (17.1%)	84 (8.7%)



شکل 2- A: علائم موزاییک خفیف و بدشکلی در برگهای توتون (*Nicotiana glutinosa*) مایه زنی شده با PVM، B: موزاییک، نکروز شدید و

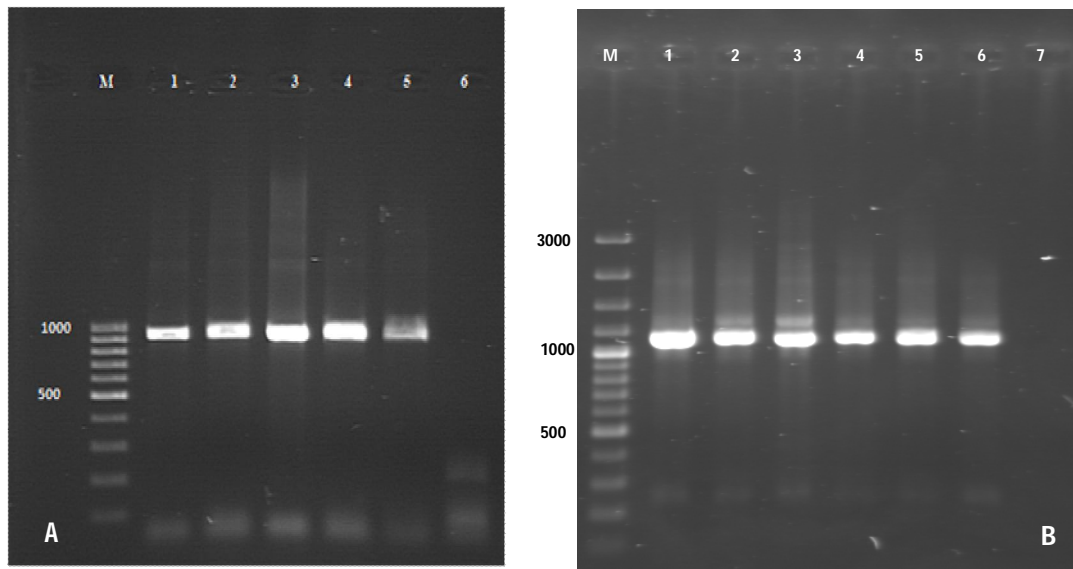
بدشکلی برگهای جوان توتون مایه زنی شده با PVS

Figure 2- A: Mild mosaic and malformation in *Nicotiana glutinosa* were inoculated with PVM, B: mosaic, severe necrosis and malformation in young leaves inoculated by PVS



شکل 3- علائم موزاییک و زردی در برگهای جوان گوجه فرنگی مایه‌زنی شده با PVM (سمت راست)، عدم مشاهده علائم در گوجه فرنگی مایه‌زنی شده با PVS (سمت چپ)

Figure 3- Mosaic and yellowing in tomato plants were inoculated with PVM (right), no symptoms in tomato leaves inoculated by PVS (left)



شکل 4- A: الکتروفورز محصول PCR از گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با ویروس PVM بر روی ژل آگاروز 1% با استفاده از جفت آغازگرهای PVM CP-F/PVM CP-R و مشاهده باند مربوط به ژن پروتئین پوششی در محدوده تقریبی 915bp، M- سایز مارکر، 1- شاهد مثبت، 2 تا 5- گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به PVM، 6- شاهد منفی B: الکتروفورز محصول PCR از گیاهان سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با ویروس PVS بر روی ژل آگاروز 1% با استفاده از جفت آغازگرهای CP F/CP R و مشاهده باند مربوط به ژن پروتئین پوششی در محدوده تقریبی 1118bp، M- سایز مارکر 1kb، 1- شاهد مثبت، 2 تا 6- سیب‌زمینی‌های آلوده به PVS، 7- شاهد منفی

Figure 4- A: Amplification of complete length of the PVM coat protein in RT-PCR, M: 100 bp.DNA Ladder (Thermoscientific), Lanes 2-5 represents infected samples, lane 1 positive DNA control, lane 6 Healthy potato, B: Amplification of complete length of the PVS coat protein in RT-PCR, M: 100 bp.DNA Ladder (Thermoscientific), Lanes 2-6 represents infected samples, lane 1 positive DNA control, lane 7 Healthy potato.

بیماری در برگ‌های بالایی آن‌ها ظاهر شد. در برگ‌های جوان سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با PVM علائم موزاییک خفیف و بدشکلی برگ مشاهده شد در حالی که در سیب‌زمینی‌های مایه‌زنی شده با PVS علائم موزاییک، نکروز برگ و بدشکلی در برگ‌های جوان

مقایسه برخی صفات بیولوژیکی ویروس‌های M و S سیب‌زمینی

دو هفته پس از مایه‌زنی نمونه‌های آلوده به ویروس M و S سیب‌زمینی به گیاهان سیب‌زمینی، توتون و گوجه فرنگی علائم

ویروسهای PVM و PVS در گیاهان محک نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این ارتباط هر دو ویروس مذکور در گیاهان سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با آزمون پی سی آر تشخیص داده شدند در حالیکه در بوته‌های گوجه‌فرنگی تنها آلودگی به PVM ردیابی شد. همچنین آلودگی توتونهای مایه‌زنی شده با PVM و PVS با استفاده از آزمون پی سی آر محرز شد.

علایم مشاهده شده در بوته‌های سیب‌زمینی آلوده به PVM یا PVS با علائم گزارش شده توسط سایر محققین مطابقت دارد (4، 5، 7). بر اساس گزارشهای موجود گوجه‌فرنگی میزبان افتراقی PVM از PVS است و عدم ردیابی PVS در این گیاه دور از ذهن نیست (2).

مشاهده شد (شکل 1). در برگ توتون‌های مایه‌زنی شده با PVM علائم موزاییک و بدشکلی برگ مشاهده شد در حالی‌که در توتون‌های مایه‌زنی شده با PVS علائم موزاییک، نکروز شدید و بدشکلی در برگ‌های جوان ظاهر شد (شکل 2). در بوته‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با PVM علائم موزاییک، زردی و بدشکلی برگ مشاهده شد در حالی‌که در بوته‌های مایه‌زنی شده با PVS علائم خاصی وجود نداشت (شکل 3).

با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی مربوط به پروتئین پوششی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با PVM قطعه‌ای به طول 915 جفت باز و از گیاهان آلوده به PVS قطعه 1118 جفت‌بازی تکثیر شد (شکل 4). تلفیح همزمان

منابع

- 1- Adams M.J., and Antoniw J.F. 2004. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archive of Virology*, 149:1045–1060.
- 2- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L., and Zurcher, E.J. 1996. `Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database.
- 3- Cavileer T.D., Clarke R.C., Corsini D.L., and Berger P.H. 1998. A new strain of potato *carlavirus* M. *Plant Disease*, 82:98-102.
- 4- Clark M.F., and 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.
- 5- Cox B.A., and Jones R.A.C. 2010. Genetic variability in the coat protein gene of Potato virus S isolates and distinguishing its biologically distinct strains. *Archive of Virology*, 155:1163–1169.
- 6- Flatken S., Ungewickell V., Menzel W., and Maiss, E. 2008. Construction of an infectious full-length cDNA clone of potato virus M. *Archive of Virology*, 153:1385–1389.
- 7- Foster G.D., and Mills P.R. 1992. The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of potato virus S. *Virus Genes*, 6:213–220.
- 8- Ge B.B., He Z., Jiang D.M., Zhang Z.X., Liu G.J., and Wang H.Q. 2012. Characterization and complete nucleotide sequence of potato virus M isolated from tomato in China. *Acta Virology*, 56(3):261-263.
- 9- Gramstat A., Courtzopoulos A., and Rohde W. 1990. The 12-kDa protein of potato virus M displays properties of a nucleic acid-binding regulatory protein. *FEBS Letters*, 276:34-38.
- 10- Jafarpour B. 1989. Identification of Potato Virus S and Potato Virus X in Mashhad. P. 166. Proceedings of the 9th Iranian Plant Protection Congress.
- 11- Mahy B.W.J., and Van Regenmortel M.H.V. 2010. Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Elsevier Academic Press, 4.
- 12- Martelli G.P., Adams M.J., Kreuze J.F., and Dolja, V.V. 2007. Family *flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. *Phytopathology*, 45:73-100.
- 13- Matousek J., Schubert J., Dedic P., and Pta'cek, J. 2000. A broad variability of potato virus S (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22:29–37.
- 14- Matousek J., Schubert J., Pta'cek J., Kozlova' P., and Dedic, P. 2005. Complete nucleotide sequence and molecular probing of potato virus S genome. *Acta Virology*, 49:195–205.
- 15- Naghibzade M., Jafarpour B., and Falahati rastegar M. 2008. Identification and Distribution of Potato Virus A in Razavi and Northern Provinces of Iran. P. 520. Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress.
- 16- 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.
- 17- Rupasov V.V., Morozov S.YU., Kanyuka K.V., and Zavriev, S.K. 1989. Partial nucleotide sequence of potato virus M RNA shows similarities to *potexviruses* in gene arrangement and the encoded amino

- acid sequences. *Journal of General Virology*, 10:1861-1869.
- 18- Salari Kh., Massumi H., Heydarnejad J., Hosseini pour A. and Varsani, A. 2011. Analysis of Iranian Potato virus S isolates. *Virus Genes*, 43:281-288.
- 19- Schultz E.S., and Folsom D. 1923. Transmission, variation, and control of certain degeneration diseases of Irish potatoes. *Journal of Agricultural Research*, 25:43-147.
- 20- Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., and Maejima K. 2011. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by *potato virus M*. *Journal of Virology*, 85:10269-10278.
- 21- Xu H., D'Aubin J., and Nie, J. 2010. Genomic variability in *Potato virus M* and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes. *Virology journal*, 7(1):25.