

تعیین فراوانی، خصوصیات بیولوژیکی و جایگاه تبارزایی جدایه‌های ویروس A سیب‌زمینی بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی در دو استان خراسان رضوی و مرکزی

فاطمه حسینی^۱، رضا پوررحیم^{۲*}، مژده ملکی^۳ و شیرین فرزادفر^۲

۱، فارغ التحصیل کارشناسی‌ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا

۲، استادیاران بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

۳، استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۶/۴)

Incidence, Biological Properties and Phylogenetic Status of Potato Virus A Isolates in Khorasan-e-Razavi and Markazi Provinces Based on Coat Protein Gene

F. HOSSEINI¹, R. POURRAHIMI^{2*}, M. MALEKI³ AND SH. FARZADFAR²

1, Graduated M.Sc. Plant Pathology, Islamic Azad University, Varamin Pishva Branch, Varamin,

Iran; 2, Assistant Professors, Plant Virus Research Department, Iranian Research Institute of Plant

Protection, Tehran, Iran; 3, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Islamic Azad University,

Varamin Pishva Branch. Varamin, Iran.

(Received: May 9, 2013 - Accepted: August 26, 2013)

Abstract

Potato virus A is one of the most important viruses infecting potato in the world. During spring and summer of the year 2011, a total of 280 symptomatic and 463 random leaf samples, and 1186 tuber samples were collected from potato fields located in Khorasan-e-razavi and Markazi provinces, Iran and tested for PVA infection using DAS-ELISA method. Based on the results obtained, PVA infection was recorded in 39 and 11 % of symptomatic leaf samples, 23 and 6 % of random leaf samples and 17 and 13 % tuber samples in Markazi and Khorasan-e-Razavi provinces, respectively. Moreover, biological properties of the selected PVA isolates were studied using host range studies on 10 plant species. Four PVA isolates were selected and their coat protein (CP) gene was amplified by specific primers using RT-PCR and their nucleotide sequences were determined (KF152950-3). The CP sequences of four Iranian and 37 Non-Iranian (from other parts of the world) PVA isolates were compared and a phylogenetic tree was reconstructed using Neighbor Joining-NJ method with 1000 bootstrap value. The PVA isolates in the phylogenetic tree were clustered in two main groups (I and II) where group I had two subgroups (IA and IB). Three Iranian PVA isolates (Ar2, Kh4 and F2 all from Markazi province) were grouped in IA subgroup and showed highest similarity with two isolates from Germany and Netherlands (Y11427 and X91968) and the other Iranian PVA isolate (Gh4 from Khorasan-e-Razavi P.) was grouped in IB subgroup showing the highest similarity with an isolate from China (DQ309063). Comparison of the deduced amino acid (aa) sequences of CP among the four Iranian and the other PVA isolates revealed substitution of 2 to 7 aa mainly in N terminal of CP. This is the first phylogenetic study on Iranian PVA isolates and also the first report of PVA infection in Markazi province. This study showed variation among PVA isolates in Iran. These data could be considered in potato breeding programs in order to achieve PVA resistant cultivars.

Keywords: Potato virus A, detection, RT-PCR

چکیده

ویروس A سیب‌زمینی (PVA) از جمله ویروس‌های مهم خسارت‌زا در سیب‌زمینی می‌باشد. در بهار و تابستان ۱۳۸۹، تعداداً ۲۸۰ و ۴۶۳ نمونه برگ‌ی به ترتیب علائم‌دار و تصادفی و نیز تعداد ۱۳۳۶ غده از مزارع سیب‌زمینی استان‌های خراسان رضوی و مرکزی جمع‌آوری و کل نمونه‌ها با استفاده از آزمون الایزا از نظر آلودگی به ویروس PVA مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل بیانگر گسترش آلودگی به این ویروس در ۳۹ و ۱۰ درصد نمونه‌های علائم‌دار، ۲۴ و ۵ درصد نمونه‌های تصادفی و ۱۷ و ۱۳ درصد غده‌های جمع‌آوری‌شده به ترتیب از دو استان مرکزی و خراسان رضوی بود. همچنین دامنه میزبانی جدایه‌های PVA به‌دست آمده در شرایط گلخانه روی ۱۰ جنس و گونه گیاه محک مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش RT-PCR ناحیه ژن پروتئین پوششی (CP) چهار جدایه PVA، تکثیر و توالی آن تعیین شد (رس‌شمار). توالی نوکلئوتیدی ژن CP چهار جدایه ایرانی PVA با توالی مربوطه در ۳۷ جدایه خارجی این ویروس مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفته و درخت تبارزایی رسم گردید. در این درخت، ۴۱ جدایه مورد بررسی بر اساس ژن CP به دو گروه اصلی I (شامل دو زیرگروه IA و IB) و II تقسیم شدند. سه جدایه ایرانی Ar2، Kh4، F2 از استان مرکزی در زیرگروه IA دارای بیشترین شباهت با جدایه‌هایی از آلمان و هلند (به ترتیب Y11427 و X91968) و جدایه Gh4 در زیرگروه IB دارای بیشترین شباهت با جدایه‌ای از چین (DQ309063) بود. این اولین مطالعه در زمینه روابط تبارزایی جدایه‌های ایرانی PVA و نیز اولین گزارش از وقوع آلودگی به این ویروس در مزارع سیب‌زمینی استان مرکزی می‌باشد. نتایج حاصله نشان‌دهنده حضور واریانت‌ها و جدایه‌های متنوع این ویروس در کشور بوده و این اطلاعات در تهیه و اصلاح ارقام مقاوم سیب‌زمینی در برابر این ویروس حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: ویروس A سیب‌زمینی، ردیابی، تبارزایی، واکنش

زنجیره‌های پلیمرز

(King et al., 2012). در مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های PVA در خارج از کشور مشخص شده است که دو ژن P1 و CP در مقایسه با سایر نواحی ژنوم دارای بیشترین تنوع بوده‌اند (Andrejeva et al., 1996; Kekarainen et al., 1999).

آلودگی به PVA در مزارع سیب‌زمینی ۱۱ استان کشور گزارش شده است (Pourrahim et al., 2007). دو استان خراسان رضوی و مرکزی با سطح کشت به ترتیب ۵۹۰۰ و ۱۵۰۰ هکتار و تولید ۱۶۸ و ۳۳ هزار تن سیب‌زمینی در سال ۱۳۹۰ از جمله مراکز مهم تولید سیب‌زمینی خوراکی و نیز بذری می‌باشند (Anonymous, 2010) تاکنون در مورد تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی ویروس PVA در ایران هیچ مطالعه‌ای به عمل نیامده است. در این بررسی فراوانی و پراکنش PVA در مزارع سیب‌زمینی دو استان فوق مورد بررسی قرار گرفته و ضمن تعیین توالی ژن CP برخی جدایه‌های ایرانی PVA، جایگاه تبارزایی آن‌ها در بین جدایه‌های خارجی این ویروس برای اولین بار تعیین گردید. این اطلاعات در مدیریت این بیماری و به‌ویژه تهیه و اصلاح ارقام مقاوم به ویروس PVA دارای اهمیت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و تشخیص ویروس

ضمن بازدید از ۱۶ مزرعه سیب‌زمینی در هر یک از استان‌های خراسان رضوی و مرکزی، از بوته‌های سیب‌زمینی در مجموع ۲۸۰ نمونه علائم‌دار (از جمله موزائیک، پیسک و روگوز)، ۴۶۳ نمونه تصادفی و ۱۱۸۶ غده جمع‌آوری گردید. همچنین نمونه‌های علف‌هرز (شامل تاج‌ریزی سیاه، تاج‌خروس، عروسک پشت‌پرده، تاتوره، پیچک صحرايي، سلمه‌تره سفید و سلمه‌تره قرمز) با علائم مشکوک در داخل و حاشیه مزارع سیب‌زمینی جمع‌آوری شد. کل نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ویروس PVA و براساس روش DAS-ELISA مورد آزمون قرار گرفتند (Clark and Adams, 1997). آنتی‌بادی و شاهدهای مثبت (آلوده) و منفی (سالم) از شرکت بیوربا (سوئیس) تهیه شده و طبق روش توصیه‌شده توسط شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفتند. حدود ۶۰ دقیقه بعد از افزودن محلول سوبسترا، نتایج آزمون با استفاده از دستگاه الیزا ریدر مدل Multiscan 344-Labsystem (ساخت فنلاند) ارزیابی و ثبت شد. نمونه‌هایی که میزان جذب نوری چاهک مربوطه در ۴۰۵ نانومتر برابر یا بیشتر از سه برابر میانگین

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از محصولات زراعی مهم ایران و جهان می‌باشد. در سال ۲۰۱۱ سطح کشت این محصول در دنیا حدود ۱۹/۲ میلیون هکتار با تولید ۳۷۴ میلیون تن و در ایران به ترتیب ۱۵۰ هزار هکتار با ۴/۸ میلیون تن بود. عملکرد متوسط سیب‌زمینی در ایران ۳۲ تن در هکتار می‌باشد که با مقادیر متناظر در کشورهای پیشرو مانند آمریکا و هلند (به ترتیب ۴۲ و ۴۶ تن در هکتار) فاصله دارد (Anonymous, 2011).

ویروس A سیب‌زمینی (Potato virus A-PVA) یکی از عوامل ویروسی مهم بیماری‌زا در گیاه سیب‌زمینی می‌باشد که دارای گسترش جهانی است. ویروس PVA جزو خانواده Potyviridae و جنس *Potyvirus* می‌باشد (King et al., 2012). میزبان اصلی این ویروس، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) می‌باشد، اما می‌تواند دیگر گونه‌های خانواده سولاناسه را نیز آلوده کند (Murphy and McKay, 1932). این ویروس می‌تواند تا ۴۰ درصد موجب کاهش محصول در مزارع سیب‌زمینی گردد (Loebenstein, 2001). ویروس PVA در بیشتر ارقام سیب‌زمینی باعث ایجاد علائم پیسک و موزائیک می‌گردد که دامنه آن از خفیف تا شدید متفاوت است. این ویروس موزائیک رگبری مشخصی ایجاد نموده، رگبرگ‌ها عمیق‌تر شده و حواشی برگ چروکیده می‌شود. تفاوت رشد رگبرگ‌ها و پهنک برگ باعث ایجاد علائم رگوز^۱ می‌گردد. ویروس PVA در صورت آلودگی توأم با سایر ویروس‌های بیمارگر در سیب‌زمینی مانند PVX، PVY و PLRV باعث خسارت شدیدی می‌گردد (de Bokx and van der Want, 1987). ویروس PVA در طبیعت توسط چندین گونه شته به روش ناپایا و نیز از طریق غده آلوده و در شرایط آزمایشگاهی به روش مایه‌زنی مکانیکی و پیوند علفی منتقل می‌شود (Bartels, 1971).

ژنوم PVA از یک مولکول RNA خطی تک‌رشته‌ای به طول حدود ۹۵۰۰ باز تشکیل شده است که دارای یک قاب خواندنی باز (ORF) بوده و ترجمه آن منجر به ساخت یک پروتئین بزرگ (پلی‌پروتئین) به وزن حدود ۳۴۰ کیلودالتون شده و طی برش آن، آنزیم‌ها و پروتئین‌های ساختمانی ویروس از جمله پروتئین پوششی^۲ (CP) تولید می‌شوند

1. Rugose
2. Coat protein

میکرولیتر آغازگر PVA-R (غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر بافر MMuLV-10X (سیناژن-ایران)، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP Mix با غلظت ۱۰ میلی مولار (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر (۲۰۰ واحد) از آنزیم رونوشت برداری برگردان (MMuLV) (سیناژن)، ۰/۵ میکرولیتر (۲۰ واحد) از ترکیب (RNase inhibitor) (Fermentas، لیتوانی)، ۴ میکرولیتر از RNA استخراج شده و ۹/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر مدل Primus (شرکت MWG آلمان) انجام گردید. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتری شامل ۵ میکرولیتر بافر 10XPCR (سیناکلون، تهران)، ۱/۵ میکرولیتر از محلول MgCl₂ (با غلظت ۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر dNTP Mix با غلظت ۱۰ میلی مولار (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase (معادل ۵ واحد) (سیناکلون)، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای PVA-F و PVA-R (غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۵ میکرولیتر از محصول cDNA و ۳۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه اختصاصی PCR (سیناکلون، تهران) انجام گردید. برنامه این واکنش شامل ۱ مرحله ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه هر یک مشتمل بر ۵۰ ثانیه در ۹۵ درجه، ۱ دقیقه در ۴۸ درجه و ۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود که در پایان واکنش محصول به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی ۱ میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید در بافر TBE 1X الکتروفورز گردیده و از باندهای تشکیل شده توسط دستگاه UV-illuminator (مدل Imaco، ساخت هلند) عکس گرفته شد.

آنالیز تبارزایی

قطعات DNA تکثیر یافته طی واکنش PCR در مورد چهار جدایه PVA شامل جدایه های Ar2، Kh4 و F2 به ترتیب از اراک (منطقه نظام آباد)، خمین (منطقه دیوکن) و فراهان استان مرکزی و جدایه Gh4 از قوچان استان خراسان رضوی، با استفاده از کیت Wizard SV Gel/PCR Clean Up (ساخت پرومگا، آمریکا) و طبق روش توصیه شده توسط سازنده کیت، از ژل آگارز استخراج شده و توالی نوکلئوتیدی آن‌ها با استفاده از سرویس های تجاری موجود تعیین شد. توالی ژن CP به دست آمده در مورد چهار جدایه ایرانی PVA با یکدیگر و با ۳۷ توالی کامل ژن CP

جذب چاهک شاهد سالم بود، به عنوان نمونه آلوده در نظر گرفته شدند.

بررسی دامنه میزبانی

به منظور خالص سازی بیولوژیکی جدایه ها و مطالعات دامنه میزبانی، نمونه های آلوده به PVA انتخاب و پس از عصاره گیری در بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۷/۲ روی گیاهان عروسک پشت پرده (*Physalis floridana*) مایه زنی مکانیکی گردیدند (Singh, 1982). پس از سه بار انتقال متوالی تک لکه های موضعی ظاهر شده روی این گیاه، برای تکثیر ویروس از گیاه *Nicotiana tabacum* cv. Samsun استفاده شد. سیستمیک شدن فقط ویروس PVA در این گیاهان، با استفاده از آزمون الایزا مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. برای مطالعه دامنه میزبانی، تعداد ۲۱ جدایه PVA از گیاه سیب زمینی و ۲ جدایه به دست آمده از نمونه علف هرز *Solanum nigrum* که در آزمون الایزا با آنتی بادی ویروس PVA دارای واکنش مثبت بودند، با در نظر گرفتن شدت و نوع علائم متفاوت و از مناطق مختلف، انتخاب و روی ۱۰ جنس و گونه گیاه محک متعلق به ۲ خانواده گیاهی *Solanaceae* و *Chenopodiaceae* مایه زنی شدند. این گیاهان در شرایط گلخانه تا سه ماه نگهداری و علائم ایجاد شده روی هر یک از این گیاهان ثبت گردید.

تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی جدایه های PVA به کمک واکنش RT-PCR

بر اساس نوع واکنش گیاهان محک، تعداد ۱۱ جدایه (شامل ۷ جدایه از استان مرکزی و ۴ جدایه از استان خراسان رضوی) انتخاب شده و ناحیه ژن پروتئین پوششی (CP) آن‌ها با استفاده از روش RT-PCR^۱ تکثیر شد. ابتدا RNA کل گیاه با استفاده از دو روش کیت کیاژن (QIAGEN-USA) و محلول تجاری RNXplus (سیناژن-ایران) طبق توصیه شرکت های سازنده آن‌ها از گیاهان توتون رقم سامسون آلوده به این جدایه ها استخراج شد. در این آزمون، از یک جفت آغازگر

(PVA-F: 5'-GTACTGAACTGGAAAAGTACT-3')

و (PVA-R: 5'-CCCTGACAGTTGAAACATAA-3') طراحی شده برای تکثیر ناحیه ژن CP ویروس PVA استفاده گردید (Rajamaki et al., 1998). ساخت رشته مکمل (cDNA) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل یک

1. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

جدایه‌های غیرایرانی این ویروس قابل دسترسی در بانک ژن^۱ مقایسه شدند (جدول ۱). همردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL X, ver. 1.83 انجام گردید. نرم‌افزاری TreeView, ver. 1.5.2 رسم گردید.

روش Neighbor Joining (NJ) و ۱۰۰۰ مرتبه bootstrap انجام شده و درخت تبارزایی با استفاده از برنامه نرم‌افزاری TreeView, ver. 1.5.2 رسم گردید.

1. GenBank

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های PVA که توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی آن‌ها در مطالعه تبارزایی مورد استفاده قرار گرفته است

جدایه	کشور	میزبان اصلی	رس‌شمار	منبع
U	United States	<i>S. tuberosum</i>	AF543709	Valkonen <i>et al.</i> , 1995
Ali	Germany	<i>S. tuberosum</i>	AJ131401	Andrejeva <i>et al.</i> , 1996
B11	Hungary	-	Z21670	Puurand <i>et al.</i> , 1992
147-PVA	United Kingdom (UK)	<i>S. tuberosum</i>	GU144320	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
140-PVA	UK	<i>S. tuberosum</i>	GU144318	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
137-PVA	UK	<i>S. tuberosum</i>	GU144316	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
146-PVA	UK	<i>S. tuberosum</i>	GU144319	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
139-PVA	UK	<i>S. tuberosum</i>	GU144317	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
136-PVA	UK	<i>S. tuberosum</i>	GU144315	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
Sam-22-PVA	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	GU144314	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
Sam-19-PVA	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	GU144312	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
Sam-10-PVA	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	GU144310	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
Sam-05-PVA	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	GU144308	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
Sam-01-PVA	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	GU144306	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
Sam-09-PVA	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	GU144309	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
Sam-03-PVA	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	GU144307	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
Can	Canada	<i>S. tuberosum</i>	S51667	Collins <i>et al.</i> , 1993
-	India	<i>S. tuberosum</i>	GU369815	
Yunnan-1	China	<i>S. tuberosum</i>	DQ309063	
-	India	<i>S. tuberosum</i>	GU256063	
Maine	United States	<i>S. tuberosum</i>	Z49088	Valkonen <i>et al.</i> , 1995
A-ASL	Finland	<i>S. tuberosum</i>	X59985	Puurand <i>et al.</i> , 1992.
Hangzhou	China	<i>S. tuberosum</i>	AJ307035	
Pon	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	Y11428	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Pen	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	Y11424	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Dat	Germany	<i>S. tuberosum</i>	Y11426	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
716/12	Germany	<i>S. tuberosum</i>	Y11427	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Tan	Finland	<i>S. tuberosum</i>	Y11425	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Pit	Finland	<i>S. tuberosum</i>	Y11420	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Lin	The Netherlands	<i>S. tuberosum</i>	Y11423	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Her	Finland	<i>S. tuberosum</i>	Y11421	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Alc	The Netherlands	<i>S. tuberosum</i>	Y11422	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Afg	The Netherlands	<i>S. tuberosum</i>	Y10125	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Sab	The Netherlands	<i>S. tuberosum</i>	Y10126	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Adv	Germany	<i>S. tuberosum</i>	Y10250	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
A20	UK/Scotland	<i>S. tuberosum</i>	Y10079	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Jul	The Netherlands	<i>S. tuberosum</i>	X91968	Rajamaki <i>et al.</i> , 1998
Ar2	Iran (Arak)	<i>S. tuberosum</i>	KF152950	This study
F2	Iran (Farahan)	<i>S. tuberosum</i>	KF152951	This study
Gh4	Iran (Ghochan)	<i>S. tuberosum</i>	KF152952	This study
Kh4	Iran (Khomein)	<i>S. tuberosum</i>	KF152953	This study

(MegAlign ver. CLUSTAL W *et al.*, 1994) و یا (5.00, DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA; Burland, 2000) مورد مقایسه قرار گرفتند. چهار جدایه خارجی مورد استفاده برای مقایسه توالی اسیدآمینه‌ای شامل دو جدایه PVA-M (رس‌شمار Z49088) و PVA-U (رس‌شمار Z49087) از آمریکا، جدایه Can (رس‌شمار S51667) از کانادا و جدایه PVA-B11

بر اساس توالی نوکلئوتیدی به دست آمده در مورد چهار جدایه ایرانی PVA و به کمک نرم‌افزار Bioedit، توالی اسیدآمینه‌ای فرضی^۲ پروتئین CP این جدایه‌ها مشخص شد. این توالی‌ها با توالی اسیدآمینه‌ای چهار جدایه تعیین خصوصیات شده این ویروس از اروپا و آمریکا با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL X, ver. 1.83 (Thompson *et al.*)

2. Predicted

استان مرکزی (۲۳ درصد) بیشتر از مقدار متناظر در مورد شهرستان‌های مورد بررسی در استان خراسان رضوی (۶ درصد) بود (جدول ۲). بررسی غده‌های جمع‌آوری شده با آزمون الایزا حاکی از آلودگی ۱۳ و ۱۷ درصدی به ترتیب در استان‌های خراسان رضوی و مرکزی بود. همچنین در بررسی نمونه‌های علف‌هرز جمع‌آوری شده با آزمون الایزا فقط ۲ نمونه علف هرز *Solanum nigrum* و همچنین ۲ نمونه علف‌هرز سلمک سفید به وپروس PVA آلوده بودند.

بررسی خصوصیات بیولوژیکی

علائم ایجاد شده روی گیاهان محک مایه‌زنی شده با چهار جدایه PVA (شامل Ar2، Kh4، Gh4 و Sh1) در جدول ۳ ارائه شده است. انتقال آلودگی و سیستمیک شدن جدایه‌های PVA در گیاهان مایه‌زنی شده، به کمک آزمون الایزا مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

(رس‌شمار Z21670) از مجارستان (اروپا) بودند (جدول ۱).

نتایج

تشخیص نمونه‌های آلوده و علائم وپروس

وضعیت رویشی بوته‌ها در مزارع سیب‌زمینی در استان‌های مرکزی و خراسان رضوی با هم تفاوت قابل ملاحظه‌ای نشان می‌داد و درصد فراوانی علائم (پیسک و موزائیک) در مزارع مورد بازدید در استان مرکزی (۱۵ تا ۲۰ درصد) بیشتر از مزارع مورد بازدید در استان خراسان رضوی (۵ تا ۱۰ درصد) بود. نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های برگ تصادفی با استفاده از آزمون الایزا نشان داد که شهرستان اراک در استان مرکزی (با ۵۴٪) و شهرستان چناران در استان خراسان رضوی (با ۱۱٪)، دارای بیشترین درصد آلودگی به وپروس PVA می‌باشند. درصد آلودگی متوسط نمونه‌های تصادفی در شهرستان‌های

جدول ۲- وضعیت آلودگی به PVA در نمونه‌های سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از دو استان مرکزی و خراسان رضوی بر اساس نتایج آزمون الایزا

استان / شهرستان	برگ علائم‌دار	برگ تصادفی	غده تصادفی
مرکزی اراک	۲۲/۳۱ (۷۱) ^a	۱۹/۳۵ (۵۴)	۶۰/۱۷۲ (۳۵)
فراهان	۱۶/۳۵ (۴۶)	۵/۶۳ (۸)	۸/۱۵۰ (۵)
خمین	۵/۳۳ (۱۴)	۱۰/۲۶ (۳۸)	۲۰/۱۶۵ (۱۲)
شازند	۸/۳۳ (۲۴)	۱۲/۷۴ (۱۶)	۱۸/۱۱۰ (۱۶)
جمع	۵۱/۱۳۲ (۳۹)	۴۷/۱۹۸ (۲۳)	۱۰۱/۵۹۷ (۱۷)
خراسان رضوی			
چناران	۸/۳۵ (۲۳)	۹/۸۵ (۱۱)	۱۵/۱۰۳ (۱۴)
تربت حیدریه	۲/۴۳ (۵)	۲/۶۴ (۳)	۶/۱۴۶ (۴)
فریمان	۳/۴۷ (۶)	۲/۷۶ (۳)	۴/۱۷۹ (۲)
قوچان	۳/۲۳ (۱۳)	۲/۴۰ (۵)	۵۲/۱۶۱ (۳۲)
جمع	۱۶/۱۴۸ (۱۱)	۱۵/۲۶۵ (۶)	۷۷/۵۸۹ (۱۳)
جمع کل	۶۷/۲۸۰ (۲۴)	۶۲/۴۶۳ (۱۳)	۱۷۸/۱۱۸۶ (۱۵)

a: عدد داخل پارانتر: درصد آلودگی، عدد سمت راست ممیز: تعداد نمونه‌های بررسی شده، عدد سمت چپ ممیز: تعداد نمونه‌های آلوده.

جدول ۳- نتایج مطالعه دامنه میزبانی و واکنش گیاهان محک مایه‌زنی شده با چهار جدایه PVA مورد بررسی

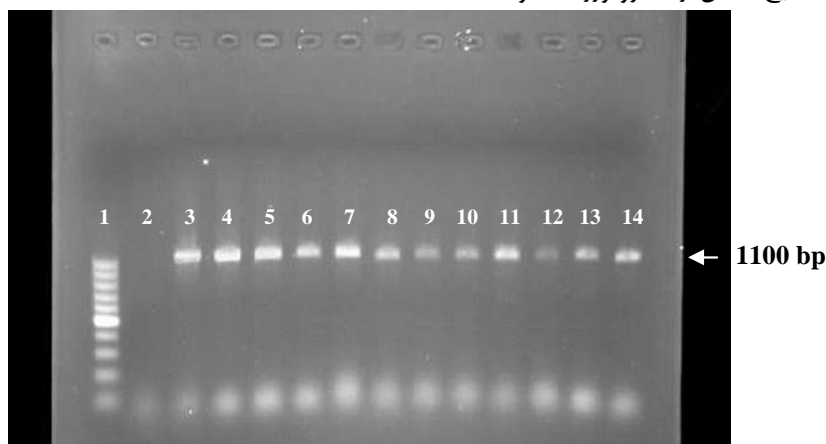
جدایه				نام علمی گیاه میزبان
Ar2	Gh4	F2	Kh4	
M	Mo	SM	Mo	<i>Nicotiana glutinosa</i>
Mo, MM	VC, M	Mo, Ld	MM, Mo	<i>Nicotiana tabacum L. cv. Samsun</i>
M	M, NLL	-	M	<i>Physalis floridana</i>
NLL	NLL	-	M	<i>Chenopodium quinoa</i>
Mo	-	Mo, Ld	Mo, Ld	<i>Capsicum annumm</i>
Mo, MM	MM	Mo, MVC	MM	<i>Solanum nigrum L.</i>

NLL: لکه‌های نکروز موضعی، M: موزائیک، Mo: پیسک، MM: موزائیک ملایم، SM: موزائیک شدید، VC: رگبرگ روشنی، MVC: رگبرگ روشنی ملایم، Ld: بدشکلی برگ، -: بدون علائم.

بررسی خصوصیات مولکولی

واکنش PCR در مورد ۱۱ جدایه مورد بررسی، نشان‌دهنده تکثیر یک قطعه DNA به طول حدود ۱۱۰۰ جفت باز در تمامی این جدایه‌ها بود که با اندازه قطعه مورد انتظار مطابقت داشت (شکل ۱).

استخراج RNA کل با استفاده از محلول تجاری RNXplus و کیت کپازن انجام گرفت. با توجه به نتایج حاصل از الکتروفورز، کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از کیت کپازن بهتر از کیفیت RNA استخراجی به کمک روش RNXplus بود. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش PCR در ژل آگارز. ستون ۱: مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: شاهد منفی (سالم)، ستون ۳: شاهد مثبت (آلوده)، ستون‌های ۴ تا ۱۴: به ترتیب مربوط به جدایه‌های Th1 و Sh4, Sh2, Kh12, Kh4, F21, F2, Ar2, Ar1, Gh4, Fr2

جدایه‌هایی از آلمان (Y11426, Y11427)، جدایه F2 (از فراهان) با جدایه‌ای از هلند (Y10125) و جدایه Gh4 (از قوچان) با جدایه‌ای از چین (DQ309063) بیشترین درصد یکنواختی توالی CP را نشان دادند. چهار جدایه ایرانی مورد بررسی در مجموع کمترین یکنواختی توالی CP را با جدایه‌هایی از انگلستان (GU144320 و Y11428) نشان داشتند.

نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین پوششی چهار جدایه ایرانی PVA با چهار جدایه خارجی این ویروس که دامنه میزبانی و خصوصیات آن‌ها مطالعه گردیده بود (Valkonen *et al.*, 1995)، در شکل ۳ ارائه شده است. براساس این نتایج، جدایه‌های فوق بیشترین تفاوت را در ناحیه انتهای آمینی خود نشان می‌دهند. جدایه Gh4 در هفت اسیدآمینه با سایر جدایه‌ها اختلاف دارد. جدایه Ar2 در پنج اسیدآمینه و دو جدایه F2 و Kh4 به ترتیب در سه و دو اسیدآمینه با سایر جدایه‌ها اختلاف داشتند.

بحث

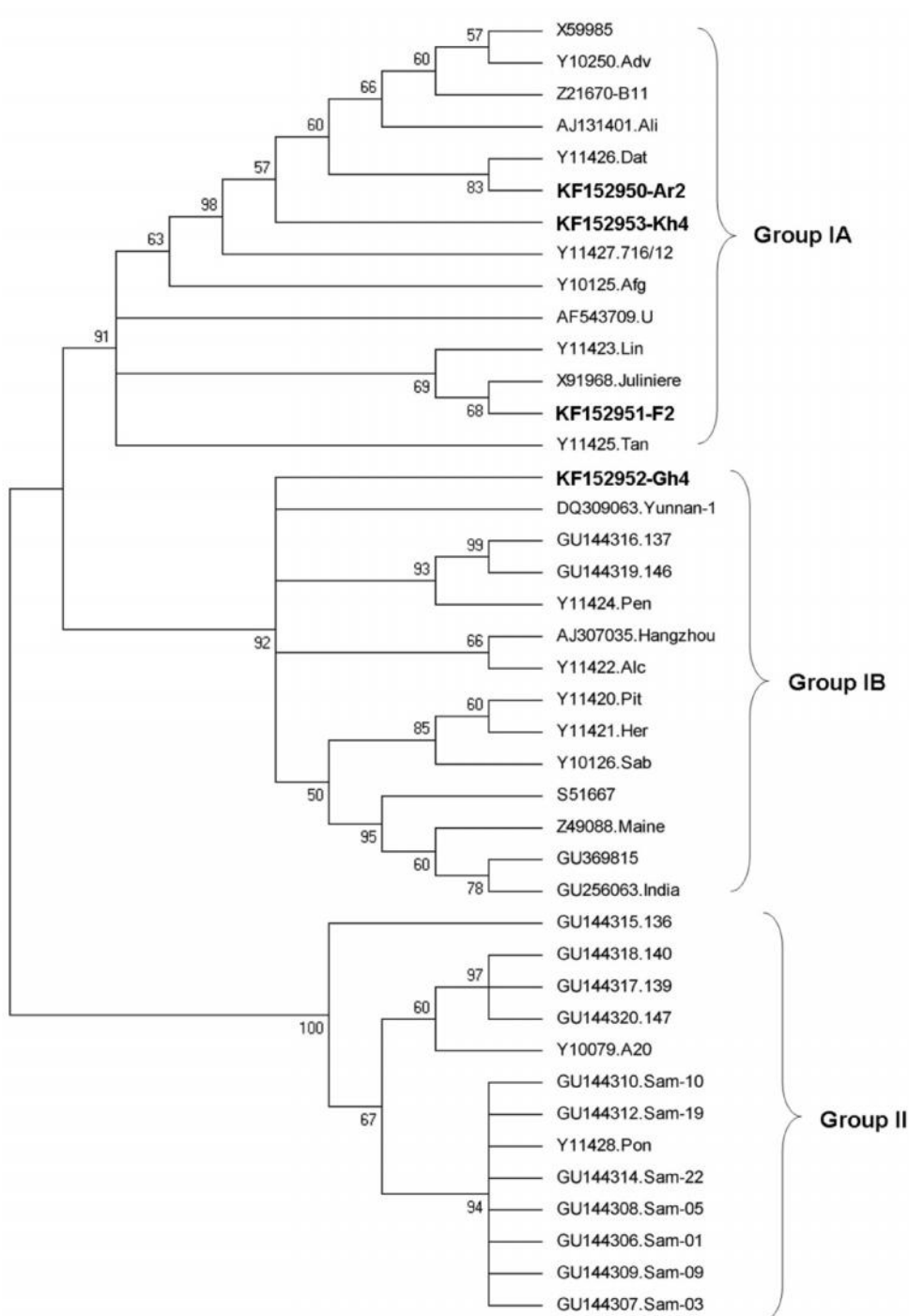
ویروس PVA یکی از مهمترین عوامل بیماری‌های ویروسی در سیب‌زمینی می‌باشد. نتایج بررسی‌های مشاهده‌ای در سطح ۳۲ مزرعه در مناطق مورد بازدید در دو استان

آنالیز تبارزایی ویروس A سیب‌زمینی (PVA)

نتایج حاصل از مقایسه توالی ژن CP به‌دست‌آمده در مورد چهار جدایه ایرانی و ۳۷ جدایه خارجی PVA با یکدیگر و درخت تبارزایی رسم شده بر این اساس، نشان داد که ۴۱ جدایه PVA به دو گروه اصلی I و II تقسیم می‌شوند. سه جدایه ایرانی Ar2, Kh4 و F2 همراه با جدایه‌هایی از آلمان، هلند، فنلاند و آمریکا در زیرگروه IA قرار گرفتند. جدایه‌های Ar2 و F2 دارای بیشترین مشابهت به ترتیب با جدایه Dat (Y11426) از آلمان و جدایه Juliniere (X91968) از هلند بود. جدایه Kh4 نیز در نزدیکی جدایه‌های آلمانی قرار داشت. در زیرگروه IB، جدایه‌هایی از هلند، فنلاند و انگلستان (از اروپا) به همراه جدایه‌هایی از چین، هند و ایران (از آسیا) و یک جدایه از آمریکا قرار داشتند که جدایه ایرانی Gh4 (از قوچان) بیشترین شباهت را با جدایه Yunnan از چین (DQ309063) نشان داد. در گروه II این درخت فیلوژنی، جدایه‌هایی قرار داشتند که همگی آن‌ها از انگلستان گزارش شده‌اند (شکل ۲). در جدول ۴ درصد یکنواختی توالی نوکلئوتیدی ژن CP در بین ۴۱ جدایه PVA مورد بررسی ارائه شده است. چهار جدایه ایرانی PVA در بین خود دارای ۹۷/۶ تا ۹۹/۸ درصد یکنواختی توالی نوکلئوتیدی CP بودند. جدایه‌های ایرانی Ar2 (از اراک) و Kh4 (از خمین) با

آلودگی‌های مزرعه‌ای انجام آزمون‌های کلینیکی و آزمایشگاهی لازم و ضروری است (Loebenstein *et al.*, 2001). اختلاف در فراوانی و شدت علائم ویروسی در مزارع سیب‌زمینی استان مرکزی در مقایسه با استان خراسان رضوی به عوامل مختلفی مانند تنوع فعالیت ناقلین، سن مزارع، تنوع در کشت‌های مجاور و وضعیت علف‌های هرز، شریط جوی و از همه مهم‌تر سلامت و کیفیت غده‌های بذری به‌کار رفته جهت احداث مزارع ارتباط دارد. با توجه به این که ویروس PVA توسط شته و بروش ناپایا منتقل می‌شود، شرایط آب و هوایی تأثیر زیادی روی فعالیت ناقلین و متعاقباً اختلاف در

مرکزی و خراسان رضوی نشان داد که فراوانی علائم ویروسی به‌ویژه پیسک و موزائیک برگی در مزارع مورد بازدید در استان مرکزی (۱۵ تا ۲۰ درصد) بیشتر از مقادیر مربوطه در استان خراسان رضوی (۵ تا ۱۰ درصد) بود. براساس نتایج آزمون الایزا بر روی نمونه‌های تصادفی، فراوانی آلودگی به PVA در دو استان مرکزی و خراسان رضوی به‌ترتیب ۲۳ و ۶ درصد تعیین گردید. اگرچه اختلاف فاحشی بین نتایج حاصل از بررسی‌های مشاهده‌ای و نتایج به‌دست‌آمده از آزمون آزمایشگاهی الایزا در برآورد فراوانی PVA در مزارع سیب‌زمینی مشاهده نشد ولی به‌منظور تخمین درصد



شکل ۲- درخت تبارزایی رسم‌شده با استفاده از توالی ژن CP مربوط به ۴۱ جدایه ویروس PVA که با استفاده از روش (NJ) Neighbor Joining و ۱۰۰۰ مرتبه bootstrap به‌دست‌آمده است. جهت اطلاعات بیشتر در مورد مشخصات جدایه‌های موجود در این درخت به جدول ۱ مراجعه شود. چهار جدایه ایرانی PVA (شامل Gh4 F2 Kh4 Ar2) با حروف درشت مشخص شده‌اند.

	10	20	30	40	50	60
Z21670.B11
Z49088.M	AeTLDA sEa1	AQKSEGRKKE	rE sNSSKAVA	VKDKDVDLGT	AGTHSVPRLK	SMTSKLTLPM
Z49087.U	AGTLDA G ETP	AQK cEgk KKE	GEGNS g KAVA	VKDKDVDLGT	AGTHSVPRLK	SMTSKLTLPM
S51667.Can	AGTLDA G ETP	AQKSEGRKKE	GEGNS g KAVA	VKDKDVDLGT	AGTHSVPRLK	SMTSKLTLPM
Ar2.s.80	AeTLDA sE T1	AQKSEGRKKE	GE s NSSKAVA	VKDKDVDLGT	AGTHSVPRLK	SMTSKLTLPM
Gh4.s.20	AeTLDA sE TP	AQKSEGR k KKE	eE GN Sg KAVA	VKDKDVDLGT	AGTHSVPRLK	SMTSKLTLPM
F2.s.100	AGTLDA G ETP	AQKSEGR q E	GEGNS S KAVA	VKDKDVDLGT	AGTHSVPRLK	SMTSKLTLPM
Kh4.R.12	AGTLDA sE T1	AQKSEGRKKE	GESNS S KAVA	VKDKDVDLGT	AGTHSVPRLK	SMTSKLTLPM
	70	80	90	100	110	120
Z21670.B11
Z49088.M	LKGKSVVNL	HLLSYKPKQV	DLSNARATHE	QFQNWYDGVM	ASYELEESSM	EIILNGFMVW
Z49087.U	LKGKSVVNL	HLLSYKPKQV	DLSNARATHE	QFQNWYDGVM	ASYELEESSM	EIILNGFMVW
S51667.Can	LKGKSVVNL	HLLSYKPKQV	DLSNARATHE	QFQNWYDGVM	ASYELEESSM	EIILNGFMVW
Ar2.s.80	LKGKSVVNL	HLLSYKPKQV	DLSNARATHE	QFQNWYDGVM	ASYELEESSM	EIILNGFMVW
Gh4.s.20	LKGKSVVNL	HLLSYKPKQV	DLSNARATHE	QFQNWYDGVM	ASYELEESSM	EIILNGFMVW
F2.s.100	LKGKSVVNL	HLLSYKPKQV	DLSNARATHE	QFQNWYDGVM	ASYELEESSM	EIILNGFMVW
Kh4.R.12	LKGKSVVNL	HLLSYKPKQV	DLSNARATHE	QFQNWYDGVM	ASYELEESSM	EIILNGFMVW
	130	140	150	160	170	180
Z21670.B11
Z49088.M	CIENGTS P DI	NGVWTMMDNE	EQVSYPLKPM	LDHAKPSLRQ	IMRHFSALAE	AYIEMRSREK
Z49087.U	CIENGTS P DI	NGVWTMMD g E	EQVSYPLKPM	LDHAKPSLRQ	IMRH Fk ALAE	AYIEMRSREK
S51667.Can	CIENGTS P DI	NGVWTMMDNE	EQVSYPLKPM	LDHAKPSLRQ	IMRHFSALAE	AYIEMRSREK
Ar2.s.80	CIENGTS P DI	NGVWTMMDNE	EQVSYPLKPM	LDHAKPSLRQ	IMRHFSALAE	AYIEMRSREK
Gh4.s.20	CIENGTS P DI	NGVWTMMD d E	EQVSYPLKPM	LDHAKPSLRQ	IMRHFSALAE	AYIEMRSREK
F2.s.100	CIENGTS P DI	NGVWTMMDNE	EQVSYPL e PM	LDHAKPSLRQ	IMRHFSALAE	AYIEMRSREK
Kh4.R.12	CIENGTS P DI	NGVWTMMDNE	EQVSYPLKPM	LDHAKPSLRQ	IMRHFSALAE	AYIEMRSREK
	190	200	210	220	230	240
Z21670.B11
Z49088.M	PYMPRYGLQ	NLRDQSLARY	A F DFYEITAT	TPIRAKEAHL	QMKAALKN	NTNMFGLDGN
Z49087.U	PYMPRYGLQ	NLRDQSLARY	A F DFYEITAT	TPIRAKEAHL	QMKAALKN	NTNMFGLDGN
S51667.Can	PYMPRYGLQ	NLRDQSLARY	A F DFYEITAT	TPIRAKEAHL	QMKAALKN	NTNMFGLDGN
Ar2.s.80	PYMPRYGLQ	NLRDQSLARY	A F DFYEITAT	TPIRAKEAHL	QMKAALKN	NTNMFGLDGN
Gh4.s.20	PYMPRYGLQ	NLRDQSLARY	A F DFYEITAT	TPIRAKEAHL	QMKAALKN	NTNMFGLDGN
F2.s.100	PYMPRYGLQ	NLRDQSLARY	A F DFYEITAT	TPIRAKEAHL	QMKAALKN	NTNMFGLDGN
Kh4.R.12	PYMPRYGLQ	NLRDQSLARY	A F DFYEITAT	TPIRAKEAHL	QMKAALKN	NTNMFGLDGN
	250	260				
Z21670.B11
Z49088.M	VTTSEEDTER	HTATDVNRNM	HLLGVKGV			
Z49087.U	VTTSEEDTER	HTATDVNRNM	HLLGVKGV			
S51667.Can	VTTSEEDTER	HTATDVNRNM	HLLGVKGV			
Ar2.s.80	VTTSEEDTER	HTATDVNRNM	HLLGVKGV			
Gh4.s.20	VTTSEEDTER	HTATDVNRNM	HLLGVKGV			
F2.s.100	VTTSEEDTER	HTATDVNRNM	HLLGVKGV			
Kh4.R.12	VTTSEEDTER	HTATDVNRNM	HLLGVKGV			

شکل ۳- نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی اسیدآمینه‌ای CP مربوط به هشت جدایه PVA شامل چهار جدایه غیر ایرانی (Can, U, M, B11) و چهار جدایه ایرانی (Ar2, Gh4, F2, Kh4). در مورد چهار جدایه ایرانی، اسیدآمینه‌های دارای اختلاف با سایر توالی‌ها با حروف درشت مشخص شده‌اند.

گرفت. با توجه به نتایج حاصله، خصوصیات جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق بیشترین مشابهت را با جدایه‌های زیرگروه IA این ویروس نشان می‌دهند که در انتخاب ارقام متحمل یا مقاوم می‌بایستی به این موضوع توجه نمود. در بخش دیگری از تحقیق، توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین CP چهار جدایه ایرانی با توالی اسیدآمینه‌ای چهار جدایه خارجی مورد مقایسه قرار گرفت. این چهار جدایه خارجی شامل جدایه‌های U و M از آمریکا، جدایه Can از کانادا و جدایه B11 از مجارستان بود. خصوصیات دامنه میزبانی این جدایه‌ها قبلاً مطالعه و مشخص شده بود (Valkonen *et al.*, 1995). همان‌طور که در مورد سایر ویروس‌های جنس *Potyvirus* گزارش شده است (Shukla *et al.*, 1994)، در توالی‌های به‌دست‌آمده در مورد چهار جدایه ایرانی PVA اولین اسیدآمینه در پروتئین CP شامل اسیدآمینه آلانین (A) بود (شکل ۳). نتایج حاصل از این مقایسه نشان داد که جدایه ایرانی Gh4 در هفت اسیدآمینه با توالی اسیدآمینه‌ای سایر جدایه‌ها اختلاف نشان می‌دهد. از این تعداد، پنج اختلاف در ناحیه انتهایی آمینی، یک تغییر در بخش میانی و یک تغییر اسیدآمینه‌ای نیز در انتهای کربوکسیلی پروتئین CP می‌باشد (شکل ۳). مشخص شده است انتهای آمینی پروتئین CP در ویروس PVA و در کل اعضای جنس *Potyvirus* دارای بیشترین اثر ایمنی‌زایی در پیکره ویروس می‌باشند (Andreeva *et al.*, 1994; Shukla *et al.*, 1989).

اگرچه تعداد بسیار محدودی از جدایه‌های PVA (جمعاً چهار جدایه) در این بررسی مورد مطالعه تبارزایی قرار گرفته‌اند، ولی همین نتایج نیز نشان‌دهنده حضور واریانت‌ها و جدایه‌های نسبتاً متنوعی از این ویروس در مناطق مورد بررسی در کشور می‌باشند. با مطالعه بیشتر روی این جدایه‌ها و تعیین مشخصات مرتبط با بیماری‌زایی آن‌ها، می‌توان درک بهتری از وضعیت جدایه‌های ایرانی PVA به‌دست آورد. این اطلاعات در ارزیابی ارقام سیب‌زمینی از نظر واکنش در برابر جدایه‌های ایرانی ویروس PVA و انتخاب ارقام متحمل یا مقاوم بسیار حائز اهمیت می‌باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد وارمین پیشوا و مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور که در انجام این تحقیق همکاری و پشتیبانی داشته‌اند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

فراوانی و شدت علائم ویروسی در مزارع سیب‌زمینی دو استان فوق دارد. در استان مرکزی درصد آلودگی به‌دست آمده براساس نمونه‌های غده‌ای (۱۷٪) اندکی از درصد تعیین شده به‌کمک نمونه‌های برگ‌ی تصادفی (۲۳٪) کمتر بود (جدول ۲). این موضوع تا حدودی قابل انتظار است چرا که به‌دنبال آلوده‌شدن بوته سیب‌زمینی به PVA، آلودگی ویروسی به‌طور یکنواخت به تمام غده‌های دختری نتاج و جوانه‌های آن‌ها منتقل نشده و نیز غلظت ویروس در غده‌ها به‌مراتب از غلظت آن در بافت‌های برگ‌ی کمتر می‌باشد (Hull, 2002). داده‌های به‌دست‌آمده در استان خراسان رضوی حالت برعکس داشته و درصد آلودگی نمونه‌های غده‌ای (۱۳٪) بیشتر از درصد آلودگی به‌دست‌آمده بر اساس نمونه‌های برگ‌ی تصادفی (۶٪) بود. اگرچه به دلیل محدود بودن تعداد نمونه و دفعات نمونه‌برداری، احتمال بروز خطا را نمی‌توان بعید دانست، ولی افزایش بیشتر فعالیت شته‌های ناقل ویروس در اواخر فصل (قبل از برداشت غده‌ها) در استان خراسان رضوی در مقایسه با استان مرکزی می‌تواند از جمله دلایل مهم در کسب این نتایج باشد. سطح کشت باغات به‌ویژه هسته‌دار در استان خراسان رضوی در مقایسه با استان مرکزی بیشتر بوده (Anonymous, 2010) و از این رو بالابودن فعالیت شته‌ها در استان خراسان رضوی دور از انتظار نیست. مشخص شده است که تأخیر در برداشت سیب‌زمینی به‌ویژه در مزارع تولید غده‌های بذری به‌دلیل افزایش دوره سبزماندن مزرعه و مصادف شدن آن با زمان اوج فعالیت شته‌های ناقل در اوایل پاییز موجب افزایش آلودگی‌های ویروسی در غده‌های حاصل از چنین مزارعی می‌شود (de Bokx and Van der Want, 1987).

در این تحقیق روش ردیابی مولکولی RT-PCR برای تشخیص آلودگی ویروس PVA در نمونه‌های سیب‌زمینی توسعه داده شد. استفاده از این روش در ردیابی آلودگی‌های این ویروس در برنامه‌های سنجش و گواهی سلامت غده‌های سیب‌زمینی بذری به‌ویژه در هسته‌های اولیه حاصل از کشت بافت، بسیار مهم و حائز اهمیت کاربردی است (Loebenstein *et al.*, 2001).

علی‌رغم گزارش ویروس PVA از مناطق مختلف کشت سیب‌زمینی (Pourrahim *et al.*, 2007) تاکنون در مورد خصوصیات مولکولی و تبارزایی جدایه‌های ایرانی این ویروس گزارشی ارائه نشده است. در این بررسی توالی کامل ژن CP چهار جدایه ایرانی ویروس PVA تعیین و با توالی مربوطه در ۳۷ جدایه خارجی این ویروس مورد مطالعه و مقایسه قرار

REFERENCES

- Andreeva L, Jarvekulg L, Rabenstein F, Torrance L, Harrison BD and Saarma M (1994) Antigenic analysis of *Potato virus A* particles and coat protein. *Ann. Appl. Biol.* 125: 337-348.
- Andrejeva J, Merits A, Rabenstein F, Puurand U and Jarvekulg L (1996) Comparison of the nucleotide sequences of the 3'-terminal regions of one aphid and two non-aphid transmissible isolates of *potato A potyvirus*. *Arch. Virol.* 141: 1207-1219.
- Anonymous (2010) Crop production statistics, Statistics and information technology office, Deputy of planning and economy, Ministry of Jihad Agriculture, 134 pp.
- Anonymous (2011) Production year book. FAO publication, available at www.faostat.org.
- Bartels, R. 1971. *Potato virus A*. CMI/ABB. Descriptions of plant viruses. No. 54
- Burland TG (2000) DNASTAR's lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular and Biology* 132: 71-91.
- Clark MF and 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.
- Collins RF, Leclerc D and AbouHaidar MG (1993) Cloning and nucleotide sequence of the capsid protein and the nuclear inclusion protein (NIb) of *Potato virus A*. *Arch. Virol.* 128: 135-142.
- de Bokx, J. A. and Van der Want, J. P. H. 1987. *Viruses of potato and seed-potato production*. Second edit., Pudoc., Wageningen, Netherlands, 259 pp.
- Hull, R. 2002. *Matthew's plant virology* (4th Ed.). Academic Press, New York. Page: 981.
- Kekarainen T, Merits A, Oruetebarria I, Rajamaki ML and Valkonen JPT (1999) Comparison of the complete sequence of five different isolates of *Potato virus A* (PVA), genus *Potyvirus*. *Arch. of Virol.* 144: 2355-2366.
- King AN, Adams NJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) *Virus taxonomy*. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. 1727 p. London.
- Loebenstein G, Berger PH, Brunt AA and Lawson RH (2001) *Virus and Virus Like Diseases of Potatoes and Production of Seed Potatoes*. Kluwer Academic Publishers, 460 p.
- Mortensen RJ, Shen X, Reid A and Mulholland V (2010) Characterization of viruses infecting potato plants from a single location in Shetland, an isolated Scottish Archipelago. *J. Phytopathol.* 158: 633-640.
- Murphy PA and McKay R (1932) A comparison of some European and American virus disease in Potato scientific proceedings Royal Dublin society. *Ns.* 20: 347-358.
- Pourrahim R, Farzadfar Sh, Golnaraghi AR, and Ahoonmanesh A (2007) Incidence and of important viral pathogens in some Iranian potato fields. *Plant Disease.* 91: 609-615
- Puurand Ü, Mäkinen K, Baumann M, and Saarma M (1992) Nucleotide sequence of the 3'-terminal region of *Potato virus a* RNA. *Virus Res.* 23:99-105.
- Rajamaki ML, Merits A, Rabenstein F, Andrejeva J, Paulin L, Kekarainen T, Kreuze JF, Foster RSL and Valkonen JPT (1998) Biological, serological and molecular differences among isolates of *potato virus A*. *Phytopath.* 88: 311-321.
- Shukla DD, Tribbick G, Mason TJ, Hewish DR, Geysen HM, and Ward CW (1989) Localization of virus specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8192-8196.
- Shukla DD, Ward CW and Brunt AA (1994) *The Potyviridae*. C.A.B. International, Wallingford, UK.
- Singh RP (1982) *Physalis floridana* as a local lesion host for post harvest indexing of Potato Virus A. *Plant Dis.* 66: 1051-1052.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple

- sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4073-4080.
- Valkonen JPT, Puurand U, Slack SA, Makinen K and Saarma M (1995) Three strain groups of *Potato virus A potyvirus* based on hypersensitive responses in potato, serological properties, and coat protein sequences. *Plant Dis*. 79: 748-753.

