The University of Tehran Press

Iranian Journal of Plant Protection Science

Online ISNN: 2008-4781

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

Biological and molecular characteristics of four potato virus Y (PVY) isolates based on partial coat protein gene

Prastoo Poursharifi [1], Akbar Dizadji [2✉], Parisa Sharifi Nezamabad [3], Mina Koohi Habibi[4], Gholam Hossein Mossahebi[5], Hadi Khateri[6]

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: parastoo.sh84@gmail.com
2. Corresponding Author. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: adizaji@ut.ac.ir
3. Department of Plant Protection, Agricultural and Natural Resources and Research Center of Golestan province, Gorgan, Iran. E-mail: pasharifi@ut.ac.ir
4. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mkhabibi@ut.ac.ir
5. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mosaheb@ut.ac.ir
6. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: hkhateri@razi.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 31 Junuary 2024

Revised: 13 March 2024

Accepted: 4 May 2024

Published online: 5 March 2024

Keywords:

Phylogeny,

strain,

serology,

Physalis.

ABSTRACT

Potato virus Y (PVY) is one of the viruses limiting tobacco and potato production in the world. To investigate the biological and molecular characteristics of PVY isolates, during 2010-2011, a total of 1178 symptomatic leaf samples of tobacco, potato, pepper and grand cherry (*Physalis divaricata*) plants were collected from eight different cities including Karaj, Urmia, Sanandaj, Shiraz, Qazvin, Varamin and Hamedan of Iran. The samples were tested serologically by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (DAS-ELISA) and PVY was detected in tobacco (27.27 %), potato (20.4 %) and grand cherry (18.75 %) samples, with no infection in pepper samples. Four biologically purified PVY isolates (Po2, Po5, Tob2 and Ph1) revealed few differences in experimental host range studies among 12 test plant species. After amplification of the 3´ genomic end of four PVY isolates with the expected size of 1200 bp, phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of partial coat protein gene (encoding N- terminal region of coat protein) revealed that Tob2, Po5 and Ph1 isolates grouped into $PVY^{N/NTN}$ clade, while only isolate Po2 grouped into PVY^{O} clade. The results of IC-RT-PCR using strain-specific primers and further pairwise nucleotide sequence comparisons and strain-specific motifs analysis in the predicted amino acid sequences of the N-terminal region of coat protein confirmed the results of phylogenetic analysis. This is the first report of *Physalis divaricata* infection with $PVY^{N/NTN}$ strain in the world.

Cite this article: Poursharifi, P., Dizadji, A., Sharifi Nezamabad, P., Koohi Habibi, M., Mossahebi, Gh. H., & Khateri, H. (2024). Biological and molecular characteristics of four potato virus Y (PVY) isolates based on partial coat protein gene. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54 (2), 349-371. DOI: https://doi.org/10.22059/IJPPS.2024.371771.1007053

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/IJPPS.2024.371771.1007053

Extended Abstract

Introduction

Potato virus Y (PVY, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*), one of the top 10 most important plant viruses (Scholthof *et al.*, 2011), is a serious problem in solanaceous crops worldwide (Green *et al.*, 2017a; Kerlan, 2006; Quenouille *et al.*, 2013). Currently, five non-recombinant (PVY^{O}, PVY^{Eu-N}, PVY^{NA-N}, PVY^{C}, and PVY^{O-O5}) and nine recombinant strains ($PVY^{N:O}$, PVY^{N-Wi}, PVY^{NTNa}, PVY^{NTNb}, $PVY-^{NE11}$, PVY^{E}, and PVY^{-SYR-I}, $^{-II}$, and $^{-III}$) have been defined (Galvino-Costa *et al.*, 2012; Green *et al.*, 2017b; Karasev & Gray, 2013). Molecular studies are useful tools to shed light on the molecular basis of virus geographical spread and adaptation to new hosts and for designing appropriate epidemic control strategies (Elena *et al.*, 2011; Jones, 2009). PVY has been

reported in several regions of Iran (Hosseini *et al.*, 2011; Pourrahim & Farzadfar, 2016; Pourrahim *et al.*, 2007; Sadeghi *et al.*, 2008; Shamsaddin Saeed *et al.*, 2008; Toosi *et al.*, 2004). In this study, biological, serological and molecular analysis of four PVY isolates was performed based on the C-terminal of the coat protein genomic region.

Materials and Methods

A total of 1178 symptomatic leaf samples of pepper, potato, tobacco and physalis were collected from the fields in Karaj, Urmia, Sanandaj, Shiraz, Qazvin, Varamin and Hamedan counties during 2010-2011. The samples were tested serologically by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (DAS-ELISA) as described by Clark and Adams (1977) using PVY-specific polyclonal antibodies (DSMZ, AS-0137).

Four ELISA-positive samples were biologically purified by serial single local lesion transfers and propagated on *Nicotiana glutinosa*, then mechanically inoculated on a number of indicator plants. Total RNA was extracted from infected *N. glutinosa* leaves by RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden Germany) and subjected to RT-PCR using CPUTR-F/CPUTR-R primer pair to amplify the virus genomic 3' end (Bukovinszki *et al.*, 2007). Amplified fragments were extracted from the gel using a GF-1 Gel DNA recovery kit (Vivantis, Malaysia) then sequenced directly in both directions (Macrogen Inc., South Korea).

Immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR) was performed by using strain-specific primers as described by Boonham *et al.* (2002).

The nucleotide sequences of Iranian isolates were compared against the online NCBI nt database using BLASTn, then aligned to a set of PVY sequences available in GenBank. Pairwise nucleotide identities were obtained by SDT v. 1.2 (Muhire *et al.*, 2014), phylogenetic tree reconstruction was done by MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Results and Discussion

PVY was detected by DAS-ELISA in samples of tobacco (27.27 %), potato (20.4 %) and physalis (18.75 %). Interestingly, although a large number of pepper samples were tested, none of them were infected by PVY. Four biologically purified PVY isolates (Po2, Po5, Tob2 and Ph1), obtained from potato, tobacco and physalis caused local lesions on *Chenopodium amaranticolor* and systemic symptoms on *Capsicum annuum*, *Datura metel*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana debneyi*, *N. glutinosa* and *N. rustica*, with minor differences in experimental host range. RT-PCR resulted in the amplification of the 3´ genomic end of PVY isolates with the expected size of 1200 bp. Phylogenetic analysis based on nucleotide sequences of partial coat protein gene (encoding N- terminal region of coat protein) of four PVY Po2, Ph1, Po5 and Tob2 isolates in this study (with NCBI GenBank accession numbers of PP195788, PP195789, PP195790 and PP195791, respectively) with other PVY sequences available in GenBank revealed that Ph1, Po5 and Tob2 isolates grouped into $PVY^{N/NTN}$ clade, while only Po2 grouped into PVY^{O} clade. Pairwise nucleotide sequence comparisons of 55 PVY genomes (for 51 isolates previously reported and the 4 isolates reported in this study) using SDT revealed that Tob2, Po5 and Ph1 isolates have >94- 100% and Po2 has >99% identity with $PVY^{N/NTN}$ and PVY^{O} isolates, respectively. Immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR) by using the strain-specific primers resulted in the amplification of a cDNA fragment with the expected size of 545 bp in Tob2, Po5 and Ph1 isolates and of 609 bp in Po2 one, which confirmed the phylogenetic results. No recombination event was detected in the partial cp gene between 55 PVY isolates.

The information obtained can be a key element in future research to develop improved control strategies for potato virus diseases in Iran.

Conclusion

The present study showed the occurrence of $PVY^{N/NTN}$ and PVY^{O} in different hosts based on biological characteristics and molecular analyses of the partial cp gene nucleotide sequence. To our knowledge, this is the first report of the occurrence of $PVY^{N/NTN}$ on *Physalis divaricata*, while whole genome sequencing of this isolate is needed.

نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۴، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی چهار جدایه ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) براساس بخشی از ناحیه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی

پرستو پورشریفی [۱]| اکبر دیزجی [۲]✉| پریسا شریفی نظام‌آباد [۳]| مینا کوهی حبیبی [۴]| غلامحسین مصاحبی [۵]| هادی خاطری [۶]

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: parastoo.sh84@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: adizaji@ut.ac.ir

۳. بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان، ایران. رایانامه: pasharifi@ut.ac.ir

۴. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mkhabibi@ut.ac.ir

۵. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mosaheb@ut.ac.ir

۶. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه hkhateri@razi.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۵

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

کلیدواژه‌ها:

تبارزائی، سویه، سرولوژی، عروسک پشت پرده.

چکیده

ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY) یکی از ویروس‌های محدودکننده تولید توتون و سیب‌زمینی در دنیا می‌باشد. به منظور بررسی خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی جدایه‌های میزبانی ویروس وای سیب‌زمینی، طی سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰، در مجموع ۱۱۷۸ نمونه از گیاهان توتون، سیب‌زمینی، فلفل و علف هرز عروسک پشت پرده که دارای علائم موزائیک بودند از هشت شهرستان مختلف کشور شامل کرج، ارومیه، رشت، سنندج، شیراز، قزوین، ورامین و همدان جمع‌آوری شد. آلودگی نمونه‌ها به PVY با آزمون سرولوژیکی ساندویچ دو طرفه الیزا (double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) بررسی و میزان آلودگی در بین نمونه‌های توتون، سیب‌زمینی، عروسک‌پشت‌پرده و فلفل به ترتیب ۲۷/۲، ۲۰/۴، ۱۸/۷۵ و صفر درصد برآورد گردید. دامنه میزبانی آزمایشی چهار جدایه منتخب ویروس وای سیب‌زمینی (Po2، Po5، Tob2 و Ph1) روی ۱۲ گونه گیاه محک در شرایط گلخانه تفاوت‌های جزئی داشت. پس از تکثیر انتهای '3 ژنوم جدایه‌ها به اندازه ۱۲۰۰ جفت باز، درخت تبارزائی براساس توالی نوکلئوتیدی یک سوم بالادست ناحیه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی بازسازی شد که جدایه‌های Tob2، Ph1 و Po5 در کلاد $PVY^{N/NTN}$ و جدایه Po2 در کلاد PVY^{O} قرار گرفتند. نتایج IC-RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی سویه، و مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و بررسی موتیف‌های اختصاصی سویه در همردیف‌های توالی آمینواسیدی پیش بینی شده انتهای آمینی پروتئین پوششی، نتایج واکاوی تبارزائی را تایید کردند. این اولین گزارش از آلودگی گونه *Physalis divaricata* به سویه $PVY^{N/NTN}$ در دنیا می‌باشد.

استناد: پورشریفی، پرستو؛ دیزجی، اکبر؛ شریفی نظام آباد، پریسا؛ کوهی حبیبی، مینا؛ مصاحبی، غلامحسین و خاطری، هادی (۱۴۰۲). ویژگی‌های بیولوژیکی و مولکولی چهار جدایه ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) براساس بخشی از ناحیه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی. *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۴ (۲)، ۳۷۱-۳۴۹. DOI: https://doi.org/10.22059/IJPPS.2024.371771.1007053

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/IJPPS.2024.371771.1007053

مقدمه

ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY)، متعلق به جنس *Potyvirus* و تیرهٔ *Potyviridae*، جزو ۱۰ ویروس مهم جهان شناخته شده (Scholthof *et al.*, 2011) که بین سال های ۲۰۱۷– ۲۰۰۴ باعث خسارت ۱۸۷ میلیون یورویی در کشورهای اتحادیه اروپا شده است (Dupuis *et al.*, 2023). ویروس وای‌سیب‌زمینی با ژنوم آرانا (RNA) تک لای مثبت، به طول تقریبی ۹/۷ کیلوباز (kb)، دارای یک چارچوب ژنی (open reading frame, ORF) بزرگ می‌باشد که پس از ترجمه به پلی پروتئین بزرگ ۳۰۶۱ اسید آمینه‌ای (Lefkowitz *et al.*, 2018) و با پردازش خودبرشی پروتئینی (autoproteolysis) به ده پروتئین عملکردی (CP، NIb، P1، HC-Pro، P3 ، 6K1، NIa -Pro، 6K2، CI و VPg) و یک پروتئین خارج از چارچوب، P3N-PIPO، که برای آلودگی ضروری است (Adams *et al.*, 2012) پردازش می‌شود. علاوه بر این چارچوب ژنی بزرگ، دو چارچوب ژنی کوچک نیز در ژنوم پوتی‌ویروس‌ها شناخته شده است (Wylie *et al.*, 2017). پروتئین پوششی (CP) به دلیل چند عملکردی بودن و نقش مهم آن در سازگاری میزبانی و اهمیت آن در انتقال ویروس با ناقل، جایگاه ویژه‌ای در مطالعات PVY دارد (Moury & Simon, 2011; Visser & Bellstedt, 2009). ویروس وای سیب‌زمینی دامنه میزبانی وسیعی دارد و در شرایط طبیعی بیش از نُه خانواده‌ی گیاهی از جمله بادنجانیان شامل سیب‌زمینی، توتون، گوجه‌فرنگی و فلفل را آلوده می‌کند (Green *et al.*, 2017a; Tsedaley, 2015) و یکی از شایع‌ترین ویروس‌های مزارع سیب‌زمینی و توتون در سراسر جهان می‌باشد (Karasev & Gray, 2013; Quenouille *et al.*, 2013). این ویروس از طریق غده‌های بذری سیب‌زمینی و توسط بیش از ۵۰ گونه شته متعلق به خانواده *Aphididae* و به صورت ناپایا منتقل می‌شود (Kerlan, 2006; Lacroix *et al.*, 2010). ویروس وای سیب‌زمینی در طبیعت به صورت مجموعه‌ای از سویه‌ها وجود دارد که بر اساس واکنش‌های فوق حساسیت (HR) نسبت به سه ژن مقاومت *N* شناخته شده در ارقام استاندارد سیب‌زمینی (Chikh-Ali *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2008) و خصوصیات مولکولی شامل توالی ژنوم و الگوهای نوترکیبی مشخص می‌شوند (Chikh-Ali *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2017a; Karasev & Gray, 2013; Lorenzen *et al.*, 2006). در حال حاضر، چهارده سویه PVY (Karasev & Gray, 2013) شامل پنج غیر نوترکیب (PVY^{O}، PVY^{C}، PVY^{NA-N}، PVY^{Eu-N}، و PVY^{O}-O5) و نُه سویه نوترکیب ($PVY^{N:O}$، PVY^{N-Wi}، PVY^{NTNa}، PVY^{NTNb}، PVY-NE11، PVY^{E}، و PVY-SYR-I، PVY-SYR-II و III–) شناخته شده است (Chikh-Ali *et al.*, 2016a; Chikh-Ali *et al.*, 2016b; Chikh-Ali *et al.*, 2007; Chikh-Ali *et al.*, 2010; Galvino-Costa *et al.*, 2012; Green *et al.*, 2017b; Hu *et al.*, 2009; Karasev & Gray, 2013; Lorenzen *et al.*, 2008; Lorenzen *et al.,* 2006; Schubert *et al.*, 2007). سویه‌های غیر نوترکیب PVY^{O}، PVY^{Eu-N} و PVY^{C} به عنوان والدین بسیاری از سویه‌های نوترکیب شناخته شده‌اند (Hu *et al.*, 2009; Lorenzen *et al.*, 2006; Ogawa *et al.*, 2012; Ogawa *et al.*, 2008). بسته به رقم میزبان، سویه‌ی PVY و زمان آلودگی، این ویروس سبب کاهش ۳۹ تا ۷۵ درصدی و در مورد سویه PVY^{N} ویروس تا ۱۰۰ درصد محصول سیب زمینی می‌گردد (Singh *et al.*, 2008; Tsedaley, 2015). تشخیص جدایه‌های PVY به دلیل تنوع بالا در سویه‌های شناسایی شده و بروز آلودگی به صورت همزمان چند سویه در میزبان، پیچیده می‌باشد. روش‌های رایج طبقه‌بندی بر اساس دامنه میزبانی، علائم‌شناسی و ویژگی‌های سرولوژیکی قادر به مشخص کردن سویه‌های PVY نمی‌باشند (Quenouille *et al.*, 2013; Revers *et al.*, 1996).

مطالعات مولکولی به عنوان ابزارهای مطالعه روند تکاملی، گسترش جغرافیایی سازگاری ویروس‌ها با میزبان‌های جدید، نقش مهمی در طراحی راهکارهای مناسب مدیریت و کنترل بیماری‌های ویروسی دارند (Elena *et al.*, 2011; Jones, 2009). ویروس وای سیب‌زمینی در بسیاری از مناطق ایران شیوع دارد و سویه‌های PVY^{NTN}، PVY^{N}، PVY^{O}، PVY^{C} و PVY^{NW} از میزبان‌های سیب‌زمینی، توتون، فلفل، بادنجان و گوجه‌فرنگی گزارش شده است (Hosseini *et al.*, 2011; Pourrahim & Farzadfar, 2016; Pourrahim *et al.*, 2007; Sadeghi *et al.*, 2008; Shamsaddin Saeed *et al.*,

2008; Toosi *et al*., 2004). در این پژوهش، ویژگی‌های بیولوژیکی چهار جدایه PVY از میزبان‌ها و مناطق مختلف ایران مورد مطالعه قرار گرفت ونیزواکاوی‌های مولکولی آنها براساس توالی نوکلئوتیدی بخشی از ناحیه ژنومی رمزکننده پروتئین پوششی (انتهای آمینی CP) به‌عمل آمد. نتایج این پژوهش می‌تواند در طراحی، توسعه و بهبود راهکارهای کنترل و مدیریت این بیماری ویروسی در ایران مؤثر باشد.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی، آزمون‌های سرولوژیکی و جدایه‌های ویروس

طی سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰، از گیاهان دارای علائم موزائیک توتون، سیب‌زمینی ، فلفل و علف هرز عروسک پشت پرده هشت شهرستان مختلف کشور شامل کرج، ارومیه، رشت، سنندج، شیراز، قزوین، ورامین و همدان نمونه برداری انجام گرفت و در مجموع ۱۱۷۸ نمونه گیاهی جمع‌آوری شد.

آلودگی نمونه های جمع‌آوری شده به ویروس وای سیب‌زمینی با آزمون ساندویچ دو طرفه الیزا (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, DAS-ELISA)(Clark & Adams, 1977) و با استفاده از پادتن چند همسانه‌ای اختصاصی PVY (DSMZ, AS-0137) بررسی شد. میزان جذب نوری چاهک‌های پلیت الیزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش الیزا (Beckman Coulter AD 340 microplate reader, Beckman, Brea, CA) تعیین و گیاهانی که میزان جذب چاهک مربوط به آنها بیش از سه برابر جذب چاهک شاهد منفی (گیاه سالم) بود به عنوان گیاه آلوده به ویروس در نظر گرفته شدند. از بین نمونه‌های با واکنش مثبت الیزا، چهار نمونه شامل دو نمونه سیب‌زمینی (Po5, Po2) به ترتیب از شهرهای ولدآباد کرج و رشت، یک نمونه توتون (Tob2) و یک نمونه عروسک پشت پرده (Ph1) از رشت انتخاب و خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

خالص سازی بیولوژیکی و مایه زنی جدایه های PVY روی گیاهان محک

خالص‌سازی بیولوژیکی جدایه‌های ویروس وای سیب‌زمینی با مایه‌زنی مکانیکی تک لکه موضعی روی گیاه محک موضعی *Chenopodium amaranticolor* انجام و روی میزبان سیستمیک *Nicotiana glutinosa* تکثیر شد. جدایه‌های خالص ویروس به روش مکانیکی روی تعدادی از گونه‌های گیاه محک مناسب ویروس به کمک بافر فسفات ۰/۱ مولار، pH ۷، حاوی Na2SO3 (2/0) درصد (وزنی/حجمی)) و PVP-40 (دو درصد (وزنی/حجمی)) مایه‌زنی گردید. گیاهان مایه‌زنی شده به مدت چهار هفته در گلخانه با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری و علائم موضعی و سیستمیک ثبت گردید. سه تا چهار هفته پس از مایه‌زنی، گیاهان با آزمون ساندویچ دو طرفه الیزا و شرایط مورد اشاره، آزمایش شدند.

استخراج آرانا کل و RT-PCR

آرانا کل از بافت برگ گیاهان *N. glutinosa* آلوده به جدایه‌های ویروس با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden Germany) و به روش توصیه شده شرکت سازنده استخراج و پس از ارزیابی کمی و کیفی آموده آرانا کل، برای تکثیر ناحیه انتهایی ´۳ ژنوم هر جدایه ویروسی به روش RT-PCR (reverse transcription- polymerase chain reaction) مورد استفاده قرار گرفت.

برای تکثیر ناحیه انتهای '3 ژنوم جدایه‌های PVY از جفت آغازگر اختصاصی CPUTR-F/CPUTR-R (جدول ۱) که ناحیه ژنی پروتئین پوششی و 3'-UTR به طول ۱۲۰۰ جفت باز را تکثیر می‌کند (Bukovinszki *et al*., 2007)، استفاده شد. واکنش‌های ساخت cDNA در حجم‌های ۲۰ میکرولیتری (حاوی µg ۵–۳ آرانا کل، pM ۵ آغازگر معکوس، µl ۴ بافر 5X RT، 0.5 mM dNTP، 0.5 mM DTT، ۲۰ واحد RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific,

England)، ۱۰۰ واحد آنزیم RevertAid M-MuLV (Thermo Fisher Scientific, England) و آب مقطر دیونیزه) تهیه و رشته دی‌ان‌ا مکمل در دمای ۴۲ °C به مدت یک ساعت ساخته شد. واکنش‌های PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری (حاوی ۵ µl محصول cDNA، ۲/۵ µl بافر 10X PCR، ۴ mM محلول $MgCl_2$، ۲ pM از هر آغازگر، ۰/۲ mM از dNTP، ۲ واحد آنزیم SmarTaq DNA polymerase (Sinaclon, Iran) و آب مقطر دیونیزه) تهیه شد. برنامه حرارتی شامل، یک چرخه واسرشتی اولیه در ۹۴ °C به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی شامل واسرشتی در ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در ۵۸ °C به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه اجرا گردید و محصول واکنش‌ها در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز افقی شد. قطعات دی‌ان‌ا تکثیر شده با استفاده از GF-1 Gel DNA recovery kit (Vivantis, Malaysia) از ژل آگاروز استخراج و برای تعیین توالی نوکلئوتیدی مستقیم از دو طرف به شرکت ماکروژن کره‌جنوبی ارسال گردید.

برای تعیین سویه جدایه‌های مورد بررسی از پنج آغازگر اختصاصی سویه (جدول ۱) در آزمون IC-RT-PCR (immunocapture-RT-PCR) استفاده شد (Lemmetty *et al.*, 1997). پس از پوشش‌دار کردن ویال ۰/۲ میکرولیتری با ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای (IgG) اختصاصی PVY (DSMZ, AS-0137) (۵۰۰ بار رقیق شده در بافر پوششی) به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ °C و سه بار شستشو با بافر شستشوی الیزا، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره برگ گیاه توتون آلوده به هر جدایه خالص PVY به ویال‌ها افزوده و به مدت یک شب در دمای ۴ °C در یخچال نگهداری شد. پس از سه بار شستشوی ویال‌ها با بافر شستشوی الیزا، مخلوط ساخت cDNA به هر ویال افزوده و مراحل بعدی طبق روش ذکر شده بالا برای RT-PCR انجام شد. جفت آغازگرهای N-8687F/N-9236R، O-8687F/O-9295R، N-8687F/O-9295R و C-8687F/O-9295R، با تکثیر قطعاتی به طول ۵۴۹، ۶۰۹، ۶۰۹ و ۶۰۹ جفت باز از ناحیه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی، به ترتیب برای شناسایی اختصاصی سویه‌های PVY^{N}، PVY^{O}، PVY^{NTN} و PVY^{C} استفاده شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی آغازگر	استفاده	منبع
CPUTR-F	AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGG-3'	تکثیر ناحیه انتهای '۳ ژنوم	Bukovinszki *et al.* (2007)
CPUTR-R	5'-AGGGAAGCTTCTAGAGTCTCCTGATTGAAG-3'		
O-8687F	5'-TCTGGRACACATACWGTRCCRA-3'	تشخیص سویه	Boonham *et al.* (2002)
O-9295R	5'-TGTACTGATGCCACCGTCGAAC-3'		
N-8687F	5'-TCTGGAACTCAYACTGTGCCAC-3'		
N-9236R	5'-CCTTCATTTGAATGTGTGCCTCT-3'		
C-8687F	5'-TCTGGAACWCATACTGTACCAA-3'		

توالی یابی و واکاوی تبارزائی

توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های PVY مورد بررسی در این پژوهش با توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌بانک NCBI مورد مقایسه قرار گرفت. همردیف‌سازی چندگانه توالی نوکلئوتیدی و توالی اسیدآمینه‌ای پیش بینی شده جدایه‌های این تحقیق با ۵۱ جدایه این ویروس (جدول ۲) از سویه‌های مختلف با نرم‌افزار MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) انجام شد. درصد یکسانی دوگانه نوکلئوتیدی جدایه‌های مختلف با نرم‌افزار SDT v. 1.2 (Muhire *et al.*, 2014) تعیین شد. درخت تبارزائی با نرم افزار MEGAX و روش حداکثر تشابه (Maximum likelihhod, ML)، با بهترین مدل جانشینی تعیین شده توسط نرم‌افزار و هزار بار تکرار، بازسازی و با ابزار برخط iTOL (https://itol.embl.de/itol.cgi) نمایش داده شد (Letunic & Bork, 2021). در بازسازی درخت تبارزائی، از یک توالی ویروس پیسک سبزرد آفتابگردان (*Sunflower chlorotic mottle virus*, SuCMoV) با رس‌شمار JN863233 به عنوان برون‌گروه استفاده شد.

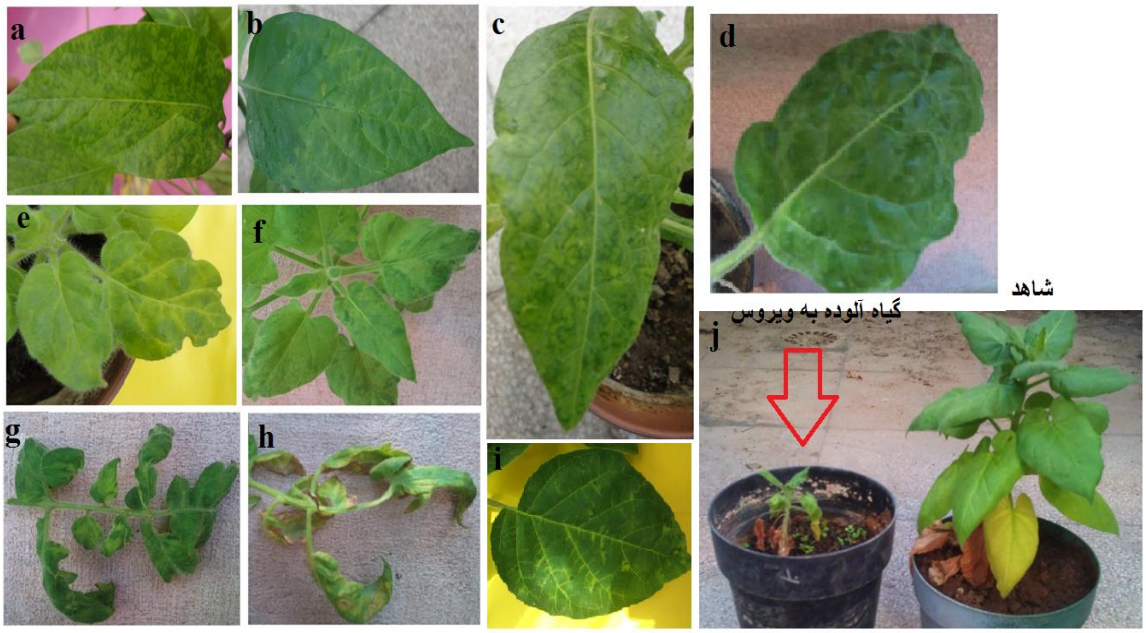
جدول ۲. مشخصات جدایه‌های **PVY** مورد استفاده در واکاوی‌های مولکولی

رس شمار	جدایه	سویه (ثبت شده در ژن‌بانک)	کشور	میزبان
AB256029	PVY-12/5		سوریه	*Solanum tuberosum* L.
AB295476	PVY-12/4	PVYN/NTN	سوریه	*S. tuberosum* L.
AB185833	PVY-12		سوریه	*S. tuberosum* L.
AB331515	NTND6	PVYNA-N	ژاپن	*S. tuberosum* L.
AB331516	NTNOK105	PVYNA-N	ژاپن	*S. tuberosum* L.
AB331519	NTNON92	PVYNA-N	ژاپن	*S. tuberosum* L.
AF012027	28	PVYC	اسپانیا	*S. tuberosum* L.
AJ439545	LYE84.2	PVYC	اسپانیا	*Solanum lycopersicum*L.
AJ584851	SASA 207	PVYN	انگلستان	*S. tuberosum* L.
AJ889867	156	PVYWilga	آلمان	*S. tuberosum* L.
AJ890344	Ditta	PVYNTN	Poland	*Nicotiana tabacum* L.
AJ890348	Adgen	PVYC	فرانسه	*S. tuberosum* L.
AM268435	New Zealand	PVYN	نیوزلند	*S. tuberosum* L.
AY166867	N-Jg	PVYN	امریکای شمالی	Tobacco
EF455803	Boushehr		ایران	*S. melongena* L.
EF026074	PVY-Oz	PVYO	امریکا	*S. tuberosum* L.
EU482153	Foggia	PVYC	ایتالیا	*S. lycopersicum* L.
EU563512	PRI-509	PVYC	هلند	*S. tuberosum* L.
HE608963	MV99		آلمان	*S. tuberosum* L.
HM367076	RB	PVYO5	کانادا	*S. tuberosum* L.
HM367075	FL	PVYO	کانادا	*S. tuberosum* L.
HM243477	HAM.KA.O	PVYN W	ایران	*S. tuberosum* L.
HM243484	KH.CH.O	PVYN W	ایران	*S. tuberosum* L.
HM243474	FA.OG.O	PVYN W	ایران	*S. tuberosum* L.
HM243471	AZA.TA.O	PVYN W	ایران	*S. tuberosum* L.
HM243479	HOR.MI.NTN.T	PVYNTN	ایران	*S. lycopersicum* L.
HQ912865	CW	PVYO	امریکا	*S. tuberosum* L.
HQ912910	CO1750	PVYO5	امریکا	*S. tuberosum* L.
JQ969036	GBVC_PVY_10 N	PVYN	بلژیک	*S. tuberosum* L.
JX424837	PVYOUK	PVYO	فنلاند	*S. tuberosum* L.
KC634008	11629-9	PVYNTN	انگلستان	*S. tuberosum* L.
KC634009	20917029	PVYNTN	انگلستان	*S. tuberosum* L.
KF933392	T5.NTN	PVYNTN	ایران	*S. lycopersicum* L.
KP063211	PV-1055	PVYC1	ایران	*N. tabacum* L.
KP063208	PV-0890	PVYC1	ایران	pepper
KR816243	Kzn5-06	PVYNTN	روسیه	*S. tuberosum* L.
KR816235	Kzn25-11	PVYN W	روسیه	*S. tuberosum* L.
KY002911		PVYC	کوبا	*S. lycopersicum* L.
KY112747		PVYN:O	فرانسه	*Nicotiana tabacum* cv. Samsun
LN907862	221		ایران	*S. tuberosum* L.
LN880858			ایران	*S. tuberosum* L.
MH603862		PVYNTNa	کره جنوبی	*S. tuberosum* L.
MF134861	Poha_1	genotype C	امریکا	*Physalis peruviana* L.
MF134862	Poha_2	genotype C	امریکا	*P. peruviana* L.
MF134863	Poha_3	genotype C	امریکا	*P. peruviana* L.
MF134864	Poha_4	genotype C	امریکا	*P. peruviana* L.
MF134865	Poha_5	genotype C	امریکا	*P. peruviana* L.
MF134866	Poha_6	genotype C	امریکا	*P. peruviana* L.
OP525294	DSMZ PV-1056		ایران	*N. tabacum* L.
OR480069	PVY-T21AL8.1T-RUS-2021		روسیه	*S. tuberosum* L.
X97895	605	PVYN	سوئیس	*S. tuberosum* L.

نتایج

آزمون‌های سرولوژیکی و مایه زنی مکانیکی روی گیاهان محک

آلودگی مجموع ۱۱۷۸ نمونه گیاهان توتون، سیب‌زمینی، عروسک‌پشت‌پرده و فلفل از طریق آزمون ساندویچ دو طرفه الیزا مورد بررسی قرار گرفت و درصد آلودگی به ویروس وای سیب‌زمینی در گیاهان جمع‌آوری شده توتون، سیب‌زمینی و عروسک‌پشت‌پرده، به ترتیب ۲۷/۲۷، ۲۰/۴ و ۱۸/۷۵ درصد برآورد گردید. علی رغم بررسی ۱۱۰۲ نمونه فلفل علائم‌دار، آلودگی به این ویروس در نمونه‌ها ردیابی نشد (جدول ۳) و به این دلیل درصد آلودگی در کل نمونه‌های مورد بررسی فقط معادل ۱/۳ درصد بود. در صورت در نظر نگرفتن نمونه‌های فلفل، فراوانی آلودگی در بین نمونه‌های مورد بررسی از سایر گیاهان حدود ۲۱ درصد بود. نتایج مایه‌زنی مکانیکی جدایه‌های خالص منتخب ویروس وای سیب‌زمینی روی گیاهان محک، در جدول ۴ آورده شده است. هفت روز پس از مایه‌زنی (dpi) لکه‌های موضعی سبزرد در برگ‌های مایه‌زنی شده سلمه قرمز ظاهر گردید. جدایه‌های Po2 و Tob2 در بوته‌های فلفل، رگ‌روشنی و موزائیک ایجاد کردند (شکل 1- a,b)، لیکن دو جدایه Ph1 و Po5 قادر به آلوده کردن گیاه فلفل نبودند. در گیاه *N. debneyi* موزائیک خفیف (جدایه Po2) تا شدید (سایر جدایه‌ها) مشاهده گردید (شکل 1- c). در گیاه *N. rustica* در هر چهار جدایه علایم موزائیک ایجاد گردید اما در جدایه Po2، علاوه بر موزائیک خفیف، چروکیدگی و بد شکلی برگ نیز مشاهده شد (شکل 1- d). روی گیاه گوجه‌فرنگی، هر سه جدایه به غیر از Ph1، باعث بروز علائم موزائیک، روخمشی و زردی برگ‌ها گردیدند (شکل 1- g,h)، نکته قابل توجه اینکه عدم آلودگی گیاهان گوجه‌فرنگی به جدایه‌ی Ph1 با DAS-ELISA تایید گردید. درگیاه *N. glutinosa*، جدایه‌های Ph1، Tob2 و Po5 باعث بروز موزائیک شدند (شکل 1- e, f). جدایه‌های مورد مطالعه در گیاه تاتوره (*Datura metel*)، سبب ایجاد علائم رگ‌روشنی، موزائیک خفیف تا شدید و بدشکلی برگ‌ها گردیدند (شکل1- i). جدایه‌ی Po2، سبب علائم موزائیک، رگ‌روشنی و کوتولگی بوته در *N. glutinosa* گردید (شکل 1- j).



شکل ۱. علائم ایجاد شده روی گیاهان محک مایه زنی شده با جدایه PVY-Po2. رگ روشنی (a) و موزائیک (b) روی گیاه فلفل (*Capsicum annuum*)، موزائیک سیستمیک *Nicotiana debneyi* (c)، موزائیک و چروکیدگی *Nicotiana rustica* (d)، رگ‌روشنی (e) و موزائیک (f) *Nicotiana glutinosa* ، موزائیک و قاشقی شدن (g) و زردی برگ (h) گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، رگ‌روشنی سیستمیک *Datura metel* (i)، کوتولگی (j) *N. glutinosa* در مقایسه با گیاه سالم (شاهد).

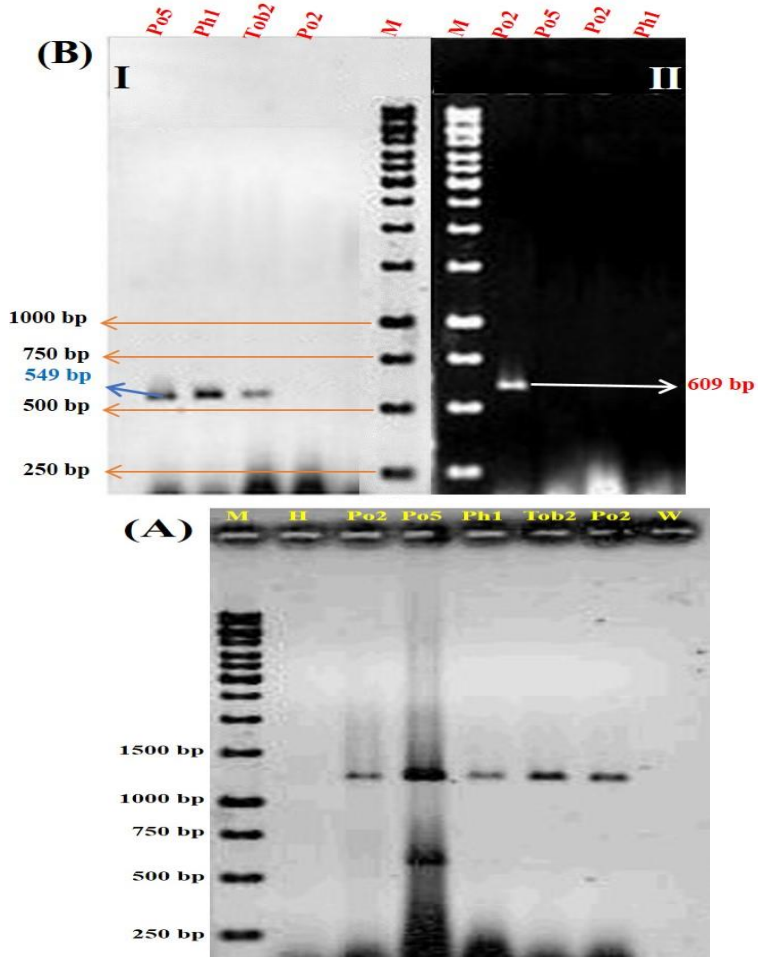
جدول ۳. نرخ وقوع ویروس وای سیب‌زمینی در نمونه‌های گیاهی علائم‌دار جمع‌آوری شده در این تحقیق

منطقه	تعداد نمونه‌های بررسی شده (تعداد نمونه‌های آلوده)			
	توتون	سیب‌زمینی	فلفل	عروسک پشت پرده
ارومیه	۴(۱)	۵ (۱)	۱۰ (۰)	–
کرج	–	۱۹ (۳)	۷۰۷ (۰)	–
رشت	۷ (۲)	۲ (۱)	۲ (۰)	۶ (۱)
همدان	–	–	۲۳ (۰)	–
شیراز	–	۸ (۲)	۴۷ (۰)	–
سنندج	–	–	۵۱ (۰)	–
قزوین	–	–	۱۴۵ (۰)	۱۰ (۲)
ورامین	–	۱۵ (۳)	۱۱۷ (۰)	–
کل	۱۱ (۳)	۴۹ (۱۰)	۱۱۰۲ (۰)	۱۶ (۳)
درصد آلودگی	۲۷/۲۷	۲۰/۴	۰	۱۸/۷۵

جدول ۴. دامنه میزبانی و علائم جدایه‌های PVY این تحقیق روی گیاهان محک پس از مایه‌زنی مکانیکی

گیاه محک	جدایه‌های PVY			
	Po2	Po5	Ph1	Tob2
فلفل (*Capsicum annuum* L.)	VC/M	–	–	VC/M
سلمه قرمز (*Chenopodium amaranticolor* L.)	CLL	CLL	CLL	CLL
سلمه (*C. quinoa* L.)	–	–	–	–
سلمه (*C. murale* L.)	–	–	–	–
تاتوره (*Datura metel* L.)	VC/M/ LD	VC/M	VC/M	VC/M
تاتوره (*D. stramonium* L.)	–	–	–	–
توتون (*Nicotiana debneyi* L.)	mM	M	M	M
توتون (*N. glutinosa* L.)	M/D/VC	M	M	M
توتون (*N. rustica* L.)	M/W	M	M	M
گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*)	mM/ LD	mM/ LD	–	M
لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Bountiful)	–	–	–	–
باقلا (*Vicia faba* L. cv. Saraziri)	–	–	–	–

M: موزائیک، mM: موزائیک خفیف، VC: رگ‌روشنی، CLL: لکه موضعی سبزرد، LD: بدشکلی برگ، D: کوتولگی، W: چروکیدگی، –: بدون علایم



شکل ۱. الگوی الکتروفورزی محصولات **RT-PCR** جدایه‌های ویروس وای سیب‌زمینی. (A) با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی CPUTR-F/CPUTR-R و (B) با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی سویه N (N-8687F و N-9236R) (BI) و سویهC (C-8687F/O-9295R) (BII). راهک‌های M) نشانگر اندازه DNA یک کیلو بازی، Gene Ruler TM, SM0313 1Kb DNA Ladder، H) گیاه سالم و W) آب مقطر.

جدول ۵. خصوصیات مولکولی جدایه‌های ویروس وای سیب‌زمینی در این تحقیق

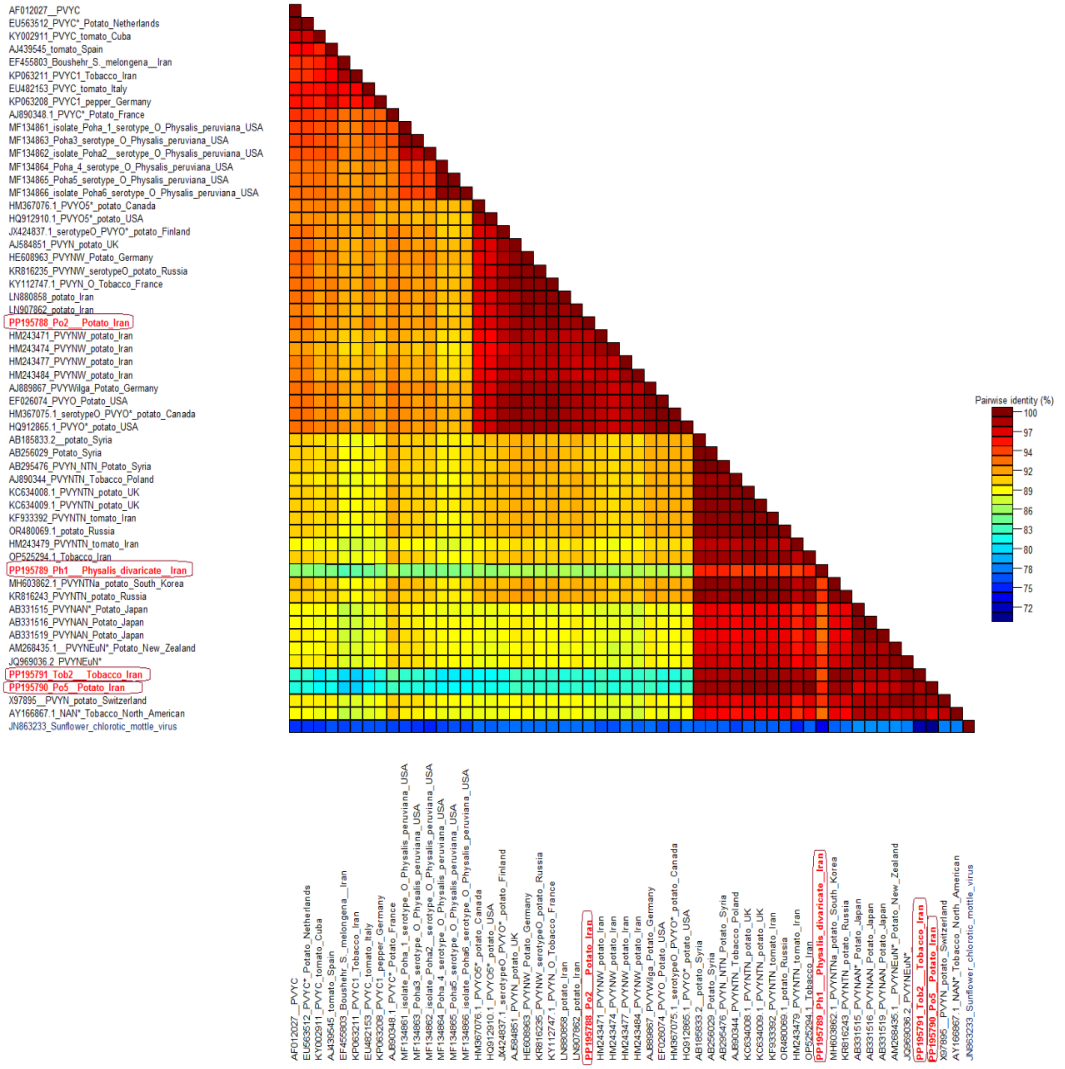
نام جدایه	استان (منطقه)	میزبان	سویه براساس آغازگرهای اختصاصی سویه	طول قطعه توالی‌یابی شده (bp)	رس‌شمار	گروه مولکولی
Po2	البرز (ولد آباد)	سیب‌زمینی	O	۷۶۲	PP195788	PVY^{O}
Po5	گیلان (رشت)	سیب‌زمینی	N	۲۷۶	PP195790	$PVY^{N/NTN}$
Ph1	گیلان (رشت)	*Physalis divaricata*	N	۴۵۹	PP195789	$PVY^{N/NTN}$
Tob2	گیلان (رشت)	*Nicotiana tabacum* cv. Burley 21	N	۲۶۹	PP195791	$PVY^{N/NTN}$

RT-PCR، توالی یابی و واکاوی تبارزائی

از ناحیه انتهای '3 ژنوم جدایه‌های PVY با استفاده از جفت آغازگر اختصاصیCPUTR-F/CPUTR-R قطعه‌ای با طول مورد انتظار ۱۲۰۰ جفت‌باز تکثیر شد (شکل ۲، A) که شامل ناحیه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی و 3'-UTR بود. توالی‌یابی کامل قطعات تکثیر شده ناموفق بود و فقط توالی نوکلئوتیدی دو انتهای هر قطعه به دست آمد که منجر به توالی یابی بخشی ازناحیه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی (جدول ۵) و ناحیه‌ای از 3'-UTR به طول ۲۵۰ جفت‌باز از جدایه‌ها گردید. توالی بخشی از ناحیه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی جدایه‌ها طبق رس‌شمارهای جدول ۵ در ژن‌بانک NCBI ثبت شد. همردیف‌سازی چندگانه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ناحیه ژنی رمزکننده پروتئین پوششی (بخش انتهایی آمینی) جدایه‌های این تحقیق با ۵۱ جدایه این ویروس از سویه‌های مختلف (جدول ۲) نشان داد که بیشترین و کمترین درصد یکسانی جدایه‌های به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف و مناطق جغرافیایی ایران، به ترتیب بین جدایه‌های Po5 با Tob2 (88/98) و جدایه‌های Po2 با Tob2 (27/83 درصد) می‌باشد. درخت تبارزایی براساس همردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی رمزکننده بخش انتهایی آمینی پروتئین پوششی جدایه‌های PVY با نرم‌افزار MEGA X، بهترین مدل جانشینی T92+G4 و ۱۰۰۰ بار تکرار و جدایه SuCMoV با رس‌شمار JN863233 به عنوان برون‌گروه بازسازی شد. در این درخت جدایه‌های ویروس در سه کلاد کاملا مجزای C، O و N/NTN قرار گرفتند که سه جدایه Po5، Tob2 و Ph1 با بیشترین قرابت با جدایه‌های PVY^{NTN}، در کلاد N/NTN و جدایه Po2 در کلاد O قرار گرفتند (شکل ۳). بر اساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی دوتایی ۵۵ جدایه PVY (برای ۵۱ جدایه گزارش شده از ژن‌بانک و چهار جدایه گزارش شده در این تحقیق) با استفاده از SDT (شکل ۴)، برای جدایه‌ی ایرانی Po5، بیشترین همسانی توالی (۱۰۰ درصد) با جدایه‌ی DSMZ PV-1056 با رس‌شمار (OP525294) از ایران ارزیابی گردید. جدایه Tob2 نیز بیشترین همسانی توالی (۹۹/۶۲ درصد) با جدایه‌های PVY-10N-GBVC (رس‌شمار JQ969036، از بلژیک)، Kzn5-60 (رس‌شمار KR816243، از روسیه) و سویه PVY^{NTN} با رس‌شمار (MH603862) از کره‌جنوبی داشت. برای جدایه Po2 نیز بیشترین همسانی توالی (۹۹/۴۷ درصد) با جدایه‌ی سویه $PVY^{N:O}$ با رس‌شمار (KY112747) از فرانسه مشاهده گردید. جدایه Ph1 نیز بیشترین همسانی توالی (۹۵/۶۵ درصد) با جدایه‌ی Po5 و (۹۴/۶۴ درصد) با جدایه‌های DSMZ PV-1056 و جدایه PVY-12/5 با رس‌شمار (AB256029) از سوریه داشت.

آزمون IC-RT-PCR با استفاده از ترکیب‌های توصیه شده از پنج آغازگر اختصاصی سویه‌های ویروس وای سیب‌زمینی (جدول ۱) و آموده آران‌ا کل استخراج شده از گیاهان آلوده به چهار جدایه خالص PVY در این تحقیق انجام شد. بر اساس الگوی الکتروفورزی محصول واکنش‌ها در ژل آگارز، با ترکیب آغازگری N-8687F/N-9236R قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۵۵۰ جفت‌باز در واکنش‌های مربوط به سه جدایه Po5، Tob2 و Ph1 (شکل ۲، BI) و با ترکیب آغازگری C-8687F/O-9295R قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۶۱۰ جفت‌باز در واکنش جدایه Po2 (شکل ۲، BII) تکثیر شد. در واکنش‌ها با سایر ترکیبات آغازگری و جدایه‌ها و نیز با ترکیبات مختلف آغازگری با نمونه گیاه سالم (شاهد منفی) هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد. این نتایج نشان دهنده تعلق سه جدایه اول به سویه‌های PVY^{N} و جدایه Po2 به سویه PVY^{O} بود.

شکل ۲. درخت تبارزائی بر اساس ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ناحیه‌ژنی رمزکننده پروتئین پوششی ژنوم ۵۱ جدایه ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) از مناطق مختلف دنیا و چهار جدایه ایرانی (Po2، Po5، Tob2 و Ph1) با استفاده از نرم‌افزار MegaX، به روش Maximum likelihood و ۱۰۰۰ مرتبه تکرار. توالی ویروس پیسک سبزرد آفتابگردان (SuCMoV) با رس‌شمار JN863233، به عنوان برون‌گروه استفاده گردیده است.



شکل ۳. ماتریکس یکسانی ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنومی CP جدایه‌های مختلف ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) ایران و جهان به همراه توالی ویروس پیسک سبزرد آفتابگردان (SuCMoV) با رس‌شمار JN863233 (به عنوان برون گروه در درخت تبارزائی) با استفاده از نرم‌افزار SDT. رنگ آبی و قرمز به ترتیب، نشان دهنده کمینه و بیشینه یکسانی می‌باشد.

بحث

ویروس وای سیب‌زمینی یکی از ویروس‌های محدودکننده تولید توتون و سیب‌زمینی در دنیا می‌باشد (Hooker, 1981; Tsedaley, 2015). با توجه به اهمیت محصولات بادنجانیان (به ویژه سیب‌زمینی) در ایران، پس از نمونه‌برداری از گیاهان علائم‌دار توتون، سیب‌زمینی، علف هرز عروسک پشت‌پرده و فلفل طی سال های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۰ و بررسی آلودگی آنها به ویروس وای سیب‌زمینی با روش DAS-ELISA، آلودگی ۱۶ نمونه (معادل ۲۱درصد) از ۷۶ نمونه توتون، سیب‌زمینی و علف هرز عروسک پشت‌پرده تعیین شد. این نتایج با درصد آلودگی ۲۴ و ۳۴/۴ درصدی PVY در مزارع سیب‌زمینی ایران (Hosseini *et al.*, 2011; Pourrahim *et al.*, 2007) و ۱۳/۷۳ درصدی مزارع توتون (Sharifi-Nezamabad *et al.*, 2020) شباهت دارد. علی‌رغم بررسی تعداد فراوانی نمونه فلفل علائم‌دار (۱۱۰۲ نمونه گیاهی) از شهرهای مختلف کشور، آلودگی به این ویروس در نمونه‌های فلفل ردیابی نشد که نتیجه‌ای جالب توجه و دور از انتظار بوده و با گزارش آلودگی ۵۹ درصدی نمونه‌های فلفل استان تهران (Mostafaei *et al.*, 2008) منافات دارد. به دلیل تعداد بالای نمونه‌های فلفل مورد بررسی و عدم ردیابی این ویروس در آنها، درصد آلودگی کلی در نمونه‌های مورد بررسی (۱۱۷۸ نمونه علائم‌دار) به PVY در این تحقیق معادل ۱/۳ درصد برآورد شد. با توجه به گزارش ویروس‌های دیگری از فلفل در ایران، نظیر ویروس لکه حلقه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato ringspot virus*, ToRSV)، ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus*, TMV) و ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) (Eyvazi *et al.*, 2015; Moodley *et al.*, 2019; Sokhansanj *et al.*, 2012)، احتمالاً ویروس‌های دیگری غیر از PVY باعث بروز علائم در این نمونه‌ها شده بودند.

دامنه میزبانی و علائم ایجاد شده روی گیاهان محک به عنوان بخشی از ویژگی‌های بیولوژیکی، برای شناسایی و تمایز سویه‌های PVY استفاده شده است (Baldauf *et al.*, 2006; Boonham *et al.*, 2002; Hosseini *et al.*, 2011; Hosseini *et al.*, 2017; Mostafaei *et al.*, 2008). براساس نتایج تحقیق حاضر، فقط جدایه‌های Po2 (سویه PVY^{O}) و Tob2 (سویه PVY^{N}) باعث آلودگی سیستمیک و بروز علائم رگ‌روشنی و موزائیک در فلفل (*C. annuum*) گردید، در حالی که دو جدایه دیگر (Po5 و Ph1 متعلق به سویه PVY^{N}) قادر به آلوده کردن این گونه نبودند. مشابه این نتایج، عدم آلودگی ۱۰ رقم فلفل با سویه‌های PVY^{O} و PVY^{N} قبلا گزارش شده است (Choi *et al.*, 2004). اگرچه، گیاهان *C. amaranticolor* و *C. quinoa* به عنوان میزبان موضعی جهت خالص‌سازی بیولوژیکی برای PVY معرفی شده‌اند اما هیچ یک از چهار جدایه‌ی PVY مورد مطالعه در این تحقیق نتوانستند *C. quinoa* را آلوده کنند. نتایج مشابهی برای برخی از جدایه‌های PVY نیز قبلا گزارش شده است (Crescenzi *et al.*, 2005; Hosseini *et al.*, 2011; Lorenzen *et al.*, 2006; Mostafaei *et al.*, 2008). هر چهار جدایه‌ی مورد مطالعه در این تحقیق سبب آلودگی سیستمیک در تاتوره (*D. metel*) شده و علائم موزائیک و رگ‌روشنی ایجاد کردند، علایم مشابهی توسط سویه‌های PVY^{N} و PVY^{NTN} در مطالعات (Hosseini *et al.*, 2011) گزارش شده است. جدایه‌ی Tob2 باعث موزائیک و جدایه‌های Po2 و Po5 باعث موزائیک خفیف و بدشکلی برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی شد، در حالی که جدایه Ph1 قادر به آلوده کردن این گیاه نبود. در تحقیقات پیشین، جدایه‌های PVY تفاوتی در آلودگی و علایم ایجاد شده روی گوجه‌فرنگی نشان ندادند (Hosseini *et al.*, 2011). چهار جدایه PVY در این تحقیق *N. rustica*، *N. debneyi* و *N. glutinosa* را به صورت سیستمیک آلوده نمودند و به طور کلی علایم ایجاد شده در هر سه گونه فوق توسط سه جدایه‌ی Tob2 ، Ph1 و Po5 مشابه هم و متفاوت از جدایه Po2 (موزائیک شدید، زردی و حتی مرگ بوته) بود. با توجه به تعدد نوترکیب های ویروس وای سیب زمینی که منجر به ظهور سویه‌های جدید می شود، احتمال می رود تفاوت بین دامنه میزبانی جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق با نتایج تحقیقات پیشین، ناشی از وقوع نوترکیبی بین جدایه‌ها باشد که روشن شدن این امر مستلزم تعیین توالی کل ژنوم یا حداقل ژن های دخیل در دامنه میزبای مانند VPg می باشد.

گونه *Potato virus Y* گونه‌ای مرکب از سویه‌هایی است که براساس خصوصیات بیولوژیکی آنها و واکنش ارقام افتراقی توتون و سیب‌زمینی و خصوصیات مولکولی (Karasev & Gray, 2013) قابل تفکیک هستند. ناحیه ژنومی رمزکننده پروتئین پوششی (به ویژه ناحیه انتهایی آمینی (N ترمینال)) کاربرد زیادی در مطالعات تنوع ژنتیکی PVY دارد (Ahmed & Elci, 2019; Hosseini *et al*., 2011; Hosseini *et al*., 2017; Mostafaei *et al*., 2008; Pourrahim & Farzadfar, 2016; Pourrahim *et al*., 2007). بخش انتهایی آمینی پروتئین پوششی PVY، نمونه قابل توجهی از پروتئین‌های چند کارکردی پوتی ویروسی است. پیش‌بینی می‌شود که این بخش از CP روی سطح ویریون قرار گرفته و در تعامل مولکولی با لیگاندها و انتقال شته‌ها (Atreya *et al*., 1995)، حرکت سلول به سلول و حرکت طولانی مسافت (آوندی) ویروس نقش دارد (Dolja *et al*., 1995; Rojas *et al*., 1997). بر اساس همردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی رمزکننده بخش انتهایی آمینی پروتئین پوششی PVY، جدایه‌های ویروس در سه کلاد کاملا مجزا (C, O, N/NTN) قرارگرفتند، که نشان می‌دهد توالی نوکلئوتیدی این بخش از ژنوم برای تعیین سویه جدایه‌های PVY کفایت می‌کند. با توجه به عدم توالی‌یابی موفق ابتدای ناحیه رمزکننده CP جدایه‌های این تحقیق، امکان پیش بینی اولین آمینواسید پروتئین پوششی نیز میسر نشد، لیکن مطابق نتایج تحقیقات پیشین (Chachulska *et al*., 1997; van der Vlugt *et al*., 1993)، شروع توالی آمینواسیدی پیش‌بینی شده CP در جدایه‌های ایرانی PVY^{O} با آلانین (A) و جدایه‌های ایرانی PVY^{N} و PVY^{NTN} با گلایسین (G) گزارش شده است (Hosseini *et al*., 2011). همچنین، بررسی دقیق توالی آمینواسید پیش بینی شده CP نشان داد که جدایه‌های ایرانی PVY^{N} و PVY^{NTN} دارای موتیف اختصاصی GSTKKDAKQ (موقعیت ۹-۱۷) و PNLNKEKE (موقعیت ۲۴-۳۱) می‌باشند که در جدایه‌های ایرانی PVY^{O} وجود ندارند (Hosseini *et al*., 2011).

با توجه به همردیف‌سازی توالی آمینواسیدی پیش‌بینی شده پروتئین پوششی چهار جدایه مورد مطالعه در این تحقیق (شکل ۵)، (۱۰۶-۱۴ aa) برای جدایه PVY-Po5، (۱۰۳-۱۴ aa) برای جدایه PVY-Tob2، (۱۶۶-۱۴ aa) برای جدایه PVY-Ph1 و (۲۶۷-۱۴ aa) برای جدایه PVY-Po2 با سایر جدایه‌های PVY به دست آمده از ژن‌بانک، جدایه‌های ایرانی Po5 و Tob2 مانند سویه‌های PVY^{N} و PVY^{NTN} (مانند KR816243، KC634009، KC634008، JQ969036، AB295476، AB331515، AB331516، AJ890344، AM268435، AY166867، HM243479، JQ969036)، دارای موتیف اختصاصی سویه (PNLNKEKE) در موقعیت ۲۴-۳۱ بودند در حالی که جدایه Po2 مشابه سویه‌های متعلق به دودمان O (مانند HM243474، LN907862 و HQ912910)، حامل موتیف اختصاصی SNLNKGKD (در همان موقعیت ۲۴-۳۱) است که در سایر جدایه‌های ایرانی (Po5، Tob2 و Ph1) مشاهده نگردید. توالی آمینواسیدی در این موتیف در جدایه Ph1 نیز تا حدودی مشابه با جدایه‌های Po5 و Tob2 می‌باشد (شکل ۵). در موقعیت ۲۸۲۶-۲۸۰۷ پلی‌پروتئین (در ناحیه آمینی پروتئین پوششی) سویه‌های PVY^{O} و PVY^{C} ویروس وای سیب‌زمینی، توالی به طول ۲۰ آمینواسید (KDAKQEQGSIQSNPNKGKDK، موقعیت ۳۲-۱۳ CP در شکل ۵) قرار دارد که این توالی در سویه‌های PVY^{N}، در موقعیت ۲۸۲۵-۲۸۱۹ پلی‌پروتئین (در بخش آمینی پروتئین پوششی به طول هفت آمینواسید (NLNKEKE ، موقعیت ۳۱-۲۵ CP در شکل ۵)) متفاوت بوده و مربوط به اپی‌توپ (NLNKEKE، (epitope ID 238801)) و اختصاصی سویه می‌باشد (Tian *et al*., 2014). در این اپی‌توپ در سویه‌های PVY^{N} و PVY^{NTN}، در موقعیت ۲۸۱۸ (موقعیت ۲۴ CP در شکل ۵)، به جای آمینواسید سرین (S) ، آمینواسید پرولین (P) قرار گرفته است. در موقعیت ۲۸۲۰ نیز به جای آمینواسید پرولین، آمینواسید لوسین قرار دارد . در این سویه‌ها همچنین در موقعیت ۲۸۲۳ و ۲۸۲۵ (به ترتیب موقعیت‌های ۲۹ و ۳۱ CP در شکل ۵)، به جای آمینواسیدهای گلیسین (G) و اسید آسپارتیک (D) آمینواسید اسید گلوتامیک (E) قرار گرفته است. در جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق نیز توالی مربوط به اپی‌توپ اختصاصی سویه‌های PVY^{N} و PVY^{NTN} در بخش آمینی پروتئین‌پوششی برای دو جدایه Po5 و Tob2 مشاهده گردید. جدایه Ph1 با اینکه در درخت تبارزائی در کلاد N/NTN قرار گرفته، در این موتیف توالی متفاوتی از سویه N/NTN دارد. شایان ذکر است که براساس درخت تبارزائی (شکل ۳) و نیز

همردیف‌سازی توالی آمینواسیدی پیش بینی شده پروتئین پوششی (شکل ۵)، جدایه با رس‌شمار AJ584851 متعلق به خوشه O می باشد، در حالی که در ژن‌بانک به عنوان سویه N ثبت شده است. سویه‌های PVY^{O}، در موقعیت ۲۸۳۷–۲۸۲۱ پلی‌پروتئین (در ناحیه آمینی پروتئین پوششی) دارای توالی اختصاصی سویه به طول ۱۷ آمینواسید (NKGKDKDVNAGTSGTHT (موقعیت ۴۳–۲۷ CP در شکل ۵)) مربوط به اپی‌توپ (epitope ID 86822) می‌باشند (Joisson *et al.*, 1992) که در بررسی‌های صورت گرفته، این توالی در سویه‌های PVY^{O} و جدایه Po2 مورد مطالعه مشاهده شد در حالی که در سایر جدایه‌ها مشاهده نگردید. این اپی‌توپ دارای توالی به طول چهار آمینواسید (GTHT) در موقعیت ۲۸۳۴ تا ۲۸۳۷ می‌باشد که در ساختار دوم پروتئین تشکیل صفحات بتا می‌دهد و در تمام جدایه‌ها حفاظت شده است (شکل ۵). همچنین در ناحیه آمینی پروتئین پوششی PVY در موقعیت ۲۸۸۵–۲۸۶۸ پلی‌پروتئین، توالی به طول ۱۸ آمینواسید (APQQIDISNTRATQSQFD (موقعیت ۹۱–۷۴ CP در شکل ۵)) مربوط به اپی‌توپ (epitope ID 80425) ویروس وجود دارد (Joisson *et al.*, 1992) که در تمام سویه‌ها حفاظت شده بوده و در جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق نیز مشاهده گردید. درپروتئین پوششی پوتی‌ویروس‌ها در موقعیت ۲۹۱۷–۲۹۱۰ پلی‌پروتئین یک موتیف اختصاصی حفاظت شده با توالی MVWCIENG (موقعیت ۱۲۳–۱۱۶ CP در شکل ۵) وجود دارد (Pappu *et al.*, 1993) که در توالی جدایه Po2 نیز مشاهده گردید.

داده‌های بیولوژیکی و واکاوی‌های مولکولی در سطح توالی نوکلئوتیدی، روابط تبارزائی و توالی آمینواسیدی پیش بینی شده نشان داد که سه جدایه از چهار جدایه (Po5، Tob2 و Ph1 از استان گیلان) نزدیک‌ترین همبستگی را با سویه‌های PVY^{NTN} دارند (شکل ۳). با این نتایج، احتمال می رود فراوانی سویه N/NTN در مناطق مورد بررسی از ایران در این تحقیق، بیشتر از سایر سویه ها باشد. گونه‌های مختلف علف هرز عروسک پشت پرده به عنوان میزبان PVY در طبیعت شناخته شده‌اند (Kerlan, 2006). گزارش‌های متعددی از آلودگی *Physalis peruviana* به ویروس وای سیب‌زمینی از مناطق مختلف دنیا (Aguirre-Ráquira *et al.*, 2014; Esquivel-Fariña *et al.*, 2022; Kisten *et al.*, 2016; Moodley *et al.* 2019) و با جدایه‌های غیرنوترکیب، با ویژگی‌های بیولوژیکی منحصر به فرد و تنوع ژنتیکی زیاد (به نام‌های Poha1-6) از سویه PVY^{C} (Green *et al.*, 2017a) گزارش شده است. در ایران آلودگی *Physalis divaricata* (synonym of *Physalis halicacabum*) به PVY از کرمان گزارش شده است (Shamsaddin Saeed *et al.*, 2008). در این تحقیق نیز جدایه‌ی Ph1، علی‌رغم قرار گرفتن در کلاد $PVY^{N/NTN}$ تبارزائی، علاوه بر عدم توانایی آلوده کردن گوجه‌فرنگی، مشابه جدایه‌های Poha قادر به آلوده کردن فلفل نیز نبود که نشان دهنده تفاوت این جدایه با سایر جدایه‌ها از نظر بیولوژیکی می‌باشد. این اولین گزارش از آلودگی *P. divaricata* به سویه $PVY^{N/NTN}$ در دنیا می‌باشد. بسیاری از مطالعات شیوع جهانی نوترکیب‌های PVY را نشان داده‌اند (Chrzanowska, 1991; Glais *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2009; Lorenzen *et al.*, 2006). در اروپا، سویه‌های غیر نوترکیب کلاد PVY^{O} تا حد زیادی با سویه نوترکیب PVY^{NTN} جایگزین شده‌اند (Boonham *et al.*, 2002). در تحقیقات پیشین مشخص گردید که در طول دهه‌های اخیر، شیوع سویه PVY^{NTN} در جمعیت PVY در برخی از استان‌ها در غرب، مرکز و جنوب ایران که مناطق مهم کشت سیب‌زمینی می‌باشند به طور قابل توجهی افزایش یافته است (Hosseini *et al.* 2017; Pourrahim & Farzadfar, 2016; Pourrahim *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر نیز سویه‌های $PVY^{N/NTN}$ به عنوان سویه‌های غالب در شمال ایران معرفی می‌شوند.

نتیجه‌گیری

بررسی آلودگی چهار گونه میزبانی ویروس وای سیب‌زمینی از شهرهای مختلف کشورحاکی از آلودگی به دو سویه $PVY^{N/NTN}$ و PVY^{O} و نیز عدم ردیابی این ویروس در بیش از ۱۰۰۰ نمونه فلفل بود، که مورد اخیر ضرورت مطالعه ویروس‌های فلفل را بیان می‌کند. همچنین آلودگی *P. divaricata* به سویه $PVY^{N/NTN}$ برای اولین بار در دنیا گزارش می‌شود، با این‌که توالی‌یابی کل ژنوم برای تعیین قطعی سویه این جدایه و جدایه‌های بیشتری توصیه می‌گردد. مطالعات تکاملی

نشان داد که جمعیت‌های PVY به صورت دودمان‌های مجزا بوده و منشا جغرافیایی، جهش، نوترکیبی و سازگاری میزبان منابع اصلی تنوع ژنتیکی برای شکل دادن به ساختار جمعیت PVY می‌باشند (Boonham *et al.*, 2002; Hosseini *et al.* 2017; Hu *et al.*, 2009). فشار انتخاب منفی بر ژن *cp* به جهت حفظ سویه‌های تیپ وحشی PVY در طبیعت بوده (Hosseini *et al.*, 2017) و بر اساس تحقیقات پیشین مشخص گردید که ژن *cp* به خصوص در ناحیه انتهای امینی و بخش مرکزی دارای چندین محل آمینواسید تحت فشار انتخاب مثبت می‌باشد (Moury & Simon, 2011; Pourrahim & Farzadfar, 2016). این یافته‌ها استدلال می‌کنند که ژن *cp* یک شاخص مؤثر برای مطالعه تنوع ژنتیکی و تکامل جمعیت‌های PVY است. جمعیت ایرانی PVY تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی بالایی در این ژن دارند. تنوع بالای نوکلئوتیدی در جمعیت ایرانی PVY، احتمالاً به دلیل حضور سویه‌های متعلق به جمعیت‌های تبارزائی PVY^{O}، PVY^{C} و $PVY^{N\text{-}Europe}$ است (Hosseini *et al.*, 2017). در مجموع، واکاوی‌های تبارزائی، بیولوژیکی و تنوع توالی ژن *cp* نشان داد که جدایه‌های ایرانی PVY یک جمعیت متنوع را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، ظهور تیپ‌های جدید ژنتیکی نشان دهنده یک زنگ خطر احتمالی بالایی است که باید در برنامه‌ریزی برای راهکارهای کنترل کارآمد در نظر گرفته شود (Elena *et al.*, 2011). با توجه به تنوع روزافزون سویه‌های نوترکیب ویروس وای سیب‌زمینی در دنیا و برای دستیابی به اطلاعات دقیقی از حضور و پراکنش سویه‌های ویروس در کشور، نیاز به بررسی آلودگی گونه‌های میزبان طبیعی به این ویروس براساس خصوصیات بیولوژیکی و واکاوی‌های مولکولی امری ضروری است تا راهکارهای مدیریتی صحیح و کارآمد پایه‌ریزی گردد.

شکل ۴. مقایسه‌ی ترادف آمینواسیدی پروتئین پوششی ژنوم سویه‌های ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) با چهار جدایه ایرانی (Po2، Po5، Tob2 و Ph1) از نظر توالی در محل اپی‌توپ‌ها (قسمت‌های هایلایت مشکی) و موتیف‌های اختصاصی سویه PVYN (PNLNKEKE) و سویه PVYO (SNLNKGKD) و سایر پوتی‌ویروس‌ها.

منابع

شریفی نظام آباد، پریسا؛ نصراله نژاد، سعید؛ آقاجانی، محمدعلی؛ دیزجی، اکبر و ندیمی احمد (۱۳۹۸). بررسی شاخص های مهم مرتبط با بیماری ویروسی وای سیب زمینی (Potato virus Y) در مزارع توتون استان گلستان. *آفات و بیماری های گیاهی*، ۸۷ (۲)، ۲۲۷- ۲۴۰.

شمس الدین سعید، فاطمه؛ معصومی، حسین؛ حسینی، عاطفه؛ حسنی پور، اکبر؛ حیدرنژاد، جهانگیر؛ شعبانیان، مهدی و میرتاج‌الدینی، منصور (۱۳۸۷). معرفی چند میزبان جدید ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) در استان کرمان. *هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران*، همدان، ایران.

طوسی، نفیسه؛ آهون منش، علی؛ پوررحیم، رضا و بهار، مسعود (۱۳۸۳). شناسائی نژادهای C و N ویروس Y سیب زمینی با استفاده از Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT- PCR) و Restriction Fragment Lenth Polymorphism (RFLP). *شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران*، تبریز، ایران.

REFERENCES

Adams, M. J., Zerbini, F. M., French, R., Rabenstein, F., Stenger, D. C., & Valkonen, J. P. T. (2012). Family Potyviridae. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 1069-1089). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00093-8

Aguirre-Ráquira, W., Borda, D., & Hoyos-Carvajal, L. (2014). Potyvirus affecting Uchuva (*Physalis peruviana* L.) in Centro Agropecuario Marengo, Colombia. *Agricultural Sciences*, 5(10), 897-905. https://doi.org/10.4236/as.2014.510097

Ahmed, M. A., & Elci, E. (2019). Effects of Potato Virus Y strains on local tomato genotype "Sazlıca". *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2(3), 205-220. https://dergipark.org.tr/en/pub/ijlsb/issue/47871/585290

Atreya, P. L., Lopez-Moya, J. J., Chu, M., Atreya, C. D., & Pirone, T. P. (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology*, 76(2), 265-270. https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-2-265

Baldauf, P. M., Gray, S. M., & Perry, K. L. (2006). Biological and serological properties of Potato virus Y isolates in northeastern United States potato. *Plant Disease*, 90(5), 559–566. https://doi.org/10.1094/Pd-90-0559

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(1-2), 103-112. https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00008-3

Bukovinszki, A., Gotz, R., Johansen, E., Maiss, E., & Balazs, E. (2007). The role of the coat protein region in symptom formation on Physalis floridana varies between PVY strains. *Virus Research*, 127(1), 122-125. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.03.023

Chachulska, A. M., Chrzanowska, M., Robaglia, C., & Zagórski, W. (1997). Tobacco veinal necrosis determinants are unlikely to be located within the 5′ and 3′ terminal sequences of the potato virus Y genome. *Archives of Virology*, 142(4), 765-779. https://doi.org/10.1007/s007050050117

Chikh-Ali, M., Bosque-Pérez, N. A., Vander Pol, D., Sembel, D., & Karasev, A. V. (2016a). Occurrence and molecular characterization of recombinant *Potato virus* Y^{NTN} isolates from Sulawesi, Indonesia. *Plant Disease*, 100(2), 269-275. https://doi.org/10.1094/pdis-07-15-0817-re

Chikh-Ali, M., Alruwaili, H., Vander Pol, D., & Karasev, A. V. (2016b). Molecular characterization of recombinant strains of Potato virus Y From Saudi Arabia. Plant Disease, 100(2), 292-297. https://doi.org/10.1094/pdis-05-15-0562-re Chikh-Ali, M., Maoka, T., & Natsuaki, K. T. (2007). The occurrence and characterization of new recombinant isolates of PVY displaying shared properties of $PVY^{N}W$ and PVY^{NTN}. *Journal of Phytopathology*, 155(7-8), 409-415.

https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01251.x

Chikh-Ali, M., Maoka, T., Natsuaki, T., & Natsuaki, K. T. (2010). PVY^{NTN-NW}, a novel recombinant strain of *Potato virus Y* predominating in potato fields in Syria. *Plant Pathology*, 59(1), 31-41. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02174.x

Chikh-Ali, M., Rowley, J. S., Kuhl, J., Gray, S. M., & Karasev, A. V. (2014). Evidence of a monogenic nature of the *Nz* gene conferring resistance against *Potato virus Y* strain Z (PVY^{Z}) in potato. *American Journal of Potato Research*, 91(6), 649-654. https://doi.org/10.1007/s12230-014-9395-7

Choi, H.-S., Bhat, A. I., Park, J.-W., Cheon, J.-U., Kim, J.-S., Pappu, H.-R., . . . Takanami, Y. (2004). Studies on Potato virus Y isolates infecting potato and tobacco in Korea. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 49(2), 253-262. https://doi.org/10.5109/4585

Chrzanowska, M. (1991). New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVYN) found recently in Poland. *Potato Research*, 34(2), 179-182. https://doi.org/10.1007/bf02358039

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(3), 475-483. https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475

Crescenzi, A., Fanigliulo, A., & Comes, S. (2005). Characterisation of the Potato virus Y isolate PVY-*LF02* inducing necrosis in tomato. *Acta Horticulturae*, 695, 331–337. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.40

Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A., & Carrington, J. C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, 206, 1007-1016. https://doi.org/10.1006/viro.1995.1023

Dupuis, B., Nkuriyingoma, P., & Ballmer, T. (2023). Economic impact of Potato virus Y (PVY) in Europe. Potato Research, https://doi.org/10.1007/s11540-023-09623-x

Elena, S. F., Bedhomme, S., Carrasco, P., Cuevas, J. M., de la Iglesia, F., Lafforgue, G., . . . Zwart, M. P. (2011). The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 287-293. https://doi.org/10.1094/mpmi-09-10-0214

Esquivel-Fariña, A., Ferro, C. G., Camelo-García, V. M., Kraide, H. D., Favara, G. M., Rezende, J. A. M., & Kitajima, E. W. (2022). Correction to: Occurrence of natural infection of Physalis peruviana with potato virus Y and pepper yellow mosaic virus in Brazil. *Journal of Plant Pathology*, 104(4), 1319-1319. https://doi.org/10.1007/s42161-022-01215-x

Eyvazi, A., Dizadji, A., Rastgou, M., & Koohi Habibi, M. (2015). Bioassay and phylogeny of five Iranian isolates of Cucumber mosaic virus from different hosts based on CP gene sequence. *Plant Protection Science*, 51(4), 200-207. https://doi.org/10.17221/80/2014-pps

Galvino-Costa, S. B. F., dos Reis Figueira, A., de Assis Câmara Rabelo-Filho, F., Moraes, F. H. R., Nikolaeva, O. V., & Karasev, A. V. (2012). Molecular and serological typing of *Potato virus Y* isolates from Brazil reveals a diverse set of recombinant strains. *Plant Disease*, 96(10), 1451-1458. https://doi.org/10.1094/pdis-02-12-0163-re

Glais, L., Tribodet, M., & Kerlan, C. (2002). Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY): evidence that $PVY^{N}W$ and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^{O} and PVY^{N} isolates. *Archives of Virology*, 147(2), 363-378. https://doi.org/10.1007/s705-002-8325-0

Green, K. J., Brown, C. J., Gray, S. M., & Karasev, A. V. (2017a). Phylogenetic study of recombinant strains of Potato virus Y. *Virology*, 507, 40-52. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.03.018

Green, K. J., Chikh-Ali, M., Hamasaki, R. T., Melzer, M. J., & Karasev, A. V. (2017b). Potato virus Y (PVY) Isolates from *Physalis peruviana* are Unable to Systemically Infect Potato or Pepper and Form a Distinct New Lineage Within the PVY(C) Strain Group. *Phytopathology*, 107(11), 1433-1439. https://doi.org/10.1094/phyto-04-17-0147-r

Hooker, W. J. (1981). *Compendium of Potato Diseases*. International Potato Center.

Hosseini, A., Massumi, H., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., & Varsani, A. (2011). Characterisation of potato virus Y isolates from Iran. *Virus Genes*, 42(1), 128-140. https://doi.org/10.1007/s11262-010-0546-8

Hosseini, H., Mehrvar, M., Zakiaghl, M., & Siampour, M. (2017). Comparative genetic diversity of potato virus Y populations based on coat protein gene. *Acta Virologica*, 61(2), 161-174. https://doi.org/10.4149/av_2017_02_05

Hu, X. J., Karasev, A. V., Brown, C. J., & Lorenzen, J. H. (2009). Sequence characteristics of potato virus Y recombinants. *Journal of General Virology*, 90, 3033–3041. https://doi.org/10.1099/Vir.0.014142-0

Joisson, C., Dubs, M. C., Briand, J. P., & Van Regenmortel, M. H. V. (1992). Detection of potyviruses with antisera to synthetic peptides. *Research in Virology*, 143(3), 167-178. https://doi.org/10.1016/s0923-2516(06)80101-9

Jones, R. A. C. (2009). Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research*, 141(2), 113–130. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.028

Karasev, A. V., & Gray, S. M. (2013). Continuous and emerging challenges of *Potato virus Y* in potato. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 571-586. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102332

Kerlan, C. (2006). *Potato virus Y*, Descriptions of Plant Viruses no. 414. In *Association of applied biologists (AAB), UK*. http://www.dpvweb.net/dpv/showadpv.php?dpvno=414

Kisten, L., Moodley, V., Gubba, A., & Mafongoya, P. L. (2016). First Report of *Potato virus Y* (PVY) on *Physalis peruviana* in South Africa. *Plant Disease*, 100(7), 1511-1511. https://doi.org/10.1094/pdis-12-15-1442-pdn

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

Lacroix, C., Glais, L., Kerlan, C., Verrier, J. L., & 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. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02342.x

Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D708-D717. https://doi.org/10.1093/nar/gkx932

Lemmetty, A., Latvala, S., Jones, A. T., Susi, P., McGavin, W. J., & Lehto, K. (1997). Purification and properties of a new virus from black currant, its affinities with nepoviruses, and its close association with black currant reversion disease. *Phytopathology*, 87(4), 404-413. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.4.404

Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293-W296. https://doi.org/10.1093/nar/gkab301

Lorenzen, J., Nolte, P., Martin, D., Pasche, J. S., & Gudmestad, N. C. (2008). NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y. *Archives of Virology*, 153(3), 517-525. https://doi.org/10.1007/s00705-007-0030-5

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 the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. *Archives of Virology*, 151(6), 1055-1074. https://doi.org/10.1007/s00705-005-0707-6

Moodley, V., Naidoo, R., Gubba, A., & Mafongoya, P. L. (2019). Development of Potato virus Y (PVY) resistant pepper (Capsicum annuum L.) lines using marker-assisted selection (MAS). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 105, 96-101. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.12.002

Mostafaei, S., Mosahebi, G., Kouhi habibi, M., & Ansari dezfouli, E. (2008). Study of biological and molecular characterization of pepper-PVY isolated from Tehran pepper fields and it's comparison with other PVY isolates. *Iranian Journal of Virology*, 2(4), 31-34.

https://doi.org/10.21859/isv.1.4.31
Moury, B., & Simon, V. (2011). dN/dS-based methods detect positive selection linked to trade-offs between different fitness traits in the coat protein of *Potato virus Y*. *Molecular Biology and Evolution*, 28(9), 2707–2717. https://doi.org/10.1093/molbev/msr105
Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE*, 9(9), e108277. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277
Ogawa, T., Nakagawa, A., Hataya, T., & Ohshima, K. (2012). The genetic structure of populations of *Potato virus Y* in Japan; based on the analysis of 20 full genomic sequences. *Journal of Phytopathology*, 160(11-12), 661-673. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01959.x
Ogawa, T., Tomitaka, Y., Nakagawa, A., & Ohshima, K. (2008). Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Research*, 131(2), 199-212. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.09.010
Pappu, S. S., Brand, R., Pappu, H. R., Rybicki, E. P., Gough, K. H., Frenkel, M. J., & Niblett, C. L. (1993). A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 43, 267. https://doi.org/ 10.1016/0166-0934(93)90158-n
Pourrahim, R., & Farzadfar, S. (2016). Population analysis of Iranian *Potato virus Y* isolates using complete genome sequence. *The Plant Pathology Journal*, 32(1), 33-46. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2015.0144
Pourrahim, R., Farzadfar, S., Golnaraghi, A. R., & Ahoonmanesh, A. (2007). Incidence and distribution of important viral pathogens in some Iranian potato fields. *Plant Disease*, 91(5), 609–615. https://doi.org/10.1094/Pdis-91-5-0609
Quenouille, J., Vassilakos, N., & Moury, B. (2013). *Potato virus Y*: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 14(5), 439–452. https://doi.org/10.1111/Mpp.12024
Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Le Romancer, M., & Dunez, J. (1996). Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*, 77, 1953–1965. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-8-1953
Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L., & Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, 237, 283-295. https://doi.org/10.1006/viro.1997.8777
Sadeghi, M. S., Behjatnia, S. A. A., Masumi, M., & Izadpanah, K. (2008). Characterisation of a strain of Potato virus Y causing eggplant mosaic in southern Iran. *Australasian Plant Pathology*, 37(1), 79–86. https://doi.org/10.1071/ap07087
Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., . . . Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938-954. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x
Schubert, J., Fomitcheva, V., & Sztangret-Wisniewska, J. (2007). Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *Journal of Virological Methods*, 140(1-2), 66-74. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.10.017
Shamsaddin Saeed, F., Massumi, F., Hosseini, A., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, M., Shaabanian, M., & Mirtajeddini, S. M. (2008, Aug). Some new hosts of Potato virus Y in Kerman 18th Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran. (In Persian)
Sharifi-Nezamabad, P., Nasrollanejad, S., Aghajani, M. A., Dizadji, A., & Nadimi, A. (2020). Investigating the Potato virus Y main disease indicators in tobacco fields of Golestan province. *Journal of Applied Entomology and Phytopathology*, 87(2), 227-240. https://doi.org/10.22092/jaep.2019.127197.1297 (In Persian).
Singh, R. P., Valkonen, J. P., Gray, S. M., Boonham, N., Jones, R. A., Kerlan, C., & Schubert, J. (2008). Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Archives of Virology*, 153(1), 1-13. https://doi.org/10.1007/s00705-007-1059-1

Sokhansanj, Y., Rakhshandehroo, F., & Pourrahim, R. (2012). First report of *Tomato ringspot virus* infecting pepper in Iran. *Plant Disease*, 96(12), 1828-1828. https://doi.org/10.1094/pdis-07-12-0664-pdn

Tian, Y. P., Hepojoki, J., Ranki, H., Lankinen, H., & Valkonen, J. P. (2014). Analysis of potato virus Y coat protein epitopes recognized by three commercial monoclonal antibodies. *PLoS ONE*, 9(12), e115766. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115766

Toosi, N., Ahoonmanesh, A., Pourrahim, R., & Bahar, M. (2004). Detection of Potato Virus Y (PVY) C and N strains by reverse-transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. (In Persian)

Tsedaley, B. (2015). A review paper on Potato virus Y (PVY) biology, economic importance and its managements. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5, 110-126.

van der Vlugt, R. A. A., Leunissen, J., & Goldbach, R. (1993). Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3′-nontranslated regions. *Archives of Virology*, 131(3-4), 361-375. https://doi.org/10.1007/bf01378638

Visser, J. C., & Bellstedt, D. U. (2009). An assessment of molecular variability and recombination patterns in South African isolates of *Potato virus Y*. *Archives of Virology*, 154(12), 1891-1900. https://doi.org/10.1007/s00705-009-0525-3

Wylie, S. J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., López-Moya, J. J., Ohshima, K., . . . Wang, A. (2017). ICTV virus taxonomy profile: *Potyviridae*. *Journal of General Virology*, 98(3), 352. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000740