

ردیابی سرولوژیکی و مولکولی ویروس S سیب‌زمینی (PVS) در ارقام رایج سیب‌زمینی در استان اردبیل

نسیم احتشام‌رانی^۱، احمد روحی‌بخش^{۲*}، بیتا سهیلی‌مقدم^۳، ناهید مسعودی^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. عضو هیات علمی بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اردبیل (مغان)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،

اردبیل، ایران

۴. دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۲۴)

Serological and molecular detection of *Potato virus S* (PVS) from common potato cultivars in Ardabil province

Nasim Ehtesham Rasi¹, Ahmad Rouhibakhsh^{2*}, Bita Soheili Moghadam³, Nahid Masoudi⁴

1. M.Sc. of Plant Protection, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Scientific member of Plant Protection Research Department, Ardabil Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre (AREEO), Ardabil, Iran

4. Ph.D. candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran
(Received: Jan. 31, 2018 - Accepted: Jun. 14, 2018)

Abstract

Potato virus S (PVS) of the genus *Carlavirus* belongs to the *Betaflexiviridae* family is one of the important potato infectious viruses. To detect PVS, the suspected leaf samples were collected from potato fields in Ardabil province during summer in 2015 and 2016. To assess the biological properties, symptomatic leaves inoculated to indicator plants in the greenhouse condition. The samples were tested for PVS infection using DAS-ELISA. RT-PCR for molecular detection was done using specific primers related to the coat protein area of *Potato virus S*. The coat protein gene nucleotide sequences of two isolates of *Potato virus S* called Ag-9 and Os-11 obtained from Agria and Oceana cultivars were determined. The CP sequences of two isolates were compared with each other and with 29 other isolates of the virus. The reconstructed phylogenetic tree clustered the isolates in two main groups I (subgroups IA and IB) and II. Two Ag-9-PVS-F and Os-11-PVS-F isolates were clustered in IB subgroup along with isolates from Azarbaijan, Hamedan, Kerman and Esfahan as well as isolates from Hungary, Ukraine, Scotland and India. The putative coat protein amino acid sequence alignment of this two isolates with 6 Iranian and 5 foreigner isolates showed difference in 8 and 25 amino acids for Ag-9-PVS-F and Os-11-PVS-F isolates respectively. The results indicate that there are various PVS isolates in the country, and the difference in nucleotide and amino acid sequences may indicate differences in the geographic origin and hence the type and timing of entry of virus isolates into the region.

Keywords: *Carlavirus*, ELISA, Phylogenetic tree, *Potato virus S*, RT-PCR

چکیده

ویروس S سیب‌زمینی (PVS) متعلق به جنس *Carlavirus* از تیره *Betaflexiviridae* یکی از ویروس‌های مهم خسارت‌زا در سیب‌زمینی می‌باشد. به منظور ردیابی ویروس S سیب‌زمینی، نمونه‌برداری از مزارع سیب‌زمینی استان اردبیل، طی تابستان سال‌های ۹۵-۱۳۹۴، صورت گرفت. گیاهان محک در گلخانه، به منظور بررسی بیولوژیکی نمونه‌های برگ‌های مشکوک به آلودگی، مایه زنی شدند. نمونه‌ها با آزمون الیزا از نظر آلودگی به ویروس PVS مورد بررسی قرار گرفتند. جهت ردیابی مولکولی، از روش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ناحیه پروتئین پوششی ویروس PVS استفاده شد. توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی مربوط به دو جدایه از ویروس (با رس‌شمار MH159207 و MH159208) جدا شده از ارقام آگریا و اوشینا تعیین شد. توالی پروتئین پوششی دو جدایه با یکدیگر و با ۲۹ جدایه دیگر قابل دسترسی در بانک ژن مقایسه شد. درخت تبارزایی رسم شده نشان داد که جدایه‌ها به دو گروه اصلی I (زیرگروه‌های IA و IB) و II تقسیم شدند. دو جدایه Os-11-PVS-F و Ag-9-PVS-F در زیرگروه IB همراه با جدایه‌های آذربایجان، کرمان، همدان و اصفهان و جدایه‌هایی از مجارستان، اوکراین، اسکاتلند و هند قرار گرفتند. هم‌ردیفی توالی اسیدآمینه فرضی پروتئین پوششی دو جدایه مورد بررسی با شش جدایه ایرانی و پنج جدایه خارجی این ویروس بیانگر اختلاف در هشت و ۲۵ اسیدآمینه به ترتیب برای جدایه‌های Os-11-PVS-F و Ag-9-PVS-F بود. نتایج نشان‌دهنده وجود جدایه‌های متنوع ویروس PVS در کشور بوده و تفاوت در توالی اسید نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای می‌تواند حاکی از تفاوت در منشأ جغرافیایی و به تبع آن نحوه و زمان ورود جدایه‌های ویروس به منطقه باشد.

واژه‌های کلیدی: RT-PCR، الیزا، درخت فیلوژنی، کارلاویروس، ویروس S سیب‌زمینی.

منتقل می‌شود (Lambert et al., 2012). سیب‌زمینی تنها میزبان طبیعی PVS است (دانش و همکاران، ۱۳۷۱) و گونه‌های حساس به آن در شرایط گلخانه در سه تیره *Amaranthaceae* و *Chenopodiaceae* می‌شوند (De Bokx, 1970). ویروس S سیب‌زمینی متعلق به جنس *Carlavirus* از خانواده *Betaflexiviridae* بوده و دارای یک مولکول RNA تک‌رشته‌ای مثبت و پیکره میله‌ای شکل خمش‌پذیر به ابعاد $12-15 \times 610-700$ نانومتر با تقارن مارپیچی می‌باشد (Adams et al., 2011). RNA ژنومی دارای حدود $3/8 - 5/8$ کیلوباز طول و دو mRNA زیرژنومی $1/3-2/3$ و $1/6-1/3$ کیلوبازی می‌باشد (Matousek et al., 2005). ژنوم ویروس PVS یک ساختار کلاهک مانند (cap) در انتهای ۵'، ۶ قاب خوانش باز (ORFs) و یک دنباله چندآدنی (poly A) در انتهای ۳' دارد همچنین انتهای ۵' فاقد Vpg می‌باشد (Mulholland, 2005). ویروس PVS دارای سویه‌های متعددی است و بر اساس توانایی در تولید و عدم تولید علائم سیستمیک در گیاه محک *Chenopodium sp.* به ترتیب به دو سویه Andean (PVS^A) و سویه معمولی (PVS^0) تقسیم می‌شود (Lin et al., 2009). این دو سویه را می‌توان با تفاوت‌های موجود در توالی نوکلئوتیدها و یا توالی اسید آمینه پروتئین‌های ۷، ۱۱ و ۳۴ کیلودالتونی از یکدیگر تفکیک کرد (Lin et al., 2009; Matousek et al., 2000). به طور معمول سویه‌های PVS در اکثر واریته‌های سیب‌زمینی علائم قابل مشاهده ایجاد نمی‌کنند، اما در واریته‌های حساس علائمی از قبیل موزائیک، رگوز برگ، برنزه شدن رنگ برگ‌ها، کوتولگی، ریزش زود هنگام برگ‌ها و در بعضی موارد نقاط بافت مرده در برگ‌های پایینی ایجاد می‌کنند (Salari et al., 2011). همچنین شیوع هم‌زمان ویروس PVS با ویروس‌های دیگر و ایجاد آلودگی

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از با ارزش‌ترین منابع غذایی ایران و جهان است و براساس آمار وزارت جهاد کشاورزی در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ استان اردبیل با دارا بودن سطح زیرکشت حدود ۲۲ هزار هکتار و تولید بیش از ۷۶۷ هزار تن سیب‌زمینی مقام دوم کشوری را بعد از استان همدان به خود اختصاص داده است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۴). ارقام سیب‌زمینی را می‌توان بر اساس طول دوره رسیدگی غده به گروه‌های زودرس، میان‌رس و دیررس تقسیم نمود. دوره رسیدگی در ارقام زودرس به حداقل ۳ ماه و در ارقام دیررس تا ۶ ماه می‌رسد. انتخاب گروه رسیدگی مناسب برای هر ناحیه می‌بایستی با توجه به تاریخ کشت و طول فصل رشد موجود انجام گیرد. سیب‌زمینی به بیش از ۵۰ ویروس حساس می‌باشد (Wale et al., 2008). خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی بسته به نوع ویروس، رقم سیب‌زمینی و شرایط محیطی از ۱۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است (De Bokx and Van der Want, 1987).

ویروس S سیب‌زمینی (PVS)، اولین بار در سال ۱۹۵۲ از هلند روی گیاه *Solanum tuberosum* گزارش شد (De Bruyn Ouboter, 1952). این ویروس دارای اهمیت اقتصادی بوده و آلودگی به آن منجر به کاهش تا ۲۰ درصد محصول می‌شود (Kerlan, 2008). ویروس PVS برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۵۳ از استان‌های فارس و آذربایجان شرقی توسط روحانی و طالب‌زاده گزارش شد (Rohani and Taleb-Zadeh, 1974). سپس در چندین استان دیگر از جمله اصفهان، خوزستان، همدان، خراسان، کرمان و فارس شناسایی شد (Salari et al., 2006; Khakvar et al., 2000; Mossahebi, 1996; Pourrahim et al., 2007). ویروس PVS توسط چندین گونه شته به روش ناپایا و نیز از طریق غده آلوده و با روش تلقیح مکانیکی

طی بازدیدهای به‌عمل‌آمده در تابستان سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از ۳۵ مزرعه سیب‌زمینی مربوط به ۱۲ رقم در پنج شهر استان اردبیل، از بوته‌های سیب‌زمینی مشکوک به آلودگی ویروسی با علائم موزاییک، زردی، پیچیدگی برگ، بدشکلی برگ و کوتولگی ۱۲۰ نمونه علائم‌دار جمع‌آوری شد. ارقام مورد نمونه‌برداری در این مطالعه ساتنه، ساتینا، اسپریت، کایزر، مارادونا، خاوران، اوشینا، پیکاسو، لوکا، جلی، آگریا و فونتاته می‌باشند که همگی از سازمان تحقیقات کشاورزی استان اردبیل تهیه و کشت شدند. آگریا رقم غالب کشت شده در استان اردبیل می‌باشد، اما ارقام دیگر نیز در سطح کمتر کشت می‌شوند به منظور ردیابی و نیز مستقر نمودن منبع ویروس در گلخانه و تکثیر بیولوژیکی ویروس مورد نظر، مایه‌زنی روی گیاهان محک در گلخانه انجام گرفت. بدین منظور با استفاده از پودر کاربوراندوم و بافر فسفات ۰/۱ مولار با ایجاد خراش در بافت برگ، ویروس به صورت مکانیکی وارد گیاه شد. گیاهان محک مورد استفاده در این بررسی توتون، فلفل، سلمه تره، لوبیا، کدو و گوجه‌فرنگی می‌باشند.

ردیابی سرولوژیکی ویروس PVS

نمونه‌های جمع‌آوری شده بر اساس روش کلی توصیفی توسط کلارک و آدامز به روش الیزای مستقیم ساندویچ آنتی‌بادی دو طرفه (-DAS ELISA) با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ویروس PVS و کانجوگیت تهیه شده از شرکت Agdia (آمریکا) مورد آزمون قرار گرفتند (Clark and Adams, 1977). شاهد‌های مثبت (آلوده) و منفی (سالم) نیز جهت اطمینان از نتیجه در آزمون استفاده شدند. نتایج آزمون با استفاده از دستگاه الیزا خوان ارزیابی و ثبت شد. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری و در مقایسه با شاهد منفی و مثبت، نمونه‌های آلوده مشخص شدند. در این آزمون جهت عصاره‌گیری، از برگ‌های جوان

مخلوط با ویروس‌های PVA، PVX، PVM و PVY موجب کاهش محصول تا ۴۰ درصد می‌شود (Nyalugwe et al., 2012).

در این تحقیق برای اولین بار در سطح استان اردبیل ردیابی سرولوژیکی و مولکولی ویروس اس سیب‌زمینی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در مزارع سیب‌زمینی استان اردبیل با تاکید بر ۱۲ رقم مورد بررسی قرار گرفت و ضمن تعیین توالی ژن CP برخی جدایه‌ها، بررسی فیلوژنتیکی این ویروس با سایر جدایه‌های ایرانی و خارجی آن انجام شد. هدف از انجام تحقیق حاضر، ردیابی و تعیین استرین ویروس S سیب زمینی در مزارع سیب‌زمینی استان اردبیل، ضمن تاکید بر ۱۲ رقم رایج، با استفاده از روش‌های سرولوژیک و مولکولی و نیز مقایسه مولکولی و بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌های این استان با سایر جدایه‌های ایرانی و خارجی این ویروس می‌باشد. در این تحقیق علاوه بر بررسی علائم و تکثیر ویروس روی گیاهان محک، از آزمون DAS-ELISA و RT-PCR نیز برای شناسایی استفاده گردید. مقایسه و آنالیز مولکولی کمک شایانی به کنترل و مدیریت ویروس مذکور در مزارع مورد کشت به منظور تولید خوراک یا بذر سیب زمینی می‌کند. با توجه به اثر سینرژیست این ویروس با سایر ویروس‌ها بویژه ویروس ایکس سیب زمینی (*Potato virus X*) که منجر به افزایش قابل توجه خسارت می‌گردد و نیز با توجه به انتقال ناپایای این ویروس با شته، ردیابی و شناسایی آن در مزارع بویژه مزارع بذری اهمیت فراوانی دارد. همچنین ردیابی و شناخت مولکولی از جدایه‌های ایرانی می‌تواند در تهیه و اصلاح ارقام گیاهی مقاوم به PVS و نیز بیان و تهیه آنتی‌بادی نو ترکیب مورد استفاده محققین قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های برگ و مایه‌زنی مکانیکی

سیب‌زمینی استفاده شد. سبب‌زمینی استفاده شد. **ردیابی مولکولی ویروس PVS استخراج اسید نوکلئیک ویروس** استخراج اسید نوکلئیک با کیفیت بالا مهم‌ترین مرحله در انجام کارهای مولکولی است. برای استخراج اسید نوکلئیک ویروس از محلول تجاری RNX-PLUS (سیناژن) و ستون‌های استخراج Total RNA (دنازیست) طبق توصیه شرکت‌های سازنده استفاده شد. به منظور اطمینان از استخراج صحیح RNA و کیفیت آن، نمونه‌ها در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند. سپس با استفاده از دستگاه UV-illuminator و در نور ماوراءبنفش مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفتند. کمیت RNA استخراج شده نیز با دستگاه نانودراپ بررسی شد. اسید نوکلئیک استخراج شده برای مطالعات بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سبب‌زمینی استفاده شد. **ردیابی مولکولی ویروس PVS استخراج اسید نوکلئیک ویروس** استخراج اسید نوکلئیک با کیفیت بالا مهم‌ترین مرحله در انجام کارهای مولکولی است. برای استخراج اسید نوکلئیک ویروس از محلول تجاری RNX-PLUS (سیناژن) و ستون‌های استخراج Total RNA (دنازیست) طبق توصیه شرکت‌های سازنده استفاده شد. به منظور اطمینان از استخراج صحیح RNA و کیفیت آن، نمونه‌ها در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند. سپس با استفاده از دستگاه UV-illuminator و در نور ماوراءبنفش مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفتند. کمیت RNA استخراج شده نیز با دستگاه نانودراپ بررسی شد. اسید نوکلئیک استخراج شده برای مطالعات بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آنالیز تبارزایی

تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی مرحله رونوشت‌برداری برگردان (Reverse Transcription) ساخت رشته‌ی DNA مکمل (cDNA) از روی مولکول RNA هدف با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاس (لیتوانی) و به کمک آغازگر oligo dt و آنزیم رونوشت‌برداری برگردان، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و طی دو مرحله طبق توصیه شرکت سازنده در دستگاه ترموسایکلر انجام شد.

مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction) تکثیر ژن پروتئین پوششی جدایه‌های PVS با استفاده از آغازگرهای ارائه شده توسط سالاری و همکاران (PVS CP-Forward: 5'-CAGTCCGGCTAGTCAATTGC-3' و PVS CP-Reverse: 5'-CTCTGACTTTGCACCATGGG-3')

قطعات DNA تکثیرشده در واکنش PCR درمورد دو جدایه PVS شامل جدایه OS-11 (رقم اوشینا) و AG-9 (رقم آگریا) برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. توالی ژن CP به دست آمده در مورد دو جدایه PVS با یکدیگر و با توالی ژن CP مربوط به ۲۹ جدایه ایرانی و غیرایرانی این ویروس قابل دسترسی در بانک ژن (NCBI) مقایسه شدند (جدول ۱). هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL X ver. 1.83 انجام گردید (Thompson *et al.*, 1994). آنالیز تبارزایی به کمک روش Neighbor Joining (NJ) و ۱۰۰۰ مرتبه Bootstrap انجام شد و درخت تبارزایی (شکل ۳) با استفاده از برنامه نرم‌افزاری MEGA7 رسم گردید (Kumar *et al.*, 2016). براساس توالی نوکلئوتیدی به دست آمده در مورد دو جدایه PVS و به کمک نرم‌افزار EXPASY، توالی اسیدآمینهای فرضی پروتئین CP این جدایه‌ها مشخص شد. این توالی‌ها با توالی اسیدآمینهای شش جدایه ایرانی و پنج جدایه خارجی تعیین خصوصیات شده این ویروس با استفاده از نرم‌افزارهای CLUSTAL X، UGENE و BIOEDIT مورد مقایسه قرار گرفتند.

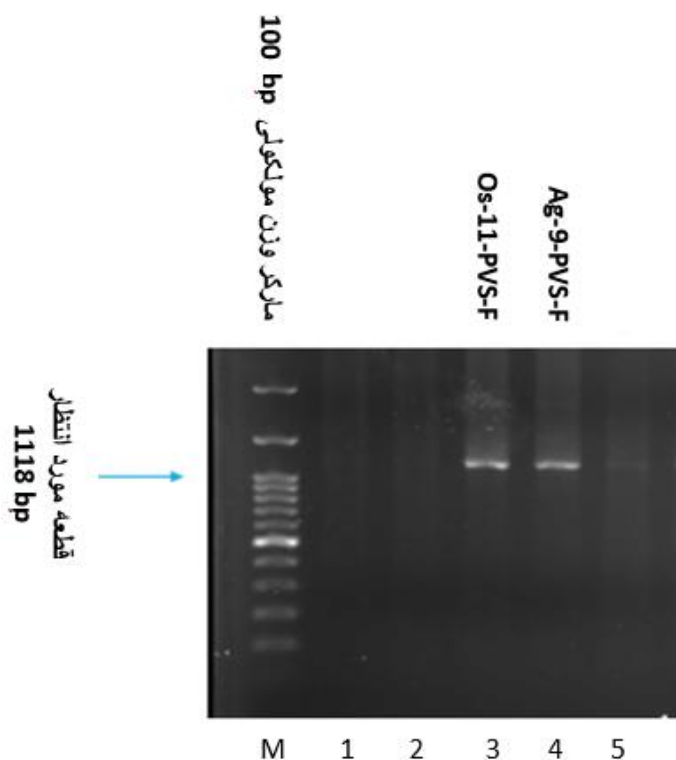


ج

ب

الف

شکل ۱. علائم PVS روی گیاهان محک مایه زنی شده (الف) موزاییک و روشن شدن برگ‌ها در گیاه توتون *Nicotiana glauca* (ب) لکه‌های موضعی کلروتیک در گیاه سلمه تره *Chenopodium album*، (ج) زردی و لکه‌های کلروزه در گیاه لوبیا *Phaseolus vulgaris*



شکل ۲. نتیجه الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر ژن پروتئین پوششی ویروس PVS در ژل آگارز یک درصد، از چپ به راست: ستون M: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱ و ۲ گیاه سیب زمینی فاقد علامت بیماری، ستون ۳ جدایه Os-11-PVS-F و ستون ۴ جدایه Ag-9-PVS-F جدا شده از سیب زمینی آلوده

بر اساس نتایج آزمون الیزا که با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ویروس PVS و به روش ساندویچ

E-mail: a_rouhibakhsh1966@yahoo.com

نتایج و بحث

بررسی خصوصیات بیولوژیکی و سرولوژیکی

* نویسنده مسئول: احمد روحی‌بخش

فارس (رس‌شمار 1.HQ875134)، کرمان (رس‌شمار 1.HQ875138) و خراسان (رس‌شمارهای 1.KC853760 و 1.HQ875141) همراه با جدایه‌هایی از آمریکا، شیلی، تانزانیا، جزایر شتلند، استرالیا، چین، اسکاتلند، انگلستان و هلند در زیرگروه IA قرار گرفتند. در زیرگروه IB دو جدایه ایرانی Ag-9-PVS-F و Os-11-PVS-F همراه با جدایه‌های گزارش شده از آذربایجان (رس‌شمار 1.HQ875132)، همدان (رس‌شمار 1.HQ875135)، کرمان (رس‌شمار 1.KC853756) و اصفهان (رس‌شمار 1.HQ875133) و جدایه‌هایی از مجارستان، اوکراین، اسکاتلند و هند قرار گرفتند. جدایه Ag-9-PVS-F در نزدیکی جدایه‌ی مجارستان (LN794168.1) و همچنین جدایه ایرانی گزارش شده از آذربایجان قرار داشت. جدایه Os-11-PVS-F بیشترین شباهت را با جدایه‌های ایرانی گزارش شده از همدان و اصفهان داشت. در گروه II این درخت فیلوژنی جدایه‌هایی از چین، برزیل و چک قرار گرفتند. در جدول ۲ درصد یکنواختی توالی نوکلئوتیدی ژن CP در بین ۳۱ جدایه PVS مورد بررسی ارائه شده است. دو جدایه Ag-9-PVS-F و Os-11-PVS-F از PVS در بین خود دارای ۹۲/۴ درصد یکنواختی توالی نوکلئوتیدی CP بودند. جدایه Ag-9-PVS-F (رقم آگریا) با جدایه ایرانی (1.HQ875132) از آذربایجان و جدایه‌های خارجی از اوکراین و مجارستان و جدایه Os-11-PVS-F (رقم اوشینا) با جدایه‌های ایرانی همدان (رس‌شمار 1.HQ875135) و اصفهان (رس‌شمار 1.HQ875133) و جدایه‌های خارجی از اسکاتلند و جزایر شتلند بیشترین درصد یکنواختی توالی CP را نشان دادند. دو جدایه گزارش شده از اردبیل در مجموع کمترین یکنواختی توالی CP را با جدایه‌هایی از برزیل و چین داشتند. نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی اسیدآمینه پروتئین پوششی دو جدایه PVS (Ag-9-PVS-F و Os-11-PVS-F) با ۶ جدایه ایرانی دیگر و ۵ جدایه خارجی این

آنتی‌بادی دو طرفه روی نمونه‌ها انجام شد، آلودگی نمونه‌های مربوط به ارقام آگریا و اوشینا به PVS تایید شد. همچنین انتقال آلودگی و سیستمیک شدن PVS در گیاهان محک تلقیح شده توسط جدایه‌های مورد نظر (شکل ۱)، به کمک آزمون الیزا مورد بررسی و تایید قرار گرفت.

بررسی خصوصیات مولکولی

با توجه به نتایج حاصل از الکتروفورز، RNA استخراج شده با استفاده از ستون‌های استخراج دنازیست نسبت به RNA استخراجی به کمک روش RNX-PLUS از کیفیت بهتری برخوردار بود. آزمون RT-PCR با استفاده از RNA کل استخراج شده از بافت آلوده و جفت پرایمر PVS-CP-R و PVS-CP-F یک قطعه ۱۱۱۸ جفت بازی از ژن CP ویروس را تکثیر کرد و بر روی ژل آگارز یک‌درصد یک باند ۱۱۱۸ جفت بازی مشاهده شد (شکل ۲) که بیانگر وجود اسید نوکلئیک ویروس در گیاه سیب‌زمینی دارای علائم مشکوک به آلودگی PVS می‌باشد. نتایج به دست آمده از بررسی مولکولی و آزمون RT-PCR با نتایج حاصل از بررسی آزمون الیزا مطابقت داشت.

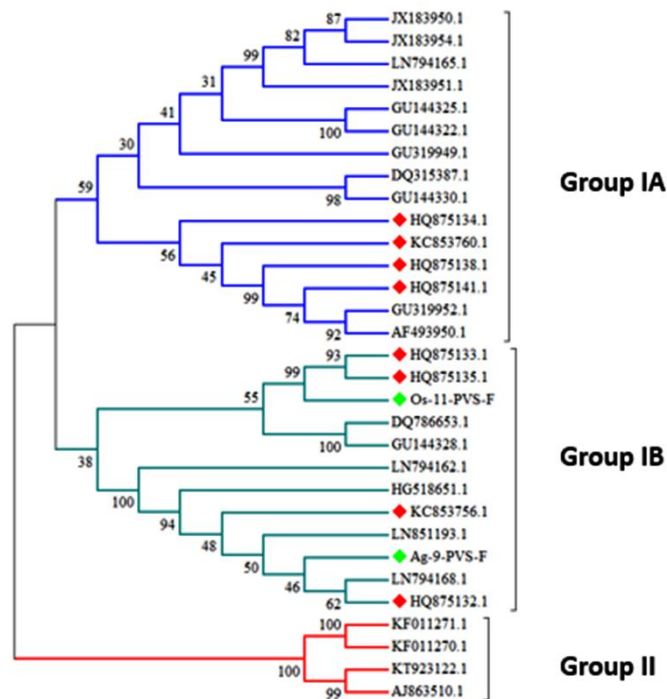
نتایج حاصل از تعیین توالی نوکلئوتیدی

توالی ناحیه CP به دست آمده در مورد دو جدایه PVS با یکدیگر و با ۲۹ توالی دیگر ناحیه CP جدایه‌های ایرانی و غیرایرانی این ویروس قابل دسترسی در بانک ژن (NCBI) مقایسه شد (جدول ۱). هم‌ردیفی توالی‌ها، آنالیز تبارزایی و درخت تبارزایی با استفاده از نرم‌افزارهای موجود رسم گردید (شکل ۳). نتایج حاصل از مقایسه توالی ژن CP به دست آمده در مورد ده جدایه ایرانی (دو جدایه مورد مطالعه در این بررسی و هشت جدایه که قبلاً گزارش شده بودند) و ۲۱ جدایه خارجی PVS با یکدیگر و درخت تبارزایی رسم شده نشان داد که ۳۱ جدایه PVS به دو گروه اصلی II و I تقسیم می‌شوند. چهار جدایه ایرانی گزارش شده از

ویروس در شکل ۴ ارائه شده است. جدایه Ag-9- در PVS-F در ۸ اسید آمینه و جدایه Os-11-PVS-F در ۲۵ اسید آمینه با سایر جدایه‌ها اختلاف داشتند.

جدول ۱. مشخصات توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های PVS مورد استفاده در مطالعه تبارزایی

جدایه	کشور	میزبان اصلی	رس شمار	منبع
PVS-O, Papa negra	Hungary	<i>S. tuberosum</i> cv. <i>Papa negra</i>	LN794168.1	Pajtli <i>et al.</i> , 2015
PVS-O, Kilimanjaro	Tanzania	<i>Solanum</i> sp.	LN794165.1	Pajtli <i>et al.</i> , 2015
PVS-O, FabiolaA	Hungary	<i>S. tuberosum</i> cv. <i>Fabiola</i>	LN794162.1	Pajtli <i>et al.</i> , 2015
PVS-O, Sam-24-PVS	Scotland	<i>S. tuberosum</i>	GU144330.1	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
PVS-O, Sam-13-PVS	Scotland	<i>S. tuberosum</i>	GU144328.1	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
PVS-O, 139-PVS	Shetlant	<i>S. tuberosum</i>	GU144325.1	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
PVS-O, 136-PVS	Shetlant	<i>S. tuberosum</i>	GU144322.1	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
strain PVS-O	India	<i>S. tuberosum</i>	DQ786653.1	Gawande <i>et al.</i> , 2006
PVS-O, AZA.TA.6	Iran (Azarbaijan)	<i>S. tuberosum</i>	HQ875132.1	Salari <i>et al.</i> , 2011
PVS-O, ESF.FA.19	Iran (Esfahan)	<i>S. tuberosum</i>	HQ875133.1	Massumi <i>et al.</i> , 2011
PVS-O, FA.SI.14	Iran (Fars)	<i>S. tuberosum</i>	HQ875134.1	Salari <i>et al.</i> , 2011
PVS-O, HAM.KA.2	Iran (Hamedan)	<i>S. tuberosum</i>	HQ875135.1	Salari <i>et al.</i> , 2011
PVS-O, KHO.CH.3	Iran (Khorasan)	<i>S. tuberosum</i>	HQ875141.1	Massumi <i>et al.</i> , 2011
PVS-O, KER.LA.12	Iran (Kerman)	<i>S. tuberosum</i>	HQ875138.1	Massumi <i>et al.</i> , 2011
PVS-O, 501-S	Iran (Khorasan)	<i>Solanum</i> sp.	KC853760.1	Tabasinezhad & Zakiaghl., 2013
PVS-O, 352-S	Iran (Kerman)	<i>Solanum</i> sp.	KC853756.1	Tabasinezhad & Zakiaghl., 2013
Cosimar	USA	<i>S. tuberosum</i>	JX183950.1	Lin <i>et al.</i> , 2012
PVS-O, Exodus	Netherlands	<i>S. tuberosum</i>	GU319952.1	Dolby & Jones, 1987
PVS-O, WAPC	Australia	<i>S. tuberosum</i>	GU319949.1	Cox & Jones, 2010
-	Brazil	<i>S. tuberosum</i>	KT923122.1	Figueira <i>et al.</i> , 2015
PVS-d	China	<i>S. tuberosum</i>	KF011271.1	Song <i>et al.</i> , 2013
PVS-c	China	<i>S. tuberosum</i>	KF011270.1	Song <i>et al.</i> , 2013
PVS-A, Vltava	CZECH	<i>S. tuberosum</i>	AJ863510.1	Matousek <i>et al.</i> , 2004
Irena	Ukraine	<i>S. tuberosum</i> cv. <i>Finka</i>	LN851193.1	Pajtli <i>et al.</i> , 2015
FL206- 1D	USA	<i>S. tuberosum</i>	JX183951.1	Lin <i>et al.</i> , 2012
Q1(Q44843)	Chili	<i>S. tuberosum</i>	JX183954.1	Lin <i>et al.</i> , 2012
PVS, Hebei	China	<i>S. tuberosum</i>	DQ315387.1	Wu <i>et al.</i> , 2005
PVS-O	UK	<i>S. tuberosum</i>	AF493950.1	Boonham <i>et al.</i> , 2003
PVS, 89.217	Hungary	<i>S. tuberosum</i>	HG518651.1	Pajtli & Palkovics, 2013
Os-11-PVS-F	Iran (Ardabil)	<i>S. tuberosum</i> cv. <i>Oceana</i>	MH159207	This study
Ag-9-PVS-F	Iran (Ardabil)	<i>S. tuberosum</i> cv. <i>Agria</i>	MH159208	This study



شکل ۳. درخت تبارزایی رسم شده با استفاده از توالی ژن پروتئین پوششی PVS مربوط به ۳۱ جدایه که با استفاده از روش Neighbor Joining (NJ) و ۱۰۰۰ مرتبه Bootstrap به دست آمده است. جدایه‌های ایرانی با \blacklozenge نشان داده شده‌اند.

و بالاخره با پیشرفت تکنولوژی تشخیص و طبقه‌بندی بر اساس تعیین توالی اسید نوکلئیک و اسید آمینه به خصوص پروتئین پوششی است. با وجود اهمیت اقتصادی سیب‌زمینی در ایران، اطلاعات دقیقی از فراوانی، پراکنش و خصوصیات جدایه‌های ویروس PVS، در استان اردبیل در دسترس نبود. بدین منظور از مزارع استان اردبیل بازدید صورت گرفت و نمونه‌های برگ‌گی علائم‌دار از مزارع جمع‌آوری شد که اکثر نمونه‌ها علائم مشخص توصیف شده حاصل از آلودگی ویروسی مانند موزاییک، کوتولگی، بدشکلی برگ و تاول‌های سبز رنگ روی برگ را نشان می‌دادند. بر اساس نتایج حاصل از مشاهدات مزرعه‌ای، بیشترین علائم مشاهده شده در مزارع، شامل انواع پیچیدگی برگ (فراوانی % ۳۵/۸۳) و موزاییک (فراوانی % ۲۳/۳۳) بود. نمونه‌های مشکوک به آلودگی ویروسی با استفاده از روش سرولوژیکی الیزا، از نظر آلودگی به ویروس PVS مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بیماری‌های ویروسی از جمله ویروس PVS، خسارت قابل توجهی در ارقام حساس سیب‌زمینی ایجاد می‌کنند، از این رو داشتن اطلاعاتی در مورد فراوانی این ویروس و چگونگی پیشگیری از بروز آن در زمان مناسب، تأثیر بسزایی در بالا بردن میزان تولید محصول این گیاه دارد. بهره‌گیری از تکنیک‌های پیشرفته و دقیق در شناسایی ویروس‌ها و بررسی تغییرات ژنتیکی جمعیت آن‌ها در جهت کنترل مؤثر این عوامل بیماری‌زا و مطالعه اپیدمیولوژی آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد. عمده‌ترین راهکار برای کنترل ویروس‌های گیاهی، پیشگیری از وقوع و گسترش بیماری است (Hull, 2002).

با توجه به اهمیت کارلا ویروس‌ها، مطالعات گسترده‌ای برای تشخیص آن‌ها صورت گرفته است و اساس طبقه‌بندی اعضای این جنس بر مبنای نوع ناقل، دامنه میزبانی، علائم ایجاد شده بر روی گیاه، رابطه‌ی سرولوژیکی بر پایه پروتئین پوششی و همچنین مورفولوژی و سرولوژی اجسام درون سلولی

جدول ۲. درصد یکنواختی توالی نوکلئوتیدی ژن CP بین ۱۰ جدایه ایرانی و ۲۱ جدایه خارجی ویروس PVS

2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
92/4	85/5	85/5	85/4	86/9	87/5	88/1	86/9	84/7	85/5	87/5	85/1	88	85/9	84/3	85/1	86/3	84/7	73/2	73/5	73/6	73/6	85/6	85/6	84/7	86/6	85/9	85/2	85/3	86/5	1	
	87/7	83/6	86/5	84/7	85/7	86/4	85/6	83/4	87/7	83/8	83/1	84/1	84	83/1	83/3	83/9	83/6	72/3	73/5	73/6	73/2	87/6	83/6	83	84/5	87/6	83/1	87/2	84/9	2	
																															3
																															4
																															5
																															6
																															7
																															8
																															9
																															10
																															11
																															12
																															13
																															14
																															15
																															16
																															17
																															18
																															19
																															20
																															21
																															22
																															23
																															24
																															25
																															26
																															27
																															28
																															29
																															30
																															31

پراکنده شده و به سایر بوته‌ها سرایت می‌کند. از این رو رعایت بهداشت زراعی بویژه حذف علف‌های هرز و نیز مبارزه با ناقلین حشره‌ای نیز در فراوانی این ویروس تأثیرگذار است.

با توجه به این که ویروس PVS به راحتی توسط حشرات ناقل (شته‌ها) و به روش ناپایا منتقل می‌شود، شرایط آب و هوایی تأثیر زیادی روی فعالیت ناقلین و به دنبال آن اختلاف در فراوانی و شدت علائم ویروسی در مزارع سیب‌زمینی استان دارد. حضور بعضی شته‌ها مثل شته سبز هلو به صورت کلنیزه در گیاه سیب‌زمینی در مزارع مورد بازدید مشاهده شد. 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) می‌تواند از جمله دلایل مهم کسب این نتایج باشد. بالا بودن سطح کشت باغات میوه به ویژه هسته‌داران در استان اردبیل و از این رو بالا بودن فعالیت شته‌ها دور از انتظار نیست. مشخص شده است که تأخیر در برداشت سیب‌زمینی به ویژه در مزارع تولید غده‌های بذری به دلیل 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). مطالعات دقیق درباره‌ی جمعیت شته‌های ناقل و روش انتقال آن‌ها و تعیین فون حشرات در مزارع سیب‌زمینی برای کسب آگاهی بیشتر از وضعیت پراکنش این ویروس مفید خواهد بود (Hosseini و همکاران، ۱۳۹۲).

با ترسیم درخت فیلوژنی برای جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق مشاهده شد که آن‌ها با جدایه‌های ایرانی (آذربایجان، همدان، کرمان و اصفهان) در یک خوشه (زیرگروه IB) قرار گرفته و این حکایت از همبستگی بین منشأ جغرافیایی و

این علایم غالبیت بیشتری داشتند که احتمالاً واریانت خاصی از ویروس در آن منطقه غالب بود. بر اساس این نتایج به منظور تخمین درصد آلودگی ویروس PVS در مزارع سیب‌زمینی، نمی‌توان تنها بر مشاهدات چشمی اکتفا نمود و جهت کسب نتایج صحیح، استفاده از بررسی‌های آزمایشگاهی مانند آزمون الیزا و روش‌های مولکولی لازم و ضروری می‌باشد.

در همه نمونه‌های علائم‌دار مورد بررسی به کمک آزمون الیزا، آلودگی به ویروس PVS مشاهده نشد. این موضوع نشان می‌دهد که برخی از این علائم ناشی از دیگر ویروس‌های بیماری‌زای سیب‌زمینی و یا عوامل بیماری‌زای غیرویروسی می‌باشد. همچنین برخی استرس‌های محیطی مانند کمبودها یا مسمومیت‌های تغذیه‌ای نیز می‌تواند موجب بروز علائم مشابه با آلودگی ویروسی گردد. در هر صورت از آنجا که هدف این تحقیق مطالعه ویروس PVS بود مطالعه بر روی ویروس‌های دیگر و بررسی آلودگی‌های مخلوط انجام نشد.

اختلاف در شدت علائم ویروسی و فراوانی آلودگی PVS در مناطق مختلف مورد بررسی می‌تواند دلایل متعددی از جمله ارقام کشت‌شده، حجم کم نمونه‌های مورد بررسی، تفاوت در الگوی کشت، تفاوت در بهداشت مزارع و روش‌های زراعی اعمالی در آن‌ها، تنوع فعالیت ناقلین، سن مزارع، تنوع در کشت‌های مجاور، وضعیت علف‌های هرز، شرایط جوی و از همه مهمتر سلامت و کیفیت غده‌های بذری به کار رفته جهت احداث مزارع داشته باشد. نوع رقم سیب‌زمینی کشت شده در میزان خسارت ویروس PVS تأثیر داشته و ارقام مختلف از لحاظ حساسیت به این ویروس در مراتب حساس تا مقاوم قرار دارند. علاوه بر نوع رقم، کیفیت و سلامت غده‌های بذر هر مزرعه نیز بسیار حائز اهمیت است. استفاده از غده بذر آلوده در مزرعه می‌تواند منبع اولیه آلودگی را وارد مزرعه کند و از طرفی با توجه به انتقال مکانیکی و انتقال با حشرات، این منبع آلودگی، هرچقدر هم که محدود باشد، به راحتی در طی فصل

بیولوژیکی و مولکولی وجود ویروس PVS در منطقه مورد تایید قرار گرفت. اگرچه تعداد بسیار محدودی از جدایه‌های PVS (دو جدایه) 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 می‌باشد. با مطالعه بیشتر روی این جدایه‌ها و تعیین مشخصات مرتبط با بیماری‌زایی آن‌ها، می‌توان درک بهتری از وضعیت جدایه‌های ایرانی PVS به دست آورد. این اطلاعات در ارزیابی ارقام سیب‌زمینی از نظر واکنش در برابر جدایه‌های ایرانی ویروس PVS و انتخاب ارقام متحمل یا مقاوم بسیار حائز اهمیت می‌باشند. ویروس‌ها در مزارع سیب‌زمینی ایران گسترش داشته و اغلب به صورت آلودگی مخلوط وجود دارند و آلودگی‌های به وجود آمده با این ویروس‌ها همیشه با چشم قابل تشخیص نیستند. در این رابطه به نظر می‌رسد که افزایش تاکید روی مطالعه عوامل مؤثر بر ساختار اپیدمی‌های ویروسی در محصول سیب‌زمینی و بهینه‌سازی کنترل کیفیت قابل توجه باشد. در این تحقیق روش ردیابی مولکولی RT-PCR برای تشخیص آلودگی ویروس PVS در نمونه‌های سیب‌زمینی استفاده شد. استفاده از این روش در ردیابی آلودگی‌های این ویروس در برنامه‌های سنجش و گواهی سلامت غده‌های سیب‌زمینی بذری به ویژه در هسته‌های اولیه حاصل از کشت بافت، بسیار مهم و حائز اهمیت کاربردی است (Loebenstein *et al.*, 2001).

ژنوتیپی دارد. یکی از عوامل تغییر ویروس‌ها انتخاب است که در مناطق مختلف با فشار متفاوت انجام می‌گیرد بنابراین جدایه‌های قرار گرفته در مناطق متفاوت دارای میزان تغییرات متفاوت می‌باشند به عبارت دیگر سرعت تکامل آن‌ها متفاوت است. از نظر تشابه نوکلئوتیدی توالی CP، این دو جدایه با یکدیگر تشابه % ۹۲/۴ را نشان می‌دهند.

با توجه به میزان تشابه توالی اسیدآمینه ژن پروتئین پوششی می‌توان گونه‌ها و نژادهای ویروس را از یکدیگر متمایز کرد. پس توالی اسیدآمینه فرضی برای دو جدایه مورد مطالعه در این بررسی نیز تعیین شد. در جنس کارلاویروس گونه‌های متمایز کمتر از %۷۲ تفاوت نوکلئوتیدی و یا %۸۰ تفاوت اسیدآمینه‌ای بین ژن‌های پروتئین پوششی (CP) و پلیمراز خود دارند (Hull, 2002). توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین CP دو جدایه با توالی اسید آمینه‌ای پنج جدایه خارجی و شش جدایه ایرانی مورد مقایسه قرار گرفت. این پنج جدایه خارجی شامل جدایه‌هایی از مجارستان، هلند، چین، استرالیا و برزیل بود. همچنین شش جدایه ایرانی شامل جدایه‌هایی از آذربایجان شرقی، اصفهان، فارس، همدان، خراسان و کرمان بود. با توجه به تفاوت بالای تعداد اسیدآمینه در توالی جدایه Os-11 در مقایسه با جدایه‌های مورد بررسی این احتمال وجود دارد که جدایه مورد نظر یک استرین متفاوت ویروس از بقیه باشد. تفاوت در توالی اسید نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای می‌تواند حاکی از تفاوت در منشا جغرافیایی و به تبع آن نحوه و زمان ورود به منطقه برای جدایه‌ها باشد. با توجه به نتایج بررسی‌های سرولوژیکی،

REFERENCES

Adams MJ, Candresse T, Hammond J, Kreuze JF, Martelli GP, Namba S, Pearson MN, Ryu KH, Saldarelli P, Yoshikawa N (2011) Family Betaflexiviridae. Pages 920-941 in: Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of

viruses. King AMQ Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. Elsevier, Academic Press, San Diego, CA.
Ahmadi K, Gholizadeh H, Ebadzadeh H, Hatami F, Hossein Pour R, Kazemi Fard R, Abdshah H (1394) Agricultural statistics of the year of

- 2014-2015, Vol. 1: Crop products. Ministry of Agriculture Press-ICT Center, First Edition, 163 pp.
- Andreeva L, Jarvekulg L, Rabenstein F, Torrance L, Harrison BD, Saarma, M (1994) Antigenic analysis of potato virus A particles and coat protein. *Ann. Appl. Biol.* 125: 337-348.
- Clark MF, Adam AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses, *J. Gen. Virol.* 34: 475.
- Danesh D, Soleimani S, Philosoph F, Dehghan M, (1992) The frequency of four potato viruses in experimental field of Friedan of Isfahan, *Plant disease*, 28: 1-9.
- De Bokx J A (1970) Reactions of various plant species to inoculation with *Potato virus S*, *Neth. J. Plant Path.* 76: 70-78.
- De Bokx, JA Van der Want JPH (1987) Viruses of potato and seed-potato production, 2nd Ed. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Pudoc., Wageningen, Netherlands, 259 pp.
- De Bruyn Ouboter MP (1952) A new potato virus. In: *Proc. Conf. on Potato Virus Diseases*. Wageningen-Lisse, The Netherlands, pp. 83-84.
- Hassan Panah D, Nick Shad KH, Hassani M (2008) Seed potato production, Ardabil Province Agricultural Jihad Organization, 193 pp.
- Hosseini F, Pourrahim R, Maleki M, Farzadfar Sh (2013) Incidence, biological properties and phylogenetic status of *Potato virus A* Isolates in Khorasan-e-Razavi and Markazi provinces based on coat protein gene. *Crop Biotech.* 4: 131-139.
- Hull R (2014) *Plant virology* (5th Ed.), Academic Press, New York, 1104 pp.
- Khakvar R, Pourrahim R, Shamsbakhsh M (2000) Study on six potato viruses in Khuzestan province, in *Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress*, Tehran, Iran, 312 pp.
- Kerlan C (2008) Potato viruses. In: Mahy BWJ Regenmortel MHV (Eds). (2010) *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. San Diego, California, USA pp 458- 470.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. and Evol.* 33:1870-1874
- Lambert SJ, Scott JB, Pethybridge SJ, Hay FS (2012) Strain characterization of *Potato virus S* isolates from Tasmania, Australia, *Plant Dis.* 96: 813-819.
- Lin YH, Druffel K L, Whitworth J, Pavek M J, Pappu HR (2009) Molecular characterization of two potato virus S isolates from late-blight-resistant genotypes of potato (*Solanum tuberosum*), *Arch. Virol.* 154: 1861-1863.
- Loebenstein G, Berger PH, Brunt A, Lawson RH (2001) *Virus and Virus Like Diseases of Potatoes and Production of Seed Potatoes*, Kluwer Academic Publishers, 460 pp.
- Matoušek J, Schubert J, Dědič P, Ptáček J (2000) A broad variability of potato virus S (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *Can. J. Plant Pathol.* 22: 29-37.
- Matousek J, Schubert J, Ptacek J, Kozlova P, Dedic P (2005) Complete nucleotide sequence and molecular probing of potato virus S genome, *Acta Virol.* 49: 195-205.
- Mossahebi GHM (1996) In *Proceedings of the 1st Iranian Horticultural Congress*, Iran, p. 79.
- Mulholland V (2005) *Immunocapture-polymerase chain reaction in immunochemical protocols*, 3rd edition, Human press, Totowa, USA, pp: 281-290.
- Nyalugwe EP, Wilson CR, Coutts BA,

- Jones RAC (2012) Biological properties of *Potato virus X* in potato: effects of mixed infection with Potato virus S and resistance phenotypes in cultivars from three continents, *Plant Dis.* 96: 43-54.
- Pourrahim R, Farzadfar Sh, Golnaraghi AR, Ahoonmanesh A (2007) Incidence and important of viral pathogens in some Iranian potato fields, *Plant Dis.* 91: 609-615.
- Rohani H, Taleb-Zadeh F (1974) In Proceedings of the 15th Plant Medical Congress, Tabriz, Iran, p. 64.
- Salari KH, Massumi H, Shabanian M, Heydarnejad J, Hosseini Pour A (2006) In Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran, p. 320.
- Salari KH, Massumi H, Heydarnejad J, Hosseini Pour A, Varsani A (2011) Analysis of Iranian *Potato virus S* isolates, *Virus Genes*, 43: 281-288.
- Thompson JD, Higgins DG, 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 Res.* 22: 4073-4080.
- Wale S, Platt HW, Cattlin N (2008) Diseases, Pests and Disorders of Potatoes, a Colour Handbook. Manson Publishing Ltd. UK. 176 pp.