پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۱ (۱): ۱۲۶-۱۲۱ (۱۴۰۱)- مقاله کوتاه

Journal of Applied Research in Plant Protection 11(1): 121-126 (2022)-Short Article

DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.13587

ردیابی آلودگی ویروس وای سیب زمینی (*Potato virus Y*) در حجم وسیع توده‌های بذری سیب زمینی با استفاده تلفیقی از روش‌های مولکولی و کشت تک جوانه

کبری مسلم‌خانی[۱]✉، فاطمه خلقتی بناء[۲]، محمد محمدی[۱]، جهانبخش حسین نژادیان[۱]، فرشید حسنی[۱]، شمس‌اله نیکجه فراهانی[۱]، کمال‌الدین عباسی[۱]

[۱]مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. [۲]آزمایشگاه گیاه‌پزشکی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران. ✉ moslemkhany@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۵ بازنگری: ۱۴۰۰/۲/۹ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۵

چکیده

سالانه بیش از ۳۰۰ محموله بذری سیب زمینی در سیستم رسمی کنترل و گواهی بذر کشور با هدف کاهش عوامل بیماری‌زای سیستمیک و تجمعی، از نظر آلودگی به ویروس‌های مهم سیب زمینی مورد آزمون قرار می‌گیرند. در این فرآیند درستی، حساسیت، اختصاصیت و سرعت روش تشخیصی برای صدور گواهی به موقع و صحیح از اهمیت بسیاری برخوردار است. در پژوهش حاضر کارایی استفاده تلفیقی از روش کشت تک جوانه و روش‌های مولکولی مبتنی بر RT-PCR برای ردیابی آلودگی ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) در آزمون تعداد زیاد نمونه‌های بذری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد حساسیت، دقت و حتی سرعت ارزیابی توده‌های بذری با روش‌های مبتنی بر RT-PCR در مقایسه با روش سرولوژیکی ELISA افزایش می‌یابد. بهره‌گیری از روش RT-PCR در ردیابی ویروس PVY، دارای دقت تشخیصی یک نمونه آلوده در نمونه ترکیبی حاصل از ۵۰ بوته بوده در حالی‌که توانایی روش ELISA به میزان یک دهم این قابلیت بود و این روش قادر به ردیابی یک نمونه آلوده در نمونه ترکیبی حاصل از پنج نمونه انفرادی بود. همچنین به دلیل دقت بسیار بیشتر آزمون‌های مبتنی بر RT-PCR صدور گواهی نادرست برای طبقه بذری مشاهده نشد، حال آن که بر اساس نتایج ELISA حدود شش درصد از توده‌های بذری مورد آزمون به جای طبقه گواهی شده به دلیل عدم توان ردیابی غلظت کم ویروس به اشتباه در طبقه مادری تشخیص داده شدند. بر اساس استانداردهای ملی حداکثر آلودگی مجاز به PVY در پایین‌ترین طبقه بذری چهار درصد است که همین موضوع قابلیت اجرایی شدن این سیستم را با هزینه‌های قابل قبول (حداکثر با ارزیابی پنج زیر نمونه) فراهم می‌آورد.

کلمات کلیدی: توده بذری، سیب‌زمینی، ردیابی، گواهی، ویروس

Detecting *Potato virus Y* in massive potato seed lots by using single sprout culture and RT-PCR as an integrated diagnostic method

Cobra Moslemkhani[1], Fatemeh Khelghatibana[2], Mohammad Mohammadi[1], Jahanbakhsh Hosseininejhadian[1], Farshid Hassani[1], Shamsollah Nikjeh Farahani[1], Kamaleddin Abbasi[1]

[1]Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [2]Plant Protection Lab, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. ✉moslemkhany@yahoo.com

Received: 14 April 2021 Revised: 29 April 2021 Accepted: 26 June 2021

Abstract

In order to minimize the systemic infection in potato seed tubers, annually more than 300 potato seed lots are subjected to laboratory testing for potato viruses in the national potato seed certification system. The accuracy, sensitivity, specificity and speed are of the most important criteria for a diagnostic method to be employed in seed certification laboratory testing procedure. In this study the efficiency of using two methods including single sprout culture and RT-PCR as an integrated diagnostic method was investigated for detecting Potato Virus Y in potato seed samples. According to the present study, RT-PCR performance in Potato Virus Y detection was better than ELISA in terms of sensitivity, accuracy and time saving. RT-PCR successfully detected one infected sample in a combined sample consists of 50 individual samples while ELISA enabled to detect one infected sample in a much smaller combined sample consists of only five subsamples. Moreover because of ELISA retractions to detect low virus concentration and its false negative result, about six percent potato seed lots were incorrectly determined basic seeds instead of certified seeds. Considering the maximum permissive virus infection percent in national potato seed standards (4% for the lowest seed class) and the maximum required subsamples to be tested (5 subsamples), using RT-PCR method in potato seed certification is economically recommended.

Key words: Certification, Detection, Potato, Seed lot, Virus

How to cite:

Moslemkhani K, Khelghatibana F, Mohammadi M, Hosseininejhadian J, Hassani F, *et al.*, 2022. Detecting *Potato virus Y* in massive potato seed lots by using single sprout culture and RT-PCR as an integrated diagnostic method. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (1): 121–126.

مقدمه

با گذشت بیش از یک دهه از فعالیت سیستم رسمی تولید بذر سیب‌زمینی در ایران، به روشنی می دانیم که آلودگی‌های ویروسی به ویژه ویروس PVY مهمترین دلیل تنزل و افت طبقه بذری در مزارع تولید سیب‌زمینی بذری در کشور است (Moslemkhani *et al*. 2018). تشخیص دقیق بیماری مهمترین و نخستین مرحله در سیستم مدیریت تولید بذر سالم به شمار می‌رود (Jeong *et al*. 2014). با دسترسی بشر به انبوه داده‌های ژنتیکی از بیمارگرهای مختلف، استفاده از روش‌های مولکولی متعدد مانند روش‌های مبتنی بر تشخیص نوکلئیک اسید رو به توسعه است. نتایج مطالعات قبلی نشان داده است روش qRT-PCR به اندازه $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۷}$ برابر ELISA در ردیابی آلودگی ویروس PVY در توده‌های بذری سیب زمینی دقت داشته است (Kogovsek *et al*. 2008). همچنین گزارشات متعددی روش‌های مبتنی بر RT-PCR را به لحاظ دقت، سرعت و حتی هزینه کاندید مناسب و برتر برای جایگزینی با روش های سرولوژیکی در سیستم کنترل و گواهی بذر سیب زمینی معرفی کرده اند (Hühnlein *et al*. 2013; Lacomme *et al*. 2015; Schumpp *et al*. 2021). سیستم گواهی بذر کشور سوئیس از سال ۲۰۱۳ تا سال ۲۰۱۶ از این روش‌ها برای پایش سلامت غده‌های بذری بهره بردند و حدود ۱۰۰۰ توده بذری مختلف سیب‌زمینی را تنها در مدت شش هفته و به وسیله شش تا هشت نفر نیروی انسانی از نظر آلودگی به ویروس‌های مهم سیب‌زمینی ارزیابی کرده‌اند (Schumpp *et al*. 2021). درحال‌حاضر آلودگی‌های ویروسی در سیستم تولید بذر سیب‌زمینی ایران عمدتا با استفاده از آزمون سرولوژیکی Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) پایش می‌شوند که متاسفانه طی چند سال اخیر به دلیل وابستگی به واردات آنتی بادی ضمن افزایش چشمگیر هزینه‌های آزمون (به دلیل افزایش قیمت دلار)، تامین هرساله آنتی‌بادی به دلیل اثرات تحریم‌ها بسیار دشوار شده است و سیستم کنترل و گواهی بذر کشور را با چالش مواجه نموده است. این در حالی است که دسترسی به مواد آزمون‌های مولکولی به دلیل توسعه روز افزون شرکت‌های دانش بنیان در کشور امکان‌پذیرتر خواهد بود. تحقیق حاضر به بررسی کارایی استفاده تلفیقی از روش کشت تک جوانه و روش‌های مولکولی برای ردیابی آلودگی ویروس PVY در توده‌های بذری سیب‌زمینی در سیستم گواهی بذر سیب‌زمینی در ایران پرداخته است. روش RT-PCR یا سایر روش‌های مولکولی در حوزه کشاورزی بیشتر در فاز تحقیقاتی و بر روی تعداد محدودی نمونه کاربرد داشته است در حالیکه تحقیق حاضر به قابلیت استفاده از این روش‌ها در فاز اجرایی و در حجم وسیع نمونه خواهد پرداخت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش غده‌های بذری رقم بانبا در طبقه S در فضای کنترل شده گلخانه کشت و سپس گیاهچه‌های هشت برگی با عصاره گیاه آلوده به نژاد PVY^{O} (گیاه آلوده به این نژاد ویروس از کلکسیون مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تامین شد) به صورت مکانیکی آلوده‌سازی شدند (Eigenbrode *et al*. 2002). دو هفته پس از آلوده سازی، از نقاط مختلف تمام بوته‌ها (از نوک بوته و برگهای میانی و قاعده بوته) نمونه برگی برداشت شد و آلودگی این نمونه‌ها با روش‌های TAS-ELISA، RT-PCR و qRT-PCR طبق آنچه در قسمت بعدی شرح داده می‌شود، مورد آزمون قرار گرفت. به منظور ارزیابی قابلیت روش‌های تشخیصی مورد اشاره برای ردیابی ویروس در حجم وسیع توده‌های بذری از نوزده مزرعه سیب‌زمینی بذری در استان‌های همدان، مرکزی، خراسان رضوی، اصفهان، زنجان، کردستان، فارس و نیز یک مزرعه در استان البرز (از کرت‌های کنترلی سیب‌زمینی در محل مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال) به صورت تصادفی با حرکت در مسیر W شکل در سطح مزرعه نمونه برداشت شد (از هر مزرعه ۱۰۰ عدد غده) و پس از شکست خواب غده‌ها، تک جوانه اصلی آنها در شرایط کنترل شده گلخانه و خاک استریل کشت شدند. گیاهچه‌های ۳۰ روزه از نظر آلودگی به ویروس PVY با بررسی چشمی علائم و روش‌های TAS-ELISA، RT-PCR و qRT-PCR ارزیابی شدند.

برای ارزیابی آلودگی ضمن بررسی چشمی علائم (نظیر موزائیک، پیچیدگی، نکروز آوندی و غیره)، آزمون TAS-ELISA با ا ستفاده از آنتی بادهای پلی کلنال شرکت Agdia و طبق دستورالعمل شرکت مربوطه روی نمونه مرکب پنج تایی (حاصل از ترکیب عصاره پنج نمونه) انجام شد و آزمون‌های RT-PCR نیز با نمونه‌های مرکب ۵۰ تایی (حاصل از ترکیب ۵۰ نمونه) انجام شد. نمونه‌های مرکب عاری از آلودگی با ثبت وضعیت سلامت (درصد آلودگی صفر) از ادامه فرایند آزمون خارج شدند و هر زیر نمونه ۵۰ تایی آلوده به پنج نمونه مرکب ۱۰ تایی تبدیل و آلودگی در زیر نمونه‌ها ارزیابی شد.

استخراج RNA با استفاده از کیت Ribosin plant (GeneAll, Korea) و واکنش نسخه‌برداری معکوس با استفاده از HyperScriptTM Mater mix (GeneAll, Korea) بر اساس

دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی Y3S و Y4A (محصول ۴۸۰ bp) و آغازگرهای عمومی 18S rRNAR و 18S rRNAF (محصول ۲۵۵ bp) به عنوان کنترل داخلی آزمون استفاده شد (Du *et al*. 2006; Singh *et al*. 1996).

برای انجام آزمون qRT-PCR، نیز از آغازگرهای اختصاصی PVYR و PVYF (محصول ۱۶۶ bp) و آغازگر عمومی مشابه آزمون RT-PCR استفاده شد (Du *et al*. 2006). واکنش qRT-PCR در ۴۰ چرخه، در دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR System شرکت Applied Biosystems، با استفاده از کیت تاکارا (Takara, Japan) انجام گرفت. تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده از نرم افزار REST® (Pfaffi 2001) محاسبه شد.

نتایج و بحث

علائم بیماری در گیاهانی که به صورت مصنوعی آلوده شدند، در برگ‌های بالایی نسبت به دیگر قسمت‌های گیاه، مشهودتر بود و در تمام روش‌های تشخیصی بیشترین غلظت ویروس در بخش-های بالایی بوته ردیابی شد (جدول ۱). پیش‌تر نیز ردیابی غلظت‌های کمتر ویروس در بخش‌های پایین در مقایسه با بخش-های فوقانی گیاه گزارش شده بود (Pererschmitt *et al*. 1992). انتقال و جابجایی ویروس در بافت‌های جوان سریعتر از بافت‌های مسن است (Dupuis *et al*. 2017). بنابراین نمونه‌برداری از قسمت‌های فوقانی گیاه امکان ردیابی موفق‌تر آلودگی را بهبود خواهد داد. از آنجایی که در ارزیابی‌های بیولوژیکی شرایط محیطی، واکنش رقم، آلودگی‌های ترکیبی، وجود نژادهای جدید به عنوان عوامل مداخله‌گر در بروز و نوع علائم شناخته می‌شوند (Baldauf *et al*. 2006; Aurori *et al*. 2016)، بنابراین صرفا بازرسی چشمی علائم نمی‌تواند در سیستم گواهی سلامت تود-های بذری کفایت نماید و تلفیق روش بررسی چشمی علائم با روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی، افزایش دقت و صحت نتایج را به همراه خواهد داشت.

ویروس PVY با استفاده از سه تکنیک TAS-ELISA، RT-PCR و Real time RT-PCR از قسمت‌های مختلف گیاهان آلوده شده با موفقیت ردیابی شد. این در حالی است که در هیچ یک از گیاهان سالم تیمار شده با بافر، آلودگی ویروس ردیابی نشد. همان‌طور که در جدول یک نشان داده شده است نتایج در هر چهار روش انطباق نسبی نشان می‌دهند. سایر محققین نیز انطباق نسبی نتایج آزمون‌های ارزیابی چشمی گیاهان رشد یافته از جوانه (Seed growth test) را با ELISA، RT-PCR و Real time RT-PCR گزارش نموده‌اند (Russo *et al*. 1999; Singh *et al*. 2013). در پژوهش حاضر در ارقام بورن و آگریا آلودگی ویروس PVY با استفاده از RT-PCR دو درصد بیشتر از روش ELISA گزارش شد (جدول ۲). پیش از این نیز Schumpp *et al*. (2021) نتایج مشابهی را در آنالیز اسکیل وسیعی از نمونه‌های بذری سیب‌زمینی در رقم آلکساندرا گزارش نمودند و نتایج آنها نیز حاکی از موفقیت بیشتر روش RT-PCR در ردیابی ویروس در حجم وسیع توده‌های بذری سیب‌زمینی بود. در تحقیقات حاضر نیز مشخص شد دو درصد آلودگی بیشتر ردیابی شده با RT-PCR باعث تنزل طبقه بذری از طبقه مادری به طبقه گواهی شده گردید. از طرفی واکنش ارقام در نتایج آزمون ها تاثیر گذار است زیرا مبنای این بررسی‌ها ارزیابی تک جوانه است و در ارقام حساس نسبت به ارقام متحمل احتمال آلودگی تمام جوانه‌های یک غده بیشتر است در حالیکه در ارقام متحمل برخی جوانه‌ها ممکن است حامل ویروس نباشند و همین امر نتایج متفاوتی را در مورد آلودگی یک غده بسته به انتخاب نوع جوانه رقم خواهد زد اگرچه انتخاب جوانه‌های انتهایی بسیار موفق‌تر از جوانه‌های جانبی عمل می‌نماید (Schumpp *et al*. 2021). از نظر قدرت ردیابی، روش‌های RT-PCR و qRT-PCR توانستند ویروس را در نمونه ترکیبی حاصل از ۵۰ بوته با دقت یک نمونه آلوده در ۵۰ نمونه، ردیابی کنند. حال آنکه در آزمون ELISA قابلیت ترکیب حداکثر پنج نمونه برای ردیابی موفق ویروس وجود داشت.

جدول ۱. ردیابی ویروس PVY از قسمت‌های مختلف گیاهان آلوده شده رقم بانبا (در هشت تکرار) با استفاده از چهار روش ارزیابی چشمی گیاهچه‌های رشد یافته، ELISA، RT-PCR و qRT-PCR (نتایج کمی ارائه شده میانگینی از نتایج هشت تکرار است).

Table 1. Detection of PVY virus from different parts of infected plants (with eight replicates) using four methods of visual inspection of grown seedlings, ELISA, RT-PCR and qRT-PCR (The quantitative results are the average of eight replication).

Variety	Visual inspection			TAS-ELISA (Optical Density at 405 nm)			RT-PCR			qRT-PCR Expression relative to control (Fold change)		
	upper	mid	down	upper	mid	down	upper	mid	down	upper	Mid	down
Banba	+	+	-	+(0.18)	+(0.1)	+(0.06)	+	+	+	265957	1468	519

+: Virus infection detected; -: Virus infection not detected

برخلاف نتایج بازرسی چشمی در مزرعه و امکان بروز خطا در مشاهده علائم بیماری، ارزیابی چشمی بوته حاصل از کشت تک جوانه در شرایط دمایی کنترل شده در گلخانه و به دور از تابش مستقیم نور خورشید، امکان شناسایی و تشخیص علائم ویروسی را با دقت بیشتری همراه می‌نماید و انطباق نسبی بین ارزیابی علائم در گلخانه و نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی مؤید این نکته است (جدول ۲). استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی به همراه بازرسی چشمی علائم در گلخانه، به تقویت سیستم گواهی بذر و اطمینان بیشتر از نتایج ارزیابی کمک خواهد کرد. از زمان ایجاد سیستم رسمی گواهی بذر سیب‌زمینی در کشور طی دوازده سال اخیر، سلامت توده‌های بذری سیب‌زمینی از نظر آلودگی به ویروس‌های مهم سیب‌زمینی تنها با استفاده از آزمون الایزا ارزیابی شده‌است. در واقع الایزا به دلیل قابلیت‌هایی چون تکرار پذیری بالا و امکان آزمون شمار بالای نمونه مورد توجه بوده است (Aurori *et al*. 2016) و روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک تا کنون بیشتر برای اهداف تحقیقاتی و برای ارزیابی سلامت، شمار اندک نمونه مورد استفاده قرار گرفته است. با عنایت به اینکه آنتی‌بادی‌ها و پلیت‌های الیزا وارداتی است و فرایند پیچیده و هزینه‌های بسیار سنگینی برای واردات این مواد نیاز است لذا با در نظر گرفتن این موضوع که در استانداردهای ملی حداکثر سطح آلودگی قابل قبول به ویروس PVY در طبقه پیش پایه صفر، طبقه پایه دو و گواهی شده چهار درصد برآورد شده است، می‌توان به جای آزمون ELISA (با هزینه نسبتا مشابه) از آزمون‌های RT-PCR همراه با بررسی علائم گیاهچه‌های حاصل از کشت تک جوانه، در حجم وسیع توده‌های بذری استفاده کرد و به عنوان یک روش کارآمد، مطمئن و قابل رقابت با سایر روش‌های تشخیصی (Singh *et al*. 2013) برای آزمون‌های پیش از کشت قابل توصیه است.

جدول ۲. درصد آلودگی ردیابی شده PVY در نمونه‌های برداشت شده از مزارع بذری (در طبقات پایه و گواهی شده) در مناطق همدان، مرکزی، خراسان رضوی، اصفهان، زنجان، کردستان و البرز با استفاده از روش‌های تشخیصی مختلف (هر نمونه از صد عدد غده تشکیل شده است).

Table 2. Percentage of PVY infection detected in samples taken from seed fields (in basic and certified classes) in Hamedan, Markazi, Khorasan Razavi, Isfahan, Zanjan, Kurdistan and Alborz provinces using different detection methods (each sample contains 100 tubers).

	Infection rates in 100 tubers					Infection rates in 100 tubers			
variety-province	**ELISA (Mother plant)**	**ELISA (Daughter plant)**	**visual inspection (Daughter plant)**	**RT-PCR (Daughter plant)**	**variety-province**	**ELISA (Mother plant)**	**ELISA (Daughter plant)**	**visual inspection (Daughter plant)**	**RT-PCR (Daughter plant)**
Boren- Isfahan*	1	5	5	7	Agria-Isfahan	0	0	0	0
Jelly-Isfahan	0	2	2	2	Jelly-Kurdistan	0	0	1	1
Esprite -Isfahan	0	0	0	0	Agria-Markazi	0	0	2	2
Sante -Isfahan	0	0	0	0	Banba-Hamedan	0	0	0	0
Banba -Isfahan	2	2	3	2	Agria-Alborz*	>10	>10	38	>10
Arinda-Alborz*	>10	>10	19	>10	Banba-Alborz*	>10	>10	12	>10
Arinda-Khorasan razavi	0	0	0	0	Milva-Alborz*	>10	>10	25	>10
Fontane-Khorasan razavi	0	0	0	0	Agria-Hamedan	0	0	1	1
Agria- Khorasan razavi	0	0	0	0	Jelly-Hamedan	0	0	0	0
Picasso- Khorasan razavi	0	0	0	0	Sante-Hamedan	0	0	0	0
Agria- Kurdistan	0	0	0	0	Boren-Alborz*	>10	>10	27	>10
Fontane-Alborz*	>10	>10	22	>10	Agria-Hamedan	0	0	3	2
Agria-Khorasan razavi	0	0	0	0	Agria-Zanjan	2	2	2	2

*Marked samples are related to experimental field without isolation distance from contaminant sources.

References

Aurori A, Badarau CL, Rakosy-Tican E, 2016. Challenges in the detection and identification of *Potato virus Y*, an important pathogen of potato. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Biologia* 61(2).

Baldauf PM, Gray SM, Perry KL, 2006. Biological and serological properties of *Potato virus Y* isolates in northeastern United States potato. *Plant Disease* 90: 559–566.

Drygin YF, Blintsov AN, Grigorenko VG, Andreeva IP, Osipov AP, *et al*., 2012. Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnostics of PVX infection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 179–189.

Du Z, Chen J, Hiruki C, 2006. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Disease* 90: 185–189.

Dupuis B, 2017. The movement of *Potato virus Y* (PVY) in the vascular system of potato plants. *European Journal of Plant Pathology* 147: 365–373.

Eigenbrode SD, Ding H, Shiel P, Berger PH, 2002. Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Proceedings of the Royal Society of London. Series B. *Biological Sciences* 269: 455–460.

Hühnlein A, Drechsler N, Steinbach P, Thieme T, Schubert J, 2013. Comparison of three methods for the detection of *Potato virus Y* in seed potato certification. *Journal of Plant Diseases and Protection* 120: 57–69.

Jeong JJ, Ju HJ, Noh J, 2014. A review of detection methods for the plant viruses. *Research in Plant Disease* 20: 173–181.

Kogovšek P, Gow L, Pompe-Novak M, Gruden K, Foster GD, *et al.*, 2008. Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of Virological methods* 149: 1-11.

Moslemkhani C, Hasani F, Khaledi N, 2018. Development of seed potato certification system in Iran and *Potato virus Y* as the most important factor in disruption of certification system. Iranian *Journal of Seed Science and Research* 5:111–119 (in Persian with English abstract).

Peiman M, Xie C, 2006. Sensitive detection of potato viruses, PVX, PLRV and PVS, by RT-PCR in potato leaf and tuber. *Australasian Plant Disease Notes* 1: 41–46.

Pfaffi MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT- PCR. *Nucleic Acids Researches* 29: 2002–2007

Peterschmitt M, Quiot JB, Reynaud B, Baudin P, 1992. Detection of maize streak virus antigens over time in different parts of maize plants of a sensitive and a so-called tolerant cultivar by ELISA. *Annals of Applied Biology* 121 (3): 641–653.

Russo P, Miller L, Singh RP, Slack SA, 1999. Comparison of *PLRV* and *PVY* detection in potato seed samples tested by Florida winter field inspection and RT-PCR. *American Journal of Potato Research* 76: 313–316.

Schumpp O, Bréchon A, Brodard J, Dupuis B, Farinelli L, *et al*., 2021. Large-Scale RT-qPCR Diagnostics for Seed Potato Certification. *Potato Research* 1–17.

Singh M, Singh RP, Fageria MS, Nie X, Coffin R, *et al*., 2013. Optimization of a Real-Time RT-PCR assay and its comparison with ELISA, conventional RT-PCR and the grow-out test for large scale diagnosis of *Potato virus Y* in dormant potato tubers. *American Journal of Potato Research* 90: 43–50.

Webster CG, Wylie SJ, Jones MG, 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Current Science* 25: 1604-1607.

Yang JG, Wang FL, Chen DX, Shen LL, Qian YM, *et al*., 2012. Development of a one-step immunocapture real-time RT-PCR assay for detection of *Tobacco Mosaic Virus* in Soil. *Sensors* 12: 16685–16694.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)