آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۳، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۴

# بررسی مقاومت لاین‌های تراژن توتون *Nicotiana tabacum* cv. Samsun در برابر سه جدایه ایرانی ویروس Y سیب‌زمینی[۱]

**Assessment of virus resistance in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Samsun lines against three Iranian isolates of potato virus Y**

**رضا پوررحیم[۱،۵]، علی آهون‌منش[۲]، هاله هاشمی[۳]، سیروس زینلی[۴] و شیرین فرزادفر[۵]**

۱- واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ۲- دانشگاه صنعتی اصفهان
۳- مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران، ٤- انستیتو پاستور ایران،
۵- مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران

(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۱، تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۳)

## چکیده

در این بررسی ژن پروتئین پوششی نژاد نکروتیک ویروس وای سیب‌زمینی (PVY-CP) در حامل pBIN19 همسانه سازی گردید. به کمک طراحی آغازگر، این ژن به نحوی همسانه سازی شد که فاقد کدون شروع باشد. گیاهان توتون *Nicotiana tabacum* cv. Samsun به روش قطعه برگی و با استفاده از باکتری *Agrobacterium tumefacience* توسط ژن PVY-CP تراژن گردیدند. مقاومت لاین‌های تراژن *Nicotiana tabacum* cv. Samsun حاوی ژن الحاقی PVY-CP، در برابر واگیرش سه جدایه ویروس وای سیب‌زمینی شایع در ایران شامل PVYn-H، PVYn-Mz و PVYo-Ar مورد ارزیابی قرارگرفت. بر اساس خصوصیات بیولوژیکی، سرولوژیکی و نقشه تحدید ژن پروتئین پوششی، جدایه‌های PVYn-H و PVYn-Mz با نژاد نکروتیک PVY و جدایه PVYo-Ar با نژاد معمولی PVY مشابهت داشتند. حضور ژن PVY-CP الحاقی به ژنوم گیاه، در

---

۱- این مقاله بر اساس نتایج پایان‌نامه دوره دکتری نگارنده اول ارایه گردیده است.

۲۹ لاین از ۳۱ لاین مقاوم به کانامایسین، بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد تأیید قرار گرفت. نتایج ارزیابی نشانه‌های بیماری و آزمون الایزا نشان داد که در مایه‌زنی جدایه PVYn-H، ۵ لاین مقاوم، ۹ لاین دارای نشانه‌های ملایم بیماری و ۱۷ لاین حساس و در برابر مایه‌زنی جدایه PVYn-Mz، ٤ لاین مقاوم، ۱۰ لاین با نشانه‌های ملایم بیماری و ۱۷ لاین حساس و در برابر مایه‌زنی جدایه PVYo-Ar دو لاین با نشانه‌های ملایم و ۲۹ لاین حساس بودند. با توجه به فقدان کدون شروع در تراژن PVY-CP، هیچ محصول پروتئینی حاصل از ترجمه تراژن در لاین‌های مقاوم، ردیابی نگردید. بر این اساس به نظر می‌رسد که در این گیاهان، مقاومت با منشأ آر.ان.ای (RNA mediated resistance-RMR) مطرح باشد. مکانیسم(های) احتمالی مطرح در چنین مقاومتی مورد بحث قرار گرفته است. با توجه به محدود بودن منابع مقاومت طبیعی در بین گیاهان متعلق به جنس *Nicotiana*، دست یابی به منابع مقاومت مهندسی شده مفید می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ویروس Y سیب‌زمینی، نژادها، گیاهان تراریخت، مقاومت مهندسی شده

**مقدمه**

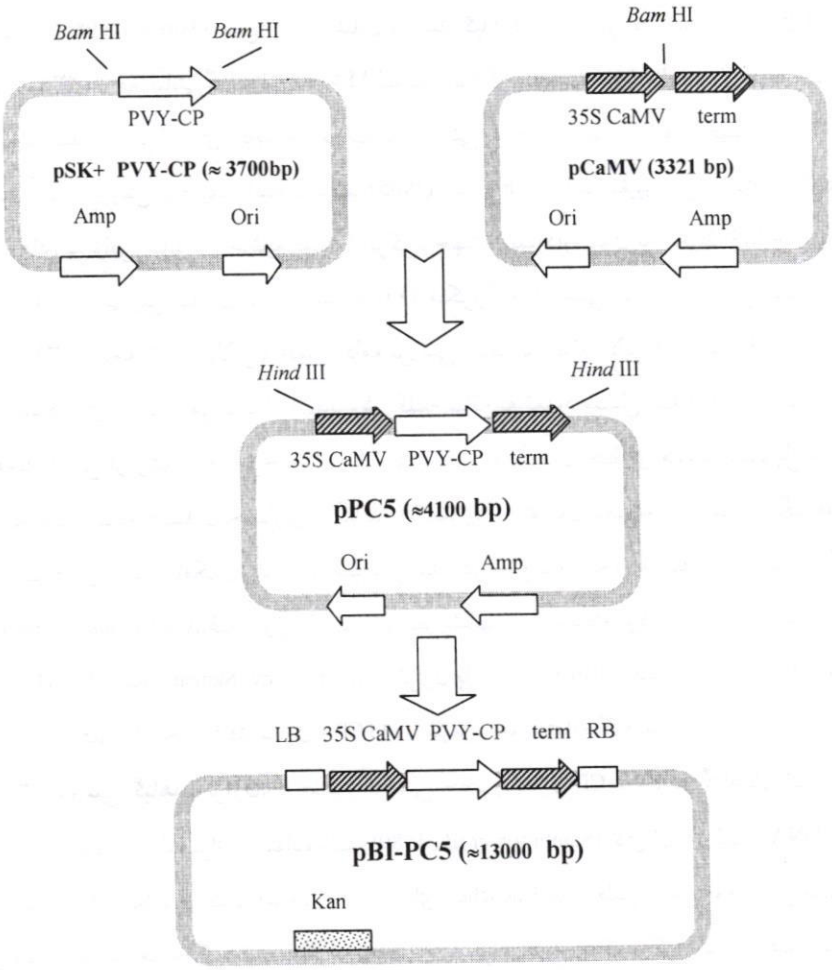
ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*-PVY) عضو تیپ جنس *Potyvirus* از خانواده Potyviridae می‌باشد. این خانواده، بزرگ‌ترین گروه ویروس‌های گیاهی را شامل می‌شود (Murphy *et al.*, 1995). نشانه‌های حاصل از آلودگی توتون به PVY بسته به جدایه ویروس و ژنوتیپ توتون، شامل روشن شدن رگبرگ‌ها و موزائیک تا نکروز شدید برگ و لکه‌های نکروتیک در برگ‌ها و ساقه‌ها می‌باشد (Shew & Lucas, 1991). آلودگی به PVY موجب کاهش کمی و کیفی تولید توتون می‌شود (Sievert, 1971; Latorre, 1983). هر ساله در ایران، ویروس وای سیب‌زمینی موجب کاهش ۱۰ تا گاهی ۱۰۰ درصد محصول توتون می‌گردد (Shahraeen & Ellahinia, 2000). سویه نکروتیک و خطرناک PVY (PVYn) از مزارع توتون بسیاری از کشورهای دنیا و از جمله ایران گزارش شده است (Gooding & Tolin, 1973; Bagnal, 1992; Latorre *et al.*, 1982; Shahraeen & Ellahinia, 2000; Vorster *et al.*, 1990). این نژاد در مزارع سیب‌زمینی کشور نیز شیوع داشته و هر ساله موجب خسارت به محصول سیب‌زمینی می‌گردد که این موضوع به ویژه در مناطق تولید غده‌های بذری سیب‌زمینی از

اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد (Danesh *et al.*, 1992; Hooker, 1990; Pourrahim *et al.*, 1998; Shamsbakhsh *et al.*, 2002). PVY توسط چندین گونه شته به روش ناپایا انتقال می‌یابد که این موضوع کنترل بیماری‌های ناشی از آن را با مشکل روبرو ساخته است. در این راستا، موفق‌ترین روش‌ها شامل استفاده از ارقام متحمل یا مقاوم به PVY بوده است (Shew & Lucas, 1991). متاسفانه در جنس *Nicotiana*، منابع ژنتیکی مقاومت در برابر PVY که در عین حال از نظر کیفی نیز مورد پذیرش باشند، بسیار نادر می‌باشد (Burk *et al.*, 1982). برخی از لاین‌های اصلاح شده توتون حاوی ژن مقاومت *va* در برابر PVY، گرچه در مقابل آلودگی به این ویروس مقاوم تا متحمل می‌باشند (Gupton & Burk, 1973) ولی این لاین‌ها در برابر بیماری سفیدک داخلی توتون (کپک آبی) بسیار حساس هستند (Gooding *et al.*, 1985). به علاوه سویه‌هایی از PVY شناسایی شده‌اند که می‌توانند بر مقاومت ناشی از ژن *va* غلبه کنند (Gooding, 1985). برخی از سویه‌های PVY در ژنوتیپ‌هایی از توتون که حاوی ژن مقاومت به نماتد مولد گره (root knot) می‌باشند، موجب بروز نشانه‌های شدید بیماری به صورت نکروز می‌گردند، در حالی‌که همین سویه‌ها در ژنوتیپ‌های توتون فاقد ژن مقاومت به نماتد، نشانه بیماری ملایم‌تری ایجاد می‌کنند. از این‌رو می‌بایستی به دنبال منابع مقاومت جدیدی در مقابل آلودگی به PVY در گیاه توتون بود. بیان ژن پروتئین پوششی ویروس در گیاهان تراژن می‌تواند موجب مقاوم شدن این گیاهان در برابر آلودگی با همان ویروس گردد. این نوع مقاومت اصطلاحاً مقاومت با منشأ بیمارگر (Pathogene drived resistance - PDR) نامیده می‌شود (Powell-Abel *et al.*, 1986) که از آن در تهیه لاین‌های توتون (*Nicotiana* sp.) تراژن مقاوم به PVY استفاده شده است (Lindbo & Doughrty, 1992; Stark & Beachy, 1989). با این وجود هنوز در سطح تجاری، گیاهان توتون تراژن مقاوم به PVY مورد استفاده قرار نگرفته‌اند. در این تحقیق مقاومت لاین‌های *N. tabacum* cv. Samsun تراژن حاوی ژن پروتئین پوششی نژاد نکروتیک PVY در برابر واگیرش سه جدایه شایع این ویروس در ایران بررسی گردید. تراژن پروتئین پوششی PVY بکار رفته، بگونه‌ای دست‌ورزی گردید که فاقد کدون شروع بوده و در نتیجه قادر به ترجمه و تولید پروتئین پوششی PVY در لاین‌های گیاهان تراژن نباشد. تعدادی از لاین‌های تراژن حاصله، در برابر آلودگی با جدایه‌های ایرانی نکروتیک PVY مقاوم بودند. مکانیسم(های) احتمالی مطرح در چنین مقاومتی مورد بحث قرارگرفته است.

**روش بررسی**

**۱- همسانه‌سازی ژن پروتئین پوششی PVY:** در این تحقیق، از پلاسمیدهای pPC5 و pBI-PC5 حاوی توالی کدکننده پروتئین پوششی PVY که در بررسی‌های قبلی تهیه شده بود، استفاده گردید (Pourrahim *et al.*, 2004). در پلاسمید pPC5 به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای نواحی ابتدا و انتهای ژن پروتئین پوششی ویروس وای سیب‌زمینی (PVY-CP)، توالی ژن پروتئین پوششی سویه نکروتیک PVY، تکثیر و در ناحیه بین پیشبر 35S CaMV و توالی خاتمه دهنده (terminator) این پلاسمید همسانه‌سازی شده بود.

توالی آغازگرهای بکار رفته عبارت بود از: Da1:5′-cacggatccgcaaatgcacaattgatgca-3′ و Da2: 5′-gacggatcctcacatgttcttgactccaagtag-3′. در مرحله بعد با استفاده از آنزیم Hind III، قطعه‌ای از pPC5 که از سمت 5′ به ترتیب حاوی توالی‌های مربوط به پیشبر 35S CaMV، ژن PVY-CP و توالی خاتمه دهنده بود، بریده شده و در ناقل pBin19 در محل ORF مربوط به ژن *LacZ*، همسانه سازی گردید (Pourrahim *et al.*, 2004). پلاسمیدهای نوترکیب حاصله (pBI-PC5)، جهت تراریخت نمودن بافت گیاهی بکار رفت (شکل ۱). پلاسمید pBI-CP5 ابتدا به سلول‌های باکتری *E. coli* JM109 و سپس با استفاده از روش آمیزش سه والدی (triparental mating) به سلول‌های باکتری *Agrobacterium tumefaciens* نژاد LBA4404 انتقال داده شد (Ditta *et al.*, 1980). سلول‌های باکتری نژاد LBA4404 دارای پلاسمید کمکی pAL4404 می‌باشند که این پلاسمید حاوی ژن‌های *vir* جهت انتقال ناحیه T-DNA به سلول‌های گیاهی است. به منظور اطمینان از حضور پلاسمید pBI-PC5 در سلول‌های *A. tumefaciens* ترانس کانجوگانت حاصله، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه ژن پروتئین پوششی PVY استفاده شد. سلول‌های *A. tumefaciens* ترانس کانجوگانتی که حاوی پلاسمید p-BI-PC5 بودند، جهت تراریخت نمودن گیاه استفاده شدند.




**شکل ۱**- مراحل شماتیک همسانه سازی ژن پروتئین پوششی ویروس وای سیب زمینی در حاملین پلاسمیدی

**Fig. 1-** Schematic diagram of cloning of coat protein gene of *potato virus Y* in plasmid vectors