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[۵،۱]، علی آهون‌منش[۲]، هاله هاشمی[۳]، سیروس زینلی[٤] 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

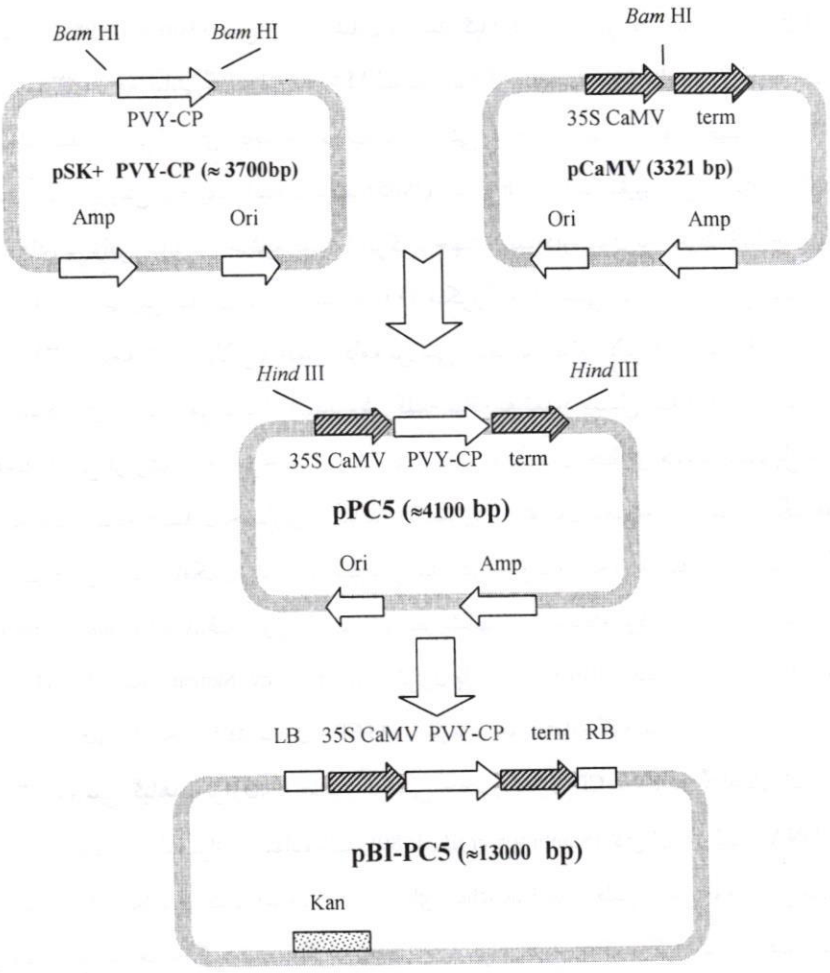
ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*-PVY) عضو تیپ جنس *Potyvirus* از خانواده Potyviridae می‌باشد. این خانواده، بزرگ‌ترین گروه ویروس‌های گیاهی را شامل می‌شود (Murphy *et al.*, 1995). نشانه‌های حاصل از آلودگی توتون به PVY بسته به جدایه ویروس و ژنوتیپ توتون، شامل روشن شدن رگبرگ‌ها و موزائیک تا نکروز شدید 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

۲- تراریخت نمودن گیاه: بذور گیاهان *N. tabacum* cv. Samsun پس از استریل نمودن سطحی در محلول ۵ درصد کلراکس و شستشو در آب مقطر استریل، در محیط کشت MS کشت شد (Torres, 1998). پس از سبز شدن و رشد گیاهچه‌ها در شرایط استریل درون اتاقک رشد (۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد، نور ۱٤٥۰۰ لوکس با ۱۲ ساعت روشنایی و رطوبت نسبی ٥±۷٥ درصد)، از برگ‌های حاصله قطعات یک سانتی‌متر مربعی تهیه شده و جهت تراریخت نمودن آنها از روش توصیف شده توسط Horsch *et al.* (1985) با تغییراتی، استفاده گردید. جوانه‌های باززایی شده در حاشیه قطعات برگی، جهت ریشه‌دار شدن به محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ایندول‌استیک اسید و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین انتقال داده شدند. ۳۱ گیاهچه تراژن (لاین) جهت ادامه بررسی انتخاب شدند. لاین‌ها با نام TCP1، TCP2 و ... نامگذاری شده و هر یک از آنها بروش قلمه ساقه به تعداد شش عدد ازدیاد گردیدند. گیاهچه‌ها پس از رشد و در مرحله ۳ تا ٤ برگی، ابتدا به گلدان حاوی ماسه استریل و یک هفته بعد به گلدان حاوی خاک پاستوریزه انتقال یافته و پس از نگه‌داری به مدت ۱۰ روز در اتاقک رشد با شرایط ذکر شده در بالا، به گلخانه منتقل شدند. از گیاه *N. tabacum* cv. Samsun غیرتراژنی که در شرایط مشابهی رشد یافته بود، به عنوان شاهد غیر تراژن (H) و از گیاه *N. tabacum* cv. Samsun تراژن با حامل pBin19 فاقد ژن الحاقی PVY-CP، به عنوان شاهد تراریخت فاقد تراژن (TCP^-) در مایه‌زنی‌ها استفاده گردید.

۳- بررسی گیاهان تراژن: به منظور بررسی حضور تراژن PVY-CP در گیاهان تراژن، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد (Sambrook *et al.*, 1989). دی.ان.ای کل (total DNA) بافت برگ، با استفاده از کیت استخراج دی.ان.ای (Roche، آلمان) طبق روش توصیفی شرکت سازنده کیت، استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای Da1 و Da2 با غلظت ۲۰ پیکومول در میکرولیتر، ۰/٥ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase، دو میکرولیتر دی.ان.ای استخراجی از گیاه، پنج میکرولیتر بافر PCR10X، سه میکرولیتر محلول MgCl2 25mM، یک میکرولیتر محلول dNTPmix 10mM و ۳٦/٥ میکرولیتر ddH2O بود که طی برنامه‌ای شامل پنج دقیقه ۹٤ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه شامل یک دقیقه ٥۰ درجه سانتی‌گراد، دو دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه ۹٤ درجه سانتی‌گراد و در پایان، یک دقیقه ٥۰ درجه سانتی‌گراد و پنج دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد در

دستگاه ترموسایکلر مدل اپندرف (آلمان)، انجام شد. تمام آنزیم‌ها و مواد واکنش از شرکت Roche آلمان تهیه شده بود. مارکر ملکولی به کار رفته در ژل الکتروفورز شامل پلاسمید pUC18 برش یافته توسط آنزیم *Taq* بود که تولید قطعات ١٤٤٤، ٧٣٦، ٤٧٦ و ٣٠ جفت بازی نمود. در هر لاین، در صورت وجود تراژن PVY-CP در دی.ان.ای استخراجی، انتظار حضور یک باند با اندازهٔ تقریبی ٨٠٠ جفت باز در ژل الکتروفورز وجود داشت. این قطعه دی.ان.ای توسط Agarose DNA extraction kit و به روش توصیه شده به وسیله سازنده کیت (Roche، آلمان) از ژل آگارز جداسازی گردید و به وسیله آنزیم‌های برشی *Avi II*، *Bsm I*، *Hae III*، *Sfu I* و *Tru 9I* به طور جداگانه تیمار شد. محصول بدست آمده از هضم آنزیمی، در ژل آگارز الکتروفورز گردیده و قطعات DNA حاصله از برش، مورد بررسی قرارگرفتند.

به منظور مطالعه بیان ژن PVY-CP در سطح آر.ان.ای، آر.ان.ای کل گیاه (total RNA) استخراج و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن PVY-CP، بروش رونوشت برداری برگردان و سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. آر.ان.ای کل استخراج شده از گیاه با استفاده از کیت High pure RNA isolation (Roche، آلمان) و طبق روش پیشنهادی سازنده کیت، استخراج گردید و در واکنش RT-PCR بکار رفت (Pourrahim *et al.*, 2004). جهت حذف هر نوع بقایای احتمالی دی.ان.ای در نمونه‌های آر.ان.ای استخراجی، از آنزیم RNase-free DNase (Roche، آلمان) استفاده شد. با این وجود به عنوان شاهد و جهت کنترل احتمال آلودگی به دی.ان.ای (شاهد عدم آلودگی به دی.ان.ای)، نمونه‌هائی از آر.ان.ای استخراج شده بدون وارد شدن در اولین مرحلهٔ RT-PCR (یعنی مرحلهٔ ساخت رشته مکمل cDNA)، مستقیما در واکنش PCR قرارداده شدند. در صورت آلودگی این نمونه‌ها به دی.ان.ای ژنومی، می‌بایستی پس از واکنش PCR، باندی با اندازهٔ تقریبی ٨٠٠ جفت باز در ستون مربوطه در ژل مشاهده می‌شد.

گیاهان تراژن از نظر بیان ژن الحاقی PVY-CP و حضور پروتئین پوششی ویروس Y سیب‌زمینی، با استفاده از دو روش TAS-ELISA و وسترن بلات مورد بررسی قرارگرفتند (Pourrahim *et al.*, 2004). در روش TAS-ELISA از IgG چندهمسانه‌ای (پلی‌کلنال) و تک همسانه‌ای (مونوکلنال) اختصاصی نژاد نکروتیک PVY تهیه شده از DSMZ آلمان، طبق روش توصیف شده توسط de Avila *et al.* (1990) استفاده شد. برای انجام آزمون وسترن بلات،

آموده‌های پروتئینی استخراج شده از هر یک از لاین‌های گیاهان تراژن، به روش توصیف شده توسط Laemmli (1970) در ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. پس از جداسازی پروتئین‌ها، برای انتقال آنها از ژل به غشا نیتروسلولزی، از دستگاه الکتروترانسفر (Hoefer, USA) طبق روش پیشنهادی سازنده دستگاه (روش electro-transfer) استفاده شد. مراحل انجام آزمون قبلاً توضیح داده شده است (Pourrahim *et al.*, 2004).

٤- جدایه‌های ویروس وای سیب‌زمینی: در این بررسی جهت ارزیابی مقاومت لاین‌های تراژن، از سه جدایه ایرانی PVY، شامل PVYn-H، PVYn-Mz و PVYo-Ar استفاده شد. جدایه PVYn-H از گیاهان سیب‌زمینی از استان همدان جداسازی شده و خصوصیات آن با سویه نکروتیک PVY (PVYn) مطابقت داشت (Pourrahim *et al.*, 1998). جدایه PVYn-Mz از گیاهان توتون با نشانه نکروز لکه‌ای و رگبرگی، از استان مازندران جداسازی شده بود. این جدایه در آزمون DAS-ELISA، با آنتی‌بادی تک همسانه‌ای سویه PVYn (Bioreba، سوئیس)، واکنش مثبت داشته و ١٤ روز پس از مایه‌زنی در گیاهان توتون *N. tabacum* cv. Samsun و *N. tabacum* cv. White Barley تولید لکه‌های نکروزه نمود. خصوصیات این جدایه با سویه PVYn مطابقت داشت. جدایه PVYo-Ar، از گیاهان سیب‌زمینی از استان اردبیل جداسازی شده و ١٤ روز پس از مایه‌زنی در گیاهان توتون *N. tabacum* cv. Samsun و *N. tabacum* cv. White Barley تولید نشانه‌های روشن شدن رگبرگ و موزائیک ملایم نمود. خصوصیات این جدایه با سویه معمول PVY (ordinary) مشابهت داشت.

هر یک از جدایه‌ها، بروش توصیف شده توسط McDonald *et al.* (1976) خالص‌سازی شد. آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای در خرگوش سفید آزمایشگاهی تهیه شده و برای خالص‌سازی ایمیونوگلوبولین جی (IgG)، از روش رسوب با محلول سولفات آمونیم اشباع و کروماتوگرافی تبادل یونی بر روی ستون سلولزی اتیلن آمینواتان استفاده گردید (Ball *et al.*, 1990). مراحل کار قبلاً توضیح داده شده است (Pourrahim *et al.*, 2000).

بمنظور بررسی پلی‌مورفیزم ژن پروتئین پوششی سه جدایه ایرانی PVY مورد استفاده در این بررسی، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Da1 و Da2، ناحیه ژن پروتئین پوششی این جدایه‌ها به وسیله RT-PCR، تکثیر گردید. ابتدا با استفاده از آموده خالص ویروس، آر.ان.ای ژنومی هر یک از جدایه‌ها، به روش فنل-کلروفورم و رسوب با اتانول، استخراج شد

(Sudarsono *et al.*, 1993). واکنش RT-PCR در دو مرحله انجام گردید. در مرحله اول (ساخت cDNA)، به هر یک از میکروتیوب‌های نیم میلی‌لیتری، ۵ تا ۱۰ میکروگرم (حدود دو میکرولیتر) از آر.ان.ای استخراجی، یک میکرولیتر از آغازگر Da2 و شش میکرولیتر از آب دو بار تقطیر تیمار شده با DEPC اضافه شده و میکروتیوب‌ها پس از ۱۰ دقیقه در ۷۵ درجه سانتی‌گراد، بلافاصله به روی یخ انتقال یافتند. سپس دو میکرولیتر بافر 10X PCR، دو میکرولیتر 25 mM MgCl2، دو میکرولیتر 10mM dNTP mix، دو میکرولیتر 0.1 M DTT و یک میکرولیتر آنزیم Superscript II (Gibco BRL-USA) به هر یک از میکروتیوب‌ها اضافه شد. میکروتیوب‌ها بمدت ٦٠ دقیقه در ٤٢ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس بلافاصله بروی یخ منتقل شدند. جهت حذف آر.ان.ای، یک میکرولیتر از آنزیم Rnase H به هر میکروتیوب اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت انجام مرحله دوم واکنش، به هر میکروتیوب، چهار میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای Da1 و Da2، نیم میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase (0.5 uni/ul)، پنج میکرولیتر بافر 10X PCR، سه میکرولیتر 25mM MgCl2، یک میکرولیتر 10mM dNTP mix و ۳۳/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد. پس از قرار دادن میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با برنامه پنج دقیقه ٩٤ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه شامل یک دقیقه ۵۰ درجه، دو دقیقه ۷۲ درجه و یک دقیقه ٩٤ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. محصول واکنش RT-PCR به روش الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. قطعه حدود ۸۰۰ جفت بازی مربوط به ژن پروتئین پوششی PVY، با استفاده از کیت Agarose gel extraction kit (Roche، آلمان) و بر اساس روش پیشنهادی شرکت سازنده، از ژل آگارز جدا و خالص‌سازی گردید. قطعه DNA حاصله در مورد هر یک از جدایه‌ها، توسط آنزیم‌های برشی *A vi II*، *B sm I*، *Hae III*، *S fu I* و *T ru 9I* (Roche، آلمان) تیمار گردید (Sambrook, 1989). محصول بدست آمده از هضم آنزیمی از طریق الکتروفورز در ژل آگارز، مورد مطالعه قرارگرفت.

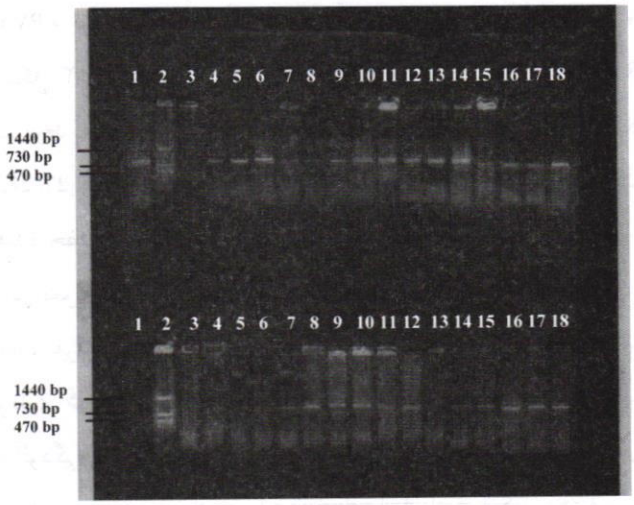
۵- مایه‌زنی لاین‌های تراژن: لاین‌های گیاهان تراژن در مرحله ۵ تا ٦ برگی، با استفاده از جدایه‌های PVY مایه‌زنی شدند. برای مایه‌زنی هر یک از جدایه‌ها، از عصاره تهیه شده از برگ گیاهان *N. tabacum* cv. Samsun واگرفته، در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷/۱ (با نسبت

یک گرم بافت : ده میلی‌لیتر بافر) به میزان ٤٠٠ میکرولیتر به ازای هر برگ، استفاده شد. از هر لاین دو گیاه و در هر گیاه چهار برگ برای مایه‌زنی استفاده گردید. چهار هفته پس از مایه‌زنی، گیاهان از نظر بروز نشانه مورد بررسی قرارگرفته و در سه گروه حساس یا تیپ وحشی (نشانه‌ها همانند گیاهان شاهد غیر تراژن)، متوسط (گیاهان واگرفته سیستمیک که نشانه‌های بیماری در آنها در مقایسه با شاهد غیرتراژن، ملایم‌تر بود) و مقاوم (گیاهان بدون نشانه مشخص) تقسیم‌بندی شدند. همچنین جهت بررسی سیستمیک شدن ویروس در گیاهان مایه‌زنی شده، آزمون DAS-ELISA بروش توصیف شده توسط Clark & Adams (1977) و با استفاده از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای تولید شده بر علیه هر یک از جدایه‌های ایرانی، انجام گردید (Pourrahim *et al.*, 2000). جهت یکنواختی این آزمون، در هر لاین از دو برگ جوان انتهایی (نیم‌گرم بافت) جهت عصاره‌گیری استفاده شد.

نتیجه و بحث

۱- وضعیت باززایی گیاهان تراژن: در حاشیه قطعات برگی منتقل شده به محیط MS حاوی کانامایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، پس از حدود دو هفته، توده‌های کالوس تشکیل گردید و پس از حدود سه تا چهار هفته بر روی این توده‌ها، جوانه‌های باززائی شده بوجود آمد. این جوانه‌ها حدود یک هفته پس از انتقال به محیط MS حاوی ایندول استیک اسید (۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و کانامایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تشکیل ریشه دادند. این حالت نشان دهنده حضور حداقل یک ژن فعال NPT II (مسئول مقاومت به کانامایسین) در این گیاهان بود. حدود ۳۱ لاین مقاوم به کانامایسین، باززائی و ریشه‌دار شدند.

۲- وضعیت تراژن در گیاهان تراریخت: نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تراژن PVY-CP، نشان دهنده حضور این تراژن در تمام لاین‌های گیاهان تراژن، به غیر از دو لاین TCP11 و TCP18 بود (شکل ۲). طی این واکنش، به غیر از دو لاین فوق، در بقیه ۲۹ لاین مورد بررسی، باندی به اندازه حدود ۸۰۰ جفت باز مشاهده گردید که با طول تراژن مطابقت داشت. در ستون‌های مربوط به دی.ان.ای استخراج شده از شاهد غیرتراریخت و شاهد تراریخت با حامل pBin19 فاقد تراژن، هیچ باندی مشاهده نشد که نشان دهنده عدم وقوع واکنش‌های غیراختصاصی بود.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات آزمون PCR بر روی دی.ان.ای استخراجی از ۳۱ لاین گیاه تراژن. ردیف بالا: ستون‌های (۱): شاهد مثبت، (۲): مارکر وزن ملکولی، (۳ الی ۱۸): لاین‌های تراژن بترتیب شماره ۳۱، ۷، ۲۲، ۲۴، ۳۰، ۲۷، ۱۳، ۱۲، ۴، ۱۵، ۲، ۲۱، ۶، ۱۴، ۱۰ و ۲۶. ردیف پایین: ستون‌های (۱): خالی، (۲): مارکر وزن ملکولی (شامل پلاسمید pUC18 برش یافته توسط آنزیم *Taq* که تولید قطعات ۱٤٤٤، ۷۳٦ و ٤۷٦ جفت بازی نمود)، (۳): شاهد منفی (شامل گیاه تراژن با pBIN19 فاقد ژن الحاقی)، (٤ و ۱۳): بترتیب لاین‌های ۱۱ و ۱۸ که تولید هیچ باندی نکرده‌اند، (۵ تا ۱۲ و ۱٤ تا ۱۸): بترتیب مربوط به لاین‌های تراژن شماره‌های ۱۶، ۲۹، ۵، ۲۰، ۸، ۱، ۲۳، ۱۷، ۳، ۹، ۲۸، ۱۹ و ۲۵.

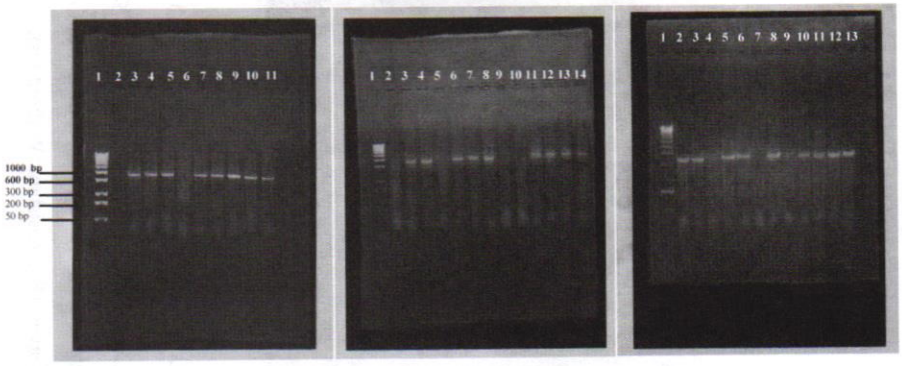
Fig 2- Electrophoresis of PCR products of extracted DNA from 31 transgenic lines. Up: Lanes (1): Positive control, (2): DNA marker (digested pUC with *Taq* which resulted into 1444, 736 & 476 bp fragments), (3-18): Transgenic lines No. 10, 14, 6, 21, 2, 15, 4, 12, 13, 27, 30, 24, 22, 7, 31 and 26 respectively. Down: Lanes (1): Empty, (2): DNA marker, (3): Negative control, (4 &13): Transgenic lines No. 11 and 18, (5-12 and 14-18): Transgenic lines No. 19, 28, 9, 3, 17, 23, 1, 8, 20, 5, 29, 16 and 25 respectively.

نتایج آزمون RT-PCR که به منظور بررسی وضعیت رونوشت‌برداری (transcription) از تراژن PVY-CP و تولید ملکول‌های رونوشت آر.ان.ای مربوطه (PVY-CP-RNA) در گیاه انجام گردید، در شکل ۳ ارائه شده است. پس از الکتروفورز محصولات RT-PCR در ژل آگارز، در ستون مربوط به هر یک از لاین‌های شماره TCP1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30 ,31 یک باند به اندازهٔ تقریبی ۸۰۰ جفت باز مشاهده شد که نشان دهندهٔ حضور ملکول‌های آر.ان.ای رونوشت‌برداری شده از تراژن PVY-CP در این لاین‌ها بود. در نمونه‌های مربوط به لاین‌های شماره TCP3, 7, 11, 14, 18, 19 ,26 هیچ‌گونه باندی به اندازه تقریبی ۸۰۰ جفت باز مشاهده نشد که نشان دهنده عدم حضور آر.ان.ای رونوشت برداری شده از تراژن PVY-CP در این نمونه‌ها و لاین‌های مربوطه بود. در ستون "شاهد عدم آلودگی به دی.ان.ای" نیز هیچگونه باندی با اندازه ۸۰۰ جفت باز مشاهده نشد که نشان دهنده عدم وجود دی.ان.ای در آموده‌های آر.ان.ای به کار رفته بود. متوسط میزان آر.ان.ای کل استخراجی از بافت گیاه با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation (شرکت Roche، آلمان)، حدود ۲۵ میکروگرم به ازای هر ۰/۳ گرم بافت برگ بود.

نتایج آزمون TAS-ELISA و وسترن بلات که به منظور بررسی بیان تراژن PVY-CP در سطح پروتئین انجام گردید، نشان‌دهنده عدم وجود واکنش مثبتی دال بر ترجمه تراژن و تولید پروتئین پوششی PVY در گیاهان تراژن بود. دقت تشخیصی روش TAS-ELISA و وسترن بلات به کار رفته در این بررسی بترتیب برابر با ۲۰ و نیم تا یک نانوگرم ویروس خالص در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاه واگرفته (شاهد مثبت) بود.

۳- ارزیابی مقاومت لاین‌های تراژن: نتایج بررسی نشانه‌های ظاهر شده و نیز آزمون DAS-ELISA روی لاین‌های تراژن مایه‌زنی شده با جدایه‌های PVYn-H، PVYn-Mz و PVYo-Ar در شکل ٤ و جدول ۱ ارائه شده است. این نتایج نشان داد در مایه‌زنی با جدایه PVYn-H، از ۳۱ لاین مورد بررسی، پنج لاین مقاوم، ۹ لاین متوسط (دارای نشانه‌های ملایم بیماری) و ۱۷ لاین حساس، در مورد جدایه PVYn-Mz، چهار لاین مقاوم، ۱۰ لاین متوسط و ۱۷ لاین حساس و در مایه‌زنی با جدایه PVYo-Ar، دو لاین متوسط و ۲۹ لاین حساس بودند. شدت نشانه‌های ظاهر شده در لاین‌های گیاهی، با مقادیر بدست آمده در آزمون الایزا همبستگی مثبت داشت، به نحوی که در لاین‌های بدون نشانه یا با نشانه ملایم، غلظت ویروس

کمتر و در لاین‌های با نشانه‌های شدید (موزائیک و نکروز لکه‌ای)، غلظت ویروس بیشتر بود.



(III) (II) (I)

شکل ۳- الکتروفورز محصولات آزمون RT-PCR بـر روی RNA اسـتخراجی از ۳۱ لایـن گیاه تراژن.

(I) ستون‌های (۱): مارکر وزن ملکولی، (۲ تا ٦): لاین‌های تراژن بترتیب شماره ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥، (۷): شاهد منفی، (۸ تا ۱۲): لاین‌های تراژن بترتیب شماره ٦ تا ۱۰، (۱۳): شاهد مثبت.

(II) ستون‌های (۱): مارکر وزن ملکولی، (۲-۱۳): لاین‌های تراژن بترتیب شماره ۱۱ تا ۲۲، (١٤): شاهد مثبت.

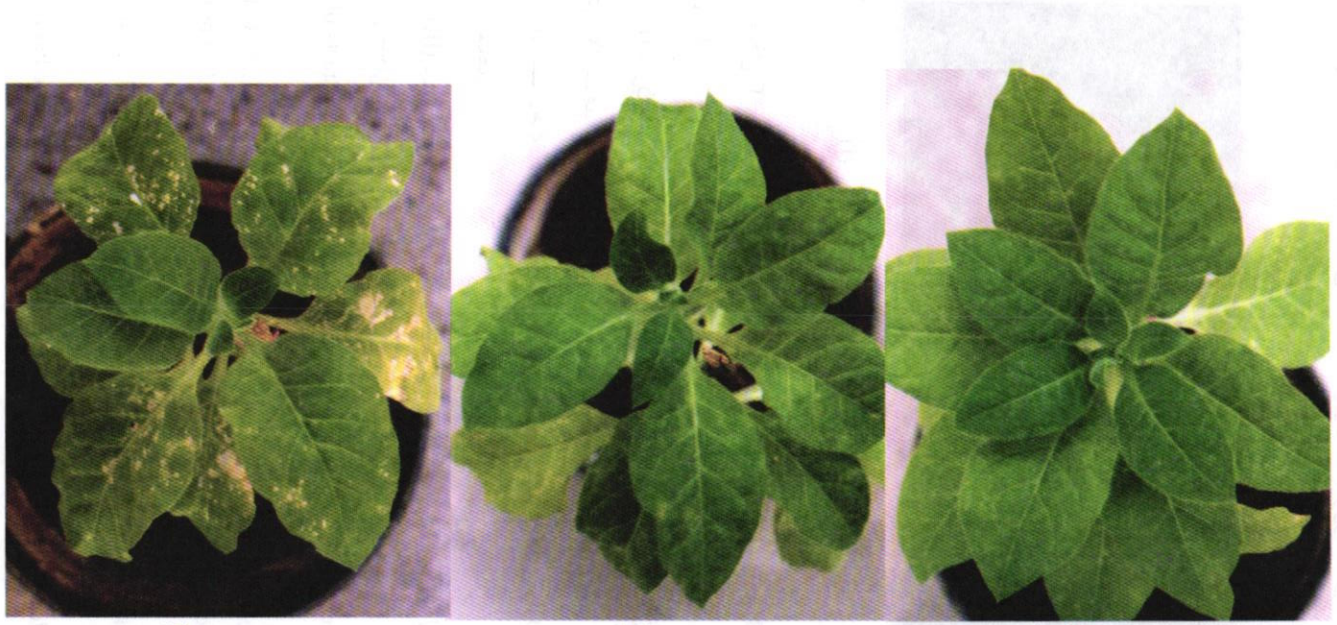
(III) ستون‌های (۱): مارکر وزن ملکولی، (۲): خـالی، (۳-۱۱): لایـن‌هـای تـراژن بترتیـب شماره ۲۳ تا ۳۱.

Fig. 3- Electrophoresis of RT-PCR products amplified from the RNA extracts of 31 transformed lines.

(I): Lines (1): Molecular weight marker, (2 to 6): Transgenic lines Nos. 1, 2, 3, 4, 5 respectively. (7): Negative control, (8 to 12): Transgenic lines Nos. 6 to 10, (13): Positive control.

(II): Lines (1): Molecular weight marker, (2 to 13): Transgenic lines Nos. 11 to 22, (14): Positive control.

(III): Lines (1) Molecular weight marker, (2): Empty, (3 to 11): Transgenic lines Nos. 23 to 31.



(S) (M) (R)

شکل ٤- انواع واکنش لاین‌های گیاهان تراژن مایه‌زنی شده با جدایه ایرانی ویروس Y سیب زمینی (PVYn-H). (S): حساس: بدشکلی، کاهش رشد و نکروز سیستمیک در برگ‌ها، (M): متوسط: بدشکلی و موزائیک پیسه‌ای ملایم در برگ‌ها، (R): مقاوم: بدون نشانه‌های مشخص برگی

Fig. 4- Different reactions of transgenic lines to inoculation with Iranian potato virus Y isolate (PVYn-H): (S): Susceptible: Malformation, stunting and systemic necrosis on leaves, (M): Moderate: Mild mottling and malformation of leaves, (R): Resistant: Without visual symptoms.

نتایج الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ژن پروتئین پوششی سه جدایه ایرانی PVY توسط آنزیم‌های برشی *Avi II*، *Bsm I*، *Hae III*، *Sfu I* و *Tru 9I* نشان داد که نقوش الکتروفورزی محصول هضم آنزیمی در دو جدایه PVYn-H و PVYn-Mz مشابه یکدیگر بودند. در ناحیه ژن پروتئین پوششی مربوط به جدایه PVYo-Ar، جایگاه برشی آنزیم *Tru 9I* وجود نداشت.

در این تحقیق گیاهان توتون *N. tabacum* cv. Samsun به وسیله ژن PVY-CP مربوط به نژاد نکروتیک ویروس وای سیب‌زمینی که فاقد کدون شروع بود، تراریخت گردیدند. تعدادی از لاین‌های تراژن در برابر واگیرش با هر دو جدایه نکروتیک PVYn-H و PVYn-Mz مقاوم بودند، در حالیکه در برابر جدایه PVYo-Ar فقط در دو لاین واکنش متوسط و در بقیه لاین‌ها واکنش حساسیت مشاهده شد. در تمامی لاین‌های تراریخت، به غیر از دو مورد (TCP11 و TCP18)، وجود تراژن PVY-CP از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد تأیید قرارگرفت (جدول ۱). احتمالاً در دو گیاه TCP11 و TCP18، قطعه T-DNA انتقالی در طی پدیده تبدیل (transformation)، فاقد تراژن PVY-CP کامل و فعال گردیده است و یا اینکه این دو لاین، به نوعی از تأثیر کانامایسین رهایی یافته‌اند. نتایج حاصل از تحقیقات سایر محققان نیز نشان می‌دهد که گیاهان تراریختی که بر اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک در محیط کشت انتخابی مورد گزینش قرار می‌گیرند، احتمال دارد فاقد تراژن فعال یا کامل باشند (Sudarsono *et al.*, 1995).

در لاین‌های مقاوم، مقاومت به صورت کاهش یا ملایم‌تر شدن نشانه‌های بیماری و نیز کاهش غلظت ویروس بروز نمود. با توجه به این که تراژن PVY-CP به کار رفته در این بررسی، فاقد کدون شروع بود، همانگونه که انتظار می‌رفت، در هیچ یک از لاین‌های تراریخت، پروتئین پوششی حاصل از ترجمه تراژن به روش‌های TAS-ELISA و وسترن بلات، قابل ردیابی نبود. پس از مایه‌زنی دو جدایه نکروتیک PVYn-H و PVYn-Mz، بر اساس نشانه‌های ظاهر شده در گیاهان و نتایج آزمون DAS-ELISA، لاین‌هایی که در آنها رونوشت آر.ان.ای تراژن PVY-CP وجود داشت (لاین‌های TCP2, 10, 21, 25)، در برابر واگیرش هر دو جدایه PVY مقاوم بودند. این نتایج نشان می‌دهد که واکنش مقاومت در این لاین‌ها، با حضور رونوشت آر.ان.ای تراژن ارتباط مستقیم داشته و نوعی مقاومت با منشأ آر.ان.ای (RNA mediated resistance-RMR) می‌باشد. این نتایج با فرضیه‌های قبلی ارائه شده در این زمینه مطابقت داشته و وجود مقاومت با منشأ آر.ان.ای در گیاهان سیب‌زمینی تراریخت با

جدول ۱- نتایج حاصله از بررسی بیان تراژن در سطح آر.ان.ای و پروتئین و نوع واکنش لاین‌های تراژن در برابر مایه‌زنی با سه جدایه ایرانی ویروس وای سیب زمینی

Table 1- Transgene expression in RNA and protein level and reactions of transgenic lines to inoculation with three Iranian potato virus Y isolates.

Reaction to			ELISA results			No. of NPT(II) loci	Expression		Transgene DNA	Line
PVYo-Ar	PVYn-Mz	PVYn-H	PVYo-Ar	PVYn-Mz	PVYn-H		Protein	RNA		
S	M	M	1.152	0.867	0.908	1	-	+	+	TCP1
S	R	R	1.164	0.193	0.207	1	-	+	+	TCP2
S	S	S	1.143	1.015	1.052	4	-	-	+	TCP3
S	S	S	1.136	1.134	1.171	2	-	+	+	TCP4
S	S	S	1.149	1.172	1.137	1	-	+	+	TCP5
S	S	S	1.125	1.086	1.018	2	-	+	+	TCP6
S	S	S	1.132	1.112	1.083	2	-	-	+	TCP7
S	M	M	1.142	0.598	0.771	1	-	+	+	TCP8
S	S	S	1.128	1.201	1.194	1	-	+	+	TCP9
M	R	R	0.731	0.209	0.246	2	-	+	+	TCP10
S	S	S	1.184	1.157	1.138	0	-	-	-	TCP11
S	S	S	1.153	1.134	1.125	1	-	+	+	TCP12
S	M	M	1.130	0.735	0.521	1	-	+	+	TCP13
S	S	S	1.114	1.164	1.104	3	-	-	+	TCP14

ادامه‌ی جدول ۱- نتایج حاصله از بررسی بیان تراژن در سطح آر.ان.ای و پروتئین و نوع واکنش لاین‌های تراژن در برابر مایه‌زنی با سه جدایه ایرانی ویروس وای سیب زمینی

Table 1 continued- Transgene expression in RNA and protein level and reactions of transgenic lines to inoculation with three Iranian potato virus Y isolates.

Reaction to			ELISA results			No. of NPT(II) loci	Expression		Transgene DNA	Line
PVYo-Ar	PVYn-Mz	PVYn-H	PVYo-Ar	PVYn-Mz	PVYn-H		Protein	RNA		
S	S	S	1.167	1.150	1.196	1	-	+	+	TCP15
M	M	M	0.649	0.871	0.427	1	-	+	+	TCP16
S	M	M	1.173	0.613	0.859	1	-	+	+	TCP17
S	S	S	1.145	1.215	1.186	0	-	-	-	TCP18
S	S	S	1.162	1.149	1.139	1	-	-	+	TCP19
S	S	S	1.153	1.164	1.213	1	-	+	+	TCP20
S	R	R	1.124	0.205	0.195	1	-	+	+	TCP21
S	M	M	1.195	0.817	0.738	3	-	+	+	TCP22
S	S	S	1.167	1.099	1.191	1	-	+	+	TCP23
S	M	M	1.159	0.595	0.795	1	-	+	+	TCP24
S	R	R	1.176	0.174	0.186	1	-	+	+	TCP25
S	S	S	1.134	1.139	1.072	2	-	-	+	TCP26
S	S	S	1.119	1.086	1.158	1	-	+	+	TCP27
S	M	M	1.092	0.432	0.937	1	-	+	+	TCP28

ادامه‌ی جدول ۱- نتایج حاصله از بررسی بیان تراژن در سطح آر.ان.ای و پروتئین و نوع واکنش لاین‌های تراژن در برابر مایه‌زنی با سه جدایه ایرانی ویروس وای سیب زمینی

Table 1 continued- Transgene expression in RNA and protein level and reactions of transgenic lines to inoculation with three Iranian potato virus Y isolates.

Reaction to			ELISA results			No. of	Expression		Transgene	Line
PVYo-Ar	PVYn-Mz	PVYn-H	PVYo-Ar	PVYn-Mz	PVYn-H	NPT(II) loci	Protein	RNA	DNA	
S	S	S	1.181	1.211	1.063	2	–	+	+	TCP29
S	M	R	1.155	0.519	0.189	2	–	+	+	TCP30
S	M	M	1.177	0.614	0.806	1	–	+	+	TCP31
S	S	S	1.129	1.138	1.126	1	–	–	–	TCP-(In)[a]
S	S	S	1.117	1.125	1.114	0	–	–	–	H (In)[b]
-	-	-	0.119	0.141	0.103	1	–	–	–	TCP-[c]
-	-	-	0.124	0.132	0.115	0	–	–	–	H[d]

a : گیاهان *Nicotiana tabacum* cv. Samsun که با ناقل pBin19 فاقد ژن PVY-CP ترانسفورم شده و دارای توالی‌های پیشبر 35S و Km^r بوده و با PVY مایه زنی شده‌اند (شاهد آلوده یا مثبت).

a: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun plants transformed by pBin19 without PVY-CP insert. These plants contain 35S promotor and Km^r gene and inoculated with PVY (Positive control).

b : گیاهان غیرتراریخت *N. tabacum* cv. Samsun مایه زنی شده با PVY (شاهد آلوده یا مثبت).

b: Nontransformed *Nicotiana tabacum* cv. Samsun plants inoculated with PVY (positive control).

c: گیاهان *N. tabacum* cv. Samsun که با ناقل pBin19 فاقد ژن PVY-CP، ترانسفورم شده و دارای توالی‌های پیشبر 35S و Km^r بوده و با PVY مایه زنی نشده‌اند (شاهد سالم یا منفی).

c: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun plants transformed by pBin19 without PVY-CP insert. These plants contain 35S promotor and Km^r gene and not inoculated with PVY (Negative control).

d: گیاهان غیرتراریخت *N. tabacum* cv. Samsun مایه زنی نشده با PVY (شاهد سالم یا منفی).

d: Nontransformed *Nicotiana tabacum* cv. Samsun plants not inoculated with PVY (minus control).

تراژن PVY-CP توسط سایر محققان، مورد تأیید قرارگرفته است (Smith *et al.*, 1995; Van der Vluget *et al.*, 1992). به نظر می‌رسد در این لاین‌های مقاوم، نوعی مکانیسم دفاع سلولی فعال شده و با حذف آر.ان.ای ویروس PVY مهاجم، موجب بروز فنوتیپ مقاومت در آنها می‌شود (Van der Vluget *et al.*, 1992). احتمالاً مقاومت با منشأ آر.ان.ای و پدیده خاموشی ژن در مرحله پس از رونوشت برداری (post transcriptional gene silencing, PTGS) دارای مکانیسم مشابهی می‌باشند (Baulcombe, 1996; Goodwin *et al.*, 1996). در این مدل، به دنبال بیان تراژن، با تشکیل و حضور آر.ان.ای دورشته‌ای مربوطه، مکانیسم PTGS فعال شده و موجب تخریب سریع و اختصاصی آر.ان.ای مورد هدف و بروز فنوتیپ مقاومت می‌گردد (Dougherty & Parks, 1995; Mueller *et al.*, 1995). در مقاومت با منشأ آر.ان.ای نیازی به ترجمه تراژن و تولید محصول پروتئینی از آن نمی‌باشد که از جمله مزایای این نوع مقاومت مهندسی شده محسوب می‌گردد. زیرا به دلیل عدم تولید محصول پروتئینی از تراژن، احتمال کپسیدپوشی سایر جدایه‌ها یا ویروس‌های دیگر توسط پروتئین پوششی تولیدی خود گیاه برطرف شده و در نتیجه امکان تشکیل ویروس‌های نوترکیب کاذب و نیز احتمال کسب توانائی انتقال جدایه‌های غیر قابل انتقال توسط ناقلین، منتفی می‌گردد.

مایه‌زنی جدایه PVYo-Ar بر روی ۳۱ لاین تراژن مورد بررسی نشان داد که فقط دو لاین TCP10 و TCP16 دارای واکنش متوسط بوده و بقیه لاین‌ها واکنش حساسیت داشتند. خصوصیات بیولوژیکی جدایه PVYo-Ar با نژاد معمول (ordinary) ویروس وای سیب‌زمینی (PVYo) مشابهت داشت. بررسی تأثیر آنزیم‌های برشی بر روی ناحیه ژن پروتئین پوششی این جدایه، مشخص نمود که نقشه تحدید (restriction map) این جدایه، متمایز از نقشه تحدید دو جدایه نکروتیک PVYn-H و PVYn-Mz بود. این موضوع نشان می‌دهد که توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه PVYo-Ar دارای تفاوت‌هایی با توالی این ژن در دو جدایه نکروتیک PVYn-H و PVYn-Mz (حداقل در ناحیه 5′) می‌باشد. در این تحقیق از ژن پروتئین پوششی مربوط به نژاد نکروتیک PVY جهت تراریخت نمودن گیاهان استفاده شد. از آن جا که توالی این ژن در جدایه‌های نکروتیک، دارای تفاوت‌هایی با توالی آن در جدایه‌های نژاد معمول (از جمله PVYo-Ar) می‌باشد، به نظر می‌رسد پایین بودن درصد همانندی (هومولوژی) بین تراژن PVY-CP الحاقی به ژنوم گیاه و ژن پروتئین پوششی جدایه PVYo-Ar مایه‌زنی شده،

موجب شده است تا لاین‌های تراژن نتوانند مقاومت مناسبی علیه جدایه PVYo-Ar نشان دهند.

در لاین‌های 29، 27، 23، 20، 15، 12، 9، 6، 5، 4 TCP علیرغم وجود تراژن PVY-CP و ساخته شدن رونوشت‌های آر.ان.ای از آن در گیاه، مقاومتی در برابر واگیرش جدایه‌های ایرانی PVY مشاهده نشد. این حالت احتمالاً ناشی از رونوشت برداری کم تراژن PVY-CP در این لاین‌ها می‌باشد. مشخص شده است که برای فعال شدن مکانیسم مقاومت با منشأ آر.ان.ای، نیاز به تجمع حداقل میزان معینی از رونوشت‌های آر.ان.ای تراژن در گیاه تراریخت می‌باشد و تنها پس از رسیدن غلظت آر.ان.ای به این حد بحرانی است که مکانیسم تخریب اختصاصی آر.ان.ای فعال می‌گردد (Sudarsono *et al.*, 1995). در مورد این لاین‌ها نیز احتمال دارد تراژن PVY-CP الحاق شده به ژنوم گیاه، از فعالیت لازم جهت تولید رونوشت‌های آر.ان.ای تراژن برخوردار نبوده و در نتیجه نتوانسته است غلظت کافی از رونوشت‌های آر.ان.ای را در سلول جهت تحریک مکانیسم مقاومت فراهم نماید. نتیجه قطعی در این مورد، بوسیله سنجش کمی رونوشت‌های آر.ان.ای تراژن در لاین‌های تولیدی قابل حصول می‌باشد. در گیاهان تراریخت عوامل مختلفی مانند جایگاه ژنی می‌توانند بر روی میزان تولید رونوشت‌های آر.ان.ای از تراژن تأثیرگذار باشند (Meyer, 1995).

در لاین‌های 26، 19، 14، 7، TCP3 علیرغم وجود تراژن در گیاه، هیچ رونوشت آر.ان.ای از تراژن قابل ردیابی نبوده و تمام این لاین‌ها در برابر مایه‌زنی با هر یک از سه جدایه PVY، حساس بودند. تمام پنج لاین فوق الذکر (به غیر از TCP 19)، در ژنوم خود دارای بیش از یک نسخه از تراژن الحاقی می‌باشند (Pourrahim *et al.*, 2004). می‌توان انتظار داشت که در این لاین‌ها تراژن پس از الحاق در ژنوم گیاه، خاموش شده باشد. عوامل متعددی مانند متیله شدن، تشکیل هتروکروماتین و تعداد نسخه‌های الحاقی تراژن به ژنوم گیاه، در خاموشی تراژن در گیاهان تراریخت دخالت دارند (Meyer, 1995).

با توجه به محدود بودن منابع مقاومت طبیعی در بین گیاهان جنس *Nicotiana* sp. در برابر جدایه‌های نکروتیک ویروس Y سیب‌زمینی، تهیه و استفاده از منابع مقاومت مهندسی شده، مفید و ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری نویسنده اول می‌باشد. هزینه‌های این تحقیق توسط سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی در قالب بورس تحصیلی نویسنده اول تأمین شده است که بدینوسیله تشکر می‌گردد. از پرسنل بخش تحقیقات بیوتکنولوژی و بخش تحقیقات بیولوژی ملکولی انستیتو پاستور ایران و نیز بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی ایران- اوین، نهایت تشکر به عمل می‌آید. همچنین از زحمات آقای دکتر بهار در مطالعه متن مقاله و ارائه اصلاحات تشکر می‌گردد.

نشانی نگارندگان: رضا پوررحیم، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران و بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵، ایران؛ علی آهون‌منش، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران؛ هاله هاشمی، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران، ایران؛ سیروس زینلی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، مؤسسه انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران؛ شیرین فرزادفر، بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵، ایران.