دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۵، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳ (ص ۲۳۹-۲۲۹)

تهیهٔ گیاه توتون تراژن مصون به طیف گسترده‌ای از سویه‌های ویروس وای سیب‌زمینی

هادی خاطری[۱]، غلامحسین مصاحبی‌محمدی[۲*]، اشتفان وینتر[۳]، مینا کوهی‌حبیبی[۴] و اکبر دیزجی[۵]
۱، ۲، ۴ و ۵. دانشجوی سابق دکتری، استاد، دانشیار و استادیار گروه گیاهپزشکی،
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. بخش ویروس‌های گیاهی DSMZ آلمان، برانشوایگ
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۱۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۸/۱۸)

چکیده

ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY) از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا در مزارع توتون مناطق مختلف استان‌های گلستان، مازندران و گیلان است. با توجه به بی‌تأثیری حشره‌کش‌ها در کاهش آلودگی به PVY، شکسته شدن منابع طبیعی مقاومت توسط سویه‌های خاص و مشکلات روش‌های سنتی اصلاحی، به‌کارگیری روش‌های جایگزین ایجاد مقاومت به PVY در توتون با به‌کارگیری مقاومت مشتق‌شده از بیمارگر می‌تواند راهکاری برای کاهش خسارت در نظر گرفته شود. در این پژوهش گیاهان توتون تراژنی تولید شدند که در برابر طیف گسترده‌ای از جدایه‌های PVY از سویه‌های مختلف این ویروس مقاوم‌اند. ناحیه‌ای به اندازهٔ ۴۷۲ جفت‌باز از ژنوم یک جدایهٔ ایرانی PVY شامل توالی نوکلئوتیدی بخش‌هایی از CP و 3'UTR به منظور تهیهٔ یک سازهٔ سنجاق‌سری برای مقاومت به PVY به‌کار گرفته شد و تراژن‌سازی توتون رقم Wisconsin 38 با این سازه به کمک اگروباکتریوم انجام گرفت. ۶۱ درصد از گیاهان تراژن T0 حاصل به PVY مقاوم بودند و انتقال مقاومت به نسل بعد در ۹ لاین مختلف با استفاده از روش داس الایزا تأیید شد. یکی از این لاین‌ها با ۱۲ جدایهٔ مختلف PVY شامل چهار جدایهٔ ایرانی و هشت جدایه از کشورهای دیگر تحت آزمایش قرار گرفت و مصونیت آن بر اساس عدم ظهور علائم و نتایج آزمون‌های داس الایزا و RT-PCR به تأیید رسید. این پژوهش نشان داد که سازهٔ سنجاق‌سری به‌کاررفته دارای کارایی بسیار زیادی برای ایجاد توتون تراژن مصون در مقابل سویه‌های مختلف PVY بوده است.

واژه‌های کلیدی: تراژن‌سازی با واسطهٔ اگروباکتریوم، سازهٔ سنجاق‌سری، مقاومت طیف گسترده.

مقدمه

گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از خانوادهٔ بادمجانیان، یک محصول اقتصادی مهم است که در بسیاری از نقاط جهان کشت می‌شود و تولید سالانهٔ آن در ایران حدود ۱۹۰۰۰ تن است (FAO, 2011). بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین مشکلات توتون‌کاران است. در این بین، ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY) یکی از شایع‌ترین ویروس‌ها در مزارع توتون مناطق مختلف استان‌های گلستان، مازندران و گیلان است (Abedi, 1998). در حال حاضر، همهٔ ارقام تجاری توتون زیر کشت در ایران نسبت به این ویروس حساس‌اند. ویروس وای سیب‌زمینی گونهٔ تیپ جنس *Potyvirus* (تیرهٔ *Potyviridae*) است و علاوه بر توتون باعث بیماری‌های مهمی در دیگر گیاهان تیرهٔ بادمجانیان مانند سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی نیز می‌شود. PVY به‌طور طبیعی با بیش از ۴۰ گونه شته به‌صورت ناپایا منتقل می‌شود (Lacroix *et al.*, 2010)، ولی از بین بردن شته‌ها با حشره‌کش کاهش چندانی در آلودگی محصول ایجاد

* تلفن: ۰۹۱۲۳۸۰۱۸۹۶
E-mail: mosaheb@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

نکرده است (Raccah, 1986; Raccah & Fereres, 2009; Hull, 2009). با توجه به نبود یک روش کارآمد برای حفاظت مستقیم از بوته‌های توتون در برابر آلودگی به PVY، یا کنترل انتقال ویروس توسط شته‌ها، مقاومت ژنتیکی در برابر PVY به عنوان ابزاری امیدبخش مورد توجه بوده است (Lacroix *et al.*, 2010)؛ اما بروز سویه‌های غلبه‌کننده بر مقاومت به PVY، امکان استفاده از منابع طبیعی مقاومت در توتون را محدود کرده است (Chen *et al.*, 2010; Lacroix *et al.*, 2010). علاوه بر این، نبود امکان شکستن هم‌بستگی منفی بین ژن مقاومت به نماتود ریشهٔ گرهی (*Rk*) و حساسیت به سویه‌های خاصی از PVY (Sudarsono *et al.*, 1995) و روند بسیار زمان‌بر مورد نیاز برای تلاقی و تلاقی‌های برگشتی (Fatima *et al.*, 2008) از جمله محدودیت‌های اصلی برای استفاده از روش‌های سنتی اصلاحی است. بنابراین، به‌کارگیری روش‌های جایگزین ایجاد مقاومت به PVY در توتون ضروری به نظر می‌رسد (Sudarsono *et al.*, 1995).

به‌کارگیری مقاومت مشتق‌شده از بیمارگر (PDR، pathogen derived resistance) یکی از روش‌های قدرتمند برای ایجاد مقاومت به بیماری در گیاهان است و فناوری‌های موجود امکان تغییر ژنتیکی گیاهان با ژن‌های کدکنندهٔ مقاومت در برابر ویروس را فراهم آورده‌اند (Simon-Mateo & Garcia, 2011; Chen et al., 2010). از مدت‌ها پیش، از حفاظت تقاطعی به‌صورت تجاری برای کاهش خسارت ویروس‌های گیاهی استفاده می‌شد (Powell-Abel *et al.*, 1986; Latorre & Flores, 1985). مطالعات اولیه نشان داد که بیان برخی ژن‌های ویروسی در گیاهان تراژن (transgenic) نیز ممکن است باعث مقاومت در برابر ویروس شود و در نتیجه نیازی به ایجاد آلودگی با ویروس کامل نخواهد بود (Powell-Abel *et al.*, 1986; Beachy, 1990). بررسی‌های بعدی مشخص کرد که ارتباطی بین سطح پروتئین ویروسی بیان‌شده در گیاه تراژن و میزان حفاظت در برابر ویروس وجود ندارد (Stark & Beachy, 1989; Lawson *et al.*, 1990) و وجود نسخه‌های غیر قابل ترجمهٔ Coat protein (CP) نیز منجر به مقاومت می‌شود (Zhu *et al.*, 2004; van der Vlugt *et al.*, 1992). نقش مکانیسم‌های با واسطهٔ آران‌ای، که توسط مکانیسمی مشابه بازدارندگی توأم (co-suppression) (Lindbo *et al.*, 1993) رخ می‌دهند، در بیشتر پدیده‌های PDR تأیید شده است (Simon-Mateo & Garcia, 2011; van der Vlugt *et al.*, 1992). آزمایش‌های Waterhouse *et al.* (1998) برای اولین بار با موفقیت نشان دادند که مولکول‌های dsRNA محرک قوی خاموشی آران‌ای به‌شمار می‌روند (Bhaskar & Jiang, 2010; Waterhouse *et al.*, 1998). تراژن‌سازی توتون و سیب‌زمینی توسط آران‌ای سنجاق‌سری خودمکمل (self-complementary hairpin RNA) موجب مقاومت نسبت به PVY شده (Smith *et al.*, 2000; Mitter *et al.*, 2001; Missiou *et al.*, 2004; Mitter *et al.*, 2003) و سازه‌های مبتنی بر ژن‌های مختلف PVY نیز نتایج مشابهی نشان داده‌اند (Chen *et al.*, 2010). همچنین بیان‌گذرای (transient expression) آران‌ای سنجاق سری توسط *A. tumefaciens* منجر به مقاومت در برابر انتقال PVY توسط شته (Vargas *et al.*, 2008) می‌شود.

گزارش‌هایی وجود دارند که نشان می‌دهند گیاهان تراژن تنها در برابر سویه‌های خاصی از ویروس مقاوم بوده‌اند (Pourrahim *et al.*, 2006; Bau *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2005)، در حالی که معمولاً در طبیعت سویه‌های مختلفی وجود دارند. با توجه به این که مقاومت گیاه تراژن در برابر طیف گسترده‌ای از سویه‌های ویروس مدنظر بیش از مقاومت در برابر سویه‌های خاص مورد قبول خواهد بود، هدف این پژوهش تولید گیاهان توتون تراژنی بود که در برابر طیف متنوعی از جدایه‌های ایرانی و خارجی PVY از سویه‌های مختلف این ویروس مقاوم باشند.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های ویروسی

در این پژوهش، ۱۲ جدایه PVY از جمله چهار جدایهٔ ایرانی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱) که از بین آنها PV-1055 به عنوان جدایهٔ اصلی در اغلب آزمایش‌ها به‌کار گرفته شد. در طول تحقیق، نمونه‌های ویروسی در گیاه *Nicotiana clevelandii* A. Gray در گلخانه با دمای ۲۴-۲۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری شده و هر چهار هفته با تلقیح مکانیکی به گیاهان جوان منتقل شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. مشخصات ۱۲ جدایهٔ ویروس وای سیب‌زمینی (PVY) مورد استفاده در پژوهش حاضر

جدایه	رس‌شمار	سویه	میزبان اولیه	کشور
PV-0321	KP063202	N	*Solanum tuberosum* cv. Amigo	آلمان
PV-0343	KP063203	O	*Solanum tuberosum* cv. Christa	آلمان
PV-0403	KP063204	NTN	*Solanum tuberosum*	مجارستان
PV-0410	KP063205	NTN	*Solanum tuberosum* cv. Nicola	آلمان
PV-0446	KP063206	NTN	*Solanum lycopersicum*	آلمان
PV-0722	KP063207	C1	pepper (chilli pepper)	ایتالیا
PV-0890	KP063208	C1	pepper	ایران
PV-0893	KP063209	C2	*Solanum tuberosum*	آلمان
PV-1031	KP063210	NW	*Solanum tuberosum* cv. Quarta	آلمان
PV-1055	KP063211	C1	*Nicotiana tabacum* (Coker 347*PVH19)	ایران (تیرتاش)
PV-1056	KP063212	NTN	*Solanum tuberosum* cv. Marfona	ایران (فیروزکوه)
PV-1057	KP063213	O	*Nicotiana tabacum* cv. Basma Serres	ایران (ارومیه)

تهیهٔ سازهٔ سنجاق‌سری برای مقاومت به PVY

یک قطعه حدود ۱۷۵۳ جفت‌بازی از انتهای '۳ ژنوم جدایهٔ PVY PV-1055 و ۱۱ جدایهٔ دیگر PVY تکثیر، همسانه‌سازی و تعیین توالی گردید. به این منظور، استخراج آران‌ای کل از گیاهان آلوده، سنتز دی‌ان‌ای مکمل و سپس PCR با استفاده از جفت آغازگرهای PV2I-T7 و PV1-SP6 (Mackenzie *et al.*, 1998) (توالی‌ها در جدول ۲) صورت گرفت و محصولات PCR در داخل حامل pDrive همسانه‌سازی شد. همسانهٔ نوترکیب حاوی این محصول PCR از PV-1055، HK50 نامیده شد. هم‌ردیف‌سازی چندگانهٔ توالی قطعهٔ تکثیرشده از ۱۲ جدایهٔ PVY مذکور با استفاده از ابزار AlignX در نرم‌افزار Vector NTI 11.5 انجام گرفت و یک قطعه ۴۷۲ جفت‌بازی از ژنوم PVY PV-1055 متشکل از ۳۷۹ جفت‌باز از ژن CP و ۹۳ جفت‌باز از '3 UTR برای تهیهٔ سازهٔ سنجاق‌سری انتخاب شد. با استفاده از HK50 به عنوان DNA الگو و جفت آغازگر HK50-Mluf و HK50-Stuc که بر مبنای توالی جدایه PV-1055 و توسط نرم‌افزار Vector NTI 11.5 طراحی شدند (توالی‌ها در جدول ۲)، دو مکان برشی برای آنزیم‌های MluI و StuI به‌ترتیب به دو انتهای '۵ و '۳ این قطعه ۴۷۲ جفت‌بازی افزوده شدند و محصول PCR (HK50MluStu به طول ۴۸۸ باز) مجدداً در pDrive قرار داده شد.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده. در زیر نوکلئوتیدهای مربوط به مکان برشی آنزیم‌های Mluf و Stuc در توالی آغازگرها خط کشیده شده است.

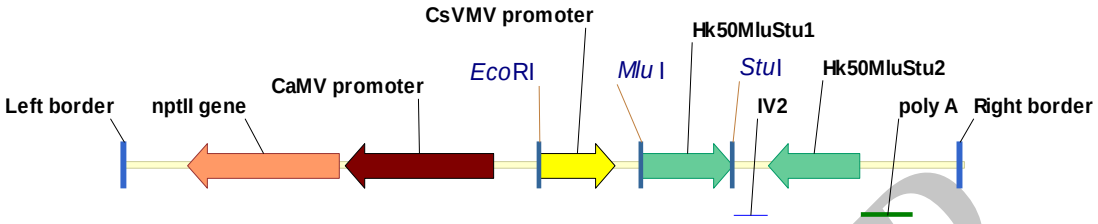
آغازگر	توالی نوکلئوتیدی	دمای ذوب
PV1-SP6	GATTTAGGTGACACTATAGAATTTTTTTTTTTTTTV	۶۰
PV2I-T7	TAATACGACTCACTATAGGGNAAYAAYAGYGGNCAR	۶۵
HK50-Mluf	GTACGCGTTGAATACCCGTTGAA	۵۸
HK50-Stuc	TGAGGCCTATTATTAGTTGCAATAAAAGTAGTACAGG	۶۲
NPTII_loc	GCACGTACTCGGATGGAAGCC	۵۸
NPTII_ups	TCGCCGCCAAGCTCTTCAGC	۶۲

با هضم آنزیمی، قطعهٔ محدود به مکان برشی MluI و StuI از pDrive جدا و به حامل pING71-IV2 الحاق گردید. pING71-IV2 یک حامل دوتایی (binary vector) تراژن‌سازی گیاهی است که مبتنی بر pCAMBIA 2300 (با شمارهٔ دسترسی AF234315 در GenBank) بوده و دارای یک پروموتر قوی از ویروس *Cassava vein mosaic virus* و اینترون IV2 (۱۷۸ جفت‌باز) سیب‌زمینی (Vancanneyt *et al.*, 1990) است. در این حامل، ژن

Archive of SID

www.SID.ir

مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین (*nptII*، نئومایسین فسفوترانسفراز) به عنوان نشانگر انتخابی برای غربال سلول‌های تراژن گیاهی وجود دارد. ناقل حاصل با هضم آنزیمی توسط SmaI و AscI خطی گردید و مجدداً نسخه‌ای از HK50MluStu، این بار در پایین دست اینترون IV2، قرار داده شد تا منجر به یک سازهٔ سنجاق‌سری (pHK1) شود (شکل ۱). صحت الحاق‌های انجام گرفته و نیز جهت آنها در حامل دوتایی نوترکیب توسط هضم آنزیمی و توالی‌یابی بررسی شد و سپس با روش الکتروپوریشن به *A. tumefaciens* LBA4404 انتقال داده شد.



شکل ۱. نقشهٔ سازهٔ سنجاق‌سری در حد فاصل نواحی مرزی LB و RB به طول ۴۴۲۳ باز

تراژن‌سازی توتون

تراژن‌سازی توتون بر اساس دستورالعمل آزمایشگاه دکتر یورگ لندزمن انستیتو جولیوس کوهن آلمان انجام گرفت. به این صورت که کشت باکتریایی به‌دست آمده از یک تک کلنی سویهٔ *A. tumefaciens* LBA4404 حاوی حامل دوتایی واجد سازهٔ سنجاق‌سری (pHK1)، دو بار پشت سر هم و هر بار به مدت ۴۸ ساعت در ۲۸ درجهٔ سلسیوس در محیط کشت عصارهٔ مخمر (yeast extract medium) (Wise *et al.*, 2006) حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، سولفات استرپتومایسین (۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کانامایسین (۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت شد. از این کشت برای تلقیح دو لولهٔ فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط جامد مخمر- مانیتول (yeast-mannitol) (Wise *et al.*, 2006) استفاده شد. بعد از ۴۸ ساعت نگهداری در ۲۸ درجهٔ سلسیوس، سلول‌های باکتریایی به درون محلول تلقیح (MS9+200µM acetosyringone) شسته شدند. محلول MS9با اضافه کردن ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر IAA و یک میکروگرم در میلی‌لیتر BAP به محلول MS (حاوی ویتامین‌ها و ۲٪ ساکارز) تهیه شد. میزان جذب نوری سوسپانسیون باکتریایی در ۶۰۰ نانومتر بین ۰/۳ تا ۰/۴ تنظیم شد.

از برگ‌های توتون رقم Wisconsin 38 (W38 یا Havana 38) قطعاتی به اندازهٔ حدود یک سانتی‌متر مربع جدا و به مدت نیم ساعت در سوسپانسیون باکتریایی قرار داده شدند. جداکشت‌ها (explants) به آرامی با سطح کاغذ سترون تماس داده شدند تا رطوبت اضافی سطح آنها برطرف گردد. سپس روی محیط هم‌کشتی (MS9 حاوی 200µM acetosyringone که با فیتوآگار (Phytoagar) به میزان ۷/۵ گرم بر لیتر جامد شده بود) قرار گرفته و به مدت ۴۸ ساعت در ۲۶ درجهٔ سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. جداکشت‌ها در محلول MS9 حاوی آنتی‌بیوتیک ticarcillin (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای ۵-۱۰ دقیقه شست‌وشو داده شده، به آرامی خشک شده و به محیط کشت انتخابی باززایی (regeneration) (MS9 حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ticarcillin) منتقل شدند و سپس در اتاقک رشد با دمای ۲۴ درجهٔ سلسیوس با چرخهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. حدوداً یک بار در هفته تجدید کشت روی همین محیط انجام گرفت و غلظت ticarcillin به‌تدریج به ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش داده شد. بعد از ۴-۵ هفته، شاخساره‌های در حال ظهور از کالوس‌های مستقل بریده شدند و به محیط انتخابی ریشه‌زایی (MS حاوی ساکاروز ۲٪+ ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین) انتقال یافتند. پس از ریشه‌زایی، محیط کشت به‌طور کامل از ریشه‌ها شسته شده و گیاهان در گلدان‌های حاوی پیت ماس کاشته شدند و به‌صورت تدریجی با شرایط گلخانه سازگار شدند. برای اطمینان از صحت مراحل آزمایش، تعدادی ریزنمونه که توسط آگروباکتریوم آلوده نشده بودند نیز روی

Archive of SID

www.SID.ir

هر دو نوع محیط غیرانتخابی و انتخابی قرار داده شدند. تراژن‌سازی جداگانه‌ای نیز با حامل دوتایی خالی (pING71-IV2) انجام گرفت.

تأیید تراژن‌سازی

برای تأیید تراژن‌سازی از روش‌های RT-PCR و لکه‌گذاری سادرن (Southern-blot) استفاده شد. نسخه‌برداری ژن *nptII* در گیاهانی که از تراژن‌سازی با pHK1 و نیز ناقل خالی به‌دست آمده بودند توسط RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *nptII* بررسی گردید. به این منظور، پس از استخراج آران‌ای و سنتز cDNA، برای تکثیر یک قطعه از ژن *nptII* با استفاده از جفت آغازگر NPTII_loc و NPTII_ups (جدول۲) PCR انجام گرفت و سپس نمونه‌ها روی ژل آگارز دو درصد بررسی شدند.

در آزمون لکه‌گذاری سادرن به منظور تأیید حضور ژن *nptII* در DNA گیاهان تراژن، جداسازی DNA از بافت گیاهی با استفاده از محلول DNAzol ES (ساخت MRC Inc.، آمریکا) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. دی‌ان‌ای گیاهی پس از هضم با آنزیم EcoRI روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید و پس از واسرشت‌سازی مطابق روش سمبروک و راسل به غشای نایلونی (Amersham Hybond-NX، آلمان) انتقال یافت (Sambrook & Russell, 2001). از کاوشگر (probe) اختصاصی نشان‌دارشده با دیگوکسیژنین (digoxigenin) که با استفاده از کیت PCR DIG probe synthesis kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) و طبق توصیهٔ شرکت سازنده تهیه شده بود، برای دورگه‌سازی (hybridization) استفاده شد. کاوشگر نشان‌دارشده با دیگوکسیژنین با استفاده از CDP-Star (Roche) طبق توصیهٔ شرکت سازنده، ردیابی و در معرض فیلم اشعهٔ ایکس رؤیت گردید.

ارزیابی مقاومت در گیاهان T0

از تراژن‌سازی با سازهٔ سنجاق‌سری (pHK1) در مجموع ۷۲ گیاه و از تراژن‌سازی توسط حامل دوتایی خالی (pING71-IV2)، ۲۱ گیاه به‌دست آمد. همهٔ این گیاهان T0 در گلخانه با جدایهٔ PVY PV-1055 به روش مکانیکی مایه‌زنی شدند تا مقاومت به ویروس در آنها ارزیابی شود. علاوه بر گیاهان تراژن مذکور، مایه‌زنی گیاهان تیپ وحشی (wild type) برای مقایسه انجام گرفت و گیاهان مایه‌زنی‌شده از نظر بروز علائم، تحت ارزیابی قرار گرفتند. از همهٔ این گیاهان نمونه‌هایی تهیه شده و توسط پادتن چندهمسانه‌ای PVY (AS 0137/403، DSMZ آلمان) با استفاده از آزمون DAS-ELISA طبق روش کلارک و آدامز (۱۹۷۷) آزمایش شدند. گیاهان فاقد علائم با نتایج منفی در آزمون الایزا (نمونه‌هایی که میانگین جذب نوری به‌اضافهٔ سه برابر انحراف معیار در آنها نسبت به شاهد سالم پایین‌تر بود) به عنوان مقاوم در نظر گرفته شدند. گل‌آذین این گیاهان (پس از حذف گل‌های بازشده) پاکت‌زنی گردید و بذر آنها برای آزمایش مقاومت در نتاج جمع‌آوری شد.

آزمایش‌های ارزیابی مقاومت در نتاج

برای ضدعفونی سطحی، بذور توتون زیر جریان ملایم شیر آب به مدت ۲۰ دقیقه شست‌وشو داده شد و پس از ۲۰ ثانیه غوطه‌وری در اتانول ۷۰ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۳٪ هیپوکلریت سدیم+۰/۱٪ توییین ۲۰ قرارگرفتند و سپس پنج بار با آب سترون شست‌وشو داده شدند. برای تعیین میزان جوانه‌زنی، بذور ضدعفونی سطحی شده روی محیط MS قرار داده شدند و برای تعیین درصد بذرهای تراژن و انتخاب گیاهان تراژن برای آزمون‌های بعدی مقاومت در برابر ویروس، بذرها روی محیط MS انتخابی حاوی ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین قرار داده شدند (Guerineau, 1995; Martin *et al.*, 2001). بذرهای تیپ وحشی توتون رقم W38 نیز به‌عنوان شاهد روی همین محیط‌ها قرار داده شدند. بوته‌های نسل T1 حاصل از تراژن‌سازی با سازهٔ سنجاق‌سری (pHK1) که به کانامایسین مقاوم بودند همان‌گونه که در بالا اشاره شد، از محیط کشت به گلخانه انتقال یافتند و در آزمایش‌های بعدی به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمایش توارث مقاومت به PVY در گیاهان نسل T1

از میان توتون‌های تراژن‌شده با سازهٔ سنجاق‌سری pHK1 که در نسل T0 به PVY مقاوم بودند، ۹ لاین انتخاب شد و گیاهان نسل T1 به‌دست‌آمده از رشد بذرهای آن‌ها (روی محیط انتخابی) از نظر مقاومت در برابر PVY PV-1055 آزمایش شدند. به این منظور

Archive of SID

www.SID.ir

حداقل ۲۰ بوته از هر لاین تحت مایه‌زنی قرار گرفتند. این گیاهان از نظر بروز علائم ارزیابی شدند و حدود دو هفته پس از مایه‌زنی، نمونه‌هایی از آنها با آزمون DAS-ELISA آزمایش شدند.

آزمایش مقاومت در برابر سویه‌های مختلف PVY

برای این آزمایش، یک لاین توتون تراژن (316T1، حاصل تراژن‌سازی با سازهٔ سنجاق‌سری) که بوته‌های متعددی از آن در آزمایش قبلی به جدایهٔ PV-1055 مقاومت نشان داده بودند، انتخاب گردید. بوته‌های نسل T1 به‌دست‌آمده از این لاین با ۱۲ جدایهٔ ویروس PVY شامل چهار جدایهٔ ایرانی و هشت جدایه از کشورهای آلمان، ایتالیا و مجارستان (به نمایندگی از اغلب سویه‌های مهم PVY) مایه‌زنی شدند (جدول ۱). هر جدایه PVY به شش بوتهٔ مختلف لاین 316T1 و سه بوتهٔ تیپ وحشی تلقیح شد. همچنین ۱۰ بوته از لاین 349T1 نیز با جدایهٔ ایرانی PV-1056 مایه‌زنی شدند. بوته‌های به‌دست‌آمده از بذرهای تراژن و بوته‌های تیپ وحشی با آزمون داس الایزا تحت آزمایش قرار گرفتند. همچنین از بوته‌های به‌دست‌آمده از بذرهای تراژن که با جدایه‌های مختلف PVY مایه‌زنی شده بودند، سه بوته به ازای هر جدایه انتخاب شده و با روش RT-PCR و توسط جفت آغازگرهای PV2I-T7 و PV1-SP6 از نظر وجود آلودگی به PVY آزمایش شدند.

نتایج و بحث

صحت سازهٔ سنجاق‌سری بر اساس نتایج توالی‌یابی نوکلئوتیدی و نیز انطباق نتایج برش‌های آنزیمی با نقشهٔ ژنتیکی حامل تأیید شد. طول قطعهٔ به‌کار گرفته‌شده از ژنوم ویروس (۴۷۲ باز) برای تهیهٔ این سازه نسبت به قطعات ۶۰۵ و ۷۳۵ جفت بازی مورد استفاده در برخی تحقیقات قبلی (Mitter *et al.*, 2001; Missiou *et al.*, 2004) بسیار کمتر است که آن را می‌توان به عنوان یک مزیت در نظر گرفت. میزان یکسانی نوکلئوتیدی این قطعه از PVY PV-1055 با ۱۱ نمونه PVY دیگر بین ۹۱/۵ تا ۹۷٪ (میانگین ۹۴/۲٪) برای کل ۴۷۲ جفت‌باز و ۹۲/۶ تا ۹۶/۸٪ (میانگین ۹۴/۸٪) در بخش ۳۷۹ جفت‌بازی از CP بود (جدول ۳). حفاظت‌شدگی ناحیهٔ انتخاب‌شده برای تهیهٔ سازهٔ سنجاق‌سری در کارایی سازه علیه سویه‌های مختلف ویروس بسیار اهمیت دارد.

جدول ۳. علائم جدایه‌های PVY به‌کار رفته روی توتون رقم W38 و درصد یکسانی نوکلئوتیدی هر جدایه با بخشی از ژنوم جدایه PVY PV-1055 که در سازهٔ سنجاق‌سری به‌کار رفته است.

جدایه	سویه	علائم [الف]	درصد یکسانی نوکلئوتیدی با قطعهٔ ۴۷۲ بازی [ب]	درصد یکسانی نوکلئوتیدی با قطعهٔ ۳۷۹ بازی [ج]
PV-0321	N	VC, VB	۹۱/۵	۹۲/۶
PV-0343	O	VC, VB	۹۴/۹	۹۵/۸
PV-0403	NTN	MN, VN, VB	۹۳/۲	۹۳/۷
PV-0410	NTN	MN, VN, VB	۹۳/۲	۹۳/۷
PV-0446	NTN	MN, VN, VB	۹۳/۲	۹۳/۷
PV-0722	nnp	VC	۹۴/۹	۹۵/۵
PV-0890	C1	VC, VB	۹۷	۹۶/۸
PV-0893	C2	VB	۹۶/۶	۹۶/۶
PV-1031	NW	MN, VC	۹۴/۷	۹۵/۸
PV-1055	C1	VC, VB	۱۰۰	۱۰۰
PV-1056	NTN	VB, CS	۹۳/۲	۹۳/۷
PV-1057	O	VC, VB	۹۴/۳	۹۵

الف) علائم روی توتون رقم W38 (تیپ وحشی) شامل VC: روشنی رگبرگ، VB: رگبرگ نواری، VN: بافت مردگی رگبرگ، MN: بافت مردگی دِمار (رگبرگ اصلی)، CS: لکهٔ سبزرد

ب و ج) به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ درصد یکسانی نوکلئوتیدی توالی این جدایه‌ها با کل ناحیهٔ ۴۷۲ جفت‌بازی (شامل بخش‌هایی از CP و 3'UTR)، یا فقط ناحیهٔ ۳۷۹ جفت‌بازی مربوط به بخشی از CP از ژنوم جدایه PVY PV-1055 است که در سازهٔ سنجاق‌سری به‌کار رفته است.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *nptII*، وجود یک باند حدود ۲۷۵ جفت بازی را در نمونه‌های گیاهان تراژن نشان داد که تأییدی بر حضور و نسخه‌برداری ژن *nptII* در این گیاهان است. استفاده از کاوشگر اختصاصی *nptII* در آزمون لکه‌گذاری سادرن با نمونه‌های دی‌ان‌ای لاین 316T1 که با آنزیم EcoRI هضم شده بودند نیز وجود یک باند را نشان داد. با توجه به اینکه در سازهٔ به‌کاررفته نیز یک جایگاه برشی برای آنزیم EcoRI (در خارج از محل اتصال کاوشگر) وجود دارد (شکل)، می‌توان نتیجه گرفت که این گیاهان یک نسخه از تراژن را دریافت کرده‌اند.

ارزیابی گیاهان T0 حاصل از تراژن‌سازی

در آزمایش‌های انجام‌گرفته در این پژوهش، تمامی بوته‌های تیپ وحشی که با جدایهٔ PVY PV-1055 مایه‌زنی شده بودند، علائم مشخصهٔ آلودگی به PVY، شامل روشنی رگبرگ و رگبرگ نواری را نشان دادند و آلودگی آنها توسط آزمون داس الایزا نیز تأیید شد. از مجموع ۷۲ بوتهٔ T0 حاصل از تراژن‌سازی توتون رقم W38 با سازهٔ سنجاق‌سری (pHK1) که به گلخانه منتقل شده و با جدایهٔ PVY PV-1055 مایه‌زنی شده بودند، ۴۴ بوته (۶۱ درصد) بدون علامت بودند و در آزمون داس الایزا نیز سالم تشخیص داده شدند.

Pourrahim *et al.* (2006)، با آزمایش ۳۱ لاین تراژن T0 در برابر سه جدایهٔ ایرانی PVY مشاهده کردند که به‌ترتیب ۴ و ۵ لاین در برابر دو جدایهٔ زه PVYn-H و PVYn-Mz مقاوم بودند، اما هیچ لاین مقاومی در برابر سویهٔ معمولی PVYo-Ar وجود نداشت. بنابراین نسبت گیاهان T0 مصون از آلودگی که در پژوهش حاضر به‌دست آمدند (۶۱ درصد) در مقایسه با گزارش Pourrahim *et al.* (2006) که حداکثر حدود ۱۶ درصد بوده، بسیار بالاتر است که این نتیجه به احتمال زیاد به علت به‌کارگیری دو نسخه از توالی ویروسی به‌صورت سازهٔ سنجاق‌سری (به‌جای یک نسخه به‌صورت خطی) بوده است. گزارش‌های موجود نشان داده‌اند که سازه‌های سنجاق‌سری با تشکیل آران‌ای دو رشته‌ای محرکی قوی برای خاموشی ژن به‌شمار می‌روند (Bhaskar & Jiang, 2010; Waterhouse *et al.*, 1998). ۲۸ بوته دیگر (۳۹ درصد) دارای علائم مشخصهٔ PVY بوده و آزمون داس الایزا نیز وجود آلودگی را در آنها تأیید کرد. بوته‌های آلوده از نظر زمان بروز علائم، شدت علائم و نتایج داس الایزا تفاوتی با گیاهان تیپ وحشی (غیرتراژن) نداشتند. این نتایج نشان می‌دهند که در این بررسی فقط دو نوع واکنش مصونیت و حساسیت مشاهده شد. به این صورت که گیاهان T0 تحت بررسی یا مقاومت نشان دادند، یا همانند گیاهان تیپ وحشی آلوده شدند. بنابراین حد واسطی مانند تحمل (به‌صورت کاهش شدت علائم یا تأخیر در بروز علائم) که در برخی تحقیقات قبلی گزارش گردیده است (Schubert *et al.*, 2005; Kavosipour *et al.*, 2012; Pourrahim *et al.*, 2006) مشاهده نشد.

همهٔ ۲۱ بوتهٔ به‌دست‌آمده از تراژن‌سازی توسط ناقل خالی (pING71-IV2) دارای علائم PVY و پاسخ مثبت در آزمون داس الایزا بودند و هیچ‌گونه تفاوتی با گیاهان تیپ وحشی نشان ندادند. این نتیجه قابل انتظار بود و با گزارش‌های قبلی از تراژن‌سازی با ناقل خالی (از جمله (Kavosipour *et al.*, 2012)) نیز مطابقت داشت؛ چرا که سازهٔ به‌کاررفته در این تراژن‌سازی فقط حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و اینترون IV2 بوده است.

بذرهای جمع‌آوری‌شده از گیاهان T0 و نیز بذرهای تیپ وحشی روی محیط MS غیرانتخابی دارای جوانه‌زنی مطلوبی بوده (بالای ۹۰ درصد) و گیاهچه‌های حاصل به‌خوبی رشد کردند. هر دو نوع بذر مذکور روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین نیز قادر به جوانه‌زنی بودند، اما بذرهای تیپ وحشی پس از جوانه‌زنی قادر به توسعهٔ ریشه نبودند (شکل) و حدود ۱۴ روز پس از کاشت کاملاً زرد شدند. حدود ۷۵ درصد از بذرهای جمع‌آوری‌شده از گیاهان T0 که روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین جوانه زدند، توانستند به‌خوبی ریشه‌زایی و رشد کنند. این گیاهان پس از رشد کافی برای آزمایش‌های بعدی به گلخانه منتقل شدند.

در آزمایش بررسی توارث مقاومت به PVY در گیاهان نسل T1 حاصل از تراژن‌سازی با سازهٔ سنجاق‌سری، همهٔ گیاهان T1 از نُه لاین مذکور که با جدایهٔ PVY PV-1055 مایه‌زنی شده بودند، فاقد هر نوع

Archive of SID

www.SID.ir

علائم ویروسی بودند و نبود آلودگی در آنها توسط آزمون داس الایزا نیز تأیید شد (جدول ۴). بنابراین مقاومت اعطاشده توسط سازهٔ سنجاق‌سری با موفقیت از بوته‌های والد (T0) این لاین‌ها به گیاهان نسل بعد منتقل شده بود. این گیاهان از بین حدود ۷۵ درصد از نتاج هر لاین و نه همهٔ آنها انتخاب شده بودند، چرا که در مرحلهٔ کشت بذرها، با کمک فشار آنتی‌بیوتیک یک غربال اولیه صورت گرفته بود تا بذرهای فاقد تراژن حذف گردند. در نتیجه، درصد بذرهای حاوی ژن مقاومت به PVY در هر یک از این لاین‌ها نیز حدود ۷۵ درصد خواهد بود.

شکل ۲. کشت بذرهای جمع‌آوری‌شده از گیاهان T0 حاصل از تراژن‌سازی توتون رقم W38 با سازهٔ سنجاق‌سری (راست) و بذرهای تیپ وحشی همین رقم (چپ) روی محیط MS انتخابی حاوی ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین

جدول ۴. نتایج بررسی توارث مقاومت به PVY در گیاهان نسل T1 از نُه لاین حاصل از تراژن‌سازی با سازهٔ سنجاق‌سری

لاین	گیاهان مایه‌زنی‌شده	گیاهان فاقد علائم
301T1	۲۵	۲۵
303T1	۲۰	۲۰
306T1	۲۱	۲۱
307T1	۲۶	۲۶
308T1	۲۱	۲۱
310T1	۲۲	۲۲
311T1	۲۲	۲۲
316T1	۲۲	۲۲
349T1	۵۵	۵۵
تیپ وحشی	۱۰	۰

در آزمایش پایداری مقاومت در برابر سویه‌های مختلف PVY، همهٔ گیاهان تیپ وحشی که با ۱۲ جدایهٔ PVY مایه‌زنی شده بودند، علائم مختلف آلودگی به PVY را نشان دادند (جدول ۳). این علائم بسته به جدایهٔ ویروس از رگبرگ نواری تا بافت‌مردگی شدید دِمار (رگبرگ اصلی) متغیر بودند. در گیاهانی که دارای نکروز شدید دمار بودند، تغییر شکل برگ و اختلال در رشد نیز ایجاد گردید (شکل ۳).

در هیچ‌یک از بوته‌های نسل T1 لاین 316 (حاصل تراژن‌سازی با سازهٔ سنجاق‌سری) که با ۱۲ جدایهٔ ویروس PVY مایه‌زنی شده بودند علائمی دیده نشد. همچنین ۱۰ بوته لاین 349T1 که با جدایهٔ PV-1056 مایه‌زنی شده بودند، هیچ علائمی نشان ندادند. در آزمون داس الایزا نیز این گیاهان سالم تشخیص داده شدند. در روش RT-PCR، یک باند حدود ۱۷۵۰ جفت‌بازی در نمونه‌های آلودهٔ تیپ وحشی مشاهده شد، ولی نمونه‌های لاین‌های تراژن 316 و 349 به مانند نمونه‌های شاهد منفی (بدون مایه‌زنی با ویروس) فاقد این باند بودند. بنابراین مقاومت در برابر ۱۲ جدایه PVY پایدار بود. در خصوص گیاهان تراژن مقاوم به PVY مواردی از عدم مصونیت در مقابل برخی جدایه‌ها گزارش شده است (Schubert *et al.*, 2005; Pourrahim *et al.*, 2006)، ولی در این تحقیق با وجود استفاده از جدایه‌های متنوع PVY که از سویه‌های رایج این ویروس بودند، چنین موردی دیده نشد. این موضوع نشان‌دهندهٔ کارایی بالای سازهٔ به‌کاررفته برای تراژن‌سازی است.

Archive of SID

www.SID.ir

الف ب ج

شکل ۳. برخی علائم آلودگی به PVY. الف) کاهش رشد و نکروز شدید دِمار (رگبرگ اصلی) در سه بوتهٔ تیپ وحشی توتون رقم W38 (ردیف پایین) در مقایسه با بوته‌های تراژن‌شده با سازهٔ سنجاق‌سری (ردیف بالا) که بدون علائم‌اند. ب) نمای نزدیک یک بوتهٔ تیپ وحشی توتون رقم W38 دارای ز شدید دِمار. ج) علائم رگبرگ نواری.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق گیاهان توتون تراژنی به‌دست آمدند که به PVY مقاوم بودند و نسل بعدی آنها نیز به طور کامل در برابر جدایه‌های مختلف PVY (از انواع سویه‌های رایج این ویروس و از کشورهای مختلف) مصونیت داشتند. در آزمون‌های مختلف این تحقیق در مجموع بیش از ۳۰۰ بوته نسل T1 از لاین‌های مختلف حاصل از تراژن‌سازی با سازهٔ سنجاق‌سری با جدایه‌های مختلف PVY مایه‌زنی شدند و مصونیت آن‌ها با روش‌های مختلف تأیید گردید. این مطالعه اولین گزارش از توتون تراژن مصون در مقابل چندین جدایهٔ PVY ایرانی و خارجی است.

هرچند گزارشی از کشت تجاری یک گیاه تراژن مقاوم به PVY یافت نشد، بررسی‌ها در این زمینه جریان دارند (Bravo-Almonacid *et al.*, 2012) و همانند بسیاری از گیاهان تراژن دیگر که به‌صورت گسترده در جهان کشت می‌شوند (Gray *et al.*, 2013)، ممکن است به زودی گیاهان توتون تراژن مقاوم به PVY نیز به‌صورت تجاری کشت شده و به عنوان راهکاری برای حل مشکلات کشاورزان در نظر گرفته شوند. البته این امر مستلزم طی مراحل متعدد و از جمله بررسی جنبه‌های مختلف ایمنی‌زیستی است. دربارهٔ گیاه توتون خصوصاً تیپ‌های گرمخانه‌ای و بارلی این مزیت وجود دارد که کشاورزان اقدام به گل‌زنی می‌نمایند و علاوه بر این، به احتمال زیاد با روش‌های اصلاحی موجود می‌توان مقاومت تراژن به PVY (یا دیگر بیمارگرها) را در ارقام توتون نر عقیم تلفیق کرد و به این ترتیب یکی از نگرانی‌های مرتبط با گیاهان تراژن را که انتشار دانه‌های گرده است تا حدی مرتفع کرد. همچنین روش‌هایی برای حذف ژن‌های نشانگر انتخابی (مانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک) وجود دارند که به‌کارگیری آنها می‌تواند به رفع نگرانی‌ها در این زمینه کمک کند.

REFERENCES

1. Abedi, H. (1998). Appearance of PVY in tobacco fields of Iran (Regions of Mazandaran and Gorgaan). In: *Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco (CORESTA) Congress*, 11-15 Oct., Brighton, England, CORESTA, p. 146.
2. Bau, H. J., Cheng, Y. H., Yu, T. A., Yang, J. S. & Yeh, S. D. (2003). Broad-spectrum resistance to different geographic strains of *Papaya ringspot virus* in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology*, 93 (1), 112-120.
3. Beachy, R. N. (1990). Coat protein mediated resistance in transgenic plants. In: T. P. Pirone and J. G. Shaw (Eds), *Viral Genes and Plant Pathogenesis.* (Pp. 13-22). New York: Springer.
4. Bhaskar, P. B. & Jiang, J. (2010). Silencing as a tool for transgenic crop improvement. In: C. Kole, C. H. Michler, A. G. Abbott and T. C. Hall (Eds), *Transgenic Crop Plants: Principles and Development.* (Pp. 187-199). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
5. Bravo-Almonacid, F., Rudoy, V., Welin, B., Segretin, M. E., Bedogni, M. C., Stolowicz, F., Criscuolo, M., Foti, M., Gomez, M., Lopez, M., Serino, G., Cabral, S., Dos Santos, C., Huarte, M. & Mentaberry, A. (2012). Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina. *Transgenic Research*, 21 (5), 967-982.

Archive of SID

www.SID.ir

6. Chen, X. M., Liu, J., Xu, L., Jiang, F., Xie, X. Y., Zhu, C. X. & Wen, F. J. (2010). Inhibiting virus infection by RNA interference of the eight functional genes of the *Potato Virus Y* genome. *Journal of Phytopathology*, 158 (11-12), 776-784.
7. FAO. (2011). FAOSTAT-Agriculture, Production Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Databases.
8. Fatima, T., Rivera-Dom´ınguez, M., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hern´andez, M. ı.-E., Handa, A. K. & Mattoo, A. K. (2008). Tomato. In: C. Kole and T. C. Hall (Eds), *Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Vegetable Crops.* (Pp. 1-45). Blackwell Publishing Ltd.
9. Gray, S., Whitworth, J., Xu, H. & Singh, R. (2013). The current state (2012) of Potato virus Y (PVY) affecting potato grown in North America. In *North American Plant Protection Organization (NAPPO) Science and Technology Documents*.
10. Guerineau, F. (1995). Tools for expressing foreign genes in plants. In: H. Jones (Ed), *Plant Gene Transfer and Expresssion Protocols.* (Pp. 1-32). Totowa, NJ: Humana Press Inc.
11. Hull, R. (2009). *Comparative Plant Virology* (2nd). Academic Press.
12. Kavosipour, S., Niazi, A., Izadpanah, K., Afsharifar, A. & Yasaie, M. (2012). Induction of resistance to *Cucumber mosaic virus* (CMV) using hairpin construct of *2b* gene. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48 (2), 65-67. (In Farsi).
13. Lacroix, C., Glais, L., Kerlan, C., Verrier, J. L. & Jacquot, E. (2010). Biological characterization of French P*otato virus Y* (PVY) isolates collected from PVY-susceptible or -resistant tobacco plants possessing the recessive resistance gene va. *Plant Pathology*, 59 (6), 1133-1143.
14. Latorre, B. A. & Flores, V. (1985). Strain identification and cross-protection of Potato Virus Y affecting tobacco in Chile. *Plant Disease*, 69 (11), 930-932.
15. Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P. & Tumer, N. E. (1990). Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Biotechnology (N Y)*, 8 (2), 127-134.
16. Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L. & Dougherty, W. G. (1993). Pathogen derived resistance to potyviruses: working, but why? *Seminars in Virology*, 4 (6), 369-379.
17. Mackenzie, A. M., Nolan, M., Wei, K. J., Clements, M. A., Gowanlock, D., Wallace, B. J. & Gibbs, A. J. (1998). Ceratobium mosaic potyvirus: another virus from orchids. *Archives of Virology*, 143 (5), 903-914.
18. Martin, R. C., Mok, D. W. S., Smets, R., Van Onckelen, H. A. & Mok, M. C. (2001). Development of transgenic tobacco harboring a zeatin O-glucosyltransferase gene from *Phaseolus*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37 (3), 354-360.
19. Missiou, A., Kalantidis, K., Boutla, A., Tzortzakaki, S., Tabler, M. & Tsagris, M. (2004). Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Molecular Breeding*, 14 (2), 185-197.
20. Mitter, N., Sulistyowati, E. & Dietzgen, R. G. (2003). *Cucumber mosaic virus* Infection Transiently Breaks dsRNA-Induced Transgenic Immunity to *Potato virus Y* in Tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16 (10), 936-944.
21. Mitter, N., Sulistyowati, E., Graham, M. W. & Dietzgen, R. G. (2001). Suppression of gene silencing: a threat to virus-resistant transgenic plants? *Trends in Plant Science*, 6 (6), 246-247.
22. Pourrahim, R., Ahounmanesh, A., Hashemi, H., Zeynali, S. & Farzadfar, S. H. (2006). Assessment of virus resistance in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Samsun lines against three Iranian isolates of potato virus Y. *Applied Entomology and Phytopathology*, 73 (2), 17-38. (In Farsi).
23. Powell-Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. & Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232 (4751), 738-743.
24. Raccah, B. (1986). Nonpersistent viruses: epidemiology and control. *Advances in Virus Research*, 31, 387-429.
25. Raccah, B. & Fereres, A. (2009). Plant virus transmission by insects. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd.
26. Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd). New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
27. Schubert, J., Matoušek, J. & Supp, P. (2005). Stability of pathogen-derived *Potato virus Y* resistance in potato under field conditions and some aspects of their ecological impact. In: J. H. H. Wesseler (Ed), *Environmental Costs and Benefits of Transgenic Crops.* (Pp. 63-78).
28. Simon-Mateo, C. & Garcia, J. A. (2011). Antiviral strategies in plants based on RNA silencing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1809 (11-12), 722-731.
29. Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G. & Waterhouse, P. M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407 (6802), 319-320.

Archive of SID

www.SID.ir

30. Stark, D. M. & Beachy, R. N. (1989). Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. *Nature Biotechnology*, 7 (12), 1257-1262.
31. Sudarsono, J., Woloshuk, S., Parry, D., Hellmann, G., Wernsman, E., Lommel, S. & Weissinger, A. (1995). Transgenic burley and flue-cured tobacco with resistance to four necrotic isolates of potato virus Y. *Phytopathology*, 85, 1493-1506.
32. van der Vlugt, R. A., Ruiter, R. K. & Goldbach, R. (1992). Evidence for sense RNA-mediated protection to PVY^N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Molecular Biology*, 20 (4), 631-639.
33. Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. & Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, 220 (2), 245-250.
34. Vargas, M., Martinez-Garcia, B., Diaz-Ruiz, J. R. & Tenllado, F. (2008). Transient expression of homologous hairpin RNA interferes with PVY transmission by aphids. *Virology Journal*, 5.
35. Waterhouse, P. M., Graham, M. W. & Wang, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (23), 13959-13964.
36. Wise, A. A., Liu, Z. & Binns, A. N. (2006). Culture and maintenance of *Agrobacterium* strains. *Methods in Molecular Biology*, 343, 3-13.
37. Zhu, J., Zhu, X., Wen, F., Bai, Q., Zhu, C. & Song, Y. (2004). Effect of cDNA fragments in different length derived from potato virus Y coat protein gene on the induction of RNA-mediated virus resistance. *Science in China series C Life Sciences*, 47 (4), 382-388.

Archive of SID

www.SID.ir