مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۵، شماره ۴، سال ۱۳۸۸

# ارزیابی مقاومت کلون‌های امیدبخش سیب زمینی در برابر ویروس‌های PVX، PVY و PVA در گلخانه

# Evaluation of Resistance of Potato Promising Clones to PVX, PVY and PVA in Greenhouse

رحیم احمدوند[۱] و حسن حسن‌آبادی[۱]

۱ - مربی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

**تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۲/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱/۲۰**

## چکیده

**احمدوند، ر.، و حسن‌آبادی، ح. ۱۳۸۸** ارزیابی مقاومت کلون‌های امیدبخش سیب زمینی در برابر ویروس‌های PVX، PVY و PVA در گلخانه. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۵:** ۵۳۱ - ۵۱۷.

**در این تحقیق مقاومت شانزده کلون امیدبخش سیب‌زمینی نسبت به ویروس‌های PVX ، PVY و PVA در قالب سه آزمایش جداگانه در شرایط گلخانه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا با استفاده از آزمون DAS-ELISA هر یک از کلون‌ها نسبت به ویروس‌های PVX ، PVY ، PVA ، PVM ، PLRV و PVS مورد بررسی قرار گرفتند و کلون‌هایی که آلودگی به یک یا چند ویروس داشتند با به کارگیری روش الکتروتراپی عاری از ویروس شدند و به صورت تک گره روی محیط MS تکثیر شدند. گیاهچه‌ها را پس از یک ماه در گلخانه کاشته و مینی‌تیوبرهای حاصل به عنوان ماده آزمایشی استفاده شدند. دو هفته پس از برداشت غده‌چه‌های هر یک از کلون‌ها گیاهچه‌ها با عصاره توتون آلوده به هر یک از ویروس‌ها به طور جداگانه مایه‌زنی و واکنش آن‌ها پس از یک ماه با آزمون DAS- ELISA بررسی شد. نتایج نشان داد که بین کلون‌ها از نظر میزان مقاومت در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشته و اختلاف بین گیاهچه‌ها معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین میزان جذب کلون‌های آزمایشی در آزمون الایزا نشان داد که کلون‌های ۱-۳۹۷۰۱۵ و ۱۳-۱۹۷۰۱۵ نسبت به هر سه ویروس مقاوم و کلون ۲-۳۹۷۰۰۸ نسبت به هر سه ویروس حساس بودند. سایر کلون‌های مورد بررسی نسبت به یک یا دو ویروس مقاوم و یا حساس بودند.**

**واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، کلون‌های امیدبخش، ویروس‌های PVX ، PVY و PVA ، مقاومت، آزمایش گلخانه‌ای.**

نویسنده مسئول: ahmadvand2000@yahoo.com



Archive of SID
www.SID.ir

**مقدمه**

گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) از گیاهان بومی نیم کره غربی و از کوه‌های آند در بولیوی یا پرو منشاء گرفته است (Khajehpour, 1994). سیب‌زمینی در حدود دو قرن پیش وارد ایران شده و هم اکنون در مناطق مختلف کشور کشت می‌شود. بر اساس آمارنامه کشاورزی در سال۱۳۸۴-۱۳۸۳ سطح زیر کشت این محصول در ایران ۱۸۹/۶۷۱ هزار هکتار با تولید ۴۸۳۰/۱۲ هزار تن و عملکرد ۲۵۷۶۳ کیلوگرم در هکتار بود (Anonymous, 2005).

به دلیل این‌که سیب‌زمینی به صورت غیر جنسی تکثیر می‌شود، آلودگی‌های ویروسی از نسلی به نسل دیگر منتقل شده و در یک محصول بذری با درصد آلودگی پایین طی چند سال کشت متوالی درصد آلودگی افزایش یافته و عملکرد آن شدیداً کاهش می‌یابد که به این حالت اضمحلال یا دژنراسیون بذر (Seed Degeneration ) گفته می‌شود.

تاکنون بیش از ۲۵ نوع بیماری ویروسی از سیب‌زمینی گزارش شده که برخی از آن‌ها اهمیت اقتصادی داشته و در هر منطقه تعدادی از آن‌ها خسارت بالایی به این محصول وارد می‌کنند. خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی بسته به نوع ویروس، رقم سیب‌زمینی و شرایط محیطی از ۱۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است (de Bokx and Van der Want, 1987).

ویروس X سیب زمینی Potato virus X (PVX) از گروه ویروس‌های رشته‌ای با یک پیکره است. PVX دارای گسترش جهانی بوده و شایع‌ترین ویروس سیب‌زمینی است. میزان خسارت آن بسته به نژاد آن و رقم سیب‌زمینی از ۱۰ تا بیش از ۵۰ درصد گزارش شده است (Beemster and de Bokx, 1987).

این ویروس به صورت مکانیکی و از طریق غده‌های آلوده ارقام حساس انتقال می‌یابد.

براساس خصوصیات مختلف ویروس، نژادهای متفاوتی برای آن گزارش شده است. بر اساس روابط سرولوژیکی یعنی واکنش به آنتی بادی‌های پلی کلونال و یا آنتی بادی‌های مونوکلونال، چهار گروه شامل $PVX^{c}$، $PVX^{A}$، $PVX^{O}$ و $PVX^{HB}$ بر مبنای دمای غیر فعال شدن (Termal inactivation point) سه گروه و براساس واکنش ارقام سیب‌زمینی *S. tuberosum* با ژن‌های عامل ایجادکننده واکنش فوق حساسیت (*Nx* و *Nb*) و آل‌های مربوطه (nxNb، NxNb، Nxnb، nxnb) نیز چهار گروه X4، X3، X2 و X1 تشخیص داده شده است (Cockerham, 1958). نژاد $PVX_{3}$ شایع‌ترین نژاد این ویروس است. نژاد HB به هردو ژن *Nb* و *Nx* گیاه غلبه کرده و به راحتی در گیاه تکثیر می‌یابد و در گیاه محک گل تکمه‌ای لکه موضعی ایجاد نمی‌کند (Moriera *et al.*, 1980).

در ایران این ویروس از اکثر مناطق کشور



Archive of SID

www.SID.ir

گزارش شده و اخیراً گروهای نژادی ۱و۳ این ویروس از استان‌های خراسان و اردبیل گزارش شده است (Foroutani *et al.*, 2004).

ویروس Y سیب‌زمینی Potatovirus Y (PVY) گونه تیپ جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae* است. این ویروس به صورت رشته‌ای بوده و از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی است که گسترش جهانی دارد. میزان خسارت آن بسته به نژاد ویروس در آلودگی‌های اولیه ۱۵-۷۰ درصد و در آلودگی‌های ثانویه تا ۸۰ درصد گزارش شده است (de Bokx and Van der Wantt, 1987؛ Buchen-Osmond, 1987[1]). PVY به وسیله مایه‌زنی عصاره، پیوند و حداقل ۲۵ گونه شته به صورت ناپایا منتقل می‌شود. شته سبز هلو (*Myzus persicae*) مهم‌ترین ناقل آن است (Delago and Grogan, 1970[2]). مهم‌ترین گروه‌های نژادی شامل نژاد O (Potato virus $Y^o$) (نژاد معمولی)، نژاد C (نژاد رگه‌ای)، نژاد N (نکروز رگبرگ توتون) و نژاد NTN هستند.

در زمینه پراکنش ویروس PVY در کشور اطلاعات محدودی وجود دارد. اما فراوانی این ویروس در اصفهان، همدان، آذربایجان شرقی، اردبیل و خراسان به ترتیب ۵۷، ۳۲، ۱۵، ۳۸ و ۵۲ درصد برآورد شده است (Pourrahim, unpublished report, 2006).

ویروس A سیب‌زمینی Potato virus A(PVA) نیز متعلق به خانواده *Potyviridae* است که دارای پیکره رشته‌ای است. انتقال آن با شته به صورت ناپایا و مکانیکی است. این ویروس از اکثر مناطق کشت محصول سیب‌زمینی گزارش شده که ممکن است عملکرد را تا ۴۰٪ کاهش دهد (Bartels, 1971). PVA به وسیله هفت گونه شته از جمله شته سبز هلو به صورت ناپایا، به وسیله پیوند زدن و مایه زنی با عصاره گیاهی قابل انتقال است.

سه نوع مقاومت طبیعی در سیب‌زمینی نسبت به پوتی‌ویروس‌ها وجود دارد که شامل مقاومت بسیار بالا (Extreme Resistance :ER)، فوق حساسیت (Hypersensitive Resistance :HR) و مقاومت نسبت به انتقال ویروس‌ها است (Cockerham, 1970؛ Ross, 1986؛ Jones, 1990؛ Valkonen, 1994؛ Valkonen, 1997). مقاومت ER نسبت به PVA و PVY به ترتیب توسط ژن‌های $R_a$ و $R_y$ کنترل می‌شود. مقاومت نوع HR نسبت به پوتی‌ویروس‌ها به وسیله ژن‌های غالب کنترل می‌شود و حالت اختصاصی نژادی (Strain specific) داشته و به صورت واکنش نکروتیک موضعی در ارقام آلوده مشاهده می‌شود. مقاومت فوق حساسیت نسبت به ویروس‌های PVA و PVY به ترتیب به وسیله

1,2: www.http://biology.anu.edu.au.



Archive of SID

www.SID.ir

ژن‌های *Na* و *Nc* کنترل می‌شوند (Cockerham, 1970).

مقاومت به ویروس PVX به صورت فوق حساسیت (Hypersensitive)، مصونیت (Immune) و مقاومت نسبی (Relative Resistance) مشاهده شده است (Bonierbale *et al.*, 2005).

لوکوس $R_X$ در سیب‌زمینی مقاومت نوع ER را نسبت به ویروس PVX کنترل می‌کند.

واکنش فوق حساسیت در سیب‌زمینی نسبت به برخی از استرین‌های PVX توسط ژن‌های *Nx* و *Nb* کنترل می‌شود (Cockerham, 1970).

در اکثر برنامه‌های اصلاحی ارزیابی مقاومت غده‌ها نسبت به بیماری‌ها پس از نسل سوم غیر جنسی و یا نسل‌های پس از آن توسط مایه‌زنی مصنوعی انجام می‌شود و یا این که شانس آلودگی را در شرایط طبیعی تا جایی که امکان دارد بالا می‌برند (Plaisted *et al.*, 1984). روش مایه زنی توده‌ای (Mass inoculation) برای غربال کردن کلون‌های مقاوم به PVX و PVY به کار برده شد (Timian *et al.*, 1955 a, b). در یک مطالعه واکنش ۵۵ رقم طی سال‌های ۱۹۸۸-۱۹۸۰ نسبت به ویروس‌های PVY، PVX، PLRV، PVA، PVM و PVS در مزرعه و گلخانه بررسی و مشاهده شد که ارقام Pilica، Bzura، Bobr، Brda و San مقاومت بالایی نسبت به هر سه ویروس PVY، PVX و PVA داشتند، در حالی که رقم Dryf مقاومت بالایی تنها به PVX داشت و Stobrawa مقاومت بالایی به PVY نشان داد. ارقام Lotos، Irga و Perkos بیشترین مقاومت را به PLRV نشان دادند (Chrzanowska and Zagorska, 1988). سینگ و همکاران (Singh *et al.*, 1994) واکنش ۲۵۸ کلون سیب‌زمینی متعلق به ۶۹ گونه Solanum را نسبت به ویروس PVY در گلخانه بررسی و مشاهده کردند که گونه *S. stoloniferum* و کلون PI161171 نسبت به $PVY_N$ ایمن بودند. (Corsini *et al.*, 1994) ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی را با مقاومت بالا به صورت مقاومت ترکیبی نسبت به PVX، PVY و PLRV شناسایی کرده و آن‌ها را جهت به دست آوردن کلون‌های والد با مقاومت بالا کراس دادند. با مایه‌زنی در مزرعه میزان مقاومت را با توجه به تعداد غده‌های آلوده تعیین کردند.

در ایران هنوز گزارشی در مورد ارزیابی مقاومت سیب‌زمینی نسبت به ویروس‌های فوق وجود ندارد.

این تحقیق با توجه به اهمیت ویروس‌های یاد شده در ایران و همچنین لزوم بررسی واکنش کلون‌های امیدبخش در دست معرفی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### عاری سازی از ویروس و تکثیر کلون‌های امید بخش سیب‌زمینی

کلون‌های مورد بررسی که دارای صفات زراعی مطلوب بر اساس نتایج تحقیقات اولیه



Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب شده‌اند.

در فصل زراعی سال ۱۳۸۲ به منظور تکثیر اولیه کلون‌های امیدبخش مورد استفاده در آزمایش، آن‌ها در مزرعه کاشته شدند و پس از برداشت غده‌ها، توسط اسید جیبرلیک با غلظت $20 mgl^{-1}$ جوانه‌دار شدند. با استفاده از آنتی‌بادی‌های خریداری شده از شرکت Bioreba سوئیس در آزمون الایزا (DAS- ELISA) آلودگی هر یک از کلون‌ها نسبت به ویروس‌های PVY، PVX، PVA، PVM، PLRV و PVS بررسی شد. کلون‌هایی که نسبت به ویروس‌های مذکور آلودگی نداشتند، جهت تکثیر از طریق ریز ازدیادی انتخاب شدند. کلون‌های آلوده به ویروس نیز با استفاده از الکتروتراپی عاری از ویروس شدند. به منظور تکثیر، کلون‌ها به صورت تک گره (Single node) روی محیط کشت پایه MS کشت شده و پس از رشد کافی در اتاق رشد، به گلخانه منتقل و پس از حدود دو ماه ریزغده تولیدی برداشت شد (Pajoohandeh, 2000).

برای شناسایی بوته‌های آلوده به ویروس‌های مورد بررسی در تمامی مراحل آزمایش از آزمون الایزا استفاده شد. به منظور تفسیر نتایج آزمون الایزا (DAS- ELISA)، میانگین جذب(در طول موج ۴۰۵ نانومتر) شاهدهای منفی را محاسبه کرده و سه برابر آن به عنوان حد آلودگی در نظر گرفته شد.

گیاهچه‌هایی که میزان جذب نوری چاهک آن‌ها بالاتر از حد آلودگی بود به عنوان آلوده تلقی شدند.

**تهیه زادمایه ویروس‌های PVX، PVY و PVA**

برای تهیه زادمایه ویروس، از غده‌های سیب‌زمینی برداشت شده از مزرعه کرج و سایر مناطق کشت این محصول از جمله همدان، زنجان، مشهد و اردبیل تعدادی غده از بوته‌های مشکوک به آلودگی را انتخاب کرده و ضمن جوانه‌دار کردن با اسید جیبرلیک نسبت به ویروس‌های فوق با استفاده از DAS-ELISA آزمایش شدند و در فصل کاشت بوته‌های مشکوک به ویروس‌های PVX، PVY و PVA انتخاب و با آزمون الایزا بررسی شدند. غده‌هایی که تنها به یکی از ویروس‌های فوق آلودگی داشتند انتخاب و در گلخانه کاشته شدند. بوته‌های آلوده نیز از طریق کشت بافت تکثیر شدند. پس از رشد کافی هر یک از بوته‌های آلوده به ویروس‌های PVX، PVY و PVA با استفاده از بافر فسفات (PBS) با pH=۷/۴ به نسبت حجمی/ وزنی ۱:۱ از برگ هر یک از آن‌ها عصاره‌گیری و با استفاده از پودر کربوراندوم به ترتیب روی گیاهان محک گل تکمه‌ای (*Gompherena globosa*) و عروسک پشت‌پرده (*Physalis floridana*) و توتون (*Nicotiana tabaccum* c.v. *samsun*) به صورت مکانیکی مایه‌زنی شدند.

بوته‌های با علایم تیپیک آلودگی برای هر یک از ویروس‌ها انتخاب و ضمن عصاره‌گیری با استفاده از بافر فسفات PBS با pH=۷/۴



Archive of SID

www.SID.ir

جهت تکثیر روی گیـــاه توتون مایه زنـی شـدند. حدود سه هفته بعد که علائـم توسـعه یافـت، هـر یک از گیاهچه‌های توتون بـا اسـتفاده از آزمـون DAS-ELISA نـسبت بـه ویـروس‌هـای مـذکور آزمایش شدند و آلودگی آن‌ها بـه اثبـات رسـید. گیاهچـه توتـون‌هـای آلـوده در محـیط MS بـه صورت تک‌گره کشت بافت شده و جهت انجام مراحل ارزیابی نگهداری شدند.

**ارزیابی مقاومت به ویروس‌هـای PVX، PVY و PVA**

دراین تحقیق سه آزمایش جداگانه بـرای هـر یک از ویروس‌های PVX،PVY و PVA انجـام شـد. هـر سـه آزمـایش در قالـب طـرح کـاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانـه بـا دمـای ۲۵-۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بدین ترتیـب که در هر تکرار سه غده بـذری از هـر کلـون در داخل گلـدان‌هـای حـاوی خـاک، ماسـه و پیـت مـوس بـه نـسبت‌هـای ۱:۱: ۲ کاشـته شـد. در هـر آزمایش حدود سه هفته بعد از کشت بوتـه‌هـا بـه صورت مکانیکی توسط هر یک از ویروس‌هـای PVX، PVY و PVA به طور جداگانه مایـه‌زنـی شدند. برای تهیه زادمایه، عـصـاره بـرگ‌هـــای گیاه آلوده به ویروس‌های فوق در هاون چینی در بـافر فـسفات تهیـه و سوسپانـسیونی بـه نـسبت وزنی/حجمی۱:۱ تهیه شد. برگ‌های کلـون‌هـای آزمایـــشی بـــا پـــودر کربورانـــدوم ۶۰۰mesh غبارپاشی شد و با مالش دادن ۳-۲ برگچه از هـر گیـاه بـا پارچـه ملمـل آغـشته بـه سوسپانـسیون، مایه‌زنی انجام شد. برای اطمینـان ۴۸ سـاعت بعـد مجدداً مایه‌زنـی تکـرار شـد. در هـر آزمـایش دو تیمار به عنـوان شـاهد در نظـر گرفتـه شـد. یکـی شاهد منفی که بـه جـای عـصاره ویـروس از بـافر فسفات برای مایه‌زنی رقم حساس اسـتفاده شـد و دیگری تیمار شاهد حساس بـود کـه بـرای PVX از رقـــم Kennebec و بـــرای PVY از رقـــم Shepody استفاده شد.

حـدود ۲۵ روز بعـد از مایـه‌زنـی و یـا بعـد از ظهور علائم روی گیاه شاهد حساس، بـا اسـتفاده از آزمون DAS-ELISA میزان جذب هر یک از گیاهچه‌ها یادداشت شد.

به دلیل زیاد بـودن تعـداد گیاهچـه‌هـا در هـر آزمایش، از چند تشتک الایزا استفاده شد. برای یکنواخت کردن میـزان جـذب تـشتک‌هـای هـر آزمـایش، از شـاهد منفـی اسـتفاده شـد (در هـر تشتک عصاره گیاه سالم در سه چاهک به عنوان شاهد منفی اضافه شد). پس از یکنواخت کـردن (Adjust) جذب همـه تـشتک‌هـای الایـزا، حـد کلـی آلـودگی بـا اسـتفاده از میـانگین کلـی شاهدهای منفی محاسبه شـد (سـه برابـر میـانگین شاهد منفی). داده‌های حاصل از آزمون الایزا در هر سـه آزمـایش بـا اسـتفاده از نـرم افـزار SAS مـورد تجزیـه و تحلیـل آمـاری قـرار گرفتـه و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD انجام شد.

**نتایج و بحث**

**ارزیابی مقاومت کلون‌ها نسبت ویروس PVY**

بـا توجـه بـه ایـن کـه متوسـط کـل جـذب



Archive of SID

www.SID.ir

شاهدهای منفی تشتک‌های الایزا به میزان ۰/۱۵۵ بود، بنابراین گیاهچه‌هایی که بیش از سه برابر متوسط جذب شاهد منفی بود (۰/۴۶۵) به عنوان گیاهچه آلوده (حساس) در نظر گرفته شدند.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به ارزیابی کلون‌های مورد بررسی نشان داد که بین میزان مقاومت کلون‌های در سطح ۱٪ اختلاف معنی وجود دارد (جدول ۱).

با مقایسه میانگین میزان جذب نوری با طول موج ۴۰۵ نانومتر در آزمون الایزا برای هر یک از کلون‌ها مشخص شد که کلون ۲-۳۹۷۰۳۱ بیشترین میزان جذب (۲/۶۹۵) را داشته و با شاهد حساس در یک گروه قرار گرفت (جدول ۲). کلون ۱- ۳۹۷۰۱۵ با کمترین جذب (۰/۱۷۳) در گروه مقاوم‌ها قرار گرفت. بر اساس داده‌های جدول ۲ کلون‌های امیدبخش با شماره‌های ۲-۳۹۷۰۳۱، ۲-۹۷۰۰۸ ، ۱۵-۳۹۶۱۵۱ ، ۸-۳۹۶۱۵۱ و ۱۴-۳۹۷۰۰۷ به عنوان حساس به ویروس PVY در نظر گرفته شدند. سایر کلون‌ها شامل ۸-۳۹۷۰۰۹، ۳-۳۹۷۰۰۸ ، ۱۱-۳۹۷۰۰۷، ۲-۳۹۶۱۵۱ ، ۲-۳۹۷۰۱۵ ، ۶-۳۹۷۰۰۹ ، ۱۳-۳۹۷۰۱۵ ، ۳-۳۹۷۰۰۹ ، ۹-۳۹۷۰۰۷ ، ۱-۳۹۷۰۹۷ و ۱-۳۹۷۰۱۵ مقاوم به این ویروس بودند. به منظور بررسی نوع مقاومت کلون‌های مقاوم (فوق حساسیت یا مقاومت بسیار بالا) عصاره برگ آن‌ها روی توتون مایه‌زنی شد. اما متأسفانه به دلیل شرایط نامناسب گلخانه علیرغم این که آزمایش دو بار تکرار شد، نتایج قابل اعتماد نبود.

**رزیابی مقاومت کلون‌های امیدبخش نسبت به ویروس PVX**

در این آزمایش، متوسط کل جذب شاهدهای منفی تشتک‌های الایزا ۰/۱۳۴ بود که سه برابر آن(۰/۳۰۲) به عنوان حد آلودگی در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین میزان جذب نوری عصاره کلونهای مورد بررسی در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. (جدول ۳). با مقایسه میانگین میزان جذب نوری با طول موج ۴۰۵ نانومتر در آزمون الایزا برای هر یک از کلونها مشخص شد که رقم Kennebec (شاهد) با میانگین جذب ۲/۴۱۳ بیشترین جذب را داشته و کلون‌های ۳-۳۹۷۰۰۸ و ۲-۳۹۷۰۳۱ به ترتیب با میانگین جذب ۱/۳۴۴ و ۱/۲۹۲ در گروه حساس قرار گرفتند. از طرفی کلون ۱-۳۹۷۰۹۷ با میانگین جذب ۰/۰۸۷ کمترین میزان را داشت و به همراه کلون‌های ۳-۳۹۷۰۰۹، ۸-۳۹۶۱۵۱، ۱۳-۳۹۷۰۱۵، ۲-۳۹۶۱۵۱ و ۱-۳۹۷۰۱۵ در گروه مقاوم‌ها قرار گرفتند(جدول ۴).

کلون‌های ۳۹۶۱۵۱، ۱۳-۳۹۷۰۱۵، ۲-۳۹۶۱۵۱، ۱-۳۹۷۰۱۵ و ۱-۳۹۷۰۹۷ نیز مقاوم و کلون‌های ۳-۳۹۷۰۰۸، ۲-۳۹۷۰۳۱، ۸-۳۹۷۰۰۹، ۱۱-۳۹۷۰۰۷، ۲-۳۹۷۰۰۸، ۲-۳۹۷۰۱۵، ۶-۳۹۷۰۰۹ و ۹-۳۹۷۰۰۷



Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تجزیه واریانس واکنش (OD) کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی نسبت به ویروس PVY

Table 1. Analysis of variance for response of potato promising clones to PVY

| S. O. V. | منابع تغییرات | درجه آزادی df. | میانگین مربعات MS |
|---|---|---|---|
| Clone | کلون | 16 | 5.9660** |
| Clone(replication) | کلون( تکرار) | 34 | 0.4901 |
| Sample | گیاهچه | 102 | 0.0057 |
| C.V. | ضریب تغییرات | 11.12 | |

**: Significant at 1% probability level

** : در سطحاحتمال ۱٪ معنی دار است

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان جذب نوری با طول موج ۴۰۵ نانومتر هر یک از کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی در آزمون الایزا نسبت به ویروس PVY

Table 2. Mean comparison of absorbance (in 405 nm) of promising clones of potato to PVY in ELISA test

| شماره کلون Clone No. | کد کلون Clone Code | جذب Absorbance | واکنش Response |
|---|---|---|---|
| 397031-2 | 27 | 2.690a | S |
| Susceptible check | 101 | 2.510a | S |
| 397008-2 | 28 | 1.406b | S |
| 396151-15 | 17 | 1.060b | S |
| 396151-8 | 20 | 0.903bc | S |
| 397007-14 | 5 | 0.800bcd | S |
| 397009-8 | 18 | 0.293cd | R |
| 397008-3 | 7 | 0.260cd | R |
| 396151-2 | 19 | 0.212d | R |
| 397007-11 | 6 | 0.203d | R |
| 397015-2 | 12 | 0.197d | R |
| 397015-13 | 13 | 0.187d | R |
| 397009-3 | 3 | 0.181d | R |
| 397007-9 | 34 | 0.180d | R |
| 397009-6 | 25 | 0.175 D | R |
| 397015-1 | 10 | 0.172 D | R |
| 397097-1 | 4 | 0.165 D | R |

میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون **LSD** در سطح احتمال ۱٪ هستند.

**Means with similar letters are not significantly different at 1 % probability level (LSD).**
**S: Susceptible R: Resistant**



Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- تجزیه واریانس واکنش (OD) کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی نسبت به ویروسPVX

Table 3. Analysis of variance for response of potato promising clones to PVX

| S. O. V. | منابع تغییرات | درجه آزادی df. | میانگین مربعات MS |
|---|---|---|---|
| Clone | کلون | 16 | 3.6041** |
| Clone(replication) | کلون( تکرار) | 34 | 0.3237 |
| Sample | گیاهچه | 102 | 0.0153 |
| C.V. | ضریب تغییرات | 18.33 | |

**: Significant at 1% probability level.

** : در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است.

جدول ۴- مقایسه میانگین میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی در آزمون الایزا نسبت به ویروس PVX

Table 4. Mean comparison of absorbance (in 405 nm) of promising clones of potato to PVX in ELISA test

| شماره کلون Clone No. | کد کلون Clone Code | جذب* Absorbance | واکنش Response |
|---|---|---|---|
| Susceptible check | 101 | 2.413a | S |
| 397008-3 | 7 | 1.344b | S |
| 397031-2 | 27 | 1.292b | S |
| 397009-8 | 18 | 1.018bc | S |
| 397007-11 | 6 | 0.927bc | S |
| 397008-2 | 28 | 0.902bc | S |
| 397015-2 | 12 | 0.848bc | S |
| 397009-6 | 25 | 0.842bc | S |
| 397007-9 | 34 | 0.730cd | S |
| 396151-15 | 17 | 0.222de | R |
| 397007-14 | 5 | 0.195de | R |
| 397009-3 | 3 | 0.150e | R |
| 396151-8 | 20 | 0.146e | R |
| 397015-13 | 13 | 0.137e | R |
| 396151-2 | 19 | 0.128e | R |
| 397015-1 | 10 | 0.092e | R |
| 397097-1 | 4 | 0.87e | R |

میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون **LSD** در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Means with similar letters are not significantly different at 1 % probability level (LSD).
S: Susceptible R: Resistant



Archive of SID

www.SID.ir

حساس ارزیابی شدند. در بین کلون‌های حساس کلون ۹-۳۹۷۰۰۷ کمترین میانگین جذب را داشت که احتمالاً در شرایط مزرعه‌ای نسبت به سایر کلون‌ها مقاوم‌تر خواهد بود.

**ارزیابی مقاومت کلون‌های امیدبخش نسبت به ویروس PVA**

با توجه به این که متوسط جذب شاهدهای منفی در این آزمایش، ۰/۰۸۴ بود، سه برابر این میزان یعنی ۰/۲۵۲ حد آلودگی تلقی شد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به واکنش کلون‌های امیدبخش نسبت به PVA نیز نشان داد که بین کلون‌های آزمایشی در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۵).

با مقایسه میانگین جذب هر یک از کلون‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر در آزمون الایزا مشخص شد که کلون ۲-۳۹۶۱۵۱ با میزان جذب ۲/۳۴۳ حساس‌ترین کلون و کلون‌های ۲-۳۹۷۰۰۸ و ۸-۳۹۶۱۵۱ به ترتیب با میزان جذب ۰/۹۹۹ و ۰/۳۸۴ در رده‌های بعدی بودند.

سایر کلون‌ها شامل ۱۴-۳۹۷۰۰۷، ۸-۳۹۷۰۰۹، ۶-۳۹۷۰۰۹، ۱-۳۹۷۰۱۵ ۱۳-۳۹۷۰۱۵، ۹-۳۹۷۰۰۷،۲-۳۹۷۰۱۵ و ۱۵-۳۹۶۱۵۱ نیز به عنوان مقاوم به ویروس PVA در شرایط گلخانه ارزیابی شدند (جدول ۶).

جدول ۷ نیز واکنش هر یک از کلون‌های مورد بررسی را نسبت به ویروس‌های PVX، PVY و PVA را نشان می‌دهد.

دوسی و همکاران (Dusi *et al.*, 2001) برای ارزیابی مقاومت دو کلون ترنسژنیک حاصل از رقم Achat نسبت به ویروس PVY در شرایط گلخانه‌ای، غده‌های عاری از ویروس این دو کلون را در قالب یک طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با پنج تکرار کاشته و یک ساقه از هر گلدان باقی گذاشتند. سه هفته بعد از کاشت، برگ‌های بالایی گیاهان توسط عصاره توتون آلوده به ویروس مایه‌زنی شد و داده‌های حاصل از جذب در ۴۰۵ نانومتر تجزیه واریانس شد. روش بررسی دوسی و همکاران با روش بررسی در این تحقیق مطابقت دارد، به علاوه در این تحقیق به منظور کاهش خطای آزمایش در هر تکرار سه گیاهچه در نظر گرفته شد. تاکاکس و همکاران (Takacs *et al.*, 1999) مقاومت هشت گونه وحشی سیب‌زمینی را نسبت به ویروس $PVY^C$ در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی کردند. آن‌ها گونه‌های مورد بررسی را با ویروس به صورت مکانیکی مایه‌زنی کرده و سه هفته بعد با انجام آزمون DAS- ELISA و مایه‌زنی روی گیاه محک آلودگی آن‌ها را بررسی کرده و گونه‌هایی که در آزمون الایزا منفی بودند به عنوان مقاوم تلقی کردند. بارکر (Barker, 1996) در تحقیقی ارقام Barbara و Pirola با ژن *Ry* (عامل مقاومت Extreme Resistance) نسبت به همه نژادهای



Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- تجزیه واریانس واکنش (OD) کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی نسبت به ویروسPVA

Table 5. Analysis of variance for response of potato promising clones to PVA

| S. O. V. | منابع تغییرات | درجه آزادی df . | میانگین مربعات MS |
|---|---|---|---|
| Clone | کلون | 12 | 7.2576** |
| Clone(replication) | کلون( تکرار) | 26 | 0.7332 |
| Sample | گیاهچه | 84 | 0.0166 |
| C.V. | ضریب تغییرات | 15.92 | |

** : در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است.

**: Significant at 1% probability level.

جدول ۶- مقایسه میانگین میزان جذب نوری با طول موج ۴۰۵ نانومتر کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی در آزمون الایزا نسبت به ویروس PVA

Table 6. Mean comparison of absorbance (in 405 nm) of promising clones of potato to PVA in ELISA

| شماره کلون Clone No. | کد کلون Clone Code | جذب Absorbance | واکنش Response |
|---|---|---|---|
| 396151-2 | 19 | 2.344a | S |
| 397008-2 | 28 | 2.331a | S |
| 397097-1 | 4 | 1.921a | S |
| 397009-3 | 3 | 0.993b | S |
| 396151-8 | 20 | 0.384bc | S |
| 397007-14 | 5 | 0.251bc | S |
| 397009-8 | 18 | 0.165c | R |
| 397009-6 | 25 | 0.154c | R |
| 397015-1 | 10 | 0.097c | R |
| 397015-13 | 13 | 0.095c | R |
| 397007-9 | 34 | 0.092c | R |
| 397015-2 | 12 | 0.092c | R |
| 396151-15 | 17 | 0.080c | R |

میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Means with similar letters are not significantly different at 1 % brpbability level (LSD).

S: Susceptible R: Resistant



Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۷- واکنش کلون‌های امیدبخش نسبت به ویروس‌های PVX، PVY و PVA

Table 7. Reaction of promising clones of potato to PVX, PVY and PVA

| Clone no. شماره کلون | واکنش Reaction | | |
|---|---|---|---|
| | PVX | PVY | PVA |
| 397009-3 | R | R | S |
| 397097-1 | R | R | S |
| 397007-14 | R | S | R |
| 397007-11 | S | R | - |
| 397008-3 | S | R | - |
| 397015-1 | R | R | R |
| 397015-2 | S | R | R |
| 397015-13 | R | R | R |
| 396151-15 | R | S | R |
| 397009-8 | S | R | R |
| 3966151-2 | R | R | S |
| 396151-8 | R | S | S |
| 397009-6 | S | R | R |
| 397031-2 | S | S | - |
| 397008-2 | S | S | S |
| 397007-9 | S | R | R |

R: Resistance مقاوم S: Susceptible حساس

PVY و ویروس PVA) را با ارقام حساس تلاقی داد. وراثت این فنوتیپ در نتاج آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل از تفرق برای مقاومت به PVY و PVA در نتاج Pirola دقیقاً در یک مدل ژنتیکی قرار گرفت که نشان می‌داد ژن ER نسبت به PVA و PVY توسط یک لوکوس کنترل می‌شود. اگر چه احتمال می‌رود که در کنترل این مقاومت دو ژن دخالت داشته و هر ژن یک ویروس را کنترل کند ولی پیوستگی نزدیکی با هم داشته و با هم وارد گیاه می‌شوند. از طرفی داده‌های حاصل از تفرق رقم Barbara دقیقاً در مدل ژنتیکی دیگری قرار گرفت که نشان‌دهنده وجود دو ژن مستقل یکی ژن کنترل‌کننده ER نسبت به PVA و PVY و دیگری ژن کنترل‌کننده ER نسبت به PVA بوده که مقاومت نسبت به PVY را کنترل نمی‌کند. با توجه به

داده‌های حاصل از بررسی کلون‌ها احتمال می‌رود که کلون‌های ۱-۳۹۷۰۱۵، ۲-۳۹۷۰۱۵، ۱۳-۳۹۷۰۱۵ ، ۸-۳۹۷۰۰۹ ، ۶-۳۹۷۰۰۹ و ۹-۳۹۷۰۰۷ در مدل ژنتیکی اول و کلون ۱۴-۳۹۷۰۰۷ در مدل ژنتیکی دوم قرار گیرند، یعنی این کلون دارای مقاومت ER نسبت به PVA است ولی مقاومت به PVY ندارد.

با توجه به این که واکنش مقاومت فوق حساسیت (Hypersensitive Resistance)



Archive of SID

www.SID.ir

نسبت به ویروس‌های PVA و PVY در دمای پایین بروز می‌کند (Valkonen et al., 1998؛ Hamalainen et al., 2000). لذا عدم ظهور لکه‌های نکروز فوق حساسیت در گیاهچه‌های توتون ایندکس شده ممکن است به دلیل بالا بودن دمای گلخانه بوده باشد که در این شرایط تفکیک مقاومت ER از فوق حساسیت امکان‌پذیر نبوده است.

**References**


Anonymous 2005. **Agricultural Statistics of Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture. Tehran, Iran (in Farsi).**

**Barker, H. 1996.** Inheritance of resistance to PVY and PVA in progeny obtained from potato cultivars controlling gene *Ry*: evidence for a new gene for extreme resistance to PVA. Theoretical and Applied Genetics 93: 710-716.

**Bartels, R. 1971.** Potato Virus A. Descriptions of Plant Viruses. No.54. CMI/ABB, UK.

**Beemster, A. B. R., and de Bokxs, J. A. 1987.** Survey of properties and symptoms. pp. 84-113. In: de Boks, J. A., and Van der Want, J. P. H. (ed.) Viruses of Potato and Seed Potato Production, Second ed. Production. PUDOC, Wageningen, Neltherlands..

**Bonierbale, M., Haan, S., and Forbes, E. 2005.** Procedures for standard evaluation triales of advanced potato clones. CIP. Peru. 66pp.

**Chrzanowska, M., and Zagorska, H. 1988.** Reaction to viruses in potato varieties on the national list in 1988. Purcifull, J. (ed.) Handbook of Plantvirus. Infections and Comparative Diagnosis. Kurstak Amsterdam: Elsevier/ North- Holland.

**Cockerham, G. 1958.** Experimental breeding in relation to virus resistance. Proceedings of the Third Conference on Potato Virus Disease, Lisse-Wageningen. pp.199-203.

**Cockerham, G. 1970.** Genetical studies on resistance to potato PVX and Y Heredity 25: 309-348.

**Corsini, D., Pavek, J., Martin, M., and Brown, C. 1994.** Potato germplasm with combined resistance to leaf roll virus and viruses X and Y. American Potato Journal 71: 377-385.




Archive of SID

www.SID.ir

**De Bokx, J. A., and Van der Want, J. P. H. 1987.** Viruses of Potato and Seed Potato Production, Second ed. Production. PUDOC, Wageningen, Netherlands, 259pp.

**Delgado, S., and Grogan, R., G. 1970.** Potato virus Y. Description of Plant Viruses. CMI/ABB, UK.

**Dusi, A. N., Carvalo, C., Torres, A. C., and Avila, A. C. 2001.** Resistance levels to two strains of potato virus Y in transgenic potatoes cv. Achat. Horticultura Brasileira 19: 384-350.

**Forootani, S., Jafarpour, B., Falahati Rastegar, M., and Beigzadeh, N. 2004.** Identification of races 1 and 3 of PVX in Khorasan and Ardebil Provinces. Proceedings of the 16th. Iranian Plant Protection Congress,Vol. II. Plant Diseases. Tabriz University, Tabriz, Iran. page 222 (in Farsi).

**Hamalainen, H. J., Kekarainen, T., Christaine, G., Watanabe, K. N., and Valkonen, J. P. T. 2000.** Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of PVA in diploid potatoes. Molecular Plant Microbe Interaction 13: 402-412.

**Jones, R. A. C. 1990.** Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. Annals of Applied Biologh 117: 93-105.

**Khajehpour, M. 1994.** Producing of Industrial Plants. Jihad-e-Daneshgahi,. Industrial University of Isfahan, Iran. 251 pp. (in Farsi).

**Moriera, A., Jones, R. A. C., and Fibourg, C. E. 1980.** Properties of a resistance-breaking strain of potato virus X. Annals of Applied Biology 95: 93- 105.

**Pajoohandeh, M. 2001.** Producing a Bank of Viroliferous *In vitro* Potato Germplasm . MSc. Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. 174pp. (in Farsi).

**Plaisted, R. L., Thurston, H. D., Brodie, B. B., and Hoopes, R. W. 1984.** Selecting for resistances to disease in early generations. American Potato Journal 61: 395-403.

**Ross, H. 1986.** Potato breeding- problems and perspectives. Advances in Plant Breeding. Supplemented 13. Journal of Plant Breeding, Verlang . Paul. Parey. Berlin.



Archive of SID

www.SID.ir

**Singh, M., Singh, R. P., and Somerville, T. H. 1994.** Evaluation of tuber bearing solanum species for symptomology, as diagnostic hosts and source of immunity to potato virus Y necrotic strain. American Potato Journal 71: 567-579.

**Takacs, A. P., Horvath, J., Kaziczi, G., and Pribek, D. 1999.** Solanum specieses as new resistance sources of C strain of Potato Y Potyvirus. Proceedings of the 51st International Symposium on Crop Protection. Gent, Belgium, May 1999, Part II – Mededeligen.

**Timian, R. G., Hooker, W. J., and Peterson, C. E. 1955a.** Immunity to virus x in potatoes. studies of segregating seedling populations. Phytopathology 45: 445-450.

**Timian, R. G., Peterson, C. E., and Hooker, W. J. 1955b.** Immunity to virus x in potato: selective of immune plants in a breeding program. American Potato Journal 32: 411-417.

**Valkonen, J. P. T. 1994.** Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.). Plant Breeding 112: 1-16.

**Valkonen, J. P. T. 1997.** Novel resistance to potyviruses in tuber bearing potato species, and temperature sensitive expression of hypersensitive resistance to potato virus Y. Annals of Applied Biology 130: 91-104.

**Valkonen, J. P. T., Rokka, V. M., and Watanabe, K. N. 1998.** Examination of the leaf drop symptom of virus infected potato using another culture derived haploid. Phytopathology 88: 1073-1077.

Archive of SID



www.SID.ir