

“مجله نهال و بذر”  
جلد ۳۷، شماره ۱، سال ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

## غربالگری بیولوژیکی و مولکولی برخی ارقام و کلونهای امیدبخش سیبزمینی برای مقاومت به ویروس X سیبزمینی

### Biological and Molecular Screening of Some Potato Cultivars and Promising Clones for Resistance to *Potato Virus X* (PVX)

رحیم احمدوند<sup>۱</sup>، حجت اله جوانمرد طوسی<sup>۲</sup>، احمد موسی پور گرجی<sup>۳</sup>

- ۱- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.
- ۳- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

#### چکیده

احمدوند، ر.، جوانمرد طوسی، ح. و موسی پور گرجی، ا. ۱۴۰۰. غربالگری بیولوژیکی و مولکولی برخی ارقام و کلونهای امیدبخش سیبزمینی برای مقاومت به ویروس X سیبزمینی. مجله نهال و بذر ۳۷: ۸۲-۶۳.

این پژوهش به منظور غربالگری برخی ژنوتیپهای سیبزمینی شامل ۳۵ رقم تجاری در ایران و ۲۴ کلون امیدبخش حاصل از برنامه‌های به نژادی، نسبت به ویروس X سیب زمینی (*Potato virus X = PVX*) با استفاده از آزمون‌های بیولوژیکی و نشاتگرهای مولکولی انجام شد. برای این منظور، ابتدا جدایه ویروسی روی گیاه محک گل تکمهای مایه‌زنی و خالص‌سازی بیولوژیک و سپس با مایه‌زنی روی گیاه توتون، تکثیر و در محیط کشت بافت نگهداری گردید. برای ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها نسبت به این ویروس از روش استاندارد مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی (CIP) شامل مایه‌زنی مکانیکی و پیوند استفاده شد. ابتدا سه گیاهچه سیب‌زمینی از هر ژنوتیپ به صورت مکانیکی در شرایط گلخانه‌ای توسط عصاره آلوده به ویروس مایه‌زنی شد و ژنوتیپ‌ها براساس نتایج آزمون DAS-ELISA در دو گروه مقاوم و حساس قرار گرفتند. به منظور تعیین نوع مقاومت ژنوتیپ‌های مقاوم بر روی گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به PVX در سه تکرار پیوند و آلودگی آنها توسط آزمون الایزا بررسی شد. نتایج حاصل از هر دو آزمایش مایه‌زنی مکانیکی و پیوند نشان داد که ۱۲ رقم تجاری و ۱۱ کلون امیدبخش سیب‌زمینی دارای مقاومت از نوع بسیار بالا (Extreme Resistance, ER) و ۹ رقم تجاری و یک کلون امیدبخش دارای مقاومت از نوع فوق حساسیت (Hypersensitive Reaction, HR) نسبت به PVX بودند. سایر ژنوتیپ‌ها شامل ۱۴ رقم تجاری و ۱۲ کلون امیدبخش در حداقل یکی از تکرارها به PVX آلوده شدند و به‌عنوان حساس شناسایی گردیدند. غربالگری برای ژن‌های مقاومت *Rx1* و *Rx2* نیز توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) به ترتیب با استفاده از نشاتگرهای اختصاصی *5RX1* و *106RX2* در ژنوتیپ‌های با مقاومت ER انجام شد. نتایج بررسی‌های مولکولی نیز نشان داد که ۱۳ ژنوتیپ سیب‌زمینی دارای ژن مقاومت *Rx1* و هفت ژنوتیپ دارای ژن مقاومت *Rx2* بودند و در ژنوتیپ‌های با مقاومت HR و حساس هیچیک از این ژن‌ها ردیابی نشد و با نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای و سرولوژیکی مطابقت داشت. با توجه به نتایج این پژوهش از ژنوتیپ‌های با مقاومت ER به ویروس و دارای ژن *Rx1* و *Rx2* می‌توان در برنامه‌های به نژادی به عنوان والد مقاوم برای تولید ارقام سیب زمینی با صفات مطلوب زراعی و مقاوم نسبت به PVX استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، مقاومت فوق حساسیت، مقاومت بسیار بالا، نشاتگر مولکولی، رقم مقاوم.

تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۳۷۸۵

نگارنده مسئول: ahmadvandra@gmail.com

## مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)

نقش مهمی در تغذیه مردم جهان داشته و ارزش غذایی آن هم‌ردیف گندم و برنج است. سیب‌زمینی در ۱۴۰ کشور کشت می‌شود که بیش از ۱۰۰ کشور تولیدکننده آن در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری واقع شده‌اند. سیب‌زمینی از نظر تولید سالیانه بعد از گندم، برنج و ذرت در جهان در مقام چهارم قرار دارد (Ezekiel et al., 2013). بر اساس آمارنامه کشاورزی در سال ۹۸-۱۳۹۷ سطح زیر کشت این محصول در کشور ۱۴۳ هزار هکتار و تولیدی معادل ۵/۲ میلیون تن و میانگین عملکرد ۳۷ تن در هکتار بود (Anonymous, 2019).

یکی از موانع اصلی تولید سیب‌زمینی خسارت ناشی از آفات و بیماری‌ها می‌باشد که در برخی موارد عملکرد را تا بیش از ۹۰ درصد کاهش می‌دهند. در بین عوامل بیماری‌زای مختلف این محصول، ویروس‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند، زیرا سیب‌زمینی به صورت غیرجنسی تکثیر شده و آلودگی ویروسی به نسل‌های بعدی نیز منتقل می‌شود. تاکنون بیش از ۵۰ نوع بیماری ویروسی از سیب‌زمینی گزارش شده که تعدادی از آنها اهمیت اقتصادی داشته و در هر منطقه تعدادی از آنها خسارت بالایی به این محصول وارد می‌کنند. خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی به نوع ویروس و نژاد آن، رقم سیب‌زمینی، نحوه انتقال و شرایط محیطی بستگی دارد

و از ۱۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است (de Bokx et al., 1972).

ویروس X سیب‌زمینی (*Potato virus X*, PVX) دارای گسترش جهانی بوده و یکی از شایع‌ترین ویروس‌های سیب‌زمینی است، به طوری که به عنوان دهمین ویروس مهم گیاهی شناسایی شده است (Scholthof et al., 2011). میزان خسارت آن به نژاد ویروس و رقم سیب‌زمینی بستگی داشته و از ۱۰ تا بیش از ۵۰ درصد گزارش شده است. این ویروس ممکن است به صورت نهفته بوده و به ظاهر هیچ‌گونه علائمی در گیاه نداشته باشد. در صورت ابری بودن هوا علائم بیماری به صورت ماتل خفیف مشاهده می‌شود. به طور کلی علائم ناشی از این ویروس مخفی و یا بسیار خفیف است. در برخی ارقام چوب‌پنبه‌ای شدن غده در اثر آلودگی به PVX مشاهده شده است. آلودگی هم‌زمان این ویروس با ویروس‌های PVA (*Potato virus A*) و PVY (*Potato virus Y*) باعث ایجاد خسارت بیشتر می‌شود (Beemster, 1987). این ویروس به صورت مکانیکی و از طریق غده‌های آلوده انتقال می‌یابد.

ویروس X سیب‌زمینی از جنس *Potexvirus* و خانواده *Alphaflexiviridae* از گروه ویروس‌های رشته‌ای با یک پیکره است. این ویروس اولین بار توسط اسمیت در سال ۱۹۴۱ میلادی توصیف شد. پیکره آن رشته‌ای انعطاف‌پذیر به طول ۵۱۵ و ضخامت ۱۳ نانومتر

ژن *Nb* مقاومت بر علیه گروههای نژادی ۱ و ۲ ایجاد می کند. در حالی که ژن *Nx* مقاومت بر علیه گروههای نژادی ۱ و ۳ را القاء می کند. اما گروه نژادی ۴ به هر دو ژن غلبه می کند. ژن *Nb* روی کروموزوم ۵ در همان ناحیه ژن *Rx2* مکان یابی شده است (De Jong *et al.*, 1997). از بین آنها، مقاومت از نوع ER مورد توجه به نژادگران سیب زمینی می باشد. دو ژن غالب *Rx1* و *Rx2* در سیب زمینی عامل مقاومت ER نسبت به PVX بوده و در محل مایه زنی مرگ سلولی و لکه های نکروزه قابل مشاهده نیست. عملکرد (Function) این دو ژن یکسان بوده و حضور هر یک از این ژن ها حتی در وضعیت ژنتیکی ساده (Simplex, Aaaa) در سیب زمینی برای ایجاد مقاومت ER در این گیاه کافی است (Bendahmane *et al.*, 2000).

ژن *Rx1* روی کروموزوم ۱۲ و *Rx2* روی کروموزوم ۵ قرار دارد. ژن *Rx1* از زیرگونه وحشی *S. tuberosum ssp. andigena* مشتق شده است (Ritter *et al.*, 1991; Bendahmane *et al.*, 1999). ژن *Rx2* از گونه وحشی *S. acaule* مشتق شده است (Bendahmane *et al.*, 1999). نشانگرهای مولکولی به عنوان یک ابزار ژنتیکی قوی برای ردیابی ژن های مطلوب در کلکسیون های گیاهی در اختیار به نژادگران هستند. در حال حاضر از نشانگرهای مولکولی در برنامه های به نژادی به عنوان مکمل و سرعت دهنده برنامه های به نژادی کلاسیک استفاده می شود.

است. نود و چهار درصد پیکره را پوشش پروتئینی با وزن مولکولی ۲۵۰۸۰ دالتون تشکیل داده که دارای ۱۲۷۰ زیر واحد (Subunit) است. ژنوم تک رشته ای مثبت (- Positive sense RNA) با وزن مولکولی  $2/1 \times 10^6$  دالتون و تعداد ۶۴۳۵ نوکلئوتید می باشد. ساختار انتهایی 5' آن Cap و ساختار انتهایی 3' آن PolyA است و حاوی پنج قاب قرائت باز (Open reading frame, ORF) است (Huisman *et al.*, 1988). استفاده از ارقام مقاوم مؤثرترین و آسان ترین روش برای کنترل بیماری های ویروسی است. با توجه به اهمیت ویروس های سیب زمینی در زراعت این محصول و میزان خسارتی که وارد می کنند، در برنامه های به نژادی سیب زمینی واکنش کلون های پیشرفته نسبت به بیماری های مهم ویروسی بررسی می شود.

مقاومت به PVX به صورت فوق حساسیت (Hypersensitive Resistance, HR)، مقاومت بسیار بالا (Extreme Resistance, ER)، مقاومت به تجمع ویروس (Resistance to virus accumulation) و مقاومت گیاه بالغ (Mature plant resistance) مشاهده می شود (Bonierbale, 2007). مقاومت فوق حساسیت نسبت به PVX در سیب زمینی توسط دو ژن غالب *Nx* و *Nb* کنترل می شود. سویه های PVX بر اساس توانایی آنها در القاء پاسخ فوق حساسیت در ارقام سیب زمینی حامل این دو ژن گروه بندی می شوند.

درصد شباهت دارند. شباهت نوکلئوتیدی بالای این دو ژن تفکیک آنها را از یکدیگر مشکل می‌کند. از طرفی به دلیل ماهیت خاص ژنتیکی سیب‌زمینی (اتوتتراپلوئید و تترازومیک)، پدیده نوترکیبی رایج تر بوده و استفاده از نشانگرهای مولکولی را برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر (MAS) به ویژه در ژنوتیپ‌های با زمینه ژنتیکی متفاوت، مشکل تر می‌نماید. احمدوند و همکاران (Ahmadvand *et al.*, 2013) بر اساس توالی ژن‌های مقاومت، دو پرایمر اختصاصی شامل 1Rx1 و 5Rx1 برای ژن *Rx1* و یک پرایمر اختصاصی 106Rx2 را برای ژن *Rx2* معرفی کردند که در این تحقیق از دو پرایمر اختصاصی 5Rx1 و 106Rx2 استفاده شد.

در این پژوهش به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم در میان برخی ارقام رایج سیب‌زمینی کشور و کلون‌های امیدبخش و همچنین امکان استفاده از آنها در برنامه‌های به‌نژادی، ابتدا واکنش بیولوژیکی آنها در شرایط گلخانه‌ای به دو روش مایه‌زنی مکانیکی و پیوند بررسی شد و سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مقاومت به PVX نوع ژن مقاومت (*Rx1* یا *Rx2*) در ژنوتیپ‌های مقاوم تعیین گردید. نتایج این تحقیق امکان استفاده از ژنوتیپ‌های حامل این دو ژن به عنوان والد جهت تولید ارقام مقاوم هترو دوپلکس (Heteroduplex) به PVX را فراهم می‌کند.

(Tuvevsson *et al.*, 2007).

در مطالعات قبلی نشانگرهای مولکولی مختلف پیوسته به ژن‌های *Rx1* و *Rx2* برای ردیابی هر یک از ژن‌های مقاومت ER نسبت به PVX معرفی و برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی سیب‌زمینی پیشنهاد شده‌اند. از این نشانگرها می‌توان به CP60 (*DdeI*)، 77L (*AluI*)، 77R (*HaeIII*)، 218 (*DdeI*)، 221R (*AluI*)، IPM3، IPM4 (*DdeI*)، GP3 (*TaqI*) اشاره کرد که برای ردیابی ژن *Rx1* مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kanyuka *et al.*, 1999).

دو نشانگر پیوسته به ژن *Rx2* شامل GP21 (*AluI*) و TG432 نیز برای ردیابی ژن *Rx2* معرفی شده‌اند (De Jong *et al.*, 1997). هیچ یک از این نشانگرها اختصاصی نیستند، به طوری که در برخی از ارقام مقاوم قطعه مورد نظر تکثیر نشده و یا برعکس در برخی ارقام حساس باند مرتبط با نشانگر تکثیر می‌شود. همچنین الگوی هضمی نشانگرهای CAPS با ژنوتیپ‌های حساس و یا مقاوم همخوانی نداشت. بنابراین قابلیت استفاده از آنها در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر (Marker Assisted Selection, MAS) وجود ندارد (Ahmadvand *et al.*, 2013).

مقایسه توالی بین دو ژن *Rx1* و *Rx2* مشخص کرده که این دو ژن ارتباط تکاملی بسیار نزدیکی با هم دارند. این دو ژن در سطح نوکلئوتید ۹۵ درصد و در سطح پروتئین ۹۶

**مواد و روش‌ها**

**عاری سازی از ویروس و تکثیر ژنوتیپ‌ها**

در این پژوهش تعداد ۵۹ ژنوتیپ سیب‌زمینی شامل ۳۵ رقم تجاری و ۲۴ کلون امیدبخش دریافتی از مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی (CIP) برای آزمایشات بیولوژیکی و مولکولی غربالگری انتخاب شد (جدول ۱). ابتدا با انجام آزمون الایزا دو طرفه (DAS-ELISA) بر اساس روش کلارک و آدامز (Clark and Adams, 1977) توسط

آنتی‌بادی‌های چندهمسانه (Polyclonal) خریداری شده از شرکت Bioreba سوئیس، احتمال آلودگی هر یک از ژنوتیپ‌ها نسبت به هر یک از ویروس‌های PVY, PVX, PLSV, PVM, PVA (Potato virus M), PLRV, (Potato leafroll virus) و (Potato virus S) مورد بررسی قرار گرفت. غده‌هایی که نسبت به ویروس‌های مذکور آلودگی نداشتند، جهت تکثیر انتخاب شدند.

جدول ۱- ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی مورد بررسی

Table 1. Experimental potato cultivars and promising clones

ردیف No.	رقم Cultivar	ردیف No.	رقم Cultivar	ردیف No.	رقم/کلون Cultivar/Clone	ردیف No.	کلون Clone
1	Oceania	16	Katica	31	Sinora	46	397015-11
2	Marabel	17	Verona	32	Ramos	47	396151-5
3	Caesar	18	Demon	33	Savalan	48	397097-14
4	Markies	19	Bzura	34	Fontane	49	397007-9
5	Opal	20	Florida	35	Picasso	50	397045-7
6	Caruso	21	Hermes	36	Sante	51	396309-7
7	Pamela	22	Jelly	37	397081-1	52	397031-7
8	Lady Rosetta	23	Arinda	38	397082-10	53	397031-16
9	Dai fla	24	White Lady	39	396128-32	54	397008-14
10	Emeraude	25	Lorett	40	397074-2	55	397009-8
11	Burren	26	Milva	41	397045-13	56	396140-4
12	Cara	27	Elodie	42	397007-4	57	397045-1
13	Agria	28	Impala	43	397031-1	58	397067-11
14	Desiree	29	Labadia	44	397081-4	59	397031-11
15	Luca	30	Marfona	45	397007-16		

الکتروترابی عاری از ویروس شدند (Pajouhandeh, 2001). ژنوتیپ‌های انتخابی سالم، به صورت تک‌گره (Single node) روی محیط کشت پایه MS کشت شدند و پس از

به منظور غربالگری اولیه، ژنوتیپ‌های آلوده به PVX به دلیل حساسیت به ویروس از سایر مراحل تحقیق حذف شدند، اما ژنوتیپ‌های آلوده به سایر ویروس‌ها با استفاده از روش

از لکه‌های موضعی ظاهر شده در سطح برگ را به‌عنوان یک جدایه فرضی ویروسی انتخاب کرده و جهت تکثیر روی توتون (*Nicotiana glutinosa*) به‌صورت مکانیکی مایه‌زنی شدند. یک ماه پس از مایه‌زنی، با استفاده از آزمون سرولوژیکی الیزا آلودگی گیاهان توتون به PVX تایید شد. برای جلوگیری از اختلاط جدایه خالص ویروس روی توتون با سایر جدایه‌ها و یا سایر ویروس‌ها روی گیاهان دیگر در محیط گلخانه، گیاهان آلوده به PVX خالص به صورت تک‌گره روی محیط MS کشت بافت در اتاق رشد تکثیر و نگهداری شدند.

در کلیه آزمون‌های الیزا برای تعیین حد آلودگی، پس از کسر میزان جذب چاهک کنترل (Blank)، میانگین جذب نوری شاهد‌های منفی (عصاره گیاه سالم) در طول موج ۴۰۵ نانومتر محاسبه شد و دو برابر آن به‌عنوان حد آلودگی در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی که میزان جذب نوری چاهک آن‌ها بیش از حد آلودگی بود به‌عنوان آلوده تلقی شدند.

#### آزمون‌های بیولوژیکی

مایه‌زنی مکانیکی: این آزمایش در سه تکرار در شرایط گلخانه با دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس انجام شد. بدین ترتیب که تعداد سه مینی تیوبر از هر رقم/کلون در داخل گلدان‌های حاوی پیت‌موس و پرلیت به نسبت ۲:۱ کشت شدند. هنگامی که گیاهچه‌ها به مرحله ۴-۲

رشد کافی در اتاق رشد، به گلخانه منتقل و پس از حدود دو ماه ریزغده‌های تکثیری برداشت شدند.

#### بررسی واکنش بیولوژیکی ژنوتیپ‌ها نسبت به PVX در شرایط گلخانه‌ای

برای ارزیابی واکنش ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی مورد بررسی نسبت به PVX، از روش استاندارد مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی (CIP) استفاده شد (Bonierbale, 2007). بر اساس این روش دو آزمایش جداگانه شامل مایه‌زنی مکانیکی و مایه‌زنی پیوند انجام شد.

#### تهیه زادمایه ویروس PVX

برای تهیه زادمایه ویروس، طی بازدید از مزارع استان اردبیل از بوته‌های مشکوک به آلودگی نمونه‌برداری و آلودگی آن‌ها نسبت به PVX با استفاده از آزمون DAS-ELISA و آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای تایید شد. نمونه‌های آلوده با توجه به حد آلودگی (R) شناسایی شدند و از بین آن‌ها نمونه‌های با غلظت (OD) بیش از دو برای مایه‌زنی انتخاب و عصاره آلوده هر نمونه با استفاده از پودر کربوران‌دوم ۶۰۰ مش (mesh) روی گیاه محک گل‌تکمه‌ای (*Gompherena globosa*) به‌صورت مکانیکی مایه‌زنی شد و در شرایط گلخانه با دمای بین ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس، تناوب نوری ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی و رطوبت حدود ۷۰ درصد نگهداری شدند.

حدود یک هفته پس از مایه‌زنی، هر یک

حداقل یکی از تکرارها، به عنوان حساس تلقی شد.

مایه زنی با پیوند: به منظور تعیین نوع مقاومت (ER یا HR)، ساقه ژنوتیپ‌های مقاوم در آزمایش مایه‌زنی مکانیکی به گیاه گوجه فرنگی آلوده به PVX پیوند زده شدند. برای این منظور، تعداد سه گیاهچه از هر رقم/کلون امیدبخش به عنوان پیوندک به طور جداگانه روی گیاهچه‌های گوجه فرنگی رقم حساس روتگرز (Rutgers) آلوده به PVX به عنوان پایه پیوند اسکنه‌ای زده شده و یک ماه بعد از آلودگی توسط آزمون الیزا مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). ژنوتیپ‌هایی که در هر دو آزمایش مایه‌زنی مکانیکی و پیوند مقاوم بودند، به عنوان ژنوتیپ با مقاومت بسیار بالا (ER) شناسایی شدند و در صورت مشاهده آلودگی در حداقل یک تکرار آزمایشی، نوع مقاومت فوق‌حساسیت (HR) تعیین شد.

برگی رسیدند (حدود سه هفته بعد از کشت)، سوسپانسیون به نسبت وزنی / حجمی ۵٪ از عصاره برگ‌های گیاه توتون آلوده به PVX به عنوان زادمایه توسط هاون چینی در بافر فسفات (pH 7.5; 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.025 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) تهیه شد.

برگ‌های گیاهان آزمایشی را توسط پودر کربوراندوم ۶۰۰ mesh غبار پاشی کرده و با مالش دادن ۲-۳ برگچه از هر گیاه توسط پارچه ممل آغشته به سوسپانسیون ویروس، مایه‌زنی انجام شد. برای اطمینان ۴۸ ساعت بعد مایه‌زنی مجدداً تکرار شد. در این آزمایش رقم وایت لیدی (White Lady) به عنوان شاهد مقاوم و رقم هرمس (Hermes) به عنوان شاهد حساس در نظر گرفته شد. حدود ۲۵ روز بعد از مایه‌زنی، آلودگی هر یک از گیاهان با استفاده از تست DAS-ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت و در صورت آلودگی



شکل ۱- پیوند اسکنه‌ای ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی روی پایه گوجه فرنگی رقم روتگرز آلوده به PVX  
Fig. 1. Grafting potato genotypes' scions on tomato cv. Rutgers rootstocks infected with PVX

و کیفیت DNA نمونه‌ها توسط دستگاه نانودراپ Thermo Scientific (مدل ND-1000) و ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. از DNA استخراج شده رقم وایت‌لیدی (White Lady) به عنوان شاهد مقاوم حامل ژن *Rx2* و رقم کارا (Cara) به عنوان شاهد مقاوم حامل ژن *Rx1* استفاده شد. به منظور ردیابی ژن‌های مقاومت *Rx1* و *Rx2* به ترتیب از آغازگرهای اختصاصی 5Rx1 و 106Rx2 مبتنی بر توالی هر یک از ژن‌ها استفاده شد که به ترتیب قطعه‌های ۱۸۶ و ۵۴۳ جفت‌بازی را تکثیر می‌نمایند (Ahmadvand *et al.*, 2013). توالی هر یک از این آغازگرها در جدول ۲ آمده است.

### ردیابی ژن‌های مقاومت توسط نشانگرهای اختصاصی *Rx1* و *Rx2*:

استخراج دی‌ان‌ای (DNA) ژنومی از برگ گیاهان سیب‌زمینی به روش والبوت و وارن (Walbot and Warren, 1988) با اندکی تغییرات شامل موارد زیر انجام شد. در این روش پس از پودر کردن بافت گیاهی در نیتروژن مایع، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت پودر شده به یک میلی‌لیتر از بافر Lysis (100mM Tris HCL، 1mM NaCl، 50 mM EDTA، pH=8، 1% PVP و ۸۰ میکرولیتر 10% SDS قبل از قرار دادن در حمام بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. کمیت

### جدول ۲- آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *Rx1* و *Rx2*

Table 2. Specific primer pairs for *Rx1* and *Rx2* genes

نام آغازگر Primer name	تعداد نوکلئوتید No. nucleotide	ترادف آغازگرها (5'-3') Sequence (5'-3')	دمای اتصال Annealing Temperature	طول قطعه تکثیر شده (جفت باز) Size of amplified fragment (bp)
5RX1	20	F:TCAGGGCAAAACCTAACAC	64	186
5RX1	20	R: ATCGGCCTAGAGTGACATCG		
106 RX2	21	F: GGAGAAATCCTGCAATGTAAC	66	543
106 RX2	21	R: CTTGTCAAAGAAAGAAGGCCT		

F: Forward primer, R: Reverse primer, bp: Base pairs

R: آغازگر معکوس، bp: جفت باز

۸/۸ میکرولیتر آب خالص بود. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از دستگاه ترموسایکلر Biometra (مدل T-Gradient Thermoblock) استفاده شد که با چرخه حرارتی زیر برای تکثیر قطعات مورد نظر روی دستگاه تنظیم شد: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه و تعداد ۳۵ چرخه با واسرشت

اجزای مخلوط واکنش PCR (Master Mix) با حجم نهایی ۲۴ میکرولیتر شامل سه میکرولیتر از DNA (۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۲/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (پنج میکرومول)، سه میکرولیتر بافر PCR 10X محتوی کلرید منیزیم، ۲/۴ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP) (۱۰ میلی‌مولار)، دو میکرولیتر آنزیم یک واحد *Taq* DNA Polymerase (شرکت سیناژن) و



جمع آوری شده از استان اردبیل نشان داد که میزان جذب نوری تعداد ۱۰ نمونه آلوده به PVX در طول موج ۴۰۵ نانومتر بیش از ۲ (OD>2) بود. یک هفته پس از مایه زنی عصاره این نمونه‌ها روی گیاه محک گل تکمه‌ای (*G. globosa*) علائم لکه موضعی روی برگ‌های آن ظاهر شد (شکل ۲). هر یک از لکه‌های موضعی به‌عنوان یک جدایه خالص فرضی ویروسی انتخاب و روی یک گیاهچه توتون مایه زنی شد. پس از ظهور علائم و تایید آلودگی با تست الایزا، از آن‌ها نمونه کشت بافت تهیه شد. از بین این نمونه‌ها، جدایه خالص X6 با میزان جذب سه برای انجام آزمایشات مایه زنی انتخاب شد.

سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها بر اساس جدول ۲ به مدت ۲۰ ثانیه، بسط زنجیره در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و بسط نهایی زنجیره در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصول نهایی حاصل از PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر 1X BE با استفاده از الکتروفورز تفکیک و اندازه تقریبی قطعه تکثیر شده با استفاده از نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی (100bp) تعیین شد.

## نتایج و بحث

### خالص سازی و تکثیر ویروس

نتایج آزمون DAS-ELISA روی نمونه‌های



تصویر ۲ - علائم لکه موضعی ناشی از PVX روی گیاه محک گل تکمه‌ای

Fig. 2. Local lesion symptoms on test plant *Gompherena globosa* inoculated with PVX

مورد بررسی در استان همدان بر اساس

در یک مطالعه برخی از جدایه‌های

PVX نیز توسط آزمون الایزا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۱۲ رقم و ۱۱ کلون امیدبخش فاقد آلودگی بودند. این ژنوتیپ‌ها که در هر دو آزمایش مکانیکی و پیوند فاقد آلودگی بودند به عنوان ژنوتیپ‌های با مقاومت از نوع بسیار بالا (ER) در نظر گرفته شدند. سایر ژنوتیپ‌های مقاوم در آزمایش مایه‌زنی مکانیکی شامل نه رقم تجاری و یک کلون امیدبخش پس از پیوند روی گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس واکنش حساسیت بروز دادند. بنابراین به عنوان ژنوتیپ‌های با مقاومت فوق حساسیت (HR) شناسایی شدند (جدول ۴). این ۱۰ ژنوتیپ با مقاومت فوق حساسیت در آزمایش مایه‌زنی مکانیکی در محل مایه‌زنی علائم نکروز موضعی بروز داده بودند که احتمالاً نشان دهنده وجود ژن *Nb* یا *Nx* در این ژنوتیپ‌ها است (Bonierbale, 2007; Cockerham, 1970). نتایج حاصل از آزمایشات مایه‌زنی مکانیکی و پیوند نشان داد که ۴۴ درصد ژنوتیپ‌ها نسبت به PVX حساس بوده و ۳۹ درصد ژنوتیپ‌ها با مقاومت ER و تنها ۱۷ درصد آنها دارای مقاومت از نوع HR بودند. رقم تجاری آگریا، که حدود ۲۵ درصد سطح زیرکشت سیب‌زمینی را در کشور به خود اختصاص داده است (مکاتبات شخصی با دفتر سبزی و صیفی، وزارت جهاد کشاورزی)، دارای مقاومت از نوع بسیار بالا (ER) بود. اما رقم مارفونا به عنوان یک رقم نسبتاً زودرس که سال‌های متمادی در سطح نسبتاً وسیعی کشت می‌شد دارای مقاومت HR بود.

توالی پوشش پروتئینی گروه بندی شد (Shokrollahi et al., 2013). در مطالعه دیگری نمونه‌های جمع آوری شده از نه استان بر اساس نوع علائم روی گیاه توتون گونه *N. glutinosa* به دو گروه تقسیم شدند (Massumi et al., 2014). نمونه مورد بررسی در این تحقیق روی توتون علائم موزائیکی خفیف ایجاد کرد که به جدایه‌های گروه دو این تحقیق شباهت دارد.

### نتایج ارزیابی بیولوژیکی ژنوتیپ‌ها نسبت به PVX در شرایط گلخانه‌ای

#### نتایج مایه‌زنی مکانیکی:

سه هفته پس از مایه‌زنی مکانیکی هر یک از تکرارها، نتایج حاصل از آزمون الایزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر نشان داد که تعداد ۳۳ ژنوتیپ شامل ۱۲ کلون امیدبخش و ۲۱ رقم تجاری سیب‌زمینی در هیچ‌یک از تکرارهای آزمایشی آلودگی نداشتند. بنابراین به عنوان ژنوتیپ‌های مقاوم در نظر گرفته شدند و برای تعیین نوع مقاومت در آزمایش مایه‌زنی پیوند مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین میزان جذب ۲۶ ژنوتیپ شامل ۱۴ رقم تجاری و ۱۲ کلون امیدبخش در طول موج ۴۰۵ نانومتر بیش از حد آلودگی بود و به عنوان ژنوتیپ‌های حساس به PVX تلقی شدند (جدول ۳).

#### نتایج مایه‌زنی پیوند

واکنش ژنوتیپ‌های پیوند شده روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم روتگرز آلوده به

جدول ۳- واکنش ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی به PVX در آزمایش مایه‌زنی مکانیکی

Table3. Reaction of potato cultivars and promising clones to PVX in mechanical inoculation assay

ردیف	رقم	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	واکنش	ردیف	رقم/کلون	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	واکنش	ردیف	کلون	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	واکنش
No.	Cultivar	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Reaction	No.	Cultivar/Clone	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Reaction	No.	Clone	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Reaction
1	Oceania	R	R	R	R	21	Hermes*	S	S	S	S	41	397045-13	R	R	S	S
2	Marabel	R	R	R	R	22	Jelly	S	S	R	S	42	397007-4	R	S	S	S
3	Caesar	S	S	R	S	23	Arinda	R	S	S	S	43	397031-1	R	S	S	S
4	Markies	R	R	R	R	24	White Lady*	R	R	R	R	44	397081-4	R	R	R	R
5	Opal	R	R	R	R	25	Lorett	R	R	R	R	45	397007-16	S	S	S	S
6	Caruso	S	S	R	S	26	Milva	R	R	R	R	46	397015-11	R	R	R	R
7	Pamela	S	S	R	S	27	Elodie	R	R	R	R	47	396151-5	R	R	R	R
8	Lady Rosetta	R	R	R	R	28	Impala	S	S	S	S	48	397097-14	R	R	R	R
9	Daifla	S	R	S	S	29	Labadia	R	R	R	R	49	397007-9	S	S	S	S
10	Emeraude	S	S	S	S	30	Marfona	R	R	R	R	50	397045-7	R	R	R	R
11	Burren	R	R	R	R	31	Sinora	R	R	R	R	51	396309-7	R	R	R	R
12	Cara*	R	R	R	R	32	Ramos	R	R	R	R	52	397031-7	R	R	S	S
13	Agria	R	R	R	R	33	Savalan	S	S	S	S	53	397031-16	S	S	R	S
14	Desiree	S	S	S	S	34	Fontane	R	R	R	R	54	397008-14	R	S	R	S
15	Luca	R	R	R	R	35	Picasso	R	R	R	R	55	397009-8	S	S	S	S
16	Katica	S	S	S	S	36	TP22-1	R	S	S	S	56	396140-4	R	R	R	R
17	Verona	R	R	R	R	37	397081-1	R	S	S	S	57	397045-1	R	R	R	R
18	Demon	S	S	S	S	38	397082-10	R	R	R	R	58	397067-11	R	R	R	R
19	Bzura	R	R	R	R	39	396128-32	R	R	R	R	59	397031-11	R	R	R	R
20	Florida	S	S	S	S	40	397074-2	S	S	S	S						

R: Resistant, S: Susceptible, \*: Resistant control, \*\*: Susceptible control, Rep.: Replication

R: مقاوم، S: حساس، \*: شاهد مقاوم، \*\*: شاهد حساس.

جدول ۴- واکنش ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی نسبت به PVX در آزمایش مایه‌زنی پیوند

Table 4. Reaction of potato cultivars and promising clones to PVX in grafting inoculation assay

ردیف No.	رقم Cultivar	تکرار ۱ Rep. 1	تکرار ۲ Rep. 2	تکرار ۳ Rep. 3	واکنش Reaction	ردیف No.	رقم / کلون Cultivar/ Clone	تکرار ۱ Rep. 1	تکرار ۲ Rep. 2	تکرار ۳ Rep. 3	واکنش Reaction
1	Oceania	S	S	S	HR	18	Sinora	S	S	S	HR
2	Marabel	R	R	R	ER	19	Ramos	S	S	S	HR
3	Markies	S	S	S	HR	20	Fontane	R	R	R	ER
4	Opal	R	R	R	ER	21	Picasso	S	S	S	HR
5	Lady Rosetta	R	R	R	ER	22	397082-10	R	R	R	ER
6	Burren	S	S	S	HR	23	396128-32	R	R	R	ER
7	Cara	R	R	R	ER	24	397081-4	R	R	R	ER
8	Agria	R	R	R	ER	25	397015-11	R	R	R	ER
9	Luca	R	R	R	ER	26	396151-5	R	R	R	ER
10	Verona	S	S	S	HR	27	397097-14	R	R	R	ER
11	Bzura	R	R	R	ER	28	397045-7	S	S	S	HR
12	White Lady	R	R	R	ER	29	396309-7	R	R	R	ER
13	Lorett	R	R	R	ER	30	396140-4	R	R	R	ER
14	Milva	S	S	S	HR	31	397045-1	R	R	R	ER
15	Elodie	R	R	R	ER	32	397067-11	R	R	R	ER
16	Labadia	R	R	R	ER	33	397031-11	R	R	R	ER
17	Marfona	S	S	S	HR						

HR: واکنش مقاومت فوق حساسیت، ER: واکنش مقاومت بسیار بالا، R: مقاوم، S: حساس.

HR: Hypersensitive Resistance, ER: Extreme Resistance, R: Resistant, S: Susceptible, Rep.: Replication.

دارای مقاومت HR بودند. در سیب زمینی واکنش فوق حساسیت نسبت به PVX به صورت سوش اختصاصی (Strain-specific) می باشد و ژن های این نوع مقاومت تنها نسبت به یک سوش خاص از ویروس مقاومت نشان داده و روی سایر سوش ها مؤثر نیستند (فرضیه ژن برای ژن) و همچنین تحت تاثیر دما و شرایط فیزیولوژیکی گیاه قرار می گیرد. بنابراین یک مقاومت پایدار نیست (Jones, 1990; Loebenstein and Carr, 2006).

ژن های مقاومت تک ژنی HR نسبت به PVX در بسیاری از ارقام سیب زمینی گزارش شده است که مقاومت مزرعه ای نسبت به این ویروس ایجاد می کنند. مقاومت فوق حساسیت نسبت به PVX در سیب زمینی توسط دو ژن غالب  $Nx$  و  $Nb$  کنترل می شود (Cockerham, 1970). در کاتالوگ بسیاری از ارقام وارداتی سیب زمینی در کشور واکنش به PVX را به صورت مقاومت "نسبتاً زیاد" و یا "خیلی زیاد" ارائه می دهند که نوع مقاومت ER یا HR را از هم تفکیک نکرده است، بنابراین احتمال آلودگی این ارقام به PVX وجود دارد.

**نتایج غربالگری ژنوتیپ ها برای ژن های  $Rx1$  و**

**$Rx2$  با استفاده از نشاتگرهای مولکولی**

**غربالگری ژنوتیپ ها برای ژن  $Rx1$**

به منظور تکثیر بخشی از ژن های مقاومت  $Rx1$  توسط واکنش زنجیره ای پلی مر از از جفت آغازگر 5RX1 استفاده شد. آغازگر 5RX1 در

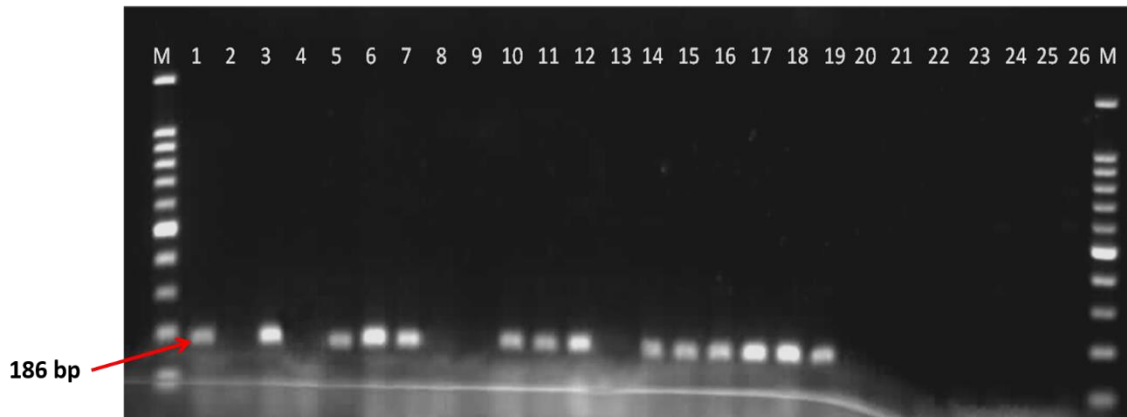
در مقابل رقم جلی (Jelly) با سطح زیر کشت زیاد در بسیاری از مناطق، نسبت به PVX حساسیت نشان داد که لازم است در برنامه تولید بذر این رقم مراقبت های لازم برای پیشگیری از گسترش آلودگی صورت گیرد. از بین کلون های امیدبخش، ۵۰ درصد آنها نسبت به این ویروس حساس بودند. آزمایشات قبلی روی گروه دیگری از کلون های امیدبخش دریافتی از مرکز بین المللی سیب زمینی (CIP) نیز نشان داد که بسیاری از آنها نسبت به PVX حساس بودند (احمدوند، منتشر نشده).

در برخی از منابع مقاومت ER به دلیل ایجاد سطح بالایی از مقاومت به عنوان پاسخ مصونیت (Immune response) در نظر گرفته می شود. به طوریکه گیاه حتی تحت فشار اینوکولوم زیاد ویروس آلوده نمی شود و گیاه را به عنوان میزبان (Non-host) برای ویروس در نظر می گیرند. بنابراین در سیب زمینی مقاومت ER مورد توجه به نژادگران است، زیرا این نوع مقاومت نسبت به همه نژادهای ویروس مقاوم است و همچنین بر خلاف مقاومت از نوع فوق حساسیت، تحت تاثیر شرایط محیطی و فیزیولوژی گیاه قرار نمی گیرد.

در مجموع از ۵۹ ژنوتیپ مورد بررسی در این تحقیق، ۳۳ ژنوتیپ شامل ۱۲ رقم و ۱۱ کلون امیدبخش دارای مقاومت ER بودند که می توان از آنها در برنامه های به نژادی به عنوان منبع مقاومت استفاده کرد. در مقابل تنها ۱۰ ژنوتیپ شامل نه رقم و یک کلون امیدبخش

ویروس حساس هستند. مقایسه نتایج مولکولی با نتایج آزمونهای بیولوژیکی (مایه زنی مکانیکی و پیوند) نشان داد که ۱۳ ژنوتیپی که باند مورد نظر در آنها تکثیر شده، مقاومت ER داشته و این قطعه در هیچکدام از ژنوتیپهای حساس تکثیر نشد که حاکی از توانایی نشانگر مولکولی 5RX1 برای تفکیک دقیق ژنوتیپهای حساس از ژنوتیپهای مقاوم حامل ژن *Rx1* است.

رقم کارا (Cara) (شاهد حامل ژن *Rx1*) و ۱۳ ژنوتیپ شامل شش رقم تجاری و هفت کلون امیدبخش مقاوم قطعه‌ای از DNA با اندازه ۱۸۶ جفت باز تکثیر نمود. اما این قطعه در رقم بزورا (Bzura) (شاهد حامل ژن *Rx2*) و همچنین ارقام حساس در آزمایش بیولوژیکی تکثیر نشد (شکل ۳). بنابراین ارقامی که این قطعه در آنها تکثیر نشد حامل ژن *Rx2* و یا نسبت به این



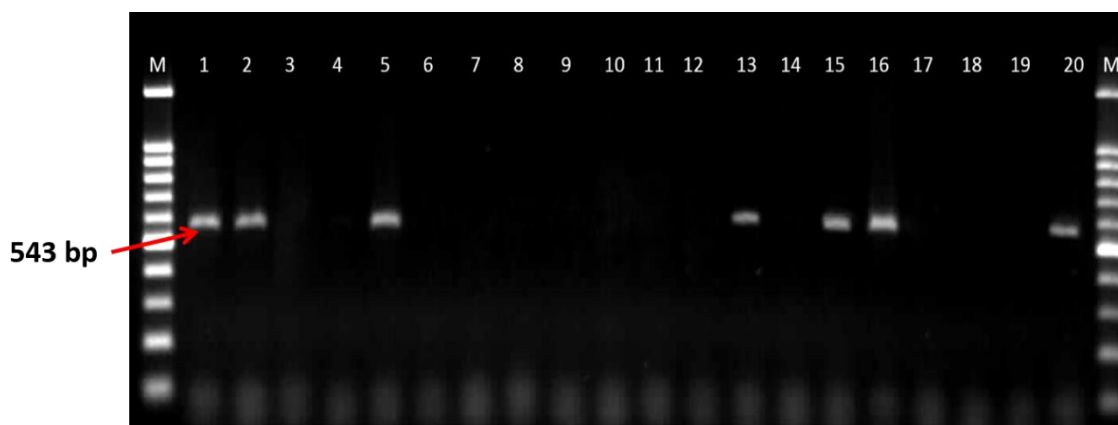
شکل ۳- الگوی الکتروفورز ژنوتیپهای سیب‌زمینی مورد آزمایش با استفاده از جفت آغازگر 5RX1 (نشانگر اختصاصی ژن *Rx1*).

M: Lader (100bp)؛ شماره ۱ تا ۲۶ به ترتیب از چپ به راست بیانگر، ۱: Cara، ۲: Bzura، ۳: Labadia، ۴: Pamella، ۵: 396128-32، ۶: Lady Rossetta، ۷: 396309-7، ۸: Hermes، ۹: 397031-1، ۱۰: Marabel، ۱۱: Agria، ۱۲: Fontane، ۱۳: TP22-1، ۱۴: 397031-11، ۱۵: 397082-10، ۱۶: 397067-11، ۱۷: 396151-5، ۱۸: 397081-4، ۱۹: Opal، ۲۰: White Lady، ۲۱: Luca، ۲۲: Sinora، ۲۳: 397015-11، ۲۴: Emrad، ۲۵: Burren، ۲۶: Daifla هستند.

Fig. 3. Electrophoresis pattern of examined potato genotypes (1 to 26) using primer pairs, 5RX1 (*Rx1*-marker specific); Samples from left to right: M: Lader (100bp), 1: Cara, 2: Bzura, 3: Labadia, 4: Pamella, 5: 396128-32, 6: Lady Rossetta, 7: 396309-7, 8: Hermes, 9: 397031-1, 10: Marabel, 11: Agria, 12: Fontane, 13: TP22-1, 14: 397031-11, 15: 397082-10, 16: 397067-11, 17: 396151-5, 18: 397081-4, 19: Opal, 20: White Lady, 21: Luca, 22: Sinora, 23: 397015-11, 24: Emrad, 25: Burren, 26: Daifla

غربالگری مولکولی توسط نشانگر 106RX2 با غربالگری بیولوژیکی (مایه زنی مکانیکی و پیوند) نشان داد که نتایج بیولوژیکی و مولکولی با همدیگر تطابق کاملی دارد و این نشانگر برای غربالگری ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی برای ژن *Rx2* قابل اعتماد می‌باشد. نتایج مطالعات دیگر نیز نشان داده که دو نشانگر *5Rx1* و *106Rx2* برای ردیابی به ترتیب ژن‌های مقاومت *Rx1* و *Rx2* کارایی لازم را دارند ( Ozkaynak *et al.*, 2018; Shaikhaldein *et al.*, 2018).

**نتایج غربالگری ژنوتیپ‌ها برای ژن *Rx2***  
آغازگر اختصاصی 106RX2 در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطعه‌ای به طول ۵۴۳ جفت‌باز از ژن *Rx2* در رقم وایت‌لیدی (White Lady) (حامل ژن *Rx2*) و نه ژنوتیپ با مقاومت ER در آزمایشات بیولوژیکی شامل چهار رقم تجاری و چهار کلون امیدبخش تکثیر نمود. اما این آغازگر قادر به تکثیر این قطعه در رقم کارا (Cara) (حامل ژن *Rx1*) و ژنوتیپ‌های حساس نبود (شکل ۴ و ۵). مقایسه نتایج



شکل ۴- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در نمونه‌های سیب‌زمینی با استفاده از جفت آغازگر 106RX2 (نشانگر اختصاصی ژن *Rx2*).

M: مارکر (100bp)، شماره ۱ تا ۲۰ به ترتیب از چپ به راست بیانگر، ۱: Bzura، ۲: White Lady، ۳: Cara، ۴: Agria، ۵: 396140-4، ۶: Sinora، ۷: Burren، ۸: Oceania، ۹: Marfona، ۱۰: Markiz، ۱۱: Caesar، ۱۲: Picaso، ۱۳: Luca، ۱۴: Ramos، ۱۵: Loretta، ۱۶: Elodie، ۱۷: Marabel، ۱۸: 396128-32، ۱۹: 397031-7، ۲۰: 397097-14 هستند.

Fig. 4. Electrophoresis pattern of examined potato genotypes (1 to 20) using primer pairs, 106Rx2 (*Rx2*-marker specific); Samples from left to right: M: Lader (100bp), 1: Bzura, 2: White Lady, 3: Cara, 4: Agria, 5: 396140-4, 6: Sinora, 7: Burren, 8: Oceania, 9: Marfona, 10: Markiz, 11: Caesar, 12: Picaso, 13: Luca, 14: Ramos, 15: Loretta, 16: Elodie, 17: Marabel, 18: 396128-32, 19: 397031-7, 20: 397097-14



تصویر ۵- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نمونه‌های سیب‌زمینی با استفاده از آغازگر 106RX (نشانگر اختصاصی ژن Rx2).

شماره ۱ تا ۳۰ به ترتیب از چپ به راست بیانگر M مارکر (100 bp) ۱: 397031-11، ۲: 397007-9، ۳: 397082-10، ۴: 397081-1، ۵: 397031-1، ۶: 396151-5، ۷: 397074-2، ۸: 397081-4، ۹: 396309-7، ۱۰: 397009-8، ۱۱: 397067-11، ۱۲: 397045-7، ۱۳: 397045-13، ۱۴: Bzura، ۱۵: 396140-4، ۱۶: 397008-14، ۱۷: 397007-4، ۱۸: 397007-16، ۱۹: 397045-1، ۲۰: Emrad، ۲۱: Arinda، ۲۲: Opal، ۲۳: Labadia، ۲۴: Hermes، ۲۵: Difella، ۲۶: Rosseta، ۲۷: Impala، ۲۸: Cara، ۲۹: Katica، ۳۰: 397015-11 می‌باشند.

Fig. 5. Electrophoresis pattern of examined potato genotypes using primer pairs, 106Rx2 (Rx2-marker specific); Samples from left to right: M: Lader (100bp), 1: 397031-11, 2: 397007-9, 3: 397082-10, 4: 397081-1, 5: 397031-1, 6: 396151-5, 7: 397074-2, 8: 397081-4, 9: 396309-7, 10: 397009-8, 11: 397067-11, 12: 397045-7, 13: 397045-13, 14: Bzura, 15: 396140-4, 16: 397008-14, 17: 397007-4, 18: 397007-16, 19: 397045-1, 20: Emrad, 21: Arinda, 22: Opal, 23: Labadia, 24: Hermes, 25: Difella, 26: Laddy Rosseta, 27: Impala, 28: Cara, 29: Katica, 30: 397015-11

شد که دارای یکی از دو ژن *Rx1* و یا *Rx2* بودند. در مقابل در هیچ کدام از ژنوتیپ‌هایی که در آزمایشات بیولوژیکی حساس ارزیابی و شناسایی شدند، نشانگر اختصاصی مرتبط با این ژن‌ها تکثیر نشد (جدول ۵).

مقایسه نتایج آزمایشات بیولوژیکی و مولکولی نشان داد که با یکدیگر مطابقت دارند به طوری که ژنوتیپ‌هایی که در آزمایشات گلخانه‌ای به عنوان مقاوم از نوع ER ارزیابی و شناسایی شدند، با آزمایشات مولکولی مشخص



جدول ۵- واکنش بیولوژیکی ارقام و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی به PVX و مقایسه آن با نتایج نشانگرهای مولکولی

Table 5. Biological reaction of potato cultivars and promising clones to PVX in comparison with results of molecular markers

ردیف No.	رقم Cultivar	واکنش بیولوژیکی			ردیف No.	رقم/کلون Cultivar/Clone	واکنش بیولوژیکی			ردیف No.	کلون Clone	واکنش بیولوژیکی		
		Biological Reaction	Rx1	Rx2			Biological Reaction	Rx1	Rx2			Biological Reaction	Rx1	Rx2
1	Oceania	HR	-	-	21	Hermes	S	-	-	41	397045-13	S	-	-
2	Marabel	ER	+	-	22	Jelly	S	-	-	42	397007-4	S	-	-
3	Caesar	S	-	-	23	Arinda	S	-	-	43	397031-1	S	-	-
4	Markies	HR	-	-	24	White Lady	ER	-	+	44	397081-4	ER	+	-
5	Opal	ER	+	-	25	Lorett	ER	-	+	45	397007-16	S	-	-
6	Caruso	S	-	-	26	Milva	HR	-	-	46	397015-11	ER	-	+
7	Pamela	S	-	-	27	Elodie	ER	-	+	47	396151-5	ER	+	-
8	Lady Rosetta	ER	+	-	28	Impala	S	-	-	48	397097-14	ER	-	+
9	Daifla	S	-	-	29	Labadia	ER	+	-	49	397007-9	S	-	-
10	Emeraude	S	-	-	30	Marfona	HR	-	-	50	397045-7	HR	-	-
11	Burren	HR	-	-	31	Sinora	HR	-	-	51	396309-7	ER	+	-
12	Cara	ER	+	-	32	Ramos	HR	-	-	52	397031-7	S	-	-
13	Agria	ER	+	-	33	Savalan	S	-	-	53	397031-16	S	-	-
14	Desiree	S	-	-	34	Fontane	ER	+	-	54	397008-14	S	-	-
15	Luca	ER	-	+	35	Picasso	HR	-	-	55	397009-8	S	-	-
16	Katica	S	-	-	36	TP22-1	S	-	-	56	396140-4	ER	-	+
17	Verona	HR	-	-	37	397081-1	S	-	-	57	397045-1	ER	-	+
18	Demon	S	-	-	38	397082-10	ER	+	-	58	397067-11	ER	+	-
19	Bzura	ER	-	+	39	396128-32	ER	+	-	59	397031-11	ER	+	-
20	Florida	S	-	-	40	397074-2	S	-	-					

HR: واکنش مقاومت فوق حساسیت، ER: واکنش مقاومت بسیار بالا، R: مقاوم، S: حساس.

HR: Hypersensitive Resistance, ER: Extreme Resistance, R: Resistant, S: Susceptible

## سپاسگزاری

امکانات لازم برای اجرای بهینه این پروژه تحقیقاتی را فراهم آوردند سپاسگزاری می کنند. از آقای مهندس علی نصراللهی که در کلیه مراحل اجرای این پروژه تحقیقاتی کمال همکاری را داشتند نیز تشکر می نمایم.

داده های مورد استفاده در این مقاله از پروژه تحقیقات شماره ۲-۰۳-۰۳-۹۳۱۶۱ مصوب موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر بود. نگارندگان بدینوسیله از مدیریت آن موسسه که

## References

- Ahmadvand, R., Wolf, I., Gorji, A. M., Polgár, Z., and Taller, J. 2013.** Development of molecular tools for distinguishing between the highly similar *Rx1* and *Rx2* PVX extreme resistance genes in tetraploid potato. *Potato Research* 56: 277-291.
- Anonymous, 2019.** Statistical Year Book of Agricultural Crops. 1<sup>st</sup> Volume: Filed Crops. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. 97 pp. (in Persian).
- Beemster, A. B. R. 1987.** Virus translocation and mature-plant resistance in potato plants. pp. 116-125. In: de Bokx, J. A., and van der Want, J. P. H (eds.). *Viruses of potatoes and seed potato production*. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.
- Bendahmane, A., Baulcombe, D. C., and Kanyuka, K. 1999.** The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11: 781-791.
- Bendahmane, A., Querci, M., kanyuka, K., and Baulcombe, D. C. 2000.** Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant Journal* 21: 73-81.
- Bonierbale, M. 2007.** Procedures for standard evaluation trials of advanced potato clones. An International cooperator's guide. International Potato Center, Peru. 126 pp.
- Clark, M. F., and Adams, A. 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.
- Cockerham, G. 1970.** Genetical studies on resistance to *Potato viruses X* and *Y*. *Heredity* 25: 309-348.
- de Bokx, J.A., Beemster, R. H. R., Lambers, H. J., van Hoof, H. A., Maat, D. Z., Reestman, A. J., Rozendaal, A., Schepers, A., and van Slogteren, D. H. M. 1972.** *Viruses of potatoes and seed-potato production*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, The Netherlands. 237 pp.
- De Jong, W., Forsyth, A., Leister, D., Gebhardt, C., and Baulcombe, D. C. 1997.** A

- potato hypersensitive resistance gene against *Potato virus X* maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 246-252.
- Ezekiel, R., Singh, N., Sharma, S., and Kaur, A. 2013.** Beneficial phytochemicals in potato-a review. *Food Research International* 50: 487-496.
- Huisman, M. J., Linthorst, H. J. M., Bol, J. F., and Cornelissen, J. C. 1988.** The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *Journal of General Virology* 69: 1789-1798.
- Jones, R. A. C. 1990.** Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Annals of Applied Biology* 117: 93-105.
- Kanyuka, K. B. A., Bendahmane, A., van der Voort, J. N. A. M. R., and van der Vossen, E. A. G. 1999.** Mapping of intra locus duplications and introgressed DNA: aids to map-based cloning of genes from complex genomes illustrated by physical analysis of the *Rx* locus in tetraploid potato. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 679-689.
- Loebenstein, G., and Carr, J. P. 2006.** Natural resistance mechanisms of plants to viruses. Springer. The Netherlands. 547 pp.
- Massumi, H., Poormohammadi, S., Pishyar, S., Maddahian, M., Heydarnejad, J., Hosseini-Pour, A., van Bysterveldt, K., and Varsani, A. 2014.** Molecular characterization and field survey of Iranian *Potato virus X* isolates. *Virus Disease* 25: 338-344.
- Ozkaynak, E., Devran, Z., and Kaheci, E. 2018.** Development of Turkish potato varieties tolerance to *Potato virus Y* and *Potato virus X*. *Ekin. Journal of Crop Breeding and Genetics* 4: 55-59.
- Pajouhandeh, M. 2001.** Creation of *in vitro* virus free potato germplasm bank. M. Sc. Thesis. Tarbiat Modares University. Tehran, Iran. 185 pp.
- Ritter, E., Debener, T., Barone, A., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1991.** RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to *Potato virus X* (PVX). *Molecular and General Genetics* 227: 81-85.
- Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., and Ahlquist, P. 2011.** Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938-954.
- Shaikhaldein, H. O., Hoffmann, B., Alaraidh, I. A., and Aseel, D .G. 2018.** Evaluation of extreme resistance genes of *Potato virus X* (*Rx1* and *Rx2*) in different

potato genotypes. Journal of Plant Diseases and Protection 125: 251-257.

**Shokrollahi, N., Pourrahim, R., Farzadfar, Sh., and Nazari, S. 2012.** Biological and molecular characterization of two *Potato virus X*- isolates from Hamedan province.

Applied Entomology and Phytopathology 80: 119-130 (in Persian).

**Turesson, S., Dayteg, C., Hagberg, P., Manninen, O., Tanhuanpää, P., Tenhola-Roininen, T., Kiviharju, E., Weyen, J., Förster, J., and Schondelmaier, J. 2007.**

Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding programmes. Euphytica 158: 305-312.

**Walbot, V., and Warren, C. 1988.** Regulation of *Mu* element copy number in maize lines with an active or inactive Mutator transposable element system. Molecular and General Genetics 211: 27-34.