

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 الکتروترایی 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.

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 سال ۱۳۸۴-۱۳۸۳ 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 این که 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 سیب‌زمینی (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 آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و یا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، چهار گروه شامل PVX^A ، PVX^C ، PVX^{HB} و PVX^O 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 آلل‌های مربوطه ($nxnb$ ، $Nxnb$ ، $NxNb$ ، $nxNb$) نیز چهار گروه $X1$ ، $X2$ ، $X3$ ، $X4$ تشخیص داده شده است (Cockerham, 1958). نژاد PVX_3 شایع‌ترین نژاد این ویروس است. نژاد HB به هر دو ژن Nx و Nb 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

(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). 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

گزارش شده و اخیراً گروه‌های نژادی او ۳ 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, 1987¹). 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, 1970²). 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

1,2: [www.http://biology.anu.edu.au](http://biology.anu.edu.au).

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. (Corsi et al., 1994) ژرم پلاسما سیب‌زمینی را با مقاومت بالا به صورت مقاومت ترکیبی نسبت به PVY، PVX 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

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 Bzura، Pilica، Brda، Bobr و San مقاومت بالایی نسبت به هر سه ویروس PVY، PVX و PVA داشتند، در حالی که رقم Dryf مقاومت بالایی تنها به

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 mg l^{-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 PVA، PVX، PVY، 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 تک‌گره (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 PVA و PVY، PVX

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 PVA، PVY، PVX و 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 PVA، PVY، PVX با استفاده از بافر فسفات (PBS) با $\text{pH}=7/4$ 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 (*Gomphrena globosa*) و عروسک پشت‌پرده (*Physalis floridana*) و توتون (*Nicotiana tabacum* c.v. samsun) به صورت مکانیکی مایه‌زنی شدند.

بوته‌های با علائم تبیک آلودگی برای هر یک از ویروس‌ها انتخاب و ضمن عصاره‌گیری با استفاده از بافر فسفات PBS با $\text{pH}=7/4$

مایه‌زنی انجام شد. برای اطمینان ۴۸ ساعت بعد مجدداً مایه‌زنی تکرار شد. در هر آزمایش دو تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. یکی شاهد منفی که به جای عصاره ویروس از بافر فسفات برای مایه‌زنی رقم حساس استفاده شد و دیگری تیمار شاهد حساس بود که برای PVX از رقم Kennebec و برای PVY از رقم Shepody استفاده شد.

حدود ۲۵ روز بعد از مایه‌زنی و یا بعد از ظهور علائم روی گیاه شاهد حساس، با استفاده از آزمون DAS-ELISA میزان جذب هر یک از گیاهچه‌ها یادداشت شد.

به دلیل زیاد بودن تعداد گیاهچه‌ها در هر آزمایش، از چند تشتک الایزا استفاده شد. برای یکنواخت کردن میزان جذب تشتک‌های هر آزمایش، از شاهد منفی استفاده شد (در هر تشتک عصاره گیاه سالم در سه چاهک به عنوان شاهد منفی اضافه شد). پس از یکنواخت کردن (Adjust) جذب همه تشتک‌های الایزا، حد کلی آلودگی با استفاده از میانگین کلی شاهد‌های منفی محاسبه شد (سه برابر میانگین شاهد منفی). داده‌های حاصل از آزمون الایزا در هر سه آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی مقاومت کلون‌ها نسبت ویروس PVY
با توجه به این که متوسط کل جذب

جهت تکثیر روی گیاه توتون مایه زنی شدند. حدود سه هفته بعد که علائم توسعه یافت، هر یک از گیاهچه‌های توتون با استفاده از آزمون DAS-ELISA نسبت به ویروس‌های مذکور آزمایش شدند و آلودگی آن‌ها به اثبات رسید. گیاهچه توتون‌های آلوده در محیط MS به صورت تک‌گره کشت بافت شده و جهت انجام مراحل ارزیابی نگهداری شدند.

ارزیابی مقاومت به ویروس‌های PVY، PVX و

PVA

در این تحقیق سه آزمایش جداگانه برای هر یک از ویروس‌های PVY، PVX و PVA انجام شد. هر سه آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه با دمای ۱۶-۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بدین ترتیب که در هر تکرار سه غده بذری از هر کلون در داخل گلدان‌های حاوی خاک، ماسه و پیت موس به نسبت‌های ۱:۱:۲ کاشته شد. در هر آزمایش حدود سه هفته بعد از کشت بوته‌ها به صورت مکانیکی توسط هر یک از ویروس‌های PVY، PVX و PVA به طور جداگانه مایه‌زنی شدند. برای تهیه زادمایه، عصاره برگ‌های گیاه آلوده به ویروس‌های فوق در هاون چینی در بافر فسفات تهیه و سوسپانسیونی به نسبت وزنی/حجمی ۱:۱ تهیه شد. برگ‌های کلون‌های آزمایشی با پودر کربوران‌دوم mesh ۶۰۰ غبارپاشی شد و با مالش دادن ۲-۳ برگچه از هر گیاه با پارچه ململ آغشته به سوسپانسیون،

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 تستک‌های الیزا 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 الیزا 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 و ۲-۳۹۶۱۵۱ در گروه مقاوم‌ها قرار گرفتند (جدول ۴).

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

شاهدهای منفی تستک‌های الیزا 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 معنی‌وجود دارد (جدول ۱).

با مقایسه میانگین میزان جذب نوری با طول موج ۴۰۵ نانومتر در آزمون الیزا 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، ۲-۳۹۶۱۵۱، ۸-۳۹۶۱۵۱، ۲-۹۷۰۰۸، ۱۴-۳۹۷۰۰۷ به عنوان حساس به ویروس PVY در نظر گرفته شدند. سایر کلون‌ها شامل ۸-۳۹۷۰۰۹، ۳-۳۹۷۰۰۸، ۱۱-۳۹۷۰۰۷، ۲-۳۹۶۱۵۱، ۶-۳۹۷۰۰۹، ۲-۳۹۷۰۱۵، ۳-۳۹۷۰۰۹، 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

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.	ضرب تغییرات	11.12	

** : Significant at 1% probability level

** : در سطح احتمال 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

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

مورد بررسی را نسبت به ویروس‌های PVX، PVY و PVA را نشان می‌دهد.

دوسسی 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 الیزا 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

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 الیزا 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 و 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

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

** : Significant at 1% probability level.

** : در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است.

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 % probability level (LSD).

S: Susceptible

R: Resistant

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

S: Susceptible حساس R: Resistance مقاوم

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)

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

نسبت به ویروس‌های PVA و PVY در دمای پایین بروز می‌کند (Valkonen et al., 1998)؛ لکه‌های نکروز فوق حساسیت در گیاهچه‌های 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, Netherlands.*
- Bonierbale, M., Haan, S., and Forbes, E. 2005.** Procedures for standard evaluation trials 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.

- 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., Carvalho, 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.

- 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.