



## بررسی راندمان انتقال ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) توسط پیوند زدن جهت به کارگیری در تحقیقات مختلف

حدیثه سادات حسینی پویا<sup>۱\*</sup>، محمد فارسی<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ۲- عضو هیات علمی دانشگاه فردوسی مشهد

\* نویسنده مسئول

[hadispouya@yahoo.com](mailto:hadispouya@yahoo.com)

### چکیده

انتقال ویروس ها به گیاه در تحقیقات مختلف از جمله بررسی بیماریزایی و تشخیص ویروس، اثر متقابل میزبان-ویروس، به گزینی برای مقاومت به ویروس ها و... مورد نیاز است. یکی از راههای انتقال در برخی از ویروس های گیاهی روش پیوند زدن است. در این تحقیق از گوجه فرنگی آلوده به عنوان پیوندک برای انتقال ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی به ۲۸ لاین گوجه فرنگی استفاده نمودیم. پیوند زدن در مرحله ۷-۸ برگی گیاه صورت گرفت و پس از ۴۵ تا ۵۰ روز برای اطمینان از انتقال ویروس همه لاین ها را پس از استخراج DNA توسط واکنش PCR کنترل نمودیم. ویروس در همه گیاهانی که علائم نشان داده بودند، پس از ۵ تا ۶ هفته ردیابی شد. می توان گفت راندمان انتقال ویروس به این لاین ها توسط پیوند زدن بیش از ۷۰ درصد می باشد. با توجه به درصد موفقیت این روش در انتقال ویروس می توان از آن به عنوان یک روش مطمئن در انتقال ویروس مورد نظر استفاده نمود. این اطمینان بیشتر در لاین هایی که مورد آزمون بوده اند ایجاد می شود.

واژگان کلیدی: پیوند زدن، انتقال، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی، PCR.

### مقدمه

در مطالعات آزمایشگاهی جهت بررسی بیماریزایی و تشخیص ویروس، اثر متقابل میزبان-ویروس، به گزینی برای مقاومت به ویروس ها و... نیاز است که در بررسی های آزمایشگاهی و گلخانه ای و ارزیابی نهایی مزرعه ای از روش هایی برای تلقیح و انتقال آلودگی ویروسی استفاده شود. اگرچه بسیاری از ویروس های گیاهی به ویژه آنهایی که ایجاد موزائیک می کنند، از طریق مکانیکی منتقل می شوند اما ویروس هایی که در آوندهای گیاه مستقر می شوند از این طریق قابل انتقال نیستند. یکی از راههای انتقال ویروس ها در برخی از ویروس های گیاهی روش پیوند زدن است. تاکنون در تحقیقات مختلف از روش پیوند زدن برای انتقال ویروس هایی مثل ویروس موزائیک زرد سیب زمینی (PVMV)، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) و... استفاده شده است (Boissot, 2008). با بررسی درصد موفقیت این روش در انتقال ویروس می توان از آن به عنوان یک روش مطمئن در انتقال ویروس مورد نظر استفاده نمود. این اطمینان بیشتر در لاین هایی که مورد آزمون بوده اند ایجاد می شود. اخیراً در چین هم بر روی انتقال ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی توسط پیوند مطالعه ای صورت گرفته که نتایج آن بیانگر امکان استفاده موفق از این روش برای انتقال ویروس است (Li و همکاران، 2009). در مورد ویروس های مخرب انجام برنامه های اصلاحی برای کاهش خسارت



اقتصادی مستلزم پیشرفت و توسعه روش های تلقیح، بررسی توارث مقاومت و تعیین اثرپذیری یک میزبان مقاوم به اپیدمی بیماری است (Lapidot, ۲۰۰۷).

#### مواد و روش ها

مواد آزمایش عبارت بود از ۲۸ لاین گوجه فرنگی که هر کدام در ۵ تکرار در شرایط گلخانه عاری از آلودگی کشت شدند. پیوند زدن را در مرحله ۸-۷ برگی که گیاه برای پیوند زدن قدرت لازم را دارد انجام شد. پس از مشاهده علائم برای اطمینان از انتقال ویروس همه لاین ها را توسط واکنش PCR کنترل نمودیم. برای این منظور ابتدا DNA ویروس را استخراج نمودیم. شرایط PCR مورد استفاده شامل سه مرحله ۳۵ سیکلی ۳۰ ثانیه ای در دماهای ۹۵°C، ۶۰°C و ۷۲°C و در مرحله آخر ۷ دقیقه در ۷۲°C می باشد. واکنش PCR را با استفاده از آغازگر های اختصاصی انجام دادیم. این آغازگر ها باعث تکثیر قطعه ۵۸۰ جفت بازی داخل ژن کد کننده پوشش پروتئینی می شوند (Accotto و همکاران، ۲۰۰۰). آغازگر های اختصاصی مورد استفاده عبارتند از:

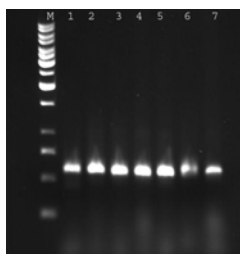
TY1(+):	5'-GCCCATGTATCGGAAGCC-3'
TY2(-):	5'-GGATTAGAGGCATGCGTAC-3'

#### نتایج و بحث

با توجه به نتایج بدست آمده می توان نتیجه گرفت که درصد موفقیت انتقال ویروس توسط پیوند بیش از ۷۰٪ می باشد (جدول ۱). هر لاین در ۵ تکرار کشت شد که برخی از این تکرارها قبل از پیوند زدن از بین رفتند. اکثریت گیاهان علائم بارز نشان دادند. گرچه پیوند ۱۰۰٪ ویروس را انتقال نداده اما با توجه به درصد گیاهان آلوده شده می توان از این روش برای انتقال ویروس استفاده نمود. البته شایان ذکر است که گیاهان در گلخانه عاری از آلودگی به هر گونه عامل بیماریزا و همچنین آفات به ویژه سفید بالک ها برای جلوگیری از اثرات این عوامل بر روی گیاهان مورد آزمون بودند. گیاهان بدون علامت نیز توسط واکنش PCR کنترل گردیدند زیرا ممکن است که با وجود انتقال ویروس بیماری بدون علامت باشد. تکرارهای بدون علامت ما به علت عدم موفقیت پیوند علامتی نشان ندادند و عاری از ویروس بودند. ویروس در همه گیاهانی که علائم نشان داده بودند ردیابی شد. در این تحقیق در پنجمین و ششمین هفته پس از انتقال ویروس توسط پیوند، علائم ظاهر شدند.

جدول ۱- تعداد گیاه پیوند زده شده از هر لاین و تعداد گیاه دارای علائم آلودگی پس از پیوند

شماره لاین	تعداد گیاه پیوند زده شده	تعداد گیاه آلوده	شماره لاین	تعداد گیاه پیوند زده شده	تعداد گیاه آلوده
۱	۴	۳	۱۵	۳	۳
۲	۵	۳	۱۶	۳	۲
۳	۵	۳	۱۷	۳	۲
۴	۳	۲	۱۸	۴	۳
۵	۳	۲	۱۹	۳	۲
۶	۳	۲	۲۰	۳	۳
۷	۴	۳	۲۱	۳	۲
۸	۳	۲	۲۲	۳	۲
۹	۳	۳	۲۳	۳	۲
۱۰	۳	۲	۲۴	۳	۲
۱۱	۳	۲	۲۵	۳	۲
۱۲	۳	۳	۲۶	۳	۲
۱۳	۳	۲	۲۷	۵	۵
۱۴	۳	۲	۲۸	۳	۲



تصویر ۱- پروفیل بانندی حاصل از ردیابی ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی توسط PCR بر اساس پرایمراختصاصی (+, -) TY 1,2

### نتیجه گیری کلی

استفاده از روش پیوند زدن در انتقال ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه فرنگی (TYLCV) به لاین های مورد آزمایش موفقیت آمیز بود.



#### منابع

1. Accotto, G.P., Navas-Castillo, J., Noris, E., Moriones, E., and Louro, D. 2000. Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 106: 179-186.
2. Boissot, N., Urbino, C., Dintinger, J., Pavis, C. 2008. Vector and graft inoculations of Potato yellow mosaic virus reveal recessive resistance in *Solanum pimpinellifolium*. *Annals of applied biology*. 152(2):263-269.
3. Lapidot, M. 2007. Screening for TYLCV-Resistance Plants using Whitefly-Mediated Inoculation. Springer Netherlands pub. 329-342.
4. Li, Y., Longying, Z., Yanhui, W., shaojun, Y., Hui, Z. and Weimin, Z. 2009. Detection of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Shanghai and study on graft inoculation. *Genomics and Applied Biology*. 28 (1): 115-118.

### Study of Tomato yellow leaf curl virus inoculation by grafting to apply in different researchs

Hadiseh sadat Hosseini-pouya<sup>1\*</sup>, Mohammad Farsi<sup>2</sup>

1Agricultural Biotechnology(MSc), 2 Faculty of Agriculture, Ferdosi University of Mashhad.

\* Corresponding:

[hadispouya@yahoo.com](mailto:hadispouya@yahoo.com)

#### Abstract

Inoculation of viruses is important in different researchs such as virulence, host-virus interaction, screening for viruses resistance, etc. One of the viruses inoculation methods is grafting. In graft inoculation, TYLCV (Tomato yellow leaf curl virus)-infected tomato as scions from source plants of tomato were side graft-inoculated with 28 health tomato lines stems. Total DNA were extracted from 28 tomato lines after 45-50 days for PCR detection. The results showed that most of them infection after 5-6 weeks. Grafting efficiency is up 70 per cent. Thereby, graft-inoculation can be used for virus inoculation in different researchs.

**Key words:** grafting, inoculation, Tomato yellow leaf curl virus, PCR.