

تأثیر آلودگی ویروس موزاییک خیار و ویروس موزاییک کلم گل بر مقاومت کلزا به ویروس موزاییک شلغم

سیده فاطمه نوربخش شورا^۱ و مسعود شمس بخش^{۲*}

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۲۴)

چکیده

ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus*, TuMV) از مزارع کلزا به طور گسترده گزارش شده است. کشت رقم های مقاوم بهترین راه کنترل بیماری های ویروسی است. با این وجود گیاهان مقاوم به یک ویروس در آلودگی هم زمان با سایر ویروس ها ممکن است مقاومت خود را از دست بدهند. از این رو در پژوهش حاضر تأثیر آلودگی مخلوط TuMV، با ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) و ویروس موزاییک کلم گل (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) روی مقاومت یک رقم متحمل کلزا (کرج ۳) و یک لاین کلزای تراریخته از رقم بهاره RGS003 دارای سازه سنجاق سری با مقاومت بالا در برابر TuMV در شرایط گلخانه بررسی شد. مایه زنی گیاهان به روش مکانیکی و ارزیابی غلظت نسبی TuMV با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی انجام گرفت. نتایج این پژوهش نشان دادند آلودگی هم زمان TuMV و CaMV تأثیری روی مقاومت کلزای تراریخته مقاوم به TuMV ندارد. نتایج RT-PCR نیمه کمی نیز اختلاف معنی داری در غلظت TuMV در حضور CaMV نشان ندادند. در حالی که برهمکنش هم افزایی بین TuMV و CMV قادر به غلبه بر مقاومت گیاهان کلزای تراریخته در برابر TuMV شد. نتایج RT-PCR نیمه کمی نیز نشان دادند غلظت TuMV در گیاه تراریخته در حضور CMV افزایش یافت، در حالی که در رقم کرج ۳ غلظت TuMV تحت تأثیر CMV قرار نگرفت. بنابراین برای معرفی گیاهان تراریخته مقاوم به TuMV لازم است سازه ای طراحی شود که گیاه تراریخته هم زمان به TuMV و CMV مقاوم شوند.

واژه های کلیدی: برهمکنش ویروس ها، سرکوب خاموشی RNA، *Brassica napus*.

Effect of *Cucumber mosaic virus* and *Cauliflower mosaic virus* Infections on the Resistance of Canola to *Turnip mosaic virus*

Seyedeh Fatemeh Nourbakhsh Shourabi¹ and Masoud Shams-bakhsh^{2*}

1, 2. Former M. Sc. Student and Associate Professor of Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: Dec.12, 2018 - Accepted: Apr. 13, 2019)

ABSTRACT

Turnip mosaic virus (TuMV) has frequently been reported from canola fields. Cultivation of resistant varieties is the best method to control viral diseases. However, plants that are resistant to a virus may lose their resistance in co-infection with other viruses. Therefore, in the present study the effect of mixed infection of TuMV with *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) on the resistance of a tolerant canola cultivar (Karaj 3) and a transgenic canola of RGS003 spring variety with hairpin construct and high resistance to TuMV was investigated under greenhouse conditions. Canola plants were inoculated mechanically and then, relative TuMV content was assayed by semi-quantitative RT-PCR. Results demonstrated that mixed infection of TuMV and CaMV did not affect the resistance of transgenic canola plants against TuMV. Also, there was not any significant difference in TuMV content in the presence of CaMV. However, synergistic interaction between TuMV and CMV could overcome the resistance of canola plants to TuMV. The result of semi-quantitative RT-PCR indicated that TuMV accumulation was enhanced in the presence of CMV in transgenic plants, whereas TuMV levels were not affected by co-infection with CMV in Karaj 3. Therefore, it is concluded that for the introduction of TuMV-resistant transgenic plants, it is necessary to design a construct that the resulting transgenic plants would also be resistant to CMV simultaneously.

Keywords: *Brassica napus*, RNA silencing suppression, virus interactions.

* Corresponding author E-mail: shamsbakhsh@modares.ac.ir

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) یکی از اعضای خانواده Brassicaceae و یکی از مهم‌ترین منابع روغن گیاهی در جهان است (Banuelos *et al.*, 2002). بیماری‌های ویروسی کلزا سالانه خسارت‌های کمی و کیفی بالایی به این محصول مهم کشاورزی وارد می‌کنند. ویروس موزاییک شلغم (*Turnip mosaic virus*, TuMV) یکی از شایع‌ترین این عوامل است که انتشاری جهانی دارد (Walsh & Jenner, 2002). ایجاد و معرفی گیاهان مقاوم به ویروس از مؤثرترین و اقتصادی‌ترین راه‌های کنترل بیماری‌های ویروسی گیاهان است. خاموشی RNA یا خاموشی ژن پس از رونویسی (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS) به‌عنوان یک سازوکار دفاعی علیه نوکلئیک اسید خارجی عمل می‌کند و یکی از انواع مقاومت برگرفته از بیمارگر است (Dougherty *et al.*, 1994). فرآیند خاموشی بعد از رونویسی از طریق تولید RNAهای دولا شروع می‌شود و با مقاومت بالایی در برابر ویروس‌ها همراه است. گیاهان تراریخته بیان‌کننده RNA دولا به شکل سنجاق سری تا ۹۰ درصد بازدهی در خاموشی ژن نشان داده‌اند (Smith *et al.*, 2000). این روش در تولید گیاهان کلزا مقاوم به TuMV نیز موفق بوده است (Jafari *et al.*, in press).

آلودگی هم‌زمان دو یا چند ویروس در گیاه یک پدیده معمول و رایج است که در بعضی از موارد منجر به تشدید علائم می‌شود. علاوه بر این آلودگی توأم ممکن است بر غلظت ویروس‌های آلوده‌کننده تأثیر بگذارد (Syller, 2012). ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus*, CMV) قادر به آلوده کردن طیف وسیعی از محصولات زراعی مهم است و به دلیل خسارات اقتصادی فراوان و پراکنش جهانی به‌مثابه یکی از مهم‌ترین ویروس‌های آلوده‌کننده گیاهان شناخته شده است (Palukaitis & García-Arenal, 2003). برهمکنش هم‌افزایی بین CMV و پوتی‌ویروس‌ها گزارش شده است، به‌عنوان مثال آلودگی هم‌زمان TuMV و CMV در گیاهان *Nicotiana benthamiana* به افزایش شدت علائم منجر شده است (Takeshita *et al.*, 2012). به‌علاوه آلودگی توأم CMV با سایر ویروس‌های گیاهی

در اغلب موارد منجر به شکست مقاومت گیاهان و وقوع بسیاری از بیماری‌های مهم ویروسی در گیاهان شده است. به‌عنوان مثال گزارش شده است آلودگی هم‌زمان CMV و ویروس پیسک فلفل (*Pepper mottle virus*, PepMoV)، منجر به شکسته شدن مقاومت یک رقم مقاوم فلفل در برابر PepMoV شده است (Guerini & Murphy, 1999). شکسته شدن مقاومت گیاهان آرابیدوپسیس تراریخته مقاوم به TuMV در اثر آلودگی با CMV نیز گزارش شده است (Nomura *et al.*, 2014). بر اساس آزمایش‌های سرولوژیکی و بیولوژیکی وجود ویروس‌های موزاییک شلغم، زردی غربی چغندر (*Beet western yellow virus*, BWYV)، موزاییک کلم‌گل (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)، پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) و موزاییک خیار از گیاه کلزا از ایران گزارش شده است (Shahraeen *et al.*, 2003; Zahedi, 2010). از این‌رو، بررسی واکنش گیاهان مقاوم معرفی‌شده برای یکی از ویروس‌های فوق، نسبت به سایر ویروس‌ها ضروری است. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی پایداری مقاومت طبیعی و برگرفته از بیمارگر گیاهان کلزا به TuMV در آلودگی توأم با CMV و CaMV است.

مواد و روش‌ها

رقم‌های کلزا

در این پژوهش لاین hp-7 به‌عنوان کلزای تراریخته از رقم بهاره RGS003 دارای سازه سنجاق سری با مقاومت بالا در برابر TuMV (Jafari *et al.*, in press)، رقم RGS003 (غیر تراریخته) به‌عنوان رقم حساس و رقم کرج ۳ به‌عنوان گیاه غیر تراریخته متحمل به TuMV (Jafari *et al.*, 2016) استفاده شدند. بذر رقم‌های RGS003 و کرج ۳ از مرکز تحقیقات دانه‌های روغنی کشور تهیه شدند.

منابع ویروسی

منشأ جدایه ویروس موزاییک شلغم خالص‌شده از گیاه *Brassica chinensis* با رس‌شمار Ku535893 و منشأ ویروس موزاییک کلم‌گل شامل همسانه عفونت‌زای

استفاده از آزمون PCR شناسایی شد. برای این منظور از آغازگرهای CP-130-F و CP-130-R استفاده شد (Jafari *et al.*, in press). آزمون PCR با استفاده از کیت تجاری Taq master mix (2X) شرکت Amplicon و طبق دستورالعمل آن در دستگاه ترموسایکلر SensQuest thermocycler (Germany) انجام شد. برنامه PCR شامل واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه بود.

کاشت بذرها و اجرای آزمایش در شرایط گلخانه

بذرهای حاصل از گیاهان تراریخته لاین T1 و بذرهای گیاهان غیر تراریخته رقم‌های کرج ۳ و RGS003 در گلدان‌های پلاستیکی کشت و در گلخانه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور گزینش گیاهان تراریخته از غیر تراریخته، گیاهان لاین T1 در مرحله ۳-۵ برگی با عصاره برگ‌های گیاهان آلوده به TuMV مایه‌زنی شدند و با استفاده از سامانه نمره‌دهی ۸-۰ (Jafari *et al.*, 2016) شد. علاوه بر این از علف‌کش فسفینوتریسن (با نام تجاری باستا) به عنوان گزینشگر انتخابی گیاهان تراریخته از غیر تراریخته استفاده شد. در این آزمون با استفاده از گوش پاک‌کن سطح برگ گیاهان در مرحله رشدی با ارتفاع ۳۰-۲۰ سانتی‌متری با آخرین رقت علف‌کش باستا (۱/۰ میلی‌گرم ماده مؤثره بر میلی‌لیتر) که باعث بروز نکروز در برگ‌های کلزا می‌شود، تیمار شدند (Jafari *et al.*, in press). واکنش گیاهان در برابر علف‌کش ۳-۵ روز بعد ثبت شد. بذرهای حاصل از گیاهان T1 نیز به منظور اثبات تراریخته بودن والدشان روی محیط کشت حاوی علف‌کش باستا به میزان ۱۰ میلی‌گرم ماده مؤثره در لیتر قرار داده شدند. گزینش گیاهان تراریخته از غیر تراریخته ۳۰-۲۵ روز بعد از کشت بذرها انجام گرفت.

استخراج DNA و آزمون PCR

جدایه CM1841 به نام pCa122 (Anderson *et al.*, 1991) با رس شمار V00140 بود. به منظور فعال‌سازی این دو ویروس برگ‌های آلوده در بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH ۷/۴ عصاره گیری و با پودر کربورانوم به برگ‌های شلغم مایه‌زنی شدند. در این پژوهش از ویروس موزاییک خیار جدایه فارس (اهدایی مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز) استفاده شد. جهت فعال‌سازی این ویروس، برگ‌های آلوده به کدو مایه‌زنی شدند، بعد از هفت روز علائم سیستمیک ظاهر و آلودگی ویروسی تأیید شدند.

گزینش گیاهان تراریخته لاین T1

بذرهای حاصل از گیاهان تراریخته لاین T0، در گلدان‌های پلاستیکی کاشته و در گلخانه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور گزینش گیاهان تراریخته از غیر تراریخته، گیاهان لاین T1 در مرحله ۳-۵ برگی با عصاره برگ‌های گیاهان آلوده به TuMV مایه‌زنی شدند و با استفاده از سامانه نمره‌دهی ۸-۰ (Jafari *et al.*, 2016) شد. علاوه بر این از علف‌کش فسفینوتریسن (با نام تجاری باستا) به عنوان گزینشگر انتخابی گیاهان تراریخته از غیر تراریخته استفاده شد. در این آزمون با استفاده از گوش پاک‌کن سطح برگ گیاهان در مرحله رشدی با ارتفاع ۳۰-۲۰ سانتی‌متری با آخرین رقت علف‌کش باستا (۱/۰ میلی‌گرم ماده مؤثره بر میلی‌لیتر) که باعث بروز نکروز در برگ‌های کلزا می‌شود، تیمار شدند (Jafari *et al.*, in press). واکنش گیاهان در برابر علف‌کش ۳-۵ روز بعد ثبت شد. بذرهای حاصل از گیاهان T1 نیز به منظور اثبات تراریخته بودن والدشان روی محیط کشت حاوی علف‌کش باستا به میزان ۱۰ میلی‌گرم ماده مؤثره در لیتر قرار داده شدند. گزینش گیاهان تراریخته از غیر تراریخته ۳۰-۲۵ روز بعد از کشت بذرها انجام گرفت.

استخراج DNA از گیاهان لاین T1 با استفاده از روش CTAB (Doyle, 1987) انجام شد. بعد از استخراج DNA، سازه انتقال یافته به DNA گیاه

ارزیابی غلظت نسبی TuMV با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی

پانزده روز بعد از مایه‌زنی از برگ‌های فوقانی گیاهان به منظور استخراج RNA نمونه برداری شد. استخراج RNA به روش CTAB (Doyle, 1987) انجام شد. با استفاده از دستگاه نانودراپ کمیت و کیفیت RNA استخراج شده برای هر نمونه تعیین شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت HyperScript RT premix (GeneAll, South Korea) طبق دستورالعمل کیت انجام شد. غلظت نسبی TuMV با آزمون PCR به صورت نیمه کمی با استفاده از جفت آغازگرهای تکثیرکننده بخشی از ژن پروتئین پوششی TuMV (Sanchez *et al.*, 2003) و جفت آغازگرهای 18S (Faria *et al.*, 2006) در دو تکرار ارزیابی شد. برنامه تکثیری به صورت واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و سپس ۲۷ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۵/۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. برای کمی کردن ژل از نرم افزار TotalLab استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (9.1) انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون کمترین اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از ارزیابی علائم نشان دادند رقم RGS003 (غیر تراریخته) به عنوان رقم حساس کلزا که در برابر آلودگی TuMV علائم شدید نشان می‌دهد، در اثر آلودگی توأم TuMV و CMV علائم را شدیدتر نشان داده و گیاه دچار کاهش رشد بیشتری می‌شود (شکل ۱ و جدول ۱). این در حالی است که بعد از مایه‌زنی بوته‌های کلزا به صورت انفرادی با CMV، منحصراً لکه‌های کلروتیک خفیف روی برگ‌های میانی ظاهر شد. از آنجایی که در آلودگی توأم CMV و

TuMV علائم متفاوتی نسبت به آلودگی انفرادی با TuMV ظاهر شد، شاخص جدید با نمرة ۹ تحت عنوان کاهش رشد شدید و بدشکلی برگ‌ها به سامانه نمره‌دهی ۸-۰ اضافه شد. بسیاری از برهمکنش‌های هم‌افزایی که تاکنون گزارش شده‌اند نتیجه سرکوب سازوکار دفاعی میزبان توسط یکی از ویروس‌ها است. در مورد CMV پروتئین 2b در خلق این رابطه هم‌افزایی نقش دارد (Siddiqui *et al.*, 2011; Ryang *et al.*, 2004). پروتئین 2b ویروس موزاییک خیار علاوه بر اینکه در حرکت راه دور و بیماری‌زایی ویروس نقش مهمی دارد، سرکوبگر خاموشی RNA نیز است و در کاهش siRNAها نقش دارد (Ding *et al.*, 1994). هرچند در گیاه آرابیدوپسیس CMV و ویروس چروکیدگی شلغم (*Turnip crinkle virus*, TCV) رابطه آنتاگونیستی دارند (Li *et al.*, 2016).

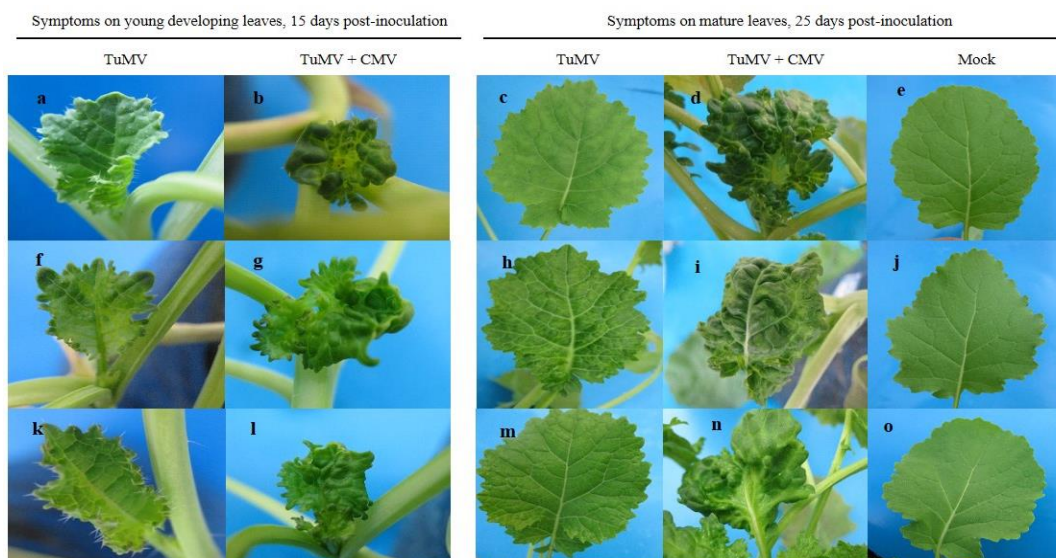
نتایج پژوهش حاضر نیز نشان دادند گیاهان رقم کرج ۳ در هر سه حالت مایه‌زنی (CMV و TuMV هم‌زمان، ابتدا CMV و پنج روز بعد TuMV، ابتدا TuMV و پنج روز بعد CMV) مقاومت خود را در برابر TuMV از دست دادند. در حالتی که گیاهان ابتدا با CMV و پنج روز بعد با TuMV مایه‌زنی شدند علائم با شدت بیشتری نمایان شدند (جدول ۱). در حقیقت یک زمان مشخصی نیاز است تا تجمع ویروس به حدی برسد که بتواند با مقاومت میزبان مقابله کند (García-Cano *et al.*, 2006). در گیاه *Capsicum annuum* cv. Avelar مقاوم به PepMoV، در اثر آلودگی CMV محدودیت حرکت PepMoV تسهیل می‌شود و می‌تواند بافت‌های جوان را به طور سیستمیک آلوده کند (Guerini & Murphy, 1999).

در این پژوهش نیز مشخص شد CMV قادر به سرکوب کردن خاموشی RNA در گیاهان تراریخته مقاوم به TuMV بود و TuMV فرصت آلوده کردن برگ‌های جوان را به دست آورده است. بنابراین به نظر می‌رسد پروتئین 2b در شکسته شدن مقاومت گیاهان تراریخته نقش داشته باشد، این پروتئین از طریق تداخل در حرکت سیگنال‌های خاموشی، می‌تواند PTGS را سرکوب کند. پروتئین 2b در گیاهان تراریخته *Nicotiana tabacum* نیز به عنوان سرکوبگر

مستقر شده است ندارد و از آغاز آن در برگ‌های جدید ممانعت می‌کند (Li *et al.*, 1999).

نتایج بررسی اخیر نیز نشان دادند گیاهان مایه‌زنی شده با تیمار ابتدا TuMV و پنج روز بعد CMV به‌طور معنی‌دار کمتر از گیاهان مایه‌زنی‌شده با تیمار ابتدا CMV و پنج روز بعد TuMV مقاومت خود را از دست دادند (جدول ۱). بنابراین ترتیب مایه‌زنی این دو ویروس در میزان شکسته شدن مقاومت اهمیت دارد. در گیاهان توتون بیان‌کننده RNAهای دولا مقاوم به PVY، هرچه فاصله بین مایه‌زنی CMV و PVY بیشتر می‌شود گیاهان حساسیت بیشتری نشان می‌دهند (Mitter *et al.*, 2003).

خاموشی ناشی از سنس عمل می‌کند (Guo & Ding, 2002). هرچند مقاومت‌های ناشی از RNAهای دولا در ایجاد گیاهان مقاوم به ویروس بسیار مؤثرتر است، با این حال گزارش شده است CMV قادر به سرکوب کردن خاموشی RNA از طریق سازه سنجاق سری در گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس وای سیب‌زمینی (Potato virus Y, PVY) است (Mitter *et al.*, 2003). بعد از آلودگی CMV، خاموشی RNA اغلب در بافت‌های انتهایی و برگ‌های جوان سرکوب می‌شود، در حقیقت پروتئین 2b از انتشار سیگنال خاموشی RNA در قسمت‌های در حال رشد ممانعت می‌کند (Nomura *et al.*, 2014). این پروتئین تأثیری بر بافت‌هایی که PTGS



شکل ۱. علائم ظاهر شده روی گیاهان کلزا در اثر مایه‌زنی مکانیکی TuMV به‌تنهایی و هم‌زمان با CMV در مقایسه با گیاه شاهد مایه‌زنی شده با بافر فسفات (Mock). a, b, c, d, e: Karaj 3. f, g, h, i, j: RGS003 (non-transgenic). k, l, m, n, o: RGS003 (transgenic) (تراریخته)

Figure 1. Symptoms appeared on canola plants by mechanical inoculation with TuMV and co-inoculation with TuMV and CMV in comparison with control plants inoculated with phosphate buffer (Mock). a, b, c, d, e: Karaj 3. f, g, h, i, j: RGS003 (non-transgenic). k, l, m, n, o: RGS003 (transgenic)

جدول ۱. مقایسه میانگین غلظت نسبی TuMV در آلودگی انفرادی و هم‌زمان با CMV و CaMV پانزده روز بعد از مایه‌زنی در گیاه کلزا

Table 1. Means comparison of relative TuMV content in single infection and simultaneous infection with CMV and CaMV, 15 days after inoculation of canola plants

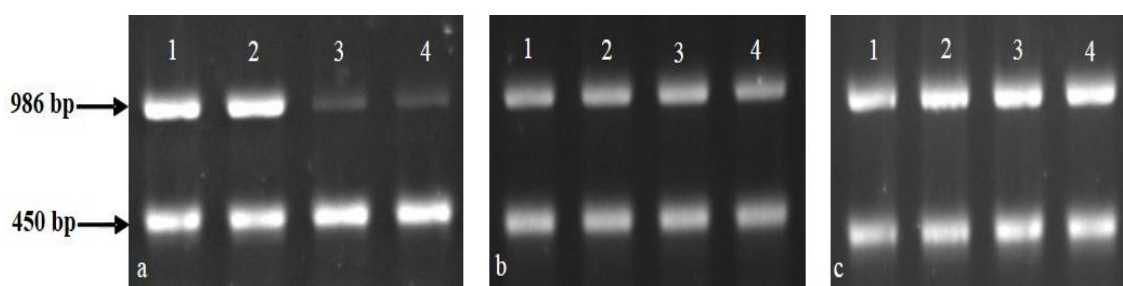
Plants inoculated with	Karaj 3	RGS003 (non-transgenic)	RGS003 (transgenic)
TuMV	1.00 ^a	1.00 ^a	1.00 ^a
TuMV and CMV on the same day	1.04 ^a	1.03 ^a	1.01 ^a
TuMV and CaMV on the same day	1.01 ^a	1.02 ^a	0.54 ^b
TuMV, CaMV and CMV on the same day	1.01 ^a	0.98 ^a	0.55 ^b

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Means indicated by same letters are not significantly different at 5% level.

رقم کرج ۳ و RGS003 (غیر تراریخته) تفاوت معنی داری نسبت به آلودگی انفرادی با TuMV نداشت (شکل ۲ و جدول ۲). در بسیاری از برهمکنش‌های هم‌افزایی که یک پوتی‌ویروس درگیر است، افزایش قابل توجهی در تجمع غیر پوتی‌ویروس گزارش شده است؛ بدون اینکه تجمع پوتی‌ویروس تغییر کند (Bance, 1991; Hamilton & Dodds, 1970). بنابراین افزایش شدت علائم احتمالاً به دلیل افزایش غلظت CMV بوده است، به طوری که در اثر آلودگی توأم CMV و TuMV، تسهیل حرکت CMV از کوتیلدون‌ها به سمت برگ‌های بالایی باعث افزایش چشمگیری در تجمع CMV می‌شود (Sano & Kojima, 1989). در گیاه تراریخته غلظت نسبی TuMV در آلودگی هم‌زمان TuMV و CMV به طور معنی داری افزایش یافت (جدول ۲). این نتیجه با نتایج بسیاری از گزارش‌ها منطبق است که نشان داده‌اند در گیاهان تراریخته در اثر آلودگی CMV، میزان ویروسی که گیاه به آن مقاوم بوده افزایش می‌یابد (Mitter *et al.*, 2003; Mitter *et al.*, 2001; Simon-Mateo *et al.*, 2003). نتایج RT-PCR نیمه کمی نیز تأییدکننده عدم وجود برهمکنش بین TuMV و CaMV بودند به طوری که در هیچ یک از رقم‌های کرج ۳ و RGS003 (تراریخته و غیر تراریخته) تفاوت معنی داری در غلظت نسبی TuMV در آلودگی هم‌زمان با CaMV نسبت به آلودگی انفرادی این ویروس مشاهده نشد (جدول ۱).

ویروس موزاییک کلم گل یکی دیگر از ویروس‌هایی است که آلودگی آن همراه با TuMV و CMV به کرات گزارش شده است (Shahraeen *et al.*, 2003). بنابراین در پژوهش حاضر تأثیر آلودگی توأم CaMV با CMV و TuMV بر مقاومت گیاه کلزا بررسی شد. نتایج نشان دادند آلودگی هم‌زمان CaMV و TuMV تأثیری بر مقاومت گیاهان تراریخته و رقم کرج ۳ نداشت. همچنین آلودگی هم‌زمان CMV و CaMV نیز تأثیری بر شدت علائم ایجادشده در گیاه کلزا نداشت. گزارش‌های دیگری نیز نشان داده شده است CaMV و TuMV رابطه هم‌افزایی با یکدیگر ندارند (Ghasemzadeh & Shams-Bakhsh, 2016; Martín & Elena, 2009). باین حال در گیاه کلم گل رابطه هم‌افزایی بین CaMV و ویروس لکه حلقوی سیاه کلم (Cabbage black ring spot virus, CBRSV) مشاهده شده است (Broadbent, 2015). نتایج پژوهش‌ها نیز نشان داده‌اند نوع برهمکنش CaMV با سایر ویروس‌ها به جدایه این ویروس بستگی دارد (Hii *et al.*, 2002). یکی از دلایل تفاوت برهمکنش CMV و TuMV با برهمکنش CaMV و TuMV در گیاه کلزا می‌تواند تفاوت سرکوبگر خاموشی 2b و P6 و نحوه تأثیرشان بر سازوکار دفاعی گیاه میزبان باشد. نتایج حاصل از کمی کردن شدت باندها با استفاده از نرم‌افزار TotalLab نشان دادند غلظت نسبی TuMV در آلودگی هم‌زمان TuMV و CMV در دو



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصول RT-PCR نیمه کمی در ژل آگارز یک درصد، باند ۹۸۶ جفت بازی حاصل از آغازگرهای تکثیرکننده بخشی از ژن پروتئین پوششی TuMV و باند ۴۵۰ جفت بازی حاصل از آغازگرهای 18S. a، b و c: به ترتیب گیاهان RGS003 (تراریخته)، RGS003 (غیر تراریخته) و کرج ۳. ۱: آلودگی انفرادی TuMV. ۲: آلودگی هم‌زمان TuMV و CaMV. ۳: آلودگی هم‌زمان TuMV و CMV. ۴: آلودگی هم‌زمان TuMV، CaMV و CMV.

Figure 2. Electrophoresis pattern of semiquantitative RT-PCR products in 1% agarose gel, 986 bp band is the result of primers that reproduce part of coat protein gene of TuMV and 450 bp band is the result of 18S primers. a, b, c: RGS003 (transgenic), RGS003 (non-transgenic) and Karaj 3 respectively. 1: infection of TuMV. 2: co-infection of TuMV and CaMV. 3: co-infection of TuMV and CMV. 4: co-infection of TuMV, CaMV and CMV.

جدول ۲. مقایسه میانگین درصد بهبودی و شاخص شدت علائم TuMV در آلودگی انفرادی و توأم با CMV و CaMV به ترتیب پنج و چهار هفته بعد از مایه‌زنی گیاهان کلزا

Table 2. Means comparison of the percentage of recovery and severity index of TuMV symptoms in individual and mixed infection with CMV and CaMV, five and four weeks after inoculation of canola plants, respectively

Plants inoculated with	severity index of TuMV symptoms			recovery of TuMV symptoms (%)		
	Karaj 3	RGS003 (non-transgenic)	RGS003 (transgenic)	Karaj 3	RGS003 (non-transgenic)	RGS003 (transgenic)
TuMV	2.43 ^h	6.23 ^{fg}	2.46 ^h	44.28 ^{bcd}	49.04 ^b	62.22 ^a
TuMV and CMV on the same day	8.06 ^{abc}	7.66 ^{bc}	6.56 ^{ef}	8.33 ^{ij}	24.83 ^{fg}	38.90 ^{cde}
CMV 5 days after TuMV	7.43 ^{cd}	6.73 ^{def}	5.53 ^g	10.83 ^{ij}	25.74 ^{fg}	40.95 ^{cd}
TuMV 5 days after CMV	8.63 ^a	8.33 ^{ab}	7.36 ^{cde}	3.33 ^j	14.48 ^{hi}	31.11 ^{ef}
TuMV and CaMV on the same day	2.36 ^h	6.10 ^{fg}	2.60 ^h	41.28 ^{bcd}	46.63 ^{bc}	60.74 ^a
TuMV, CaMV and CMV on the same day	7.93 ^{abc}	7.46 ^{cd}	6.53 ^{ef}	7.03 ^{ij}	18.88 ^{gh}	38.42 ^{de}
phosphate buffer	0.0 ⁱ	0.0 ⁱ	0.0 ⁱ	-	-	-

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Means indicated by same letters are not significantly different at 5% level.

شود و به گیاهان کلزا خسارت وارد کند و باعث کاهش عملکرد کلزا شود. بنابراین نتایج این پژوهش از دیدگاه اپیدمیولوژی دارای اهمیت بسزایی هستند. این در حالی است که آلودگی توأم TuMV و CaMV در گیاهان تراریخته و غیر تراریخته تأثیری روی شدت علائم حاصله از TuMV نداشت و در غلظت TuMV نسبت به آلودگی انفرادی نیز تفاوتی مشاهده نشد. علاوه بر این در آلودگی هم‌زمان سه ویروس TuMV، CaMV و CMV علائم متفاوتی نسبت به آلودگی هم‌زمان TuMV و CMV ظاهر نشد. همچنین این نتایج نشان دادند آلودگی با CMV می‌تواند به سرکوب کردن خاموشی منجر شود و گیاهان تراریخته را به فنوتیپ حساسیت بازگرداند. بنابراین احتمال آلودگی توأم ویروس‌ها در طبیعت می‌تواند استفاده از سازوکار خاموشی برای ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس را با کاهش کارایی روبه‌رو کند. از این رو لازم است برای تولید گیاهان تراریخته از روش‌های مؤثرتر و پایدارتری استفاده کرد، به طوری که سازه‌ها به نحوی طراحی شوند که گیاهان تراریخته به‌طور هم‌زمان به TuMV و CMV مقاوم شوند. با این وجود گیاهان تراریخته کلزای دارای سازه سنجاق سری مورد استفاده در این پژوهش پس از شکسته شدن مقاومت در برابر TuMV نسبت به گیاهان غیر تراریخته بهبودی بیشتری نشان دادند.

نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان دادند درصد بهبودی گیاهان تراریخته در آلودگی توأم CMV و TuMV به‌طور معنی‌دار بیشتر از گیاهان غیر تراریخته است (جدول ۲). احتمالاً در گیاهان تراریخته فعالیت دفاعی PTGS تداوم داشته و تنها میزان آن کاهش یافته است. گزارش شده است مقاومت گیاهان تراریخته بیان‌کننده RNAهای دولا مقاوم به PVY، در اثر مایه‌زنی CMV تنها به‌صورت موقت شکسته می‌شود و از بهبودی گیاهان جلوگیری نمی‌کند. در حقیقت در گیاهان تراریخته RNAهای دولا یک فاکتور دفاعی اضافی را فراهم کرده و به بهبودی منجر می‌شود (Mitter *et al.*, 2003). در مقابل در پژوهش دیگری سرکوب مقاومت ناشی از پروتئین پوششی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس ای سیب‌زمینی *Potato virus A (PVA)* در اثر آلودگی PVY به بهبودی منجر نشد و گیاهان همچنان آلودگی PVA را نشان دادند (Savenkov & Valkonen, 2001).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر حاکی از این هستند که آلودگی توأم CMV و TuMV در گیاهان غیر تراریخته حساس (RGS003) و متحمل (کرج ۳) کلزا بدون افزایش غلظت TuMV می‌تواند به افزایش شدت علائم TuMV منجر

REFERENCES

- Anderson, E. J., Qiu, S. G. & Schoelz, J. E. (1991). Genetic analysis of determinants of disease severity and virus concentration in *cauliflower mosaic virus*. *Virology*, 181(2), 647-655.
- Bance, V. B. (1991). Replication of *potato virus X* RNA is altered in coinfections with *potato virus Y*. *Virology*, 182(2), 486-494.

3. Banuelos, G. S., Bryla, D. R. & Cook, C. G. (2002). Vegetative production of kenaf and canola under irrigation in central California. *Industrial crops and products*, 15(3), 237-245.
4. Broadbent, L. (2015). *Investigation of virus diseases of Brassica crops*: Cambridge University Press, 112 pp.
5. Ding, S. W., Anderson, B. J., Haase, H. R. & Symons, R. H. (1994). New overlapping gene encoded by the *Cucumber mosaic virus* genome. *Virology*, 198(2), 593-601.
6. Dougherty, W., Lindbo, J., Smith, H., Parks, T., Swaney, S. & Proebsting, W. (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7(5), 544-552.
7. Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
8. Faria, J. C., Albino, M. M., Dias, B. B., Cançado, L. J., da Cunha, N. B., Silva, L. d. M., Vianna, G. R. & Aragao, F. J. (2006). Partial resistance to *Bean golden mosaic virus* in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) line expressing a mutated rep gene. *Plant Science*, 171(5), 565-571.
9. Garcia-Cano, E., Resende, R. O., Fernandez-Munoz, R. & Moriones, E. (2006). Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology*, 96(11), 1263-1269.
10. Ghasemzadeh, A. & Shams-bakhsh, M. (2016). Reaction of canola cultivars to *Cauliflower mosaic virus* and co-infection of *Turnip mosaic virus* and *Cauliflower mosaic virus* under greenhouse condition. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 39(3), 71-82. (in Farsi)
11. Guerini, M. N. & Murphy, J. F. (1999). Resistance of *Capsicum annum* 'Avelar' to pepper mottle potyvirus and alleviation of this resistance by co-infection with cucumber mosaic cucumovirus are associated with virus movement. *Journal of General Virology*, 80(10), 2785-2792.
12. Guo, H. S. & Ding, S. W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 21(3), 398-407.
13. Hamilton, R. & Dodds, J. (1970). Infection of barley by tobacco mosaic virus in single and mixed infection. *Virology*, 42(1), 266-268.
14. Hii, G., Pennington, R., Hartson, S., Taylor, C. D., Lartey, R., Williams, A., Lewis, D. & Melcher, U. (2002). Isolate-specific synergy in disease symptoms between cauliflower mosaic and turnip vein-clearing viruses. *Archives of Virology*, 147(7), 1371-1384.
15. Jafari, M., Shams-bakhsh, M. & Moieni, A. (2016). Reaction of commercial canola varieties and lines against *Turnip mosaic virus* (TuMV) isolate. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 52(2), 147-159. (in Farsi)
16. Jafari, M., Shams-bakhsh, M. & Moieni, A. (2018). Efficiency of the partial genome of *Turnip mosaic virus* (TuMV) to induce resistance in canola. *Iranian journal of plant protection science*, (in press). (in Farsi)
17. Li, H. W., Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., Ji, L. H., Wong, S. M. & Ding, S. W. (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 18(10), 2683-2691.
18. Li, Y., Zhang, J., Zhao, F., Ren, H., Zhu, L., Xi, D. & Lin, H. (2016). The interaction between *Turnip crinkle virus* p38 and *Cucumber mosaic virus* 2b and its critical domains. *Virus Research*, 222, 94-105.
19. Martín, S. & Elena, S. F. (2009). Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. *Journal of General Virology*, 90(11), 2815-2820.
20. Mitter, N., Sulistyowati, E. & Dietzgen, R. G. (2003). *Cucumber mosaic virus* infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to *Potato virus Y* in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(10), 936-944.
21. Mitter, N., Sulistyowati, E., Graham, M. W. & Dietzgen, R. G. (2001). Suppression of gene silencing :a threat to virus-resistant transgenic plants? *Trends in Plant Science*, 6(6), 246-247.
22. Nomura, K., Uekusa, H. & Kita, N. (2014). Suppression of transgene RNA silencing in transgenic *Arabidopsis thaliana* by a mild strain of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 80(5), 443-448.
23. Palukaitis, P. & García-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, 62, 241-323.
24. Ryang, B. S., Kobori, T., Matsumoto, T., Kosaka, Y. & Ohki, S. T. (2004). *Cucumber mosaic virus* 2b protein compensates for restricted systemic spread of *Potato virus Y* in doubly infected tobacco. *Journal of General Virology*, 85(11), 3405-3414.
25. Sanchez, F., Wang, X., Jenner, C., Walsh, J. & Ponz, F. (2003). Strains of *Turnip mosaic potyvirus* as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Research*, 94(1), 33-43.
26. Sano, Y. & Kojima, M. (1989). Increase in cucumber mosaic virus concentration in Japanese radish plants co-infected with turnip mosaic virus. *Japanese Journal of Phytopathology*, 55(3), 296-302.

27. Savenkov, E. & Valkonen, J. (2001). Coat protein gene-mediated resistance to *Potato virus A* in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *Journal of General Virology*, 82(9), 2275-2278.
28. Shahraeen, N., Farzadfar, S. & Lesemann, D. E. (2003). Incidence of viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) in Iran. *Journal of Phytopathology*, 151(11-12), 614-616. (in Farsi)
29. Siddiqui, S. A., Valkonen, J. P., Rajamäki, M. L. & Lehto, K. (2011). The 2b silencing suppressor of a mild strain of *Cucumber mosaic virus* alone is sufficient for synergistic interaction with *Tobacco mosaic virus* and induction of severe leaf malformation in 2b-transgenic tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(6), 685-693.
30. Simon-Mateo, C., López-Moya, J. J., Guo, H. S., Gonzalez, E. & García, J. A. (2003). Suppressor activity of potyviral and cucumoviral infections in potyvirus-induced transgene silencing. *Journal of General Virology*, 84(10), 2877-2883.
31. Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G. & Waterhouse, P. M. (2000). Gene expression: total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407(6802), 319-320.
32. Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology*, 13(2), 204-216.
33. Takeshita, M., Koizumi, E., Noguchi, M., Sueda, K., Shimura, H., Ishikawa, N., Matsuura, H., Ohshima, K., Natsuaki, T. & Kuwata, S. (2012). Infection dynamics in viral spread and interference under the synergism between *Cucumber mosaic virus* and *Turnip mosaic virus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 18-27.
34. Walsh, J. A. & Jenner, C. E. (2002). *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), 289-300.
35. Zahedi Tabarestani, A., Shams-bakhsh, M. & Safaei, N. (2010). Distribution of three important aphid borne canola viruses in Golestan province. *Iranian journal of plant protection science*, 41(2), 251-259. (in Farsi)