

تحریک اجزاء دفاع سیستمیک اکتسابی (SAR) در توتون سامسون

دارای ژن مقاومت N توسط ویروس Y سیب زمینی (PVY)

فرشاد رخشنده‌رو*^۱، حمیدرضا زمانی‌زاده^۲

۱- اساتید گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم

و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rakhshandehroo_srbiau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

دفاع سیستمیک اکتسابی (SAR) از جمله دفاع‌هایی است که می‌تواند موجب ایجاد مقاومت گیاهان در برابر آلودگی‌های سیستمیک ویروسی شود. در این بررسی کوشش به عمل آمد تا با استفاده از گیاه توتون سامسون (*N. tabacum* cv. Samsun NN) و نیز گیاه حساس توتون سامسون با بیان کم ژن *RDR6*، بیان فاکتورهای دفاعی درگیر در دفاع سیستمیک اکتسابی (SAR) در هنگام پاسخ فوق حساسیت پس از آلودگی با ویروس TMV و نیز در هنگام آلودگی سیستمیک با ویروس Y سیب زمینی (PVY) مورد بررسی قرار گیرد. برای این منظور با استفاده از تکنیک Sq-RT-PCR میزان بیان کمی ژن‌های *JVR*، *ERF5* و *AOX1* سنجش شد. همچنین برای اولین بار میزان غلظت سالیسیلیک اسید در بافت‌ها با استفاده از باکتری گزارشگر سالیسیلیک اسید با نام *Acinetobacter* sp. ADP1 مورد سنجش قرار گرفت و امکان تولید پروتئین PR-1 در بافت‌ها با استفاده از آزمون وسترن بلات (Western Blot) ارزیابی گردید. نتایج حاکی از آن بود که واکنش دفاعی SAR می‌تواند در پاسخ به تنش‌های زیستی از جمله آلودگی سیستمیک ویروس PVY در توتون فعال گردد ولی برای موثر بودن سیگنال سیستمیک کننده آن یعنی سالیسیلیک اسید اجزاء ژنتیکی انتقال سیگنال باید بیان مناسبی داشته باشند و در زمان کمی بیان شوند و احتمالاً ژن *RDR6* می‌تواند یکی از اجزاء ژنتیکی موجود در انتقال سیگنال مسیر SAR باشد. از آنجائی که تا کنون تک ژن‌های مقاومت برای ایجاد مقاومت در برابر ویروس PVY کارآمد نبوده‌اند، بنابراین مقاومت‌های افقی چند ژنی با فراهم آوردن مقاومت‌های سیستمیک مانند SAR می‌توانند برای کنترل این بیماری ویروسی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

خاموشی ژن،
مقاومت سیستمیک اکتسابی،
ویروس PVY^o،
Sq-RT-PCR

مقدمه

با وجود آنکه یک گیاه می‌تواند به طور همزمان مورد تهاجم یک یا چند میکروارگانیسم خطرناک قرار گیرد ولی به ندرت امکان دارد آلودگی به هر یک از آنها در گیاه صورت پذیرد. دلیل این امر حضور ژن‌های متنوع مقاومت در میزبان می‌باشد. ژن‌های متفاوتی که در گیاهان وجود دارند به آنها این امکان را می‌دهد تا بیمارگرهای محیط را شناسائی نموده و نسبت به آنها پاسخی مناسب در جهت دفاع از خود بروز دهند (۲۲). مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) در میزبان‌های مقاوم به ویروس‌ها به میزان زیادی مورد بررسی قرار گرفته است. مقاومت سیستمیک اکتسابی با بروز پاسخ فوق حساسیت (HR) در میزبان همراه می‌باشد و اسید سالیسیلیک سیگنال سیستمیک کننده مقاومت در گیاهان محسوب می‌شود (۱۳). در واقع می‌توان گفت مقاومت (SAR) منتج شده از مقاومت (HR) می‌باشد و جلوی حرکت سیستمیک ویروس را می‌گیرد و بافت را آماده پاسخ‌های مقاومتی ثانویه می‌سازد (۱۰، ۷، ۴). در هنگام بروز پاسخ فوق حساسیت گیاه به صورت آگاهانه دست به خودکشی در بافت مورد حمله می‌زند تا از نفوذ بیشتر بیمارگر در موضع مورد حمله قرار گرفته شده جلوگیری نماید (۲۴). پس از ناسازگار شناخته شدن رابطه تعامل ژن برای ژن در گیاه ناسازگار انفجار اکسیژنی Oxidative burst با دخالت NADPH Oxidase System های غشائی صورت پذیرفته و رادیکال‌های آزاد اکسیژنی Reactive Oxygen Species (ROS) تولید می‌شوند (۲۹). رادیکال‌های آزاد اکسیژنی به عنوان مولکول پیامبر سیگنال عمل نموده و موجب تحریک فاکتورهای رونویسی در هسته سلول می‌شوند. فاکتورهای رونویسی تحریک شده مسئول بیان ژن‌های مقاومت و جلوگیری کننده از تکثیر بیمارگر در گیاهان مقاوم می‌شوند. از نظر ماهیت، مهار کننده مذکور می‌تواند متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی معروف به فایتوالکسین‌ها و یا ترکیبات فنلیک متفاوت باشند (۱۰). با حضور رادیکال‌های آزاد اکسیژنی ترکیبات فنلی اکسید شده و موجب تخریب پروتئینی پاتوژن مهاجم و سلول می‌شوند. همچنین پروتئین‌های اختصاصی ضد میکروبی مانند Inhibitors of Pathogen related protein (PR-Proteins) و

viral replication proteins (IVR) نیز در موضع مورد تهاجم گیاه تولید می‌شوند که موجب مهار اختصاصی ویروس‌ها می‌شوند (۱۸، ۹، ۱). در این زمان توازن فعالیت‌های متابولیکی سلول شامل فعالیت‌های کاتابولیسمی (تنفس) و آنابولیسمی (فوتوستتر) سلول به هم خورده و نرخ تنفس افزایش پیدا کرده و در نتیجه اکسیدازهای پایانه ثانوی در چرخه تنفسی مانند (AOX) Alternative Oxidase تولید می‌شوند که برای تولید سالیسیلیک اسید سیگنال می‌دهند و موجب فعال شدن دفاع اکتسابی سیستمیک Systemic Acquired Resistance (SAR) از طریق چرخه‌ای موسوم به Sham Pathway می‌شوند (۲۷، ۲۶، ۱۱).

جنس‌ها و گونه‌های ویروسی متعلق به خانواده *Potyviridae* از جمله مهمترین ویروس‌ها را شامل می‌شوند که بر روی طیف گسترده‌ای از میزبان‌های گیاهی خسارت‌زا می‌باشند (۱۹). ویروس Y سیب زمینی از پوتی ویروس‌ها می‌باشد که با ناقل شته و به روش ناپایا منتقل می‌شود و از ویژگی سازگاری بالا با میزبان‌های مختلف گیاهی برخوردار می‌باشد. تا کنون روش‌های مبارزه با ناقلین و مدیریت زراعی برای کنترل آن مفید نبوده است (۲۳). تنها راه کنترل موثر این ویروس استفاده نمودن از ارقام مقاوم زراعی می‌باشد. همچنین بر خلاف سایر ویروس‌های گیاهی که تک ژن‌های غالب در میزبان موجب ایجاد مقاومت می‌شوند، مشخص شده است که ژن‌های مغلوب در کنترل این بیماری ویروسی در گیاهان مختلف موثر می‌باشند. مشخص شده است که ژن‌های مغلوب در ایجاد مقاومت‌های افقی به صورت مشارکتی با یکدیگر در فرایندهای دفاعی میزبان شرکت می‌کنند (۸، ۷). مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) از جمله دفاع‌هایی است که با دخالت چند ژن می‌تواند موجب ایجاد مقاومت در برابر آلودگی‌های سیستمیک ویروسی در گیاهان شود. تا کنون نقش این دفاع در ایجاد مقاومت در برابر ویروس‌های مختلف گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است (۳۰، ۲۸). با وجود اینکه تغییر در میزان سالیسیلیک اسید در هنگام بروز آلودگی سیستمیک به ویروس PVY^o در گیاهان مشاهده شده است ولی تا کنون امکان کنترل ویروس PVY^o توسط این نوع از دفاع در گیاهان مورد بررسی قرار نگرفته است. در این تحقیق تلاش شده است تا با

در این تحقیق از توتون *N. tabacum* cv. Samsun، دارای ژن مقاومت N استفاده شد. همچنین برای مقایسه میزان بیان ژنهای مقاومت دخیل در دفاع سیستمیک اکتسابی از لاین تراریخت توتون سامسون *N. tabacum* cv. Samsun NN، حساس به آلودگی PVY با نام R-5-1 استفاده شد. آزمون وسترن بلات^۳

هدف از انجام این آزمون بررسی میزان غلظت پروتئین پوششی ویروس Y سیب زمینی^۴ و نیز میزان غلظت پروتئین مقاومتی^۵ PR-1 در بین لاینهای مورد ارزیابی بود. آزمون مذکور مطابق با روش Manoussopoulos و همکاران ۲۰۰۰ انجام پذیرفت (۱۵). برای این منظور ۲ هفته پس از بروز آلودگی و همزمان با ایجاد علائم سیستمیک بر روی برگ گیاهان مایه زنی شده پروتئین کل بافت برگ توتونهای مورد ارزیابی با استفاده از بافر تریس حاوی مرکاپتواتانل استخراج شد و پس از دناتوره کردن پروتئین توسط حرارت و SDS، پروتئینهای مذکور بر روی ژل پلی آکریل آماید SDS-PAGE ناپوسته ۱۲ درصد به میزان ۱۴ ماکرولیتر الکتروفورز شدند. حرکت پروتئینها در ژل به مدت یک ساعت و با ولتاژ ۳۵۰ ولت صورت پذیرفت. برای هر آزمون ژلها توسط رنگ آبی کوماسی رنگ آمیزی شدند تا از یکسان بودن میزان غلظت پروتئینهای الکتروفورز شده اطمینان حاصل شود. پس از آن از طریق دستگاه Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell، پروتئینهای موجود بر روی ژل به غشاءهای نیتروسلولزی توسط نیروی الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ v برای مدت یک ساعت انتقال داده شدند. غشاءها پس از بلوکه شدن در ۵ درصد شیرخشک بدون چربی در آنتی بادی اولیه پلی کلونال اختصاصی PVY و نیز آنتی بادی تک همسانهای اختصاصی تهیه شده بر علیه پروتئین PR-1 (تولید شده در مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند (SCRI) به صورت یک شبانه روز در دمای اتاق انکوبه و پس از شستشو در بافر توسط آنتی بادی ثانویه^۶ نشاندار شده توسط آنزیم آلکالین فسفاتاز انکوبه شدند. سپس غشاء در محلول

بررسی بیان برخی از فاکتورهای کلیدی درگیر در دفاع (SAR) امکان فعال شدن و اثر کنترل کنندگی دفاع مذکور به عنوان یک دفاع ذاتی و پایه گیاه در کنترل ویروس PVY^۱ در گیاه مدل توتون مورد بررسی قرار گیرد. ویروس PVY^۱ در گیاه توتون سامسون دارای ژن مقاومت NN ایجاد آلودگی سیستمیک می کند. با وجود آنکه گیاه توتون به صورت سیستمیک دچار آلودگی ویروس PVY^۱ می شود ولی مشاهده می شود که با وجود ضعف تدریجی، گیاه در نهایت در اثر آلودگی از بین نمی رود که این امر بر خلاف سایر ویروسهای گیاهی می باشد (۵). در این بررسی تلاش شد تا با استفاده از توتون تراریخت با بیان کم ژن *RDR6* که از قبل حساسیت آن به آلودگی سیستمیک ویروس PVY^۱ ثابت شده بود (۲۱) ضمن بررسی فاکتورهای ژنتیکی درگیر در مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) در پاسخ زیستی میزان در هنگام آلودگی سیستمیک به ویروس PVY^۱ امکان دخالت دفاع سیستمیک اکتسابی (SAR) در کنترل ویروس و نیز نقش ژن *RDR6* در این دفاع برای اولین بار در مورد ویروس Y سیب زمینی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

منابع ویروسی

در این پژوهش از نژاد O ویروس Y سیب زمینی^۱ برای ایجاد آلودگی سیستمیک و از نژاد U1 ویروس موزائیک توتون^۲ برای تحریک دفاع سیستمیک اکتسابی استفاده شد. نژادهای ویروسی از نمونههای ذخیره شده در آزمایشگاه تحقیقات ویروس شناسی مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند (SCRI) تهیه شدند. مایه زنی مکانیکی با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH= ۷/۵ انجام شد. مایه زنی در مرحله ۴ برگ توتونهای تراریخته لاین R-5-1 با بیان کم ژن *RDR6* و غیر تراریخت سامسون انجام شد. نمونه برداریها از برگهای فوقانی و یک هفته پس از مایه زنی، صورت پذیرفت.

مواد گیاهی

³ Western blotting Assay

⁴ Coat protein- PVY

⁵ Pathogen related protein-1

⁶ Goat anti rabbit

¹ Potato virus Y strain O (PVY^O)

² Tobacco mosaic virus (TMV)

دو هفته پس از مایه‌زنی ویروس PVY^o و همزمان با بروز علائم موزاییک سیستمیک از برگ‌ها استخراج شد. RNA های استخراج شده با آنزیم (DNaseI, RQ1 -RNaseI free) جهت حذف آلودگی DNA تیمار شدند. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم M-MuLV مطابق دستورالعمل شرکت (Promega, U.S.A, Inc) صورت پذیرفت. آزمون PCR در باحضور ۱۱ μl از cDNA ساخته شده در حجم ۲۴ μl از واکنشگرهای شامل (2 mM MgCl₂, 0.4mM 4dNTP-Mix, 0.4 μM Foreward primer, 0.4 μM Reverse primer, 0.6 units Gold Taq Flexi DNA 10X Taq Flexi Buffer polymerase (Promega Inc, USA), مطابق دستور شرکت سازنده) در دستگاه ترموسایکلر با ۳۰، ۲۵ و ۳۵ چرخه حرارتی شامل (۲ دقیقه واسرشت اولیه، یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهائی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) صورت پذیرفت. همچنین از ژن *β-Tubulin* به عنوان کنترل درونی برای نرمال‌سازی بیان ژن برای این آزمون استفاده شد. تولیدات حاصل از همسانه‌سازی ژن‌ها مربوط به چرخه‌های مختلف آزمون PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد تفکیک شدند. برای هر ژن از نمونه‌های کنترل منفی و مثبت استفاده شده و تمام آزمون‌ها با ۴ تکرار انجام شدند.

توسعه دهنده واکنش رنگ‌زائی شامل NBT و BCIP جهت بروز باندها انکوبه شد. در هر آزمون از مارکر وزن مولکولی رنگ دار ۱۷۵ کیلودالتونی (Biolab New England, Inc) استفاده شد. از طریق این آزمون میزان غلظت پروتئین‌های PR-1 و پروتئین پوششی ویروس Y سیب زمینی (CP-PVY) ویروس Y سیب زمینی برای نمونه‌های مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. در این آزمون برای اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین PR-1 از آنتی بادی مونوکلونال با غلظت ۱/۱۰۰۰۰ و برای بررسی میزان غلظت پروتئین پوششی ویروس PVY از آنتی بادی پلی کلونال با غلظت ۱/۱۰۰۰ استفاده شد. همچنین از Goat anti rabbit به میزان رقت ۱/۱۰۰۰۰ استفاده شد.

آزمون‌های ارزیابی میزان بیان ژن

جهت بررسی میزان بیان‌های ژن‌های دخیل در مقاومت سیستمیک اکتسابی شامل *IVR*, *AOX1*, *ERF5* از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. آغازگرها با استفاده از نرم افزار (Oligo6 Molecular biology, Insights, Inc, U.S.A) طراحی شدند (جدول ۱). بررسی میزان بیان ژن‌ها با استفاده از آزمون RT-PCR - Semiquantitative مطابق روش Marone و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد (۱۶). RNA کل بافت لاین‌های توتون مورد بررسی با استفاده از ستون‌های کوچک استخراج RNA شرکت Qiagen.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در بررسی تغییرات بیان ژن. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار (Oligo 6 Molecular biology Insights, Inc, U.S.A) برای اولین بار برای این آزمون طراحی شدند.

Gene	Sequences		Amplified DNA (bp)
IVR	Sense:	5'-ATCGTTAACAATCGACCTGAAGCTGCT-3'	581
	Antisense:	5'-ATGGGATCCTCATAAAAGCTCAGCCTCT-3'	
AOX 1	Sense:	5'-GATGACACGTGGAGCGACAAGG-3'	620
	Antisense:	5'-CCACTCTGTTCTGAATCGCCTAAG-3'	
ERF5	Sense:	5'-ATGTCAAGTAACTCAAGCCCA-3'	780
	Antisense:	5'-TCAGTCCCTTCGACACGAATG-3'	
β-tubulin	Sense:	5'-CTTGCAATTGGTACACAGG-3'	300
	Antisense:	5'-CACTCTCCAGCATTCATCC-3'	

اندازه‌گیری کمی آنزیم پلی فنل اکسیداز POX

اندازه‌گیری میزان تغییرات کمی آنزیم POX در بافت برگ توتون-های مورد ارزیابی با استفاده از روش توصیف شده توسط Brisson و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام شد (۳). در زمان ۱۵ روز پس از مایه زنی ویروس انجام پذیرفت. برای این منظور میزان غلظت پروتئین تام در واحد وزن خشک برگ توتون با استفاده از روش برادفورد محاسبه شد و افزایش میزان غلظت هر کدام از آنزیم‌های مورد بررسی بر مبنی کسری از جذب اختصاصی هر کدام از آنزیم‌ها در دقیقه بر میزان ماکرو گرم پروتئین تام برای هر لاین در نظر گرفته شد. تمام آزمون‌های طیف سنجی جهت بررسی فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز در حجم نهائی یک CC و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با لامپ UV/Visible و دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-3100 spectrophotometer) انجام پذیرفت. برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از سوسترای Guaiacol استفاده شد. میزان اکسیداسیون فلن در طول موج ۴۷۰ نانومتر تا ۴۰ ثانیه پس از اضافه شدن سوسترای یادداشت برداری شد.

بررسی میزان تغییرات سالیسیلیک اسید در نمونه‌های مورد ارزیابی

این آزمون مطابق روش Huang و همکاران انجام پذیرفت (۱۲). برای انجام این آزمون از باکتری‌های متصل شده به ژن لوسیفراز استفاده شد. باکتری مذکور از جنس *Acinetobacter sp. ADP1* و دارای پروموتور حساس به سالیسیلیک اسید بود که در زمان حضور غلظت‌های فیزیولوژیک سالیسیلیک اسید در بافت‌های تزریق شده با باکتری تولید نور می‌نمود و از این طریق سنجش غلظت سالیسیلیک اسید در بافت‌های آلوده به ویروس در بین لاین‌های مورد بررسی ردیابی قابل اندازه‌گیری بود. برای این منظور یک کلنی از باکتری حاوی گزارشگر لوسیفراز *Acinetobacter sp. ADP1* برای یک شبانه روز در میزان ۱۰ میلی لیتر از محیط LB فاقد آنتی بیوتیک کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با سرعت RPM ۱۸۰ در انکوباتور دار شیکر دار انکوبه گردید. سپس باکتری در ۲۰۰ میلی لیتر از محیط رشد باکتری LB رقیق و برای ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با سرعت

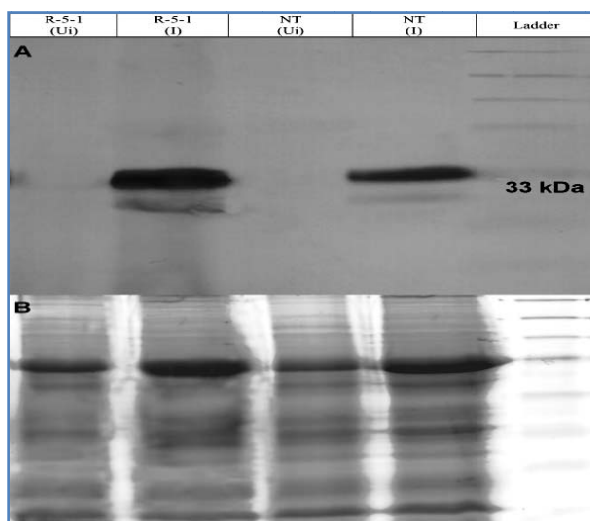
RPM ۱۸۰ بر روی شیکر انکوباتور انکوبه شد. سوسپانسیون باکتری با OD ۶۰۰ برابر ۰/۴ برای تزریق هیپودرمی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های مورد بررسی تا ۲ ساعت قبل از انجام آزمون توسط سرنگ ۵ سی سی بدون سوزن با باکتری *Acinetobacter sp. ADP1* به صورت هیپودرمی به درون بافت برگ نمونه‌های توتون مایه زنی شدند. برگ‌ها پس از مایه زنی در انکوباتور ۳۷ درجه برای مدت یک ساعت انکوبه و سپس جهت بررسی ردیابی نور تولید شده که بیانگر حضور سالیسیلیک اسید نیز می‌باشد در درون اتاق تاریک قرار گرفته و با فیلتر Chemoluminescence High Sensitivie و با دوربین CCD مورد عکاسی قرار گرفتند. در هر بار آزمایش جهت بررسی میزان غلظت سالیسیلیک اسید در بافت‌ها از مارکرهای سری رقت زنده و مصنوعی *Invivo and Invitro Ladders* استفاده و از آنها در کنار نمونه‌های مایه زنی شده در اتاق تاریک عکس گرفته شد. برای تهیه نردبان مولکولی مصنوعی از رقت‌های ۰، ۱، ۲، ۳، ۳/۵، ۴، ۵، ۶، ۷، ۷/۵ و ۱۰ ماکرو مولار سالیسیلیک اسید استفاده شد. برای تهیه سری رقت‌های مورد نظر ابتدا یک محلول غلیظ یک میلی مولار سالیسیلیک اسید در متانول تهیه. سپس با آب رقت-های بیشتر سالیسیلیک اسید شامل (رقت‌های ۰، ۱، ۲، ۳، ۳/۵، ۴، ۵، ۶، ۷، ۷/۵ و ۱۰ ماکرو مولار) از محلول غلیظ تهیه شد. در نهایت ۳۰ ماکرولیتر از هر کدام از رقت‌های سالیسیلیک اسید با ۵۰ ماکرولیتر محیط LB و ۶۰ ماکرولیتر از باکتری *Acinetobacter sp. ADP1* رشد یافته در محیط LB ترکیب و در تیوب‌های PCR، ۲۵۰ ماکرولیتری ریخته شد. مارکر غلظت سالیسیلیک اسید به همراه نمونه‌ها برای یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. جهت بررسی میزان غلظت سالیسیلیک اسید میزان نور متصاعد شده از نردبان با نور بافت‌ها مورد مقایسه قرار گرفت تا میزان غلظت سالیسیلیک اسید مشخص شود. همچنین از نردبان زنده سالیسیلیک اسید نیز برای سنجش غلظت-های بیشتر شامل ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ ماکرومولار استفاده شد. این آزمون برای زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۷ و ۱۴ روز پس از مایه‌زنی باکتری برای تمام نمونه‌ها در ۲ تکرار انجام پذیرفت.

نتایج

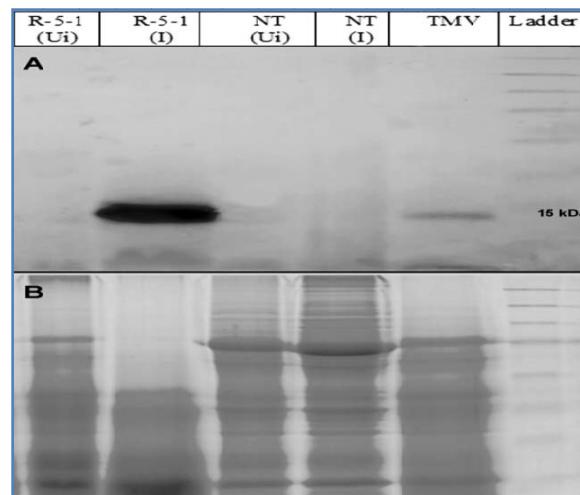
آزمون وسترن بلات

بررسی میزان غلظت‌های مختلف پروتئین پوششی ویروس Y سیب زمینی به منظور بررسی حساسیت در لاین توتون تراریخت R-5-1 در مقایسه با توتون سامسون غیر تراریخت صورت پذیرفت. نتایج آزمون وسترن بلات نشان داد تا ۲ هفته پس از مایه‌زنی توتون‌های مورد ارزیابی با ویروس PVY^o، پروتئین پوششی ویروس با وزن مولکولی ۳۳ kDa در تمام نمونه‌ها تولید می‌شود (شکل ۱). همچنین مشخص شد که لاین تراریخت R-5-1 در مقایسه با توتون غیر تراریخت از حساسیت بیشتری نسبت به آلودگی ویروسی برخوردار می‌باشد (شکل ۱).

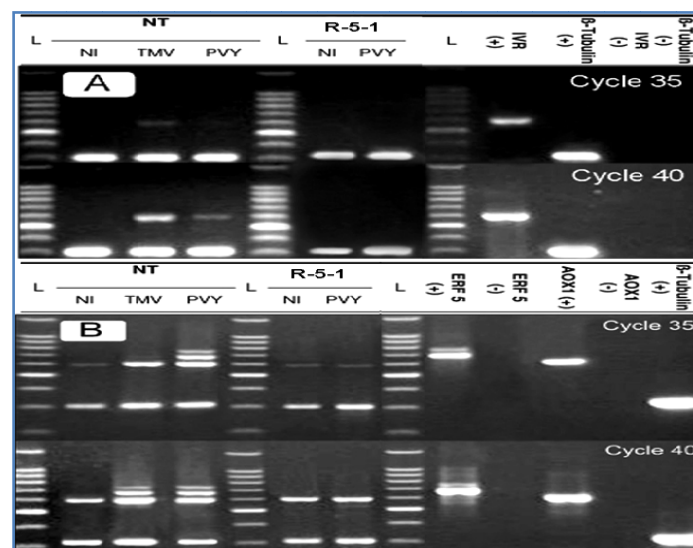
در این بررسی امکان تولید پروتئین PR-1 برای آلودگی‌های ویروسی PVY و TMV در توتون‌های مورد ارزیابی بررسی شد. نتایج آزمون وسترن بلات برای بررسی بیان پروتئین PR-1 در نمونه‌های مورد بررسی نشان داد که پروتئین مذکور می‌تواند تا ۴ روز پس از مایه زنی توتون غیر تراریخت با ویروس TMV و همزمان با تشکیل زخم نکروزه و بروز پاسخ فوق حساسیت در بافت‌ها بیان شود (شکل ۲). همچنین مشخص شد که تا ۲ هفته پس از مایه‌زنی توتون‌های مورد ارزیابی با ویروس PVY^o، پروتئین PR-1 با وزن مولکولی ۱۵ kDa می‌تواند تنها در بافت برگ توتون حساس لاین R-5-1 تولید شود (شکل ۲). بیان پروتئین PR-1 یک شاخص مهم برای دفاع (SAR) محسوب می‌شود و تا کنون نقش آن برای ویروس PVY بررسی نشده است.



شکل ۱- آزمون وسترن بلات پروتئین پوششی ویروس PVY^o. (A) باندهای پروتئینی به وزن مولکولی ۳۳kDa پس از رنگ آمیزی با سوپسترای NBT و BCIP بر روی غشاء نیتروسلولزی شکل گرفته‌اند. (B) عکس ژل پلی آکریل آماید دارای پروتئین مربوط به نمونه‌های پروتئینی مورد ارزیابی. برای این آزمون از مارکر وزن مولکولی رنگ‌دار ۱۷۵ کیلودالتونی شرکت Biolab New england استفاده شد. Non transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun , NN) (NT) (توتون غیر تراریخت). R-5-1) لاین توتون تراریخت با توان پایین در بیان ژن *RDR6*. Uninfect (Not Inoculated) (Ui) (نمونه توتون مایه‌زنی نشده سالم) و I) Inoculated with PVY (نمونه توتون مایه‌زنی شده و آلوده به ویروس PVY^o).



شکل ۲- آزمون وسترن بلات پروتئین PR-1. (A) باندهای پروتئینی به وزن مولکولی ۱۵kDa پس از رنگ آمیزی با سوبسترای NBT و BCIP بر روی غشاء نیتروسلولزی شکل گرفته‌اند. (B) عکس ژل پلی آکریل آماید دارای پروتئین مربوط به نمونه‌های پروتئینی مورد ارزیابی (NT) (توتون غیر تراریخت). (1) لاین توتون تراریخت با توان پایین در بیان ژن *RDR6*. (Ui Uninfect (Not Inoculated). (I Inoculated with PVY و (I Inoculated with PVY) (نمونه توتون مایه‌زنی نشده سالم) و (I Inoculated with PVY) (نمونه توتون مایه‌زنی شده و آلوده به ویروس PVY°).



شکل ۳- نتایج آزمون Sq-RT-PCR برای بررسی میزان بیان فاکتورهای مقاومتی (A) *IVR* و (B) *ERF5*، *AOX1*. برای این آزمون از ژن β -*Tubulin* به عنوان کنترل درونی استفاده شد. اندازه تولیدات حاصل از همسانه سازی ژن‌های مذکور بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد مطابق اندازه‌های اشاره شده در (جدول ۱) برای هر ژن بود. از مارکر وزن مولکولی (L)، ۱۰۰ جفت باز تهیه شده از شرکت Promega استفاده شد. (Ni بیانگر چاهک مربوط به نمونه سالم می‌باشد. PVY) چاهک مربوط به نمونه آلوده به ویروس PVY می‌باشد. (NT) توتون تیپ وحشی غیر تراریخت. + و - بیانگر شاهد های منفی و مثبت برای بررسی بیان هر ژن می‌باشند. چرخه ۳۵ و ۴۰ تعداد چرخه‌هایی از آزمون PCR که برای همسانه سازی ژن‌های مورد بررسی از آن استفاده شد.

آزمون ارزیابی میزان بیان ژن‌های دخیل در مقاومت سیستمیک اکتسابی

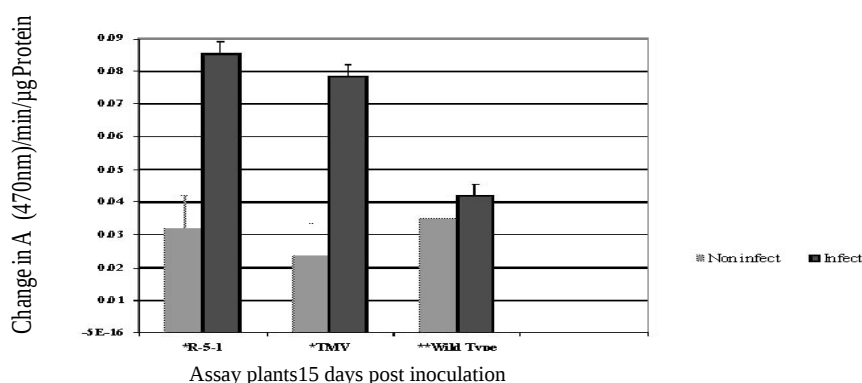
بررسی نتایج کمی سنجی بیان ژن‌های مقاومت *AOX1*، *JVR* و *ERF5* در این پژوهش نشان داد که ژن‌های مذکور به میزان زیادی در پاسخ فوق حساسیت تا ۴ روز پس از مایه زنی ویروس TMV در توتون سامسون غیر تراریخته دارای ژن مقاومت N بیان می‌شوند (شکل ۳). اگرچه ژن‌های مورد اشاره در پاسخ سازگار توتون غیر تراریخته به آلودگی سیستمیک ویروس PVY^o نیز بیان شدند ولی با میزان کمتری نسبت به پاسخ فوق حساسیت. نتایج حاکی از آن بود که با افزایش حساسیت به آلودگی ویروسی PVY در توتون تراریخته لاین R-5-1 با بیان کم ژن *RDR6*، ژن‌های درگیر در مقاومت شامل *ERF5* و *JVR* بیان نمی‌شوند. اگرچه ژن *AOX1* در این لاین حساس هنوز دارای بیان می‌باشد (شکل ۳).

سنجش کمی آنزیم پراکسیداز

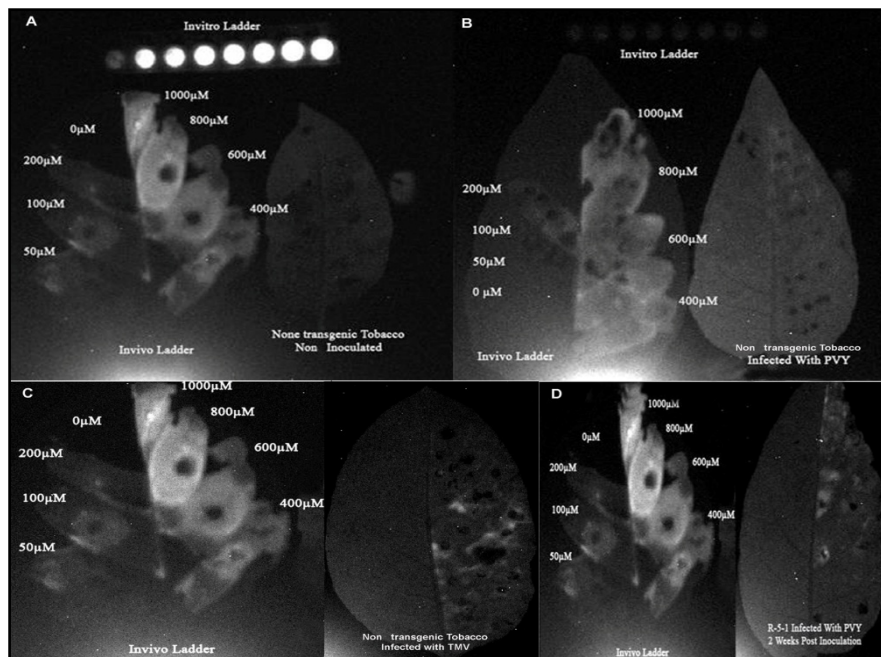
سنجش کمی آنزیم پراکسیداز برای توتون تراریخت (R-5-1) با بیان خیلی کم ژن *RDR6* نشان داد میزان فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز تا ۱۵ روز پس از مایه زنی ویروس PVY^o بیشتر از توتون تیپ وحشی آلوده به ویروس است (شکل ۴). در مجموع در تمام توتون‌های مورد بررسی فعالیت اختصاصی آنزیم پراکسیداز پس از مایه‌زنی ویروس افزایش یافت (شکل ۴).

سنجش کمی هورمون سالیسیلیک اسید در بافت برگ توتون‌های مورد ارزیابی

نتایج این آزمون نشان داد که توتون‌های مورد بررسی تا ۱۴ روز پس از مایه زنی ویروس PVY^o دارای غلظت‌های متفاوتی از سالیسیلیک اسید در بافت برگ‌های فوقانی خود می‌باشند. در توتون غیر تراریخت تا ۳ روز پس از مایه‌زنی مکانیکی با استرین U1 ویروس TMV و قبل از تولید لکه‌های موضعی بافت مرده، سالیسیلیک اسید با غلظت ۱۰۰ تا ۲۰۰ ماکرومولار تجمع نمود (شکل ۵C). بیشترین میزان تولید سالیسیلیک اسید در بافت برگ توتون غیر تراریخت آلوده به ویروس TMV تا ۵ روز پس از مایه‌زنی و همزمان با تولید لکه‌های نکروز بافت مرده به غلظت تقریبی ۸۰۰ تا ۶۰۰ ماکرومولار مشاهده شد (شکل ۵C). همچنین مشاهده شد که اسید سالیسیلیک با غلظت ۲۰۰ تا ۱۰۰ ماکرومولار تا ۱۴ روز پس از مایه‌زنی مکانیکی ویروس PVY^o در بافت برگ-های فوقانی توتون تراریخت R-5-1 حساس به آلودگی PVY^o تجمع نمود (شکل ۵D). کمترین میزان تولید سالیسیلیک اسید با غلظت تقریبی ۵۰ - ۰ ماکرومولار در بافت برگ توتون غیر تراریخت تا ۱۴ روز پس از مایه‌زنی ویروس PVY^o صورت پذیرفت (شکل ۵B). در این آزمون از برگ توتون غیر تراریخت در حالت سالم و عاری از آلودگی به عنان شاهد استفاده شد که پس از مایه زنی با باکتری گزارشگر هیچگونه سیگنالی قابل ردیابی نبود (شکل ۵A).



شکل ۴- فعالیت اختصاصی (Specific activity) آنزیم پراکسیداز در برگ‌های توتون مورد ارزیابی (*N. tabacum* cv. Samsun NN) ۱۵ روز پس از مایه‌زنی ویروس PVY^o و ۴ روز پس از مایه‌زنی ویروس TMV. R-5-1: توتون تراریخت حساس به آلودگی PVY^o که در آن بیان ژن *RDR6* با استفاده از ساختارهای ساقه و حلقه کاهش یافته است. Wild Type) توتون غیر تراریخته (*N. tabacum* cv. Samsun NN) که دارای ژن مقاومت NN بوده و در برابر آلودگی ویروس TMV ایجاد زخم موضعی می‌کند. * و ** به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد.



شکل ۵- بررسی میزان تولید سالیسیلیک اسید در بافت برگ لاین‌های توتون مورد ارزیابی با استفاده از باکتری متصل به لوسیفراز گزارشگر سالیسیلیک اسید ۲ هفته پس از مایه‌زنی ویروس PVY. برای هر نمونه مورد بررسی جهت تعیین میزان غلظت سالیسیلیک اسید در کنار نردبان‌های غلظت زنده (در برگ) و مصنوعی (در تیوب PCR) قرار داده شده است. (A) توتون غیر تراریخت *N. tabacum* cv. Samsun NN عاری از آلودگی (B) توتون غیر تراریخت آلوده به ویروس دو هفته پس از مایه‌زنی مکانیکی با ویروس PVY (C) توتون غیر تراریخت *N. tabacum* cv Samsun NN ۵ روز پس از مایه‌زنی مکانیکی با ویروس TMV (D) توتون تراریخت لاین R-5-1 دو هفته پس از مایه‌زنی مکانیکی با ویروس PVY.

بحث

بیان ژن *RDR6* می‌تواند موجب تکثیر بیش از اندازه توالی ژنتیکی مهاجم شده و از این طریق موجب فعال شدن فرایند ذاتی-دفاعی خاموشی ژن بعد از رونوشت برداری (PTGS) گردد (۲۰). در گذشته مقاومت SAR در گیاهان مدل مقاوم به آلودگی‌های ویروس‌های مورد بررسی قرار گرفته بود (۲۸، ۲۷). نتایج این بررسی برای اولین بار نشان داد که فاکتورهای مقاومت می‌توانند در هنگام بروز آلودگی سیستمیک گیاه توتون به ویروس PVY تا ۲ هفته پس از مایه‌زنی بیان شوند و غلظت ویروس را کاهش دهند. نتایج آزمون Sq-RT-PCR نشان داد که ژن‌های *IVR* و *ERF5* می‌توانند تا ۵ روز پس از مایه‌زنی مکانیکی توتون غیر تراریخت با ویروس TMV و همزمان با بروز پاسخ فوق حساسیت و تا ۲ هفته پس از مایه‌زنی ویروس PVY در توتون غیر تراریخت همزمان با بروز علائم موزاییک سیستمیک افزایش پیدا کنند (اشکال 3A و 3B). این اولین گزارش از بیان ژن *IVR* در هنگام بروز یک آلودگی سیستمیک مانند PVY می‌باشد. در

مقاومت سیستمیک اکتسابی از جمله مقاومت‌هایی است که در برابر حمله عوامل بیماری‌زا در گیاهان فعال می‌شود. سالیسیلیک اسید هورمون سیستمیک کننده آن در گیاهان می‌باشد و تا کنون نقش ایجاد مقاومت از طریق SAR در برابر بسیاری از عوامل قارچی و باکتریایی بیماری‌زای گیاهی به اثبات رسیده است (۱۳، ۲). نتایج تحقیقات گذشته نشان داده بود که پس از شناسایی‌هایی که بین میزبان و بیمارگرهای ویروسی صورت می‌پذیرد و منجر به بروز مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) می‌شود بیان ژن *RDR6* گیاه افزایش یافته و حذف ویروس‌ها در سلول‌ها صورت می‌پذیرد. این امر در گذشته برای گیاهان توتون و آرابیدوپسیس در هنگام آلودگی به عوامل ویروسی TMV، CMV، PVX و Turnip vein clearing virus به اثبات رسیده بود (۲۸، ۲۷). تحقیقات گذشته نشان داد که سالیسیلیک اسید با افزایش میزان

سال ۱۹۸۱ Loebenstein و Gera مشخص کردند که رقم توتون *N. tabacum* cv Samsun NN مقاوم به ویروس TMV پس از بروز زخم موضعی و پاسخ فوق حساسیت در مناطق آلوده پروتئین ویژه‌ای به نام با خاصیت ضد ویروسی Inhibitor of Virus Replication (IVR) تولید می‌کند که به فضاهای آپوپلاستی و بین سلولی وارد می‌شود (۱۴). پروتئین مذکور در توتون *N. tabacum* cv. Samsun nn که دارای ژن مقاومت مغلوب nn می‌باشد پس از ایجاد آلودگی‌های سیستمیک ویروسی نیز تولید می‌شود. و همچنین مشخص شده است که در هنگام بروز مقاومت سیستمیک القائی (ISR) نیز در میزبان تولید می‌شود (۱). پروتئین IVR بسیار به حرارت حساس می‌باشد و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد غیر فعال می‌شود (۱، ۹). فاکتور رونویسی *ERF5* مسئول بیان و تولید اتیلن می‌باشد و آزمایشات گذشته نشان داده است که جاسمونیک اسید و اسید سالیسیلیک چه در زمانی که به سطح گیاه پاشیده شوند و یا هنگامی که درون گیاه مایه زنی شوند و یا در زمانی که به صورت تراریخت در گیاه بیان شوند موجب افزایش بیان فاکتور *ERF5* نمی‌شوند ولی اتیلن اثری مثبت در بیان فاکتور مذکور دارد (۶). همچنین نتایج پژوهش‌های گذشته اثبات نموده است مقاومت به پاتوژن‌های قارچی نکروتروف مانند *Botrytis cinerea* از طریق مقاومت سیستمیک اکتسابی با دخالت هورمون اتیلن صورت می‌پذیرد که با افزایش بیان ژن فاکتور رونویسی *ERF5* همراه می‌باشد (۲). تمام این موارد نشان می‌دهند که دفاع سیستمیک در زمان بروز آلودگی سیستمیک ویروس PVY در توتون نیز فعال می‌شود. اما نتایج نشان دادند علیرغم آنکه ژن‌های دخیل در دفاع میزبان شامل *ERF5* و *IVR* در توتون تراریخت بیان نمی‌شوند (شکل ۳) ولی در گیاه تراریخت با بیان کم ژن *RDR6* غلظت هورمون سالیسیلیک اسید (شکل ۵) و نیز فعالیت اختصاصی آنزیم پرکسیداز (POX) (شکل ۴) و غلظت پروتئین PR-1 در بافت‌ها بسیار بیشتر از بافت‌های آلوده به TMV می‌باشد که پاسخ فوق حساسیت را نشان دادند (شکل ۲). همزمان نتایج آزمون وسترن بلات پروتئین پوششی ویروس PVY نشان داد میزان غلظت پروتئین مذکور در بافت برگ‌های توتون تراریخت R-5-1 بسیار

بیشتر از توتون غیر تراریخت می‌باشد به این مفهوم که این لاین از حساسیت بیشتری به آلودگی ویروسی برخوردار می‌باشد (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهند تنش زیستی حاصل از آلودگی شدید ویروس PVY در توتون حساس لاین R-5-1 با بیان کم ژن *RDR6* احتمالاً توانسته است موجب فعال شدن سیگنال‌های دفاع سیستمیک اکتسابی (SAR) شامل سالیسیلیک اسید و آنزیم POX در این لاین شود. از سوی دیگر به دلیل حضور تعداد کم نسخه‌های mRNA از ژن *RDR6* در سلول و اختلال در عملکرد سیستم انتقال پیام مقاومت، مسیر انتقال پیام در سلول مختل شده است و سیگنال‌های سالیسیلیک اسید و پراکسیداز دیگر نتوانسته‌اند به نحو موثری موجب بیان ژن‌های دفاعی در میزبان شوند. نتایج آزمون وسترن بلات برای پروتئین PR-1 نشان داد میزان غلظت پروتئین مذکور در لاین R-5-1 به میزان زیادی افزایش یافته است (شکل ۲). افزایش غلظت پروتئین PR-1 در این لاین با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک و نیز پروتئین پوششی ویروس PVY صورت پذیرفت. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی *Pathogenesis* related proteins (PR-Protein) در فضاهای درون و بیرون سلولی گیاهان وجود دارند و اغلب در ساختمان دیواره سلولی به کار رفته‌اند. این پروتئین‌ها در بافت‌های مختلف، در دماهای متفاوت و نیز شرایط مختلف فیزیولوژیک گیاه به طور متفاوت تولید می‌شوند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی را به صورت مخفف (PR-Protein) می‌نامند. این پروتئین‌ها ۱۵ تا ۲۰ درصد از وزن کل پروتئین‌های بافت را تشکیل می‌دهند و آنها را بر مبنی تفاوت در وزن‌های مولکولی، آرایش اسید آمینه‌ای و نیز روابط سرولوژیک به ۱۴ گروه طبقه بندی مایند (۲۴). برخی از آنها بسیار بازی و برخی نیز بسیار اسیدی می‌باشند از اینرو بسیار محلول و فعال می‌باشند. پروتئین‌های مذکور دارای وزن مولکولی بسیار پائین بوده و به حرارت مقاوم هستند و در pH های کم دوام خوبی دارند. پژوهش‌ها حاکی از آن است که PR-1 اسیدی در توتون بیشتر در محیط‌های بین سلولی حضور دارند. در صورتی که PR-1 های بازی بیشتر در درون واکوئل‌های درون سلولی وجود دارند (۲۵). بیشتر PR پروتئین‌ها دارای خاصیت آنزیمی ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشند و در اثر تنش‌های محیطی و

کنترل کنندگی در آن می باشد. از نتایج این بررسی در مجموع می توان نتیجه گرفت که پاسخ دفاعی SAR می تواند در پاسخ به تنش های بیوتروفیک از جمله آلودگی های سیستمیک ویروسی نیز بیان شود ولی برای موثر بودن سیگنال سیستمیک کننده آن یعنی سالیسیلیک اسید اجزاء ژنتیکی انتقال سیگنال باید بیان مناسبی داشته باشند و احتمالاً ژن *RDR6* می تواند یکی از اجزاء ژنتیکی موجود در آبشار انتقال سیگنال مسیر SAR باشد. نتایج حاصل از این بررسی می تواند راه را برای مهندسان ژنتیک در طراحی الگوهای ژنتیکی برای ایجاد مقاومت در گیاهان در برابر آلودگی های ویروسی همچون ویروس PVY که تا کنون تک ژن های دفاعی موثری برای آنها شناخته نشده است هموار سازد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدینوسیله به خاطر ایجاد شرایط و امکانات برای انجام این تحقیق و همچنین نظرات دقیق علمی بدینوسیله از آقای پروفیسور Peter Palukaitis محقق بخش ویروس شناسی مرکز تحقیقات زراعی اسکاتلند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایند. همچنین بدینوسیله از زحمات جناب آقای دکتر بهروز شاهسون بهبودی دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه تهران به دلیل فراهم آوردن امکان انجام تحقیق و راهنمایی های علمی کمال تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Akad F, Teverovsky E, David A, Czosnek H, Gidoni D, Gera A, Loebenstein G (1999) A cDNA from tobacco codes for an inhibitor of virus replication (IVR)-like protein. *Plant Molecular Biology*, vol. 40: 969-976.
2. Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal*, vol. 29: 23-32.
3. Brisson LF, Tenhaken R, Lamb CJ (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, vol. 6: 1703-1712.
4. Bruce TJ, Pickett JA (2007) Plant defence signalling induced by biotic attacks. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 10: 387-392.
5. de Bokx JA, Huttinga H (1981) Potato virus Y. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No. 242.

صدمات فیزیکی نیز تولید می شوند. اسید سالیسیلیک، جاسمونیک اسید، اکسین، سایتوکینین، اتیلن و گروه های فعال اکسیژنی می توانند به عنوان سیگنال تولید کننده آنها عمل نمایند. تا کنون مکانیسم عمل پروتئین PR-1 در مقاومت توتون دارای ژن مقاومت N نسبت به ویروس ها مشخص نشده است و داده های ضد و نقیضی در مورد نقش این پروتئین ها در بروز مقاومت وجود دارد. بررسی های متفاوتی بر روی نقش PR پروتئین ها در واکنش نسبت به ویروس ها صورت پذیرفته است و نتایج این بررسی ها حکایت از آن دارد که بر خلاف آلودگی های قارچی و باکتریایی که تولید این پروتئین ها در گیاه با بروز مقاومت نسبت به آنها همراه می باشد در مورد ویروس ها و ویروئیدها تولید این پروتئین ها موجب توسعه علائم در میزبان های حساس می شود. به عنوان مثال می توان به نتایج حاصل از بررسی های Naderi و Berger در سال ۱۹۹۷ اشاره نمود (۱۸). این دانشمندان اشاره نمودند در هنگام آلودگی ارقام حساس سیب زمینی به ویروس PVY میزان PR پروتئین ها افزایش می یابد (۱۸). نتایج نشان داد بیان ژن *AOX1* و نیز آنزیم پراکسیداز نیز تا ۲ هفته پس از آلودگی ویروس PVY در لاین حساس R-5-1 افزایش می یابد (اشکال B ۳ و ۴). آنزیم AOX وظیفه تخلیه الکترون تولید شده در چرخه فسفریلاسیون اکسیداتیو و در نهایت کاهش رادیکال های آزاد اکسیژنی مازاد تولید شده را بر عهده دارد (۲۹). چرخه وابسته به AOX به موازات چرخه انتقال الکترون در پاسخ های دفاعی میزبان به پاتوژن فعال می شود و به عنوان یک دریچه اطمینان عمل می نماید و وظیفه حفظ سلامت میتوکندری و سیستم تنفسی جاندار را عهده دار می گردد (۱۷). آنزیم پراکسیداز نیز در اکسیداسیون ترکیبات فنلیک و نیز حذف نمودن پراکسید هیدروژن از محیط درون سلولی نقش دارد (۳). فعالیت بالای آنزیم پراکسیداز در توتون حساس لاین R-5-1 همزمان با کاهش بیان ژن *AOX1* (در مقایسه با توتون غیر تراریخت و پاسخ فوق حساسیت) می رساند که تنش زیستی حاصل از آلودگی شدید ویروس در لاین حساس با افزایش تنفس و تجمع رادیکال های آزاد در سلول ها همراه می باشد و این امر بیانگر عملکرد ناقص سیستم اکسیداسیون سلول در لاین توتون حساس و کاهش توان

6. Fischer U, Dröge-Laser W (2004) Overexpression of *NtERF5*, a New Member of the Tobacco Ethylene Response Transcription Factor Family Enhances Resistance to *Tobacco mosaic virus*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, vol. 17: 1162-1171.
7. Fraser RS (1986) Genes for resistance to plant viruses. *Critical Review In Plant Sciences*, vol. 3: 257-94.
8. Fraser, RSS (1990) The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 28: 179-200.
9. Gera A, Tam Y, Teverovsky E, Loebenstein G (1993) Enhanced tobacco mosaic virus production and suppressed synthesis of the inhibitor of virus replication in protoplasts and plants of local lesion responding cultivars exposed to 35°C. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol. 43: 299-306.
10. Goodman RN, Kira'ly Z, Wood KR (1986) *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*, University of Missouri Press, USA, p. 433.
11. Holtzapffel RC, Castelli J, Finnegan PM, Millar AH, Whelan J, Day DA (2003) A tomato alternative oxidase protein with altered regulatory properties. *Biochemica et Biophysica Acta-Gene Structure And Expression*, vol. 606: 153-162.
12. Huang WE, Huang L, Preston GM, Naylor M, Carr JP, Li Y, Singer A, Whiteley AS, Wang H (2006) Quantitative in situ assay of salicylic acid in tobacco leaves using a genetically modified biosensor strain of *Acinetobacter* sp. ADP1. *The plant Journal*, vol. 46: 1073-1083.
13. Loake G, Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 10: 466-472.
14. Loebenstein G, Gera A (1981) Inhibitor of virus replication released from tobacco mosaic virusinfected protoplasts of a local lesion-responding tobacco cultivar. *Virology*, vol. 114: 132-139.
15. Manousopoulos N, Maiss E, Tsagris M (2000) Native electrophoresis and Western blot analysis (NEWeB): a method for characterization of different forms of potyvirus particles and similar nucleoprotein complexes in extracts of infected plant tissues. *Journal of General Virology*, vol. 81: 2295-2298.
16. Marone M, Mozzetti S, Ritis D, Pierelli L, Scambia G (2001) Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Proceed Online*. Vol. 3: 19-25.
17. Murphy AM, Gilliland A, York CJ, Hyman B, Carr JP (2004) High-level expression of alternative oxidase protein sequences enhances the spread of viral vectors in resistant and susceptible plants. *Journal of General Virology*, vol. 85: 3777-3786.
18. Naderi M, Berger PH (1997) Pathogenesis-related protein 1a is induced in potato virus Y infected plants as well as by coat protein targeted to chloroplasts. *Physiology of Molecular Plant Pathology*, vol. 51: 41-44.
19. Pringle CR (1999) *Virus Taxonomy* - 1999. *Archives in Virology*, vol. 144: 421-429.
20. Qu F, Ye X, Hou G, Sato S, Clemente TE, Morris TJ (2005) RDR6 has a broad-spectrum but temperature dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology*, vol. 79: 15209-15217.
21. Rakhshandehroo F, Takeshita M, Squires J, Palukaitis P (2009) The Influence of RNA-Dependent RNA Polymerase 1 on *Potato virus Y* Infection and on Other Antiviral Response Genes. *Molecular Plant Microbe Interactions*, vol. 22: 1312-1318.
22. Scheel D (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 1: 305-310.
23. Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994) *The Potyviridae*. CAB International, University Press, Cambridge, United Kingdom, 516 p.
24. Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 103: 753-765.
25. Van Loon LC (1999) Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Eds. S.K. Datta, S. Muthukrishnan, CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 1-19.
26. Yang Y, and Klessig DF (1996) Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible *myb* oncogene homolog from tobacco. *Proceedings of Natural of Academic Science*. vol. 93: 14972-14977.
27. Yang Y, Li R, Qi M (2000) In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant Journal*.vol. 22: 543-551.
28. Yang, SJ, Carter SA, Cole AB, Cheng NH, Nelson RS (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of Natural of Academic Science*, vol. 101: 6297-6302.
29. Yip JYH, Vanlerberghe GC (2001) Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Plant Physiology*, vol. 112: 327-333.
30. Yu D, Fan B, MacFarlane SA, Chen Z (2003) Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Molecular Plant Microbe Interactions*, vol. 16: 206-216.