Archive of SID

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.3, Fall 2019, P. 499-509
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۵۰۹-۴۹۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

بررسی کارآیی تیمارهای تلفیقی گرمادرمانی و کشت مریستم انتهایی بر تولید نهال عاری از سه ویروس آلوده کننده سیب "گوشت سرخ" (*Malus pumila* Mill.) در شرایط درون شیشه‌ای

نوشین کاظمی[1*]- علی اکبر حبشی[2]- وهب اسدی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹

چکیده

این پژوهش با هدف تولید نهال عاری از سه ویروس ACLSV، ASPV، ASGV سیب "گوشت سرخ" (*Malus pumila* Mill.)، در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) در سال ۱۳۹۴ انجام شد. آزمایش‌ها با ارزیابی اثربخشی تیمار گرمادرمانی (۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد) و کشت مریستم انتهایی (در سه اندازه کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر و بزرگ‌تر از ۰/۷ میلی‌متر) بر نرخ حذف ویروس از ریزشاخه‌ها انجام شد. در ابتدا حضور ویروس‌هایACLSV، ASGV و ASPV در نمونه‌های مادری با روش‌های آزمون الایزای ساندویچ دو طرفه آنتی بادی و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس تیمارهای گرمادرمانی و کشت مریستم در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. ریزشاخه‌های رشد یافته از مریستم توسط الایزا و RT-PCR برای هر سه ویروس بررسی شدند. به‌طورکلی نرخ حذف سه ویروس ACLSV (۲۵/۹ درصد)، ASGV (۷/۴ درصد) و ASPV (۴۴/۴ درصد) با یکدیگر متفاوت بود. نتایج نشان داد افزایش طول مدت گرمادرمانی و کاهش اندازه مریستم با اثر گذاری متفاوت بر ویروس‌های مورد مطالعه باعث افزایش نرخ عاری شدن ریزنمونه‌ها از ویروس شده است. افزایش دوره زمانی گرمادرمانی در ۲۱ روز باعث کاهش رشد و تکثیر و حتی از بین رفتن ریزنمونه‌ها شد. بنابراین ۱۴ روز گرمادرمانی مؤثرترین تیمار جهت حذف آلودگی ویروس‌های ASGV (۱۱/۱۱درصد)، ASPV (۸۸/۸۹ درصد) و ACLSV (۴۴/۴۴ درصد) از ریزنمونه‌های مورد مطالعه بود. در پایان آزمایش نمونه‌هایی که توسط هر دو روش الایزا و RT-PCR سالم تشخیص داده شدند، تکثیر و ریشه‌دار شدند و در شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: الایزا، Apple chlorotic leaf spot virus، Apple stem grooving virus، Apple stem pitting virus، RT-PCR

مقدمه

سیب یکی از مهم‌ترین میوه‌های مناطق معتدله و سردسیری است که بالاترین نرخ تجارت جهانی میوه تازه و فرآورده را در بین محصولات باغی دارد. متأسفانه استفاده از نهال آلوده به ویروس، میزان تولید این محصول و حتی سلامت گیاه را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد، به‌طوری‌که منجر به خسارت قابل ملاحظه و در نهایت افت عملکرد در کل جهان می‌شود (۷). ویروس‌های Apple chlorotic leaf spot virus) ACLSV، Apple stem grooving virus) ASGV و Apple stem pitting virus) ASPV) به ترتیب از جنس‌های *Trichovirus*، *Capillovirus* و *Foveavirus* که هر سه در خانواده‌ی *Flexiviridae* قرار دارند، پاتوژن‌های رایجی در سیب و گلابی هستند که به‌طور معنی‌داری میزان محصول و کیفیت میوه را کاهش می‌دهند (۱ و ۹). برخلاف بسیاری از آفات و بیماری‌هایی که باعث کاهش عملکرد محصولات می‌شوند، هیچ روش مبارزه قطعی علیه آلودگی‌های ویروسی وجود ندارد. بنابراین استفاده از نهال‌های سالم و عاری از ویروس برای استفاده در باغ‌های مادری و در نهایت احداث باغ‌های سالم اجتناب ناپذیر است (۱۲ و ۱۵). ازطرفی با توجه به اینکه هیچ ناقل طبیعی برای این ویروس‌ها شناخته نشده است، استفاده از ماده گیاهی سالم یک راه مؤثر برای جلوگیری از خسارت ویروس است (۲۳).

در آزمایش‌های گذشته روش‌های متعددی جهت حذف ویروس های دانه‌داران از جمله گرمادرمانی، شیمی درمانی و کشت مریستم انتهایی مورد بررسی قرار گرفته است، هر یک از محققین پیشین بر اساس هدف، امکانات و ارقام مورد بررسی از یک یا تلفیقی از روش-

۱- پژوهشگر پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات و علوم باغبانی
(*- نویسنده مسئول: Email:nooshinkazemi792000@yahoo.com)
۲- دانشیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی ایران
۳- دانشجوی دکتری پژوهشکده ملی انگور و کشمش دانشگاه ملایر
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.77252

www.SID.ir

Archive of SID

های مذکور بهره گرفته‌اند (۸، ۱۸، ۱۹ و۲۳). به نظر می‌رسد زمانی که یک گیاه آلوده به ویروس در دمای بالا رشد می‌کند، تکثیر ویروس در این حالت کنترل می‌شود و تقسیم سلولی و رشد سریع‌تر گیاه نسبت به ویروس می‌تواند نقاط عاری از ویروس مخصوصاً در قسمت‌های رأسی گیاه، مانند نواحی مریستمی به وجود آورد. در نتیجه این احتمال وجود دارد که تکثیر ویروس در بافت‌ها محدود شود و از طرفی عدم وجود ارتباط آوندی کامل بین مریستم و بافت‌های زیرین باعث ایجاد نقاط عاری از ویروس در نواحی مریستی شود (۶ و ۲۱). بنابراین گرمادرمانی یکی از مهم‌ترین راهکار حذف ویروس‌های درختان میوه مانند سیب و گلابی است و مریستم برداری پس از گرمادرمانی، جهت تکمیل فرآیند حذف ویروس بسیار رایج است (۱۸ و ۲۵). تکنیک الایزا (Enzyme-linked immunosorbent assay) با وسعت و کاربرد زیادی به عنوان یک راه تشخیص سریع آلودگی ویروسی در گیاهان مختلف استفاده می‌شود (۲ و ۱۳). به‌علاوه سنجش به کمک RT-PCR نیز به‌طور گسترده‌ای برای تشخیص ویروس‌های سیب و دیگر درختان میوه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶).

هدف از انجام این پژوهش دستیابی به دستورالعمل مناسب جهت عاری نمودن گیاه سیب "گوشت سرخ" از ویروس‌های زیانبار اقتصادی و تولید کلون‌های عاری از ویروس به شیوه ریز ازدیادی می‌باشد تا با حفظ این ژنوتیپ‌های ارزشمند به عنوان ژرم پلاسم بومی کشور در برنامه های اصلاحی آینده مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

این پژوهش در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشگاه بیوتکنولوژی ایران (ABRII) انجام شد. نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق، یکی از ژنوتیپ‌های سیب "گوشت سرخ" (شکل۳، A) بود که گیاهی منحصر به فرد از خانواده‌ی *Rosaceae*، جنس *Malus* و گونه *pumila* است. آنچه این گیاه را از دیگر گیاهان این گونه متمایز نموده، وجود میزان بالای آنتی‌اکسیدان و آنتوسیانین در کورتکس آن می‌باشد که علاوه بر ایجاد جذابیت ظاهری، خواص درمانی ویژه‌ای شامل جلوگیری از بیماری‌های قلبی، سرطان و دیابت دارد (۵).

نمونه‌های گیاهی در فصل بهار (اواخر اردیبهشت) از سرشاخه‌های در حال رشد سیب "گوشت سرخ" موجود در شهرستان شاهرود تهیه شدند. قطعات گیاهی شامل جوانه‌های جانبی با طول ۱/۵ تا ۲/۵ سانتی‌متر پس از ضدعفونی شدن در محیط کشت پایه MS به همراه دو میکرومولار BAP مستقر شدند. پس از شش هفته، ریزشاخه‌ها به محیط کشت بهینه پرآوری: محیط پایه MS حاوی چهار میکرومولار BAP، سه میکرومولار GA_3، ۳۰ بر لیتر گرم ساکاروز، ۶/۸ گرم بر لیتر آگار (۱۰)، در اتاقک رشدی با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل شدند.

بررسی اولیه آلودگی ویروسی در ریزشاخه‌های مادری

پس از تکثیر اولیه، ریز نمونه‌های سیب گوشت سرخ با روش‌های الایزا و RT-PCR جهت بررسی حضور ویروس‌های ASGV، ACLSV و ASPV مطالعه شدند. جهت آزمون الایزای ساندویچ دو طرفه آنتی بادی (DAS-ELISA) از کیت BIOREBA (سوئیس) استفاده شد. استخراج RNA از ریز نمونه‌ها برای RT-PCR با استفاده از پروتکل و بافر تهیه‌شده توسط معصومی و همکاران (۱۴) صورت گرفت و ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت دومرحله‌ای شرکت Thermo Scientific انجام شد و کیفیت آن با استفاده از آغازگر اکتین طراحی شده در پژوهش قبلی (۱۱) (جدول ۱) مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ویروس‌هایASPV، ACLSV و ASGV نیز در جدول (۱) ذکرشده است. آغازگر ویروس ASPV با بررسی مقالات و منابع موجود در این زمینه انتخاب‌شد، و آغازگر ویروس‌های ASGV و ACLSV، با استفاده از اطلاعات ژنوم هر ویروس از پایگاه داده NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) و (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo) و با استفاده از یک ابزار طراحی اولیه آنلاین (www.genscript.com) و بر اساس ژن تولید پروتئین پوششی ویروس طراحی شدند (۱۱). دمای اتصال اختصاصی هر یک از آغازگرها با استفاده از گرادیانت دمایی مورد بررسی قرار گرفت و دمای بهینه اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. محصول PCR بر روی ژل (w/v) ۱/۵ درصد آگاروز (رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید) قرار گرفت و سپس با کمک نور ماورای بنفش مشاهده شد.

اعمال تیمارهای حذف ویروس

پس از بررسی اولیه آلودگی در گیاه مادری، تعدادی از ریزنمونه‌های سیب "گوشت سرخ" به محیط کشت بهینه پرآوری منتقل شدند. ده روز پس از کشت، گیاهچه‌های درحال رشد در چهار رژیم زمانی گرمادرمانی قرار گرفتند. به این منظور گیاهچه‌ها ده روز پس از تکثیر در محیط کشت جدید (به‌صورت مستقیم و بدون افزایش تدریجی دما) برای مدت ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در دمای ۱±۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. گرمادرمانی ریزشاخه‌ها در محیط کشت پایه MS با افزودن چهار میکرومولار BAP، سه میکرومولار GA_3 در محیطی با شرایط نوری مناسب (۱۶ ساعت روشنایی و ۲۰۰۰ لوکس نور) انجام گرفت، تا نمونه‌ها امکان تولید و رشد شاخه‌های جدید را داشته باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- فهرست توالی آغازگر اکتین و توالی آغازگرهای اختصاصی تشخیص وجود ASPV، ACLSV و ASGV در سیب

Table 1- The primer of actin and list of used primers in the multiplex detection for ASPV, ACLSV and ASGV in apple

نام ویروس Virus name	نام آغازگر primer	توالی (´۳-´۵) Sequence (5´- 3´)	اندازه Size(bp)	منبع Reference
ASGV	ASG-F ASG-R	GGAAGACGTGCTTCAACAAGC ATCCAACAGCGGGAAACTGGG	236	11
ACLSV	ACLSV-F ACLSV-R	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	219	11
ASPV	ASPV247-F ASPV247-R	CAGTATTGTGCCTTYTAYGCRAAGC CCATAGAACGGATGCGGTACATYTG	247	4
ACTIN	ACTIN –F ACTIN –R	GTTCCCTGGTATTGCAGACCG CAAGGATGGACCCTCCAATCC	125	11

پس از پایان تیمارهای گرمادرمانی، اقدام به جداسازی مریستم انتهایی از ریزشاخه‌های رشد یافته در تیمارها گردید. مراحل جدا سازی مریستم زیر لوپ و تحت شرایط استریل در هود لامینار انجام گرفت. مریستم برداری در سه اندازه انجام شد (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر و بزرگ‌تر از ۰/۷ میلی‌متر). محیط کشت مورداستفاده جهت رشد مریستم‌ها حاوی نمک‌های پایه و ویتامین‌های MS ½ بود به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP و ۲/۵ گرم بر لیتر ژلرایت جهت جامد کردن محیط کشت. ظروف مورد استفاده در این مرحله پتری‌های یک بار مصرف و استریل با قطر هشت سانتی‌متر بودند. پس از قرار دادن مریستم‌ها در محیط کشت، درب پتری‌ها با کمک پارافیلم بسته شد و در نهایت برای رشد در فیتوترون با متوسط دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۲۰۰۰ لوکس نور مستقر شدند (۲۴). بعد از ۳۰ تا ۳۵ روز مریستم‌های رشد کرده و زنده مانده (شکل۳، B1)، به محیط کشت تکثیر، در شیشه‌های مک‌کارتی (به ارتفاع هشت سانتی‌متر و قطر داخلی ۲۰ میلی‌متر) منتقل شدند. پس از یک ماه ریزشاخه‌ها به محیط کشت تکثیر سیب در شیشه‌های بزرگ‌تر (جار آزمایشگاهی) منتقل شدند.

تکثیر گیاهچه‌های عاری از سه ویروسASGV، ACLSV و ASPV

هشت ماه پس از اعمال تیمار گرمادرمانی گیاهان رشد یافته از مریستم، از نظر وجود ویروس بررسی شدند. گیاهانی که با هر دو روش الایزا و RT-PCR عاری از ویروس بودند، در محیط کشت بهینه تکثیر شدند. تعداد ۴۰ ریزشاخه عاری از ویروس در محیط کشت ریشه‌زایی حاوی نمک‌های MS ۱/۲، فاقد ویتامین، همراه با ۳۰g/l ساکاروز و ۳ میکرو مولار IBA قرار داده شد. در هر ظرف پنج ریزشاخه با طول تقریبی ۴۰ میلی‌متر گذاشته شد، سپس ظروف کشت به مدت یک هفته در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از یک هفته ریز نمونه‌ها به محیط کشت دوم ریشه-زایی منتقل شدند. این محیط کشت حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط کشتMS ۱/۲ ، همراه ۳۰g/l ساکاروز و بدون هورمون بود. پس از انتقال ریزشاخه‌ها به محیط دوم ریشه‌زایی، شیشه‌های حاوی ریز نمونه در فیتوترون با متوسط دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۲۰۰۰ لوکس نور قرار گرفتند تا ریشه‌ها مشاهده شوند. گیاهان ریشه‌دار به داخل گلدان‌هایی به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر حاوی پرلایت و پیت ماس (۱:۱) استریل شده منتقل شدند و به مدت ۴ تا ۵ روز در رطوبت نسبی حدود ۹۰ درصد در گلخانه با دمای بین ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس سطح رطوبت نسبی به حدود ۶۰ درصد کاهش داده شد و گیاهان برای حدود چهار هفته در این شرایط قرار گرفتند. یک سال بعد حضور سه ویروس ASGV، ACLSV و ASPV با روش RT-PCR در نمونه‌ها مورد ارزیابی مجدد قرار گرفت.

واکاوی آماری و بررسی عملکرد آزمایش‌ها

آزمایش‌ها به‌صورت آزمون فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای پژوهش شامل زمان قرارگیری ریزشاخه تحت تیمار گرمادرمانی در چهارسطح (۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) و اندازه مریستم در سه سطح (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر و بزرگ‌تر از ۰/۷ میلی‌متر) بود. هر تیمار شامل پنج تکرار (در هر ظرف آزمایش پنج ریزنمونه قرار گرفت) بود به عبارتی ۳۰۰ واحد آزمایشی در این تیمارها قرار گرفتند. همچنین ۲۴۰ مریستم (چهار سطح تیمار زمانی گرمادرمانی، سه اندازه مریستم و ۲۰ تکرار) در این آزمایش کشت شد و ۷۲ ریزنمونه (چهار سطح تیمار زمانی گرمادرمانی، سه اندازه مریستم و شش تکرار) در پایان مراحل پژوهش با تکنیک‌های الایزا و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. محاسبات آماری داده‌های به دست آمده توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد و نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار Excel رسم گردید. میانگین تیمارها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

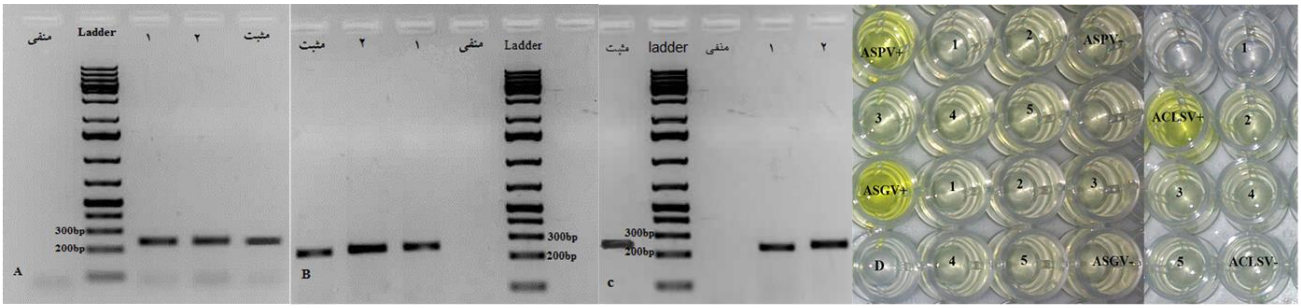
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

بررسی اولیه تشخیص آلودگی ویروسی در ریزنمونه‌های مادری

پس از گذشت ۶۰ دقیقه از افزودن محلول رنگ‌گیری ویروس-های ASGV و ACLSV به چاهک‌ها و انکوبه کردن پلیت در تاریکی و دمای اتاق (۲۵°C-۲۰)، خوانش چاهک‌ها توسط دستگاه ELISA reader انجام شد و اعداد به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱: D و جدول ۲). خوانش چاهک‌ها برای ویروس ASPV پس از ۱۲۰ دقیقه و در شرایط مشابه انجام شد (شکل ۱: D). میانگین اعداد به‌دست آمده از بررسی ریزشاخه‌ها با تکنیک الایزا اختلاف معنی داری با نتایج نمونه منفی موجود در کیت نداشت، درحالی‌که طبق نتایج حاصل از تکنیک RT-PCR، نمونه مادری مورد بررسی، به هرسه ویروس ASGV، ASPV و ACLSV آلوده بود (شکل ۱: A، B وC و جدول ۲).



شکل ۱- نتایج RT- PCR دو ریز نمونه مادری از سیب گوشت سرخ با آغازگرهای اختصاصی ویروس‌های ASGV (A)، ASPV (B) و ACLSV (C). اندازه قطعات مورد بررسی ۲۴۷bp (برای ویروسASPV)، ۲۳۶bp (برای ویروس ASGV) و ۲۱۹bp (برای ویروسACLSV) بوده است. تصویر نتایج الایزا در پنج نمونه مادری(D).

Figure 1- The result of RT-PCR, in two mother samples of red flesh apple for ASGV (A), ASPV (B) and ACLSV (C). The size of the tested parts was 247 bp (for the ASPV), 236 bp (for the ASGV) and 219 bp (for the ACLSV). The results of ELISA in five mother samples (D).

نتایج بررسی اثر تیمارها بر حذف ویروس از ریزشاخه‌ها با روش‌های الایزا و RT-PCR

مدت زمان تیمار گرمادرمانی، و اندازه‌ی مریستم جدا شده از ریزشاخه‌ها، اثر معنی‌داری ($P<$۰/۰۱) بر حذف ویروس‌هایASGV،ACLSV وASPV از ریزشاخه‌های مورد بررسی داشت.

مقایسه میانگین نتایج نشان داد مریستم‌های کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر مؤثرترین تیمار اندازه، جهت حذف ویروس‌های ACLS (۶۶/۶۷ درصد)، ASG (۲۲/۲۲درصد) و ASP (۶۶/۶۷ درصد) از ریزشاخه‌های مورد مطالعه بوده است. ضعیف‌ترین تیمار این بخش نیز کشت مریستم با اندازه بزرگتر از ۰/۷ میلی‌متر بود که کمترین میزان عاری شدن از ویروس‌های ACLS (صفر درصد)، ASG (صفر درصد) و ASP (۲۲/۲۲ درصد) در آن مشاهده شد. به طور کلی نتایج این بخش نشان داد، مریستم‌های بزرگ‌تر از ۰/۲ میلی‌متر که همراهی پریموردیوم‌های برگی بیشتری داشتند، شانس زنده‌مانی و رشد جداکشت‌ها را افزایش دادند و این نتیجه در تحقیقات قبلی نیز به‌دست آمده است (۲۰). اما طبق نتایج این پژوهش و پژوهش‌های دیگر در این زمینه (۱۱ و ۲۳) نرخ عاری سازی گیاهان از ویروس به صورت معنی‌داری تحت تأثیر اندازه مریستم قرار داشت و رابطه معکوسی بین اندازه مریستم و درصد عاری سازی ریزنمونه از ویروس برقرار بود. بنابراین هرچه اندازه مریستم کشت شده کوچکتر باشد، شانس بالاتری جهت عاری شدن از ویروس‌ها خواهد داشت.

براساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، افزایش طول مدت تیمار گرمادرمانی رابطه مستقیم و معنی‌داری بر عاری شدن ریزشاخه-های مورد بررسی از سه ویروس ACLSV ، ASGV و ASPV داشت. از طرفی قرارگیری طولانی مدت ریزشاخه‌ها در شرایط گرمادرمانی (۲۱ روز) به شدت به ریزنمونه‌ها خسارت وارد کرد، به-طوری‌که تمام ریزشاخه‌های قرار گرفته در تیمار ۲۱ روز گرمادرمانی از بین رفتند. نتایج حاصل در این زمینه مشابه نتایج آزمایشات پژوهش دیگری (۹) بود که عنوان کرده بودند تقریبا تمام ریزنمونه‌های قرار گرفته در تیمار گرمادرمانی ۳۸ درجه، پس از ۲۰ روز از بین رفتند. در پژوهشی (۲۴) آمده است، میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌های گلابی، پس از گذشت ۳۵ روز گرمادرمانی در ۳۷ درجه سانتیگراد، ۶۴ درصد بود. این اختلاف در نتایج حاصله، می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان مقاومت میزبان به دمای بالا، و همچنین تفاوت در میزان دمای به

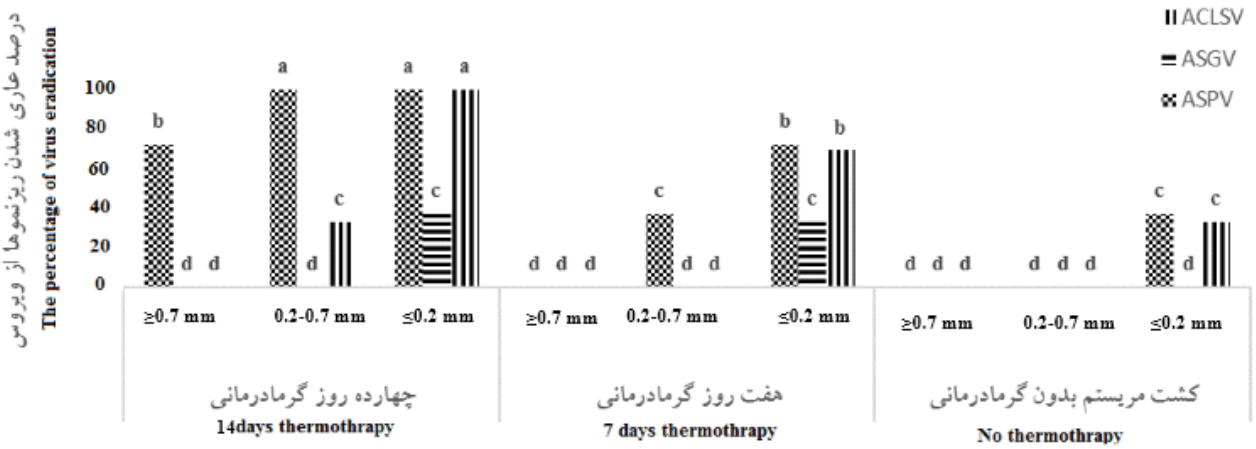
www.SID.ir

Archive of SID

کارگرفته شده جهت تیمار گرمادرمانی باشد. در پژوهشی (۲۳) در ارتباط با ریزنمونه‌های گلابی Fengshui آمده است، تعدادی از گیاهچه‌ها پس از ۱۵ روز گرمادرمانی از بین رفتند، و در ادامه آزمایش میزان از دست رفتن ریزنمونه‌ها با افزایش دوره‌ی گرما درمانی به شدت افزایش یافت.

مقایسه میانگین نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد تیمارهای ۱۴روزه (۴۴/۴۴ درصد) گرمادرمانی اثر مناسبی بر حذف ویروس ACLS از ریزشاخه‌ها داشته است و درصد قابل توجهی از ریزشاخه-های مورد مطالعه در تیمار ۱۴ روز گرمادرمانی (۸۸/۸۹ درصد) از ویروس ASP عاری شدند. تفاوت معنی‌داری بین دوره‌های ۷ و ۱۴ روزه گرمادرمانی (۱۱/۱۱درصد) جهت حذف ویروس ASG از ریزشاخه‌های مورد بررسی مشاهده نشد (شکل ۲). این امر می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت کم ویروس ASG به افزایش طول مدت گرمادرمانی باشد. تیمار کشت مریستم به تنهایی (تیمار شاهد) راندمان بسیار پایین در حذف ویروس‌های ACLSV (صفر درصد)، ASPV (۱۱/۱۱ درصد) و ASGV (صفر درصد) از ریزشاخه‌ها داشت (شکل ۲).

به طور کلی نتایج این بخش نشان داد، با افزایش طول دوره گرمادرمانی نمونه‌ها پیش از مریستم برداری، میزان عاری شدن گیاهان در هر سه نوع ویروس افزایش یافته است، این نتایج منطبق بر نتایج بسیاری از پژوهش‌های قبلی است که افزایش طول دوره‌ی گرمادرمانی را در حذف ویروس بسیار مؤثر می‌دانند (۸ و ۱۷). از طرفی در پژوهش‌ها آمده است، دمای بالا با جلوگیری از ساخت و تکثیر RNA ویروس می‌تواند انتشار ویروس به مریستم انتهایی را کاهش دهد (۱۸، ۲۳ و ۲۵). بدیهی است که توان ارقام و گونه‌های مختلف در زمینه امکان رشد و نمو در شرایط گرمادرمانی متفاوت است و با توجه به نتایج، تیمار ۱۴ روز گرمادرمانی بهترین تیمار پژوهش حاضر در زمینه حذف ویروس از ریزنمونه‌های مورد آزمایش بود، که ضمن حفظ تعداد قابل ملاحظه‌ای از ریزنمونه‌ها، بیشترین نرخ عاری شدن از ویروس‌های مورد مطالعه را نشان داد.



شکل ۲- درصد عاری شدن ریزنمونه‌ها از ویروس‌های ACLSV، ASGV و ASPV در پایان دوره گرمادرمانی و پس از هشت ماه از کشت مریستم گیاهچه‌های *Malus pumila* Mill.

Figure 2- The percentage of ASPV, ACLSV and ASGV elimination at the end of thermotherapy treatments after eight months of meristem culture of *Malus pumila* Mill. Explants (DMRT, $p \leq 0.01$)

نتایج آزمون الایزا در ریزشاخه‌های حاصل از مریستم کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، پس از ۱۴ روز گرمادرمانی در جدول (۲) آمده است. نتایج اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های سالم و آلوده به ویروس (با استناد به نتایج RT-PCR) را نشان نداد. به طور کلی نتایج به دست آمده از آزمون الایزا در این پژوهش، با نتایج RT-PCR هم‌خوانی نداشت و قابل تفسیر نبود. در تعدادی از ریزشاخه‌ها با اینکه عدد حاصل از آزمون الایزا، از کنترل منفی بالاتر بود، اما نتیجه RT-PCR نمونه را عاری از ویروس نشان داد، و در برخی موارد نتایج آزمون الایزا مثبت کاذب بود و این نمونه‌ها در روش RT-PCR سالم تشخیص داده شدند. بنابراین با توجه به نتایج این بخش (جدول ۲) و پژوهش‌های پیشین (۲، ۱۱ و ۱۳)، الایزا از دقت کافی جهت ردیابی ویروس برخوردار نبود و برای دسترسی به نتیجه مناسب، استفاده از روش‌های دقیق‌تر مانند RT-PCR توصیه می‌شود.

نتایج RT-PCR نشان داد، نرخ حذف سه ویروس ACLSV (۲۵/۹ درصد)، ASGV (۷/۴ درصد) و ASPV (۴۴/۴ درصد) در گیاه با یکدیگر متفاوت بود. این امر می‌تواند ناشی از تفاوت ساختار ویروس‌ها و سرعت حرکت ذرات پروتئین ویروس و عوامل مؤثر بر انتقال ویروس در سلول‌های گیاهی باشد که در پژوهش‌های گذشته نیز بررسی و تایید شده است (۲۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- نتایج بررسی وجود ویروس‌های ASPV، ACLSV و ASGV سیب با استفاده از تکنیک الایزا (بررسی‌شده در OD 405/492nm) و RT-PCR در پنج ریز نمونه مادری و ریز نمونه‌های رشد یافته از مریستم (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر) پس از ۱۴ روز گرمادرمانی در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد.

Table 2- The results of the presence of ASPV, ACLSV, and ASGV viruses by using ELISA (tested in OD 405 / 492nm) and RT-PCR in five maternal explants and meristem grown explants (0.2 mm≥) after 14 days of thermotherapy at 38°C.

نوع ویروس virus	نوع نمونه مورد بررسی Type of examined sample	ریز نمونه ۱ Explants 1	ریز نمونه ۲ Explants 2	ریز نمونه ۳ Explants 3	ریز نمونه ٤ Explants 4	ریز نمونه ٥ Explants 5
ACLS	نتیجه الایزای ریزنمونه مادری Result of mother samples by ELISA	0.140	0.160	0.160	0.202	0.243
	نتیجه RT-PCR ریزنمونه‌مادری Result of mother samples by RT-PCR	+	+	+	+	+
	نتیجه الایزای نمونه رشد یافته از مریستم The result of ELISA in grown samples from meristems[a]	0.122	0.118	0.165	0.160	0.153
	نتیجه RT-PCR نمونه رشد یافته از مریستم The result of RT-PCR in grown samples from meristems	-	-	+	+	-
	کنترل مثبتACLSV Positive control of ACLSV	3	3	3	3	3
	کنترل منفیACLSV Negative control of ACLSV	0.110	0.110	0.110	0.110	0.110
ASG	نتیجه الایزای ریزنمونه مادری Result of mother samples by ELISA	0.168	0.202	0.247	0.174	0.184
	نتیجه RT-PCR ریزنمونه‌مادری Result of mother samples by RT-PCR	+	+	+	+	+
	نتیجه الایزای نمونه رشد یافته از مریستم The result of ELISA in grown samples from meristems[a]	0.116	0.147	0.261	0.142	0.180
	نتیجه RT-PCR نمونه رشد یافته از مریستم The result of RT-PCR in grown samples from meristems	-	+	+	-	+
	کنترل مثبتACLSV Positive control of ACLSV	3	3	3	3	3
	کنترل منفیACLSV Negative control of ACLSV	0.110	0.110	0.110	0.110	0.110
ASP	نتیجه الایزای ریزنمونه مادری Result of mother samples by ELISA	0.179	0.234	0.348	0.245	0.320
	نتیجه RT-PCR ریزنمونه‌مادری Result of mother samples by RT-PCR	+	+	+	-	-
	نتیجه الایزای نمونه رشد یافته از مریستم The result of ELISA in grown samples from meristems[a]	0.120	0.183	0.273	0.203	0.105
	نتیجه RT-PCR نمونه رشد یافته از مریستم The result of RT-PCR in grown samples from meristems	-	-	-	-	-
	کنترل مثبتACLSV Positive control of ACLSV	3	3	3	3	3
	کنترل منفیACLSV Negative control of ACLSV	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150

ازطرفی براساس نتایج پژوهش‌های پیشین که در گیاه گلابی صورت گرفت، ویرس ACLSV پس از ۳۳ روز گرمادرمانی حذف شد

www.SID.ir

Archive of SID

اما غلظت ویروس ASGV (با تکنیک الایزا) نزدیک به نمونه مثبت بود (۳)، در مطالعه دیگری نیز (۲۴) آمده است ACLSV نسبت به دماهای بالا حساس‌تر از ASGV بود، نتایج مذکور با نتایج حاصل از این پژوهش، مشابهت داشت و حذف ویروس ASGV در ریزشاخه-های سیب گوشت سرخ سخت تر از حذف ویروس ACLSV انجام شد.

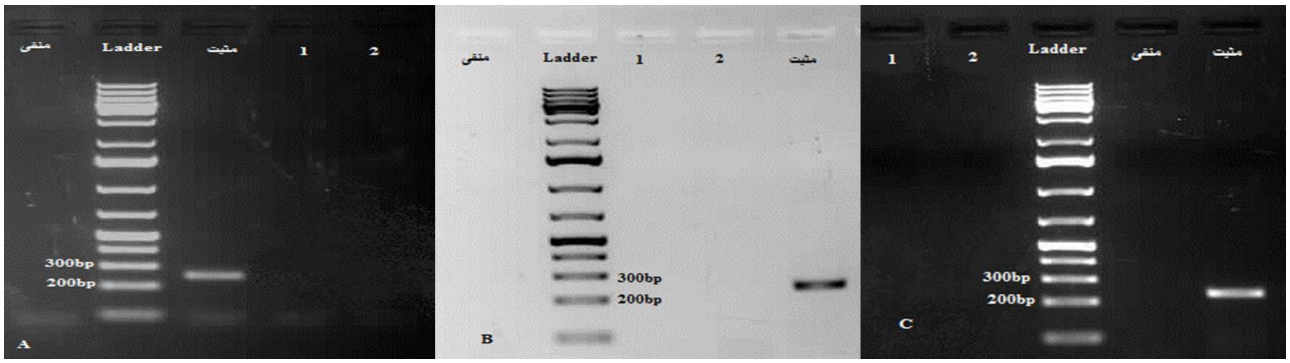
به‌طور کلی در بین ویروس‌های مورد مطالعه در این پژوهش، ویروس ASPV نرخ حذف بالاتری نسبت به ویروس‌های ACLSV و ASGV داشت. در تأیید نتایج حاصل از این پژوهش، در پژوهش های قبلی نیز کارآمدی متفاوت حذف این سه ویروس از ریزشاخه-های گیاهی گزارش شده است (۹ و ۱۱).

تولید نهال عاری از سه ویروس ASPV، ASGV و ACLSV

در انتها ۸۶ درصد از ریزنمونه‌های عاری از سه ویروس ASPV ، ASGV و ACLSV ریشه‌دار شدند. ۹۵ درصد از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، در شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند (شکل ۳). یک سال بعد عدم حضور ویروس در گیاهان گلدانی با تکنیک RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴) و تمامی گیاهان مورد بررسی عاری از آلودگی به ویروس‌های مورد مطالعه بودند.

شکل ۳- میوه سیب گوشت سرخ (A)، ریزنمونه رشد یافته از مریستم (B1)، پرآوری شاخه (B2)، مرحله ریشه‌زایی (C)، و تعدادی از نهال‌های سازگار شده عاری از سه ویروس ACLSV، ASGV و ASPV (D)

Figure 3- Fruit of red flesh apple (A), a grown up explant from meristem (B1), *in vitro* shoot multiplication (B2), rooting stage (C) and a number of adapted virus-free seedlings from ASPV, ACLSV and ASGV (D)



شکل ٤- نتیجه RT-PCR دو نمونه نهال گلدانی سیب گوشت سرخ عاری از ویروس‌های ACLSV (A)،ASPV (B) و ASGV (C)

Figure 4- The result of RT-PCR, in tow red flesh apple seedlings, free from ASPV, ACLSV and ASGV

نتیجه‌گیری

بررسی اولیه گیاهان مادری با روش مولکولی RT-PCR نشان داد تمام نمونه‌های مادری مورد بررسی، به ویروس‌های ASG، ASP و ACLS آلودگی داشتند. طول دوره تیمار گرمادرمانی (۳۸ درجه سانتی‌گراد) و اندازه‌ی مریستم کشت شده از ریز نمونه‌ها، اثر معنی‌داری ($P < ۰/۰۱$) بر حذف سه ویروس ACLSV، ASGV وASPV داشت. روش الایزا از دقت کافی جهت ردیابی ویروس برخوردار نبود و در بسیاری از موارد نتایج به‌دست آمده از این روش با نتایج حاصل از RT-PCR مغایرت داشت. تیمار ۱۴ روز گرمادرمانی به همراه اندازه یک مریستم برداری (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر) موثرترین تیمار در عاری شدن ریزشاخه‌های مورد مطالعه از سه ویروس ACLS (۱۰۰ درصد)، ASG (۳۷ درصد) و ASP (۱۰۰ درصد) بود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1- Adams M.J., Antoniw J.F., Bar Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G., and Fauquet C. M. 2004. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. Archives of Virology 149(8): 1045-1060.
2- Asghar A., and Singh G. 2007. Production of *Indian citrus ringspot virus* free plants of Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. Journal of Central European Agriculture 8(1).
3- Cies´lin´ska M. 2002. Elimination of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. Acta Horticulture 596: 481-484.
4- Deng X.Y., Hong N., Hu H.J., and Wang G.P. 2004. Detection of latent viruses in *Pyrus pyrifolia* by IC-RT-PCR and TC-RT-PCR. Journal of Fruit Science 21: 569-572.
5- Etherton P. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, Journal of Medicine 113: 71–88.
6- Gambino G., Di Matteo D., and Gribaudo I. 2009. Elimination of *Grapevine fanleaf virus* from three *Vitis vinifera* cultivars by somatic embryogenesis. European Journal of Plant Pathology 123(1): 57-60.
7- Hadidi A., and Barba M. 2011. Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. Virus and Virus Like Diseases of Pome and Stone Fruits 1(8).
8- Hu G.J., Hong N., Wang L.P., Hu H.J., and Wang G.P. 2012. Efficacy of virus elimination from *in vitro*-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. Crop Protection 37: 20-25.
9- Hu G., Dong Y., Zhang Z., Fan X., Ren F., and Zhou J. 2015. Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 121(2): 435-443.
10- Kazemi N., Amiri M.E., and Jafarkhani Kermani M. 2013. Hormonal optimization of medium for multiplication of rare apple genotype of Red Flesh. Thesis for M. Sc. in Horticulture. University of Zanjan.
11- Kazemi N., Zaree Nahandi F., Habashi A.A., and Asadi W. 2019. Molecular Assessment of Chemotherapy and Meristem Culture Efficiency for Production of Seven Cultivars of Virus-Free Pear (*Pyrus communis* L.). Journal of Agricultural Crops Production 21(1): 107-118.
12- Komorowska B., Malinowski T., and Michalczuk L. 2010. Evaluation of several RT-PCR primer pairs for the detection of *Apple stem pitting virus*. Journal of Virological Methods 168(1-2): 242-247.
13- Manganaris G.A., Economou A.S., Boubourakas I.N., and Katis N.I. 2003. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. Plant Cell Reports 22(3): 195-200.
14- Masoomi-Aladizgeh F., Jabbari L., Khayam Nekouei R., and Aalami A. 2016. A simple and rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. Protoc Exch.
15- Mathioudakis M.M., Maliogka V.I., Dovas C.I., Paunović S., and Katis N.I. 2008. Reliable RT-PCR detection of *Apple stem pitting virus* in pome fruits and its association with quince fruit deformation disease. Plant Pathology 58(2): 228-236.
16- Menzel W., Jelkmann W., and Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99(1-2): 81-92.
17- Panattoni A., Luvisi A., and Triolo E. 2013. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. Spanish Journal of Agricultural Research (1): 173-188.
18- Paprstein F., Sedlak J., Polak J., Svobodova L., Hassan M., and Bryxiova M. 2008. Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 94(3): 347-352.
19- Paprštein F., Sedlák J., Svobodová L., Polák J., and Gadiou S. 2013. Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance. Horticultural Science (Prague) 40: 186-190.
20- Ramgareeb S., Snyman S.J., Van Antwerpen T., and Rutherford R.S. 2009. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum spp*. cultivar NCo376) using apical meristem culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 100(2): 175-181.
21- Retheesh S.T., and Bhat A.I. 2010. Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. Crop Protection 29(10): 1214-1217.
22- Sareila O., Hohkuri M., Wahlroos T., and Susi P. 2004. Role of viral movement and coat proteins and RNA in phloem-dependent movement and phloem unloading of tobamoviruses. Journal of Phytopathology 152(11-12): 622-629.
23- Tan R., Wang L., Hong N., and Wang G. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 101(2): 229-235.
24- Wang L., Wang G., Hong N., Tang R., Deng X., and Zhang H. 2006. Effect of thermotherapy on elimination of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* for *in vitro*-cultured pear shoot tips. HortScience 41(3): 729-732.
25- Wang Q., Cuellar W.J., Rajamaki M.L., Hirata Y., and Valkonen J.P. 2008. Combined thermotherapy and

www.SID.ir

Archive of SID

cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Molecular Plant Pathology 9(2): 237-250.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.3, Fall 2019, P. 499-509
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۵۰۹-۴۹۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Evaluation of Combined Treatments of Thermotherapy and Apical Meristem Culture Efficiency on Virus Elimination from *in vitro* Shootlets of Red Flesh Apple (*Malus pumila* Mill.)

N. Kazemi[1*]- A.A. Habashi[2]- W. Asadi[3]

Received: 26-12-2018
Accepted: 31-07-2019

Introduction: Apple (*Malus spp.*) is one of the most economically important fruit crop worldwide. This crop is highly affected by various virus infections, leading its considerable devastation and eventually results in yield loss in the whole world. Among effective viruses, *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) which have been firstly characterized in apple (*Malus domestica*), play important roles in altering the plant defense mechanism, leading a low performance. According to the references, heat treatments can reduce the movement of virus particles into the apical meristem through inhibiting viral RNA synthesis, so high temperature over a long period is an efficient method for virus elimination. In additions, meristem culture is also a common method to eradicate viruses from horticultural plants. This study was done to produce virus-free (ACLSV, ASPV, ASGV) apple (*Malus pumila* Mill.) plantlets.

Materials and Methods: The effect of different thermotherapy duration (0, 7, 14 and 21 days at 38 °C) and the sizes of apical meristems for meristem culture(less than 0.2 mm, between 0.2 and 0.7 mm and larger than 0.7 mm) was assessed on virus eradication. Our plant material was a genotype of red flesh apple belongs to Budagovsky Bud.9 (*Malus+pumila*) "Niedzwetzkyana" of *Rosaceae* family from Shahroud, that has high levels of important phytochemicals like antioxidants, flavonoids and anthocyanins in its cortex, which in addition to attractiveness, creating special healing properties in some disease. At first the presence of ACLSV, ASGV and ASPV were checked in mother samples by ELISA and RT-PCR methods. Then we performed the thermotherapy treatments and later meristems were cultivated and grown *in vitro*. Regenerated shoots from meristem were tested by ELISA and RT-PCR methods for all three viruses. Samples that were diagnosed virus-free by both techniques, were proliferated, rooted and transferred into the pots to be used for later propagation and establishment of the mother orchard.

Results and Discussion ELISA results for the presence or absence of ACLSV, ASGV and ASPV were indeterminate; they were neither negative nor positive for each virus, indicating ELISA was not an accurate method to study virus infections in our samples. Therefore, careful examination of initial infection of samples was performed by RT-PCR. Examining mother samples by RT-PCR showed that all samples were infected by ASG, ASP and ACLS viruses.

Results of RT-PCR testing suggested that the number of days in thermotherapy and the size of meristem had a significant effect ($P<0.01$) on the ACLSV, ASGV and ASPV elimination. Increasing in the duration of the thermotherapy decreased the survival rate of the explants and it was difficult to acquire virus-free explants after 21 days treatments, because all the explants were destroyed in this treatment. The relation between the size of meristem and its survival has been examined in different studies, whose results are consistent with the present research and confirms that increasing the size of the meristem and the number of leaf primordium, will increase the vitality. However, it should be noted that larger meristems are more susceptible to viral contamination. In the previous study, the percentage of ASGV and ACLSV elimination was significantly influenced by the size of the meristem and the duration of the thermotherapy. In the same study, ACLSV, ASGV and ASPV could not be detected in plants grown from meristems smaller than 1 mm after 35 days of thermotherapy. They also showed that virus eradication was happened after shorter period of thermotherapy if smaller meristems were cultured (0.7 mm). The results of our study were consistent with these observations; ACLSV, ASGV and ASPV appeared to be eliminated more frequently from the smallest meristem treatment (smaller than 0.2 mm) compared to the other treatments (0.2-0.7 mm and larger than 0.7 mm). Elimination rates of ACLSV, ASGV and ASPV were different in each case and ASPV-free frequency obtained in regenerated shoots treatment was higher than other viruses (ASGV and ACLSV). This observation was similar to the results of

1- Researcher of Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
(*- Corresponding Author Email: nooshinkazemi792000@yahoo.com)
2- Departement of Tissue and Cell Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Ph.D. Student National Institute of Grape and Raisin in Malayer University, Iran

www.SID.ir

Archive of SID

some previous studies. It could be due to differences in the morphology of the viruses and transmission factors in plant cells that affect viruses, which has been investigated and confirmed in previous studies.

Meristem culture alone, without other treatments, had very low efficiency in virus elimination from explants. The best results of virus eradication from apple explants was obtained after 14 days of thermotherapy, that we had 44.44%, 11.11% and 88.89% of virus-free samples from ACLSV, ASGV and ASPV, respectively. Generally, our results showed that by increasing the thermotherapy duration, the elimination of all three types of viruses was increased. Many researchers also found that thermotherapy is a very effective treatment in virus eradication.

Conclusion: Results showed that increasing the duration of thermotherapy (14 days) and reducing the size of cultivated meristem (smaller than 0.2mm) increased the elimination rate of all three viruses (ACLSV ،ASPV ،ASGV) from apple explants.

Keywords: *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple stem grooving virus*, *Apple stem pitting virus*, ELISA, RT-PCR

www.SID.ir