



به‌زرعی کشاورزی

دوره ۲۱ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۸

صفحه‌های ۱۱۸-۱۰۷

ارزیابی مولکولی کارایی شیمی‌درمانی و کشت مریستم برای تولید هفت رقم

گلابی (*Pyrus communis* L.) عاری از ویروس

نوشین کاظمی^۱، فریبرز زارع نهندی^۲، علی اکبر حبشی^۳، وهب اسدی^۴

۱. دانش‌آموخته دکتری، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، کرج، ایران.
۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳. دانشیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران.
۴. دانشجوی دکتری، پژوهشکده ملی کشمش و انگور و دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۲۹

چکیده

این مطالعه با هدف تولید نهال سالم گلابی (*Pyrus communis* L.) جهت تکثیر و ایجاد یک باغ سالم مادری در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ابری) در سال ۱۳۹۳ انجام شد. آزمایش‌ها با ارزیابی کارایی شیمی‌درمانی (تیمارهای ریباویرین با غلظت‌های صفر، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم) 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 حذف تعدادی از سویه‌های ویروس (ASGV، ACLSV و ASPV) از هفت رقم گلابی (ابته‌فتل، بیروتی، درگری، کوشیا، لوئیزبون، ملینا و اسپادونا) صورت گرفتند. در ابتدا حضور سویه‌های سه ویروس ACLSV، ASPV و ASGV در نمونه‌های مادری با روش RT-PCR بررسی شد و تمام ریزنمونه‌ها به هر سه ویروس آلودگی داشتند، به‌جز ارقام ابته‌فتل و بیروتی که عاری از ویروس ASP بودند. تیمارهای شیمی‌درمانی و کشت مریستم در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد. ریزنمونه‌های رشدیافته از مریستم توسط RT-PCR برای هر سه ویروس مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد افزایش غلظت ریباویرین و کاهش اندازه مریستم در عاری شدن نمونه‌ها از هر سه ویروس بسیار مؤثر بوده است. همچنین واکنش ارقام و ویروس‌های مورد مطالعه به تیمارهای این پژوهش متفاوت بود. نمونه‌هایی که توسط RT-PCR سالم تشخیص داده شدند، تکثیر و ریشه‌دار شده و به گلدان منتقل شدند تا بتوان آن‌ها را به‌منظور ایجاد باغ مادری سالم مورد استفاده قرار داد.

کلیدواژه‌ها: ریباویرین، گلابی، نهال عاری از ویروس، Apple chlorotic leafspot virus، Apple stem grooving virus، Apple stem pitting virus، RT-PCR.

مقدمه

ریباویرین^۴ یک ترکیب شیمیایی آدنین یا گوانین دار با پتانسیل بالا جهت از بین بردن ویروس‌های گیاهی است (Papstein *et al.*, 2013). بهینه‌سازی غلظت ریباویرین و طول مدت زمان مواجهه ریزنمونه‌ها با این تیمار برای هر سیستم میزبان ویروس بسیار مهم است، زیرا غلظت بالای ریباویرین در محیط کشت می‌تواند بر رشد گیاهان کشت بافتی اثر منفی گذاشته و بسته به گونه گیاهی میزبان باعث بروز مسمومیت شود (Cieslinska, 2007; Hauptmanova, 2007; Paunovic *et al.*, 2007; Pola k, 2011).

ریباویرین با ایجاد اختلال در مسیر ساخت RNA ویروس و مهار عملکرد صحیح RNA پلیمرز باعث جلوگیری از تکثیر ویروس در بافت میزبان می‌گردد (Quecini *et al.*, 2006). ریباویرین ممکن است ویروس‌ها را از ساقه‌های اصلی گیاه حذف نکند، اما رشد جدید در حضور ریباویرین می‌تواند بدون ویروس باشد و یا حاوی مقادیر بسیار کم ویروس باشد (Simpkins *et al.*, 1981).

تکنیک الایز^۵ با وسعت و کاربرد زیادی به‌عنوان یک راه تشخیص ویروس‌های گیاهی استفاده می‌شود (Valero *et al.*, 2003). اما روش مناسبی جهت تشخیص غلظت‌های پایین ویروس نیست و توصیه می‌شود که در این زمینه از روش RT-PCR بهره گرفته شود (Manganaris *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2007).

این پژوهش باهدف دستیابی به گیاهان سالم برای تکثیر اولیه و احداث باغ مادری و درنهایت تولید نهال سالم گلابی (عاری از ویروس) از ارقام ابته‌فتل، بیروتی، درگزی، کوشیا، لوتیزبون، ملینا و اسپادونا صورت گرفت. جهت نیل به این هدف کارایی تیمارهای شیمی‌درمانی به‌صورت تلفیقی با تکنیک کشت مرستم در زمینه حذف ویروس با استفاده از روش RT-PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

سویه‌های سه ویروس^۱ ACLSV،^۲ ASGV و^۳ ASPV پاتوژن‌های رایجی در گلابی (*Pyrus sp. L.*) هستند که به‌طور معنی‌داری میزان محصول و کیفیت میوه آن را کاهش می‌دهند (Adams *et al.*, 2004; Shim *et al.*, 2004). ویروس‌های ذکرشده به سه جنس مختلف از خانواده Flexiviridae تعلق دارند (Adams *et al.*, 2004). جنس‌های سه ویروس موردبررسی عبارت‌اند از: ACLSV (*Trichovirus*)، ASGV (*Capillivirus*) و ASPV (*Foveavirus*) (Hu *et al.*, 2015). این سه ویروس در بدو ورود به گیاه معمولاً بی‌علامت هستند، اما زمانی که یک گیاه با چند سویه ویروس آلوده می‌شود؛ علائم بیماری به‌صورت شدید و ناگهانی بروز می‌کنند و به گیاه آسیب می‌زنند (Rana *et al.*, 2010; Tatineni *et al.*, 2009).

عدم وجود روش مبارزه قطعی علیه آلودگی‌های ویروسی باعث الزام استفاده از نهال‌های سالم و عاری از ویروس برای استفاده در باغ‌های مادری و درنهایت احداث باغ‌های سالم می‌شود (Komorowska *et al.*, 2008; Mathioudakis *et al.*, 2010). هیچ ناقل طبیعی برای این سه ویروس شناسایی نشده است، بنابراین با تولید و کشت پایه‌های عاری از ویروس گلابی و مراقبت از گیاهان در هنگام هرس و پیوند، می‌توان از داشتن گیاهان سالم اطمینان حاصل کرد (Tan *et al.*, 2010).

با توجه به عدم امکان گسترش آوند در ناحیه مرستمی گیاه، بیماری‌های ویروسی و باکتریایی توانایی آلوده‌سازی مرستم را ندارند. پس اگر بتوان این بخش را بدون همراهی آغازنده‌های برگ‌گی جدا و کشت نمود، می‌توان به بیماری‌زدایی از گیاه امیدوار بود (Hosokawa, 2008; Retheesh & Bhat, 2010).

4. 1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide
5. Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay

1. Apple chlorotic leafspot virus
2. Apple stem grooving virus
3. Apple stem pitting virus

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و مکان انجام پژوهش

گیاهان مورد استفاده در این پژوهش شامل هفت رقم گلابی (ابته فتل (*Abate Fetel*), بیروتی (*Beiruti*), درگزی (*Dargazi*), کوشیا (*Coscia*), لوئیزبون (*Louise Bonne*), ملینا (*Mellina*) و اسپادونا (*Spadona*)) بودند که از سرشاخه‌های جوان درختان بالغ بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر (واقع در ایستگاه کمال‌آباد کرج) در طول فصل رشد تهیه شدند و پس از ضدعفونی و استقرار، در محیط کشت مناسب پرآوری (James, 2001) تکثیر گردیدند. آزمایش‌ها در سال ۱۳۹۳ در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شدند.

بررسی اولیه تشخیص آلودگی ویروسی در ریزنمونه‌ها

پس از طی شدن مرحله استقرار و تکثیر اولیه، ریزنمونه‌های هفت رقم گلابی (ابته‌فتل، بیروتی، درگزی، کوشیا، لوئیزبون، ملینا و اسپادونا) با روش RT-PCR جهت بررسی حضور سویه‌های سه ویروس ASGV، ACLSV و ASPV مطالعه شدند. استخراج RNA از ریزنمونه‌های گلابی برای RT-PCR با استفاده از پروتکل و بافر تهیه‌شده توسط Masoomi et al. (2016) صورت گرفت. ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت دو مرحله‌ای شرکت Thermo Scientific انجام شد. ساخته‌شدن cDNA با کمک آغازگر اکتین (جدول ۱) مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی سویه‌های سه ویروس ASPV، ACLSV و ASGV نیز در جدول ۱ آمده است. محصول PCR بر روی ژل (w/v) ۱/۵ درصد آگاروز (رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم بروماید) قرار گرفت و سپس با کمک نور ماورای بنفش مشاهده شد.

اعمال تیمارهای حذف ویروس

شیمی‌درمانی

جهت اعمال تیمار شیمی‌درمانی از ریباویرین^۱ با غلظت‌های صفر، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. ریزنمونه‌های هفت رقم مورد مطالعه در محیط کشت تکثیر گلابی (محیط پایه QL به همراه BAP ۱mg/L، ۳۰g/L ساکاروز، ۶/۸g/L آگار) در مواجهه با غلظت‌های مختلف ریباویرین قرار گرفتند. مدت زمان این تیمارها هشت هفته بود.

کشت مریستم

پس از پایان زمان تیمارهای شیمی‌درمانی، اقدام به جداسازی مریستم انتهایی از ریزشاخه‌های رشد یافته در تیمارها شد. مراحل جداسازی مریستم زیر لوپ و تحت شرایط استریل در هود لامینار انجام گرفت. مریستم‌برداری در سه اندازه انجام شد (اندازه یک: کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، اندازه دو: بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر و اندازه سه: بزرگ‌تر از ۰/۷ میلی‌متر). محیط کشت مورد استفاده جهت رشد مریستم حاوی نمک‌های پایه و ویتامین‌های MS ۱/۲ بود به همراه ۰/۵ mg/l هورمون BAP و ۲/۵ g/l 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 قراردادن مریستم‌ها در محیط کشت، درب پتری‌ها با کمک پارافیلیم بسته شد و در نهایت برای رشد در فیتوترون با متوسط دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۲۰۰۰ لوکس نور مستقر شدند (Wang et al., 2006). بعد از ۳۰ تا ۳۵ روز مریستم‌های رشد کرده و زنده، به محیط کشت تکثیر (Kazemi et al., 2017)، در شیشه‌های مک‌کارتی (به ارتفاع هشت سانتی‌متر و قطر داخلی ۲۰ میلی‌متر) منتقل شدند. پس از یک ماه ریزنمونه‌ها

1. Virazole®; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

۲۰۰ میلی لیتر حاوی پرلایت و پیت خزه (۱:۱) استریل شده منتقل شدند و به مدت چهار تا پنج روز در رطوبت نسبی حدود ۹۰ درصد در گلخانه با دمای بین 24 ± 1 درجه سانتی گراد قرار گرفتند، سپس سطح رطوبت نسبی به حدود ۶۰ درصد کاهش داده شد و گیاهان برای حدود ۴ هفته در این شرایط قرار گرفتند. یک سال بعد به صورت مجدد حضور سویه‌های سه ویروس ASPV، ACLSV، و ASGV با روش RT-PCR در نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکاوی آماری و بررسی عملکرد آزمایش‌ها

آزمایش‌های مسیر پژوهش به صورت آزمون فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای پژوهش شامل شیمی درمانی در چهار سطح (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر) و اندازه مریستم در سه سطح (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر، بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر و بزرگ‌تر از ۰/۷ میلی‌متر) بر سویه‌های سه ویروس مورد بررسی (ASP، ASG، ACLS) در هفت رقم گلابی (ابته‌فتل، بیروتی، درگزی، کوشیا، لوئیزبون، ملینا و اسپادونا) بود. در هر ظرف آزمایش شیمی درمانی پنج ریزنمونه قرار گرفت و هر تیمار پنج تکرار داشت به عبارتی ۷۰۰ واحد آزمایشی در این تیمارها قرار گرفتند. همچنین ۱۶۸۰ مریستم در این آزمایش کشت شد (هفت رقم گلابی، چهار سطح شیمی درمانی، سه اندازه مریستم و ۲۰ تکرار).

به محیط کشت تکثیر گلابی در شیشه‌های بزرگ‌تر (جار آزمایشگاهی) منتقل شدند.

تکثیر گیاهچه‌های عاری از ویروس

حضور سه ویروس مورد مطالعه در ریزنمونه‌های رشد یافته از مریستم، با استفاده از تکنیک RT-PCR بررسی شد. ریزنمونه‌های سالم تشخیص داده شده، در محیط کشت مناسب (Kazemi et al., 2017) تکثیر شدند.

جهت ریشه‌دار کردن نمونه‌های سالم، ابتدا آن‌ها در محیط کشت ریشه‌زایی، حاوی نمک‌های MS ۱/۲، فاقد ویتامین، همراه با ۳۰g/l ساکاروز، ۱mg/l هورمون IBA و ۰/۳mg/l هورمون IAA قرار داده شدند. در هر ظرف پنج ریزنمونه با طول تقریبی ۴۰ میلی‌متر گذاشته شد، سپس ظروف کشت به مدت یک هفته در شرایط تاریکی و دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Sun et al., 2009).

پس از یک هفته ریزنمونه‌ها به محیط کشت دوم ریشه‌زایی منتقل شدند. این محیط کشت حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط کشت MS ۱/۲، همراه با ۳۰g/l ساکاروز و بدون هورمون بود. پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط دوم ریشه‌زایی، شیشه‌های حاوی ریزنمونه در اتاق رشد با دمای متوسط 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۲۰۰۰ لوکس روشنایی قرار گرفتند تا ریشه‌ها مشاهده شوند. ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌هایی به حجم

جدول ۱. فهرست توالی آغازگر اکتین و توالی آغازگرهای اختصاصی تشخیص وجود ASPV، ACLSV و ASGV در هفت رقم گلابی

(ابته‌فتل، بیروتی، درگزی، کوشیا، لوئیزبون، ملینا و اسپادونا)

منبع	اندازه (bp)	توالی (۵'–۳')	نام آغازگر	ویروس
Kazemi et al., 2017	۲۳۶	GGAAGACGTGCTTCAACAAGC ATCCAACAGCGGAAACTGGG	ASG-F ASG-R	ASGV
Kazemi et al., 2017	۲۱۹	TTCATGGAAGACAGGGGCAA AAGTCTACAGGCTATTTATAAGTCTAA	ACLSV-F ACLSV-R	ACLSV
Deng et al., 2004	۲۴۷	CAGTATTGTGCCTTYTAYGCRAAGC CCATAGAACGGATGCGGTACATYTG	ASPV247-F ASPV247-R	ASPV
Kazemi et al., 2017	۱۲۵	GTTCCCTGGTATTGCAGACCG CAAGGATGGACCCTCCAATCC	ACTIN-F ACTIN-R	ACTIN

ریزنمونه‌ها در تیمار ریباویرین، علاوه بر غلظت تیمار به گونه و ارقام مختلف گیاهی نیز بستگی دارد (Paprstein *et al.*, 2013).

نتایج بررسی اثر تیمارها بر حذف ویروس از ریزنمونه‌ها با روش RT-PCR

براساس نتایج به‌دست‌آمده، غلظت ریباویرین استفاده‌شده جهت شیمی‌درمانی و اندازه مرستم کشت‌شده از ریزنمونه‌ها، اثر معنی‌داری ($P < 0.01$) بر حذف سویه‌های سه ویروس ASPV، ASGV، ACLSV از ریزنمونه‌های مورد بررسی داشت. نوع رقم گلابی (ابته‌فتل، بیروتی، درگزی، کوشیا، لوئیزبون، اسپادونا، ملینا)، اثر معنی‌داری ($P < 0.01$) در حذف ویروس‌های ASP و ASG داشت، اما فاقد تأثیر معنی‌دار بر حذف ویروس ACLS بود.

مقایسه میانگین نتایج حاصل از بررسی اثر رقم بر عاری شدن ریزنمونه‌ها (پس از اعمال تیمارهای شیمی‌درمانی و کشت مرستم) از ویروس ASG نشان داد، بیشترین میانگین عاری شدن از این ویروس در رقم کوشیا ($67/3$ درصد) و کمترین میانگین آن در رقم اسپادونا ($15/5$ درصد) به‌دست آمده است.

ارقام کوشیا و لوئیزبون بالاترین میانگین عاری شدن از ویروس ASP ($85/5$ درصد) در بین ارقام را نشان دادند. لازم به‌ذکر است ارقام مادری ابته‌فتل و بیروتی از ابتدا عاری از ویروس ASP بودند. در بین ارقام مورد مطالعه، کمترین میانگین عاری شدن از ویروس ASP، در رقم اسپادونا ($48/5$ درصد) مشاهده شد.

نتایج به‌طورکلی نشان داد، نرخ حذف سویه‌های سه ویروس ACLS ($38/3$ درصد)، ASG ($35/2$ درصد) و ASP ($79/7$ درصد) در ریزنمونه‌های هفت رقم گلابی مورد مطالعه با یکدیگر متفاوت بوده است، این امر می‌تواند ناشی از تفاوت در مورفولوژی ویروس‌ها و

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۰) انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها به‌روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مورد مقایسه قرار گرفت. نمودارهای مربوطه توسط نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) رسم گردید.

نتایج و بحث

بررسی اولیه تشخیص آلودگی ویروسی در ریزنمونه‌ها

نتایج نشان داد تمام نمونه‌های مادری مورد بررسی، به ویروس‌های ASG و ACLS آلودگی داشتند. نمونه‌های مادری ارقام درگزی، کوشیا، لوئیزبون، ملینا و اسپادونا به ویروس ASP آلودگی داشتند اما ارقام ابته‌فتل و بیروتی عاری از این ویروس بودند (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

اثر تیمارهای شیمی‌درمانی بر رشد و تکثیر ریزنمونه‌ها

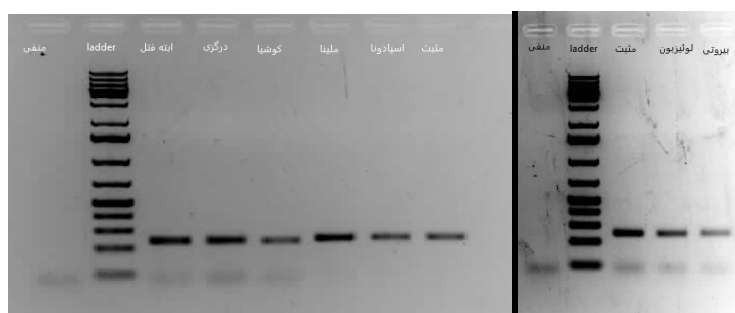
رشد و پرآوری ریزشاخه‌های تولیدشده در تیمار شیمی‌درمانی، به‌طور معنی‌داری ($P < 0.01$) تحت تأثیر غلظت ریباویرین در محیط کشت قرار گرفت. نرخ رشد و پرآوری ریزنمونه‌های تحت تیمار شیمی‌درمانی کمتر از نمونه‌های شاهد بود (شکل ۴) و با افزایش غلظت ریباویرین در محیط کشت، میانگین پرآوری کاهش یافت. رابطه منفی بین غلظت ریباویرین و رشد و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در تحقیقات قبلی نیز ذکر شده است (Cieslinska, 2007; Paunovic *et al.*, 2007) همچنین عنوان‌شده که غلظت‌های بالاتر از 25mg/l ریباویرین می‌تواند در گیاه مسمومیت ایجاد کند. تمام ریزنمونه‌های گلابی موجود در تیمار ریباویرین با غلظت 80mg/l مورد پژوهش از دست رفتند و میزان رشد و باززایی ریزشاخه در دیگر تیمارهای ریباویرین (بسته به رقم ریزنمونه) بسیار متنوع بود (شکل ۴). این نتایج نشان می‌دهد که تفاوت رشد و پرآوری و مقاومت یا حساسیت رشدی

ریزنمونه‌ها مشاهده نشد. در تأیید نتایج حاصل شده، در پژوهشی (Hu *et al.*, 2015) نیز ذکر شده، کارآمدی متفاوتی در حذف ویروس‌های ACLS (۸۴/۸ درصد)، ASP (۹۴/۱ درصد) مشاهده شد، به طوری که در بین ویروس‌های ذکر شده ASP راحت‌تر از بقیه حذف شد.

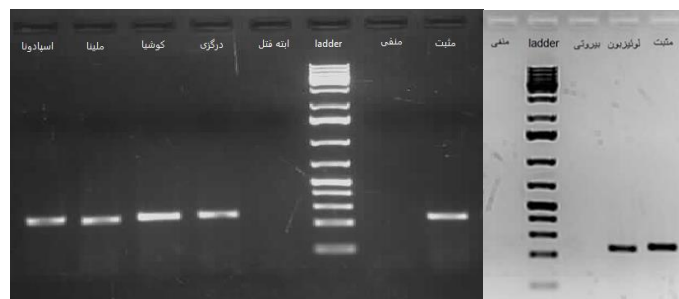
عوامل مؤثر بر انتقال ویروس در سلول‌های گیاهی باشد که در تحقیقات گذشته نیز بررسی و تأیید شده است (Prokhnevsky *et al.*, 2002; Sareila *et al.*, 2004). در بین سویه‌های سه ویروس مورد مطالعه در پژوهش، ویروس ASP نرخ حذف بالاتری داشت و تفاوت معنی‌داری بین حذف ویروس‌های ACLS و ASP در



شکل ۱. نتیجه RT-PCR نمونه‌های مادری با پرایمر ویروس ACLS. (ladder مورد استفاده 1KB plus بوده و قطعه cDNA مورد بررسی ۲۱۹ bp بوده است).

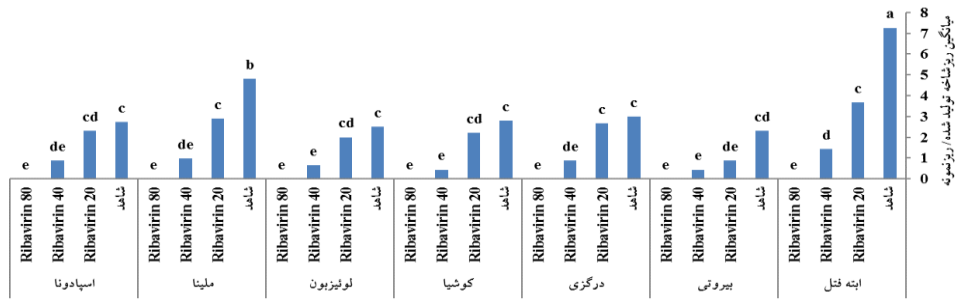


شکل ۲. نتیجه RT-PCR نمونه‌های مادری با پرایمر ویروس ASG. (ladder مورد استفاده 1KB plus بوده و قطعه cDNA مورد بررسی ۲۳۶ bp بوده است).



شکل ۳. نتیجه RT-PCR نمونه‌های مادری با پرایمر ویروس ASP. (ladder مورد استفاده 1KB plus بوده و قطعه cDNA مورد بررسی ۲۴۷ bp بوده است).

ارزیابی مولکولی کارآیی شیمی‌درمانی و کشت مریستم برای تولید هفت رقم گلابی (*Pyrus communis* L.) عاری از ویروس



شکل ۴. میزان رشد و تولید ریزشاخه در پایان دوره‌های شیمی‌درمانی (هشت هفته) با استفاده از ریبویرین، در هفت رقم گلابی، حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.01$) در بین نتایج است.

(۵/۱ درصد)، ASPV (۵۶/۲ درصد) و ASGV (۸/۴ درصد) از ریزنمونه‌ها داشت (شکل ۵).

اثر غلظت‌های مختلف تیمار ریبویرین بر میزان سالم‌سازی گیاهان مورد مطالعه

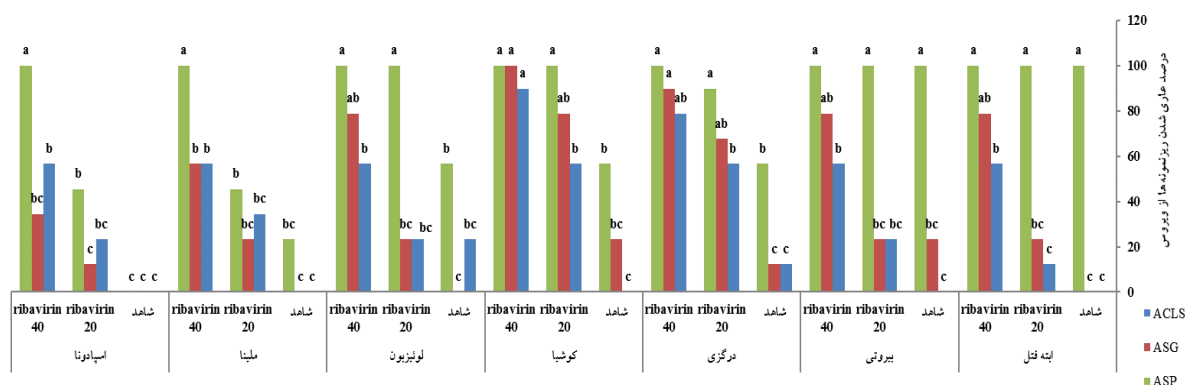
براساس نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، افزایش غلظت ریبویرین رابطه مستقیم و معنی‌داری بر عاری شدن ریزنمونه‌های مورد بررسی از سویه‌های سه ویروس ASGV، ASPV و ASLV داشت. از طرفی استفاده از غلظت بالای ریبویرین (۸۰ mg/l) در محیط کشت منجر به سمیت و از بین رفتن ریزنمونه‌ها شد. بنابراین با توجه به نتایج، تیمار ریبویرین ۴۰ میلی‌گرم در لیتر بهترین تیمار پژوهش حاضر در زمینه حذف ویروس از ریزنمونه‌های مورد آزمایش بود. تمام ریزنمونه‌های این تیمار از ویروس ASP عاری شدند (۱۰۰ درصد) و در زمینه ویروس‌های ACLS (۶۴/۵ درصد) و ASG (۷۳/۹ درصد) هم درصد عاری‌سازی قابل‌توجهی در مقایسه با تیمارهای گرمادرمانی (Kazemi et al., 2017) مشاهده شد. تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر ریبویرین (با اختلاف معنی‌دار نسبت به تیمار ۴۰ mg/l ریبویرین) مؤثرتر از تیمار شاهد در حذف سویه‌های سه ویروس ASP (۸۲/۹ درصد)، ACLS (۳۲/۸ درصد) و ASG (۳۵/۹ درصد) از ریزنمونه‌ها بود (شکل ۵).

اثر تیمار اندازه مریستم کشت‌شده بر میزان عاری‌سازی ریزنمونه‌ها از ویروس

در پژوهش‌های بسیاری، رابطه بین اندازه مریستم و زنده‌مانی آن مورد بررسی قرار گرفته که نتایج آنها با پژوهش حاضر مطابقت داشته و تأیید می‌کند هرچه اندازه مریستم بزرگ‌تر و همراهی پریموردیوم‌های برگری را بیشتر داشته باشد، میزان زنده‌مانی جداکشت افزایش خواهد یافت (Chiari & Bridgen, 2002; Ramgareeb et al., 2009).

در پژوهشی گزارش شده است، درصد عاری‌سازی گیاهان از ویروس‌های ASG و ACLS به‌صورت معنی‌داری تحت تأثیر اندازه مریستم قرار دارد (Tan et al., 2010). مقایسه میانگین نتایج نشان داد اندازه یک (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر) مریستم برداری مؤثرترین تیمار جهت حذف آلودگی ویروس‌های ACLS (۴۵/۵ درصد)، ASG (۵۴ درصد) و ASP (۸۹/۹ درصد) از ریزنمونه‌های مورد مطالعه بوده است. ضعیف‌ترین تیمار نیز اندازه سه مریستم برداری بود که کمترین میزان عاری شدن از ویروس‌های ACLS (۰/۸ درصد)، ASG (۲۱/۷ درصد) و ASP (۶۶/۷ درصد) در آن مشاهده شد.

تیمار کشت مریستم به تنهایی (تیمار شاهد) راندمان بسیار پایین در حذف سویه‌های سه ویروس ACLSV



شکل ۵. مقایسه درصد عاری شدن ریزنمونه‌های رشد یافته از مریستم هفت رقم گلابی، از ویروس‌های ASP، ASG و ACLS در پایان دوره‌های شیمی‌درمانی و کشت مریستم. حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.01$) در بین نتایج است.

به نوع ریزنمونه و غلظت ویروس در مواد اولیه گیاهی نیز مرتبط باشد. به‌طور کلی، با توجه به نتایج ارزیابی شده از شرایط رشد و درصد عاری‌شدن ریزنمونه‌ها از ویروس در تیمار ریباویرین با غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر، می‌توان گفت این تیمار در مسیر تولید نهال عاری از ویروس گلابی مؤثر و قابل توصیه است.

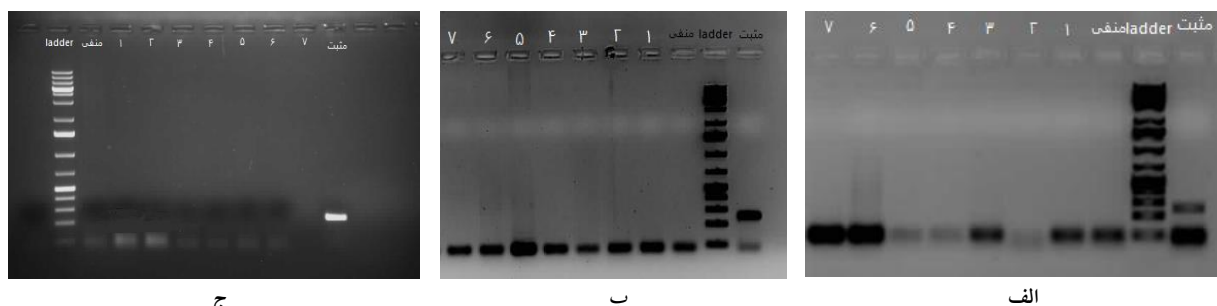
تولید نهال سالم گلابی

۷۳ درصد از ریزنمونه‌های سالم (عاری از سه ویروس ASP، ASG و ACLS) که تحت تیمار ریشه‌زایی قرار گرفته بودند ریشه‌دار شدند. ۹۶ درصد از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، در شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند (شکل ۷). یک سال بعد عدم حضور ویروس در گیاهان گلدانی با تکنیک RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶) (تمامی گیاهان مورد بررسی عاری از آلودگی ویروسی بودند)، تا گیاهان به‌منظور احداث باغ سالم مادری جهت تولید نهال عاری از ویروس گلابی مورد استفاده قرار گیرند.

نتایج یک پژوهش نشان داد که ریباویرین فعالیت ضد ویروسی بالایی نسبت به ASGV دارد (James, 2001). اما طبق نتایج این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین حذف ACLSV و ASGV مشاهده نشد و حذف ASPV از ریزنمونه‌های این پژوهش بهترین نتیجه را داشت. این مورد لازم است ذکر شود ASPV در همه تیمارها سریع‌تر از ACLSV و ASGV حذف شد و نتایج مشابهی نیز در مطالعات دیگر مشاهده شده است (Hu et al., 2015; Kazemi et al., 2017).

در پژوهشی بیان شده که تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ریباویرین قادر به حذف ACLSV از ۷۸ تا ۸۸ درصد از ریزنمونه‌های گلابی است (Cieslinska, 2002). همان محقق گزارش کرد که ریباویرین در غلظت ۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در حذف ACLSV از ریزنمونه‌های میروبالان مؤثر است (Cieslinska, 2007). نتایج این مطالعه از لحاظ غلظت‌های مؤثر، با گزارش مذکور تطابق نداشت، این موضوع نشان می‌دهد که موفقیت شیمی‌درمانی می‌تواند

ارزیابی مولکولی کارآیی شیمی‌درمانی و کشت مریستم برای تولید هفت رقم گلابی (*Pyrus communis* L.) عاری از ویروس



شکل ۶. نتیجه RT-PCR تعدادی از نمونه‌های عاری از ویروس (الف. ACLSV، ب. ASPV، ج. ASGV، ۱: ابته‌فتل، ۲: بیروتی، ۳: درگزی، ۴: کوشیا، ۵: لوئیزبون، ۶: ملینا و ۷: اسپادونا).



شکل ۷. الف) یک نمونه مریستم در حال رشد، ب) ریزنمونه رشد یافته از مریستم در شیشه‌های مک کارتی، ج و د) مرحله سازگاری نهال سالم گلابی در گلخانه.

بیشترین میانگین عاری شدن از ویروس ASG در رقم کوشیا (۶۷/۳ درصد) و کمترین میانگین آن در رقم اسپادونا (۱۵/۵ درصد) به‌دست‌آمد. ارقام کوشیا و لوئیزبون بالاترین میانگین عاری شدن از ویروس ASP (۸۵/۵ درصد) را نشان دادند و رقم اسپادونا (۴۸/۵ درصد) کمترین میانگین را داشت. تیمار ریبویرین ۴۰ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه کوچک‌ترین اندازه مریستم برداری (کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر) بیشترین اثر را بر عاری شدن ریزنمونه‌ها از ویروس داشتند.

منابع

Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., & 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-004-0304-0>.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی اولیه گیاهان مادری با روش مولکولی RT-PCR نشان داد به‌جز ارقام ابته‌فتل و بیروتی که تنها به ویروس ASP آلودگی نداشتند، ارقام درگزی، کوشیا، لوئیزبون، ملینا و اسپادونا به هر سه ویروس مورد مطالعه آلوده بودند. رشد و زنده‌مانی ریزشاخه‌ها، در تیمارهای شیمی‌درمانی با ریبویرین، به‌طور معنی‌داری ($P < 0/01$) تحت تأثیر نوع رقم، غلظت تیمار و اثر متقابل این دو فاکتور بود. غلظت ریبویرین استفاده شده جهت شیمی‌درمانی و اندازه مریستم کشت‌شده از ریزنمونه‌ها، اثر معنی‌داری ($P < 0/01$) بر حذف سویه‌های سه ویروس ACLSV، ASGV و ASPV از ریزنمونه‌های مورد بررسی داشت. نوع رقم گلابی (ابته‌فتل، بیروتی، درگزی، کوشیا، لوئیزبون، اسپادونا، ملینا)، اثر معنی‌داری ($P < 0/01$) در حذف ویروس‌های ASP و ASG داشت، اما فاقد تأثیر معنی‌دار بر حذف ویروس ACLS بود.

به‌زراعی کشاورزی

دوره ۲۱ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۸

- Chiari, A., & Bridgen, M. P. (2002). Meristem culture and virus eradication in *Alstroemeria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1), 49-55. <https://doi.org/10.1023/A:1012947401640>.
- Cieslinska, M. (2002). Elimination of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) from pear by in vitro thermotherapy and chemotherapy. *Acta Horticulturae*, (ISHS), 596, 481-484. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.596.80>.
- Cieslinska, M. (2007). Application of thermotherapy and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 15, 117-124.
- Deng, X. Y., Hong, N., Hu, H. J., & 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.
- Hauptmanova, A., & Polak, J. (2011). The elimination of Plum pox virus in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of in vitro cultures. *Horticultural Science* (Prague), 38(2), 49-53. <https://doi.org/10.17221/10/2010-HORTSCI>.
- Hosokawa, M. (2008). Leaf primordia-free shoot apical meristem culture: a new method for production of viroid-free Plants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77(4), 341-349. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.77.341>.
- Hu, G., Dong, Y., Zhang, Z., Fan, X., Ren, F., & 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. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0714-6>.
- James, D. (2001). Long term assessment of the effects of in vitro chemotherapy as a tool for *Apple stem grooving virus* elimination. *Acta Horticulturae* (ISHS), 550, 459-462. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.550.69>.
- Kazemi, N., Zaree Nahandi, F., Habashi, A., & Dadpour, M. (2017). Assessment of the efficacy of thermotherapy and Meristem culture using molecular and serological techniques to optimize production of healthy pear plantlet. Thesis for the degree of Ph.D. University of Tabriz.
- Komorowska, B., Malinowski, T., & Michalczyk, 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. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.04.024>.
- Manganaris, G. A., Economou, A. S., Boubourakas, I. N., & Katis, N. I. (2003). Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports*, 22(3), 195-200. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0681-y>.
- Mathioudakis, M. M., Maliogka, V. I., Dovas, C. I., Paunović, S., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01952.x>.
- Masoomi-Aladizgeh, F., Jabbari, L., Khayam Nekouei, R., & Aalami, A. (2016). A simple and Rapid system for DNA and RNA isolation from diverse plants using handmade Kit. *Nature, Protocol Exchange*.
- Papstein, F., Sedlak, J., Svobodova, L., Polak, J., & Gadiou, S. (2013). Results of in vitro chemotherapy of apple cv. Fragrance. *Horticultural Science* (Prague), 40(4), 186-190. <https://doi.org/10.17221/37/2013-HORTSCI>.
- Prokhnevsky, A. I., Peremyslov, V. V., Napuli, A. J., & Dolja, V. V. (2002). Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of Beet yellows virus. *Journal of Virology*, 76(21), 11003-11011. DOI: 10.1128/JVI.76.21.11003-11011.2002.
- Paunovic, S., Ruzic, D., Vujovic, T., Milenkovic, S., & Jevremovic, D. (2007). In vitro production of Plum pox virus-free plums by chemotherapy with ribavirin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21(4), 417-421. <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817486>.
- Quecini, V., Lopes, M. L., Pacheco, F. T. H., & Ongarelli, M. D. G. (2006). Ribavirin, a guanosin analogue mammalian antiviral agent, impairs Tomato spotted wilt virus multiplication in tobacco cell cultures. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(1), 1-13. <https://doi.org/10.1080/03235400600628047>.
- Ramgareeb, S., Snyman, S. J., Antwerpen, T. V., & 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. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9634-7>.
- Rana, T., Chandel, I.V., Kumar, Y., Ram, R., Hallan, V. & Zaidi, A.A., (2010). Molecular variability analyses of Apple chlorotic leaf spot virus capsid protein. *Journal of Biosciences*, 35(4), 605-615. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0069-4>.

- Retheesh, S.T. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.017>.
- Sareila, O., Hohkuri, M., Wahlroos, T., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00905.x>.
- Sharma, S., Singh, B., Rani, G., Zaidi, A. A., Hallan, V., Nagpal, A., & Virk, G. S. (2007). Production of Indian citrus ringspot virus-free plants of Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. *Journal of Central European Agriculture (JCEA)*, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.5513/jcea.v8i1.426>.
- Shim, H. K., Min, Y. J., Hong, S. Y., Kwon, M. S., Kim, H.R., Choi, Y. M., Lee, S. C., & Yang, J. M. (2004). Nucleotide sequences of a Korean isolate of Apple stem grooving virus associated with black necrotic leaf spot disease on pear (*Pyrus pyrifolia*). *Molecules & Cells*, 18(2), 192-199.
- Simpkins, I., Walkey, D.G.A., & Neely, H.A. (1981). Chemical suppression of virus in cultured plant tissues. *Annals of Applied Biology*, 99(2), 161-169. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1981.tb05143.x>
- Sun, Q., Sun, H., & Bell, R. L. (2009). Effect of polyvinyl alcohol on in vitro rooting capacity of shoots in pear clones (*Pyrus communis* L.) of different ploidy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(3), 299-304. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9604-0>.
- Tan, R. R., Wang, L. P., Hong, N., & Wang, G. P. (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. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9681-0>.
- Tatineni, S., Afunian, M. R., Hilf, M. E., Gowda, S., Dawson, W. O., & Garnsey, S. M. (2009). Molecular characterization of Citrus tatter leaf virus historically associated with Meyer lemon trees: complete genome sequence and development of biologically active in vitro transcripts. *American Phytopathological Society*, 99(4), 423-431. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-4-0423>.
- Valero, M., Ibanez, A., & Morte, A. (2003). Effects of high vine yard temperatures on the Grape vine leaf roll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. *Scientia Horticulturae*, 97(3-4), 289-296. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00212-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00212-1).
- Wang, L. P., Wang, G. P., Hong, N., Tan, R. R., Deng, X. Y., & 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. *Hort Science*, 41(3), 729-732. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.08.003>.



Crops Improvement

(Journal of Agricultural Crops Production)

Vol. 21 ■ No. 1 ■ Spring 2019

Molecular Assessment of Chemotherapy and Meristem Culture Efficiency for Production of Seven Cultivars of Virus-Free Pear (*Pyrus communis* L.)

Nooshin Kazemi¹, Fariborz Zaree Nahandi², Ali Akbar Habash^{3*}, Wahab Asadi⁴

1. Former Ph. D. Student, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2. Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, IRAN.
3. Associate Professor, Department of Tissue and Cell Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
4. Ph. D. Candidate, Iranian Research Institute in Grape and Raisin, Malayer University, Malayer, Iran.

Received: October 21, 2018

Accepted: November 11, 2018

Abstract

The present study aims at producing healthy primary pear plants for propagation and establishing a high health maternal orchard, for which an experiment was conducted in 2014 at Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), trying to evaluate the effectiveness of chemotherapy treatments (Ribavirin 0, 20, 40, and 80 mg/l) as well as the sizes of apical meristems culturing (below 0.2 mm, between 0.2 and 0.7 mm, and above 0.7 mm) on eradication of some virus strains (ACLSV, ASPV, ASGV) from seven pear cultivars ("Abate Fetel", "Beirut", "Coscia", "Dargazi", "Louise Bonne", "Mellina", and "Spadona"). Initially, the maternal samples are tested for ACLSV, ASGV, and ASPV by RT-PCR and all explants are infected with all three viruses, with the exception of Abate Fetel and Beirut which have been free from ASPV. The chemotherapy treatments and meristems cultivation take place *in vitro*, with the regenerated shoots from meristem tested by RT-PCR for all three viruses. Results show that increasing the concentration of ribavirin and reducing the size of cultivated meristem are effective on elimination of all three viruses from the explants. Also, the responses from the studied cultivars and virus varieties have varied among this experiment's treatments. Samples, diagnosed as virus free by means of RT-PCR, are then proliferated, rooted, and transferred into pots to be used for later propagation along with establishment of the maternal orchard.

Keywords: Apple chlorotic leaf spot virus, apple stem grooving virus, apple stem pitting virus, pear, ribavirin, rt-pcr, virus free plantlet.