تهیه هسته‌های اولیه عاری از ویروس از ارقام و پایه های اصیل هسته داران با غربالگری بیمارگرها

مسعود نادرپور[۱]، راحله شهبازی[۲]، فاطمه رمضانی[۲]، امیدخالصه[۳]، مرتضی همتی[٤]

۱-عضو هیئت علمی ۲-کارشناس ۳-تکنسین ٤- محقق مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

مواد تکثیری اولیه سالم از ارقام اصیل محصولات باغی، اساسی ترین نیاز برای ورود به برنامه تولید نهال گواهی شده است. این مواد که با نام «هسته های اولیه» شناخته می‌شوند، منبعی سالم و اصیل برای ایجاد درختان مادری تأمین‌کننده پایه و پیوندک سالم به منظور استفاده در تولید نهال گواهی‌شده بر اساس بیمارگرها و شرایط فنی اشاره‌شده در استانداردهای مواد تکثیری درختان باغی هستند. در شرایط فعلی، هر چند که امکان واردات هسته‌های اولیه برخی از ارقام گیاهی از خارج کشور وجود دارد، اما تجربه موجود در مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال نشان داده است که امکان ورود برخی از بیمارگرهای خطرناک در این مواد تکثیری وجود دارد. به‌علاوه برخی از ارقام، بومی ایران بوده و نیاز به تهیه هسته های اولیه آنها در داخل کشور وجود دارد. هسته‌های اولیه معمولاً با تکیه بر ترکیبی از روش‌های کشت مریستم، گرمادرمانی و شیمی‌درمانی یا کرایوتراپی سالم‌سازی می‌شوند. هر کدام از این روش‌ها دارای معایب و مزایایی هستند. مهم‌ترین مزیت این روش‌ها، احتمال عاری‌بودن مواد تکثیری تهیه شده از تمام بیمارگرها است. اما معایبی مانند کارآیی پایین آنها در برخی موارد در حذف بیمارگرهای معین، از بین‌رفتن گیاهان تحت شرایط گرمادرمانی و به‌ویژه ایجاد تغییرات ژنتیکی ناخواسته در هسته‌های اولیه حاصل می‌باشد. روش جایگزین که برای اولین بار در مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال انجام شد، «غربال‌گری منابع اولیه از بیمارگرها» ی اشاره شده در استانداردها با روش‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مختلف مبتنی بر پروتئین، اسید نوکلئیک و زیست سنجی برای ردیابی بیمارگرها در مراحل مختلف تهیه هسته‌های اولیه استوار است. در این روش، ارقام مورد نظر و اصیل در باغات منتخب شناسایی شده و سپس این ارقام و نیز پایه‌های مورد نظر، از نظر آلودگی به بیمارگرهای معین مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. از پیوندزنی پیوندک‌های حاصل از ارقام سالم روی پایه‌های سالم، نهال سالم ایجاد شده و در شرایط اسکرین‌هاوس نگهداری می‌شوند. نهال‌های حاصل، به مدت دو فصل زراعی، با روش‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای فوق از نظر احتمال

حضـور آلودگـی (ها) بررسـی شـده و در نهایـت نهال‌های سـالم به عنوان هسـته اولیـه عـاری از ویـروس‌های معیـن معرفی می‌شـوند.

بـه منظور تهیه مواد تکثیری سـالم هسـته‌داران، دانـه داران و پایه‌های رویشـی ایـن گـروه از محصولات باغـی بـا روش غربال‌گـری بیمارگرها، پـروژه‌هایـی در راسـتای تولیـد هسـته‌هـای اولیـه عـاری از بیمارگرهـا با حمایـت‌هـای مالـی معاونـت علمی و فنـاوری ریاسـت جمهوری از سـال ۱۳۹۳ بـه‌شـرح زیر انجام شـد.

۱-بررسی آلودگی ها در ارقام اصیل و پایه‌های رویشی و بذری

در ایـن پـروژه‌هـا بررسـی سـلامت ارقـام موجـود کدگـذاری شـده در باغـات منتخـب بخـش‌هـای خصوصـی و دولتی اسـتان‌هـای آذربایجان غربـی و خراسـان‌رضوی، از نظـر آلودگی به بیمارگرهای ویروسـی(جدول ۱) کـه جـزء بیمارگرهـای اشـاره‌شـده در اسـتانداردهای ملـی سـلامت مـواد تکثیـری هسـته‌داران و دانـه‌داران هسـتند، بررسـی شـد. بـه همین منظـور نمونه‌هایی از درختان مشـخص‌شـده تهیه و وضعیت سـلامت آن هـا بـا اسـتفاده از روش‌های سـرولوژیکی مبتنـی بـر Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) بررسـی (شـکل ۱-الـف) و نمونـه‌هـای آلـوده از پـروژه‌ها حذف گردیـد. از نمونـه‌هـای سـالم در آزمون‌هـای سـرولوژیکی،RNA ژنومی اسـتخراج و بررسـی آلودگـی‌هـای نهـان بـا روش‌هـای مولکولـی مبتنی بـر اسـید نوکلئیـک (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) انجـام (شـکل ۱-ب، ج) و نمونـه‌های آلوده نهان از پـروژه‌هـا حذف شـد. از نمونه‌های سـالم در هر دو آزمـون برای انتخاب منابـع پایه و پیوندک سـالم اسـتفاده شـد.

۲-تهـیه نهال با پیوندک‌های برگرفته از ارقام سـالم روی پایه‌های سالم

پیونـدک‌هـای سـالم از ارقام اصیل روی پایه‌های سـالم بررسـی شـده در بنـد ۱ پیونـد شـده و نهـال‌هـای حاصـل به مـدت دو فصـل زراعی در اسـکرین‌هـاوس و تحـت شـرایط کاملاً حفاظت‌شـده نگهداری شـدند.

۳-بررسی نهایی سلامت هسته های اولیه

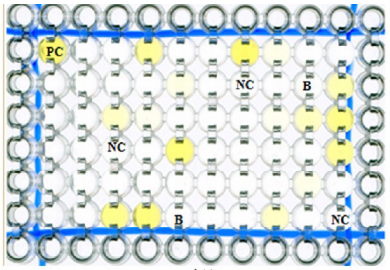
بـه منظور بررسـی احتمـال حضور آلودگـی‌های ویروسـی در نهال‌های حاصـل، در دو فصـل زراعـی بعدی، تمام نهـال ها به تعـداد حداقل دو بار بـا آزمـون هـای DAS-ELISA و مولکولـی مبتنـی بر اسـید نوکلئیک از نظر آلودگی به بیمارگرهای ویروسـی اشـاره شـده در بند ۱ بررسـی شدند. تعـداد معـدودی از نهـال‌هـا، علیرغـم واکنـش منفـی آنهـا در روش‌های آزمـون فـوق به بیمارگرهـا در مرحلـه اول، آلودگی به برخـی بیمارگرها از جملـه بـه PNRSV و PDV را نشـان دادنـد. ایـن نهال‌هـا از ادامه پروژه هـا حذف شـدند. بـه‌منظور اطمینان از سـلامت کامل نهال‌هـای باقیمانده از نظـر بیمارگرهـای ویروسـی، آزمـون‌های زیسـت‌سـنجی (شـکل ۱-د) تمـام نهـال هـا از طریق مایه‌کوبی عُصـاره برگرفته از آن‌هـا روی گیاهان علفـی (www.dpv.net،جـدول ۲) و نگهـداری آنها تحت شـرایط کنترل شـده انجـام شـد. هیچ‌گونـه آلودگـی در ارقام سـالم نهایـی با اسـتفاده از ایـن آزمـون‌ها ردیابی نشـد.

جدول۱- بیمارگرهای ویروسی بررسی شده در باغ‌های دانه دار و هسته دار استان‌های آذربایجان غربی و خراسان رضوی و نهال‌های حاصل بر اساس استانداردهای ملی

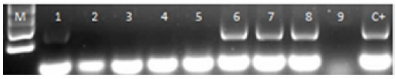
ردیف	نام علمی ویروس	نام بیماری	تعداد باغ منتخب	تعداد درخت بررسی شده[۲]	نمونه آلوده[۱]	روش های آزمون
۱	*Apple mosaic virus* (ApMV)	موزائیک سیب	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	+	DAS-ELISA RT-PCR
۲	*Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV)	سبزرد سیب	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	+	»
۳	*Arabis mosaic virus* (ArMV)	موزائیک اربیس	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	+	»
۴	*Apple stem pitting virus* (ASPV)	ساقه هاشوری سیب	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	-	»
۵	*Apple stem grooving virus* (ASGV)	ساقه شیاری سیب	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	-	»
۶	*Cherry leafroll virus* (CLRV)	پیچیدگی برگ گیلاس	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	+	»
۷	*Tobacco ringspot virus* (TRSV)	لکه حلقوی توتون	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	-	»
۸	*Tomato ringspot virus* (ToRSV)	لکه حلقوی گوجه فرنگی	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	+	»
۹	*Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)	لکه حلقوی بافت مرده هسته داران	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	+	»
۱۰	*Prune dwarf virus* (PDV)	کوتولگی هسته داران	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	-	»
۱۱	*Plum pox virus* (PPV)	آبله هسته داران	۳۷	۳۳۱+۱۰۸	-	»
مجموع				۴۸۲۹		

۱- (+)و (-) به ترتیب نشان‌دهنده این است که آن عامل در بین نمونه‌ها ردیابی‌شده یا نشده است.

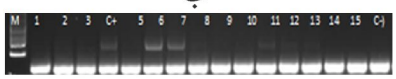
۲- اعداد اول، تعداد درختان بررسی شده در باغات منتخب و دوم، تعداد نهال های تهیه شده از ارقام سالم است.



الف



ب



ج

د

شکل ۱- نمایی از آزمون‌های سرولوژیکی مبتنی بر DAS-ELISA (الف، ویروس ASPV)، مولکولی مبتنی بر RNA (ب، ج به ترتیب ویروس‌های ArMV و ASGV) و زیست‌سنجی (د، گیاه تلقیح شده *Cucumis sativus* L.) برای ردیابی آلودگی‌های ویروسی در روش غربالگری بیمارگرها برای تولید هسته‌های اولیه سالم هسته‌داران. در شکل (الف) چاهک‌های علامت‌گذاری شده با PC، شاهد مثبت، NC، شاهد منفی و B چاهک خالی یا بلانک آزمون و بقیه نمونه های زردرنگ، نمونه های آلوده به ASPV هستند در شکل های (ب) و (ج). C+ کنترل مثبت و C- شاهد منفی آزمون های RT-PCR هستند. قطعات تکثیر شده در شکل های (ب) و (ج) به ترتیب قطعات ژنومی مربوط به ArMV و ASGV به طول ۴۹۷و ۴۹۹ نوکلئوتاید هستند.

از نتایج این پروژه ها تاکنون تعداد ۵۵ هسته اولیه عاری از ویروس از ارقام زعفرانی، آلبرتا و انجیری هلو، رد گلد و شمس شلیل،جعفری و منوچهری زردآلو و نیز سه پایه رویشی (GF۶۷۷ و GN) در قالب بیش از ۸۲ هزار آزمون (جدول ۳) تهیه و برای تکثیر در سطح کلان طی تفاهم نامه‌هایی به بخش‌های خصوصی تحویل شده است. فاز دوم پروژه‌ها در سال جدید برای بقیه هسته داران و دانه داران به بهره‌برداری خواهد رسید، ان شاا...

نتیجه گیری

به دلیل سیستم سنتی تهیه نهال در گذشته (و حال) و تهیه پایه و پیوندک از درختان با وضعیت سلامتی نامعلوم، درختان باغی موجود در باغات میوه، کم و بیش به بیماری‌های سیستمیک تأثیرگذار در کیفیت و کمیت میوه و طول عمر درختان میوه، آلوده هستند. این آلودگی‌ها متأسفانه در طی زمان به دلیل عدم رعایت مسائل فنی به‌ویژه در هنگام هرس یا سایر امور به باغی و نیز از طریق ناقلین بیولوژیکی و دانه گرده به سایر درختان منتقل می شود. بنابراین استفاده از این درختان برای تولید نهال گواهی‌شده کاملاً غیرمنطقی بوده و وجود مواد تکثیری سالم همانند هسته‌های اولیه، نخستین گام در ورود به تولید نهال‌گواهی‌شده است تا هم از شیوع آلودگی‌ها کاسته شود، هم نگهداری باغ صرفه اقتصادی داشته باشد و هم مواد غذایی تهیه شده برای تغذیه جامعه، از نظر استانداردهای ملی و بین المللی، سالم باشد. امروزه تهیه هسته های اولیه با استفاده از روش‌های برگرفته از تکنیک های کشت بافت مانند کشت مریستم انتهایی- به دلیل غلظت بسیار پایین ویروس های گیاهی در این ناحیه و توزیع غیر یکنواخت ویروس در بافت‌های گیاهی- انجام شده و موفقیت‌هایی به‌ویژه در ترکیب با روش‌های شیمی‌درمانی و گرمادرمانی به دلیل حذف کامل یا کاهش تعداد ویروس‌های گیاهی در بافت، به‌دست آمده است. ایراد بزرگ این روش‌ها، موفقیت ناکافی آنها در حذف تعدادی از ویروس های معین و از بین رفتن تعدادی از گیاهان تحت شرایط گرمادرمانی است. ولی تغییرات ژنتیکی ناخواسته و غیر قابل قبول از نظر اصالت که به تغییرات سوماکلونی مشهور است، بزرگترین ایراد برخی از روش‌های برگرفته از فناوری کشت بافت است. اخیراً روش دیگری تحت عنوان کرایوتراپی به عنوان روشی بسیار کارا در تهیه مواد تکثیری عاری

جدول ۲-گیاهان محک استفاده شده در بررسی سلامت نهال های حاصل از روش غربالگری بیمارگرها با روش زیست سنجی و بیمارگرهای قابل ردیابی.

ردیف	نام علمی گیاه محک	بیمارگرهای قابل ردیابی
۱	sativus Cucumis	PDV ,PNRSV ,CLRV ,ToRSV ,ArMV ,ApMV
۲	quinoa Chenopodium	ASGV ,CLRV ,ToRSV ,TRSV ,ACLSV ,ArMV
۳	amaranticolor Chenopodium	CLRV ,ToRSV ,TRSV ,ACLSV ,ArMV
۴	Burley White .cv tabacum Nicotiana	CLRV ,ArMV
۵	Samson ,cv tabacum .N	PPV
۶	Clevelandii .cv tabacum .N	PPV ,TRSV
۷	benthamiana .N	PPV

جدول ۳ – آزمون های انجام شده برای تهیه هسته های اولیه سالم و پایه های رویشی ارقام هسته دار

نوع آزمون*												
زیست سنجی								مولکولی	سرولوژیک			
مجموع آزمون	*N. benthamiana*	*N. tabacum cv. Clevelandii*	*N. tabacum cv. Samson*	*N. tabacum cv. White burley*	*Ch. amaranticolor*	*Ch. quinoa*	*C. sativus*	RT-PCR	DAS-ELISA	تعداد ویروس	تعداد نمونه	نوع نمونه
۳۸۶۳۲	–	–	–	–	–	–	–	۱۹۳۱۶	۱۹۳۱۶	۱۱	۴۳۹	درخت
۴۳۶۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۸۴۸	۲۲۳۵۲	۱۱	۱۰۸/۱۴۶	نهال/پایه
۸۲۲۳۲												

* آزمون ها روی نهال هسته های اولیه در دو فصل زراعی در چهار تکرار انجام شده است.

از آلودگی معرفی شده است ولی در مورد ایرادات احتمالی آن، هنوز گزارشی منتشر نشده است. به نظر می‌رسد که «روش غربالگری بیمارگرها» در تهیه هسته‌های اولیه سالم، روشی قابل تأمل در مقایسه با روش‌های فوق باشد. در این روش اولاً تعداد آزمون‌های انجام شده در مقایسه با روش‌های دیگر زیادتر نبوده ولی کامل‌تر می‌باشد و احتمال هرگونه حضور آلودگی‌های نهان با آزمون‌هایی که در طی مراحل تهیه و دو فصل زراعی بعدی صورت می‌گیرد، مرتفع می‌شود. این تعداد آزمون‌ها و با این دقت و حساسیت معمولاً در روش‌های مبتنی بر کشت بافت انجام نمی‌شوند. ثانیاً، احتمال تغییرات ژنتیکی در این روش برخلاف روش‌های مبتنی بر کشت بافت به صفر می‌رسد چرا که اساساً هیچ روش غیرمعمولی در تهیه مواد تکثیری انجام نمی‌شود. بنابراین، روش معرفی‌شده در این مقاله می‌تواند به‌عنوان جایگزینی شایسته‌تر در مواردی که احتمال موفقیت روش‌های مبتنی بر کشت بافت در حذف آلودگی‌ها یا نگهداری مواد تکثیری بعد از روش‌های شیمی‌درمانی و گرمادرمانی وجود داشته یا احتمال تغییرات ژنتیکی وجود دارد، مطرح باشد.

منابع

Bettoni, J. C., Costa, M. D., Gardin, J. P. P., Kretzschmar, A. A., and Pathirana, R. 2016. Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. Revista Brasileria de Fructicultura 38: e-883.

Feng, C., Wang, R., Li, J., Wang, B., Yin, Z., Cui, Z., Li, B., Bi, W., Zhang, Z., Li, M., and Wang, Q. 2013. Production of Pathogen-Free Horticultural Crops by Cryotherapy of In Vitro-Grown Shoot Tips. In: Lambardi, et al. (eds), Protocols for Micropropagation of selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York.

Manganaris, G. A., Economou, A. S., and Boubourakas, I. 2003. Production of virus-free propagation material from infected nectarine trees. Acta Hort 616: 501-505.

Paunovic, S., Ruzic, D., Vujovic, T., Milenkovic, S., and Jevremovic, D. 2007. In vitro production of Plum pox virus-free plums by chemotherapy with ribavirin. Biotechnology and Biotechnological Equipments 21: 417-421.

Rongrong, T., Liping, W., Hong, N., and Guoping, W. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. Plant Cell Tissue and Organ Culture 101: 229-235.

Verma, N., Ram, R., and Zaidi, A. A. 2005. Invitro production of Prunus necrotic ringspot virus-free begonias through chemo- and thermotherapy. Scientica Horticulturae 103: 239-247.