مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

حذف ویروس موزاییک خیار از گلایل با استفاده از روش‌های کشت مریستم، گرمادرمانی و برق‌درمانی

ثریا تورنگ[1]، مسعود شمس بخش*[2]، احمد معینی[3]

[1]دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

[2]دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

[3]دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۸/۲۹

چکیده

گل گلایل (*Gladiolus sp.*) جزء شش گل برتر صادراتی در دنیا می‌باشد و در ایران نیز مقام دوم تولید گل شاخه‌بریده را به خود اختصاص داده‌است. ویروس موزاییک خیار (*Cucumber mosaic virus,* CMV) از جمله ویروس‌های شایع گل گلایل است. از آنجاییکه گلایل به روش رویشی از طریق پداژه تکثیر می‌شود، آلودگی ویروسی به آسانی به نسل بعد منتقل می‌شود. از این‌رو کنترل ویروس‌های گلایل از طریق استفاده از گیاهان مادری سالم دست‌یافتنی است. در تحقیق حاضر روش‌های کشت مریستم و کشت مریستم همراه با گرمادرمانی و برق‌درمانی برای حذف CMV از گیاهان آلوده به‌کار گرفته و کارایی این روش‌ها مقایسه‌شد. در مجموع ردیابی CMV با استفاده از آزمون الایزا نشان داد که ۷۳ درصد از گیاهان باززایی شده عاری از ویروس بودند درحالیکه ردیابی با آزمون RT-PCR نشان دادکه ٤۲ درصد گیاهان عاری از ویروس شدند. بهترین نتیجه حذف ویروس از کشت مریستم گرمادرمانی شده در اندازه ۰/۵ میلی‌متر بدست آمد که در نتیجه همه‌ی گیاهان تیمارشده عاری از ویروس شدند. این اولین گزارش از کاربرد برق‌درمانی برای حذف CMV از گیاهان گلایل آلوده می‌باشد، بهترین نتیجه برق درمانی از تیمار شدت جریان ۱۵ میلی آمپر همراه با کشت مریستم به مدت ۱۵ دقیقه به دست آمد. همچنین نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که گرمادرمانی همراه با کشت مریستم روش مناسب‌تری برای حذف CMV از گیاهان گلایل آلوده بود.

واژه‌های کلیدی: ***گلایل، ویروس موزاییک خیار، ویروس زدایی.***

* نویسنده مسئول: مسعود شمس بخش تلفن: ۰۲۱٤۸۲۹۲۲۷٤ Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir

مقدمه

گل زینتی گلایل (*Gladiolus* sp.) متعلق به خانواده Iridaceae با بیش از ۱۸۰ گونه است که گونه‌های اصلاح شده آن از جمله مهم‌ترین گیاهان زینتی شاخه بریده و تک‌لپه‌ای در دنیا بشمار می‌رود و جزء شش گل برتر صادراتی می‌باشد (Dubey & Singh, 2010). در ایران نیز تولید گل گلایل اهمیت زیادی داشته و پس از گل رز رتبه دوم تولید گل شاخه‌بریده را به خود اختصاص می‌دهد (Anonymous, 2010).

ویروس موزاییک خیار *Cucumber mosaic virus* متعلق به جنس *Cucumovirus* و خانواده *Bromoviridae* می‌باشد. این ویروس توسط ٦۰ گونه شته به‌صورت ناپایا منتقل می‌شود و بیش از ۱۳۰۰ گونه گیاهی متعلق به ۵۰۰ جنس و بیش از ۱۰۰ خانواده شامل انواع سبزی‌ها، گیاهان زینتی، علف‌های هرز و سایر گیاهان را آلوده می‌کند (Duarte *et al.*, 2013). علایم بیماری ناشی از ویروس بستگی به استرین بیمارگر، رقم گلایل و شرایط آب و هوایی متفاوت‌است و شامل موزاییک، کوتولگی، کلروز، رگه‌های زرد در برگ‌ها، شکستگی رنگ گلبرگ‌ها، کاهش میزان گلدهی و ریزبودن پداژه می‌باشد (Duarte *et al.*, 2013; Raizada *et al.*, 1989).

قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر معمولاً علایم مشخصی روی پداژه‌ها ایجاد می‌کنند، بنابراین پداژه‌های آلوده به‌هنگام کاشت شناسایی و حذف می‌شوند یا عوامل بیماری‌زای آن‌ها توسط قارچ‌کش و باکتری‌کش کنترل می‌شوند. به‌دلیل عدم بروز علایم مشخص آلودگی ویروسی روی پداژه‌های گلایل، آلودگی به ویروس‌ها مخفی می‌ماند و سبب خسارت می‌شود. بعلاوه، تکثیر ارقام گلایل از طریق اندام رویشی (پداژه) است و در نتیجه ویروس‌ها از نسلی به نسل بعد منتقل و باعث افزایش شدت خسارت بیماری از سالی به سال دیگر می‌شوند و همچنین انتقال پداژه‌های آلوده به ویروس به نقاط مختلف دنیا سبب اشاعه ویروس می‌شود. بنابراین، استفاده از مواد گیاهی سالم مناسب‌ترین و مؤثرترین راه مدیریت بیماری‌های ویروسی به شمار می‌رود و از جمله روش‌های رایج در تولید اندام‌های تکثیری عاری از ویروس کشت مریستم، گرمادرمانی و کشت مریستم همراه با گرمادرمانی و برق درمانی است. از روش کشت مریستم به منظور حذف ویروس-های مختلفی از میزبان‌های متنوعی استفاده شده است به‌عنوان مثال برای حذف ویروس‌های موزاییک نیشکر (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)، ویروس موزاییک سورگوم (*Sorghum mosaic virus*, SrMV)، ویروس موزاییک رگه‌ای نیشکر (*Sugarcane streak mosaic virus*, SCSMV) و ویروس زردی برگ نیشکر (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV) از گیاه نیشکر آلوده (Cheong *et al.*, 2012)، حذف ویروس موزاییک آلسترومریا (*Alstromeria mosaic virus*, AIMV) ازگیاه آلسترمریا (Fuji

et al., 2005) و حذف ویروس برگ بادبزنی مو (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) از دو رقم انگور ایرانی (سیاه و بی دانه) (Salami *et al*., 2005) استفاده شده است. روش کشت مریستم انتهایی برای حذف CMV از اندام‌های تکثیری گلایل توسط محققین مورد استفاده قرارگرفته‌است که سبب حذف ویروس از این گیاهان شده است (Lilien-kipnis *et al*., 1997; Selvarajan *et al*., 1999; Mangal *et al*., 2003).

استفاده از روش گرمادرمانی توأم با کشت مریستم انتهایی سبب حذف ویروس موزاییک زرد لوبیا از گلایل (Sharifi Nezamabad *et al*., 2015)، حذف دو ویروس لکه سبزرد برگ سیب (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) و ساقه شیاری سیب (*Apple stem grooving virus*, ASGV) از درختان دانه‌دار (Wang *et al*., 2006)، حذف ویروس ابلقی میخک (*Carnation mosaic virus*, CarMV) (Sepahpour *et al*., 2009)، حذف ویروس‌های ساقه آبله آلو (*Plum pox virus*, PPV) و نقش حلقوی نکروتیک هسته‌داران (*Prunus necrotic ring spot virus*, PNRSV) (Manganaris *et al*., 2003) و حذف PPV از زردآلو (Koubouris *et al*., 2007) شده است. از روش گرمادرمانی توأم با کشت مریستم انتهایی جهت تولید گیاهان گلایل عاری از ویروس‌های موزاییک زرد لوبیا و موزاییک خیار استفاده‌شده‌است، پداژه‌های گلایل پس از گرمادرمانی با آب گرم ۵۰ درجه سلسیوس، مریستم در اندازه ۰/۷ –۰/۵ میلی‌متر جدا شد و در محیط‌کشت ۱/۲MS با ترکیبات هورمونی ویژه کشت شدند. این روش در حذف هر دو ویروس مؤثر عمل کرده است و سبب حذف ۸۰ تا ۱۰۰ درصد گیاهان حاصل شده است (Mangal *et al*., 2003).

استفاده از روش برق‌درمانی توأم با کشت مریستم سبب حذف ویروس ای سیب زمینی (*Potato virus A*, PVA) و وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y*, PVY) (Emami Meybodi *et al*., 2011)، حذف ویروس ای انگور (*Grapvine virus A*, GVA) از انگورهای آلوده به این ویروس (Bayati *et al*., 2011)، حذف PVY از سیب‌زمینی (Almaarri *et al*., 2012)، حذف ویروس ایکس سیب زمینی (*Potato virus X*, PVX) ازسیب زمینی (Gonzales *et al*., 2004) وحذف CarMV از میخک‌های آلوده به این ویروس (Sepahpour *et al*., 2009) شده‌است. از این روش تا کنون برای حذف CMV از گلایل استفاده‌نشده‌است.

با توجه به اهمیت گل گلایل، آلودگی آن به ویروس موزاییک خیار و نحوه تکثیر این گل، تولید پداژه‌های عاری از ویروس و ارائه آن به پرورش‌دهندگان گل و گیاه امری ضروری است. از این‌رو هدف از انجام تحقیق حاضر مقایسه کارآیی روش‌های کشت مریستم انتهایی، کشت مریستم همراه با گرمادرمانی و کشت مریستم همراه با برق‌درمانی برای حذف ویروس موزاییک خیار از گیاه گلایل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی آلوده

طی ماه‌های تیر تا آبان سال ۱۳۹۱ از گلخانه‌های پاکدشت و مراکز توزیع پداژه‌های گلایل در استان‌های تهران و البرز نمونه‌برداری انجام‌شد. پداژه‌ها کاملاً تصادفی انتخاب و در گلدان‌های پلاستیکی حاوی نسبت مساوی خاک و ماسه کاشته و در دمای ۲۳–۱۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

آزمون الیزا (Enzyme-linked immunosorbent assay)

برای ردیابی ویروس آزمون سرولوژیکی به روش الیزا غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای (تهیه شده از مرکز تحقیقات بیماری‌های ویروسی غلات، دانشگاه شیراز) با رقت ۱:۱۰۰۰ انجام گرفت. برای این منظور یکدهم گرم از برگ هر نمونه گیاه، کنترل منفی و کنترل مثبت در سه میلی لیتر بافر استخراج عصاره‌گیری شد. هفتادوپنج میکرولیتر از عصاره گیاهی به همراه ۲۵ میکرولیتر از بافر پوششی در چاهک‌های تشتک الیزا ریخته شد. سه چاهک با بافر عصاره‌گیری پر شد و تشتک به مدت یک شب در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از تخلیه چاهک‌ها و شست‌وشو توسط بافر ، ۱۰۰ میکرولیتر بافر حائل (Blocking buffer) به هر چاهک اضافه شد و به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس شست‌وشو مانند مرحله قبل انجام گرفت. آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای به نسبت ۱:۱۰۰۰ در بافر کانجوگیت رقیق شد و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. در این مرحله تشتک به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس شست‌وشو مانند مراحل قبل انجام و آنتی بادی متصل شده به آنزیم آلکالین‌فسفاتاز به عنوان آنتی بادی ثانویه (Goat anti-rabbit-IgG-alkaline phosphatase conjugate) به نسبت ۱:۷۵۰۰ در بافر کانجوگیت رقیق شد و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و تشتک به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس شست‌وشو مانند مراحل قبل انجام گرفت. در مرحله بعد ۱۰ میلی‌گرم پارانیتروفنل‌فسفات به‌عنوان سوبسترای آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در ۱۰ میلی‌لیتر بافر سوبسترا حل و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. برای بررسی نتایج آزمون الیزا هر ۱۵ دقیقه یکبار به مدت یک ساعت میزان تغییر رنگ چاهک‌ها در طول موج ٤۰۵ نانومتر با دستگاه الیزا خوان Anthos 2020 ساخت کشور اتریش اندازه گرفته شد. چاهک‌هایی که میزان جذب نوری آنها بیش از دوبرابر میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل منفی (گیاه عاری از ویروس) بود، به عنوان نمونه مثبت تلقی شدند (Dijkstra & Jager,1998).

نسخه‌برداری معکوس – واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

جهت استخراج آرانای کل (Total RNA) از برگ‌های گلایل حاصل از کشت مریستم با استفاده از محلول RNX-Plus سیناژن (تهران، ایران) بر اساس دستوالعمل شرکت سازنده با تغییراتی به شرح زیر انجام شد؛ یکدهم گرم از بافت برگ در ازت مایع پودر، سپس یک میلی‌لیتر محلول RNX-Plus اضافه و پس از تکان دادن، ٤۰۰ میکرولیتر فنل اشباع به آن اضافه شد. بعد از مخلوط کردن، نمونه‌ها به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند، رونشین به میکروتیوب جدید منتقل و ۲۰۰ میکرولیتر فنل اشباع و۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه اضافه شد. پس از مخلوط کردن، نمونه‌ها به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد، رونشین به میکروتیوب جدید منتقل و ٤۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شد. مجددا نمونه‌ها مخلوط و به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند، رونشین به لوله جدید منتقل و دو برابر حجم فاز رویی اتانول سرد اضافه شد و به مدت یک شب در فریزر نگه‌داری شد، نمونه‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور و در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند و سپس با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول سرد ۷۰ درصد شست‌وشو شد، پس از خشک کردن رسوب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ۲۵ میکرولیتر آب اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرارداده‌شد. آر ان ای استخراج شده تا زمان استفاده در دمای منفی ۷۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. آرانای استخراج شده با کمک آغازگرهای اختصاصی برای ساخت cDNA (دی‌انای مکمل) استفاده شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت hyperScript RT premix (GeneAll, South Korea) طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده انجام شد. برای انجام این واکنش از هفت میکرولیتر آب، ده پیکومول از آغازگر اختصاصی معکوس CMV-R (5'- GCG De) (CGA AAC AAG CTT CTT ATC -3' Blass *et al.*, 1984)، دو میکرولیتر آرانای کل استخراج شده از گیاهان مورد آزمایش و ۱۰ میکرولیتر RT premix استفاده شد. واکنش در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ep Gradient Termocycler، اپندورف، ساخت کشور آلمان) انجام‌شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از آغازگرهای CMV-F (5'- GTA GAC ATC TGT GAC GCG A -3') و CMV-R استفاده‌شد (De Blass *et al.*, 1984). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ۱٦/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (PCR× buffer۱۰) ۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs (dATP، dGTP، dTTP،dCTP) با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکومول، پنج واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase و دو میکرولیتر از cDNA

ساخته‌شده CMV در لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتری سترون ریخته‌شد و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ep Gradient Termocycler، اپندورف، ساخت کشور آلمان) انجام شد. برنامه حرارتی استفاده شده شامل یک چرخه دمایی ۹٤ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی شامل ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه، دمایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۸۰ ثانیه و در آخر یک چرخه دمایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. تفکیک محصولات PCR، با استفاده از الکتروفورز محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر 1×TAE (تریس باز ۰/٤۸ گرم، استیک اسید ۰/۱۱ میلی‌لیتر و اتیلن دی‌آمین تترا استات ۰/۵ مولار با اسیدیته ۸ ،۰/۲ میلی‌لیتر) انجام شد. برای بررسی اندازه باندهای تشکیل شده از نشانگر دی‌ان‌ای یک کیلوبازی(GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas) استفاده‌شد.

گرمادرمانی

آزمایش در دو دما (دمای اتاق و دمای ۳۷ درجه سلسیوس) و با دو سطح مریستم (نیم و یک میلی‌متر) با نه تکرار به مدت سه هفته طراحی شد. گیاهان گلایل آلوده به ویروس موجود در گلخانه، به اتاق رشد با دمای اولیه ۲۸ درجه سلسیوس، منتقل و به منظور سازگار کردن گیاهان با دمای ۳۷ درجه سلسیوس، هر روز دو درجه دما افزایش داده شد، سپس گیاهان به مدت سه هفته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

برق‌درمانی

آزمایش برق درمانی با دو فاکتور؛ مدت زمان (با ۲ سطح ۱۰ و ۱۵ دقیقه) و شدت جریان (با سه سطح صفر، ۱۰ و ۱۵ میلی‌آمپر) با ۱۷ تکرار انجام شد. برای ضد عفونی سطحی، قطعه‌های ساقه با اندازه ۵-۲ سانتی‌متری از گیاهان آلوده به ویروس جدا وبه مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۰/۰۵ قرارداده‌شدند و سپس با آب مقطر سترون شست‌وشو شدند. ساقه‌ها درون دستگاه الکتروفورز افقی حاوی بافر 1×TBE (تریس باز ۱۰/۸ گرم، بوریک اسید ۵/۵ گرم و اتیلن دی آمین ترا استات ٤ میلی‌لیتر) در معرض جریان الکتریکی قراردادهشدند. قلمه‌ها پس از تیمار الکتریکی بلافاصله به‌صورت سطحی سترون و پس از جدا کردن مریستم با اندازه ۰/۷ میلی‌متر به محیط‌کشت منتقل شدند.

کشت مریستم

این آزمایش با سه سطح از اندازه مریستم ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی‌متر انجام شد. برای انجام کشت مریستم از محیط‌کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) استفاده شد. نوع و غلظت هورمون‌ها، میزان آگار و ساکارز اضافه شده به محیط در مراحل مختلف در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- نوع و غلظت هورمون‌ها، میزان آگار و ساکارز اضافه شده به محیط کشت در مراحل مختلف کشت مریستم.

Table 1- Type and concentration of hormones, agar and sucrose added to medium in the different steps of meristem culture.

مرحله رشدی Growing steps	مدت زمان (هفته) Time (week)	هورمون (میلی‌گرم در لیتر) Hormone (mg/l)	آگار (گرم در لیتر) Agar (g/l)	ساکارز (گرم در لیتر) Sucrose (g/l)
استقرار (Establishment)	10	BAP (4)	6-7	25
پرآوری (Proliferation)	6	BAP(4) NAA (0.125)	6-7	25
ریشه‌زایی (Root induction)	5	NAA (0.5)	5.4	25
القای کورم (Corm induction)	13	NAA (0.125)	5.4	50-60

نتایج

نمونه‌برداری

از مجموع ٤٨٦ پداژه گلایل بررسی شده با آزمون الایزا، تعداد ٢٤٦ پداژه به ویروس موزاییک خیار آلوده بودند. درصد آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به ویروس موزاییک خیار ٥٠/٦١ درصد بود. نتایج حاصل از نمونه‌برداری از نظر آلودگی به ویروس موزاییک خیار در جدول ۲ آمده است.

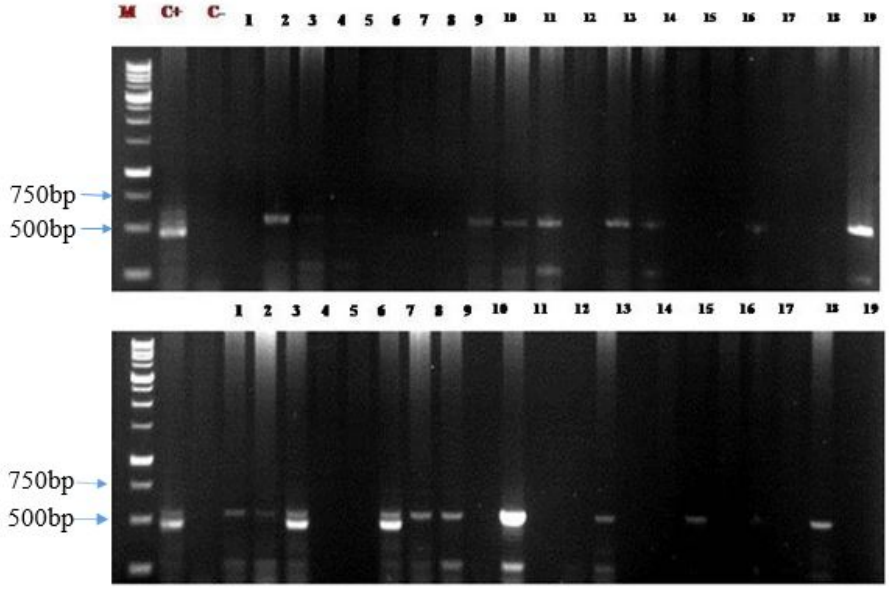
ردیابی ویروس در گیاهان حاصل از کشت مریستم و کشت مریستم توام با گرمادرمانی و برق‌درمانی

نتایج حاصل از ردیابی ویروس از گیاهان باززایی شده با آزمون الایزا نشان داد که در مجموع ۷۳ درصد گیاهان عاری از ویروس شده بودند در صورتیکه در ردیابی ویروس از گیاهان باززایی شده با آزمون RT-PCR ٤٢ درصد گیاهان عاری از ویروس شده بودند. واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی CMV (De Blass *et al.*, 1984) منجر به تکثیر قطعه مورد انتظار به اندازه ۵۱۹ جفت باز شد که تایید کننده آلودگی گیاهان بود (شکل ۱). بهترین نتیجه حذف ویروس از کشت مریستم با اندازه ۰/۵ میلی‌متر از نمونه‌های تیمار شده با گرمادرمانی بدست آمد که در نتیجه همه‌ی گیاهان تیمارشده عاری از ویروس شدند و بهترین نتیجه باززایی گیاهان از کشت مریستم با اندازه یک میلی‌متر بدست آمد که در نتیجه آن ۷۵ درصد گیاهان باززایی شدند (جدول ۳).

جدول ۲- نتایج آزمون الایزای پداژه‌های گلایل در بررسی آلودگی به ویروس موزاییک خیار.

Table 2- Results of ELISA for survey of gladiolus corm infection with CMV.

محل جمع آوری Collection place	نمونه‌های بررسی شده Tested samples	نمونه آلوده Infected sample	درصد آلودگی Percentage of infection
پاکدشت (Pakdasht)	436	233	53.44
کرج (Karaj)	50	13	26



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی محصول RT-PCR ویروس موزاییک خیار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CMV-F و CMV-R در ژل آگارز ۱/۲٪ همراه با شاهد مثبت و منفی.

Figure 1- Electrophoresis pattern of products amplified by RT- PCR of CMV using CMV-F and CMV-R primers on 1.2% agarose gel. Lane M, molecular weight marker (GeneRuler^{TM} 1kbp DNA ladder, Fermentas); Lane C^{-} , negative control; Lane C^{+}, positive control; Empty lanes depict healthy samples and lanes with bands depict infected samples.

جدول ۳- حذف CMV از گلایل با استفاده از روش گرمادرمانی همراه با کشت مریستم.

Table 3- CMV elimination from Gladiolus by thermotherapy along with meristem culture.

اندازه مریستم (میلی‌متر)/تیمار Meristem size (mm)/ Treatment	تعداد ریزنمونه Explants number	تعداد باززایی، ریشه‌زایی و القایی پداژه Shoot regeneration, Root induction and Corm induction	حذف ویروس بر اساس نتیجه RT-PCR Virus elimination based on RT-PCR
۰/۵/ بدون تیمار حرارتی 0.5/ No thermotherapy	8	3	2
۱/ بدون تیمار حرارتی 1/ No thermotherapy	6	4	0
۰/۵ تیمار حرارتی 0.5/ thermotherapy	10	4	4
۱/ تیمار حرارتی 1/ thermotherapy	8	6	0

بررسی روش تلفیقی گرمادرمانی با کشت مریستم روی تولید گیاهچه‌های عاری از ویروس موزاییک خیار گلایل

باززایی، ریشه‌زایی، القای پداژه و حذف ویروس ۱۸ مریستم گرمادرمانی شده و ۱٤ مریستم گرمادرمانی نشده در اندازه نیم و یک میلی‌متر از پداژه‌های گلایل آلوده به CMV بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که از ۱۸ مریستم گرمادرمانی شده ۱۰ گیاه باززایی شد و از این تعداد چهار گیاهچه عاری از ویروس بودند در حالیکه از ۱٤ مریستم گرمادرمانی نشده هفت گیاه باززایی شد و از این تعداد دو گیاهچه عاری از CMV بودند. جزئیات نتایج در جدول ۳ آورده شده‌است.

بررسی روش تلفیقی برق‌درمانی با کشت مریستم روی تولید گیاهچه‌های عاری از ویروس گلایل

حذف CMV از گلایل با استفاده از روش برق‌درمانی همراه با کشت مریستم پس از اعمال تیمار الکتریکی و سپس کشت مریستم بررسی شد. از تعداد ۳٤ نمونه که به مدت ۱۰ دقیقه تحت اثر شدت جریان قرار داده شد پنج نمونه و از همین تعداد که به مدت ۱۵ دقیقه تیمار شد تعداد شش نمونه عاری از ویروس شدند. جزئیات نتایج این آزمایش در جدول ٤ آمده است.

جدول٤- حذف CMV از گلایل با استفاده از روش برق‌درمانی همراه با کشت مریستم هایی به اندازه ۰/۷ میلی‌متر بر اساس نتیجه RT-PCR.

Table 4- Elimination of CMV from Gladiolus by electrotherapy along with meristem culture from meristem with 0.7 mm in size based on RT-PCR.

حذف ویروس Virus elimination	باززایی، ریشه‌زایی و القای پداژه Shoot regeneration, Root induction and Corm induction	شدت جریان ثابت (میلی‌آمپر) Electric current (mA)	مدت زمان تیمار (دقیقه) Time (min)	تعداد ریزنمونه Explants number
2	6	10	10	17
3	5	15	10	17
2	10	0	10	17
3	5	10	15	17
3	4	15	15	17
2	10	0	15	17

بررسی تأثیر روش کشت مریستم روی تولید گیاهچه‌های گلایل عاری از ویروس موزاییک خیار

باززایی، ریشه‌زایی، القای کورم و حذف ویروس از اندازه‌های ۰/۵، ۰/۷ و یک میلی-مترمریستم‌های کشت‌شده در محیط‌کشت MS نشان داد که مریستم کشت شده با اندازه یک میلی‌متر قادر به حذف ویروس موزاییک خیار از گلایل نبود در حالیکه از مریستم‌های کشت شده در اندازه ۰/۵ و ۰/۷ میلی‌متردو نمونه عاری از ویروس شدند. نتایج این آزمایش در جدول ۵ نشان داده‌شده‌است.

جدول ۵- حذف CMV از گلایل با استفاده از روش کشت مریستم.

Table 5- CMV elimination from Gladiolus by meristem culture.

حذف ویروس بر اساس نتیجه RT-PCR Virus elimination based on RT-PCR	باززایی، ریشه‌زایی و القای پداژه Shoot regeneration, root induction and corm induction	اندازه مریستم (میلی‌متر) Meristem size (mm)	تعداد ریزنمونه Explants number
2	3	0.5	8
2	10	0.7	17
0	4	1.0	6

بحث

در این پژوهش به طور کلی میزان آلودگی پداژه‌های گلایل به ویروس موزاییک خیار در نمونه‌های جمع‌آوری شده ازپاکدشت ۵۳/٤٤ درصد و در نمونه‌های جمع‌آوری شده از کرج ۲٦ درصد تعیین شد. بررسی میزان آلودگی پداژه‌های جمع‌آوری شده از تهران، کرج و محلات به ویروس موزاییک زرد لوبیا حاکی از ۸۰/۳۵ درصد آلودگی بوده‌است. همچنین نتایج آن پژوهش نشان داده‌است که پداژه‌های جمع‌آوری شده به ویروس موزاییک خیار، ویروس موزاییک توتون و ویروس رگه‌ای توتون آلوده نمی‌باشد (Sharifi, 2009). این اختلاف در نتایج را می‌توان به تفاوت در مکان جمع‌آوری پداژه‌ها نسبت داد. با توجه به آلودگی بیش از نیمی از پداژه‌های موجود در بازار به ویروس موزاییک خیار، گستردگی دامنه میزبانی این ویروس و شیوه انتقال آن در طول فصل رشد، احتمال آلودگی اکثر گیاهان وجود دارد، بنابراین استفاده از پداژه‌های سالم برای کشت در مزارع جدید تولید گل از روش‌های اساسی برای کنترل آلودگی به ویروس موزاییک خیار و کاهش خسارت این ویروس می‌باشد.

در تحقیق حاضر از روش کشت مریستم انتهایی و همچنین گرمادرمانی و برق درمانی به همراه کشت مریستم برای حذف ویروس موزاییک خیار از گلایل استفاده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که میزان حذف ویروس از مریستم انتهایی با اندازه نیم میلی‌متر ٦٦/٦٦ درصد و از مریستم‌هایی با اندازه ۰/۷ میلی‌متر ۲۰ درصد بود (جدول ۵). کشت مریستم انتهایی با اندازه ۰/۷-۰/۵ میلی‌متر برای حذف ویروس موزاییک زرد لوبیا از گلایل سبب حذف ویروس از ۹۰-۸۰ درصد گیاهان تیمار شده گردید (Bertaccini & Marani, 2003). کشت مریستم انتهایی با اندازه ۰/۵ تا ۰/۷ میلی‌متر برای حذف دو ویروس موزاییک خیار و موزاییک زرد لوبیا از گلایل سبب حذف هر دو ویروس از همه گیاهان شده است (Logan & Zettler, 1985). نتایج این تحقیق با یافته‌های فوق متفاوت بود. در این تحقیق برای ردیابی ویروس در گیاهان باززایی‌شده از آزمون RT-PCR استفاده‌شد در حالیکه پژوهشگران یادشده برای شناسایی ویروس در گیاهان باززایی‌شده از آزمون سرولوژیکی الایزا استفاده کردند. بنابراین به‌نظر می‌رسد این اختلاف به‌دلیل استفاده از روش با حساسیت بیشتر (RT-PCR) در ردیابی ویروس در پژوهش حاضر می‌باشد.

در تحقیق حاضر میزان حذف ویروس در روش گرمادرمانی همراه با کشت مریستم انتهایی در اندازه ۰/۵ میلی‌متر ۱۰۰ درصد بود (جدول ۳) که با نتایج پژوهش‌های قبلی مشابه است (Mangal *et al*., 2006; Selvarajan *et al*., 1999). از روش گرمادرمانی همراه با کشت مریستم انتهایی برای حذف دو ویروس موزاییک خیار و موزاییک زرد لوبیا از گیاه گلایل استفاده

شده‌است و در نتیجه کشت مریستم با اندازه ۰/۳-۰/۵ میلی‌متر سبب عاری شدن ۸۰ تا ۱۰۰ درصد نمونه‌ها از هر دو ویروس شده است (Selvarajan *et al*., 1999) و در پژوهش دیگری روش گرمادرمانی همراه با کشت مریستم انتهایی با اندازه ۰/۷-۰/۵ میلی‌متر برای حذف این دو ویروس از گیاه گلایل سبب حذف هر دو ویروس به میزان ۱۰۰ درصد گیاهان شده است (Mangal *et al*., 2006). کشت مریستم همراه با گرمادرمانی برای حذف ویروس موزاییک زرد لوبیا از گلایل‌های آلوده به این ویروس، مورد استفاده قرارگرفته‌است کشت مریستم با اندازه‌های ۰/۵ و یک میلی‌متر سبب حذف ویروس از ۸۹ تا ۹۹ درصد گیاهان شده است (Sharifi Nezamabad *et al*., 2015). در پژوهش حاضر کارایی حذف ویروس در روش کشت مریستم همراه با گرمادرمانی مریستم با اندازه ۰/۵ میلی‌متر ۱۰۰درصد و مریستم با اندازه ۰/۵ میلی‌متر بدون اعمال گرما ٦٦/٦٦ بود (جدول ۳) که بالابودن درصد عاری از ویروس‌شدن در گیاهان حاصل از ریزنمونه‌های گرمادرمانی‌شده نسبت به گرمادرمانی‌نشده، نشان‌دهنده کارایی گرمادهی در تولید گیاهچه‌های عاری از ویروس است. نتایج بدست آمده توسط سایر محققین نیز نشان دهنده موثرتر بودن روش کشت مریستم همراه با گرمادرمانی نسبت به روش کشت مریستم به‌تنهایی در تولید اندام‌های گیاهی عاری از ویروس می‌باشد (Koubouris *et al*., 2007; Manganaris *et al*., 2003; Wang *et al*., 2006).

در تحقیق حاضر روش برق‌درمانی برای اولین‌بار به‌منظور حذف ویروس موزاییک خیار از گلایل استفاده‌شد. نتایج بدست‌آمده از بکارگیری روش برق‌درمانی نشان‌داد که شدت جریان ۱۰ میلی‌آمپر به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه به ترتیب باعث حذف ۳۳/۳۳ و ٦۰ درصد ویروس از نمونه‌های باززایی‌شده شد. در حالیکه تیمار ۱۵ میلی‌آمپر به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه به ترتیب باعث حذف ٦۰ و ۷۵ درصد از نمونه‌های باززایی‌شد. پایه‌های مادری مو آلوده به ویروس ای انگور با استفاده از روش برق درمانی همراه با کشت مریستم سبب حذف ویروس در گیاهان تیمار شده با شدت جریان ۲۰ و ۳۰ میلی‌آمپر به مدت ۱۵ دقیقه شده است در حالیکه تیمار ۱۰ دقیقه قادر به حذف ویروس نشده است (Bayati *et al*., 2011). نتایج پژوهش حاضر با نتایج Bayati و همکاران (۲۱۱) تفاوت دارد، در این تحقیق از اندازه مریستم ۰/۷ میلی‌متر استفاده‌شد درحالیکه که Bayati و همکاران (۲۰۱۱) از اندازه مریستم یک میلی‌متر استفاده کرده بودند و احتمالا اختلاف در میزان حذف ویروس به دلیل اختلاف در گونه گیاه میزبان، گونه ویروس و احتمالا اختلاف در اندازه مریستم کشت شده است.

در تحقیق حاضر در مجموع ۷۳ درصد گیاهان تیمار شده با استفاده از آزمون الایزا عاری از ویروس تشخیص داده شدند درصورتیکه در آزمون ملکولی ٤۲ درصد عاری از ویروس تشخیص داده شدند. تفاوت بین درصد ردیابی ویروس با این دو روش در نتایج سایر محققین

نیز مشاهده شده است (Verma *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 1993). این اختلاف را می‌توان به دقت بیشتر روش RT-PCR نسبت به الیزا نسبت داد.

با توجه به اهمیت گل گلایل، آلودگی گسترده پداژه‌های موجود در بازار به ویروس موزاییک خیار و نحوه تکثیر این گل، توصیه می‌شود پداژه‌های گلایل عاری از ویروس موزاییک خیار با استفاده از روش کشت مریستم با اندازه ۰/۵ میلی‌متر همراه با گرمادرمانی تولید و در اختیار تولیدکنندگان گل قرار گیرد.

منابع

Almaarri K, Massa R, Albiski F (2012). Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate Potato Y potyvirus from infected potato plants. Plant Biotechnology 29: 237-243.

Anonymous (2010). Statistics office of ornamental plants and vegetable, Deputy of Horticulture, Ministry of Jahad-e-Agriculture of Iran, Tehran.

Baker KF (1993). Thermotherapy of planting material. Phytopathology 52: 1244- 1255.

Bayati S, Shams-Bakhsh M, Moieni A (2011). Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. Journal of Agriculture, Science and Technology 13: 443-450.

Bertaccini A, Marani F (2003). BYMV-free clones of eight gladiolus cultivars obtained by meristem tip culture. Acta Horticulture 177:299-308.

Cheong EJ, Mock R, Li R (2012). Elimination of five viruses from sugarcane using in vitro culture of axillary buds and apical meristems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 109: 439-445.

De Blass C, Borja MI, Saiz M, Remero J (1994). Broad spectrum detection of Cucumber mosaic virus using the polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology 141:323-329.

Dijkstra J, Jager C (1998). Practical plant virology protocols and exercise. Springer Lab Manual, 459pp.

Duarte L M L, Rivas E B, Harakava R, Veauvy M C D, lexandre M A (2013). Genealogy of cucumber mosaic virus isolated from ornamental species, American Journal of Plant Sciences, 4: 1081-1087.

Dubey VK, Singh VP (2010). Molecular characterization of Cucumber mosaic virus infecting Gladiolus, revealing its phylogeny distinct from the Indian isolate and alike the Fny strain of CMV. Virus Genes 41: 126-134.

Emami Meybodi D, Mozafari J, Babaeiyan N, Rahimian H (2011). Application of electrotherapy for thee of potato potyviruses. Journal of Agriculture, Science and Technology 13: 921-927.

Fuji S, Shinoda K, Ikeda M, Furuya H, Fukumota F. (2005). Complete nucleotide sequence of the new *potexvirus* (*Alstromeria virus X*). Archive of virology 150: 2377-2385.

Gonzales JE, Sanchez R, Sanchez A (2004). Biophysical analysis of electric current mediate nucleoprotein inactivation process. Centro Agricola 2:42-47.

Koubouris GC, Malioga VI, Katis NI, Efthimiou K, Valsilakakis MD (2007). Elimination of Plum pox virus through in vitro thermotherapy and shoot tip culture compared to conventional heat treatment in apricot cultivar Bebecou. Journal of General Plant Pathology 73: 370-373.

Lilien-Kipnis H, Azizbekova N, Ziv M (1997). Bulb and inflorescence development in Nerinesarniensis. Israel Journal of Plant Sciences 45: 13-18.

Logan AE, Zettler FW (1985). Rapid *in vitro* propagation of virus indexed gladioli. Acta Horticulture165: 168-172.

Mangal M, Bhardwaj SV, Handa A, Jindal KK (2003). Production of virus tested gladioli through in vitro and in vivo techniques. Acta Horticulturae 624: 511-514.

Mangal SV, Bhardwaj A, Handa KK (2006). Production of viruses tested gladioli through in vitro and invivo. Acta Horticulture 164:169-180.

Manganaris GA, Economou AS, Boubourakas IN, Katis NI (2003). Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in Nectarine. Plant Cell Reports 22:195-200.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 437-496.

Raizada RK, Zaidi AA, Srivastava KM, Shreni VCD, Singh BP (1989). Detection of bean yellow mosaic virus in different part of Gladiolus Indian. Journal of Plant Pathology 7(2): 91-96.

Salami AR, Ebadi A, Zamani Z, Koohi-Habibi M (2005). Elimination of *grapevine fanleaf virus* two Iranian cultivars "BidaneSefid" and "Shahroodi" by in vitro meristem culture and thermotherapy. International Workshop on Advances in Grapevine and Wine Research. Septamber 2005, Venosa, Italy.

Selvarajan R, Gupta M, Datta L, Misra RL (1999) Production of gladiolus virus-free plants through meristem tip culture and in combination with thermotherapy and chemotherapy. Acta Horticulture 2:101- 106.

Sepahpour S, Moieni A, Shams-Bakhsh M, Baghizadeh A (2009) Effects of electric current value and time treatments on elimination of Carnation mottle virus and in vitro plantlet regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus*). Acta Horticulturae 829: 395-398.

Sharifi N (2009). Elimination of Bean yellow mosaic virus from Gladiolus by meristem tip culture and thermotherapy. M.S. Thesis, Tehran University, Tehran, Iran.

Sharifi Nezamabad P, Koohi Habibi M, Dizadji A, Kalantari S (2015). Elimination of Bean yellow mosaic virus through thermotherapy combined with meristem-tip culture in gladiolus corms. Journal of Crop Protection 4(4): 533-543.

Verma N, Ram R, Hallan V, Kumar K, Zaidi AA (2004). Production of Cucumber mosaic virus-free chrysanthemum by meristem tip culture. Crop Protection 23: 469-473.

Wang LP, Wang GP, Hong N, Tan RR, Deng XY, Zhang H (2006). Effect of thermotherapy on elimination of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* for in vitro-culture pear shoot tips. Horticultural Science 41: 729-732.

Elimination of *Cucumber mosaic virus* from gladiolus by meristem tip culture, thermotherapy and electrotherapy

Turang S.[1], Shams-bakhsh M.[*2], Moieni A.[3]

[1]Former Ms.c. student of Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2]Associate Professor of Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3]Associate Professor of Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract

Flowers of *Gladiolus* sp. are among the top six flowers of export value and in Iran take the second place in the production of cut flowers. *Cucumber mosaic virus* is one of the most common viruses in gladiolus worldwide. As, the gladioli are propagated through corms, therefore viral diseases could be easily transmitted to the next generation. To produce healthy stock plants, it is important to produce and culture virus-free corms. In the present research, thermotherapy along with meristem culture, electrotherapy along with meristem culture and meristem culture alone were employed to eliminate CMV from infected gladiolus plants. CMV detection using DAS-ELISA showed that 73 percent of the regenerated plants were free of viruses whereas, RT-PCR analysis showed that 42 percent of plants were virus-free. The efficiency of virus elimination from thermo-treated meristems culture with size 0.5 were 100%. This is the first report of application of electrotherapy for CMV elimination from gladiolus plants and the best results were obtained by using 15 milliamps for 15 minutes. The results showed that thermotherapy along with meristem culture was a more efficient method for elimination of CMV from infected gladiolus plants.
Key words: *Gladiolus, Cucumber mosaic virus, Virus elimination.*

[*] Corresponding Author: Shams-Bakhsh M. Tel: 02148292274 Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir