**Iranian Journal of Horticultural Science**
Vol 50, No 4, Winter 2020 (983-992)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.267056.1516

**علوم باغبانی ایران**
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۸ (ص ۹۹۲-۹۸۳)

# ارزیابی مولکولی کارایی گرمادرمانی و کشت مریستم برای حذف شماری از بیماری‌های ویروسی در رقم‌های مهم تجاری گلابی (*Pyrus communis* L.)

**نوشین کاظمی[۱]، فریبز زارع نهندی[۲]، علی اکبر حبشی[۳*] و محمدرضا دادپور[۲]**
**۱ و ۲. دانشجوی سابق دکتری و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز**
**۳. دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی ایران (ابری)، کرج**
**(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۵)**

## چکیده

**این پژوهش با هدف تولید نهال عاری از سه ویروس ACLSV (*Apple chlorotic leafspot virus*)، ASGV (*Apple stem grooving virus*) و ASPV (*Apple stem pitting virus*) در هفت رقم گلابی شامل ابته فتل، بیروتی، درگزی، کوشیا، لوئیزبون، ملینا و اسپادونا انجام شد. آزمایش‌ها با ارزیابی اثربخشی دوره‌های گرمادرمانی شامل صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و کشت مریستم انتهایی با اندازه کمتر از ۰/۲ میلی‌متر، بر میزان حذف ویروس از ریزنمونه‌ها انجام شد. در ابتدا حضور ویروس‌های مورد مطالعه در ریزنمونه‌های مادری با روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و به جز، نمونه‌های مادری رقم‌های ابته‌فتل و بیروتی که عاری از ویروس ASPV بودند، سایر ریزنمونه‌ها به هر سه ویروس آلودگی داشتند. گرمادرمانی و کشت مریستم در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. ریزشاخه‌های حاصل از گرمادرمانی و کشت مریستم توسط RT-PCR برای هر سه ویروس مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج نشان داد میزان حذف سه ویروس ACLSV، ASGV و ASPV به‌ترتیب با درصدهای ۲۶/۶۳، ۳۵/۵ و ۷۸/۴۶ در رقم‌های مختلف با یکدیگر متفاوت بود. بیشترین میزان عاری شدن از ویروس در رقم کوشیا و کمترین آن در رقم اسپادونا مشاهده شد. افزایش طول مدت گرمادرمانی رابطه مستقیم با افزایش درصد عاری سازی ریزنمونه‌ها از هر سه ویروس مورد مطالعه داشت، اما از طرفی این 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، ASPV و ACLSV به‌ترتیب با ۶۱/۴، ۱۰۰ و ۴۵/۵ درصد از ریزنمونه‌های مورد مطالعه بود. در پایان آزمایش نمونه‌هایی که توسط RT-PCR سالم تشخیص داده شدند، تکثیر و ریشه‌دار شدند و در شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند.**

**واژه‌های کلیدی:** گرمادرمانی، Apple chlorotic leafspot virus، Apple stem grooving virus، Apple stem pitting virus، RT-PCR.

# Molecular assessment of thermotherapy and meristem culture efficiency on some virus's eradication from important commercial pear cultivars (*Pyrus communis* L.)

**Nooshin Kazemi[1], Fariborz Zaare-Nahandi[2], Ali Akbar Habashi[3*] and Mohammad Reza Dadpour[2]**
1, 2. Former Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Associate Professor, Department of Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran
(Received: Oct. 10, 2018 - Accepted: Jan. 5, 2019)

## ABSTRACT

This study was aimed to eradicate three viruses, Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), Apple stem grooving virus (ASGV) and Apple stem pitting virus (ASPV) from seven pear cultivars including Abate Fetel, Beiruti, Dargazi, Coscia, Louise Bonne, Mellina, Spadona. Experiments were performed by evaluation of the effectiveness of thermotherapy duration including 0, 7, 14 and 21 days at 38 °C and meristem culturing in size of less than 0.2 mm on virus eradication rates of explants. At first mother samples were tested for ACLSV, ASGV and ASPV by and RT-PCR and all samples were infected by all three viruses, except Abate Fetel and Beiruti samples, that were free of ASP virus. Thermotherapy and meristem culturing were performed *in vitro*. Explants from thermotherapy and meristem culturing were tested by RT-PCR for all three viruses and the results showed that eradication rates of ACLSV, ASGV and ASPV, respectively 78.46, 26.63 and 35.5 percent were different in the different pear cultivars. The highest rate of virus eradication was related to Coscia and the lowest to Spadona cultivars. There was a direct relationship between increasing the duration of thermotherapy and virus elimination of explants, but this increased period of time up to 21 days reduced the growth and multiplication and even destroyed the explants. Therefore, 14 days of thermotherapy was the most effective treatment for elimination of ASGV, ASPV and ACLSV, respectively 61.4, 100 and 45.5 percent, from pear explants. At the end of the experiment, samples that were diagnosed virus free using RT-PCR, were proliferated, rooted and transferred to greenhouse condition for acclimation stage.

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

* Corresponding author E-mail: Habashia@yahoo.com

## مقدمه

گلابی (*Pyrus* L.) از مهم‌ترین درختان میوه مناطق معتدله است که به‌دلیل ارزش غذایی و اقتصادی بالا، سالیان متمادی است که در ایران کشت می‌شود (Abdollahi, 2010) و براساس آمار موجود در این زمینه، کشور ایران با تولید ۲۵۵ هزار تن گلابی در سال در رتبه سیزدهم جهان قرار دارد (FAO, 2016). با این‌که میزان تولید و سطح زیر کشت گلابی در جهان از سال ۱۹۹۴ تا ۲۰۱۶ دارای افزایش منظم بوده، اما این دو پارامتر در ایران با کاهش رونق همراه بوده است. از دلایل این امر می‌توان به سرمازدگی، خشکسالی، آفت، بیماری‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی متعدد در سال‌های اخیر اشاره نمود که سبب بروز خسارت به رقم‌ها و پایه‌های مختلف درخت گلابی می‌شود (Abdollahi *et al*., 2010; FAO, 2016). راهکارهایی برای مبارزه و پیشگیری علیه بسیاری از آفات و بیماری‌هایی که منجر به کاهش عملکرد و خسارت محصول درختان دانه‌دار می‌شوند، شناخته شده است. اما هیچ روش مبارزه قطعی علیه آلودگی‌های ویروسی وجود ندارد و استفاده از نهال‌های سالم و عاری از ویروس تنها راه شناخته شده جهت جلوگیری از آسیب اقتصادی ویروس‌ها به اغلب درختان میوه از جمله درختان میوه‌دانه‌دار است (Mathioudakis *et al*., 2008; Komorowska *et al*., 2010).

سویه‌های سه ویروس ACLSV (*Apple chlorotic leafspot virus*)، ASGV (*Apple stem grooving virus*) و ASPV (*Apple stem pitting virus*) از خانواده *Flexiviridae*، بیمارگرهای پنهان و رایجی در سیب و گلابی هستند که به‌طور معنی‌داری میزان محصول و کیفیت میوه را کاهش می‌دهند (Shim *et al*., 2004; Adams *et al*., 2004). این ویروس‌ها در بدو ورود به گیاه، دارای علائم ظاهری کم یا فاقد علامت هستند که معمولاً با ناهنجاری‌های تغذیه‌ای روی میوه و برگ اشتباه گرفته می‌شوند. به تدریج با افزایش سن گیاه، غلظت ویروس‌ها نیز افزایش یافته و علائم بیماری به‌صورت شدید و ناگهانی روی بخش‌های مختلف درخت بروز می‌کند (Tatineni *et al*., 2009; Rana *et al*., 2010). با توجه به این‌که علائم و خسارت ویروس معمولاً همزمان با سن باردهی اقتصادی گیاه مشهود می‌شوند، آلودگی به ویروس‌ها خسارت غیر قابل کنترل و جبران‌ناپذیری را به باغ وارد می‌کنند. از طرفی، استفاده از نهال آلوده به ویروس، میزان تولید و حتی سلامت گیاه میزبان را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد، به‌طوری‌که منجر به آسیب قابل‌ملاحظه و در یک نگاه کلی، افت عملکرد آن محصول در سطح جهانی شده است (Hadidi & Barba, 2011). به‌علاوه گزارش‌هایی مبنی بر اثر بیماری‌های ویروس در ایجاد ناسازگاری پایه و پیوندک در برخی گونه‌های گلابی ارائه شده است (Campbell, 1967). در مقابل، استفاده از نهال سالم و عاری از ویروس، علاوه بر تسریع رشد نهال و باردهی زودتر رقم پیوندی، به نهاده‌های کشاورزی پاسخ بهتری نشان داده و عملکرد کمی و کیفی و بازده سرمایه‌گذاری بهتری دارد (Posnette *et al*., 1963; Meijneke *et al*., 1973; Wang *et al*., 2011; Grimova *et al*., 2016). لازم به ذکر است، با توجه به این‌که هیچ ناقل طبیعی برای ویروس‌های ACLSV، ASGV و ASPV شناخته نشده است، استفاده از ماده گیاهی سالم یک راه مؤثر برای جلوگیری از خسارت ویروس است (Tan *et al*., 2010).

در پژوهش‌های قبلی، تکنیک الایزا به‌عنوان یکی از راه‌های تشخیص سریع آلودگی ویروس‌های گیاهی در سیب و گلابی معرفی شده است (Adams *et al*., 1999; Valero *et al*., 2003)، اما با استفاده از این تکنیک امکان ردیابی ویروس‌ها در غلظت‌های پایین وجود ندارد. از طرفی با توجه به این‌که در این روش پروتئین پوششی ویروس ردیابی می‌شود، گاهی نتایج مثبت کاذب به‌دست می‌آید (Kazemi *et al*., 2019). بنابراین توصیه می‌شود که در این زمینه از روش‌های دقیق‌تر که مبتنی بر ردیابی RNA ویروس هستند مانند RT-PCR بهره گرفته شود (Menzel *et al*., 2002; Manganaris *et al*., 2003; Sharma *et al*., 2007). از طرفی زمانی که یک گیاه آلوده به ویروس در دمای بالا وادار به رشد می‌شود، به‌طور معمول تقسیم سلولی و رشد گیاه سریع‌تر از گسترش ویروس اتفاق خواهد افتاد و در نتیجه این احتمال وجود دارد که تکثیر ویروس در بافت‌ها محدود شود. در نتیجه این فرآیند، نقاط عاری از ویروس به‌خصوص در قسمت‌های رأسی گیاه، مانند نواحی مریستمی گیاه می‌تواند تولید شود (Cooper &

(Walkey, 1978). لذا چنین به نظر می‌رسد که بیماری‌های ویروسی فاقد توان آلوده سازی مریستم‌های دارای رشد بسیار فعال می‌باشد که از دلایل این امر، عدم وجود ارتباط آوندی کامل بین مریستم و بافت‌های زیرین قابل ذکر است (Verma *et al*., 2005; Gambino *et al*., 2006; Hosokawa, 2008; Retheesh & Bhat, 2010). از طرفی افزایش دما و طول دوره گرمادرمانی می‌تواند در حذف ویروس‌ها بسیار مؤثر واقع شود (Manganaris *et al*., 2003; Koubouris *et al*., 2007; Dziedzic, 2008; Tan *et al*., 2010). براساس پژوهش‌های پیشین گرمادرمانی از مهم‌ترین راهکارهای حذف ویروس‌های درختان میوه مانند سیب و گلابی است و مریستم برداری پس از گرمادرمانی، جهت تکمیل فرآیند حذف ویروس بسیار رایج است (Manganaris *et al*., 2003; Valero *et al*., 2013; Wang *et al*., 2003; Paprstein *et al*., 2008 & *al*., 2008).

این تحقیق با هدف دست‌یابی به‌دستورالعمل مناسب جهت تولید نهال عاری از ویروس‌های ACLSV، ASGV و ASPV در هفت رقم تجاری گلابی صورت گرفت. جهت نیل به این هدف کارایی تیمارهای گرمادرمانی، به‌صورت تلفیقی با تکنیک کشت مریستم در زمینه حذف ویروس با استفاده از روش RT-PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### تهیه مواد گیاهی و استقرار

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق هفت رقم گلابی شامل 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 در کلکسیون گلابی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، واقع در ایستگاه کمال‌شهر کرج تهیه شدند. نمونه‌ها پس از ضدعفونی شامل شست‌وشو با الکل اتیلیک ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد و حدود ۲۰ میکرولیتر Tween20 و در نهایت شست‌وشو با آب مقطر استریل، در محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) با افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (بنزیل آمینوپورین) به‌همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به‌عنوان منبع کربوهیدرات و ۶/۸ گرم در لیتر آگار مستقر و به اتاق رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۲۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی منتقل گردیدند.

### بررسی اولیه تشخیص آلودگی ویروسی

پس از طی شدن مرحله استقرار و تکثیر اولیه در محیط کشت مناسب (Kazemi *et al*., 2019)، ریز نمونه‌های رقم‌های گلابی با روش RT-PCR جهت بررسی حضور ویروس‌های ASGV، ACLSV و ASPV مطالعه شدند. استخراج RNA از ریزنمونه‌های گلابی با استفاده از پروتکل و بافر تهیه شده توسط Masoomi *et al*. (2016) صورت گرفت. ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت دو مرحله‌ای شرکت Thermo Scientific و آغازگر اختصاصی انجام شد. کیفیت و مناسب بودن cDNA ساخته شده، با کمک آغازگر اکتین طراحی شده در این آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی ویروس‌ها در جدول ۱ ذکر شده است. محصول PCR بر روی ژل (w/v) ۱/۵ درصد آگارز رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم بروماید، قرار گرفت و سپس با کمک نور ماورای بنفش مشاهده شد.

### گرمادرمانی و کشت مریستم

آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل چهار سطح گرمادرمانی (صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) و هفت رقم گلابی مورد بررسی بود. در هر ظرف آزمایش گرمادرمانی پنج ریزنمونه و هر تیمار در ۵ تکرار به اجرا گذاشته شد.

ریزنمونه‌های رقم‌های گلابی پس از استقرار و تکثیر در محیط کشت پرآوری حاوی محیط پایه QL (Quoirin & Lepoivre, 1977) به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶/۸ گرم در لیتر آگار، جهت اعمال تیمارهای گرمادرمانی مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول۱. فهرست و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص وجود آلودگی ویروسی در رقم‌های مختلف گلابی مورد بررسی
Table 1. The list and nucleotide sequences of primers used for detection for virus infection in various evaluated pear cultivars

| Viruses | Primers | Sequences (5´- 3´) | Size (bp) | References |
|---|---|---|---|---|
| ASGV | ASG-F | GGAAGACGTGCTTCAACAAGC | 236 | Kazemi *et al*., 2019 |
| | ASG-R | ATCCAACAGCGGGAAACTGGG | | |
| ACLSV | ACLSV-F | TTCATGGAAAGACAGGGGCAA | 219 | Kazemi *et al*., 2019 |
| | ACLSV-R | AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA | | |
| ASPV | ASPV247-F | CAGTATTGTGCCTTYTAYGCRAAGC | 247 | Deng *et al*., 2004 |
| | ASPV247-R | CCATAGAACGGATGCGGTACATYTG | | |
| ACTIN | ACTIN -F | GTTCCCTGGTATTGCAGACCG | 125 | Kazemi *et al*., 2019 |
| | ACTIN -R | CAAGGATGGACCCTCCAATCC | | |

افزایش دمای محیط به‌صورت تدریجی انجام شد، به این صورت که ریزنمونه‌ها ابتدا به‌مدت سه روز در دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس دمای اتاق کشت در هر سه روز سه درجه سانتی‌گراد افزایش یافت تا به دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد رسید. سپس گیاهچه‌های گلابی در چهار رژیم زمانی گرمادرمانی، برای مدت صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز در دمای ۱±۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. گرمادرمانی در محیطی با شرایط نوری مناسب شامل دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس انجام گرفت.

پس از پایان تیمار گرمادرمانی، جداسازی و کشت مریستم انتهایی در اندازه کوچک‌تر از ۰/۲ میلی‌متر (Kazemi *et al*., 2019) انجام شد. کشت مریستم از ریزنمونه‌های تیمار صفر روز گرمادرمانی، به‌عنوان تیمار شاهد انجام گرفت. مراحل جدا سازی مریستم زیر لوپ و تحت شرایط استریل در هود لامینار انجام گرفت. محیط کشت مریستم شامل نمک‌های پایه و ویتامین‌های MS ۱/۲ و حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. بعد از ۳۰ تا ۳۵ روز، مریستم‌های رشد کرده و زنده به محیط کشت QL به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP، در شیشه‌های مک‌کارتی به ارتفاع ۸ سانتی‌متر و قطر داخلی ۲۰ میلی‌متر منتقل شدند.

**تکثیر گیاهچه‌ها**

حضور ویروس‌های مورد بررسی در رقم‌های گلابی رشد یافته از مریستم، با استفاده از تکنیک RT-PCR بررسی شدند. گیاهان سالم تشخیص داده شده، در محیط کشت QL به‌همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP تکثیر و سپس در محیط کشت حاوی نمک‌های MS ۱/۲ فاقد ویتامین، همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IAA ریشه دار شدند (Sun *et al*., 2009). ریزنمونه‌های ریشه دار شده به گلدان‌هایی به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر حاوی پرلایت و پیت ماس (۱:۱) استریل شده منتقل و به‌مدت ۴ تا ۵ روز در گلخانه با رطوبت نسبی حدود ۹۰ درصد و دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس میزان رطوبت نسبی گلخانه به حدود ۶۰ درصد کاهش داده شد و گیاهان برای حدود ۴ هفته در این شرایط قرار گرفتند. یک سال بعد از سازگاری، حضور سه ویروس ASGV، ACLSV و ASPV مجدداً با روش RT-PCR در نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

**تجزیه و تحلیل آماری**

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰رسم شدند.

## نتایج و بحث

**تشخیص آلودگی‌های ویروسی**

بررسی اولیه آلودگی‌های ویروسی در ریزنمونه‌های مادری با استفاده از روش RT PCR نشان داد نمونه‌های مادری دو رقم ابته‌فتل و بیروتی عاری از ویروس ASPV بودند، اما به دو ویروس دیگر شامل ویروس‌های ASGV و ACLSV آلودگی داشتند. نمونه‌های مادری رقم‌های درگزی، کوشیا، لوئیزبون، ملینا و اسپادونا نیز به هر سه ویروس ASGV، ASPV و ACLSV آلودگی داشتند. به‌طورکلی بررسی‌های ملکولی اولیه نشان داد تمام ریزنمونه‌های مادری تهیه

شده از رقم‌های گلابی مورد مطالعه در این تحقیق دچار آلودگی ویروسی بودند، بنابراین در ادامه پژوهش تحت تیمارهای حذف ویروس قرار گرفتند.

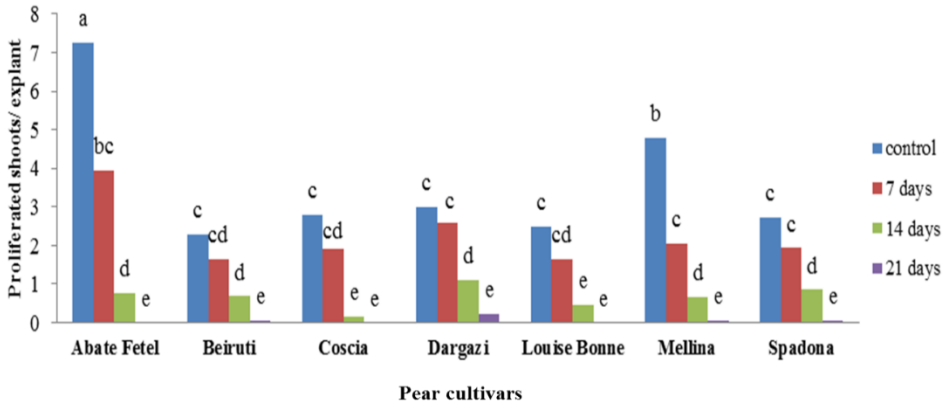
**تیمارهای گرمادرمانی**

نتایج نشان داد اثر رقم و طول دوره‌ی گرمادرمانی و اثر متقابل این دو فاکتور بر رشد و زنده‌مانی ریزشاخه‌های جدید و تازه تولیدشده طی دوره‌های گرمادرمانی معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) بود. با افزایش طول دوره گرمادرمانی، میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها کاهش یافت، به‌طوری که پس از ۲۱ روز گرمادرمانی، اغلب ریزنمونه‌ها از دست رفتند (شکل ۱). نتایج حاصل در این زمینه مشابه نتایج پژوهش دیگری بود که عنوان کرده بودند تقریباً تمام ریزنمونه‌های گلابی قرار گرفته در تیمار گرمادرمانی ۳۸ درجه سانتی‌گراد، پس از ۲۰ روز از بین رفتند (Hu*et al*., 2015). در پژوهشی دیگر نیز میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌های گلابی، پس از گذشت ۳۵ روز گرمادرمانی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۶۴ درصد گزارش شده بود (Wang *et al*., 2006). همچنین در پژوهشی روی ریزنمونه‌های گلابی رقم فنگ‌شویی (Fengshui)، گزارش شده تعدادی از گیاهچه‌ها پس از ۱۵ روز گرمادرمانی از بین رفتند و در ادامه آزمایش میزان از دست‌رفتن ریزنمونه‌ها با افزایش دوره گرمادرمانی، به‌شدت افزایش یافت (Tan *et al*., 2010). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش و پژوهش‌های پیشین، رابطه منفی بین طول دوره گرمادرمانی و میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها تایید شده است (Paprstein *et al*., 2008; Tan *et al*., 2010; Hu *et al*., 2012) و تفاوت در میزان خسارت گیاهچه‌ها، می‌تواند به‌دلیل تفاوت در میزان تحمل رقم‌های مختلف گلابی به دمای بالا و همچنین تفاوت در تیمار دمایی و زمان گرمادرمانی باشد. بنابراین، یافتن دوره زمانی بهینه گرمادرمانی که در آن، هم سلامت ریزنمونه‌ها حفظ شود و هم امکان کنترل ویروس وجود داشته باشد، بسیار ضروری است.

**حذف ویروس از ریزنمونه‌ها**

براساس نتایج، مدت زمان قرارگیری ریزنمونه‌ها در تیمار گرمادرمانی، اثر معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) بر حذف ویروس‌های ACLSV، ASGV و ASPV از ریزنمونه‌های مورد بررسی داشت. نوع رقم گلابی، اثر معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) در حذف ویروس‌های ASGV و ASPV داشت، اما فاقد تأثیر معنی‌دار بر حذف ویروس ACLSV بود.

مقایسه میانگین اثر رقم بر عاری‌شدن ریزنمونه‌ها از ویروس ASGV نشان داد، بیش‌ترین میانگین عاری‌شدن از ویروس ASGV در رقم‌های کوشیا (۶۰ درصد) و درگزی (۵۰ درصد) و کمترین میانگین عاری شدن ریزنمونه‌ها از ویروس ASGV در رقم‌های ملینا و اسپادونا (۶/۷ درصد) مشاهده شد.




شکل ۱. مقایسه میانگین اثر تعداد روزهای گرمادرمانی (۳۸ درجه سانتی‌گراد) بر رشد و پرآوری ریزنمونه‌های هفت رقم گلابی. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن است.

Figure 1. Mean comparison effect of number of thermotherapy (38˚C) days on growth and proliferation of seven pear cultivars. Different letters show significant differences according to Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.01$).

رقم‌های کوشیا (۷۶/۶۷ درصد) و درگزی (۷۳/۴ درصد) بالاترین میانگین عاری شدن از ویروس ASPV در بین رقم‌های مورد مطالعه را نشان دادند (رقم‌های مادری ابته‌فتل و بیروتی از ابتدا عاری از ویروس ASPV بودند). در بین رقم‌های مورد مطالعه، کمترین میانگین عاری شدن از ویروس ASPV (۴۰ درصد) در رقم اسپادونا مشاهده شد. به‌طور کلی در بین هفت رقم گلابی مورد مطالعه، بیش‌ترین میزان عاری شدن از هر سه ویروس در رقم کوشیا و کمترین آن در رقم اسپادونا حاصل شد. بررسی توالی ژنوم ویروس ASGV از سیب، گلابی، گلابی ژاپنی و مرکبات نشان داد ساختار این ویروس به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای در گیاهان مختلف، متفاوت است (Magome *et al*., 1997). حتی در شاخه‌های یک درخت نیز این تفاوت ساختار می‌تواند مشاهده شود. مطالعات بیشتر نشان داد معابر انتقال ویروس در سلول‌های گیاه می‌تواند عامل این تغییر در AGSV (Magome *et al*., 1999) و ACLSV (Yaegashi *et al*., 2007) باشد. تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای که در میزان حذف یک ویروس از ریزنمونه‌های رقم‌های مختلف حاصل شده، می‌تواند ناشی از تنوع در نوع و ساختار ویروس‌ها و یا تفاوت در بافت سلول‌های گیاهی هر رقم باشد، که این مورد به‌نوبه خود می‌تواند حتی عامل ایجاد تنوع در ویروس شود.

نتایج به‌طور کلی نشان داد میزان حذف سه ویروس ACLSV، ASGV و ASPV به‌ترتیب با درصدهای ۲۶/۶۳، ۳۵/۵ و ۷۸/۴۶ در هفت رقم مورد مطالعه گلابی با یکدیگر متفاوت بود ، این امر می‌تواند ناشی از تفاوت در مورفولوژی ویروس‌ها و سرعت حرکت ذرات پروتئین ویروس و عوامل مؤثر بر انتقال ویروس در سلول‌های گیاهی باشد که در تحقیقات گذشته نیز بررسی و تأیید شده است (Callaway *et al*., 2001; Prokhnevsky *et al*., 2002; Sareila *et al*., 2004). در بین ویروس‌های مورد مطالعه در این پژوهش، ویروس ASPV درصد حذف بالاتری داشت. در تأیید این نتایج، در پژوهشی ذکر شده که میزان حذف ویروس‌های ACLSV، ASGV و ASPV از ریزنمونه‌ها متفاوت بود و به‌ترتیب سالم سازی با درصدهای ۸۴/۸، ۸۳ و ۹۴/۱ مشاهده شده است (Hu *et al*., 2015). در پژوهش‌ها آمده است که ویروس ACLSV پس از ۳۳ روز گرمادرمانی از نمونه‌های گلابی حذف شد، اما حذف ویروس ASGV بسیار دشوار بود، به‌طوری‌که نتیجه بررسی غلظت این ویروس در گیاه با استفاده از تکنیک الایزا نزدیک به نمونه مثبت بود (Knapp *et al*., 1995; Cieslinska, 2002). در تحقیق دیگری نیز آمده است ACLSV نسبت به دماهای بالا حساس‌تر از ASGV بود و با اعمال تیمارهای گرمادرمانی راحت‌تر و سریع‌تر از ویروس ASGV حذف شد (Wang *et al*., 2006). نتایج تحقیقات مذکور با پژوهش ما مطابقت نداشت، زیرا به‌طور کلی میزان عاری شدن ریزنمونه‌ها از ویروس ASGV در این پژوهش بیشتر از ویروس ACLSV به‌دست آمد و این عدم تطابق می‌تواند تأییدی دیگر بر تفاوت ناشی از تنوع در مورفولوژی ویروس‌ها و تغییرات و تنوع آن‌ها در میزبان‌های مختلف باشد.

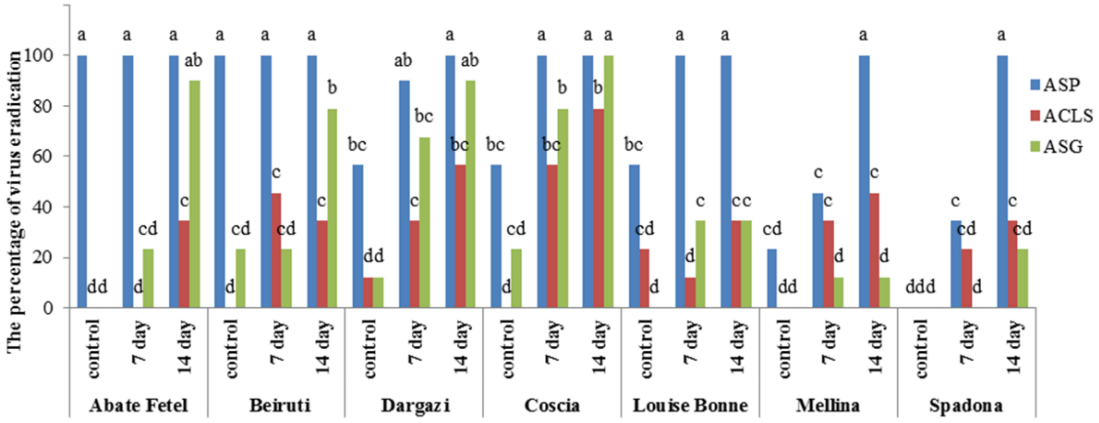
نتایج طول مدت گرمادرمانی نشان داد تیمار شاهد (بدون گرمادرمانی) دارای راندمان بسیار پایینی در سالم سازی بود و درصد حذف ویروس‌های ACLSV، ASPV و ASGV از ریزنمونه‌های این تیمار به‌ترتیب ۵/۰۷، ۵۶/۱۵ و ۸/۴ درصد بود (شکل ۲). بنابراین گرمادرمانی یک عامل مؤثر در حذف بیماری‌های ویروسی از ریزنمونه‌های گلابی در این پژوهش بود. از طرفی باتوجه به این‌که اغلب گیاهچه‌های مورد بررسی متحمل ۲۱ روز گرمادرمانی نبودند و تعداد زیادی از ریزنمونه‌های این تیمار از بین رفت، نتایج این تیمار ذکر نشده است.

مقایسه میانگین نتایج حاصل از روش RT-PCR نشان داد ۱۴ روز گرمادرمانی با ۶۱/۴ درصد حذف آلودگی ویروس ASGV از ریزنمونه‌های مورد مطالعه، مؤثرترین تیمار گرمادرمانی در این زمینه بود. میزان عاری شدن ریزنمونه‌های تیمار ۱۴ روز گرمادرمانی از ویروس ASPV و ویروس ACLSV نیز به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۴۵/۵ درصد بود (شکل ۲). به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد، با افزایش طول دوره گرمادرمانی، میزان عاری شدن گیاهان در هر سه نوع ویروس افزایش یافت. این نتایج منطبق بر گزارش های پژوهش‌های قبلی است که افزایش طول دوره‌ی گرمادرمانی را در حذف ویروس بسیار مؤثر می‌دانند (Paprstein *et al*., 2008; Wang *et al*., 2008; Panattoni *et al*., 2013).

در پژوهش‌ها آمده است دمای بالا با جلوگیری از ساخت و تکثیر RNA ویروس می‌تواند انتشار ویروس به مریستم انتهایی را کاهش دهد (Paprstein *et al*., 2008; Wang *et al*., 2008; Tan *et al*., 2010; Valero *et al*., 2003) و به‌طورکلی طول دوره گرمادرمانی عامل مؤثری در حذف ویروس از گیاه است (Tan *et al*., 2010; Hu *et al*., 2012; Wang *et al*., 2006, 2006b; Dziedzic, 2008;). بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از رقم‌های مورد بررسی در این پژوهش، ۱۴ روز گرمادرمانی می‌تواند تیمار مناسبی جهت حذف بیماری‌های ویروسی از گیاه گلابی باشد که ضمن حفظ گیاه، اثر مناسبی در حذف ویروس‌های مورد مطالعه از ریز نمونه‌ها داشت.

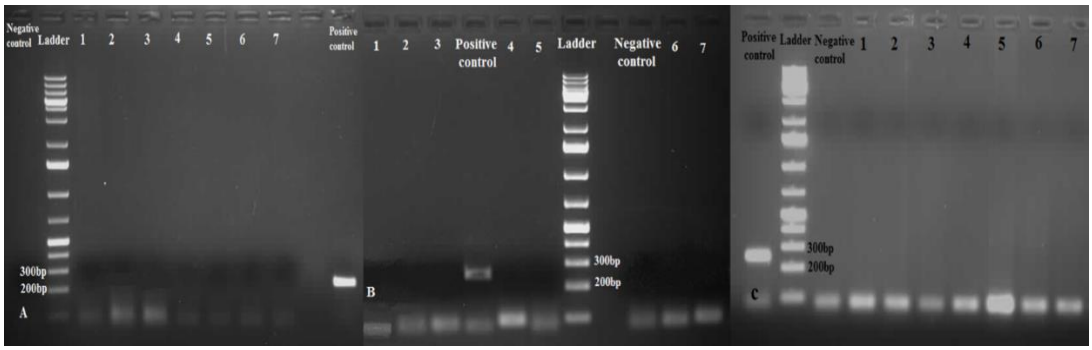
**تولید نهال گلابی عاری از سه ویروس مورد مطالعه**

براساس نتایج ثبت‌شده از این پژوهش ۶۷ درصد ریزنمونه‌های عاری از سه ویروس ASPV، ASGV و ACLSV، که تحت تیمار ریشه‌زایی قرار گرفته بودند، ریشه‌دار شدند. نود و شش درصد از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، در شرایط گلخانه‌ای با موفقیت سازگار شدند (شکل ۴). نهال‌های گلدانی برای مدت یک سال در گلخانه محافظت شدند و سپس عدم حضور سه ویروس ASPV، ASGV و ACLSV، در هفت رقم گلابی مورد مطالعه با تکنیک RT-PCR مورد بررسی مجدد قرار گرفت (شکل ۳) و نتایج نشان داد تمامی گیاهان مورد بررسی عاری از آلودگی‌های ویروسی بودند.




شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل گرمادرمانی و کشت مریستم بر درصد حذف ویروس‌هایASPV، ACLSV و ASGV از هفت رقم گلابی. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($P$<۰/۰۱) براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

Figure 2. Mean comparison interaction effect of thermotherapy and meristem culturing on percentage of ASPV, ACLSV and ASGV elimination from seven pear cultivars. Different letters show significant differences according to Duncan's Multiple Range Test ($P$≤0.01).




شکل ۳. نتیجه RT-PCR تعدادی از نمونه‌های عاری از ویروس (A: ACLSV، B: ASPV و C: ASGV)؛ ۱: ابته فتل، ۲: بیروتی، ۳: درگزی، ۴: کوشیا، ۵: لوئیزبون، ۶: ملینا و ۷: اسپادونا).

Figure 3. The result of RT-PCR, in a number of virus-free samples, (A: ACLSV, B: ASPV, C: ASGV, 1: Abate Fetal, 2: Beiruti, 3: Dargazi, 4: Coscia, 5: Louise Bonne, 6: Mellina and 7: Spadona).

شکل ۴. تولید نهال ابته فتل عاری ازACLSV، ASGV و ASPV. A) پرآوری درون شیشه‌ای، B و C) تولید ریشه در ریزنمونه‌ها و D) مرحله سازگاری نهال ریشه‌دار شده در گلخانه.

Figure 4. Production of ACLSV, ASGV and ASPV free Abate Fetal plantlets. A: *In vitro* proliferation, B and C: Root production in explants, D: Stages of adaptation rooted plantlets in the greenhouse.

**نتیجه‌گیری کلی**

بررسی اولیه گیاهان مادری با روش مولکولی RT-PCR نشان داد، به جز رقم‌های ابته‌فتل و بیروتی که به ویروس ASPV آلودگی نداشتند، سایر نمونه‌ها به هر سه ویروس موردمطالعه آلوده بودند. تیمارهای گرمادرمانی، رقم و اثر متقابل این دو عامل، رشد و زنده‌مانی ریزشاخه‌های گلابی را به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) تحت تأثیر قرار داد. به‌طوری‌که اغلب ریزنمونه‌های تیمار ۲۱ روز گرمادرمانی از بین رفتند. نوع رقم گلابی نیز اثر معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) در حذف ویروس‌های ASGV و ASPV داشت، اما فاقد تأثیر معنی‌دار بر حذف ویروس ACLSV بود. علاوه بر این تعداد روزهای تیمار گرمادرمانی، اثر معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) بر حذف ویروس‌های ACLSV، ASGV و ASPV از ریزنمونه‌های مورد بررسی داشت و به‌طور کلی با در نظر گرفتن اثر تیمارها بر زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، تیمار ۱۴ روز گرمادرمانی مؤثرترین تیمار در عاری‌کردن گیاهچه‌های گلابی از ویروس بود.

## REFERENCES


1. Abdollahi, H. (2010). *Pear: Botany, Cultivars and Rootstocks*. Iranian Agricultural Ministry Publications, Tehran, Iran. 210pp.
2. Adams, A.N., Guise, C.M. & Crossley, S. J. (1999). Plum pox virus detection in dormant plum trees by PCR and ELISA. *Plant Pathology*, 48, 240- 244.
3. 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, 1045-1060.
4. Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E.T., Sit, T. L. & Lommel, S.A. (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 419-460.
5. Campbell, A.I. (1967). The effect of some pear viruses on the growth and compatibility of a number of *Pyrus* species and near relatives. *Journal of Horticultural Science*, 42(2), 133-138.
6. Cieslinska, M. (2002). Elimination of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. *Acta Horticulturae*, 596, 481-484.
7. Cooper, V.C. & Walkey, D.G.A. (1978). Thermal inactivation of cherry leaf roll virus in tissue cultures of *Nicotiana rustica* rose from seeds and meristem tips. *Annals of Applied Biology*, 88, 273-278.
8. 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.
9. Dziedzic, E. (2008). Elimination of *Prunus* necrotic ring spot virus (PNRSV) from plum 'Earliblue' shoots through thermotherapy *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16, 101-109.
10. Food and Agriculture Organization. (2016). FAOSTAT. Retrieved May 1, 2012, from http://www.fao.org/statistics/en.
11. Gambino, G., Bondaz, J. & Gribaudo, I. (2006). Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 397-404.
12. Grimova, L., Winkowska, L., Zíka, L. & Rysanek, P. (2016). Distribution of viruses in old commercial and abandoned orchards and wild apple trees. *Journal of Plant Pathology*, 98, 549-554.
13. Hadidi, A. & 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), 1-7.
14. Hosokawa, M. (2008). Leaf primordia-free shoot apical meristem culture: a new method for production of viroid-free Plants. *The Japanese Society for Horticultural Science*, 77, 341-349.

15. Hu, G.J., Hong, N., Wang, L.P., Hu, H.J. & 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.
16. 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*, 121, 435-443.
17. Kazemi, N., Zaree, N.F., Habashi, A.A. & 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 crops improvement*, 21(1): 107-118. (In Farsi)
18. Knapp, E., Hanzer, V., Weiss, H., da Caˆmara Machado, A., da Clmara Machado, A., Weiss, B., Wang, Q., Katinger, H. & Laimer da Clmara Machado, M. (1995). New aspects of virus elimination in fruit trees. *Acta Horticulturae*, 386, 409-418.
19. Komorowska, B., Malinowski, T. & Michalczuk, L. (2010). Evaluation of several RT-PCR primer pairs for the detection of Apple stem pitting virus. *Journal of Virological Methods*, 168, 242-247.
20. Koubouris, G.C., Maliogka, V.I., Efthimiou, K., Katis, N.I. & Vasilakakis, M.D. (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.
21. Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T. & Miyakawa, T. (1997). Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. *Phytopathology*, 87, 389-396.
22. Magome, H., Yoshikawa, N. & Takahashi, T. (1999). Single-strand conformation polymorphism analysis of apple stem grooving capillovirus sequence variants. *Phytopathology*, 89, 136-140.
23. 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, 195-200.
24. Mathioudakis, M.M., Maliogka, V.I., Dovas, C.I., Paunovi´c, 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, 228-236.
25. 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 site.*
26. Meijneke, C.A.R., Van Oosten, H.J., & Peerboom, H. (1973). Growth, yield, and fruit quality of virus-infected and virus-free Golden Delicious apple trees. *Acta Horticulturae*, 44, 209-212.
27. Menzel, W., Jelkmann, W. & 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, 81-92.
28. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
29. Panattoni, A., Luvisi, A. & Triolo, E. (2013). Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11, 173-188.
30. Paprstein, F., Sedlak, J., Polak, J., Svobodova, L., Hassan, M. & Bryxiova, M. (2008). Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 94, 347-352.
31. Paprstein, F., Sedlak, J., Svobodova, L., Polak, J. & Gadiou, S. (2013). Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance. *Horticultural Science* (Prague), 40, 186-190.
32. Posnette, A.F., Cropley, R. & Ellemberger, C. (1963). The effect of virus infection on the growth and crop of apple, pear and plum trees. *Phytopathologia Mediterranea*, 2, 158-161.
33. 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*. *Virology*, 76, 11003-11011.
34. Quoirin, M. & Lepoivre, P.H. (1977). Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. In: *Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes*, Sept., Gent, Belgium, *78*, pp. 437-442.
35. Rana, T., Chandel, l.V., Kumar, Y., Ram, R., Hallan, V. & Zaidi, A.A., (2010). Molecular variability analyses of *Apple chlorotic leaf spot virus* capsid protein. *BioScience*, 35, 605-615.
36. 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, 1214-1217.
37. 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. *Phytopathology*, 152, 622-629.
38. 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*, 1, 1-8.
39. 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*). *Molecular Cell Biology*, 18, 192-199.

40. 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 Organ Culture*, 99, 299-304.
41. 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 Organ Culture*, 101, 229-235.
42. 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, 423-431.
43. Valero, M., Ibanez, A. & Morte, A. (2003). Effects of high vine yard temperatures on the Grapevine leaf roll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. *Scientia Horticulturae*, 97, 289-296.
44. Verma, N., Ram, R. & Zaidi, A.A. (2005). *In vitro* production of *Prunus* necrotic ringspot virus-free begonias through chemo- and thermotherapy. *Scientia Horticulturae*, 103, 239-247.
45. 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. *Horticultural Science*, 41, 729-732.
46. Wang, Q.C. & Valkonen, J.P.T. (2008). Elimination of two viruses which interact synergistically from sweet potato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods*, 154, 135-145.
47. Wang, L.P., Hong, N., Matic, S., Myrta, A., Song, Y.S., Michelutti, R. & Wang, G.P. (2011). Pome fruit viruses at the Canadian clonal genebank and molecular characterization of apple chlorotic leaf spot virus isolates. *Scientia Horticulturae*, 130, 665-671.
48. Yaegashi, H., Isogai, M., Tajima, H., Sano, T. & Yoshikawa, N. (2007). Combinations of two amino acids (Ala40 and Phe75 or Ser40 and Tyr75) in the coat protein of Apple chlorotic leaf spot virus are crucial for infectivity. *Journal of General Virology*, 88, 2611-2618.