ارزیابی کشت مریستم ریشه در حذف برخی از ویروس‌ها از سیر رقم همدان

فهیمه قائمی‌زاده[۱]، فرشاد دشتی[۲*]، حسن ساریخانی[۲]، غلام خداکرمیان[۳]

۱-دانشجوی دکتری علوم باغبانی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان. ۲ - دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.۳- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

* نویسنده‌ی مسئول: Dashti1350@yahoo.com

چکیده

بیماری‌های ویروسی از دلایل کاهش عملکرد در گیاهانی با تکثیر غیرجنسی نظیر سیر (*Allium sativum*) می‌باشند. پوتی ویروس‌ها (نظیر ویروس زردپاکوتاهی پیاز) و الکسی ویروس‌ها از مهمترین ویروس‌های بیماری زا در سیر هستند. در این پژوهش ابتدا آلودگی سیر رقم همدان به ویروس زرد پاکوتاهی پیاز و الکسی‌ویروس‌ها با استفاده از روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. سپس ویروس زدایی با استفاده از کشت مریستم ریشه به طول ۱ میلی‌متر در محیط کشت MS مایع و جامد حاوی غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکرومولار نفتالین استیک اسید (NAA) و غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار بنزیل آدنین (BA) مورد بررسی قرار گرفتند. در انتها حذف ویروس‌ها با استفاده از روش RT-PCR بررسی شد. تکثیر قطعاتی به طول ۳۰۰ جفت‌باز برای ویروس زرد پاکوتاهی پیاز و ۱۸۰ جفت‌باز برای الکسی‌ویروس‌ها، آلودگی سیر رقم همدان را به ویروس‌های ذکر شده تایید کرد. بر اساس نتایج بدست آمده کشت مریستم ریشه روش موثری در تولید سیر عاری از ویروس می‌باشد. نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که تمام گیاهان باززایی شده از کشت مریستم ریشه در محیط کشت مایع و جامد از ویروس زرد پاکوتاهی پیاز و الکسی‌ویروس‌ها عاری شدند. بالاترین درصد باززایی در محیط کشت جامد(۶/۷ ٪) و مایع (۷۵٪) به ترتیب در ترکیب هورمونی ۱ میکرومولار NAA با ۱۰ میکرومولار BA و ۰/۵ میکرومولار NAA با ۱۰ میکرومولار BA مشاهده شد.

کلمات کلیدی: *Allium sativum*، الکسی ویروس‌ها، ویروس زرد پاکوتاهی پیاز، RT-PCR، مریستم ریشه

مقدمه

تکثیر غیرجنسی سیر منجر به تجمع ویروس‌ها در گیاه می‌شود. در میان ویروس‌های آلوده کننده سیر، ویروس زرد پاکوتاهی پیاز و الکسی‌ویروس‌ها با توجه به خسارت اقتصادی فراوان مورد توجه هستند. این ویروس‌ها عملکرد را بین ۳۲-۵۰ درصد کاهش می‌دهند (Cafrune et al., 2006 ; Lot et al., 1998).

استفاده از تکنیک کشت بافت می‌تواند مناسب‌ترین شیوه برای تولید مواد گیاهی گواهی شده جهت تکثیر باشد. کشت مریستم نوک شاخساره و گنبدهای مریستمی صفحه‌ی پایگاهی از روش‌های مناسب برای تولید سیر عاری از ویروس می‌باشند (Ayab &Sumi, 2001; Bhojwani et al, 1981). اما در همه روش‌های ذکر شده، راندمان کار پایین است. استفاده از مریستم نوک ریشه با توجه به بالا بودن تعداد ریشه در هر ریز نمونه، سهولت انجام تکنیک بدون نیاز به بینوکولر و قابلیت تولید گیاه عاری از ویروس راندمان بالاتری در ویروس زدایی دارد (Haque et al, 2006, 1997). شناسایی نمونه‌های آلوده به ویروس یک مرحله ضروری در تیمارهای عاری سازی می‌باشد. تکنیکRT-PCR یک روش موثر در شناسایی نمونه‌های آلوده بوده، و امکان ردیابی آلودگی در مقادیر اندک را با دقت بالا فراهم می‌کند (Robert et al., 1998).

نظر به اینکه شناسایی آلودگی ویروسی در برنامه‌های عاری سازی ضرورت دارد و تاکنون پژوهشی برای عاری سازی مبتنی بر کشت مریستم ریشه در ارتباط با الکسی‌ویروس‌ها و ویروس زردپاکوتاهی پیاز در سیر رقم همدان صورت نگرفته است، لذا انجام این پژوهش ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور برای تشخیص آلودگی در ارتباط با ویروس‌های ذکر شده در سیر رقم همدان از تکنیک RT-PCR و برای عاری سازی از کشت مریستم ریشه استفاده شد.

مواد روش‌ها

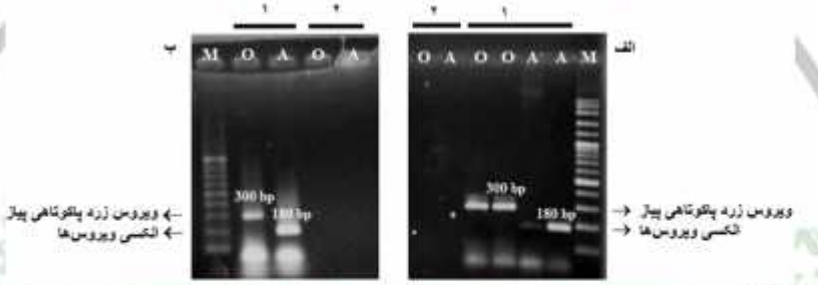
در این تحقیق استخراج RNA کل از نمونه‌های برگی و با استفاده از کیت RNX-plus (سینا کلون، ایران) انجام شد. سپس ساخت cDNA با استفاده پرایمر oligo d(T) و کیت 2step RT-PCR (سینا کلون، ایران) صورت گرفت. مخلوط واکنش PCR جهت شناسایی الکسی‌ویروس‌ها و ویروس زردپاکوتاهی پیاز به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر cDNA، ۴ میکرولیتر از Master Mix کیت 2stepRT-PCR (سینا کلون، ایران)، ۲ میکرولیتر از هر یک از آغازگر عمومی الکسی‌ویروس‌ها (N/RT1,N/RT2) و آغازگراختصاصی ویروس زردپاکوتاهی پیاز (ON/RT1,ON/RT2) تهیه شد. شرایط PCR با چرخه‌های دمایی به صورت ۳۰ سیکل به صورت ۴۵ ثانیه دمای ۹۲°c، ۳۰ ثانیه دمای ۵۰°c و ۴۵ثانیه دمای ۷۲°c انجام گردید. محصول PCRروی ژل آگارز ۱درصد به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۸۰، الکتروفورز شد. رنگ آمیزی ژل توسط اتیدیوم بروماید انجام و در زیر نور UV از ژل حاصل عکس گرفته شد (Ayab & Sumi, 2001). به منظور ویروس زدایی و جهت تولید ریشه، فلس‌های ضدعفونی شده شامل صفحه‌ی پایگاهی و بخشی از بافت ذخیره‌ای تهیه و از سمت صفحه پایگاهی بر روی محیط کشت پایه MSحاوی ۳ ٪ ساکارز و ۰/۸ آگار کشت شدند. ۱۴روز پس از تشکیل ریشه بر روی صفحه پایگاهی، ریشه‌های قوی که در انتها کرم مایل به قهوه‌ای روشن بودند جدا شدند. سپس مریستم ریشه به اندازه ۱ میلی‌متر جدا شد و در محیط کشت مناسب باززایی قرار گرفتند. برای تعیین بهترین شرایط باززایی از محیط کشت پایه MS به صورت جامد یا مایع به همراه هورمون‌های NAA (غلظت ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکرومولار) و BA (غلظت ۰، ۵، ۵/۷، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) حاوی ۳ ٪ ساکاروز استفاده شد. نمونه-های کشت شده در اتاقک رشد به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از کشت مریستم، نمونه‌ها هر روز مورد بررسی قرار گرفتند. به محض مشاهده‌ی جست‌های شاخساره ازنوک ریشه، شاخساره‌ها جدا شده و به منظور پرآوری به محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میکرومولار BA و ۰/۰۵ میکرومولار NAA منتقل شدند. درصد باززایی ریزنمونه‌ها با تقسیم تعداد نمونه‌هایی که شاخساره تولید کردند به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده محاسبه شد. در نهایت ارزیابی حذف ویروس زرد پاکوتاهی پیاز و الکسی‌ویروس‌ها درگیاهان باززایی شده با استفاده از روش RT-PCR انجام شد.

نتایج وبحث

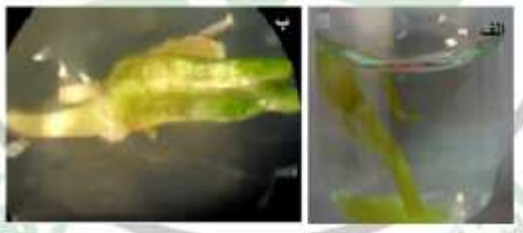
محصول PCR ، تکثیر قطعاتی به طول ۳۰۰ جفت‌باز برای ویروس زرد پاکوتاهی پیاز و ۱۸۰ جفت‌باز برای الکسی‌ویروس‌ها را نشان داد (شکل۱). نتیجه‌ی بدست آمده در این پژوهش با یافته‌های Ayab&Sumi (2001) مطابقت داشت. وجود نواحی تکثیر شده در نمونه‌های مورد مطالعه، آلودگی به ویروس‌های مذکور را تایید کرد. در محیط کشت جامد بالاترین درصد باززایی مستقیم (۶/۷٪) در ترکیب هورمونی ۱ میکرومولار NAA و ۱۰ میکرومولار BA مشاهده شد. در این ترکیب هورمونی، ۳۰ روزپس از کشت، شاخساره از نواحی پریموردیایی نوک ریشه خارج شد (شکل۲). این نتایج با یافته‌ی Haque و همکاران(1997) و Parvin و همکاران (2006) مطابقت داشت، با این تفاوت که درصد باززایی در پژوهش‌های نامبرده به ترتیب ۷۵ و ۶۳ درصد

گزارش شد. تفاوت‌های موجود در پژوهش حاضر با سایر پژوهش‌های صورت گرفته می‌تواند به علت تفاوت در واکنش رقم به ترکیبات محیط کشت و شرایط محیطی ریز نمونه باشد (Parvin, 2006).

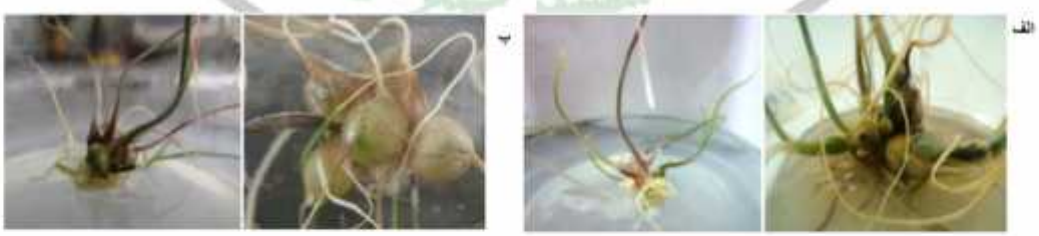
بالاترین درصد باززایی مستقیم (۷۵٪) در محیط کشت مایع در ترکیب هورمونی ۰/۵ میکرومولار NAA و ۱۰ میکرومولار BA مشاهده شد. شاخساره از نواحی پریموردیایی نوک ریشه ۲۰ روز پس از کشت خارج شد (شکل ۲). بر اساس نتایج بدست آمده درصد باززایی در محیط کشت مایع در مقایسه با محیط کشت جامد بیشتر بود. مزایای استفاده از محیط کشت مایع در افزایش باززایی در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است(Rathore et al.,2014; Kim et al., 2003). افزایش باززایی در محیط کشت مایع می‌تواند به علت افزایش قابلیت دسترسی ریز نمونه به جذب مواد غذایی و هورمون‌ها در محیط کشت می‌باشد (Kim et al., 2003). بر اساس نتایج بدست آمده از PCR، همه‌ی گیاهان حاصل از باززایی مستقیم پس از انتقال محیط کشت پرآوری (شکل ۳) عاری از ویروس زرد پاکوتاهی پیاز و الکسی‌ویروس‌ها بودند (شکل ۱). تطابق نتایج حاضر با یافته‌های Haqueو همکاران (2006)، قابلیت استفاده از مریستم ریشه برای تولید سیر عاری از ویروس در سیر رقم همدان را تایید کرد.



شکل ۱- نتایج حاصل PCR ژن پروتئین پوششی الکسی‌ویروس‌ها (A) و ویروس زرد پاکوتاهی پیاز (O) در گیاهان حاصل از باززایی مستقیم در (الف) محیط کشت مایع و (ب) محیط کشت جامد. چاهک ۱ کنترل مثبت و چاهک ۲ گیاه عاری از الکسی‌ویروس‌ها (A) و گیاه عاری از ویروس زرد پاکوتاهی پیاز (O)



شکل۲: تشکیل شاخساره حاصل از کشت مریستم ریشه در محیط کشت مایع (الف) و جامد (ب).



الف:گیاهان باززایی شده عاری از ویروس حاصل از کشت مریستم درمحیط کشت جامد (الف) و مایع (ب) پس از انتقال به محیط کشت پرآوری

منابع

1. Ayab, M. and Sumi, S. 2001. A novel and efficient tissue culture method -"stem–disc dome culture" for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Rep, 20:503-507.
2. Bhojwani, S.S., Cohen, D. and Fry, P.R. 1981. Production of virus–free garlic and field performance of micro propagation plants. Scientia Horticulture. 18:39-43.
3. Cafrune, E.E., Perotto, M.C. and Conci, V.C. 2006. Effect of two Allexivirus isolates on garlic yield. Plant Disease.90: 898–904.
4. Haque, M.S., Hattori, K., Suzuki, A. and Tsuneyoshi, T. 2006. An Efficient Novel Method of ...Producing Virus Free Plants from Garlic Root Meristem. Biotechnology and Sustainable .Agriculture 2006 and Beyond 2007. 2: 107-110
5. Haque, M.S., Wada,T. and Hattori,K. 1997. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 50: 83–89.
6. Lot, H., Chovelon, V., Souche, S. and Delecolle, B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant..Disease. 82: 1381–1385.
7. Robert, U. and Ravanikar, M. 1998. Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on.shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. Scientia Horticulture. 73:193-202.
8. Parvin, L. Al., Munsur, M. H. M. and Rosemila, U. 2007 "Effect of growth regulators and genotypes on in vitro regeneration of garlic (Allium sativum L.) from root tips". Journal of Bangladesh Arill University. 5(2): 239-243.
9. Kim, E.K., Hahn. E J., Murthy, H.N., & Paek, K.Y. 2003. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 73, 231–236.
10. Rathore, J. S., Rai, M. K., Phulwaria, M., & Shekhawat, N. S. 2014. A liquid culture system for improved micropropagation of mature Acacia nilotica (L.) Del. ssp. indica and ex vitro rooting. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. 84(1), 193-200.
11. Pierik, R. L. M .1987. "In vitro Culture of Higher Plants". Martinus Nijhoff Publishers. pp: 200.
12. Appiano, A. and D'Agostino, G. 1983. "Distribution of tomato bushy stunt virus in root tips of systemically infected (*Gomphrena globosa*)". Ultra Structure Research. 85(3), 239-248.

Evaluation of root meristem culture for elimination of some viruses from Garlic (cv. Hamedan)

F.Ghaemizadeh[1], F.Dashti[2*], H.Sarikhani[2], Gh.Khodakaramian[3]

1-PhD student of Horticultural science, Bu-Ali Sina University of Hamedan. 2-Associated professor, Dep. of Horticulture, Bu-Ali Sina University of Hamedan. 3- Professor, Dep. of Plant Protection, Bu-Ali Sina University of Hamedan.

*Corresponding Author: Dashti1350@yahoo.com

Abstract

Asexual propagation of garlic (*Allium sativum* L.) causes accumulation of viruses such as Allexiviruses and Putiviruses like Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV). In this study, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect garlic (cv. Hamedan) viruses. Then, the possibility of obtaining plant material free from these viruses through root meristems (1 mm) culture on solid and liquid MS medium containing 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8 µM NAA and 0, 5, 7.5, 10 and 20 µM BA . The presence of viruses in regenerated plants was also tested by RT-PCR after treatments. Amplified segment of 180 bp (for Allexiviruses) and 300bp (for OYDV) conformed infection of collected sample by mentioned viruses in garlic (cv. Hamedan). According to RT-PCR, all plants regenerated through root meristem culture on liquid and sold medium were virus free. The percentage of regeneration were 6.7 and 75 % in solid medium (supplemented with 1 µM NAA and 10µM BA) and liquid medium (supplemented with 0.5 µM NAA and 10µM BA)respectively.

Key words: *Allium sativum*, Allexiviruses, Onion yellow dwarf virus, RT-PCR, Root meristem