بررسی تاثیر گرما درمانی به منظور حذف ویروس تریستزا در پرتقال تامسون ناول (*Citrus sinensis*)

مالک قاسمی [1*]، مهسا هاشمی سجادی [2]، ولی ربیعی [3]، حسین طاهری [1]

۱- اعضای هیئت علمی موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر. ۲- کارشناس ارشد باغبانی. ۳- استادیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه زنجان.

نگارنده مسئول: مالک قاسمی malek_ghasemi@yahoo.com

چکیده

بیماری تریستزا یکی از مهمترین بیماریهای ویروسی مرکبات است که باعث خسارت فراوان در دنیا شده است. هم اکنون این بیماری در برخی از مناطق مرکبات کاری شمال کشور شایع می‌باشد. گرمادرمانی یکی از روش‌های مدیریت این بیماری است که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است، بدین منظور ۳۶ اصله نهال پرتقال رقم تامسون ناول پیوند شده بر روی پایه سیترنج جهت مطالعه تاثیر گرمادهی بر روی حذف این ویروس در فیتوترون قرار گرفتند. ابتدا نهال‌ها به صورت دستی و از طریق پیوند، آلوده شده و جهت اطمینان از آلودگی گیاهان تحت آزمون سرولوژیکی الایزا قرار گرفتند. به منظور آمادگی جهت قرار گرفتن در دماهای بالا، به مدت دو هفته در دمای ۳۰/۳۵ (روز / شب) پیش تیمار شدند و بعد از آن، تیمارها به صورت ۱۱ هفته در دمای ۳۰/۴۰، ۲ هفته در دمای ۳۲/۴۲ و در نهایت ۱۰ روز در دمای ۳۴/۴۴ ، اعمال گردیدند. پس از هر مرحله، آزمون الایزا صورت گرفت. در تیمار آخر، ۱۲ عدد از نهال‌ها خشک شدند و در ۲۵ درصد از گیاهان باقی مانده بعد از هر سه تیمار گرمایی و گذشت سه ماه از تیمار آخر، توسط آزمون الایزا، ایمونوپرینتینگ و تست گیاه محک آلودگی مشاهده نشد.

کلمات کلیدی : سالم سازی، آزمون سرولوژیکی الایزا، ایمونوپرینتینگ، تست گیاه محک، تریستزا

مقدمه

به لحاظ اقتصادی ویروس تریستزای مرکبات، مهم‌ترین عامل بیماریزای ویروسی در مرکبات بوده و در سطح جهان به عنوان یکی از مشکلات اصلی در تولید مرکبات قلمداد می‌شود (۷). همچنین ویروس تریستزا ممکن است در تعدادی از ارقام جنس سیتروس صرف‌نظر از آنکه روی چه پایه‌ای باشند، موجب فرورفتگی ساقه یا ساقه آبله‌ای[1] شده که افت شدید کیفیت و عملکرد میوه را به دنبال خواهد داشت. (۳). آلودگی درختان مرکبات مادری و پیوندک‌های حاصل از آنها به عوامل ویروسی و شبه ویروسی موجب کاهش عمر متوسط و حتی مرگ و زوال درختان، افت عملکرد، کاهش اندازه و تعداد میوه شده و مشکلاتی را در زمینه دریافت مواد غذایی و گرفتن پیوند ایجاد کرده و در نهایت درخت را مستعد انواع تنش های محیطی می کند (۹). گرمادرمانی به‌عنوان یکی از روش‌های مدیریت بیماریهای ویروسی در مرکبات شناخته شده است و به صورت موفقیت آمیزی توسط محققین مختلف به منظور حذف عوامل ویروسی و تشکیل کلون‌های سالم به کار رفته است (۴، ۷، ۱۱). این روش برای اولین بار به‌طور موفقیت آمیزی توسط گرنت(۵) جهت حذف ویروس تریستزا و پسوروز از پیوندک مرکبات به‌کار گرفته شد. آزمایشات انجام شده بر روی ویروس‌ها و گیاهان میزبان نشان می‌دهد هنگامی که گیاهان تحت دمای بالا قرار داده می‌شوند (گرمادرمانی)، غلظت ویروس کاهش می‌یابد (۱۰) . فرضیات مختلفی برای این پدیده ذکر می‌شود. یکی از این فرضیات موسوم به نظریه "پروتیین های شوک گرمایی" چنین گفته می شود که در دماهای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد که برای سنتز غالب پروتیین‌های موجود گیاهی بازدارنده می‌باشد، سنتز یک‌سری از پروتیین های جدید آغاز می شود و این پروتیین های جدید موجب کاهش غلظت آران ای ویروس می شوند (۱) در تحقیق حاضر امکان تولید پیوندک‌های عاری از ویروس تریستزا از نهال‌های آلوده به ویروس به کمک گرمادرمانی در اتاقک با دمای کنترل شده (فیتوترون) بررسی شده است.

[1] *Stem pitting*

مواد و روشها

۳۶ اصله نهال پرتقال رقم تامسون ناول[1] پیوند شده بر روی پایه نارنج [2] به صورت دستی و از طریق پیوند، آلوده شده و جهت اطمینان از آلودگی مورد تست الایزا قرار گرفتند، سپس جهت تیمار گرمادرمانی به فیتوترون موسسه تحقیقات مرکبات رامسر انتقال داده شدند. گیاهان مربوط به هر تیمار دمایی، به طور جداگانه تحت شرایط گرم قرار گرفتند. برای هر تیمار ۱۲ اصله نهال در نظر گرفته شد.در این تحقیق مراحل گرمادرمانی شامل یک مرحله پیش تیمار (دمای ۳۰/۳۵ (روز – شب)، به مدت دو هفته) و سه مرحله تیمار هوای گرم: ۳۰/۴۰ ،۳۲/۴۲ و ۳۴/۴۴ (روز – شب)، به ترتیب طی سه بازه زمانی: ۱۱ هفته، ۲ هفته و ۱۰ روز می‌باشد. جهت اطمینان از نتایج حاصله از مراحل فوق، گیاهان به مدت ۳ ماه در دمای ۲۰/۲۲ درجه سانتیگراد (که برای تکثیر ویروس مطلوب می باشد)، قرار گرفتند. بعد از به پایان رسیدن هر تیمار دمایی، گیاهان جهت بررسی وضعیت غلظت ویروس در مقایسه با دو نمونه شاهد آلوده و سالم، مورد آزمون سرولوژیکی الایزا قرار گرفتند. در این آزمون از کیت الایزا ساخت شرکت بیوربا[3] استفاده شد. نتایج مراحل آزمون توسط دستگاه الایزا ریدر[4] در دو طول موج ۴۰۵ و ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. در انتهای مراحل گرمادرمانی، از نمونه های برگی از چهار جانب نهال های داخل فیتوترون گرفته و دمبرگ ها به کمک تیغ تیز برش عرضی داده شدند و بلافاصله روی کاغذ های نیتروسلولزی لکه گذاری انجام شد. در خانه های ترسیم شده روی کاغذ نیتروسلولز، هر دو خانه متعلق به یک نهال و در هر خانه ۳ الی ۴ لکه ایجاد شد. از لایم بذری و آلوده به ترتیب به عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده گردید. سپس غشاهای نیتروسلولزی جهت تثبیت ویروس در معرض محلول ۱٪ آلبومین بووین[5] قرار گرفته و بعد از سه بار شستشو، در غلظت مشخص آنتی بادی نشاندار غوطه ور شدند و مجددا شسته شدند. بعد از مدت کوتاهی از اضافه کردن محلول سوبسترا[6]، رنگ بنفش در لکه های مربوط به کنترل مثبت و نمونه های آلوده دیده شد در حالیکه کنترل منفی و نمونه های سالم بدون تغییر رنگ باقی ماندند.. دلیل انجام این آزمون مقایسه نتایج آن با نتایج آزمون الایزا بود از آنجا که این روش نسبت به روش الیزا سریع‌تر و ارزان‌تر است .در صورتی که نتایج آن با روش الایزا منطبق باشد قابل توصیه است. در تست نبات محک بعد از گذشت سه ماه از تیمار آخر انجام شد و نبات محک مورد استفاده مکزیکن لایم[7] و اجرای پیوند به صورت تی معکوس بود.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج آزمون الایزا ، ملاحظه شد که رژیم حرارتی۳۲/۴۲ (روز/ شب) نسبت به دمای۳۰/۴۰ و ۳۴/۴۴، دمای مناسب‌تری جهت گرمادرمانی می‌باشد چرا که در کنار حفظ ساختار پروتئینی نهال‌ها، در تعداد بیشتری از گیاهان غلظت ویروس کاهش یافته است (۹۱ درصد) ولی ویروس‌ها به طور کامل از بین نرفته و پس از چند ماه مجددا تیتر آن‌ها افزایش یافته است در دمای ۳۴/۴۴ علاوه بر خشک شدن تعدادی از نمونه‌ها که می‌تواند به علت تاثیر روی آنزیم ها باشد با افزایش تیتر ویروس نیز روبرو هستیم (تنها در ۶۲/۵ درصد از نمونه ها تیتر ویروس کاهش یافته است). همچنین ملاحظه می‌شود که بعد از گذشت سه ماه و قرار گیری نهال ها در دمای ۲۲ / ۲۰ (دمای مناسب جهت تکثیر ویروس)، تنها در ۲۵ درصد از گیاهان باقی مانده، توسط آزمون الایزا، ایمونوپرینتینگ و تست گیاه محک آلودگی مشاهده نشد. در این پژوهش، به منظور بالا بردن مقاومت گیاهان به دماهای بالاتر تمام نهال ها به مدت ۲ هفته در دمای ۳۰/۳۵ (روز / شب) قرار داده شدند، در تحقیقات مشابه وجود پیش تیمار قبل از اعمال تیمارهای گرمایی ضروری نشان داده شده است (۱ و۲۱). همچنین در این تحقیق دمای ۴۲ / ۳۲ (روز / شب) جهت غیر فعال نمودن ویروس

[1] *Citrus sinensis*
[2] *Citrus urantium*
[3] BIOREBA
[4] Medispec ESR 200 Elisa plate Reader
[5] Albumin Buvin
[6] BCIP-NBT
[7] *Citrus aurantifolia L.*

تریستزا مناسب تشخیص داده شد و این در حالی است که در آزمایشات مشابه دمای نهایی ۵۰ / ۴۰ درجه سانتی‌گراد (روز / شب) به مدت یک هفته به دنبال انجام پیش‌تیمار دمایی صددر صد سالم سازی را گزارش کرده‌اند (۱)، دمای ۴۰ / ۳۰ درجه سانتی گراد (روز / شب) به مدت ۸ هفته (۷)، دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۷ هفته (۱۲) و دمای ۳۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ هفته (۲۶) به میزان صفر تا ۵۰ درصد در غیر فعال نمودن این ویروس کارآمد گزارش شده‌اند. به‌دلیل وجود گزارش‌های متفاوت و گاهی متناقض در این تحقیق سعی کردیم ترکیبی از گزارش‌های محققان دیگر را اعمال نماییم تا به ترکیب دمایی مناسبتر برسیم. علت این تفاوت در نتایج به دست آمده می تواند به خاطر بررسی ارقام مختلف از گونه پرتقال و یا پایه های به کار رفته باشد زیرا تحمل ارقام و پایه‌ها مختلف متفاوت است. در نهایت از آنجا که گرمادرمانی زمینه مناسبی را در جهت کاهش غلظت ویروس فراهم می کند (حتی اگر به طور کامل منجر به حذف ویروس نگردد)، می توان از آن در کنار پیوند نوک شاخساره (STG) و بالا بردن ضریب اطمینان از حذف ویروس، استفاده نمود. همچنین از آنجا که در میان روشهای تشخیص ویروس، فنون مولکولی از محدوده ردیابی بسیار دقیق تری نسبت به فنون سرولوژیکی برخوردارند (۱۰ الی ۱۰۰ برابر دقیق ترند)(۵ و ۱۷)، توصیه می‌شود در بررسی نتایج آزمون‌های گرمادرمانی و سایر روشهای سالم‌سازی، از روش‌های تشخیص مولکولی استفاده گردد.

نتیجه گیری کلی

گرمادرمانی به عنوان یکی از روش‌های سالم سازی نهال‌های مرکبات مطرح می‌باشد که بسته به نوع گونه گیاهی و ویروس آلوده کننده، می‌تواند به تنهایی یا در کنار پیوند نوک شاخساره (STG) منجر به تولید نهال سالم گردد. تفاوت در نتایج پژوهش‌های سایرین با یک‌دیگر و نتایج این تحقیق بیانگر ضرورت انتخاب ارقام و پایه‌های متحمل به گرما می‌باشد. کم بودن درصد نمونه‌های سالم سازی شده بیانگر تفاوت در تیتر اولیه ویروس و یا عدم کارایی این روش در حذف ویروس به تنهایی بوده و ضرورت استفاده از روش‌های ترکیب روش گرمادرمانی و پیوند نوک شاخه میباشد

منابع مورد استفاده

1)Arif, M., Ibrahim, M., Ahmad, A and Hassan, SH. 2005. Elimination of citrus tristeza closterovirus from citrus bud-wood through thermotherapy. *Pakistan Journal of Botany*., 37(2): 423-430.

7) Calavan, E.C., Roistacher, C.N. and Nauer, E.M. 1972. Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. *Plant Disease. Report*. 56: 976-978.

3) Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquin, C., Roman, M.P., Olmos, A., Martinez, M.C., Hermoso de Mendoza, A., Lopez, A. and Navarro, L. 2000a . Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the valencian community of Spain. *Virus Research* 71: 85-95.

4) Gonsalves, D., Purcifull, D.E. and Garnsey, S.M. 1978. Purification and Serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 68: 553-559.

5) Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gump, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M. and Dawson, W.O. 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511-520.

16) Lee, R.F, and Bar-Joseph, M. 2000. Tristeza. In: Compendium of Citrus Diseases, 2nd edn (Ed.Timmer LW, Garnsey SM and Graham JH), pp. 61-63. APS Press, St Paul (US).

7) Matthews, R.E.F.(cd.), 1993. Diagnosis of plant virus diseases. CRC Press, Boca Raton, Florida, 374 pp.

8)Quak, F. 1977. Meristem culture and virus-free plants. In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cells, tissue, and organ culture. Springer, Berlin. pp. 598–615.

9) Roistacher, C.N. and Bar-Joseph, M. 1984. Transmission of tristeza seedling yellow tristeza virus by Aphis gossypii from sweet orange, grapefruit, and lemon to mexican lime, grape fruit, and lemon. Pp. 9-18. In: (Eds.): S.M. Garnsey and L. W. Timmer, IOCV, Riverside, CA.

10) Roistacher, C.N. and Calavan, E.C. 1974a. Heat tolerance of preconditioned citrus bud-wood for virus inactivation. In: Proceding. 5th Confrence. Internationa. Organ. Citrus Virol. 256-261. (Ed.): W.C. Price. University of Florida Press, Gainesville.

11) Roistacher, C.N. and Calavan, E.C. 1974b. Inactivation of five citrus viruses in plants held at warm glass house temperatures. *Plant Disease. Report*. 58: 850-853.

The Effect of thermotherapy on Elimination of Citrus Tristisa Virus in thomson navel orange (*Citrus sinensis*)

Malek Ghasemi[1], Mahsa Hashemi Sajadi[2], Vali Rabiei[3]
1- Scientific mission members of Citrus Research Institute of Iran, Ramsar
2- graduate and Assistant Professor of Zanjan University, Agriculture faculty

Abstract

Tristeza is one of the most important and devastating citrus viral disease in the world. There are many infected citrus planting areas in Iran. Thermotherapy is one of the tristeza management methods that was used in this study. Thus 12 thomson navel orange scions on soure orange rootstocks were placed in temperature controlled chamber (TCC) to investigate the effect of thermotherapy on elimination of Tristeza virus. At first, the scions were inoculated by grafting of infected buds and after six months tested by ELISA to ensurecontamination. Plants were placed in temperature of 35/30 0C (days/night) for two weeks (pre conditioning). Then they were incubated at higher temperatures including: 40/30, 42/32, 44/340C for eleven weeks, two weeks and 10 days, respectively. In the last temperature, four plants dried and in 25 percent of the remaining plants, there was not verified any infected by ELISA, Direct Tissue Blot Immunoassay and indicator plant tests after three months from the last experiment.

Keywords: Sanitation, ELISA serological test, Immunoprinting, Indicator plant test, Tristeza