کاربرد تکنیک تغییر یافته ریز پیوندی نوک شاخساره پس از ارزیابی سریع وضعیت سلامت شش بیوتیپ منتخب مرکبات نسبت به بیماری های مهم ویروسی و شبه ویروسی

سیدکریم رضای منتظری [۱]، مالک قاسمی [۲*]، سید مهدی بنی هاشمیان [۲]، مهسا هاشمی سجادی [۳]، فرهاد رفعت [۲]، مصطفی عبادی [۴]
۱و۴- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد واحد دامغان. ۲- اعضاء هیئت علمی و استادیار موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر. ۳- کارشناس ارشد علوم باغبانی. ۴- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات مرکبات کشور.
نویسنده مسئول:مالک قاسمی(malek_ghasemi@yahoo.com).

چکیده

به دلیل گسترش فراوان بیماری های ویروسی و شبه ویروسی، فعالیت ناقلین و بهره برداری غیراصولی، امکان آلودگی ژنوتیپ های مختلف مرکبات متصور است. در این بررسی ابتدا ارزیابی سریع وضعیت سلامت شش بیوتیپ منتخب مرکبات نسبت به بیماری های مهم ویروسی و شبه ویروسی مرکبات شامل بیماری‌های تریستزا، استابورن و بیماری‌های ناشی از ویروئیدهای مرکبات با استفاده از تکنیک‌های سرولوژیکی و روش‌های مبتنی بر PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد ژنوتیپ های E, C, A و F، آلوده به ویروئیدهای اگزوکورتیس مرکبات (Citrus exocortis viroid, CEVd)، کوتولگی رازک (Hop stunt viroid, HSVd)، تاخوردگی برگ مرکبات (Citrus bent leaf viroid, CBLVd) و کوتولگی مرکبات (Citrus dwarfing viroid, CDVd) و ژنوتیپ های B و D عاری از آلودگی به ویروئید های ذکر شده تشخیص داده شدند. در ضمن عوامل بیماری های تریستزا و استابورن در تمامی ژنوتیپ ها ردیابی نشد. سپس جهت تولید گیاهان عاری از بیماری پیوند نوک شاخه با روش تغییر یافته ناوارو و همکاران(۱۹۷۵) انجام شد. در ابتدا قلمه هایی از بیوتیپهای طبیعی پرتقال‌خونی تهیه و درون لوله‌های آزمایش حاوی پرلیت استریل کشت گردیدند. پس از ظهور شاخساره‌ها نوک شاخه حاوی مریستم و دو برگ اولیه به اندازه ۰/۲ تا ۰/۴ میلیمتر جدا شدند. این پیوندکها بر روی دو پایه سیترنج و سیترومیلو با دو روش تی واژگون و برش مثاثی پیوند شدند. این آزمایش در قالب آزمایشات فاکتوریل و طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار و ۱۰ واحد آزمایشی در هر تکرار انجام گردید. در آزمایش پیوند نوک شاخه پیوند مثلثی موفقتر بود ولی بین پایه‌ها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت.

کلمات کلیدی: ریز پیوندی، تریستزا، الیزا،ویروئید، ، PCR

مقدمه

بیماری‌های ویروسی و شبه‌ویروسی در مرکبات بسیار حائز اهمیت است و خسارت فراوان کمی و کیفی محصول را سبب می شوند. وجه مشترک همه این بیماری ها، قابلیت انتقال از طریق پیوند است. علاوه بر نقش انسان در جابجایی مواد گیاهی آلوده ، این بیماری ها ممکن است با ناقلین یا ابزار آلوده نیز منتقل شوند. از آنجا که در مناطق مریستمی نوک شاخه آوند وجود ندارد انتقال بیماری‌های آوندی با پیوند نوک شاخه میسر نیست. ناوارو (۱۹۷۶). روش استاندارد تشخیص بیماری های ویروسی و شبه ویروسی مرکبات در گیاهان مادری پیوندک بر کاربرد توام گیاهان محک و تکنیک های سریع سرولوژیکی و مولکولی استوار است (Duran-Vila, et a., 1993). با وجودی که استفاده از گیاهان محک به منظور افزایش تیتر ویروئید و بهبود کارایی روش تشخیص صورت می‌گیرد، ولی طول دوره تشخیص با این روش افزایش می‌یابد. اطلاع از وضعیت سلامت ارقام قبل و بعد از ورود به مراحل سالم‌سازی، کارایی و صحت انجام این مراحل را مورد تایید قرار می‌دهد. تکنیک‌های مختلف ارزیابی سریع سلامت ارقام به این منظور استفاده شده است (Murcia et al., 2009, Roistacher, 1991، بنی هاشمیان ۱۳۹۰). ویروئیدها با داشتن اسید نوکلئیک از نوع RNA تک رشته ای و بدون پوشش پروتئینی، ریز ترین عوامل بیماریزای گیاهی به حساب می آیند. مرکبات میزبان چندین گونه ویروئید شامل (Citrus

(Citrus dwarfing viroid) CDVd،(Citrus bent leaf viroid) CBLVd ،(Hop stunt viroid) HSVd ،exocortis viroid) CEVd، (Citrus bark cracking viroid) CBCVd)، (Citrus viroid-V) CVd-V و (Citrus viroid-VI) CVd-VI است. بیماری های اگزوکورتیس و کاککسیای مرکبات، دو بیماری مهم این محصول به ترتیب به وسیله ویروئیدهای CEVd و HSVd ایجاد می شوند. علایم بیماری های ناشی از ویروئیدها تنها در میزبان های حساس بروز می کند و در بسیاری از ارقام تجاری مرکبات با وجود آلودگی علائمی ظاهر نمی شود. روش معمول ریزپیوندی در سال ۱۹۷۵ توسط ناوارو و همکارانش توضیح داده شدکه شامل پنج مرحله می‌باشد: آماده‌سازی پایه، آماده‌سازی پیوندک، پیوند، کشت گیاهان پیوندی در درون لوله آزمایشگاهی و انتقال به خاک. سانتوز[1] (۱۹۸۴)، روش معمول بدست آوردن گیاهان عاری از ویروس را ساده نمود. آنها گیاهچه‌های ریزپیوندی شده را بلافاصله بدون انتقال به محیط مایع و نگهداری در اتاقک رشد، روی پایه‌های یک ماهه پیوند زدند. پایه‌های پیوندی را به کمک پوشش‌های پلاستیکی پوشانده و در شرایط گلخانه نگهداری نمودند. میزان زنده‌مانی گیاهان در این روش ۸۰ درصد برآورد شد و این در حالی است که مرحله سازگاری گیاهچه و انتقال آن از محیط مایع به خاک، حذف گردید. در سال ۱۹۹۱، زونگ[2] و همکارانش نیز پنج مرحله معمول ریزپیوندی را به سه مرحله شامل: کشت بذور در محیط خاکی مخصوص برای تولید پایه، ریزپیوندی و انتقال گیاهان تبدیل نمودند.استرانتینو[3] (۱۹۹۲).

مواد و روشها

آزمون سرولوژیکی بر اساس روش ترویجی و همکاران، ۱۳۹۰، استخراج DNA برای آزمون عامل استابورن به روش CTAB (Zhang et al., 1998) و PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام گردید. آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) دو مرحله ای با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروئیدهای CEVd، HSVd، CBLVd و CDVd بر اساس روش توصیف شده توسط (Bernad & Duran- Vila, 2006) ولی با استفاده از کیت Revert Aid kit (Fermentase) انجام شد. در آزمایش پیوند نوک شاخه، بذرها از هر دو پوست خارج و با محلول‌های ۱۵ درصد هیپوکلریت سدیم تجاری همراه با توین ۲۰، ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل صورت گرفت. سپس درمحیط کشت موراشی و اسکوگ، که با ۱ درصد آگار جامد شده بودند، کاشته شدند و تمامی کشت‌ها به مدت دو هفته در شرایط تاریک درون آون با دمای ثابت ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا نمونه‌ها اتیوله شوند. پیوندک مورد نیاز از نهال بیوتیپ های پرتقال خونی آلوده که در داخل گلخانه نگهداری می‌شوند تامین گردید. در ابتدا قلمه هایی از آنها تهیه و درون ظرف‌های حاوی پرلیت استریل کشت گردیدند. لوله ها درون اطاقک رشد قرار گرفتند . پس از ظهور شاخساره‌ها نوک شاخه حاوی مریستم و دو برگ اولیه به اندازه ۰/۲ تا ۰/۴ میلیمتر جدا شدند. این پیوندک‌ها بر روی دو پایه سیترنج و سیترواملو با دو روش تی واژگون و برش مثاثی پیوند شدند. گیاهان پیوندی در اطاقک رشد قرار گرفتند. در صورت موفقیت پیوند گیاهچه‌ها به خاک مناسب منتقل شدند. پیوندک‌ها پس از شستشوی اولیه با آب و مایع شوینده با محلول‌های ۵ درصد هیپوکلریت سدیم تجاری و توین ۲۰، ۰/۱ درصد به مدت‌های ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند سپس سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل صورت گرفت. بعد از گیرایی پیوند، زمانی که پیوندک دارای دو برگ توسعه یافته بود به ترکیب خاکی مناسب منتقل شدند. جهت بررسی آلودگی گیاهان حاصله از ریزپیوندی از آزمون های ذکر شده در فوق استفاده شد. این آزمایش در قالب آزمایشات فاکتوریل و طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار و ۱۰ واحد آزمایشی در هر تکرار انجام گردید.

[1] Santos
[2] Zhong
[3] Starrantino

نتایج

ژنوتیپ های E, C, A و F از بین شش ژنوتیپ مورد بررسی، آلوده به ویروئیدهای اگزوکورتیس مرکبات (Citrus exocortis viroid, CEVd)، کوتولگی رازک (Hop stunt viroid, HSVd)، تاخوردگی برگ مرکبات (Citrus bent leaf viroid, CBLVd) و کوتولگی مرکبات (Citrus dwarfing viroid, CDVd) و ژنوتیپ های B و D عاری از آلودگی به ویروئید های ذکر شده تشخیص داده شدند. در ضمن عوامل بیماری های تریستزا و استابورن در تمامی ژنوتیپ ها ردیابی نشد. همچنین نتایج آزمایش پیوند نوک شاخه نشان داد پیوند مثلثی موفقتر بود ولی بین پایه ها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت.

Application of the modified STG technique after Sanitary Assessment of six selected Citrus Genotypes for the important virus and virus-like Diseases

Seyed Karim reza montazery[1],Malek Ghasemi[2], Seyed Mehdi Banihashemian[2], Mahsa Hashemi Sajadi[3] Farhad Rafat[2] & Mostafa Ebadi[4]

1 &4- Postgraduate and Assistant Professor of damghan Azad University, Agriculture faculty

2- Scientific staff member of Citrus Research Institute of Iran,Ramsar.(malek_ghasemi@yahoo.com)

3-M.s of Horticulture Science

Abstract

Due to spread of virus and virus-like diseases and their vectors, there is the possibility of infection of different citrus genotypes. Rapid assessment of the sanitary status of six selected citrus genotypes was assessed for the important virus and virus-like diseases including tristeza, stubborn and viroid diseases using serological techniques and PCR-based methods. The results showed infection of A, C, E and F genotypes to Citrus exocortis viroid (CEVd), Hop stunt viroid (HSVd), Citrus bent leaf viroid (CBLVd) and Citrus dwarfing viroid (CDVd). B and D genotypes were free of viroids. Also the agents of Tristeza and Stubborn diseases were not detected in all six genotypes. A modified Shoot-tip grafting (STG) method was used to produce disease-free plants. Firstly, cuttings of the genotypes were grown in the test tubes containing sterile perlite.The 2/0 to 4/0 mm aparted tip meristems from the genotypes was placed on the rootstocks using two inverted T and triangle grafting methods. The experiment was done in a completely randomized design with four replications. The triangle grafting method showed better results than the other method. There was no significant difference between rootstocks.

Keywords: Shoot-tip grafting (STG) , Citrus tristeza virus (CTV) , ELISA , Viroid, PCR

منابع

بنی‌هاشمیان،س.م.، طاهری،ح، محمدعلیان،ی، بووه،ج.م، دوران‌ویلا،ن. ۱۳۸۹. بررسی اجمالی آلودگی ویروئیدی برخی ارقام مرکبات موجود کشور. نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۱۲-۹ مرداد، تهران. صفحه ۶۶۲.

بنی هاشمیان ، س، م .، طاهری، ح .، محمد علیان، ی. و دوران ویلا، ن. ۱۳۹۰. کاربرد روش نوین هیبریداسیون با قابلیت تشخیص مستقیم ویروئیدهای مرکبات در نمونه های باغات مرکبات شمال و جنوب کشور. اولین کنگره ملی علوم و فناوریهای نوین کشاورزی. ۲۱-۱۹ شهریور، زنجان. صفحات ۱-۴.

ترویجی، م. ۱۳۹۱. تعیین پراکنش ویروس تریستزای مرکبات با روش های سرولوژیکی، بیولوژیکی و مولکولی در غرب استان مازندران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان.

Bernad, L. and N. Duran-Vila. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. Molecular and Cellular Probes 20:105-113.

Duran – Vila, N.,J. A. Pina and L. Navarro. 1993. Improved indexing of citrus viroids. Pages 202-211 in: Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol. Twelfth Conference of International Organization of Citrus Virologists Riverside, CA.

Murcia, N., P. Serra,A. Olmos and N. Duran- Vila. 2009. A novel hybridization approach of detection of citrus viroids. Molecular and Cellular Probes. 23: 25-102.

Navarro, L. 1976. The citrus variety improvement program in Spain. In: Calavan E.C. (ed.) Proceedings of the 7th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, California, pp. 198-202.

Roistacher, C. N. 1991. Graft-transmissible disease of citrus. Hand book for detection and diagnosis. FAO publication. 286 pp.
Santos, F.H.P. 1984. Modified micrografting procedure in citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 327-329.
Starrantino, A. 1992. In vitro micrografting of citrus. Rev. Plant Pathology 72(3): 184.
Zhang, Y., Uyemoto, j. k., Kirkpatrick, B. C., 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay.J. virol. Methods 71:45-50.
Zhong, Q.S., Shu, G.P. and Song, S.H. 1991. The modification of the citrus shoot-tip grafting technique. China Citrus 20(2): 11-13.