بسم الله الرحمن الرحيم

نوع نشریه: دستورالعمل فنی
نام نشریه: دستورالعمل سالم‌سازی و تکثیر ارقام هلو با هدف تولید هسته اولیه عاری از ویروس
نویسنده: دکتر رضا ضرغامی
ویراستار علمی: دکتر مهران عنایتی‌شریعت‌پناهی
ویراستاران ادبی: دکتر حسن رهنما و عصمت جعفری‌نژاد
طراحی: محمد جداری
تهیه شده در: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
شمارگان: ۳۰
نوبت انتشار: اول
سال انتشار: ۱۳۹۹
مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۵۸۱۸۸ به تاریخ ۱۳۹۹/۰۶/۲۰ است

# سالم‌سازی و تکثیر ارقام هلو با هدف تولید هسته اولیه عاری از ویروس

دکتر رضا ضرغامی

فهرست مطالب

چکیده ..... ۱
کلمات کلیدی ..... ۱
مقدمه ..... ۱
بررسی منابع ..... ۲
مراحل پروتکل تکثیر هلو ..... ۳
ماده گیاهی، روش ضدعفونی و ساخت محیط کشت ..... ۳
مواد تشکیل دهنده محیط کشت ..... ۳
تهیه محلول عناصر پرمصرف و کم‌مصرف ..... ۴
ویتامین‌ها ..... ۵
هورمون‌ها ..... ۵
ساخت محیط کشت ..... ۶
مراحل کلی عاری از ویروس‌سازی هلو ..... ۷
جمع‌آوری نمونه‌های برگی ..... ۸
ردیابی ویروسی با استفاده از تست الیزا ..... ۸
مراحل استقرار و شاخه‌زایی نمونه‌ها ..... ۱۰
ترموتراپی ..... ۱۰
مرحله مریستم‌برداری ..... ۱۱
مرحله تولید شاخه و تکثیر آن‌ها ..... ۱۲
RT-PCR شاخه‌های تکثیر شده ..... ۱۳
مرحله ریشه‌زایی ..... ۱۴
مرحله سازگاری یا انتقال از شرایط *in vivo* ..... ۱۵
مرحله انتقال به گلخانه ..... ۱۵
نتیجه‌گیری ..... ۱۶
سپاس‌گزاری ..... ۱۶
فهرست منابع ..... ۱۷

## • چکیده

از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی در جنس پرونوس PPV (ویروس آبله آلو) و PNRSV (ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران) می‌باشند که به شدت نابودکننده و باعث کاهش شدید کیفیت میوه‌ها و همچنین ریزش میوه‌های نارس می‌شود. این بیماری به عنوان یکی از عوامل مهم محدودکننده تولید هلو در کشور مطرح می‌باشد. یکی از روش‌های مؤثر برای غلبه بر این مشکل تولید و تامین مواد گیاهی سالم و عاری از ویروس به عنوان هسته اولیه ارقام مهم هلو و ایجاد باغ‌های مادری از این مواد و نهایتاً تامین مواد گیاهی سالم مورد نیاز باغ‌های هلو است. تولید گیاهان عاری از ویروس برای کنترل بیماری‌های ویروسی، وارد کردن ارقام جدید از کشورهای دیگر، مبادله مواد اصلاح شده بین کشورها یا مناطق داخل کشور و حفظ ژرم‌پلاسم گیاهی ضروری است. با دانش امروزی، تکنیک کشت بافت تنها روش موثر برای حذف ویروس است. روش مبتنی بر ترموتراپی در شرایط درون‌شیشه‌ای از جمله ترکیب ترموتراپی با کشت مریستم برای حذف موثر ویروس‌های مختلف هلو با موفقیت انجام شده است. در این دستورالعمل نسبت به چگونگی سالم‌سازی ارقام هلو از طریق ترموتراپی همراه با کشت مریستم و ایجاد و تکثیر هسته اولیه اقدام می‌شود.



• **کلمات کلیدی:** ترموتراپی، کشت مریستم، عاری از ویروس‌سازی، هلو، RT-PCR


## • مقدمه

بیماری‌های ویروسی باعث خسارت‌های زیادی در عملکرد محصول می‌شوند و برای مدت طولانی محدودیتی برای توسعه پایدار تولید کشاورزی بوده‌اند (Hadidi *et al*., 2011; Barba *et al*., 2015). به عنوان مثال، ویروس آبله آلو (PPV)، یکی از جدی‌ترین بیماری‌های ویروسی است که به درختان میوه جنس Prunus حمله می‌کند، که تقریباً در تمام کشورهای تولیدکننده میوه هسته‌دار، شایع است. کاهش عملکرد سالانه ناشی از آلودگی این ویروس به میزان ۱/۵ میلیون تن برای آلو و ۰/۶ میلیون تن برای زردآلو، تقریباً به ارزش ۵۴۰۰ و ۳۶۰۰ میلیون یورو برای سال‌های قبل و اخیر در اروپا بوده است (Scorza *et al*., 2015). به طوری که تا سال ۲۰۱۳، بیش از ۳۳ میلیون یورو در پروژه‌های تحقیقاتی برای کنترلPPV در اروپا سرمایه‌گذاری شده است (Wang *et al*., 2018). تولید گیاهان عاری از ویروس برای کنترل بیماری‌های ویروسی، وارد کردن ارقام جدید از کشورهای دیگر، مبادله مواد اصلاح شده بین کشورها یا مناطق و حفظ ژرم‌پلاسم گیاهی ضروری است. تکنیک‌های درون‌شیشه‌ای (*in vitro*) موثرترین روش‌ها را برای حذف

ویروس ارایه می‌دهد. روش‌های مبتنی بر ترموتراپی *in vitro* از جمله ترکیب ترموتراپی با کشت مریستم، شیمی‌درمانی، ریزپیوندی یا سرمادرمانی کشت مریستم، تقریباً برای حذف موثر ویروس‌های مختلف تمام محصولات مهم اقتصادی با موفقیت انجام شده است (Wang *et al*., 2016).

## • بررسی منابع

هلو با نام علمی (*Prunus persica*) یکی از مهم‌ترین درختان میوه در سراسر جهان است. بیماری‌های ویروسی به ویژه ویروس آبله آلو (PPV) و ویروس لکه حلقوی بافت مرده هسته‌داران (PNRSV) عامل ایجاد خسارات جدی در اغلب میوه‌های هسته‌دار از جمله هلو و شلیل هستند. ویروس‌ها اساسی‌ترین مشکل در تولید محصولات کشاورزی هستند که از نسلی به نسل دیگر منتقل شده و کیفیت محصول را کاهش می‌دهند. دو ویروس PPV[1] و PNRSV[2] مهم‌ترین ویروس‌های شناخته شده در هلو و از مخرب‌ترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار می‌باشند که باعث کاهش شدید کیفیت میوه‌ها و ریزش میوه‌های نارس می‌شوند. ویروسPNRSV موجب کاهش کمی و کیفی میوه‌ها شده و خسارت هنگفتی را هر ساله به میوه‌کاری‌های سراسر جهان وارد می‌سازد.

استفاده از ترموتراپی و سیستم کشت بافت، برای عاری‌سازی و تولید هسته‌های اولیه به‌علاوه بکارگیری یک روش حساس برای بررسی عاری بودن مواد گیاهی تکثیر شده از ویروس، می‌تواند منجر به تولید گیاهان مادری سالم برای احداث باغ‌های مادری هلو گردد.

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۸ انجام گرفت، ریزنمونه‌هایی که از درختان غیر بیماری‌زا گرفته شده بود ریزشاخه‌های بهتر و کارآمدتری در مقایسه با کشت‌های حاصل از درختان بیمار ایجاد کردند (Batakaev *et al*., 2018).

از کشت نوک مریستم در سطح گسترده‌ای برای تولید گیاهان عاری از ویروس در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است (Ayabe and Sumi, 2001). با توجه به اینکه درمانی برای بیماری‌های ویروسی وجود ندارد و از آنجایی که منبع گیاهی مقاوم به ویروس در میان رقم‌های هلو نسبتاً محدود است (Escalettes *et al*., 1997)، ترموتراپی همراه با کشت نوک مریستم از روش‌های اصلی تولید گیاهان عاری از ویروس است (Walkey, 1980).

1- Plum pox virus
2- Puunms necrotic ring spot virus

ضرغامی و همکاران در سال ۱۳۹۶ به بهینه‌سازی پروتکل تکثیر نیمه انبوه هلو با هدف تولید پایه‌های عاری از ویروس پرداختند. هدف این پروژه سالم‌سازی ارقام هلو (آلبرتا، ردتاب، دیکسی رد و حاجی کاظمی) از طریق ترموتراپی همراه با کشت ریز نمونه‌های تک گره و ایجاد و تکثیر هسته اولیه بود. پس از تولید گیاهان سالم و تایید سلامت آن‌ها، نسبت به بهینه‌سازی پروتکل ریزازدیادی آن‌ها اقدام شد و در نهایت از هر رقم تعدادی گیاه کشت بافتی تولید و در اختیار گذاشته شد.

در طی تحقیقی توسط Dessoky و همکاران در سال ۲۰۱۸ حذف ویروس PPV به روش *in vitro* در درختان هلو با استفاده از کشت مریستم به همراه ترموتراپی انجام گردید (رئوس مریستم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۸ روز قرار گرفتند). در این مطالعه ۶۰ درصد از درختان هنگامی که توسط RT-PCR و DAS-ELIZA ایندکس شدند، عاری از ویروس بودند.

## • مراحل پروتکل تکثیر هلو

### ۱- ماده گیاهی، روش ضدعفونی و ساخت محیط کشت

در ابتدا، قطعات تک‌گره از شاخه‌های یکساله در فصل رشد در طی سال نمونه‌برداری شد و ریزنمونه‌ها (شاخه‌های یکساله تک‌گره) با استفاده از ضدعفونی‌کننده‌های عمومی کشت بافت، استریل شده و درون محیط استقرار (MS) کشت می‌شوند. ضدعفونی ریزنمونه‌ها به مدت یک دقیقه با الکل ۷۰ درصد، ۱۰ دقیقه نانوسیلور ۴۰۰۰ با غلظت ۲/۵ درصد و به مدت ۱۰ دقیقه با ماده وایتکس ۲۵ درصد انجام گرفته و سپس سه مرحله شست‌وشو، هر بار به مدت ۱۰-۵ دقیقه توسط آب مقطر استریل به منظور حذف اثرات وجود ضدعفونی‌کننده‌ها بر روی نمونه‌ها انجام می‌گیرد.

#### ۱-۱- مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت

برای مطالعه مراحل استقرار، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و تشکیل گیاهچه از محیط MS[1] همراه با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شد. این محیط پایه دارای عناصر پرمصرف و کم‌مصرف، آهن و ویتامین‌ها می‌باشد. ویتامین‌ها شامل تیامین هیدروکلرید، پیرودوکسال هیدروکلرید، نیکوتینیک‌اسید، بیوتین، مایواینوزیتول، کلسیم پنتوتنیت و گلایسین می‌باشند. ترکیبات معدنی و ویتامین‌ها ابتدا به صورت محلول‌های مادر تهیه شدند و سپس مورد استفاده قرار می‌گیرند. تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده شامل نفتالین‌استیک‌اسید

1- Murashige and Skoog, 1962

(NAA)، اندول‌بوتیریک‌اسید (IBA)، ۲- ایزوپنتنیل‌آدنین‌پورین (2ip)، ۶- بنزیل‌آدنین‌پورین (BAP) می‌باشند.

## ۲-۱- تهیه محلول عناصر پرمصرف و کم‌مصرف

عناصر پرمصرف و کم‌مصرف که برای محیط کشت لازم هستند ابتدا به صورت استوک و در حجم یک لیتر تهیه و در ظروف شیشه‌ای و دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. غلظت هر یک از نمک‌های تشکیل‌دهنده استوک و مقدار مورد نیاز آن‌ها در محیط کشت در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. قابل ذکر است که برای عناصر پرمصرف استوک ۱۰X و برای عناصر کم‌مصرف استوک ۱۰۰X تهیه شده است. این عمل از برهم‌کنش احتمالی و تشکیل رسوب جلوگیری می‌کند.

سولفات آهن مورد نیاز به صورت استوک ۱۰۰X تهیه می‌شود. بدین صورت که مقدار۳۷۰ میلی‌گرم از Fe-NaEDTA را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و برای تهیه یک لیتر محیط کشت ۱۰ میلی‌لیتر از آن مورد استفاده قرار می‌گیرد.

**جدول ۱**- غلظت نمک‌های تشکیل‌دهنده عناصر پرمصرف محیط کشت MS

| نام ترکیب | غلظت مورد نیاز برای استوک ۱۰x(g/l) | غلظت مورد نیاز در محیط کشت (mg/l) |
|---|---|---|
| $NH_4NO_3$ | ۱۶/۵ | ۱۶۵۰ |
| $KNO_3$ | ۱۹ | ۱۹۰۰ |
| $CaCl_2.2H_2O$ | ۴/۴ | ۴۴۰ |
| $MgSO_4.7H_2O$ | ۳/۷ | ۳۷۰ |
| $KH_2PO_4$ | ۱/۷ | ۱۷۰ |
| $NaH_2PO_4.2H_2O$ | ۱/۷ | ۱۷۰ |

**جدول ۲**- غلظت نمک‌های تشکیل‌دهنده عناصر کم‌مصرف محیط کشت MS

| نام ترکیب | غلظت مورد نیاز برای استوک ۱۰۰x(g/l) | غلظت مورد نیاز در محیط کشت (mg/l) |
|---|---|---|
| KI | ۰/۰۸۳ | ۰/۸۳ |
| $H_3BO_3$ | ۰/۶۲ | ۶/۲ |
| $MnSO_4.4H_2O$ | ۲/۲۳ | ۲۲/۳ |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | ۰/۸۶ | ۸/۶ |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | ۰/۰۲۵ | ۰/۲۵ |
| $CuSO_4.5H_2O$ | ۰/۰۰۲۵ | ۰/۰۲۵ |
| $CoCl_2.6H_2O$ | ۰/۰۰۲۵ | ۰/۰۲۵ |

### ۳-۱- ویتامین‌ها

ویتامین‌ها برای تهیه بخش آلی محیط کشت از هر کدام از ویتامین‌های تیامین هیدروکلرید، پیرودوکسال هیدروکلرید، نیکوتینیک اسید، بیوتین و کلسیم پنتوتنیت به مقدار ۱۰ میلی‌گرم وزن کرده و هر کدام را جداگانه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و برای تهیه هر لیتر محیط کشت، ۱۰ میلی‌لیتر از هر کدام استفاده شد. جهت تهیه گلایسین ۲۰ میلی‌گرم از آن را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و برای تهیه هر لیتر محیط کشت، ۲۰ میلی‌لیتر از هر کدام استفاده شد. در مورد مایواینوزیتول، در زمان تهیه محیط کشت به ازای هر لیتر محیط، ۱۲۵ میلی‌گرم از این ماده مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳).

### ٤-۱- هورمون‌ها

برای تهیه استوک 2,4-D، ابتدا ۱۰ میلی‌گرم از آن را به یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتر خشک و تمیز منتقل کرده، سپس چند قطره اتانول ۹۶ درصد به آن افزوده تا بلورها کاملاً حل شوند. سپس حجم آن را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم. به منظور تهیه استوک NAA،

مقدار ۱۰ میلی‌گرم از آن را در بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری خشک و تمیز ریخته و توسط چند قطره سود یک نرمال حل نموده و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. استوک‌های BAP، 2ip، IBA و ABA هم به همین صورت تهیه می‌گردند و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند.

جدول ۳- غلظت ترکیبات آلی مورد استفاده در محیط کشت MS

| نام ترکیب | غلظت مورد نیاز برای استوک ۱۰x(g/l) | غلظت مورد نیاز در محیط کشت (mg/l) |
|---|---|---|
| Myo-Inositol | ۱۲۵۰ | ۱۲۵ |
| Nicotinic acid | ۱۰ | ۱ |
| Pyridoxine hydrochloride | ۱۰ | ۱ |
| Thiamine hydrochloride | ۱۰ | ۱ |
| Glycine | ۲۰ | ۲ |
| Calcium pantothenate | ۱۰ | ۱ |
| Biotin | ۱۰ | ۱ |

## ۲- ساخت محیط کشت

هنگام تهیه یک لیتر محیط کشت ابتدا مقداری آب در ظروف خالی ریخته و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از استوک عناصر پرمصرف و ۱۰ میلی‌لیتر از استوک عناصر کم‌مصرف و ۱۰ میلی‌لیتر از استوک آهن را به آن می‌افزائیم. منبع کربن آلی در محیط MS ساکارز است. مقدار ساکارز مورد استفاده در محیط کشت، ۳۰ میلی‌گرم در لیتر بوده و در هنگام تهیه محیط کشت به ازای هر لیتر محیط کشت مورد نیاز ۳۰ گرم ساکارز افزوده شده و کاملاً حل گردید. بعد از افزودن ترکیبات فوق، مقدار مورد نیاز ساکارز به عنوان منبع کربن، ویتامین‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد را اضافه می‌کنیم. برای جلوگیری از ترشحات فنولی مقدار سه گرم در لیتر هم ذغال فعال اضافه می‌کنیم و به حجم می‌رسانیم. سپس pH محیط کشت را در ۵/۸-۵/۶ تنظیم می‌کنیم. برای

تنظیم pH از سود یک نرمال یا اسیدکلریدریک یک نرمال استفاده می‌شود. برای این که محیط‌های کشت به صورت جامد درآیند، برای هر لیتر محیط کشت مقدار هفت گرم در لیتر آگار اضافه می‌شود. در این حالت محیط کشت برای اتوکلاو کردن آماده است. اتوکلاو کردن محیط‌های کشت که به منظور سترون کردن آن‌ها می‌باشد، در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع به مدت ۲۰ دقیقه صورت می‌گیرد. در این شرایط آگار نیز کاملاً حل می‌شود و محلولی شفاف به وجود می‌آید. پس از اتمام اتوکلاو، محیط‌های کشت به فضای لامینار ایرفلو که قبلاً با الکل ۷۰ درصد کاملاً ضدعفونی شده است، انتقال داده می‌شوند. قابل ذکر است به دلیل حساسیت کلسیم پنتوتنیت به دمای بالا، این ماده را بعد از اتوکلاو شدن محیط و کمی خنک شدن آن اضافه می‌کنیم. هنگامی که دمای محیط‌ها به ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌رسد و قبل از اینکه آگار حل شده سبب جامد شدن محیط‌ها گردد آن‌ها در داخل پتری‌دیش یا شیشه مرباهایی که استریل بوده و به فضای لامینار منتقل شده‌اند به میزان ۳۰-۲۵ میلی‌لیتر توزیع می‌گردند. بعد از انتقال محیط‌ها به پتری‌دیش یا شیشه مربایی در مدت زمان کوتاهی به حالت جامد درمی‌آیند که در این حالت ریزنمونه‌های گیاهی روی آن کشت شده و اطراف دهانه پتری‌دیش با پارافیلم مسدود می‌شود. سپس کشت‌ها به محیطی که حائز شرایط آزمایشگاهی برای رشد بوده، منتقل می‌شوند.

## ۳- مراحل کلی عاری از ویروس‌سازی هلو

- جمع‌آوری نمونه‌های برگی ارقام از باغ‌های موردنظر
- ردیابی ویروس‌ها (تست الایزا)
- استقرار و تکثیر ریزنمونه‌ها
- ترموتراپی ریزنمونه‌های تکثیر یافته
- مریستم‌برداری ریزنمونه‌های ترموتراپی شده
- تولید شاخه و تکثیر آنها
- شاخه‌های تکثیر شده RT- PCR
- تکثیر نمونه‌هایی که تست RT- PCR منفی بوده (عاری از ویروس)

- ریشه‌زایی
- سازگاری
- گلخانه
- ارزیابی تولید در شرایط باغ و بررسی خصوصیات کمی و کیفی

## ۱-۳- جمع‌آوری نمونه‌های برگی

جمع‌آوری نمونه‌های برگی، از ارقام یا پایه‌های مورد نظر به صورت تصادفی از شاخه‌های سالم و مشکوک به آلودگی ویروسی در فصل بهار انجام می‌شود. نمونه‌ها درون ظروف یا کیسه‌های پلاستیکی نفوذناپذیر در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت کوتاه نگهداری می‌شوند. جهت نگهداری بلند مدت نمونه‌ها به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شوند.

## ۲-۳- ردیابی ویروسی با استفاده از تست الیزا

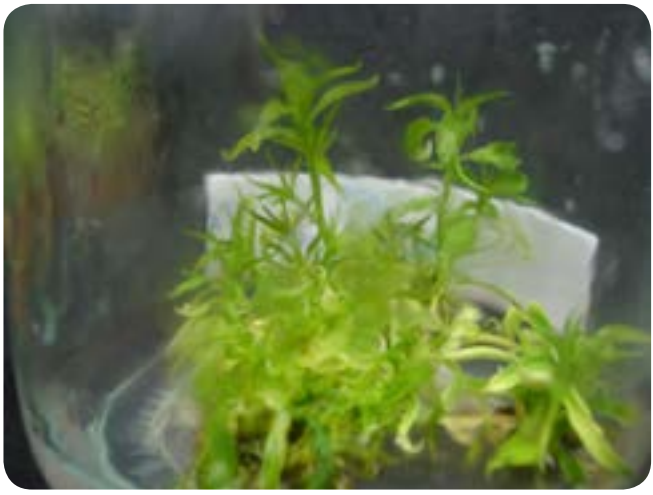
ابتدا حدود ۲۰۰ میلی‌گرم برگ از هر نمونه جدا کرده همراه با ۴۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج در هاون‌های چینی اتوکلاو شده کوبیده می‌شود، سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و فاز رویی محلول را جهت ادامه کار و استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره می‌نماییم. آنتی‌ژن ویروس (IGG) موردنظر همراه با Coating بافر به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در داخل هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا اضافه گردیده و پس از بسته‌بندی پلیت الایزا (جهت حفظ رطوبت)، در دمای حدود چهار درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب فرصت داده می‌شود تا پروتئین به مقدار کافی به کف چاهک‌ها متصل شود. در این مرحله تعدادی چاهک به عنوان شاهد خالی نگه داشته می‌شوند. پس از خروج پلیت از یخچال، بافر تخلیه شده و شست‌وشوی چاهک‌ها در سه مرحله و هر مرحله به مدت سه دقیقه توسط بافر صورت می‌گیرد، سپس براساس نقشه از پیش طراحی شده (براساس نمونه‌های مورد بررسی)، در هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده از نمونه‌های گیاهی اضافه می‌گردد. در چاهک‌های شاهد نیز عصاره گیاه افزوده خواهد شد و در نهایت کیت کنترل مثبت و منفی، برای ویروس‌های مورد مطالعه اضافه می‌گردند. در پایان این مرحله نیز پلیت مورد استفاده، جهت حفظ رطوبت بسته‌بندی گردیده و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مرحله محتویات چاهک‌های پلیت خارج شده از

یخچال، تخلیه گردیده و چند مرحله توسط بافر شست‌وشو آبکشی صورت می‌گیرد، تا آنتی‌بادی‌های متصل نشده، با عمل شست‌وشو از محیط حذف شوند. پس از این کار، Conjugate بافر به همراه آنزیم مخصوص هر ویروس اضافه شده و پس از بسته‌بندی پلیت‌ها جهت حفظ رطوبت، به مدت پنج ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند. در آخرین مرحله پس از تخلیه محتویات چاهک‌ها و شست‌وشوی پلیت، حدود ۲۰۰ میکرولیتر ترکیب سوبسترای مناسب رنگ‌گیری به چاهک‌ها اضافه گردیده و با توجه به نوع ویروس مورد مطالعه، به مدت یک تا دو ساعت در تاریکی و دمای اتاق (۲۵ –۲۰ درجه سانتی‌گراد) پلیت را انکوبه می‌گردانیم. پس از اتمام زمان مذکور، چاهک‌های پلیت توسط دستگاه Eliza Reader مورد خوانش قرار می‌گیرند و با مقایسه اعداد به دست آمده از نمونه‌های مورد مطالعه با نمونه‌های مثبت و منفی، نتیجه آلودگی ویروسی در ارقام هلو مورد مطالعه ثبت می‌گردد (شکل ۱).

**شکل ۱**– تست الیزا جهت اثبات نمونه‌های آلوده به ویروس PPV در درختان هلو

### ۳-۳- مرحله استقرار و شاخه‌زایی نمونه‌ها

در ابتدا قطعات تک‌گره از شاخه‌های یکساله که در فصل رشد نمونه‌برداری گردیده‌اند، پس از ضدعفونی درون محیط استقرار که شامل محیط کشت MS که حاوی یک میلی‌گرم BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم NAA می‌باشند، قرار می‌گیرند. نمونه‌ها به مدت دو ماه در دمای اتاق، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و فتوپریود ۱۴ ساعت نگهداری شده تا جوانه‌ها رشد نمایند. پس از دو ماه نمونه‌های استقرار یافته جهت شاخه‌زایی به محیط MS حاوی دو میلی‌گرم BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم NAA منتقل می‌شوند (شکل ۲).



**شکل ۲**- مرحله شاخه‌زایی در هلو (رقم آلبرتا)

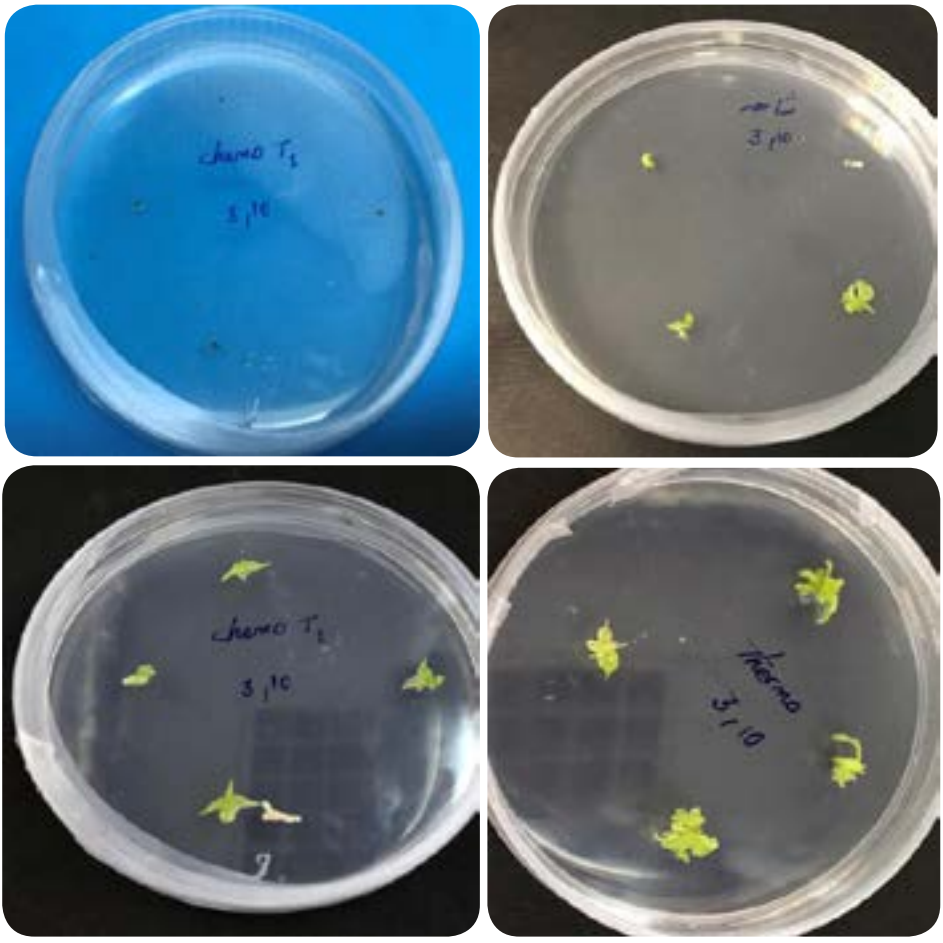
### ٤-۳- ترموتراپی

به دلیل اینکه گیاهچه‌های هلو محدوده دمایی خاصی را تحمل می‌کنند، دماهای متفاوتی برای بهینه شدن تیمار گرمادرمانی گذاشته می‌شود، لذا پس از بهینه شدن تیمار گرمادرمانی، شاخه‌هایی به طول ۳-۲/۵ سانتی‌متر شامل سه برگ از نمونه‌های ***in vitro*** از ارقام مورد مطالعه، در محیط بهینه ارقام در انکوباتور با (۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی) با دمای اولیه ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند. در طی یک هفته دما روزانه ۲ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد تا به دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد برسد، بعد از ۱۰ روز که در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، از نمونه‌ها عمل مریستم‌برداری انجام می‌گیرد (شکل ۳).

**شکل ۳**- مرحله ترموتراپی گیاهچه‌های کشت بافتی هلو

### ۵-۳- مرحله مریستم‌برداری

مراحل جداسازی مریستم زیر لوپ و تحت شرایط استریل زیر هود لامینار انجام می‌گیرد. مریستم‌برداری در اندازه بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر انجام می‌شود. محیط کشت مورد استفاده جهت رشد مریستم‌ها حاوی نمک‌های پایه و ویتامین‌های MS به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP و ۵/۵ گرم بر لیتر آگار جهت جامد کردن محیط کشت می‌باشد. ظروف مورد استفاده در این مرحله پتری‌دیش‌های یک بار مصرف و استریل با قطر هشت سانتی‌متر می‌باشد. پس از قرار دادن مریستم‌ها در محیط کشت، درب پتری‌ها با کمک پارافیلم بسته شده و برای رشد در فیتوترون با متوسط دمای ۱±۲۴ درجه با ۱۶ ساعت روشنایی و ۲۰۰۰ لوکس نور مستقر می‌گردند. بعد از ۳۰ تا ۳۵ روز مریستم‌های رشد کرده و زنده به محیط کشت جدید (محیط بهینه تکثیر)، در شیشه‌های مربایی منتقل می‌شوند (شکل ۴).



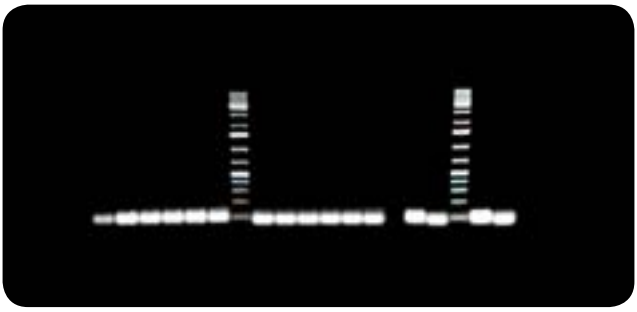
**شکل ٤**- مراحل تکامل مریستم‌های هلو بعد از چهار هفته

### ٦-٣- مرحله تولید شاخه و تکثیر آنها

مریستم‌های رشد یافته جهت یک بار تکثیر و شاخه‌زایی به محیط کشت MS حاوی چهار میلی‌گرم BAP و دو میلی‌گرم IBA منتقل می‌شوند. در این مرحله شاخه‌های تکثیر شده از یک مریستم جهت تست‌های ویروسی با کمک RT-PCR انجام می‌گیرد و در صورت سالم بودن در مراحل بعدی تکثیر انبوه صورت می‌گیرد.

### ۷-۳- RT-PCR شاخه‌های تکثیر شده

استخراج RNA با روش CTAB با کمی تغییرات انجام می‌شود (معصومی و همکاران، ۲۰۱۶). ابتدا به ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه برگی پودر شده، یک میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شده و بعد از اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول، نمونه‌ها ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند. هر پنج دقیقه یک‌بار اینورت شده سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ می‌شوند. پس از برداشتن فاز رویی(۵۰۰ میکرولیتر) هم حجم آن، کلروفوم- ایزوامیل الکل (۲۴:۱) اضافه شده و به مدت پنج دقیقه با دست به آرامی اینورت گردیده و سانتریفیوژ مثل مرحله قبل انجام می‌شود. این مرحله دو بار تکرار شده و بعد از برداشتن لایه رویی، ایزوپروپانول به میزان ۷۰۰ میکرولیتر اضافه می‌گردد و سانتریفیوژ مانند مراحل قبل انجام می‌شود. در مرحله آخر بعد از خالی کردن، سوپرنات الکل ۹۶ درصد سرد اضافه گردیده و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ انجام شده و در نهایت پس از خالی کردن الکل و خشک شدن نمونه‌ها، آب DEPCE به میزان ۳۵- ۴۵ میکرولیتر به هر نمونه اضافه می‌شود. پس از حل شدن پلیت‌ها نمونه‌ها برای بلند مدت در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌گردند. پس از نانودراپ نمونه‌ها، کیفیت RNAهای استخراجی توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای ساخت cDNA به RNAهای خالص شده ابتدا یک میکرولیتر آنزیم Oligo(dT)18 primer و Water nuclease- free اضافه شده، حجم کلی واکنش باید ۱۲ میکرولیتر باشد. سپس نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه قرار گرفته و در مرحله آخر چهار میکرولیتر Reaction buffer 5x، یک میکرولیتر Ribolock RNase Inhibitor، دو میکرولیتر Dntp mix و یک میکرولیتر RevertAidM-Mul- vRT به حجم واکنش قبلی اضافه می‌گردند. نمونه‌ها ابتدا در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ دقیقه و سپس در ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای پنج دقیقه قرار می‌گیرند. در نهایت cDNAهای با کیفیت مطلوب با پرایمرهای اختصاصی هر ویروس مورد آزمون قرار می‌گیرند (شکل ۵).



**شکل ۵**- تست RT-PCR جهت اثبات عاری از ویروس گیاهچه‌های کشت بافتی هلو

### ۸-۳- مرحله ریشه‌زایی

جهت ریشه‌دار نمودن، ریزشاخه‌های تولیدی به محیط ریشه‌زایی منتقل می‌گردند، بدین صورت که گیاهچه‌هایی که از نظر طول و رشد رویشی قوی‌تر بودند، به محیط ذکر شده انتقال داده می‌شوند. محیط ریشه‌زایی شامل محیط MS حاوی ۷۰ میلی‌گرم آهن و چهار میلی‌گرم بر لیتر IBA و در شرایط تاریکی به مدت یک هفته تا ۱۰ روز بوده و سپس به شرایط روشنایی منتقل می‌گردند (شکل ۶).

**شکل ٦**- مرحله ریشه‌زایی در هلو (رقم آلبرتا)

### ۹-۳- مرحله سازگاری یا انتقال از شرایط *in vitro* به *in vivo*

زمانی که گیاهچه‌های حاصل به اندازه پنج تا شش سانتی‌متر رسیدند به منظور سازگاری به شرایط برون آزمایشگاهی (*in vivo*)، از بستر کشت پیت ماس: پرلیت به نسبت ۱:۱ که قبلا استریل گردیده‌اند، استفاده می‌شود. جهت جلوگیری از تعرق و رطوبت کافی از کیسه‌های پلاستیکی و یا لیوان‌های یکبار مصرف استفاده می‌شود و به مدت سه الی چهار هفته در این شرایط نگهداری می‌شوند و توصیه می‌گردد علاوه بر آبیاری از ۱۰ درصد محیط MS هم استفاده شود (شکل ۷).

**شکل ۷**- مرحله سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی هلو

### ۱۰-۳- مرحله انتقال به گلخانه

بعد از سه الی چهار هفته گیاهچه‌های سازگار شده به گلخانه و کشت آنها در گلدان انجام می‌گیرد. بستر کاشت شامل پیت ماس: پرلیت: خاک باغچه به نسبت ۱:۱:۱ (که در صورت امکان قبلاً استریل شده باشد)، است (شکل ۸).

**شکل ۸**- مرحله انتقال گیاهچه‌های کشت بافتی هلو به گلدان (رقم آلبرتا)

## • نتیجه‌گیری

دستورالعمل معرفی شده در مورد پروتکل عاری از ویروس‌سازی هلو تا نتیجه‌گیری نهایی یعنی انتقال گیاهچه‌های درون گلدان به مزرعه به مدت زمان حداقل ۲۰-۲۴ ماه نیاز دارد و این پروتکل برای کلیه ارقام با تغییرات جزئی قابل استفاده می‌باشد. جهت ریشه‌زایی ارقام هلو وجود آهن قرمز ضروری می‌باشد.

## • سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به دلیل حمایت مالی در قالب پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۹۰۰۰۱-۰۵-۰۵-۲ تقدیر و تشکر می‌شود.

## • فهرست منابع

ضرغامی ر، وطن‌پور ازغندی ع، بوذری ن و رستمی ع (۱۳۹۶) ایجاد پروتکل تکثیر نیمه انبوه ارقام عاری از ویروس هلو. سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی. پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی. گزارش نهائی شماره فروست ۵۲۲۳۱.

Ayabe 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 Reports, 20(6): 503-507.

Barba M, Ilardi V and Pasquini G (2015) Control of pome and stone fruit virus diseases. In Advances in virus research. Academic Press. 91: 47-83.

Batakaev AA, Bamatov IM and Vinter MA (2018) Studying tolerance of prune (*Prunus domestica*) to the plum pox virus (PPV) by criterion" Efficiency of microshoots' regeneration" in controlled *in vitro* conditions. Journal of Pharmaceutical sciences and research, 10(1): 59-64.

Dessoky ES, Attia OA, Ismail AI and El-Sharnouby ME (2018) Production of Virus-Free Peach (*Prunus persica* L. Batsch) Plants cv. Balady Grown in Taif, by Meristem Culture and Thermotherapy. Bioscience Research, 15(1):124-132.

Escalettes V, Dosba F, Lansac M and Eyquard JP (1997) June. Genetic resistance to Plum pox potyvirus in peaches. In IV International Peach Symposium 465: 689-698.

Hadidi A and 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).

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, DOI: 10.1038/protex.2016.015.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3): 473-497.

Scorza R, Callahan A, Dardick C, Ravelonandro M, Polak J, Malinowski T, Zagrai I, Cambra M and Kamenova I (2013) Genetic engineering of Plum pox virus resistance: 'Honey Sweet' plum—from concept to product. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 115(1):1-12.

Walkey DGA and DGA W (1980) Production of virus-free plants by tissue culture.

Wang MR, Li BQ, Feng CH and Wang QC (2016) Culture of shoot tips from adventitious shoots can eradicate Apple stem pitting virus but fails in Apple stem grooving virus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 125(2): 283-291.

Wang MR, Cui ZH, Li JW, Hao XY, Zhao L and Wang QC (2018) *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication. Plant methods, 14(1): 87.