سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی
پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری

سالم سازی درختان سیب با استفاده از تکنیک هرس جوان‌سازی

حسن حاج‌نجاری و طیبه کشاورز

شماره نشریه

۱۴۰۰

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم باغبانی

نشریه فنی

سالم سازی درختان سیب با استفاده از تکنیک هرس جوان‌سازی

شماره ثبت ۶۱۱۳۵

آبان ۱۴۰۰

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی
پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری

عنوان نشریه: **سالم سازی درختان سیب با استفاده از تکنیک هرس جوان‌سازی**
نگارنده :**دکتر حسن حاج نجاری**
شماره نشریه..... :
نوع نشریه :نشریه فنی
نام و نام خانوادگی ویراستاران :**دکتر ناصر بوذری، دکتر سیروس آقاجانزاده، دکتر نوشین کاظمی**
ناشر :م**ؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری**
تاریخ انتشار: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰
این نشریه با شماره ۶۱۱۳۵ از مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع رسانی کشاورزی.مورخ ۱۴۰۰/۱۱/۳۰ به ثبت رسیده است .
مسئولیت
درستی مطالب با نویسنده /نویسندگان است.

مخاطبان نشریه فنی:

معاونت باغبانی، رؤسای سازمان‌های جهاد استان و مدیران باغبانی و ترویج

شرکت‌های کشت بافت، پژوهشکده_های باغبانی، تعاونی‌های تولید باغبانی، نهالستان ها، هلدینگ ها

میوه کاران، کارشناسان باغبانی و کارشناسان پهنه

کارشناسان و مروجان ترویج و آموزش کشاورزی

به نژادگران، درختان میوه

دانشجویان رشته باغبانی

اهداف آموزشی:

درختان میوه لزوما دچار آلودگی‌های ویروسی نیستند، امکان یافتن درختان سالم و عاری از ویروس در درختان مسن میوه نیز وجود دارد، حذف هزینه‌های غیرضرور قبل از انعقاد قرادارد برای سالم‌سازی ویروس‌های مهم در نمونه‌های گیاهی ارقام درختان میوه، اهمیت هرس جوانسازی در کاهش آلودگی‌های ویروسی درختان میوه، سرعت بخشیدن به فرآیند سالم سازی، تولید هسته‌های اولیه و باغ مادری سالم

فهرست مطالب

چکیده ۵

مقدمه ۵

ارزیابی ارقام و آلودگی‌های پیدا و پنهان ۶

فرضیه اثر جوانسازی بر سطح سلامت گیاهان ۶

نقش غربال ارقام در برنامه‌های اصلاحی ۷

تاثیر سطح سلامت درختان بر عملکرد ۸

اهداف جوان‌سازی ۹

ترکیبات برگی سیب و جوانسازی ۱۰
ترکیبات فاز انتقالی به بلوغ و جوانسازی ۱۱
واکنش گیاه به آلودگی ویروسی از طریق تغییر متابولیت ها و ترکیبات درون سلولی ۱۲
فرآیند فعالیت ویروس در میزبان ۱۳
علائم اختصاصی بیماری ویروسی ۱۴
مبارزه ۱۵
ایمن سازی گیاه از طریق به‌نژادی ۱۵
مقاومت مستقیم ۱۵
مقاومت غیرفعال ۱۶
مدیریت بیماری ویروسی ۱۶
اقدامات پیشگیرانه ۱۶
سطوح ردگیری ویروس ۱۶
سالم سازی ۱۷
احداث اولین باغ های کنترل ویروس سیب در کشور ۱۸
ارزیابی عملکرد درختان کنترل ویروس و آلوده ۱۹
فرآیند جوان‌سازی و بررسی سطح سلامت درختان ۲۰
آزمون الایزا ۲۲
گروه بندی ارقام بر اساس سطح سلامت/آلودگی ۲۴
شناسایی درختان آلوده در تعداد و غلظت بالای ویروس ۲۵
نتیجه گیری ۳۰
فرضیات تحقیق و کاربرد نتایج ۳۱
ابعاد کاربردی در صنعت تولید نهال ۳۲
ابعاد اجرایی و سیاست گزاری ۳۴
فهرست منابع ۳۵

چکیده

بر اساس فرضیه اثر جوان‌سازی بر افزایش سطح سلامت درختان در شرایط اقلیمی کرج و با هدف بررسی سطح آلودگی درختان مستقر در کلکسیون ملی ارقام (Varieties) یا کاشتارهای (Cultivars) تجاری بومی و وارداتی سیب اقدام به هرس سنگین درختان مسن سیب بر پایه‌های بذری گردید. نمونه برداری از جست‌های پررشد علفی با کوتیکول نازک درختان پس از سربرداری طی چندسال در فصول مختلف صورت گرفت. آزمون‌های الایزا و RT-PCR در قالب طرح مشترک با موسسه تحقیقات گیاهپزشکی به عمل آمد. نتایج غیرمنتظره و امیدوارکننده با تلفیق نتایج آزمون الایزا طی سه مرحله غربالگری و همچنین RT-PCR نشان داد ارقام یلوترنسپرنت۱، رداسپورکوپر۲، استارکینگ۱، مکینتاش۱ و گلوکناپفل۱ عاری از چهار ویروس مهم سیب ASPV، ACLSV، ASGV و ToRSV بودند. تعدادی بیشتری از ارقام مشکوک به آلودگی به یک ویروس بودند. گروه بزرگی فقط آلوده به یک ویروس با بسامد بالای ACLSV بودند. بر اساس استانداردهای جهانی امکان تولید هسته‌های اولیه و احداث باغ مادری عاری از ویروس (Virus free) و کنترل ویروس (Virus tested) به صورت مستقیم و بدون هزینه‌های سالم‌سازی فراهم شد. غربال کلکسیون هسته (Core collction)، باغ هیبرید (Selection plot)، باغ مادری (Mother orchard) برای ویروس‌های مهم در هر محصول، با ردگیری و تشخیص ویروس‌ها امکان شناسایی گروهی از درختان سالم ارقام قابل دست‌یابی است. روش غربال با حذف هزینه‌های هنگفت و زمان‌بر سالم‌سازی و تولید مستقیم هسته‌های پیش‌تکثیر، احداث باغ مادری سالم و تولید نهال عاری از ویروس و کنترل ویروس را فراهم می‌سازد. به این شکل، سالم‌سازی به درختان آلوده به ۲ – ۳ ویروس محدود خواهد شد. توصیه می‌شود برای رسیدن به نتایج مطلوب در مناطقی با تابش بالای آفتاب، ساعات ابری کم، رطوبت نسبی پایین بر نمونه‌های علفی تازه‌رسته برگرفته پس از هرس سنگین جوان‌سازی اقدام شود. نشریه با نگاه به باغبانی کاربردی مدرن بر محور سلامت گیاه همراه با بررسی منابع و تحلیل فیزیولوژی رشد ونمو، تغذیه، تشریح و ژنتیک مقاومت درختان میوه تدوین شده است.

مقدمه

رواج حدود ۱۰ تا ۱۵ رقم پرمحصول رایج تجاری سیب در سطح جهان در سیستم‌های کشت متراکم یک تا سه ردیفه و فرم‌های تربیت مختلف دوکی (Spindle)، اپسیلون (Y)، وی (V) در باغداری تک‌محصولی منجر به کاهش تنوع ژنتیک و خطرات غیرقابل پیش بینی شده است. عدم بهره‌گیری از واحدهای تجاری سازی در پژوهشکده‌ها و نبود سیستم ارتباطی مدون بین تحقیقات و صنعت باغبانی با هدف افزایش ضریب نفوذ خروجی‌های به‌نژادی مانند ارقام جدید معرفی شده، ارقام و پایه‌های رویشی امیدبخش در دست معرفی که والدهای آنان طی هزاران سال به شرایط اقلیمی

کشور سازگاری نشان داده اند و یا ارقام بومی متحمل به تنش‌ها ی زنده وغیر زنده سرمایه حیاتی کشور در بحث امنیت غذایی آحاد جامعه هستند. موادگیاهی با تنوع بالای ژنتیک به مرور به بیمارگرهای قارچی و ویروسی می-شوند. ارقام وارداتی سازگار که آزمایشات سازگاری به آب و هوای کشور را طی بیش از ۲۰ سال پشت سر گذاشته‌اند نیز نیاز به توجه بیشتر سیاستگزاران دارند. تجارت نهال و تبادل ژرم پلاسم در سطح جهان. تغییرات آب و هوایی با تاثیر بر منطقه توزیع میزبان‌ها و ناقل‌ها توانایی ویروس‌ها در جهش و سازگاری از جمله عوامل موثر در شیوع آلودگی ویروسی می باشد (Anderson et al., 2004). ارزیابی ارقام سیب موجود در کلکسیون قدیمی ملی ارقام تجاری بومی و وارداتی سیب واقع در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمالشهر از سال ۱۳۸۲آغاز شد.

ارزیابی ارقام و آلودگی‌های پیدا و پنهان

ارزیابی ها بر تمامی ابعاد مهم باغبانی اعم از فنولوژی یا پدیده‌شناسی (Phenology)، میوه شناسی و صفات رشدی و رویشی صورت گرفت. گزارش جامع از نتایج یک دهه تحقیقات به نژادی و به باغی منتشر شد (Hajnajari. 2010). مجموعه ۹۳ رقمی کلکسیون ارقام سیب تحت غربال‌های متعددی قرار گرفت. در یک دوره ۱۵ ساله با اعمال تیمارهای مصنوعی خود-گرده افشانی، درصد میوه بندی، رشد لوله گرده در اندام مادگی توسط میکروسکوپ فلورسنت و s-alleles خودناسازگاری در ۹۳ کاشتار و نژادگان بررسی شد. دو رقم بومی زودرس شیخ احمد و مشهد، دو رقم پاکوتاه مربایی و زینتی به علاوه نژادگانIRI6 به عنوان کاملا خودسازگارشناسایی شدند (حاج نجاری و مرادی. ۱۳۹۳). بررسی سطوح مقاومت ارقام به بیمارگرهای رایج و نیز تعیین سلامت آنان در کلکسیون ارقام برای اهداف به نژادی از نوع سرشاخه کاری، تولید نهال برای باغ های الگویی و انجام پروژه های به باغی حائز اهمیت است. آلودگی‌های پنهان در گسترش بیماری آتشک ازطریق مواد تکثیر شونده رویشی و نهال‌های آلوده نیز نقش به‌سزایی ایفا می‌نمایند.

فرضیه اثر هرس جوان‌سازی بر سطح سلامت گیاهان

یافتن نمونه‌های برگی عاری از ویروس در این پژوهش را می‌توان به تحریک درختان به تولید جست‌های علفی سریع-الرشد به‌وسیله هرس سنگین جوان‌سازی برشمرد. عملیات جوان‌سازی موجب پدیدآمدن تغییرا ت قابل ملاحظه‌ای در

ریخت‌شناسی درخت و شرایط درون‌سلولی بافت‌های مریستمی مزوفیل می‌گردد. بر اثر جوان‌سازی، درختان دچار نوعی عدم تعادل حجمی بین ساختمان وسیع ریشه و اندام هوایی کاهش یافته می‌گردند. ورودی حجم بالای آب وعناصر معدنی از ساختمان بزرگ ریشه به تاج کوچک شده درخت موجب تغییردر فیزیولوژی رشد و تغذیه گیاه می‌شود. به نظر می‌رسد طی یک فرآیند بسیار طبیعی، اندام‌های رویشی تازه رسته علفی پررشد با کوتیکول نازک با قرار گرفتن در معرض دمای بالا و انرژی تابشی شدید، در شرایط کرج، نوعی گرمادرمانی در سطح سلولی به وقوع می پیوندد. فرضیه سالم‌سازی از طریق جوان‌سازی از آن‌جا قوت می‌گیرد که حرکت ویروس‌ها در رئوس مریستمی اندام های رویشی جدید با قدرت رشد بالا، بسیار کندتر از سرعت تقسیم سلولی دسته‌جات آوندی بافت‌های گیاهی جدید می‌باشد. بررسی وجود آلودگی درونی بیمارگر در درختان مستقر در کلکسیون سیب با استفاده از روش‌های تشخیصی بهینه سازی شده و قابل اطمینان کشت روی محیط انتخابی، سرولوژیک، آزمون‌های مولکولی مبتنی بر تشخیص اسید نوکلئیک انجام گرفت.

نقش غربال ارقام در برنامه‌های اصلاحی

غربال ارقام یک روش متداول برای اهداف اصلاحی مختلف در باغ ژرم پلاسم (دانهال‌های تصادفی جمع آوری شده)، باغ هیبرید (Selection plot) و یا کلکسیون ارقام و پایه های رویشی اعمال می شود. بر همین اساس، مطالعات هفت ساله میدانی با هدف سطح حساسیت ارقام به بیماری باکتریایی آتشک (*Erwiniaamylovora*) با هدف رکوردگیری از علائم خسارت در سطح باغ کلکسیون در کرج انجام شد. ارقام به صورت برآورد چشمی و با استفاده از سیستم USDA گروه‌بندی شدند. نتایج تجزیه مرکب داده‌های سه ساله حاصل از ارزیابی پس از گروه‌بندی ارقام توسط سیستم نمره دهی GRIN نشان داد از ۹۰ رقم مورد بررسی، ۱۹ رقم (۲۱٪) از کل ژرم پلاسم سیب شامل ۱۰ رقم ایرانی و نه رقم خارجی بسیار مقاوم بودند. ۵۱ رقم دربرگیرنده ۵۷٪ ارقام شامل ۲۳ رقم ایرانی و ۲۸ رقم خارجی نیمه مقاوم، ۱۷ رقم که ۱۹٪ زیست توده شامل سه رقم ایرانی و ۱۴ رقم خارجی حد وسط، و دو رقم ایرانی (۲٪) نیمه حساس بودند (حاج نجاری. ۱۳۹۴). طی تحقیقات ۲۵ ساله اخیر اطلاعات بسیار ارزشمندی شامل شناسایی ارقام تجاری سیب سازگار رایج در جهان، شناسایی ارقام متحمل به تنش‌های زنده مانند پوسیدگی طوقه و آتشک وغیر زنده مانند تنش خشکی و سرمای بهاره، شناخت خصوصیات کلیدی فنولوژی، گروه‌های گرده‌زا، ویژگی‌های میوه‌شناسی و عملکردی ارقام و ژنوتیپ-های پرمحصول بومی و ژنوتیپ‌های امیدبخش موجود در کلکسیون ملی ارقام تجاری بومی و وارداتی سیب تهیه گردید. با استفاده مستقیم از این اطلاعات، ارقام جدید شربتی و گل‌بهار معرفی و نامگذاری شدند، گروهی از ارقام بومی رایج پرمحصول در دفتر ملی ارقام موسسه تحقیقات ثبت و گواهی ثبت شدند. طلاعات به دست‌آمده از ارزیابی ارقام در برنامه‌های به‌نژادی برای انتخاب والدین و تولید ده‌ها رقم امیدبخش و پایه رویشی جدید سیب استفاده شد. سال ۱۳۸۵،

در پایان آزمایشات سازگاری ارقام وارداتی موجود در کلکسیون کرج فهرست ارقام سازگار شناسایی شده در شرایط اقلیمی کرج به معاونت باغبانی ارائه شد. عملکرد ثبت شده این ارقام بدون هرگونه اطلاع از سطح سلامت درختان این آنان صورت گرفت. بدون تردید در صورت عدم آلودگی‌های پنهان ویروسی می توان ظرفیت ژنتیک واقعی ارقام را از نظر عملکرد و کیفیت میوه به نمایش گذاشت.

تاثیر سطح سلامت درختان بر عملکرد

با استفاده از خروجی‌های تحقیقات سازگاری یک برنامه توسعه‌ای با هدف احداث باغ‌های مادری سالم، هسته‌های اولیه کنترل ویروس (Virus tested) گروهی از این ارقام به کشور وارد شد. آزمایشات سازگاری ترکیب‌های پیوندی وارداتی سیب از ایتالیا در پایان قرنطینه دو ساله، طی ۱۲ سال در سه استان البرز، آذربایجانغربی و اصفهان با درختان آلوده هم‌سن همان ارقام مورد مقایسات کیفی و کمی قرار گرفتند. نتایج نشان داد درختان سالم کنترل ویروس از نظر تمامی صفات عملکردی و صفات رویشی نسبت به درختان آلوده برتری داشتند (Mizani and Hajnajari. 2013). بررسی نمونه‌های برگی توسط آزمون‌های الایزا و ملکولی درختان ارقام سیب موجود در کلکسیون در ایستگاه کمالشهر در سال ۱۳۹۲ منجر به ردگیری وتشخیص دو ویروسApMV وTomRSV گردید (میزانی وحاج نجاری. ۱۳۹۲). در پایان آزمایشات سازگاری منطقه‌ای ارقام گالاشنیگا، فوجی روسسو (Mizani and Hajnajari. 2015)، ردچیف و جوناگلد به عنوان ارقام سازگار شناسایی و توصیه شدند (حسنی وهمکاران. ۱۳۹۸، پیرمرادیان وهمکاران. ۱۳۹۷). آلودگی‌های ویروسی در سطح جهانی موجب خسارات فراوان می شود. درختان آلوده به ویروس ارقام متحمل به سرمای انجماد آنتونوفکا (Antonovka) و لندزبرگر رنت (Landsberger Renette) در روسیه یا کاملا خشک شدند و یا به شدت خسارت دیدند، در حالی‌که درختان سالم و عاری از ویروس این ارقام هیچ‌گونه آسیبی ندیدند. مشابه همین واکنش در درختان آلوده به ویروس رقم مقاوم مکاینتاش به *Apple mosaic* و*Apple rubbery wood* مشاهده شد، در حالی که تعداد درخت محدودی از درختان ارقام حساس Golden Delicious, Starkrimson وJonared زنده‌مانی نشان دادند (Zawadzka. 1976). ایجاد هسته‌های اولیه سالم کنترل ویروس و یا عاری از ویروس به منظور بهره‌گیری از ژرم-پلاسم ارزشمند تجاری سیب در برنامه‌های توسعه‌ای سیب‌کاری در کشور به عنوان یک اولویت کاربردی همواره مطرح بوده است. با توجه به گزارش‌های متفاوت از سطوح مختلف آلودگی‌های ویروسی در باغ‌های سیب کشور، طی یک غربال چهارساله وسیع بر نمونه‌های برگی ارقام تجاری سیب پس از هرس جوان‌سازی اقدام به ردگیری و تشخیص سطح سلامت درختان ارقام تجاری کلکسیون سیب در کرج نسبت به آلودگی چهار ویروس مهم سیب صورت گرفت (Keshavarz and Hajnajari. 2021).

اهداف جوان‌سازی (Rejuvenation goals)

پیری درخت موجب تغییر شکل و فرم رویشی تاج می‌شود. اندزه و حجم اسکلت و میزان چوب نسبت به شاخه‌های بارده افزایش می‌یابد. شاخه‌های بیرونی پرحجم می شوند و تبدیل به یک مانع در برابر نفوذ نور به داخل تاج می‌گردند. در این شرایط باردهی بیشتر در بالای تاج صورت می‌گیرد. افزایش سن درختان و تنش‌های محیطی منجر به ضعف بنیه دفاعی و افزایش سطح آسیب‌پذیری درختان در برابر بیماری‌های قارچی، باکتریایی و آلودگی‌های پنهان ویروسی می-گردد. به دنبال آن، تولید جوانه‌های گل، تشکیل میوه و در تهایت عملکرد در درخت کاهش می‌یابد و کیفیت محصول افت پیدا می‌کند. در هرس جوانسازی با حذف منظم و یا فراگیر شاخه‌ها از ۱/۳ تا ۲/۳ اندازه تاج کاهش داده می شود. کاهش عامدانه شدید اندام هوایی منجر به تغییر ساختار درخت می‌شود و نسبت حجمی تاج به ریشه را متحول می‌سازد. هرس سنگین درختان در فصل خواب بین دو زیست توده (Biomass) تاج و ریشه نوعی عدم توازن ایجاد می نماید. ساختار نامتعادل درخت با ورود حجم چند برابری شیره خام از ساختمان حجیم ریشه، اندام هوایی با وفور آب و عناصر غذایی موجود در شیره گیاهی تحریک به رشد رویشی بسیار قوی می‌گردند. بایستی لحاظ نمود که همراه با ورود شیره خام به شبکه آوندی رقم پیوندی، مقادیر قابل ملاحظه‌ای از هورمون‌های سیتوکینینی بیوسنتزشده در رئوس ریشه‌ها به اندام‌های تشریحی پیوندک انتقال می‌یابند (De Klerk et al., 2011). با آغاز فصل رویشی، اسکلت کوچک با دریافت میزان بالای آب و املاح وهورمون‌های رشد، تحریک به تولید انبوهی از جست‌های جدید رویشی سریع الرشد با بافت علفی می‌شود. در هرس جوان‌سازی (Rejuvenation)، حذف انبوه شاخه‌های نوع اول ودوم و تنش دیده مسن درخت موجب تولید اندام هوایی جدید سالم و فعال زیستی می‌شود. واکنش قطعی و اثبات‌شده گیاه به جوان‌سازی علاوه بر بهبود ویژگی‌های رویشی، قدرت تولید گل و میوه و نیز کیفیت محصول بهبود می‌یابد به طوری‌که درخت به مرحله جوانی باز می‌گردد. این واکنش به قدری قوی است که به آن بازیابی قدرت رشد (Reinvigoriment) نیز گفته می‌شود. به غیر از هرس جوان‌سازی، دیگر تیمارها مانند اثر هرس ریشه همراه ویا بدون استفاده از قارچ‌های میکوریز نیز به بهبود کیفیت تاج در کشور چین بررسی شد. شاخه‌های پرحجم اطراف تاج درختان چهل ساله رقم فوجی مانع تمایز و تشکیل جوانه گل، کاهش تعداد میوه و رنگ‌گیری میوه‌های داخل تاج می‌شد. انجام تیمارهای هرس ریشه همراه و بدون قارچ-های میکوریز با هدف بهبود کیفیت شاخه‌بندی تاج صورت گرفت. هرس ریشه نیز می‌تواند موجب جوان‌سازی و

افزایش کیفیت فرم شاخه‌دهی شود. تعداد شاخه‌های بیرونی طی دوسال به ترتیب ۳۳,۹۶ و ۳۸,۵۱ درصد کاهش یافت ولی تعداد جست‌ها روی شاخه‌ها تا ۹۷,۹۹ و ۱۲۳,۶۹ درصد افزایش نشان داد. هر یک از دو تیمار هرس ریشه و میکوریز به تنهایی ارتفاع درختان را به ترتیب معادل ۳۹۰,۲۰ درصد و ۴۷۸,۴۳ درصد و سطح سایه گستر را ۱,۵ تا ۲ متر افزایش دادند. این دو شاخص رشدی توسط تیمار تلفیقی هرس ریشه + میکوریز معادل ۳۸,۷۱ و ۶۰,۲۶ درصد افزایش یافت. با ترمیم تاج برداشت محصول به میزان ۳۱۵,۷۹ و ۳۷۳,۶۸ درصد افزایش یافت. تاثیر تیمار تلفیقی به مراتب بیشتر از هرس ریشه بود (Jingfuet al.,2017). به هر شکل بررسی سطح سلامت درختان پس از جوان‌سازی، استفاده از ابزار و تجهیزات تخصصی برای تشخیص و شناسایی ویروس برای ارزیابی و مدیریت بیماری نقش محوری دارند.

ترکیبات برگی سیب و جوان‌سازی

مطالعات انجام‌شده بر محتوای ترکیبات فنولی برگ‌های سیب نشان داد بین کاشتارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد. کاشتارآلداس (Aldas)، دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها بود. فلوریدزین در دامنه ۷,۷۷ تا ۱۳,۳۶ میلی گرم در لیتر به عنوان رایج‌ترین ترکیب در برگ‌ها بود و 'لیگول' (Ligol) با بیشترین میزان از این ترکیب گزارش شد. بررسی درون شیشه‌ای عصاره‌های برگی کاشتارهای سیب نشان دهنده وجود همبستگی مثبت بین فعالیت قوی انتی-اکسیدانی با میزان کل ترکیبات فنولی و فلانوئیدی طی آزمون‌های مختلف بود (Liaudanskas et al., 2014). نتایج این تحقیقات نشان می دهد همزمان با تحریک قدرت رویشی اندام هوایی، تمامی فرایندهای سوخت و ساز سلولی و نیز بیوسنتز ترکیبات انتی‌اکسیدانی افزایش می یابد. به دنبال افزایشی فعالیت انتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی قدرت دفاعی گیاه بهبود می‌یابد و در نتیجه آلودگی‌های قارچی دفع و یا کم می‌شوند. بر همین اساس، برخی محققین در آمریکای لاتین با هدف مدیریت تلفیقی و تولید محصول سالم به جای کاربرد سموم اقدام به جوان‌سازی درختان رقم هلوی بومی کردند. تیمار جوان‌سازی موجب افزایش رشد شاخه ها، اندازه برگ، تراکم گلدهی، بهبود عملکرد و یکنواختی اندازه میوه ها و از همه مهم‌تر موجب کنترل آفات و بیماری ها گردید. نتایج این بررسی سه‌ساله اثبات نمود تیمار جوان‌سازی به طور معنی‌داری موجب کاهش ابتلای درختان به بیماری‌های قارچی مونیلیا(Monilia) و کورینیوم (Coryneum) نسبت به

شاهد گردید (Williams et al., 1992). در آلمان تیپ‌های متفاوت آلو با میوه‌های بسیار کوچک کشت و کار می شد و رقم Hauszwetsche رایج‌ترین آلو بود. طی یک دوره هفت ساله(۱۹۸۲-۱۹۷۶ میلادی)، یک به‌نژادگر به نام Hartman اقدام به ارزیابی و به‌گزینی ۱۲ کلون برتر آلو از نظر صفات عملکرد، اندازه میوه و قند بالا نمود. سال ۱۹۷۸ ارقام گزینش‌شده را تکثیرکرد و آزمایشات سازگاری را در شش منطقه آغاز کرد. پس از پنج سال در سال ۱۹۸۳میلادی اقدام به پیش‌گزینی (Pre-selection) ژنوتیپ‌های سازگار برای مناطق مختلف کرد. عملکرد در درخت کلون‌های برتر، بیرون از زیستگاه اصلی خود، معادل ۵۰ کیلوگرم در درخت و با میوه هایی با میانگین وزن پایین ۲۸ تا ۲۳ گرم ثبت شد. هارتمن دلیل عملکرد متفاوت و غیریکنواختی اندازه میوه کلون‌ها همراه با تولید سیخک روی شاخه‌ها را به جوان‌سازی نسبت داد. در نهایت شش کلون آلو hüfer, Meschenmoser, Wolff, Gunser, Chraderhof 100 , Etscheid معرفی شدند. وی بدون اشاره به آلودگی‌های ویروسی اذعان نمود پس از هرس جوانسازی قلمه های خشبی سالم برای تکثیر انبوه بین باغداران توزیع شده است (Hartman. 1986).

ترکیبات فاز انتقالی به بلوغ و جوان‌سازی

ژنتیک گیاه مهم‌ترین عامل در تحول و انتقال بافت مریستمی از مرحله جوانی به مرحله بلوغ است. گذر به مرحله گلدهی از بخش بالایی تاج آغاز می‌شود و رفته رفته به پایین تاج گسترش می‌یابد. در عین حال این فرآیند تحت تاثیر عوامل محیطی و یا برخی تیمارها می‌تواند به یک‌باره کل تاج درخت را در برگیرد. هرس جوان‌سازی فرایندی در جهت عکس تغییر فاز دوره نونهالی به بلوغ است. Webster (2005)، اظهار داشت در پایان مرحله جوانی و انتقال به فاز بالغ، نهال بر مبنای الگوی ژنتیک موجود در مریستم‌های انتهایی محتوای متفاوت پروتئین‌ها در مرکبات، و نیز ترکیبات پلی‌پپتیدی در کاشتار گیلاس استلا (Stella) ثبت شده است. برخی ترکیبات پلی‌آمینی ردیابی شده در برگ نهال‌های درختان میوه طی فرآیند تغییر فاز دوره جوانی به بلوغ، در برگ درختان جوان‌سازی شده نیز شناسایی شده‌اند.

واکنش گیاه به آلودگی ویروسی از طریق تغییر متابولیت ها و ترکیبات درون سلولی

در لیتوانی، طی بررسی ترکیبات شیمیایی برگ درختان سیب در شرایط معمول رشد، توسط گازکروماتوگرافی و گازکروماتوگرافی-مس اسپکترومتری، ۲۸ ترکیب شامل انواع روغن فرار، چهار ترکیب ترپنوئیدی و هیدروکربن‌های الیفاتیک ردگیری و شناسایی شد (Judžentienė and Misiūnas. 2017). واکنش آنزیم‌های انتی‌اکسیدانی بر اثر آلودگی ویروس لکه سبزرد سیب (ACLSV) عامل بیماری ویرولا (viruela)، بر رقم اندیکاتور بسیار حساس'GF305' هلو به این ویروس، قبل از انکوباسیون کوتاه مدت و پس از انکوباسیون بلند مدت با تیمار سرمایی مطالعه شد. انکوباسیون کوتاه مدتACLSV موجب تغییرات معنی‌دار فعالیت‌های اسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز گردید. اعمال انکوباسیون بلندمدت هیچ‌نوع علائم ظاهری روی برگ‌ها و خسارت به غشاهای سلولی مزوفیل هلو از نوع پراکسایش لیپیدها تولید نشد، ولی علی‌رغم هرگونه واکنش ریخت‌شناسی بررسی‌ها نشان داد افزایش ترکیبات آنزیمی و همچنین فعالیت‌های انتی‌اکسیدانی برگ‌ها در چرخه آنزیمی ascorbate–glutathione cycle با فعالیت‌های آنزیمی glutathione-S-transferase و superoxide dismutase همبستگی داشت (García-Ibarra al., 2011). سایر بیمارگرها نیز به صورت مشابه عمل می‌کنند. برای مثال بیمارگر پوسیدگی طوقه در بافت‌های گیاهی میزبان، تغییرات فیزیولوژیک ایجاد می‌کند. علاوه بر این، تغییراتی نظیر اختلال در سوخت و ساز اسیدهای آمینه، افزایش محتوای کل قند، کاهش جزئی محتوای سلولز و سطح نیتروژن، پتاسیم و فسفرکل گزارش شده است. سطح فتوسنتز و تبخیر و تعرق گیاهان آلوده به بیمارگرهای ویروسی دچار ایستایی شد (Nakova. 2011).

فرآیند فعالیت ویروس در میزبان

بیمارگر ویروسی چرخه سوخت و ساز سلول میزبان را به خدمت می‌گیرد و سنتز پروتیین در سطح ریبوزوم را از مسیر مورد نیاز و طبیعی گیاه میزبان خارج می‌کند به طوری‌که گیاه مجبور به سنتز پروتئین‌های ویروس می‌شود. بیماری‌های ویروسی در بسیاری از موارد در گیاهان علائم آشکار ایجاد نمی‌کنند بلکه به صورت پنهان توان تولیدی درختان آلوده را کاهش می‌دهند و اثر منفی بر کیفیت و عملکرد محصول می‌گذارند. وقتی غلظت ویروس در درختان جوان و مسن در سطوح پایین باشد هرچند علائم مشهودی ایجاد نمی‌شود ولی افت عملکرد، کاهش اندازه میوه، عدم رنگ گیری

کامل، کاهش تراکم رنگ رویی از جمله نشانه‌های نامحسوس فعالیت وخسارات بار ویروس‌ها به‌شمار می‌روند (Mizani and Hajnajari . 2013).بیشترین میزان غلظت ویروس *Apple mosaicvirus* در برگ‌های جوان نهال‌های آلوده به ویروس جوان چهار رقم سیب قبل از شروع گلدهی مشاهده شد. در اواخر فروردین میانگین غلظت ویروس ApMV در برگ‌ها ۱/۹ برابربیشتر از گلبرگ‌ها ، ۴۱ برابر بیشتر نسبت به جوانه‌های خواب و ۸۱ برابر بیشتر از بافت زاینده بود. غلظت ویروس در نمونه‌های برگی جوان برداشت شده پس از فروردین ماه به مرور کاهش یافت به طوری که در مرداد میزان آلودگی به صفر رسید (Svoboda and Polak. 2010).برای ردگیری ASPV با استفاده از روش پیوند دوبله (Double grafting method) از رقم محک سیب Spy 227 استفاده شد.ناسازگاری بین پایه پیوندک و علائم epinasty روی گیاه محک ظاهر شد (Brakta et al., 2015).

علائم اختصاصی بیماری ویروسی

بررسی‌های سالانه درختان طی ارزیابی خصوصیات رویشی ارقام سیب مستقر در کلکسیون علائم پس‌رفت رشدی، کاهش شادابی وسلامت اندام هوایی مشاهده شد. جدای از علائم مربوط به فقر عناصر معدنی مهم چون آهن، کلسیم، پتاسیم و روی مانند کم برگی، کاهش سبزینگی، زرد برگی، سوختگی حاشیه برگ‌ها علائمی چون ریزبرگی، رزت شدن سرشاخه ها، کتابی شدن وخمیدگی سرشاخه‌های علفی ثبت گردید. به دنبال شدت یافتن علائم درختان دچار زوال شدند به طوری‌که این درختان طی سال‌های بعد در مرحله‌های شروع گلدهی، تمام گل تا فندقه سبز خشک شدند. مجموع این علائم نشان دهنده آلودگی‌های ویروسی در باغ ارقام تجاری کلکسیون کرج بودند که قبل از شروع غربال مشخص نبود. این مطالعات و بررسی‌های ملکولی منتج به ردگیری وتشخیص ۲۶ درخت آلوده به دو ویروس و شش درخت آلوده به سه ویروس گردید (جدول ۴). درختان آسیب دیده به طور معمول پس از یک دوره سه تا پنج ساله از ظهور علائم مختلف دچار ضعف و زوال می شدند. بررسی های Mizani and Hajnajari (2013) نشان داد آلودگی های پنهان موجب افت شدید قدرت رشد، تغییر ساختار درخت، افت کیفیت میوه مانند کاهش قند کل میوه (Brix Grade)، بروز ناهنجاری های فیزیولوژیک و کاهش چشمگیر عملکرد در درخت می گردند.

مبارزه

کنترل بیماری‌های ویروسی به دلیل پیچیدگی، قابلیت انتقال ویروس و نیز تغییرپذیری ژنتیکی بالای آن بسیار دشوار است (Elena et al., 2014). راه‌های مبارزه با آلودگی‌های ویروسی می تواند استفاده از ارقام مقاوم ، پیشگیری از انتشار

ویروس از طریق قرنطینه، حذف گیاهان آلوده، کنترل ناقل‌های طبیعی، سالم سازی، صدور گواهی سلامت و دیگر روش ها باشد.

ایمن سازی (Immunization) گیاه از طریق به‌نژادی

یکی از راهبردهای کنترل آلودگی استفاده از ارقام مقاوم است. این مقاومت می‌تواند از طریق مقاومت ژنتیکی ناشی ازبه‌نژادی، انتقال ژن و یا دیگر روش‌ها باشد. به‌نژادی برای ایجاد مقاومت به ویروس در گیاهان همواره به عنوان موثرترین و ساده‌ترین راه برای جلوگیری از خسارت‌های حاصل از بیماری‌های ویروسی کاربرد دارد. سازوکارهای مقاومت بسیار متفاوت و تحت اثرات متقابل مراحل چرخه ویروس و گیاه میزبان می باشد. مقاومت به آلودگی می‌تواند دارای تفاوت‌هایی از نظر اختصاصی بودن، پایداری و ماندگاری داشته باشد. به‌نژادی برای مقاومت به ویروس یک فرایند طولانی و پرهزینه است، بنابراین برای مقرون به صرفه بودن الزاما بایستی از حفاظت ماندگار برخوردار باشد. امکان‌پذیر بودن پیش‌بینی ماندگاری مقاومت ژنتیک میزبان به بیماری ویروسی بستگی به طبیعت مقاومت، تغییرات ژنتیک لازم برای یک ویروس برای غلبه به مقاومت میزبان و تاثیر این تغییرات بر سازگاری ویروس دارد (Lecoq et al., 2004). تغییرات ژنتیک مورد نیاز برای داخل کردن ژن‌های مقاومت از کاشتارهای تجاری یا گونه‌های وحشی به ارقام حساس با استفاده از تلاقی‌های برگشتی رایج‌ترین روش ایمن سازی در برابر آلودگی‌های ویروسی است. ایمن سازی به دو شکل است.

۱-مقاومت مستقیم از نوع واکنش فوق حساس است که توسط پروتئین‌های مقاومت هدایت می‌شود. رمزگزاری شده با الل‌های غالب (Dominant alleles) به طور مشخص قادر به شناسایی یک توالی یا یک الگوی تطبیقی از ویروس ژن است(Avirulence determinant, Avr) که القاکننده مرگ سلول آلوده است. در شرایط مرگ سلولی، امکان انتقال ویروس به سلول‌های مجاور از بین می‌رود و از ایجاد آلودگی سیستمیک جلوگیری می‌شود (Rubio et al., 2020). به این ترتیب ژن‌های ویروس مهلک خاموش و غیر فعال می‌شود (Gene silencing). تیم پژوهشگر چین و ژاپنی از تولید واکسن گیاهی بر علیه یک ویروس,(ALSV) *Apple latent spherical virus* ایزوله شده از درخت سیب در ژاپن خبر می دهند (Li et al., 2019). سطح مقاومت یا تحمل میزبان به آلودگی به احتمال با نبود آلودگی و فقدان علامت از طریق آنالیز زنده‌مانی میزبان قابل ارزیابی است.

۲-مقاومت غیرفعال توسط الل‌های مغلوب مقاوم (Resistance recessive alleles) گیاه میزبان علیه ویروس مهاجم رمزگزاری می‌شوند (Shahriar and Islam. 2021). به‌نژادگران به طور معمول به دنبال مقاومت کامل در ژرم پلاسم و کاشتارهای درختان میوه هستند به طوری‌که ویروس در آن‌ها آلودگی سیستمیک ایجاد نکند. آزمون الایزا و

هیبریداسیون ملکولی ابزار مناسبی برای تشخیص بررسی مقاومت تعداد زیادی از ژرم‌پلاسم و کاشتارهای تجاری به صورت همزمان می‌باشد (Saade et al. 2000). در صورت امکان‌پذیر نبودن ایجاد مقاومت کامل در عملیات به‌نژادی، می‌توان از مقاومت نسبی به معنای کاهش انباشتگی ویروس یا کاهش غلظت ویروس نیز بهره گرفت. در همین جهت تحمل نسبی به مفهوم کاهش خسارت ویروس بدون تاثیر بر تکثیر آن نیز می‌تواند راهکار مناسبی باشد (Rubio et al., 2020). به هرشکل، به‌نژادی برای مقاومت به ویروس برای بسیاری از گونه های گیاهی و ویروسی به علت نادر بودن ژن‌های مقاوم در خویشاوندی‌های ژنتیک سازگار متناسب نیست. ژن‌های موتانت‌های مقاوم به ویروس می‌توانند در بسیاری از اعمال مهم زیستی دخالت نمایند لذا احتمال واکنش‌های نامطلوب و غیرمنتظره در فرآیند رشد و فیزیولوژی گیاه در این موتانت‌ها دور از انتظار نیست. به همین دلیل برخی محققین (Sicora et al., 2011) اظهار داشتند علی‌رغم گسترش فنون بیوشیمی گیاهی و فناوری‌های ریز ملکولی، برنامه‌های جهش زایی گیاهان دچار وقفه شده اند. اکنون تلفیق تنوع با جمعیت‌های جهش‌یافته با استفاده از روش‌های بسیار جدید غربال، شناسایی صفاتی که از طریق متدهای غربال کلاسیک به‌نژادی امکان پذیر نبود در سطح ملکولی میسر شده است. به‌نژادگران اقلیم گیاهی علاقمند به تنوع ژنتیک میزبان هستند ولی نبایستی از تنوع ژنتیک ویروس_ها غفلت شود. شناسایی واریانت‌های ویروس با جهش‌های ناگهانی آن با استفاده از Multiplex real-timeqPCR به عنوان ابزار ارزشمندی برای شناسایی انتشار سه ویروس مهم سیب برشمرده شده است (Menzel et al.,2002). یک روش دیگر مصون سازی حفاظت تقاطعی (Cross-protection) ایجاد مقاومت علیه سویه های خشن و مهاجم ویروس از طریق واکسینه کردن گیاهان با تلقیح سویه ضعیف شده همان ویروس است (Pechinger et al., 2019).

مدیریت بیماری ویروسی

مدیریت بیماری ویروسی نیاز به تشخیص دقیق و سریع جنس، خانواده، نژاد (Strain) یا واریانت (Variant) بیمارگر دارد. فنون تشخیص و کنترل ویروس دربرگیرنده شاخص‌هایی چون دقت، سطح ردگیری، شناسایی همزمان چند آلودگی (Multiplexing)، تعیین کمیت (Quantification) و قابلیت طراحی (Designability) می‌باشد.کنترل بیماری-های ویروسی در دو محور اصلی مصون سازی با استفاده از ارقام مقاوم و انجام اقدامات حفاظتی برای جلوگیری از انتشار ویروس خلاصه می‌شود (Rubio et al., 2020).

اقدامات پیشگیرانه

اقدامات پیشگیرانه دربرگیرنده مجموعه‌ای از روش‌های بسیار متفاوت است. این افدامات عبارتند از: ۱) وارد کردن ترکیب‌های پیوندی کنترل ویروس درختان میوه از خارج از کشور، قرنطینه دو ساله گیاهان زیر نظارت سازمان حفظ

نباتات، ۲) خرید و وارد کردن هسته‌های اولیه عاری از ویروس کاشتارها و یا پایه‌های رویشی در شرایط درون شیشه با اخذ گواهی سلامت از کشور مبدا، ۳) وارد کردن پیوندک و قلمه ارقام با گواهی از کشور مبدا، ۴) صدور گواهی سلامت عاری از ویروس (Virus free) و کنترل ویروس (Virus tested) برای ارقام و پایه های‌رویشی در دست تکثیر در نهالستان‌ها که همگی برای جلوگیری از ورود و انتشار آلودگی در جغرافیای باغبانی کشور به‌شمار می‌روند. هرچند عملیات قرنطینه بر آن گروه از مواد گیاهی که به صورت رسمی به کشور وارد می‌شود توسط سازمان حفظ نباتات صورت می‌گیرد ولی هیچ گونه اقدامات پیشگیرانه‌ای در نهالستان ها، جا به‌جایی و توزیع نهال در سطح داخلی بین استان ها صورت نمی‌گیرد. شیوع غالب بیماری‌های ویروسی به دلیل نبود باغ های مادری سالم دراغلب مناطق تولید نهال کشور می‌باشد.

سطوح ردگیری ویروس

شناسایی صحیح ویروس‌ها برای مدیریت بیماری یک مرحله چالشی است. ردگیری و شناسایی ویروس‌ها بر اساس اختصاص یک ویروس در یک نمونه گیاهی به گروهی از ویروس‌ها با ویژگی‌های مشترک می‌باشد. در بسیاری از موارد به شناسایی گونه ویروس یا استفاده از فنون سرولوژیک بسنده می‌شود، ولی ردگیری می‌تواند واحدهای طبقه بندی‌شده (Taxonomic) بالاتر تا تعیین جنس و خانواده و یا در اجزای ریزتر در حد نژاد (Strain) نظیر شناسایی واریانت ها، موتانت‌ها یا سرو تایپ‌ها (Serotypes) با مشخصات متمایز زیستی یا ملکولی از طریق به‌کارگیری مونوکلونال انتی‌بادی‌ها (Monoclonal antibodies) باشد (Kusano et al., 2014). ظهور فناوری‌های توالی‌یابی با توان بالا (High-Throughput Sequencing) یک انقلاب در زمینه تشخیص ویروس‌های گیاهی است. کشف ویروس جدید لوتئوویروس (luteovirus) در سیب از این جمله است (Liu et al., 2018). از دیگر فناوری‌ها می‌توان از Single-Molecule Real-Time (SMRT) و توالی‌یابی نانوحفره (Nanopore sequencing) نام برد (Davis et al., 2013). ردگیری ویروس بایستی بر اساس روش‌های حساس و در طیف گسترده صورت گیرد، تا آن‌جا که گفته می‌شود حذف مواد عاری از ویروسی که مشکوک به آلودگی هستند به دلیل ریسک انتشار مواد آلوده و گسترش بیماری ارجحیت دارد. بهره‌گیری از تجهیزات ردگیری در محل، به شدت در تصمیم‌گیری سریع برای جلوگیری از واردات و صادرات ژرم پلاسم آلوده و شیوع بیماری کمک می‌کند. توالی‌یابی با ظرفیت بالا High-Throughput Sequencing (HTS)که به عنوان توالی‌یابی نسل بعد شناخته می شود که در کشف انواع آلودگی‌های ویروسی موجود در نمونه‌های بسیاری از محصولات باغبانی کارآیی بسیار بالایی داشته است. در سطح جهانی، استقبال روزافزونی از این ابزار در قرنطینه و نهالستان‌ها به چشم می‌خورد (Maree et al., 2018).

سالم‌سازی

در شرایطی که هسته اولیه سالم ارقام و کاشتارهای تجاری ارزشمند در دسترس نباشند تولید گیاهان سالم با حذف ویروس‌های اصلی هر محصول برای عینیت بخشیدن و شکل‌گیری یک باغبانی پیشرو و اقتصادی ضرورت می‌یابد. سالم‌سازی با بهره‌گیری از فنون مختلف گرمادرمانی (Thermotherapy)، شیمی‌درمانی (Chemotherapy)، برق درمانی (Electrotherapy)، سرمادرمانی (Cryotherapy) و کشت بافت به تنهایی و یا در تلفیق با دیگر فنون انجام می گیرد (Magyar Tábori. 2021). روش‌های مختلفی چون کشت رئوس مریستمی (Shoot tip culture)، گرمادرمانی، شیمی درمانی و یا ریزپیوند (Shoot tip-grafting) به تنهایی و یا در تلفیق با یکدیگر برای حذف آلودگی‌های ویروسی از درختان میوه و پایه های رویشی کاربرد یافته است. تیمار گرمادرمانی در درجات دمایی مختلف، شیمی درمانی با استفاده از انتی ویروس ریباویرین (Ribavirin) به تنهایی و یا در تلفیق با دیگر تیمارها برای حذف سه ویروس *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem grooving virus*(ASGV), and *Apple stem pitting virus* (ASPV) از رقم سیب Xinhongjiangjun رایج در کشور چین به عنوان بزرگ‌ترین تولیدکننده جهانی سیب اعمال شد. کارآیی حذف آلودگی‌ها با استفاده از دو جفت آغازگر برای هر ویروس توسط RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction) مشخص گردید. استفاده از ۱۵ و ۲۵ میکروگرم/میلی لیتر ریباویرین علی‌رغم کند کردن رشد رویشی مواد گیاهی، با حذف ۷۴/۴ ٪ تا ۷۵٪ از آلودگی ویروسی زنده مانی تمام گیاهان حفظ شد. میانگین نرخ حذف ویروس در تیمار دمایی ۳۶-۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ روز حداکثر به ۴۵ ٪ رسید. افزایش دما موجب افزایش معنی‌دار رشد و تکثیر نمونه‌ها شد ولی در دمای C ۰/۵± ۳۸ هیچ شاخه جانبی رشد نکرد. تلفیق تیمارهای گرمادرمانی C^o ۳۶ با شیمی درمانی (25 µg/ml) نرخ حذف ویروس ها تا ۹۵٪ افزایش یافت. کارآیی حذف آلودگی ویروسی از جوانه های انتهایی و جانبی به ترتیب برابر ۶۵/۳٪ و ۷۲/۷٪ بود. نتایج این بررسی نشان داد حذف ASPV آسان‌تر از حذف ACLSV و ASGV بود (Hu et al., 2015). کشت رئوس مریستمی نمونه‌های برگرفته از درختان سیب ارقام Danhong, Hongan, Saenara, Summerdream به مدت چهار هفته تحت گرمادرمانی در دمای ۳۷^oC قرار گرفتند. سپس با استفاده از آغازگرها اقدام به ردگیری چهار ویروس مهم سیب توسط RT-PCR گردید. میزان سالم سازی ارقام سیب به ترتیب برابر ۲۸٪، ۱۶٪، ۱۲٪ و ۱۲٪ بود. آنان نتیجه گرفتند گرمادرمانی روش مناسبی برای

تولیدگیاهان سالم است (Li et al., 2013). برای کاهش خسارات حاصل از انتشار وسیع *Apple proliferation virus* در نهالستان‌ها و باغ‌های مسن سیب روش‌های مبارزه متفاوتی به کار گرفته شده است. در اولین تیمار کنترل فیزیکی، قرار دادن نهال‌های آلوده سه ساله سیب به مدت دو روز در هوای گرم ۳۸°C اثر درمانی اساسی داشت، به حدی که فعالیت حیاتی میکوپلاسمادر محل پیوند نیز متوقف شد. این تیمار در جوانه‌های نهال‌های پیوندی ناهنجاری هورمونی کم‌تری در مقایسه با شاهد (تیمارنشده) ایجاد نمود. دومین تیمار: روی قلمه‌های ارقام سیب در دمای ۵۰°C تا ۵۵٪ موفقیت داشت و جوانه‌ها هیچ مشکلی نداشتند. سومین تیمار: غوطه‌ورسازی قلمه‌ها در آبگرم ۵۰°C برای دو ساعت بسیار خسارت بار بود. چهارمین تیمار: پرتودهی با اشعه ایکس و ماوراء بنفش اثرات در حد متوسط نشان داد. تیمارهای شیمی‌درمانی مورد استفاده در اولین تیمار: موثرترین داروهای شیمیایی شناسایی شده با سمیت کمتر به ترتیب نزولی عبارتند از:

۱-Pyoctamin 1%0 ۲-Chloramphenicol 1%0 ۳ و ۴-Penicillin وTetracyclin با اثر درمانی ۱۰۰٪. و میزان موفقیت به ترتیب۵۵٪، ۴۴٪، ۳۵٪ و ۲۲٪ را داشتند. چهار دارو از نه داروی آزمایش شده بر درختان همان ارقام در مرحله باردهی طی دو سال، بر اساس متغیرهای رقم وسیستمیک بودن دارو، دامنه واکنش وسیعی در قابلیت انتقال مشاهده شد. برای مثال در آخرین تیمار ۰٫۱٪ Benlate، Derosal، ۰٫۰۷۵٪، ۰٫۱٪ Topsin M و در نهایت ۰٫۲٪ Kasumin، در ۱۶ واریانت شدت بیماری کاهش نیافت بلکه موجب افزایش میزان خسارت در گیاه میزبان گردید (Gheorghiu. 1976)

احداث اولین باغ‌های کنترل ویروس سیب در کشور

در الگوی جدید واردات ژرم پلاسم، قبل از سفارش ترکیب‌های پایه پیوندی درخواستی، تعداد نهال از هر ترکیب پیوندی و مناطق مختلف آزمایشات سازگاری به صورت هدفمند مشخص شد. در یک پروژه ملی از ۲۰ ترکیب پایه پیوندی، همواره ترکیب نهال شاهد پایه-رقم گلدن دلیشز بر پایه بذری همسال انتخاب شد. پایه‌های رویشی جدید سالم کنترل ویروس برای همه مناطق اختصاص یافت. سال ۱۳۸۴، پس از دریافت نهال‌های ترکیب‌های پیوندی کنترل ویروس یک ساله تامین‌شده در حد قابل قبول در چهار استان البرز، اصفهان، خراسان رضوی و آذربایجانغربی توزیع شد. در شرایطی که تحقیقات و تاسیسات سالم‌سازی ابتدایی در کشور پا نگرفته بود، برای اولین بار دسترسی محدود به هسته های اولیه عاری از ویروس ترکیب های پیوندی تجاری سیب میسر شد. ویژگی‌های نهال با ذکر نام رقم-پایه رویشی و

سطح سلامت گیاهان از آلودگی‌های ویروسی توسط برچسب‌های آبی و سفید رنگ الحاقی همراه با گواهی سلامت عاری از ویروس‌های مهم مورد نظر از سوی مؤسسه تحقیقات میوه کاری رم ارائه شد. به این ترتیب، همزمان ۵۸۰ اصله از رقم پایه های رویشی (Cultivar rootstock) مالینگ و مالینگ مرتون عاری از ویروس MM111، M26، MM106، M9با اهداف تحقیقات کاربردی پس از قرنطینه احداث کلکسیون پایه، تشکیل هسته‌های اولیه، باغ مادری پایه سالم با احداث خزانه تکثیر عاری از ویروس بین چهار استان توزیع شد. زمستان ۱۳۸۷، چهار باغ تحقیقاتی عاری از ویروس در مناطق ایزوله استان‌های هدف احداث شد (حاج نجاری. ۱۳۹۰). تحقیقات سازگاری منطقه‌ای ارقام در قالب طرح ملی کلید خورد. صفات رویشی و نیز بررسی تجانس (Graft affinity) هر یک از ارقام بر پایه های کلونی انتخابی همراه با مقایسه با گیاهان هم‌سال آلوده(شاهد) انجام پذیرفت. در پایان ارقام فوجی کیکو، گالاشنیگا، ردچیف و جوناگلد معرفی شدند. متاسفانه آمار دقیقی درخصوص نهال‌های آلوده در کشور و شیوع آلودگی‌های ویروسی در دست نیست. به احتمال زیاد یکی از دلایل عمده میانگین عملکرد در واحد سطح پایین باغ‌های سیب کشور به دلیل عدم سلامت نهال ونیز نبود علائم ویروسی بویژه در سنین جوانی نهال می باشد. طی دو دهه اخیر تحقیقات وسیعی بر تاثیر سلامت نهال بر کیفیت و کمیت محصول و صفات رویشی درختان سیب صورت گرفته است که در ذیل به آن اشاره خواهدشد.

ارزیابی عملکرد درختان کنترل ویروس و آلوده

و سلامت منطقه به علت عدم کاشت درخت‌های میوه قبل از احداث سیب بود. نتایج بررسی های سه ساله در باغ آزمایشی کنترل ویروس ایستگاه مشکین آباد در مقایسه با درختان آلوده به ویروس باغ تحقیقاتی کمالشهر نشان داد درخت‌های آلوده توانایی تبدیل گل به میوه کمتری نسبت به درخت‌های سالم دارند. در مجموع، آلودگی‌های ویروسی باعث کاهش قدرت رشد، عملکرد و حتی زوال درخت‌های آلوده شدند (میزانی و حاج نجاری. ۱۳۹۲). هرچند در تعداد زیادی از تلفیق‌های ویروس- میزبان سرعت تنفس افزایش می‌یابد ولی بافت‌های میزبان نکروزه نمی‌شوند. ممکن است این وضعیت قبل از ظاهر شدن علائم ویروسی ایجاد شود و پس از توسعه بیماری ادامه یابد. سطح تنفس گیاهان در آلودگی‌های مزمن اغلب کمتر از مقدار طبیعی است (Meijnske et al., 1975)، در نتیجه درخت‌های آلوده توانایی کم‌تری در تشکیل میوه نسبت به درخت‌های سالم دارند (Meijnske et al., 1975; Engel. 1990). نتیجه پژوهش های انجام شده در کرج، ارومیه و سمیرم نشان داد عامل‌های ویروسی بر ویژگی‌های وزن میوه، تعداد عدسک، طول دم میوه، طول میوه، نسبت طول به قطر میوه و نیز ویژگی عملکردی درصد میوه‌بندی درخت‌های آلوده تاثیر منفی داشت (پیرمرادیان و همکاران. ۱۳۹۷؛ حسنی و همکاران. ۱۳۹۸). هر گونه کاهش در سطح فتوسنتز به احتمال موجب بروز اختلال‌های متفاوت فیزیکی و شیمیایی می‌گردد. بر اساس نتیجه‌های پژوهش‌های مختلف در سطح جهان، با افزایش سن درخت‌های آلوده و افزایش غلظت ویروس‌ها در اندام‌های رویشی، به ویژه در برگ‌ها به عنوان واحدهای فتوسنتزی،

کاهش کیفیت میوه از دیدگاه ویژگی‌های ظاهری، شکل، اندازه، شدت رنگ رویی و ارزش غذایی نیز سرعت می‌یابد. به نظر می‌رسد افزایش سرعت زوال و کوتاهی عمر درخت‌ها به دلیل کاهش سطح فتوسنتز با توجه به شکل تخریبی ویروس‌ها در انحراف تولید زیستی طبیعی آمینواسیدها و عدم تشکیل پروتئین‌های مورد نیاز در گیاه میزبان باشد. پژوهش‌های مقایسه ای بین درختان سالم و آلوده در کرج نشان داد پس از ریزش های سه گانه درصد میوه‌بندی و قدرت حفظ میوه با افزایش تعداد ویروس‌های مهم کاهش یافت (Mizani and Hajnajari. 2013). با توجه به نتیجه‌های پژوهش‌های بومی در خصوص کاهش درصد میوه‌بندی و عملکرد گیاهان آلوده می‌توان اذعان داشت علی‌رغم وجود ساعت‌های آفتابی زیاد، سطح تشعشع بالا و رطوبت نسبی پایین شرایط اقلیمی مطلوبی در مناطق عمده تولید سیب کشور، آلودگی‌های ویروسی یکی از عامل‌های مؤثر در پایین بودن سطح عملکرد در واحد سطح سیب بشمار می رود (منوچهری و اسکندری. ۱۳۷۴). بیمارگرهای ویروسی به راحتی هم از طریق ابزارهای باغبانی، پیوند و نیز توسط ناقل‌هایی چون قارچ‌ها، حشرات مکنده و یا نماتدها انتقال می‌یابند و درون گیاه از سلول به سلول منتقل می‌شوند (Oparka, et al., 2001)، رعایت استانداردهای لازم در خصوص حفظ فاصله باغ‌های مادری سالم برای حفاظت از مواد گیاهی عاری از ویروس ضرورت دارد.

جوان‌سازی و سطح سلامت درختان مسن سیب درکرج

این آزمایش با غربال درختان مسن ارقام تجاری سیب با هدف ردگیری و تشخیص سطح سلامت یا آلودگی گیاهان بر هر سه درخت (تکرار) سیب متعلق به ۳۳ رقم انتخابی تجاری، فرم تربیت جامی بر پایه های بذری از ۹۳ رقم و نژادگان بومی امیدبخش و وارداتی کلکسیون ملی ارقام تجاری واقع در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمالشهر کرج صورت گرفت. جدای از تاثیر پایه‌های بذری در کنترل سطح آلودگی ویروسی در مقایسه با پایه های رویشی، تاثیر تیمار جوان‌سازی با درنظر گرفتن متغیرهای اقلیمی مانند سطح بالای تشعشع، شدت بالای تابش آفتاب طی روزهای بلند و گرم در کرج، مبنای این فرضیه قرار گرفت که اندام‌های رویشی بسیار جوان تحت تاثیر شرایط اقلیمی و گرمادرمانی طبیعی بر سلامت مریستم های تازه تشکیل یافته حداقل در گروهی از درختان تاثیر گذار باشند. به این منظور، پس از یک هرس خشک و سنگین در زمستان ۱۳۹۱، حجم تاج درختان به میزان دو سوم کاهش داده شد. برتری نسبی حجم بالای ریشه به تاج موجب رشد انبوهی از شاخه های نورست و جوانسازی گیاهان در سال ۱۳۹۲گردید. به منظور بررسی تاثیر عامل مدیریتی هرس سنگین و عامل محیطی دمای بالا بر سطح آلودگی ارقام انتخابی با عملکرد بالا، نمونه های برگی طی سال های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶، در سه نوبت طی سه فصل مختلف از هر سه درخت تهیه و مشخصات نمونه ها ثبت شدند (جدول ۱,۱).

جدول ۱,۱. فهرست سومین سری از نمونه های برگی تهیه شده حسب شماره درخت از ارقام کلکسیون قدیم سیب کمالشهر برای انجام آزمون الایزا . ۱۳۹۶/۰۶/۲۸					
ردیف	رقم	شماره درخت	ردیف	رقم	شماره درخت
۱	مشهد نوری	درخت ۱ ، ۲	۱۷	مربایی	درخت ۲ ، ۳
۲	گل‌بهار	درخت ۳	۱۸	آی آر آی ۶	درخت ۲
۳	قندک کاشان	درخت ۲ ، ۳	۱۹	خورسیجان	درخت ۱ ، ۲
۴	شیخ احمد	درخت ۱ ، ۲	۲۰	زنوز مرند	درخت ۱
۵	یلوترانسپارنت۱	درخت ۲	۲۱	اخلمد مشهد	درخت ۱، ۲ ، ۳
۶	امپایرآل رد۱	درخت ۳	۲۲	اورلئان	درخت ۳
۷	نایان ارنگه	درخت ۲	۲۳	شیشه ای تبریز	درخت ۱
۸	رد رم بیوتی	درخت ۲ ، ۳	۲۴	پاییزه مشهد	درخت ۳
۹	گلوکناپفل	درخت ۱	۲۵	کوپر فوز	درخت ۲ ، ۳
۱۰	جاناتان ۱	درخت ۳	۲۶	اردبیل ۱	در خت ۱ ، ۳
۱۱	پرایم گلد	درخت ۳	۲۷	گانی بیوتی	درخت ۲ ، ۳
۱۲	رد اسپور کوپر	درخت ۲،۳	۲۸	کوپر اسپور	درخت ۲
۱۳	یلو اسپور	درخت ۲ ، ۳	۲۹	گلدن اسموتی ۲	درخت ۲ ، ۳
۱۴	گرانی اسمیت	درخت ۱ ، ۲ ، ۳	۳۰	شربتی	درخت ۱، ۲ ، ۳
۱۵	سلطانی شبستر	درخت ۲	۳۱	اسکارلت ویلسون	درخت ۳
۱۶	اردبیل ۲	درخت ۲ ، ۳			

*: نمونه های برگی ارقام پس از هرس جوان‌سازی از جهات مختلف درختان سیب برداشت شد.

* درختان ارقام آزایش و زینتی به دلیل فرسایش ژنتیک تهیه نمونه مطلوب امکان‌پذیر نشد.

آزمون الایزا

نمونه_های برگی به آزمایشگاه بخش بیماری‌های ویروسی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی منتقل شدند و تحت سه غربالگری قرار گرفتند (جدول‌های ۱ تا ۳). سه غربال متوالی برای ردگیری، تشخیص چهار ویروس زیر در گیاهان در برنامه تشخیص قرار گرفت:

۱- ویروس لکه سبزرد سیب (ACLSV)*Apple Leaf CloroticLeaf Spot Virus*

۲-ویروس لکه حلقوی سیب(ASPV)*Apple Stem Pit Virus*

۳-ویروس لکه شیاری سیب(ASGV) *Apple Stem Pitting Virus*

۴-ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی(ToRSV) *Tomato Ring Spot Virus*

غربالگری اول:برای ویروس لکه سبزرد سیب (ACLSV)*Apple Leaf Clorotic Leaf Spot Virus*

غربالگری دوم:برای دو ویروس لکه حلقوی سیب*Apple Stem Pit Virus (ASPV)*و لکه شیاری سیب *Apple Stem Pitting Virus* (ASGV)

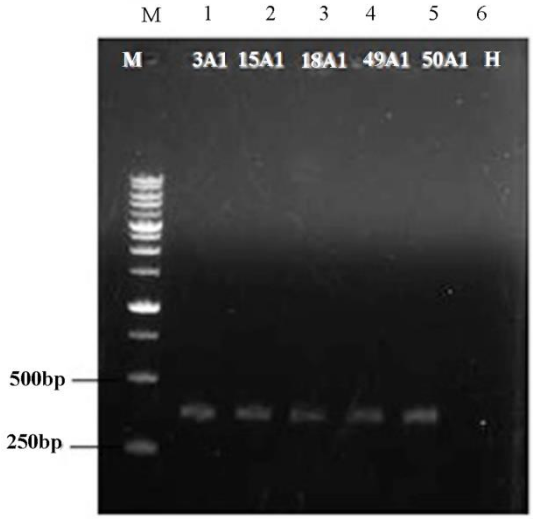
غربالگری سوم برای چهار ویروسASGV، ToRSV،ACLSV، ASPV

جدول۱: نتایج آزمون الایزا در غربالگری اول برای ویروس لکه سبزرد سیب بر ۳۵ رقم سیب انتخابی

رقم (Cultivar)	تکرار (شماره درخت Tree Number)		
	تکرار درخت ۱	درخت ۲ تکرار	درخت ۳ تکرار
گلبهار	–	–	+
شیخ احمد	+	+	
امپایرآل رد	–	+	+
رد رم بیوتی	+	–	–
گلوکناپفل	–	+	–
نوردرن اسپای	+	+	–
رد اسپور کوپر	+	–	+
گرانی اسمیت	+	+	–
مشهد	+	+	–
سلطانی شبستر	+	+	–
اردبیل۲	+	–	–
گلدن اسموتی	+	+	
رد اسپور	+	–	–
قرمز رضاییه	+	–	+
مربایی	+	–	+
آی آر آی۶	–	+	–
خو.رسیجان	+	+	–
زنوز مرند	+	+	–
اخلمد مشهد	+	–	+
اورلئان	+	–	+
شیشه ای تبریز	+		+
پاییزه مشهد	+	+	–
گراونشتاین	–	+	+
یلوترانسپارنت	–	–	+
اردبیل ۱	+	+	–
گلدن دلیشز	+		+
کوپر اسپور	+		+
عسلی	+	+	
شربتی		+	+
زینتی	+	+	
شفیعی	+	+	
آزایش	+	+	
گلشاهی	+	+	

گروه بندی ارقام بر اساس سطح سلامت/آلودگی

با انجام سه بار نمونه برداری متوالی از درختان مسن سیب در فصول و مراحل مختلف رشد موجود در کلکسیون ارقام تجاری بومی وارداتی و تلفیق نتایج سه بار غربالگری نسبت به چهار ویروس مهم سیب شامل ASGV،ACLSV، ASPV وToRSV توسط آزمون الایزا و نتایج RT-PCR (شکل ۱)، از نظر سطح آلودگی ویروس‌های مورد مطالعه گروه بندی شدند. نتایج نشان داد که پنج رقم مکینتاش۱، استارکینگ۱، رداسپورکوپر۲، یلو ترنسپرنت۱ و گلوکناپفل۱ عاری از هر چهار ویروس مورد مطالعه بودندکه در زیرگروه عاری از ویروس (AA) قرار گرفتند (جدول ۴، شکل‌های ۱ و ۲). ارقام استارکینگ۱، مکینتاش۱ و رداسپورکوپر۲ هر چند در آزمون الایزا مشکوک به آلودگی به ACLSV بودند اما نتایج RT-PCR نشان دهنده عدم آلودگی این ارقام به ACLSV و عاری بودن ارقام ذکر شده از هر چهار ویروس مورد مطالعه بود. رقم یلوترنسپرنت۱ هم در آزمون الایزا و هم در آزمون PCR عاری ازهر چهار ویروس بود. رقم اردبیل ۱-۲ و رقم در دست معرفی خودسازگار IR6-1 هر چند در آزمون الایزا عاری از هر چهار ویروس تشخیص داده شد اما آزمون RT-PCR نشان دهنده آلودگی رقم اردبیل ۱-۲ به ویروس ASPV و آلودگی رقم IR6-1 به ASGV بود. سه رقم شامل استارکینگ۳، مکینتاش۲ و اخلمد مشهد۲ عاری از ۳ ویروس ASPV، ASGV و ToRSV بودند و تنها مشکوک به آلودگی به ACLSV تشخیص داده شدند. رقم گل‌بهار۱ تنها مشکوک به آلودگی به ASGV و عاری از سایر ویروس‌ها بود. مجموع این چهار رقم در زیرگروه A قرار گرفتند. ۲۷ درخت متعلق به ۲۰ رقم فقط آلوده به یک ویروس تشخیص داده شدند (زیرگروه B). تعداد ۳۰ درخت، آلوده به دو ویروس بودند (زیرگروه C) و هفت درخت متعلق به شش رقم، آلوده به سه ویروس ASGV، ACLSV و ASPV بودند و در زیرگروه D قرار گرفتند. ۱۱ ویروس آلوده کننده درخت‌های متعلق به هر رقم ارائه شده است (جدول ۲). رقم پاییزه مشهد هر چند در آزمون الایزا مشکوک به آلودگی به ACLSV و عاری از ASPV بود، اما نتایج PCR نشان داد که عاری از ACLSV و تنها آلوده به ASPV می باشد. ارقام گلدن اسپور۱، اورلئان۲، رداسپور کوپر۳، فوجی۳ و سلطانی شبستر۳ بیشترین میزان آلودگی(آلودگی به سه ویروس) را نشان دادند. هیچ یک از ارقام مورد مطالعه نه در آزمون الایزا و نه در آزمون PCR آلوده به ToRSV تشخیص داده نشد. تعدادی از ارقام شامل مشهد، قرمز رضاییه، زنوز مرند، عسلی، زینتی، شفیعی، آزایش، رد دلیشز، آل رد جاناتان، ولثی، استیمن و گلدن کرج به دلیل این‌که تنها با یک یا دو ویروس مورد مطالعه ارزیابی شده بودند در این گروه‌بندی لحاظ نشدند.



شکل۱. نتایج آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آر. ان. ای استخراج شده از برخی ارقام موجود در کلکسیون سیب کمالشهر و جفت آغازگر تکثیر کننده بخشی از پروتئین پوششی ویروس ساقه شیاری سیب

جدول ۲: نتایج آزمون الایزا در غربالگری دوم برای دو ویروس ASPV،ASGV بر ۲۸ رقم سیب انتخابی

شماره	نام رقم	شماره درخت	ASPV	ASGV	شماره	نام رقم	شماره درخت	ASPV	ASGV
۱	گل بهار	۳	+	–	۱۵	ولئی	۲	–	–
۲	شیخ احمد	۱	–	+	۱۶	گلدن اسموتی ۱	۲	–	–
۳	ردرم بیوتی	۲	–	+	۱۷	رداسپور۱	۲	–	–
٤	رد دلیشز	۲	–	–	۱۸	استیمن	۱	–	–
٥	گلوکناپفل	۱	–	–	۱۹	آی آر آی۶	۲	–	–
٦	واین سپ	۲	–	–	۲۰	استارکینگ۲	۲	+	–
۷	نوردرن اسپای	۱	–	–	۲۱	امپایرآل رد۲	۲	+	–
۸	آل رد جاناتان	۳	+	+	۲۲	گلدن کرج	۲	–	–
۹	فوجی	۳	+	–	۲۳	گراونشتاین	۳	–	–
۱۰	پرایم گلد۱	۳	–	+	۲۴	مکینتاش	۱	–	–
۱۱	رداسپور کوپر	۳	–	+	۲۵	جاناتان۲	۱	–	–
۱۲	یلواسپور۱	۱	–	–	۲۶	گانی بیوتی	۳	+	–
۱۳	گرانی ا سمیت۱	۱	–	+	۲۷	اسکارلت ویلسون	۲	+	–
۱٤	سلطانی شبستر	۱	–	–	۲۸	شربتی	۲	–	–

شناسایی درختان آلوده در تعداد و غلظت بالای ویروس

با توجه به نتایج حاصل از غربال سوم و ردگیری وتشخیص سطح آلودگی توسط آزمون الایزا در تابستان ۱۳۹۶، درختان ارقام تجاری سیب دارای بیشترین آلودگی انواع و غلظت ویروسی شامل سه درخت اورلئان (شماره های ۱، ۲ و ۳) در غلظت های متوسط و بالا، دو درخت اسکارلت ویلسون (شماره های ۲ و ۳) در غلظت های بالا، دو درخت مشهد نوری (شماره های ۱ و ۳) در غلظت‌های بالا، دو درخت سلطانی شبستر (شماره های ۲ و ۳) در غلظت‌های بالا، یک درخت گلاب کهنز (شماره ۱) در غلظت متوسط-کم، یک درخت گلدن اسپور (شماره ۱) در غلظت متوسط-زیاد، از هریک از ارقام ذیل شامل گلشاهی(شماره ۲)،اردبیل۱ (شماره ۱)، اردبیل۲ (شماره ۱)، رد رم بیوتی(شماره ۲)، فوجی(شماره ۳)، گلدن اسموتی (شماره ۲) و رد اسپور کوپر (شماره ۳) یک درخت به تعداد ۱ تا ۳ ویروس دچار آلودگی در غلظت‌های پایین بودند.

جدول ۳: نتایج آزمون الایزای ارقام سیب کلکسیون کمالشهر با استفاده از آنتی سرم ویروس‌های لکه سبزرد سیب، ساقه شیاری سیب، ساقه آبله سیب و لکه حلقوی گوجه فرنگی (تابستان ۱۳۹۶)

نام رقم	شماره درخت	ASPV	ASGV	ALSV	ToRSV	نام رقم	شماره درخت	ASPV	ASGV	ALSV	ToRSV
گلاب کهنز	۱	+	–	++	–	اورلئان	۱	+++	++	+	–
شربتی	۳	–	–	+	–	پرایم گلد۱	۲	+	–	+	–
اسکارلت ویلسون	۳	+++		+++	–	شیشه ای تبریز	۳	–	+	+	–
جاناتان	۲	–	+	+	–	نوردرن اسپای	۱	+	–	+	–
گلدن اسپور	۱	+++	++	+	–	گانی بیوتی	۱	–	–	+	–
گانی بیوتی	۳	+	–	–	–	سلطانی شبستر	۲	+	–	+++	–
کوپر اسپور	۱	–	–	+	–	پاییزه مشهد	۳	–	–	م-	–
گلشاهی	۲	+	–	+	–	سلطانی شبستر	۳	+	–	+++	–
گلدن اسپور	۲	+	+	–	–	اسکارلت ویلسون	۲	++	–	+++	–
اخلمد مشهد	۳	–	–	++	–	جاناتان ۲	۱	–	–	+	–
کوپر اسپور	۳	–	-	+	–	جاناتان ۲	۲	–	–	+	–
اخلمد مشهد	۲	–	–	م-	–	شربتی	۱	–	–	+	–

استارکینگ	۱	–	–	–م	–	گلدن دلیشز	۳	+	–	+	–
استارکینگ	۲	–	–	–م	–	شیشه ای تبریز	۱	+	–	+	–
استارکینگ	۳	–	–	–م	–	اورلئان	۳	+	–	+	–
مربایی	۲	–	–	+	–	اردبیل۱	۱	+	-	+	–
مکینتاش	۲	–	–	–م	–	مشهد نوری	۳	+	–	+	–
مکینتاش	۱	–	–	–م	–	مشهد نوری	۱	+	+	++	–

ادامه جدول ۳:نتایج آزمون الایزای ارقام سیب کلکسیون کمالشهر با استفاده از آنتی سرم ویروس‌های لکه سبزرد سیب، ساقه شیاری سیب، ساقه آبله سیب و لکه حلقوی گوجه فرنگی (تابستان ۱۳۹۶)

نام رقم	شماره درخت	ASPV	ASGV	ALSV	ToRSV	نام رقم	شماره درخت	ASPV	ASGV	ALSV	ToRSV
نایان ارنگه	۲	+	–	–م	–	یلو ترنسپرنت	۲	+	+	-	-
گلوکناپفل	۲	–	–	+	–	گانی بیوتی	۳	–	م	+	–
رد اسپور کوپر	۲	–	–	م	–	نوردرن اسپای	۳	+	-	-	–
خورسیجان	۱	+	–	–	–	رد رم بیوتی	۲	+	+	-	–
گلبهار	۲	+	–	+	–	گلبهار	۱	–	م	-	–
مشهد نوری	۲	+	–	+	–	شیخ احمد	2	م	م	+	–
یلو اسپور	۲	+	–	–	–	یلو اسپور	۱	+	–	+	–
گلوکناپفل	۱	–	–	–	–	جاناتان	۳	–	+	+	–
IRI6	۲	–	–	-	–	اورلئان	۲	+	+	+	–
اردبیل ۱	۲	–	–	–	–	نایان ارنگه	۳	–	–	+	–
واین سپ	۲	+	–	+	–	گلبهار	۳	–	-	+	–
رد رم بیوتی	۳	+	–	–	–	رد اسپور کوپر	۳	+	+	+	–
شیخ احمد	۱	–	+	+	–	فوجی	۳	+	+	+	–
زنوز مرند	۱		nt	+	-	گلدن اسموتی	۲	+	م	+	–
اردبیل۲	۱	+	–	+	–	سلطانی شبستر	۱	–	–	+	–
گلدن اسموتی	۳	+	–	+	–	مربایی	۱	–	–	+	–
یلو ترنسپرنت	1					IRI6	2		-	-	–

جدول ٤: گروه بندی درختان ارقام تجاری سیب از نظر آلودگی به چهار وبروس											
رقم	شماره درخت	ASPV	ASGV	ACLSV	ToRSV	**رقم**	شماره درخت	ASPV	ASGV	ACLSV	ToRSV
زیرگروه AA: عاری از ویروس						**زیرگروه C: آلودگی به دو ویروس**					
یلوترنسپرنت	۱	–	–	–	–	گلاب کهنز	۱	+	–	+	–
رداسپور کوپر	۲	–	–	–	–	اسکارلت ویلسون	۳	+	–	+	–
استارکینگ	۱	–	–	–	–	جاناتان	۲	–	+	–	–
مکینتاش	۱	–	–	–	–	گلشاهی	۲	+	–	+	–
گلوکناپفل	۱	–	–	–	–	گلدن اسپور	۲	+	+	–	–
زیرگروه A: مشکوک به یک ویروس						پرایم گلد	۲	+	+	–	–
گلبهار	۱	–	م	-	–	شیشه ای تبریز	۳	–	+	+	–
استارکینگ	۳	–	–	م	–	نوردرن اسپای	۱	+	–	+	–
اخلمد مشهد	۲	–	–	م	–	سلطانی شبستر	۳	+	–	+	–
مکینتاش	۲	–	–	م	–	اسکارلت ویلسون	۲	+	–	+	–
زیرگروه B: آلوده به یک ویروس						گلدن دلیشز	۳	+	–	+	–
گراونشتاین	۳	–	–	+	–	شیشه ای تبریز	۱	+	–	+	–
IR6	۲	–	–	+	–	اورلئان	۳	+	–	+	–
رداسپور	۱	–	–	+	–	اردبیل۱	۱	+	–	+	–
پاییزه مشهد	۳	+	–	–	–	مشهد نوری	۳	+	–	+	–
شربتی	۳	–	–	+	–	یلوترنسپرنت	۲	+	+	–	–
گانی بیوتی	۳	+	–	–	–	گلبهار	۲	+	–	+	–
کوپر اسپور	۱	–	–	–	–	مشهد نوری	۲	+	–	+	–
اخلمد مشهد	۳	–	–	–	–	شیخ احمد	۱	–	+	+	–
کوپر اسپور	۳	–	–	+	–	اردبیل۲	۱	+	–	+	–
مربایی	۲	–	–	+	–	گلدن اسموتی	۳	+	–	+	–
نایان ارنگه	۲	–	–	+	–	ردرو بیوتی	۳	+	+	–	–
گانی بیوتی	۱	–	–	+	–	یلو اسپور	۱	+	–	+	–
جاناتان۲	۱	–	–	+	–	جاناتان	۳	–	+	+	–
جاناتان۲	۲	–	–	+	–	گلدن اسموتی	۲	+	–	+	–
شربتی	۱	–	–	+	–	گلبهار	۳	+	–	+	–

ادامه جدول ٤: گروه بندی درختان ارقام تجاری سیب از نظر آلودگی به چهار وبروس											
رقم	شماره درخت	ASPV	ASGV	ACLSV	ToRSV	رقم	شماره درخت	ASPV	ASGV	ACLSV	ToRSV
گلوکناپفل	۲	–	–	+	–	امپایر آل رد	۲	+	–	+	–
خورسیجان	۱	+	–	–	–	گرانی اسمیت	۱	–	+	+	–
یلواسپور	۲	+	–	–	–	استارکینگ	۲	+	+	–	–
رد رم بیوتی	۳	+	–	–	–	واین سپ	۲	+	–	+	–
گانی بیوتی	۳	–	–	+	–						
شیخ احمد	۲	–	–	+	–						
نوردرن اسپای	۳	–	+	–	–						
نایان ارنگه	۳	–	–	+	–						
سلطانی شیستر	۱	–	–	+	–	–					
مربایی	۱	–	–	+	–	–					
اردبیل۱	۲	+	–	–	–	–					
IR6	۱	–	+	–	–	**زیرگروه D: آلوده به سه ویروس**					
سلطانی شیستر	۱	–	–	+	–	گلدن اسپور	۱	+	+	+	–
مربایی	۱	–	–	+	–	اورلئان	۱و ۲	+	+	+	–
اردبیل۱	۲	+	–	–	–	مشهد نوری		+	+	+	–
IR6	۱	–	+	–	–	رداسپور کوپر	۳	+	+	+	–
سلطانی شیستر	۱	–	–	–+	–	فوجی	۳	+	+	+	–
						سلطانی شبستر	۲	+	+	+	–

نتیجه گیری

تلفیق نتایج آزمون الایزا طی سه مرحله غربالگری و همچنین RT-PCR نشان داد ارقام یلوترنسپرنت۱، رداسپورکوپر۲، استارکینگ۱، مکینتاش۱ و گلوکناپفل۱ عاری از چهار ویروس مهم سیب شامل ASPV، ACLSV، ASGV و ToRSV بودند. ویژگی‌های فنولوژیک، کیفیت میوه و عملکردی این ارقام در کتاب اطلس میوه ارقام ایران به تفصیل توضیح ارائه شده است (حاج_نجاری. ۱۳۹۷). درصد زیادی از درختان کلکسیون به یک یا دو ویروس آلوده بودند و نکته قابل توجه این‌که در ارقامی که تنها به یک ویروس آلوده بودند درصد بالایی از آن‌ها آلودگی به ACLSV نشان دادند. در ارقامی که به دو ویروس آلوده بودند آلودگی عمدتا به دو ویروس ACLSV و ASPV بود هر چند آلودگی مخلوط به ASPV و ASGV و یا آلودگی مخلوط ASGV و ACLSV نیز مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده نشان دهنده درصد بالای آلودگی ارقام سیب موجود در کلکسیون قدیمی سیب مستقر در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمالشهر به دو ویروس ASPV وACLSV می باشد. با توجه به این‌که مبادلات ژرم پلاسم عامل اصلی انتقال ویروس های جدید به کشورهای مختلف می باشند لذا یکی از مهم‌ترین راهبردها جهت کنترل ویروس‌های درختان میوه ممانعت از ورود ژرم پلاسم

آلوده به کشور است. اندام‌های تکثیری رویشی آلوده عامل اصلی انتقال و گسترش ویروس‌های درختان میوه می باشند (Pupola et al., 2011). با توجه به این‌که ویروس‌های مهم درختان سیب فاقد ناقل طبیعی شناخته شده اند لذا تولید اندام‌های تکثیری عاری از ویروس و احداث باغ‌های مادری سالم، اصولی‌ترین روش در جلوگیری از اشاعه ویروس‌ها در این گروه از محصولات می باشد (Paunovic and Jeveremovic, 2004). همان‌طور که اشاره شد در این بررسی تعدادی از ارقام شامل مکینتاش۱، استارکینگ۱، رداسپورکوپر۲، یلو ترنسپرنت۱ هم در آزمون الایزا و هم در آزمون RT-PCR عاری از هر چهار ویروس مهم مورد مطالعه تشخیص داده شد لذا درختان این ارقام قابل بهره‌برداری در برنامه تولید مواد تکثیری گواهی‌شده جهت احداث باغ‌های جدید می‌باشند. رقم امیدبخش IRI6 و رقم مربایی والد انتخابی پایه های رویشی (Hajnajari. 2021؛ رشیدی وهمکاران. ۱۴۰۰) و پایه‌های بذری (Saghafian et al., 2021) با تعداد سه درخت سالم از مجموع سه تکرار بیشترین سطح سلامت به بیمارگرهای ویروسی را نشان دادند. ارقام جدید زودرس گل‌بهار و شربتی، همراه با دو رقم بسیار پرمحصول بومی اردبیل۱، اخلمد مشهد و ارقام تجاری وارداتی مکینتاش، استارکینگ، گلوکناپفل، کوپر اسپور، گانی بیوتی و جاناتان۲ هر یک با ۲ درخت سالم از سه تکرار موجود در کلکسیون ارقام قدیمی آلودگی به بیمارگرهای ویروسی ثبت نشد. با توجه به این‌که تعدادی از ارقام در شرایط یکسان محیطی درصد آلودگی پایین تری نشان دادند می‌توان در مورد بررسی میزان مقاومت این ارقام به ویروس‌های مورد مطالعه پژوهش‌های بیشتری انجام داد. با استفاده از نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، بررسی سطح مقاومت ارقام به ویروس در یک کارگروه متشکل از متخصصین ویروس شناس و به‌نژادگران باغبانی ادامه یابد. این تحقیق بر ارقام درختان مسن سیب پیوندی بر پایه‌های بذری صورت گرفت. با توجه به نقش پایه‌های بذری در مقاومت به برخی بیماری‌های ویروسی نیاز به تحقیق بیشتر به اثرات متقابل بین سه متغیر نوع ویروس، رقم و نوع پایه وجود دارد.

فرضیات تحقیق و کاربرد نتایج

بررسی منابع ارائه شده نشان می‌دهد چگونه عملیات جوان‌سازی موجب احیای فعالیت‌های حیاتی گیاه و بازگشت درخت پیر به ویژگی‌های دوره جوانی می گردد. ساختار تشریحی توسعه یافته تشکیلات آوندی اندام هوایی پیوندک که تا قبل از هرس سنگین جوان‌سازی مسئول نقل و انتقال آب، عناصر معدنی و هورمون‌های رشد سیتوکینینی به حجم عظیمی از شاخه‌ها و اندامک‌های فرسوده از تنش‌های محیطی و بیماری‌ها بودند پس از هرس سنگین، ورودی حجیم شیره خام را صرف فعال کردن جوانه‌های خفته در حجم محدود باقی‌مانده تاج می کند. از دیدگاه فیزیولوژی اسکلت کوچک درخت در رقم پیوندی با دریافت بسته قوی تغذیه‌ای از نظر کیفیت و کمیت، در مقطع زمانی بهینه بیداری درخت، و شرایط بهینه محیطی دمایی، نوری ورطوبتی در ابتدای فصل رویشی واکنش انفجاری در رشد رویشی نشان می دهد. اندام رویشی درخت در شکل جست‌های متعدد با سرعت رشد زیاد و کیفیت سبزینگی عالی واکنش نشان می-

دهد. این تغییرات فراگیرتر از بهبود فنوتیپ صفات رویشی و نیز عملکرد گیاه است به‌طوری‌که زمینه‌ساز دگرگونی و تحول در سوخت وساز (Metabolism) و فرآورده‌های سوخت وساز (Metabolites) در سطح سلولی می‌شود. اندامک‌های برگ‌های تازه تشکیل یافته در بهترین مثلث حیاتی تغذیه‌ای، محیطی و مرحله رشدی قرار می‌گیرند و در شرایط زیرساختی تشریحی مطلوب قرار دارند. پس از جوان‌سازی، فرآورده‌های فتوسنتزی نه تنها کربوهیدرات‌ها بلکه بیوسنتز ترکیبات فنولی افزایش می‌یابند و به دنبال آن چرخه فعالیت‌های حیاتی آنتی اکسیدانی شدت می‌یابد. طبیعی است که اندام‌های هوایی متشکل از اندامک‌های پربنیه وقوی در بالاترین سطح از سیستم دفاعی خود در برابر تنش های زنده بویژه بیمارگرهای ویروسی قرار دارند. بدین ترتیب عملیات جوان‌سازی اولین گام برای تولید گیاهان سالم یعنی تشکیل بافت برگی نو و عاری از ویروس برداشته می‌شود. این فرضیه با اصل اثبات‌شده در خصوص سرعت رشد و تقسیم سلولی بالاتر آوندهای گیاهی مریستمی از سرعت حرکت ویروس در آوندها همسو است (Hipper et al., 2013). تولید گیاهان عاری از ویروس از کشت درون‌شیشه رئوس مریستمی (Shoot tip culture) با تهیه برش های ۰,۱ تا ۰,۳ میلی متری از پیوندک بر اساس همین فرضیه شکل گرفته است (Bhat and Rao. 2020). فناوری گرمادرمانی خود الهام گرفته از طبیعت است. حدود ۵۰ سال پیش، تکنیک گرمادرمانی روی نهال و قلمه سیب اعمال شد (Zawadzka. 1976). پهنک برگ درخت جوان‌سازی شده که دارای کوتیکول نازک، پارانشیم با فضاهای سلولی زیاد و ضخامت کم است (Hajnajari et al., 2019)، که تحت انرژی تابشی نیمروزی اردیبهشت-خرداد در کرج و اقلیم‌های مشابه، به فناوری سالم‌سازی عینیت می‌بخشد. بدون تردید جوان‌سازی غلظت ویروس در شیره گیاهی را کاهش می‌دهد. در پایان مقاومت ژنتیک ارقام سیب به ویروس*Apple Stem Grooving Virus* ودیگر ویروس‌ها و سطح آلودگی یا سلامت پیوندک از موضوعات تحقیقاتی آتی است (Chen et al., 2014).

ابعاد کاربردی در صنعت تولید نهال

نتایج به‌دست‌آمده از نظر سطح سلامت درختان مسن سیب در کلکسیون ارقام کاربردی و امیدبخش است. حتی در موارد گیاهان مشکوک به آلودگی به یک ویروس و یا آلوده به یک ویروس امکان تولید هسته‌های پیش تکثیر سالم با لیبل سفید کنترل ویروس وجود دارد. این یافته‌ها پنجره جدید کاربردی برای تولید هسته‌های اولیه پیش‌تکثیر سالم برای گروهی از ارقام تجاری ایجاد می‌کند. احداث باغ های مادری سالم (Virus free) و کنترل ویروس (Virus tested) باتوجه به نکات زیر با سرعت و دقت بیشتری قابل انجام خواهد بود.

۱- این بررسی‌ها نشان داد که احتمال یافتن درختان مسن کاملا سالم و عاری از چهار گونه ویروس و به عبارتی عاری از ویروس وجود دارد.

۲- تعداد پنج رقم تجاری رایج سیب استارکینگ، یلوترنسپرنت، رداسپور کوپر، گلوکناپفل **و** مکینتاش در جهان عاری از ویروس بودند.

۳- چهار درخت از رقم جدید گل‌بهار و ارقام پرمحصول اخلمد مشهد، استارکینگ و مکینتاش مشکوک به آلودگی به یک ویروس بودند.

۴- بهره برداری مستقیم از درختان سالم با تهیه پیوندک برای احداث باغ مادری عاری از ویروس وجود دارد. تولید هسته‌های اولیه عاری از ویروس بدون صرف کم‌ترین وقت و هزینه برای سالم سازی امکان پذیر خواهد بود.

۵-به همین ترتیب از دو رقم گل-بهار و اخلمد مشهد مشکوک به آلودگی به یک ویروس بودند پس از ویروس زدایی آماده بهره‌برداری به عنوان مواد سالم وجود دارد.

۶- تولید نهال با گواهی سلامت عاری از ویروس (Virus free) با لیبل آبی امکان‌پذیر خواهد بود.

۷- از مجموع ۲۱ رقم سیب تجاری بومی و وارداتی تعداد ۳۲ درخت آلوده به یک ویروس تشخیص داده شدند. این تعداد درخت قابلیت بهره برداری مستقیم برای احداث باغ مادری کنترل ویروس (Virus tested) دارند. بر اساس استانداردهای جهانی در خصوص نهال سیب چنانچه نهال فقط به یک ویروس آلوده باشد تحت عنوان کنترل ویروس قابل تکثیر در سطح تجاری با لیبل سفید می باشد.

۸- تولید نهال با گواهی سلامت کنترل ویروس (Virus tested) با لیبل آبی امکان‌پذیر خواهد بود. تولید هسته‌های اولیه کنترل ویروس در کم‌ترین وقت و با هزینه کم برای سالم سازی امکان پذیر خواهد بود.

۹- در عین حال در صورت تشخیص آلودگی در باغ مادری، تکثیر این ارقام با اعمال روش گرما درمانی ۵۰ درجه سانتی گراد برای دو ساعت همراه با کشت مریستم بر اساس منابع مورد اشاره تا ۵۵ درصد امکان موفقیت برای تولید گیاهان سالم وجود دارد.

ابعاد اجرایی و سیاست گزاری

توصیه می‌شود قبل از انعقاد قرارداد با شرکت‌ها برای سالم سازی نمونه‌های ارقام بومی معرفی و نامگذاری شده، ارقام رایج بومی پرمحصول، ارقام و پایه‌های رویشی امیدبخش حاصل از برنامه‌های به‌نژادی درختان میوه به نکات زیر توجه مبذول دارند. نمونه‌های گیاهی ابتدا توسط دو آزمون الایزا و RT-PCR ردگیری و تشخیص داده شوند و سپس عقد قرارداد برای حذف تعداد ویروس تشخیص داده شده منعقد شود. به این ترتیب مدت زمان سالم‌سازی نیز مشخص می-

شود. در شرایط عدم اطلاع از تعداد ویروس‌های آلوده‌کننده درختان میوه در یک باغ کلکسیون و باغ مادری نبایستی فرض بر آلودگی ارقام به تمام ویروس‌های مهم محصول مورد نظر، در مورد سیب چهار ویروس، گذاشته شود.

شکل‌های ۲ و ۳- تاثیر هرس جوان‌سازی بر صدور جست‌های علفی پررشد در درختان مسن 'مکاینتاش' و 'یلو ترانسپارنت'

فهرست منابع

پیرمرادیان م، حاج نجاری ح. حسنی ق. ۱۳۹۷. بررسی سازگاری منطقه‌ای، ویژگی‌های رشدی وعملکردی ترکیب‌های پیوندی وارداتی سیب بدون ویروس. علوم و فنون باغبانی ایران. دوره ۱۹ (۲): ۲۷۸-۲۶۷.

حاج نجاری ح. ۱۳۹۰. احداث اولین باغات تحقیقاتی عاری از ویروس سیب در کشور. باغدار. شماره ۴۵. صفحه: ۱۴- ۵.

حاج نجاری ح. ۱۳۹۱. غربال ۸۹ رقم سیب جهت ارزیابی مقاومت به بیماری آتشک توسط سیستم USDA در شرایط آب و هوایی کرج. حفاظت گیاهان. ج. ۲۶. ش۳ . ۲۶۸-۲۶۱.

حاج نجاری ح. ۱۳۹۷. اطلس ارقام درختان میوه ایران. نشر آموزش کشاورزی. ۲۳۵ صفحه.

حاج نجاری ح و مرادی م. ۱۳۹۳. بررسی میزان خودسازگاری، میوه شناسی، فشار اینبریدینگ چند رقم منتخب سیب و معرفی ژنوتیپ خودسازگارIRI6. علوم باغبانی ایران. دوره ۴۵. ش ۲. ص: ۱۷۴-۱۶۳.

حسنی ق، حاج نجاری ح و پیرمرادیان م. ۱۳۹۸. ارزیابی شاخص‌های رشدی،عملکرد وتناوب باردهی ارقام سیب وارداتی درشرایط اقلیمی ارومیه. پژوهش‌های میوه کاری. ۴ (۱): ۴۶-۳۷.

منوچهری، ع. و ف. اسکندری. ۱۳۷۴. بیماری‌های ویروسی نباتات. انتشارات دانشگاه تهران. تهران. ۱۹۴ ص.

میزانی آ. و حاج نجاری ح. ۱۳۹۲. اثر آلودگی های ویروسی بر صفات میوه، میوه بندی و خصوصیات رویشی ارقام سیب. علوم و فنون باغبانی ایران. ج. ۱۴. ش ۳. ص: ۳۴۲ - ۳۳۳.

Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., Daszak, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. Trends Ecol. Evol. 19: 535–544. doi: 10.1016/j.tree.2004.07.021

Amiri, M.E. (2007). Special micrografting technique for cherry (*Prunusavium* L.).Acta Hortic. 764: 151-154. DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.764.18

Bhat A.I., Rao G.P. (2020). Virus elimination by meristem-tip culture. In: Characterization of plant viruses. Springer Protocols Handbooks.Humana, New York, NY.https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0334-5_47

Brakta, A., Handa, A., Thakur, P. D., Tomar, M., & Kumar, P. (2015).*Malus pumila* 'Spy 227' and Apple stem pitting virus: graft incompatibility and epinasty. Virusdisease, 26 (1-2), 92–96. https://doi.org/10.1007/s13337-014-0242-8

Chen S, Ye T, Hao L, Chen H, Wang S, Fan Z, et al. (2014). Infection of Apple by *Apple Stem Grooving Virus* Leads to Extensive Alterations in Gene Expression Patterns but No Disease Symptoms. PLoS ONE 9(4): e95239. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095239

Davis BM, Chao MC, Waldor MK. (2013).Entering the era of bacterial epigenomics with single molecule real time DNA sequencing.Current Opinion in Microbiology. 16: 192-198. doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.01

De Klerk, G-J, & Hanecakova, Jana H. and Jan, J. (2001). The role of cytokinins in rooting of stem slices cut from apple microcuttings. Plant Biosystems - PLANT BIOSYST. 135. 79-84. 10.1080/11263500112331350680.

Elena, S. F., Fraile, A., and García–Arenal, F. (2014).Evolution and emergence of plant viruses. Adv. Virus Res. 88: 161–191. doi: 10.1016/B978-0-12-800098-4.00003-9

Engel, G. 1990. The importance of virus-free plant material in integrated fruit production.Acta Hortic. 285:127-133.

García-Ibarra A, Clemente-Moreno M. J., Barba-Espín G, Díaz-Vivancos P, Rubio M, Dicenta F, Martínez-Gómez P, Hernández AJ. (2011). Changes in the antioxidative metabolism induced by Apple chlorotic leaf spot

virus infection in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch], Environmental and Experimental Botany, 70: 277-282. Doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.004

Gheorghiu, E. (1976). Studies on the physical and chemical control of apple proliferation in tree nurseries and bearing orchards.Acta Hortic. 67: 149-158. DOI: 10.17660/ActaHortic.1976.67.17

Hajnajari H. (2010). Cultivar evaluation program of the national Iranian apple collection in the last decade.Proceedings of the International Scientific Conference of Fruit Growing Intensification in Belarus: Traditions, Progress, Prospects. Pp:33-39.

Hajnajari H. (2021). Thirty-three Half-sib apple clonal rootstocks tolerant to crown rot produced in a 14 years pathology breeding program. Acta Hortic. 1315: 227-235. DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1315.35

Hajnajari H.Akbari H. Abdossi V. (2019). Genesis of ultra-specialized histology with stable traits in mesophyll of drought tolerant apple cultivars.*Scientia Horticulturae*. 249: 168-176.

Hartmann, W. (1986).Clonal selection in the German prune Hauszwetsche.Acta Hortic. 180, 103-112. DOI: 10.17660/ActaHortic.1986.180.14

Hipper C, Brault V. Ziegler-Graff V and Revers F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. Front in Plant Science. 4: 154.1-24. doi.org/10.3389/fpls.2013.00154

Hu, G.-J, Dong, Yafeng & Zhang, Zunping & Fan, Xudong & Ren, Fang & Zhou, (2015). Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 121. 10.1007/s11240-015-0714-6

Keshavarz T. Hajnajari H. (2021). Evaluation of apple cultivars to four pome fruit viruses in Iranian National Collection of Kamalshahr Horticulture Research Station, Karaj. Archives of Phytopathology and Plant Protection:1-15. Doi. 10.1080/03235408.2020.1869397

Kusano N, Iwanami T, Narahara K, Tanaka M. (2014).Production of monoclonal antibodies specific for the recombinant viral coat protein of Apple stem grooving virus-citrus isolate and their application for a simple, rapid diagnosis by an immunochromatographic assay. J Virol Methods.195:86-91. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.09.015.

Judžentienė A and Misiūnas A. (2017). Chemical composition of apple-tree (*Malus domestica* Borkh.) leaf essential oils.chemija. 28: 172–176.

Jingfu, z. Jinxin L. Zhonglan Z. Pan, Shimei p. Yang, Li Y. & Shoujun Y. (2017). Rejuvenating older apple trees by root pruning combined with arbuscular mycorrhizal fungi. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus. 16. 27-35. 10.24326/asphc.2017.3.3.

Lecoq H, Moury B, Desbiez C, Palloix A, Pitrat M. (2004). Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. Virus Research. 100: 31-39. doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.012

Lee G, Kim JH, Kim HR, Shin IS, Cho KH, Kim SH, et al. (2013). Production System of Virus-free Apple Plants Using Heat Treatment and Shoot Tip Culture.Vol. 19, Research in Plant Disease. Korean Society of Plant Pathology;. p. 288–93. Available from: http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2013.19.4.288

Liaudanskas, M., Viškelis, P., Raudonis, R., Kviklys, D., Uselis, N., and Janulis, V. (2014). Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. The Scientific World Journal, 2014, 306217. doi.org/10.1155/2014/306217

Li C, Yamagishi N, Yoshikawa N. (2019). RNA Silencing-Mediated Apple Latent Spherical Virus Vaccine in Plants. Methods Mol Biol. 2028:273-288. doi: 10.1007/978-1-4939-9635-3_16.

Liu H, Wu L, Nikolaeva E, Peter K, Liu Z, Mollov D, Cao M and Li R. (2018). Characterization of a new apple luteovirus identified by high-throughput sequencing.Virology Journal. 15:85. doi.org/10.1186/S12985-018-0998-3

Magyar-Tábori, K.; Mendler-Drienyovszki, N.; Hanász, A.; Zsombik, L.; Dobránszki, J. (2021). Phytotoxicity and other adverse effects on the in vitro shoot cultures caused by virus elimination treatments: reasons and solutions. Plants, 10, 670. doi.org/ 10.3390/plants10040670

Maree, H.J. Fox, A. Al Rwahnih, M. Boonham, N. Candresse, Th. (2018). Application of HTS for routine plant virus diagnostics: state of the art and challenges. Frontiers in Plant Science.9:1082.

Meijnske, C.A.R., H.J. Van Oosten and H. Peerbooms.(1975). Growth, yield and fruit qualityof virus-infected and virus-free GoldenDelicious apple trees.Acta Hortic. 44:209-212.

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. J Virol Methods. 99:81-92. doi: 10.1016/s0166-0934(01)00381-0.

Mizani A. and Hajnajari H. (2013).Detection of ApMV and TomRSV in apple trees and inhibitive effect of seed rootstocks against viral infections.*International Journal of Agronomy and Plant Production*. 3:554-562.

Mizani A. and Hajnajari H. (2015).Genetic stability assessment of apple mutants "Fuji kiku8" and "GalaSchniga" during adaptation trial in Iran.*Acta Hortic*. 1074: 111-118.

Nakova, M. (2011).Phytophthora root and crown rot on fruit trees in Bulgaria.Journal of Agricultural Science and Technology. 1: 1939-1250.

Oparka, K.J. and G.R. Alison.(2001). Plasmodesmata. Plant Physiol. 125:123-126.

Panno, S., Davino, S., Rubio, L., Rangel, E., Davino, M., García-Hernández, J., et al. (2012).Simultaneous detection of the seven main tomato–infecting RNA viruses by two multiplex reverse transcription polymerase chain reactions. J. Virol. Methods. 186: 152–156. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.08.003

Pechinger K., Chooi, K. M., MacDiarmid, R. M., Harper, S. J., & Ziebell, H. (2019).A new era for mild strain cross-protection. *Viruses*, *11* (7): 670. doi.org/10.3390/v11070670

Rubio L, Galipienso L, Ferriol I. (2020). Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. Frontiers in Plant Science.11: 1092.Doi.10.3389/fpls.2020.01092

Saade, F. Aparicio, J. A. Sánchez-Navarro, M. C. Herranz, A. Myrta, B. Di Terlizzi, and V. Pallás M. (2000).Simultaneous detection of the three Ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction.PHYTOPATHOLOGY. 90:1330-1336.

Saghafian L.A. Hajnajari H. Khosrowshahli M. Mousavi A.(2021). Influence of improved apple seedling rootstocks on dwarfism, uniformity and fruit set of apple cultivars in a 15-Year scheme. *New Zealand Jiornal of Crop and Horticultural Science*.DOI: 10.1080/01140671.2021.1927764

Shahriar, S.A.; Islam, M.N.; Chun, C.N.W.; Rahim, M.A.; Paul, N.C.; Uddain, J.; Siddiquee, S. (2021). Control of plant viral diseases by CRISPR/Cas9: resistance mechanisms, strategies and challenges in food crops. Plants, 10:1264. doi.org.10.3390.plants10071264

Sharma, I, Negi, H. and Sharma, Sh. (2014). Integrated management of collar rot in apple caused by Phytophthora cactorum. 67. 168-173.

Sikora P, Chawade A, LarssonM, Olsson J, Olsson O. (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. International Journal of Plant Genomics,vol. 2011. ID 314829, 13 pages. doi.org/10.1155/2011/314829

Svoboda J., Polak J., (2010). Relative concentration of *Apple mosaic virus* coat protein in different parts of apple tree. Hort. Sci. (Prague), 37: 22–26.

Webster A.D. (2005). The causes of juvenility and phase change. In: Fundamental of Temperate Zone Tree Fruit Production. Pp: 84-92. Edited by J. Tromp, A.D. Webster and S.J Wertheim.Backhuys publishers, Leiden.The Netherlands.

Williams, W.a.y.n.e. T., Cifuentes, S., Aguila, V. and Pérez, R. (1992).Rejuvenation of a model peach orchard in the Guatemalan highlands by means of integrated management.Acta Hortic. 310: 69-82. DOI: 10.17660/ActaHortic.1992.310.8

Zawadzka B. (1976).The influence of virus and mycoplasma diseases on frost damage of apple tree.Acta Hortic. 67: 113-120. 10.17660/ActaHortic.1989.235.

پژوهشکده میوه‌های
معتدله و سردسیری
کرج: جاده محمد شهر
شهرک نهال و بذر
تلفن: ۳۶۷۰۲۵۴۱ -۰۲۶
دورنگار: ۳۶۷۰۰۹۰۸-۰۲۶
Web: http://tfri.hsri.ac.ir

انتشارات
موسسه تحقیقات
علوم باغبانی
۱۳۹۷