دستور العمل فنی

دستورالعمل پروتکل تکثیر ارقام زردآلو با هدف تولید ارقام عاری ازویروس

نویسندگان:

رضا ضرغامی

آسیه زارع خفری

بسم الله الرحمن الرحيم

نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: دستورالعمل پروتکل تکثیر ارقام زردآلو با هدف تولید ارقام عاری از ویروس

نویسندگان: رضا ضرغامی و آسیه زارع خفری

ویراستار علمی:

ویراستاران ادبی:

تهیه شده در: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

شمارگان:

نوبت انتشار: اول

سال انتشار:

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است

شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی به تاریخ است

دستورالعمل پروتکل تکثیر ارقام زردآلو با هدف تولید ارقام عاری از ویروس

نویسندگان

رضا ضرغامی

آسیه زارع خفری

فهرست مطالب

مقدمه---------- ۵

بررسی منابع---------- ۵

مراحل پروتکل تکثیر زردآلو---------- ۷

مواد تشکیل دهنده محیط کشت---------- ۷

تهیه محلول عناصر پرمصرف و کم مصرف---------- ۷

هورمون---------- ۸

ساخت محیط کشت و شرایط رشد---------- ۹

ماده گیاهی، روش ضد عفونی و ساخت محیط کشت---------- ۹

مرحله تولید شاخه و تکثیر آن‌ها---------- ۱۰

مراحل و روش های ردیابی ویروس‌ها---------- ۱۱

جمع آوری نمونه‌های برگی---------- ۱۲

روشDAS-ELISA ---------- ۱۲

ردیابی ویروس با روش ملکولی RT-PCR---------- ۱۳

روش‌های حذف ویروس در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*)---------- ۱۶

گرمادرمانی همراه با کشت مریستم---------- ۱۶

شیمی درمانی همراه با کشت مریستم---------- ۱۷

سرمادرمانی---------- ۱۷

الکتروتراپی---------- ۱۸

مرحله ریشه‌زائی---------- ۱۹

مرحله سازگاری یا انتقال از شرایط *in vitro* به *in vivo* ---------- ۱۹

مرحله انتقال به گلخانه---------- ۱۹

منابع ---------- ۲۱

مقدمه:

بیماری‌های گیاهی از دیرباز به عنوان یک محدودیت عمده در تولید اقتصادی در سراسر جهان در نظر گرفته شده است. میوه‌های هسته‌دار میزبان طبیعی چندین عامل بیماری‌زا از جمله ویروس‌ها، ویروئیدها، فیتوپلاسماها و برخی پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی سیستمیک هستند (Hauptmanová and Polák 2011). بیماری‌های ویروسی می‌توانند خسارات اقتصادی بیش از ۳۰ میلیارد دلار در سال وارد کنند (Hilaire et al., 2022). با توجه به این واقعیت که در حال حاضر هیچ روش قطعی برای حذف ویروس در باغات وجود ندارد (Wang et al., 2018) ، جلوگیری از ورود ویروس از طریق کاشت مواد عاری از ویروس از اهمیت اقتصادی بالایی در صنعت باغبانی برخوردار است. تا به امروز، روش‌های مختلفی از جمله کشت مریستم (Kazemi et al., 2020) ، گرمادرمانی (Farhadi-Tooli et al., 2022)، شیمی‌درمانی (Parštein et al., 2013)، الکتریسیته‌درمانی (Mirzaei et al., 2021) و سرمادرمانی (Wang et al., 2022)، به تنهایی یا در ترکیب با هم (Mathew et al., 2021; Bettoni et al., 2022a, b) با موفقیت برای تولید گیاهان عاری از ویروس استفاده شده است. انتخاب یک روش مناسب به طور کلی به گونه‌های گیاهی و ویژگی‌های ساختار بیولوژیکی ویروس هدف بستگی دارد (Ben Mahmoud et al., 2017)، بنابراین در این دستورالعمل ریزنمونه‌های زردآلو در معرض الکتریسیته‌درمانی، گرمادرمانی، شیمی‌درمانی و سرمادرمانی برای تعیین کارآمدترین روش‌های درون شیشه‌ای(*in vitro*) برای تولید گیاهان سالم و عاری از ویروس قرار گرفتند.

بررسی منابع:

زردآلو (*Prunus armeniaca* L) از خانواده Rosaceae، جنس.Prunus L، زیر جنس Prunophora Focke و بخش Armeniaca (Lam) است. همه گونه‌های زردآلو دیپلوئید با هشت جفت کروموزوم 2) (n = 16 هستند. زردآلو یکی از مهمترین محصولات میوه هسته‌دار است و قرن‌هاست که به عنوان میوه و گیاه زینتی در بسیاری از کشورها کشت می‌شود. بزرگترین تولیدکنندگان زردآلو در جهان ترکیه و ایران (۳۳۴۴۰۸ تن از ۵۸۵۱۵ هکتار) هستند که به ترتیب ۲۱/۶ درصد و ۱۴/۷ درصد از تولید جهانی زردآلو را به خود احتصاص داده‌اند و پس از آن پاکستان، ازبکستان، ایتالیا، الجزایر، ژاپن، مراکش، مصر و اسپانیا قرار دارند (Ali Khan et al., 2021). این گیاه معمولاً از طریق قلمه‌های رویشی که ممکن است به عوامل بیماری‌زا آلوده باشند تکثیر می‌شود (Šisko et al., 2022). تکثیر زردآلو از طریق کاشت مستقیم بذر نیست زیرا نهالی که از این روش به دست می‌آید هتروزیگوت است و معمولا از روش های رویشی یا غیرجنسی مانند پیوند زدن،کاشت قلمه از طریق پیوند زدن استفاده می‌شود. که این روش تکثیر، محصول بهتری داده و رواج بیشتری دارد ولی برای کشاورز سودآور نمی‌باشد. بنابراین تکنیک‌های تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای بعنوان روش کارآمد و موثر امکان تولید مواد گیاهی با کیفیت بالا در زمان و مکان کمتر را فراهم می‌کند

(Lal et al., 2022). ثابت شده است که سرمادرمانی نوک ساقه یک استراتژی کارآمد و قابل اعتماد برای از بین بردن ویروس‌ها از مواد گیاهی آلوده است (Bettoni et al., 2019). در زردآلو روش سرمادرمانی دو مرحله‌ای با ۱۰٪ نوک شاخه‌های منجمد شده موفق به حذف ویروس *Plum pox potyvirus* (PPV) گردید(Şekerz et al. 2015). ارزیابی پایداری ژنتیکی گیاهان *P. Ferlenain* باززایی شده از راس منجمد نیز هیچ تغییر ژنتیکی را در مقایسه با شاهد نشان نداد، بنابراین این رویکرد می‌تواند به طور قابل اعتمادی برای حفظ طولانی مدت مواد به کار گرفته شود (Helliot et al., 2001).

تکنیک‌های مرسوم استفاده شده برای از بین بردن بیماری‌های ویروسی در گیاهان، به عنوان مثال، کشت مریستم به تنهایی و یا همراه با ترموتراپی یا شیمی‌درمانی، گاهی اوقات برای تولید مواد عاری از ویروس در برخی گونه‌ها با شکست مواجه می‌شود. روش جایگزین با استفاده از روش‌های جریان الکتریکی به عنوان ابزار کارآمدتر برای غلبه بر این مشکل پیشنهاد شده است (González et al., 2006). الکتروتراپی یک روش ساده سالم‌سازی بدون نیاز به استفاده از تجهیزات خاص یا گران قیمت است. و به نظر می‌رسد موثرتر، سریع‌تر و راحت‌تر از روش‌های قبلی در تولید گیاهان عاری از ویروس است همچنین در مقایسه با دیگر روش‌ها برای از بین بردن ویروس مقرون به صرفه‌تر است. این رویکرد با موفقیت برای از بین بردن بیماری‌های ویروسی در گیاهان علفی و چوبی مانند انگور، سیب زمینی، گلایول و گل محمدی استفاده شده است (Zare khafri et al., 2024).

به طور کلی، اندازه نوک شاخه رابطه مثبتی با بقا و باززایی آن دارد، در حالی که رابطه منفی با موفقیت حذف ویروس دارد (Wang et al., 2018). تیمار گرمایی می‌تواند با تنظیم دمای بالاتر (۳۸ درجه سانتی گراد) در طول روز و دمای پایین‌تر (۲۸ درجه سانتی گراد) در شب یا با افزایش تدریجی دما از ابتدای درمان موثرتر باشد (Hesari et al., 2022 , Abdullahi and Lawrence 2022). در طول گرما درمانی عموما محیط تکثیر و شاخه زایی بهینه استفاده می‌شود (Abdullahi and Lawrence 2022) اما به نظر می‌رسد محیط‌های کشت بر بقای کشت‌ها در طول عملیات حرارتی نیز تأثیر می‌گذارد (Dziedzic 2008, Stein et al. 1991). همچنین اندازه نوک ساقه جدا شده پس از عملیات حرارتی تأثیر زیادی بر حذف ویروس دارد (Zarghami and Ahmadi 2022). رایج‌ترین ماده ضد ویروسی در حذف ویروس گیاهی ریباویرین (Virazole) است که یک آنالوگ مصنوعی گوانوزین می‌باشد و با ادغام در RNA، سنتز RNA ویروسی را مهار می‌کند. به نظر می‌رسد که ریباویرین به صورت یک مکانیسم کلی عمل نمی‌کند، بلکه ویروس‌های مختلف را به روش‌های مختلف مهار می‌کند (Lerch 1987, Parker 2005).

شیمی درمانی ریز نمونه‌های آلو با ریباویرین در غلظت پایین ۱۰ یا ۳۰ میلی‌گرم در لیتر برای حذف ACLSV و PNRSV بی اثر بود، اما در غلظت‌های بالاتر ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر،پس از دو هفته درمان و سپس کشت مریستم، هر دو پاتوژن را با موفقیت از بین برد (Mazeikiene et al. 2019). اکتریسیته درمانی را می‌توان بر روی هر نوع ریزنمونه (بخش ساقه، نوک ساقه، گیاهچه، جوانه و غیره) برای از بین بردن ویروس با اثربخشی بالا استفاده کرد (Adil et al. 2022). در مطالعه‌ای که برای حذف ویروس PPV در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) در درختان هلو با استفاده از کشت مریستم به همراه الکتریسیته درمانی انجام گردید (نوک‌های مریستم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۸ رور قرار گرفتند)، نتایج نشان داد ۶۰ درصد از درختان هنگامی که توسط RT-PCR و DAS-ELIZA ردیابی شدند، عاری از ویروس بودند (Dessoky et al., 2018).

۱- مراحل پروتکل تکثیر زردآلو:

۱-۱- مواد تشکیل دهنده محیط کشت

در این دستورالعمل برای مراحل استقرار، شاخه‌زائی، ریشه‌زائی و تشکیل گیاهچه از محیط غذایی QL (Quoirin and Lepoivre, 1977) همراه با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده می‌شود. این محیط پایه دارای عناصر پرمصرف و عناصر کم مصرف، آهن و ویتامین‌ها می‌باشد (جدول ۱). ویتامین‌ها شامل تیامین نیکوتینیک اسید و گلایسین می‌باشند. ترکیبات معدنی و ویتامین‌ها ابتدا به صورت محلول‌های مادر تهیه شده و سپس مورد استفاده قرار می‌گیرند. تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده شامل ایندول - بوتیریک‌اسید (IBA)، ۶ بنزیل‌آدنین‌پورین (BAP) می‌باشند.

۱-۱-۱- تهیه محلول عناصر پرمصرف و کم مصرف:

جهت تهیه محلول‌های ذخیره‌ای عناصر ماکرو در محیط کشت QL می‌توان غلظت‌های هر یک از ترکیبات عناصر ماکرو را ۱۰ برابر کرد و هر یک از آن‌ها را جداگانه در مقداری (۱۰۰سی‌سی) آب استریل شده حل کرد و سپس آن‌ها را به آرامی با هم مخلوط کرد و به حجم ۱ لیتر (۱۰۰۰ سی‌سی) رساند. جهت تهیه محلول‌های ذخیره‌ای عناصر میکرو باید غلظت‌های هر یک از ترکیبات عناصر میکرو را ۱۰۰ برابر کرد و سپس آن‌ها را جداگانه وزن نمود و در یک بشر یک لیتری مقداری آب استریل شده (۵۰۰ سی سی) ریخته و سپس هر یک از عناصر میکرو که وزن شده را یکی یکی به بشر حاوی آب مقطر استریل شده اضافه نمود و هم زد تا به خوبی حل شوند و سپس بشر را به حجم ۱ لیتر (۱۰۰۰ سی‌سی) رساند. محلول‌های ذخیره‌ای عناصر ماکرو و عناصر میکرو تهیه شده را باید در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری نمود. $FeNa_2EDTA$ بهتر است به صورت تازه تهیه و استفاده شود.

۱-۱- ۲- ویتامین‌ها:

جهت تهیه محلول‌های ذخیره‌ای هر یک از ویتامین‌ها ابتدا پودر ویتامین مورد نظر را را از یخچال برداشته و مقدار ۵۰ میلی‌گرم از آن را وزن کرده و داخل یک فالکون ۵۰ سی‌سی ریخته و سپس به آن ۵۰ سی‌سی آب مقطر استریل شده اضافه کرده و هم می‌زنیم تا حل شوند و سپس در یخچال در دمای ۴ درجه-ی سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. جهت استفاده از میواینوزیتول نیازی به تهیه محلول ذخیره‌ای از آن نیست و می‌توان در هر بار استفاده ۱۰۰ میلی‌گرم از آن را وزن کرده و به محیط کشت اضافه نمود.

Macro Elements	**mg/l**
$Ca(NO_3)2.anhydrous$	۵۷۸/۹۲
KH_2PO_4	۲۷۰
KNO_3	۱۸۰۰
$MgSO_4$	۱۷۵/۷۹
NH_4NO_3	٤۰۰
Micro Elements	**mg/l**
$CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۲۵
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۲۵
FeNaEDTA	۳٦/۷۰
H_3BO_3	٦/۲۰
KI	۰/۰۸
$MnSO_4.H_2O$	۰/۷٦
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۲۵
$ZnSO_4.7H_2O$	۸/٦۰
Vitamins	**mg/l**
Glysine	۲
Thiamine-Hcl	۲
Nicotinic-Acid	۱
Myo-Inositol	۱۰۰

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت QL

۱-۱- ۳ هورمون:

جهت تهیه جداگانه هورمون‌های BAP و IBA پودرهای این تنظیم‌کنندهای رشد را از یخچال برداشته و به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از هر یک جداگانه وزن کرده و داخل دو بشر ۵۰ سی سی ریخته و چند قطره هیدروکسید سدیم یک نرمال به هر یک از آن‌ها اضافه کرده و هم می‌زنیم تا حل شوند و سپس آن‌ها را به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده و در یخچال در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. این تنظیم-کننده‌های رشد نیز بعد از اضافه شدن به محیط کشت و اندازه‌گیری pH همراه با محیط کشت اتوکلاو می‌شوند.

۱-۲- ساخت محیط کشت و شرایط رشد:

محیط کشت بهینه جهت استقرار ریزنمونه‌های زردآلو به رقم و نوع ریزنمونه بستگی زیاد دارد. کمترین تفاوت در میان ارقام مورد برسی زردآلو در تولید جوانه فعال در محیط پایه QL مشاهده شد لذا این محیط برای استقرار و تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای ارقام زردآلو انتخاب می‌گردد. جهت استقرار ریزنمونه‌های زردآلو باید از محیط کشت پایه QL به همراه ۰/۰۶ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و ۳۰ گرم در لیتر شکر استفاده شود. محیط کشت QL آماده که به صورت پودر و حاوی عناصر ماکرو، عناصر میکرو و ویتامین‌ها می‌باشد باید مقدار ۳/۳۸ گرم در لیتر وزن گردد. قبل از اتوکلاو کردن و اضافه کردن آگار به محیط کشت pH آن باید روی ۵/۸±۰/۲ توسط NaOH یا HCL یک نرمال تنظیم شود و ۶ گرم در لیتر آگار برای جامد کردن محیط کشت قبل از اتوکلاو اضافه گردد. شیشه‌های مربایی حاوی ریزنمونه‌های کشت شده در مرحله استقرار باید به اتاقک رشد با شدت نور۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس نور سفید فلورسانت، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۱ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردند. اتوکلاو کردن محیط‌های کشت باید در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه انجام شود. لازم به ذکر می‌باشد می‌توان از محلول‌های ذخیره‌ای عناصر ماکرو، میکرو و ویتامین‌ها به جای پودر آماده استفاده کرد که در بالا طرز تهیه آن‌ها شرح داده شد.

۱-۳- ماده گیاهی، روش ضد عفونی و ساخت محیط کشت:

جهت استقرار و ضد عفونی ابتدا باید برگ‌های سرشاخه‌های جوان تهیه شده با استفاده از قیچی استریل شده جدا شوند، سپس با استفاده از قیچی باغبانی استریل شده سرشاخه‌های جوان باید به قطعات حدود ۳-۲ سانتی‌متر حاوی یک یا دو جوانه جانبی بریده (تقسیم) شوند. قطعات ۳-۲ سانتی‌متری را در یک بشر ریخته و چند قطره مایع طرفشویی به آن اضافه گردد و روی بشر فویل آلومنیومی با چند سوراخ ریز گذاشته شود سپس بشر در زیر شیر آب (ولرم) به مدت ۰/۵ ساعت جهت آبشویی قرار داده شود. بعد از آبشویی ریز نمونه

ها را به شیشه های مربایی استریل شده منتقل و جهت ضد عفونی ریزنمونه‌ها به هر یک از شیشه‌های مربایی ۱۵۰ سی سی الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه اضافه و سپس خالی شود، در مرحله بعد به شیشه‌های مربایی حاوی ریزنمونه‌ها، ۱۵۰ سی‌سی محلول هیپوکلریت سدیم[1] ۲۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه اضافه و سپس خالی گردد و در نهایت ریزنمونه‌ها سه مرتبه با آب استریل شده هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شوند (شکل ۱). ریز نمونه‌های۳- ۲ سانتی‌متری زردآلو بعد از ضد عفونی باید در شیشه های مربایی حاوی ۵۰ سی‌سی محیط کشت QL (Quoirin and Lepoivre, 1977) کشت شوند. لازم به ذکر می‌باشد تهیه محلول‌های ضدعفونی و مراحل آن همه باید در زیر هود لامینار فلو انجام شود.

شکل ۱– آماده سازی و ضدعفونی ریز نمونه‌های گیاهی

۱-٤- مرحله تولید شاخه و تکثیر آن‌ها:

جهت ریز ازدیادی زردآلو ابتدا باید شاخساره‌های تولید شده در مرحله استقرار را بعد از گذشت یک ماه که به اندازه کافی رشد کردند را در زیر هود لامینار جدا کرد و در محیط پایه QL بهینه شده جهت ریزازدیادی زردآلو کشت کرد. محیط بهینه جهت ریز ازدیادی زردآلو محیط QL همراه با ۱ میلی گرم در لیترBAP و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA است(شکل ۲).

[1] NaOCl

شکل ۲- پرآوری و تکثیر زردآلو در محیط بهینه شده QL

۲- مراحل و روش‌های ردیابی ویروس‌ها:

جمع آوری برگ‌های درخت آلوده

↓

تشخیص ویروس‌ها با روش RT-PCR

↓

استقرار ریزنمونه‌های درختان آلوده در شرایط آزمایشگاهی

↓

تشخیص ویروس‌ها با روش RT-PCR

↓

تکثیر شاخساره‌های آلوده

↓

بررسی روش‌های مختلف سالم‌سازی در شرایط آزمایشگاهی

↓

تشخیص ویروس‌ها با روش‌های RT-PCR پس از اعمال روش‌های مختلف سالم‌سازی

↓

تکثیرکشت بافتی مواد عاری از ویروس

↙ ↘

نگهداری تعداد کمی از نمونه ها در شرایط آزمایشگاهی به عنوان پشتیبان برای تامین بیشتر مواد عاری از ویروس

ریشه دهی و کاشت در اسکرین هوس و آزمایش مجدد گیاه با روش RT-PCR

۲-۱- جمع آوری نمونه‌های برگی:

جمع‌آوری نمونه‌های برگی، از رقم زردآلو بصورت تصادفی از شاخه‌های سالم و مشکوک به آلودگی ویروسی در فصل بهار انجام می‌گردد (شکل ۳). نمونه‌ها به منظور ردیابی ویروس‌ها در ازت مایع فریز و پس از انتقال به آزمایشگاه جهت نگهداری بلند مدت به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل می‌شوند.

شکل ۳– درخت زردآلو جهت جمع آوری نمونه‌های برگی

۲-۲- روش DAS-ELISA

از روش سرولوژیکی DAS-ELISA برای شناسایی اولیه آلودگی برگ‌های زردآلو که در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شده‌اند، استفاده می‌شود. عصاره‌گیری طبق روش (Koenig, 1984) انجام شده و عصاره‌های مذکور در مقابل آنتی بادی چند همسانه‌ای ویروس تهیه شده از شرکت Bioreba با آزمون الایزای مستقیم به صورت ساندویچ دو طرفه (DAS-ELISA) مطابق با روش Clark و Bar-joseph (Clark and Adams, 1977) قرارمی‌گیرند. که مراحل آن به صورت زیر می‌باشد (شکل ۴):

الف- مرحله Coating (بافر پوششی حاوی آنتی بادی اولیه)

ب- مرحله Antigen (ویروس)

ج- مرحلهConjugate (آنتی بادی ثانویه)

د- مرحله Substrate (سوبسترا)

شکل ۴–مراحل و میزان تغییر رنگ ایجاد شده در چاهک‌های پلیت الایزا

۲- ۳- ردیابی ویروس با روش ملکولی RT-PCR:

برای بررسی نمونه‌ها از لحاظ آلودگی ویروسی، می‌توان به صورت اختصاصی‌تر از روش مولکولی RT-PCR استفاده کرد. الگوی اولیه در RT-PCR، مولکول RNA تک رشته‌ای است. از آنجائیکه DNA پلیمراز قادر به استفاده از RNA بعنوان الگو نمی‌باشد، مرحله دیگری به RNA اضافه شده است. طی این مرحله، با استفاده از آنزیم RT (ReverseTranscriptase) از الگوی RNA، مکمل آن cDNA (complementary DNA) سنتز می‌شود و بوسیله تکنیک PCR تکثیر می‌یابد.

در آزمون RT-PCR، جهت تکثیر توالی‌های مورد نظر ویروس و یا ژنوم میزبان (کنترل) باید از دستگاه چرخه‌های دمایی (Thermocycler) استفاده شود. جهت انجام RT-PCR باید به ترتیب مراحل زیر اقدام گردد:

۱- نمونه برداری از برگ برای استخراج RNA

۲- استخراج RNA مبتنی بر روش CTAB

۳- بررسی کمی و کیفی نمونه‌های RNA با استفاده از دستگاه نانودرآپ جهت بررسی میزان آلودگی به DNA و پروتئین

۴- تیماربا DNase I جهت خالص‌سازی RNA

۵- ساخت cDNA

۶- ارزیابی صحت سنتز cDNA با استفاده از آغازگر روبیسکو (Rubisco)

۷- انجام RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی برای ویروس های مورد مطالعه پیش از توضیح مراحل RT-PCR، ابتدا سه بخش پیش نیاز جهت RT-PCR ضروری می باشد:

الف) طراحی و انتخاب آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش، ب) غلظت و نسبت ترکیبات استفاده شده و برنامه دمایی و زمانی مسیر واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)، ج) مواد مورد نیاز و نحوه‌ی انجام الکتروفورز ژل آگارز. ابتدا باید با بررسی مقالات و منابع موجود در این زمینه، برای هر یک از ویروس‌های مورد مطالعه یک توالی مناسب به عنوان آغازگر انتخاب شود (جدول ۲).

ویروس	توالی(5'-3')	اندازه قطعه(bp)	منبع
ArMV-F1	TTGGTTAGTGAATGGAACGG	۴۲۷	Jarosova and Kundu, 2010
ArMV-R1-1	CAAGCTATCATGTGGGCAAA		
ApMV-F1	CGTAGAGGAGGACAGCTTGG	٤٥٠	Sanchez-Navarro et al., 2005
ApMV-R1	CCGGTGGTAACTCACTCGTT		
ACLSV-F2	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	٦٧٧	Menzel et al., 2002
ACLSV-R2	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA		
TRSV-F2	CAGGGGCGTGAGTGGGGGCTC	۳۱٥	Jarosova and Kundu, 2010
TRSV-R2	CAATACGGTAAGTGCACACCCG		
ToRSV-F2	ACTTCTGAAGGCTACCCGTT	٥٨٠	Jarosova and Kundu, 2010
ToRSV-R2	CCACCACACTCCACCTACC		
PNRSV-F3	GCCGAATTTGCAATCATACCC	٥٩٩	Sanchez-Navarro et al., 2005
PNRSV-R3	ACTTCGGTCTTGAATTCGAT		
PPV-F1	CTCTTCTTGTGTTCCGACGTTTC	۳٤٥	Jarosova and Kundu, 2010
PPV-R1	GGAATGTGGGTGATGATGG		
PDV-F2	CAACGTAGGAAGTTCACAG	٥٠٤	Sanchez-Navarro et al., 2005
PDV-R2	GCATCCCTTAAAGGGGCATC		
Rbc1–F	TACTTGAACGCTACTGCAG	١٨٤	Herranz et al., 2005
Rbc1–R	CTGCATGCATTGCACGGTG		

جدول ۲- پرایمرهای اختصاصی برای ویروس مورد بررسی در این مطالعه

انجام RT-PCR **باید با استفاده از آغازگرهای طراحی شده و تکثیر**DNA **در دستگاه ترموسایکلر** Biosystem **برای هر کدام از ویروس‌ها و ژن کنترل داخلی به طور جداگانه انجام شود. به منظور بررسی صحت ساخت** cDNA **نیز از پرایمر روبیسکو استفاده شود. چرخه‌های واکنش** RT-PCR **(جدول ۳) جهت تکثیر ژن‌های مرجع از روی** cDNA **به شرح زیر می‌باشد:**

مرحله	دما	زمان	تکرار
واسرشت سازی اولیه	۹۴	۴min	۱
واسرشت سازی	۹۴	۳۰S	۳۵
اتصال آغازگر	۵۹	۳۰S	۳۵
توسعه‌ی آغازگر	۷۲	۴۵S	۳۵
توسعه‌ی آغازگر	۷۲	۷min	۱

جدول۳- چرخه‌های واکنش PCR

۸- الکترو فورز

جهت بارگذاری و الکتروفورز نمونه‌ها ابتدا مقدار ۲ میکرولیتر RNA و ۱۵ میکرولیتر از محصولات PCR با استفاده از سر سمپلرهای استریل شده برداشته شود (در کلیه‌ی مراحل آزمایش این تحقیق از وسایل اتو کلاو شده استفاده شود) و مقدار ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری به هر نمونه اضافه گردد. بافر بارگذاری به دلیل دارا بودن گلیسرول سنگین بوده و سبب می‌شود نمونه‌ها به سهولت بارگیری شود. همچنین به دلیل داشتن دو رنگ قابل رؤیت در هنگام الکتروفورز، به آسانی می‌توان موقعیت DNA را روی ژل ردیابی کرد. سپس برای تعیین سایز روی باندها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از نشانگر اندازه ((GeneRuler 1kb plus DNA Ladder (invitrogen) با مقدار ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری 6X مخلوط شود و ۶ میکرولیتر بافر تهیه شده در چاهک اول تزریق گردد. سپس الکتروفورز نمونه‌ها با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت برای مدت ۶۰ دقیقه برای RNA و ۶۰ تا ۱۰۰ دقیقه برای محصول PCR انجام شود. ژل از دستگاه الکتروفورز جدا شود و برای مشاهده و عکس‌برداری باندهای حاصل به دستگاه ژل داک منتقل گردد و با استفاده از اشعه UV تصویر حاصله مشاهده شود.

۳-روش‌های حذف ویروس در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*):

۳-۱- گرمادرمانی همراه با کشت مریستم:

جهت تیمار گرمادرمانی، شاخساره‌های (۲-۳ cm) کشت شده در محیط کشت مناسب پرآوری، باید در یک انکوباتور(دارای ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرارگیرد. در طول یک هفته تدریجاً دمای انکوباتور از ۲۴°C به ۳۸°C افزایش یابد(به ازای هر روز، ۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) و سپس به مدت ۲ هفته دمای آن در۳۸°C ثابت نگه داشته شود (شکل ۵). در پایان دوره‌ی گرمادرمانی، شاخه‌هایی که این دما را تحمل کرده و رشد نموده‌اند، به محیط کشت تازه منتقل شوند و برای رشد بعدی در اتاق رشد با دمای معمولی ۲۴°C و شدت نور حدود ۵۰۰۰ لوکس نگهداری گردند. پس از ۶-۴ هفته، شاخه‌های جدید ایجاد شده جهت مریستم برداری به اتاق کشت استریل منتقل شوند. بدین منظور باید بخش‌های‌تک گره‌ای ساقه‌های غیراصلی را کوتاه کرده، برگ‌ها را با دقت جدا کرده و با استفاده از استریوسکوپ برگچه‌های پیرامونی مریستم مدنظر را حذف کرده و نوک‌های شاخه (مریستم) ارقام زردآلو(۰/۷، ۱و ۲ میلی‌متر) را با یک تیغه‌ی تیز برش داده شود و مریستم به بستر کشت مناسب جهت رشد انتقال داده شود. کشت‌های گیاهی در فیتوترون با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰ ٪ ، نوردهی ۱۶ ساعته (نور فلورسنت سفید) قرار گیرد و نوک مریستم هر سه هفته یکبار به بستر جدید انتقال یابد. هنگامی که طول نمونه‌ها به ۲ سانتی‌متر رسید، نمونه‌ها به محیط رشد مناسب (محیط QL حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA) جهت پرآوری انتقال یابند. بعد از۴ یا ۶ ماه تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای وجود یا عدم وجود آلودگی ریزنمونه‌ها به ویروس با استفاده از روش مولکولی RT-PCR تعیین گردد (شکل ۸).

شکل۵ – گرمادرمانی نمونه‌های ارقام زردآلو آلوده به ویروس درون دستگاه انکوباتور

۲-۳- شیمی درمانی همراه با کشت مریستم:

پس از سه ماه، شاخساره‌های (۵-۲/۳ cm) رشد یافته در فیتوترون (پس از ۴ واکشت) باید به محیط کشت جدید حاوی ریباویرین با غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر منتقل شوند. پس از ۴ هفته از کشت نمونه‌ها در محیط حاوی ریباورین، نوک‌های شاخه زردآلو(۱ سانتی‌متر طول) از نمونه‌های زنده مانده جدا گردد و به محیط کشت جدید حاوی ریباویرین با غلظت ۲۵ میلی‌گرم جهت تکثیر منتقل شوند و برای رشد در اتاق رشد با دمای معمولی ۲۴°C و شدت نور حدود ۵۰۰۰ لوکس نگهداری گردند. دراین دستورالعمل، نمونه‌ها باید ۲ مرتبه در محیط حاوی ریباورین کشت شوند. پس از ۶-۴ هفته، نوک‌های شاخه زنده مانده و تکثیر شده جهت تکثیر بیشتر به محیط کشت تازه بدون ریباورین منتقل شوند بعد از۴ یا ۶ ماه تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای وجود یا عدم وجود آلودگی ریزنمونه‌ها به ویروس با استفاده از روش مولکولی RT-PCR تعیین گردد (شکل ۸).

۳-۳- سرمادرمانی:

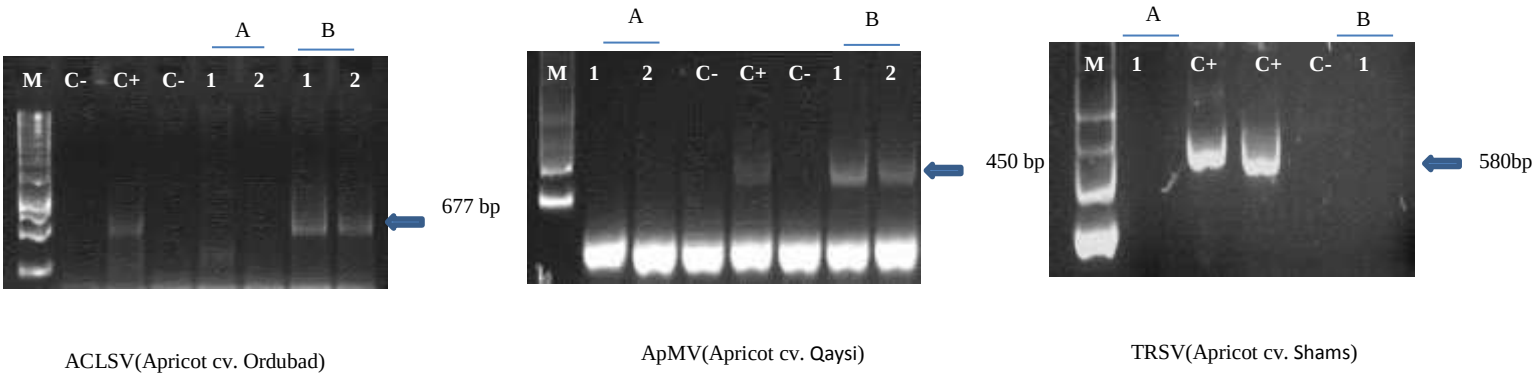
در پروتکل سرمادرمانی (انجماد) به طور خلاصه، نوک‌های شاخه زردآلو (۲-۱میلی‌متر) در محیط QL شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، دی متیل سولفوکسید (DMSO) ۵ درصد و پرولین ۲ درصد پیش‌کشت شوند و به مدت ۱ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند و بعد از آن ریزنمونه‌ها در ویال‌هایی با حجم ۲ سی‌سی حاوی محلول PVS2 (۳۰ درصد گلیسرول، ۱۵ درصد اتیلن گلیکول، ۱۵ درصد دی متیل سولفوکسید و ۴ مولار ساکارز در محیط QL با PH= 5/8) به مدت ۴۰ دقیقه تحت تیمار قرار گیرند. سرد شدن آهسته نوک شاخه‌ها با انتقال کرایویال‌ها به دستگاه(Mr. Frosty (Nalgene® حاصل شد که در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد تا دما به -۴۰ درجه سانتیگراد کاهش یابد. پس از فروبری سریع در نیتروژن مایع (LN) ویال‌های حاوی ریزنمونه‌ها حداقل ۱ ساعت درنیتروژن مایع قرارداده شوند، سپس ویال‌های حاوی ریزنمونه‌ها به سرعت به حمام آب گرم (بن‌ماری) منتقل و به مدت ۱ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. و درنهایت نوک‌های شاخه (مریستم‌ها) به محلول شستشو (۱/۲ مولار ساکارز به مدت ۳۰ دقیقه) منتقل شده و جهت باززایی در محیط تکثیر مناسب کشت گردند (شکل ۶). بعد از۴ یا ۶ ماه تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای وجود یا عدم وجود آلودگی ریزنمونه‌ها به ویروس با استفاده از روش مولکولی RT-PCR تعیین گردد.

شکل ۶- گیاهچه حاصل از سرمادرمانی مریستم زردآلو

٤-۳- الکتروتراپی:

ابتدا باید دستگاه الکتروفورز با بافر TAE (Tris-acetate-EDTA) و یا محلول آب و نمک (۱M) و ریزنمونه های (۲/۵-۲ cm) حاوی یک یا دو جوانه جانبی پر شود، پالس‌های الکتریکی ۳۰-۴۰ میلی‌آمپری در مدت زمان‌های ۱۵ دقیقه‌ای اعمال گردد و پس از خروج ریزنمونه‌های الکتروتراپی شده از دستگاه الکتروفورز، این نمونه‌ها ضدعفونی گردد و به طور مستقیم در محیط کشت استقرار(محیط کشت پایه QL به همراه ۰/۰۶ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP) بهینه‌شده کشت شوند (شکل ۷). میزان کاهش آلودگی ویروسی در این ریزنمونه‌ها بعد از ۴ واکشت با استفاده از روش مولکولی RT-PCR بررسی گردد (شکل ۸).

شکل ۷- الکتروتراپی ریزنمونه‌های ارقام زردآلو آلوده به ویروس به منظور حذف آلودگی ویروسی



ACLSV(Apricot cv. Ordubad) ApMV(Apricot cv. Qaysi) TRSV(Apricot cv. Shams)

شکل ۸- A: after sanitation; B: prior to elimination; C- : negative control; C+ : positive control; M: DNA marker 1 kb

٤- مرحله ریشه‌زائی:

در این مرحله، باید گیاهچه‌هایی که از نظر طول (۵-۴ سانتی‌متر) و رشد رویشی در مرحله پرآوری قوی‌تر هستند انتخاب و به محیط‌های ریشه‌زایی انتقال داده شوند. بنابراین گیاهچه‌های انتخاب شده ابتدا باید در شیشه‌های مربایی حاوی ۵۰ سی‌سی محیط کشت QL۱/۲ همراه با غلظت۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شوند و سپس به مدت ۱۰-۷ روز در تاریکی مطلق جهت القای کالوس ریشه‌زایی قرار گیرند و پس از گذشت زمان مذکور، گیاهچه‌ها باید به شیشه‌های مربایی حاوی ۵۰ سی‌سی محیط کشت QL ۱/۲ بدون هورمون و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال یابند. سپس شیشه‌های حاوی گیاهچه‌ها به اتاقک رشد با شدت نور۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس نور سفید فلورسانت، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۱ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردند.

٥- مرحله سازگاری یا انتقال از شرایط *in vitro* به *in vivo*:

جهت سازگاری ابتدا باید گیاهچه‌های واجد شاخساره و برگ‌های مطلوب و ریشه‌های قوی، از ظروف کشت بیرون آورده و ریشه‌ها با دقت با آب مقطر استریل شستشو داده شوند تا بقایای محیط کشت جدا گردد. ریشه‌های طویل تا حدی هرس شوند و همچنین برگ‌های پایینی زرد و نامطلوب ریزنمونه‌ها جدا گردند. سرانجام، هر یک از گیاهان به داخل گلدان‌های کوچک حاوی ترکیب کوکوپیت و پرلیت (به نسبت ۲:۱) منتقل گردند و هریک از گلدان‌ها جهت تأمین رطوبت از کف، درون پتری‌های بزرگ قرار گیرند. و در شرایط گلخانه با دمایی در حدود ۱ ± ۲۴ و رطوبت نسبی ۹۰ درصد نگهداری شوند. جهت جلوگیری از تبخیر در طی دو هفته‌ی اول پس از انتقال، روی هر گیاه یک لیوان یکبار مصرف شفاف قرار گیرد. همچنین همه‌ی گلدان‌ها به طریق آبیاری از کف (جذب آب از پتری‌های حاوی آب) آبدهی شوند. (تغذیه‌ی گیاهان با استفاده از محلول رقیق ۰/۱ غلظت QL برای مدت دو هفته انجام گیرد و پس از استقرار بیشتر گیاهان، تغذیه با آب شهری انجام گیرد). پس از ده روز، منافذی در لیوان‌های یکبار مصرف شفاف که بر روی گیاهان قرار داشتند، جهت سازگار شدن گیاه با محیط جدید، ایجاد گردد. بعد از ۲ هفته،

باید لیوان‌های یک بار مصرف از روی گیاهان برداشته شوند و سپس تغذیه‌ی گیاه به طریق معمول (آبیاری بستر گیاه) انجام گیرد (شکل ۹).

٦- مرحله انتقال به گلخانه:

بعد از ۵ الی ۶ هفته گیاهچه‌های سازگار شده به گلخانه منتقل و کشت آنها در گلدان انجام می‌گیرد. بستر کاشت شامل پیت ماس: پرلیت:خاک به نسبت ۱:۱:۱ می‌باشد (در صورت امکان استریل) (شکل ۹).

شکل ۹- ریشه‌زایی، سازگاری و انتقال ارقام زردآلو سالم سازی شده به گلخانه

نتیجه گیری: دستورالعمل معرفی شده در مورد پروتکل عاری از ویروس ارقام زردآلو تا نتیجه گیری نهایی یعنی انتقال گیاهچه‌های درون گلدان به مزرعه به مدت زمان حداقل ۲۰-۲۴ ماه نیاز دارد و ثانیا این پروتکل برای کلیه ارقام با تغییرات جزئی قابل استفاده است. جهت ریشه زائی ارقام زردآلو وجود آهن قرمز و تاریکی ضروری می‌باشد.

سپاس گزاری

بدین وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به دلیل حمایت مالی در قالب پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۹۶۰۳۹۸-۰۰۶۰۵۳۳-۰۵-۳تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع:

Abdullahi I, Lawrence T (2022) Accelerated in vitro thermotherapy and indexing against apple chlorotic leaf spot virus in Shiro plum. Can J Plant Pathol 44(1):136–146.

Adil S, Singh V, Anjum A, Quraishi A (2022) A mini-review on electrotherapeutic strategy for the plant viral elimination. Plant Cell Tiss Organ Cult 150:41–55.

Ali Khan F, Afzal A, Erum S, Irum S, Khan H, Hussain Z, Sher H, Bostan N, Rabi F (2021) Optimization protocol for in vitro establishment of selected apricot germplasm, 30, 10899-10907.

Ben Mahmoud K, Najar A, Jemai N, Jemmali A (2017) Advances in sanitation methods for fruit tree species through in vitro technologies: possibilities and limits. J New Sci 45(4):2483–2495.

Bettoni JC, Souza JA, Volk GM, Dalla Costa M, da Silva FN, Kretzschmar AA (2019) Eradication of latent viruses from apple cultivar 'Monalisa' shoot tips using droplet-vitrification cryotherapy. Sci Hortic 250:12–18. https:// doi. org/ 10. 1016/j. scien ta. 2019. 02. 033.

Bettoni JC, Mathew L, Pathirana R, Wiedow C, Hunter DA, McLachlan A, Khan S, Tang J et al (2022a) Eradication of Potato Virus S, Potato Virus A, and Potato Virus M from infected in vitro-grown potato shoots using in vitro therapies. Front Plant Sci 13:878733. https:// doi. org/ 10. 3389/ fpls. 2022. 878733.

Bettoni JC, Fazio G, Carvalho Costa L, Hurtado-Gonzales OP, Rwahnih MA, Nedrow A, Volk GM (2022b) Thermotherapy followed by shoot tip cryotherapy eradicates latent viruses and Apple Hammerhead Viroid from in vitro apple rootstocks. Plants 11:582. https:// doi. org/ 10. 3390/ plant s1105 0582.

Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of general virology, 34(3), 475-483.

Dessoky ES, Attia OA, Ismail AI, El-Sharnouby M E (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.

Dziedzic E (2008) Elimination of Prunus necrotic ring spot virus (PNRSV) from plum 'Earliblue' shoots through thermotherapy in vitro. J Fruit Ornam Plant Res 16:101–109

Farhadi-Tooli S, Ghanbari A, Kermani MJ, Zeinalabedini M, Bettoni JC, Naji, AM. and Kazemi N (2022) Droplet-vitrification cryotherapy and thermotherapy as efficient tools for the eradication of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus from virus-infected quince in vitro cultures. European Journal of Plant Pathology, 162(1), 31-43.

González JE, Sánchez R, Sánchez A (2006) Biophysical analysis of electric current mediated nucleoprotein inactivation process. Centro Agrícola, 2, 42-47.

Hauptmanová A and Polák J (2011) The elimination of Plum pox virus in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of in vitro cultures.

Helliot B, Panis B, Locicero A, Reyniers K, Muylle H, Vandewalle M, Michel C, Swennens R. and Lepoivre P (2001) Development of in vitro techniques for elimination of virus diseases from Musa. Acta Horticulturae, .535-538.

Hesari N, Haji Mohammadi A, Zarghami R, Fakheri B, Kiss-Bába E, Szegő A, Mirmazloum I (2022) Eradication of PPV and PNRSV viruses from three Peach cultivars using Thermotherapy in Vitro, including optimization of Microshoots'

Hilaire J, Tindale S, Jones G. et al. (2022) Risk perception associated with an emerging agri-food risk in Europe: plant viruses in agriculture. Agric & Food Secur 11, 21. https://doi.org/10.1186/s40066-022-00366-5

Parštein F, Sedlak J, Svobodova L, Polak J, Gadiou S (2013) Results of in vitro chemotherapy of apple cv. Fragrance. Hort Sci 40:186–190.

Kazemi N, Zaare Nahandi F, Habashi AA and Masoomi-Aladizgeh F (2020) Comparing the efficiency of conventional and novel methods of virus elimination using molecular techniques. European Journal of Plant Pathology, 157, 887-897.

Koenig R, Lesemann D. E, Burgermetster W (1984) Beet Necrotic Yellow Vein Virus: Purification, preparation of Antisera and Detection by Means of ELISA, and Electro-Blot Immunoassay. Journal of Phytopathology, 111(3-4), 244-250.

Lerch B (1987) On the inhibition of plant virus multiplication by Ribavirin. Antiviral Res 7(5):257–270

Lal M, Jamwal M, Sood Y, Bakshi P, Sharma N, Sharma S, Kumar S, 2022, Micropropagation of fruit crops: A review, Plant Science Today, ISSN 2348-1900.

Mathew L, Tiffin H, Erridge Z, McLachlan A, Hunter D, Pathirana R (2021) Efficiency of eradication of raspberry bushy dwarf virus from infected raspberry (Rubus idaeus) by in vitro chemotherapy, thermotherapy and cryotherapy and their combinations. Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC) 144:133–141.

Mazeikiene I, Kviklys D, Siksnianiene JB, Zinkus D, Stanys V (2019) Influence of Ribavirin on Prunus domestica L. regeneration, genome stability and virus eradication in vitro. In Proceedings of the Latvian Academy of Sciences (Vol. 73, No. 3, pp. 238–243). De Gruyter Poland.

Mirzaei L, Yadollahi A, Jafarkhani Kermani M, Naderpour M. Zeinanloo AA (2021) Screening and the possibility of providing virusfree stock plants of some commercial olive cultivars. PhD dissertation, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Parker WB (2005) Metabolism and antiviral activity of ribavirin. Virus Research 107:165–171.

Quoirin M, Lepoivre P (1977) Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de Prunus. Acta Hortic 78:437–442.

Şekerz MG, Süzerer V, Elibuyuk IO, Çiftçi YÖ (2015) In Vitro Elimination of PPV from Infected Apricot Shoot Tips via Chemotherapy and Cryotherapy. International journal of agriculturebiology, 17(5).

Šiško M, Ternjak T, Grobelnik-Mlakar S (2022) The Effects of Different Cytokinin Types and Their Concentration on in Vitro Growth of Apricot (Prunus armeniaca L.) Shoots. Agricultura Scientia, 19(1), pp.1-6.

Stein A, Spiegel S, Faingersh G, Levy S (1991) Responses of micropropagated peach cultivars to thermotherapy for elimination of Prunus necrotic ringspot virus. Ann Appl Biol 119:265–271

Wang MR, Cui ZH, Li JW, Hao XY, Zhao L, Wang QC (2018) In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. Plant Method 14:1–18.

Wang MR, Bi WL, Bettoni JC, Zhang D, Volk GM, Wang QC (2022) Shoot tip cryotherapy for plant pathogen eradication. Plant Pathol 71(6):1241–1254.

Zare Khafri A, Zarghami R, Naderpour M, Ahmadi B, Mirzaei L, (2024) Assessment of virus eradication methods from infected in vitro-grown apricot cultures. Plant Cell Tiss Organ Cult 156, 52. https://doi.org/10.1007/s11240-023-02621-4.

Zarghami R, Ahmadi B (2022) Production of Plum Pox Virus-Free and Prunus Necrotic Ringspot Virus-Free Regenerants Using Thermotherapy and Meristem-Tip Culture in Prunus persica L. Erwerbs-Obstbau, 1–9.