تهیه نهال سالم از ارقام اصیل زیتون کشور با استفاده از غربالگری عوامل بیماری زا

مسعود نادرپور[1*]، راحله شهبازی[2]، عبدالرضا کاوند[3]، محمد کاوند[4]

۱-استادیار ، معاونت تحقیقات و فناوری بذر و نهال، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج. ۲- کارشناس ارشد، معاونت تحقیقات و فناوری بذر و نهال، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ۳- دکترا، معاونت تحقیقات کنترل و گواهی نهال، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج. ۴- کارشناس ارشد، واحد تحقیقات کنترل و گواهی بذر و نهال، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک.

*نویسنده مسئول: m.naderpour@spcri.ir

چکیده

نهال سالم و اصیل به عنوان شالوده اساسی در توسعه صنعت باغبانی دنیا مطرح است. این نهاده ارزشمند در کشورهای توسعه یافته از باغات مادری که مواد اولیه آن از هسته های اولیه سالم تهیه شده است، تامین می گردد. زمانیکه هسته های اولیه سالم موجود نباشد، سالم سازی ارقام موجود با تکیه بر روش های ترموتراپی، بیوشیمیایی و کشت بافت بویژه کشت مریستم انتهایی برای عاری سازی ماده تکثیری از عوامل بیماری زای مورد نظر انجام گرفته و مواد تکثیری سالم به عنوان هسته اولیه برای استفاده در توسعه باغات مادری و نهال سالم و اصیل در اسکرین هاوس نگهداری می شوند. اما این روش ها علیرغم نیاز به امکانات آزمایشگاهی بالا و نیروی انسانی متخصص از گرایشات مختلف کشاورزی، همیشه موفق نبوده اند. روش جایگزین، اسکرین ارقام موجود با روش های مختلف بیماری شناسی، انتخاب منابع سالم و اصیل و در نهایت تکثیر و نگهداری آنها در اسکرین هاوس است. در این پروژه تحقیقاتی ارقام اصیل زیتون در استان های زنجان، گیلان و خوزستان با روش های سرولوژیکی و مولکولی مبتنی بر اسید نوکلئیک از نظر آلودگی به بیماریهای ویروسی مندرج در استانداردهای ملی سلامت زیتون (ArMV، CLRV و CMV) و SLRSV مورد ارزیابی قرار گرفته و همزمان از درختان مذکور نمونه هایی به عنوان منابع اصیل در گلخانه پرورش و نگهداری شدند. منابع پرورش یافته در مراحل مختلف رشد چندین بار با روش های فوق برای ردیابی عوامل مذکور مورد ارزیابی قرار گرفته و در نهایت تعداد ۱۲۴ نهال سالم مربوط به هفت رقم از بین آنها انتخاب شدند.

کلمات کلیدی: هسته اولیه، زیتون، سالم سازی

مقدمه

سلامت نهال در کنار اصالت آن لازمه گام نهادن در مسیر باغبانی پایدار، توسعه صنعت مدرن باغبانی و استفاده بهینه از این صنعت است. طیف وسیعی از عوامل بیماری زای مختلف گیاهی (ویروس ها، ویروئیدها، شبه ویروس ها، پروکاریوت ها، قارچ ها و نماتد ها) درختان باغی میوه ای و غیر میوه ای را از نظر کمی و کیفی تحت تاثیر قرار داده و در کوتاه مدت یا بلند مدت باعث زوال باغات می شوند. آلودگی به برخی از این عوامل از جمله عوامل بیماری های ناشی از سه گروه اول بسته به نوع عامل و میزبان آن ها معمولا بدون نشانه های بارز بیماری هستند که به همین دلیل غالبا در پروسه تولید نهال مورد بررسی قرار نگرفته یا روش های بکار رفته در ارزیابی آلودگی به این عوامل، قادر به ردیابی آنها در بافت های آلوده گیاهی نیستند. با توجه به تکثیر غیر جنسی نهال، عوامل بیماری زای فوق بویژه عوامل بیماری زای سیستمیک (مانند ویروس ها، ویروئیدها، شبه ویروس ها، فایتوپلاسماها و تعداد معدودی از باکتری ها و قارچ ها) معمولا به آسانی از طریق مواد تکثیری (پایه، پیوندک، قلمه، پاجوش و ...) به نهال منتقل شده و عملا آلودگی ها بدون دخالت عوامل زنده محیطی به باغ تازه تاسیس شده وارد می شوند. مضافا اینکه تعدادی از همین عوامل از طریق ناقلین بیولوژیکی، بذر و دانه گرده نیز منتقل می شوند. عوامل بیماری زای ویروسی و شبه ویروسی در زیتون معمولا فاقد علائم بیماری بوده، گیاهان محک برای ردیابی آنها از زیتون تاکنون معرفی نشده و حتی ردیابی آنها با روش های

معمول بیماری شناسی مانند روش های سرولوژیکی در این گیاه به سختی انجام می گیرد Albanese et al., 2012; Bertolini et al., 2001; Al Abdullah et al., 2005). به همین دلیل از روش های مبتنی بر اسید نوکلئیک مانند Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) و استخراج و بررسی Double Stranded RNA (dsRNA) برای ردیابی عوامل بیماری زای ویروسی و شبه ویروسی (به ترتیب) در زیتون استفاده می شود (Bertolini et al., 2001; Al Abdullah et al., 2005; Naderpour et al., 2014, 2015; Fadel et al., 2005; Varanda et al., 2010). شناخته شده ترین روش ها در تهیه هسته های اولیه سالم درختان باغی ترموتراپی، روش های بیوشیمیایی، کشت مریستم انتهایی یا ترکیبی از دو یا هر سه روش می باشد. بدلیل عدم موفقیت صد در صد این روش ها در از بین بردن عوامل بیماری زا، ردیابی این عوامل نیز پس از هر روش امری ضروری و لازم الاجرا است. هر چند که این روش ها در تهیه منابع سالم بسیار مهم هستند ولی هزینه بالا، عدم موفقیت صد در صد در عاری سازی از آلودگی های موجود و از همه مهمترامکان بروز موتاسیون بویژه در مراحل کشت مریستم انتهایی و از بین رفتن اصالت از جمله معایب این روش ها محسوب می شوند (Wang et al., 2006; Koubouris et al., 2007; Rongrong et al., 2010; unpublished data, SPCRI). بنابراین غربالگری عوامل بیماری زای درختان باغی اصیل و سازگار با شرایط منطقه در باغات موجود در فضای باز به منظور انتخاب ارقام سالم، تهیه نمونه هایی زنده از آنها و نگهداری در شرایط غیر قابل نفوذ به عوامل بیماری زا و ناقلین بیولوژیکی آنها (اسکرین هاوس) به دلیل امکان آلودگی منابع سالم در فضاهای باز و ارزیابی منابع موجود در اسکرین هاوس در دوره های مختلف با روش های حساس می تواند به عنوان روش جایگزین مطرح باشد که در تحقیق حاضر در مورد زیتون انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی این تحقیق درختان مادری اصیل و شناسه دار زیتون از ارقام (زرد، روغنی، شنگه، گلوله و ماری)، (زرد، روغنی، شنگه، گلوله، ماری وفیشمی) و (باغملک و روغنی) به ترتیب در مراکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان های زنجان (طارم)، گیلان (رودبار) و خوزستان (صفی آباد) بود. اصالت هر کدام از این ارقام قبلا در پروژه تحقیقاتی مشترک بین موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال وپژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی از طریق انگشت نگاری ژنتیکی به اثبات رسیده است (Ghareyazi et al., 2005). نمونه های برگ و شاخه از مجموع ۳۹ درخت شناسه دار متعلق به ارقام روغنی (۱۱ درخت)، زرد (۷ درخت)، شنگه (۷ درخت)، گلوله (۵ درخت)، ماری (۵ درخت)، باغملک (۱ درخت) و فیشمی (۳ درخت) جمع آوری شده و در روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. همزمان شاخه های یکساله به تعداد ۲۰ شاخه از هر درخت انتخاب و پس از تیمار با ایندول بوتیریک اسید در مخلوط خاک و ماسه (به نسبت یکسان) در گلدان کشت شده و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. نمونه ها با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی ویروس های *Arabis mosaic virus* (ArMV)، *Cherry leafroll virus* (CLRV)، *Cucumber mosaic virus* (CMV) (مندرج در استانداردهای ملی سلامت زیتون) و *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) تهیه شده از شرکت های Agdia (USA) و Bioreba (Switzerland) و آزمون های سرولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. همزمان از نمونه های مذکور، RNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج RNA (Qiagene, Germany) استخراج شده و آلودگی/سلامت نمونه ها با استفاده از پروتکل های بهینه سازی شده/توسعه یافته در موسسه متبوع (Naderpour et al., 2014, 2015) با آزمونهای RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. کنترل مثبت این آزمون ها نمونه های آلوده به ویروس ها بود که از نقاط مختلف کشور از میزبان های متفاوت از جمله زیتون ردیابی شده بودند. کنترل مثبت ویروس SLRSV از شرکت تامین کننده آنتی بادی تهیه شد. به منظور تایید بیشتر نتایج آزمون های RT-PCR ، باندهای تک گانه تکثیر شده ار نمونه های کنترل مثبت پس از جداسازی از ژل آگارز و خالص سازی با کیت استخراج DNA از ژل Qiagen (Germany)، به طور مستقیم در شرکت MWG, Europhines (Germany) ترادف یابی شدند. نهال های رشد یافته در گلخانه به همان ترتیب با آزمون های فوق از نظر آلودگی به

هر چهار ویروس بررسی شدند. در نهایت RNA دو رشته ای (dsRNA) از همه نمونه ها با کمی تغییرات در روش توصیه شده (Dodds et al., 1984) استخراج شده و در روی ژل های آگارز و پلی اکریل آماید از نظر احتمال آلودگی نمونه ها به dsRNA ویروس ها و شبه ویروس ها مطالعه گردید.

نتایج و بحث

آزمون های سرولوژیکی با آنتی بادی های اختصاصی ویروس های ArMV، CLRV، CMV و SLRSV در بین نمونه های جمع آوری شده از باغات شناسه دار زیتون و نیز نهال های تهیه شده از همان درختان، هیچ گونه آلودگی به این ویروس ها را نشان نداد. با توجه به حساسیت بسیار بالای روش های مولکولی مبتنی بر RT-PCR در ردیابی عوامل بیماری زا بویژه عواملی بیماری زای ویروسی در زیتون (Bertolini et al., 2001; Al Abdullah et al., 2005; Naderpour et al., 2014, 2015; Fadel et al., 2005; Varanda et al., 2010)، از این روش ها برای ردیابی ویروس های مورد مطالعه در نمونه های جمع آوری شده با پروتکل های توسعه یافته (Naderpour et al., 2014, 2015) استفاده شد. به دلیل امکان از بین رفتن RNA کل استخراج شده از بافت های گیاهی در اثر ریبونوکلئازهای اندمیک و/یا وجود بازدارنده های RT-PCR نظیر پلی ساکاریدها و پلی فنولیک ها در RNA مورد مطالعه، ابتدا از تکثیر قطعه ای از cDNA ژن کنترل داخلی (*Nad5*) برای تایید کیفیت RNA استخراج شده و نیز درستی آزمون RT-PCR استفاده شد (Naderpour et al., 2014, 2015; Menzel et al., 2002). آزمون های RT-PCR از وجود ویروس های ArMV ، SLRSV و CLRV در نمونه های برخی از درختان مربوط به ارقام زرد، شنگه و ماری حکایت داشته ولی در بین نمونه های نهال های برگرفته از درختان فقط ویروس SLRSV در برخی از نهال های ارقام روغنی، ماری و زرد ردیابی شد. این نتایج با نتایج منتشر شده قبلی مبنی بر حساسیت پایین آزمون های سرولوژیکی در ردیابی ویروس ها از زیتون و لزوم استفاده از واکنش های مبتنی بر اسید نوکلئیک در ردیابی عوامل بیماری زا همخوانی داشته و این روش ها را برای برنامه های گواهی نهال بسیار ضروری نشان داد (Albanese et al., 2012; Bertolini et al., 2001; Al Abdullah et al., 2005; Varanda et al., 2010; Fadel et al., 2001). در نتایج بررسی dsRNA استخراج شده از نمونه ها، آلودگی به شبه ویروس ها مشاهده نگردید که البته شبه ویروس ها تاکنون از روی زیتون در کشور گزارش نشده اند. به دلیل شرایط نامساعد محیطی در گلخانه نگهداری نهال های تهیه شده در این تحقیق، فقط تعداد ۱۲۴ نهال از ارقام باغملک، روغنی، زرد، شنگه، گلوله، ماری و فیشمی سالم نگهداری شدند. نهال های مذکور در مراحل مختلف رشدی بارها با آزمون های فوق مورد مطالعه قرار گرفته و پس از اطمینان از سلامت آنها در اختیار برخی ارگان های خصوصی و دولتی برای تکثیر قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که در مواقعی که منابع سالم برای تهیه مواد تکثیری موجود نباشد و روش های سالم سازی- بنا به دلایل اشاره شده در قسمت مقدمه- قابل کاربرد نباشد، اسکرین ارقام موجود بر اساس استانداردهای ملی سلامت و نگهداری منابع مورد مطالعه در اسکرین هاوس به منظور جلوگیری از آلودگی طبیعی می تواند روشی جایگزین باشد.

منابع

1. Albanese, G., Saponari, M., Faggioli, F. 2012. Phytosanitary Certification. p.107-128. In: Olive Germplasm-The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy. Rijeka, Croatia: InTech Press.
2. Albdullah, A., Elbeaino, T., Minafra, A., Digiaro, M., and Martelli, G. P. 2009. Detection and variability of *Olive latent virus-3* in the Mediterranean region. Journal of Plant Pathology 91(3): 521-525.
3. Bertolini, E., Olmos, A., Martinez, M. C., Gorris, M. T., and Cambra, M. 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. Journal of Virological Methods 96: 33-41.
4. Dodds, J. A., Morris, T. J., and Jordan, R. L. 1984.Plant viral double-stranded RNA. Annual Review of Phytopathology 22: 151-168.
5. Fadel, C., Digiaro, M., Choueiri, E., El Beaino, T., Saponari, M., Savino, V., and Martelli, G. P. 2005. On the presence and distribution of olive viruses in Lebanon. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35: 33-36.

6. Ghareyazi, B., Nankali, A., and Shahryari, M. 2005. Identification of olive cultivars using molecular markers (DNA fingerprinting). Final Report, Center for Agriculture Information and Scientific Documentation, Areo, Ministry of Agriculture, Iran, no. 84/567, pp. 69.
7. Koubouris, G. C., Maliogka, V. I., Efthimiou, K., Katis, N. I., andVasilakakis, M. D. 2007. Elimination of Plum pox virus through in vitro thermotherapy and shoot tip culture aompared to conventional heat treatment in apricot cultivar Bebecou. Journal of General Plant Pathology 73: 370-373.
8. Menzel, W., Jelkmann, W., and Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of planty mRNA as internal control. Journal of Virological Methods. 99: 81-92
9. Naderpour, M., Shahbazi, R., Sadeghi, M., and Arefi, H. M. 2015. Simultaneous detection of Arabis mosaic virus, Cherry leafroll virus and Cucumber mosaic virus wuth coamplification of plant mRNA as internal control for olive certification programs. Iranian Journal of Virology (in press).
10. Rongrong, T., Liping, W., Hong, N., and Guoping, W. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. Plant Cell Tissue and Organ Culture 101: 229-235.
11. Varanda, C., Cardoso, J. M. S., Felix, M. D., Oliviera, S., and Clara, M. H. 2010. Multiplex RT-PCR for detection and identification of three necroviruses that infect olive trees. European Journal of Plant Pathology 127(2): 161-164.
12. Wang, L., Wang, G., Hong, N., Tang, R., Deng, X., Zhang, H. 2006. Effect of thermotherapy on elimination of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic leafspot virus for invitro-cultured pear shoot tips. HortScience 41: 729-732.

Production of virus free nuclear stocks of olive by pathogen screening

M. Naderpour[1*], R. Shahbazi[2], A. Kavand[3], M. Kavand[4]

1-Assistant professor of molecular plant virology, Seed and Plant Research and Technology Deputy, Seed and Plant Certification Research Institute, AREEO, Karaj. 2- M. Sc. of Plant Protection, Seed and Plant Research and Technology Deputy, Seed and Plant Certification Research Institute, AREEO, Karaj 3-Ph.D of horticulture, Plant Control and Certification Deputy, Seed and Plant Certification Research Institute, AREEO, Karaj. 4- M. Sc. of horticulture, Seed and Plant Research Certification Research Department, Markazi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Arak.

*Corresponding author: m.naderpour@spcri.ir

Abstract

Certified saplings play fundamental roles in developing/improving of horticultural industry. Certified saplings are produced from the mother blocks which, in turn, originate from healthy nuclear stocks. Sanitation of plant propagating materials using thermotherapy, biochemical and tissue culture specifically shoot-tip grafting could result in production of virus-free nuclear stocks from the infected plant materials. However, these methods demand highly equipped tissue culture laboratory and skilful staff. Moreover, they are not successful in all cases and may cause undesirable mutations. Sanitation could be replaced by other methods such as screening of given plants for plant pathogens, selection of healthy resources and conservation in screen houses. The last method was studied in the present research on some registered olive cultivars in Zanjan, Gilan and Khuzestan provinces using different serological and molecular approaches. Simultaneously, saplings were potted from these cultivars and kept under green house conditions. All samples and saplings in different growing phases were analyzed for virus infections using serological and molecular techniques. One hundred twenty four virus free saplings were prepared using these methods.

Key words: Nuclear stocks, Olive, Sanitation