روش‌های تعیین ژنوتیپ‌های سازگاری برای انتخاب درختان گرده‌زا

اسفندیار حسنی مقدم

عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

مقدمه

برخی از درختان میوه مانند بادام، گیلاس، سیب، بعضی آلوها، زردآلو، گلابی، بعضی ارقام آلبالو و فندق به علت پدیده خودناسازگاری برای گرده افشانی و تشکیل میوه نیازمند ارقام گرده زا هستند. ارقامی که وظیفه تولید گرده جهت گرده‌افشانی رقم اصلی را دارند، گرده‌زا نامیده می‌شوند. نقش ارقام گرده‌زا لزوما فقط تولید گرده نبوده بلکه این ارقام می‌توانند دارای محصول تجاری و بازار پسند باشند. گرده‌زاها باید به دقت انتخاب شوند تا تشکیل میوه کافی را در رقم اصلی باغ تضمین کنند. در برخی موارد حتی در حضور یک رقم گرده‌زا نیز میزان تشکیل میوه پایین است که این میتواند به دلیل دگرناسازگاری و یا عدم همزمانی گلدهی رقم گرده‌زا با رقم اصلی در داخل باغ باشد.گاهی کاشت دو یا چند رقم مختلف نیز مشکل گرده افشانی و تلقیح را حل نخواهد کرد. با توجه به اینکه برای احداث باغ های تجاری درختان میوه خانواده رزاسه تهیه ارقام گرده زای مناسب و سازگار از اهمیت بالایی برخوردار است تا بتوان محصول اقتصادی را در زمان باردهی باغ میوه تولید نمود. لذا هدف از نگارش این مقاله بررسی روش‌های انتخاب ارقام گرده‌زا سازگار با رقم اصلی جهت احداث باغ‌های مدرن و تجاری می‌باشد.

۱- بررسی درصد تشکیل میوه

میزان خودناسازگاری ارقام با تعیین درصد تشکیل میوه اولیه و همچنین درصد تشکیل میوه نهایی بعد از خودگرده افشانی و مقایسه آن با درصد تشکیل میوه همان رقم یا ارقام به دنبال دگرگرده افشانی تعیین می‌شود. برای جلوگیری از عمل لقاح بوسیله گرده‌های ناخواسته توسط حشرات، بهترین روش پوشانیدن و حفاظت شکوفه‌ها، شاخه‌ها و یا کل درخت قبل از باز شدن گل‌ها با استفاده از پاکت‌های کاغذی،کیسه‌های پارچه‌ای و تورهای سیمی و یا نایلونی می‌باشد. در مورد گیلاس، بادام، سیب و گلابی نیازی به اخته کردن گل‌ها نیست ولی در مورد سایر درختان از قبیل زردآلو، آلبالو وآلوها اخته کردن برای جلوگیری از خودگرده‌افشانی ناخواسته اخته کردن گل ضروری می‌باشد.

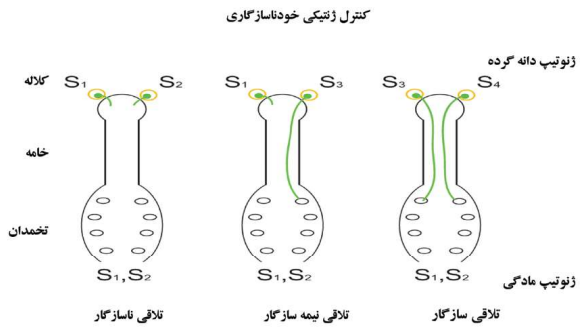
در روش بررسی درصد تشکیل میوه بعد از گرده‌افشانی کنترل شده برای تعیین روابط سازگاری بین ارقام مختلف درخت سیب، نسبت تعیین درصد میوه اقدام می‌نمایند. در ارقامی که با خود گرده افشانی، کمتر از ۵ درصد تشکیل میوه دادند به عنوان ارقام خودناسازگار شناخته می شوند. علاوه بر این در ارقامی که بعد از خود گرده افشانی بین ۵ تا ۱۰ درصد تشکیل میوه دارند را به عنوان ارقام نیمه سازگار و همچنین در ارقامی از درخت سیب که با استفاده از خودگرده افشانی بیش از ۱۰ درصد تشکیل میوه نهایی به عنوان ارقام سازگار با همدیگر شناخته شده می شوند(نیکی ، ۱۹۹۶). درصد تشکیل میوهٔ اولیه بعد از خود تلقیحی در درخت گلابی اگر بیشتر از ۷۰ درصد باشد بعنوان ارقام سازگار باهم و در تلاقی‌های نیمه سازگار درصد تشکیل میوه بین ۳۰ تا ۷۰ درصد می‌باشد. چنانچه درصد تشکیل میوه در ارقام خودناسازگار گلابی بعد از خودتلقیحی کمتر از ۳۰ درصد باشد بعنوان ارقام ناسازگار معرفی می شوند. در درخت گیلاس درصد تشکیل میوه بعد از خودگرده افشانی در ارقامی که خودسازگار هستند بیشتر از ۵ درصد می‌باشد. ولی درصد تشکیل میوه بعد از خودگرده‌افشانی در ارقام خودناسازگار گیلاس بین ۱ تا ۳ درصد می‌باشد. در درخت آلبالو ارقامی که با دانهٔ گرده خودی کمتر از ۱ درصد تشکیل میوه دارند به عنوان خودناسازگار، بین ۱ تا ۱۰ درصد تشکیل میوه به عنوان ارقام نیمه سازگار و چنانچه درصد تشکیل میوه بیش از ۱۰ باشد آن ارقام را به عنوان خودسازگار تلقی می‌نمایند. در بادام درصد تشکیل میوه در ارقام خودسازگار بعد ازخودتلقیحی و تلاقی های سازگار بیشتر از ۴ درصد و در ارقام خودناسازگار بعد از خودتلقیحی و همچنین تلاقی های ناسازگار درصد تشکیل میوه کمتر از ۴ درصد می‌باشد. در درخت زردآلو چنانچه درصد تشکیل میوه بعد از خودتلقیحی بیشتر از ۱۰ درصد باشد بعنوان ارقام سازگار شناخته شده می شوند و در تلاقی‌های نیمه‌سازگار درصد تشکیل میوه بین ۵ تا ۱۰ درصد می باشد. لازم به ذکر است که درصد تشکیل میوه در ارقام زردآلوی خودناسازگار بعد از خودتلقیحی و نیز در تلاقی‌های ناسازگار کمتر از ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۱- تعیین روابط سازگاری بین گونه های مختلف درختان میوه بعد از خودگرده افشانی

ردیف	نام گونه درخت	تلاقی سازگار (درصد)	تلاقی نیمه سازگار (درصد)	تلاقی ناسازگار (درصد)
۱	سیب	بیشتر از ۱۰	۵ تا ۱۰	کمتر از ۵
۲	گیلاس	بیشتر از ۵	-	کمتر از ۳
۳	بادام	بیشتر از ۴	-	کمتر از ۴
۴	گلابی	بیشتر از ۷۰	۳۰ تا ۷۰	کمتر از ۳۰
۵	زردآلو	بیشتر از ۱۰	۵ تا ۱۰	کمتر از ۵

۲- بررسی رشد لوله گرده

خودناسازگاری در درختان خانواده رزاسه از نوع گامتوفیتیک می‌باشد و واکنش خودناسازگاری در داخل خامه اتفاق می‌افتد. در این درختان ریبونوکلئازهای خامه باعث تخریب RNA لوله گرده شده و در نهایت باعث توقف رشد لوله گرده در داخل خامه می‌شود. رشد لوله گرده را می‌توان با رنگ آمیزی توسط آنیلین- بلو (Aniline blue) و به کمک میکروسکوپ فلوروسنس بررسی کرد. اگر لوله گرده یک رقم درخامه رقم دیگر کاملا رشدکند و به تخمدان برسد این دو رقم با هم سازگارند. چناچه ۵۰ درصد از لوله‌های گرده در طول خامه یا در یک سوم بالای خامه متوقف شود این ارقام نیمه سازگار ودر صورتی که ۱۰۰ درصد لوله های گرده در طول خامه و یا در یک سوم بالایی خامه متوقف بشوند این ارقام با همدیگر ناسازگار می‌باشند. انجام تلاقی های کنترل شده و مطالعه رشد لوله گرده با میکروسکوپ فلورسنس به دو صورت انجام می‌گیرد.



شکل۱-کنترل ژنتیکی خود ناسازگاری گامتوفیتیک . عکس‌العمل ناسازگاری بین بخش انتین دانه گرده که دارای بافت هاپلوئید است و مادگی می‌باشد.

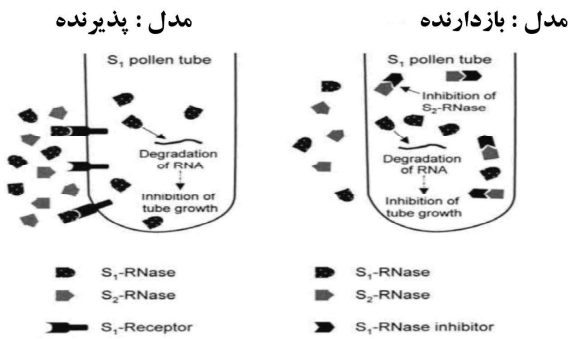
الف) گرده افشانی در شرایط باغ: در این روش خود گرده افشانی کنترل شده در گل‌های اخته شده در باغ انجام می‌گیرد و سپس نمونه های مادگی که خودگرده افشانی شده‌اند را در طی زمان‌های مختلف برداشت آماده مشاهده با میکروسکوپ فلورسنس شده وسپس رشد لوله گرده و میزان نفوذ آن به درون خامه و تخمدان مشخص می‌شود.

ب) گرده افشانی در شرایط آزمایشگاه: از این روش به منظور حذف اثرات نامطلوب شرایط محیطی باغ در تلاقی‌های کنترل شده، استفاده شده و مطالعه رشد لوله گرده با کمک میکروسکوپ فلورسنت انجام می‌گیرد. در این روش گل‌ها را در مرحله بالن جمع آوری و گل‌ها را اخته کرده و در آزمایشگاه از ناحیه دمگل در داخل سینی‌های حاوی تورهای مخصوص در داخل آب قرار میدهند و خودگرده‌افشانی کنترل شده انجام می‌گیرد. بعد از گرده افشانی و رشد لوله گرده، تعدادی مادگی در هر تیمار گرده‌افشانی شده کمک میکروسکوپ بررسی می شوند. در مادگی‌های مورد بررسی، درصد لوله گرده رسیده به انتهای خامه به عنوان شاخصی برای خودسازگاری یا خود ناسازگاری رقم است.

۳- مطالعه ریبونوکلئازهای خامه گل

محصول مکان‌ژنی ناسازگاری در خانواده رُزاسه یک سری گلیکوپروتئین در خامه است که دارای فعالیت ریبونوکلئازی می باشند. این ریبونوکلئازها در مادگی گلهای بالغ وجود دارند و نقش آنها بازدارندگی اختصاصی از رشد لوله گرده حاوی آلل مشابه با یکی از آلل‌های مادگی می‌باشد. تصور بر این است که ریبونوکلئازهای ناسازگاری از مادگی به داخل لوله گرده ناسازگار رفته و باعث تخریب RNA ریبوزومی لوله گرده می‌گردد که در نهایت موجب مرگ سلول لوله گرده می‌شود.

با توجه به اینکه آنزیم های ریبونوکلئاز مستقیماً در بروز و بیان خودناسازگاری مؤثرند هستند، شناسایی و تجزیه و تحلیل پروتئین های خو ناسازگاری توسط جداسازی الکتروفورز پروتئین های روی ژل پلی اکریل آمید بعنوان یکی از روش‌های تعیین ژنوتیپ های خودناسازگاری مطرح می‌باشد. تعیین ژنوتیپ‌های خودناسازگاری ارقام بر اساس الگوی باندی آنها پس از رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید می باشد.



شکل۲- مدل‌های مختلف جلوگیری از رشد لوله گرده خودی توسط ریبونوکلئازهای خامه

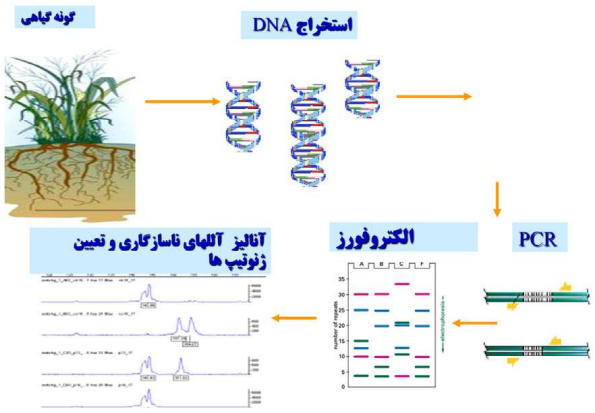
بوسکویچ و توبوت (۱۹۹۶) با بررسی و مطالعه ریبونوکلئازهای خامه گل ارقام گیلاس با استفاده از روش ایزوالکتروفوکوسینگ اعلام کردند که هر ریبونوکلئاز بیان شده در مادگی با یکی از آلل‌های

خودناسازگاری مرتبط می‌باشد. این محققین آنالیز ریبونوکلئازهای خامه گل را یک روش مفید و سودمند برای شناسایی و تمایز آلل‌های خودناسازگاری و مشخص کردن روابط ناسازگاری بین ارقام گیلاس و همچنین سایر درختان میوهٔ خانواده رزاسه اعلام کردند.

۴- روش‌های مبتنی بر PCR

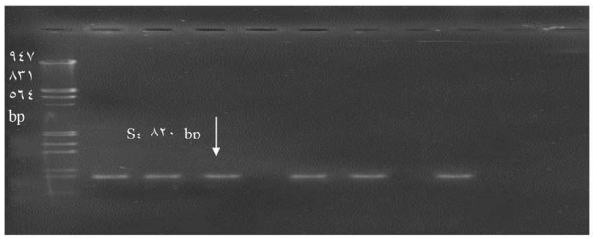
شناسایی ژنوتیپ های خود ناسازگار به وسیله PCR بر اساس تکثیر DNA هدف توسط آغازگرهای عمومی و اختصاصی که بر اساس توالی DNA کدکننده آلل های S طراحی شده‌اند با استفاده از ژل آگارز در الکتروفورز افقی و سپس رنگ آمیزی در اتیدیوم بروماید صورت می گیرد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روشی بسیار قوی و کارآمد است که تکثیر ردیف منتخبی از مولکول یک ژنوم را تا چندین میلیون برابر در کمتر از نیم روز امکان پذیرمی‌کند. این فرایند هنگامی امکان‌پذیر است که دست کم ردیف کوتاهی از دو انتهای قطعه DNA مورد نظر معلوم باشد. در این فرایند که تقلیدی از فرایندهای همانندسازی DNA در طبیعت می‌باشد الیگونوکلئوتیدهای مصنوعی که مکمل ردیف شناخته شده دو انتهای قطعه مورد نظر DNA هستند به عنوان آغازگر مورد استفاده قرار می‌گیرند تا واکنش‌های آنزیمی همانندسازی DNA در درون لوله آزمایش امکان پذیر شود. این همانندسازی فرایندی است آنزیمی و توسط انواع مختلفی از آنزیمDNA ها صورت می پذیرد.تکثیر اختصاصی آللDNA ها به روش PCR یک روش جایگزین مناسب برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری وتعیین روابط ناسازگاری در درختان میوه می‌باشد. استفاده از روش PCR برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در سیب، گلابی، بادام، زردآلو مورد بررسی و مطالعه



شکل۳- مراحل مختلف شناسایی ژنوتیپ های خود ناسازگار به وسیله روش واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR

قرار گرفته است. استفاده از روش PCR برای شناسایی آلل های خودناسازگاری درگیلاس توسط حسنی مقدم، سونوولد و همکاران و نیز دکوپیر و همکاران مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است.



شکل -۴ نتیجه تکثیر اختصاصی آلل خودناسازگاری S۴ در درخت گیلاس بر روی ژل آگارز ترتیب ارقام از چپ به راست مجتهدی -۲ حاج یوسفی -۳ سیاه قزوین -۴ سیاه مشهد -۵ صورتی همدان -۶ قرمز رضائیه -۷ شبستر -۸ شعاع السلطنه

نتیجه گیری کلی

شناسایی و تعیین آلل های خودسازگاری و خودناسازگاری در درختان میوه به ویژه در ژنوتیپ های جدید برای احداث باغات تجاری و مدرن جهت افزایش عملکرد و تولید اقتصادی ضروری است. بنابرین به منظور تولید محصول اقتصادی در باغ های تجاری، شناسایی آلل های خودناسازگاری و تعیین ژنوتیپ امیدبخش جهت تعیین ارقام گرده زای مناسب و سازگار با ارقام مهم تجاری، دستیابی به گرده افشانی موفق و همچنین انتخاب والدین مناسب برای تولید ارقام جدید در برنامه‌های بهنژادی، اهمیت زیادی دارد فقدان این اطلاعات و در نتیجه انتخاب ترکیب نامناسب ارقام در هنگام احداث باغ های تجاری و عدم توجه به روابط ناسازگاری بین آنها، می‌تواند بشدت به کاهش عملکرد و تولید اقتصادی این صنعت منجر گردد.

انتخاب گرده‌زای مناسب به روش سنتی با توجه به تغییرات آب و هوایی منطقه باید حتماً طی چندین سال انجام شود که این امر مستلزم صرف هزینه و زمان زیاد بوده و همچنین از دقت بالای برخوردار نمی‌باشند و گاهاً نتایج به دست آمده توسط این روش خطابرانگیز بوده و قابل اطمینان نمی‌باشد. درضمن تمایز دقیق بین تلاقی‌های سازگار و نیمه سازگار نیز با روش های سنتی مشخص نمی‌باشد.

کاربرد نشانگرهای مولکولی برای تعیین گرده‌زای مناسب یکبار انجام شده و نتایج آن قابل تعمیم برای سال‌های مختلف می‌باشند. روش‌های مولکولی علاوه بر دقت و سرعت خیلی زیاد، هزینه کمتری نسبت به روش‌های سنتی (تلاقی‌های کنترل شده) دارد و در مراحل اولیه جوانه زنی و رشد گیاه وحتی بر روی کوتیلودونهای بذری قابل انجام می‌باشد.

منابع

۱- ارشادی، احمد (۱۳۸۲) « بررسی گرده‌افشانی و تشکیل میوه و ارزیابی ارقام سیب ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی.» پایان نامه دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲- حسنی‌مقدم، اسفندیار (۱۳۸۵) « شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در ارقام گیلاس ایرانی با استفاده از تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز» پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۳- سیفی، اسماعیل (۱۳۷۵) «تعیین بهترین رقم گرده‌زا برای گیلاس سیاه مشهد.» پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- نقوی، محمد رضا، قره‌یاضی، بهزاد و حسینی سالکده، قاسم (۱۳۸۴) « نشانگرهای مولکولی» انتشارات دانشگاه تهران. ۳۲۰ صفحه

5- Boskovic, R. and Tobutt, K.R. (1996) “Correlation of stylar ribounuclease zymogram whit incompatibility alleles in sweet cherry” Euphytica 9 : 245-250

6- Choi, C., Tao, R. and Anderson, R. (2002) “Identification of self-incompatibility alleles and pollen incompatibity groups in sweet cherry by PCR based S-allels typing and controlled pollination” Euphytica 123 : 9-20

7- de Cuyper, B., Sonneveld, T., and Tobutt, K.R. (2005) “Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherrys” Molecular ecology 14 : 945-955

8- Faust, M. (1989) “Physiology of temperat zone fruit trees” Wiley interscience Publication

9- Ishimizu, T., Inoue, K., Shimonaka, M. Saito, T., Terai, A. and Noriok, S. (1999) “PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanes pear cultivrs” Theor. Appl. Genet. 98 : 961-967

10- Jansens, G.A., Godris, I.J. and Broekaert, W.F. (1995) “A molecular method for S- alleles identification in apple based on alleles specific PCR” Theor. Appl. Genet. 91: 691-698

11- Julia, H., Attila, H., Rita, H., Eva, S.B. and Andezej, P. (2005) “New self-incompatibility alleles in apricot (Prunus armeniaca L.) reveald by styler ribounuclease assay and S-PCR analysis” Euphytica 145 : 57-66

12- Komori, S., Soejima, J., Abe, K., Kotodan, N. and Kato, N. (2000) “ Analysis of S-alleles genotype and genetic diversity in the apple” Acta Hort 538 : 83-86

13- Lopez, M., Mneija, M., Roviva, M., Collins, G., Vargas, F.J. and Arus, P. (2004) “Self-incompatibility genotypes in almond re-evaluated by PCR, stylar ribonuclease, sequencing analysis and controlled pollination” Theor.Appl. Genet 109 : 954-964

14- Macpherson, M.J. and Moller, S.G. (2001) “PCR” published by springer-verlag New york pp 276

15- Nathanael, R.H., Yaman, H. and Tao, R. (2002) “Self-incompatibility and compatibility in teterapoloid sour cherry (Prunus cerasus L)” Sex Plant Repro. 15: 39-46

16) Ortega, E., Sutherland, B.G., Dicenta, F., Boskovic, R. and Tobutt, K.R. (2005) “Determining of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers detection of new S-alleles and correction of report S-genotype” Plant Breeding 124 : 188-196

17- Sassa, H., Mase, W., Hirano. H., and Ikehashi, H. (1994) “Identification of self-incompatibility related glycoproteins in styles of apple (Malus ⊠ domestica)” Theor. Appl. Genet. 89: 201-

18- Sonneveld, T., Tobbut, K.R. and Robbins, T.P. (2003) “Alleles-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) allele S1-S16 using consensus and alleles-specific primers” Theor. Appl. Genet. 107 : 1059-1070

19- Stone, S.L. and Goring, D.R. (2001) “The molecular biology of self-incompatibility system in flowering plant” Plant Cell Tissue and Organ Culture 67 : 93-114

20- Yaegaki, H., Shimada, T., Moriguchi, T. And Hayama, H. (2001) “Molecular characteraization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (Prunus mume Sier. Et Zucc.)” Sex plant Reprod 13 : 251-257

21- Zuccherelli, S., Tassainari, P., Broothaerts, W., Tatarini, S., Dondini, L. and Sansavini, S. (2002) “S-alleles characterization in self-incompatibility pear (Pyrus communis L.)” Sex plant Reprod. 15 : 153-158