بررسی سازگاری گرده و مادگی تلاقی‌های دی‌آلل بادام با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و درصد تشکیل میوه

مهدی فلاح*[۱]، علی ایمانی[۲]، یاور شرفی[۳]، موسی رسولی[۴]

[۱*] دانشجوی دکتری علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

[۲] دانشیار بخش تحقیقات باغبانی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

[۳] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد تهران

[۴] استادیار گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر

*نویسنده مسئول: fallah_mahdi@yahoo.com

چکیده

بادام (Prunus dulcis L.) یکی از مهم‌ترین گونه‌های جنس پرونوس می‌باشد که اکثر ارقام و ژنوتیپ های آن خودناسازگار و برخی نیز دگرناسازگارند. ارقام خودناسازگار برای گرده‌افشانی، تلقیح و تولید نیازمند دانه‌گرده سازگار سایر ارقام می‌باشند. در این راستا مطالعه سازگاری گرده‌افشانی سه رقم تونو، شکوفه، سهند و سه ژنوتیپ امیدبخش انتخابی A1.16، A9.7، A230 با استفاده از روش گرده‌افشانی کنترل‌شده و بررسی رشد لوله گرده توسط میکروسکوپ فلورسنت در آزمایشگاه و محاسبه درصد تشکیل میوه در باغ انجام گرفت. ترکیب تلاقی‌ها بر اساس همپوشانی گلدهی در پنج گروه به‌صورت دی‌آلل انجام شد. نتایج نشان داد که ترکیب تلاقی A9.7♂ × تونو♀ (با ۶۰/۵۲ درصد تشکیل میوه و ۱۰/۹۷ درصد نفوذ لوله گرده به تخمدان)، تونو♂ × A9.7♀ (با ۶۶/۶۷ درصد تشکیل میوه و ۱۰/۴ درصد نفوذ لوله گرده به تخمدان) و A1.16♂ × شکوفه♀ (با ۷۴/۹۲ درصد تشکیل میوه و ۱۴/۴۰ درصد نفوذ لوله گرده به تخمدان) بیشترین سازگاری در تلاقی‌های دی‌آلل بکار رفته در گروه‌های مختلف را داشتند. همچنین، تلاقی‌های تونو♂ × A230♀ (با ۳۰/۹ درصد تشکیل میوه و ۳ درصد نفوذ لوله گرده به تخمدان) و تونو♂ × سهند♀ (با ۲۹/۲ درصد تشکیل میوه و ۱/۸ درصد نفوذ لوله گرده به تخمدان) کمترین سازگاری را بین تلاقی‌ها داشتند.

کلمات کلیدی: **بادام، سازگاری، گرده‌افشانی کنترل‌شده، تشکیل میوه، میکروسکوپ فلورسنت.**

مقدمه

بادام (*Prunus dulcis*) یکی از مهم‌ترین میوه‌های خشک مناطق معتدله بوده که اکثر ارقام آن خودناسازگار هستند و برای تولید میوه تجاری نیاز به گرده‌افشانی با دانه گرده مناسب و سازگار دارند، بنابراین تعیین سازگاری ارقام قبل از احداث باغ از اهمیت بالایی در تولید بادام برخوردار است (Socias I company., ؛ Imani andTalaie, 1998). 1990 خودناسازگاری موجود در ارقام مختلف بادام و گونه‌های دیگر جنس پرونوس از نوع گامتوفیتیک می‌باشد (Dicenta *et al*, 1993) و آلل‌های ناسازگاری این جنس دارای دو اینترون هستند (Martinez Gomez *et al*, 2003). پژوهشگران برای شناخت از سازگاری دانه گرده با مادگی از روش‌های مختلفی مانند گرده‌افشانی کنترل‌شده در مزرعه و محاسبه درصد تشکیل میوه، تلاقی کنترل‌شده و سپس ردیابی رشد لوله گرده با میکروسکوپ فلورسنت، الکتروفورز پروتئین‌های خامه و PCR اختصاصی آلل S، استفاده کرده‌اند(Ortega *et al*, 2002; Martinez-Gomez *et al*, 2003; Sanchez-perez *et al*, 2004). گرده‌افشانی کنترل‌شده در مزرعه و محاسبه درصد تشکیل میوه در چند هفته پس از گرده‌افشانی و ردیابی رشد لوله گرده در زمان‌های مختلف پس از گرده‌افشانی در نقاط مختلف مادگی از روش‌های

متداول برای ارزیابی سازگاری دانه گرده و مادگی می‌باشد. بررسی نفوذ لوله گرده در نقاط مختلف مادگی نشان داد زمان ۷۲ ساعت برای رسیدن لوله گرده به تخمدان تلاقی‌های بررسی شده مناسب نبوده و در زمان ۱۲۰ ساعت پس از گرده‌افشانی درصد مادگی‌های دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه افزایش یافت (ortega *et al*, 2002).

هدف از انجام این تحقیق بررسی روابط سازگاری دانه گرده و مادگی برخی ارقام و نژادگان‌های بادام با روش گرده افشانی کنترل‌شده در مزرعه، بررسی درصد تشکیل میوه و ردیابی رشد لوله گرده با میکروسکوپ فلورسنت جهت انتخاب بهترین ترکیب تلاقی‌ها و توصیه‌های لازم برای احداث باغ و برنامه‌های اصلاحی بود.

مواد و روش‌ها

ترکیب تلاقی‌ها بر اساس همپوشانی گلدهی در پنج گروه شامل A9.7 × تونو، A230 × تونو، A1.16 × تونو، سهند × تونو و A1.16 × شکوفه به‌صورت دی‌آلل انجام شد به‌این‌ترتیب که در هر گروه هر دو رقم یا نژادگان یک‌بار به‌عنوان والد مادری و یک‌بار به‌عنوان والد پدری در نظر گرفته شدند. جهت اطمینان از قدرت جوانه‌زنی دانه‌های گرده اقدام به کشت دانه‌گرده در محیط کشت جامد حاوی ۱۵ درصد ساکاروز، یک درصد آگار و ۲۰ پی‌پی‌ام اسیدبوریک استفاده شد و سپس درصد جوانه‌زنی آن‌ها تعیین شد (Imani and Talaie, 1998). برای انجام گرده‌افشانی در زمان مناسب در هر واحد آزمایشی عمل گرده‌افشانی کنترل‌شده انجام و تعداد گل‌های گرده‌افشانی شده در هر شاخه ثبت و کیسه‌ها روی شاخه‌ها قرار گرفتند. به‌منظور تعیین درصد تشکیل میوه، در سه نوبت (شمارش اول ۱۶ روز، شمارش دوم ۴۲ روز و شمارش سوم ۹۰ روز) بعد از عمل گرده‌افشانی تعداد میوه‌های تشکیل‌شده شمارش و نتایج ثبت گردید (Rasouli *et al*, 2009).

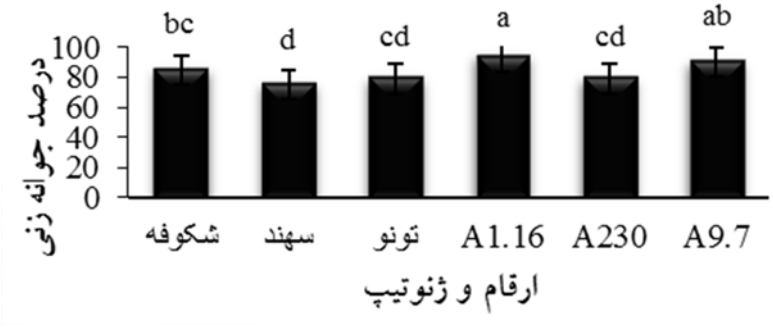
به‌منظور ردیابی لوله گرده مادگی‌های تلقیح شده ۱۲۰ ساعت پس از گرده‌افشانی قطع‌شده و در محلول فیکساتور قرار داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها از محلول فیکساتور خارج و در محلول سولفیت سدیم ۵ درصد قرار گرفتند، سپس به‌منظور نرم شدن بافت مادگی در داخل اتوکلاو در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شده و در نهایت توسط محلول آنیلین‌بلو رنگ‌آمیزی لوله‌های گرده انجام گرفت (Socias i Company *et al*, 1976). زوائد و کرک‌های موجود روی خامه و تخمدان پاک شدند و نفوذ لوله گرده ارقام مختلف در مادگی‌ها با میکروسکوپ فلورسنس مورد بررسی قرار گرفت. میانگین جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلاله و لوله‌های گرده وارد شده به نقاط مختلف مادگی ثبت شد و بر اساس آن درصد نفوذ لوله‌های گرده به قسمت بالایی و میانی خامه و تخمدان محاسبه و ملاک تجزیه آماری قرار گرفت (Rasouli and Arzanim 2010). آزمایش تست جوانه‌زنی دانه در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گرفت. آزمایش مربوط به ترکیب تلاقی‌ها در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی انجام گرفت و آزمایش مربوط به ردیابی لوله گرده در مادگی نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ده تکرار برای هر ترکیب تلاقی انجام گرفت. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه دانکن در هر گروه به‌صورت جداگانه و از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد آنالیز قرار گرفت. نمودار از طریق نرم‌افزار EXCEL رسم گردید.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی دانه گرده در شرایط درون شیشه

نتایج جوانه‌زنی دانه گرده در شرایط درون شیشه‌ای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد نشان داد. درصد جوانه‌زنی دانه گرده ارقام موردمطالعه در دامنه ۷۵ تا ۹۴ درصد بود. بالاترین درصد جوانه‌زنی دانه گرده مربوط به ژنوتیپ $A_{1.16}$ (۹۴ درصد) و کمترین درصد جوانه‌زنی دانه گرده مربوط به رقم سهند (۷۵ درصد) بود (نمودار۱).

جوانه‌زنی مناسب گرده ارقام و ژنوتیپ‌های بکار رفته در تحقیق حاضر نشان از قوه نامیه بالای آن‌ها بوده که در صورت سازگاری والدهای مادری با والدهای پدری می‌توان انتظار داشت که تعداد مطلوبی لوله گرده وارد تخمدان شود.

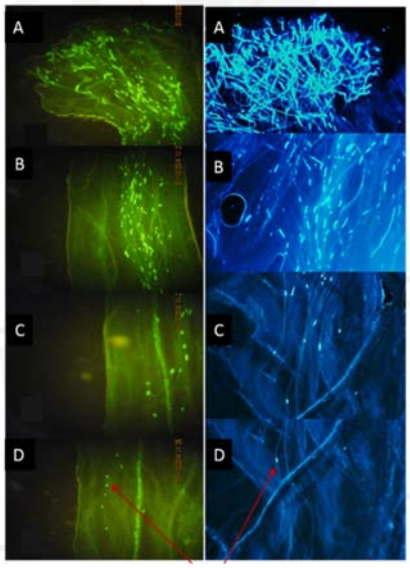


نمودار ۱- درصد جوانه‌زنی ارقام و ژنوتیپ‌ها

در درختان میوه میزان درصد جوانه‌زنی دانه‌گرده متفاوت بوده و باید محیط کشت مناسب هر گونه یا رقم به‌صورت اختصاصی تهیه گردد همچنین، علاوه بر ترکیبات محیط کشت، سن اولیه گرده و درجه حرارت در جوانه‌زنی گرده بادام به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای تأثیرگذار است (Imani and Tlaie, 1998).

میزان نفوذ لوله گرده به نقاط مختلف مادگی

ردیابی رشد لوله گرده در نقاط مختلف مادگی ترکیب تلاقی‌های مختلف با میکروسکوپ فلورسنت انجام و درصد نفوذ لوله گرده به قسمت بالایی خامه، قسمت میانی خامه و درون تخمدان تلاقی‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد درصد رشد لوله گرده از سمت کلاله به تخمدان کاهش می‌یابد(شکل ۱).



شکل ۱- جوانه‌زنی و رشد لوله گرده رقم تونو در سطح کلاله (A)، بالای خامه (B)، وسط خامه (C) و درون تخمدان (D) ژنوتیپ $A_{9.7}$ (سمت چپ)، جوانه‌زنی و رشد لوله گرده رقم سهند در سطح کلاله (A)، بالای خامه (B)، وسط خامه (C) و درون تخمدان (D) رقم تونو.

در تلاقی‌های مختلف میزان نفوذ لوله گرده در نقاط مختلف مادگی با یکدیگر اخلاف معنی‌دار داشت که نشان از قابلیت متفاوت رشد لوله گرده در تلاقی‌های مختلف دارد. مقایسه میانگین درصد لوله گرده وارد شده به تخمدان نشان داد ترکیب تلاقی‌های ♂A1.16 × ♀شکوفه، ♂A9.7 × ♀تونو، ♂تونو × ♀A9.7 و ♂شکوفه × ♀A1.16 به ترتیب

با ۱۴/۴۰، ۱۰/۹۷، ۱۰/۴ و ۱۰/۲ درصد، دارای بیشترین درصد نفوذ لوله‌های گرده به تخمدان بودند (جدول۱). تحقیقات نشان می‌دهد عوامل محیطی مانند باد، باران و دماهای پایین می‌توانند باعث کندی رشد لوله گرده در خامه شده و زمان رسیدن لوله گرده به تخمدان را طولانی و حتی غیرممکن سازد. سرعت حرکت لوله گرده در خامه ارقام مختلف بادام متفاوت بوده و دما تأثیر متفاوتی بر سرعت رشد لوله گرده در ارقام مختلف دارد.

جدول ۱- درصد نفوذ لوله گرده به نقاط مختلف مادگی و درصد تشکیل میوه در تلاقی‌های مختلف

ترکیب تلاقی ♀ ♂	درصد لوله گرده نفوذ کرده			تعداد گل تلقیح شده	درصد تشکیل میوه		
	قسمت بالایی خامه	قسمت میانی خامه	درون تخمدان		شمارش اول	شمارش دوم	شمارش سوم
Tuono × $A_{9.7}$	۵۳/۲۵ab	۲۵/۴۹ bc	۱۰/۶ab	۵۳۵	۷۷/۳۰ab	۷۱/۲۲a	۶۶/۶۷ab
$A_{9.7}$ × Tuono	۵۲/۸۰ab	۱۷/۵۶cde	۱۰/۹۷ab	۳۹۴	۷۵/۷۵ ab	۶۵/۷۲ab	۶۰/۵۲ab
Tuono × A_{230}	۵۷/۱a	۱۱/۸e	۳c	۴۱۵	۴۳/۲c	۳۷/۵de	۳۰/۹e
A_{230} × Tuono	۳۱/۷۷c	۱۱/۸۰c	۳/۱۵c	۶۲۶	۴۷/۸۲c	۴۵/۸۲cd	۴۲/۴۵cde
Tuono × سهند	۳۶/۸bc	۲۳/۴bcd	۱/۸c	۵۶۵	۴۷/۲c	۳۱/۵e	۲۹/۲e
سهند × Tuono	۳۶/۸۷bc	۱۳/۴۳de	۳/۷۴c	۳۸۵	۴۵/۷۲c	۴۳/۸۷cde	۳۹/۵۲de
Tuono × $A_{1.16}$	۷۰/۳a	۲۸/۷bc	۸/۳b	۴۰۲	۷۳/۸ab	۵۶/۶bc	۵۴/۵bcd
$A_{1.16}$ × Tuono	۶۵/۰۵a	۲۳/۸۴bcd	۸/۳۸b	۳۰۹	۶۸/۳۲b	۶۲/۵۲ab	۵۶/۶۰bc
شکوفه × $A_{1.16}$	۵۷/۷۱ a	۳۰/۸۸ b	۱۴/۴۰ a	۵۱۸	۸۱/۶۰a	۷۶/۲۵a	۷۴/۹۲a
$A_{1.16}$ × شکوفه	۶۱/۴a	۴۵a	۱۰/۲ab	۵۳۰	۶۷/۳b	۵۶/۶bc	۵۵/۱bc

محاسبه درصد تشکیل میوه در تلاقی‌های مختلف (جدول ۱) نیز نشان داد بین گرده دهنده‌های مختلف استفاده در تلاقی‌های مختلف از نظر درصد تشکیل میوه نیز مانند درصد نفوذ لوله گرده در مادگی اختلاف معنی‌دار وجود داشت. ترکیب تلاقی‌های A1.16♂ × شکوفه♀، تونو♂ × A9.7♀ وA9.7♂ × تونو♀ به ترتیب با ۷۴/۹۲، ۶۶/۶۷، ۶۰/۵۲ درصد، درصد تشکیل میوه دارای بیشترین درصد تشکیل میوه بودند. همانند آنچه در میزان نفوذ لوله گرده توسط گرده دهنده‌های مختلف به تخمدان این تلاقی‌ها مشاهده شد، نتایج بدست آمده از درصد تشکیل میوه نیز با آن مطابقت داشته و نشان داد در تلاقی‌هایی که میزان نفوذ لوله گرده به تخمدان بیشتر بود، درصد تشکیل میوه نیز بیشتر می‌باشد. این نتیجه با نتایج سایر محققین (ortega *et al*, 2002). مبنی بر افزایش درصد تشکیل میوه با افزایش نفوذ لوله گرده به تخمدان، مطابقت داشت. در اکثر تلاقی‌های بکار رفته در این تحقیق درصد تشکیل میوه بالایی بدست آمد که این نتایج با نتایج بدست آمده برای درصد تشکیل میوه در تلاقی‌های، مرسد♂ × کارپاریل♀(با ۶۷/۵۰ درصد تشکیل میوه) و تونو♂ × کارپاریل♀(با ۶۹/۵۰ درصد تشکیل میوه) مطابقت داشت (Dorostkar *et al*., 2005).

در تلاقی‌های دی‌آلل تونو × سهند و تونو × A230 در هر دو حالت که ارقام تونو و سهند و ژنوتیپ A230، چه به‌عنوان والد مادری و چه به‌عنوان والد پدری بودند کمترین درصد نفوذ لوله گرده به تخمدان و کمترین درصد تشکیل میوه مشاهده شد. وجود آلل S_1 در ارقام سهند و تونو (Zeinalabedini *et al*, 2007) و ژنوتیپ A_{230} (Fallah *et al*, 2014) نشان داد کاهش درصد تشکیل میوه در این تلاقی‌ها ناشی از وجود آلل‌های S_1 ناسازگاری مشترک در این ارقام و ژنوتیپ است که این آلل مشترک باعث بیان پروتئین‌های S-RNases در خامه و به دنبال آن باعث کالوزه شدن و توقف رشد لوله گرده در ۱/۳ بالایی خامه می‌شود که در نهایت نفوذ لوله گرده به تخمدان و درصد تشکیل میوه در این تلاقی‌ها کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد ترکیب تلاقی‌های A9.7♂ × تونو♀ ، تونو♂ × A9.7♀ و A1.16♂ × شکوفه♀ دارای بیشترین سازگاری و تشکیل میوه در تلاقی‌های دی‌آلل بکار رفته در این تحقیق بود. بنابراین، می‌توان در کشت باغات بادام به‌منظور حصول حداکثر محصول از آن‌ها بهره برد.

منابع

Rasouli, M. and Arzani, K. 2010. Effect of type pollen on the pollen tube growth and quantitative and qualitative cherry fruir cultivar Zard Daneshkadeh. Iranian Journal of Horticultural Science, 4 (41), 309-318. (In farsi).

Rasouli. M., Fatahi, R., Zamani, Z. & Imani, A. 2009. Study Compatibility and Effects of pollination cultivar "Supernova" with pollen different Variety in Almond. Iranian Journal of Horticultural Science, 4 (40), 61-70. (In farsi).

Zeinalabedini, M. 2007. Study of genetic relationships among some of almond cultivars and Prunus related species with using SSR markers. Ph. D. thesis in Horticultural Science, Faculty of Agriculture,Tabriz University, Iran. (In Farsi).

Ortega E, Martinez-Garca P, Dicenta F, Boskovic R and Tobutt KR 2002. Study of self-compatibility in almond progenies from self-fertilization by florescence microscopy and stylar ribonuclease assay. Acta Horticulturae. 591: 229-232.

Fallah, M., Sharafi,Y., Rasouli, M. & Imani, A. 2014. Compatibility relationships among some almond genotypes and cultivars using PCR. *Iranian Society of plant physiology*.7- 9 May., Esfahan University, Esfahan, Iran, 3: 941-944 (in Farsi).

Imani, A. & Talaie, A. R. 1998. Effect of culture medium type & temperature on pollen germination of almond in vitro. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 29, 79-87.

Dicenta, F. & Garcia, J. E. 1993. Inheritance of self-compatibility in almond. *Heredity*, 70: 313-317.

Dorostkar, M. 2005. Survey on the morphological properties of almond in Fars Province. *Proceedings of the IV International Symposium on Pistachios & Almonds*. Iranian Pistachio Research Institute, Rafsanjan, Iran. Page 325 (in Farsi).

Imani, A. & Talaie, A. R. 1998, Effect of culture medium type & temperature on pollen germination of almond in vitro. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 29, 79-87.

Martinez Gomez, P., Alonso, J. M., Lopez, M., Battle. I., Ortega, E., Sanchez-perez, R. & Disenta, F. 2003. Identification of self-incompatibility alleles in almond & related Prunus species using PCR. Theorical and Applied Genetics, 123: 397-401.

Ortega E., Egea, J., Cánovas, J. A. & Dicenta, F. 2002. Pollen tube dynamics following half- and fullycompatible pollinations in self-compatible almond cultivars. Journal of Sexual Plant Reproduction, 15, 47-51.

Sanchez-Perez, R., Dicenta, F. & martinez-Gomez, p. 2004, Identification of S-alleles in almond using multiplex PCR. Euphytica. 138: 263-269.

.Socias i Company, R. 1990. Breeding self-incompatibility almond. Plant Breeding Review, 8: 313-338.

Socias i Company, R., Kester, D.E. & Bradley, M.V. 1976. Effect of temperature & genotype on pollen tube growth in some self-compatible & self-incompatible almond cultivars. Journal of the American Society for Horticultural *Science*, 101: 490-493.

Study of Compatibility Pollen and Pistil Almond Diallel Crosses using Fluorescent Microscopy and Percentage of Fruit Set

Mehdi Fallah[1]*, Alli Imani[2], Yavar Sharafi[3], Mousa Rasouli[4]
[1,3] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran
[2] Horticultural Departments of Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Karaj, Iran
[4]Department of Horticulture and Landscape engineering, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran
*Corresponding Author: fallah_mahdi@yahoo.com

Abstract

Almond is one of the most important Prunus species. Most almond cultivars and genotypes are self-incompatible and some of others are cross-incompatible. Therefore self-incompatible cultivars for pollination inoculated and production require compatible pollen other cultivars. In this regard the study of pollen and pistil compatibility of the three cultivars Tuono, Shokofeh, Sahand and promising three genotypes choice A1.16, A9.7, and A230 using method controlled pollination and pollen tube growth by fluorescence microscopy in laboratory and determine the fruit set percentage in the field. Crosses were performed based on flowering overlap among the five groups For Diallel crosses was performed. Results showed that crosses♀ Tuono × ♂A9.7 (60.52 % fruit set and 10.97 % pollen tube penetrate in the ovary), ♀A9.7 × ♂Tuono (66.67 % fruit set and 10.4 % pollen tube penetrate in the ovary) and ♀ Shokofeh ×♂ A1.16 (74.92 % fruit set and 14.40 % pollen tube penetrate in the ovary) the highest of compatibility on dialle crosses were used in mentioned groups. Furthermore crosses♀ A230 × ♂ Tuono (30.9 % fruit set and 3 % pollen tube penetrate in the ovary) and ♀ Sahand × ♂ Tuono (29.2 % fruit set and 1.8 % pollen tube penetrate in the ovary) showed Least of compatibility on dialle crosses.

***Keywords*: Almond, Compatibility, Controlled Pollination, Fruit Set, Fluorescence Microscopy**.