مطالعات اولیه و هیبریداسیون کنترل شده جهت دستیابی به ارقام گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) مقاوم به آتشک (*Erwinia amylovora*)

حمید ظفری نیا*[۱]، کاظم ارزانی[۲] و حمید عبداللهی[۳]
[۱*] دانشجوی دکتری علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه تربیت مدرس، تهران
[۲] استاد گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس، تهران
[۳]دانشیار موسسه تحقیقات باغبانی، کرج
*نویسنده مسئول: hamid.zafarinia@gmail.com

چکیده

اصلاح درختان گلابی جهت ایجاد مقاومت نسبت به بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) تاریخچه نسبتا طولانی داشته است و مهمترین منابع مقاومت به این بیماری ارقام و ژنوتیپ‌هایی ذکر شده اند که گاهی دارای کیفیت میوه چندانی نبوده اند. در ایران مطالعه برروی آتشک از سال ۱۳۶۸ با مشاهده این بیماری در باغ‌های گلابی اروپایی، آغاز شده است. از طرفی چنین به نظر می‌رسد که ارقام گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) موجود در کشور که توسط گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس در سال ۱۳۷۸ به کشور وارد شده‌اند به این بیماری باکتریایی حساس می‌باشند. پژوهش حاضر با اقدامات اولیه و انجام هیبریداسیون کنترل شده و در راستای شروع یک برنامه اصلاحی بلند مدت و به منظور امکان دستیابی به ارقام و یا ژنوتیپ‌های مقاوم و یا متحمل به بیماری آتشک در سال باغی ۱۳۹۷-۱۳۹۸ انجام گردید. با بررسی‌های اولیه بر روی ژرم پلاسم گلابی در کشور، از دانه گرده دو رقم گلابی اروپایی لویزبون و درگزی در هیبریداسیون کنترل شده با برخی از ارقام گلابی آسیایی و اروپایی در بهار ۱۳۹۸ استفاده گردید. هیبریداسیون کنترل شده با استفاده از دانه‌های گرده از قبل جمع آوری شده ارقام نسبتا مقاوم به آتشک گلابی اروپایی لویزبون و درگزی انجام شد. ارقام و ژنوتیپ‌های گرده گیرنده در گرده افشانی کنترل شده شامل رقم گلابی آسیایی KS_{13}، و اروپایی شاه میوه، ژنوتیپ امید بخش A_{95} و دانهالی گلابی بودند. نتایج کشت دانه گرده در آزمایشگاه نشان داد که دانه‌های گرده ارقام لویزبون و درگزی استفاده شده در گرده افشانی کنترل شده از قدرت جوانه زنی بالای ۹۵٪ برخوردار بودند. اگرچه در شمارش‌های انجام شده، تفاوت در درصد تشکیل میوه ارقام گرده گیرنده مشاهده گردید. و بالاترین درصد تشکیل میوه در رقم KS_{13} (♀) با رقم درگزی (♂) با درصد تشکیل میوه ۴۴٪ و سپس شاه میوه (♀) با رقم درگزی (♂) با ۲,۵٪ ثبت گردید. همچنین، در گرده افشانی رقم A_{95} (♀) با رقم درگزی (♂) و بذری اروپایی (♀) با لویزبون (♂) و درگزی (♂) میوه‌های تشکیل شده ریزش نمودند که ممکن است ناشی از سرمای بهاره حادث شده پس از گرده افشانی و یا خودناسازگاری ژنتیکی باشد که در آینده بررسی خواهد شد. پژوهش حاضر با انجام بررسی‌های لازم برروی نتاج بذور حاصل از میوه‌های تشکیل شده و همچنین ارزیابی ژرم پلاسم گلابی و منابع ژنتیکی مرتبط ادامه خواهد یافت.

کلمات کلیدی: گلابی آسیایی، گلابی اروپایی، آتشک گلابی، گرده افشانی کنترل شده

مقدمه

بیماری آتشک (fire blight) که توسط *E.amylovora* ایجاد می‌شود باعث صدمات جدی به تولید درخت گلابی گردیده است. این بیماری از شمال آمریکا منشأ گرفته و در طول سال‌ها به آرامی در تمام جهان پراکنده شده است و عامل اصلی در کاهش سطح زیرکشت درختان دانه‌دار می‌باشد (Vanneste, 2000). میزبان‌های این بیماری خانواده *Maloidae* مانند گلابی، سیب، به، *Cotoneaster*، *Crataegus* و *Mespilus* می‌باشد. این بیماری تمام بخش‌های گیاه مانند گل، نوک شاخه و طوقه درخت را تحت

IrHC2019

تاثیر قرار می‌دهد. علایمی مانند نکروزه شدن شاخه‌ها و قهوه‌ای شدن برگ‌ها در این بیماری مشاهده می‌شود. آنتی بیوتیک ها به صورت مفیدی این بیماری را کنترل می‌کنند اما در بسیاری از کشورها به دلیل مسائل زیست محیطی و ایجاد استرین‌های مقاوم نسبت به این بیماری ممنوع می‌باشد. سموم حاوی ترکیبات مسی و عوامل آنتاگونیست از جمله روش‌های دیگر کنترل این بیماری می‌باشد. اگرچه ممکن است ارقام نسبتا مقاوم در میان ارقام مورد کشت دیده شود اما بیشترین میزان مقاومت در ارقام وحشی گلابی و سیب دیده می‌شود. استفاده از ارقام وحشی جهت انتقال صفت مقاومت به ارقام اهلی پروسه‌ای زمان بر می‌باشد که مطالعات ژن‌های مقاومت به بیماری و روش‌های بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک می‌تواند در کنار روش‌های اصلاحی کلاسیک مورد استفاده قرار گیرد (Peil *et al.*, 2009). بنابراین ایجاد ارقام مقاوم یکی از مهمترین روش‌های مدیریت این بیماری است که توسط استفاده از ارقام مقاوم، پایه‌ها و میان پایه‌های مقاوم به این بیماری می‌توان به این هدف دست یافت (Bergamashi *et al.*, 2006). تاکنون فعالیت‌هایی اصلاحی در راستای دستیابی به ارقام مقاوم از طریق گرده افشانی کنترل شده صورت گرفته است (Evrenosoglua *et al.*, 2019; Eversonglu *et al.*, 2010; Bergamaschi *et al.*, 2006). این تحقیق با انجام هیبریداسیون برخی از ارقام گلابی آسیایی و اروپایی به عنوان والد مادری (♀) و ارقام درگزی و لویزبون (♂) به عنوان والد گرده دهنده و در راستای شروع دستیابی به ارقام مقاوم به آتشک انجام شد که بررسی‌های مرتبط ادامه خواهد یافت.

مواد و روش‌ها

ارقام گرده دهنده (♂)شامل ارقام مقاوم به آتشک یعنی لویزبون و درگزی بود که از کلکسیون موسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر در کرج در زمستان ۱۳۹۷ تهیه گردید. ارقام مادری (♀) شامل ارقام گلابی آسیایی KS_{13} (Arzani, 2002a; Arzani, 2002b; Arzani, 2005) و ارقام گلابی اروپایی شاه میوه، A_{95} (Najafzadeh and Arzani 2015) و دانهالی گلابی اروپایی بود.

جمع آوری دانه گرده و انجام گرده افشانی:

به منظور تهیهٔ دانه‌های گرده، شاخه های دارای جوانهٔ گل (ارقام لویزبون و درگزی) از درختان در مرحله تورم نسبی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل و در ظروف حاوی آب قرار داده شدند. بساکها در مرحلهٔ تورم کامل جمع آوری شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و در شرایط سایه نگهداری شدند. پس از خشک شدن کامل بساکها و آزاد شدن گرده‌ها، دانه‌های گرده در ظروف شیشه‌ای درب دار تا زمان استفاده در دمای ۴ درجهٔ سانتیگراد نگهداری شدند. برای انجام گرده افشانی کنترل شده در شرایط مزرعه، از ارقام مورد نظر شاخه‌هایی با تعداد کافی جوانهٔ گل در مرحلهٔ بادکنکی درختان موجود علامت گذاری و سپس گلها توسط پنس به دقت و بدون آسیب رسیدن به کلاله ها اخته شده، سپس به منظور محافظت مادگی‌ها از گرده افشانی ناخواسته با گرده ارقام دیگر، شاخه‌ها توسط کیسه های ململی پوشانیده شدند. ارقام گرده افشان (♀) شامل ۴ رقم گلابی شاه میوه، A_{95}، دانهالی اروپایی و گلابی آسیایی Ks_{13} بود و به طور متوسط در هر رقم ۵۰ گل اخته و گرده افشانی گردید. گرده افشانی دستی گلها در ۱ و ۲ روز بعد از اخته شدن با استفاده از قلم موی استریل با گرده مورد نظر انجام شد و سپس تعداد میوه‌های تشکیل شده پس از ۴۰ روز محاسبه گردید. پتانسیل جوانه زنی دانه‌های گرده ازطریق کشت درون شیشه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط کشت جوانه زنی دانه گرده حاوی ۱٪ آگار، ۲۰٪ ساکارز و ۰۱/٪ اسید بوریک بود که در اتاقک رشد در شرایط دمای ۲۲ درجهٔسانتیگراد قرارگرفته و بعد از ۲۴ ساعت روند رشد لوله‌های گرده با افزودن چند قطره کلروفرم متوقف شده سپس میزان جوانه زنی دانه‌های گرده توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند (Evrenosoglua *et al.*, 2010).

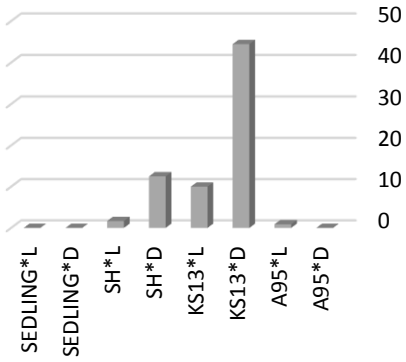
IrHC2019

نتیجه گیری و بحث:

بیماری آتشک گلابی به عنوان خطرناک‌ترین بیماری درختان دانه‌دار است. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۶۸ در درختان گلابی منطقه برغان کرج مشاهده شد و برنامه‌های اصلاحی و گزینشی جهت مقاومت به این بیماری از سال ۱۹۹۶ در ایران آغاز گردید (عرفانی و همکاران، ۱۳۹۲). مهمترین برنامه‌های اصلاحی در زمینه آتشک گلابی در کشورهای آمریکا، نیوزیلند، کانادا، ترکیه، لهستان، آلمان، ایتالیا، سوئیس، فرانسه و جمهوری چک درحال انجام است که با این بیماری درگیر می‌باشند. دورگ گیری کلاسیک که به صورت جنسی و بین گل ارقام مختلف صورت می‌گیرد مهمترین روش اصلاح می‌باشد که نیازمند چندین بک کراس جهت انتقال صفات مربوطه می‌باشد اگرچه گاهی وقتها با یک تلاقی ساده برخی از صفات مقاومت منتقل می‌شوند مانند انتقال صفت مقاومت به اسکب از گونه وحشی سیب *M. floribunda* به سیب‌های تجاری در سال ۱۹۱۴ (Peil *et al*., 2009). ارقام گلابی لویزبون و درگزی مقاوم به آتشک گلابی می‌باشند که در این طرح جهت انتقال صفت مقاومت به برخی ارقام گلابی آسیایی مورد استفاده قرار گرفت و درادامه بذور حاصل از آنها جهت مشاهده صفت مقاومت برروی پایه گلابی پیرودوارف که نسبت به آتشک مقاومت ایجاد می‌کند پیوند خواهد خورده و توسط آغشته کردن ارقام با عامل بیماری آتشک مقدار مقاومت به این بیماری مورد بررسی قرار خواهند گرفت. در این تحقیق پس از کشت دانه گرده و جوانه زنی آن، گرده افشانی ۴ رقم گلابی انجام شده و به برخی از گزارش‌های اولیه در این مورد اشاره می‌شود. درصد جوانه زنی و رشد دانه گرده در بین ارقام درگزی (۹۶٪) و لویزبون (۹۴٪) چندان تفاوتی نداشت (نمودار ۱). بیشترین تشکیل میوه در رقم Ks_{13} (♀)با رقم درگزی (♂) با درصد تشکیل میوه ۴۴٪ و سپس شاه میوه (♀) با رقم درگزی (♂) با درصد تشکیل میوه ۲,۵٪ بود. در گرده افشانی رقم A_{95}(♀) با رقم درگزی (♂) و بذری (♀) با لویزبون (♂) و درگزی (♂) میوه‌های تشکیل شده ریزش کردند و به طور کلی در رقم A_{95} تنها با دانه گرده لویزبون (♂) یک میوه تشکیل گردید (نمودار ۲). اگرچه تشکیل میوه بالای ۲۰٪ برای درختان میوه قابل قبول است (Eversungl*et al*., 2019) اما شاید یکی از دلایل ریزش میوه‌ها سرمای شدیدی بود که پس از گرده افشانی و تشکیل میوه در باغ رخ داد. قدرت جوانه زنی دانه گرده و تشکیل میوه در میان ارقام مختلف متفاوت می‌باشد و این برای بدست آوردن جمعیت بزرگ جمعیت‌های هیبرید بسیار مهم می باشد (Eversonglu *et al*., 2010) و مطابق با نتایج بدست آمده از آلودگی توسط عامل آتشک پلی ژنی می‌باشد که توسط هر دو والد به نسل بعد منتقل می‌شود اگرچه والد مادری در این امر نقش مهم تری نسبت به والد پدری ایفا می‌کند، اگرچه صفات قابل انتقال در گلابی آسیایی مونوژنی می‌باشد (Eversonglu *et al*., 2019) و به دلیل پلی ژنی بودن این صفات بهترین روش انتقال صفات مقاومت استفاده از روش هیبریداسیون کنترل شده است (Bel *et al*., 2005) و تعیین سطوح میزان قدرت ارقام تولیدی توسط آلوده کرده نتاج توسط عامل آتشک امکان پذیر است (Bergamaschi *et al*, 2006). پژوهش حاضر با انجام بررسی‌های لازم برروی نتاج بذور حاصل از میوه‌های تشکیل شده و همچنین ارزیابی ژرم پلاسم گلابی و منابع ژنتیکی مرتبط ادامه خواهد یافت.

IrHC2019

نمودار «۱» درصد جوانه زنی دانه گرده ارقام درگزی و لویزبون در محیط کشت



نمودار «۲» درصد تشکیل میوه در ارقام مختلف (♀❋♂)

منابع:

عرفانی، ج.، عبداللهی، ح.، عبادی، ع.، فتاحی مقدم، ر. و ارزانی، ک. ۱۳۹۲. ارزیابی مقاومت به بیماری آتشک و نشانگرهای وابسته به آن در برخی ارقام گلابی اروپایی و آسیایی. مجله به نژادی نهال و بذر، ۱(۲۹): ۶۷۲-۶۵۹

Arzani, K. 2002a. Introduction of some Asian pear cultivars (Pyrus pyrifolia) to Iran. Acta Horticulturae 596:287-290.

Arzani, K. 2002b. The position of pear breeding and culture in Iran: Introduction of some Asian pear (Pyrus serotina Rehd.) cultivars. Acta Horticulturae 587:167-173.

Arzani, K. 2005. Progress in National Asian pear project: Study on the adaptation of some Asian pear (Pyrus serotina Rhed) cultivars under Iran environmental conditions. Acta Horticulturae 671:209-212.

Bell, A.C., Ranney, T.G., Eaker, T.A and Sutton, T.B. 2005. Resistance to fire blight among flowering pears and quince. Hortscience, 40 (2): 413–415.

Bergamaschi, M., Rivalta,L., Sirri, S., Biondi, E., Ramili, F and Bazzi, C. 2006. Reactivity to fire blight of new promising pear selections. Acta Horticulture. 704:571-577.

Evrenosoglua, Y., Mertoglua, K., Bilginb, N. A., Misirlib, A and Ozsoy, A. N. 2019. Inheritance pattern of fire blight resistance in pear. Scientia Horticulturae, 246: 887–892.

Evrenosoglui, Y., Misirli, A., Akcay, M. E., Unal, A., Acarsoy, N., Ozdemir, N., Bilen, M., Boztepe, O and Gunen, E. 2010. Variability of different pear hybrid populations in terms of hybridization performance and the response to fire blight (Erwinia amylovora) attack. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, 38: 241-247.

Najafzadeh, R. and K. Arzani 2015. Superior Growth Characteristics, Yield, and Fruit Quality in Promising European Pear (Pyrus communis L.) Chance Seedlings in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology. 17(2): 427-442.Peil, A., Vincent, G.M., Geider, K., Richter, K., Flachowsky, H and Hanke, M.V. 2009. Improvement of Fire Blight Resistance in Apple and Pear. International Journal of Plant Breeding, 3 (1): 1-27.

Venisse, J. S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J. P and Brisset, M. N. 2002. Modulation of defense responses of Malus spp. during compatible and incompatible interactions with Erwinia amylovora. Molecular Plant-Microbe Interactions, 15: 1204-1212.

IrHC2019

Preliminary studies and controlled hybridization to achieve Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) Resistant to fire blight (*Erwinia amylovora*)

Hamid zafarinia[1]*, Kazem arzani[2], Hamid abdollahi[3]
[1*] Ph.D. Student of Science and Engineering of Horticulture, Tarbiat Modares University, Tehran
[2] Professor of Horticultural Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran
[3] Associate Professor of Horticultural Research Institute, Karaj
*Corresponding Author: hamid.zafarinia@gmail.com

Abstract:

Breeding of pear cultivars has a relatively long history of resistance to fire blight *(Erwinia amylovora*), and the most important sources of resistance to this disease are cultivars and genotypes that have sometimes been of poor quality. In Iran, the study on fire blight has begun since 1989 with the observation of this disease in European pear trees. On the other hand, it seems that the *Pyrus serotina* Rehd, An Asian pear grown in the country, imported by the Department of Horticulture of Tarbiat Modarres University in 1999, is susceptible to this bacterial disease. The present study was carried out with the first steps and control of hybridization and in order to initiate a long-term breeding program in order to be able to access resistant or tolerant cultivars or genotypes in the year 1398-1398. Initial studies on pear germplasm in the country used pollen grains of two European pears of Lewisbone and Dargazy in controlled hybridization with some Asian and European pear cultivars in the spring of 2019. Controlled hybridization was carried out using pre-collected pollen grains of comparatively resistant cultivars of European pears of Lewisbone and Dargazy. Pollen cultivars and genotypes were included in the controlled pollination including Asian pear cultivars KS_{13} and European Shahmiveh, seedling hopeful genotype A95 and Pear seedlings. Pollen germination results in the laboratory showed that pollen grains of Lewisbone and Dargazy cultivars used in controlled pollination had germination strength of over 95%. However, in the counting, differences in the percentage of fruit production of pollinator cultivars were observed. And the highest percentage of fruit production in KS_{13} (♀) cultivars was recorded with Dargazy (♂) with fruit production of 44% and then fruit shahmiveh (♀) with Dargazy (♂) with 2.5%. Also, in the pollination of A95 (♀) cultivars with Dargazy (♂) and European seed (♀) with Lewisbone (♂) and Dargazy (♂), the fruit was abscission, which may be due to spring cold after the pollination or genetic self-compatibility that will be reviewed in the future. The present study will continue with necessary studies on the progeny of seeds from fruit and also the evaluation of pear germplasm and related genetic resources.

Keyword: Asian pear, European pear, Fire blight, Controlled pollination

IrHC2019