جنبه های مختلف مطالعه کروموزوم ها در به نژادی درختان میوه
Different aspects of chromosomal study in fruit tree breeding

اسد اسدی آبکنار
مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور.

چکیده

در درختان میوه تجزیه و تحلیل اطلاعات کروموزومی در پیشرفت به نژادی، آنالیز ژنوم، دست ورزی هدفمند سطح پلوئیدی و غیره اهمیت دارد. به طور کلی گیاهان از نظر طول متوسط کروموزوم ها (اندازه) به دو گروه بزرگ کروموزوم (با متوسط طول تقریبا 10 میکرون ویا بیشتر در مرحله متافازی) و ریز کروموزوم (با متوسط طول کمتر از 10 میکرون) تقسیم بندی می شوند. درختان میوه در گروه دوم جای دارند که در آنها به دلیل ریز بودن وهمچنین شباهت های ساختاری زیاد کروموزوها ، مطالعات سیتوژنتیک روش های تکنیکی ویژه ای دارد که از گروه اول کاملا متفاوت است. آگاهی از جنبه های مختلف این مطالعات می تواند به خصوص به نژادگران درختان میوه را در دست یابی به اهداف مورد نظرشان کمک زیادی نماید. در این جا جنبه های مختلف مطالعات کروموزومی دردرختان میوه از جمله روش های آماده سازی و مشاهده ی نمونه های کاریوتایپی، جنبه های کاربردی دست ورزی سطح کروموزومی و روش های متداول در تفکیک کروموزوم ها از جمله کروموزوم باندینگ (نوار بندی کروموزومی) FISH و GISH به طور مفصل شرح داده می شوند. همچنین به عنوان نمونه استفاده از CMA باندینگ (نوار بندی CMA) در تفکیک کروموزوم های والدین درهیبریدهای مرکبات مورد اشاره قرار می گیرد.

کلیات

در سلول های گیاهی که به سمت تقسیم پیش می روند کروماتین رفته رفته به شکل کروموزوم در می آید. اما خود کروماتین در این مرحله به صورت دو بخش تقریبا قابل تفکیک یعنی یوکروماتین و هتروکروماتین قابل رویت است. یو کروماتین کم رنگ می گیرد، بخش فعال از نظر بیان ژن می باشد و 90 در صد کروماتین را تشکیل می دهد. هتروکروماتین بخش پر رنگ و غیر فعال بوده که 10 درصد از کروماتین را تشکیل می دهد. گیاهان از نظر متوسط طول (اندازه ی) کروموزوم ها به دو گروه عمده تقسیم بندی می شوند: 1) بزرگ کروموزوم یا L-type؛ در این گروه متوسط طول کروموزوم ها در مرحله ی متافاز در حدود 10 میکرون یا بیشتر می باشد. گیاهانی نظیر جو(Barley)، لیلیوم (*Lilium*)، سکاله (*Secale*)، باقلا (*Vicia*)، کاج (*Pinus*)، گینکو (Ginko) در این گروه جای دارند. 2) ریز کروموزوم یا S-type ؛ در این گروه متوسط طول کروموزوم ها در مرحله ی متافاز در حدود 1-3 میکرون می باشد. مثال از این دسته گیاهان عبارتند از: برنج، آرابیدوپسیس و تقریبا کلیه درختان میوه. در درختان میوه به دلیل ریز بودن و همچنین شباهت های ساختاری کروموزوم ها مطالعات سیتوژنتیک روش های تکنیکی ویژه ای دارد که از گروه اول کاملا متفاوت می باشد.

تهیه نمونه های کروموزومی

در گروه بزرگ کروموزوم برای تهیه نمونه های کروموزومی بیشتر از روش (Squash) اسکوآش استفاده می شود در صورتی که این روش در گروه ریز کروموزوم جواب گو نیست و بیشتر از روش هضم آنزیمی (Enzymatic maceration) استفاده می گردد. برای تهیه نمونه های کروموزومی در درختان میوه بیشتر از نوک ریشه های فعال و یا مریستم انتهایی شاخه و برگ های بسیار جوان (2- 3 میلی متر) استفاده می شود. مراحل کلی آماده سازی نمونه عبارتند از : پیش تیمار با هیدروکسی کینولین، تثبیت با فیکساتور، هضم آنزیمی، تهیه اسلاید، مطالعه زیر میکروسکوپ برای یافتن مناسب ترین مرحله تقسیم (پیش متافاز و متافاز)، عکس برداری و تجزیه و تحلیل عکس ها با نرم افزار های کاریوتایپی. در جدول 1 روش هضم آنزیمی برای تهیه نمونه های کروموزومی در تعدادی از جنس های درختان میوه به عنوان نمونه آورده شده است و نشان می دهد که برای هر جنس و گاهی بسته به گونه ی

جنس معین غلظت آنزیمی و طول مدت هضم آنزیمی متفاوت می باشد که باید برای هر گیاه تعیین گردد تا بتوان نمونه ی کروموزومی مناسبی برای مطالعه به دست آورد.

جدول 1. شرایط هضم آنزیمی برای تهیه نمونه های کروموزومی در تعدادی از جنس های درختان میوه.

نام لاتین	نام عمومی	نمونه کروموزومی	ترکیب آنزیمی	دما (درجه سانتی گراد)	طول مدت (ساعت)
Prunus persica	هلو	نوک ریشه	2% سلولاز 6% پکتیناز	37	1
Prunus avium	گیلاس	نوک ریشه	1% سلولاز 0/75% ماسروزایم 0/15% پکتولایز	37	1/30-1
Malus domestica	سیب	نوک ریشه	متفاوت عمدتا 2% سلولاز 20% پکتیناز	37	1/30-1
Musa	موز	نوک ریشه	5% سلولاز 1% پکتیناز 1% پکتولایز	37	2-1
Pyrus	گلابی	نوک ریشه	4% سلولاز 1/5%ماسروزایم 0/3% پکتولایز	37	2-1
Diospyrus	خرمالو	نوک ریشه یا مریستم انتهایی	4% سلولاز 1% پکتولایز	37	2-1/15
Citrus	مرکبات	نوک ریشه یا مریستم انتهایی	2% سلولاز 1/5%ماسروزایم 0/3% پکتولایز	37	دقیقه45- ساعت1

سطوح پلوئیدی

n تعداد کروموزوم در سلول جنسی یا گامت، 2n تعداد کروموزوم در سلول های سوماتیکی (غیر جنسی) و x که با یک ضریب همراه است، (تعداد سری کروموزوم ها) و در نتیجه سطح پلوئیدی گیاه را نشان می دهد. مثلا گیاهی که در آن 2n=6x =60 می باشد گیاهی است هگزاپلوئید که در سلول های سوماتیکی خود60 عدد کروموزوم در 6 سری ازدسته های10 تایی دارد و در گامت ها 30 عدد کروموزوم در سه سری از دسته های 10 تایی دارد. آگاهی از سطوح پلوئیدی گونه ها و جنس های درختان میوه ای که به نژادگر با آنها کار می کند بسیار اهمیت دارد چرا که گیاهان دارای سطوح پلوئیدی متفاوت فنوتیپ متفاوتی داشته و صفات منحصر به فردی نشان می دهند. افزایش سطح پلوئیدی باعث خاموشی ژن و ایجاد بعضی مقاومت ها در گیاهان می شود. سطوح پلوئیدی بسته به جنس و گونه در درختان میوه متفاوت است. به عنوان مثال در جنس تمشک (*Rubus*) سطح پلوئیدی از

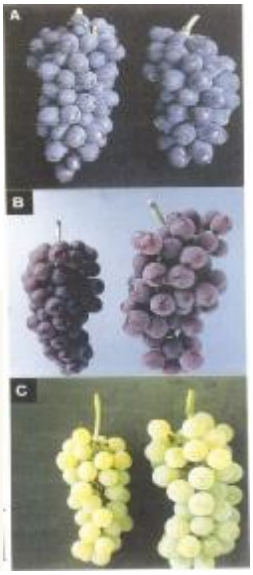
2n=2x=14 تا 2n=14x=98 متغیر است. گونه های جنس خرمالو (*Diospyros*) دارای چهار سطح پلوئیدی 2n=2x=30 ، 2n=4x=60، 2n=6x=90 و 2n=9x=135 ، می باشند. همین سطوح متفاوت پلوئیدی گاهی مانع از آمیزش بین گونه ها و دست یابی به هیبرید های مد نظر می شود به طور که این موضوع در مورد گونه های جنس سیب *Malus* مطرح است. در مرکبات اکثر گونه های جنس *Citrus* و جنس های وابسته دیپلوئید بوده و به راحتی با یکدیگر قابل تلاقی می باشند.

کاربرد های دست ورزی سطح کروموزومی

در بازار جهانی مرکبات بسیاری از ارقام جدید که بی بذر می باشند تریپلوئید هستند. برای دست یابی به تریپلوئید ها در مرکبات ابتدا لازم است که ارقام تتراپلوئید ها به دست آیند تا در تلاقی با دیپلوئید ها مورد استفاده قرار گیرند. در مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور یکی از روش های تولید ارقام تتراپلوئید در لیمو ترش ، لیمو شیرین و پرتقال محلی بهینه سازی شده است که در ارائه شفاهی در این مورد توضیح داده می شود. در انگور ارقام تتراپلوئید حبه های درشت تردارند و تراکم حبه ها در خوشه کمتر می شود (تصویر1، الف). در خرمالو ارقام بی بذر *Diospyrus kaki* نوناپلوئید (2n=9x=135) می باشند. در تعدادی از درختان میوه مثل انگور استفاده از تتراپلوئید ها به جای دیپلوئیدها به عنوان پایه باعث پاکوتاهی درخت و رنگ بهتر حبه می شوند.

روش های تفکیک کروموزوم های ریز

در گیاهان ریز کروموزوم مثل درختان میوه روش هایی که عمدتا برای تفکیک کروموزوم ها و رسم ایدیوگرام ها بکار می روند عبارتند از رنگ آمیزی و نواربندی با CMA (Chromomycin A3) ، DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) ، FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) و GISH (Genomic *in situ* hybridization). باید مشخص شود که کدام یک از این روش ها در کدام جنس از درختان میوه کارآمد تر می باشد و گاهی باید دو یا چند روش به طورترکیبی استفاده شوند. مثلا در مرکبات استفاده از نواربندی CMA توام با FISH بسیار کارآمد می باشد. در FISH از DNA های ریبوزومی نشاندار و در GISH از کل DNA نشاندار به عنوان پروب در هیبریداسیون با کروموزوم ها ی گیاهان مورد مطالعه (هیبرید، گونه های جدید) ، استفاده می شود. در تصویر 2 کاربرد CMA باندینگ در تفکیک کروموزوم های والدین در دورگ های بین جنسی مرکبات دیده می شود. این تصویر نشان می دهد که با استفاده از تنها یک روش تعداد محدودی از کروموزوم های والدین در هیبریدها قابل شناسایی هستند و باید از ترکیب دو یا چند روش اشاره شده در بالا استفاده کرد. برای جزئیات بیشتر به مقاله Asadi Abkenar et al., 2007 مراجعه شود.



الف) ب)

ج)

تصویر 1. اثر افزایش سطح پلوئیدی بر صفات میوه در سه نمونه از درختان میوه

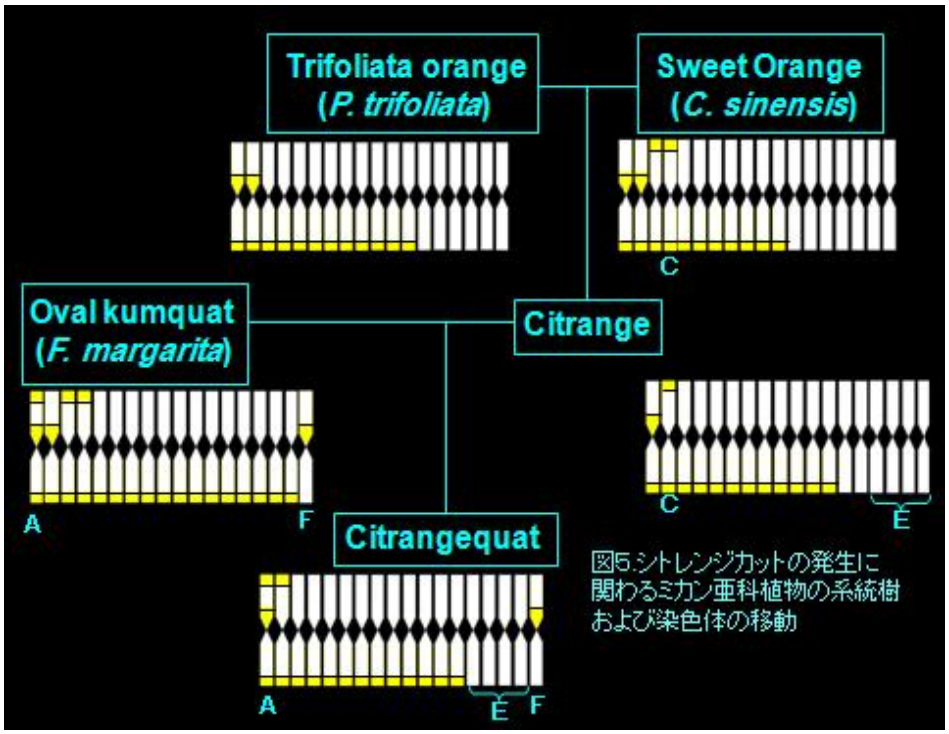
الف) مقایسه ی خوشه های انگور در گیاه مادری دیپلوئید (چپ) و تتراپلوئید همان گیاه (راست)

A : رقم زود رس Buffalo B : رقم بی دانه Prima Seedless C : رقم درشت حبه Neo Muscat

ب) پرشین لایم (Persian lime) رقمی است تریپلوئید و بی بذر در صورتی که تقریبا همه ی مرکبات دیپلوئید و پر بذر می باشند.

ج) میوه بی بذر خرمالودر یک رقم نوناپلوئید 2n=9x= 135

در مجموع می توان اشاره کرد که سطوح پلوئیدی متفاوت در گونه های یک جنس از درختان میوه گاهی مانع تولید هیبرید می گردد و حتی در ارقام یک گونه فنوتیپ های متفاوت (با صفات متفاوت) به وجود می آورد. صفاتی مثل درشتی میوه، برگ، ضخامت بیشتر برگ، تغییر در میزان متابولیت های ثانویه، بعضی از مقاومت ها به تنش های زنده و غیر زنده، پاکوتاهی پایه ها، بی بذری ارقام و غیره از صفات بارز در نتیجه افزایش سطح پلوئیدی می باشند. بنابراین آگاهی از سطوح پلوئیدی گونه ها و جنس های وابسته به درخت میوه ای که به نژادگر با آن سروکار دارد و توان دست ورزی آن برای رسیدن به اهداف به نژادی بسیار ضروری است.



تصویر 2. کاربرد CMA باندینگ در تفکیک کروموزوم های والدین در دورگ های مرکبات (Asadi Abkenar et al., 2007)

منابع

Asadi Abkenar, A., R. Matsumoto, S. Tanaka, and Y. Katayama. 2007. Parental chromosome differentiation in citrangequat [*Fortunella* sp. × (*Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata*) using CMA banding patterns. Scientia Horticulturae 114: 74-76.

Choi, Y. A., R. Tao, K. Yonemori, and A. Sugiura. 2003. Physical mapping of 45S rDNA by fluorescent *in situ* hybridization in persimmon (*Diospyros kaki*) and its wild relatives. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78 (2): 265-271.

Liu, J. Y., C. W. She, Z. L. Hu, Z. Y. Xiong, L. H. Liu and Y. C. Song. 2004. A new chromosome fluorescence banding technique combining DAPI staining with image analysis in plants. Chromosoma 113: 16-21.

Martinez-Gomez, P. R. Sanchez-Perez., Y. Vaknin, F. Dicenta, and T. M. Gradziel. 2005. Improved technique for counting chromosomes in almond. Scientia Horticulturae 105: 139-143.

Motosugi, H., Y. Yamamoto, T. Naruo, and D. Yamaguchi. 2007. Growth and fruit quality of 'Kyoho' grapevines grafted on autotetraploid rootstocks. Journal of Japanese Society for Horticultural Science 76 (4): 271-278.

Yamamoto, M. 2012. Recent progress on studies of chromosome observation in deciduousfruit trees. Journal of Japanese Society for Horticultural Science 81 (4): 305-313.