اصلاح انگور در ایران برای مصارف تازه خوری و کشمشی (کلیدی)

علی عبادی، محمد رضابی همتا، محمد رضا فتاحی مقدم، محمد رضا نقوی، داریوش آتشکار، حسن ساریخانی، علیرضا سلامی، جواد عرفانی مقدم، مهدی حدادی نژاد و مریم کریمی

چکیده

انگور یکی از مهمترین میوه ها در جهان و ایران است که در طی دو قرن اخیر تلاش های زیادی برای اصلاح آن در جهان به عمل آمده است. اصلاح انگور در ایران برای مصارف تازه خوری و کشمشی با ارزیابی ۹۰ رقم از ارقام موجود در کلکسیون انگور پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج در سال ۱۳۷۶ آغاز شد. بر اساس نتایج بدست آمده ارقام عسکری، یاقوتی، بیدانه سفید و بیدانه قرمز به عنوان والدهای پدری و ارقام موسکات هامبورگ، قزل اوزوم، دیزماری، رجبی سفید، علی بابا، الحقی قرمز و تبرزه به عنوان والدهای مادری برای دست یابی به ژنوتیپ های جدید بی دانه با حبه درشت تر و سایر مشخصه های کیفی انتخاب شدند. از مجموع ۱۶۰۰ نتاج بدست آمده، ۴۸۱ نتاج از ۲۸ تلاقی در طی فصول ۱۳۸۷-۱۳۸۵ مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعدادی از نتاج بیدانه دارای صفات مطلوبی از جمله بزرگ بودن حبه ها، گوشتی بودن حبه ها، زودرسی، استحکام خوب حبه به خوشه و تراکم مناسب حبه ها در خوشه بودند که در صفات مذکور نسبت به ارقام بیدانه موجود شناخته شده در ایران برتری بارزی می دهند. نتایج همچنین نشان داد برخی از صفات دارای وراثت پذیری بالایی می باشند. وراثت پذیری برای وزن، طول و عرض حبه به ترتیب۰/۶۵ ، ۰/۶۷ و ۰/۵۴ برآورد شد. وراثت پذیری برای تاریخ رسیدگی، قند، اسید و نسبت قند به اسید به ترتیب ۰/۶۰، ۰/۲۹، ۰/۳۷ و ۰/۲۸ برآورد شد. نتایج مربوط به همبستگی نشان داد که همبستگی وزن حبه با درصد قند و اسید بیشتر تحت تاثیر عوامل ژنتیکی قرار دارد و همبستگی فنوتیپی بین آنها نسبتا پایین است. تکرار پذیری صفات مورد مطالعه همچنین بالا بود. تکرار پذیری برای صفت رنگ حبه ۰/۹۸ برآورد شد. صفات مرتبط با عصاره دارای کمترین مقدار تکرارپذیری بودند. از کل ۱۶۰۰ نتاج حاصل از ۲۸ ترکیب تلاقی مختلف، ۳۸۱ نتاج از سال ۱۳۸۵ به مرحله میوه دهی رسیدند که در طی دو فصل ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ مورد ارزیابی قرار گرفتند و ۱۰۰ نتاج در سال ۱۳۸۷ به مرحله میوه دهی رسیدند که در همان سال مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر این اساس، ۱۱٪ نتاج در کلاس کاملاً بیدانه ، ۱۳/۶٪ نتاج در کلاس تا حدی بیدانه، ۲۴/۱٪ نتاج در کلاس تا حدی دانه دار و ۵۱/۲٪ نتاج در کلاس کاملاً دانه دار قرار گرفتند. درصد نتاج بیدانه تولید شده توسط چهار والد پدری عسکری، یاقوتی، بیدانه سفید و بیدانه قرمز به ترتیب ۱۵/۴٪، ۱۰/۸٪، ۹/۳٪ و ۱۰/۶٪ بوده است. در حالیکه درصد نتاج بیدانه برای هر والد مادری موسکات هامبورگ، قزل‌اوزوم، دیزماری، رجبی سفید، علی بابا، الحقی قرمز و تبرزه به ترتیب ۵/۴٪، ۵٪، ۱۷/۵٪، ۱۳/۲٪، ۱۰/۴٪، صفر و ۳۶٪ بدست آمد. به این ترتیب تا به حال، برای تولید تعداد بیشتر نتاج بی دانه جدید، بهترین والد پدری رقم عسکری و بهترین والد مادری رقم تبرزه تشخیص داده شدند. در ادامه این پروژه در نظر است تا با بررسی بقیه نتاج موجود که تا به حال میوه تولید نکرده اند، نسبت به انتخاب سایر ژنوتیپ های بی دانه اقدام نموده و سپس آنها را وارد مرحله مقایسه آماری تکرار دار نماییم تا در نهایت بتوان نسبت به معرفی بهترین ژنوتیپ ها اقدام نمود. در طی تحقیقی دیگر، چگونگی تشکیل میوه و مکانیزم بی دانگی در چهار رقم انگور بی دانه سفید، بی دانه قرمز، عسکری و یاقوتی از طریق

میکروسکوپ فلورسنت و اولترامیکروتوم بررسی شد. نتایج نشان داد که در تمامی چهار رقم بی دانه ایرانی، استعداد باروری وجود دارد و حداقل تعدادی از تخمک ها در هر گل بارور می شوند. با این حال سقط زایگوت و پیش جنین در مراحل بعدی اتفاق می افتد. زمان سقط جنین در ارقام مختلف متفاوت بود و مشخص گردید که ارقام بی دانه مورد بررسی همگی از نوع استنوسپرموکارپ بوده و حالت پارتنوکارپی در آن ها دیده نشد. تحقیق در مورد امکان نجات جنین در والد های مادری بی دانه از دیگر بررسی هایی بود که در این پروژه طی سال های ۱۳۷۸ و ۱۳۷۹ انجام شد. در این تحقیق اثر والد مادری، اثر والد پدری و زمان جداسازی تخمک از حبه بر موفقیت این روش کاملا موثر بود، به طوری که در بین والدهای مادری، تخمک ارقام عسکری، یاقوتی و فلیم سیدلس بهتر جوانه زده و تولید گیاه نمودند. همچنین در بین والد های پدری، رقم دیز ماری موجب افزایش در صد جوانه زنی تخمک های کشت شده در محیط کشت گردید. بررسی های تکمیلی در ارتباط با انتقال ژن های مقاومت از سال ۱۳۸۶ آغاز گردید. در این ارتباط، ابتدا جنین زایی سوماتیکی در تعدادی از ارقام تجاری بررسی گردید. نتایج نشان داد که نوع ریز نمونه، رقم و محیط کشت در تولید کالوس های جنین‌زا کاملا موثر هستند. در ادامه اقدام به شناسایی و کلون سازی ژن های مقاومت به بیماری سفیدک سطحی گردید. در این ارتباط، ابتدا ژن کیتیناز III کلون گردید و در ادامه کلون سازی ژن های Run 1 و pmr6 در دست انجام است.

مقدمه

انگور یکی از مهمترین میوه هایی است که از زمان های قدیم مورد کشت و کار قرار گرفته است و در تجارت جهانی نقش مهمی دارد. در بین کشورهای تولید کننده انگور، کشور ما در رده هفتم قرار دارد. انگور دارای مصارف متعددی از جمله تازه خوری، کشمش و تهیه آب انگور می باشد. با توجه به اهمیت این محصول، اصلاح آن برای اهداف مختلف از قرنها پیش آغاز شده و همچنان ادامه دارد (۵ و ۴۵).

در آمریکا از ابتدای قرن ۱۷ تلاش های زیادی برای اصلاح انگور انجام شده است. از اولین کارهای اصلاحی دورگ گیری بین دو گونه وینیفرا ولابراسکا بود که نتاج آنها به نام هیبریدهای راجرز معروف شدند (۵). در اروپا دورگ گیری بین گونه های مو از زمانی که خسارت آفت شته فیلوکسرا در فرانسه مشاهده شد، آغاز گردید (۲۱، ۴۵). در سال ۱۹۶۴لیستی که شامل ۱۷۵ رقم انگور تازه خوری بود ارائه شد و به دنبال آن در سال ۱۹۸۸، ۱۸۰ رقم انگور تازه خوری و کشمشی که بوسیله ۳۷ برنامه اصلاحی بوجود آمده بودند، در سراسر جهان معرفی شدند (۴۵). مهمترین ارقامی که در قرن های ۱۹ و ۲۰ معرفی شدند، شامل ایتالیا، کاردینال، پرلت، فلیم سیدلس، کریمسون سیدلس و سوپریور سیدلس بودند.

اهداف اصلاحی در انگور شامل مقاومت به آفات و بیماریها (۲۱، ۴۵)، مقاومت به ویروسها (۳۸)، اصلاح پایه ها (۱۰، ۲۰، ۴۵)، اصلاح انگورهای تازه خوری به منظور تولید ارقامی با حبه درشت و بیدانه، رنگ مطلوب و انبارمانی مناسب، گوشتی بودن حبه و عطر و طعم مطلوب (۷۱)، زمان رسیدن (۲۷، ۵۵)، اصلاح انگورهای کشمشی (۴۵) و اصلاح ارقام آب میوه ای (۴۵) می باشند. برای رسیدن به این اهداف از روشهای کلاسیک دورگ گیری (۲۵، ۴۸، ۴۹، ۶۵)، روش نجات جنین (۲۰، ۲۵، ۲۷، ۴۸، ۸۰)، گزینش کلونی (۶،۵۸)، موتاسیون (۶، ۱۲، ۴۵) و مهندسی ژنتیک (۵۶، ۸۰) استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این پروژه ابتدا در سال ۱۳۷۷، ۹۰ رقم موجود در کلکسیون ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی با توجه به دیسکریپتور انگور (۳۸ صفت کمی و کیفی) مورد ارزیابی قرار گرفتند و بر روی داده های بدست آمده تجزیه واریانس، تجزیه رگرسیونی گام به گام، تجزیه علیت، تجزیه به مولفه ها و تجزیه کلاستر انجام شد. در ادامه این تحقیق در سال های ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸ با نمونه گیری از تخمک های چهار رقم انگور بیدانه ایرانی (یاقوتی، عسکری، بیدانه سفید و بیدانه قرمز) در زمان باز شدن گلها، ۲ روز، ۳ هفته، ۶ هفته و ۸ هفته بعد از باز شدن گل ها و قرار دادن تخمک های آنها در داخل کپسول های ژلاتینی حاوی محلول GMA اقدام به تهیه برش هایی با ضخامت چهار میکرون با اولترا میکروتوم گردید. از هر تخمک تعداد قابل توجهی برش بدست آمد. پس از رنگ آمیزی برش های مربوط به هر تخمک، نسبت به بررسی وضعیت تخمک ها در زمان شکوفایی و ۴۸ ساعت پس از آن اقدام گردید.

بدنبال بررسی مرفولوژیکی، گلهای والدهای مادری علی بابا، رجبی سفید، الحقی قرمز، تبرزه، دیزماری، قزل اوزوم و موسکات سیاه در سالهای ۱۳۷۸ و ۱۳۷۹ اخته گردیده و سپس با گرده چهار رقم بیدانه سفید، بیدانه قرمز، یاقوتی و عسکری در روز پس از اخته کردن و دو روز بعد گرده افشانی شدند. در زمان برداشت، میوه ها برداشت و بذور آنها خارج گردیده و در آذر ماه همان سال کشت گردیدند. نهال های بدست آمده در اواسط بهار سال بعد به زمین اصلی منتقل و در فواصل ۳ × ۰/۵ متر در ایستگاه تحقیقات گروه کشت گردیدند. از سال پنجم به بعد به تدریج نهال ها شروع به گلدهی و تولید میوه نمودند. بررسی های مربوط به خصوصیات میوه و بذر در ژنوتیپ های به گل رفته (۴۸۱ نهال) تا به حال بررسی و ژنوتیپ های بیدانه با کیفیت برتر نسبت به والدین پدری بیدانه مشخص گردیده اند.

در کنار این بررسیها، بررسی امکان نجات جنین در برخی ارقام استنوسپرموکارپ با بررسی محیط های کشت و زمانهای متفاوت جداسازی تخمک از حبه در سالهای ۱۳۷۸ و ۱۳۷۹ انجام گردید و سپس در سال ۱۳۸۷ امکان تلاقی ارقام بیدانه با یکدیگر و سپس نجات جنین دورگ آنها با توجه به تأثیر زمان های جداسازی تخمک از حبه و جنین از تخمک، تأثیر والدهای مادری و پدری مورد بررسی قرار گرفت.

از دیگر تحقیقات در حال انجام در ارتباط با اصلاح انگور، ایجاد کالوس های جنین زا و شناسایی ژن های مقاومت به سفیدک سطحی مو، کلون سازی آنها و انتقال آنها به ارقام تجاری است که بخشی انجام و بخشی دیگر در حال انجام است.

نتایج و بحث

بررسی ویژگی های صفات نشان داد که تمام صفات از ضرایب فنوتیپی بالایی برخوردار می باشند که خود نشان دهنده وجود تنوع در ارقام و امکان انتخاب ارقام بر اساس صفات ویژه می باشد. تجزیه علیت نشان داد که صفات تعداد خوشه در بوته، وزن خوشه، تعداد و وزن حبه بیشترین تأثیر را روی عملکرد بوته دارند.

نتایج تجزیه به مولفه های اصلی نشان داد که هفت مولفه با مقادیر ویژه بیش از یک، ۸۱٪ مجموع تغییرات را توجیه می نماید. همچنین تجزیه عامل ها نشان داد که هفت عامل اول ۸۰/۹٪ از کل تغییرات موجود را توجیه می نماید که چهار

عامل اول آن ۶۵/۶٪ از واریانس کل را در بر می گیرد. تجزیه کلاستر ارقام بر اساس تمام صفات، صفات مربوط به عملکرد بوته و صفات مربوط به بذر و اندازه حبه به روش وارد انجام شد و ارقام بر اساس تنوع ژنتیکی به ترتیب به ۴، ۵ و ۴ کلاستر گروه بندی شدند.

نتیجه بررسی میکروسکوپی برش های تهیه شده از تخمک های ارقام انگور بیدانه سفید، بیدانه قرمز، یاقوتی و عسکری نشان داد که تمامی ارقام مورد بررسی دارای تخمک های سالم بوده و در آنها باروری صورت می گیرد، ولیکن رشد جنین در مراحل اولیه متوقف شده و بذر سقط می شود. علت اصلی این پدیده ناتوانی زایگوت برای تقسیم شدن در اکثر موارد بود. بنابراین اندوسپرم هسته ای به دلیل عدم تقسیم زایگوت تدریجا تخریب شده و اندوسپرم و زایگوت هر دو از بین می روند و حبه بدون بذر به رشد خود ادامه می دهد. از بین رفتن زایگوت و اندوسپرم در رقم بیدانه قرمز خیلی زود اتفاق می افتد. بطوریکه پس از ۲۱ روز از شکوفایی گلها جنین و اندوسپرم فعال در این رقم دیده نشد. در حالیکه در رقم عسکری پیش جنین زنده حتی پس از شش هفته مشاهده شد. رشد اندوسپرم در رقم یاقوتی سریعتر از بقیه ارقام بود. اندازه شبه بذرها در ارقام مختلف تا حدودی مشخص کننده وضعیت درونی آن بود، بطوریکه بذور درشت تر اندوسپرم و پیش جنین پیشرفته تری داشتند و در آنها حتی اندوسپرم سلولی نیز قابل مشاهده بود. این وضعیت در ارقام یاقوتی وعسکری مشاهده شد ولیکن در ارقام بیدانه سفید و بیدانه قرمز اندوسپرم هسته ای قبل از سلولی شدن از بین رفته بود. بنابراین نجات جنین در این ارقام باید قبل از ۲۱ روز انجام شود. در سایر ارقام مورد بررسی، نجات جنین را می توان دیرتر انجام داد که بنوبه خود در موفقیت تکنیک نجات جنین بسیار موثر است. نتاج بدست آمده از دورگ گیری های انجام شده در سال های پنجم و ششم پس از کاشت در مزرعه تدریجا شروع به تولید گل و میوه نمودند. از کل ۱۴۰۰ نتاج حاصل از تلاقی های مختلف، ۴۸۱ نتاج به مرحله میوه دهی رسیدند که در طی سه فصل زراعی ۱۳۸۵ ، ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتاج بدست آمده بر اساس ارزیابی ها انجام شده متکی بر متوسط وزن تر یک شبه بذر یا بذر در چهار کلاس کاملا بیدانه (۱۱٪)، تاحدی بیدانه (۱۳/۶٪)، تا حدی دانه دار (۲۴/۱٪) و کاملا دانه دار (۵۱/۲٪) قرار گرفتند. درصد نتاج بیدانه برای چهار والد عسکری، یاقوتی، بیدانه سفید و بیدانه قرمز به ترتیب ۱۵/۴٪، ۱۰/۸٪، ۹/۳٪ و ۱۰/۶٪ بود. نتاج امید بخش بیدانه حبه متوسط و حبه درشتی که تا بحال بدست آمده اند، عبارتند از: I21، B98، A119، I73، R80، L125، K67، S52 ، R84 , F10,S55,Q45,R87.

نتایج آزمایشات انجام شده در ارتباط با استفاده از تکنیک نجات جنین نشان داد که اثر رقم، والد پدری و اثر متقابل آنها در جوانه زنی تخمک ها معنی دار بود. والد پدری دانه دار نسبت به والد پدری بیدانه موجب افزایش درصد جوانه زنی در تخمک های رقم یاقوتی گردید. همچنین علاوه بر ژنوتیپ ارقام مادری و پدری، تاریخ جداسازی تخمک از حبه و کشت آن نیز بر جوانه زنی تخمک ها تأثیر معنی داری نشان داد، به طوریکه بالاترین درصد جوانه زنی تخمک ها (۱۰/۲٪) در رقم فلیم سیدلس در زمان ۴۰ روز پس از شکوفایی گلها بود و جداسازی و کشت تخک ها در زمان های ۳۰، ۵۰ و ۶۰ روز چندان موفقیت آمیز نبود. تلاش در جهت اپتیمم نمودن شرایط در تلاقی های بین ارقام بیدانه هم اکنون در حال انجام است.

بررسی های تکمیلی در ارتباط با انتقال ژن های مقاومت از سال ۱۳۸۶ آغاز گردید. در این ارتباط، ابتدا جنین زایی سوماتیکی در تعدادی از ارقام تجاری بررسی گردید. نتایج نشان داد که نوع ریز نمونه، رقم و محیط کشت در تولید کالوس های جنین زا کاملا موثر هستند.

در ادامه اقدام به شناسایی و کلون سازی ژن های مقاومت به بیماری سفیدک سطحی گردید. در این ارتباط، ابتدا ژن کیتیناز III کلون گردید و در ادامه کلون سازی ژن های Run 1 و pmr_6 در دست انجام است.

منابع

1- Aguero, C., Riquelme, C. and Tizio, R. 1995. Embryo rescue from seedless grapevines (Vitis vinifera L.) treated with growth retardants. Vitis 34 (2): 73-76.
2- Alleweldt, G and Possingham, J. V. 1988. Progress in grapevine breeding. Theor. Appl. Genet. 75: 669-673.
3- Altpeter, F., Clark, D., Gmitter, F., Gray, D., Hannah, C., Moore, G., Polston, J. and Scott, J. 2006. Molecular Genetics for Enhanced plant breeding. University of Florida: 1-5.
4- Barker, C. L., Donald, T., Pauquet, J., Ratnaparkhe, M. B., Bouquet. A., Adam- Blondon, A. F., Thomas, M. R. and Dry, I. 2005. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene ,Run1, using a bacterial artificial chromosome library. Theor Appl Genet 111: 370-377.
5- Bouquet, A. and Danglot, Y. 1996. Inheritance of seedlessness in grapevine(Vitis vinifera l.). Vitis 35 (1): 35-42.
6- Cancellier, S., Calo, A. and Costacurta, A. Genetic improvement for crossbreeding in table grape varieties. Genetic resources, evaluation and screening: 81-87.
7- Clark, J. R. 2005. Grape Breeding Program. University of Arkansas Department of Horticulture: 1-1.
8- Clingeleffer, P. R. 1995. Overseas varieties and breeding programs- a summary from a table grape perspective. 4th Australian Table Grape Industry Technical Conference, C.S.I.R.O. No 1167: 1-6.
9- Colova-Tsolova, V. and Jiang, L. 2001. Genetically Engineered Grape for Seedless and Stress Tolerance. ASEV 52 nd Annual meeting, Sandiego, California: 1-1.