

بررسی الگوهای خودناسازگاری برای شناسایی رقم‌های خودسازگار و خودناسازگار اطلسی

Petunia hybrida grandiflora (Solanaceae)

حکیمه علومی* و رضانزاد فرخنده**

* مرکز بین‌المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان

** دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست‌شناسی

چکیده

خودناسازگاری، یکی از مهمترین مکانیسم‌های گیاهی است که توسط آن گیاهان از درون‌زادگیری ممانعت می‌کنند. در این پژوهش، رشد لوله‌گرده هشت رقم گیاه اطلسی در شرایط "در شیشه"^۱ و "در زیوه"^۲ در مادگی خود تلقیح و مادگی دگرتلقیح و همچنین میزان بذردهی گل‌های خودتلقیح و دگرتلقیح، به عنوان شاخص‌های خودناسازگاری بررسی شدند و رقم‌های خودسازگار از خودناسازگار شناسایی شدند. رشد لوله‌گرده در شرایط "در زیوه"، ۴۸ ساعت پس از گرده افشانی کلالة با گرده‌های گل‌های همان پایه و پایه‌های سایر رقم‌ها، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مطالعه گردید. نتایج، رشد طبیعی گرده‌های جمع‌آوری شده از بساک‌های تازه شکفته را در شرایط "در شیشه" در تمامی رقم‌ها در خامه‌های خود و دگرتلقیح نشان داد. جوانه زنی و رشد لوله‌گرده در تمامی رقم‌های خود و دگرتلقیح در سطح کلالة به شکل طبیعی انجام گرفت. خامه ارقامی که به عنوان خودناسازگار تشخیص داده شدند، ناهنجاری‌هایی از جمله: توقف رشد لوله‌گرده در ۱/۳ ابتدایی طول خامه، نازک شدن ضخامت قطر لوله‌گرده در بخش‌های میانی و انتهای طول خامه در مقایسه با رقم‌های خودسازگار خود تلقیح نشان داد. مطالعه میزان بذردهی در نمونه‌های خودتلقیح، کاهش تعداد بذر را در مقایسه با نمونه‌های دگرتلقیح نشان داد. با استفاده از این ویژگی‌ها که از مشخصات گرده افشانی ناسازگار ذکر شده است و همچنین با استفاده از میزان بذردهی در گرده افشانی‌های خود و دگرتلقیح، رقم‌های خودسازگار از خودناسازگار تشخیص داده شدند.

واژه‌های کلیدی: خودتلقیحی، دگرتلقیحی، *Petunia hybrida grandiflora*، لوله‌گرده، خودسازگاری،

1. In vitro

2. In vivo

مقدمه

به طور معمول در ۱/۳ ابتدای مسیر گذر خامه یا در بخش های بعدی خامه یا حتی در تخمدان متوقف می شود (۳ و ۱۷). در تیره های با سیستم خودناسازگار گامتوفیتی، سازگاری یک تلقیح با ژنوم هاپلوئید یک گرده و ژنوم دیپلوئید مادگی مشخص می شود (۷). در این سیستم ها، خودناسازگاری به وسیله یک جایگاه S چندآلی کنترل می شود (۷ و ۹)؛ هرچند ممکن است عواملی غیر از جایگاه S نیز در خودناسازگاری گامتوفیتی نیز دخالت داشته باشند (۱۴). جایگاه S دارای حداقل دو ژن متفاوت است که یکی اختصاصی بودن گرده (ژن F-box) و دیگری اختصاصی بودن مادگی را (ژن S-RNase) در واکنش خودناسازگاری کنترل می کند (۷ و ۹). وقتی که آلل S حمل شده به وسیله گرده با یکی از دو آلل S موجود در مادگی یکسان باشد، باروری متوقف می شود (۱۳). هر هاپلوטיפ S یک ریونوکلاز ویژه را به رمز درمی آورد که RNA گرده را در گرده افشانی ناسازگار، تجزیه می کند (۵ و ۱۳). رد گرده ناسازگار به مقادیر بالایی از انواع RNase نیاز دارد (۳ و ۲۰)؛ گرچه در این گیاهان در اغلب موارد خودناسازگاری با یک لوکوس تک ژنی کنترل می شود، مطالعات نشان داده است که ترکیبات متعدد در یک مسیر انتقال سیگنال پیچیده در مسیر بازشناسی گرده دخالت دارند (۱۵).

Elizabeth و همکاران (۱۹۸۲) علایم متفاوتی از رشد غیر طبیعی لوله گرده را در واکنش های ناسازگاری بین گونه ای در خرزهره هندی (*Rhododendron*) گزارش نمودند. این بی نظمی ها

بسیاری از گیاهان گلدار به منظور ایجاد تنوع ژنتیکی، دارای راهکارهایی برای جلوگیری از درون زادگیری^۱ بوده، از این طریق برون زادگیری^۲ را تحریک می کنند. یکی از کارآمدترین این روشها خودناسازگاری است (۲۲) که یک سد تولید مثلی درون گونه ای پیش تخمی در گیاهان گلدار است و از باروری با گرده خودی یا گرده افرادی که از نظر ژنتیکی مشابه هستند، ممانعت کرده، به گرده غیرخودی اجازه لقاح و باروری می دهد (۱۰). به طور معمول، خودناسازگاری به دو صورت اسپوروفیتی (SSI)^۳ و گامتوفیتی (GSI)^۴ دیده می شود.

در نوع اسپوروفیتی که تیره شب بو و مرکبان شاخص آن هستند، زمان بیان ژن S (جایگاه خودناسازگاری)^۵ در پرچم، پیش میوزی^۶ یا حداقل میوزی و قبل از تفکیک شدن تتراد است. بنابراین، در این سیستم تشخیص فنوتیپ ناسازگار گرده، به ژنوتیپ گیاه تولید کننده گرده بستگی دارد (۱۰ و ۱۱). خودناسازگاری گامتوفیتی در پانزده تیره گیاهی شناسایی شده که تیره های *Solanaceae*، *Rosaceae* و *Scrophularaceae* مکانیسم های مشابهی دارند (۳ و ۱۰). در خودناسازگاری گامتوفیتی برخلاف سیستم های خودناسازگاری اسپوروفیتی که رشد لوله گرده ناسازگار اغلب در سطح کلاله متوقف می شود، گرده ناسازگار به طور طبیعی در سطح کلاله رشد می کند، اما رشد بعدی آن

1. In breeding
2. Out-cross
3. Sporophytic self-incompatibility
4. Gametophytic self-incompatibility
5. S-locus product
6. Pre-meiotic

در ایران کشت می‌شوند، شامل Cool Water Mix، Flash، Flash Red Picotee، Bravo Purple Star، Bravo، Bravo purple، Bravo Pink، Salmon، Apple blossom و Bravo Peach Flare از شرکت Syngenta seeds B.V. تهیه و در بلوک‌های جداگانه در شرایط مزرعه‌ای (۱۹) کشت داده شدند. پس از گلدهی، آزمایشهای خود و دگرتلقیح بر اساس روش Sharma و Shivanna (۱۹۸۵) انجام گرفت. پس از ۲۴ ساعت خامه‌های خود و دگرتلقیح هر رقم به طور تصادفی، نمونه برداری شده و مطالعات خودناسازگاری بر روی آنها انجام گرفت.

مطالعات زیستایی دانه گرده در شرایط "در

شیشه"

به منظور اطمینان از موفقیت گرده‌افشانی مصنوعی، لازم است که قبل از انجام گرده‌افشانی زیستایی گرده‌ها بررسی گردد. دانه‌های گرده بساک‌های تازه شکفته شده، جمع آوری و به منظور بهینه سازی شرایط رشد گرده، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرارداد شدند. سپس در محیط کشت اصلاح شده Brewbacker و Kwack (1963) (۱) کشت شدند و پس از ۳۰ دقیقه، میزان جوانه زنی گرده‌ها مطالعه گردید. میزان رشد لوله‌های گرده پس از سه ساعت بررسی شد. بررسی درصد رویش در ظروف پتری محتوی ۱۰۰ دانه گرده انجام گرفت که برای مطالعه رشد لوله گرده در هر پتری، طول ۲۰ لوله گرده با میکرومتر اندازه‌گیری شد. هر آزمایش با سه تکرار انجام گرفت.

شامل ترکیدگی، چروکیدگی، پیچ خوردگی لوله گرده، غیرطبیعی شدن نوک آن و نیز اختلال در رسوب‌گذاری کالوز بود. آنها همچنین شش محل متفاوت را در مادگی برای توقف رشد لوله گرده در پاسخ های ناسازگاری تشخیص دادند که شامل بخش ترشحي کلالة، کانال موسیلاژی در بخش بالا و پایین خامه، حفره تخمدان، سفت و کیسه جنینی است (۴). گیاه اطلسی *Petunia hybrida* (تیره سیب زمینی) تاکنون از جنبه های متعدد خودناسازگاری بررسی شده است (۳ و ۱۸). تصویری شود این گونه، در اوایل قرن بیستم از دورگ‌گیری دو یا چند گونه وحشی این جنس مشتق شده باشد. انگشت نگاری مولکولی این دیدگاه را تأیید می‌کند که این گونه، از دورگ‌گیری^۱ گونه دارای گل‌های صورتی (به طور احتمال *P. integrifolia*) با گونه دارای گل‌های سفید (*P. axillaris* یا *P. parodii*) به وجود آمده باشد که گونه اول برون‌زادگیر و خودناسازگار بوده، در حالی که گونه دوم می‌تواند خودسازگار یا خودناسازگار باشد. اگرچه تعدادی رقم‌های ناسازگار *P. hybrida* نیز شناسایی شده‌اند، اما رقم‌های این گونه، بیشتر خودسازگار با بذردهی فراوان هستند (۱۸). با توجه به اهمیت تجاری گیاه اطلسی به عنوان یک گیاه زینتی و نقش مهم واکنش‌های ناسازگاری در تهیه بذر و نیز تولید گیاهان هیبرید، در این پژوهش تشخیص ارقام خودسازگار و خودناسازگار اطلسی در ایران، با استفاده از برخی ویژگی‌های شاخص خودناسازگاری انجام گرفت.

مواد و روش ها

دانه هشت رقم *P. hybrida grandiflora* که

تلقیح خودی و غیر خودی

کلاله سی گل از هر رقم با گرده بساک‌های تازه شکفته همان گل گرده‌افشانی شدند. همچنین در هر رقم سی گل نیز با استفاده از گرده پایه‌های مجاور و پایه‌های سایر رقم‌ها گرده‌افشانی شدند. برای جلوگیری از گرده‌افشانی طبیعی در گل‌هایی که به طور مصنوعی گرده‌افشانی شده بودند، پس از قطع پرچم‌ها و عقیم نمودن گل‌ها، انتهای گلبرگ‌ها با نخ بسته شد (۱۹).

مطالعات "در زیوه"

برای بررسی میزان جوانه زنی و رشد لوله گرده در نمونه‌های خودتلقیح یا دگرتلقیح، این گل‌ها پس از ۴۸ ساعت جمع آوری شدند و مادگی آنها جدا شد. مادگی‌ها به مدت دو ساعت در محلول کارنولی (استیک اسید والکل به نسبت ۱ به ۳) تثبیت و تا زمان مطالعه در اتانول ۷۰٪ نگهداری شدند. پس از هیدرولیز به مدت ۲۴ ساعت در سود ۸ نرمال، نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در آب جاری قرار گرفتند. رنگ آمیزی با آبی آنیلین (آبی آنیلین ۱٪ در ۱۰۸ میلی مولار K_3PO_4) به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (۱۲). میزان و نحوه رشد لوله گرده در سطح کلاله، خامه و تخمدان با استفاده از مادگی‌های رنگ شده و پس از له شدن روی لام، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Olympus مدل AH2 مورد مطالعه قرار گرفت. عکس‌برداری با دوربین Olympus مدل C-35AD-4 صورت گرفت. تعداد هفت مادگی گرده‌افشانی شده به صورت خود و دگرتلقیح در هر رقم، با میکروسکوپ فلورسنت مطالعه گردیدند.

مطالعه میزان دانه‌دهی

بررسی میزان دانه‌دهی گل‌های خودتلقیح و دگرتلقیح با شمارش تخمدان‌های بارور (پرشده) و تخمدان‌های بدون دانه در پانزده گل به مدت پانزده روز پس از گرده‌افشانی انجام گرفت. این مطالعه سه بار تکرار شد.

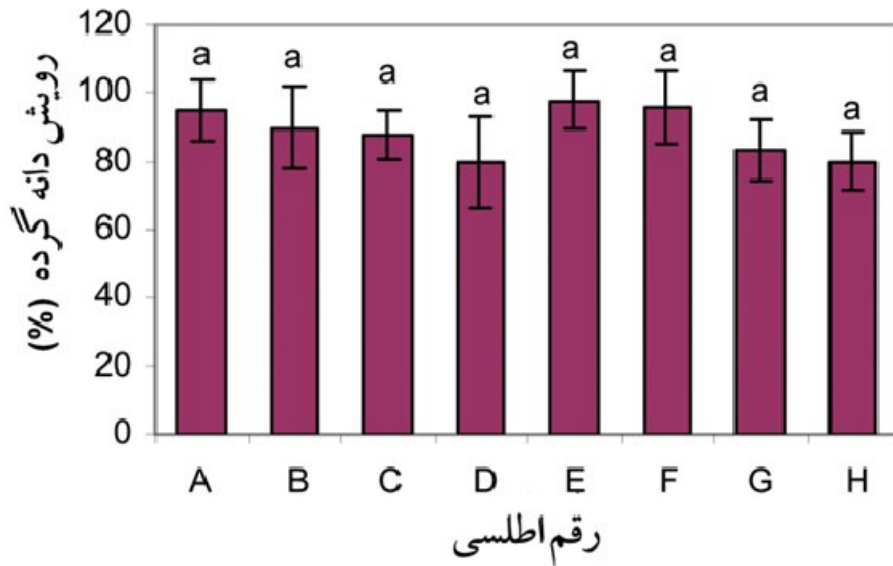
بررسی آماری

بررسی‌های آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک عاملی^۱ و آزمون Duncan با ضریب اطمینان ۹۵٪ توسط نرم افزار SPSS انجام گرفت.

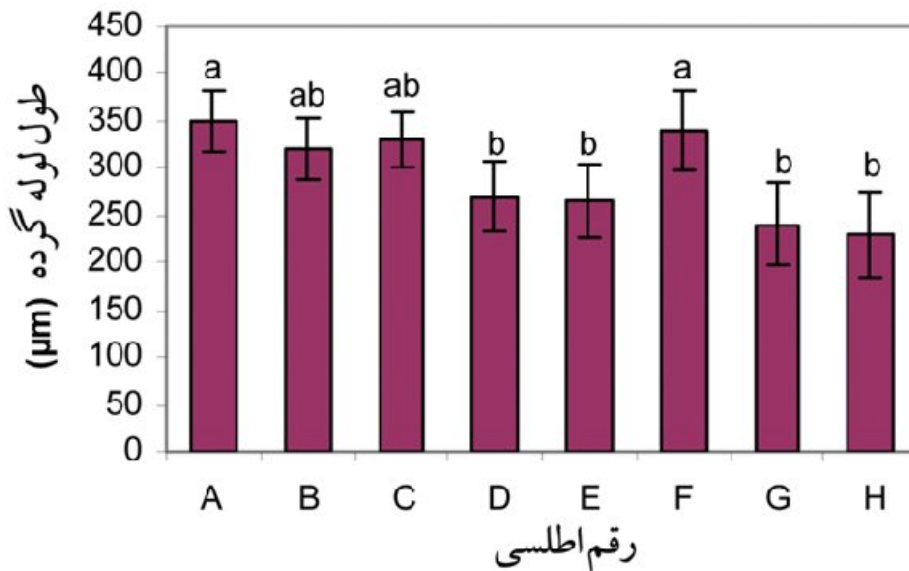
نتایج

رویش دانه‌های گرده از بساک‌های تازه شکفته شده در شرایط "در شیشه" در تمامی رقم‌ها درصد بالای رویش و جوانه‌زنی را پس از ۲۴ ساعت پیش تیمار گل‌ها با دمای ۴ درجه سانتیگراد، نشان داد (شکل ۱ و جدول ۱). بنابراین، گرده تمامی رقم‌ها دارای زیستایی بالایی بودند که برای انجام مطالعات خودناسازگاری مناسب تشخیص داده شد (شکل ۲، شکل ۳ و جدول ۱).

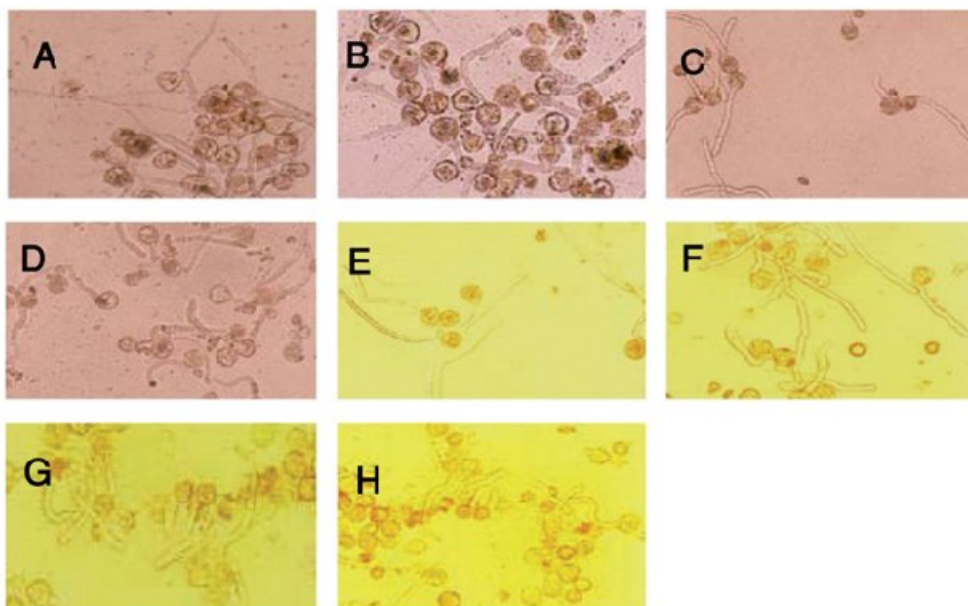
بررسی الگوهای خودناسازگاری برای شناسایی رقم‌های خودسازگار و خودناسازگار اطلسی / ۱۷



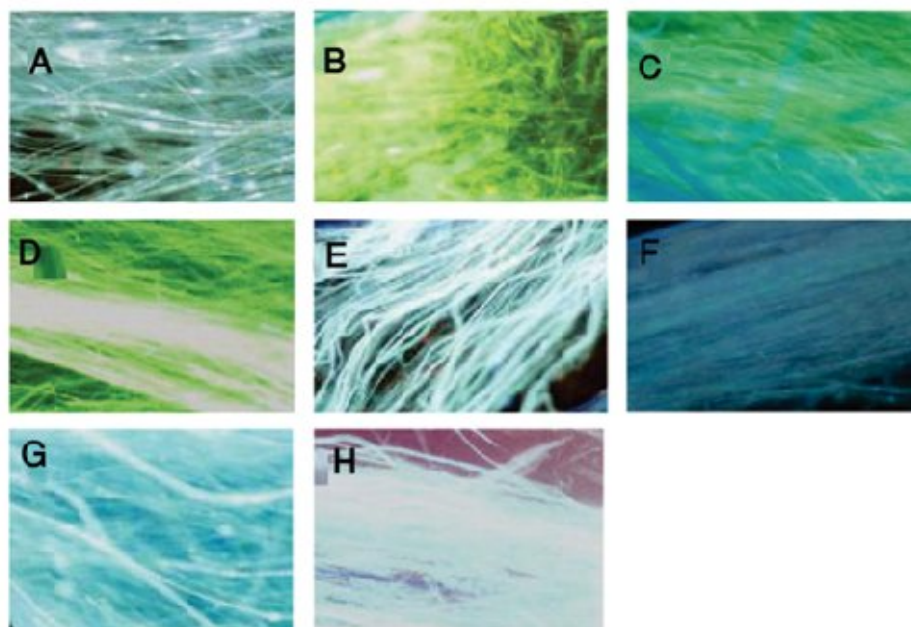
شکل ۱- میزان رویش (%) دانه گرده بساک‌های تازه شکفته پس از قرارگیری در دمای ۴ درجه سانتیگراد در محیط کشت در رقم‌های مختلف اطلسی (A: Cool Water Mix، B: Bravo Purple Star، C: Flash Red، D: Picotee، E: Bravo Pink، F: Bravo purple، G: Bravo Apple blossom، H: Bravo Peach Flare). میانگین‌ها با حروف مشابه با ضریب اطمینان ۹۵٪، معنی دار نیستند.



شکل ۲- میزان رشد (µm) لوله گرده بساک‌های تازه شکفته پس از قرارگیری در دمای ۴ درجه سانتیگراد در محیط کشت در رقم‌های مختلف اطلسی (A: Cool Water Mix، B: Bravo Purple Star، C: Flash Red، D: Picotee، E: Bravo Pink، F: Bravo purple، G: Bravo Apple blossom، H: Bravo Peach Flare). میانگین‌ها با حروف مشابه با ضریب اطمینان ۹۵٪، معنی دار نیستند.



شکل ۳- رویش و رشد دانه‌های گرده تازه شکفته رقم‌های مختلف اطلسی در محیط کشت (A: Cool Water Mix، B: Bravo Purple Star، C: Flash Red Picotee، D: Flash Salmon، E: Bravo Pink، F: Bravo purple، G: Bravo Apple blossom، H: Bravo Peach Flare) (بزرگنمایی ۱۰x).

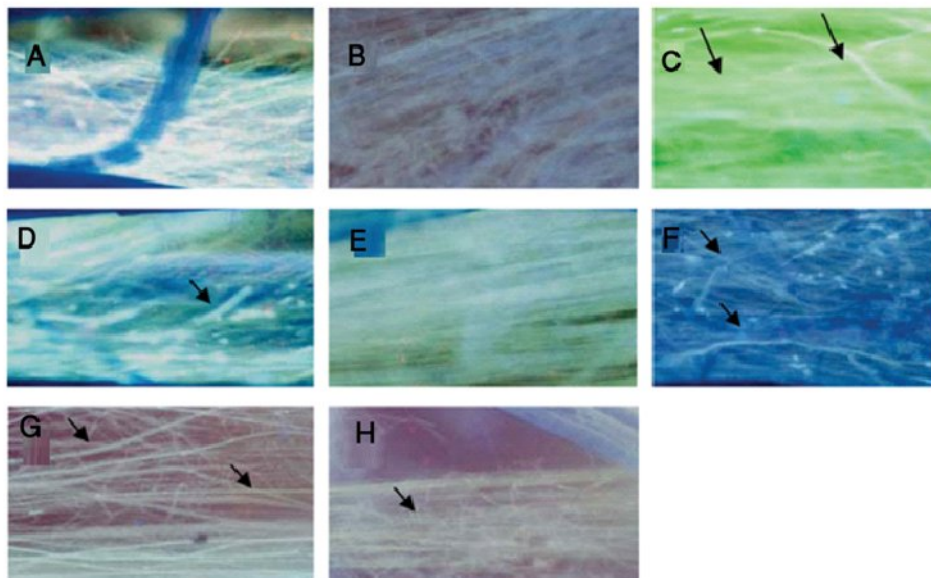


شکل ۴- رشد دانه‌های گرده رقم‌های مختلف اطلسی در بخش زیر کلاله (۱/۳ ابتدای خامه) در شرایط خودتلقیح (A: Cool Water Mix، B: Bravo Purple Star، C: Flash Red Picotee، D: Flash، E: Salmon، F: Bravo purple، G: Bravo Apple blossom، H: Bravo Peach Flare) (بزرگنمایی ۴۰x).

بررسی الگوهای خودناسازگاری برای شناسایی رقم‌های خودسازگار و خودناسازگار اطلسی / ۱۹

رقم‌های Flash Salmon و Bravo Purple و تشکیل نشدن صفحات کالوزی در رقم‌های Bravo در Bravo Peach Flare و Apple blossom رقم Bravo Cool Water Mix، رشد طبیعی لوله‌های گرده تا انتهای خامه و تخمدان دیده شد (شکل ۵). بررسی رشد لوله‌های گرده در آزمایشهای دگرتلقیح در شرایط "در زیوه" نشان داد که در تمامی رقم‌ها، رشد لوله‌های گرده در تمام بخش‌های مادگی به طور طبیعی انجام می‌گیرد.

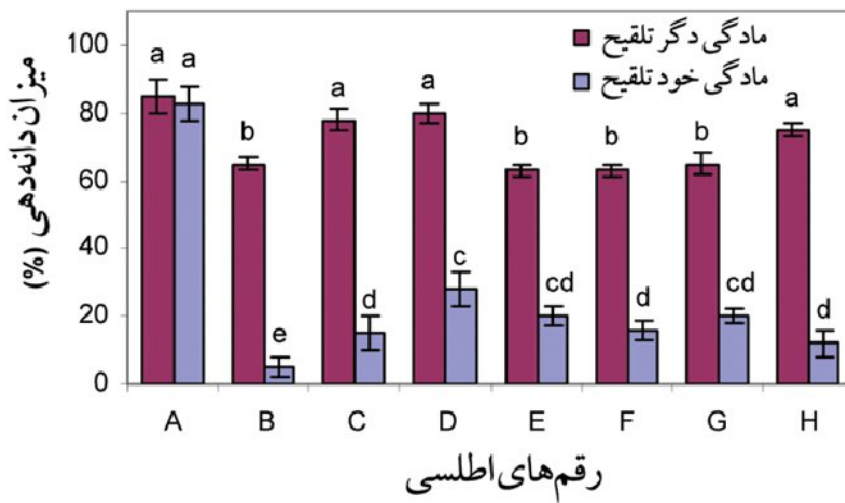
نتایج بررسی رشد لوله‌های گرده در بخش‌های انتهایی خامه نشان داد که رشد لوله‌های گرده خود تلقیح (بجز در رقم Bravo Purple Star) تا انتهای خامه ادامه می‌یابد، اما این رشد در رقم‌هایی که خودناسازگار تشخیص داده شدند، با ناهنجاری‌هایی به صورت زیر همراه بود: نازک شدن لوله‌های گرده در بخش انتهایی خامه در رقم‌های Red Picotee، Flash Salmon، Bravo Pink، Bravo، Bravo Peach Flare و Apple blossom و نازک شدن لوله‌های گرده و گسترش صفحات کالوزی در



شکل ۵- رشد دانه‌های گرده در بخش انتهایی خامه در رقم‌های مختلف اطلسی در شرایط خودتلقیح (A: Cool Water Mix، رشد طبیعی لوله‌های گرده، صفحات کالوزی به طور طبیعی قابل تشخیص هستند. B: Bravo Purple Star، عدم وجود لوله‌های گرده در بخش انتهایی خامه، رشد لوله‌های گرده در بخش ابتدای خامه متوقف شده است. C: Red Picotee، لوله‌های گرده به صورت بسیار ناهماهنگ رشد نموده‌اند. D: Flash Salmon، صفحات کالوزی بسیار گسترده و ضخیم و رشد نامنظم لوله‌های گرده. E: Bravo Pink، لوله‌های گرده بسیار نازک شده. F: Bravo Purple، رشد غیر عادی لوله‌های گرده و تشکیل دیواره کالوزی به صورت غیرطبیعی. G و H: Bravo Apple blossom و Bravo Peach Flare، لوله‌های گرده بسیار نازک با قطر متغیر و نبود صفحات کالوزی قابل تشخیص (بزرگنمایی ۴۰x).

Water Mix در سایر رقم‌ها در مادگی‌های خودتلقیح در مقایسه با دگرتلقیح بسیار کم است (شکل ۶ و جدول ۱).

مطالعه میزان دانه‌دهی رقم‌های اطلسی پانزده روز پس از گرده‌افشانی خودتلقیح و دگرتلقیح نشان داد که میزان دانه‌دهی، بجز در رقم Bravo Cool



شکل ۶- میزان دانه‌دهی (%) مادگی‌های خودتلقیح و دگرتلقیح در رقم‌های مختلف اطلسی (A: Bravo Cool Water Mix، B: Bravo Purple Star، C: Flash Red Picotee، D: Flash Salmon، E: Bravo Pink، F: Bravo purple، G: Bravo Apple blossom، H: Bravo Peach Flare). میانگین‌ها با حروف مشابه با ضریب اطمینان ۹۵٪، معنی‌دار نیستند.

جدول ۱- میزان رویش و رشد دانه گرده در شرایط در شیشه و میزان دانه دهی پس از خود و دگرتلقیحی در رقم‌های اطلسی (میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن و با ضریب اطمینان ۹۵٪ مقایسه شده است).

رقم اطلسی	رویش دانه گرده (%)	طول لوله گرده (μm)	دانه دهی پس از دگرتلقیحی	دانه دهی پس از خودتلقیحی
Cool Water Mix	89.33333±1.20185 ^a	341.6667±10.92906 ^a	81.33333±0.666667 ^a	80.66667±1.20185 ^a
Bravo Purple Star	85.66667±2.333333 ^a	310±10.40833 ^{ab}	64±1.154701 ^b	6.66667±0.881917 ^d
Flash Red Picotee	87.66667±3.179797 ^a	306.6667±15.89899 ^{ab}	80±1.154701 ^a	15.66667±0.881917 ^c
Flash Salmon	80±5.773503 ^a	280±15.27525 ^b	79±0.57735 ^a	21±0.57735 ^b
Bravo Pink	89.33333±2.333333 ^a	280±5.773503 ^b	64±0.57735 ^b	18±2.309401 ^{bc}
Bravo Purple	87.33333±1.452966 ^a	340±7.637626 ^a	63.66667±0.333333 ^b	15.33333±0.881917 ^c
Bravo Apple Blossom	80±2.886751 ^a	285±8.660254 ^b	66±0.57735 ^b	17.66667±2.027588 ^{bc}
Bravo Peach Flare	79.33333±3.480102 ^a	277.6667±8.685876 ^b	79±0.57735 ^a	15±0.57735 ^c

بحث و نتیجه گیری

جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله گرده در

شرایط «در شیشه»

تعیین میزان زیستایی گرده در مطالعات خودناسازگاری، به منظور اطمینان از موفقیت گرده‌افشانی مصنوعی انجام می‌گیرد. به طور کلی، زیستایی گرده‌ها، توانایی آنها را در ارائه سلول‌های اسپرم به کیسه رویانی پس از گرده‌افشانی مشخص می‌کند. گزارش شده است گرده‌های دوهسته‌ای-که در بیشتر گیاهان با خودناسازگاری گامتوفیتی دیده می‌شود- به طور معمول براحتی در محیط کشت رشد می‌کنند (۲۱).

نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز این گزارش را تأیید می‌کند (شکل ۱، ۲ و ۳). گرده‌های جمع آوری شده از بساک‌های تازه شکفته در تمامی رقم‌ها، پس از سی دقیقه قرارگیری در محیط کشت Brewbaker و Kwack (۱۹۶۳) در آگار ۱٪ شروع به رویش و رشد نمودند که نشان‌دهنده درصد بالای زیستایی دانه‌های گرده در تمامی رقم‌ها بود. Sharma و Shivanna (۱۹۸۵) نیز بیان کردند که گرده گیاه اطلسی چند دقیقه پس از قرارگیری روی محیط کشت شروع به رویش می‌کند (۱۹). به طور کلی، گرده‌های جمع‌آوری شده از بساک‌های تازه شکفته در این تحقیق، لوله گرده طبیعی را روی محیط کشت در تمامی رقم‌ها به وجود آوردند که نشان‌دهنده زیستایی کامل گرده‌های استفاده شده برای گرده‌افشانی مصنوعی بود. بنابراین، ناهنجاری‌هایی که در رشد لوله‌های گرده پس از گرده‌افشانی رخ می‌دهد، به دلیل اختلال در زیست پذیری دانه گرده نبوده، به احتمال زیاد ناشی از برهم‌کنش‌های خودناسازگاری است.

رشد لوله گرده در مادگی

رشد لوله گرده در تمام ارقام در سطح کلاله خودتلقیح، عادی بود. دانه گرده خودی و غیر خودی در تمامی رقم‌ها در سطح کلاله به طور طبیعی به سمت بافت خامه رشد نمود و تفاوتی در رشد لوله‌های گرده خودی و غیر خودی در بافت‌های کلاله مشاهده نشد. نتایج حاضر با نتایج به دست آمده روی گیاه اطلسی (۱۹) و *Tectona grandis* (۲۱) مطابقت دارد. تحقیقات نشان داده که در سیستم‌های خودناسازگاری گامتوفیتی، عوامل خودناسازگار بر جوانه‌زنی گرده تأثیر نمی‌گذارد (همان‌طور که در این مطالعه نیز مشاهده شد، در شرایط خود و دیگر تلقیح جوانه‌زنی و رشد لوله گرده در سطح کلاله در رقم‌ها مشابه بود) (۵ و ۱۹). دانشمندان با بررسی سیتولوژی کلاله اطلسی بیان کردند که به نظر نمی‌رسد کلاله تأثیری بر رشد لوله‌های گرده داشته باشد. بیشترین رشد لوله گرده در بافت کلاله با استفاده از ذخایر تغذیه‌ای دانه گرده انجام می‌گیرد و بنابراین، در این بافت، رشد لوله‌های گرده سازگار و ناسازگار به صورت مشابه و حتی با سرعت‌های یکسان دیده می‌شود (۳ و ۸). دانشمندان همچنین بیان کردند احتمال آن هست که لوله گرده‌ای که در گیاه توتون در سطح کلاله با استفاده از ذخایر دانه گرده رشد می‌کند، به مولکول‌های مسئول در بازدارندگی لوله‌های گرده ناسازگار حساس نباشد. به نظر می‌رسد علت این که لوله‌های گرده در کلاله مهار نمی‌شوند، در ارتباط با لوله‌های گرده است. بررسی توالی cdna کلون شده نشان داده که نسخه‌های S خامه‌ای و کلاله‌ای از ژن مشابهی مشتق می‌شوند. این احتمال وجود دارد که ریبونوکلائزهای مسئول در بازدارندگی رشد لوله گرده ناسازگار، قبل از اینکه

افزایش سرعت رشد، نتیجه اکتساب مواد غذایی از مادگی باشد (۱۱) که در این مطالعه نیز مشاهده شد رشد لوله گرده خودی و غیرخودی در فاز اتوتروف (در بافت کلانه) در تمامی رقم‌ها به طور طبیعی انجام می‌شود، اما در فاز هتروتروف (در بافت خامه) در رقم‌هایی که خودناسازگار تشخیص داده شدند، با ناهنجاری‌هایی همراه بود: برخلاف بسیاری مطالعات که نشان‌دهنده توقف رشد لوله گرده ناسازگار گامتوفیتی (از جمله اطلسی) در ابتدای بافت خامه هستند به طوری که محل گردن خامه مهمترین نقش را در سیستم خودناسازگاری اطلسی بازی می‌کند (۲، ۶، ۸، ۱۱، ۱۸ و ۲۲). در این مطالعه بجز در رقم **Bravo Purple Star** که رشد لوله های گرده خودناسازگار در ۱/۳ ابتدای خامه متوقف شده بود، در سایر ارقام خودناسازگار رشد لوله گرده خودتلقیح تا انتهای خامه مشاهده شد، اما با پیشرفت رشد لوله گرده به بخش‌های پایینی خامه، این رشد با بی‌نظمی‌های ذکر شده در بالا همراه بود. مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان داده است که نوک لوله‌های گرده ناسازگار به طور خاصی غنی از کالوز می‌شوند. بنابراین، به نظر می‌رسد تغییر در رسوب‌گذاری کالوزی در لوله‌های گرده ناسازگار به احتمال ناشی از مهار رشد است و عامل مهار رشد لوله گرده نیست (۴).

Elizabeth و همکاران (۱۹۸۲) در مطالعه ناسازگاری بین گونه‌ای در خرزهره هندی، الگوهای متفاوتی را از رشد غیرعادی و توقف لوله گرده ناسازگار در مادگی گزارش کردند که شامل نازک شدن نوک لوله گرده در بخش‌های رأسی و انتهای خامه، قطور شدن لوله‌های گرده در خامه، نوک تیز شدن لوله گرده در تخمدان و تشکیل صفحه

طول لوله گرده به حد مشخصی برسد یا لوله به قدرت پذیرش خاصی برسد، به گرده یا RNA گرده دسترسی ندارند. احتمال دیگر این است که در شروع رویش گرده، غلظت rRNA در لوله برای ادامه سنتز پروتئین در طول دروه اول رشد درون کلانه، کافی باشد (۸).

در رقم **Bravo Purple Star**، رشد لوله‌های گرده در ۱/۳ ابتدای خامه متوقف می‌شود (شکل ۴). بنابراین، این رقم خودناسازگار، تنها رقمی بود که مشابه اغلب گونه‌های خودناسازگار رد گرده خودی را در بخش ابتدای خامه نشان داد. در سایر ارقامی که خودناسازگار تشخیص داده شدند، رشد لوله‌های گرده در بخش ابتدایی به طور طبیعی انجام گرفت. ادامه رشد لوله گرده نیز در بخش انتهایی خامه در ارقامی که خودناسازگار تشخیص داده شدند، مشاهده شد، اما این رشد با ناهنجاری‌هایی به صورت رشد غیر عادی لوله گرده (نازک یا ضخیم شدن)، گسترش یا عدم تشکیل صفحات کالوزی همراه بود. در رقم **Bravo Cool Water Mix**، رشد طبیعی لوله‌های گرده تا انتهای خامه و تخمدان دیده شد (شکل ۵). لوله‌های گرده سازگار و ناسازگار هر دو تغییرات اولیه مشابهی را در زمان ورود به مسیر گذر متحمل شدند که این تغییرات در افزایش جذب مواد از مادگی دخالت دارد. جذب این مواد در لوله‌های ناسازگار یک عدم تعادل متابولیک را القا می‌کند که باعث تغییر در سرعت رشد لوله گرده می‌شود (۸). براساس مطالعات **Kao** و **Tsukamoto** (۲۰۰۴)، رد لوله گرده خودتلقیح در طول رشد لوله گرده در خامه و زمان رد آن با مرحله گذر رشد لوله گرده از فاز رشد آهسته (اتوتروفی) به فاز رشد سریع (هتروتروفی) مطابقت دارد و تصور می‌شود که

شد. برخی مطالعات بیانگر افزایش ضخامت دیواره کالوزی در انتهای رشد لوله‌گرده است که در این پژوهش در رقم‌های Flash Salmon و Bravo Purple این علائم مشاهده شد. مطالعات Elizabeth و همکاران (۱۹۸۲) بیان می‌کنند که افزایش ضخامت دیواره کالوزی می‌تواند ناشی از کاهش سرعت رشد لوله‌گرده در مقایسه با سرعت تشکیل دیواره‌های کالوزی باشد. همچنین تغییر فعالیت آنزیم‌های سنتزکننده دیواره سلولی سبب تغییر ضخامت و رشد لوله‌گرده می‌شود و لوله‌های گرده ناسازگار قادر به شکستن مواد خامه‌ای که فشار اسمزی لازم برای رشد سریع لوله‌گرده را مشابه با نمونه‌های سازگار فراهم می‌کنند، نیستند (۸).

میزان بذر دهی در تمامی رقم‌ها جز در رقم Bravo Cool Water Mix در آزمایش‌های خودتلقیح در مقایسه با آزمایش‌های دگرتلقیح (شکل ۶) نشان دهنده تولید بسیار کم بذر است. دانه دهی پایین در گونه‌های با درجات مختلف خودناسازگاری در گونه‌های *Gmilina*, *Vitex cooperi* و *aborlia* و *Tectona grandis* (از تیره *Verbenaceae*) که گرده دوهسته‌ای و خودناسازگاری گامتوفیتی دارند، نیز گزارش شده است (۲۱). با استفاده از این نتایج، شاید بتوان نتیجه گرفت که در رقم‌های Flash Red Picotee، Bravo Pink، Flash Salmon، Purple، Bravo Apple blossom و Bravo Peach Flare واکنش‌های خودناسازگاری در تخمدان یا حتی تخمک بوده، در نتیجه باروری اسپرم با تخم‌زا انجام نگرفته است. همچنین ممکن است واکنش خودناسازگاری منجر به تشکیل جنین ناپایدار شود (۱۴). برخی مطالعات نشان داده است که در شرایطی که مقدار ریبونوکلائاز S موجود در خامه در

کالوزی در نوک لوله‌گرده در محل مهار در خامه بود (۴). Owens و Tangmitcharoen (۱۹۹۷) نیز با مطالعه خودناسازگاری در گیاه *Tectona grandis*، نازک شدن لوله‌های گرده و نیز نوک آن‌ها مشاهده کردند (۲۱). همچنین گزارش‌های دیگری از انواع بی‌نظمی در رشد لوله‌های گرده این درخت وجود دارد که شامل رشد معکوس، پیچ‌خوردگی، افزایش رسوبات کالوزی و نیز تورم نوک لوله‌گرده است (۱۷ و ۲۱). مطالعه گیاه *Lycopersicum peruvianum* نشان داده است که نه تنها توقف رشد لوله‌های گرده ناسازگار در خامه دیده می‌شود، بلکه ناپدید شدن لایه داخلی سلول و تجزیه شدن لوله نیز انجام می‌گیرد. بیان شده است که ناپدید شدن لایه داخلی، احتمالاً ناشی از شکسته شدن آن به ذرات متعددی است که به درون سیتوپلاسم لوله آزاد می‌شوند (۸). همچنین گزارش شده است رسوب لایه فیبریلی خارجی در نوک لوله با یک سیتوپلاسم متراکم، بویژه در سلول زایشی، از علائم ریخت‌شناسی اولیه رشد لوله ناسازگار در گیاه اطلسی است. بنابراین، لوله‌های گرده ناسازگار که به بافت گذر نفوذ کرده‌اند، دیواره‌های بسیار ضخیم‌تری را در گیاه اطلسی نشان می‌دهند (۸ و ۱۹).

نتایج پژوهش حاضر مشابه مطالعات سایر محققان (۱۹ و ۲۱)، بی‌نظمی‌های مختلف رشد لوله‌گرده را در بخش‌های مختلف مادگی گیاهان خودناسازگار نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که در اطلسی (با خودناسازگاری گامتوفیتی)، رد رشد لوله‌گرده خودی برخلاف نتایج بسیاری از محققان، محدود به بخش ابتدایی نبوده و ادامه رشد لوله‌گرده در بخش‌های انتهایی (شکل ۵) نیز دیده

خامه از رشد بازمانده، و یا حتی در تخمدان متوقف شود. بنابراین، مکانیسم خودناسازگاری ممکن است غیر از بیان S-RNase که بنا به گزارش بسیاری از دانشمندان در زیر کلالة بیشترین میزان و نقش در خودناسازگاری را دارد، به عوامل ذکر شده در بالا وابسته باشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که در ارقام اطلسی که به طور معمول در ایران کشت می‌شوند، جهت تهیه بذر بارور باید از واکنش‌های دگرتلقیحی استفاده نمود. مورد استثناء رقم Bravo Cool Water Mix است که خودسازگار بوده، خودتلقیحی سبب تولید بذر بارور می‌گردد.

شرایط خودتلقیحی به حد آستانه برای رد تمامی گرده‌ها در شرایط خودتلقیحی نرسد، خودناسازگاری به طور جزئی و در شرایطی که ریبونوکلائاز S به حد مشخصی برسد خودناسازگاری کامل (مانند رقم Bravo purple star در این پژوهش) رخ خواهد داد. مقدار S-RNase خامه بسته به زمینه ژنتیکی گیاه مورد مطالعه داشته، و هیچ ارتباطی با شرایط گرده و شرایط محیطی گیاه مورد مطالعه ندارد (۱۹). بنابراین، احتمال دارد که در رقم‌های مورد مطالعه غیر از رقم خودسازگار Bravo cool water mix، بروز خودناسازگاری و رشد نکردن کامل لوله گرده خودی به دلیل وجود مقادیر متنوعی از S-RNase باشد.

مطالعات دیگری نیز بیان کرده‌اند که در نهاندانگان ممکن است یک تا چهار جایگاه چند آلی (بیش از یک جایگاه) مرتبط با خودناسازگاری وجود داشته باشد که می‌تواند به مهار رویش گرده خودی منجر شود (۱۴)؛ حتی فرضیاتی وجود دارد که برهم کنش گرده با خامه ممکن است مرتبط با ژن S نباشد. خودناسازگاری گامتوفیتی وابسته به ژن S تنها یکی از موارد متعدد برهم کنش گرده با خامه خودناسازگار است (۱۶). بنابراین، نتیجه‌گیری دقیق این فرضیه‌ها، نیازمند انجام آزمایشهای تکمیلی و بررسی علت و معلول خودناسازگاری، در این ارقام است.

با استفاده از نتایج این تحقیق می‌توان بیان کرد که الگوی خودناسازگاری در رقم‌های گیاه اطلسی بسیار متفاوت بوده، تنها به توقف رشد لوله گرده در بخش ۳/۱ ابتدای خامه محدود نمی‌شود و ممکن است گرده ناسازگار در بخش‌های میانی یا انتهای

References:

- Brewbaker JL, Kwack BH. 1963, The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*, 50(9):859-865.
- Cruz-Garcia F, Hancock CN and McClure B. 2003, S-RNase complexes and pollen rejection. *Journal of Experimental Botany*. 54(380): 123-130.
- Dowd E P, McCubbin AG, Wang X, Verica JA, Tsukamoto T, Ando T and Kao TH. 2000, Use of *Petunia inflata* as a Model for the Study of Solanaceous Type Self-incompatibility. *Annals of Botany*. 85: 87-93.
- Elizabeth G, Williams R, Knox B and Rouse JL. 1982, Pollination subsystems distinguished by pollen tube arrest after incompatible interspecific crosses in *Rhododendron* (Ericaceae). *Journal of Plant Science*. 53: 255-277.
- Franklin-Tong N (VE) and Franklin FCH. 2003, Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms *Trends in Plant Science*. 8(12): 598-605.
- Geitmann A, Emons AMC and Franklin-Tong VE. 2001, Early cellular events in pollen tubes during the self-incompatibility reaction *Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth*. IOS Press: 203-219.
- Hauck Nathanael R, Yamane H, Tao R, and Iezzoni Amy F, 2006. Accumulation of Nonfunctional S-Haplotypes Results in the Breakdown of Gametophytic Self-Incompatibility in Tetraploid *Prunus*. *Genetics*. 172: 1191-1198
- Herrero M. and Dickinson H G. 1981, Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible interspecific matings. *Journal of Plant Science*. 47, 365-383.
- Huaa Z, Xiaoying Menga and Teh-hui Kao. 2007. Comparison of *Petunia inflata* S-Locus F-Box Protein (Pi SLF) with Pi SLF-Like Proteins Reveals Its Unique Function in S-RNase-Based Self-Incompatibility. *The Plant Cell*. 19:3593-3609
- Kao TH and McCubbin A. 1997, Molecular and biochemical base of gametophytic self-incompatibility in *Solanaceae*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 35(3): 171-176.
- Kao TH and Tsukamoto T. 2004, The Molecular and Genetic Bases of S-RNase-Based Self-Incompatibility. *The Plant Cell* 16:S72-S83.
- Martin SW. 1959, Staining and observing pollen tube in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-125.
- McClure B. 2006, New views of S-RNase-based self-incompatibility. *Current Opinion in Plant Biology*. 9:639-646.
- McClure B A and Franklin-Tong Veronica, 2006. Gametophytic self-incompatibility understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition, *Planta*. 224(2): 233-245
- McCormick S. 1998, Self-incompatibility and other pollen-pistil interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 1(1):18-25.
- Mulcahy D L, and Mulcahy G B, 1983. Gametophytic Self-Incompatibility Reexamined. *Science*. 220(4603): 1247 - 1251
- Newbigin E, Anderson MA and Clarke AE. 1993, Gametophytic Self-incompatibility Systems *The Plant Cell*. 5: 1315-1324.
- Robbins TP, Harbord RM, Sonneveld T and Clarke K. 2000, The Molecular Genetics of Self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Annals of Botany*. 85 (A): 105-112.

- Shivanna KR and Sharma N. 1985, Self-incompatibility recognition in *Petunia hybrida*. *Micron and Microscopica Acta*. 16(4): 233-245.
- Steinbachs JE and Holsinger KE. 2002, S-RNase-mediated Gametophytic Self-Incompatibility is Ancestral in Eudicots *Molecular Biology and Evolution*. 19 (6):825-829.
- Tangmitcharoen S and Owens J N. 1997, Pollen viability and pollen-tube growth following controlled pollination and their relation to low fruit production in Teak (*Tectona grandis*). *Annals of Botany*. 80:401-410.
- Wang Y, Wang Xi, Skirpan AL and TH Kao. 2003, S-RNase-mediated self-incompatibility. *Journal of Experimental Botany*. 54(380): 115-122.