شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

فصلنامه اختصاصی مرکز توسعه دهندگان بذر شمال ایران (INSEC)

سال دوم، شماره ۹، اسفند ماه ۱۴۰۱

صاحب امتیاز: شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

مدیر مسئول: علی زمان میرآبادی

سردبیر: میترا رمضانی

@takatoservice
info@takato.ir
www.takato.ir
www.ordc
takato.genebank
۰۱۱۳۳۴۳۴۹۶۸

فهرست مطالب

مقدمه ۳

کاربرد مصرف نیتروژن در کلزا (مروری) ۴

میکوپارازیتیسم: مکانیسم تریکودرما در سرکوب بیمارگرهای گیاهی (بخش نخست) ۸

نگرانیهای پیرامون حضور ژنهای نشانگر مقاوم به آنتی بیوتیک در گیاهان ترنسژنیک ۱۱

آلترناریا عامل بلایت دانه های روغنی خانواده براسیکا ۱۶

زیست شناسی و زراعت کاربناتا ۱۹

اصلاح معکوس، رویکرد جدید بر پایه مهندسی فرآیند میوز ۲۳

دابل هاپلوییدی و بررسی آن در فلفل دلمه ۲۹

تغذیه و توصیه کودی کلزا ۳۴

مقدمه

دانه های روغنی به دلیل ارزش تجاری و اقتصادی آنها در سرتاسر جهان اهمیت بسیاری دارند. تنش‌های حاصل از فلزات سنگین یکی از اصلی‌ترین چالش‌های غیرزیستی است که رشد و توسعه دانه‌های روغنی را محدود می کند .فلزات سنگین از طریق مکانیسم‌های متعدد باعث ایجاد سمیت در محصولات دانه‌های روغنی می‌شوند. هرچند گیاهان دانه‌های روغنی پتانسیل بهبود سمیت ناشی از فلزات سنگین را با تنظیم هموستاز خود در سطح بهینه نشان می دهند. در محصولات دانه‌های روغنی، فلزات سنگین تولید رادیکال‌های می‌کنند که با کوفاکتورهای فلزی آنزیم‌های گیاهی رقابت می‌کنند که این مسئله بر فعالیت آنزیم‌ها متصل کننده گروه‌های سولفیدریل و حاوی نیتروژن تأثیر می‌گذارند و باعث نشت سلولی از طریق برهمکنش با گروه‌های سر فسفولیپید می‌شوند. سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی با تنظیم میزان آنزیم های آنتی اکسیدانی مختلف و آنتی اکسیدان‌هاای غیر آنزیمی که در سم زدایی رادیکال‌های آزاد در گیاهان تحت استرس نقش دارند، تحمل گیاه را در برابر سمیت ناشی از فلزات افزایش می دهد. فیتوکلاتین ها همچنین با اتصال به یون های فلزی در واکوئل ها برای محافظت از مراکز متابولیک حساس به فلز در سیتوپلاسم، نقش مهمی در دفاع سلولی ایفا می کنند. تکنیک‌های مهندسی ژنتیک برای افزایش توانایی گیاهان در مقاومت در برابر تنش‌های محیطی استفاده می شوند. چندین روش تراریخته برای رشد محصولات دانه‌های روغنی جهت افزایش جذب فلز و رشد گیاه استفاده می شود. مقالات زیادی در خصوص پیشرفت‌های علمی و عملی در خصوص واکنش دانه‌های روغنی به تنش فلزات سنگین، مکانیسم‌های تحمل فلزات و تأثیر سمیت فلزات بر کیفیت روغن و همچنین تلاش‌های اصلاحی در مورد فلزات سنگین در محصولات دانه‌های روغنی وجود دارد که همگی اهمیت و لزوم مهندسی ژنتیک و فرایندهای اصلاحی در تولید ارقام و هیبرید های دانه‌های روغنی در برابر تنش‌های غیر زیستی را نشان می دهد.

علی زمان میرآبادی

مدیر تحقیقات و آموزش

زمستان ۱۴۰۱

کارایی مصرف نیتروژن در کلزا (مروری)

صلاح معتمدی
کارشناس به زراعی مرکز تحقیقات کاربردی
و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

Nitrogen use efficiency in rapeseed (A review)

مقدمه:

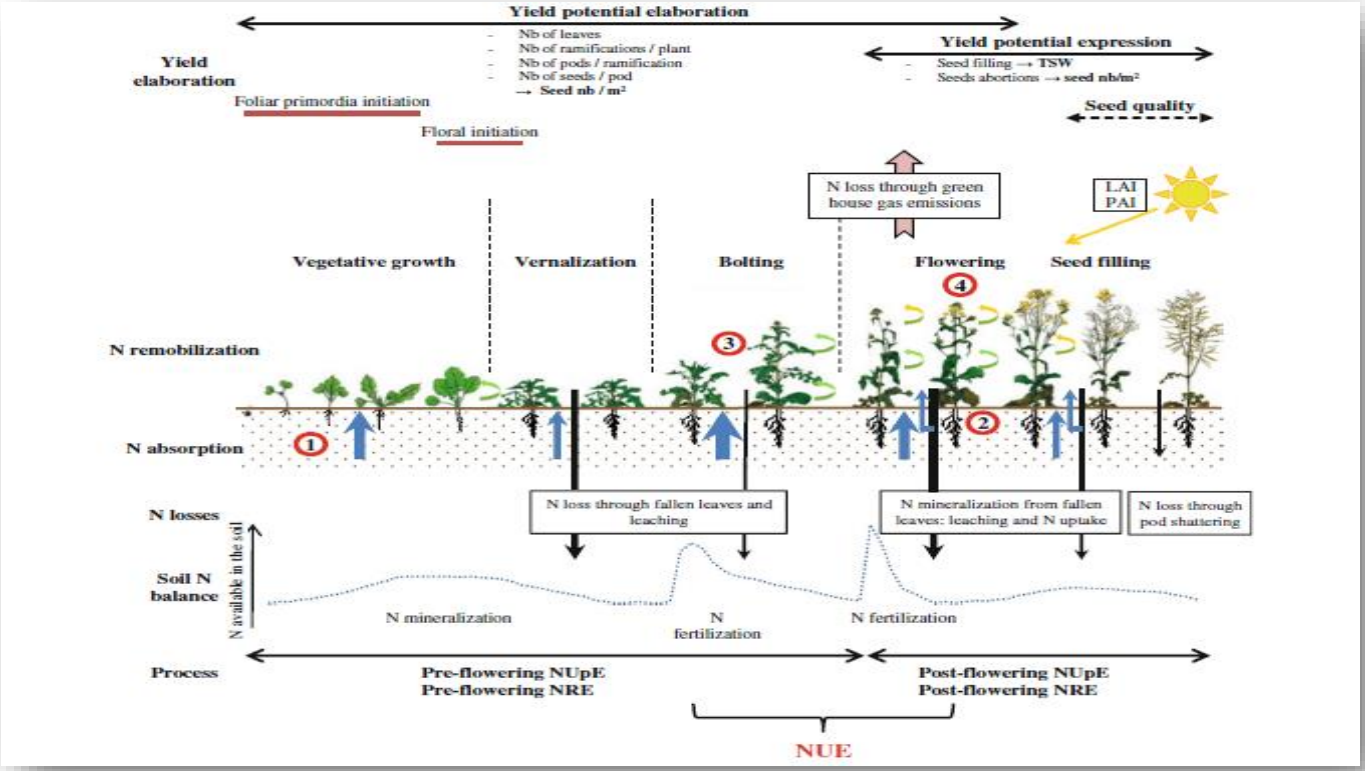
استفاده از نیتروژن معدنی در قرون گذشته تاثیر زیادی در عملکرد محصولات کشاورزی داشته است، اما استفاده بی رویه این عنصر در قالب کودهای کشاورزی باعث آلودگی آب و هوا نیز شده است. لذا مدیریت بهینه نهاده‌های حاوی نیتروژن با حفظ راندمان بالا برای ارتقا سطح کشاورزی پایدار ضروری است. تعیین میزان استفاده از نیتروژن (NUE[1]) در محصولات مختلف ضروری است. کلزا به دلیل NUE کم آن، به کود نیتروژن وابسته است. توضیح مراحل مختلف و تاثیر آنها در عملکرد دانه کلزا پیچیده است، از مراحل همپوشانی جذب نیتروژن و انتقال مجدد در طول چرخه محصول، صفات مربوط به جذب نیتروژن، مانند طول ریشه و مقدار نیتروژن جذب شده پس از گلدهی و صفات مربوط به انتقال مجدد نیتروژن به عنوان عوامل احتمالی دخیل در بهبود نحوه استفاده از نیتروژن در گیاه کلزا شناسایی شده اند. مجموعه قابل توجهی از مطالعات در مورد کنترل ژنتیکی صفات راندمان استفاده از نیتروژن قبلا منتشر شده و ژن‌های تاثیرگذار بالقوه مرتبط شناسایی شده‌اند. تنوع ژنتیکی کلزا ممکن است با بهره برداری از تنوع ژنتیکی بین جمعیتی و منابع ژنی نزدیک به *Brassica rapa* و *Brassica oleracea* غنی شود (Lassaletta et al. 2014).

در قرن گذشته، تولید و افزایش استفاده از کودهای معدنی ازته و استفاده از این کودها در کشاورزی مدرن در دستیابی به سطوح بالای عملکردی که در تولید کشاورزی امروزی امکان پذیر است، بسیار مهم بوده است. با این حال، تأثیر کودهای نیتروژن بر محیط زیست همیشه مثبت نبوده است (Tilman et al. 2002). اگرچه پیشرفت هایی برای بهینه‌سازی کوددهی آن حاصل شده است، با این حال نیمی بیشتر از نیتروژن مورد استفاده در سراسر جهان برای محصولات، در حال حاضر در محیط باقی می ماند (Lassaletta et al. 2014). مقادیر نیتروژن در هنگام برداشت از مزارع حذف نمی‌شود و از سیستم تولید کشاورزی از طریق رواناب، شستشوی نیترات یا به عنوان اکسید نیتروژن فرار یا آمونیاک از دسترس گیاه خارج شده و باعث آسیب زیست محیطی می‌شود (Billen et al. 2013).

رشد گیاه، جذب نیتروژن و ارتباط با عملکرد، داستان پیچیده ای را در کلزای زمستانه ایجاد می کند

[1] -Nitrogen use efficiency

عملکرد دانه کلزا در واحد سطح یک صفت پیچیده است که از ترکیب چندین جزء از جمله تراکم بوته، تعداد شاخه در بوته، تعداد غلاف در شاخه، تعداد دانه در غلاف و وزن تک دانه حاصل می شود (Diepenbrock, 2000). تعیین متوالی اجزای عملکرد به ما امکان می دهد که چرخه محصول کلزا را به دو مرحله همپوشانی تقسیم کنیم: ایجاد پتانسیل عملکرد از یک سو و بیان پتانسیل عملکرد از سوی دیگر (شکل ۱). در طول فاز رشد رویشی در پاییز و زمستان، افزایش شاخص سطح برگ عمدتاً به توانایی جذب نور و کارایی استفاده از تشعشع بستگی دارد. در دسترس بودن نیتروژن خاک نیز بسته به شرایط آب و هوایی بر شاخص سطح برگ تأثیر می‌گذارد. در آب و هوای معتدل، کانی‌سازی نیتروژن خاک ممکن است برای تامین نیاز نیتروژن گیاه در پاییز کافی باشد، اما در مناطق سردتر، ممکن است به کوددهی نیتروژن نیاز باشد. سیستم ریشه پس از ظهور گیاهچه به سرعت توسعه می یابد و نیتروژن معدنی به طور موثر از خاک جذب و در زیست توده رویشی گنجانده می شود. به عنوان مثال، کلزا راندمان جذب نیتروژن بالایی را در مراحل اولیه نشان می دهد و می تواند تا ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار جذب می‌کند. این باعث می‌شود در پاییز رشد قابل توجه ای داشته باشد (Rossato et al. 2001). زیست توده گیاهی به طور چشمگیری در این دوره اول افزایش می‌یابد. به طور همزمان، نیتروژن از برگهای مسن به برگ‌های جوان منتقل می‌شود. شروع مراحل اولیه برگی در اوایل پاییز می‌شود. در نتیجه، تعداد شاخه‌ها، برگ‌های فتوسنتزی، گل‌ها و تخمک‌ها تا حدی قبل از پایان زمستان ایجاد می‌شود (شکل ۱). این مسئله در تعداد دانه نهایی (محصول مورد انتظار) در هر متر مربع تاثیر گذار است (متغیری که همبستگی زیادی با عملکرد دانه دارد). بنابراین تنش نیتروژن در طول پاییز ممکن است بر عملکرد نهایی تأثیر منفی بگذارد. در طول زمستان، بخشی از سطح برگ تولید شده در این دوره، با پخزدگی از بین می رود که منجر به تلفات مهم نیتروژن به میزان ۲ تا ۳/۵ درصد از وزن خشک برگ‌های افتاده (از بین رفته) می‌شود (Malagoli et al. 2005).



شکل ۱– پویایی (جنب و جوش) نیتروژن در چرخه محصول کلزا، روابط به هم پیوسته بین رشد گیاه، پویایی نیتروژن، و بسط عملکرد در چرخه محصول را نشان می دهد. جذب نیتروژن با فلش‌های آبی نشان داده می‌شود که عرض آنها (خطوط آبی)، مقدار نسبی نیتروژن جذب شده در یک نقطه زمانی معین را نشان می‌دهد. تلفات نیتروژن با فلش‌های سیاه نشان داده می‌شوند که عرض آنها (خطوط سیاه)، مقدار نسبی از دست رفته نیتروژن را در یک نقطه زمانی معین نشان می‌دهد. مراحل حیاتی برای استقرار نهایی کارایی مصرف نیتروژن (NUE) به شرح زیر است: راندمان جذب نیتروژن قبل از گلدهی (NUpE) و راندمان انتقال مجدد نیتروژن (NRE)- (شماره۱). راندمان جذب نیتروژن پس از گل دهی (NUpE) (شماره ۲). NRE متوالی و مونوکارپیک در طول دوره گلدهی و پر شدن بذر (شماره ۳). و تعاملات بین کارایی مصرف نیتروژن (NUE)، شاخص سطح برگ (LAI) و شاخص سطح غلاف (PAI) (شماره ۴). و وزن هزار دانه (TSW).

شاخص سطح برگ جدید در طول بهار از ابتدای رشد ساقه تا گلدهی ایجاد می شود. بنابراین، در دسترس بودن ازت خاک در طول توسعه در بهار تأثیر زیادی بر گسترش شاخص سطح برگ و مدت زمان آن دارد. در طی این دوره، نیتروژن به طور فعال از برگ‌های پیر شده به برگ‌ها و ساقه‌های جوان‌تر (پلی کارپ) و سپس به غلاف‌ها و دانه‌ها (منوکارپ) منتقل می‌شود (شکل ۱). از مرحله گل‌دهی به بعد، برگ‌ها دیگر تولید نمی‌شوند و شروع پیری به سرعت اتفاق می‌افتد و برگ‌ها بسته به موقعیت خود روی ساقه اصلی، توانایی حرکت مجدد متفاوتی از خود نشان می‌دهند (Malagoli et al. 2005). به موازات آن، فعالیت فتوسنتزی تا حدی توسط شاخص منطقه غلاف انجام می‌شود. علاوه بر این، منبع نیتروژن نیز از طریق بازجذب نیتروژن از برگ‌هایی که در طول پاییز افتاده‌اند، با راندمان جذبی که می‌تواند به ۴۰ درصد از محتوای نیتروژن برگ‌های ریخته شده برسد، حفظ می‌شود (Dejoux et al. 2000). با این وجود، نسبت محتوای نیتروژن گیاه به نیتروژن عرضه شده معمولاً از ۵۰ تا ۶۰ درصد در کلزا تجاوز نمی کند (Malagoli et al. 2005). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، تولیدکنندگان باید

تعدادی از فرآیندهای حیاتی را به منظور شناسایی و انتخاب پویایی نیتروژن بهینه و توسعه گیاه در طول چرخه محصول بررسی کنند. این موارد شامل (۱) راندمان جذب نیتروژن قبل از گلدهی و راندمان انتقال مجدد نیتروژن، برای اطمینان از ایجاد پتانسیل عملکرد، (۲) راندمان جذب نیتروژن پس از گلدهی، برای حفظ ذخیره نیتروژن در گیاه در مرحله پر شدن دانه، (۳) راندمان انتقال مجدد نیتروژن مرتبط با فرآیندهای پیری پلی کارپیک و مونوکارپیک از گلدهی به بعد، برای توسعه پتانسیل عملکرد محصول، و (۴) برهمکنش بین تعادل نیتروژن و تعادل کربن، شامل متغیرهای فتوسنتزی مانند شاخص سطح برگ، شاخص سطح غلاف، و راندمان استفاده از تشعشع.

منابع

1. Billen, G., Garnier, J., Lassaletta, L. 2013. The nitrogen cascade from to the sea: modelling nitrogen transfers at regional watershed and global scales. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 368(1621):20130123. doi:10.1098/rstb.2013.0123
2. Dejoux, J-F., Recous, S., Meynard J-M., Trinsoutrot و I., Leterme P. 2000. The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves:mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. Plant Soil 218:257–272. doi:10.1023/A:1014934924819
3. Diepenbrock, W. 2000. Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. Field Crop Res 67:35–49. doi:10.1016/S0378- 4290(00)00082-4
4. Good, AG., Shrawat, AK., Muench, DG. 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? Trends Plant Sci 9(12):597–605. doi:10. 1016/j.tplants.2004.10.008
5. Lassaletta, L., Billen, G., Grizzetti, B., Anglade, J., Garnier, J. 2014. 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. Eagricultural soils
6. nviron Res Lett 9(10):105011. doi:10.1088/1748-9326/9/10/105011
7. Malagoli, P., Laine, P., Rossato, L., Ourry, A. 2005. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. Ann Bot 95(5):853–861. doi:10.1093/aob/ mci091
8. Stahl, A., Friedt, W., Wittkop, B., Snowdon, RJ. 2015. Complementary diversity for nitrogen uptake and utilisation efficiency reveals broad potential for increased sustainability of oilseed rape production. Plant Soil 400(1–2):245–262. doi:10.1007/s11104-015-2726-8
9. Tilman, D., Cassman, KG., Matson, PA., Naylor, R., Polasky, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature 418(6898):671–677.

میکوپارازیتیسم: مکانیسم تریکودرما در سرکوب بیمارگرهای گیاهی (بخش نخست)

آیدین حسن زاده
کارشناس گیاهپزشکی مرکز تحقیقات کاربردی
و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

Mycoparasitism as a mechanism of Trichoderma mediated suppression of plant diseases

مقدمه

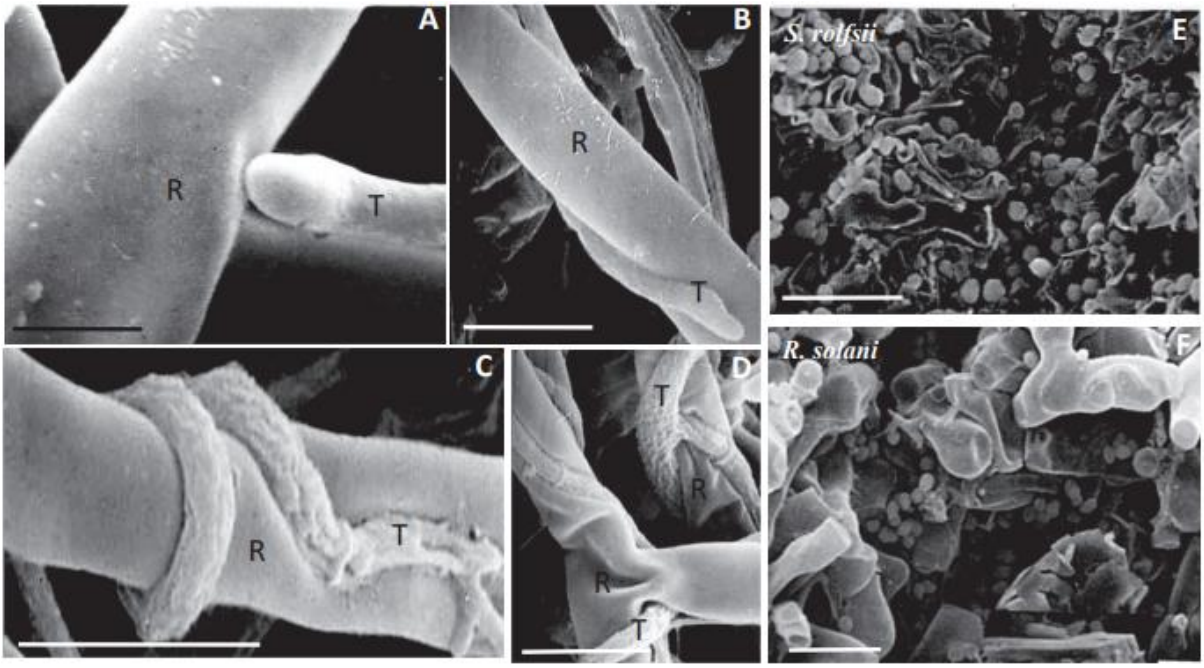
نخستین تحقیقات در خصوص امکان بکارگیری تریکودرما در مهار زیستی، با مشاهده توانایی گونه‌های این جنس در پارازیته کردن دیگر قارچ‌های بیمارگر گیاهی آغاز شد (Weindling, 1932). با این حال، ۴۰ سال بطول انجامید تا مشخص شد تریکودرما می‌تواند در مزرعه برای سرکوب یک قارچ بیمارگر گیاهی مورد استفاده قرار گیرد (Wells *et al.*, 1972). از آن زمان، میکوپارازیتیسم بعنوان یک مکانیسم مهم کنترل بیولوژیکی در تحقیقات مختلف مورد توجه قرار گرفته است (Lifshitz *et al.*, 1986; Inbar *et al.*, 1996; Howell, 2002; Steyaert *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004b; Xu *et al.*, 2010; John *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011). جزئیات چگونگی پارازیته شدن قارچها توسط تریکودرما در مقالات متعددی منتشر شده است. کیتینازها، بتا گلوکانازها و پروتئازها بعنوان آنزیم‌های کلیدی در میکوپارازیتیسم شناخته شده‌اند (Vazquez-Garciduenas *et al.*, 1998; Cortes *et al.*, 1998; Carsolio *et al.*, 1999). سپس این تحقیقات با تجزیه و تحلیل ژن‌های اختصاصی، بویژه ژن‌هایی که در انتقال سیگنال نقش دارند و مطالعات ژنومی، ادامه یافت (Druzhinina *et al.*, 2011). در سال ۱۹۹۷، برای نخستین‌بار مشاهده شد کلونیزاسیون ریشه توسط تریکودرما می‌تواند سبب کاهش علائم یک بیمارگر برگی شود. این پدیده، مقاومت سیستمیک القایی (ISR)، نامیده می‌شود (Pieterse *et al.*, 2014; Bigirimana *et al.*, 1997). همچنین، این پدیده، پاسخ دفاعی القایی (IDR) نامیده شده است تا هر دو شکل مقاومت القایی موضعی و سیستمیک (ISR) و مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) را شامل شود (Mukherjee *et al.*, 2022). پاسخ دفاعی القایی بعنوان یک مکانیسم کنترل بیماری گیاهی، به مدت دو دهه بر تحقیقات تریکودرما غالب شد (Harman *et al.*, 2004; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2018). میکوپارازیتیسم، آنتی‌بیوز و پاسخ دفاعی القایی، سه حالت متداول در سرکوب بیمارگرهای گیاهی هستند که در این میان، میکوپارازیتیسم موثرترین روش در کاهش مایه تلقیح بیمارگر است، بویژه در خصوص بیمارگرهای خاکزاد که گونه‌های تریکودرما بطور گسترده در برابر آنها مورد استفاده قرار می‌گیرند. قدرت سرکوب بیماری در شیوه میکوپارازیتیسم از آنتی‌بیوز و پاسخ دفاعی القایی بیشتر است، اگر چه فعالیت‌های هم‌افزایی[1] در این فرآیندها ممکن است رخ دهد(Zeilinger *et al.*, 2016b).

میکوپارازیتیسم در برابر میکوتروفی

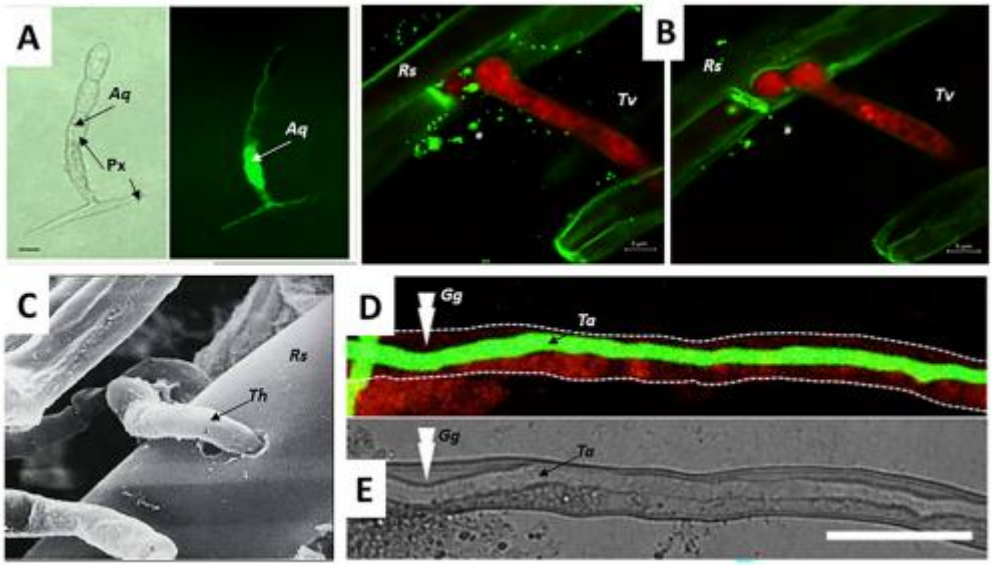
زمانیکه میکوپارازیت، خود را بر روی ریسه در حال رشد و یا اندام مقاوم (مانند سختینه) یک قارچ دیگر، تثبیت می‌کند (شکل ۱) قارچ پارازیته شده، اغلب بعنوان میزبان و یا طعمه شناخته می‌شود. میکوتروفی به مکانی که مواد غذایی از آن محل می‌آیند، اطلاق می‌شود و با تعامل متفاوت است. میکوتروف‌ها مواد غذایی را از سایر قارچها (زنده و یا مرده)، بدست می‌آورند؛ بنابراین، قارچ میکوتروف لزوما میکوپارازیت نیست. میکوپارازیتیسم تخصصی ممکن است از بستر یک قارچ ساپروفیت ناشی شود (Druzhinina *et al.*, 2011). بیمارگرهای گیاهی ممکن است بافت میزبان را از بین ببرند (نکروتروف) و یا با سلول‌های میزبان تعامل نزدیک برقرار کنند که در این صورت سلول‌های میزبان ضمن تامین مواد غذایی برای قارچ بیمارگر، زنده می‌مانند

[1] Synergistic activities

(بیوتروف). به همین ترتیب، میکوپارازیت می‌تواند بعنوان یک قارچ بیوتروف زنده بماند و مواد مغذی را از یک میزبان زنده بدست آورد و یا یک نکروتروف باشد که سلول‌های میزبان را از بین می‌برد و مواد مغذی را از زیست‌توده مرده بدست می‌آورد (Barnett and Binder, 1973).



شکل ۱. میکوپارازیتیسم گونه *Trichoderma virens* بر روی *Rhizoctonia solani* و *Sclerotium rolfsii*. (A-D): برهم‌کنش ریسه‌های *T. virens* (T) و *R. solani* (R) که شامل ساختارهای مارپیچ و فروپاشی میسلیوم میزبان. (E و F): رشد و هاگ‌زایی *T. virens* درون سختینه‌های *S. rolfsii* و *R. solani*. مقیاس‌ها (A): ۵ میلی‌متر، (B-F): ۱۰ میلی‌متر. منبع: A-D (Mukherjee *et al.*, 2012a)؛ E و F (Mukherjee *et al.*, 1995). برخلاف بیوتروف‌ها، نکروتروف‌ها اغلب دامنه میزبانی وسیعی دارند. گونه *Ampelomyces quisqualis* از راسته Pleosporales نمونه‌ای از میکوپارازیت بیوتروف است که بعنوان یک عامل بیولوژیک در برابر قارچ‌های عامل سفیدک پودری شناخته می شود (Haridas *et al.*, 2020). این گونه میکوپارازیت از چرخه زندگی و مکانیسم پراکنش میزبان خود (*Podosphaera xanthii*; Erysiphales)، برای گسترش پیکنیدیوسپورهای خود استفاده می‌کند (شکل ۲A). مطالعه برهم‌کنش سه جانبه مخمر بازیدیومیست *Anthracocystis flocculosa* (Ustilaginales)، قارچ عامل سفیدک پودری جو *Blumeria graminis* (Erysiphales) و گیاه جو (*Hordeum vulgare*)، جنبه جدیدی از میکوپارازیتیسم را نشان داد. این مخمر قارچ *Blumeria* را در میزبان (گیاه جو)، پارازیته می‌کند و در نهایت آن را از بین می‌برد (Laur *et al.*, 2018). هدف کلی این تعامل، تخریب بیمارگر گیاهی است. اگرچه برخی از گونه‌های تریکودرما بعنوان نکروتروف شناخته می‌شوند، توسعه انگلی درون‌سلولی نیز در آنها مشاهده شده است (Rousseau *et al.*, 1996؛ شکل ۲). این نوع رابطه تعاملی را می‌توان از طریق مقایسه با بیمارگرهای گیاهی،بعنوان یک مرحله همی‌بیوتروفی در نظر گرفت. بدیهی است در تعامل بین قارچ میزبان و تریکودرما، به دلیل سالم ماندن دیواره سلولی میزبان، تشخیص بیوتروفی بودن و یا نکروتروفی بودن رفتار تریکودرما مشکل است اما چنین تعاملی در نهایت با رشد تریکودرما بصورت درون‌سلولی، به تخریب قارچ میزبان منجر خواهد شد (شکل ۲B, D, E).



شکل ۲. برهم‌کنش‌های قارچ میکوپارازیت و میزبان قارچی. (A): بیان ژن GFP در سویه *Ampelomyces quisqualis* RS1 (Aq) بصورت درون سلولی برای یک کنیدیوفور در حال توسعه گونه *Podosphaera xanthii* (Px)؛ مقیاس ۲۰ میلی‌متر؛ منبع: (Nemeth *et al.*, 2019). (B): نفوذ ریسه *Trichoderma virens* (Tv) به داخل ریسه گونه *Rhizoctonia solani* (Rs)؛ منبع: (A. MendozaeMendoza, unpublished) و (C): *Trichoderma afroharzianum*. (D,E): *Trichoderma atroviride* (Ta)، رشد به داخل ریسه قارچ میکوریز آربوسکولار (AMF)، گونه *Gigaspora gigantea* (Gg) (فلش‌های سفید؛ مقیاس ۱۵ میلی‌متر)، منبع: (Lace *et al.*, 2015).

با توجه به اینکه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، همزیست بسیاری از گیاهان از جمله گیاهان زراعی هستند (Sawers *et al.*, 2008) و با توجه به رفتار میکوپارازیتی گونه‌های تریکودرما، مطالعه تاثیر کاربرد همزمان تریکودرما و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار علیه بیمارگرهای گیاهی، ضروری خواهد بود (شکل۲D, E). قارچ‌های میکوریز آربوسکولار می‌توانند مقاومت به بیماری را در گیاه میزبان (برای مثال در برنج)، افزایش دهند (Campo *et al.*, 2020)، با این وجود، میکوریزها نمی‌توانند جایگزین گونه‌های تریکودرما در میکوپارازیتیسم در برابر بیمارگرهای خاکزاد شوند.

پایان بخش نخست

منابع

1- Mukherjee, P.K., Mendoza-Mendoza, A., Zeilinger, S. and Horwitz, B.A., 2022. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*, *39*, pp.15-33.
2- Weindling, R., 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, *22*(8), pp.837-845.
3- Wells, H.D., Bell, D.K. and Jaworski, C.A., 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*.

نگرانی‌های پیرامون حضور ژن‌های نشانگر مقاوم به آنتی‌بیوتیک در گیاهان ترنسژنیک

سارا کبیر نتاج
کارشناس بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

Concerns about the presence of antibiotic resistance marker genes in transgenic plants

مقدمه

اولین نسل از گیاهان تغییر یافته ژنتیکی که در کشاورزی معرفی شدند از طریق به‌کارگیری ژن‌های نشانگر مقاوم به آنتی بیوتیک تولید شده‌اند. این ژن‌ها جهت تهیه وکتورهای انتقال ژن و/یا انتخاب گیاهان تغییر یافته ژنتیکی به‌کار می‌روند. در سال ۲۰۲۲، بیش از ۱۳۰ لاین از محصولات ترنسژنیک تجاری در دسترس، حاوی یک یا چند ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک از جمله *nptII* و *bla* بوده‌اند (ISAAA, 2022). ژن *nptII* از طریق سنتز پروئین‌های مهار کننده منجر به مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌شود. از آنجاییکه در برخی از پروژه‌های انتقال ژن، این ژن‌ها در گیاه تجاری نهایی باقی می‌مانند، نظراتی مبنی بر نگرانی در مورد خطر احتمالی حضور آنها در محصولات تغییر یافته ژنتیکی وجود دارد. این نگرانی‌ها منجر به انجام بررسی‌های متعدد جهت مطالعه آثار زیان‌بار احتمالی مصرف این محصولات شده‌است. اگرچه امروزه روش‌های نوینی در تولید گیاهان تغییر یافته ژنتیکی عاری از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک ارائه شده است ولیکن ارائه نتایج این تحقیقات منجر به برطرف شدن شبهات موجود خواهد شد. در سال ۲۰۰۹ سازمان ایمنی مواد غذایی اروپا (EFSA[1]) از انجمن‌های GMO[2] و BIOHAZ[3] درخواست کرد نظرات مشورتی خود را در مورد اثرات ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک در محصولات تغییر یافته ژنتیکی ارائه دهند (EFSA, 2009). مطالبی که در ادامه آمده است نتایج تحقیق و برخی گزارشات علمی موجود در پاسخ به برخی سوالات رایج در حوزه گیاهان تراریخت می‌باشد. به طور کلی چهار سوال اصلی پیرامون اثرات زیانبار ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک موجود در گیاهان ترنسژنیک بر سلامت انسان مطرح شده‌است:

۱- آیا ژن های مقاومت به خودی خود برای سلامتی انسان مضر هستند؟

ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیچ تفاوتی با سایر ژن‌های موجود در گیاهان یا حیوانات ندارند و مانند DNA موجود در هر منبعی در مسیر روده هضم می‌شوند. همچنین مقدار ترنسژن بلع شده در مقایسه با DNA دریافت شده از سایر منابع گیاهی و حیوانی بسیار کم است. برای مثال گاوهای شیرده که با ذرت ترنسژنیک مقاوم به آفات، تغذیه می‌شوند مقدار ۵۷ میکروگرم DNA ترنسژن دریافت می‌کنند که در برابر میزان DNA دریافتی از سایر منابع که برابر با ۵۴ گرم در روز است بسیار ناچیز و برابر با $۱۰ * ۱^{-۶}$ می‌باشد (Aumaitre e al, 2002). در ذرت ترنسژنیک، ترنسژن ۰/۰۰۰۱ ٪ از کل DNA را شامل می‌شود. در سال ۲۰۰۲ FDA[4] با در نظر گرفتن تمامی ترنسژن‌ها یا محصولات ترنسژنیک، آن‌ها را به طور کلی برای مصارف غذایی یا دارویی امن اعلام کرده‌است و برخی محققین نیز اثرات مخرب آن‌را حداقل و بسیار کم اعلام کرده‌اند (Jonas et al, 2001). بنابراین به نظر می‌رسد مصرف محصولات ترنسژنیک به خودی خود برای سلامتی انسان یا حیونات خطری نداشته باشد (Goldstein et al, 2005).

۲- آیا پروتئین‌های تولید شده بواسطه این ژن‌ها برای سلامتی انسان مضر هستند؟

ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها زمانی که در سلول‌های گیاهی بیان می‌شوند پروتیئن‌هایی را تولید می‌کنند که به همراه چند ده هزار پروتئین موجود در گیاهان که بخش بزرگی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند، تجزیه می‌شوند. پروتئین‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیکی که در پروژه‌های مهندسی ژنتیک گیاهان به کار می‌رود تفاوت بنیادی با سایر پروتئین‌های رژیم غذایی انسان

[1] European Food Safety Authority
[2] Genetically Modified Organisms
[3] Biological Hazards
[4] Food and Drug Administration

ندارند و سمیتی برای انسان و حیوانات آزمایشگاهی نداشته و از نظر FDA برای استفاده در غذا و دارو و خوراک دام بدون مشکل هستند. این پروتئین‌ها توسط پپسین به سرعت قابل هضم بوده و همچنین حساس به حرارت هستند. پروتئین‌های حاصل از ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از لحاظ بیوانفورماتیکی جهت وجود تشابه توالی با آلرژن‌ها نیز بررسی شده‌اند و بر اساس نتایج موجود، احتمال ایجاد حساسیت توسط ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک بسیار بعید است. برای مثال ژن *npt*IIبرای استفاده در غذای انسان و دام و همینطور محصولات زیست فناور دارویی غیر سمی اعلام شده و تاثیرات حساسیت زا ندارد (Fuches et al, 1993). از سوی دیگر باید درنظر داشت که ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک که توسط سیستم‌های باکتریایی بیان می‌شود در سلول‌های گیاهی غیر فعال می‌شوند. همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک توسط باکتری‌های فلور روده نیز تولید می‌شوند بطوریکه در اثر استفاده انسان از آنتی‌بیوتیک، باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در روده زنده می‌مانند و تکثیر می‌شوند. بنابراین بشر در طی تاریخ با این ژن‌ها روبرو شده است ولیکن تابه حال اثر مخربی از چنین ژن‌هایی گزارش نشده است. به طور کلی از نتایج فوق می توان نتیجه گرفت که پروتئین‌های تولید شده از ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هیچ خطر گزارش شده ایی در برابر سایر پروتئین‌های مصرفی رژیم غذایی انسان ندارند (Goldstein et al, 2005).

۳- آیا ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک می‌توانند به باکتری‌ها منتقل شوند و تاثیر نامطلوب در روند درمان‌های ضد میکروبی بگذارند؟

باکتری‌های مستعد هنگامی که در تماس با ژن‌های خارج سلولی قرار می‌گیرند، می‌توانند از طریق فرآیندی به نام انتقال افقی ژن (HGT[1]) در معرض تبادل مواد ژنتیکی قرار گیرند. HGT روشی است که در آن باکتری‌ها قادر به جذب مواد ژنتیکی از محیط اطراف به عنوان مثال، خاک، یا موجودات غیر مرتبط به درون خود هستند. ترنسفورماسیون فرایند خاصی از HGT است که در آن یک سلول باکتری می‌تواند DNA یا RNA خارج سلولی را از محیط بگیرد که امکان تغییر بالقوه در ژنوتیپ را فراهم می‌کند، این امر ممکن است تکامل را تسریع کند (Bertolla & Simonet, 1999). بنابراین، مواد ترنسژن محصولات تغییر یافته ژنتیکی که در خاک آزاد شده‌اند، ممکن است از طریق ترنسفورماسیون جذب باکتری‌های خاک شوند.

انتقال ژن به صورت طبیعی شامل چهار مرحله است: DNA خارج سلولی به سطح سلول متصل می‌شود، سلول DNA را از طریق دیواره سلولی یا غشای سلولی جذب می‌کند، DNAدر ژنوم باکتری وارد و در نهایت، DNA خارجی بیان می‌شود. برای اینکه ترنسفورماسیون‌های ژنتیکی رخ دهد، باید شرایط مساعدی فراهم باشد. این شرایط شامل وجود DNAهای زیستی قابل دسترس برای جذب در خاک و حضور سلول‌های مستعد باکتری برای انجام ترنسفورماسیون می‌باشد. میکروب‌ها در شرایط تنش محیطی مانند کمبود مواد مغذی، که آن‌ها را وادار به جذب املاح خارج سلولی از محیط اطراف خود می‌کند، برای جذب DNA خارجی مناسب هستند. علاوه بر این، مستعد بودن جهت ترنسفورماسیون به تشابه بالا بین توالیDNA خارجی و ژنوم میکروبی بستگی دارد (EFSA 2009)، بطوریکه مطالعات نشان می‌دهد کاهش تشابه بین دو توالی ترنسژن و ژنوم میزبان (از ۲۰۰ الی ۵۰۰ جفت باز به ۵۰ جفت باز) می‌تواند منجر به کاهش انتقال به میزان ۱۰٪ شود (Bertola and Simonet 1999). علاوه بر جذب ترنسژن توسط میکروب‌ها از طریقHGT ، ترنسژنی که پس از لیز سلولی آزاد می‌شوند ممکن است به عنوان یک منبع مغذی (به عنوان مثال، کربن، نیتروژن و فسفر) برای میکروب‌های مجاور عمل کنند. مطالعات نشان داده‌اند که وقتی DNA جذب می‌شود، علاوه بر اینکه به‌عنوان منبع مغذی عمل می‌کند، می‌تواند برای ترنسفورماسیون طبیعی و ترمیم DNA ژنومی به کار روند. انتقال توسط موبینگی مکانیسم دیگری است که به ماندگاری DNA یا RNA در خاک کمک می کند. اسیدهای نوکلئیک که تجزیه یا جذب نمی شوند به فضاهای منافذ پر از آب رفته و تا زمانی که به سلول های مستعد برسند از نظر بیولوژیکی فعال باقی می مانند

[1] Horizontal Gene Transfer

.چندین مطالعه نشان داده‌اند که با آزاد شدن DNA از محصولات، در دسترس بودن آن در خاک طی ۱۰ تا ۲۰ روز ابتدا به طور تصاعدی کاهش می یابد و سپس ثابت می شود. کاهش سریع در دسترس بودن DNA در خاک به دلیل جذب DNA به محل‌های اتصال خاک است که می‌تواند DNA را از تخریب سریع محافظت کند. این امر نشان دهنده شانس کمتر برای انتقال ژنتیکی DNA آزاد شده قدیمی است که در خاک وجود دارد ولی تجزیه نشده است. تا کنون مطالعات آزمایشگاهی متعددی در مورد انتقال مواد ژنتیکی تراریخته به جوامع باکتریایی انجام شده است. استفنسن و همکارانش در سال ۲۰۱۵ حضور *npt*II در باکتری‌ها را در طول زمان، در ماتریس‌های خاکی متعدد (به عنوان مثال، خاک متراکم که سالانه با فضولات حیوانی غنی می‌شود، خاک غنی نشده با محتوای رس بالا و خاک غنی نشده با محتوای ماسه بالا) ردیابی کردند. نتایج نشان داد که چندین جدایه باکتری در خاک نسبت به کانامایسین بسیار مقاوم بودند، هیچ جدایه‌ای حاوی ژن *npt*II تراریخته نبود (Steffensen 2015). این نتایج همچنین با یافته های مطالعه Smalla و همکارانش مطابقت داشت (1993)، که نتوانستند از میان جدایه‌های جمع آوری شده از مزارع ترنسژنیک، سویه مقاوم به کانامایسین حاوی ژن *npt*II را شناسایی کنند. داده ها نشان داد که ژن‌های دیگری هستند که بخش عمده‌ای از مقاومت به کانامایسین را در جدایه‌های محیطی ایجاد می‌کنند و یا اینکه رویدادهای انتقال ژن بین محصول ترنسژنیک و باکتری‌ها با احتمال پایین رخ می‌دهند. از آنجاییکه تنها کمتر از ۱۰٪ از باکتری‌های موجود در خاک را می‌توان در یک محیط آزمایشگاهی رشد داد، توانایی تعیین شیوع واقعی انتقال ژن بین محصولات تراریخته و میکروب‌های خاک با محدودیت مواجه می شود (Goldstein et al, 2005).

از سوی دیگر، انتقال DNA از گیاهان ترنسژنیک به باکتری‌ها، در صورت وقوع، در مقایسه با انتقال ژن بین باکتری ها، با نرخ پایینی رخ می دهد. تجزیه و تحلیل‌های متاژنومی اخیر در کل جمعیت‌های باکتریایی (از جمله باکتری‌های غیرقابل کشت) نشان داده‌اند که عوامل ایجاد کننده مقاومت کانامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین در همه محیط‌های مورد بررسی وجود دارد. چنین ژن‌های مقاومتی ممکن است از این مخزن محیطی انتخاب شده و در بین باکتری‌ها منتشر شوند. بسیاری از ژن‌های نشانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در گیاهان ترنسژنیک مانند *npt*II منشأ باکتریایی دارند. این ژن‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک به میزان مختلف در گونه‌های مختلف، جدایه‌ها و محیط‌های مختلف، در باکتری‌های طبیعی وجود دارند. باید توجه داشت که وجود آنتی بیوتیک‌ها و استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در محیط‌های مختلف از عوامل کلیدی در انتخاب و انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. کانامایسین و نئومایسین هر دو توسط WHO به عنوان یک "ضد میکروب بسیار مهم" برای سلامت انسان طبقه بندی می‌شوند. همچنین کانامایسین به عنوان یک داروی مهم برای درمان عفونت‌های سل مقاوم به دارو توصیه می‌شود. افزایش روزافزون سویه‌های مقاوم به دارو با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مهم مانند کانامایسین در سراسر جهان، دلیلی برای نگرانی جهانی است و میبایست اقدامات موثری در کنترل هرچه بهتر میزان استفاده از آتتی بیوتیک‌ها و جلوگیری از آزادسازی این ترکیبات در طبیعت مانند کنترل رهاسازی پسآب کارخانه‌ها صورت گیرد. از مطالب فوق چنین نتیجه گیری می‌شود که عوامل مهم‌تر و بیشتری در ایجاد مقاومت دارویی وجود دارد که میبایست کنترل شونددر واقع ژنi های مقاوم به آنتی بیوتیکموجود در گیاهان ترنسژنیک در ایجاد چنین مقاومتی دخیل نیست و یا سهم بسیار ناچیزی دارد (EFSA 2009).

۴- آیا ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک می توانند در نتیجه ورود به سلول های انسانی آسیب وارد کنند؟

طبق گزارشات، برخی قطعات ژن‌های گیاهی در سلول‌های پوششی دستگاه گوارش و سلول‌های سیستم ایمنی حیوانات (گلبول های سفید) مشاهده شده‌اند، ولیکن تاکنون گزارشی در مورد ادغام این قطعات در DNA حیوانات و یا بیان آنها در سلول‌های حیوانی یا انسانی ارائه نشده‌است. چرا که تمامی مواد غذایی دریافتی و همینطور باکتری‌های روده حاوی DNA بوده و سلول‌های انسانی همواره با آنها در تماس هستند با این وجود هیچ مدرکی مبنی بر ورود همیشگی و منظم ژن‌های دست نخورده گیاهی

یا باکتریایی به درون سلول‌های انسانی وجود ندارد. باید توجه داشت که ژن‌های مقاومت هیچ کاربردی در بدن انسان ندارند بنابراین توجیهی برای ورود این ژن‌ها به ژنوم وجود ندارد، اگرچه در طی تکامل بشر هیچگونه ژنی حتی ژن‌هایی که قابلیت تولید مواد ضروری برای انسان دارند نیز از منابع گیاهی توسط سلول‌های انسانی دریافت نشده اند. Schubbert در بررسی آزمایشگاهی خود در سال های ۱۹۹۴ و ۱۹۹۷ نشان داد که زمانی که مقادیر بالایی از DNA باکتری یا باکتریوفاژ به موش‌های آزمایشگاهی خورانده می‌شود، بسیاری از سلول‌های این حیوان حاوی قطعاتی از DNA دریافتی می‌شوند. این سلول‌ها در واقع با انجام عمل فاگوسیتوز این قطعات را دریافت می‌کنند. در طی عمل فاگوسیتوز، سلول بسیاری از مواد اطراف خود از جمله DNA را می‌بلعد ولیکن این قطعات وارد ژنوم سلول نمی شوند. از سوی دیگر الگوهای متیلاسیون در DNA گیاهی و حیوانی متفاوت است. قطعات DNA باکتریایی که به سلول گیاهی وارد می شود نیاز به الگوهای اصلاحی دارند که این امر در نهایت منجر به تحریک فاگوسیتوز می شود (Schubbert et al,1664; 1997). به طور خلاصه اگرمقادیر بالایی از DNAگیاهان ترنسژنیک وارد بدن انسان شود احتمال دارد وارد سلول‌ها شود ولی تا کنون شواهدی مبنی بر ورود این ژن‌ها به ژنوم انسان و تکثیر آن مشاهده نشده‌است. بنابراین ورود ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از منابع گیاهی به سلول‌های انسانی و آسیب آنها به سیستم ایمنی بسیار بعید است.

منابع

1. Aumaitre, A., Aulrich, K., Chesson, A., Flachowsky, G., Piva, G. 2002. New feeds from genetically modified plants: substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility, and safety for animals and the food chain. Livest Prod Sci 74, 223– 238. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301622602000167?via%3Dihub
2. Bertolla, F., Simonet, P. 1999. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. Res Microbiol 150, 375– 384. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10466405/.
3. EFSA. 2009. Consolidated presentation of the joint scientific opinion of the GMO and BIOHAZ panels on the “Use of antibiotic resistance genes asmarker genes in genetically modified plants” and the scientific opinion of the GMO panel on “consequences of the opinion on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants on previous EFSA assessments of individual GM plants”, EFSA J. 1108. 1–8.
4. Fuchs, R.L., Ream, J.E., Hammond, B.G., Naylor, M.W., Leimgruber, R.M., Berberich, S.A. 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (npt-II) protein. Bio/Technology 11, 1543– 1547. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7764244/
5. Goldstein, D.A., Tinland, B., Gilbertson, L.A., Staub, J.M., Bannon, G.A., Goodman, R.E., McCoy, R.L., Silvanovich, A. 2005. Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies. Journal of Applied Microbiology, 99: 7-23. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15960661/
6. ISAAA. 2022. Genes list. https://www.isaaa.org/gmapp roval datab ase/genes list/defau lt.asp. Accessed 18 March 2022.
7. Jonas, D.A., Elmadfa, I., Engle, K.H., Heller, K.J., Kozianowski, G., Konig, A., Muller, D., Narbonne, J.F. W, Wackernagel., J. Kleiner. 2001. Safety considerations of DNA in food. Ann Nutr Metab 45, 235– 254. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11786646/
8. Schubbert, R., Lettmann, C., Doerfler, W. 1994. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. Mol Gen Genet 242, 495– 504. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8121408/

9. Schubbert, R., Renz, B., Schmitz, B.,Doerfler, W. 1997. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. Proc Natl Acad Sci USA 94, 961– 966. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9819049/
10. Smalla, K., Van Overbeek, L.S., Pukall, R.,Van Elsas, J.D. 1993. Prevalence of npt II and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. FEMS Microbiology Ecology, 13, 47– 58. https://academic.oup.com/femsec/article/13/1/47/559731
11. Steffensen, A.E. 2015. Prevalence of nptII genes in three differ-ent soil fields in Tromsø. Master's thesis, UiT Norges arktiske universitet.
12. Un Jan Contreras, S., Gardner, C.M. 2022. Environmental fate and behaviour of antibiotic resistance genes and small interference RNAs released from genetically modified crops. J Appl Microbiol. Nov;133(5):2877-2892. doi: 10.1111/jam.15741. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35892194/

آلترناریا عامل بلایت دانه های روغنی خانواده براسیکا

نیلوفر فلاح
کارشناس گیاهپزشکی مرکز تحقیقات کاربردی
و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

Alternaria blight of oilseed Brassicas

مقدمه

گونه‌های روغنی Brassica از مهم‌ترین منابع تامین روغن خوراکی در جهان به شمار می‌روند. در این بین کلزا سومین محصول مهم دانه‌های روغنی جهان محسوب می‌شود (Shekhawat et al,2012). این محصولات در برخی شرایط محیطی نسبت به برخی عوامل بیمارگر از جمله سوختگی برگ آلترناریایی (لکه سیاه آلترناریایی) که در اثر گونه‌های *Alternaria* ایجاد می‌شود حساسیت دارند. جنس آلترناریا متعلق به شاخه ی *Ascomycota* است که برخی به صورت ساپروفیت و برخی نیز بیماری زا هستند. این جنس متعلق به کلاس *Dothideomycetes* و راسته *Pleosporales* و خانواده *Pleosporaceae* با تشکیل کنیدی های چند شکلی و همچنین دارای هیف با دیواره عرضی مشخص می‌شوند. Saharan & Mehta,2002).

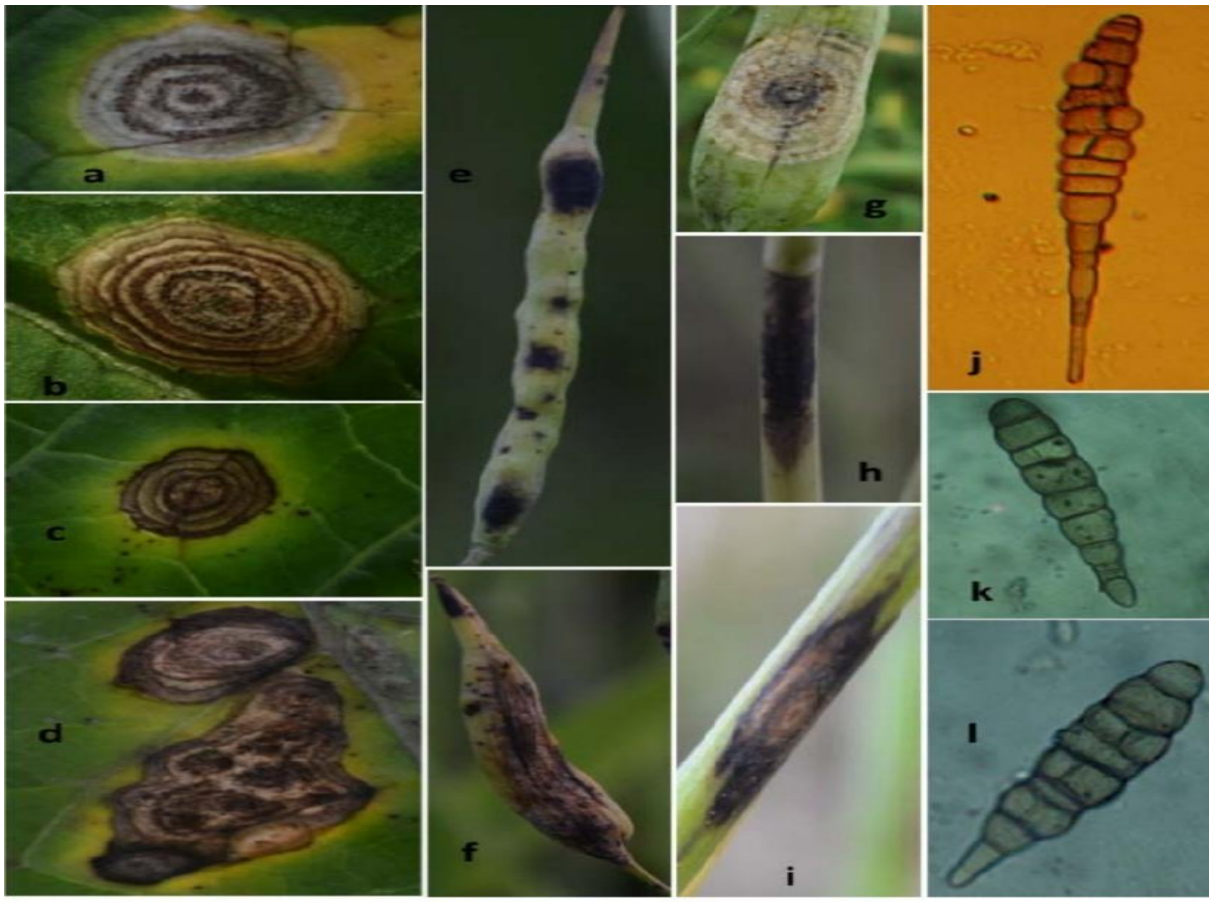
Nees برای اولین بار جنس آلترناریا را در سال ۱۸۱۷ با گونه *Alternaria tenuis* معرفی کرد که بعدا به *A.alternata* تغییر نام پیدا کرد. برکلی در سال۱۸۳۶ متوجه عفونت قارچی روی گیاه متعلق به خانواده *Brassicaceae* شد که در نهایت نام این قارچ *A.brassica* شد. تیرهوت در سال ۱۹۰۱ در هند برای نخستین بار بلایت آلترناریا را از گیاه خردل گزارش کرد. آلترناریا هر ساله در سراسر مناطق جهان که رشد دانه کلزا و خردل وجود دارد باعث ایجاد بیماری می‌شود و باعث کاهش عملکرد تا ۴۷درصد و در بعضی موارد تا ۷۰درصد می‌شود(McDonald,1959).

تا کنون گونه‌های مختلف قارچی برای این عامل بیمارگر بر روی کلزا شناسایی شده است که از مهم‌ترین آنها می توان به سه گونه *A. brassicicola* ،*A. brassicae* و *A. raphani* اشاره نمود. قارچ آلترناریا نکروتروف است و بر روی برگ و ساقه ایجاد علائم می‌کند(شکل ۱) و باعث کاهش نواحی فتوسنتزی و القای پیری زودرس می‌شود. گونه‌های آلترناریا عمدتاً قارچ‌های ساپروفیت هستند، اما برخی از آنها پاتوژن‌های گیاهی محسوب می‌شوند. هفت پاتوتیپ *A.alternata* از متابولیت‌های ثانویه ای که توسط میزبان به طور اختصاصی تولید می‌شود برای ایجاد بیماری زایی استفاده می‌کنند. این سموم سلول‌های میزبان را قبل از کلونیزاسیون می‌کشند.

در بین گونه‌های مختلف آلترناریا به نظر می‌رسد گونه ی *Alternaria brassicicola* مکانیسم متفاوتی را به کار می‌گیرد. با بررسی‌هایی که صورت گرفت مشخص شد که در این مورد از متابولیت‌های ثانویه‌ای که توسط میزبان به طور اختصاصی تولید می‌شود برای ایجاد بیماری زایی استفاده نمی‌شود و یا احتمال استفاده از آنها توسط پاتوژن ضعیف است. به طور مشابه، هیچ ژنی که لیپازها یا آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی را کد کند، شناسایی نشده است، اگرچه این آنزیم‌ها برای قارچ مهم به شمار می‌روند. این پاتوژن‌ها از طریق بذر، خاک و همچنین به صورت هوازاد قابل انتقال هستند و در شرایط آب و هوایی مرطوب و در مناطق با بارندگی نسبتا زیاد فراوانی بیشتری دارند.

A. brassicae ،*A. brassicicola* و *A. raphani* کم و بیش علائمی شبیه به هم بر روی برگ‌ها و ساقه‌ها و خورجین‌های کلزا ایجاد می‌کنند. لکه های ایجاد شده توسط *A.brassicae* معمولا خاکستری رنگ هستند. در *A.brassiccicola* لکه

های ایجاد شده مخملی هستند در حالیکه لکه های ایجاد شده توسط قارچ *A.raphani* زرد رنگ با هالهای در اطراف آن مشاهده می‌شوند. علائم این بیماری در روی برگ‌ها در ابتدا به رنگ سیاه هستند و پس از رشد به صورت دوایر متحد المرکز مشاهده می‌شود و در نهایت لکه‌های بزرگی را تشکیل می‌دهند که می تواند باعث سوختگی شوند. علائم بیماری اغلب روی برگ‌های مسن تر رخ می‌دهد و علت آن هم این است که برگ‌های مسن‌تر به خاک نزدیک‌تر هستند. این قارچ میزان فتوسنتز گیاه را کاهش داده و باعث کوچک شدن دانه ها می‌شود(Meena et al,2010).



شکل ۱: از a تا i خسارت قارچ *Alternaria* بر روی گیاه و از j تا l شکل کنیدی زیر میکروسکوپ

به دلیل خسارات شدید ناشی از بلایت آلترناریا در کلزا، از اهداف اصلاحی متخصصین، ایجاد گونه‌های مقاوم به این بیماری است. در گذشته تلاش‌های زیادی برای تولید واریته‌های مقاوم به آلترناریا صورت گرفته است اما تا کنون رقم تجاری در این خصوص گزارش نشده است. بالاترین میزان مقاومت نسبت به *A.brassicae* مربوط به خویشاوندان وحشی براسیکا و در گیاه *Camelina sativa* گزارش شده است. در بررسی انجام شده در مورد مقاومت سی و هشت گونه متعلق به نه جنس در مقابل گونه *A.brassicae* به مدت دو سال، مشخص شد که گونه های B.desvottesii, C.sativa,*Coincya pseuderucastrum, Diplotaxis berthautii, Diplotaxis catholica, Diplotaxis cretacea, Diplotaxis erucoides* و *Erucastrum gallicum* از مقاومت بیشتری نسبت به سایرین برخوردار بودند(Sharma et al,2002).

نتیجه

شکی نیست که سوختگی برگ آلترناریایی یکی از بیماری‌های مخرب دانه های روغنی براسیکا در سراسر جهان است و گونه‌های بیماری‌زا ی آلترناریا باعث کاهش قابل توجه در کیفیت و کمیت محصولات برداشت شده از دانه های روغنی براسیکا محسوب می‌شوند، اما هنوز منبع مقاومت تجاری شده در بین این محصولات شناسایی نشده است .با این حال، سطح بالایی از مقاومت در برابر *A. brassicae* از گونه‌ی وحشی در مقابل آن در شرایط ایزوله و آزمایشگاهی گزارش شده است. به دلیل عدم وجود مقاومت القایی در براسیکاهای کشت شده در برابر بیماری بلایت آلترناریایی می توان از روش‌های دیگری برای مدیریت بیماری استفاده نمود.

برای کنترل و مبارزه با این بیماری یکی از متداول‌ترین روش‌ها استفاده از قارچ‌کش‌ها است. علیرغم استفاده زیاد از قارچ‌کش‌ها در برابر پاتوژن‌ها، این قارچ‌کش ها باعث خطراتی برای انسان شده و همچنین ممکن است خطرات زیست محیطی را همراه داشته باشد. از این رو، امروزه بیشتر تاکید بر روش‌های دیگر مدیریت بیماری مانند کشت واریته‌های نسبتاً مقاوم، استفاده از عوامل مهار زیستی و تغییر در شیوه‌های زراعی وسازگار با محیط زیست و ایمنی است.

منابع

1. Degenhardt KJ, Skoropad WP, Kondra ZP (1974). Effect of *Alternaria* black spot on yield, oil content and protein content of rapeseed. Can. J. Plant Sci. 54:795-799.
2. Dharmendra, K., Neelam, M., Yashwant, K. B., Ajay, K., Kamlesh, K., Kalpana, S., ... & Adesh, K. (2014). Alternaria blight of oilseed Brassicas: A comprehensive review. African Journal of Microbiology Research, 8(30), 2816-2829.
3. Kumar, Chauhan J S and Chattopadhyay C (eds.). Agrotech Publishing Academy, Udaipur. pp. 364-388. Cho Y, Cramer RA Jr., Kim KH, Davis J, Mitchell TK, et al. (2007). The Fus3/Kss1 MAP kinase homolog Amk1 regulates the expression of genes encoding hydrolytic enzymes in *Alternaria brassicicola*. Fungal Genet. Biol. 44:543-553.
4. McDonald WC (1959). Gray spot of rape in Manitoba. Can. J. Plant Sci. 39:409.
5. Meena PD, Chattopadhyay C, Meena RL (2008). Eco-friendly management of *Alternaria* blight in *Brassica juncea*. Indian Phytopathol. 61(1):65-69.
6. Nees von Esenbeck GG (1817). System der Plize Urid Schwamme, Wurzburg. p. 234.
7. Sharma G, Dinesh V, Kumar A, Haque A, Bhar SR, Prakash S, Chopra VL (2002). *Brassica* coenospecies: a rich reservoir for genetic resistance to leaf spot caused by *Alternaria brassicae*. Euphytica125: 411-417.
8. Shekhawat K, Rathore, SS, Premi, OP, Kandpal, BK, Chauhan, JS (2012). Advances in agronomic management of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czernj and Casson): An overview. Int. J. Agron. Article ID 408284:1- 14.

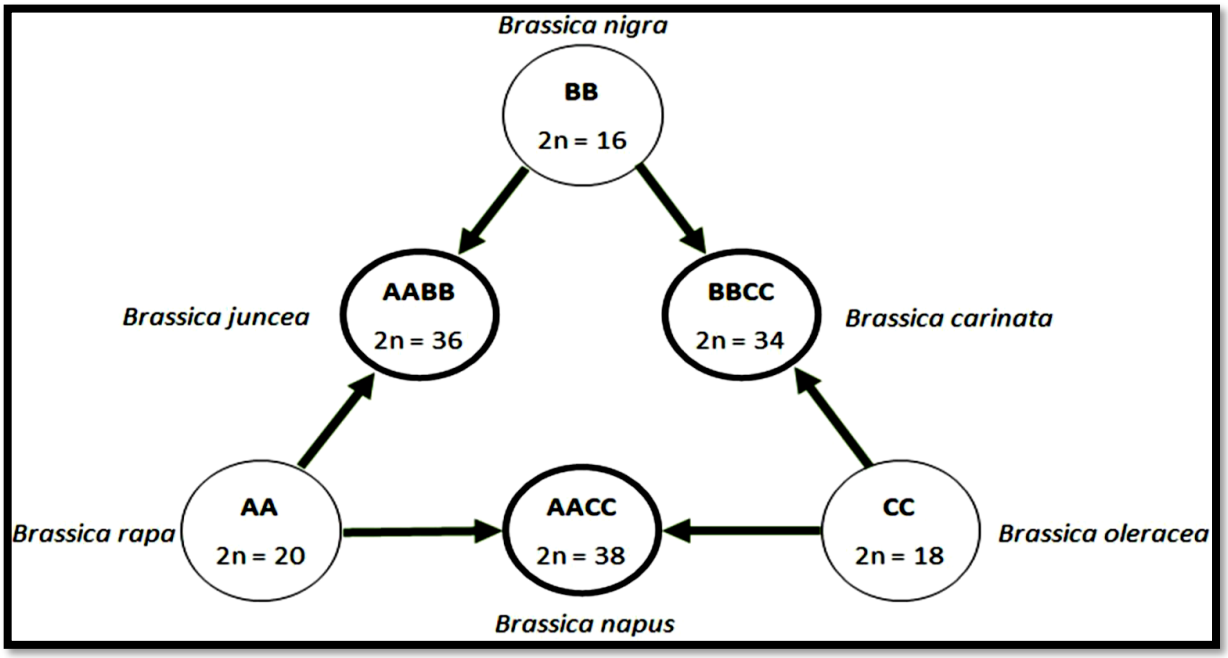
الهام شهرکی
کارشناس تحقیقات نمایندگی گلستان

زیست شناسی و زراعت کارینا تا

Biology and agronomy of *Brassica carinata*

رابطه بین گونه‌های مختلف *Brassica* و Carinata

تیره شب بو از جداگلبرگان، گیاهانی علفی با دوره رشد یک‌ساله هستند. پنج گونه از این گیاه نسبت به دیگر گونه‌ها معروف‌تر هستند. *Brassica napus* با ژنوم AC(n=19)، *Brassicarapa* با ژنوم A(n=10)، *Brassicajuncea* با ژنوم AB(n-18)، *Brassica carinata* با ژنوم BC(n=17) و *Sinapsis alba* با ژنوم D(n=12) این پنج گونه را تشکیل می‌دهند. روابط ژنومی گونه‌های اصلی جنس براسیکا پیچیده است. از تلاقی بین سه گونه دیپلوئید خردل سیاه *B.nigra*، کلم *B.oleracea* و شلغم روغنی *B.campestris*، سه گونه آمفی‌دیپلوئید کلزای معمولی *Brassica napus*، خردل هندی *B.juncea* و خردل حبشی *B.carinata* به وجود آمده‌اند. از بین این گونه‌ها، معروف‌ترین گونه که به شکل زراعی کشت می‌شود گونه *Brassica napus* است ولی دیگر گونه‌ها نیز به صورت محدود در برخی مناطق دنیا کشت می‌شوند(Warwick et al., 2006). همانطور که در شکل یک مشاهده می‌کنید، گونه *Carinata* از خانواده Brassicacea،راسته Capparales، جنس *Brassica* یک آلوتتراپلوئید با ژنوم 2n=4x=34، BBCC و اندازه ژنوم 1300Mb می‌باشد. که از هیبرید بین *B.nigra* با ژنوم 2n=2x=16، BB و اندازه 630mb و *B.oleracea* با ژنوم 2n=2x=18، CC و اندازه 700mb منشا گرفته است(Palmer et al., 1985).

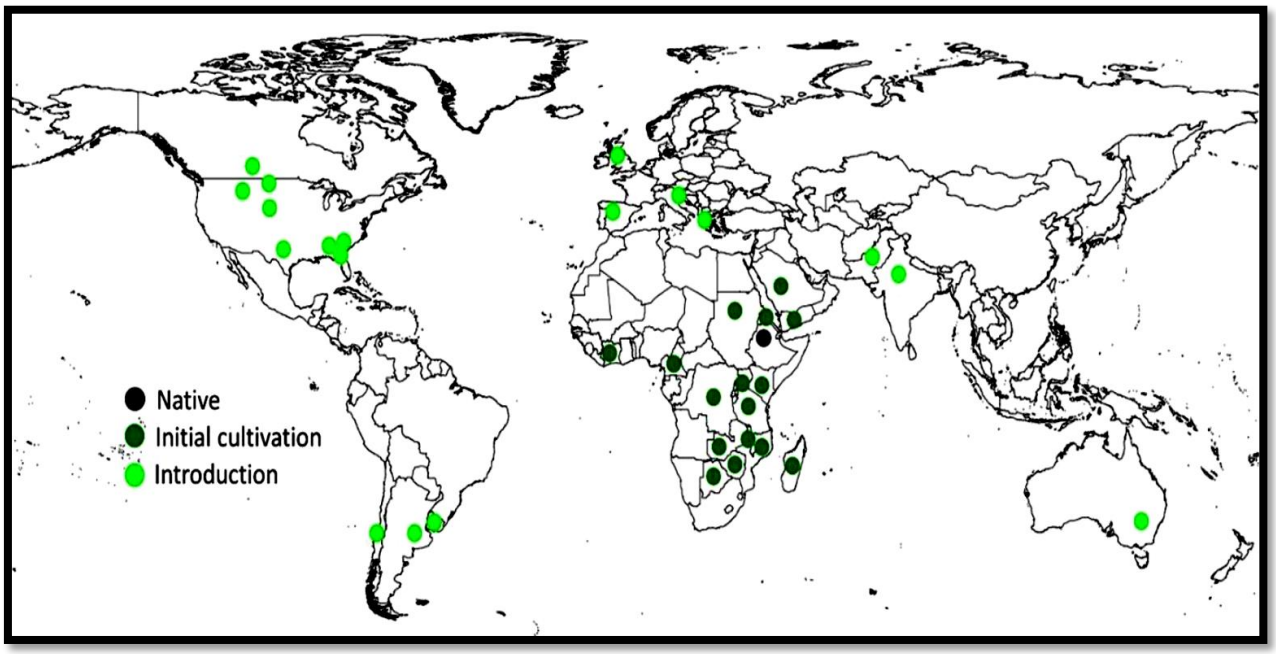


شکل ۱. رابطه بین گونه‌های مختلف *Carinata*

مبدا و توزیع

گیاه خردل اتیوپی(*B.carinata*) گیاه روغنی با استفاده خوراکی و غیرخوراکی برای تولید بیودیزل می‌باشد و با شرایط نامساعدی نظیر خاک رسی، شنی، آب‌وهوای نیمه خشک و دمای هوای بالا سازگار بوده و در شرایط نامطلوب محیطی دارای عملکرد زراعی بهتری نسبت به *Brassica napus* می‌باشد (Cardone *et al*., 2003).در یک بررسی در ایتالیا یک لاین از گونه *B. napus* را با دو رقم از گونه *B.carinata* به مدت سه سال مقایسه کردند و مشاهده کردند که *B.carinata* عملکرد دانه بالاتر و پایدارتری

نسبت به گونه *B. napus* داشت که مربوط به تحمل بیشتر آن به تنش‌های غیرزنده بود(Mazzoncini et al., 1993). کشت کارینا‌تا از هزاره چهارم تا پنجم قبل از میلاد در شمال شرقی آفریقا و مناطق اطراف آن مانند شرق استوایی آفریقا، غرب مرکزی استوایی آفریقا ، اقیانوس هند غربی و آسیای جنوب غربی آغاز شده است. در سال ۱۹۵۷ از اتیوپی به عنوان منبع سبزیجات برگدار به آمریکای شمالی معرفی شد(شکل ۲). به دلیل استفاده از آن به‌عنوان جایگزین ناپوس در نقاط مختلف جهان از جمله اروپا، اسپانیا، استرالیا، نیوزیلند، یونان، جنوب آمریکا و ایتالیا روند افزایشی کشت کارینا‌تا را داریم(Zada et al.,2013).



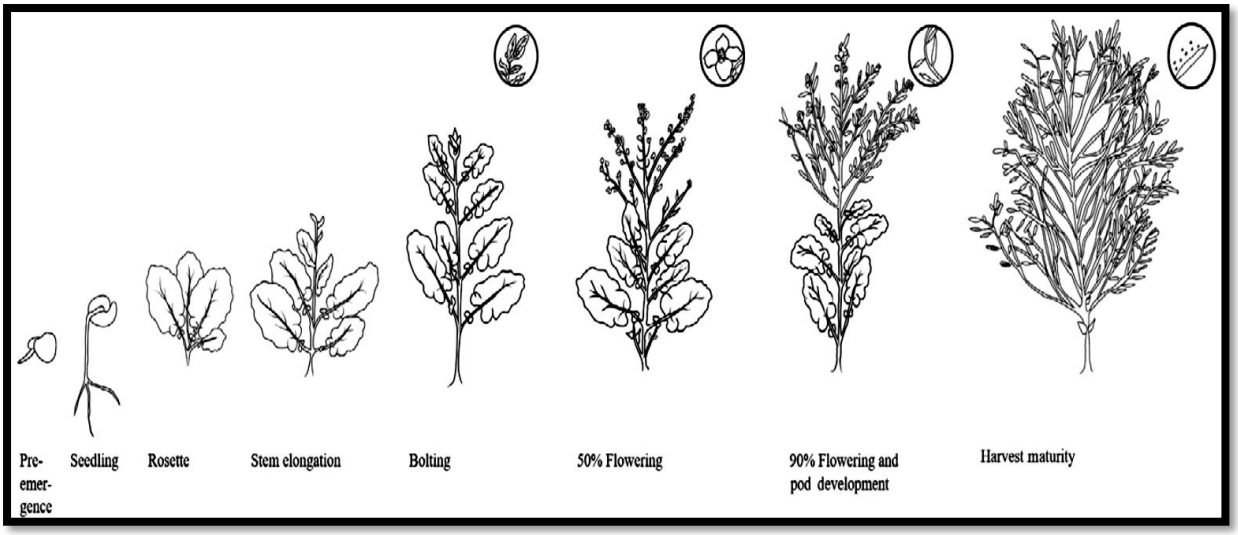
شکل۲. توزیع کارینا‌تا براساس مبدا، کشت اولیه و مناطق معرفی

مورفولوژی، فنولوژی و زراعت کارینا‌تا

ساقه‌ها بدون کرک، مومی شکل و قطر آن به دو سانتی‌متر می‌رسد. برگ‌هایی با دمبرگ کوتاه، متناوب، بدون کرک تا کمی موم‌دار دارند. دارای سه لوب عمیق تا ۲۰ سانتی‌متر طول و ۱۰ سانتی‌متر عرض می‌باشد. برگ‌های بالایی رنگ روشن‌تری دارند و لوب‌های کمتری دارند و از نظر اندازه کوچکتر، باریک‌تر و کمتر مومی شکل می‌شود. گل آذین بسیار منشعب و کشیده است گل‌ها به صورت انتهایی روی ساقه و شاخه‌های اصلی قرار می‌گیرند. کاسبرگ سبز با طول ۷-۴ میلی‌متر می‌باشد. چهار گلبرگ بیضی شکل دارد(شکل ۳)، (Nanda et al., 1996).

دوره رشد تا شروع گلدهی در کارینا‌تا از ۷۷ تا ۱۲۶ روز متفاوت است و در چند مکان و سال‌های مختلف فلوریدا به عوامل ژنوتیپی و آب و هوا بستگی دارد.چرخه عمر کارینا‌تا با ۱۵۴ روز برای ژنوتیپ‌های زودرس و ۱۶۵ روز برای ژنوتیپ‌های دیررس می‌باشد و به‌عنوان یک محصول زمستانه در فلوریدا رشد می‌کند(Kumar et al., 2020).

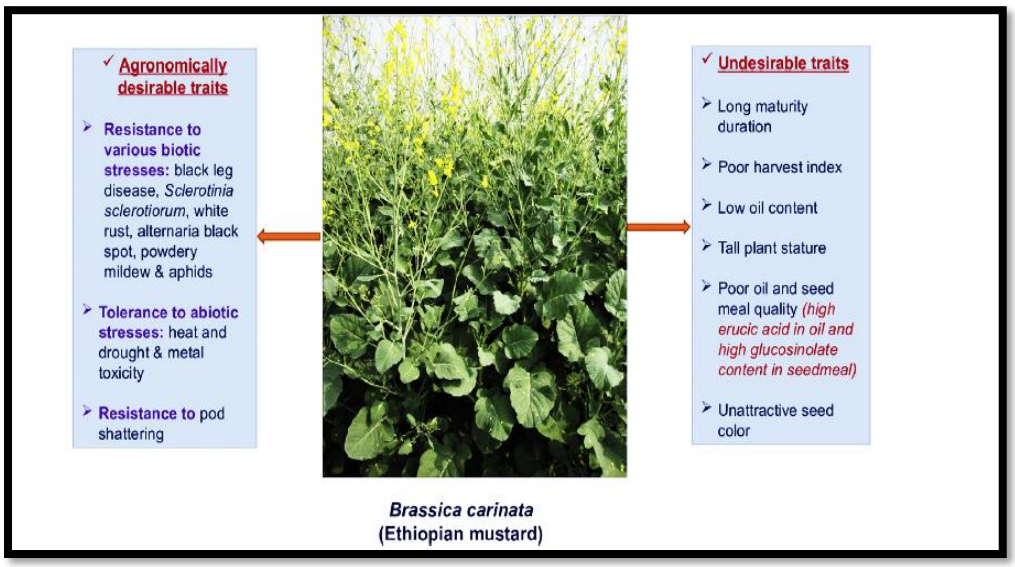
کارینا‌تا به طیف وسیعی از شرایط آب و هوایی متحمل می‌باشد. در آب و هوای قاره ای مرطوب با گرم و مرطوب می‌توان در پائیز کشت کلزا را انجام داد. در جنوب شرقی ایالات متحده به طور کلی ۴-۳ هفته قبل از اولین یخبندان کشت انجام می‌شود. در کشت پائیزه گلدهی کارینا‌تا در فلوریدا ۱۰۲ روز طول کشید و ۱۶۱ روز تا بلوغ طول کشید و در کشت بهاره در ساسکاچوان کانادا ۵۵ روز گلدهی و ۱۱۰ روز پس از کاشت تا بلوغ طول کشید(Kumar et al., 2020).



شکل ۳. مراحل فنولوژی کاریناتا

صفات زراعی مطلوب و نامطلوب

*B.carinata*دارای صفات مطلوب زراعی از جمله مقاومت در برابر تنش‌های زنده مختلف از جمله بیماری ساق سیاه، زنگ سفید، سفیدک پودری، اسکلروتینا و صفات نامطلوب از جمله شاخص برداشت ضعیف، محتوای کم روغن و کیفیت پایین، ارتفاع زیاد، رنگ دانه نامناسب می‌باشد.استفاده از خردل اتیوپی علی‌رغم داشتن صفات مقاومتی به تنش‌های زنده و غیرزنده محبوبیتی در بین کشاورزان ندارد(شکل۴)، (Raman et al., 2017). در کانادا، اسپانیا و هند به دلیل مقاومت این محصول به تنش‌های زنده علاقه خود را به این محصول نشان دادند و برای بهبود و اصلاح نژاد و ژنومیک *B.carinata* به صفات مطلوب بیشتر، سایر گونه‌های*Brassica*،را گرداوری می‌کنند. (Velasco et al., 1997).



شکل۴. صفات زراعی مطلوب و نامطلوب موجود در *B.carinata*

منابع:

1. Cardone, M., Mazzoncini, M., Menini, S., Rocco, V., Senatore, A., Seggiani, M.,Vitolo, S. (2003). *Brassica carinata*as an alternative oil crop for the production of biodiesel in Italy: agronomic evaluation, fuel production by transesterication and characterization. Biomass and Bioenergy, 25: 623–636.
2. Kumar, S., Seepaul, R., Mulvaney, M., Colvin, B., George, S., Marois, J., Bennett, R., Leon, R., Wright, D., & Small, I. (2020). *Brassicacarinata*genotypes demonstrate potential as a winter biofuel crop in South East United States. *Industrial Crops and Products*, *150*,112353. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112353.
3. Mazzoncini, M., Vannozi, P., Megale, P., Secchiari, A., Pistotia and Lazzeri, L. (1993). Ethiopian mustard (*B.carinata A. Braum*) crop in central Italy. Note 1: Characterization and agronomic evaluation. *Agriculture-Mediterranean* 123: 330-338.
4. Nanda, R., Bhargava, S. C., Tomar, D., and Rawson, H. M. (1996). Phenological development of *Brassica campestris*, *B. juncea*, *B.napus* and *B. carinata*grown in controlled environments and from 14 sowing dates in the field. *Field Crops Research*, *46*(1–3), 93–103. https://doi.org/10.1016/0378-4290(95)000909.
5. Palmer, J. D. (1985). Comparative organization of chloroplast genomes. *Annual Review of Genetics*, *19*,325–354. https://doi.org/10.1146/annur ev.ge.19.120185.001545.
6. Warwick, S. I., Gugel, R. K., McDonald, T., and Falk, K. C. (2006).Genetic variation of Ethiopian mustard (*Brassica carinata*A.Braun) germplasm in western Canada. *Genetic Resources andCrop Evolution*,*53*(2), 297–312.https://doi.org/10.1007/s10722-004-6108-y.
7. Zada, M., Zakir, N., Rabbani, M. A., and Shinwari, Z. K. (2013).Assessment of genetic variation in Ethiopian mustard (*Brassicacarinata*A. Braun) germplasm using multivariate techniques.*Pakistan Journal of Botany*, *45*, 583–593.
8. Raman, R., Qiu, Y., Coombes, N., Song, J., Kilian, A., Raman, H. (2017). Molecular diversity analysis and genetic mapping of pod shatter resistance loci in Brassica carinata L. Front. Plant Sci. 8, 1765
9. Velasco, L., Martinez, J. M., and Haro. A. D. (1997). Induced variability for C18 unsaturated fatty acids in Ethiopiam mustard. Can. J. Plant Sci. 77, 91-95.

اصلاح معکوس، رویکرد جدید بر پایه مهندسی فرآیند میوز

رضا وجدان
کارشناس به نژادی مرکز تحقیقات کاربردی
و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis

مقدمه

یکی از مهمترین پدیده‌ها در اصلاح نباتات ایجاد نتاج نسل اول هیبرید (F1) است که از لحاظ اندازه، ویژگی‌های رشدی و عملکرد در مقایسه با والدین خالص اولیه برتر باشد، به این پدیده هتروزیس می‌گویند. بروز این پدیده، می تواند ناشی از عوامل مختلفی باشد که هنوز به طور کامل شناخته نشده است (Springer and Stupar, 2007; Stupar et al., 2008; Fernandez-Silva et al., 2009; Wei et al., 2009). سوالی که در اینجا پیش می‌آید این است که چگونه می‌توان بروز صفتی را بهبود بخشید در حالیکه از عامل بوجود آورنده‌ی آن اطلاعات چندانی در دست نیست؟ به نژادگران دریافتند از طریق تلاقی‌های کنترل شده‌ی لاین‌های اینبرد می‌توانند هتروزیس را برآورد کنند. طبیعت تصادفی بودن این رویکرد، موجب دشواری بهینه سازی اثرات هتروزیس می‌شود. یکی از استراتژیهای جایگزین برای این روش، بر پایه‌ی معکوس کردن انتخاب گیاهی در نسل‌های جوامع تعریف شده با سطوح بالای هتروزیگوسیتی و تنوع تصادفی می‌باشد. سپس این جوامع، در شرایط محیطی مختلف (از نظر عرض جغرافیایی، شوری، رطوبت و ...) مورد بررسی قرار می‌گیرند و بهترین ژنوتیپ‌های هتروزیگوت برای ادامه پروسه‌ی اصلاحی انتخاب می‌شوند. یکی از عوامل محدود کننده در دستیابی به سطوح بالای تنوع در برنامه‌های اصلاحی رایج این است که تولید دوباره‌ی هتروزیگوت‌ها از طریق بذر، غیرممکن یا دشوار است. ترکیب آلل‌های مطلوب بدلیل تفرق صفات در نسل‌های بعدی بهم می‌خورد. بنابراین توسعه روش‌هایی به منظور سهولت نگهداری ژنوتیپ‌های هتروزیگوت، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها در به نژادی گیاهی می‌باشد. آپومیکسی به عنوان روشی برای نگهداری فنوتیپ‌های هتروزیگوت پیشنهاد شده است، ولی هنوز بعنوان یک روش کاربردی در اصلاح نباتات مورد استفاده قرار نگرفته است (Perotti et al., 2004).

تکنیک اصلاح معکوس با مختل نمودن فرایند کراسینگ اور و تثبیت کروموزوم‌های غیرنوترکیب حاصل و به دنبال آن دابل هاپلوئیدی، سبب بازسازی لاین‌های هموزیگوت اولیه شده و چالش عدم امکان نگهداری هتروزیگوت مطلوب را بر طرف می‌سازد. در این روش دو مرحله ضروری شامل ممانعت از برقراری کراسینگ اور در بوته‌های انتخابی و به دنبال آن بازیابی دابل هاپلوئیدها از اسپورهای دارای کروموزوم غیرنوترکیب می‌باشد. از لاین‌های دابل هاپلوئید حاصل می‌توان هموزیگوت‌های برتر را در سطح تجاری مجدداً بدست آورد (شکل ۱). از سوی دیگر این تکنیک برای گیاهانی با زمینه ژنتیکی مشخص نیز قابل استفاده است. اگر کراسینگ اور و به جای F2 در F1 حذف شود، اصلاح معکوس می‌تواند لاین‌هایی با کروموزوم‌های جایگزین شده تولید نماید.

این لاین‌ها دارای یک یا بیش از یک کروموزوم از یک والد در زمینه ژنتیکی والد دوم هستند. با تلاقی برگشتی این لاین‌ها با لاین‌های والدینی اصلی، جوامعی که برای کروموزوم (ها) تفرق می‌یابند، بدست می‌آید. به لحاظ تئوریک، تکنیک اصلاح معکوس منجر به بازترکیبی کروموزومی میان دو گیاه هموزیگوس در تمام حالات ممکن می‌شود.

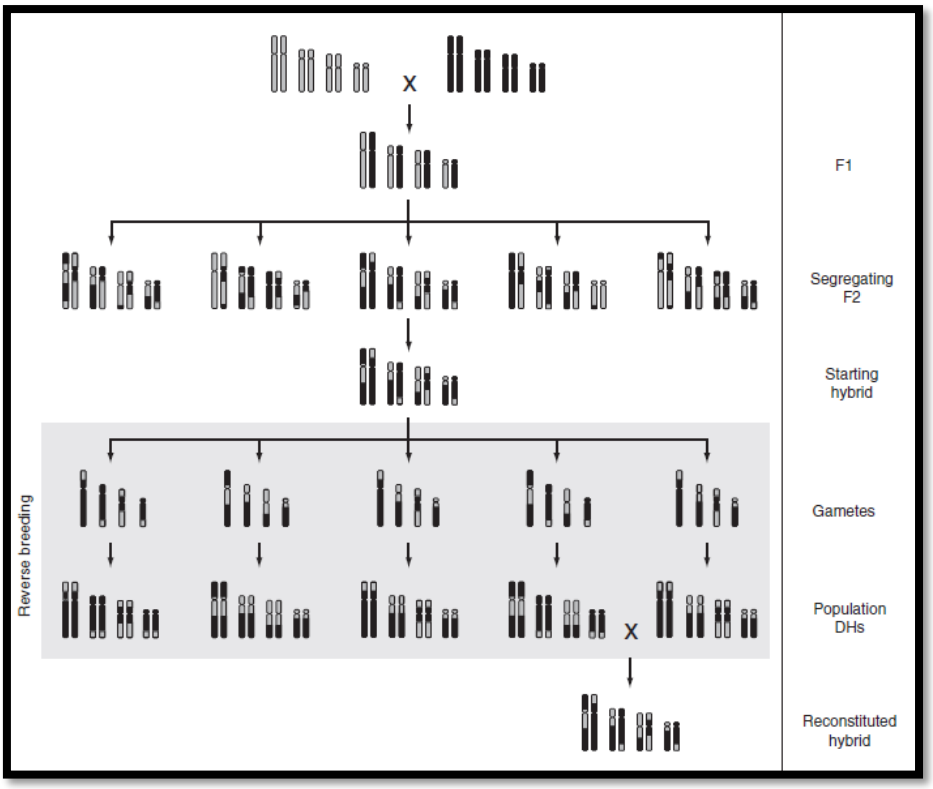
نوترکیبی در گیاهان گلدار توسط کمپلکس سیناپتونمال، طی مراحل چرخه‌ی میوز رخ می‌دهد. در پروفاز یک، کروموزوم‌های همولوگ در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند (Bivalent) و با مبادله‌ی قطعاتی میان کرماتیدهای غیرخواهری، کراسینگ اور شکل می‌گیرد. کروموزوم‌های آکیاسماتیک (که نوترکیبی را نشان نمی‌دهند) بصورت Univalent باقی می‌مانند. کیاسماتا که در Bivalent موجبات تفرق کروموزوم‌های همولوگ را فراهم می‌آورد، در Univalent وجود ندارند. در نتیجه ممکن است تمامی کرموزوم‌ها در یک سمت سلول تجمع یابند و یا با نسبت‌های متفاوتی به دو قطب سلول حرکت نمایند. این وضعیت یک توزیع نامتعادل در تعداد کروموزوم‌ها را بوجود می‌آورد (آنیوپلوئیدی)، از این روی گیاهان آکیاسماتیک بشدت عقیم هستند (Couteau et al., 1999; Hartung et al., 2007). با فرض اینکه هر Univalent شانس مساوی برای حرکت به دو قطب سلول داشته باشد، احتمال تشکیل اسپور با تعداد کروموزوم نرمال برابر $^{x}/_{2}^{1}$ خواهد بود (x برابر تعداد کروموزوم هاپلوئید گونه‌ی مورد نظر). بعنوان مثال برای گیاه آرابیدوپسیس (2n = 2x = 10)، فراوانی اسپورهای متعادل، یک در هر ۳۲ اسپور است (۳٪). برای گیاهانی با عدد کروموزومی هاپلوئید بالاتر از ۱۲ این احتمال بسیار ضعیف می‌شود یعنی یک در بیش از ۴۰۰۰ اسپور. این مورد در گونه‌های مختلف باید بررسی شود. همانطور که می‌دانید اصلاح معکوس بر پایه سرکوب موثر کراسینگ اوور میوزی است. بنابراین ژن‌هایی که در تشکیل کراسینگ اور ضروری هستند نیز می‌توانند مورد هدف قرار گیرند. برای مثال ژن ASY1 در آرابیدوپسیس و برنج و بعلاوه موتانت‌هایی نظیر dmc1, sds, ptd & spo11 که در فرایند شکل‌گیری کراسینگ اور در گیاهان مختلف نقش دارند (Couteau et al., 1999; Azumi et al., 2002; Stacey et al., 2006; Siaud et al., 2004; Higgins et al., 2004) و یا siRNAs[1] که موجب خاموشی دائمی ژن می‌شود، می‌توان ژن‌های هدف را غیر فعال نمود. برای گیاهانی که ترانسفورماسیون پایدار، سخت یا غیرممکن باشد، راه جایگزین استفاده از القای خاموشی ژن با استفاده از ویروس Virus-induced gene silencing (VIGS) به عنوان روشی موثر برای القای خاموشی ژن پس از نسخه برداری (Post-Transcriptional Gene Silencing,PTGS). در این روش گیاه با ویروسی تغییر یافته که شامل یک توالی RNA دارای ژن هدف است، آلوده می‌شود. گیاه در پاسخ دفاعی متقابل، با استفاده از siRNA، RNA ویروسی و بطور همزمان RNA آندوژنز گیاهی را تجزیه می‌کند (Ruiz et al.,1998; Baulcombe, 2004). روش دیگری که بر مبنای غربالگری ژنتیکی-شیمیایی است، استفاده از ماده‌ی شیمیایی میرین، به عنوان مهارکننده کمپلکس Mre11-Rad50-Nbs1 (Dupre´ et al., 2008)

[1] Small interfering RNA sometimes known as short interfering RNA or silencing RNA

می‌باشد. این ماده با مهار یا حذف کراسینگ اوور طی فرایند میوز، سبب تسریع اصلاح معکوس می‌شود. کارایی تشکیل دابل هاپلوئیدی[1] از اسپورهای هاپلوئید، کاملاً وابسته به گونه است (Forster et al., 2007). ویژگی منحصر به فرد DHهای بدست آمده از اسپورهایی که از طریق میوز آکیاسماتیک بوجود آمدند، این است که حاوی کروموزوم‌های والدینی غیر نوترکیب هستند. در این روش به دلیل عدم توزیع طبیعی کروموزوم‌ها در دو قطب سلول، احتمال تشکیل اسپورهای نابارور آنیوپلوئید، بسیار محتمل است. بنابراین انتخاب اسپورهای یوپلوئید مورد نیاز، تا حدی بصورت خودکار انجام می‌شوند، چرا که تنها اسپورهای دارای یک نسخه از تمام کروموزوم‌ها، قادرند از تمامی مراحل نموی طی تقسیم سلولی و جنین‌زایی تا بازیابی گیاه کامل عبور کنند. هایپرپلوئیدی نتاج (نوعی عقیمی کروموزومی که عدد کروموزومی از حالت نرمال دیپلوئیدی بیشتر است) با استفاده از مارکرهای همبارز یا فلوسیتومتری [2] (دستگاهی برای شمارش تعداد سلول در محلول سوسپانسیون) قابل تشخیص‌اند. گسترش اصلاح معکوس به گیاهانی محدود است که تکنیک دابل هاپلوئیدی در آنها بطور معمول انجام شود. این تکنیک در برنامه‌های اصلاحی اغلب گونه‌های گیاهی بطور معمول اجرا می‌شود، در هر حال استثناهایی هم وجود دارد، نظیر: سویا، پنبه، کاهو و گوجه فرنگی که گیاهان دابل‌هاپلوئید یا تشکیل نمی‌شوند و یا با نرخ بسیار پائینی تولید می‌شوند (Zhang et al., 2008).

ترکیب سرکوب کراسینگ اوور، به همراه باززایی اسپورهای هاپلوئید در تکنیک DH منجر به کاربردهای اصلاحی قدرتمند و جدیدی می‌شود. یکی از کاربردهای مهم تولید لاین‌های هموزیگوت مکمل[3] است که برای تولید هیبریدهای F1 اختصاصی استفاده می‌شوند. بعلاوه وقتی که اصلاح معکوس [4] در خصوص هتروزیگوت‌های F1 بکار گرفته می‌شود، امکان تولید لاین‌هایی با کروموزوم‌های جایگزین وجود دارد که این خود امکان اصلاح هدفمند در مقیاس تک کروموزوم را فراهم می‌آورد. RB کاملاً با لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی تجاری، که در کشاورزی مدرن بسیار مورد استفاده‌اند، قابل رقابت است. این تکنیک به گیاهانی با عدد هاپلوئیدی ۱۲ یا کمتر و اینکه اسپورها به گیاه دابل هاپلوئید قابل بازیابی باشند، محدود می‌باشد. در گونه‌های پلی پلوئید با تعداد کروموزوم زیاد، بازسازی بساک که برپایه‌ی حذف تقسیم دوم میوز بوده (سبب تولید اسپورهای غیرکاهشی تقسیم دوم میوز(SDR[5]) می‌شود) پیشنهاد شده است. استفاده از اسپورهای SDR بازسازی سریع فنوتیپ مورد نظر و همچنین امکان دستیابی به لاین‌های دارای کروموزوم جایگزین را امکان پذیر می‌نمایند (Van Dun and Dirks, 2006).

[1] Double Haploied
[2] flow cytometry
[3] complementary homozygous lines
[4] Reverse breeding
[5] Second Division Restitution, SDR



شکل۱: طرح کلی اصلاح معکوس. اصلاح معکوس قادر است برای اصلاح هتروزیگوت‌های نا معلوم بکار گرفته شود. تلاقی دو والد هموزیگوس (نوارهای خاکستری و سیاه) یک هتروزیگوت F1 را می سازد و وقتی آن را خودگشن کنیم، جمعیت F2 بدست می‌آید. هیبرید اولیه از ساختار ژنتیکی نامعلوم برای خصوصیات مطلوبش انتخاب می شود و تحت دو مرحله اصلاح معکوس قرار می گیرد (قسمت خاکستری شکل). با خاموشی کراسینگ اوور در فرایند میوز، تمام کروموزوم‌های والدینی از طریق اسپورها منتقل می‌شوند. نکته در این مثال چهار کروموزوم در هیبرید ۱۶ ترکیب متفاوت در گامت‌ها ایجاد می‌نمایند- تنها ۵ ترکیب برای راحتی نمایش داده شده است. گامت‌های آکیاسماتیک بااستفاده از تکنیک کشت درون شیشه برای تولید لاین‌های دابل هاپلوئید بکار گرفته می‌شوند. از این جمعیت، والدین مکمل را می‌توان انتخاب نمود تا بعد از تلاقی هیبرید اولیه بطور کامل بازسازی شود. لاین‌های دابل هاپلوئید حاصل جهت ساخت کتابخانه‌ی دائمی برای خلق تنوع گسترده از هیبریدهای تعریف شده قابل بهره‌برداری است.

منابع

1. Azumi, Y., Liu, D., Zhao, D., Li, W., Wang, G., Hu, Y. and Ma, H. (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. EMBO J. 21, 3081–3095.
2. Azumi, Y., Liu, D., Zhao, D., Li, W., Wang, G., Hu, Y. and Ma, H. 2002. Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. EMBO J. 21, 3081–3095.
3. Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. Nature, 431, 356– 363.
4. Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. Nature, 431, 356– 363.
5. Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D. and Doutriaux, M.-P. (1999) Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a dmc1 mutant of Arabidopsis. Plant Cell, 11, 1623–1634.
6. Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D. and Doutriaux, M.-P. 1999. Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a dmc1 mutant of Arabidopsis. Plant Cell, 11, 1623–1634.
7. Dupre´ , A., Boyer-Chatenet, L., Sattler, R.M., Modi, A.P., Lee, J.-H., Nicolette, M.L., Kopelovich, L., Jasin, M., Raer, R., Paull, T.T. and Gautier, J. (2008) A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the mre11-rad50-nbs1 complex. Nat. Chem. Biol. 4, 119–125.

8. Dupre´ , A., Boyer-Chatenet, L., Sattler, R.M., Modi, A.P., Lee, J.-H., Nicolette, M.L., Kopelovich, L., Jasin, M., Raer, R., Paull, T.T. and Gautier, J. 2008. A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the mre11-rad50-nbs1 complex. Nat. Chem. Biol. 4, 119–125.
9. Fernandez-Silva, I., Moreno, E., Eduardo, I., Arus, P., Alvarez, J.M. and Monforte, A.J. (2009) On the genetic control of heterosis for fruit shape in melon (Cucumis melo L.). J. Hered. 100, 229–235.
10. Fernandez-Silva, I., Moreno, E., Eduardo, I., Arus, P., Alvarez, J.M. and Monforte, A.J. 2009. On the genetic control of heterosis for fruit shape in melon (Cucumis melo L.). J. Hered. 100, 229–235.
11. Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J. and Touraev, A. (2007) The resurgence of haploids in higher plants. Trends Plant Sci. 12, 368–375.
12. Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J. and Touraev, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. Trends Plant Sci. 12, 368–375.
13. Hartung, F., Wurz-Wildersinn, R., Fuchs, J., Schubert, I., Suer, S. and Puchta, H. (2007) The catalytically active tyrosine residues of both SPO11-1 and SPO11-2 are required for meiotic doublestrand break induction in Arabidopsis. Plant Cell, 19, 3090– 3099.
14. Hartung, F., Wurz-Wildersinn, R., Fuchs, J., Schubert, I., Suer, S. and Puchta, H. 2007. The catalytically active tyrosine residues of both SPO11-1 and SPO11-2 are required for meiotic doublestrand break induction in Arabidopsis. Plant Cell, 19, 3090– 3099.
15. Higgins, J.D., Armstrong, S.J., Franklin, F.C.H. and Jones, G.H. (2004) The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in Arabidopsis. Genes. Dev, 18, 2557–2570.
16. Higgins, J.D., Armstrong, S.J., Franklin, F.C.H. and Jones, G.H. 2004. The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in Arabidopsis. Genes. Dev, 18, 2557–2570.
17. Perotti, E., Grimanelli, D., John, P., Hoisington, D. and Leblanc, O. (2004) Why is transferring apomixis to crops still a dream? In new directions for a diverse planet: proceedings for the 4th International Crop Science Congress (Fischer, T., Turner, N., Angus, J., McIntyre, L., Robertson, M., Borrell, A. and Lloyd, D., eds), Brisbane, Australia: URL: http://www.cropscience.org.au/ icsc2004/poster/3/2/1/1367_perottie.htm.
18. Perotti, E., Grimanelli, D., John, P., Hoisington, D. and Leblanc, O. 2004. Why is transferring apomixis to crops still a dream? In new directions for a diverse planet: proceedings for the 4th International Crop Science Congress (Fischer, T., Turner, N., Angus, J., McIntyre, L., Robertson, M., Borrell, A. and Lloyd, D., eds), Brisbane, Australia: URL: http://www.cropscience.org.au/ icsc2004/poster/3/2/1/1367_perottie.htm.
19. Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell, 10, 937–946.
20. Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell, 10, 937–946.
21. Siaud, N., Dray, E., Gy, I., Ge´ rard, E., Takvorian, N. and Doutriaux, M.-P. (2004) Brca2 is involved in meiosis in Arabidopsis haliana as suggested by its interaction with Dmc1. EMBO J 233, 1392–1401.
22. Siaud, N., Dray, E., Gy, I., Ge´ rard, E., Takvorian, N. and Doutriaux, M.-P. 2004. Brca2 is involved in meiosis in Arabidopsis haliana as suggested by its interaction with Dmc1. EMBO J 233, 1392–1401.
23. Springer, N.M. and Stupar, R.M. (2007) Allelic variation and heterosis in maize: how do two halves make more than a whole? Genome Res. 17, 264–275.
24. Springer, N.M. and Stupar, R.M. 2007. Allelic variation and heterosis in maize: how do two halves make more than a whole? Genome Res. 17, 264–275.
25. Stacey, N.J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., Maxwell, A., Roberts, K. and Sugimoto-Shirasu, K. (2006) Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. Plant J. 48, 206–216.
26. Stacey, N.J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., Maxwell, A., Roberts, K. and Sugimoto-Shirasu, K. 2006. Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. Plant J. 48, 206–216.

27. Stupar, R., Gardiner, J., Oldre, A., Haun, W., Chandler, V. and Springer, N. (2008) Gene expression analyses in maize inbreds and hybrids with varying levels of heterosis. BMC Plant Biol. 8,33.
28. Stupar, R., Gardiner, J., Oldre, A., Haun, W., Chandler, V. and Springer, N. 2008. Gene expression analyses in maize inbreds and hybrids with varying levels of heterosis. BMC Plant Biol. 8,33.
29. Van Dun, C.M.P. and Dirks, R.H.G. (2006) Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V. Near Reverse Breeding, WO/ 2006 / 094773.
30. Van Dun, C.M.P. and Dirks, R.H.G. 2006. Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V. Near Reverse Breeding, WO/ 2006 / 094773.
31. Wei, G., Tao, Y., Liu, G., Chen, C., Luo, R., Xia, H., Gan, Q., Zeng, H., Lu, Z., Han, Y., Li, X., Song, G., Zhai, H., Peng, Y., Li, D., Xu, H., Wei, X., Cao, M., Deng, H., Xin, Y., Fu, X., Yuan, L., Yu, J., Zhu, Z. and Zhu, L. (2009) A transcriptomic analysis of superhybrid rice LYP9 and its parents. PNAS, 106, 7695–7701.
32. Wei, G., Tao, Y., Liu, G., Chen, C., Luo, R., Xia, H., Gan, Q., Zeng, H., Lu, Z., Han, Y., Li, X., Song, G., Zhai, H., Peng, Y., Li, D., Xu, H., Wei, X., Cao, M., Deng, H., Xin, Y., Fu, X., Yuan, L., Yu, J., Zhu, Z. and Zhu, L. 2009. A transcriptomic analysis of superhybrid rice LYP9 and its parents. PNAS, 106, 7695–7701.
33. Wijeratne, A.J., Chen, C., Zhang, W., Timofejeva, L. and Ma, H. (2006) The Arabidopsis thaliana PARTING DANCERS gene encoding a novel protein is required for normal meiotic homologous recombination. Mol. Biol. Cell 17, 1331–1343.
34. Wijeratne, A.J., Chen, C., Zhang, W., Timofejeva, L. and Ma, H. 2006. The Arabidopsis thaliana PARTING DANCERS gene encoding a novel protein is required for normal meiotic homologous recombination. Mol. Biol. Cell 17, 1331–1343.
35. Zhang, X, Jin, S, Liu, D, Lin, Z, Zeng, F, Zhu, L, Tu, L and Guo, X (2008) Cotton biotechnology: challenge the future for cotton improvement. In Advances in Plant Biotechnology (Rao, G.P., Zhao, Y., Radchuk, V.V. and Bhatnagar, S.K., eds), pp. 241– 301. Houston, Texas: Studium Press LLC.
36. Zhang, X, Jin, S, Liu, D, Lin, Z, Zeng, F, Zhu, L, Tu, L and Guo, X. 2008. Cotton biotechnology: challenge the future for cotton improvement. In Advances in Plant Biotechnology (Rao, G.P., Zhao, Y., Radchuk, V.V. and Bhatnagar, S.K., eds), pp. 241– 301. Houston, Texas: Studium Press LLC.

دابل هاپلوییدی و بررسی آن در فلفل دلمه

علی مجد عزیزی
کارشناس به نژادی مرکز تحقیقات کاربردی
و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

Double hoploidy in sweet papper

در شش دهه گذشته، تحقیقات بسیاری بر روی سلول‌های هاپلوئید با منشاء دانه‌ی گرده و سلول تخمک برای تولید دابل هاپلوییدها در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که البته میزان موفقیت آنها باهم متفاوت بوده است(Jose M, et. 2021). برای تولید گیاهان هاپلوئید روش‌های درون شیشه‌ای مختلفی وجود دارد که به دو دسته اصلی آندروژنز و ژینوژنز تقسیم می‌شوند. به فرآیند القاء و باززایی گیاه هاپلوئید با استفاده از سلول‌های گامتی نر، آندروژنز وبرای گامت‌های ماده ژینوژنز گفته می‌شود (زمانی، ۱۳۹۵).تولید آزمایشگاهی دابل هاپلوییدهای آندروژنیک به دلایل متعددی نسبت به تولید دابل هاپلوییدهای ژنوژنیک موفق‌تر بوده است.

اول اینکه سلول‌های هاپلوئید نر به مراتب فراوان‌تر هستند. در یک گل هرمافرودیت مشخص، هزاران میکروسپور یا دانه گرده در هر یک از چندین بساک یک گل وجود دارد، در حالی که تنها یک مگاسپور عملکردی وجود دارد که باعث ایجاد شش سلول هاپلوئید در هر کیسه جنینی، از جمله سلول تخم، در هر تخمک می‌شود. گونه‌های مختلف ممکن است تعداد تخمک‌های متفاوتی در هر گل داشته باشند، و در برخی موارد ممکن است تا صدها تخمک وجود داشته باشد، اما این تعداد هرگز با تعداد بسیار زیاد گرده‌های تولید شده توسط یک گل قابل مقایسه نخواهد بود. دوم، سلول‌های هاپلوئید ماده در داخل تخمک‌ها محصور شده‌اند، که توسط لایه‌هایی از بافت‌های هسته و دیواره تخمک احاطه شده‌اند که این امر جنین‌های هاپلوئید تازه تشکیل شده را در فضای بسیار کوچکی محدود می کند و به موازات جنین بزرگ می شوند، در حالیکه در روش آندروژنیک جنین‌ها فقط باید بر سد تحمیل شده توسط دیواره‌های بساک غلبه کنند بنابراین، بیرون آمدن از بافت‌های اطراف برای رویان‌های ژنوژنیک مشکل‌تر خواهند بود، که باعث کاهش میزان موفقیت می‌شود (Jose M, et. 2021).

در اصلاح نباتات فناوری دابل هاپلوئید یک رویکرد بسیار مناسب برای صرفه جویی در زمان و هزینه‌های مربوطه، برای تولید لاین خالص کاملا هموزیگوت مشابه والدین است که برای تولید بذر هیبرید در مقیاس بزرگ توصیه می‌شود. علاوه بر این، تولید گیاهان دابل هاپلوئید در تحقیقات ژنتیکی کاربردی، از جمله تخمین نوقص نوترکیبی و نقشه‌برداری ژنتیکی صفات کیفی پیچیده، تثبیت ژن‌ها در لاین‌ها هموزیگوت، یا جهش‌یافته‌های مغلوب و غیره مفید محدود، هستند (شریعت پناهی، ۱۳۸۸). فناوری (دابل هاپلوئیدی) بر استفاده از سلول‌های هاپلوئید (عمدتا گامت‌های گیاهی یا سلول‌های اولیه آنها) به عنوان جنین هاپلوئید متکی است. دوبل شدن خود به خودی کرومزوم ها به ندرت و با نرخ پایینی در طبیعت اتفاق می افتد، و به همین دلیل است که چنین فرآیندی باید از طریق دستکاری تجربی القا شود تا نرخ آن افزایش یابد (شریعت پناهی، ۱۳۸۸).

روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوییدهای بسیار متنوع هستند. در یک طبقه بندی ساده آنها را به دو روش in vivo (روش هایی که در شرایط طبیعی انجام می شود) و in vitro (روش هایی که نیاز به کشت در شرایط آزمایشگاهی برخی از قسمت های گیاه دارند) تقسیم می کند. گونه‌هایی وجود دارند که به یکی از این روش‌ها یا هر دو روش پاسخ می‌دهند و برخی دیگر هستند که به هیچ یک از روش‌های موجود پاسخ نمی‌دهند که نیازمند تحقیقات بیش‌تر می‌باشد.

کاربرد هاپلوئیدها و دابل هاپلوییدها

گیاهان هاپلوئید با دو برابر کردن کروموزوم‌ها به گیاهان دابل هاپلوئید تبدیل می‌شوند. انواع کاربردهای هاپلوئیدهای مضاعف شده عبارتند از :

- ایجاد تنوع ژنتیکی از طریق اعمال جهش‌زاهای فیزیکی و شیمیایی در لاین‌های هاپلوئید و در ادامه مضاعف کردن تعداد کروموزوم‌های آنها
- تظاهر ژن‌های مغلوب در نسل‌های اولیه
- کوتاه کردن دوره تفکیک نسلهای در حال تفرق و رسیدن به خلوص کامل
- افزایش کارآیی انتخاب، به ویژه غربال کردن لاین‌ها در شرایط تنش‌های محیطی
- بازیابی تنوع F2 از طریق کشت میکروسپورهای گیاهان F1 (Forster and Thomas, 2005).

روش‌های تولید گیاهان دابل‌هاپلویید در فلفل

فلفل، در میان خانواده سولاناسه، از نظر سختی پاسخ‌دهی به نرزایی در رتبه سوم قرار دارد، با این حال پس از کشت بساک برای القا ء نرزایی، این روش بیشترین اثر بخشی را در زمینه آندروژنز داشته است (Simarro Seguí, 2011) , با اینکه از کشت بساک فلفل به عنوان یک ابزار در مطالعات پایه‌ای استفاده شده است، اما مهم‌ترین کاربرد آن، تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده به منظور استفاده در برنامه‌های اصلاحی و در ادامه کمک به تولید ارقام هیبرید تجاری با حداکثر هتروزیس بوده است (Simarro Seguí, al e. 2011). در این زمینه اولین گزارش تولید هاپلوئیدهای خود به خودی در گیاه فلفل در سال ۱۹۴۳ ارائه شد (Bamford and Christensen, 1943). تولید گیاهان دابل هاپلویید فلفل با روش‌های مختلفی ارزیابی شده است، اما در حال حاضر، کارآمدترین و جهانی ترین روش تا حد زیادی کشت بساک بر اساس استفاده از روش Dumas de Vaulx و همکاران(۱۹۸۱) است. این پروتکل (جدول ۱) منتشر شده در سال با ویژگی‌های هر زمینه فلفل خاص سازگار شده است (Mireia, et. 2021).

جدول ۱- پروتکل Dumas de Vaulx, شامل عناصر ماکرو و میکرو و ویتامین ها در دو محیط کشت R و C (Dumas de Vaulx, 1981)

	Milieu C	Milieu R
Macro-éléments (en mg/l) :		
KNO_3	2 150	2 150
NH_4NO_3	1 238	1 238
$MgSO_4, 7H_2O$	412	412
$CaCl_2, 2H_2O$	313	313
KH_2PO_4	142	142
$Ca(NO_3)_2, 4H_2O$	50	50
NaH_2PO_4, H_2O	38	38
$(NH_4)_2SO_4$	34	34
KCl	7	7
Micro-éléments (en mg/l) :		
$MnSO_4, H_2O$	22,130	20,130
$ZnSO_4, 7H_2O$	3,625	3,225
H_3BO_3	3,150	1,550
KI	0,695	0,330
$Na_2MoO_4, 2H_2O$	0,188	0,138
$CuSO_4, 5H_2O$	0,016	0,011
$CoCl_2, 6H_2O$	0,016	0,011
Vitamines et acides aminés (en mg/l) :		
méso-inositol	50,300	50,300
pyridoxine (HCl)	5,500	5,500
acide nicotinique	0,700	0,700
thiamine (HCl)	0,600	0,600
pantothénate de Calcium	0,500	0,500
vitamine B12	0,030	—
biotine	0,005	0,005
glycine	0,100	0,100
Fer chélaté (en mg/l) :		
Na_2E.D.T.A.	18,65	18,65
$FeSO_4, 7H_2O$	13,90	13,90
Additifs (en g/l) :		
saccharose	30	30
agar	8	8
pH ajusté à :	5,9	5,9

- کشت بساک و میکروسپور

در کشت بساک در یک مرحله حساس و کوتاه بساک‌ها از گیاه جدا شده و روی یک محیط کشت مناسب قرار می گیرند. مرحله زمانی برداشتن بساک‌ها برای القای هاپلوئیدی بسیار حساس است و یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده در تعیین میزان موفقیت در تولید جنین از کشت بساک می باشد و بر اساس نظرات بعضی محققین، مناسب‌ترین بساک‌ها، آنهایی هستند که هنگام جداسازی حاوی میکروسپورهای تک هسته‌ای (مرحله قبل از اولین تقسیم میتوز دانه گرده) باشند. کشت بساک با وجود کاربردهای فراوان، مشکلاتی نیز دارد. بافت دیواره اسپروفیتی بساک در روند جنین زایی به صورت مفید و یا بازدارنده اثر گذار است و در نهایت مطالعات را روی مکانیزم القاء جنین زایی میکروسپور مشکل می‌سازد. جذب مواد غذایی به وسیله میکروسپور در بساک‌های کشت شده بستگی به موقعیت آن‌ها در بساک‌ها دارد که در نتیجه یک انتخاب نامطلوب را بین میکروسپورها باعث می‌شود. موادی که به وسیله دیواره بساک آزاد می شود ممکن است باعث بازدارندگی یا پشتیبانی جنین زایی شود. همچنین دیواره‌ی بساک هاپلوئید نبوده و باعث تولید گیاهان دیپلوید می‌شود. کشت میکروسپور به لحاظ مزایای آن نسبت به کشت بساک، مورد توجه قرار گرفته است. در این روش امکان بازیافت تعداد زیادی گیاهان هاپلوئید وجود دارد. علیرغم پیچیدگی

تکنیکی که روش کشت میکروسپور دارد، بخصوص استخراج میکروسپورها، این روش مشکلات ناشی از کشت بساک را تا حدودی بر طرف نموده است (عنایتی شریعت پناهی، م.، امامی میبدی، د. ۱۳۸۸).

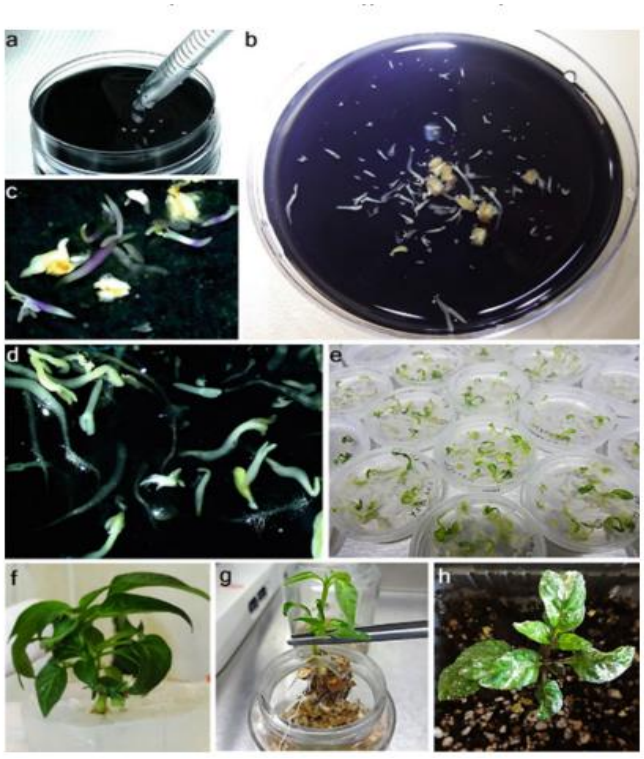
- کشت میکروسپور ریخته شده (Shed-Microspore Culture)

این روش جایگزین سیستم‌های مختلف کشت بساک و میکروسپور، برای ایجاد یک روش کارآمد در تولید دابل هاپلوییید فلفل تند اندونزیایی (Capsicum annuum L) شد که از روش‌های گزارش شده قبلی بهتر عمل کرد.

عوامل مهم پروتکل عبارتند از:

- انتخاب جوانه های گل با بیش از ۵۰ درصد میکروسپورهای تک سلولی دیررس
- یک روز پیش تیمار جوانه ها در دمای چهار درجه سانتی گراد
- کشت بساک ها در سیستم محیطی دو لایه به مدت یک هفته در دمای نه درجه سانتی گراد. C و پس از آن در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در تاریکی مداوم.
- محیط حاوی اجزای Nitsch و ۲٪ مالتوز، با ۱٪ زغال چوب فعال در زیر لایه‌ی جامد و ۲,۵ میکرومولار
- زاتین و ۵ میکرومولار ایندول-۳ استیک اسید در لایه بالایی مایع.

در این بررسی تمام ده ژنوتیپ فلفل تند مورد آزمایش، به این پروتکل پاسخ دادند. بهترین ژنوتیپ‌ها در هر جوانه گل اصلی چهار تا هفت گیاه تولید کردند(شکل ۱) (supena, et. 2006).



شکل ۱- مراحل کشت (a)، جنین‌زایی (b)، باززایی (c, e و d) و سازگار کردن (f، g، h) گیاه فلفل در روش کشت میکروسپور ریخته شده

نتیجه گیری

روش کشت میکروسپور ریخته شده قابل بهینه سازی برای انواع رقم‌های فلفل می‌باشد و در محیط کشت از دو فاز جامد و نیمه مایع استفاده شده است. در این روش بساک‌ها بعد از جداسازی از محور گل در محیط جامد قرار داده شده و روی آنها یک محیط نیمه مایع ریخته می‌شود. بساک‌ها بعد از چند روز باز شده و میکروسپورها در محیط نیمه مایع پخش می‌شوند که بعد از دو یا سه هفته میکروسپورها شروع به کالوس زایی و باززایی می‌کنند. در این پروتکل میکروسپورها از صدمات مکانیکی که در استخراج میکروسپور و همچنین عوامل بازدارنده که در دیواره‌ی بساک برای میکروسپورها وجود داشت به دور می‌مانند و همین عامل می‌تواند سبب جنین زایی و باززایی بیشتر شده و متعاقباً امکان تولید گیاهان هاپلویید و دابل هاپلویید را بالا ببرد.

منابع:

۱- زمانی، م، معینی، ا. چوکان، ر. ۱۳۹۵. بررسی آندروژنز (کشت بساک و میکروسپور) هیبریدهای تجاری فلفل فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum L.*) پایان نامه‌ی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی تربیت مدرس تهران

۲- عنایتی شریعت پناهی، م.، امامی میبدی، د. ۱۳۸۸. میکروسپور: سلولی هاپلوئید با کاربردهای متنوع در ژنتیک و اصلاح نباتات. انتشارات ژنتیک نوین، شماره ۳. صفحه ۱۳-۵.

3- Dumas de Vaulx,R., Chambonnet, D., Pochard, E. 1981. Culture in vitro d'anthe`res du piment (*Capsicum annuum L.*): ame´lioration des taux d'obtention de plantes chez diffe´rents ge´notypes par des traitements a` +35C. Agronomie 1:859–864

4- Forster, B. P., Thomas, W. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. Plant Breeding Reviews, 25: 57–88.

5- Jose, M., Seguı´-Simarro (ed). 2021. Doubled Haploid Technology: Volume 2: Hot Topics, *Apiaceae, Brassicaceae,* Solanaceae, Methods in Molecular Biology, vol. 2288, part of Springer Nature 2021 https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1335-1_17,

6- Mireia A, P, J., Seguı´-Simarro, M. 2021. Anther Culture in Sweet Pepper (*Capsicum annuum L.*) Methods in Molecular Biology, vol. 2288, part of Springer Nature https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1335-1_17,

7- Seguí-Simarro, J, M. 2016. Androgenesis in solanaceae. In Vitro embryogenesis in higher plants. Springer, 209–244.

8- Seguí-Simarro, J., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., González-García, B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. Plant Cell Reports, 30: 765–78.

9- Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers J. B. M. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum L.*). Plant Cell Reports, 25: 1–10

مهری برومند
کارشناس خاکشناسی مرکز تحقیقات کاربردی
و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

تغذیه و توصیه کودی کلزا

Canola nutrition and fertilizer recommendations

مقدمه

در اکثر کشورهای پیشرفته، در مزارع کلزا به طور معمول، عملکردهای بالا با مصرف سطح بالاتر کود حسب نیاز گیاه به دست می‌آید. اما همبستگی دقیقی بین نیاز کودی کلزا و عملکرد آن وجود ندارد. در کانادا محدودیت‌های آب و هوایی در زراعت کلزا موجب کاهش عملکرد می‌گردد. این در حالی است که عملکرد پایین را در برخی از کشورهای در حال توسعه بوسیله کودهای شیمیایی و اصلاح سایر روشها می‌توان بهبود بخشید (احمدی و جاویدفر، ۱۳۷۷).

زمان و روش مناسب مصرف کودهای شیمیایی می‌تواند نقش موثری در افزایش کارایی مصرف کود و دستیابی به حداکثر عملکرد داشته باشد بنابراین میزان، نوع، زمان و نحوه مصرف کود باید با توجه به نوع گیاه زراعی تعیین گردد. آزمایش خاک زمین زراعی موثرترین روش برای تخمین نیاز غذایی و کودی گیاه زراعی می‌باشد(مصطفوی راد و همکاران،۱۳۹۷). در جدول ۱ حدود غلظت بحرانی عناصر غذایی در خاکهای زیر کشت کلزا ذکر شده است. اگر غلظت عناصر در خاک به پایین‌تر از حد بحرانی آن برای هر عنصر برسد گیاه علائم کمبود را نشان داده و با کاهش عملکرد مواجه خواهد شد.

جدول ۱ -حد بحرانی عناصر غذایی (میلی‌گرم در کیلوگرم) در خاک های زیر کشت کلزا (نورقلی پور و همکاران ،۱۳۹۳)

فسفر	پتاسیم	آهن	روی	منگنز	مس	بور
۱۵	۲۰۰	۵	۱	۵	۰/۸	۰/۸

در صورت دسترسی به آزمون خاک و مقدار عناصر غذایی موجود درخاک می توان برحسب مقدار محصول مورد انتظار میزان کودهای لازم را تعیین نمود. با استفاده از جداول ۴-۲ می‌توان میزان کود مورد نیاز برای گیاه کلزا را در محدوده اقلیمی سواحل دریای خزر برآورد کرد.

جدول ۲ -توصیه کودی اوره (کیلوگرم در هکتار) برای کلزا در اقلیم سواحل دریای خزر (نورقلی پور و همکاران ،۱۳۹۳)

عملکرد	درصد کربن آلی خاک						
(Kg/ha)	۰/۳-۰/۱	۰/۶-۰/۳	۰/۶-۰/۹	۰/۶-۰/۹	۱/۲-۰/۹	۱/۵-۱/۲	۱/۸-۱/۵
۲۲۰۰	۳۳۰-۲۹۰	۲۹۰-۲۵۰	۲۳۰-۲۱۵	۲۰۰-۱۹۰	۱۸۵-۱۷۵	۱۸۵-۱۷۵	۱۷۰-۱۶۰
۲۶۰۰	۳۷۰-۳۳۰	۳۳۰-۲۹۰	۲۷۰-۲۳۰	۲۱۰-۲۰۰	۲۰۰-۱۸۵	۲۰۰-۱۸۵	۱۸۰-۱۷۰
۳۰۰۰	۴۱۰-۳۷۰	۳۷۰-۳۳۰	۳۱۰-۲۷۰	۲۵۰-۲۱۰	۲۰۵-۲۰۰	۲۰۵-۲۰۰	۱۹۰-۱۸۰

۲۱۵-۱۹۰	۲۳۰-۲۰۵	۲۳۰-۲۰۵	۲۹۰-۲۵۰	۳۵۰-۳۱۰	۴۱۰-۳۷۰	۴۵۰-۴۱۰	>۳۴۰۰

جدول ۳ - توصیه کود فسفری مورد نیاز کلزا برای اقلیم سواحل دریای خزر(کیلوگرم دی آمونیوم فسفات یا سوپرفسفات تریپل در هکتار)(نورقلی پور و همکاران ،۱۳۹۳)

عملکرد مورد انتظار (Kg/ha)	فسفر قابل استفاده خاک به روش اولسن(میلی‌گرم در کیلوگرم)			
	۳-۱	۷-۳	۱۱-۷	۱۵-۱۱
۱۰۰۰	۱۳۰-۱۰۰	۱۰۰-۵۰	۵۰	۵۰-۰
۱۴۰۰	۱۶۰-۱۳۰	۱۳۰-۷۰	۷۰-۵۰	۵۰-۰
۱۸۰۰	۱۹۰-۱۶۰	۱۶۰-۱۰۰	۱۰۰-۵۰	۵۰
۲۲۰۰	۲۱۰-۱۹۰	۱۹۰-۱۳۰	۱۳۰-۷۰	۷۰-۵۰
۲۶۰۰	۲۳۰-۲۱۰	۲۱۰-۱۶۰	۱۶۰-۱۰۰	۱۰۰-۵۰
۳۰۰۰	۲۴۰-۲۳۰	۲۳۰-۱۹۰	۱۳۰-۱۹۰	۱۳۰-۷۰
>۳۴۰۰	۲۵۰-۲۴۰	۲۴۰-۲۱۰	۲۱۰-۱۶۰	۱۰۰-۱۶۰

جدول ۴ - توصیه کود پتاسیمی مورد نیاز کلزا در اقلیم سواحل دریای خزر(کیلوگرم سولفات پتاسیم در هکتار) (نورقلی پور و همکاران ،۱۳۹۳)

عملکرد مورد انتظار(کیلوگرم در هکتار)	پتاسیم قابل استخراج توسط روش استات آمونیوم (میلی‌گرم در کیلوگرم)					
	<۴۰	۸۰-۴۰	۱۲۰-۸۰	۱۶۰-۱۲۰	۲۰۰-۱۶۰	۲۲۰-۲۰۰
۲۵۰۰	۲۰۰	۲۰۰-۱۷۰	۱۷۰-۱۴۰	۱۲۰-۸۵	۷۰-۴۰	۲۵
۳۰۰۰	۲۲۵	۲۲۵-۱۹۵	۱۹۰-۱۶۰	۱۴۰-۱۰۵	۸۰-۵۰	۳۵
۳۵۰۰	۲۵۰	۲۴۰-۲۱۵	۲۱۰-۱۸۰	۱۶-۱۲۵	۹۰-۶۰	۴۵
≥۴۰۰۰	۲۷۵	۲۴۵	۲۱۵	۱۶۵	۱۰۵	۵۵

تذکر: اعداد جداول فوق برای خاکهای با بافت سبک تا متوسط است. در خاکهای با بافت سنگین(مقدار رس بیش از ۳۰ درصد) مقدار ۱۰ درصد به ارقام فوق اضافه می‌گردد.

در صورت عدم دسترسی به نتایج آزمایش خاک می‌توان براساس میزان تولید گندم در منطقه، نیاز کودی کلزا را کمی بیش از گندم تعیین نمود. نیاز کلزا به کودهای نیتروژنه، فسفاته و پتاسه حدود ۲۵ درصد بیشتر از گندم می‌باشد.

جدول ۵ مقادیر پیشنهادی کودها را در صورت عدم دسترسی به آزمون خاک نشان می‌دهد.

جدول ۵- توصیه کودی برای گیاه کلزا در صورت عدم انجام آزمون خاک (رامئه و همکاران، ۱۴۰۱)

نام محصول	مراحل فنولوژی	مقدار مصرف کود
کلزا	مرحله کاشت (قبل از جوانه زنی)	۵۰کیلوگرم در هکتار کود اوره + ۵۰ الی ۷۵ کیلوگرم سوپر فسفات تریپل در هکتار + ۵۰ کیلوگرم سولفات پتاسیم
	۶ برگی و در صورت وقوع روزت (بعد از مرحله روزت)	اوره به میزان ۵۰ الی ۷۵ کیلوگرم در هکتار
		محلولپاشی منو پتاسیم فسفات به همراه منو آمونیوم فسفات هر کدام به میزان ۱/۵ کیلوگرم در هکتار همراه با اوره به میزان ۱ کیلوگرم در هکتار و فولویک اسید به میزان ۲ در هزار (مصرف ۴۰۰ لیتر آب در هکتار)
	ظهور ساقه گل دهنده	اوره به میزان ۷۵ الی ۱۰۰ کیلو در هکتار + کلرور پتاسیم به میزان ۵۰ الی ۷۵ کیلوگرم در هکتار
		محلول‌پاشی نیترات پتاسیم به میزان ۳ کیلو در هکتار به همراه محلول پاشی روی مایع به میزان ۲ در هزار (مصرف ۴۰۰ لیتر آب در هکتار)
	غنچه دهی	مصرف اوره به میزان ۵۰ الی ۷۵ کیلوگرم در هکتار+ ۵۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم+ کلرور پتاسیم به میزان ۵۰ الی ۷۵ کیلوگرم در هکتار

به طور کلی، برای دستیابی به حداکثر عملکرد دانهٔ کلزا ۱۰۰ تا ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار نیاز است و بیشترین مقدار جذب آن در کلزا تا زمان گلدهی می‌باشد(مصطفوی راد و همکاران،۱۳۹۷). چنانچه دورهٔ رشد و نمو گیاه را به چهار دوره

جوانه زدن تا تشکیل روزت، ساقه رفتن، گلدهی و رسیدگی تقسیم کنیم بیشترین نیاز گیاه به نیتروژن در مرحله ساقه رفتن و سپس گلدهی است (رامئه و همکاران، ۱۴۰۱)

در زمان کاربرد کودها باید توجه داشت که بذر کلزا نسبت به کودهای نیتروژنه و محل قرار گیری آنها ممکن است واکنش شدیدی نشان دهد لذا بهتر است در ردیفهایی با فاصله ۲/۵ سانتی‌متری از ردیف کاشت بذور کلزا جایگذاری شوند (مصطفوی راد و همکاران،۱۳۹۷)

از آنجایی که فسفر تحرک کمی دارد در معرض آبشویی نیز قرار نمی‌گیرد. بیشترین قابلیت استفاده کودهای فسفره بلافاصله بعد از کاربرد بوده و کلزا در مراحل اولیه‌ی رشد خود به سرعت این عنصر را جذب می‌کند. این جذب تا هشت هفته ادامه دارد در نتیجه فسفر هم زمان با کاشت باید مصرف گردد(نورقلی پور و همکاران، ۱۳۹۳). به ترتیب حدود ۵۰ و ۳۰ کیلوگرم فسفر برای تولید ۲ تن کلزا و گندم لازم است و در خاکهای آهکی و اسیدی این مقدار به ۶۰ تا ۸۰ کیلوگرم فسفردر هکتار قابل افزایش است. همانطور که در بالا اشاره شد به دلیل حساسیت کلزا به کاربرد توام کود با بذر از یک طرف و تحرک کم فسفر در خاکهای زراعی از طرف دیگر، بهتر است کودهای فسفاته به صورت نواری در فاصله ۲/۵سانتیمتری زیر یا کنار ردیفهای کاشت بذور کلزاجایگذاری شوند تا عملکرد بهتری به دست آید (مصطفوی راد و همکاران،۱۳۹۷). در خاکهای آهکی کاربرد کودهای فسفره به صورت نواری و در زیر بذر بسیار مفید است زیرا سطح تماس کود و خاک را کم کرده و سرعت تبدیل فسفر به ترکیبات با حلالیت پایین را کاهش می‌دهد. بدین ترتیب میتوان از میزان مصرف کود تا نصف مقدار آن کا هش داد. در غیر این صورت بهترین روش مصرف، پخش سطحی و دیسک زدن است (نورقلی پور و همکاران، ۱۳۹۳). همانگونه که در جدول ۱ ذکر شد حد بحرانی مقدار پتاسیم به منظور دستیابی به حداکثر عملکرد حدود ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک است. برای تولید سه تن کلزا در خاکی با مقدار پتاسیم کمتر از ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک، حدود ۱۵۰ کیلوگرم($K2O$) در هکتار لازم است. در صورت کمبود شدید پتاسیم، مصرف کودهای پتاسیمی به صورت کود پایه و سرک توصیه می‌گردد. جهت افزایش کارایی کودهای پتاسه بهتر است در زیر و کنار ردیفهای کاشت بذور کلزا قرار گیرند(مصطفوی راد و همکاران،۱۳۹۷).

گوگرد چهارمین عنصر غذایی است که برای رشد کافی و مناسب کلزا ضروری بوده و کمبود آن حتی پیش از آنکه علائم کمبود در کلزا ظاهر شود سبب کاهش شدید عملکرد می‌گردد. مصرف مقدار مناسبی از گوگرد میتواند سبب افزایش حدود چهار برابری عملکرد کلزا گردد. کمبود گوگرد در کلزا بیشتر در اوایل غنچه‌دهی و مرحله گلدهی مشاهده می‌گردد. کاربرد مقدار ۵۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد برای کلزا پیشنهاد شده است (نورقلی پور و همکاران، ۱۳۹۳). در صورت در دسترس بودن کود سولفات آمونیوم می‌توان ۱۰۰کیلوگرم در هکتار از آن را جایگزین ۵۰ کیلوگرم در هکتار کود اوره در مرحله سرک اول و دوم نیتروژن نمود. چنانچه از شکل سولفات عناصر برای جبران کمبودها در خاک مثل سولفات پتاسیم، منیزیم، روی، منگنز، و مس استفاده شود

می‌تواند گوگرد مورد نیاز گیاه را نیز تامین کند.لازم به ذکر است که کود گوگرد به شکل پودری، بنتونیتی یا در ترکیب با مواد آلی قبل از کشت باید مصرف گردد(شیرانی راد و همکاران، ۱۳۹۹).

مقدار کل منیزیم مورد نیاز کلزا نسبت به عناصر اصلی و مواد غذایی ثانویه اندک است به طوری که در زراعتهای مطلوب کلزای پاییزه حداکثر ۳۰ تا ۴۰ کیلوگرم در هکتار منیزیم جذب میکنند. میانگین میزان منیزیم در کل گیاه به طور طبیعی در محدوده ۰/۴ تا ۰/۱۵ درصد ماده خشک است(احمدی و جاویدفر، ۱۳۷۷).

کلسیم به مقدار زیاد و تقریبا به اندازه ازت و پتاسیم توسط کلزا جذب مشود. البته کلسیم مورد نیاز کلزا از مقادیر زیاد کلسیم محلول موجود در خاک تقریبا به آسانی تامین میگردد و زراعت معمولا مشکلی در تهیه این ماده ندارد(احمدی و جاویدفر، ۱۳۷۷).

کمبود روی از شایع‌ترین کمبودهای عناصر غذایی ریزمغذی در جهان بوده و در بخش‌های وسیعی از خاک‌های مناطق مختلف دنیا مشاهده می‌گردد. کلزا در مقاسیه با غلات دانه ریز نظیر گندم به مقادیر بالاتری از روی نیاز داشته و ممکن است دو برابر غلات از خاک روی جذب کند. حد مطلوب عنصر روی درگیاه کلزا ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم برای دستیابی به عملکرد مناسب دانه گزارش شده است. هنگامیکه مقدار عنصر روی در گیاه کلزا به ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم برسد، به نظر می‌رسد مصرف خاکی و یا محلولپاشی سولفات روی لازم باشد. چنانچه مقدار روی در خاک کمتر از یک میلی‌گرم بر کیلوگرم باشد، کود سولفات روی ترجیحا به صورت نواری مصرف گردد. بدین ترتیب می‌توان ضرورت و مقدار کاربرد کودهای حاوی عنصر روی را بر اساس نتایج آزمون خاک زمین زراعی و یا اندازه گیری مقدار روی در بافت گیاه تعیین نمود. در خاکهای قلیایی پیشنهاد می‌گردد سولفات روی در خاک تحت الارض به میزان ۴۰ تا ۸۰ کیلوگرم در هکتار به صورت مصرف خاکی و به شکل نواری و همچنین دو بار به صورت محلولپاشی به ترتیب در مرحله خروج از روزت (آغاز ساقه‌دهی) و قبل از گلدهی جهت دستیابی به حداکثر عملکرد دانه کلزا مصرف گردد (مصطفوی راد و همکاران،۱۳۹۷).

در موارد کمبود شدید عناصر کم مصرف به ویژه روی مصرف خاکی و محلول‌پاشی هر دو توصیه می‌گردد. محلول پاشی با غلظت سه تا پنج در هزار سولفات روی همانطور که ذکر شد می‌تواند در دو مرحله خروج از روزت و قبل از گلدهی انجام گرفته و ۳۰ کیلوگرم در هکتار نیز به صورت خاکی اعمال گردد (نورقلی‌پور و همکاران، ۱۳۹۳).

در مناطق دچار کمبود، کاربرد کلات آهن توصیه می شود اما گرانی این نوع از کودها سبب محدودیت مصرف آن می گردد. انواع دیگری از کودها مانند سولفات آهن نیز در خاک قابل استفاده است اما این نوع کودها در خاکهای آهکی کارآیی چندانی ندارد. لذا توصیه می‌گردد از محلولپاشی ترکیبات حاوی آهن استفاده گردد. محلولپاشی گیاهان دچار کلروز در ۲-۳ نوبت با فاصله ۱۵ روز با محلول چهار در هزار سولفات آهن(۴ کیلوگرم سولفات آهن ($FeSo4$) در 1000 لیترآب) به همراه سیتویت

یا چند قطره مایع ظرفشویی بسیارمؤثر است. استفاده از غلظتهای بالاتر توصیه نشده و اغلب موجب سوختگی برگها میگردد. در صورت بروز علایم کمبود و ظهور زردی، محلول‌پاشی باید چندین بار انجام گیرد پس بهتر است محلول‌پاشی پیش ظهور زردی در گیاه صورت پذیرد (نورقلی‌پور و همکاران، ۱۳۹۳).

در مورد منگنز نیز در شرایطی که کمبود آن وجود داشته باشد دادن سولفات منگنز به خاک می تواند مؤثر واقع شود ولی محلول‌پاشی آن کارایی بیشتری دارد. معمولاً محلول پاشی ۱۰کیلوگرم سولفات منگنز در هنگامی که بوته ها ۳۰ درصد زمین را پوشانده باشند کافی است اما در موارد کمبود شدید منگنز در زراعتهای پاییزه، محلول پاشی مجدد در اوایل بهار ممکن است ضروری باشد (احمدی و جاویدفر، ۱۳۷۷)

کمبود مس در کلزا به ندرت رخ داده و بیشتر در خاکهای شنی و گچی با مقدار ماده آلی زیاد و برخی خاکهای پیتی رخ میدهد. کلزا در مقایسه با دیگر گیاهان زراعی نظیر گندم، جو، چاودار و کتان قابلیت تحمل بیشتری در برابر کمبود عنصر مس دارد. غلظت بحرانی عنصر مس در کلزا حدود ۲ تا ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک گیاه است. جهت رفع کمبود مس میتوان از محلول پاشی سولفات مس یا اکسی کلرید مس که حاوی یک کیلوگرم در هکتار مس باشد استفاده نمود. بهتر است محلول پاشی در اوایل رشد بوته‌ها ترجیحا در مرحله روزت و هنگامی که بوته ها ۱۰ سانتی متر ارتفاع دارند صورت گیرد(مصطفوی راد و همکاران،۱۳۹۷؛ احمدی و جاویدفر، ۱۳۷۷).

معمولا خاکهایی با مقدار کمتر از ۰/۸ میلی‌گرم در کیلوگرم برُ دچار کمبود این عنصر بوده و مصرف مقدار ۱۰- ۱۵ کیلوگرم در هکتار اسیدبوریک به صورت پخش یکنواخت توصیه میگردد. هرگز برُ به صورت نواری استفاده نگردد. توجه داشته باشید که چنانچه بیشتر از مقدار مورد نیاز بور مصرف گردد برای گیاه ایجاد سمیت خواهد کرد لذا تأکید می شود که فقط در صورت کمبود برُ در خاک آنرا مصرف نمایید. در توصیه کودی برُ علاوه بر مقدار آن در خاک خصوصا در خاکهای شور، مقدار آن در آب آبیاری نیز باید در نظر گرفت چون ممکن است مقدار آن در آب آبیاری سبب جبران کمبود آن در خاک شود(نورقلی‌پور و همکاران، ۱۳۹۳).

در صورت وجود کمبود همزمان چند عنصر میکرو، بهتر است کود کامل میکرو مصرف گردد البته در اراضی شور توجه شود که بدون عنصر بُر باشد.

استفاده از کودهای آلی نیز می‌تواند علاوه بر بهبود وضعیت فیزیکی خاک، بخشی از نیازهای غذایی گیاه را هم تامین نماید. این کودها میتوانند منشا گیاهی یا جانوری داشته و یا مخلوطی از آنها باشد. مقدار مصرف کود آلی بستگی به درجه پوسیدگی، میزان عناصر غذایی، نسبت کربن به نیتروژن و نوع آن دارد. در صورتیکه کود آلی پوسیده نباشد بهتر است چند ماه قبل‌تر با خاک مخلوط و با اعمال رطوبت مناسب پوسانده شود .اگر کود آلی درجه رسیدگی کافی داشته باشد میتوان همزمان با کشت آن را مصرف کرد. بهتر است کود آلی در عمق مؤثر ریشه با خاک کاملاً مخلوط شود.

در ادامه (جدول ۶) تقویم کوددهی پیشنهادی کلزا منطبق بر مراحل فنولوژیکی آن آورده شده است.

جدول ۶-تقویم کوددهی پیشنهادی کلزا منطبق بر مراحل فنولوژیکی(نورقلی‌پور و همکاران،۱۳۹۳)

نوع کود	مراحل رشد فنولوژیکی					
	قبل از کشت	دانه رست	خروج از روزت	ساقه دهی	غنچه دهی	گلدهی
کوددهی نیتروژن	۳۰ درصد توصیه			۳۵ درصد توصیه	۳۵ درصد توصیه	
کوددهی فسفر	۱۰۰ درصد توصیه ترجیحا به صورت نواری					
کوددهی پتاسیم	۱۰۰ درصد توصیه ترجیحا به صورت نواری					
کودهای آلی	توسط دیسک با خاک مخلوط شود					
کودهای زیستی	بذرمال					
کودهای حاوی عناصر ریز مغذی			محلول پاشی		محلول پاشی	
اسید هیومیک		کودآبیاری		محلول پاشی		کود آبیاری
محرک‌های رشد گیاهی				محلول پاشی		
کودهای محلول پتاسیم بالا					محلول پاشی	
کودهای محلول فسفر بالا			محلول پاشی			

منابع:

۱. احمدی، م.ر.، جاویدفر، ف. ۱۳۷۷. تغذیه گیاه روغنی کلزا. کمیته دانه‌های روغنی. ۱۹۴ صفحه.

۲. شیرانی‌راد، ا.ح.، علیزاده، ب.، امیری اوغان، ح.، جباری، ح.، رودی، د.، کیهانیان، ع.ا.، رحمانپور، س.، نورقلی‌پور، ف.، ایوانی، ا.، ملک احمدی، ه.، رضوی، ر.، دولت پرست، ب. ۱۳۹۹. دستورالعمل فنی تولید کلزا در کشور. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. ۳۲ صفحه.

۳. رامئه، و.، دلیلی، ع.، رمضانپور، م. براری، ح.، نورعلیزاده، م. ۱۴۰۱. توصیه های فنی کشت کلزا. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران. ۱۵ صفحه.

۴. مصطفوی راد، م.، نوبهار، ا.، محبوب خمامی، ع. ۱۳۹۷. مدیریت تغذیه در زراعت کلزا. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان. ۲۴ صفحه.

۵. نورقلی‌پور، ف.، رضایی، ح.، میراشاهی، ک.، غیبی، م.ن.، حقیقت‌نیا، ح.، رمضانپور، م.ر.، ارزانش، م.ح.، اسدی رحمانی، ه.، میرزاپور، م.ه.، زمانی، ص.، محمدی کیا، ر.، طهرانی، م. ۱۳۹۳. دستورالعمل مدیریت تلفیقی حاصلخیزی خاک و تغذیه کلزا. موسسه تحقیقات خاک و آب کشور. ۵۵ صفحه.

Oilseeds Research and Development Company

Quarterly journal of

Iranian north seed extender center

Current Issue: Number 9, Feb 2023

Language: Farsi(Persian)

Publisher:

Oilseeds Research & Development Company

Certification No: 88688

Director- in- charge: Ali Zamanmirabadi

Editor- in- chief: Mitra Ramezani

www.takato.ir **info@takato.ir**

Phone: +981133434968 **Fax:** +981133434968

takatoservice takato.genebank www.takato.ir www.ordc.ir