

خودناسازگاری گرده و تعیین گرده‌دهنده مناسب برای به (*Cydonia oblonga* Mill.) رقم اصفهان

## Pollen Self-incompatibility and Determination of Appropriate Pollinizer for Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Cultivar Isfahan

حسن اکبری بیشه<sup>۱</sup>، حمید عبداللهی<sup>۲</sup>، محمد ترکاشوند<sup>۳</sup> و ایوبعلی قاسمی<sup>۴</sup>

۱ و ۴- به ترتیب کارشناس ارشد و استادیار، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران  
۲- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران  
۳- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم باغبانی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۳

### چکیده

اکبری بیشه، ح.، عبداللهی، ح.، ترکاشوند، م. و قاسمی، ا. ۱۳۹۵. خودناسازگاری گرده و تعیین گرده‌دهنده مناسب برای به (*Cydonia oblonga* Mill.) رقم اصفهان. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۲: ۲۶-۱۳.

بررسی و مقایسه پتانسیل عملکرد علوفه و صفات مورفولوژیک ارقام وارداتی با ارقام رایج شبدر برسیم می‌تواند به تنوع در بین ارقام شبدر برسیم و افزایش تولید علوفه در کشور کمک کند. این پژوهش در قالب در کشور ما رقم غالب درخت به، رقم اصفهان است که این رقم عمدتاً تشکیل میوه نسبتاً کم و تراکم بار محدودی در باغ‌های فاقد رقم گرده‌زا دارد. به منظور بررسی سطح خودناسازگاری و تعیین بهترین ژنوتیپ گرده‌دهنده برای رقم تجارتي به اصفهان، در این تحقیق اثر دانه گرده چهار ژنوتیپ به، به عنوان رقم گرده‌دهنده بر درصد تشکیل میوه و خصوصیات کمی و کیفی میوه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در اصفهان به مدت سه سال (۱۳۸۵ تا ۱۳۸۷) مورد مطالعه قرار گرفت. رقم به اصفهان با چهار ژنوتیپ گرده‌دهنده شامل NB4 و PK2، KVD2، KM1 به همراه تیمار خود گرده‌افشانی و گرده‌افشانی آزاد به عنوان شاهد، گرده‌افشانی شد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین درصد تشکیل میوه، بین تیمارهای گرده‌افشانی، به جزء دو تیمار گرده‌دهنده KVD2 و NB4 اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیش‌ترین میزان تشکیل میوه در به اصفهان با ۲۳/۴۲ درصد مربوط به ژنوتیپ KM1 و کم‌ترین میزان تشکیل میوه با ۸/۴ درصد مربوط به تیمار خود گرده‌افشانی بود. مقایسه میانگین اثر تیمارهای گرده‌افشانی بر وزن میوه بیانگر اختلاف معنی‌داری تیمار گرده ژنوتیپ KM1 با سایر تیمارها بود. ژنوتیپ KM1 با هم پوشانی گلدهی مطلوب و بالاترین درصد تشکیل میوه و همچنین بیش‌ترین تعداد بذر به ازاء میوه، به عنوان بهترین گرده‌دهنده برای به رقم اصفهان شناسایی شد. بررسی وجود آلل‌های S در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه حاکی از تکثیر آلل‌های این مکان ژنی در اغلب ژنوتیپ‌ها بود، لیکن استفاده از ژنوتیپ‌های دارای دو آلل S شامل دو ژنوتیپ KM1 و NB4، تشکیل بذر بیش‌تری را در میوه‌های به رقم اصفهان به همراه داشت.

واژه‌های کلیدی: به، ژنوتیپ، گرده‌افشانی، آلل S، نیمه‌خودسازگاری.

## مقدمه

طعم خاص بافت آن بوده و به همین دلیل بیش از سایر ارقام بومی و محلی به مورد توجه قرار گرفته است (منیعی، ۱۹۹۴).

بررسی اجمالی باغ‌های به، نشان می‌دهد که در این درخت نیز همانند سایر درختان میوه دانه‌دار تولید شکوفه به وفور و تشکیل میوه با فراوانی پائین تری صورت انجام می‌شود. بدون شک میزان تولید میوه در درخت به نوع رقم، سال و شرایط خاص آن باغ وابسته است. بندک و همکاران (Benedek *et al.*, 2001) در بررسی روی میزان تشکیل میوه و ریزش‌های مختلف میوه به رقم اکمک در منطقه وان ترکیه، میزان تشکیل میوه نهائی را در این رقم طی دو سال به ترتیب ۱۲/۳ و ۸/۶ درصد گزارش کردند. بر اساس بررسی آن‌ها میزان تبدیل شکوفه به میوه در محدوده ۲۰ تا ۲۵ درصد برای باردهی مطلوب درخت به مناسب است. عوامل متعددی در باردهی درخت به موثر است، لیکن در کنار عوامل اولیه نظیر سلامت و تغذیه درخت، دو عامل شامل ساختار باردهی و پراکنش تولید شاخه‌های بارده یا اسپورها (Alipour *et al.*, 2014) و گرده‌افشانی کافی (Benedek *et al.*, 2001) از اهمیت بیش تری برخوردار است. بر اساس تحقیق دری و همکاران (Déri *et al.*, 2006) روی تولید شهد در شکوفه‌های درخت به، گزارش شده که گلوکز، فروکتوز و ساکاروز سه قند اصلی شهد شکوفه‌های این درخت بوده و ساکاروز به عنوان قند غالب شهد تشخیص

درخت به با نام علمی *Cydonia oblonga* Mill. متعلق به خانواده گل‌سرخیان (Rosaceae) و زیرخانواده دانه‌داران (Pomoideae) است (Westwood, 1993). این گونه به صورت وحشی و یا نیمه اهلی در جنگل‌های شمال ایران از آستارا تا کتول گرگان گسترده شده است (Sabeti, 1995). در بین انواع درختان میوه دانه‌دار مورد کشت و کار در مناطق مختلف کشور، درخت به و میوه آن به دلیل تنوع ژنتیکی و کیفیت میوه از جایگاه ویژه‌ای برخوردار بوده و در کم‌تر کشوری چنین گستره تولید و تنوع ارقام و ژنوتیپ‌های آن قابل مشاهده است. از جمله مهم‌ترین ارقام بومی گزینش شده به در کشور می‌توان به ارقام اصفهان گورتون، شمس، نیشابور و ترش آذربایجان اشاره کرد که از میان این ارقام، به اصفهان از نظر کیفیت میوه، بیش از سایر ارقام مورد استقبال قرار گرفته و به عنوان تنها رقم تجاری به در کشور توسعه یافته است (Razavi *et al.*, 1999؛ Manee, 1994). بر اساس آمار وزارت جهاد کشاورزی، استان اصفهان با سطح زیر کشت بیش از ۱۲۵۰ هکتار و تولید سالیانه حدود ۱۲ هزار تن، اصلی‌ترین استان تولید کننده میوه به در کشور است (Anonymous, 2013). خصوصیات شاخص میوه به رقم اصفهان شامل کیفیت عالی، درستی میوه، رنگ زرد طلایی پوست میوه و عطر و

با میزان تشکیل میوه در حدود ۳ تا ۸ درصد، ارقام نیمه خودناسازگار با میزان تشکیل میوه ۱ تا ۲ درصد و ارقام کاملاً خودناسازگار طبقه‌بندی می‌شوند (Nagy-Déri *et al.*, 2013). بر اساس این طبقه‌بندی، ارقام نیمه خودسازگار، اگر همراه با گرده‌دهنده کشت شوند، میزان باروری از سالی به سال دیگر فرق می‌کند. همچنین ارقام نیمه خودناسازگار و کاملاً خودناسازگار، برای تشکیل میوه نیازمند به ارقام گرده‌زای مناسب و سازگار هستند. ارشوو (Ershov, 1989) در بررسی میزان خودسازگاری ۲۳ رقم به مناطق مختلف یوگسلاوی سابق، گزارش کرد که طیف گسترده‌ای از خودسازگاری در ارقام به مشاهده شده و از این بین پنج رقم از ارقام مورد بررسی کاملاً خودسازگار و سایر ارقام میزان متفاوتی از خودناسازگاری بروز دادند. این نتایج با تحقیق نوتزو و روبی (Nuzzo and Rubbi, 2004) در رابطه با مطالعه خودناسازگاری ارقام به در ایتالیا منطبق است، به صورتی که از ۲۲ رقم به مورد بررسی، نشان داده شد که اکثر آن‌ها خودناسازگار بودند و برای تولید محصول نیاز به دگرگرده‌افشانی داشتند و همچنین تعدادی از ارقام خودسازگار بودند که ترجیحاً برای به دست آوردن میوه بهتر، لازم است که دگرگرده افشانی شوند.

در بررسی باغ‌های به احداث شده به صورت تک رقم با استفاده از به اصفهان، باردهی در بیش تر سال‌ها از میانگین عملکرد متوسط ۷ تا

داده شد. همچنین میزان غلظت شهد در ژنوتیپ‌های به مورد بررسی حاکی از جلب زنبور کافی توسط شهد موجود بوده است.

از دیگر عوامل موثر در تشکیل میوه درختان میوه دانه‌دار، میزان خودسازگاری گرده است. اغلب درختان خانواده گلسرخیان دارای خودناسازگاری گامتوفیتیک هستند که توسط یک مکان ژنی با چندین آلل S کنترل می‌شود (Zisovich *et al.*, 2004). اخیراً مشخص شده که خودناسازگاری گامتوفیتیک در نتیجه تاثیر متقابل S-RNase در حال تظاهر در خامه و هاپلوتایپ اختصاصی F-box لوله گرده ایجاد و پذیرش و یا عدم پذیرش لوله گرده توسط خامه در اثر متقابل پروتئین‌های تولیدی این ژن‌ها تعیین می‌شود (Ushijima *et al.*, 2003). این مکان‌های F-box دارای درجات مختلفی از تنوع ژنتیکی بوده و این که کدام یک از این F-box تعیین کننده نهایی ناسازگاری است به طور کامل مشخص نیست. درخت به در اکثر منابع به عنوان یک درخت خودسازگار معرفی شده است (منیعی، ۱۹۹۴؛ Westwood, 1993) لیکن بر اساس شواهد ارائه شده در مورد اثر متقابل آلل‌های S و مکان‌های F-box این سؤال مطرح است که استفاده از گرده غیر تا چه اندازه می‌تواند در بهبود و افزایش باردهی ارقام این درخت مثمر واقع شود. بر اساس یک تقسیم‌بندی، ارقام به از نظر خودگرده‌افشانی به چهار گروه ارقام خودسازگار با میزان تشکیل میوه بالاتر از ۱۰ درصد، ارقام نیمه خودسازگار،

رقم به اصفهان به عنوان تیمار شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

برای انجام تیمارهای گرده‌افشانی، در هر تیمار چهار درخت که از نظر سن، وضعیت رشد رویشی و سطح گسترش تاج یکنواخت بوده و در ردیف‌های منظم کشت شده بودند، انتخاب و علامت‌گذاری شدند. با بالونی شدن جوانه‌های گل، شش شاخه مناسب و یکنواخت در جهات مختلف هر درخت به طور تصادفی انتخاب و با شمارش جوانه هر شاخه، با کیسه‌های پارچه‌ای ململ پوشانده شدند. کلیه شکوفه‌های موجود در کیسه‌های ایزولاسیون با استفاده از پنس در مرحله قبل از باز شدن شکوفه‌ها و قبل از ترکیدگی کیسه‌های بساک اخته شدند. در نیمه دوم فروردین ماه از ارقام گرده‌دهنده، شاخه گل‌دار تهیه و در آزمایشگاه دانه‌گرده از آن‌ها جمع‌آوری و در ظروف شیشه‌ای کوچک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مجاورت پرمنگنات پتاسیم به عنوان ماده جاذب رطوبت در داخل یک دسیکاتور شیشه‌ای تا زمان انجام عمل گرده‌افشانی نگهداری شدند. برای اطمینان از قدرت جوانه‌زنی دانه‌های گرده جمع‌آوری شده، آزمون تعیین درصد جوانه زدن دانه‌های گرده انجام شد. به این منظور، دانه‌های گرده هر ژنوتیپ به تفکیک در ظروف شیشه‌ای که حاوی محلول ۱۰ درصد ساکاروز و ۲۰ قسمت در میلیون اسید بوریک بودند توزیع شده و در شرایط اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

۱۰ تن در هکتار برخوردار است. متوسط عملکرد پائین تر باغ‌های به ایران در مقایسه با باغ‌های به کشورهای ازبکستان و ترکیه که به ترتیب در حدود ۱۰ و ۹/۸ تن در هکتار گزارش شده است (Anonymous, 2011) در درجه اول به ساختار باردهی و تولید اسپور کم در رقم غالب باغ‌های به کشور بازگشته (علیپور و همکاران، ۲۰۱۴) و در کنار آن عدم استفاده از رقم گرده‌دهنده می‌تواند به عنوان عاملی مکمل و جانبی در کاهش بخشی از عملکرد این باغ‌های موثر باشد. بر این اساس در تحقیق حاضر به بررسی مقدماتی میزان خودسازگاری در به رقم اصفهان در مقایسه با گرده‌افشانی آزاد پرداخته شد و سپس اثر گرده سایر ژنوتیپ‌ها روی باردهی و خصوصیات میوه این رقم مورد مقایسه قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق اثر دانه‌گرده چهار ژنوتیپ درخت به، به عنوان گرده‌دهنده بر میزان باروری و تشکیل میوه و همچنین خصوصیات کمی و کیفی میوه به رقم اصفهان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار به مدت سه سال (۱۳۸۵ تا ۱۳۸۷) در استان اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. ارقام گرده‌دهنده مورد استفاده شامل ژنوتیپ‌های KM1، PK2، NB4 و KVD2 بودند. علاوه بر گرده چهار رقم گرده‌دهنده مورد استفاده، دو تیمار گرده‌افشانی آزاد و خودگرده‌افشانی نیز روی

تعداد میوه در هر تیمار شمارش و برداشت و پس از انتقال به آزمایشگاه، صفات کمی و کیفی میوه‌های حاصل از هر تیمار گرده‌افشانی به طور جداگانه اندازه‌گیری شد.

صفات مورد نظر در مرحله گلدهی شامل تاریخ شروع گلدهی به صورت زمانی که ۱۰ درصد گل‌ها باز شده و تاریخ تمام گل به صورتی که ۹۰ درصد گل‌ها کاملاً باز شده بودند، در کنار صفات طول دوره گلدهی همراه با صفت زمان پایان گلدهی بررسی شد. صفات میوه مورد نظر مشتمل بر ابعاد میوه، میزان مواد جامد محلول، میزان سفتی بافت و اسیدیته میوه بود. همچنین در این مرحله صفت تعداد بذر کامل تشکیل شده درون هر میوه مورد بررسی و یادداشت برداری قرار گرفت. ابعاد میوه به وسیله کولیس، میزان مواد جامد محلول نمونه‌ها به وسیله دستگاه رفراکتومتر، میزان سفتی بافت میوه به وسیله پترومتر و اسیدیته میوه به روش تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال اندازه‌گیری شد. داده‌های سه ساله هر تیمار بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی در نرم افزار SAS و تجزیه واریانس مرکب و میانگین تیمارها با آزمون LSD مقایسه شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل (Excel Microsoft, 2003) رسم شدند.

**استخراج DNA و ارزیابی امکان تکثیر آلل‌های S**  
ارقام به مورد استفاده در تحقیق برای استخراج DNA و بررسی امکان جداسازی و

قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از بینوکولر درصد جوانه‌زنی گرده هر یک از ژنوتیپ‌ها به طور جداگانه در پنج تکرار تعیین شد.

زمانی که اکثر گل‌های شاخه‌های ایزوله شده باز و کلاله مادگی آن‌ها آماده پذیرش دانه گرده شد، هریک از شاخه‌های ایزوله شده از کیسه خارج شدند و گل‌های آن‌ها با گرده ژنوتیپ‌های مورد نظر با استفاده از قلم موهای کوچک و یا پاکن انتهای مداد گرده‌افشانی دستی شد. گل‌های گرده‌افشانی شده مجدداً شمارش و با کیسه‌های ایزولاسیون پوشانده شدند. برای اطمینان از عمل گرده‌افشانی کامل، دو روز بعد مجدداً شکوفه‌های ایزوله شده دوباره با گرده مورد نظر گرده‌افشانی دستی شدند. تعداد میوه تشکیل شده پس از ریزش خرداد ماه زمانی که قطر میوه حدود ۳ تا ۴ سانتی‌متر رسیده بود شمارش و ثبت شد. با توجه به عدم امکان بقاء میوه‌های پارتنوکارپ و میوه‌های دارای جنین ناقص در به پس از ریزش خرداد ماه، به منظور جلوگیری از شمارش میوه‌های دارای بذر سقط شده، شمارش میوه‌ها به منظور تعیین درصد تشکیل میوه پس از ریزش خرداد ماه صورت انجام شد. تعداد میوه به ازای هر صد گل به صورت درصد محاسبه شد. در طول فصل رشد مراقبت‌های لازم از درختان شامل آبیاری، تغذیه و مبارزه با آفات بر اساس عرف مناطق به کاری اصفهان انجام شد. با فرارسیدن زمان برداشت محصول، مجدداً

انجام شد. حذف RNA با ۴ میکرولیتر RNase-A و رسوب و انعقاد DNA طی دو مرحله تعلیق در ۳:۲ حجم ایزوپروپانول سرد و سپس اتانول مطلق انجام شد. خلوص و غلظت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و سپس روش اسپکتروفتومتریک در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفته و مقدار و غلظت DNA مورد نیاز هر نمونه جهت انجام PCR بهینه‌سازی شد.

#### واکنش PCR

جفت آغازگر FB-R و FB-F که قبلاً توسط بابائی و همکاران (Babaei *et al.*, 2012) جهت تکثیر آلل‌های S گونه‌های مختلف گلابی در نواحی حفاظت شده این مکان ژنی طراحی شده بود جهت انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با این جفت آغازگر در حجم ۲۵ میکرولیتر با اجزاء واکنش شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۷۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر، ۲/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۶ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای پیش‌رو و پیرو، ۰/۳ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase ۵ واحدی انجام شد. پروفایل حرارتی ترموسایکلر مطابق با ۳ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه واسرشته‌سازی در

استخراج آلل‌های S مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور استخراج DNA ژنومی، برگ‌های جوان و سالم در آخر اردیبهشت ماه برداشت و تا زمان استخراج، در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با توجه به تجمع بالای ترکیبات پلی‌ساکاریدی و مواد فنلی در بافت‌های برگ‌ها برداشت شده، از روش تلفیقی CTAB-SDS به‌عنوان روش مناسب برای استخراج DNA استفاده شد (Khorrarnadel Azad *et al.*, 2008). به منظور تخلیص DNA ژنومی، ۲۰ میلی‌گرم بافت برگ فریز شده در حضور نیتروژن مایع آسیاب شده و دیواره سلولی بافت آسیاب شده توسط ۶۰۰ میکرولیتر بافر استخراج ۶۵ درجه سانتی‌گراد حاوی Tris-HCl، EDTA و SDS (pH=8) به ترتیب با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۴۰ میلی‌مولار به علاوه یک درصد PVP هضم شدند. نمونه‌های استخراجی با استفاده از ۱۵ میکرولیتر بتا-مرکاپتواتانول و ۵ میکرولیتر پروتئیناز K و نگهداری در ۵۵ و سپس در ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حضور ۱۶۸ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار و ۷۸ میکرولیتر CTAB ۱۰ درصد هر کدام به مدت ۳۰ دقیقه، به ترتیب، عاری از آلودگی‌های پروتئینی و ترکیبات پلی‌ساکاریدی- فنولی شد. هضم و حذف کامل پروتئین‌های هیستونی با دو مرحله شستشو در یک حجم محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل ۱:۲۴ و یک مرحله در نیم حجم محلول ۵ مولار آمونیم استات صورت

داشت (جدول ۲). بیش‌ترین میزان تشکیل میوه با ۲۳/۴ درصد مربوط به گرده ژنوتیپ KM1 و کم‌ترین میزان تشکیل میوه با ۸/۶ درصد مربوط به تیمار خودگرده‌افشانی به اصفهان بود. بین ژنوتیپ‌های NB4 با ۱۸/۵ درصد و KVD2 با ۲۰/۴ درصد میزان تشکیل میوه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به نتایج، گرده ژنوتیپ KM1 بیش‌ترین تأثیر را بر درصد باروری گل‌ها و تشکیل میوه در بین تمام تیمارها از خود نشان داد و بعد از آن تیمار گرده KVD2 بیش‌ترین درصد تشکیل میوه را داشت. با توجه به خصوصیات مناسب ژنوتیپ KM1 از نظر زمان گلدهی، گلدهی منظم، تراکم زیاد گل، عدم سال‌آوری و همچنین هم‌پوشانی مناسب با رقم به اصفهان به عنوان ارقام گرده‌زای مناسب برای این رقم قابل ارائه است، این در حالی است که ژنوتیپ KVD2 همپوشانی گلدهی قابل توجهی با ژنوتیپ KVD3 نداشت. از نظر درصد تشکیل میوه نیز دو تیمار گرده ژنوتیپ‌های KM1 و KVD2 بر اساس نتایج بن‌دک و همکاران (Benedek et al., 2001) قادر به ایجاد مناسب‌ترین میزان باردهی و تشکیل میوه در رقم به اصفهان خواهد شد. از سوی دیگر پایین بودن درصد تشکیل میوه در تیمار خودگرده‌افشانی نشان می‌دهد، به رقم اصفهان از نظر گرده‌افشانی یک رقم نیمه‌خودسازگار است که نتایج این تحقیق از یک سو با میزان تشکیل میوه حدود ۸ درصدی در تیمار خودگرده‌افشانی

۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها و ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به عنوان مرحله بسط و اکنش و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تهیه و مراحل ۲ تا ۴ با ۴۰ چرخه تکرار شد. محصولات تکثیری و اکنش‌ها بوسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد در بافر TAE و ولتاژ ۶۵ ولت از یک دیگر تفکیک شده و در اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و زیر اشعه‌ی UV قابل رویت شدند. محاسبه وزن باندها با استفاده از لدر<sup>۳۳۳</sup> ۱۰۰۰ bp صورت انجام شد و محصول و اکنش‌های PCR به منظور اطمینان از صحت قطعه تکثیری توالی‌یابی شدند.

## نتایج و بحث

### اثر گرده‌افشانی بر باروری

تجزیه مرکب داده‌های مربوط به بررسی تأثیر نوع گرده روی صفات مورد بررسی، اعم از صفات مرتبط با درصد باروری شکوفه، وزن میوه و متوسط تعداد بذر در میوه بیانگر معنی‌دار بودن تأثیر نوع گرده بر میزان باروری به اصفهان بود، در حالی که اثر سال و اثر متقابل سال در تکرار و سال در تیمار بر هیچ‌کدام از صفات معنی‌داری نبود (جدول ۱).

نتایج مقایسه میانگین درصد تشکیل میوه به رقم اصفهان نشان داد که بین تیمارهای مختلف گرده‌افشانی به جزء KVD2 و NB4 اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده وجود

جدول ۱- تجزیه واریانس مرکب صفات مرتبط با تاثیر نوع گرده بر میزان باروری و وزن میوه  
Table 1. Combined analysis of variance of traits related to the effects of pollen type on fertilization and fruit weight

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Mean of Squares		
			شکوفه‌های بارور Fertilized Blooms	تعداد بذر Seed number	وزن میوه Fruit weight
Year (Y)	سال	2	23.43 <sup>ns</sup>	1.54 <sup>ns</sup>	2.18 <sup>ns</sup>
Y × Rep.	سال × تکرار	9	25.58 <sup>ns</sup>	11.81 <sup>ns</sup>	1240.00 <sup>s</sup>
Treatment (T)	تیمار	5	68.89 <sup>***</sup>	689.96 <sup>***</sup>	19675.8 <sup>***</sup>
Y × T	سال × تیمار	10	12.36 <sup>ns</sup>	2.77 <sup>ns</sup>	541.58 <sup>ns</sup>
Error	خطا	45	21.85	3.28	475.06

ns و \*\*: به ترتیب تفاوت غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.  
ns and \*\*: Not significant and significant at 1% probability level, respectively.

جدول ۲- میانگین دو سالانه صفات مرتبط با تاثیر نوع گرده بر میزان باروری و خصوصیات میوه  
Table 2. Biennial means of traits related to the effects of pollen type on fertilization and fruit characteristics

گرده‌زا Pollinizer	درصد شکوفه‌های بارور Fertilized blooms	تعداد بذر Seed number	وزن میوه Fruit weight (g)
KM1	23.42a	29.75a	347.92a
PK2	15.93c	20.16c	263.50d
KVD2	20.39b	20.41c	282.17c
NB4	18.49b	26.33b	313.92b
KVD3 (Isfahan)	8.56e	9.42e	230.67e
Open Pollination	11.36d	13.67d	292.00c

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌دار با یک‌دیگر در سطح احتمال ۱٪ دارند.

Means followed by different letters in each column are significantly different at the 1% level of probability.

ارشوو (۱۹۸۹) و سامی (۲۰۱۳) در مورد به، مبنی بر این که درصد تشکیل میوه بعد از دگرگرده‌افشانی به طور معنی‌داری بیش‌تر از درصد تشکیل میوه بعد از خودگرده‌افشانی است، مطابقت دارد.

مقایسه میانگین مربوط به تعداد بذر تشکیل شده در میوه نشان داد که در صفت تعداد بذر به ازای هر میوه اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های گرده‌دهنده به جزء PK2 و KVD2 وجود داشت (جدول ۲). بیش‌ترین تعداد بذر مربوط

(نگی - دری و همکاران، ۲۰۱۳) و از سوی دیگر با اثر مثبت دو تیمار گرده ژنوتیپ‌های KM1 و KVD2 مورد تایید قرار گرفت. این نتایج همچنین با بررسی سامی (Sami, 2013) که میزان تشکیل میوه این رقم را در شرایط خودگرده‌افشانی زیر ۸ درصد گزارش کرده بود منطبق است. همچنین بررسی اثر تیمار گرده‌افشانی بر درصد تشکیل میوه نشان داد که میزان باروری در گرده‌افشانی آزاد از خودگرده‌افشانی بیش‌تر بود. این نتایج با نتایج



تشکیل بیش از حد زیاد میوه سبب سال‌آوری و کوچک شدن اندازه میوه می‌شود (Faust, 1989)، لیکن ارزیابی‌های نشان داده که به رقم اصفهان به دلیل ساختار باردهی خاص و وجود بخش‌های طویل فاقد اسپور در طول بازو که به عنوان یکی از شاخص‌های وابسته به این رقم محسوب می‌شود از پتانسیل باردهی کمی در مقایسه با بسیاری دیگر ژنوتیپ‌ها و ارقام نظیر رقم جدید پردیس برخوردار است (Abdollahi, 2014). بر این اساس تشکیل زیاد میوه در این رقم تا بیش از ۲۰ درصد از شکوفه‌ها سبب کوچک شدن اندازه میوه نشده است. از سوی دیگر دلیل این امر می‌تواند ساختار تک گل بودن درخت به در انتهای شاخه‌های بارده باشد که از ایجاد خوشه‌های میوه متراکم و رقابت کننده روی درخت به جلوگیری می‌کند.

#### اثر گرده‌افشانی بر خصوصیات کیفی میوه

تجزیه واریانس اثر تیمار ژنوتیپ گرده‌دهنده بیانگر تاثیر نوع گرده روی صفات کیفی میوه به اصفهان بود، اگرچه دامنه تغییرات صفات در مقایسه با صفات مربوط به میزان باروری بسیار کم‌تر مشاهده بود (جدول ۳). در بررسی اثر تیمارهای گرده‌افشانی بر خصوصیات کمی و کیفی میوه از نظر سفتی بافت، مقایسه میانگین‌ها نشان داد بین تیمارهای گرده‌دهنده KVD2، PK2، NB4 و گرده‌افشانی آزاد اختلاف معنی‌داری مشاهده وجود نداشت

به تیمار گرده‌دهنده KM1 با ۲۹/۸ عدد بذر به ازاء میوه و NB4 با ۲۶/۳ عدد بذر به ازاء میوه و کم‌ترین تعداد بذر مربوط به تیمار خود گرده‌افشانی با ۹/۴ عدد بذر به ازاء میوه بود. همچنین در میوه‌های به مورد بررسی در زمان برداشت، هیچ یک فاقد بذر نبودند که این مطلب نشان می‌دهد که در درختان به تشکیل میوه به صورت پارتنوکاری وجود ندارد و انجام لقاح برای تشکیل و رشد میوه ضروری است. بررسی‌های میدانی نیز نشان داده که در باغات به، میوه‌هایی که دارای جنین ناقص هستند، فقط قادر به حفظ میوه تا خرداد ماه بوده و پس از ریزش خرداد ماه هیچ میوه فاقد بذر و یا دارای بذرهای ناقص و سقط شده روی درخت باقی نخواهد نمی‌ماند.

مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای گرده‌افشانی بر صفت وزن میوه تشکیل شده، اختلاف معنی‌داری را بین ژنوتیپ KM1 با سایر ژنوتیپ‌ها نشان داد (جدول ۲)، اما بین تیمار گرده ژنوتیپ KVD2 و گرده‌افشانی آزاد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیش‌ترین وزن میوه با ۳۵۲ گرم مربوط به تیمار گرده‌دهنده ژنوتیپ KM1 و کم‌ترین میزان وزن میوه با ۲۳۰ گرم مربوط به تیمار خود گرده‌افشانی بود. مقایسه این نتایج با داده‌های حاصل از درصد تشکیل میوه و تعداد بذر به ازاء میوه نشان‌گر ارتباط مستقیم تعداد بذر با اندازه میوه در درخت به است. اگرچه در درختان میوه دانه‌دار نظیر سیب و گلابی، تلقیح زیاد و همچنین

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مرتبط با تاثیر نوع گرده روی کیفیت میوه  
Table 3. Analysis of variance of traits related to the effects of pollen type on fruit quality characteristics

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Mean of Squares		
			Total acid	TSS	Fruit Firmness
Rep	تکرار	3	0.001**	0.001**	0.001**
Genotype	ژنوتیپ	5	0.263**	2.423**	0.311**
Error	خطا	15	0.001	0.001	0.001

\*\* : تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪. \*\*: Significant difference at 1% level of probability.

تولیدی از زرد روشن تا زرد تیره در ژنوتیپ‌های KVD2 و KM1 متغیر بود. رنگ گوشت میوه‌ها در همگی تیمارها کرم رنگ بود، همچنین از نظر رنگ بذر، عطر و طعم میوه اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. نتایج این تحقیق با نتایج نوزو و روبی (۲۰۰۴) در مورد میوه درخت به و طلایی و همکاران (Talaei *et al.*, 2007) در سیب بومی رقم شفیع آبادی و سایر ارقام سیب (Minh Tuan and Chung-Ruey, 2013) مبنی بر این که منابع گرده، اثر معنی‌داری بر درصد تشکیل میوه، وزن میوه، قطر، شکل، تعداد بذر و قند کل داشت، مطابقت دارد.

#### تکثیر آل‌های S و رابطه آن با باروری

بررسی طول باندهای تولیدی حاصل از تکثیر DNA ارقام و ژنوتیپ‌های به‌مورد استفاده حاکی از امکان تکثیر مکان ژنی S در چهار ژنوتیپ از پنج ژنوتیپ بود. نتایج مقایسه توالی نواحی تکثیری ژنوتیپ‌های به با توالی‌های مکان‌های ژنی S به ودیعه گذاشته شده در بانک

(جدول‌های ۳ و ۴). کم‌ترین میزان سفتی بافت مربوط به تیمار خود‌گرده‌افشانی بود. از نظر میزان مواد جامد محلول نیز بین تیمار KM1 با تیمار گرده‌افشانی آزاد و خود‌گرده‌افشانی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بیش‌ترین میزان مواد جامد محلول مربوط به تیمار KM1 و کم‌ترین میزان مربوط به تیمار خود‌گرده‌افشانی بود. بین بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود نداشت. از نظر میزان اسیدیته نیز وضعیت مشابه مواد جامد محلول بود، فقط اختلاف معنی‌داری بین تیمار خود‌گرده‌افشانی و گرده‌افشانی آزاد با KM1 مشاهده شد. از نظر بازارپسندی میوه، نتایج نشان داد که دانه گرده ژنوتیپ‌های مختلف بر خصوصیات ظاهری و پومولوژی میوه تاثیر قابل توجهی داشتند. میوه‌های حاصل از تیمار گرده‌افشانی KM1 و KVD2 دارای بازارپسندی خیلی خوب بود. همچنین به جزء میوه تولیدی از تیمار خود‌گرده‌افشانی، بقیه میوه‌ها از نظر بازارپسندی دارای کیفیت خوب بوده و همگی دارای شکل یکنواخت بودند. رنگ پوست در میوه‌های

جدول ۴- اثر تیمارهای مختلف گرده افشانی روی خصوصیات کمی و کیفی میوه به رقم اصفهان  
Table 4. Effect of pollen type on quantitative and qualitative characteristics of quince fruits of cultivar Isfahan

گرده‌زا Pollinizer	سفتی بافت Fruit firmness	مواد جامد محلول TSS (%)	اسید کل (%) Total acid (%)	یکنواختی میوه Fruit uniformity	رنگ گوشت Pulp color	رنگ پوست Peel color
KM1	6.3a	16.3a	3.1b	Uniform	Cream	Dark yellow
PK2	5.7bc	15ab	3.3ab	Uniform	Cream	Yellow
KVD2	5.9ab	14.7b	3.2ab	Uniform	Cream	Dark yellow
NB4	6.0ab	15.6ab	3.3ab	Semi-uniform	Cream	Yellow
KVD3 (Isfahan)	5.5c	14.2b	3.5a	Mod. ununiform	Cream	Light yellow
Open Pollination	5.8bc	14.6b	3.5a	Uniform	Cream	Yellow

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده‌اند، اختلاف معنی دار با یکدیگر در سطح احتمال ۱٪ دارند.  
Means followed by different letters in each column are significantly different at the 1% level of probability.

اطلاعاتی با استفاده از نرم‌افزار تحت وب  
FastA بیانگر شباهت بالای این نواحی با سایر  
آلل‌های S گونه‌های سیب و گلابی بود. نتایج  
طول باندهای حاصل از محصولات واکنش  
PCR در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- طول باندهای حاصل از تکثیر مکان ژنی S در ژنوتیپ‌های مختلف به  
Table 5. Length of amplified fragments on S locus in quince genotypes

ژنوتیپ‌های به Quince genotypes	طول (جفت باز) و تعداد آلل‌های S تکثیر شده Length (bp) and number of amplified S alleles	
	Allele I	Allele II
KM1	550	700
PK2	---	---
KVD2	600	---
NB4	600	800
KVD3 (Isfahan)	650	---

اصفهان تنها وجود یک آلل S در این مکان ژنی  
بود که با توجه به نیمه خودسازگار بودن به و  
امکان وجود خودگشنی‌هائی طبیعی تا تولید این  
ژنوتیپ‌ها، چنین امری چندان دور از انتظار  
نیست. اما نکته قابل تامل دیگر وجود دو آلل S  
در ژنوتیپ‌های به KM1 و NB4 بود که نشان  
می‌دهد این ژنوتیپ‌ها همانند دیگر خویشان  
خود در خانواده گل‌سرخیان از جمله سیب و  
گلابی از دو آلل S متمایز از هم برخوردارند.  
در رابطه با امکان تاثیر آلل‌های S موجود در  
ژنوتیپ‌های به روی باروری رقم به اصفهان

این جدول نشانگر این است که در اغلب  
ژنوتیپ‌های مورد نظر در این تحقیق حداقل  
یک یا دو آلل S با استفاده از آغازگرهای  
طراحی شده در نواحی حفاظت شده این مکان  
ژنی قابل تکثیر است. تنها در ژنوتیپ PK2 هیچ  
آللی با استفاده از جفت آغازگر مورد نظر تکثیر  
نشد که این عدم وجود قطعه و یا تغییرات  
ژنتیکی ایجاد شده در این مکان ژنی می‌تواند با  
استفاده از آغازگرهای طراحی شده در سایر  
مناطق حفاظت شده مورد تایید قرار گیرد. نکته  
جالب توجه دیگر در ژنوتیپ به KVD2 و رقم



در این تحقیق نسبت به جداسازی بخشی از این مکان ژنی و بررسی امکان وجود تنوع در آلل‌های آن پرداخته شد. اگرچه اطلاعات به دست آمده در این تحقیق به منظور فهم ارتباط آلل‌های موجود در درخت به با شدت خودناسازگاری و ارتباط آن با سایر مکان‌های درگیر در این بحث بسیار اندک و مقدماتی است، لیکن شواهدی بر شباهت این ساختار با گونه‌های نزدیک همانند سیب و گلابی ارائه شد که لازم است در آینده این ساختار نیز مورد بررسی دقیق‌تری قرار گیرد.

توجهی از ارقام بومی و ژنوتیپ‌های به وجود داشته و تاکنون همه آن‌ها از نظر خصوصیات میوه، ارزش تجاری شدن و در نهایت امکان استفاده به عنوان رقم گرده‌زا برای دیگر ارقام تجاری مورد ارزیابی قرار نگرفته‌اند، ادامه انجام چینی بررسی‌هایی می‌تواند به معرفی ارقام گرده‌زای سازگارتر و یا دارای ارزش میوه بالاتر و یا همانند به رقم اصفهان و با هم‌پوشانی بهتر زمان گلدهی منجر شود. از سوی دیگر بررسی اطلاعات به ودیعه گذاشته شده در بانک‌های اطلاعاتی بیانگر عدم جداسازی و شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در درخت به است که

## References

- Abdollahi, H. 2014.** Guidebook of Pome Fruits (Apple, Pear and Quince) Cultivation and Growing. Education and Extension Publisher, Tehran, Iran. 98pp. (in Persian).
- Alipour, M., Abdollahi, H., Abdousi, V., Ghasemi, A. A. Adli, M., and Mohamadi, M. 2014.** Evaluation of vegetative and reproductive characteristics and distinctness of some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes from different regions of Iran. Seed and Plant 30-1: 507-529 (in Persian).
- Anonymous. 2013.** Yearbook of Agricultural Products of Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. 250 pp. (in Persian).
- Babaei, F., Abdollahi, H., and Hajmansoor, S. 2012.** Identification of self-incompatibility alleles in some Iranian native pear cultivars by PCR method. Seed and Plant Improvement Journal 28-1 (2): 201-214 (in Persian).
- Benedek, P., Szabó, T., and Nyéki, J. 2001.** New results on the bee pollination of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). Acta Horticulturae 561: 243-248.
- Ershov, L. A. 1989.** Biology of Quince Pollination. Reports of the Soviet Scientists to the 17th International Congress on Horticulture. Moscow, USSR. pp. 106-111.
- Faust, M. 1989.** Physiology of Temperate Zone Fruit Trees. John Wiley & Sons Incorporation, New York, USA. 605pp.

- Nagy-Déri, H., Orosz-Kovács, Z., and Farkas Á. 2013.** Comparative studies on nectar from two self-fertile and two self-sterile cultivars of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) and their attractiveness to honeybees. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 88: 776-782.
- Khorramdel Azad, M., Abdollahi, H., and Taeb, M. 2008.** Optimization of DNA extraction from Iranian quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes. The 2nd International Student Conference of Biotechnology. 15-17 November, University of Tehran, Tehran, Iran. Page 39 (in Persian).
- Manee, A. 1994.** Pear and Quince, and their Growing. Iran Technical Publication Company, Tehran, Iran. 113 pp. (in Persian).
- Minh Tuan, M., and Chung-Ruey, Y. 2013.** Effect of various pollen sources on ability, fruit set and quality in ‘Long Red B’ wax apple. *International Journal of Biological, Food, Veterinary and Agricultural Engineering* 7: 74-77.
- Nuzzo, V., and Rubbi, G. 2004.** Description and Use of Quince for Fruit Production. Department of Pomology University of Potenza, Italy. 15pp.
- Razavi, F., Arzani, F., and Vezvae, A. 1999.** Identification of local quince (*Cydonia oblonga*) genotypes in some parts of Isfahan province. *Seed and Plant* 15: 354-374 (in Persian).
- Sabeti, H. 1995.** Iranian Forests, Trees and Shrubs. Yazd University Publishers, Yazd, Iran. 810pp. (in Persian).
- Sami, A. 2013.** Evaluation of 2,4-D, pollination and nutrition treatment effects on fruit set of quince cultivar Isfahan in Semirom region. MSc. Thesis, Islamic Azad University of Isfahan, Isfahan, Iran. 74pp. (in Persian).
- Talaei, A. R., Vahedi, B., Asgari, M. A., and Ershadi, A. 2007.** Detection of best pollinizers for some Iranian apple cultivars. *Iranian Journal of Horticultural Science* 38: 241-250 (in Persian).
- Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Tao, R., and Hirano, H. 2003.** Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* 15: 771-781.
- Westwood, M. N. 1993.** Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 523 pp.
- Zisovich, A. H., Stern R. A., Sapir, G., Shafir, S., and Goldway, M. 2004.** The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sexual Plant Reproduction* 17: 151-156.