



## بررسی صفت خودناسازگاری در ۲۵ ژنوتیپ/رقم سیب با استفاده از روش میکروسکوپی

آیدا خوش حرف مطلق<sup>۱</sup>، رحیم قره شیخ بیات<sup>۲</sup>، سید مهدی میری<sup>۳</sup> و حسن حاج نجاری<sup>۴</sup>

۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه باغبانی- گرایش بیوتکنولوژی و ژنتیک ملکولی

۲ عضو هیئت علمی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۳ دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

\*نویسنده مسئول: r.bayat@areeo.ac.ir

### چکیده

اکثر ارقام سیب خودناسازگار هستند و ناسازگاری آن‌ها از نوع گامتوفیتیک است و جهت لقاح و تولید میوه تیز با رقم گرده افشان دارند. خود ناسازگاری سیب باعث کاهش محصول می‌شود. در این ارتباط روش‌های مطالعه این صفت مانند مطالعه رشد لوله گرده خودی در شرایط آزمایشگاهی توسط میکروسکوپ فلورسنت یکی از روش‌های تعیین وضعیت خود(نا)سازگاری ارقام است. در تحقیق حاضر به منظور شناسایی ارقام خودسازگار سیب یا ارقام و ژنوتیپ‌های با درصد خودسازگاری قابل قبول به منظور احداث باغ‌های یکدست و تک رقمی با هدف کاهش تعداد گرده افشان‌ها در واحد سطح و یکنواخت‌سازی اندازه درختان که باعث تسهیل در عملیات باغبانی می‌شود، اقدام به مطالعه میکروسکوپی نمونه گل‌های تلقیح شده در شرایط کنترل شده شد و با نتایج به دست آمده در کارهای میدانی قبلی مقایسه شد. بیشترین میزان رشد لوله گرده در ارقام "پاییزه مشهد با ۸۶/۶٪، شیخ احمد با ۸۰٪، بلدپونتواز با ۶۶/۶٪، یلوترانسپارنت با ۴۶/۶٪، گانی بیوتی با ۳۳/۳٪، ولثی با ۲۶/۶٪ و استیمن با ۲۶/۶٪ مشاهده شد که درجاتی از خودسازگاری را در ارقام در شرایط مطالعه شده تایید می‌کند. کمترین میزان رشد لوله گرده در ارقام "های ارنی، استارکان روژ، نوردن اسپای، گلاب اصفهان، اردبیل ۱، اردبیل ۲، بلدوبسکوپ، انگلیسی شیراز، رد رم بیوتی، مکینتاش، گلدن اسموتی، پرایم گلد، گلشاهی، ارلی گلد، آی آر آی ۱، آی آر آی ۳، آی آر آی ۴ و آی آر آی ۵" ثبت گردید.

**کلمات کلیدی:** سیب، خودناسازگاری، لوله گرده

### مقدمه

سیب از تیره گلسرخیان (Rosaceae) و زیر تیره سیبیان (Pomoidae) است. اکثر ارقام سیب خودنا بارور بوده و نیاز به ارقام گرده-زا یا گرده‌دهنده دارند، خودناسازگاری سیب از نوع گامتوفیتیک و مکانیسم خودناسازگاری خانواده Rosaceae با خانواده Solanaceae مشابه است (جلیلی مرندی، ۱۳۸۶). تعداد کروموزوم های سیب برابر  $2n = 34 (x=17)$  است (وست وود، ۱۳۷۵). سیب از مهمترین محصولات باغی و مهمترین و گسترده ترین محصول در مناطق معتدله و سردسیری جهان است، ایران به جهت داشتن شرایط آب و هوایی مناسب یکی از کشورهای عمده تولید کننده سیب است، اکثر ارقام سیب خودناسازگار هستند و ناسازگاری آن‌ها از نوع گامتوفیتیک است و جهت لقاح و تولید میوه تیز با رقم گرده افشان دارند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۶). سیب به دلیل دگرگشتن بودن، جهش‌های رویشی طبیعی و همچنین دورگ‌گیری های کنترل شده دارای تنوع بسیار چشمگیری در سطح ارقام تجاری یا غیرتجاری است. حاج نجاری و مرادی (۱۳۹۲) نتایج مطالعات خودسازگاری ۵۳ رقم بومی و وارداتی سیب را در مقایسه با گرده افشانی آزاد منتشر کردند. نتایج به دست آمده نشان داد، نمونه های مورد مطالعه عموماً خودناسازگار می‌باشند. همچنین با تعیین سطح خودسازگاری در ارقام انتخابی سیب و بررسی مقایسه‌ای خصوصیات پومولوژیک میوه‌ها، رقم IRI6 را با قدرت بالای نگهداری میوه، صد در صد خودسازگار تلقی کردند و همچنین دریافتند ارقام بومی مربایی، زینتی، پاییزه مشهد و شیخ احمد دارای درجه خود سازگاری بالا هستند به منظور بررسی و شناسایی ارقام خودسازگار و تعیین درصد خودسازگاری تحقیقات گسترده‌ای روی ۱۸ رقم و ژنوتیپ سیب موجود در کلکسیون ایستگاه کمال شهر پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری در طی سال های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۷ انجام شد. فروغی کیا (۱۳۹۳) با استفاده از آزمایشات میدانی و میکروسکوپی رقم IRI6 و مربایی را خودسازگار و همچنین کمترین میزان رشد لوله گرده در آزمایشات میکروسکوپی در رقم امپایر آل رد، یلو ترانسپارنت، اردبیل ۱ و انگلیسی شیراز اعلام نموده است.

### مواد و روش‌ها

ارقام بومی شامل: شیخ احمد، گلاب اصفهان، اردبیل ۱، اردبیل ۲، انگلیسی شیراز، پاییزه مشهد، گلشاهی و ارقام وارداتی: های ارنی، استارکان روژ، نوردن اسپای، گانی بیوتی، دلشیز، یلو ترانسپارنت، بلدوبسکوپ، رد رم بیوتی، استیمن، مکینتاش، بلدپونتواز، ولثی، پرایم



گلد، ارلی گلد و ارقام امید بخش: آی آر ای ۴، آی آر ای ۵، ای آر ای ۳ و آی آر ای ۱ که در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمالشهر کرج کشت شده‌اند مورد استفاده قرار گرفتند.

روش اجرای آزمایش: در مرحله اول تعدادی از شاخه‌های بارور از هر درخت انتخاب شد. از هر رقم یک شاخه حامل ۱۰-۱۵ گل آذین در مرحله بادکنکی تهیه گردید و به آزمایشگاه منتقل و ایزوله شدند. شاخه‌ها در سطل‌های کوچک حاوی آب نگهداری شدند. به منظور گرده افشانی دستی برای خود گرده افشانی یا تلقیح مصنوعی به کمک یک گوش پاک کن، گرده خودی از یک گل به بقیه گل‌های همان شاخه منتقل شده و سپس با کیسه‌های مخصوص شاخه‌ها را ایزوله شدند. ۷۲ ساعت بعد از عملیات خود گرده افشانی، تعداد ۱۵ تا ۲۰ مادگی سالم را از شاخه‌ها جدا شده و داخل شیشه‌ها (ویال) حاوی فیکساتور (استیک اسید، اتانول، فرمالدئید) قرار داده شدند و سپس به یخچال ۴ درجه تا زمان معاینه میکروسکوپی منتقل گردیدند. برای معاینه میکروسکوپی بعد از خارج نمودن نمونه‌ها از یخچال برای زدودن محلول فیکساتور از بافت مادگی، نمونه‌ها درون ظرفی به مدت ۲ ساعت در آب مقطر با تعویض‌های متوالی آب شستشو داده شدند، پس از آن نمونه‌ها به درون لوله‌های اپندورف حاوی  $NaOH$  ۸ نرمال جهت نرم شدن بافت‌ها به مدت ۴-۶ ساعت منتقل شدند، سپس این محلول از اپندورف‌ها تخلیه شده و مادگی‌ها مجدداً تا سه مرتبه با آب مقطر شست و شو داده شده، پس از آن به وسیله پنس و اسکالپر، زیر میکروسکوپ نوری کرک های روی تخمدان و بافت‌های زاید حذف شده و برای مدت یک ساعت در آب مقطر قرار گرفتند تا از پلاستیسیته نمونه‌ها جلوگیری شود. در مرحله آخر به منظور رنگ آمیزی به مدت ۲ ساعت در محلول آنیلین بلو قرار داده شدند و پس از طی این مراحل، مادگی‌ها آماده مشاهده توسط میکروسکوپ فلوروسنت شدند. میزان نفوذ لوله گرده و تعداد لوله‌های گرده در طول خامه از سطح کلالة تا مجاورت تخمدان و مواردی در تخمدان رکورد گیری شدند. برای هر رقم ۳ نمونه که شامل ۵ کلالة می‌باشد و در مجموع تعداد ۱۵ مشاهده به عمل آمد. میزان حضور گرده در سطح کلالة و لوله گرده در میانه خامه، انتهای خامه و مرحله به تخمدان رسیده شمارش شد و در Excel وارد شد.

شکل ۱- نمای زیر میکروسکوپی و معاینه مادگی‌ها برای تعقیب رشد لوله گرده از سطح کلالة تا تخمدان مادگی.



## نتایج و بحث

قره شیخ بیات و همکاران (۱۳۹۱) وجود حتی یک لوله گرده درون تخمدان را در تلاقی کاملاً کنترل شده، به منزله سازگار بودن تلاقی منظور کردند. اگر لوله‌های گرده پیش از رسیدن به تخمدان متوقف شوند، نمونه خودناسازگار معرفی می‌گردد. شاخص‌های متفاوتی برای اثبات خودسازگاری از طریق مشاهدات میکروسکوپی نفوذ گرده از محققان گزارش شده است.

قره شیخ بیات و همکاران به نقل از آلنسو و سوسایس آی کومیانی، آورده‌اند ژنوتیپ‌هایی که بیش از ۷۵ درصد از مادگی‌های آن‌ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه باشند به عنوان خیلی خودسازگار، ژنوتیپ‌هایی که ۵۰-۷۵ درصد از مادگی‌های آن‌ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه باشند، به عنوان مشکوک و ژنوتیپ‌هایی که کم تر از ۲۵ درصد از مادگی‌های آن‌ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه باشند به عنوان خودناسازگار معرفی می‌شوند، بنابراین داده‌های پژوهش فوق نشان داد که ارقام شیخ احمد و پاییزه مشهد خیلی خود سازگار و ارقام یلوترانسپارنت و بلدوپونتواز خودسازگار و ارقام گانی بیوتی، استیمن و ولثی مشکوک به سازگاری هستند (جدول ۱). تحقیق حاضر بر روی ۲۶ رقم و ژنوتیپ در آزمایشگاه بیولوژی و آزمایشگاه ملکولی انجام شد و نتایج حاصل نشان داد که ارقام شیخ احمد،



پاییزه مشهد، بلدوپونتواز، یلوترانسپارنت، گانی بیوتی، ولثی و استیمن در مشاهدات میکروسکوپ فلورسنت رشد لوله گرده در داخل تخمدان قابل تعقیب و مشاهده است. در آزمایش مرادی (۱۳۹۰) ارقام مربایی، پاییزه مشهد، بلدوپونتواز و شیخ احمد را خودسازگار معرفی شده‌اند که نتیجه آزمایش‌های ایشان با نتایج این پژوهش مشابه بود. همچنین نتایج به دست آمده برای ارقام/ژنوتیپ‌های پاییزه مشهد، اردبیل ۲، استارکان رژ، نوردن اسپای، رد رم بیوتی و ژنوتیپ IRI3 با گزارش فروغی کیا و همکاران، که از منبع ژنتیکی یکسانی استفاده کرده بود، همخوانی دارد. به هر حال باید در نظر داشت که برای قضاوت نهایی لازم است سایر روش‌های مطالعه صفت خودسازگاری با تاکید بر نتایج آزمایش‌های باغ نیز به اجرا درآید. اگر چه روش‌های ملکولی و آزمایشگاهی نتایج دقیق‌تری را ارائه می‌دهند ولیکن آنچه در طبیعت اتفاق می‌افتد تحت تاثیر عوامل متعددی است که در مطالعات آزمایشگاهی معمولاً تحت کنترل بوده و بر روی باروری گل‌ها تاثیر آنها حذف می‌شود.

## سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از دکتر داریوش داوودی به خاطر راهنمایی بی دریغ در انجام مطالعات میکروسکوپی در بخش نانو تکنولوژی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران اعلام می‌کنند.





جدول ۱- نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی تلفیح مصنوعی با دانه گرده خودی در نمونه‌های مورد مطالعه.

نام رقم	تعداد مادگی های آزمایش شده	حضور دانه گرده در سطح کلانه	تعداد مادگی با لوله گرده			درصد مادگی با لوله گرده			فنون تپ
			در میانه خامه	در انتها	به تخمدان رسیده	در میانه خامه	در انتهای خامه	به تخمدان رسیده	
۱	های ارنی	65	8	0	0	53.3	0	0	خودسازگار / خودناسازگار
۲	استارکان روژ	56	6	0	0	40	0	0	خود سازگار
۳	نوردن اسپای	91	9	0	0	60	0	0	خود سازگار
۴	شیخ احمد	92	15	13	12	100	86.6	80	خیلی خود سازگار
۵	گلاب اصفهان	74	6	0	0	40	0	0	خودناسازگار
۶	گانی بیوتی	52	10	8	5	66.6	53.3	33.3	مشکوک به سازگاری
۷	یلوترانسپارنت	48	12	9	7	80	60	46.6	خودسازگار
۸	اردبیل ۱	66	8	3	0	53.3	20	0	خودناسازگار
۹	اردبیل ۲	53	10	0	0	66.6	0	0	خودناسازگار
۱۰	بلدوبسکوپ	88	8	0	0	53.3	0	0	خودناسازگار
۱۱	انگلیسی شیراز	71	8	0	0	53.3	0	0	خودناسازگار
۱۲	ردرم بیوتی	72	9	3	0	60	20	0	خودناسازگار
۱۳	استیمن	82	11	8	4	73.3	53.3	26.6	مشکوک به سازگاری
۱۴	پاییزه مشهد	120	15	15	13	100	100	86.6	خیلی خود سازگار
۱۵	مکینتاش	113	11	0	0	73.3	0	0	خود سازگار
۱۶	بلدوپونتواز	61	12	12	10	80	80	66.6	خود سازگار
۱۷	ولثی	80	10	7	4	66.6	46.6	26.6	مشکوک به سازگاری
۱۸	گلدن اسموتی	81	7	0	0	46.6	0	0	خود سازگار
۱۹	پرایم گلد	51	6	0	0	40	0	0	خود سازگار
۲۰	گلشاهی	96	9	0	0	60	0	0	خود سازگار
۲۱	اریل گلد	85	8	0	0	53.3	0	0	خود سازگار
۲۲	آی آر آی ۱	73	11	6	3	73.3	40	20	خودناسازگار
۲۳	آی آر آی ۳	76	13	0	0	86.6	0	0	خود سازگار
۲۴	آی آر آی ۴	70	12	0	0	80	0	0	خود سازگار
۲۵	آی آر آی ۵	99	14	0	0	93.3	0	0	خود سازگار



## فهرست منابع

- جلیلی مرندی، ر.، ۱۳۸۶، میوه کاری، انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه، واحد آذربایجان غربی.
- حاج نجاری و مرادی ۱۳۹۲، بررسی میزان خودسازگاری، میوه‌شناسی، فشار اینبریدینگ چند رقم منتخب سیب و معرفی ژنوتیپ خودسازگار IRI6. مجله علوم باغبانی
- فروغی کیا، ن. ۱۳۹۳. مطالعه سطح خودسازگاری برخی از ارقام خودسازگار انتخابی سیب با استفاده از مطالعات میدانی و آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد. گروه باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
- قره شیخ بیات، ر.، ۱۳۹۱. ردیابی الل خودسازگاری در زردآلو به کمک روش های مبتنی بر PCR و تایید آن با تلاقی های کنترل شده. مجموعه مقالات ارایه شده در دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران. تهران.
- مرادی، م.، ۱۳۹۰، تعیین سطح خودسازگاری در ارقام انتخابی سیب و بررسی مقایسه ای خصوصیات پومولوژیک میوه ها، پایان نامه کارشناسی ارشد باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
- وست وود، ن.، ۱۳۷۵، میوه کاری در مناطق معتدله، ترجمه رسول زادگان، د. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان، ۷۵۹

## Evaluation of self- incompatibility trait in 25 apple varieties by means of fluorescent microscopy

**Khoshharf motlagh A<sup>1</sup>, Gharesheikhsbayat R<sup>2\*</sup>, Miri S. M<sup>3</sup>, Hajnajari H<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>M.Sc. graduated from Islamic Azad University, Department of Horticulture, Karaj, Iran.

<sup>2, 4</sup>Horticultural Science Research Institute, AREEO, Karaj, Iran.

<sup>3</sup>Department of Horticulture, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

\*Corresponding Author: r.bayat@areeo.ac.ir

### Abstract

Apple cultivars mostly are self-incompatible and gametophytic type is the mechanism of self-incompatibility in apple as other Rosaceae family members. In order to obtain economic yield/tree, adequate cross pollination and later fertilization, is needed. In the current work, one the most common laboratory based techniques; following pollen tube growth by fluorescent microscopy, is applied to clarify the situation of self-compatibility of 25 Iranian endemic apple genotypes and some foreign introduced cultivars. Cultivars and genotypes with high degree of self-compatibility make it more easier to establish solid blocks for apple orchards. In our study, the results were compared to previously obtained results in orchard that was conducted under controlled pollination some years ago. The findings show that genotypes/cultivars: PAYIZE MASHHAD, SHIKH AHMAD, BOLDO PONTUAS, YELLOW TRANSPARENT, GUNNY BEAUTY, WEALTHY, STAYMAN have the highest percent of pollen tube penetration in the pistils indicating their acceptable degree of auto fertility and on the other side the varieties: HI EARNY, STARKAN ROGE, NORTHERN SPY, PRIME GOLD, RED ROMEO BEAUTY, Mc INTOSH, GOLAB ISFAHAN, ARDEBIL 1, ARDEBIL 2, BOLDO BOSCOPE, ENGLISH SHIRAZ, GOLDEN SMOOTHY, GOLSHAHI, EARLY GOLD, IRI1, IRI3, IRI3 and IRI5, have the minimum pollen tube growth along the styles, meaning their low potentiality of auto fertility and their neediness to pollinators in orchards.

**Key words:** apple, self-incompatibility, pollen tube