

## تأثیر دانه گرده بر تشکیل بذر و میوه در نارنگی کلمانتین و بررسی نقش قرابت ژنتیکی منابع گرده‌زا در عمل لقاح

هادی علی نژاد جهرمی<sup>۱</sup>، عبدالکریم زارعی<sup>۲\*</sup> و عبدالرحمان محمدخانی<sup>۳</sup>

۱ و ۳. دانش آموخته دکتری و دانشیار، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱۸)

### چکیده

به منظور بررسی اثر دانه‌های گرده مختلف بر خصوصیات کمی و کیفی میوه نارنگی کلمانتین آزمایشی در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در شش تیمار با چهار تکرار انجام گرفت. بدین منظور گرده‌افشانی نارنگی کلمانتین با دانه‌های گرده لیموشیرین، لیمولیسبون، گریپ‌فروت، نارنج، خودگرده‌افشانی و آزادگرده‌افشانی انجام گرفت. تعیین سازگاری و ناسازگاری رقم‌های گرده‌دهنده به دو روش گرده‌افشانی کنترل شده و مطالعه میکروسکوپی رشد لوله گرده انجام شد. نتایج حاصل از مطالعه میکروسکوپی نشان داد نارنگی کلمانتین خودناسازگار بوده و با همه گونه‌های مورد آزمایش سازگار بود. درصد تشکیل میوه مربوط به گل‌های گرده‌افشانی شده با گرده‌های لیموشیرین (۷۳/۷۵)، لیمولیسبون (۷۱/۲۵)، گریپ‌فروت (۷۰) و نارنج (۷۰) تفاوت معنی‌داری نشان نداد، در حالی که تیمارهای گرده‌افشانی باز و خودگرده‌افشانی تشکیل میوه کمتری داشتند. بیشترین بذر سالم از میوه‌های حاصل از گرده نارنج (۱۳/۲ عدد) حاصل شد. در حالی که میوه‌های حاصل از خودگرده‌افشانی بذری نداشتند. همچنین گرده‌های نارنج و لیمولیسبون نسبت به بقیه گونه‌های مرکبات مورد استفاده، قدرت بیشتری برای جوانه‌زنی و نفوذ در مادگی گل‌های نارنگی کلمانتین دارا بودند. بررسی قرابت ژنتیکی بین گونه‌های مورد ارزیابی مشخص نمود نارنج بیشترین شباهت را در سطح دی ان ا با نارنگی کلمانتین داشت. نتایج این پژوهش مشخص کرد نوع دانه گرده تأثیر بالایی در میزان تشکیل میوه و ویژگی‌های کمی و کیفی میوه نارنگی کلمانتین دارد. در مجموع با توجه به فاکتورهای مختلف، گونه‌های گریپ‌فروت و لیمولیسبون به عنوان بهترین نوع گرده‌دهنده برای تولید اقتصادی میوه نارنگی کلمانتین پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: تشکیل میوه، جوانه‌زنی گرده، قرابت ژنتیکی، گرده‌افشانی، مرکبات.

## Effect of pollen grain sources on the fruit and seed formation of the Clementine mandarin and the role of genetic similarity of the pollen sources in fertilization

Hadi Alinejad-Jahromi<sup>1</sup>, Abdolkarim Zarei<sup>2\*</sup> and Abdolrahman Mohammadkhani<sup>3</sup>

1, 3. Ph.D. Graduate and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran

(Received: July 29, 2021- Accepted: Oct. 10, 2021)

### ABSTRACT

In order to investigate the role of different pollen grains on the qualitative and quantitative characteristics of 'Clementine' mandarin (*Citrus clementina*), an experiment was carried out based on a randomized complete blocks design with six treatments and four replications. The 'Clementine' mandarin was subjected to the open-, self-, and cross-pollination with the pollen grains of sweet lemon (*Citrus limetta*), grapefruit (*Citrus paradisi*), Lisbon lemon (*Citrus limon*) and sour orange (*Citrus aurantium*). The compatibility and incompatibility of pollinators were determined using controlled pollination methods and the microscopic analyses of pollen tube growth. The microscopic evaluations revealed that 'Clementine' mandarin is a self-incompatible cultivar but it is compatible with all studied species. The fruit set in the flowers that were pollinated with sweet lemon (73.75%), Lisbon lemon (71.25%), grapefruit (70%) and sour orange (70%) were not significantly different, while the self- and open- pollinated flowers produced a lower level of fruit set. The highest viable seeds (13.2) were recorded in the fruits that were pollinated with sour orange, while the self-pollinated ones had no seed. In addition, the pollens of sour orange were the most successful for penetration to the basal portion of style and into ovary of 'Clementine' mandarin. Evaluation of genetic affinity among *Citrus* species revealed that sour orange is the most genetically similar species with 'Clementine' mandarin. Results of this investigation showed that the source of pollen grain substantially affect the fruit set as well as qualitative and quantitative attributes of 'Clementine' mandarin. By considering all of the fruit-related factors, the pollens of *C. paradisi* and *C. limon* are suggested as the best choice for improving qualitative and quantitative characteristics of 'Clementine' mandarin.

**Keywords:** *Citrus*, fruit set, genetic relationship, pollen germination, pollination.

\* Corresponding author E-mail: zareii@jahromu.ac.ir

### مقدمه

ایران با سطح زیر کشت حدود ۲۹۰ هزار هکتار رتبه هشتم تولید مرکبات در دنیا را به خود اختصاص داده است (Asadi Kangarshahi & Akhlaghi Amiri, 2021). در بیشتر ارقام مرکبات به خصوص ارقام خود ناسازگار و غیر پارتنوکارپ، برای تولید محصول کافی، گرده‌افشانی از اهمیت زیادی برخوردار است. بنابراین وجود دانه‌گرده زنده و سازگار در زمان گرده‌افشانی ضروری است. نوع گرده در مرکبات بر کمیت، کیفیت و خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیایی میوه نقش به‌سزایی دارد (Talaei *et al.*, 2002). از طرف دیگر در ارقام پارتنوکارپ میوه‌های بدون بذر تولید می‌شود و بی‌بذری به عنوان یک مزیت باعث افزایش بازارپسندی محصول می‌گردد. ارقام خودناسازگار و نیز دگرناسازگار با بعضی از ارقام، در صورت عدم وجود گرده‌دهنده مناسب، میوه‌های کوچک نامرغوب و یا پر بذر تولید می‌کنند (Ortega & Dicenta, 2004). نارنگی کلمانتین (*Citrus clementina*) یکی از ارقام مهم مرکبات می‌باشد که به دلیل خودناسازگاری همواره مشکلاتی از لحاظ لقاح و تشکیل میوه به همراه دارد. بنابراین برای تولید میوه تجاری نیاز به گرده‌دهنده مناسب و سازگار می‌باشد (Ebadi *et al.*, 2017). دانه گرده ممکن است بر قسمت‌های مختلف میوه اثر متفاوتی داشته باشد. اثر دانه‌گرده بر خصوصیات میوه (متازنیا) و اثر دانه‌گرده بر کیفیت بذر (زنیا) دو نوع مختلف از این تاثیرات می‌باشند. دانه‌گرده می‌تواند در نحوه تشکیل و رشد بذر و آندوسپرم موثر باشد و اندازه آن را کوچک، بزرگ، ناقص و یا کامل نماید. با ایجاد هر یک از این حالت‌ها، رشد و تکامل فرابر میوه تحت تاثیر قرار می‌گیرد. برخی از هورمون‌های رشد میوه، نظیر جیبرلین از آندوسپرم بذر تأمین می‌شود و چنانچه منبع تأمین این نوع هورمون ناقص باشد و یا عملکرد ضعیفی داشته باشد، رشد میوه محدود شده و به اندازه مطلوب نخواهد رسید. از این رو اثر دانه گرده با بررسی اثرات فیزیولوژیکی رویان و آندوسپرم روی ویژگی‌های میوه به خوبی قابل درک است. بدیهی است که دانه‌های گرده‌ایی که موجب رشد ناقص بذر می‌شوند، در نهایت عملکرد را کاهش می‌دهند

(Dejampor & Garigorian, 2004). اصطلاح متازنیا برای اولین بار توسط سوینگل در سال ۱۹۲۸ عنوان گردید (Swingle, 1928). وی در آزمایش‌های خود متوجه شد که دانه‌های گرده تغییراتی در شکل، اندازه، وزن و حتی زمان رسیدن میوه به وجود می‌آورند. اثر متازنیا در درختان میوه نظیر سیب، خرما، زغال اخته، پسته، بادام، گیلان، گردوی آمریکایی و مرکبات و اثر زنیا در گردوی آمریکایی، بلوط، خرما و مرکبات توسط محققان مختلف گزارش شده است (Swingle, 1928; Riazhi & Rahemi, 1994; Asadi & Abknar, 1996; Kumar & Das, 1996; Wallace & Lee, 1999; Talaei *et al.*, 2002; Ehlenfeldt, 2003; Rasoli & Arzani, 2010; Militaru *et al.*, 2015). تحقیقات مختلفی در زمینه اثرات والد گرده دهنده بر خصوصیات کمی و کیفی میوه‌های تولید شده در برخی از گونه‌های مرکبات گزارش شده است (Wallace & Lee, 1999; Talaei *et al.*, 2002; Gambetta *et al.*, 2013). نتایج حاصل از بررسی اثر گرده‌افشانی بر پارتنوکاری، ناسازگاری و تعداد بذر در نارنگی رقم Afourer (دانه‌ال شانس حاصل از پایه مادری Murcott و والد گرده‌دهنده نامشخص) که یک رقم خود ناسازگار می‌باشد، نشان داده که در گرده‌افشانی آزاد درصد تشکیل میوه بدون بذر کاهش می‌یابد (بین ۷ تا ۳۴٪) از طرف دیگر در درختانی که از ورود زنبور عسل به اطراف آن‌ها جلوگیری شده بود، میوه‌های بدون بذر افزایش یافت (۹۸ تا ۹۹٪) (Gambetta *et al.*, 2013). این محققان نتیجه‌گیری نمودند که نارنگی Afourer در تولید میوه‌های پارتنوکارپ به صورت متفاوت عمل می‌کند. آن‌ها همچنین مشاهده کردند که در اثر خودگرده‌افشانی لوله گرده چهل درصد طول خامه را طی می‌کند و سپس متوقف می‌شود و این نشان می‌دهد که سیستم ناسازگاری گامتوفیتیکی می‌باشد (Gambetta *et al.*, 2013). در ارقام مرکبات ناسازگار، لوله گرده کوتاه و ضخیم همراه با رسوب کالوز نامنظم می‌باشد در حالی که در ارقام سازگار لوله گرده باریک و بلند با رسوب کالوز منظم است (Ngo *et al.*, 2001; Distefano *et al.*, 2009). به نظر می‌رسد در بیشتر مرکبات هیبریدی، ناسازگاری گامتوفیتیکی وجود دارد. با این وجود درجات

که در این رقم بین ۵۰۰ تا ۹۰۰ متر قابلیت جابجایی دانه گرده وجود دارد و در احداث باغ جهت دگرگرده‌افشانی یا جلوگیری از آن باید این فاصله‌ها را از منبع گرده‌زا مدنظر داشت (Chao *et al.*, 2005). پرتقال خونی Moro مناسب‌ترین گرده‌دهنده برای کاهش تعداد بذر در نارنگی کلمانتین و لیمو خوشه‌ای بهترین گرده‌دهنده برای افزایش تشکیل میوه در نارنگی گزارش شده‌اند (Asadi Abkenar, 1996).

روش‌های متعددی جهت بررسی سازگاری و ناسازگاری ارقام مختلف درختان میوه و تعیین گرده‌دهنده مناسب برای آن‌ها توسعه یافته است. یکی از این روش‌ها، گرده‌افشانی کنترل شده و ردیابی رشد لوله گرده با میکروسکوپ فلورسنس می‌باشد (Ortega & Dicenta, 2003). مطالعات برای شناسایی گرده‌دهنده مناسب برای گیلاس رقم قرمز رضائیه بعد از گرده‌افشانی کنترل شده با ارقام مختلف و بررسی با میکروسکوپ فلورسنس مشخص کرده که لوله گرده رقم مشکین شهر ۹۶ ساعت پس از گرده‌افشانی به تخمدان می‌رسد، که در نهایت این مطالعه میکروسکوپی با روش گرده‌افشانی کنترل شده در باغ مطابقت نشان داد و رقم مشکین شهر به عنوان گرده‌دهنده مناسب برای گیلاس رقم رضائیه انتخاب شده است (Mahmoodi *et al.*, 2007).

با توجه به گزارش‌های مختلف، دانه گرده در تشکیل بذر و کمیت و کیفیت میوه مرکبات بسیار موثر است. همچنین طراحی مناسب باغ و تنظیم فاصله درختان سازگار و ناسازگار از نظر گرده‌افشانی بر کنترل فرآیند گرده‌افشانی و مرغوبیت محصول، موثر است. در این پژوهش سعی شده علاوه بر تعیین درختان گرده‌زایی که باعث افزایش کمیت و کیفیت محصول می‌شود، نحوه رشد لوله گرده درون کلاله و تخمدان مورد بررسی قرار گیرد. در نهایت با استفاده از نشانگر مولکولی تنوع ژنتیکی ارقام مورد استفاده در آزمایش مشخص و تاثیر قربت ژنتیکی در لقاح بررسی گردید.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی و شرایط رشدی گیاهان

این پژوهش در سال ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ به صورت طرح

متفاوت ناسازگاری در بعضی از ارقام غیر هیبرید مثل نارنگی کلمانتین گزارش شده است (Distefano *et al.*, 2009). خودناسازگاری در مرکبات واکنش بین لوله گرده و بافت خامه می‌باشد (Yamamoto & Tominaga, 2002). به نظر می‌رسد واکنش ناسازگاری می‌تواند تحت تاثیر بلوغ مادگی و خامه در هنگام گرده افشانی قرار گیرد (Ngo *et al.*, 2001).

مطالعه روی پرتقال واشنگتن ناول بیانگر این است که میوه‌هایی که از طریق پارتنوکارپی تولید می‌شوند بی‌بذر بوده و یا فقط شامل یک بذر توخالی در میوه می‌باشند، در حالی که در گرده‌افشانی غیر مستقیم که از دانه گرده نارنج استفاده شده بود میوه‌ها دارای تعداد بذر بیشتری می‌باشند (El-Tomi, 2015). همچنین تعداد بذر تشکیل شده در پرتقال واشنگتن ناول تحت تاثیر نوع دانه گرده قرار می‌گیرد و تعداد بذر تشکیل شده در اثر گرده‌افشانی با دانه گرده لیموشیرین و نارنج به ترتیب از ۲ تا ۶/۶۷ عدد متغیر است (El-Tomi, 2015). نتایج حاصل از پرتقال بلدی نشان داده که میزان قند در میوه‌های ناشی از گرده‌افشانی غیر مستقیم بیشتر و میزان اسیدیته آن کمتر است (Sabry, 1990). ارزیابی اثر دانه گرده لایم-های Baladi و Agami و نارنگی Baladi روی لایم‌های Baladi و Agami نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری از لحاظ مواد جامد محلول، اسیدیته و ویتامین ث در دو سال آزمایش وجود نداشته، با این وجود در لایم Housseni در یک سال آزمایش مواد جامد محلول وقتی توسط دانه گرده نارنگی Baladi گرده‌افشانی شده بود افزایش یافته بود (Kitat *et al.*, 1994). نتایج حاصل از بررسی اثر دانه گرده روی سه رقم نارنگی نشان داده که منابع مختلف دانه گرده اثر معنی‌داری روی مقدار قند، اسیدیته، تعداد بذر، وزن و درصد تشکیل میوه دارند و نتیجه‌گیری شده که در کشت توام هر رقم خودناسازگار نارنگی با گرده‌دهنده مناسب آن و مدیریت صحیح انتقال دهنده‌های گرده، می‌توان باعث بهبود عملکرد کمی و کیفی میوه شد (Wallace & Lee, 1999). مطالعه روی فاصله حمل شده دانه گرده نارنگی کلمانتین و Afourer توسط زنبور عسل، به کمک مارکرهای مولکولی نشان داده

با پارافیلیم درز بندی گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. ۱۸ ساعت بعد از کاشت، ظروف کشت با ۰/۵ سی سی اسید استیک ۴۵ درصد تثبیت گردیدند. درصد جوانه‌زنی به وسیله میکروسکوپ مجهز به عدسی شیئی با بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر تعیین گردید. در ۸ میدان دید که به طور تصادفی انتخاب می‌شدند، درصد جوانه‌زنی ۴۰۰ عدد دانه گرده تعیین شد. دانه گرده‌ای جوانه زده محسوب شد که طول لوله گرده آن برابر یا بیشتر از قطر دانه گرده بود (Chelong & Sdoodee, 2012).

#### آزمایش گرده‌افشانی

تعداد بیست و چهار درخت یکنواخت (هر درخت به عنوان یک واحد آزمایشی) در یک باغ انتخاب شدند. روی هر درخت در هر تکرار ۸ تا ۱۰ شاخه با تعداد جوانه‌ی گل کافی در مرحله بادکنکی انتخاب و اخته گردید. سپس به منظور محافظت مادگی‌ها از گرده‌افشانی ناخواسته با گرده ارقام دیگر، شاخه‌ها توسط کیسه‌هایی از جنس ململ پوشانیده شد. در گرده‌افشانی دستی به محض مشاهده ترشحات کلاله، گل‌ها با گرده مورد نظر گرده‌افشانی شدند و یک هفته بعد از گرده‌افشانی پاکت‌ها از روی گل‌ها برداشته شد. مادگی‌های گرده‌افشانی شده (بین سه تا هشت عدد برای هر شاخه) جهت بررسی میکروسکوپی ۹۶ ساعت بعد از گرده‌افشانی از شاخه جدا شد و در محلول FAA (اتانول ۷۰ درصد، فرمالدئید ۴۰ درصد و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۱:۱۸) تثبیت و تا زمان انجام مطالعات میکروسکوپی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Talaei et al., 2002; Chelong & Sdoodee, 2012). نمونه‌های میکروسکوپی براساس روش Chelong & Sdoodee (2012) آماده شد. به‌طور خلاصه قسمت مادگی با آب مقطر برای سه ساعت شست و شو شدند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول سولفیت سدیم ۰/۵٪ در فشار ۱ psi نگهداری شدند. برای نرم شدن بافت و رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها در ماده رنگی آنیلین بلو ۰/۱٪ و بافر فسفات پتاسیم نرمال ۰/۱٪ قرار گرفتند و پس از کرک‌زدائی روی لام له شدند (Talaei et al., 2002; Chelong & Sdoodee, 2012).

پایه بلوک‌های کامل تصادفی در شش تیمار با چهار تکرار در بخش مرکزی شهرستان جهرم انجام گرفت. درختان مورد مطالعه در زمان آغاز آزمایش ۸ ساله بوده و روی پایه‌های لیموترش پیوند شده بودند. باغ تجاری در شهرستان جهرم با عرض جغرافیایی ۲۸ درجه و ۱۹ دقیقه تا ۲۹ درجه و ۱۰ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۲ درجه و ۴۵ دقیقه تا ۵۴ درجه و ۴ دقیقه شرقی قرار گرفته است. آب و هوای گرم و خشک و میانگین میزان بارندگی حدود ۲۶۰ میلی‌متر در سال می‌باشد. میانگین دمای منطقه حدود ۲۰ درجه سانتی‌گراد و بیشینه دما در تابستان به ۴۵ درجه و کمینه دما در زمستان به ۵- درجه سانتی‌گراد می‌رسد. ارتفاع متوسط، حدود ۱۰۵۰ متر از سطح دریا می‌باشد.

#### تیمارهای مورد استفاده

تیمارهای ارزیابی شده در این آزمایش عبارت بودند از: آزادگرده‌افشان، گرده نارنگی کلمانتین (خودگشنی)، گرده لیموشیرین، گرده گریپ فروت، گرده لیمو خارجی (لیسبون) و گرده نارنج (دگرگشنی).

#### تعیین درصد جوانه‌زنی

به‌منظور تهیه دانه‌های گرده، شاخه‌های دارای جوانه‌ی گل از درختان مذکور در مرحله تورم نسبی انتخاب و به آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشگاه جهرم منتقل و در ظروف حاوی آب قرار داده شد. بساک‌ها در مرحله تورم کامل جمع‌آوری و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و در شرایط سایه نگهداری شدند. پس از خشک شدن کامل بساک‌ها و آزاد شدن گرده‌ها، دانه‌های گرده در ظروف شیشه‌ای درب‌دار تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Talaei et al., 2002). برای تعیین درصد جوانه‌زنی دانه‌های گرده از محیط کشت محتوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدبوریک، ۳۰۰ میلی گرم در لیتر نترات کلسیم، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات منیزیم و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نترات پتاسیم، ۱۵٪ ساکارز و ۱٪ آگارز استفاده شد (Talaei et al., 2002; Chelong & Sdoodee, 2012). گرده‌ها به وسیله قلم موی نرم بر سطح محیط کشت پاشیده شد و سپس ظروف کشت

هایی که چند حرف جلوی آن‌ها نوشته شده است میانگین اعداد حروف در نظر گرفته شده است. سپس مجموع اعداد به دست آمده در هر فاکتور که در ستون آخر آمده است، تعیین کننده بهترین گرده‌دهنده برای نازنگی کلماتین می‌باشد.

#### نشانگر مولکولی RAPD

استخراج DNA از نمونه‌های برگ گیاهان مورد آزمایش به روش دوپل و دوپل استخراج گردید (Doyle & Doyle, 1987). نمونه‌های DNA استخراج شده پس از رقیق‌سازی توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) به وسیله ۱۰ آغازگر تصادفی ریپید مطابق روش Jalilian *et al.* (2018) تکثیر شدند. قطعات تکثیری به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و تحت نور ماورای بنفش قابل روئیت و به صورت حضور باند (۱) و عدم حضور باند (۰) امتیازدهی گردیدند.

#### محاسبات آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری MSTATC و SPSS استفاده شد و میانگین داده‌های به دست آمده با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. به علاوه تشابه ژنتیکی ارقام مورد استفاده توسط مارکر ریپید انجام گرفت. ماتریس تشابه گونه‌های مرکبات مورد استفاده بر اساس داده‌های مولکولی و از طریق ضریب تشابه جاکارد با استفاده از نرم‌افزار NTsys (نسخه ۲،۲) ترسیم گردید.

تعداد بذری که در میوه نازنگی کلماتین تحت تیمارهای مختلف گرده‌افشانی تشکیل شده بود با شباهت ژنتیکی حاصل شده در آزمایش مولکولی مقایسه گردید و همبستگی این دو فاکتور ارزیابی گردید تا اثر شباهت ژنتیکی در میزان تولید بذر تخمین زده شود.

#### نتایج و بحث

نتایج بررسی قدرت جوانه‌زنی دانه‌گرده نشان داد که همه گرده‌های ارقام مورد استفاده در آزمایش، از جمله نازنگی کلماتین، از قوه‌نامیه مناسبی برخوردار بودند (شکل ۱). نتایج آنالیز واریانس مشخص کرد که اثر تیمار در فاکتورهای وزن میوه، حجم میوه، درصد

سپس نمونه‌های تیمار شده (مادگی‌های گرده‌افشانی شده به وسیله گرده‌های مختلف) به وسیله میکروسکوپ فلورسنس مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعداد کل دانه گرده، تعداد دانه‌های گرده جوانه‌زده در سطح کلاله، تعداد لوله‌های گرده موجود در یک سوم فوقانی و تحتانی خامه و همچنین تعداد لوله گرده نفوذی به تخمدان در هر یک از تیمارهای مورد مطالعه شمارش شدند. در نهایت درصد جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلاله و درصد لوله‌های گرده نفوذی به هر قسمت خامه و تخمدان نسبت به تعداد دانه گرده جوانه‌زده در سطح کلاله محاسبه شد.

اندازه‌گیری پارامترهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی میوه‌ها در مرحله رسیدگی کامل برداشت شدند. اندازه طول و عرض میوه‌های برداشت شده توسط کولیس تعیین و سپس متوسط وزن میوه توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم محاسبه شد. از میوه‌ها عصاره تهیه و با استفاده از رفرکتومتر دستی (مدل VBR-92T ساخت چین) میزان مواد جامد محلول در هر تیمار تعیین شد. pH آب میوه نیز توسط pH متر اندازه‌گیری گردید. میزان اسید کل به روش تیتراسیون با سود ۰/۲ نرمال و معرف فنول فتالین محاسبه شد (Asadi Abkenar, 1996). ویتامین ث با استفاده از روش تیتراسیون ید در یدورپتاسیم در حضور معرف نشاسته یک درصد انجام گرفت (Babazadeh Darjazi, 2013).

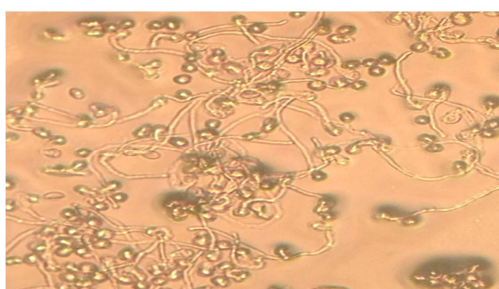
#### تعیین بهترین گرده‌دهنده

به منظور تعیین بهترین گونه گرده‌دهنده برای نازنگی کلماتین، جدولی تهیه گردید که در آن بر اساس نتایج حاصل از فاکتورهای اندازه‌گیری شده امتیازدهی به گونه‌ها صورت گرفت (جدول ۳). بدین منظور به ایده‌آل‌ترین حالت در هر یک از فاکتورها عدد ۶ و به ضعیف‌ترین آن عدد ۱ تعلق گرفت. در جهت اعمال معنی‌داری بین تیمارها به صورت قراردادی اینگونه عمل گردید که به حرف‌هایی که در جلو میانگین‌ها آمده است، به حرف a عدد ۶ و حرف b عدد ۵، به حرف c عدد ۴ و به همین ترتیب تا حرف f که عدد ۱ به آن تعلق می‌گیرد. لازم به ذکر است برای میانگین-

گرم) وجود نداشت (جدول ۲). همچنین کمترین وزن میوه مربوط به میوه‌های حاصل از گرده‌افشانی با گرده لیموشیرین و میوه‌های حاصل از خودگرده‌افشانی (۹۶/۲۵ گرم) می‌باشد. بنابراین اگر هدف را افزایش وزن میوه در درخت نارنگی کلمانتین در نظر بگیریم لیمولیسبون، گریپ‌فروت و نارنج گرده‌زای مناسبی می‌باشند. این امر با تنظیم فاصله کشت با درختان دیگر به‌خصوص لیموشیرین که باعث کاهش وزن میوه می‌شوند و همچنین مدیریت صحیح گرده‌افشان‌ها در باغ محقق می‌شود.

تشکیل میوه، تعداد بذر سالم و چروکیده در سطح ۱ درصد و در فاکتورهای قطر و طول میوه در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار داشته است (جدول ۱).

مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که هر چند بیشترین وزن میوه (۱۰۹/۳ گرم) مربوط به تیماری بود که گل‌ها با گرده لیمولیسبون گرده‌افشانی شده بودند، ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین میوه‌های گرده‌افشانی‌شده با لیمولیسبون و میوه‌های حاصل از گرده‌افشانی با گرده گریپ‌فروت (۱۰۷/۵ گرم) و گرده‌افشانی آزاد (۱۰۶/۳



شکل ۱. تصویر رشد دانه گرده رقم نارنگی کلمانتین در پتری‌دیش ۲۴ ساعت پس از کشت با استفاده از میکروسکوپ دارای بزرگنمایی ۱۰ برابر.

Figure 1. Photograph of pollen growth of Clementine mandarin in a petri dish 24 hours after culture using a microscope with a magnification of 10 times.

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر نوع گرده‌افشانی بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی میوه نارنگی کلمانتین.

Table 1. Results of variance analysis effect of pollination type on some morphological attributes of Clementine mandarin fruit.

Sources of variation	df	Mean of squares						
		Wrinkled seeds	Healthy seeds	Fruit set	Fruit volume	Fruit length	Fruit diameter	Fruit weight
Pollen source	5	19.242**	4.945**	2275.542**	213.067**	0.235*	0.237*	131.167**
Error	15	0.886	0.035	17.097	40.444	0.071	0.061	20.16
F-value		21.71	141.58	133.09	5.27	3.3	3.88	6.36
Coefficient of variation (%)		14.56	6.6	7	4.43	3.73	3.65	4.39

\*\* و \* به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد. \*\*، \* : Significantly difference at 1 and 5% of the probability level, respectively.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر گرده‌افشانی کنترل شده بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی میوه نارنگی کلمانتین.

Table 2. Mean comparison effect of controlled pollination on some morphological attributes of Clementine mandarin fruit.

Pollen source	Wrinkled seeds	Healthy seeds	Fruit set (%)	Fruit volume (ml)	Fruit length (cm)	Fruit diameter (cm)	Fruit weight (g)
Open-pollination	6.25 b	6.70 c	57.50 b	147.3 a	7.325 a	6.93 a	106.30 a
Self-pollination	2.25 c	0.00 d	11.75 c	134.8 b	6.875 b	6.50 b	96.25 b
Sweet lemon pollen	7.25 ab	9.20 bc	73.75 a	134.0 b	6.850 b	6.43 b	96.25 b
Grapefruit pollen	6.75 ab	10.47 b	70.00 a	149.0 a	7.350 a	6.90 a	107.50 a
Lisbon lemon pollen	8.25 a	12.24 ab	71.25 a	150.5 a	7.370 a	7.00 a	109.30 a
Sour orange pollen	8.00 a	13.20 a	70.00 a	146.0 a	7.250 ab	6.88 a	105.00 a

در هر ستون میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

بیشترین میانگین قطر میوه نیز به ترتیب در میوه‌های حاصل از گرده‌افشانی با گرده لیمولیسبون، گرده‌افشانی آزاد، گرده گریپ‌فروت و گرده نارنج مشاهده شد (جدول ۳). کمترین قطر میوه مربوط به میوه‌های حاصل از گرده‌افشانی با گرده لیمولیسبون بود. مشابه با دو فاکتور قبلی، بیشترین طول میوه نیز مربوط به تیمار لیمولیسبون و گریپ‌فروت و گرده‌افشانی آزاد بود که با گرده‌افشانی با گرده نارنج اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین طول میوه در تیمار لیموشیرین و خودگرده‌افشانی ثبت شد. روند مشابهی در مورد حجم میوه مشاهده گردید و تیمارهای لیمولیسبون، گریپ‌فروت، گرده‌افشانی آزاد و نارنج بیشترین حجم میوه را داشتند در حالی که در میوه‌های حاصل از گرده‌افشانی با گرده لیموشیرین و میوه‌های حاصل از خودگرده‌افشانی کمترین حجم میوه مشاهده شد. به ترتیب درصد تشکیل میوه حاصل از گرده‌افشانی با گرده‌های لیموشیرین، لیمولیسبون، گریپ‌فروت و نارنج بیشتر از دو نوع دیگر گرده‌افشانی بود. براساس نتایج این تحقیق در تیمار خودگرده‌افشانی نارنگی کلمانتین کمتر از ۱۲ درصد تشکیل میوه حاصل شد. این میزان تشکیل میوه می‌تواند از طریق پارتنوکاریک حاصل شده باشد، البته درصد بسیار پایین خودگشنی در انواع گیاهان دگرگشنی را نمی‌توان نادیده گرفت. مشابه این نتایج گزارشاتی از تشکیل درصد کمی میوه ناشی از خودگشنی در ارقام مختلف نارنگی کلمانتین گزارش شده است (Garcia-Martinez, 1984; Chao et al., 2005; Mesejo et al., 2012; Garcia-Papi, 2012). با توجه به اینکه پارتنوکاری در نارنگی کلمانتین از نوع اختیاری می‌باشد و این نوع پارتنوکاری می‌تواند تحت تاثیر محرک‌هایی از قبیل افزایش گرده‌افشانی بیشتر شود (Mesejo et al., 2012)، به نظر می‌رسد که گرده خودی، هرچند باعث تشکیل بذر نشده ولی باعث افزایش میزان پارتنوکاری در نارنگی کلمانتین شده است. نتایج مشابهی در تایید این مشاهدات در مورد نارنگی Comune که خود ناسازگار می‌باشد گزارش شده و بیان شده که خودگرده‌افشانی باعث القای بیان ژن‌های مربوط به جیبرلین و انتقال سیگنال اکسین در خامه گل گردیده که در نهایت باعث افزایش میزان میوه‌های پارتنوکارپ گردیده است

(Distefano et al., 2009). مقایسه میانگین تعداد بذر سالم نشان می‌دهد که بیشترین بذر سالم در میوه‌های حاصل از تیمار گرده نارنج و بعد از آن گرده لیمولیسبون مشاهده گردید و کمترین بذر سالم مربوط به میوه‌های حاصل از خودگرده‌افشانی (صفر عدد) بود. به علاوه بیشترین تعداد بذر چروکیده میوه در میوه‌های مربوط به تیمار گرده لیمولیسبون مشاهده شد. مشابه با بذرهای سالم، میوه‌های حاصل از خودگرده‌افشانی کمترین تعداد بذر چروکیده را در خود داشتند. بنابراین منبع دانه گرده تاثیر معنی‌داری در تشکیل بذر نارنگی کلمانتین داشت. این نتیجه با گزارش‌های قبلی (Sabry, 1990; Kitat et al., 1994; El-Tomi, 1997; Asadi Abkenar, 1996; Wallace & Lee, 1999; Talaei et al., 2002)، که بیان نموده‌اند نوع دانه گرده می‌تواند روی تعداد بذر در میوه موثر باشد، مطابقت دارد. وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها از لحاظ تعداد بذر به دلیل اثر متفاوت دانه گرده هر رقم روی میوه و بذر، عدم سازگاری جنسی کامل بین نارنگی کلمانتین و ارقام گرده‌دهنده و تفاوت در میزان درصد جوانه‌زنی دانه گرده هر تیمار می‌باشد (Chao, 2005).

بر اساس نتایج حاصل از فاکتورهای اندازه‌گیری شده (جدول ۲) و برای تعیین بهترین گرده‌دهنده نارنگی کلمانتین جدول ۳ طراحی گردید. با توجه به جدول ۳ بهترین نوع گرده‌افشانی در نارنگی کلمانتین گرده‌افشانی با گرده گریپ‌فروت، آزادگرده افشانی و بعد از آن‌ها گرده لیمولیسبون می‌باشد. در شرایط این آزمایش گرده‌افشانی با گرده لیموشیرین و خودگرده‌افشانی بدترین حالت را ایجاد کرده است. بنابراین در هنگام طراحی باغ و انتخاب ارقام باید شرایطی ایجاد گردد که گرده‌افشانی در جهت دگرگرده‌افشانی با درختان گریپ‌فروت و لیمولیسبون باشد. در هنگام کاشت ارقام مختلف در باغ باید این نکته مد نظر قرار گیرد که نارنگی کلمانتین از درختانی که در جدول ۳ دارای کمترین امتیاز هستند با فاصله بیشتری کاشته شوند از طرف دیگر می‌توان با رقمی مثل لیمولیسبون و گریپ‌فروت و حتی نارنج که در این آزمایش به عنوان گرده‌دهنده برتر انتخاب شده‌اند با فاصله کم و در کنار یکدیگر کاشته شوند تا

لیمولیسبون و گریپ‌فروت بیشترین درصد آب را به خود اختصاص دادند. از طرفی درصد آب در میوه‌های حاصل از گرده لیموشیرین و خودگرده‌افشانی کمترین میزان در بین تیمارهای مختلف بود. در مجموع نتایج این بخش بیانگر تاثیر بالای نوع دانه گرده بر خصوصیات میوه نارنگی کلمانتین (متازنیا) می‌باشد. این نتایج با گزارشات قبلی که نشان داده‌اند دانه گرده می‌تواند روی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی میوه تغییراتی ایجاد کند، مطابقت دارد (Sabry, 1990; Kitat *et al.*, 1994; Asadi abknar, 1996; El-Tomi, 1997; Wallace & Lee, 1999; Talaei *et al.*, 2002). بنابراین در هنگام طراحی باغ باید فاصله ارقام از یکدیگر را مدنظر قرار داد و همچنین در مدیریت گرده‌افشانی و عوامل دخیل در آن تدابیر لازم اندیشیده شود. با توجه به نتایج حاصل از فاکتورهای کمی و کیفی نارنگی کلمانتین می‌توان پیشنهاد داد که گرده‌های لیمولیسبون و گریپ‌فروت به‌عنوان بهترین گرده‌افشان برای استفاده در باغ‌های نارنگی استفاده شود.

نتایج حاصل از بررسی همبستگی فاکتورهای مختلف میوه نارنگی نشان داد که صفات وزن، حجم، ابعاد، حجم آب، وزن آب، و درصد آب میوه همبستگی مثبت و معنی داری با یکدیگر دارند. همچنین درصد تشکیل میوه با تعداد بذر سالم و چروکیده همبستگی مثبت و معنی داری دارد (جدول ۶).

در آزادگرده‌افشانی احتمال گرده‌افشانی نارنگی کلمانتین با گرده این ارقام بالا باشد.

مقایسه میانگین ترکیبات تشکیل دهنده میوه نشان داد که حجم آب میوه در میوه‌های حاصل از گرده‌افشانی با گرده لیمولیسبون، گرده گریپ‌فروت، گرده نارنج و گرده‌افشانی باز بیشتر از میزان آب میوه‌های حاصل از گرده‌افشانی با گرده لیموشیرین و خودگرده‌افشانی بود (جدول ۵). نتایج وزن میوه مشابه با وزن آب میوه ثبت گردید. همچنین بیشترین میزان ویتامین ث مربوط به میوه‌های حاصل از تیمار گرده‌افشانی با گرده لیمولیسبون و گرده گریپ‌فروت و همچنین کمترین میزان ویتامین ث مربوط به تیمار حاصل از خودگرده‌افشانی و گرده‌افشانی آزاد می‌باشد. آنالیز واریانس مشخص کرد اثر تیمار گرده‌افشانی بر فاکتورهای ویتامین ث، مواد جامد محلول و درصد آب میوه در سطح ۱ درصد و شاخص برداشت میوه در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار، اما بر اسید کل اثر معنی داری نداشت ( $P > 0.05$ ) (جدول ۴).

مقایسه میانگین مواد جامد محلول نشان می‌دهد که بیشترین میزان آن مربوط به تیمار گل‌ها با گرده لیمولیسبون، نارنج و لیموشیرین ثبت گردید، درحالی‌که میوه‌های حاصل از خود گرده‌افشانی دارای کمترین میزان مواد جامد محلول بودند (جدول ۵). مقایسه میانگین درصد آب میوه نشان می‌دهد که از میان تیمارهای مختلف گرده، میوه‌های حاصل از گرده

جدول ۳. تعیین بهترین گرده‌دهنده برای نارنگی کلمانتین.

Table 3. Determination the best pollinator for Clementine mandarin.

Pollen source	Healthy seeds	Fruit set (%)	Fruit volume (ml)	Fruit length (cm)	Fruit diameter (cm)	Fruit weight (g)	Total
Self-pollination	6	4	5	5	5	5	30
Sweet lemon pollen	4.5	6	5	5	5	5	30.5
Grapefruit pollen	4	6	6	6	6	6	34
Lisbon lemon pollen	3.5	6	6	6	6	6	33.5
Sour orange pollen	3	6	6	6	6	6	33

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر نوع گرده‌افشانی بر برخی شاخص‌های آب میوه نارنگی کلمانتین.

Table 4. Analysis of variance for the effects of pollination type on the fruit juice attributes of Clementine mandarin.

Sources of variation	df	Mean of squares				
		Vitamin C	TA	TSS	TSS/TA	Juice percentage
Pollen source	5	99.78**	0.016 ns	1.31**	2.10*	28.6**
Error	15	11.019	0.006	0.06	0.08	5.023
F-value		9.05	2.62	21.88	28.12	5.69
Coefficient of variation(%)		3.38	10.85	2.47	5.27	4.57

ns و \*\* به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

ns and \*\*: Non-significantly difference and significantly difference at 1% probability level, respectively



جدول ۵. مقایسه میانگین اثر نوع گرده افشانی بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی میوه نارنگی کلمانتین.

Table 5. Mean comparison effect of pollination type on some biochemical attributes of Clementine mandarin fruit.

Pollen source	Vitamin C (mg/100 g fruit juice)	TSS (%)	TA (mg/100 g fruit juice)	TSS/TA (Ratio)	Juice (%)
Open-pollination	93.75 c	9.738 b	0.745 a	13.07 b	48.49 ab
Self-pollination	91.75 c	8.87 c	0.663 a	13.38 b	46.54 b
Sweet lemon pollen	96.25 bc	10.25 a	0.653 a	15.70 a	45.68 b
Grapefruit pollen	103.30 a	9.85 b	0.819 a	12.03 c	51.96 a
Lisbon lemon pollen	103.80 a	10.43 a	0.700 a	14.90 ab	52.09 a
Sour orange pollen	100.00 ab	10.30 a	0.763 a	13.50 b	49.31 ab

در هر ستون میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

جدول ۶. همبستگی بین صفات اندازه گیری شده میوه نارنگی کلمانتین حاصل از گل‌های گرده افشانی شده با دانه گرده متفاوت.

Table 6. Correlation between Clementine mandarin fruit characteristics produced through pollination with different pollen grains.

	Fruit weight (g)	Fruit diameter (cm)	Fruit length (cm)	Fruit volume (ml)	Fruit set (%)	Volume of fruit juice (ml)	Number of healthy seeds	Number of wrinkled seeds	Fruit juice weight (g)	Vitamin C (mg/100g fruit juice)	TA (mg/100g fruit juice)	TSS (%)	Juice percentage (%)
Fruit weight (g)	1												
Fruit diameter (cm)	+0.93**	1											
Fruit length (cm)	+0.92**	+0.98**	1										
Fruit volume (ml)	+0.96**	+0.94**	+0.96**	1									
Fruit set (%)	+0.39ns	+0.28ns	+0.30ns	+0.36ns	1								
Volume of fruit juice (ml)	+0.96**	+0.89**	+0.86**	+0.89**	+0.37ns	1							
Number of healthy seeds	+0.47*	+0.37ns	+0.39ns	+0.45*	+0.95**	+0.43*	1						
Number of wrinkled seeds	+0.52**	+0.31*	+0.43*	+0.49*	+0.88**	+0.46*	+0.91**	1					
Fruit juice weight (g)	+0.96**	+0.90**	+0.87**	+0.89**	+0.38ns	+0.99**	+0.44*	+0.48*	1				
Vitamin C (mg/100g fruit juice)	+0.43*	+0.38ns	+0.37ns	+0.42*	+0.58**	+0.49*	+0.69**	+0.58**	+0.50*	1			
TA (mg/100 g fruit juice)	+0.50*	+0.55**	+0.53**	+0.53**	+0.24ns	+0.44*	+0.28ns	+0.27ns	+0.43*	+0.37ns	1		
TSS (%)	+0.41*	+0.40ns	+0.37ns	+0.37ns	+0.85**	+0.41*	+0.87**	+0.84**	+0.42*	+0.56**	+0.14ns	1	
Juice percentage (%)	+0.87**	+0.80**	+0.77**	+0.77**	+0.274ns	+0.96**	+0.34ns	+0.35ns	+0.97**	+0.47*	+0.32ns	+0.35ns	1

\*\*\*, \*\*: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و بدون تفاوت معنی‌دار.

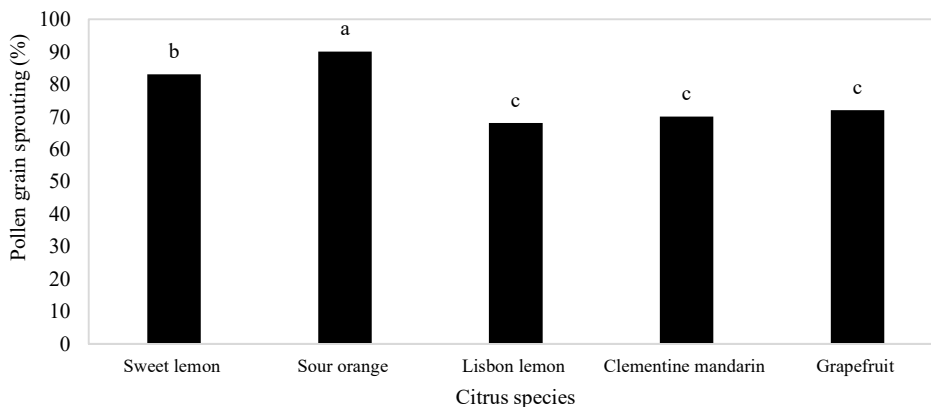
\*\*\*, \*: Significantly difference at 1 and 5% of probability level, and non-significantly difference, respectively.

بررسی اثرات فیزیولوژیکی رویان و داندرون روی ویژگی‌های میوه، اثر دانه گرده به خوبی قابل درک است (Dejampor & Garigorian, 2004).

بررسی درصد جوانه‌زنی دانه‌های گرده انواع گونه‌های مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که گرده‌های نارنج نسبت به بقیه گونه‌ها از قدرت جوانه‌زنی بیشتری برخوردار می‌باشند و پس از آن گرده‌های لیموشیرین در رتبه دوم قرار داشتند (شکل ۲). قدرت جوانه‌زنی گرده‌های گریپ فروت، نارنگی کلمانتین و لیمولیسبون تفاوت معنی‌داری با هم نداشت.

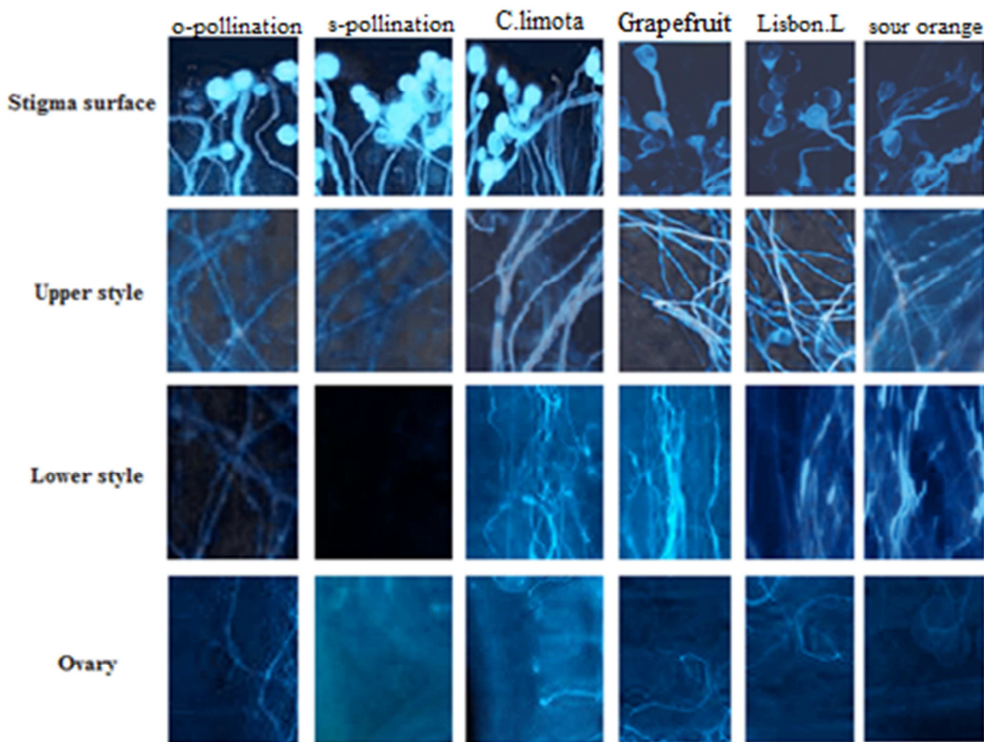
تجزیه واریانس داده‌های حاصل از مطالعات میکروسکوپی نشان داد که بین تیمارهای گرده افشانی مورد مطالعه از نظر درصد جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلالة و درصد لوله‌های گرده در بخش‌های مختلف خامه و درون تخمدان تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد (شکل ۳، جدول ۷).

یکی از فاکتورهای تاثیرگذار در اندازه میوه گونه‌های مختلف گیاهی، تعداد بذر آن می‌باشد (Buccheri & Di Vaio, 2005, Doi et al., 2018). بذور به‌عنوان یکی از منابع اصلی تولید هورمون‌های گیاهی عمل نموده و به‌طور غیر مستقیم باعث رشد بخش‌های مختلف پریکارپ میوه می‌گردند (Buccheri & Di Vaio, 2005). در این آزمایش همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تعداد بذر با اندازه و وزن میوه مشاهده گردید. افزایش تعداد میوه همبستگی مثبت بسیار بالایی با تعداد بذر درون میوه داشت و این افزایش تاثیر منفی بر حجم و وزن میوه نداشت. همان‌طور که در جدول ۶ مشخص است با افزایش درصد تشکیل میوه میزان ویتامین ث و مواد جامد محلول افزایش یافته است. با افزایش تعداد بذر سالم میزان ویتامین ث افزایش یافته است. با این وجود، بذر چروکیده نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری در میزان ویتامین ث دارد اما اثر آن از بذر سالم کمتر است. با



شکل ۲. میزان جوانه زنی دانه‌های گرده گونه‌های مختلف مرکبات مورد استفاده در این آزمایش.

Figure 2. Pollen sprouting of different *Citrus* species used in this experiment.



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپی رشد لوله گرده گونه‌های مختلف مرکبات در بخش‌های مختلف مادگی نارنگی کلمانتین.

Figure 3. Microscopic images of pollen tube growth of various *Citrus* species in different parts of Clemantine mandarin's pistil.

جدول ۷. نتایج تجزیه واریانس اثر نوع گرده بر درصد جوانه‌زنی آن در سطح کلانه و رشد لوله‌های گرده موجود در قسمت‌های مختلف خامه و تخمدان نارنگی کلمانتین.

Table 7. Results of analysis variance effect of pollen grain sources on the germination and growth of pollen tubes in different parts of style and ovary in Clemantine mandarin.

Sources of variation	df	Mean of squares			
		Stigma surface	Upper style	Lower style	Ovary
Pollen source	5	835.324**	701.127**	559.118**	388.921**
Error	15	36.811	31.624	28.692	22.302
F-value		22.69	22.17	19.48	17.43
Coefficient of variation (%)		15.34	18.74	12.78	14.52

\*\* Significantly difference at 1% of probability level.

\*\* تفاوت معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد.

دانه‌های گرده نارنج در محیط کشت بیشتر از بقیه گونه‌ها بود. بنابراین بالاتر بودن جوانه‌زنی دانه‌های گرده نارنج را می‌توان تا حدودی مرتبط با قدرت نامیه بالاتر این گونه در مقایسه با دیگر گونه‌های مرکبات دانست. خودگرده‌افشانی پایین‌ترین درصد جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله‌های گرده به بخش پایینی خامه را داشت، لذا خودگرده‌افشانی پایین‌ترین قابلیت تأمین رشد لوله‌های گرده را دارا می‌باشد و در نتیجه از میوه‌بندی ضعیف‌تری برخوردار می‌باشد و میوه‌های حاصله بدون بذر و پارتنوکارپ می‌باشند.

فقدان رشد لوله گرده در طول خامه و تخمدان گل‌های خودگرده‌افشانی‌شده نارنگی کلمانتین تاییدی بر وجود خودناسازگاری از نوع گامتوفیتیک در این گونه مرکبات است. این نتایج منطبق با گزارشات قبلی می‌باشد (El-Tomi, 1997; Distefano *et al.*, 2009, 2012). هرچند به نظر می‌رسد که در بسیاری از انواع مرکبات هیبرید خودناسازگاری گامتوفیتیک نوع غالب خودناسازگاری می‌باشد (Soost, 1956; Distefano *et al.*, 2009)، اما درجات متفاوتی از خودناسازگاری در برخی از گونه‌های غیرهیبرید از قبیل نارنگی کلمانتین گزارش شده است (Distefano *et al.*, 2009). خودناسازگاری در مرکبات در نتیجه برهمکنش بین لوله گرده و بافت خامه ایجاد می‌گردد و بر اساس درجه ناسازگاری هر بخش خامه می‌توان آن را تقسیم‌بندی نمود (Ngo *et al.*, 2001). به‌علاوه گزارش شده است که این پدیده می‌تواند تحت تاثیر میزان رسیدگی مادگی و خامه طی گرده‌افشانی باشد و قبل از باز شدن گل عمل نمی‌کند (Ngo *et al.*, 2001). همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که گرده تمام گونه‌های مرکبات مورد استفاده در این آزمایش با نارنگی کلمانتین سازگار می‌باشند.

شباهت ژنتیکی گونه‌های مرکبات بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر مولکولی نشان داد که لیمولیسبون و لیمو شیرین شبیه‌ترین گونه‌ها از نظر ژنتیکی (تشابه ژنتیکی ۰/۹۳) به یکدیگر می‌باشند در حالی‌که لیمولیسبون و نارنج حداقل تشابه ژنتیکی (تشابه ژنتیکی ۰/۱۴) را دارا می‌باشند (جدول ۹).

نتایج مقایسه میانگین صفات مربوط به اثر انواع مختلف دانه گرده بر جوانه‌زنی آن و رشد لوله گرده به تفکیک در بخش‌های مختلف مادگی گل نارنگی کلمانتین در جدول ۸ ارائه شده است. بر اساس نتایج بالاترین درصد جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلالة مربوط به گرده نارنج می‌باشد که با تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری دارد. کمترین درصد جوانه‌زنی نیز مربوط به خودگرده‌افشانی و گرده گریپ‌فروت می‌باشد. گرده‌های نارنج نسبت به بقیه تیمارها دارای بالاترین درصد لوله‌های گرده نفوذی به قسمت فوقانی خامه، قسمت تحتانی خامه و درون تخمدان بودند، البته گرده‌های لیمولیسبون از نظر رشد لوله گرده تا بخش درون تخمدان با تیمار گرده‌افشانی با نارنج اختلاف معنی‌داری نداشتند. از طرفی از بین تیمارهای مختلف، گرده‌های خودی (نارنگی کلمانتین) کمترین درصد لوله‌های گرده نفوذی به قسمت فوقانی خامه (۳۵/۳٪)، قسمت تحتانی خامه (صفر) و درون تخمدان (صفر) را به خود اختصاص دادند.

مطالعه حاضر نشان داد که در تمامی تیمارها درصد جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلالة درحد مناسبی صورت گرفته که این امر بیانگر عدم وجود مشکل جوانه‌زنی دانه گرده تیمارهای مورد بررسی می‌باشد. با این وجود عدم رشد لوله گرده حاصل از خودگرده‌افشانی در طول خامه و تخمدان، نشان از خودناسازگاری نارنگی کلمانتین دارد. در حالی که رشد لوله گرده و نفوذ به تخمدان در تیمارهای دیگر نشان می‌دهد که نارنگی کلمانتین قابلیت حمایت از اتصال دانه گرده، جوانه‌زنی دانه گرده و نفوذ لوله‌های گرده به بافت هادی را دارد و با گونه‌های استفاده شده سازگار می‌باشد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که، در بین تیمارهای مورد مطالعه، گرده نارنج میزان بالایی از درصد جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلالة را به همراه دارد و همچنین از قابلیت بیشتری در تأمین رشد لوله‌های گرده در خامه و تا حد قابل قبولی در تخمدان برخوردار می‌باشد. این موضوع می‌تواند موفقیت لقاح و در نتیجه میوه‌بندی را تضمین کند. البته بایستی در نظر داشت که قدرت جوانه‌زنی

جدول ۸. مقایسه میانگین اثر نوع گرده بر جوانه‌زنی و رشد لوله گرده در بخش‌های مختلف مادگی نارنگی کلمانتین.

Table 8. Mean comparison effect of different pollen sources on their germination and growth on different parts of pistil in Clementine mandarin.

Pollen source	Pollen germination in stigma surface (%)	Pollen grain tubes penetrated to the upper portion of style (%)	Pollen grain tubes penetrated to the basal portion of style (%)	Pollen grain tubes penetrated to the ovary (%)
Open-pollination	49.5b	44.5c	35.4d	27.5d
Self-pollination	37.3d	35.3d	0.0e	0.0e
Sweet lemon	45.2c	55.2b	38.4c	30.4c
Grapefruit	38.4d	45.3c	34.4d	31.5c
Lisbon lemon	51.6b	55.5b	42.4b	38.4ab
Sour orange	55.8a	64.2a	49.3a	41.3a

در هر ستون میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

جدول ۹. شباهت ژنتیکی گونه‌های مختلف مرکبات مورد استفاده در این پژوهش بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر مولکولی.

Table 9. Genetic similarity among different *Citrus* species used in this investigation based on the data from molecular markers.

<i>Citrus</i> species	Sour orange	Clementine mandarin	Grapefruit	Sweet lemon	Lisbon lemon
Sour orange	1.00				
Clementine	0.41*	1.00			
Grapefruit	0.26	0.21**	1.00		
Sweet lemon	0.15	0.25	0.40	1.00	
Lisbon lemon	0.14	0.22	0.39	0.93	1.00

\* و \*\*: به ترتیب نشان‌دهنده بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی نارنگی کلمانتین با گونه‌های دیگر مرکبات مورد استفاده در این تحقیق.

\*, \*\*: Represent the highest and the lowest genetic similarities between Clementine mandarin and other *Citrus* species used in this study, respectively.

### نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش از بین گونه‌های مختلف مرکبات مورد تحقیق، دانه‌های گرده نارنج، که دارای بیشترین شباهت ژنتیکی در سطح DNA با نارنگی کلمانتین بودند، بیشترین توانائی برای جوانه‌زنی در سطح کلالة، رشد لوله گرده درون خامه و نفوذ به کیسه جنینی گل‌های نارنگی کلمانتین را دارا می‌باشند. این فاکتورها می‌تواند تضمینی برای موفقیت در لقاح جنین و در نتیجه افزایش تشکیل میوه باشد. از طرفی خودگرده‌افشانی منجر به کمترین جوانه‌زنی و رشد لوله گرده در گل‌های نارنگی کلمانتین گردید که در نهایت منجر به کمترین درصد تشکیل بذر شد ولی باعث افزایش تشکیل میوه نسبت به گرده افشانی باز گردید. بنابراین به نظر می‌رسد خود گرده‌افشانی می‌تواند در تحریک تولید میوه پارتنوکارپیک در نارنگی کلمانتین تاثیر مثبت داشته باشد. به‌رحال با توجه به فاکتورهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در میوه‌های نارنگی کلمانتین، از بین گونه‌های مختلف مرکبات مورد استفاده در این پژوهش، گریپ‌فروت و لیمولیسبون بهترین گزینه‌ها برای استفاده به‌عنوان رقم‌های گرده‌دهنده نارنگی کلمانتین پیشنهاد می‌گردند.

شباهت‌های بالای ژنتیکی بین لیمولیسبون و لیمو

شیرین در سطح DNA در مطالعات قبلی هم گزارش شده است (Babar *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2017). از طرفی بر اساس نتایج حاصله بیشترین و کمترین شباهت ژنتیکی نارنگی کلمانتین از بین گونه‌های مرکبات مورد استفاده در این تحقیق به ترتیب با نارنج (شباهت ژنتیکی ۰/۴۱) و گریپ‌فروت (شباهت ژنتیکی ۰/۲۱) حاصل شد. بر اساس گزارش‌های قبلی پیشنهاد شده که نارنج یک هیبرید حاصل از تلاقی نارنگی و پوملو است (Bakley *et al.*, 2006). بنابراین دور از انتظار نیست که شباهت ژنتیکی بالاتری بین نارنج و نارنگی در سطح DNA مشاهده شد. این نتایج در بررسی میزان جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلالة هم منعکس شد و دانه‌های گرده نارنج بیشترین درصد جوانه‌زنی را در سطح کلالة نارنگی کلمانتین دارا بودند. بعلاوه نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر کارآیی نشانگر مولکولی رپید برای تعیین قرابت ژنتیکی گونه‌های مختلف مرکبات می‌باشد که منطبق با نتایج گزارشات قبلی مبنی بر کارآیی این نشانگر برای تعیین قرابت گونه‌های مرکبات (Babar *et al.*, 2014; ) (Abedinpour *et al.*, 2015) و تلاقی‌های حاصل از دیگر محصولات میوه‌ای می‌باشد (Zamani *et al.*, 2010; ) (Zarei *et al.*, 2017).

## REFERENCES

1. Abedinpour, H., Babaeian Jelodar, N., Ranjbar, G.A., & Golein, B. (2015). Study of genetic diversities and relatedness of Iranian *Citrus* genotypes using morphological and molecular markers. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 3(1), 35-49.
2. Ahmed, S., Rattanpal, H. S., Kumari, P., & Singh, J. (2017). Study of genetic variability in *Citrus* fruit crop by molecular markers-a review, *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5 (1), 111-128.
3. Asadi abkenar, A. (1996). *Effect of pollen of different cultivars of citrus on some quantitative and qualitative of Clementine mandarin*. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture. University of Tehran. Iran.(In Farsi).
4. Asadi Kangarshahi, A., & Akhlaghi Amiri, N. (2021). Effect of urea spray accordance with growth phenology on yield and alternate bearing of satsuma mandarin (*Citrus unshiu*). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 52(1), 99-111. (In Farsi).
5. Babar, M., Hussain, S. B., Javed, M., Waheed, R., Akhter, S., Bibi, F., Salahuddin, R., Ali, M., Naveed, F., & Khan, H. N. (2014). Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Citrus* rootstocks using PCR-based RAPD markers. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 12 (2), 482-485.
6. Babazadeh Darjazi, B. (2013). Comparison of vitamin C in mandarin (*Citrus Blanco*.) cultivars. *Eco-Phytochemical Journal of Medical Plants*, 3, 82-93.
7. Baekley, N. A., Roose, M. L., Krueger, R. R., & Federici, C. T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a *Citrus* germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, 112 (8), 1519-1531.
8. Buccheri, M., & Di Vaio, C. (2005). Relationship among Seed number, quality, and calcium content in apple fruits. *Journal of Plant Nutrition*, 27, 10, 1735-1746.
9. Chao, C.C.T. (2005). Pollination study of mandarins and the effect on seediness and fruit size: implications for seedless mandarin production. *HortScience*, 40(2), 362-365.
10. Chao, C., Fang, J., & Devanand, P. (2005). Long distance pollen flow in mandarin orchards determined by AFLP markers implications for seedless mandarin production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130 (3), 374-380.
11. Chelong, I., & Sdoodee, S. (2012). Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth of Shogun (*Citrus reticulata* Blanco) under climate variability in southern Thailand. *Journal of Agricultural Technology*, 8(7), 2297-2307.
12. Dejampor J., & Garigorian V. (2004). Pollen effects on some quantitative and qualitative characteristics of apricot fruit. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 5(1), 1-10.(In Farsi).
13. Distefano, G., Caruso, M., La Malfa, S., Gentile, A., & Tribulato, E. (2009). Histological and molecular analysis of pollen–pistil interaction in Clementine. *Plant Cell Reports*, 28, 1439-1451.
14. Distefano, G., Hedhly, A., Las Casas, G., La Malfa, S., Herrero, M., & Gentile, A. (2012). Male-female interaction and temperature variation affect pollen performance in *Citrus*. *Scientia Horticulturae*, 140, 1-7.
15. Distefano, G., Las Casas, G., La Malfa, S., Gentile, A., & Tribulato, E. (2009). Pollen tube behavior in different mandarin hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134 (6), 583-588.
16. Doi, K., Nozaki, R., Takahashi, K., & Iwasaki, N. (2018). Effects of the number of seeds per berry on fruit growth characteristics, especially on the duration of stage ii in blueberry. *Plants (Basel)*, 7(4), 96. doi: 10.3390/plants7040096
17. Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
18. Ebadi, H., Gholamiyan, E., Fatahi-Moghadam, J., Golein, B., Golmohamadi, M., & Moradi, B. (2017). A Guide for Planting, Growing, Harvesting and Marketing of *Citrus*. *Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO)*, Pp: 404. (In Farsi).
19. Ehlenfeldt, M. K. (2003). Investigations of metaxenia in northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Journal of the American Pomological Society*, 57(1), 26.
20. El-Tomi, A. L. (1997). *Effect of cross-pollination on June drop, preharvest drop and cropping in Washington Navel orange*. CRC Press. Boca Raton. Florida. pp. 68-87.
21. Gambetta, G., Gravina, A., Fasiolo, C., Fornero, C., Galiger, S., Inzaurrealde, C., & Rey, F. (2013). Self-incompatibility, parthenocarpy and reduction of seed presence in 'Afourer' mandarin. *Scientia Horticulturae*, 164, 183-188.
22. Garcia-Papi, M.A., & Garcia-Martinez, J.L. (1986). Fruit set and development in seeded and seedless Clementine mandarin. *Scientia Horticulturae*, 22, 113-119.
23. Jalilian, H., Zarei, A., & Erfani-Moghadam, J. (2018). Phylogeny relationship among commercial and wild pear species based on morphological characteristics and SCoT molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 235, 323-333.

24. Kitat, E. M., El-Azad, F. M., & Wehida, B. M. (1994). Metaxenia in lime (*Citrus aurantifolia* Swin), *Alexandria Journal of Agricultural Research*, 22, 85-90.
25. Kumar, K., & Das., B. (1996). Studies on xenia in almond (*Prunus dulcis* (Miller) DA Webb). *Journal of Horticultural Science (UK)*, 71(4), 545-549.
26. Mahmoodi, M., Arzani, K., & Bozari, N. (2007). Pollination, pollen tube growth and determination of suitable pollinizer for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar Ghermez Rezaeieh. *Journal of Seed and Seedling*, 23, 571-585. (In Farsi).
27. Mesejo, C., Yuste, R., Martinez-Fuentes, A., Reig, C., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E., & Agustí, M. (2012). Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus clementina*). *Physiologia Plantarum*, 148(1), 87-96.
28. Militaru, M., Butac, M., Sumedrea, D., & Chițu, E. (2015). Effect of metaxenia on the fruit quality of scab resistant apple varieties. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6, 151-156.
29. Ngo, B. X., Wakana, A., Park, S. M., Nada, Y., & Fukudome, I. (2001). Pollen tube behaviors in self-incompatible and self-compatible *Citrus*. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 45(2), 443-457.
30. Ortega, E., & Dicenta, F. (2004). Suitability of four different methods to identify self-compatible seedling in an almond breeding program. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79, 747-753.
31. Rasoli, M., & Arzani, K. (2010). Effect of pollen grains on pollen tube growth and quantitative and qualitative traits of cherry fruit (*Prunus avium* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 41, 309-318. (In Farsi).
32. Riazi, G., & Rahemi, M. (1994). The effects of various pollen on growth and development of *Pistacia vera* L. nuts. *Acta Horticulture*, 419, 67-72.
33. Sabry, H. I. (1990). *The effect of the honey bees as a pollinating agent on the yield of broad bean, clover, cotton and citrus trees*. M.Sc. Thesis. Cario University, Egypt.
34. Soost, R. K. (1956). Unfruitfulness in the clementine mandarin, *Proceeding of American Society for Horticultural Science*, 67, 171-175.
35. Swingle, W. T. (1928). Metaxenia in the date palm. *Journal of Heredity*, 19, 257-268.
36. Talaei, A., Golien, B., Ebrahimi, Y., & Vezvaei, A. (2002). Investigation and introducing the appropriate pollen for page mandarin. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 33(1), 171-177. (In Farsi).
37. Wallace, H. M., & Lee, H. S. (1999). Pollen source, fruit set and xenia in mandarin. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74, 82-86.
38. Yamamoto, M., & Tominaga, S. (2002). Relationship between seedlessness of keraji (*Citrus keraji* Hort. ex Tanaka) and female sterility and self-incompatibility. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 71, 183-186.
39. Zamani, Z., Zarei, A., & Fatahi R. (2010). Characterization of progenies derived from pollination of pomegranate cv. Malase-Tourshe-Saveh using fruit traits and RAPD molecular marker. *Scientia Horticulturae*, 124, 67-73.
40. Zarei, A., Erfani-Moghadam, J., & Mozaffari, M. (2017). Phylogenetic analysis among some pome fruit trees of Rosaceae family using RAPD markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31 (2), 89-298.