نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸، ص. ۲۱۸-۲۰۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.2, Summer 2019, P. 207-218
ISSN: 2008 - 4730

مطالعه میکروسکوپی اثر محلول‌پاشی بور بر روند رشد لوله گرده در دگرگرده‌افشانی برخی ارقام سیب

سکینه فلاح معافی[۱]- یاور شرفی[۲] *- آیت ا... رضایی[۳] - محمد حسین فتوکیان[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۳

چکیده

در گیاه سیب برای میوه‌نشینی مطلوب باید دانه گرده‌ی کافی رقم سازگار به سطح کلاله منتقل و لوله‌های گرده در مادگی رشد کرده و تخمک‌ها را تلقیح نماید. بور از جمله فاکتورهای مهم رشد و نمو لوله‌های گرده می‌باشد. در این تحقیق اثر محلول‌پاشی بـور در سـه سـطح شـاهد (صـفر)، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی روند رشد لوله گرده در دگرگرده‌افشانی چهار رقم سیب شـامل Fuji، Golden delicious، Red delicious و Gala در دو زمان ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از تلاقی، با میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمـده مشـاهده شـد کـه اثـر هریـک از فاکتورهای بور، زمان و ترکیب تلاقی بر درصد جوانه‌زنی در سطح کلاله و نفوذ لوله گرده در ابتدا، میانه‌ی خامه و ابتدای تخمدان در سطح احتمـال ۱٪ معنی‌دار بود. بیشترین درصد جوانه‌زنی (۳۳درصد) در ترکیب تلاقی (♀Golden delicious × Gala ♂) با تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتـر بـور در زمـان ۱۲۰ ساعت در سطح کلاله مشاهده شد و بیشترین نفوذ لوله گرده به قسمت ابتدایی تخمدان با ۳۲/۰۶درصد در ترکیب تلاقـی (♀Red delicious × ♂ Golden delicious) با تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. بیشترین نفوذ لوله گرده به قسـمت ابتـدایی تخمـدان در ترکیـب تلاقـی (♀Red delicious × ♂ Golden delicious) با ۱۹/۲۷درصد مشاهده شد که نشانه اثر بیشتر بور روی نفوذ لوله گرده آن‌ها همچنین، سازگاری بهتر آنهـا بـود. گذشت زمان بیشتر در همه ترکیب تلاقی‌های تیمار شده با بور موجب افزایش درصد جوانه‌زنی و افزایش میزان نفوذ لوله‌های گرده به ابتـدای تخمـدان شد.

واژه‌های کلیدی: اسید بوریک، تخمدان، تلاقی، درخت سیب، نفوذ لوله گرده

مقدمه

سیب با نـام علمـی (*Malus domestica*) یکـی از مهـم‌تـرین محصولات باغبانی ایران به شمار می‌رود که از نظـر میـزان تولیـد بـا ۱۷۰۰۰۰۰ میلیـون تـن دارای جایگـاه هفـتم تولیـد سـیب در جهـان می‌باشد (۶). مهم‌ترین هدف برای تولیدکننـدگان میـوه، دسـتیابی بـه عملکرد بالای محصول همراه با کیفیت مناسب اسـت. میـزان نهـایی تولید محصول در درختان میوه، نتیجه برهم‌کـنش تعـدادی از عوامـل است. از جمله عوامل مهم در درختان میوه خودناسـازگار میـوه‌نشـینی است که معمولاً به موفقیت فرایند گرده‌افشانی و لقاح بستگی دارد (۴، ۷، ۱۱، ۱۷، ۱۹ و ۲۰). از آنجایی که بیشتر ارقام سیب خودناسـازگاری دارند لذا برای تشکیل میوه مطلوب نیازمند به دگرگرده‌افشانی با ارقام گرده‌زای مناسب، بـا گـرده کـافی و بـا کیفیـت مناسـب مـی‌باشـند. همچنین، شرایط فیزیولوژیکی درختان گرده‌زا که به شدت تحت تأثیر تغذیه با عناصر معدنی مـی‌باشـد و بـر کیفیـت گـرده از نظـر درصـد جوانه‌زنی، قدرت زنده‌مانی و سرعت رشد لولـه گـرده در خامـه مـؤثر است (۱ و ۱۷). در مطالعات مختلفی که با کاربرد محلول‌پاشی بور بر گل‌های درختان میوه صورت گرفته، مشـاهده شـده کـه ایـن عنصـر دارای تاثیرات مثبتی در تشکیل میوه و بهبود عملکرد آن است (۲، ۸، ۱۲ و ۱۳) که دلایل آنرا داشتن نقـش مثبـت ایـن عنصـر بـر درصـد جوانه‌زنی گرده دانسته‌اند. بر اساس مطالعات صورت گرفته با اسـتفاده از میکروسکوپ فلورسنت و کاربرد غلظت‌های مختلف بور بر رشد لوله گرده و تأثیر آن در تشکیل میوه در شرایط طبیعـی و درون شیشـه‌ای بر روی درختان بالغ زردآلو مشاهده شده که کاربرد محلول‌پاشـی بـور در شرایط طبیعی باعث افزایش رشد لوله گرده به سمت تخمدان شده است. همچنین، کاربرد بور در شرایط درون شیشـه‌ای باعـث افـزایش

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد میـوه کـاری، اسـتادیاران گـروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: y.sharafi@shahed.ac.ir)
DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.67287

جوانه‌زنی گرده‌ها شده و در غلظت‌های بالاتر باعث کاهش آن گردیده است (۸). در مطالعه ای دیگر با کاربرد محلول پاشی بور در مرحله شکوفه‌دهی در توت فرنگی مشاهده شد که بور بکار رفته در این مرحله سریعاً توسط گل‌ها جذب شده و موجب بهبود رشد رویشی آن می‌شود. همچنین، با تأثیر بر جوانه‌زنی گرده و لقاح، موجب بهبود باروری گیاه توت فرنگی شده است (۹). در مطالعه ای دیگر با محلول‌پاشی عنصر روی و بور بر درخت پرتقال گزارش شد که کاربرد روی سبب افزایش طول لوله گرده پرتقال و همچنین باروری و افزایش زنده‌مانی تخمک و نیز افزایش ساکارز و نرمی پوست میوه می‌شود، درحالی که بور باعث افزایش رشد لوله گرده، اندازه میوه و میزان قند میوه می‌شود (۱۴).

بر اساس مطالعات صورت گرفته محلول‌پاشی بور برای محصولات مختلف میوه، در مرحله‌ی شکوفه‌دهی که در دوره‌های بحرانی از تشکیل گرده، جوانه‌زنی و تلقیح که قبل از تشکیل میوه قرار دارد بسیار مؤثر واقع می‌باشد. محلول پاشی بور در این مرحله سریعاً توسط گل جذب شده در نتیجه گل‌ها حاوی مقادیر کافی از بور در مراحل گلدهی و تشکیل میوه می‌باشند همچنین، بور در این مرحله تولید گل‌ها و جوانه‌زنی لوله گرده را افزایش می‌دهد و به افزایش توسعه میوه کمک می‌کند (۱۵، ۱۶ و ۱۸). بنابراین، با توجه به تاثیراتی که عنصر بور بر جوانه‌زنی و رشد لوله‌ی گرده و در نتیجه تشکیل میوه دارد، در این تحقیق تأثیر این عنصر بر جوانه‌زنی و رشد لوله گرده در دگرگرده‌افشانی چند رقم سیب شامل: (Red delicious،Golden delicious، Gala و Fuji) با استفاده از روش میکروسکوپ فلورسنت مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در اسفند ماه سال ۱۳۹۳ ابتدا ارقامی خودناسازگار از درختان سیب ۱۲ ساله روی پایه EM126 شامل (Red delicious، Golden delicious، و Fuji) انتخاب و بعد از اتیکت‌زنی ارقام، وضعیت جوانه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد محلول پاشی در زمان دو هفته قبل از باز شدن جوانه‌های گل با بور در سطح شاهد (۰)، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ (میلی‌گرم بر لیتر) روی ارقام سیب صورت گرفت. برای جذب بهتر مواد، محلول پاشی در ساعت خنک بعد از ظهر انجام گرفت. محلول پاشی روی جوانه‌ها تا زمانی ادامه پیدا کرد که شاخه‌ها کاملاً خیس شده و محلول از شاخه‌ها چکه کرد. به منظور جمع‌آوری دانه گرده، قبل از باز شدن گلها، شاخه‌هایی که حاوی غنچه کافی بودند به طول تقریبی ۵۰ سانتی‌متر از درختانی که محلول پاشی شده بودند تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. در مرحله بعد، زمانی که غنچه‌ها در پایان مرحله بالونی (Ballon Stage) قرار داشتند، بساک‌های آنها با استفاده از پنس به آرامی جدا شد و به مدت ۱۸-۱۲ ساعت روی یک برگ کاغذ در دمای اتاق (۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده تا خشک شوند. پس از جمع‌آوری گرده‌های خشک شده، تا زمان انجام آزمایش در شیشه‌های آزمایشگاهی مخصوص در یخچال نگهداری شدند. جهت اطمینان از قدرت جوانه‌زنی دانه‌های گرده جمع آوری شده همچنین، اثر عنصر بور اقدام به کشت دانه‌های گرده جمع آوری شده در محیط کشت شد. برای کشت دانه گرده از محیط کشت حاوی ۳۰ درصد ساکاروز، یک درصد آگار و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید بوریک استفاده شد. محیط کشت‌های حاوی گرده به مدت ۱۲ ساعت به انکوباتور با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از این مدت جهت توقف رشد لوله‌های گرده در زمان مورد نظر از کلروفرم استفاده شد تا رشد لوله‌های گرده متوقف گردد و طول لوله‌های گرده در تیمارهای مختلف مورد مقایسه قرار گیرد.

در پایان، جوانه‌زنی گرده‌ها در زیر میکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفت و درصد جوانه‌زنی محاسبه شد. به منظور جلوگیری از اثر توده‌ای شمارش دانه گرده در میدان‌هایی از پتری دیش صورت گرفت که توزیع دانه گرده‌ی تا حد امکان به صورت یکنواخت انجام شده بود.

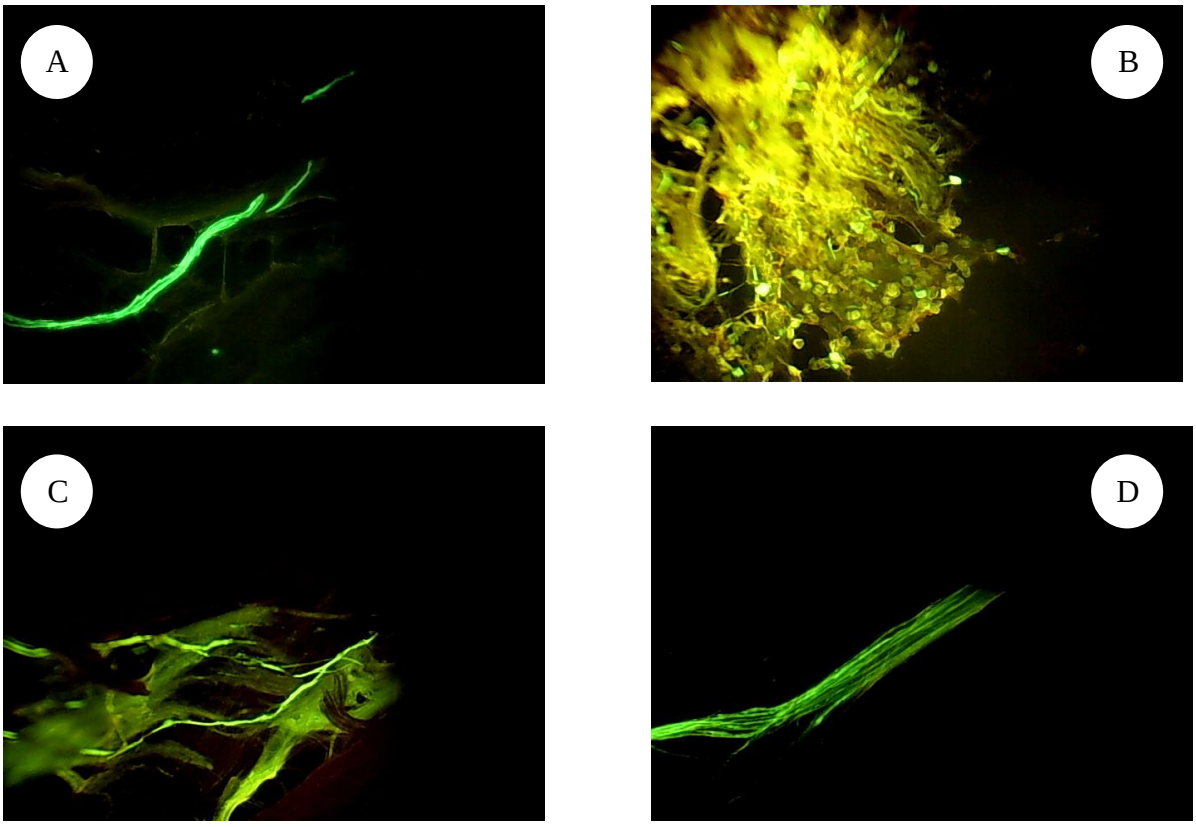
شش ترکیب تلاقی از چهار رقم سیب بصورت (♀Red delicious × ♂Golden delicious، ♀Red delicious × ♂Gala، ♀Golden delicious × ♂Fuji، ♀Golden delicious × ♂Gala و ♀Gala× ♂Fuji) در نظر گرفته شدند. برای انجام هر تلاقی، روی پایه‌های مادری چند شاخه با تعداد جوانه گل مناسب در نظر گرفته شده و با کیسه‌های مخصوص گرده افشانی ایزوله شدند تا از ورود گرده های خارجی جلوگیری شده و در زمان گرده‌افشانی با گرده‌های والد پدری تلاقی داده شوند. گرده‌افشانی شاخه‌های انتخاب شده روی پایه‌های مادری یک روز پس از اخته کردن و زمانی صورت گرفت که کلاله‌ها آماده پذیرش گرده بودند. گرده‌افشانی با قلم‌مویی مخصوص گرده‌افشانی در صبح انجام و یک روز بعد جهت اطمینان، گرده‌افشانی تکمیلی با همین روش انجام شد و برای جلوگیری از ورود گرده های ناخواسته، درختان گرده افشانی شده با ایزولاتور بسته شدند.

بعد از انجام تلاقی‌های مورد نظر روی ارقام سیب، اقدام به جمع آوری مادگی‌های تلقیح شده گردید. بدین منظور از هر ترکیب تلاقی حداقل ۲۰ مادگی سالم انتخاب شد و داخل ویال‌های شیشه‌ای حاوی ۱۰ سی‌سی فیکساتور قرار داده شدند. زمان نمونه برداری طی دو زمان ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از گرده‌افشانی تکمیلی صورت گرفت. محلول تثبیت کننده شامل ۵ درصد فرمالدئید ۵۰ درصد، ۵ درصد اسیداستیک‌گلاسیال و ۹۰ درصد الکل ۷۰ درصد بود که برای تثبیت مادگی‌های تلقیح شده مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات مختلف موجود در محلول فوق باعث توقف رشد لوله گرده تا زمان بررسی میکروسکوپی گردید. نمونه‌ها تا انجام آزمایشات بعدی در دمای چهار

درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این مرحله مادگی‌ها از داخل فیکساتور خارج و با آب مقطر سه بار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. در مرحله بعد مادگی‌ها در داخل ویال‌های شیشه‌ای حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سولفیت سدیم ۵ درصد قرار داده شدند. به منظور نرم شدن بافت مادگی در داخل اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و با فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خنک شدن ویال‌ها تا زمان انجام رنگ آمیزی داخل یخچال نگهداری شدند. رنگ‌آمیزی نمونه‌ها توسط محلول آنیلین‌بلو (Aniline Blue) صورت گرفت. روند رشد لوله گرده تلاقی‌های مختلف با میکروسکوپ فلورسنت در چهار قسمت سطح کلاله، یک سوم بالای خامه، وسط خامه، یک سوم پایین خامه و ابتدای تخمدان مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که سیب پنج برچه‌ای بوده و هر مادگی آن دارای ۵ کلاله و خامه می‌باشد میانگین درصد جوانه‌زنی و نفوذ لوله‌های گرده‌ها در هر ۵ کلاله و خامه محاسبه شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۲ عامل بور و شش ترکیب تلاقی با پنج تکرار (پنج نمونه مادگی در هر تکرار) در دو زمان مختلف (۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از انجام تلاقی‌ها) صورت گرفت. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن) همچنین، برآورد ضریب همبستگی با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

نتایج

تجزیه واریانس داده‌ها در جدول (۱) نشان داد که ترکیب تلاقی چهار رقم Gala, Golden Delicious, Red Delicious,Fuji بر درصد جوانه‌زنی گرده‌ها و تعداد لوله‌های گرده نفوذ کرده به قسمت ابتدایی، میانه خامه و ابتدای تخمدان اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱درصد نشان داد. همچنین، غلظت بور بر صفات درصد جوانه‌زنی گرده، تعداد لوله‌های گرده نفوذ کرده به ابتدا و قسمت میانی خامه و قسمت ابتدایی تخمدان در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار بود. اثر زمان نیز مشابه اثر غلظت بور بر تمام صفات مورد مطالعه در سطح احتمال ۱درصد معنی دار بود.



شکل ۱- به ترتیب سطح کلاله ، اول خامه ، وسط خامه و اول تخمدان در تلاقی ارقام 'گلدن دلیشز' و 'رد دلیشز'
Fig 1-A;Stigma surface, B; upper part of style, C; middle of style and D; ovary beginning respectively

نتایج جدول (۱) نشان می‌دهد که اثر متقابل زمان × تلاقی‌ها روی هیچ کدام از صفات مورد مطالعه معنی‌دار نبوده همچنین، اثر متقابل غلظت بور × تلاقی‌ها بر درصد جوانه‌زنی در سطح کلاله معنی‌دار نبوده، ولی بر میزان نفوذ لوله گرده در قسمت ابتدایی خامه

در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد و در سایر صفات مورد مطالعه در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار بود. ولی اثر متقابل زمان × تلاقی × غلظت بور بر هیچ یک از صفات درصد جوانه‌زنی گرده‌ها، تعداد لوله‌های گرده نفوذ کرده به قسمت میانی و انتهایی خامه همچنین، تعداد لوله گرده نفوذ کرده به ابتدای تخمدان معنی‌دار نشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر زمان، ترکیب تلاقی و عنصر بور بر درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله و درصد نفوذ لوله گرده در ابتدا، میانه‌ی خامه و ابتدای تخمدان در برخی ارقام سیب

Table 1. ANOVA for the effect of time, crosses and boron on the pollen germination on the stigma and tube penetration to upper and middle part of the style and beginning of the ovary of some apple cultivars.

Source of Variation منابع تغییرات	Df درجه آزادی	Stigma سطح کلاله	Upper Ppart of the Sstyle قسمت بالایی خامه	The Mmiddle Ppart of the Sstyle قسمت میانی خامه	Bbeginning of the Oovary ابتدای تخمدان
Cross تلاقی	5	84.44 **	59.166**	88.88**	09.60**
Concentration of Boron غلظت بور	2	81.1967 **	98.4676 **	52.3349**	02.2891**
Time زمان	1	93.5259 **	40.1352 **	42.1394**	75.1809**
Cross × time زمان× تلاقی	5	7.711ns	86.46 ns	20ns.22	82.8 ns
Cross × Boron تلاقی×بور	10	94ns.22	96.50*	39.22 **	57.38**
Boron ×Time بور × زمان	2	76.741 **	68.33 ns	82.70**	81.114**
cross × Boron ×Time بور×زمان×تلاقی	10	57.9 ns	70.32 ns	09.30 ns	34.16 ns
Error خطا	144	87.20	42.24	52.16	20.12
Total کل		23	3.20	6.20	9.2

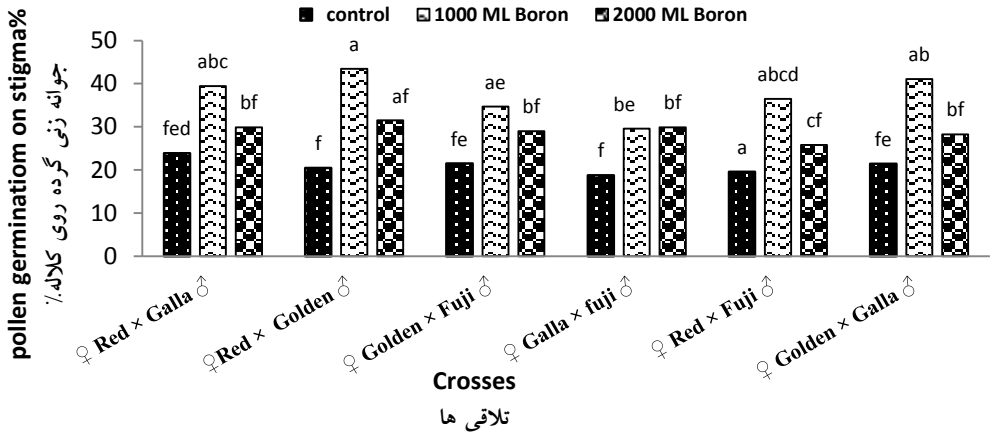
ns= غیر معنی دار ، *= معنی‌دار در سطح پنج درصد و **= معنی دار در سطح یک درصد

ns= Non Significant , * = Significant levels 1%, ** = Significant levels 5%

مطابق نتایج این بررسی، در مطالعه‌ای گزارش شده که کاربرد محلول‌پاشی بور در شرایط طبیعی باغ زردآلو موجب افزایش رشد لوله گرده به سمت تخمدان می‌شود. همچنین، کاربرد بور در شرایط درون شیشه‌ای باعث افزایش جوانه‌زنی گرده‌ها شده و در غلظت‌های بالاتر موجب کاهش آن می‌شود. حدود ۸۵ تا ۹۰ درصد جوانه‌زنی گرده‌ها در سطح کلاله در زمان ۴۸ ساعت پس از گرده‌افشانی با گرده‌های تیمار شده با سطح بور ۲۴۵ و ۴۹۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. بیشترین میزان نفوذ لوله گرده در خامه و تخمدان نیز در زمان ۴۸ ساعت پس از گرده‌افشانی با گرده‌های تیمار شده با بور در سطح‌های ۲۴۵ و ۴۹۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که با گذشت زمان در ۱۴۴ و ۱۶۶ ساعت پس از گرده‌افشانی به طور معنی داری، لوله‌های گرده بیشتری به ابتدای تخمدان رسیدند (۶). بر اساس آزمایشات صورت گرفته در این مطالعه با کاربرد گرده‌های والد پدری روی مادگی‌های والد مادری تیمار شده با بور در سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و زمان ۱۲۰ ساعت پس از انجام گرده‌افشانی، بیشترین درصد جوانه‌زنی و نفوذ لوله گرده در سطح کلاله و ابتدای تخمدان مشاهده شد که با نتایج گزارش شده در مطالعات فوق مطابقت داشت. این نتایج به احتمال زیاد به اثر بور در افزایش تقسیمات سلولی و در نتیجه افزایش طول لوله گرده و نهایتاً تسریع رسیدن لوله‌های گرده بیشتر به تخمدان مربوط می‌شود. زیرا بور در تشکیل دوک‌های کروموزومی و تقسیم میتوز و همچنین در تشکیل دیواره‌ی سلولی مؤثر است (۵).

بر اساس نتایج شکل (۲) سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بور بیشترین تأثیر را بر افزایش درصد جوانه‌زنی گرده‌ها در سطح کلاله نشان داد. در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بور مشاهده شد درصد جوانه‌زنی گرده‌ها به شدت کاهش یافته و اثر سمیّت را بر گرده‌ها نشان داده است. در واقع گرده‌هایی که از درختان تیمار شده با غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بور جمع‌آوری شده‌اند بعد از گرده‌افشانی کنترل شده روی کلاله مادگی‌هایی که آنها نیز سطح ۲۰۰۰ میلی‌گرم

بر لیتر بور را دریافت کرده‌اند موجب افزایش واکنش‌های فیزیولوژیکی در گرده‌ها شده، که بور در آنها نقش داشته و در نتیجه کاهش درصد جوانه‌زنی در این غلظت مشاهده شد. همچنین، تعداد زیادی از گرده‌ها فاقد حیات بوده و قوه‌ی نامیه‌ی خود را از دست داده بودند که نداشتن حیات گرده به معنی از دست دادن قابلیت غشا در سلول‌های رویشی برای حفظ ساختار طبیعی سلول و فرایند آبرسانی و تنظیم فشار اسمزی می‌باشد (۱۲).



شکل ۲- اثر متقابل غلظت بور (میلیگرم بر لیتر)× ترکیب تلاقی بر درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله برخی ارقام سیب

Figure 1. The interaction between Boron concentration (mg L^{-1}) ×crosses on the pollen germination on the stigma of some apple cultivars

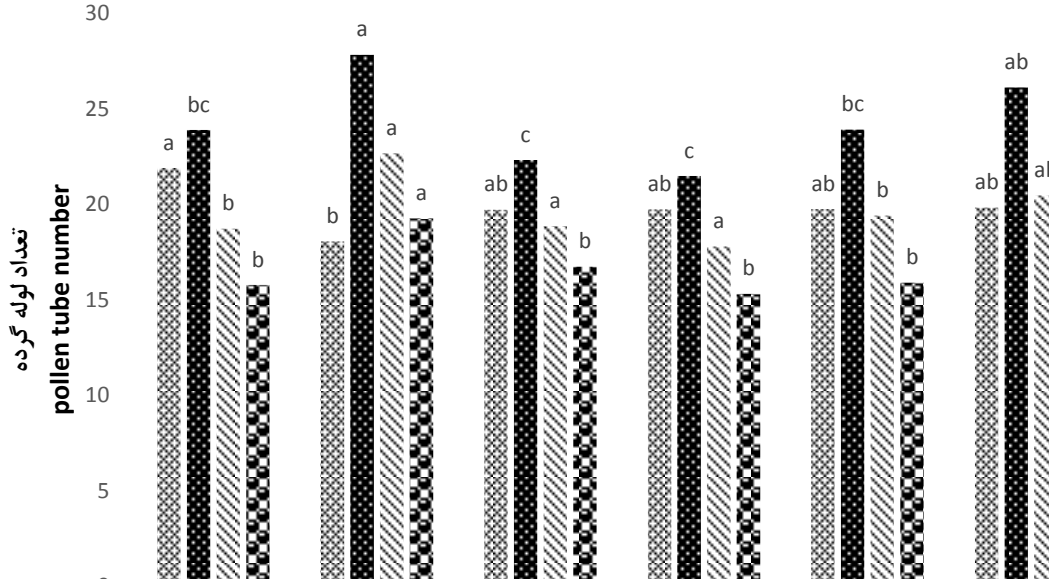
بور نقش مهمی را در حفظ یکپارچگی غشای پلاسما سلول‌های رویشی ایفا می‌کند که احتمالاً از طریق ایجاد پیوند بین اجزاء گلیکو پروتئین و گیلیکو لیپید از لایه‌های غشا پلاسما به واسطه‌ی قابلیت کمپلکس پلی‌ساکاریدهای محتوای OH بوده و یا بواسطه‌ی مشارکت در سیستم‌های آنزیمی، از جمله ATPase یا استرازها که تحت هیدراته شدن گرده‌ها فعال می‌شوند (۷).

غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بور از نظر درصد جوانه‌زنی و میزان نفوذ لوله‌های گرده در صفات مورد مطالعه و همچنین در حفظ و یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول‌های رویشی گرده‌ها مؤثر بوده و از طرفی در حفظ و پایداری لوله‌های گرده نفوذ کرده به درون خامه و تخمدان تأثیر گذار بوده است. به نظر می‌رسد که استفاده از این غلظت بور همزمان در درختانی‌که که گرده‌ی آنها به عنوان والد پدری بوده همچنین، در درختانی که مادگی آنها به عنوان والد مادری بوده در روش مزرعه(In vivo) موجب افزایش جوانه‌زنی و رشد لوله‌ی گرده می‌شود. اگرچه در درختانی که غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بور را دریافت کرده بودند به صورت قابل ملاحظه‌ای شکفتن لوله‌های گرده و تورم نوک لوله‌ها کاهش یافته بود که با نتایج مطالعات نیمورا و همکاران (۶) که گزارش کردند کاربرد غلظت ۲۴۵ میلی‌گرم بر لیتر بور موجب کاهش درصد جوانه‌زنی گرده‌ها و شکفتن لوله‌های گرده در زردآلو شده است، مطابقت داشت.

از آنجایی که بیشتر ارقام سیب خودناسازگاری دارند، لذا برای تشکیل میوه مطلوب نیازمند به دگرگرده‌افشانی هستند (۲). همچنین، بر اساس مطالعات صورت گرفته گزارش شده است که خودگرده‌افشانی کمتر از دگرگرده‌افشانی در ارقام سیب رخ می‌دهد (۳). در خود گرده‌افشانی در ارقام Fuji و Golden Delicious مشاهده شد که تشکیل میوه در این ارقام تنها بین ۱/۸–۱٪ بود. در مطالعه‌ی دیگری که روی خودناسازگاری ارقام Gala و Golden Delicious در آمریکا انجام شد، گزارش شده است که به ترتیب آل‌های S_2S_5 و S_2S_3 عامل خودناسازگاری در این ارقام می‌باشند. اگرچه رقم Golden Delicious تا حدی خودبارده می‌باشد اما دگرگرده‌افشانی موجب بهتر شدن محصول آن می‌شود (۱۰).

بر اساس نتایج بین ترکیب تلاقی‌های چهار رقم سیب از نظر درصد جوانه‌زنی و نفوذ لوله گرده به ابتدا، میانه‌ی خامه و ابتدای تخمدان در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بیشترین درصد جوانه‌زنی در ترکیب تلاقی ♀ Red delicious × ♂ Gala با ۲۱/۹۱٪ و بیشترین نفوذ لوله گرده در ترکیب تلاقی♂Golden delicious ×♀Red delicious با ۱۹/۲۷٪ مشاهده شد. نتایج بدست آمده از اثر ترکیب تلاقی بین چهار رقم سیب بر صفات مورد مطالعه با نتایج مطالعات فوق مطابقت داشته و بیان می‌کند کاربرد گرده رقم Golden delicious به عنوان والد پدری بر پایه مادری Red delicious موجب افزایش میزان نفوذ لوله

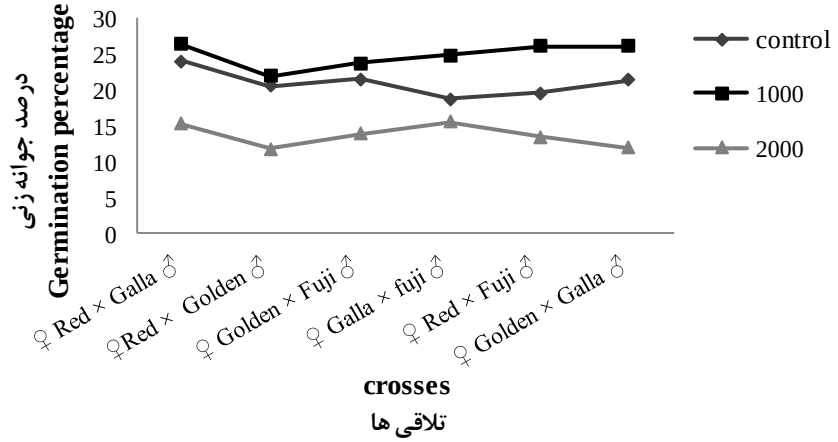
گرده شده و متعاقباً موجب بهبود تلقیح تخمک و تشکیل میوه در این رقم می‌شود. (شکل ۳)



شکل ۳- درصد جوانه‌زنی دانه گرده روی کلاله و درصد نفوذ لوله‌های گرده به ابتدا، میانه خامه و ابتدای تخمدان در برخی ارقام سیب.

Figure 2. Pollen germination percentage on the stigma and percentage of pollen tube penetration into the beginning and middle of the style and the beginning of the ovary of some apple cultivars.

بر اساس نتایج بین اثر متقابل بور و ترکیب تلاقی در سطح کلاله اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که احتمالاً بدلیل اثر سمیت بور می‌باشد.



شکل ۳- اثر متقابل غلظت بور (میلیگرم بر لیتر)× ترکیب تلاقی بر درصد جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلاله در برخی ارقام سیب

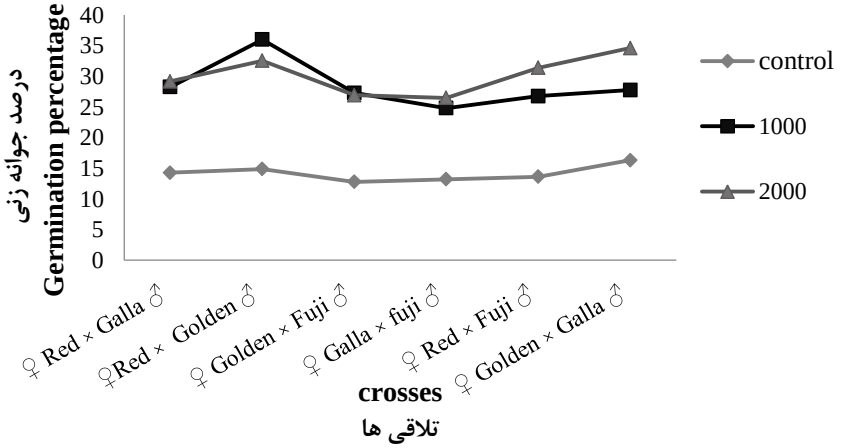
Figure 3. The interaction effect between boron concentration (mg L^{-1}) ×crosses on the pollen germination on the stigma of some apple cultivars.

همچنین، بین اثر متقابل بور و ترکیب تلاقی بر میزان نفوذ لوله گرده به ابتدای تخمدان در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار مشاهده شد (شکل ۴).

بین اثر متقابل بور و ترکیب تلاقی در میزان نفوذ لوله گرده در میانه خامه و ابتدای تخمدان در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی دار مشاهده شد (شکل ۵ و ۶).

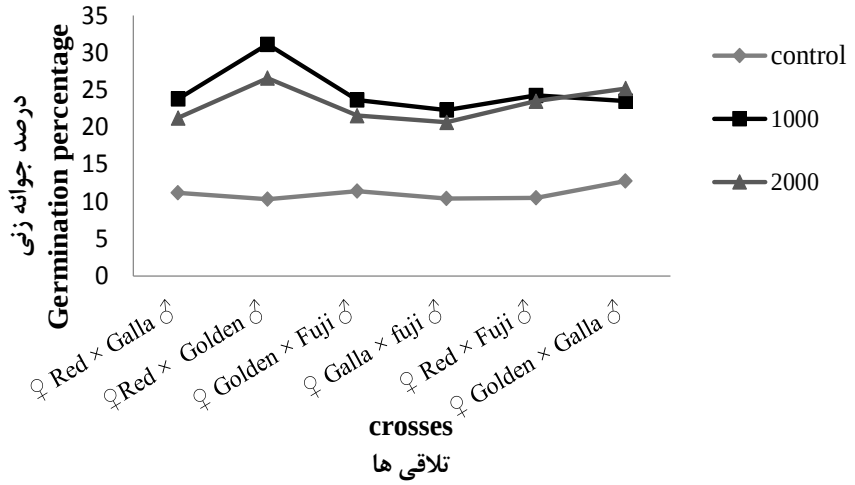
بر اساس نتایج مقایسه میانگین (شکل ۷) مشاهده شد بین اثر متقابل بور در زمان در سطح کلاله اختلاف معنی دار در سطح احتمال

۱ درصد دیده شد. همچنین، بین اثر متقابل زمان در بور بر درصد نفوذ لوله گرده در ابتدای خامه اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۸). ولی بین اثر متقابل زمان در بور بر میزان نفوذ لوله گرده در میانه خامه و ابتدای تخمدان در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (شکل ۹ و ۱۰).



شکل ۴- اثر متقابل بور (میلیگرم بر لیتر) × ترکیب تلاقی بر میزان نفوذ لوله گرده در ابتدای تخمدان در برخی ارقام سیب

Figure 4. The interaction effect of between boron concentration (mg L^{-1}) ×crosses on the pollen tube penetration into the beginning of the ovary of some apple cultivars

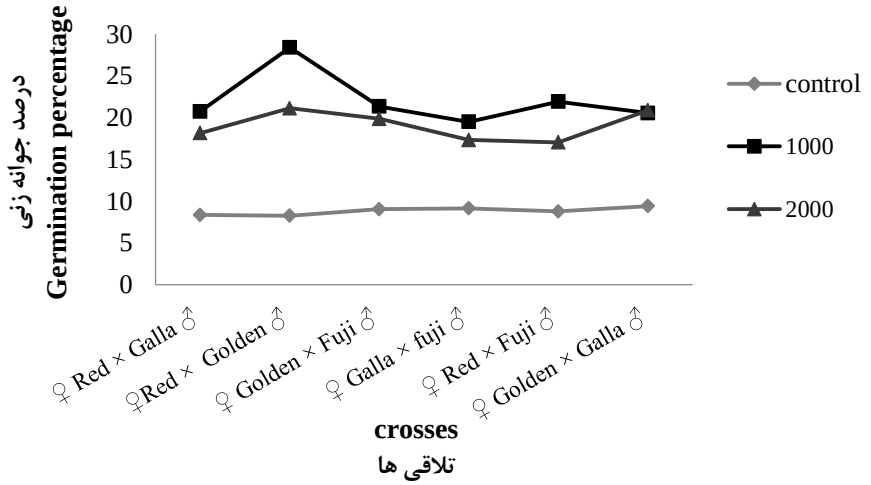


شکل ۵- اثر متقابل غلظت بور (میلیگرم بر لیتر)× ترکیب تلاقی بر میزان نفوذ لوله گرده در میانه خامه در برخی ارقام سیب.

Fig 5. The interaction effect between boron concentration (mg L^{-1}) ×crosses on the pollen tube penetration into the middle part of the style of some apple cultivars.

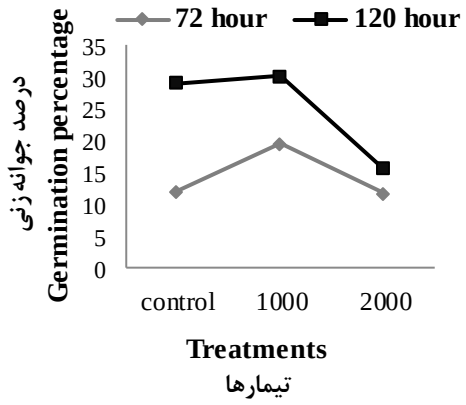
به منظور مطالعه رابطه‌ی بین بور با درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله و میزان نفوذ لوله گرده در ابتدا، میانه‌ی خامه و ابتدای تخمدان ضریب همبستگی برای تمام داده‌ها محاسبه شد. بین غلظت‌های بور با درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله و میزان نفوذ لوله گرده به ابتدا و میانه خامه رابطه‌ی معنی‌داری مشاهده نشد، که احتمالاً به دلیل اثر سمیّت بور بر کاهش میزان درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله می‌باشد. بین غلظت‌های بور و درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله و میزان نفوذ لوله گرده در ابتدای تخمدان همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد. رابطه بین غلظت‌های بور با میزان نفوذ لوله گرده در ابتدا و میانه خامه همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد. همچنین رابطه بین غلظت‌های بور با میزان نفوذ لوله گرده در میانه خامه و ابتدای تخمدان نیز همبستگی

معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد (جدول ۲).



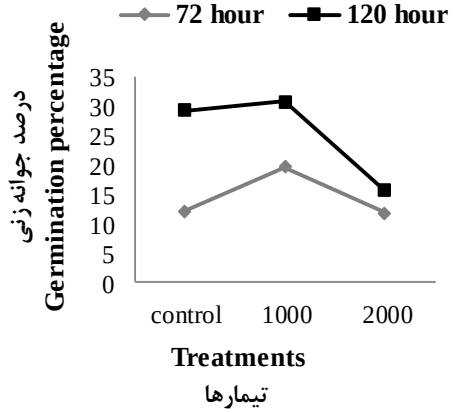
شکل ۶- اثر متقابل غلظت بور (میلیگرم بر لیتر) و ترکیب تلاقی در میزان نفوذ لوله گرده در ابتدای تخمدان در ارقام مختلف سیب

Figure 6. The interaction effect between boron concentration (mg L^{-1}) and crosses on the pollen tube penetration into the beginning of the ovary of some apple cultivars



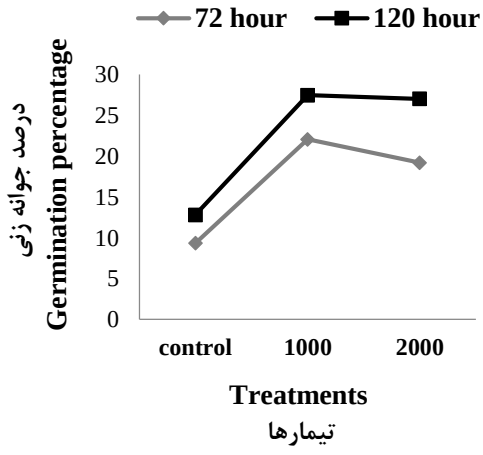
شکل ۷- اثر متقابل زمان × غلظت بور (میلیگرم بر لیتر) بر درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله در ارقام مختلف سیب.

Figure 7. The interaction effect between time×boron concentrations (mg L^{-1}) on the pollen germination percentage on the stigma of some apple cultivars.



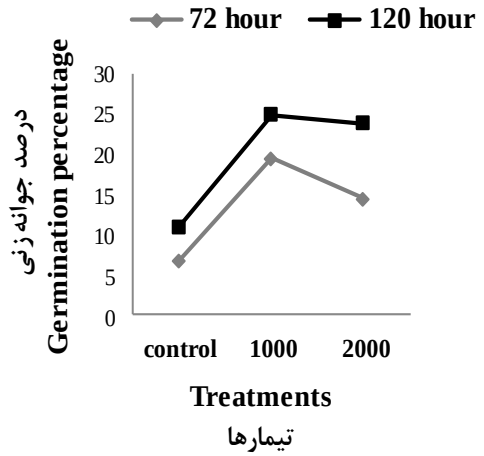
شکل ۸- اثر متقابل زمان × غلظت بور (میلیگرم بر لیتر) بر درصد جوانه‌زنی در ابتدای خامه در ارقام مختلف سیب.

Figure 8. The interactio effect between time× boron concentrations (mg L^{-1}) on the pollen germination percentage on the beginning of style of some apple cultivars.



شکل ۹- اثر متقابل زمان × غلظت بور (میلیگرم بر لیتر) بر درصد نفوذ لوله گرده در میانه خامه در برخی ارقام سیب

Figure 9. The interaction effectbetween time× boron concentrations (mg L^{-1}) on the pollen tube penetration of style of some apple percentage on the middle part cultivars



شکل ۱۰- اثر متقابل زمان × غلظت بور (میلیگرم بر لیتر) بر درصد نفوذ لوله گرده در ابتدای تخمدان در برخی ارقام سیب

Figure 10. The interaction between time× boron concentration s (mg L^{-1}) on the pollen tube penetration percentage on the beginning of the ovary of some apple cultivas

جدول ۲- ضرایب همبستگی پیرسون برای اثر بور بر درصد جوانه‌زنی گرده در سطح کلاله و نفوذ لوله گرده به ابتدا و میانه خامه و ابتدای تخمدان در برخی ارقام سیب

Table 2. Pearson correlation coefficients for the effect of the boron on the pollen germination percentage on the stigma and pollen tube penetration to the upper and middle parts of the style and so the beginning of the ovary for some apple cultivars

	Stigma level سطح کلاله	Upper part of the style قسمت بالای خامه	Middle part of the style قسمت میانی خامه	Beginning of the ovary ابتدای تخمدان
Stigma level سطح کلاله	-	0.00	0.129	0.209 **
Upper part of the style قسمت بالای خامه	0.00	-	0.927**	0.880**
Middle part of the style قسمت میانی خامه	0.129	0.927**	-	0.951**
Beginning of the ovary ابتدای تخمدان	0.209**	0.880**	0.951**	-

ns= غیر معنی دار ، *= معنی‌دار در سطح پنج درصد و **= معنی دار در سطح یک درصد

ns= Non Significant , * = Significant levels 1%, ** = Significant levels 5%

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج کلی بدست آمده در این مطالعه در ترکیب تلاقی‌های تیمار شده با سه سطح بور، مشاهده شد که ترکیب تلاقی‌هایی که در آن هم والد پدری و هم والد مادری با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بور تیمار شدند بیشترین درصد جوانه‌زنی را در بین سطوح مختلف بور نشان دادند. در حالیکه در ترکیب تلاقی‌هایی که هم والد پدری و هم مادری با غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بور تیمار شده بودند کاهش درصد جوانه‌زنی را نشان دادند که ناشی از اثر سمیّت بور در غلظت‌های بالا می‌باشد. اگرچه کاهش درصد جوانه‌زنی در ترکیب تلاقی‌های تیمارشده با سطح ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد اما نهایتاً در میزان نفوذ لوله‌های گرده در خامه و تخمدان در هر دو سطح ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بور اثر افزایشی قابل ملاحظه‌ای را در ترکیب تلاقی‌ها مشاهده شد که موجب بهبود روند تلقیح شده که متعاقباً افزایش کمیت همراه با کیفیت محصول را در پی خواهد داشت. بنابراین، محلولپاشی عنصر بور در باغات سیب جهت افزایش کمی و کیفی عملکرد توصیه می‌گردد.

منابع

1. Ahmed F F., Darwish, O. H., Gobara, A. A., & Ali, A. H. 2002. Physiological studies on the effect of ascorbic and citric acids in combined with some micronutrients on Flame seedless grapevine. *Minia Journal Agricultural Research Dev*elopment, 22(1), 105-114.
2. Alva O., Roa-Roco R N, Pérez-Díaz R, Yáñez M., Tapia J., Moreno Y., González E. 2015. Pollen morphology and boron concentration in floral tissues as factors triggering natural and GA-induced parthenocarpic fruit development in grapevine. PloS one, 10(10), 0139503.
3. Broothaerts W, & Van Nerum I. 2002. Apple self-incompatibility genotypes: an overview. In XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts 622 (pp. 379-387).
4. Dafni A., Hesse M., Pacini E. 2012. Pollen and pollination: Springer Science & Business Media.
5. De Wet, H. T., & Esme, R. (1988). The influence of temperature and boron on pollen germination in Mangifera indica L. *South* African Journal of Plant and Soil, 6(4), 228-234.
6. FAO STAT. (2012). Food and agriculture organization of the United Nations. FAO Statisticsdivision. http://faostat.fao.org/site/567.
7. Hegedűs,A,J., Lénárt,J Halász. (012. 'Sexual incompatibility in Rosaceae fruit tree species: molecular interactions and evolutionary dynamics', Biologia plantarum, 56: 201-09.
8. Iwai, H., Hokura, A., Oishi, M., Chida, H., Ishii, T., Sakai, S., Satoh, S. 2006. The gene responsible for borate cross-linking of pectin Rhamnogalacturonan-II is required for plant reproductive tissue development and fertilization. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(44), 16592-16597.
9. Lewis D H., (1980). Are there inter-relations between the metabolic role of boron, synthesis of phenolic phytoalexins and the germination of pollen? New Phytologist, 84(2): 261-270.
10. Mularczyk-Oliwa M., Bombalska A., Kaliszewski M., Włodarski M., Kopczyński K., Kwaśny M., Trafny E. A. 2012. Comparison of fluorescence spectroscopy and FTIR in differentiation of plant pollens. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 97, 246-254.
11. Nyomora A M. S., Brown P H., Pinney K., & Polito, V S. 2000. Foliar application of boron to almond trees affects pollen quality. Journal of the American Society for Horticultural Science. 125(2): 265-270.
12. Pereira M. R., Ribeiro H., Cunha M., Abreu I. 2018. Comparison of pollen quality in *Vitis vinifera* L. cultivars. Scientia horticulturae, *227*, 112-116.
13. Pilbeam D J., & Kirkby E. A. 1983. The physiology of boron in plants. Journal of Plant Nutrition, 6(7): 563-582.
14. Qin X. 1996. Foliar spray of B, Z and Mg and their effect on Fruit production and quality of jincheng orang. Journal of Southwest Agricultural University, 18(1): 40-45.
15. Radunić, M., Jazbec, A., Ercisli, S., Čmelik, Z., Ban, S. G. 2017. Pollen-pistil interaction influence on the fruit set of sweet cherry. Scientia horticulturae, *224*, 358-366.
16. Rafeii S., & Pakkish, Z. 2014. Effect of Boric acid spray on growth and development of Camarosa'strawberry(*Fragaria×ananassa* Duch). *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2(4): 1060-1063.
17. Ramírez F., Davenport T L. 2013. Apple pollination: a review. Scientia horticulturae, 162, 188-203.
18. Sakurai K., Brown S K., & Weeden N. 2000. Self-incompatibility alleles of apple cultivars and advanced selections. HortScience, 35(1), 116-119.
19. Sanzol J., and Herrero M. 2001. The Effective pollination period" in fruit trees. Scientia Horticulturae. 90(1): 1–17.
20. Shivanna K R., and Heslop-Harrison J. 1981. Membrane state and pollen viability. Annals of Botany. 47(6): 759-770.

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.2, Summer 2019, P. 207-218
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸، ص. ۲۱۸-۲۰۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Microscopic Study of the Effect of Boron Spraying on the Pollen Tube Penetration in Apple Crosses

S. Fallah Moafi[1]- Y. Sharafi[2*]- A. Rezaei[3]- M. H. Fotokian[4]

Received: 16-10-2017
Accepted: 03-06-2019

Introduction: Favorable pollen transition on the stigma and pollen tube penetration is the most important for fruit setting in the apple. Boron is the main factor for pollen tube growth. A probable responsibility for boron in pollen tube growth may include vesicle making, transportation, fusion or the successive formation of the pollen cell wall. Pollen tube cell walls are rich in polypeptides, glycoprotein, polysaccharides and arabino furanosyl which are known to form physically potent complexes with boron. Maximum cell boron content is located in the cell wall where it is associated with pectin compounds. However, under definite field conditions, foliar applications of boron have been resulted to raise fruit set by as much as 100% in many researches.

Materials and Methods: In this study effects of acid boric by 0 (as a control), 1000 and 2000 ppm concentrations was studied on the pollen tube penetration percentage to style and ovary in six crosses among four apple cultivars including "Fuji", "Gala", "Goldn delicious" and "Red delicious' by florescence microscopy method, 72 and 120 hours after pollination. All of the trees were 12 year old on EM126 rootstocks and foliar sprayed by H_3BO_3 as the boron source (0, 1000 and 2000 mg.L) in the October. Crosses among the cultivars were programmed as ♀Red delicious × Golden delicious ♂, ♂ ♀Gala× Fuji, ♀Red delicious × Fuji♂, ♀Red delicious × Gala ♂, ♂ ♀Golden delicious × Fuji and ♀Golden delicious × Gala ♂. For each cross four repeats in all direction of the tree were regarded and in each repeat at least two branches with 60 – 100 were labeled in winter. Selected female cultivar's flower buds at 'D' stage were bagged to prevent the entrance of foreign pollens on the closed pistils. Pollens collected from the male cultivar flower buds and maintained in freezer until using in the field pollination time. Pollen germination was tested in an *in vitro* medium before field application on the pistils. Selected female cultivar's flowers were pollinated with selected male parent pollen when the pistils were acceptable for pollens and repeated after 24 hours**.** Determination of pollen germination percentage and tube growth on the pistil and different parts of the styles was studied by the florescence microscopy method 72 and 120 hours after pollination healthy pistils were separated from the branches and fixed in FAA solution and prepared for fluorescence microscopy observation as indicated in Ortega and Dicenta (2006). In each pistil the number of germinated pollen grains on the stigma, the number of pollen tubes in the first, second and third section and so, in the ovary were determined by a fluorescent microscope. Because of the five partitions of the apple flower stigma and style; the mean of the five parts was evaluated for each of them. The experiment was carried out as a factorial based on completely randomized design with three factors including B in three levels (0, 1000 and 2000 mg.L), time (0, 72 and 120 hr after pollination) andsix crosses in five replications (at least 10 style per cross). Data was analyzed following SAS (26) software. Mean values were analyzed by Duncan's multiple range test.

Results and Discussion: Results showed that all of the boron concentrations, time after pollination and crosses were significantly affected pollen germination percentage on the stigma and tube penetration to different parts of the style and ovary at P<.01 level. Maximum pollen germination percentage on the stigma (33%) was observed in ♀Goldn delicious × Gala ♂ cross which treated by 1000 ppm boron 120 hr after pollination. Also, maximum pollen tube penetration to ovary was observed in ♀Red delicious × Golden delicious ♂ cross (32.06%). However, best compatibility between them and boron effects on the pollen germination percentage and tube growth in the style. It was revealed that in all of the crosses pollen germination percentage and tube growth in the style was increased by boron treatments.

Conclusion; However, boron is one of the main growth elements by its role in the cytokinin biosynthesis which is the most important hormone affects pollen tube growth and penetration. In this research the foliar

1, 2 and 3- M.Sc. Student of Pomology and Assistant Professors, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahed Unversity, Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: y.sharafi@shahed.ac.ir)
4- Associate Professor, Department of agronomy, Faculty of agriculture, Shahed unversity, Tehran, Iran

application of boron increased pollen germination and pollen tube growth in all of the studied four apple cultivars crosses. However, increasing the boron concentration led to increased pollen germination and pollen tube growth linearly.

Keywords: Boric acid, Crosses, Florescence microscopy, Pollen tube, Ovary