

## مطالعه میکروسکوپی دانه گرده و تعیین میزان قوه نامیه دانه گرده چهار رقم زیتون

فاطمه کرم نژاد<sup>۱\*</sup>، اسماعیل خالقی<sup>۲</sup> و نوراله معلمی<sup>۳</sup>

به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و استاد گروه باغبانی دانشگاه شهید چمران اهواز

\*نویسنده مسئول: karamnezhad@gmail.com

### چکیده

دانه گرده چهار رقم زیتون (دزفولی، میسن، کرونایکی و T2) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) در دانشگاه شهید چمران اهواز مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه گیری بر روی روی محور قطبی (P)، محور استوایی (E)، نسبت محور قطبی به محور استوایی (P/E)، عرض شیار و طول شیار انجام گرفت. همچنین آزمایش دیگری نیز به منظور تعیین قوه نامیه دانه گرده چهار رقم فوق الذکر صورت گرفت. نتایج مطالعه میکروسکوپی نشان داد که تفاوت معنی دار آماری در سطح ۵٪ در بین ارقام از نظر محور قطبی (طول)، محور استوایی، طول شیار و عرض شیار وجود نداشت و اما بین ارقام از نظر محور استوایی (عرض) تفاوت معناداری در سطح ۵٪ مشاهده گردید. همچنین دانه‌های گرده مورد مطالعه همگی همشکل بودند. نتایج نشان داد که مقدار محور قطبی در محدوده ۱۸/۷۶ تا ۲۰/۰۳ میکرومتر بود (به ترتیب در ارقام دزفولی و کرونایکی)، در حالی که میانگین مقدار محور استوایی در محدوده ۱۲/۷۶ تا ۱۳/۶۴ میکرومتر بدست آمد (به ترتیب در ارقام دزفولی و T2). از نظر درصد قوه نامیه نیز مشخص گردید که بیشترین درصد قوه نامیه مربوط به رقم T2 (۹۳/۸۳ درصد) و کمترین درصد قوه نامیه مربوط به رقم دزفولی (۶۵/۶۴ درصد) بود.

**کلمات کلیدی:** زیتون، دانه گرده، قوه نامیه گرده، میکروسکوپ الکترونی.

### مقدمه

زیتون با نام علمی *Olea europaea* L. از خانواده Oleaceae به دلیل رشد و پرورش در اکثر مناطق از ژرم پلاسما بسیار وسیعی برخوردار می باشد. این گیاه پتانسیل بسیار زیادی برای رشد در مناطق خشک و نیمه خشک و همچنین شور در مقایسه با سایر گیاهان را دارا می باشد (Alche et al., 2013; Chartzoulakis, 2005). مطالعات نشان داده است که مورفولوژی دانه گرده می تواند به عنوان ابزار تشخیصی مهمی برای تاکسونومیست‌ها و اصلاح گران درختان میوه به منظور شناسایی و تشخیص هویت و بررسی تفاوت بین گونه و ارقام در گونه گیاهی مورد استفاده قرار گیرد که در این راستا میکروسکوپ الکترونی (SEM) یکی از ابزارهای قدرتمند برای ارزیابی مورفولوژی دانه گرده به شمار می رود (Varasteh, & Arzani., 2009). بطوری که برخی محققین با استفاده از این دستگاه به وجود تفاوت هایی در سطح اگزین دانه گرده در درختان زیتون، انگور و سیب اشاره کرده اند (Javadi and Arzani, 2001, 1979; Ahmedullah, 1983; Marcucci et al., 1984). ارزانی و جوادی (۲۰۰۱) با بررسی دانه گرده برخی از ارقام زیتون نشان دادند که طول محور قطبی معادل ۲۲/۷۶ میکرومتر در رقم ماری و ۲۸/۵۸ میکرومتر در رقم شنگه بود. همچنین بر روی دانه گرده ارقام زرد و شنگه خطوط برجسته ضخیم مشاهده گردید. همچنین این محققین گزارش نمودند که آنالیز میکروسکوپی دانه گرده تفاوت‌های خاصی را شامل گوناگونی در اندازه و شکل شبکه های روی دانه گرده نشان داد و نتایج آنها نشان داد که از الگوی اگزینی دانه گرده ارقام مورد مطالعه می توان در مطالعات شناسایی ارقام کمک گرفت. با بررسی منابع فوق و دیگر منابع مشاهده می شود اطلاعات علمی و مدون زیادی در خصوص مطالعه میکروسکوپی دانه گرده ارقام زیتون به دلیل وسیع بودن ژرم پلاسما این گیاه وجود نداشت لذا پژوهشی با هدف ارزیابی قوه نامیه و بررسی ویژگی های مورفولوژی دانه گرده چهار رقم زیتون با استفاده از SEM انجام پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

انتخاب مواد گیاهی مورد مطالعه

این پژوهش در فروردین ماه ۱۳۹۳ بر روی ارقام T2، دزفولی، میشن و کرونیکی واقع در کلکسیون باغ زیتون گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز واقع در حاشیه غربی رودخانه با موقعیت جغرافیایی در ۳۱ درجه و ۲۰ دقیقه عرض شمالی و ۴۸ درجه و ۴۰ دقیقه طول شرقی و ارتفاع از سطح دریا ۲۲/۵ متر انجام گرفت.

## جمع آوری دانه گرده

جهت تهیه دانه گرده، شاخه‌های حاوی جوانه‌های گل از درختان مربوط به ارقام مورد مطالعه در مرحله تورم نسبی و قبل از باز شدن گل‌ها انتخاب شدند. سپس گل‌ها در پاکت‌های جداگانه برای تهیه دانه گرده به آزمایشگاه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی منتقل شدند. پس از جمع آوری دانه گرده، دانه‌های گرده درون پتری دیش ریخته و درب پتری دیش‌ها با پارافیلیم بسته شدند سپس در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Hedhly et al., 2005).

## آزمایش اول: خصوصیات میکروسکوپی دانه گرده

به منظور بررسی خصوصیات دانه گرده (محور قطبی، محور استوایی، نسبت محور قطبی/محور استوایی، طول شیار، و عرض پشته‌ها) چهار رقم زیتون از میکروسکوپ الکترونی گدازه (SEM) مدل LEO 1455VP آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شهید چمران اهواز استفاده شد. بدین منظور پس از قرار گیری دانه گرده خشک شده از هر رقم، بر روی نوار آلومینیومی و سپس این نمونه‌ها با لایه‌ی از طلا با ضخامت 200 °A پوشش داده شد و توسط میکروسکوپ الکترونی گدازه مورد بررسی قرار گرفتند. (Arzani et al., 2005). این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

## آزمایش دوم: تعیین قوه نامیه دانه گرده

به منظور مشخص کردن قوه نامیه دانه گرده از استوکارمین استفاده شد. لام‌های تهیه شده برای تعیین قوه نامیه دانه‌های گرده در زیر میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار گرفتند، دانه‌های گرده زنده به رنگ قرمز و غیر زنده به رنگ زرد مشخص شدند (Rigamoto et al., 2002). پس از مشاهده و یادداشت برداری، درصد قوه نامیه دانه‌های گرده محاسبه گردید. طرح آزمایشی مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار (ارقام) و ۴ تکرار انجام شد.

## تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها پس از نرمال شدن با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

## نتایج و بحث

## مطالعه میکروسکوپی

با توجه به جدول تجزیه واریانس مورفولوژی دانه گرده ارقام (T2، دزفولی، میشن و کرونیکی) زیتون مشخص شد که تفاوت معنی دار آماری در سطح ۵٪ در بین ارقام از نظر محور قطبی (طول)، محور استوایی، طول شیار و عرض شیار وجود نداشت و اما بین ارقام از نظر محور استوایی (عرض) تفاوت معناداری در سطح ۵٪ مشاهده گردید. بررسی مورفولوژی دانه گرده ارقام زیتون (T2، دزفولی، میشن و کرونیکی) نشان داد که دانه‌های گرده مورد مطالعه در این گروه همه بیضوی شکل بودند (شکل ۱). مقادیر میانگین محور قطبی از بازه ۲۰/۰۳ میکرومتر برای رقم دزفولی و ۱۸/۷۶ برای رقم کرونیکی بود (شکل ۶). در حالی که مقادیر میانگین محور استوایی از بازه ۱۳/۶۴ میکرومتر برای رقم دزفولی و ۱۲/۷۶ میکرومتر برای رقم T2 بود. نتایج حاکی از آن است که رقم دزفولی سایز بزرگ‌تری نسبت به دیگر ارقام داشت، هر چند که بین ارقام تفاوت معنی داری مشاهده نشد، که این نتایج با نتایج دیگر محققین مطابقت داشت (Zhu et al., 2013). محققین مورفولوژی دانه گرده ژرم پلاسز زیتون را با استفاده از SEM به منظور تشخیص تفاوت ژرم پلاسز و پلی مورفیسم مطالعه کردند. آنها گزارش نمودند که بررسی مورفولوژی دانه گرده با استفاده از SEM روابط (تفاوت‌ها و شباهت‌ها) کمی بین ارقام را به صورت جزئی نشان می‌دهد (Lanza and Marsilio., 1999). گزارش مشابهی برای پلی مورفیسم بین ارقام گلابی با استفاده از SEM نیز وجود داشت (Li et al., 2002).

جدول ۱- تجزیه واریانس مورفولوژی دانه گرده ارقام (T2، دزفولی، میشن و کرونیکی) زیتون بر اساس SEM

| دامنه تغییرات | درجه آزادی | محور قطبی | میانگین مربعات |                          | عرض پشته |
|---------------|------------|-----------|----------------|--------------------------|----------|
|               |            |           | محور استوایی   | محور قطبی / محور استوایی |          |
| رقم           | ۳          | ۰/۹۲ns    | ۰/۵۱*          | ۰/۰۱ns                   | ۰/۲۴ns   |
| خطا           | ۸          | ۰/۶۲      | ۰/۱۲           | ۰/۰۰۲                    | ۰/۱۷     |
| ضریب تغییرات  |            | ۴/۱۱      | ۲/۶۷           | ۳/۴۳                     | ۴/۷۳     |

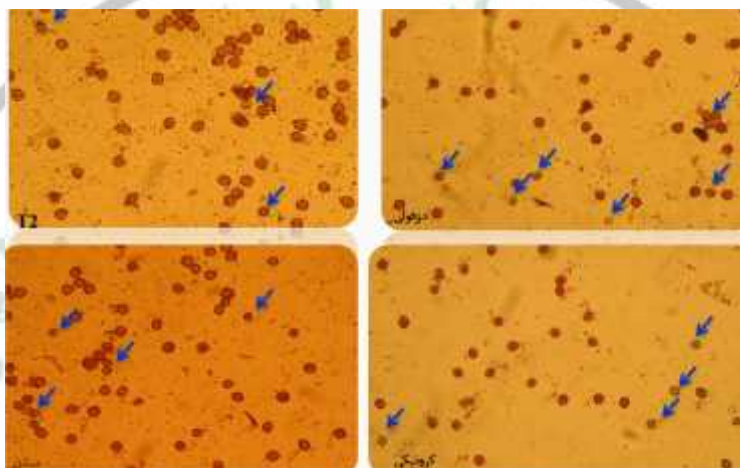
\*

: تفاوت معنادار در سطح ۵٪

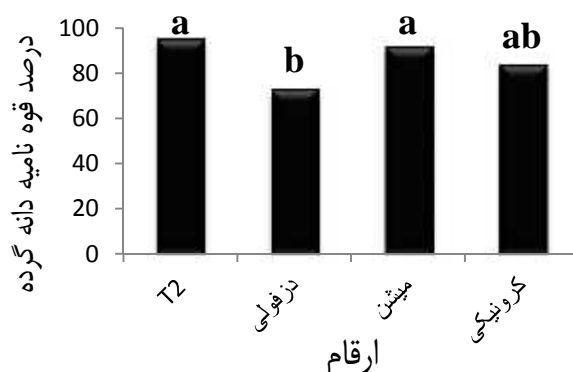
شکل ۱- شکل گرده ارقام (T2، دزفولی، میشن و کرونیکی) زیتون بر اساس SEM (با بزرگنمایی  $\times 20000$ ).

## قوه نامیه دانه گرده

قابلیت رنگ‌پذیری دانه‌های گرده زنده نیز روشی برای ارزیابی گرده‌های زنده به شمار می‌رود. ارزیابی قوه نامیه دانه گرده چهار رقم زیتون در شکل ۱ آورده شده است. با توجه به جدول تجزیه واریانس ۱ درصد قوه نامیه دانه‌های گرده ۴ رقم (T2، دزفولی، میشن و کرونیکی) زیتون مشخص گردید که بین ارقام از نظر درصد قوه نامیه در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت به طوری که، بیشترین درصد قوه نامیه در رقم T2 به میزان ۹۳/۸۳ درصد و کمترین درصد قوه نامیه در رقم دزفولی با ۶۵/۶۴ درصد بدست آمد (شکل ۲). محققین معتقدند که تنوع قابل توجهی در قوه نامیه ارقام زیتون وجود داشته که بین ۱۴ تا ۷۹ درصد (Wu et al., 2002) و ۶۸ تا ۸۶ درصد (Reale et al., 2006) باشد که این اختلاف نشان دهنده نقش عوامل ژنتیکی می‌باشد (Koubouris et al., 2012).



شکل ۱- میزان قوه نامیه دانه گرده در ۴ رقم زیتون: دانه‌های گرده فاقد قوه نامیه با فلش مشخص شده است.



شکل ۲- درصد قوه نامیه دانه گرده ۴ رقم (T2، دزفولی، میشن و کرونیکی) زیتون

## منابع

- Ahmedullah, M. 1983. Pollen Morphology of Selected Vitis Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **108**(1): 155-160.
- Alché Ramírez, J. D. D., Castro López, A. J., Jiménez-López, J. C., Morales, S., Zafra, A., Hamman-Khalifa, A. M., & Rodríguez García, M. I. 2007. Differential characteristics of olive pollen from different cultivars: biological and clinical implications.



3. Arzani, K., Nejatian, M. A., & Karimzadeh, G. 2005. Apricot (*Prunus armeniaca*) pollen morphological characterisation through scanning electron microscopy, using multivariate analysis. *New Zealand journal of crop and Horticultural science*, 33: 381-388.
4. Chartzoulakis, K. S. 2005. Salinity and olive: growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. *Agricultural Water Management*, 78: 108-121.
5. Hedhly, A., Hormaza, J. I., & Herrero, M. 2005. The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in peach. *Plant Biology*, 7:476-483.
6. Javady, T and Arzani, K. 2001. Pollen Morphology of Five Iranian Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *J. Agric. Sci. Technol.* (2001) Vol. 3: 37-42
7. Koubouris, G. C., Metzidakis, I. T., & Vasilakakis, M. D. 2012. Intraspecific variation in pollen viability, germination and ultrastructure of *Olea europaea* L. *African Journal of Biotechnology*, 11: 13442-13446.
8. Lanza, B. and V. Marsilio. 1999. Ultrastructural image analysis and biometric studies on pollen grain to distinguish olive cvs. *Acta Horticultural*. 474:133-136.
9. Li, X. G., Yang, J., Li, X. G., & Yang, J. 2002. Application of numerical taxonomy of pollen morphology on origination, evolution and classification of *Pyrus* L. L. in China. *J. Fruit Sci*, 19: 145-148.
10. Marcucci, M.C., Sansavini, S., Ciampolini, F., and Cresti, M. 1984. Distinguishing Apple Clones and Cultivars by Surface Morphology and Pollen Physiology. *J. Amer.Soc. Hort. Sci.*, **109(1)**: 10-19.
11. Reale, L., Sgromo, C., Bonofiglio, T., Orlandi, F., Fornaciari, M., Ferranti, F., & Romano, B. 2006. Reproductive biology of olive (*Olea europaea* L.) DOP Umbria cultivars. *Sexual plant reproduction*, 19(4), 151-161.
12. Rigamoto, R. R., & Tyagi, A. P. 2002. Pollen fertility status in coastal plant species of Rotuma Island. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 20: 30-33.
13. Varasteh, F., & Arzani, K. 2009. Classification of some Iranian pomegranate (*Punica granatum*) cultivars by pollen morphology using scanning electron microscopy. *Horticultural Environment and Biotechnology*, 50: 24-30.
14. Wu, S. B., Collins, G., & Sedgley, M. 2002. Sexual compatibility within and between olive cultivars. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77: 665-673.
15. Zhu, W. Z., Zhou, P., Xie, J., Zhao, G., & Wei, Z. H. 2013. Advances in the pollination biology of olive (*Olea europaea* L.). *Acta Ecologica Sinica*, 33: 64-71.

### Studies on the pollen grains using scanning electron microscopy (SEM) and pollen viability in four cultivars of olive

F. karamnezhad<sup>1</sup>, A. khaleghi<sup>2</sup>, N. moalemi<sup>3</sup>

1-Ph. D. student, 2-Assistant, and 3- Professor Horticultural Sciences Department, Shahid Chamram of University Ahvaz

\*Corresponding author: karamnezhadf@gmail.com

#### Abstract

Pollen grains from 4 olive cultivars (Dezfuli, Mission, Koroneiki, T2) were examined using scanning electron microscopy (SEM) in Shahid Chamram of University Ahvaz. The polar (P) and equatorial axis (E) of grains, P/E ratios, distances between the two furrows, and width of the pollen grain ridges were measured. As well as other experiment determine pollen viability of mentioned 4 olive cultivars. The results indicated that the non-significant difference at 5% level among cultivars polar (P), P/E ratios, distances between the two furrows, and width of the pollen grain ridges, but was observed the significant difference at 5% level equatorial axis (E) of grains. All studied cultivars showed a similar shapes. The results indicated that the mean polar axis ranged between 18.76-20.03  $\mu\text{m}$  (Dezfuli and Koroneiki,

respectively), while the mean equatorial axis ranged between 12.76-13.64  $\mu\text{m}$  (Dezfuli and T2, respectively) was obtained. The viability also determined the highest viability of the T2 (93.83 percent) and lowest viability related of Dezfuli (65.64 percent).

**Key words:** Olive, Pollen grain, Pollen viability, SEM

