

Exploring the germination and pollen grain morphology of European pear (*Pyrus communis* L.) with the promising genotype A95 and cultivar Sebri to improve yield

ABSTRACT

Since successful fruit sets in controlled hybridization programs outside the flowering season or using pollen for production purposes at appropriate times, the presence of viable pollen grains at the time of stigma receptivity is of great importance. Considering the unique and specificity of pollen in many plant groups and the morphological and structural characteristics of pollen, in this research, the effect of the storage time (12 months) of the pollen grain of 'Sebri' cultivar and promising A95 genotype of European pear at different temperatures (laboratory ambient temperature, 4, -20 and -80°C) was investigated through culturing in a suitable medium containing sucrose (15%), boric acid (20 ppm), calcium nitrate (1.219 mM) with 0.8% agar. Their morphology was evaluated using a scanning electron microscope (SEM). The results of pollen grain culture demonstrated that the highest viability of pollen grains was observed in the A95 promising genotype at 20°C after three months of storage. Results showed that the pollen germination at different storage temperatures increased with a decrease in temperature and decreased over the storage period. The results of the morphological examination of pollen grains by SEM revealed that the studied pollen grains were monads, spheroidal in shape, radially symmetrical, and had three longitudinal furrows on their surface. The shape of the pollen grains was prolate, and their sizes varied from 35.31-39.51 micrometers.

Keywords: A95 genotype, pollen morphology, pollination, SEM, pollen germination, European pear.

کاوش در جوانه‌زنی و مورفولوژی دانه گرده گلابی اروپایی (*Pyrus communis* L.) ژنوتیپ امیدبخش A95 و رقم سبری برای بهبود عملکرد

چکیده

برای تشکیل میوه موفقیت آمیز در برنامه‌های دورگ‌گیری کنترل شده در خارج از فصل گل‌دهی و یا استفاده از گرده‌ها برای اهداف تولید در زمان‌های مقتضی، وجود دانه گرده زنده در زمان پذیرش کلاله، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. با توجه به اختصاصی بودن گرده در بسیاری از گروه‌های گیاهی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ساختمانی گرده‌ها، در این تحقیق اثر مدت زمان نگهداری (۱۲ ماه) دانه گرده رقم سبری و ژنوتیپ امیدبخش A95 از گلابی اروپایی در دماهای متفاوت (دمای محیط آزمایشگاه، ۴، -۲۰ و -۸۰ درجه سانتی‌گراد) از طریق کشت در محیط کشت مناسب حاوی ساکارز (۱۵ درصد)، بوریک اسید (۲۰ ppm)، نیترات کلسیم (۱/۲۱۹ میلی مولار) و آگار (۸ درصد) بررسی و نیز ریخت‌شناسی آنها، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج کشت دانه گرده نشان داد بیشترین زنده‌مانی دانه گرده در ژنوتیپ A95، دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد و پس از سه ماه نگهداری بوده است. به‌طور کلی، میزان جوانه‌زنی دانه‌های گرده در دماهای مختلف آزمایش با کاهش دما، افزایش یافته و با گذشت زمان نگهداری، کاهش یافته است. نتایج بررسی مورفولوژی دانه گرده توسط میکروسکوپ الکترونی مشخص کرد که دانه‌های گرده مطالعه شده تک‌تایی، جور قطب و دارای تقارن شعاعی بوده، همچنین دارای ۳ شیار طولی در سطح خود بودند. شکل دانه‌های گرده prolate و اندازه آنها از ۳۵/۳۱-۳۹/۵۱ میکرومتر متفاوت بود.

واژه‌های کلیدی: ژنوتیپ A95، مورفولوژی گرده، گرده‌افشانی، SEM، جوانه‌زنی گرده، گلابی اروپایی.

مقدمه

دانه‌های گرده به‌عنوان واحدهای تولید مثل جنسی و حامل مواد ژنتیکی والد نر، در برنامه‌های به‌نژادی و تشکیل میوه موفقیت‌آمیز گیاهان عالی، نقش حیاتی ایفا می‌کنند (عابدی قشلاقی و همکاران، ۱۳۹۸). مطالعه ویژگی‌های گرده، به‌خصوص درصد جوانه‌زنی و رشد لوله گرده در گرده‌های ذخیره‌شده، برای ارزیابی میزان قوه‌نامیه و طول عمر آن‌ها در پژوهش‌ها و برنامه‌های اصلاح درختان میوه از اهمیت بالایی برخوردار است (Arzani, 2014). ویژگی‌های اختصاصی گرده در بسیاری از گروه‌های گیاهی و سهولت مطالعه‌ی آن، این امکان را فراهم کرده است که با تحلیل ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ساختمانی گرده‌ها، بتوان نوع گیاه مولد را شناسایی کرد و جایگاه آن را در رده‌بندی و تقسیمات گیاه‌شناسی مشخص نمود. این بررسی‌ها همچنین به تحلیل دقیق روابط خویشاوندی بین جنس‌ها و گونه‌ها کمک می‌کنند (سیار، ۱۳۹۳). همچنین، ذخیره‌سازی بلندمدت دانه‌های گرده یک روش مؤثر برای حفاظت از عوامل ژنتیکی به‌منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی محسوب می‌شود (عابدی قشلاقی و همکاران، ۱۳۹۸). افزون بر این، مطالعه ویژگی‌های گرده ژنوتیپ‌ها و گونه‌های خاص برای برنامه‌های اصلاحی بسیار مهم است (Calic et al., 2013; Arzani et al., 2005; Varasteh et al., 2009). در زمینه اصلاح گلابی، انتخاب ژنوتیپ‌های برتر حاصل از دانه‌های تصادفی همواره از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده است. ژنوتیپ امیدبخش A95^۱ (نهال تصادفی انتخاب شده در باغ گلابی آسیایی گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد که از بین دانه‌های گلابی درگزی که بعنوان پایه برای ارقام گلابی آسیایی کشت شده بوده‌اند انتخاب شده است (Najafzadeh and Arzani 2015; Wang and Arzani 2019)) از نظر خصوصیات پومولوژی نظیر مناسب بودن اندازه میوه، حجم میوه، وزن تازه و خشک میوه، میزان مواد جامد محلول، سفتی میوه و نتایج مثبت تست پانل بالا از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین بالا بودن اسیدیته قابل تیترو میزان کم pH موجب عطر و طعم بهتر میوه و هاله قرمز رنگ بر روی پوست میوه ژنوتیپ A95 موجب بازارپسندی و جذابیت میوه آن گردیده است. این ژنوتیپ از نظر عملکرد و قدرت رشدی در رتبه خوبی قرار دارد و بعنوان ژنوتیپ امیدبخش مورد توجه قرار گرفته است (Najafzadeh and Arzani, 2015)؛ تقی‌گذری و ارزانی، ۱۳۹۵). علاوه بر این، ضروری است که تولیدکنندگان میوه، به ویژه در ارتباط با گونه‌های خاص، با بیولوژی لقاح آشنا شوند و اقدامات احتیاطی لازم را مطابق با آن در نظر بگیرند. به‌جز برخی از گونه‌هایی از درختان میوه که میوه‌های پارتنوکارپ تولید می‌کنند، بررسی و مطالعه گرده‌افشانی و لقاح در اکثر گونه‌های درختان میوه برای تولید محصول مناسب لازم و ضروری است (Arzani, 2020). در این راستا، هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک و ارزیابی واکنش کیفی دانه گرده دو رقم گلابی اروپایی (رقم سبری و ژنوتیپ امیدبخش A95) به دماهای مختلف نگهداری (دمای محیط آزمایشگاه، ۴، ۲۰- و ۸۰- درجه سانتی‌گراد) به‌منظور ذخیره‌سازی بلند مدت برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی و یا بهره‌برداری احتمالی در پرورش این گونه‌ها بوده است.

پیشینه پژوهش

ذخیره‌سازی بلند مدت دانه گرده یک روش مفید برای حفاظت از منابع ژنتیکی برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی است، از طرف دیگر ذخیره‌سازی گرده برای گرده‌افشانی کنترل شده و دستیابی به صفات مورد نظر از طریق برنامه‌های به‌نژادی ضروری می‌باشد. به‌دلیل تأخیر شکوفایی بین درخت دهنده گرده و گیاه پذیرا دانه گرده، گرده باید قبل از استفاده تحت مراقبت‌های ویژه‌ای از نظر جمع‌آوری و نگهداری

^۱. A95 Promising genotype

برای حفظ زنده‌مانی دانه‌های گرده قرار گیرد. شرایط بهینه نگهداری دانه‌های گرده می‌تواند از گونه‌ای به گونه‌ای دیگر متفاوت باشد (Shivanna and Johri, 1985).

پتانسیل ذخیره‌سازی دانه‌های گرده به عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ، نوع گونه گیاهی، شرایط ذخیره‌سازی و نوع گل بستگی دارد (Ikram et al., 2022). علاوه بر این سن دانه گرده، رطوبت موجود در آن و وضعیت فیزیولوژیکی گل نیز روی زنده‌مانی دانه گرده در طول مدت زمان نگهداری تأثیرگذار هستند (Ćalić et al., 2021). حفظ قدرت جوانه‌زنی دانه گرده به میزان قابل توجهی به شرایط نگهداری آن، از جمله دما، رطوبت نسبی، گازهای اتمسفر و فشار هوا انبار وابسته است (پورادیب و همکاران، ۱۳۹۵). نگهداری دانه گرده به منظور افزایش انعطاف‌پذیری زمان گرده‌افشانی و صرفه‌جویی در فضای فیزیکی در گرده‌افشانی کنترل شده بسیار حائز اهمیت است (Khush-khui and Niknejad, 1976). برای ارزیابی زنده‌مانی دانه‌های گرده، روش‌های متعددی از جمله رنگ‌آمیزی و جوانه‌زنی در شرایط آزمایشگاه به کار گرفته می‌شود (Ikram et al., 2022). در این میان، جوانه‌زنی دانه‌های گرده در شرایط آزمایشگاهی معمول‌ترین و کارآمدترین روش برای سنجش زنده‌مانی در برنامه‌های بهبود ژنتیکی به‌شمار می‌آید.

تولید دانه‌های گرده با قابلیت زنده‌مانی بالا و مناسب برای حمل و نقل و نگهداری، در برنامه‌های اصلاحی از ارزش بالایی برخوردار است (Ćalić et al., 2021). بنابراین نگهداری مناسب با زنده‌مانی مناسب دانه‌های گرده، امکان تلاقی بین ژنوتیپ‌هایی را که در زمان‌های مختلف گلدهی دارند را فراهم می‌کند (Machado et al., 2014). علاوه بر این، ذخیره‌سازی مؤثر گرده و زنده‌مانی بالا برای حفظ تنوع زیستی^۱، بیوتکنولوژی^۲، حفاظت و سایر مطالعات نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Ćalić et al., 2021). برخی مطالعات نشان داده‌اند که گرده‌های ذخیره شده در دماهای پایین‌تر برای نگهداری طولانی مدت مؤثر بوده است و کاهش دمای نگهداری دانه‌های گرده رابطه مستقیم با طول عمر دانه گرده داشته است. به عنوان مثال گرده نخل خرما (Maryam et al., 2017)، انبه (Dutta et al., 2013)، بادام (Martínez-Gómez et al., 2002)، گیلاس شیرین (Özcan, 2020)، سیب (Ćalić et al., 2021)، فندق (Novara et al., 2017)، آلو (Đorđević et al., 2022)، گلابی (Bhat et al., 2012)، مرکبات (Ahmed et al., 2017) و زیتون (Şenbaş et al., 2022) در این دسته قرار می‌گیرند. گرده‌های ذخیره شده در دماهای منفی (۲۰- یا ۱۹۶- درجه سانتیگراد) توانسته‌اند طول عمر خود را حداقل به مدت یک سال افزایش دهند (Ćalić et al., 2021). گرده‌افشانی یک مرحله اساسی در تولید مثل گیاه است که رشد و نمو تخمدان‌ها را تحریک می‌کند. این فرایند با انتقال گرده از بساک به کلاله در یک گونه انجام می‌شود و برای لقاح تخمک و همچنین رشد میوه‌ها و دانه‌ها ضروری است و ارتباط مستقیمی با کیفیت و کمیت محصول میوه دارد. جوانه‌زنی دانه گرده، اولین مرحله از مجموعه‌ای است که در نهایت منجر به لقاح تخمک، رشد و توسعه میوه می‌شود (POPA et al., 2022).

مورفولوژی دانه گرده نیز به عنوان یک عنصر کلیدی برای شناسایی و طبقه‌بندی بسیاری از گونه‌های گیاهی مورد توجه است (Khaleghi et al., 2019). بررسی مورفولوژی گرده در زمینه‌های طبقه‌بندی، فیلوژنی و دیرین گیاه شناسی نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر، میکروسکوپ الکترونی روبشی^۳، به عنوان یک تکنیک قدرتمند برای مطالعه مورفولوژی گرده به کار رفته است. مطالعات SEM روی گرده درختان میوه پرورش یافته با هدف طبقه‌بندی و شناسایی رقم انجام شده است (Dar et al., 2019). تحقیقات متعدد نشان می‌دهند که با ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی دانه گرده، می‌توان روابط بین گونه‌ای و درون گونه‌ای بین انواع درختان میوه را تحلیل

^۱. Biodiversity

^۲. Biotechnology

^۳. Scanning Electron Microscope (SEM)

کرد (Khaleghi et al., 2019). پومولوژیست‌ها از ویژگی‌های مورفولوژیک دانه گرده از جمله اندازه، شکل، الگوی اگزین^۱ و ساختار برای تمایز بین گونه‌های مختلف شامل گلابی آسیایی (Ghazaeian et al., 2007)، گلابی (Shim et al., 1998)، زیتون (Javady and Arzani, 2001; Khaleghi et al., 2019)، مرکبات (Ahmadi et al., 2001)، زردآلو (Arzani et al., 2005)، خرما (Mortazavi et al., 2011)، سیب (Marcucci et al., 1984; Dar et al., 2019)، انگور (Marasali et al., 2005)، هلو و شلیل (Milatović et al., 2016)، سیب و آلو (POPA et al., 2022)، آلبالو (Rakonjac et al., 2024)، به (Radovic et al., 2016) و برخی دیگر از درختان میوه (Arzani, 2014) استفاده کرده اند.

روش شناسی پژوهش

مکان و زمان آزمایش

این پژوهش در باغ تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس واقع در ۱۵ کیلومتری غرب تهران، با طول جغرافیایی $51^{\circ}19'$ ، عرض جغرافیایی $35^{\circ}41'$ و ارتفاع ۱۱۹۰/۸ متر از سطح دریا، در سال باغی ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰ انجام گرفت. بررسی‌های آزمایشگاهی جمع‌آوری، نگهداری و جوانه‌زنی دانه‌های گرده این پژوهش در آزمایشگاه میوه‌کاری گروه علوم باغبانی و همچنین برای ثبت مورفولوژی دانه‌های گرده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) مدل Philips XL30 در دانشگاه امیرکبیر استفاده شد.

معرفی مواد گیاهی مورد استفاده در تحقیق

جمع‌آوری دانه گرده برای کشت درون شیشه‌ای

انتخاب و ایزوله کردن شاخه‌ها

پس از بازدید از باغ تحقیقاتی دانشکده کشاورزی، در آستانه باز شدن گل‌های رقم سبری و ژنوتیپ امیدبخش A95 (اواخر اسفند ماه ۱۳۹۹)، تعدادی شاخه از زوایای مختلف درختان بالغ که دارای جوانه‌های گل کافی و مناسبی بودند، به صورت تصادفی انتخاب شدند. این شاخه‌ها جهت نگهداری و کشت در آزمایشگاه با برچسب علامت‌گذاری گردیدند. همچنین برای جلوگیری ورود گرده‌های ناخواسته، شاخه‌های انتخابی قبل از باز شدن گل‌ها با کیسه‌هایی در اندازه‌های مختلف که از پیش آماده شده بودند، پوشانده شدند.

جمع‌آوری دانه گرده

پس از گذشت چند روز، گل‌های رقم سبری و ژنوتیپ امیدبخش A95 شکوفا شدند و آماده جمع‌آوری دانه گرده گردیدند. گل‌ها از شاخه جدا شده و به آزمایشگاه گروه علوم باغبانی منتقل شدند. سپس، بساک‌ها با استفاده از قیچی کوچک جدا شده و به مدت ۲۴ ساعت بر روی کاغذهای درون پتری دیش در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند. پس از خشک شدن و شکوفایی بساک‌ها، دانه‌های گرده جمع‌آوری و در

^۱. Exine

ویال‌های کوچک شیشه‌ای با حجم ۱۰cc قرار داده شدند. سپس درب این ویال‌های شیشه‌ای با پارافیلیم به صورت محکم بسته شد تا از ورود رطوبت و آلودگی جلوگیری شود. و در نهایت دانه‌های گرده در ۴ تیمار دمای مختلف (محیط آزمایشگاه، ۴°C، ۲۰°C و ۸۰°C-) نگهداری شدند.

نگهداری دانه گرده

میزان لازم از دانه‌های گرده رقم سبری و ژنوتیپ امیدبخش A95 پس از جمع‌آوری به ۴ ویال شیشه‌ای مجزا جهت کشت در ۴ بازه زمانی (۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماه نگهداری پس از گلدهی) منتقل و برای یک سال در دماهای محیط آزمایشگاه، ۴°C، ۲۰°C و ۸۰°C- نگهداری شدند. سپس در فواصل زمانی ذکر شده، دانه‌های گرده در محیط کشت مناسب حاوی ساکارز، بوریک اسید، نیترات کلسیم و آگار کشت داده شدند و میزان جوانه‌زنی آنها پس از مدت نگهداری ثبت و بررسی گردید. بررسی به‌منظور تعیین تأثیر مدت و دمای نگهداری روی میزان جوانه‌زنی دانه گرده انجام شد (Ahmadi et al., 2001).

کشت دانه گرده در آزمایشگاه

برای اطمینان از قدرت جوانه‌زنی دانه‌های گرده رقم سبری و ژنوتیپ A95 طی مدت زمان نگهداری و تحت ۴ تیمار دمایی محیط آزمایشگاه، ۴°C، ۲۰°C و ۸۰°C-، آزمون زنده بودن دانه گرده در آزمایشگاه انجام شد. دانه‌های گرده جمع‌آوری شده در محیط کشت حاوی مقادیر مشخصی از ساکارز (۱۵ درصد)، بوریک اسید (۲۰ppm)، نیترات کلسیم (۱/۲۱۹ میلی مولار) و آگار (۰/۸ درصد) درون پتری دیش شیشه‌ای کوچک با قطر ۳۵ میلیمتر کشت شدند (شیخی و همکاران، ۱۳۹۵). محیط کشت، و ابزارهای مورد استفاده شامل پتری دیش‌های شیشه‌ای، دستمال، اسپاچول، قلم‌مو در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. پس از پایان فرایند اتوکلاو محیط کشت به زیر لامینار منتقل شده و قبل از اینکه به‌صورت جامد درآید، درون پتری دیش‌ها توزیع گردید. دانه‌های گرده با استفاده از اسپاچول و قلم‌مو روی محیط کشت جامد پخش شدند و درب پتری دیش‌ها با استرچ فیلم محکم پوشانده شد و نمونه‌ها به انکوباتور منتقل گردیدند.

شرایط انکوباتور جهت نگهداری دانه‌های گرده به‌صورت دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی در روز تنظیم شد. پس از ۲۴ ساعت نگهداری، درصد جوانه‌زنی دانه‌های گرده زیر میکروسکوپ (Olympus Bx51) با بزرگنمایی $20 \times$ مورد بررسی قرار گرفت و دانه‌های گرده جوانه زده شناسایی و ثبت شدند. برای ارزیابی دقیق‌تر، پنج ناحیه مجزا در زیر میکروسکوپ روی هر تشک پتری دیش شناسایی شد و از هر ناحیه صد دانه گرده انتخاب گردید. میانگین درصد جوانه‌زنی به‌دست آمده از این پنج ناحیه به‌عنوان درصد جوانه‌زنی کل دانه گرده در نظر گرفته شد (شیخی و همکاران، ۱۳۹۵). دانه گرده‌ای جوانه زده محسوب شد که طول لوله گرده آن برابر یا بیشتر از قطر دانه گرده بود. درصد جوانه‌زنی دانه گرده با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد جوانه‌زنی دانه‌های گرده} = \frac{\text{تعداد دانه گرده تنیده}}{\text{تعداد کل دانه‌های گرده در یک ناحیه پتری}} \times 100$$

این آزمایش با سه تکرار انجام شد و برای تحلیل داده‌های جمع‌آوری شده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. به‌علاوه میانگین تیمارهای مورد بررسی با روش LSD در سطح ۵ درصد مقایسه گردید.

بررسی مورفولوژی دانه گرده

جمع آوری دانه گرده جهت بررسی مورفولوژی

برای جمع آوری دانه‌های گرده، زمانی که گل‌ها در مرحله بالنی شکل^۱ یا پاپکورنی (مرحله‌ای که در آن گل‌ها به‌طور کامل برآمده بوده و در آستانه شکوفایی قرار دارند) بودند از درختان جدا شدند (Kaufman and Rumpunen, 2002). به‌منظور جلوگیری از آمیخته شدن دانه‌های گرده ارقام مختلف در باغ تحقیقاتی، شاخه‌ها از پیش با کیسه‌های پارچه‌ای پوشانده شدند تا از هر گونه گرده‌افشانی خارجی جلوگیری شود. سپس گل‌ها بعد از باز شدن به آزمایشگاه منتقل شدند. بساک‌ها جدا شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. گرده‌ها از بساک‌های خشک شده جمع‌آوری گشته و برای اینکه رطوبت باقی‌مانده در گرده‌ها باعث فساد آن‌ها نشود، در ویال شیشه‌ای درون دسیکاتور و سپس در یخچال ۴°C درجه قرار داده شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM)

برای ارزیابی میکروسکوپ الکترونی، دانه‌های گرده مورد مطالعه به وجهی مناسب خشک شدند. مقداری از دانه‌های گرده جدا شده از بساک‌ها روی صفحه‌ای قرار گرفتند. سپس روی چسب نواری مخصوص میکروسکوپ الکترونی منتقل شدند و در ادامه روی دیسک مربوطه قرار گرفتند. سپس سطح دیسک‌ها با دستگاه sputter coater پوشش دهی طلا شد تا خاصیت رسانایی پیدا کند. در نهایت نمونه‌ها با میکروسکوپ مورد مشاهده و مطالعه قرار گرفتند.

تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM)

برای تفسیر الگوی سطح خارجی دانه‌های گرده تصاویری با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ تا ۵۰۰ برابر با میکروسکوپ مدل Philips XL30 به ثبت رسید. محور قطبی (P)، محور استوایی (E)، نسبت محور قطبی به استوایی (P/E) دانه گرده، فاصله بین دو شیار و عرض برآمدگی در دانه‌های گرده اندازه‌گیری گردید. همچنین، دانه‌های گرده آسیب دیده یا نامناسب از مطالعه حذف شدند (Arzani et al., 2005). این آزمایش با پنج تکرار انجام شد و برای تحلیل داده‌های استخراج شده از تصاویر، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. میانگین تیمارهای مورد بررسی با روش LSD در سطح ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. برای آنالیز تصاویر میکروسکوپ SEM از نرم‌افزار Microstructure Measurement استفاده شد.

^۱ Balloon stage

یافته‌های پژوهش

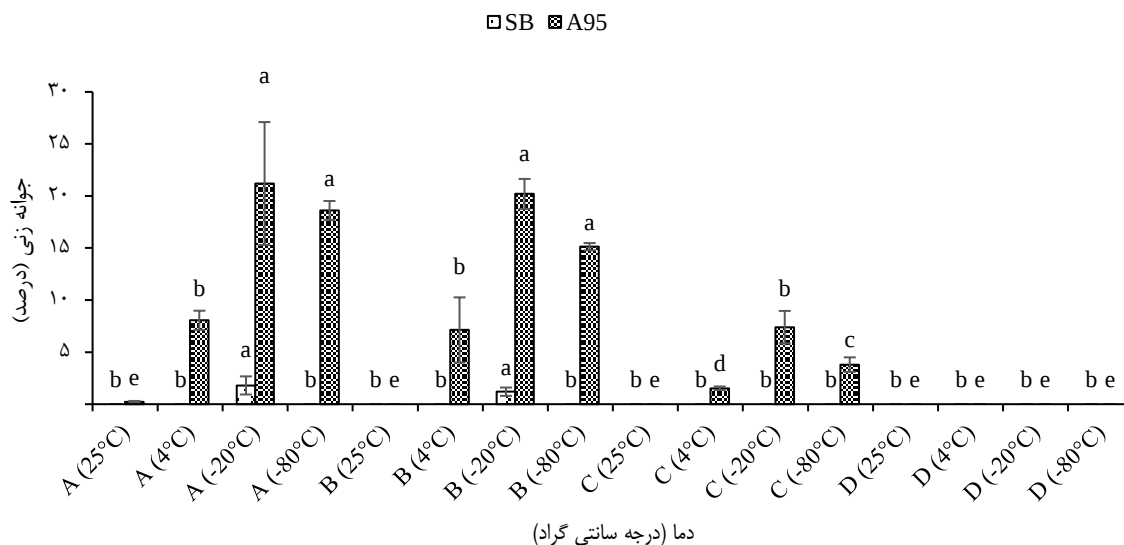
نتایج نگهداری و کشت دانه گرده

نتایج تجزیه واریانس مربوط به نگهداری و کشت دانه‌های گرده نشان داد که متغیرهای رقم، زمان و دما دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر بودند. علاوه بر این، اثرات متقابل رقم با زمان، رقم با دما، زمان با دما و رقم و زمان و دما نیز اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال یک نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱. تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی دانه گرده رقم سبری و ژنوتیپ A95 طی ۱۲ ماه نگهداری در دماهای مختلف

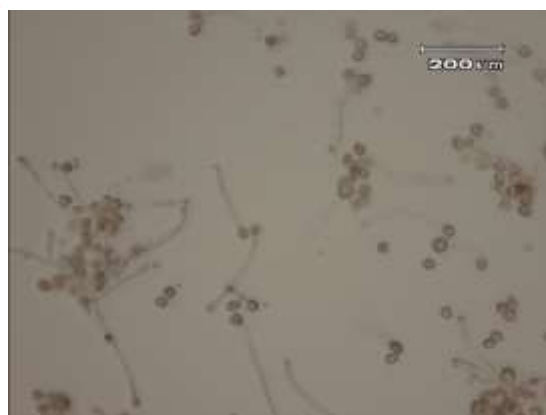
میانگین مربعات (MS)		
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی
رقم	۱	۶/۴۲**
زمان	۳	۱/۳۰**
دما	۳	۱/۱۸**
رقم × زمان	۳	۰/۸۳**
رقم × دما	۳	۰/۷۱**
زمان × دما	۹	۰/۱۶**
رقم × زمان × دما	۹	۰/۱۰**
خطا	۶۴	۰/۰۰۷
ضریب تغییرات (%)		۲۸/۱۵

*, ** و NS به ترتیب تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد و غیر معنی‌دار



شکل ۱. مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی دانه‌های گرده رقم سبری و ژنوتیپ A95
A: کشت سه ماهه، B: کشت شش ماهه، C: کشت نه ماهه و D: کشت ۱۲ ماه پس از نگهداری در دماهای ذکر شده

مطابق با شکل ۱، واکنش جوانه‌زنی رقم سبری و ژنوتیپ A95 مورد مطالعه گلابی اروپایی در پاسخ به دماها و زمان‌های مختلف به طور یکسان نبوده است. در مقایسه میانگین‌های انجام شده، بیشترین میزان جوانه‌زنی دانه‌های گرده در ژنوتیپ A95 مشاهده شد که مربوط به نگهداری در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد پس از ۳ ماه نگهداری ($21/2\%$ درصد) بود. نتایج حاصل از این آزمون نشان‌دهنده آن است که دانه‌های گرده رقم سبری و ژنوتیپ A95 در تیمارهای دمایی متفاوت دارای زیوایی کمی بودند و با گذشت زمان نگهداری، به طور قابل توجهی از زیوایی آن‌ها کاسته شد. همچنین، شکل ۲ تصویر میکروسکوپی جوانه‌زنی دانه‌های گرده و رشد لوله‌های گرده را در آزمایشگاه، ۲۴ ساعت پس از کشت در پتری دیش نشان می‌دهد. این نتایج می‌تواند به درک بهتر از عوامل مؤثر بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌های گرده در این ارقام کمک کند.



شکل ۲. نمونه‌ای از تصویر میکروسکوپی جوانه‌زنی دانه‌های گرده در زمان‌ها و دماهای متفاوت، ۲۴ ساعت پس از کشت در آزمایشگاه

نتایج بررسی مورفولوژی سطح دانه گرده

نتایج تجزیه واریانس ارائه شده در جدول ۲ نشان دهنده این است که بین پارامترهای طول محور قطبی ($0/16$ میکرومتر)، پهنای استوایی ($0/09$ میکرومتر)، طول شیار ($9/50$ میکرومتر)، عرض برآمدگی ($5/53$ میکرومتر) و نسبت P/E ($0/03$ میکرومتر) رقم سبری و ژنوتیپ A95 هیچ ارتباط معنی داری وجود ندارد. این یافته‌ها می‌توانند حاکی از عدم تأثیر قابل توجه این ویژگی‌ها بر تفاوت‌های موجود در جوانه‌زنی و عملکرد این دو ژنوتیپ باشند.

جدول ۲. تجزیه واریانس برخی خصوصیات گرده در رقم سبری و ژنوتیپ A95

منبع تغییرات	درجه آزادی	محور قطبی (μm)	پهنای استوایی (μm)	طول شیار (μm)	عرض برآمدگی (μm)	P/E
رقم	۱	$0/16^{ns}$	$0/09^{ns}$	$9/50^{ns}$	$5/53^{ns}$	$0/03^{ns}$
خطا	۸	$7/56$	$2/63$	$6/40$	$8/11$	$0/02$
ضریب تغییرات	—	$7/28$	$7/14$	$8/13$	$20/38$	$10/03$

ns و ** و * به ترتیب تفاوت معنی داری در سطح احتمال پنج و یک درصد و غیر معنی دار

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی دانه‌های گرده رقم سبری و ژنوتیپ A95 گلایی اروپایی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که بیشترین طول محور قطبی (P) و پهنای استوایی (E) (به ترتیب $39/51 \pm 1/11$ و $23/12 \pm 0/65$ میکرومتر) مربوط به دانه‌های گرده ژنوتیپ A95 بوده است. همچنین بیشترین نسبت P/E نیز در گرده ژنوتیپ A95 ($1/72$ میکرومتر) مشاهده گردید. علاوه بر این، بیشترین طول شیار و عرض برآمدگی (به ترتیب $33/51 \pm 1/10$ و $15/47 \pm 1/13$ میکرومتر) نیز در دانه‌های گرده ژنوتیپ A95 اندازه‌گیری شد. بررسی‌ها نشان داد که دانه‌های گرده مطالعه شده دارای ۳ شیار طولی در سطح خود هستند که امتداد آن‌ها تا محور قطبی قابل اندازه‌گیری می‌باشد (جدول ۳). این دانه‌ها از نظر اندازه نیز متفاوت بوده و اندازه دانه‌های گرده در محدوده $35/31 - 39/51$ میکرومتر متغیر است بوده، به‌طوریکه بزرگ‌ترین اندازه متعلق به گرده ژنوتیپ A95 با مقدار $39/51 \pm 1/11$ میکرومتر است. این یافته‌ها نشان‌دهنده تنوع مورفولوژیکی و ویژگی‌های خاص این ژنوتیپ در مقایسه با رقم سبری می‌باشند.

جدول ۳. میانگین (SE) ابعاد، ویژگی‌ها و تعیین شکل* دانه گرده رقم سبری و ژنوتیپ A95 حاصل از مطالعات SEM

شکل	P/E	عرض برآمدگی (μm)	طول شیار (μm)	پهنای استوایی (μm)	طول محور قطبی (μm)	رقم / ژنوتیپ
Prolate	$1/59a$	$11/88 \pm 0/74a$	$27/76 \pm 0/53b$	$22/18 \pm 0/48a$	$25/31 \pm 0/97b$	SB
Prolate	$1/72a$	$15/47 \pm 1/13a$	$33/51 \pm 1/10a$	$23/12 \pm 0/65a$	$39/51 \pm 1/11a$	A95

*تعیین شکل گرده بر اساس تقسیم‌بندی ارتمن

بحث

با توجه به نتایج نگهداری دانه گرده، می‌توان ادعا کرد که انتخاب شرایط مناسب نگهداری و کشت دانه‌های گرده برای این رقم و ژنوتیپ می‌تواند به بهبود جوانه‌زنی و رشد گیاه کمک کند. این نتایج نشان می‌دهد که تفاوت‌های ژنتیکی بین رقم و ژنوتیپ ممکن است تأثیر مهمی بر جوانه‌زنی دانه گرده داشته باشد. وجود تفاوت‌های ژنتیکی بین رقم و ژنوتیپ می‌تواند در حساسیت به دما و زمان نگهداری باشد. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از وجود اختلاف‌هایی در ژنوم این رقم و ژنوتیپ باشد که تأثیر مستقیم بر فرایند جوانه‌زنی دانه گرده دارند. همچنین، این تحقیق می‌تواند به درک بهتر از تفاوت‌های ژنتیکی و زیوایی میان رقم و ژنوتیپ و ارتباط آن‌ها با عملکرد کمک کند. این نتایج نشان می‌دهد که دانه‌های گرده این ژنوتیپ ممکن است به زیوایی در دماهای مختلف حساس‌تر باشند و این حساسیت با گذشت زمان کاهش می‌یابد. با توجه به این نتایج، ممکن است این اطلاعات برای انتخاب بهترین شرایط نگهداری و کشت دانه‌های گرده برای بهبود جوانه‌زنی و رشد گیاهان مفید باشند.

دما یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر قوه نامیه دانه‌های گرده است. در بسیاری از گونه‌های گیاهی، دانه‌های گرده به سرعت قوه نامیه خود را در دمای اتاق از دست می‌دهند (Borghezan et al., 2011; Cruz et al., 2008). برای نگهداری موقت گرده به مدت کوتاه (ساعت‌ها یا چند روز) بیشتر گونه‌ها به نگهداری در یخچال در دمایی بین صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد نیاز دارند (Visser, 1995). ذخیره‌سازی طولانی مدت گرده معمولاً به دماهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد نیاز دارد که در برخی موارد با رطوبت نسبی پایین همراه است (Shivanna and Johri, 1985). با این حال، دماهای بالاتر از صفر درجه سانتی‌گراد معمولاً اجازه نمی‌دهد دانه‌های گرده به مدت بیش از چند ماه زنده بمانند (Pinillos and Cuevas, 2008).

ذخیره‌سازی در دماهای بین ۱۰- تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد، زنده ماندن گرده را به مدت سال‌ها افزایش می‌دهد (Hanna and Towill, 1995). در گلابی و سیب، کنترل رطوبت در دماهای کمتر از صفر درجه سانتی‌گراد مزیتی برای حفاظت از گرده ایجاد نمی‌کند (Pinillos and Cuevas, 2008). به نظر می‌رسد که دلیل اصلی از دست دادن قابلیت زنده ماندن گرده، در رقم سبری و ژنوتیپ A95، کمبود متابولیت‌ها به علت ادامه فعالیت دانه‌های گرده در شرایط انبارداری باشد. کاهش دما و رطوبت می‌تواند متابولیسم را کند کرده و در نتیجه طول عمر زنده ماندن گرده را افزایش دهد (Shivanna and Johri, 1985).

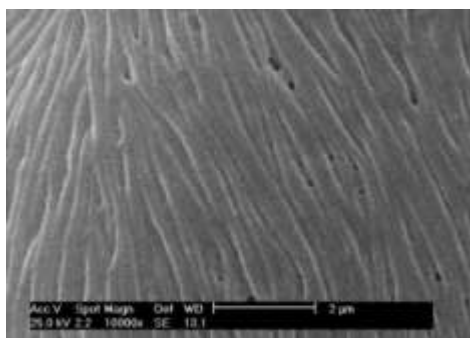
به‌طور کلی، در پژوهش حاضر مشاهده شد که میزان جوانه‌زنی دانه‌های گرده از دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد افزایش یافت، اما در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد، نسبت به ۲۰- درجه سانتی‌گراد کاهش زنده ماندن و جوانه‌زنی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای اتفاق افتاد. از دست رفتن قوه نامیه گرده‌های نگهداری شده در دمای محیط به دلیل کاهش سریع آب در آنها است. با کاهش آب درونی گرده‌ها، فرآیندهای متابولیکی متوقف شده و تنفس به طرز قابل توجهی کاهش می‌یابد. همچنین، خشک شدن پروتئین‌ها فعالیت آنزیمی را کاهش می‌دهد (Linskes, 1964). فقدان قوه نامیه همچنین می‌تواند به تغییرات هم‌زمان در ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، سرعت تنفس و فعالیت هورمون‌های درونی نسبت داده شود. افزایش طول عمر دانه گرده در دماهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد به کاهش سرعت تنفس و عدم مصرف سریع اندوخته غذایی مرتبط است. خشک شدن همچنین باعث تغییرات ساختاری شدید در غشاءهای دانه گرده شده و نفوذپذیری پلاسما را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ahmadi et al., 2001).

کاهش تدریجی جوانه‌زنی در دماهای پایین (۲۰- و ۸۰- درجه سانتی‌گراد) که در این مطالعه مشاهده شد، ممکن است به انجماد و ذوب مکرر دانه‌های گرده نسبت داده شود. علاوه بر این، دمای پایین می‌تواند منجر به تشکیل یخ درون سلولی، مرگ سلولی و در نتیجه از بین رفتن جوانه‌زنی شوند. نتایج تحقیق بات و همکاران (Bhat et al., 2012) در زمینه زنده ماندن گرده و قابلیت جوانه‌زنی در سه رقم گل‌ابی با یافته‌های این مطالعه هم‌خوانی دارد.

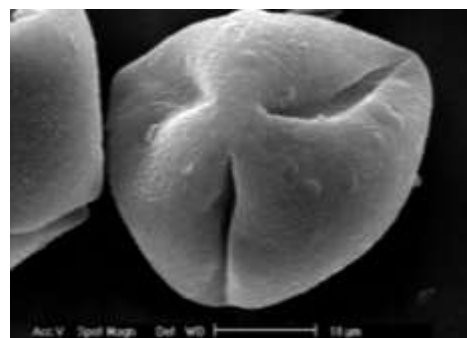
به‌طور خاص این مطالعه تأکید می‌کند که دانه‌های گرده گل‌ابی می‌توانند در دماهای پایین قوه نامه خود را حفظ کرده و با فراهم شدن شرایط دمایی مناسب، جوانه بزنند. دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌عنوان بهینه‌ترین دما و دانه گرده ژنوتیپ A95 به‌عنوان ماندگارترین دانه گرده طی یک سال نگهداری معرفی شده است، اگرچه قرار دادن دانه‌های گرده در دماهای بالاتر، تا حدود ۴ درجه سانتی‌گراد، نیز می‌تواند قوه نامیه آنها را حفظ کند، اما نگهداری در دمای محیط به‌طور قابل توجهی باعث کاهش زنده‌مانی و جوانه‌زنی دانه گرده‌ها می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که گرده‌های جمع‌آوری شده و ذخیره شده در دماهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد، برای مدت زمان طولانی نمی‌توانند بدون از دست دادن زنده‌مانی و جوانه‌زنی نگهداری شوند.

شکل و اندازه دانه‌های گرده در طبقه‌بندی گیاه‌شناسی دارای اهمیت ویژه‌ای هستند (Smitha et al., 2018). ویژگی‌های پالینولوژیکی در بسیاری از گیاهان به شدت حفظ می‌شوند، به همین دلیل این ویژگی‌ها اغلب برای طبقه‌بندی تاکسونومی گیاهان استفاده می‌شوند (Doğan and Baysal, 2019). نتایج این تحقیق با یافته‌های پژوهشگران دیگر درباره بررسی مورفولوژی دانه گرده گل‌ابی (Ghazaeian et al., 2007)، مورفولوژی دانه گرده ۱۱ رقم زردآلوی ایرانی (Arzani et al., 2005) و مورفولوژی دانه گرده ۱۴ رقم انار (Varasteh and Arzani, 2009) هم‌راستا است. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که دانه‌های گرده مطالعه شده تک‌تایی، جورق‌طب و دارای تقارن شعاعی هستند و هر یک دارای ۳ شیار طولی بر سطح خود می‌باشند (شکل ۳) که نشان دهنده ویژگی‌های خاصی از این دانه‌ها می‌باشد. در این پژوهش دانه‌های گرده ژنوتیپ A95 گل‌ابی اروپایی در مقایسه با رقم سبری، اندازه بزرگتری دارند. از نظر شکل، دانه‌های گرده در طبقه prolate قرار می‌گیرند، یعنی طول دانه گرده بیشتر از قطر آن است. این ویژگی‌ها ممکن است تأثیر چشمگیری بر خصوصیات باردهی، انتقال ژن‌ها و کیفیت محصولات داشته باشند (شکل ۴). گرده‌های مطالعه شده فاقد روزنه و منفذ بر سطح شیارها هستند، اما در سطح اگزین روزنه‌هایی دیده می‌شود (شکل ۳) که این ممکن است نقش مؤثری در تعامل گرده‌ای این گیاهان ایفا کند. با توجه به این داده‌ها، می‌توان به درک بهتری از ویژگی‌های منحصر به فرد رقم و ژنوتیپ دست یافت که می‌تواند به افزایش بهره‌وری و کیفیت محصول گل‌ابی منجر شود. این اطلاعات می‌تواند به انتخاب و توسعه ژنوتیپ‌های برتر و پربارتر در عرصه باغبانی کمک کند.

از نظر تزئینات سطح اگزین دانه‌های گرده مطالعه شده را می‌توان در گروه نامنظم قرار داد. تزئینات اگزین به‌صورت طولی با مقداری چرخش و چروک بودند (شکل ۴). تفاوت‌های نسبتاً قابل توجهی در اندازه طول شیار، عرض برآمدگی و طول محور قطبی وجود دارد که این ویژگی‌های گرده‌شناسی می‌تواند در رده‌بندی سطوح تاکسونومی مفید واقع شود. تفاوت‌های مشاهده شده در این ویژگی‌ها بین ژنوتیپ و رقم تصادفی بوده و نمی‌توان آن‌ها را به وجود تأثیر معنی‌داری از سوی ژنوتیپ A95 نسبت داد. این ویژگی‌ها احتمالاً تحت تأثیر دیگر عوامل نظیر شرایط محیطی، تغذیه و یا عوامل جغرافیایی قرار دارند و نه به دلیل تفاوت ژنتیکی بین دو ژنوتیپ. این اطلاعات همچنین می‌تواند به محققان و کشاورزان کمک کند تا بهترین رقم‌ها و ژنوتیپ‌ها را برای اهداف خاص خود انتخاب کنند و منابع خود را بهینه‌سازی نمایند.

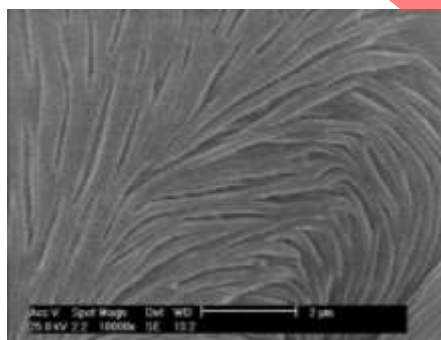


روزنه‌های مشاهده‌شده سطح اگزین ژنوتیپ A95 گلابی اروپایی (۱۰۰۰X)



شیارهای طولی در سطح گرده رقم سبری گلابی اروپایی (۲۰۰X)

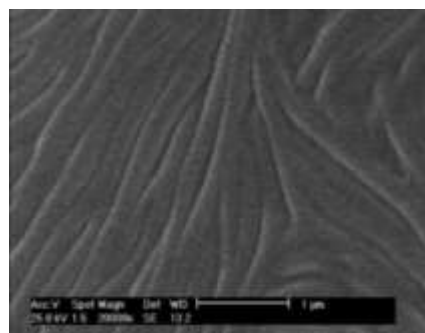
شکل ۳. شیار و روزنه‌های سطح دانه گرده



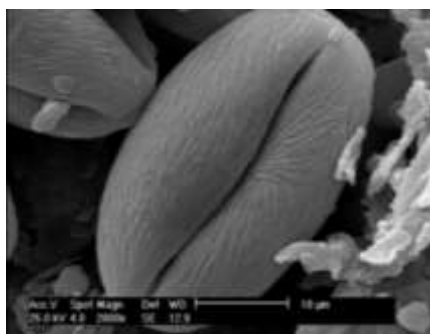
شکل ۴. تزئینات سطح اگزین. تزئینات سطح اگزین در ژنوتیپ A95 مشاهده شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با بزرگنمایی ۱۰۰۰X



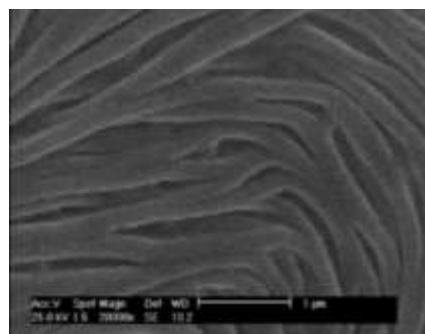
دانه گرده رقم سبری (بزرگنمایی ۲۰۰X)



الگوی اگزین رقم سبری (بزرگنمایی ۲۰۰۰X)



دانه گرده ژنوتیپ A95 (بزرگنمایی ۲۰۰۰x)



الگوی اگزین ژنوتیپ A95 (بزرگنمایی ۲۰۰۰۰x)

شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) دانه گرده

نتیجه گیری

از مجموع نتایج حاصل از تحقیق حاضر، می توان نتیجه گیری کرد که دانه های گرده گلابی به طور مؤثری می توانند در دماهای پایین قوه نامیه خود را حفظ کنند و با فراهم شدن شرایط دمایی مناسب، امکان جوانه زنی آنها وجود دارد. به طور خاص، دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به عنوان بهترین دما برای نگهداری دانه های گرده معرفی شده و گرده ژنوتیپ A95 به عنوان ماندگارترین نمونه در طول یک سال نگهداری شناسایی گردید. همچنین، نگهداری دانه های گرده در دماهای بالاتر تا حدود ۴ درجه سانتی گراد نیز می تواند قوه نامیه آنها را حفظ کند؛ درحالی که نگهداری در دمای محیط سبب کاهش سریع قوه نامیه دانه گرده ها شد. دانه های گرده ای که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند، همگی تک تایی، جور قطب و دارای تقارن شعاعی بودند و همچنین دارای ۳ شیار طولی در سطح خود بودند. این دانه ها جزو گرده های tricolporate و بدون روزنه روی سطح شیارها بودند. تفاوت های نسبتاً قابل توجهی در اندازه طول شیار، عرض برآمدگی و طول محور قطبی وجود داشت. این صفات نه تنها دارای ارزش تاکسونومی هستند، بلکه می توانند در طبقه بندی و رده بندی دانه های گرده نیز مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

از مساعدت و حمایت آزمایشگاه درختان میوه (پومولوژی) گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس جهت فراهم آوردن امکانات مالی و اجرایی این پژوهش تشکر و قدردانی می شود.

منابع

- پورادیب، محمد کمال. روحی، وحید. هوشمند، سعدالله. محمدخانی، عبدالرحمان و زرگری، حمید. (۱۳۹۵). اثر دما و مدت زمان نگهداری بر قوه نامیه دانه گرده ارقام مختلف خرما. *مجله به زراعی کشاورزی*، ۱۸ (۲)، ۴۹۵-۵۰۶. <https://doi.org/10.22059/jci.2016.56584>
- تقی گذری، الهه و ارزانی، کاظم. (۱۳۹۵). چگونگی گلدهی در ژنوتیپ امید بخش A95 در مقایسه با برخی از ارقام گلابی آسیایی *Pyrus serotina* Rehd. و *Pyrus communis* L. *سومین کنفرانس بین المللی یافته های نوین در علوم کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست*. <https://civilica.com/doc/610640>

سیار، مهیار. (۱۳۹۳). ریخت‌شناسی دانه‌های گرده جنس کلپوره (*Teucrium* L.) از زیر تیره Npetoideae متعلق به خانواده نعنائیان (Lamiaceae) در استان اردبیل. *پایان‌نامه کارشناسی ارشد*. به راهنمایی غلامرضا بخشی خانیکی. تهران: دانشگاه پیام نور، دانشکده زیست‌شناسی.

شیخی، عبدالطیف. ارزانی، کاظم و کوشش صبا، محمود. (۱۳۹۵). تعیین خود و دگر (نا) سازگاری برخی از ارقام گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) و گلابی های اروپایی (*Pyrus communis* L.) بومی ایران. *مجله به نژادی نهال و بذر*، ۳۲ (۳)، ۳۸۳-۴۰۰.
<https://doi.org/10.22092/spij.2016.113065>

عابدی ق شلاقی، ابراهیم. جوادی مجدد، داوود و فرزاد، ابراهیم. (۱۳۹۸). اثرات دما و مدت نگهداری بر قوه نامیه دانه‌گرده کیوی فروت. *نشریه علمی یافته های تحقیقاتی در گیاهان زراعی و باغی*. ۸(۱)، ۲۵-۳۶.
<https://doi.org/10.22092/RAFHC.2019.116314.1103>

REFERENCES

- Ahmadi, N., Arani, K., and Moeini, A. (2001). Study of pollen storage, germination, and pollen tube growth in some citrus cultivars. *Seed Plant Journal*, 17(2), 216–229.
- Ahmed, S., Rattanpal, H. S., Ahmad, E., and Singh, G. (2017). Influence of Storage Duration and Storage Temperature on In-Vitro Pollen Germination of Citrus Species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 892–902. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.099>
- Arzani K. (2014). Fruit tree physiology and breeding programs research using microscopic technology. Chapter 39 In book: *International Multidisciplinary Microscopy Congress: Springer Proceedings in Physics* Volume 154. Editors: Efstathios K. Polychroniadis, Ahmet Yavuz Oral, Mehmet Ozer, Pub. By Springer International Publishing Switzerland, pp.275-281.
- Arzani, K. (2020). The onset of controlled hybridization, pollination studies, and the history of pollinizer application in the commercial fruit tree orchards in Iran. *Acta Horti*, 1297, 137-144. DOI: 10.17660/ActaHort.2020.1297.19
<https://doi.org/10.17660/ActaHort.2020.1297.19>
- Arzani, K., Nejatian, M. A., and Karimzadeh, G. (2005). Apricot (*Prunus armeniaca*) pollen morphological characterization through scanning electron microscopy, using multivariate analysis. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 33(4), 381–388.
- Baraket, G., Abdallah, D., Boukhalfa, Y., Mustapha, S. B., and Salhi-Hannachi, A. (2021). Analysis of genetic diversity and water-stress tolerance in Tunisian plums (*Prunus* spp; Rosacea). *Scientia Horticulturae*, 285(2), 110141. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110141>
- Bhat, Z. A., Dhillon, W. S., Shafi, R. H. S., Rather, J. A., Mir, A. H., Shafi, W., Rashid, R., Bhat, J. A., Rather, T. R. and Wani, T. A. (2012). Influence of storage temperature on viability and in vitro germination capacity of pear (*Pyrus* spp.) pollen. *Indian Journal of Agricultural Science*, 4 (11), 128-137.
- Borghazan, M., Clauman, A. D., Steinmacher, D. A., Guerra, M. P. and Orth, A. I. (2011). In vitro viability and preservation of pollen grain of kiwi (*Actinidia chinensis* var. Deliciosa (A. Chev.) A. Chev.). *Journal of Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11: 338-344. 11.
- Calic, D., Devrnja, N., Kostic, I., and Kostic, M. (2013). Pollen morphology, viability, and germination of *Prunus domestica* cv. Pozegaca. *Scientia Horticulturae*, 155 (1), 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.03.017>
- Ćalić, D., Milojević, J., Belić, M., Miletić, R., and Zdravković-Korać, S. (2021). Impact of storage temperature on pollen viability and germinability of four Serbian autochthon apple cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 12(4), 709231. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.709231>
- Cruz, T. V., Souza, M. M., Roza, F. A., Viana, A. J. C., Belo, G. O. and Fonseca, J. W. S. (2008). Germinação in vitro de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. *Revista Brasileira Fruticultura*, 30: 875-879.
- Dar, J. A., Wani, A. A., and Dhar, M. K. (2019). Preliminary pollen analysis of some apple cultivars in Kashmir: Towards understanding the apple pollen morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90 (2), 431-438. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i2.17346>
- Doğan C, Baysal E. (2019). Pollen morphology of the coastal species of Turkish Limonium (Plumbaginaceae). *Phytotaxa*, 388(3): 212-228.

- Dorđević, M., Vujović, T., Cerović, R., Glišić, I., Milošević, N., Marić, S., Radičević, S., Fotirić Akšić, M., and Meland, M. (2022). In Vitro and In Vivo Performance of Plum (*Prunus domestica* L.) Pollen from the Anthers Stored at Distinct Temperatures for Different Periods. *Horticulturae*, 8(7), 616–616. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070616>
- Dutta, S. K., Srivastav, M., Chaudhary, R., Lal, K., Patil, P., Singh, S. K., and Singh, A. K. (2013). Low temperature storage of mango (*Mangifera inidica* L.) pollen. *Scientia Horticulturae*, 161, 193–197.
- Ghazaeian, M., Arzani, K., and Moieni, A. (2007). Study on pollen of some Asian pear genotypes by scanning electron microscopy (SEM) and suitable pollen germination medium. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 8(2), 113-124. <https://sid.ir/paper/80947/en>
- Hanna, W., and L.E. Towill. (1995). Long-term pollen storage. *Journal of Plant Breed. Rev.*, 13:179–207.
- Ikram, S., Jaskani, M. J., Ikram, S., Qureshi, M. A., Rehman, S. U., Hussain, M., Shafqat, W., Din, S. U., Zafar, M. H., Raza, S., and Bukhari, S. I. U. S. (2022). Effectiveness of pollen germination media for improving storage potential in pomegranate (*Punica granatum*) germplasm. *Journal of Plant and Environment*, 4(2), 155-161. <https://doi.org/10.33687/jpe.004.02.3896>
- Javady, T., and Arzani, K. (2001). Pollen morphology of five Iranian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 3(1), 37–42.
- Kaufmane, E., and Rumpunen, K. (2002). Pollination, pollen tube growth and fertilization in *Chaenomeles japonica* (Japanese quince). *Scientia Horticulturae*, 94(3-4), 257-271.
- Khaleghi, E., Karamnezhad, F., and Moallemi, N. (2019). Study of pollen morphology and salinity effect on the pollen grains of four olive (*Olea europaea*) cultivars. *South African Journal of Botany*, 127 (11), 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.031>
- Khush-khui M, Bassiri A and Niknejad M. (1976). Effect of temperature and humidity on pollen viability of six rose species. *Canadian Journal of Plant Science*, 56(3), 517-523.
- Linskens, H. (1964). Pollen physiology. *Journal of Annual Review of Plant Physiology*, 15(1): 255-270.
- Machado, C. D. A., Moura, C. R. F., Lemos, E. E. P. D., Ramos, S. R. R., Ribeiro, F. E., and Léo, A. D. S. (2014). Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. *Acta Scientiarum. Agron*, 36(2), 227–232.
- Marasali, B., Pinar, M., and Buyukkartal, H. N. (2005). Palynological study on the pollen grains of selected Turkish grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29(1), 75–81.
- Marcucci, M.C., Sansavini, S., Ciampolini, F., and Cresti, M. (1984). Distinguishing apple clones and cultivars by surface morphology and pollen physiology. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109(1), 10–19. <https://doi.org/10.21273/jashs.109.1.10>
- Martínez-Gómez, P., Gradziel, T. M., Ortega, E., and Dicenta, F. (2002). Low temperature storage of almond pollen. *Horticultural Science*, 37(4), 691–692. <https://doi.org/10.21273/hortsci.37.4.691>
- Maryam, A., Jaskani, M. J., and Naqvi, S. A. (2017). Storage and viability assessment of date palm pollen. *Date Palm Biotechnology Protocols Volume II: Germplasm Conservation and Molecular Breeding*, 3–13.
- Milatović, D., and Nikolić, D. (2016). Morphological characteristics and germination of pollen in European and Japanese plum cultivars. In *XI International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology*, 1260 (pp. 105-112). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2022.1352.44>
- Mortazavi, S.M.H., Torahi, A., and Beremeh, L. (2011). A study on the pollen morphology of Khuzestan male date varieties by scanning electron microscopy (SEM). *Plant Productions*, 33(2), 97-109.
- Najafzadeh, R., and Arzani, K. (2015). Superior growth characteristics, yield, and fruit quality in promising European pear (*Pyrus communis* L.) chance seedlings in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(2), 427-442.
- Novara, C., Ascari, L., LaMorgia, V., Reale, L., Genre, A., and Siniscalco, C. (2017). Viability and germinability in long term storage of *Corylus avellana* pollen. *Scientia Horticulturae*, 214(5), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.042>
- Özcan, A. (2020). Effect of low-temperature storage on sweet cherry (*Prunus avium* L.) pollen quality. *Hort Science*, 55(2), 258-260. <https://doi.org/10.21273/hortsci14660-19>

- Pinillos, V. and Cuevas, J. (2008). Artificial pollination in tree crop production. *Horticultural reviews*.
- POPA, V. I., BĂDULESCU, L., IORDĂCHESCU, M., and UDRIȘTE, A. A. (2022). Preliminary pollen grain characterization of several apple and plum varieties. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca: Horticulture*, 79(1), 33-40. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:2021.0020>
- RADOVIĆ, A., NIKOLIĆ, D., MILATOVIĆ, D., ĐUROVIĆ, D., and TRAJKOVIĆ, J. (2016). Investigation of pollen morphological characteristics in some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars. *TURKISH JOURNAL of AGRICULTURE and FORESTRY*, 40(95), 441–449. <https://doi.org/10.3906/tar-1511-76>
- Rakonjac, V., Nikolić, D., Čolić, S., Glišić, I., Đorđević, M., Popovska, M., and Radičević, S. (2024). Investigation of pollen morphology and viability of sweet and sour cherry genotypes by multivariate analysis. *Microscopy Research and Technique*, 44(58). <https://doi.org/10.1002/jemt.24674>
- Şenbaş, A., Horzum, Ö., Gencer, C. D., and Özkaya, M. T. (2022). Storage and In-vitro Germination of Some Olive Pollens. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 32(4), 843–852. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.1188414>
- Shim, K. K., Suh, B. K., and Park, S. H. (1988). A palynotaxonomic study of *Pyrus* species. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 29, 102–108.
- Shivanna, K.R., and B.M. Johri. (1985). Viability and storage. In *The Angiosperm pollen structure and function*. Wiley Eastern Ltd., New Delhi. pp. 84–117.
- Smitha, K., Paton, A., and Sunojkumar, P. (2018). Re-establishment of *Plectranthus bishopianus* (Lamiaceae) based on morphological and micromorphological data. *Plant Systematics and Evolution*, 304: 807-816.
- Varasteh, F. and Arzani, K. (2009). Classification of some Iranian pomegranate (*Punica granatum*) cultivars by pollen morphology using scanning electron microscopy. *Journal of Horticulture Environment and Biotechnology*, 50(1), 24-30.
- Visser, T. (1955). Germination and storage of pollen. *Medelingen van de Landbouwhoogeschoolte, Wageningen, the Netherlands*.
- Wang Y. and Arzani K. (2019). European pear in sergio tonetto de feritas and sunil pareek (eds.) *Postharvest Physiological Disorders in Fruits and Vegetables. 1st Edition*. CRC Press, Taylor and Francis Group, London, United Kingdom and New York, USA, pp. 305-328.

Extended Abstract

Introduction

Pollen grains, as units of sexual reproduction and carriers of genetic material, play a crucial role in breeding programs and the successful fruit formation of plants. Studying the characteristics of pollen, such as germination percentage and pollen tube growth, is essential for evaluating their viability and longevity in horticultural research. The specific traits of pollen are significant for identifying the type of parent plant and establishing its position in plant systematics. Investigating the pollen characteristics of specific genotypes and species is vital for breeding programs. In pear breeding, selecting superior genotypes from random seedlings has always been of particular importance. The promising genotype A95 (a chance selected seedling from the Asian pear collection orchard with the 'Dargazi' European pear seedling rootstock in the Department of Horticultural Science at Tarbiat Modares University) has attracted attention due to its desirable aroma, flavor, and good fruit appearance. In this context, this study aims to examine the morphological characteristics and evaluate the qualitative response of the pollen grains of two European pears including 'Sebri' and A95 promising genotype to different storage temperatures (laboratory room temperature, -4, -20, and -80 degrees Celsius) for long-term storage.

Materials and Methods

This research was conducted in the pear research orchard in the Department of Horticultural Science at Tarbiat Modares University (TMU), in Tehran, Iran during the 2021 growing season. At the beginning of the blooming of the 'Sebri' cultivar and the A95 promising genotype, several branches with sufficient and suitable flower buds were selected and labeled for flower and pollen sampling. To prevent unwanted pollen contamination, the selected branches were covered

with cotton bags before the anthesis. After anthesis, flower samples were collected from the tagged shoots, and transferred to the Pomology Lab. Department of Horticultural Science at TMU. The anthers were allowed to dry for 24 hours on filter paper inside petri dishes under the ambient environment, then pollen grains were collected, and placed in small glass vials. The vials were tightly sealed with parafilm to prevent moisture and any contaminations. The pollen grains were stored under four different temperatures (laboratory environment, 4°C, -20°C, and -80°C) for four time periods (3, 6, 9, and 12 months storage), examined for pollen viability and germination test. At the specified time intervals, the pollen grains were cultured in the small glass Petri dishes on a suitable medium containing sucrose (15%), boric acid (20 ppm), calcium nitrate (1.219 mM), and agar (0.8%). The germination percentage of the pollen grains was examined under a research microscope, and the germinated percentage was recorded. Note that, for recording the germination percentage, five separate areas were selected on each petri dish, and germinated viable pollen was recorded as a percentage. A pollen grain was considered germinated when its pollen tube reached a length equal to or greater than its diameter. For the descriptive examination of pollen grains, the scanning electron microscope (SEM, Philips XL30) was used. The pollen grains were collected from dried anthers and stored in a desiccator for further examination using SEM. The pollen samples were placed on a slide and transferred onto special adhesive tape for the SEM analysis. The surfaces of the disks were coated with gold using a sputter coater for better conductivity. The samples were examined using SEM at magnifications of 500 to 20,000 times. The polar axis (P), equatorial axis (E), ratio of polar to equatorial axis (P/E), distance between two grooves, and width of projections on the pollen grains were measured using the Microstructure Measurement software.

Results and Discussion

The germination response of the 'Sebri' cultivar and the A95 promising genotype of European pear to different temperatures and storage periods was different. Results indicated the highest pollen germination rate in the A95 promising genotype at -20°C after 3 months of storage (21.2%). Besides, the germination test results show that both the 'Sebri' cultivar and the A95 promising genotype had low viability under different temperature treatments, and their viability decreased significantly over the storage period. The results from the morphological examination of the pollen grains of the 'Sebri' cultivar and the A95 promising genotype of European pear using Scanning Electron Microscopy (SEM) showed that the highest polar axis (P) and equatorial width (E) (1.11 ± 39.51 and 0.65 ± 23.12 micrometers, respectively) were attributed to the A95 promising genotype pollen grains. Additionally, the highest P/E ratio (1.72 micrometers) was also observed in the pollen of the A95 promising genotype. Furthermore, the longest furrow and the widest projection (1.10 ± 33.51 and 1.13 ± 15.47 micrometers, respectively) were measured in the pollen grains of the A95 promising genotype. The studies revealed that the examined pollen grains had three longitudinal grooves on their surface, which extended to the polar axis and could be measured. These grains also varied in size, with pollen grain sizes ranging from 35.31 to 39.51 micrometers, with the largest size belonging to the A95 promising genotype with 39.51 ± 1.11 micrometers.

Conclusion

In the present research, results showed -20°C is the optimum temperature for pollen storage for the A95 promising genotype, so after 1 year of storage at this temperature suitable viable pollen was recorded. Although, the ambient temperature storage, dramatically reduced pollen viability over the storage tie period. In terms of the descriptive pollen analysis using SEM, the studied pollen grains are all single, polar type, and have radial symmetry, they also have three longitudinal grooves on their surface. All studied pollen grains show tricolporate type.