تعیین دمای بهینه جوانه‌زنی و نگهداری دانه گرده ژنوتیپ کاشان گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

سیده سمانه حسینی [۱]، نوراله احمدی [۲*]، عباس یداللهی [۳]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس. ۲ و ۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

* نویسنده مسئول

چکیده

این آزمایش به منظور تعیین دمای بهینه جوانه‌زنی و نگهداری دانه گرده ژنوتیپ کاشان گل محمدی صورت گرفت. ارزیابی جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله گرده نشان داد که دانه‌های گرده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بیشترین و در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد کمترین درصد جوانه‌زنی را دارا بودند. همچنین بیشترین طول لوله گرده در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد بدست آمد. نتایج بدست آمده از آزمایشات مربوط به دماهای نگهداری دانه گرده نیز نشان داد که نگهداری دانه گرده ژنوتیپ کاشان در دمای پائین (۸۰- درجه سانتی-گراد) سبب دستیابی به بیشترین درصد جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله گرده می‌گردد.

کلمات کلیدی: دانه گرده، درون شیشه‌ای، ژنوتیپ گل محمدی، شرایط جوانه‌زنی، طول لوله گرده، نگهداری دانه گرده.

مقدمه

دانه‌های گرده، سلول‌های گیاهی با ساختاری ساده هستند و فرآیند تشکیل لوله گرده یک مثال ساده از رشد و نمو است (Dane *et al.*, 2004). در برنامه‌های بهنژادی، جوانه‌زنی موفق دانه گرده و رشد لوله گرده در طول خامه از ضروریات لقاح تخمک می‌باشند که نهایتاً سبب تشکیل بذر می‌گردند (Lord, 2000). جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله گرده به فاکتورهایی از قبیل ترکیب محیط کشت جوانه-زنی، ژنوتیپ، دما و رطوبت و شرایط تغذیه‌ای گونه‌ها و واریته‌ها، زمان جمع‌آوری دانه گرده، مراحل نمو گل در زمان جمع‌آوری دانه گرده و تکنیک‌های خشک کردن و نگهداری دانه گرده بستگی دارد (Ahmadi *et al.*, 2001) در تعداد زیادی از گونه ها، انجام مطالعات برون شیشه‌ای (*in vivo*) کارآیی دانه گرده مشکل است. بنابراین اغلب تکنیک‌های دیگر از قبیل رنگ‌آمیزی دانه گرده و جوانه‌زنی درون شیشه‌ای آن و رشد لوله گرده، برای ارزیابی قوه‌ی نامیه دانه گرده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Moutinho *et al.*, 2001).

دما اثرات مجزایی بر جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله گرده دارد. بازدارندگی جوانه‌زنی دانه گرده در دماهای بالا (۳۵ درجه سانتی-گراد) و تنزل اندک در ۱۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (Sukhvibul *et al.*, 2000). در گل سرخ دماهای بالا باعث افزایش و دماهای پایین سبب کاهش جوانه‌زنی و رشد دانه گرده می‌گردد (Stephenson *et al.*, 1997). همچنین در بررسی قوه‌ی نامیه‌ی دانه گرده و میزان جوانه‌زنی هشت رقم زردآلو مشخص گردید که این ارقام بیشترین میزان جوانه‌زنی را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد داشتند (Asma, 2008). نتایج مشابهی در بادام (Mehlenbacher and Erdogan, 2000)، گیلاس و زرد آلو نیز (Pirlak, 2002) بدست آمده است.

دانه گرده، به عنوان یک سلول منفرد، مدل و سیستمی ساده برای انجام تحقیقات مرتبط با حفاظت و ذخیره آن است. دانه گرده می‌تواند به عنوان یک منبع تنوع ژنتیکی زمانی‌که نگهداری این تنوع ژنتیکی با بذر مشکل است، به‌شمار رود (Hoekstra, 2005). میزان موفقیت نگهداری دانه گرده با زنده‌مانی طولانی دانه گرده ذخیره شده ارزیابی می‌گردد. میزان آب، سرعت خنک کردن و دمای انبار کردن همگی بر طول عمر دانه گرده ذخیره شده اثر می‌گذارد (Buitink *et al.*, 2000). بر اساس گزارشات بهترین شرایط برای نگهداری دانه

گرده رز، شرایط خشک و دمای کم می‌باشد (Wen-Li *et al.,* 2009). کاهش دما، رطوبت و میزان فشار اکسیژن باعث افزایش زنده ماندن دانه‌های گرده می‌شود. در مورد میزان رطوبت باید با توجه به نوع دانه گرده، حد بحرانی آن نیز باید مورد ملاحظه قرار گیرد (Ahmadi *et al.,* 2001). مارکانت و همکاران (Marchant *et al.,* 1992) در مطالعات خود بر روی دو کولتیوار رز گزارش کردند که با کاهش دما، مدت زمان ماندگاری دانه‌های گرده افزایش یافت. قوه نامیه دانه گرده در شرایط طبیعی خیلی سریع کاهش می‌یابد. این در حالی است که قوه نامیه در دمای ۴- تا ۶- درجه سانتی‌گراد با سرعت کمتری کاهش می‌یابد (Wen-Li *et al.,* 2009). دانه‌های گرده تعداد زیادی از گونه‌ها را می‌توان در دماهای بین ۴ و ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مدت کوتاهی نگهداری کرد. زنده‌مانی طولانی مدت می‌تواند با نگهداری دانه گرده در ۸۰- درجه سانتی‌گراد یا نیتروژن مایع یا بخار نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) نیز بدست آید (Hanna and Towill, 1995).

گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) یکی از گونه‌های مهم رز بومی ایران، هم به عنوان یک گیاه زینتی و هم به عنوان گیاه دارویی، دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. با وجود اهمیت بسیار زیاد گل‌محمدی و بومی بودن این گیاه در ایران، تاکنون مطالعات چندانی بویژه در زمینه برنامه‌های اصلاحی آن در کشور صورت نگرفته است. لذا هدف از انجام این آزمایش تعیین دمای بهینه جوانه‌زنی و نگهداری دانه گرده ژنوتیپ کاشان و آذران گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) تحت شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰ در دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران صورت گرفت. با توجه به اینکه نتایج آزمایشات قبل نشان داده بود که بیشترین درصد جوانه‌زنی دانه گرده ژنوتیپ کاشان گل محمدی، در محیط گزارش شده توسط رید (۲۰۰۸) و در مرحله نمونه‌گیری گل نیمه‌باز بود (در دست چاپ)، لذا در سایر آزمایشات مربوط به مطالعه دانه گرده هر دو ژنوتیپ کاشان و آذران گل محمدی، از محیط مذکور استفاده شده و نمونه گیری از غنچه‌های نیمه‌باز صورت گرفت. در این آزمایش آماده-سازی محیط‌های جوانه‌زنی با استفاده از روش Ahmadi (۱۹۹۹) صورت گرفت. برای آزاد شدن دانه‌های گرده از درون بساک‌ها، پتری دیش‌های حاوی بساک‌های جدا شده از گل، به مدت ۴۸ ساعت درون دسیکاتور بر روی کلرید کلسیم قرار گرفتند. پس از تهیه و توزیع محیط‌های جوانه‌زنی در پتریدیش، دانه‌های گرده با استفاده از قلم موی نرم به صورت یکنواخت روی محیط‌های جوانه‌زنی پاشیده شدند. پتریدیش‌ها با پارافیلم درزگیری شده و درون انکوباتور با دمای مورد نظر قرار گرفتند.

به منظور بررسی اثر دماهای مختلف جوانه زنی بر کارآیی دانه گرده ژنوتیپ کاشان گل محمدی، آزمایش در قالب دو طرح کاملا تصادفی پیاده گردید. به طوریکه طرح اول شامل بررسی جوانه‌زنی دانه گرده ژنوتیپ کاشان با ۴ تیمار (دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد) و ۴ تکرار بود. همچنین طرح دوم مربوط به بررسی دمای نگهداری دانه گرده ژنوتیپ کاشان با ۴ تیمار (دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد) و ۴ تکرار بود مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. در مطالعه کارایی دانه گرده، دو صفت درصد جوانه‌زنی دانه گرده و طول لوله گرده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور محاسبه درصد جوانه‌زنی دانه گرده، پتریدیش‌ها با میکروسکوپ نوری مدل (Olympus) بررسی گردید. عکس‌برداری از دانه‌های گرده توسط دوربین دیجیتال DP12 نصب شده روی میکروسکوپ صورت گرفت. در ۵ میدان دید مورد نظر در هر واحد آزمایشی، دانه گرده شمارش و درصد جوانه‌زنی از نسبت دانه‌های گرده جوانه‌زده به کل دانه‌های گرده در هر میدان دید، محاسبه شد. دانه گرده‌ای جوانه‌زده محسوب گردید که طول لوله گرده آن برابر یا بیشتر از قطر دانه گرده بود (Ahmadi, 1999). همچنین به منظور محاسبه طول لوله گرده، با استفاده از

نرم‌افزار Micro Measurement 3.3، طول لوله گرده ۲ دانه گرده در هر میدان دید و نهایتاً ۱۰ دانه گرده در هر واحد آزمایشی، اندازه-گیری و میانگین این ۱۰ دانه گرده برای هر واحد آزمایشی گزارش گردید.

نتیجه‌گیری

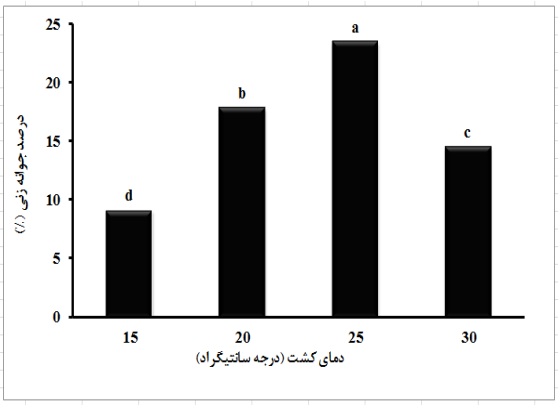
بررسی اثر دمای جوانه‌زنی بر درصد جوانه‌زنی دانه گرده ژنوتیپ کاشان نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. همچنین کم‌ترین درصد جوانه‌زنی (۹/۰۶ درصد) مربوط به دمای جوانه‌زنی ۱۵ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۱). بررسی اثر دماهای جوانه‌زنی دانه گرده بر طول لوله گرده ژنوتیپ کاشان نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین دماهای مختلف مورد مطالعه وجود داشت. به طوری‌که دانه‌های گرده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین طول گرده (۱۰۱۸/۷۴ میکرومتر) را دارا بودند. کمترین طول لوله گرده نیز در دماهای ۱۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. اختلاف معنی‌داری نیز بین دمای جوانه زنی ۲۵ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد از نظر طول لوله گرده وجود نداشت و این دو دما به ترتیب با ۹۴۵/۲۳ و ۹۴۶/۲۳ میکرومتر عنوان تیمار برتر را به خود اختصاص دادند. کمترین طول لوله گرده در ژنوتیپ کاشان مربوط به دمای جوانه زنی ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۲).

بررسی اثر دماهای مختلف نگهداری دانه گرده ژنوتیپ کاشان بر درصد جوانه‌زنی و طول لوله گرده در بازه‌های زمانی ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از نگهداری (جدول ۱) گواه از این بود که بیشترین درصد جوانه‌زنی دانه‌های گرده در تمام بازه‌های زمانی، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد و کمترین درصد جوانه‌زنی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین بلندترین طول لوله گرده نیز در تمام بازه‌های زمانی مربوط به دانه‌های گرده نگهداری شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد بود. در ۱۰ و ۳۰ روز پس از نگهداری دانه گرده، طول لوله‌های گرده نگهداری شده در دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر نداشتند. همچنین اختلاف معنی‌داری ($P\leq0.01$) از نظر طول لوله گرده بین دمای نگهداری ۲۰- و ۸۰- درجه سانتی‌گراد در ۹۰ روز پس از نگهداری دانه‌های گرده مشاهده نگردید (جدول ۱).

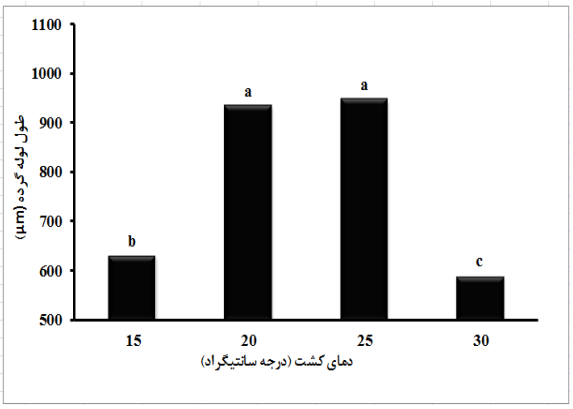
جدول ۱- اثر دماهای مختلف نگهداری دانه گرده بر درصد جوانه‌زنی و طول لوله گرده ژنوتیپ کاشان گل محمدی در بازه‌های زمانی مختلف

مدت زمان نگهداری (روز)	درصد جوانه زنی (٪)				طول لوله گرده (µm)			
دمای نگهداری (^oC)	۱۰	۳۰	۶۰	۹۰	۱۰	۳۰	۶۰	۹۰
۲۵	۱۶/۹۹ c	۱۲/۷۷ c	۸/۳۳ c	۰/۰۰ d	۴۰۹/۰۳ c	۳۴۰/۵۵ c	۲۱۹/۱۲ d	۱۱۸/۹۰ c
۴	۲۱/۸۳ b	۱۶/۱۳ b	۱۰/۸۷ c	۶/۴۰ c	۴۱۲/۹۴ c	۳۴۶/۰۰ c	۲۴۲/۷۳ c	۱۶۶/۷۲ b
-۲۰	۲۲/۹۰ b	۱۶/۱۷ b	۱۲/۲۰ b	۷/۶۰ b	۴۷۵/۴۳ b	۴۰۲/۴۶ b	۳۲۰/۸۶ b	۱۹۶/۴۵ ab
-۸۰	۲۶/۸۵ a	۲۴/۰۹ a	۱۶/۵۳ a	۹/۷۵ a	۴۸۳/۶۱ a	۴۲۸/۷۹ a	۳۶۱/۵۴ a	۲۱۴/۹۲ a

- در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل ۱- اثر دمای جوانه‌زنی بر درصد جوانه‌زنی دانه گرده ژنوتیپ آذران گل محمدی.



شکل ۲- اثر دمای جوانه‌زنی بر طول لوله گرده ژنوتیپ آذران گل محمدی.

بحث

شرایط محیطی بویژه دما، بر رشد رویشی و زایشی گیاه اثر می‌گذارد (Hoseinava *et al.*, 2006). در گل سرخ، دماهای بالا باعث افزایش و دماهای پایین سبب کاهش جوانه‌زنی و رشد دانه گرده می‌گردد (Stephenson *et al.*, 1997). مطلوب‌ترین دما برای جوانه-زنی دانه گرده و رشد لوله گرده، به ترتیب بین ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد (Mehlenbacher and Erdogan, 2000) گزارش شده است که نتایج بدست آمده از این آزمایش نیز تایید کننده این گزارشات می‌باشد. به عبارت دیگر، در ژنوتیپ کاشان گل محمدی، بهترین دما برای جوانه‌زنی دانه گرده ۲۵ درجه سانتی‌گراد (شکل ۱) و برای رشد لوله گرده ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد (بویژه ۲۵ درجه سانتی-گراد) بود (شکل ۲). نتایج مشابهی بروی دانه گرده بادام (Sorkheh *et al.*, 2011) و دیگر محصولات در شرایط درون و برون شیشه‌ای گزارش شده است. این احتمال وجود دارد که دمای بالا روی سازمان‌یابی DNA، ساختار پروتئین‌ها و آنزیم‌ها اثر گذاشته و از طریق ایجاد آسیب به این مولکول‌ها بویژه در مرحله‌ی رشد لوله گرده که متابولیسم شدیدتر است، سبب کاهش رویش و رشد لوله گرده می شود. به علاوه در دمای پایین، به دلیل کاهش فعالیت آنزیم‌ها و نیز متابولیسم دانه گرده، میزان رویش و رشد لوله گرده کم می‌باشد (Izadi Khaleghabadi *et al.*, 2008).

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، دمای نگهداری ۸۰- درجه سانتی‌گراد، بهترین شرایط جهت جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله گرده در ژنوتیپ مورد مطالعه گل محمدی است که این تایید کننده نتایج ون-لی و همکاران (Wen-Li *et al.*, 2009) است. نتایج ما نشان داد که با گذر زمان در تیمارهای مورد مطالعه در ژنوتیپ کاشان، درصد جوانه زنی کاهش یافت که این کاهش در دمای نگهداری پائین (۸۰- درجه سانتی‌گراد) کمتر بود. بر اساس نتایج هانا و توویل (Hanna and Towill, 1995) نیز کاهش در جوانه‌زنی دانه گرده در ۲۰- سریع‌تر از ۸۰- یا ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد بود. نتایج مطالعات مارکانت و همکاران (Marchant *et al.*, 1992) روی نگهداری دانه گرده دو کولتیوار رز انگلیسی گواه از این بود که نگهداری دانه گرده گل رز در دماهای ۲۰- و ۴+ درجه سانتی‌گراد، باعث کاهش سریع قوه نامیه شد، درحالی‌که سرعت کاهش قوه نامیه دانه‌های گرده‌ی نگهداری شده در دماهای خیلی پایین (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد)، بسیار کم بود. احمدی و همکاران (Ahmadi *et al.*, 2001) گزارش کردند که نگهداری دانه‌ی گرده مرکبات در فریزر ۱۸- مناسب‌تر است. درحالی‌که نگهداری در دمای اتاق سبب کاهش سریع قوه نامیه دانه گرده می‌شود که نتایج آزمایشات ما نیز تایید کننده این گزارشات است. به طور کلی، بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، بهترین دما برای جوانه‌زنی دانه گرده این ژنوتیپ

گل محمدی، ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. همچنین بهترین دما برای نگهداری دانه گرده ژنوتیپ کاشان گل محمدی درمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

Reference

1. Ahmadi, N., Arzani, K. and Moeini, A. (2001). Study of pollen storage, germination and pollen tube growth in some citrus cultivars. Seed and Plant Journal, 17 (1): 216- 229. (In Persian).
2. Ahmadi, N.A. (1999). Effects of storage methods and environmental conditions on citrus pollen germination. MSc thesis of horticultural science, Department of Horticultural Science, Faculty of agricultural science, Tarbiat Modares University (TMU). (In Persian).
3. Buitink, J., Leprince, O., Hemminga, M.A. and Hoekstra, F.A. 2000. The effects of moisture and temperature on the ageing kinetics of pollen: interpretation based on cytoplasmic mobility. Plant, Cell and Environment; 23:967–974.
4. Dane, F., Olgun, G. and Dalg, O. (2004). In vitro pollen germination of some plant species in basic culture medium. Journal of Cell and Molecular Biology, 3: 71-76.
5. Hoekstra, F.A. 2005. Differential longevities in desiccated anhydrobiotic plant systems. Integrated and Comparative Biology; 45:725–733.
6. Hanna, W.W. and Towill, L.E. 1995. Long-term pollen storage. Plant Breeding Reviews 13:179–207.
7. Hoseinava, S., Imani, A., and Makhnov, M. (2006). An investigation of the percentage of dicogami and selection of the best pollinizer for commercial varieties of hazelnut. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 37. 371-380 (In Persian).
8. Izadi Khaleghabadi, M., Rezanejad F. and Monochehri Klantri, Kh. 2008. Effects of some environmental and chemical factors on germination and pollen tube growth in petunia hybrid. Iranian Journal of Biology, 21 (4): 667-675.
9. Lord, E.M. (2000). Adhesion and cell movement during pollination. Cherchez la femme, Trends Plant Science, 5: 368–373.
10. Marchant, R., Power, J. B., Davey, M. R., Chartier, J. M., and Lynch, P. T. (1993). Cryopreservation of pollen from two rose cultivars. Euphytica, 66: 235-241.
11. Mehlenbacher, S. A., and Erdogan, V. (2000). Incompatibility in wild *Corylus* species. Acta Horticulturae, 556: 163-170.
12. Pirlak, L. 2002. The effects of temperature on pollen germination and pollen tube growth of apricot and sweet cherry. Gartenbauwissenschaft; 67 (2): 61-64.
13. Reed, B.M. 2008. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, pp.513.
14. Sorkheh, K., Shiran, B., Rouhi, V., Khodambashi, M., Wolukau, J.N. and Ercisli, S. (2011). Response of *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of almond (*Prunus dulcis* Mill.) to temperature, polyamines and polyamine synthesis inhibitor. Biochemical Systematics and Ecology, 39: 749–757.
15. Stephenson, A.G., Johannsson, M.H. and Delph, L.F. (1997). How environmental factors affect pollen performance: ecological and evolutionary perspectives. Ecology, 78 (6): 1632-1639.
16. Stephenson, A.G., Johannsson, M.H. and Delph, L.F. (1997). How environmental factors affect pollen performance: ecological and evolutionary perspectives. Ecology, 78 (6): 1632-1639.
17. Wen-Li, W., Lan-Yong, Z., Cui-Ying, Z., Cheng-shu, Z., You-peng, Z. and Cui-Fang, G. 2009. Studies on Pollen Viability and Its Storage Conditions of Pingyin Rose. Acta Horticulturae Sinica; 36 (4): 593-598.

Dtermination of optimum pollen germination and storage temperature of 'Kashan' genotype of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.)

S.S. Hosseini[1], N. Ahmadi*[2], A. Yadollahi[3]
1, 2, 3- Dept. of Horticultural Sciences, Tarbiat Modares Univesity, Tehran, Iran.
*Corresponding Author

Abstract
This investigation was conducted to study optimum pollen germination and storage temperature in 'Kashan' genotype of Damask Rose. Evaluation of pollen germination of 'Kashan' genotype indicated that maximum and minimum pollen germination rate was obtained at 25 ºC and 15 ºC, respectively. Also maximum pollen tube length was obtained at 20 ºC. Results related to the pollen storage temperature indicated that pollen grains storage of 'Kashan' genotype at low temperature (-80 ºC) was obtained maximum pollen germination rate and pollen tube length.
Keywords: Damask Rose genotype, *in vitro*, Pollen germination conditions, Pollen grain storage, Pollen tube.