بررسی اثر غلظت‌های مختلف پلی‌آمین‌ها بر درصد جوانه‌زنی و طول لوله گرده ژنوتیپ‌های کاشان و آذران 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 بررسی اثر غلظت‌های مختلف پوترسین و اسپرمیدین بر جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله گرده در دو ژنوتیپ گل محمدی با نام‌های آذران و کاشان انجام گرفت. ۷ غلظت پلی‌آمین (شاهد، پوترسین با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵ میلی‌مولار و اسپرمیدین با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌مولار) در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که در ژنوتیپ آذران، بیشترین درصد جوانه‌زنی دانه گرده در محیط حاوی ۰/۰۴ میلی‌مولار سپرمیدین بود. همچنین، اثر غلظت‌های مختلف پلی‌آمین‌ها بر درصد جوانه‌زنی دانه گرده ژنوتیپ کاشان نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی در غلظت ۰/۰۴ میلی‌مولار بدست آمد. در این ژنوتیپ، بیشترین و کمترین طول لوله گرده به ترتیب مربوط به غلظت ۰/۱ میلی مولار پوترسین و شاهد بود.

کلمات کلیدی: اسپرمیدین، پوترسین، جوانه زنی، گل محمدی، لوله گرده.

مقدمه

جوانه‌زنی موفق دانه گرده و رشد لوله گرده در طول خامه از ضروریات لقاح تخمک می‌باشند که نهایتاً سبب تشکیل بذر می‌گردند که در برنامه‌های بهنژادی اهمیت بسیاری دارند (Lord, 2000). دانه‌های گرده، سلول‌های گیاهی با ساختاری ساده هستند (Dane et al., 2004) و فرآیند تشکیل لوله گرده یک مثال ساده از رشد و نمو است (Dane et al., 2004). برای تخمین پتانسیل گرده‌افشانی در برنامه-های اصلاحی، کمیت و قابلیت زنده‌مانی دانه‌های گرده‌ی کولتیوارها و ژنوتیپ‌ها و نیز قابلیت جوانه‌زنی دانه گرده باید مورد ملاحظه قرار گیرد (Ercisli, 2007). محیط مورد استفاده برای جوانه‌زنی دانه گرده بسته به گونه‌ی گیاهی متفاوت است (Ma *et al.*, 2000)، بطوریکه دانه گرده برخی از گونه‌های گیاهی به محیط کامل‌تری نیاز دارند (Cetin *et al.*, 2000).

گزارش‌های مختلف، نقش پلی‌آمین‌ها را در فرآیندهای بلوغ و جوانه‌زنی، در انواع مختلف دانه گرده نشان داده‌اند. پلی‌آمین‌ها به‌وسیله غشای پلاسمایی و از طریق باند شدن با فسفولیپیدهای غشا و پروتئین‌ها به حالت تعادل می‌رسند و از این طریق از تاخیر در رشد لوله گرده جلوگیری می‌کنند (Singh and Tandon, 2012). به علت حضور عمده پلی آمین‌ها در گیاهان، از آن‌ها به عنوان ابزار بیوشیمیایی برای مطالعه نقش آن‌ها در فرآیندهای رشد و نموی، مانند نقش آن‌ها در در تولید مثل زایشی، استفاده می‌گردد (Duca, 2010). راجام (Rajam, 1989) گزارش کرد که بازدارنده‌های سنتز پلی‌آمین‌ها، سبب جلوگیری از جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله گرده در گل لیلیوم می‌شوند و این اثر بازدارندگی با کابرد پلی‌آمین‌های برون‌زاد در محیط کشت جوانه‌زنی دانه گرده، برطرف می‌شود. چیبی و همکاران (Chibi *et al.*, 1994)، افزایش قابل توجه بیوسنتز پلی‌آمین‌ها و همچنین فعالیت آنزیم‌های آرژنین دکربوکسیلاز و ارنیتین دکربوکسیلاز را در مراحل اولیه جوانه‌زنی دانه گرده گزارش کردند. غلظت‌های بالای پلی‌آمین‌ها روی جوانه‌زنی دانه گرده سمی به نظر می‌رسد و برخی از غلظت‌های کم نیز ناکافی به نظر می‌رسند (Sorkheh *et al.*, 2011). زو و همکاران (Xu *et al.*, 1999) یافتند که غلظت‌های بالای پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین به طور کامل از جوانه‌زنی دانه گرده در سیب جلوگیری کردند وغلظت‌های پایین

پلی‌آمین‌ها اثر کمتری در افزایش جوانه‌زنی دانه گرده نسبت به شاهد داشتند. رشد لوله گرده نیز به میزان زیادی به غلظت‌های بالای پلی آمین حساس است و غلظت‌های بالای پلی آمین‌ها منجر به کاهش رشد لوله گرده می‌گردد (Wolukau *et al.*, 2004).

گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) یکی از مهم‌ترین گونه‌های گل رز بومی کشور، هم به عنوان یک گیاه زینتی و هم به عنوان گیاه دارویی، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. با توجه به نیاز و شروع برنامه‌های اصلاحی روی رز، برای شناخت و ارزیابی دانه گرده گل محمدی بعنوان والد گرده دهنده، این آزمایش جهت بررسی غلظت‌های مختلف پوترسین بر کارآیی دانه گرده ژنوتیپ آذران و کاشان گل محمدی تحت شرایط درون شیشه‌ای (*In vitro*) انجام گردید.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف پوترسین و اسپرمیدین بر جوانه‌زنی دانه گرده و رشد لوله گرده در دو ژنوتیپ مهم گل محمدی کشور با نام‌های آذران و کاشان، 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 هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه گل محمدی، در محیط گزارش شده توسط رید (۲۰۰۸) و در مرحله نمونه‌گیری گل باز 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 آماده‌سازی محیط‌های جوانه‌زنی با استفاده از روش Ahmadi (۱۹۹۹) صورت گرفت. برای آزاد شدن دانه‌های گرده از درون بساک‌ها، پتری‌دیش‌های حاوی بساک‌های جدا شده از گل‌ها، به مدت ۴۸ ساعت درون دسیکاتور بر روی کلرید کلسیم قرار گرفتند. پس از تهیه و توزیع محیط‌های جوانه‌زنی در پتریدیش‌ها، دانه‌های گرده با استفاده از قلم موی نرم به صورت یکنواخت روی محیط‌های جوانه‌زنی پاشیده شدند. پتریدیش‌ها با پارافیلم درزگیری شده و درون انکوباتور قرار گرفتند.

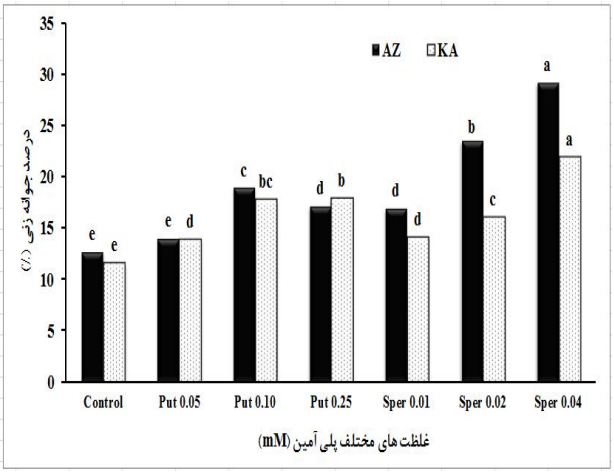
به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف پوترسین و اسپرمیدین بر کارآیی دانه گرده دو ژنوتیپ آذران و کاشان گل محمدی، آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۷ تیمار (۷ سطح پلی‌آمین (شاهد، پوترسین با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵ میلی‌مولار و اسپرمیدین با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌مولار)) و ۴ تکرار برای هر یک از اکوتیپ‌های مورد مطالعه انجام گرفت. ۲۴ ساعت پس از کشت، پتری‌دیش‌ها با استفاده از ۰/۵ میلی‌لیتر اسید استیک ۴۵ درصد تثبیت و کارآیی دانه گرده هر یک از تیمارها مورد بررسی قرار 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 استفاده از 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 گرده-ای 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، اندازه‌گیری و میانگین این ۱۰ دانه گرده برای هر واحد آزمایشی گزارش گردید.

نتیجه‌گیری

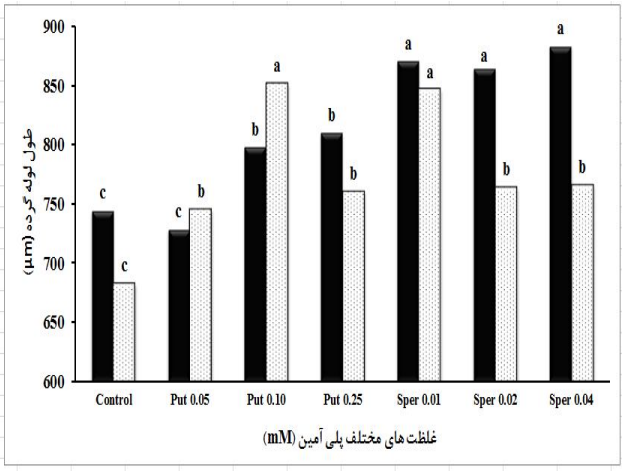
بررسی اثر غلظت‌های مختلف پلی‌آمین‌ها بر درصد جوانه‌زنی دانه گرده ژنوتیپ آذران گواه از این است که بیشترین درصد جوانه‌زنی دانه گرده در محیط حاوی ۰/۰۴ میلی‌مولار پلی‌آمین اسپرمیدین (۲۹/۱۸ درصد) بود که اختلاف معنی‌داری ($P\leq0.01$) با سایر غلظت-های پلی‌آمین اسپرمیدین و پوترسین داشت. به طور کلی کاربرد اسپرمیدین نسبت به پوترسین در بهبود درصد جوانه زنی دانه گرده

ژنوتیپ آذران گل محمدی مؤثرتر بود. در بین غلظت‌های مختلف پوترسین، محیط جوانه‌زنی حاوی ۰/۱ میلی‌مولار پوترسین اثر مثبت و معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی دانه گرده ژنوتیپ آذران نسبت به سایر غلظت‌های پوترسین داشت (شکل ۱). همچنین بررسی اثر غلظت‌های مختلف پلی‌آمین‌ها بر طول لوله گرده ژنوتیپ آذران نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف اسپرمیدین (۰/۰۴، ۰/۰۲ و ۰/۰۱ میلی مولار) از نظر طول لوله گرده وجود نداشت و عنوان تیمار برتر را به خود اختصاص دادند، اما با تیمار شاهد و غلظت‌های مختلف پوترسین اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۲).

بررسی نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف پلی‌آمین‌ها بر درصد جوانه‌زنی دانه گرده ژنوتیپ کاشان در این آزمایش نشان داد که غلظت ۰/۰۴ میلی‌مولار اسپرمیدین در محیط جوانه‌زنی با ۲۱/۹۵ درصد بیشترین درصد جوانه‌زنی را در بین تیمارهای مورد مطالعه دارا بود و اختلاف معنی‌داری ($P\leq0.01$) با سایر غلظت‌های پلی‌آمین مورد مطالعه نشان داد. همچنین کمترین درصد جوانه‌زنی (۱۱/۶۲ درصد) مربوط به دانه‌های گرده کشت شده در محیط فاقد پلی‌آمین (تیمار شاهد) بود (شکل ۱). برخلاف ژنوتیپ آذران، در این ژنوتیپ مشخص گردید که پس از تیمار ۰/۰۴ میلی‌مولار اسپرمیدین، بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به محیط جوانه‌زنی حاوی ۰/۲۵ و ۰/۱ میلی‌مولار پوترسین بود (شکل ۱). همان‌گونه که شکل ۲ نشان می‌دهد، در ارتباط با اثر غلظت‌های مختلف پلی‌آمین‌ها بر طول لوله گرده ژنوتیپ کاشان، طول لوله‌های گرده در محیط جوانه‌زنی حاوی غلظت ۰/۱ پوترسین و ۰/۰۱ اسپرمیدین اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ولی با سایر تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. همچنین بین طول لوله‌های گرده در محیط‌های کشت حاوی ۰/۰۵و ۰/۲۵ میلی‌مولار پوترسین و نیز ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌مولار اسپرمیدین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در بین غلظت‌های مورد مطالعه بیشترین و کمترین طول لوله گرده به ترتیب مربوط به غلظت ۰/۱ میلی مولار پوترسین (۸۵۲/۱۵ میکرومتر) و شاهد (۶۸۲/۹۶ میکرومتر) بود (شکل ۲).



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف پلی آمین‌ها بر درصد جوانه‌زنی دانه گرده ژنوتیپ‌های کاشان و آذران گل محمدی



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف پلی آمین‌ها بر طول لوله گرده ژنوتیپ کاشان و آذران گل محمدی

بحث

گزارش‌های مختلف، نقش پلی‌آمین‌ها را در فرآیندهای بلوغ و جوانه‌زنی، در انواع مختلف دانه گرده نشان داده‌اند (Song *et al.*, 1999). غلظت‌های بالای پلی‌آمین‌ها روی جوانه‌زنی دانه گرده سمی به نظر می‌رسد و برخی از غلظت‌های کم نیز ناکافی به نظر می‌رسند (Sorkheh *et al.*, 2011). زو و همکاران (Xu *et al.*, 1999) یافتند که غلظت‌های بالای پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین به طور

کامل از جوانه‌زنی دانه گرده در سیب جلوگیری کردند وغلظت‌های پایین پلی‌آمین‌ها اثر کمتری در افزایش جوانه‌زنی دانه گرده نسبت به شاهد داشتند. رشد لوله گرده نیز به میزان زیادی به غلظت‌های بالای پلی آمین حساس است و غلظت‌های بالای پلی آمین‌ها منجر به کاهش رشد لوله گرده می‌گردد (Wolukau *et al.*, 2004). بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش نیز مشخص گردید که غلظت‌های پائین پلی‌آمین‌ها (بویژه اسپرمیدین) سبب بهبود جوانه‌زنی دانه گرده هر دو ژنوتیپ آذران و کاشان گل محمدی شد.سرخه و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، بدون پلی‌آمین‌ها، اثر بازدارندگی بیشتری در جوانه‌زنی دانه گرده نسبت به حضور پلی-آمین‌ها داشت. بر اساس نتایج Bouchereau و همکاران (۱۹۹۹) درصد تغییرات در جوانه‌زنی در حضور پلی‌آمین‌ها نسبت به شاهد در ۱۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۲۵ یا ۳۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر است که بر نقش پلی‌آمین‌ها در تنش دمای پایین تاکید دارد. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمایشات ما، غلظت پائین پوترسین (۰/۲۵ میلی مولار) و اسپرمیدن (۰/۰۴ میلی مولار) نقش بسزایی در بهبود کارآیی دانه گرده (درصد جوانه‌زنی و طول لوله گرده) در هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه گل محمدی داشت. همچنین در این آزمایش مشاهده شد که برخلاف ژنوتیپ آذران (که تیمار ۰/۰۴ میلی مولار اسپرمیدین، تیمار برتر بود)، در ژنوتیپ کاشان، پس از تیمار ۰/۰۴ میلی‌مولار اسپرمیدین، بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به محیط جوانه‌زنی حاوی، ۰/۲۵ و ۰/۱ میلی‌مولار پوترسین بود که احتمالاً دلیل این امر اثر ژنوتیپ گیاه می‌باشد و ژنوتیپ‌های مختلف پاسخ مختلفی به غلظت‌های پلی‌آمین موجود در محیط جوانه زنی دانه گرده نشان می‌دهند. به طور کلی، بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش کاربرد غلظت ۰/۰۴ میلی‌مولار اسپرمیدین و ۰/۲۵ میلی مولار پوترسین می‌تواند نقش بسزایی در بهبود کارآیی دانه گرده ژنوتیپ کاشان و آذران گل محمدی تحت شرایط *in vitro* و در نتیجه در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی این گیاه داشته باشد.

منابع

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. Bouchereau, A., Aziz, A., Larhre, F. and Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant Science, 140: 103–125.
4. Cetin, E., Yldrm, C., Palavan-Ünsal, N. and Ünal, M. 2000. Effect of spermine and cyclohexylamine on in vitro pollen germination and tube growth in Helianthus annuus. Can J Plant Sci; 80: 241-245.
5. Chibi, F., Matilla, A.J., Angosto, T., Garrido, D. and Bornman, C.H. (1994). Changes in polyamine synthesis during anther development and pollen germination in tobacco (*Nicotiana tabacum*). Physiologia Plantarum, 92: 61–68.
6. 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.
7. Duca, S.D., Cai, G., Sandro, A.D. and Serafini-Fracassini, D. (2010). Compatible and self-incompatible pollination in *Pyrus communis* displays different polyamine levels and transglutaminase activity. Amino Acids, 38(2): 659-667.
8. Ercisli, S. 2007. Determination of pollen viability and in vitro pollen germination of *Rosa Dumalis* and *Rosa Vilosa*. Bangladesh J. Bot.; 36(2): 185-187.
9. Lord, E.M. (2000). Adhesion and cell movement during pollination. Cherchez la femme, Trends Plant Science, 5: 368–373.
10. Ma, L.G, Fan, Q.S., Yu, Z.Q., Zhou, H.L., Zhang, F.Z. and Sun, D.Y. 2000. Does Aluminum inhibit pollen germination via extracellular Calmodulin. Plant Cell Physiol; 41: 372-376.
11. Rajam, M.V. 1989. Restriction of pollen germination and tube growth in lily pollen by inhibitors of polyamine metabolism. Plant science; 59: 53-56.

12. Singh, V.V and Tandon, R. 2012. Polyethylengelycol and Polyamines Promote Pollen germination and Tube growth in *Azadira chintadica* (*Meliaceae*). The International Journal of Plant Reproductive Biology; 4(1): 23–29.
13. 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.
14. Wolukau, J.N., Zhang, Sh., Xu, G. and Chen, D. 2004. The effect of temperature, polyamines and polyamine synthesis inhibitor on *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of *Prunus mume*. Sci. Hortic; 99: 289–299.
15. Xu, J.Z., Chen, H.J., Shao, J.Z. and Wang, Y.N. 1999. Effects of exogenous polyamines and their inhibitor MGBG on the apple pollen germination and fruit set. J. Agric. Univ. Hebei (China); 22: 42–45.

Study the effect of different concentration of polyamines on pollen germination and pollen tube growth of 'Kashan' and 'Azaran' genotypes 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 the effect of different concentration of polyamines on pollen germination and pollen tube growth of 'Kashan' and 'Azaran' genotypes of Damask Rose. Seven level of polyamines (control, putrescine with concentrations 0.05, 0.1, 0.25 mM and spermidine with concentrations 0.01, 0.02, 0.04 mM) was used in this expriment. Results indicated that in 'Azaran' genotype, maximum pollen germination rate was obtained in media containing 0.04 mM spermidine. Also, different concentration of polyamines on pollen germination rate of 'Kashan' genotype indicated that maximum pollen germination was obtained in 0.04 mM spermidine. In this genotype, maximum and minimum pollen tube length was related to 0.1 mM putrescine and control, respectively.
Keywords: Damask Rose genotype, *in vitro*, Pollen germination conditions, Pollen tube, Putrescine, Spermidine.