DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2013.3092

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۱، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۵۵-۴۵ (۱۳۹۲)

بررسی اثر پرتو گاما بر جوانه‌زنی گرده‌ها و جنین‌زایی هاپلوئید بکرزا در گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

خدیجه پالوانه[۱]، عباس قمری‌زارع*[۲]، محمود لطفی[۳]، طیبه سهیلا نراقی[۴]، فرشته اسدی‌کرم[۵] و سیدرضا طبائی‌عقدایی[۶]

۱- کارشناس‌ارشد تولیدات گیاهی- اصلاح گیاهان باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، پست‌الکترونیک: ghamari-zare@rifr-ac.ir

۳- استادیار، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت

۴- کارشناس خبره، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

۵- کارشناس‌ارشد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

۶- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۱۱

چکیده

هاپلوئیدها و دابل‌هاپلوئیدها می‌توانند به‌طور مؤثری سرعت برنامه‌های اصلاحی محصولات باغبانی را افزایش دهند. این پژوهش با هدف بکارگیری دانه‌های گرده پرتوتابی‌شده به‌وسیله اشعه گاما در تلاقی گل‌های محمدی و القاء جنین‌های هاپلوئید بکرزا انجام شد. دو ژنوتیپ G_{32} و G_{40} گل‌محمدی به‌عنوان والدین مادری و ژنوتیپ G_{22} و ترکیبی از ۴۰ ژنوتیپ گل‌محمدی به‌عنوان والدین پدری مورد استفاده قرار گرفتند. غنچه‌های والدین پدری در مرحله مناسب جمع‌آوری و با اشعه گاما از منبع کبالت ۶۰ در پنج سطح دز صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۸۰۰ و ۱۴۰۰ گری پرتوتابی شدند. گل‌های ماده که یک روز قبل از گرده‌افشانی اخته شده بودند با استفاده از گرده غنچه‌های پرتوتابی شده گرده‌افشانی شدند. هیپ‌های (میوه‌ها) تلاقی‌یافته از درختچه‌های والدین مادری در دو زمان ۱۶ و ۱۹ روز پس از گرده‌افشانی برداشت شدند. به‌منظور تعیین محیط کشت مناسب برای رشد جنین‌های نابالغ حاصل از نجات جنین گل‌محمدی از سه ترکیب محیط کشت MS استفاده شد. برای غلبه بر دوره خواب، نیمی از جنین‌ها به‌مدت ۲ ماه در دمای ۴-۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. درصد تشکیل میوه و تعداد بذر در هر میوه به شدت دز اشعه و نوع والد مادری و والد گرده‌دهنده بستگی داشت. البته ترکیب محیط کشت ½MS + vit در مقایسه با دو ترکیب مورد استفاده دیگر برای رشد جنین‌ها مؤثرتر تشخیص داده شد. بنابراین وجود تیمار سرمادهی برای غلبه بر خواب جنین‌ها ضروری بود. با توجه به نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیک، به‌ویژه تعداد کلروپلاست سلول‌های روزنه، تیمار ۲۵۰ ؟ بیشترین میزان تولید گیاهان هاپلوئید را داشت.

واژه‌های کلیدی: گل‌محمدی، تولید هاپلوئید، پرتوتابی، دانه گرده، رز.

مقدمه

هاپلوئیدها و دابل‌هاپلوئیدها می‌توانند به‌طور مؤثری سرعت برنامه‌های اصلاحی محصولات باغبانی را افزایش دهند (Khush & Virmani, 1996). مشکلات دستیابی به لاین خالص سبب بروز مشکل و کندشدن روند مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی در این گیاهان شده است (Hofer & Grafe, 2003). با توجه به اینکه در برخی گیاهان چوبی ازجمله گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.) دوره تولید مثل طولانی و درجه هتروزیگوتی بالایی دارند و گاهی اوقات از خودناسازگاری برخوردارند، بدست‌آوردن گیاهان هاپلوئید با روش‌های معمول ممکن نیست (Maria, 2006).

کشت بساک، کشت میکروسپور و تولید گیاهان هاپلوئید با استفاده از پرتوتابی گرده‌ها و کشت درون شیشه‌ای جنین‌های نابالغ ازجمله روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد (Musial & Przywara, 1998). در سیب با استفاده از روش بکرزایی و نجات جنین‌های نابالغ ۱۱ گیاه هاپلوئید (Zhang & Lespinasse, 1991) و در نارنگی تعداد ۵ گیاه هاپلوئید در دزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ گری اشعه گاما به‌دست آمد (Frolicher *et al.*, 2007). در سایر محصولات ازجمله گلابی (Bouvier *et al.*, 1993)، گیلاس (Hofer & Grafe, 2003)، کیوی‌فروت (Chalak & Legave, 1997)، آلو (Peixe *et al.*, 2000) و گردو (Sadat Hosseini *et al*. 2009) استفاده از این روش برای تولید گیاهان هاپلوئید با موفقیت همراه بوده است.

البته تاکنون تولید گیاه هاپلوئید از طریق کشت بساک در رزها به‌دلیل مشکلاتی در القاء کالوس و باززایی شاخه موفق نبوده است (Tabaeizadeh & Khosh-Khui, 1981؛ Wisseman *et al.*, 1998). اما هاپلوئیدهایی با استفاده از پرتوتابی گرده و نجات جنین از ارقام شاخه بریده تتراپلوئید شامل سونیا (Sonia) (مترادف Sweet Promise) و لئونیداز (Leonidas) بدست آمده‌اند (El Mokadem *et al.*, 2002; Crespel *et al.*, 2002; Meynet *et al.*, 1994).

گل‌محمدی از مهمترین گونه‌های دارویی و معطر است که در برخی از نقاط جهان و در شرایط مختلف آب و هوایی ایران پرورش می‌یابد و کشور ایران به‌عنوان منشأ این گیاه شناخته شده است (Chevallier, 1996). این گیاه در میان ۱۵۰ تا ۲۰۰ گونه و بیش از ۱۸۰۰۰ کولتیوار جنس *Rosa* (Gudin, 2000) مهمترین منبع اسانس رز به‌شمار می‌آید که توسط تولیدکنندگان عمده اسانس گل‌محمدی جهان نظیر ترکیه، بلغارستان و نیز ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. گل ارزشمندترین بخش قابل مصرف این گیاه می‌باشد که بهبود کمیت و کیفیت آن نقش مؤثری در توسعه کشت و کار و بهره‌برداری از این گیاه خواهد داشت (Tabaei-aghdaei *et al*, 2005). متأسفانه دوره گلدهی گل‌محمدی کوتاه می‌باشد. اما برخی رزهای زینتی طول دوره گلدهی بسیار طولانی و تعداد گل بالا در شاخه و بوته دارند. اگر بتوان این صفات مناسب را به گل‌محمدی منتقل کرد قدم بسیار بزرگی در راه اصلاح آن برداشته خواهد شد. تلاش در این زمینه، با توجه به احتمال ایجاد گیاهان هاپلوییید از طریق پارتنوژنسیس در دو گونه و بعد تهیه لاین‌های دابل‌هاپلوییید و دورگ‌گیری به روش معمول و یا امتزاج سلولی و ایجاد سیبرید بین‌گونه‌ای و نهایتا گزینش هیبریدهای حاوی اسانس از گل‌محمدی و طول دوره گلدهی از رز زینتی، در پژوهش‌های آینده امکان‌پذیر خواهد بود. در همین راستا در این پژوهش تلاش شده است که از طریق پارتنوژنسیس در دو ژنوتیپ گل‌محمدی

با استفاده از پرتوتابی دانه گرده، گیاهان هاپلوئید ایجاد گردد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در بهار سال ۱۳۸۸ در مزرعه تحقیقاتی گل‌محمدی گروه تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، واقع در ۱۵ کیلومتری شمال‌غرب تهران، به طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۰ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ٤٤ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۳۲۰ متر از سطح دریا انجام شد. از دو ژنوتیپ G_{32} (با منشأ یزد) و G_{40} (با منشأ کاشان) گل‌محمدی به‌عنوان پایه‌های مادری و ژنوتیپ G_{22} (گل رز معطر با منشأ یاسوج) و ترکیبی از گرده ٤٠ ژنوتیپ گل‌محمدی از سراسر ایران موجود در مزرعه (G_M) به‌عنوان والدین گرده‌دهنده استفاده شد. پس از تعیین زمان مناسب جمع‌آوری گرده، غنچه‌های پدری جمع‌آوری و در دمای اطاق (۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲ روز قرار داده شدند و پس از خشک شدن به پژوهشکده کشاورزی و پزشکی هسته‌ای منتقل و در آنجا تحت پرتودهی با اشعه گاما از منبع کبالت ٦٠ در چهار سطح ۲۵۰، ۵۰۰، ۸۰۰ و ۱٤۰۰ گری قرار گرفتند، البته تیمار اشعه صفر به‌عنوان شاهد به تیمارها اضافه گردید.

به‌منظور جلوگیری از تلقیح ناخواسته گل‌های ماده ارقام مادری، یک روز قبل از گرده‌افشانی، به‌وسیله پنس گلبرگ‌ها و بعد پرچم‌ها با دقت و بدون آسیب رساندن به کلاله حذف شده و بعد به وسیله پاکت‌های کاغذی مناسب به ابعاد ۲۰×۱۰ سانتی‌متر پوشانده شدند. عمل گرده‌افشانی با گرده‌های حاصل از غنچه‌های شاهد و پرتوتابی‌شده در همان روز پرتوتابی و روز بعد از آن انجام شد. سپس غنچه‌های پرتوتابی شده، داری بساک‌های حاوی دانه‌های گرده، در کنار غنچه مادری بسته شده و در ادامه گل‌ها مجددا با پاکت پوشانده و اتیکت زده شدند. چند روز بعد از هر مرحله گرده‌افشانی، پس از قهوه‌ای شدن کلاله‌های غنچه‌های مادری آنها از حالت ایزوله خارج گردیدند.

برای تعیین قوه نامیه و بررسی تأثیر شدت دز اشعه بر دانه‌های گرده و مقایسه با گرده‌های شاهد، آزمون جوانه‌زنی دانه‌های گرده انجام شد. گرده‌ها در محیط کشتی با ترکیب ۱۵٪ سوکروز، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید بوریک (Gudin *et al.*, 1991) به اضافه ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نیترات کلسیم در pH=۵/۸ کشت شده و در دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. ۲٤ ساعت بعد از کشت، جوانه‌زنی دانه‌های گرده توسط میکروسکوپ نوری بررسی و دانه‌های گرده جوانه‌زده شمارش شدند و درصد جوانه‌زنی دانه‌های گرده در دزهای مختلف در ٦۰۰ دانه گرده محاسبه شد و با استفاده از نرم‌افزار SAS نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها با آزمون استیودنت نیومن کلز (Newman and Keuls) در سطح ۵ درصد بررسی شد. مقایسه برداشت میوه‌ها (هیپ‌ها) در دو زمان ١٦ و ١٩ روز پس از گرده‌افشانی (برای جلوگیری از سقط زود هنگام جنین‌ها به‌دلیل ریکالسیترانت بودن جنین گل‌محمدی) انجام شد. برای تعیین محیط کشت مناسب برای رشد جنین‌های نابالغ حاصل از نجات جنین گل‌محمدی از سه ترکیب محیطی مختلف MS استفاده گردید (جدول ۱). جنین‌ها پس از کشت جهت بررسی لزوم نیاز سرمایی برای غلبه بر خواب، به دو دسته تقسیم شده و

نیمی به‌طور مستقیم به داخل اتاق رشد و نیمه دیگر به سردخانه تاریک با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ماه، انتقال داده شدند.

به‌منظور تعیین سطح پلوئیدی گیاهان باززایی شده از روش‌های شمارش کروموزومی و بررسی‌های مورفولوژیکی استفاده گردید. برای بررسی تراکم کلروپلاست در سلول‌های روزنه از روش سری (Sari *et al.*, 1999) استفاده شد.

جدول ۱- محیط کشت‌های مورد استفاده در کشت‌های اولیه

کد محیط	ترکیبات
A	½ (Macro element) MS
B	½ (Macro element) MS + 400 mg/l^{-1} NH_4NO_3 + 0.27 µM.l^{-1} NAA + 2.22 µM/l^{-1} BA (Meynet *et al.*, 1994)
C	½ (Macro element) MS + vit (Riboflavin 0/5 mg/l^{-1} + Biotin 1 mg/l^{-1} + Ca-Panthotinate 0/5 mg/l^{-1} + Fulic acid 0/5 mg/l^{-1})

نتایج

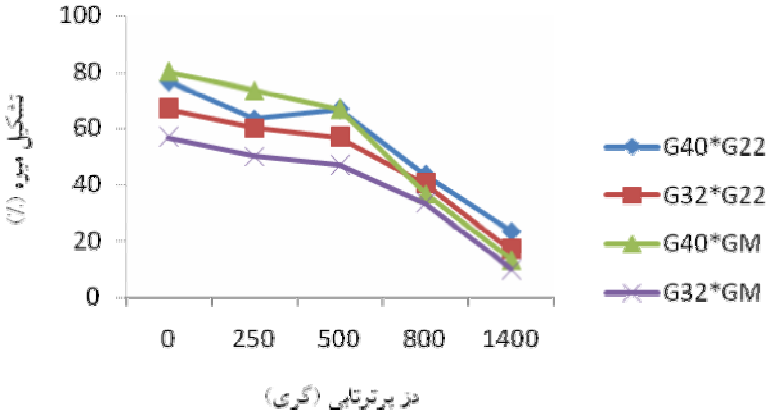
آزمون جوانه‌زنی دانه‌های گرده در محیط درون شیشه‌ای نشان داد که در هر دو ژنوتیپ G_{22} و G_M با افزایش دز اشعه گاما از صفر تا ۱٤۰۰ گری میزان جوانه‌زنی گرده‌های پرتو دیده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۲). در ژنوتیپ G_M میزان جوانه‌زنی از ۳٦/٦۷ درصد در شاهد به ۲۳/۸۳۳ درصد در ۱٤۰۰ گری و در ژنوتیپ G_{22} از ٤۹/۵ درصد در شاهد به ۲۵/۳۳ درصد در ۱٤۰۰ گری کاهش نشان داد.

همچنین درصد تشکیل میوه (شکل ۱) و متوسط تعداد بذر در هر میوه (شکل ۲)، با افزایش شدت دز پرتو گاما از ۲۵۰ تا ۱٤۰۰ گری در هر دو والد مادری به‌ویژه در ژنوتیپ G_{32}، در مقایسه با دز شاهد کاهش یافت. با افزایش شدت دز اشعه گاما، میزان ریزش میوه‌ها و تشکیل بذرهای پوک و خالی از جنین نیز افزایش یافت (شکل ۳). سطوح مختلف اشعه گاما از صفر تا ۱٤۰۰ گری بر اندازه میوه‌ها مؤثر بودند و باعث کاهش اندازه آنها شدند (شکل ۳). از نظر زمان برداشت وضعیت تکاملی جنین‌ها در برداشت ۱۹ روزه بهتر از ۱٦ روزه بود.

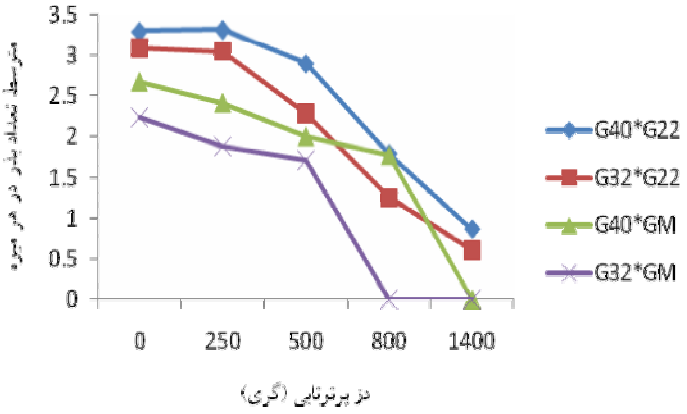
جدول ۲- درصد جوانه‌زنی در تعداد ۶۰۰ دانه گرده در هر تیمار پرتوتابی شده و شاهد در محیط درون شیشه‌ای

دز (گری)	*درصد جوانه‌زنی G_M	*درصد جوانه‌زنی G_{22}
۰	۳۶/۶۶۷ a	۴۹/۵۰۰ a
۲۵۰	۳۴/۸۳۳ ab	۴۶/۸۳۳ a
۵۰۰	۳۴/۱۶۷ ab	۴۵/۳۳۳ a
۸۰۰	۳۰/۸۳۳ b	۳۹/۵۰۰ b
۱۴۰۰	۲۳/۸۳۳c	۲۵/۳۳۳ c

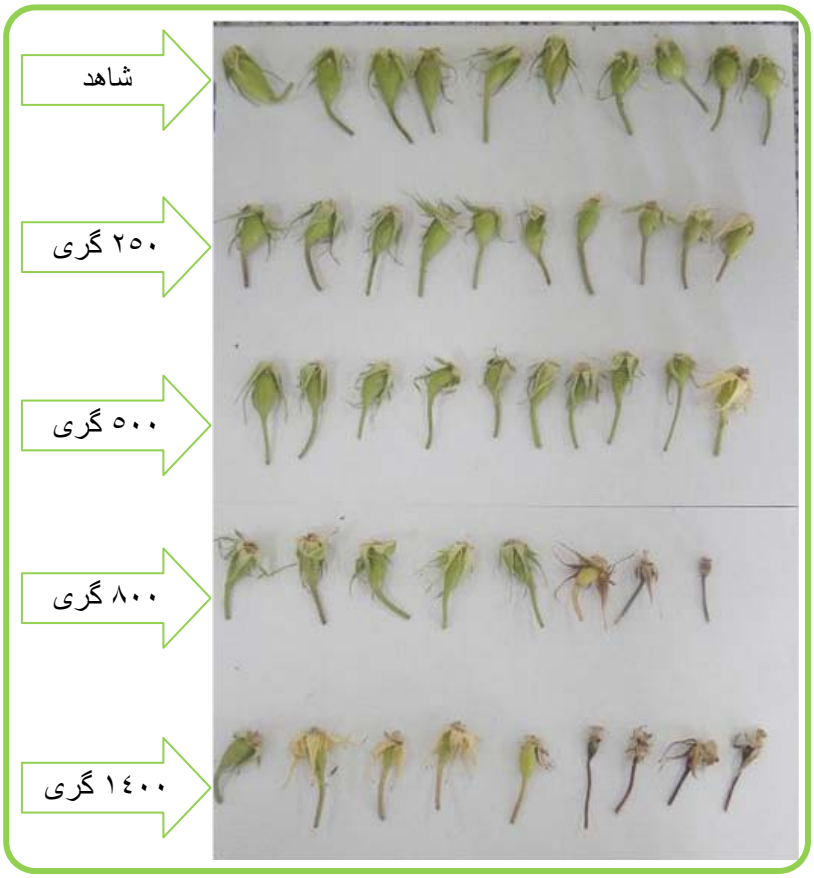
* حروف مشابه در هر ستون در سطح آلفای ۵ درصد بر اساس آزمون نیومن کلز تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱- نمودار اثر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان تشکیل میوه در تلاقی‌های مختلف گل‌محمدی



شکل ۲- نمودار اثر دزهای مختلف پرتو گاما بر میزان تشکیل بذر در تلاقی‌های مختلف گل‌محمدی



شکل ۳- اثر پرتو بر اندازه هیپ‌های حاصل از پایه G_{40} در تلاقی با گرده‌های پرتوتابی شده ژنوتیپ G_{22}

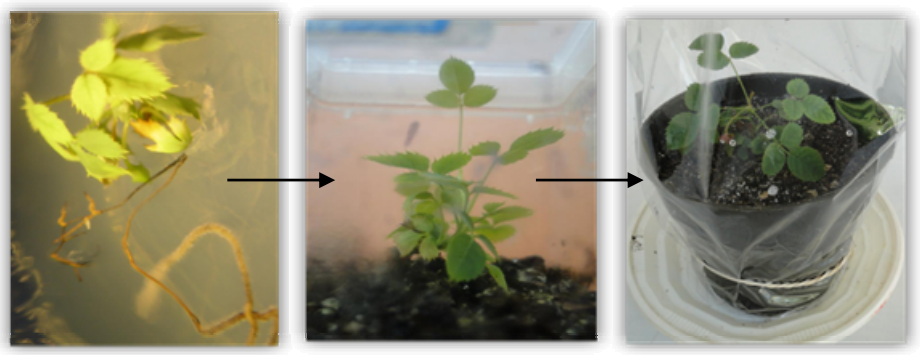
از بین سه محیط کشت اولیه مورد استفاده برای کشت جنین‌ها، بیشترین جوانه‌زنی جنین‌ها در محیط C (vit + MS (Macro element) ½) مشاهده شد. بنابراین در بازکشت‌های بعدی از این محیط با ترکیبات هورمونی مختلف با توجه به هدف مورد نظر استفاده گردید. البته وجود تیمار سرمادهی برای رشد جنین گل‌محمدی ضروری بود. در ژنوتیپ G_{40} در اثر گرده G_{22} از مجموع ۲۲۶ فندقه، ۷۳ جنین جدا شد (شکل ٤) که از این تعداد، تنها ۲۱ گیاهچه بدست آمده که ۱۲ گیاهچه از شاهد، ۷ گیاه از دز ۲۵۰ گری (شکل ۵) و ۲ گیاه از دز ۵۰۰ گری حاصل شدند. در اثر گرده G_M نیز از مجموع ۱۷۷ فندقه، تنها ٦۳ جنین حاصل شد که از این تعداد جنین، فقط ۱۳ گیاهچه که ۹ تا از شاهد و ٤ تا از دز ۲۵۰ گری بودند باززایی شدند. در ژنوتیپ G_{32} از مجموع ۱۷٤ فندقه حاصل از گرده G_{22} تنها ۱٦ جنین و از مجموع ۹۲ فندقه حاصل از گرده‌های G_M تنها ۹ جنین بدست آمدند که هیچ یک قادر به باززایی گیاهچه نشدند.

الف ب ج د و

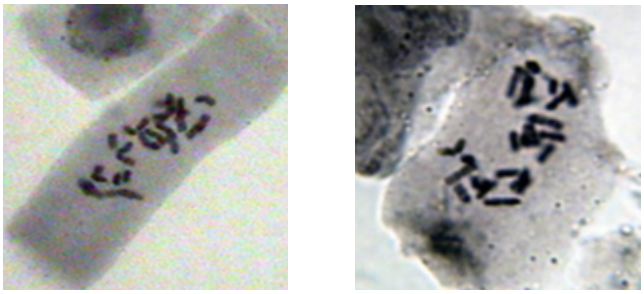
شکل ٤- برخی جنین‌های حاصل از گل‌محمدی در سال ۱۳۸۸: الف) جنین کامل و نرمال در داخل پوشش تستا. ب) جنین غیر نرمال. ج) جنین سقط شده. د) بذر پوک (فاقد جنین). ر) جنین کامل و بالغ

شکل ٥- نمونه‌هایی از گیاهچه‌های حاصل از تیمار اشعه ۲۵۰ گری در تلاقی $G_{40} \times G_{22}$

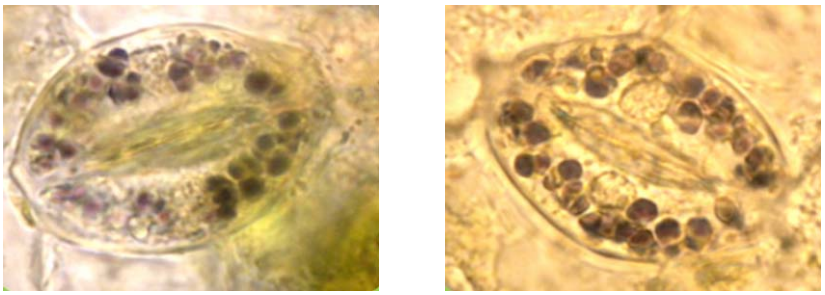
تعیین سطح پلوئیدی به روش شمارش کروموزومی، در تنها گیاه حاصل از تیمار شاهد که به گلدان منتقل شده بود (شکل ٦) و دارای مقدار کافی ریشه بود انجام شد و حدود ۲۸ کروموزوم در سلول‌های نوک ریشه این گیاه شمارش شد (شکل ۷). در سایر گیاهچه‌های بدست‌آمده متأسفانه به‌دلیل عدم تولید ریشه کافی این آزمایش موفق نبود. در بررسی‌های مورفولوژیکی مشاهده شد که تعدادی از گیاهان در تیمار ۲۵۰ گری از نظر خصوصیات ظاهری با گیاهان حاصل از تیمار شاهد متفاوت بودند. برای مثال دارای اندازه برگ کوچکتر، رنگ برگ روشن‌تر و محور ساقه ظریف‌تر بودند. از روش شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه برای بررسی این دو گروه استفاده شد. این روش نسبت به روش‌های شمارش کروموزوم‌ها آسان‌تر و سریع‌تر می‌باشد. تعداد کلروپلاست‌ها در نمونه دیپلوئید (حاصل از تیمار شاهد)، ٣٦-٣٤ عدد و در نمونه مشکوک به هاپلوئیدی (حاصل از تیمار ۲۵۰ گری)، ۲۰-۱۸ عدد بودند که تفاوت معنی‌داری بود (شکل ۸). تیمار ۲۵۰ گری بیشترین میزان تولید گیاهان مشکوک به هاپلوئیدی را داشت.



شکل ٦- تنها گیاه انتقال داده شده به خاک حاصل از تیمار شاهد در تلاقی $G_{40} \times G_{22}$



شکل ۷- کروموزوم‌های گیاهان دیپلوئید حاصل از تیمار شاهد، 2n=4x=28



الف **ب**

شکل ۸- تعداد کلروپلاست در سلول‌های نگهبان روزنه.

الف) گیاه دیپلوئید. ب) گیاه مشکوک به هاپلوئیدی

بحث

نتایج آزمون جوانه‌زنی دانه‌های گرده رز معطر و گل‌محمدی با نتایج Peixe و همکاران (۲۰۰۰) در آلو اروپایی و Sadat Hosseini و همکاران (۲۰۰۹) در گردو که شدت دز اشعه بر میزان جوانه‌زنی دانه‌های گرده را مؤثر گزارش کردند مطابقت داشت. اما با نتایج Zhang و Lespinasse (۱۹۹۱) که گزارش کردند در گرده سیب با افزایش دز پرتو از صفر تا ۱۰۰۰ گری بین میزان

جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و همچنین Frolicher و همکاران (۲۰۰۷) که میزان جوانه‌زنی در گرده نارنگی را از ۸۵ درصد در شاهد به ۷۸ درصد در دز ۹۰۰ گری گزارش کردند مطابقت نداشت. تفاوت معنی‌دار در میزان جوانه‌زنی گرده‌ها با افزایش سطوح مختلف اشعه گاما در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ما بیانگر حساس بودن گرده آنها به اشعه گاما بر خلاف درختانی ازجمله سیب و نارنگی و مشابه درختانی مانند آلو اروپایی و گردو است. هر چند در مورد گل‌محمدی تا دوز ۵۰۰ گری اختلاف معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد.

از نظر درصد تشکیل میوه و متوسط تعداد بذر در هر میوه نیز، نتایج ما با نتایج Musial و Przywara (۱۹۹۸) در کیوی فروت، Peixe و همکاران (۲۰۰۰) در آلو اروپایی، Frolicher و همکاران (۲۰۰۷) و Sadat Hosseini و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. همانطورکه ملاحظه شد، درصد تشکیل میوه و متوسط تعداد بذر در هر میوه به شدت دز اشعه و نوع والد مادری و نوع والد گرده‌دهنده بستگی داشت. به‌طوری‌که G_{32} نسبت به G_{40} در تلاقی‌های مشابه همواره میزان بذر و میوه کمتری داشت. از بین والدین پدری نیز G_{22} نسبت به G_M در تلاقی‌های مشابه همواره گرده‌دهنده بهتری بود و منجر به تولید میوه و بذر بیشتری شد. دلیل تشکیل میوه کمتر در دزهای بالاتر احتمالاً ناشی از کاهش درصد جوانه‌زنی دانه‌های گرده در دزهای بالاتر، عدم رشد مطلوب لوله گرده در دانه‌های گرده جوانه‌زده و در نتیجه نرسیدن به تخمدان باشد. این نتایج با نتایج آزمون جوانه‌زنی دانه‌های گرده پرتودیده در شرایط کشت درون شیشه‌ای مطابقت دارد. میوه‌های تشکیل حاصل از دانه‌های گرده تیمار شده با دزهای ۲۵۰ تا ۱۴۰۰ گری نسبت به نوع شاهد ریزتر بودند که با گزارش Zhang و Lespinasse (۱۹۹۱) در سیب مطابقت نداشت، اما با نتایج Sadat Hosseini و همکاران (۲۰۰۹) در گردو مطابقت داشت.

بنابراین وجود اختلاف معنی‌دار بین تعداد کلروپلاست سلول‌های روزنه در گیاهان دیپلوئید و گیاهان مشکوک به هاپلوئیدی، که با نتایج Yang و همکاران (۲۰۰۵) و Sadat Hosseini و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت، نشان داد که احتمالاً بین سطوح پلوئیدی مختلف در گل‌محمدی در غلظت کلروپلاست‌ها تفاوت وجود دارد. Kurtar و همکاران (۲۰۰۲) دزهای ۲۵ و ۵۰ گری در کدو و Frolicher و همکاران (۲۰۰۷) دزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ گری در نارنگی را بهترین دزها برای به دست آوردن گیاهان هاپلوئید گزارش کردند. اما به نظر می‌رسد پرتوتابی دانه‌های گرده به‌وسیله اشعه گاما برای تولید گیاهان هاپلوئید به روش بکرزایی القائی موفق است و لازم است پژوهش‌های بیشتری با کاربرد طیف وسیعی از دزهای اشعه گاما و با صرف وقت و دقت بیشتر در این زمینه صورت پذیرد.

سپاسگزاری

در پایان از تمام عزیزان گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور **و همچنین آقای مهندس فتح‌اللهی (کارشناس‌ارشد بخش دزیمتری** پژوهشکده کشاورزی و پزشکی هسته‌ای) و سایر دوستانی که **به هر نحو در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند بی‌نهایت سپاسگزاریم.**

منابع مورد استفاده

- Bouvier, L., Zhang, Y.X. and Lespinasse, Y., 1993. Two methods of haploidization in Pear, *Pyrus communis L.*: Greenhouse seedling selection and *in situ* parthenogenesis induced by irradiated pollen. Theoretical and Applied Genetics, 87: 229–232.
- Chalak, L. and Legave., J.M., 1997. Effects of pollination by irradiated pollen in *Hayward kiwifruit* and spontaneous doubling of induced parthenogenetic trihaploids. Scientia Horticulturae, 68: 83–93.
- Chevallier, A., 1996. The encyclopedia of medicinal plant. Dorling Kindersely, London, pp 336.
- Crespel, L., Gudin, S., Meynet, J. and Zhang, D., 2002. AFLP-based estimation of 2n gametophytic heterozygosity in two parthenogenetically derived dihaploids of *Rosa hybrida* L., Theoretical and Applied Genetics, 104: 451-456.
- El Mokadem, H., Crespel, L., Meynet, J. and Gudin, S., 2002. The occurrence of 2n-pollen and the origin of sexual polyploids in dihaploid Roses (*Rosa hybrida* L.), Euphytica, 125: 169-177.
- Frolicher, Y., Bassene, J. Jedidi-Neji, E. Dambier, D. Morillon, R. Bernadini, G. Costantino, G. and Ollitrault, p., 2007. Induced parthenogenesis in Mandarin for haploid production: Induced procedure and genetic analysis of plantlets. Plant Cell Reports, 26: 937-944.
- Gudin, S., 2000. Rose: genetics and breeding. Plant Breed. Rev., 17: 159-189.
- Gudin, S., Arene, L. and Bulard, C. 1991. Influence of season on rose pollen quality, Sexual Plant Reproduction., 4: 113-117.
- Hofer, M. and Grafe, C.h., 2003. Induction of doubled haploids in Sweet cherry *(Prunus avium* L.). Euphytica 130: 191–197.
- Khush, G.S. and Virmani, S.S., 1996. Haploids in plant breeding. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE(eds) *In vitro* Haploid Production in Higher Plants, Dordrecht: Kluwer, 1: 11–33.
- Kurtar, E.S., Sari N. and Abak K., 2002. Obtention of haploid embryos and plant through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). Euphytica, 127: 335-344.
- Maria, A.G., 2006. Doubled haploid production in fruit crops. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 86: 131-146.
- Meynet, J., Barrade, R., Duclos, A. and Siadous, R., 1994. Dihaploid plants of roses (*Rosa hybrida*, cv 'Sonia') obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds, Agronomie, 2: 169-175.
- Musial, K. and Przywara, L., 1998. Influence of Irradiated pollen on Embryo and Endosperm Development in Kiwifruit. Annals of Botany, 82: 747-756.
- Peixe, A., Campos, M.D. Cavaleiro, C. Barroso, J. and Paisa, M.S., 2000. Gamma-irradiated pollen induces the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in European Plum (*Prunus domestica* L. ,CV.Rainha Claudia verda). Scientia Horticulturae, 86: 267-278.
- Sadat hosseini, M., Vahdati, K. Lotfi, M. and Hassani, D., 2009. Induction of haploid in walnut by parthenogenesis. The 6th National Biotechnology Congress of Iran. 13-15 Agu., 2009, Tehran, Iran. 1208: 1-6.
- Tabaeizadeh, Z. and Khosh-Khui, M., 1981. Anther culture of *Rosa*, Scientia Horticulturae, 15: 61-66
- Tabaei-Aghdaei, S.R., Farhangian, S. and Jafary, A.A., 2005. Comparison of flower yield among *Rosa damascene* Mill. genotypes from central regions of Iran. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant and Genetic Research, 12: 377-391
- Wissemann, V., Mollers, C. and Hellwig, F.H., 1998. Microspore culture in the genus *Rosa*, further investigations, Journal of Applied Botany, 72: 7-9
- Yang A.F., Meng H. and Zhang J.R., 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. Cv. Zhanhua. Plant Cell Reports., 24:671-676
- Zhang, Y.X. and Lespinasse, Y., 1991. Pollination with gamma-irradiation pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. Euphytica, 54: 101–109

Investigation of gamma ray effects on pollen germination and parthenogenic haploid embryogenesis in *Rosa damascena* Mill.

K. Palvaneh[1], A. Ghamari Zare[*2], M. Lotfi[3], T.S. Naraghi[4], F. Asadi-corom[5] and S.R. Tabaei-Aghdaei[6]

1- M.Sc., Plant production, gardening plant breeding Tehran University, Abouraihan campuse, Pakdasht, I.R. Iran
2*- Corresponding author, Assis. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran.
E-mail: ghamari-zare@rifr-ac.ir
3- Assis. Prof., Tehran University, Abouraihan campuse, Pakdasht, I.R. Iran
4- B.Sc., Research Institute of forests and rangelands, Tehran, I.R. Iran.
5- M.Sc., Research Institute of forests and rangelands, Tehran, I.R. Iran
6- Assoc. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. Iran

Received: 10.16.2011 Accepted: 06.01.2012

Abstract

Haploid and doubled haploid (DH) plants are able to accelerate plant breeding programs. This study was conducted on gamma ray irradiated pollen grains of damask rose crosses and induced parthenogenic haploid embryos. Two genotypes of G_{32} and G_{40} of damask rose as maternal plant and G_{22} and mixed of forty collected genotypes from all over the country were used as paternal plants. After determining of suitable collecting time, paternal blooms were irradiated by gamma ray from 60 cobalt in five levels 0, 250, 500, 800 and 1400 Gy. Emasculated maternal flowers were pollinated by the irradiated pollens. Fruits were collected 16 and 19 days after pollination. In order to determination a suitable culture medium the immature embryos were extracted and cultured in three combination of MS medium. To overcome the existing dormancy, half part of embryos was kept at 1-4 degree centigrade for 2 month. Fruit formation percentage and seed averages per fruit depended on ray intensity, maternal and paternal parents. Half MS + vit in was better than the other medium. Chilling was necessary for overcoming the embryo dormancy. On the basis of morphological studies, especially number of chloroplasts in guard cells, the most haploid embryos were obtained by 250 Gy.

Key words: Damask rose, Haploidization, Irradiation, Pollen grain, Rose.