بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای پنج رقم گل رز شاخه بریده (*Roza hybrid* L.)

In vitro Culture Improvement of Five Cut Rose (*Rosa hybrid* L.) Cultivars

فتانه یاری[۱*]، امیر موسوی[۲]، یونس مستوفی[۱]، ذبیح‌اله زمانی[۱]، سیدمهدی سیدی[۲]، علی‌رضا مطلبی آذر[۳] و مارگیت لایمر[۴]

چکیده

با توجه به ظرفیت بالای کشت بافت گیاهی در تکثیر، دست‌ورزی و نگهداری رقم‌های اصلاح شده، پنج رقم گل رز شاخه بریده تجاری Super Green، Maroussia، Full House، Cool Water، Cherry Brandy، در ایران مورد ارزیابی قرار گرفتند. قطعات ۲ سانتی-متری ساقه، پس از گندزدایی سطحی با هیپوکلریت سدیم تجاری (۵۰- ۱۰٪) و سپس غوطه‌وری در اتانول ۷۰٪ (v/v) به مدت ۲ الی ۵ دقیقه، در محیط MS کشت شدند. جوانه‌های رشد کرده به منظور پرآوری در محیط‌های حاوی تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشدی (۲/۲۲- ۱/۱۱- ۰/۵۵- ۰/۰ میکرومولار) BA و (۰/۵۴- ۰/۲۷- ۰/۰۵۴- ۰/۰ میکرومولار) NAA مستقر شدند. برای القای ریشه در رقم‌ها، تیمار ترکیبی (۹/۹ میکرومولار) IBA و (۵/۴ میکرومولار) NAA اعمال شد. بیش‌ترین درصد شاخه‌های عاری از آلودگی در تیمار ۵۰٪ هیپوکلریت سدیم تجاری و اتانول ۷۰٪ به مدت ۵ دقیقه به دست آمد. نرخ پرآوری در ترکیب‌های تیماری از ۰/۰٪ تا ۸۲٪ بسته به رقم متغییر بود. تیمار (۲/۲۲ میکرومولار) BA و (۰/۲۷ میکرومولار) NAA در تمامی رقم‌ها از بیش‌ترین درصد پرآوری و رشد برخوردار بود. درصد تولید ریشه بسته به رقم؛ از ۰/۰٪ تا ۷۱/۴٪ تفاوت نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ضدعفونی سطحی، پرآوری، القای ریشه

---

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق دکتری (استادیار فعلی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین) و دانشیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

۲. استادیاران پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

۳. استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۴. استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی وین

*: نویسنده مسوول

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران می‌باشد.

مقدمه

گیاه زینتی رز با بیش از ۲۰۰۰ سال تاریخچه کشت، از نظر اقتصادی یکی از مهم‌ترین گیاهان به حساب آمده که کشت و کار گسترده‌ای در کل جهان دارد. از دیگر سو، گل رز یکی از مشهورترین گل‌ها، در بین محصولات شاخه بریده می‌باشد که معمولا از طریق پیوند شاخه یا جوانه تکثیر می‌شود.

تکنیک‌هایی که امروزه در حال بسط و گسترش است، دریچه جدیدی از صنعت باغبانی را به روی پرورش دهندگان باز نموده است. موفقیت تکثیر انبوه رز در شرایط کشت درون شیشه‌ای مرهون ریزازدیادی است (Rout *et al.* 2006). در طی سال‌های گذشته پژوهش‌هایی مبنی بر تکثیر درون شیشه‌ای رز به نگارش درآمده است. در چند سال اخیر، کشت درون شیشه‌ای، صنعت تجاری خزانه‌داری را متحول نموده است (Pati *et al.* 2006 & Debener and Oyant, 2009). گیاهچه‌های ریزازدیادی مناسب تولید گل‌های شاخه-بریده بوده و شاخه‌دهی بیش‌تر، بهتر و در برخی موارد عملکرد گل‌دهی آن‌ها نیز بالاتر است (Pati *et al.*, 2006; Reist, 1985). از طرف دیگر رزهای پاکوتاه کشت بافتی، به عنوان گیاه گلدانی، دارای سرعت رشد بیش‌تر، گلدهی زودتر و شاخه‌های کوتاه‌تر با انشعابات جانبی بیش‌تری نسبت به گیاهان تکثیری حاصل از شیوه‌های سنتی بوده‌اند (Pati *et al.* 2006). اولین گزارش‌ها در راستای ریزازدیادی، تکثیر و پرآوری شاخه و ریشه‌زایی موفق در گل رز متعلق به سال‌های ۱۹۶۹-۱۹۷۰ می‌باشد (Elliott, 1970; Jacobs *et al.*, 1970b; Jacobs *et al.*, 1970a). ریزازدیادی گل رز توسط پژوهش‌گران زیادی با استفاده از کشت مریستم انتهایی و جوانه‌های جانبی انجام شده است (Khosh-Khui and Teixeira da Silva, 2006; Pati *et al.* 2006; Rout *et al.* 2006; Asadi *et al.* 2009; Debener and Oyant, 2009; Jabbarzadeh and Khosh-Khui, 2005). محیط کشت Murashige and Skoog (MS) بهترین نرخ رشد و پرآوری را برای رقم‌ها مختلف رز القا می‌کند (Pati *et al.*, 2006 & Davies, 1980).

یکی از ملزومات کشت بافت، آشنایی با رفتارهای فیزیولوژیکی و حساسیت گونه‌های گیاهی به آلودگی پاتوژن-های مختلف می‌باشد. مواد مختلفی از جمله هیپوکلریت سدیم تجاری (۱۰-۵۰٪)، اتانول ۷۰٪ و کلرید جیوه در غلظت‌های متفاوت و مدت زمان تیمار از چند ثانیه تا چندین دقیقه با توجه به بافت گیاهی به‌منظور ضدعفونی سطحی و استقرار ریزنمونه‌ها تاکنون مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Asadi *et al.* 2009; Azadi *et al.* 2007; Debener and Oyant, 2009; Pati *et al.* 2006 and Rout *et al.* 2006).

تنظیم کننده رشد بنزیل آدنین (BA) در غلظت‌های کم در برخی رقم‌های گل رز سبب تحریک نمو جوانه‌های جانبی و در برخی دیگر بی‌تاثیر است (Pati *et al.*, 2006; Azadi *et al.*, 2007). افزودن BA (۴/۴۴-۴۴/۴µM) در محیط پرآوری شاخه برای شکست رکود جوانه و پرآوری شاخه‌ها در رقم‌های گل رز ضروری است. تاثیر BA، نسبت به N6 (۲-ایزوپنتیل آدنین) در پرآوری شاخه بیش‌تر است و ترکیب تنظیم کننده رشد ایندول استیک اسید (IAA) با BA، بی‌تاثیر بوده است (Pati *et al.*, 2006). تکثیر برخی از دورگه‌های گل رز در محیط کشت MS حاوی BA و نفتالین استیک اسید (NAA) بهینه شده است (Azadi *et al.* 2007; Carelli and Echeverrigaray, 2002; Asadi *et al.* 2009 and Pati *et al.*, 2006). القای ریشه در شاخه‌های در حال رشد چه به‌طور مستقیم از طریق تنظیم کننده رشدهای مصنوعی یا پس از حذف سیتوکنین‌ها از محیط کشت، بستگی به گونه و رقم دارد. از طرف دیگر، توانایی تولید ریشه؛ بستگی به برهم کنش فاکتورهای بیرونی و درونی دارد. اغلب پژوهش‌گران موفق به ریشه‌دار کردن شاخه‌های پرآوری شده کشت بافتی در محیط‌های حاوی غلظت‌های کم IBA، IAA یا NAA شده‌اند (Asadi *et al.* 2009; Azadi *et al.* 2007 and Rout *et al.* 1990 & 2006).

طی سال‌های گذشته گزارش‌های زیادی مبنی بر تکثیر درون شیشه‌ای گل رز منتشر شده است، با این وصف، یک شیوه یکسان و متمرکز در این زمینه با توجه به تنوع گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها، قابل ارایه نبوده است. از طرفی، پرورش دهندگان گل رز در ایران، رقم‌های تجاری را به‌صورت محدود خریداری می‌کنند که و حفظ و تکثیر این رقم‌ها حایز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش در ابتدا به استقرار ریزنمونه‌های کاملاً عاری از پاتوژن پرداخته شده و سپس سعی در بررسی تاثیر عواملی از جمله تنظیم کننده‌های رشد و ژنوتیپ در بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای برخی رقم‌های تجاری شاخه بریده گل رز شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پنج رقم تجاری رز شاخه بریده به نام‌های Maroussia، Full House، Cool Water، Cherry Brandy، Super Green پس از انتقال از گلخانه به اتاقک‌های رشد به

مدت ۳ هفته تحت شرایط بهینه تغذیه‌ای (محلول غذایی هوگلند) نگه‌داری شدند. در طی این مدت تمامی جوانه‌های گل به‌منظور بهبود رشد جوانه‌های جانبی، سربرداری و سمپاشی برای کنترل آلودگی‌های احتمالی انجام شد.

ضد عفونی و استقرار جوانه‌ها

قطعه‌هایی به طول ۲cm از ساقه جوانه‌دار گیاهان سالم و قوی ارقام مورد نظر پس از حذف برگ‌ها، تحت تیمارهای مختلف ضد عفونی سطحی مطابق جدول ۱ قرار داده شدند. بدین‌صورت که در داخل هود استریل، ابتدا جوانه‌ها در محلول اتانول ۷۰٪ (v/v) به‌مدت ۲ الی ۵ دقیقه، روی شیکر قرار گرفته و پس از یک‌بار شستشو با آب مقطر سترون، به‌مدت ۲۰ دقیقه در غلظت‌های مختلف محلول هیپوکلریت سدیم همراه با ۳-۴ قطره Tween80، غوطه‌ور شدند.

در ادامه نمونه‌ها ۳ دفعه هر بار به‌مدت ۵ دقیقه با آب مقطر سترون شسته شدند. پس از برش مجدد انتهای قطعات، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۴/۴۴ میکرومولار BA، ۰/۵۴ میکرومولار NAA (اتوکلاو شده به‌مدت ۲۰ دقیقه تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر) (جدول۲)، کشت و تحت شرایط ۱۶ ساعت طول روز در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در هر ظرف کشت ۵ الی ۷ ریزنمونه کشت شد. پس از گذشت یک هفته درصد جوانه‌های عاری از آلودگی و تعداد ریزنمونه‌های رشد کرده شمارش شدند. این آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد.

پرآوری شاخساره‌ها

جهت بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد بر پرآوری شاخساره‌ها، محیط کشت‌های مختلفی (جدول ۲ و ۶) مورد بررسی قرار گرفتند. شاخساره‌های سالم رشد نموده در محیط کشت استقرار پس از ۴ هفته قرارگیری در ۱۶ ساعت طول روز در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، به محیط‌های کشت پرآوری منتقل شده و هر ۵-۴ هفته در محیط کشت تازه واکشت شدند. صفات درصد پرآوری، درصد رشد شاخساره، میانگین تعداد شاخساره‌های تولیدی و میانگین طول شاخساره اندازه‌گیری شد. لازم به‌ذکر است، تعداد ریزنمونه-هایی که جوانه آن‌ها رشد نموده و تبدیل به شاخساره شده بود شمارش شد و در پایان به‌صورت درصد رشد شاخساره مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱: نوع، غلظت و مدت زمان مواد مورد استفاده در تیمارهای ضد عفونی سطحی

Table 1: Different disinfection type, concentrations and duration of use in treatments

Treatment number	Running water	(5.25% commercial)Bleach	Ethanol 70%
1	-	10% (20 min)	-
2	-	10% (20 min)	2 min
3	-	20% (20 min)	2 min
4	-	30% (20 min)	2 min
5	-	30% (20 min)	5 min
6	-	50% (20 min)	2 min
7	-	50% (20 min)	5 min
8	20 min	30% (20 min)	5 min
9	20 min	50% (20 min)	5 min

جدول ۲: ترکیبات محیط کشت‌های استقرار، پرآوری و ریشه زایی

Table 2: Composition of media for establishment, proliferation and root induction

Media component	Establishment media	Proliferation media	Root induction meida
MS	MS (salt)	MS (salt + vitamins)	½ MS salt+ full MS vitamins
BA	4.44µM	0-4.44µM	-
NAA	0.54µM	0-0.54µM	5.4µM
IBA	-	-	9.9µM
Sucrose	30 g	30 g	30 g
Agar	7.5 g/l	7.5 g/l	7.5 g/l
pH	5.7	5.7	5.7

در ترکیب محیط کشت MS از کلات آهن (۹۶ میلی‌گرم بر لیتر) FeEDDHA به جای (۳۶/۷ میلی‌گرم بر لیتر) FeEDTA استفاده شد. این آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد.

القای ریشه در شاخساره‌ها

شاخساره‌هایی قوی با ارتفاع تقریبی ۱ سانتی‌متر از بین تمامی تیمارهای مرحله قبل انتخاب و به‌منظور بررسی واکنش ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در محیط کشت ریشه‌زایی در محیط (½ MS salt+ full MS vitamins حاوی ۹/۹ میکرومولار IBA و ۵/۷ میکرومولار IAA) حاوی کلات آهن FeEDDHA کشت شدند. روی هر شاخساره تنها ۱ برگ و جوانه انتهایی در حال رشد نگه‌داری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و ۵ ریزنمونه در هر ظرف کشت، انجام گرفت. پس از ۲ هفته شاخساره‌ها به محیط عاری از تنظیم کننده رشد و ۱۶ ساعت طول روز منتقل شدند و پس از گذشت دو هفته دیگر، درصد ریشه-زایی و درصد رشد شاخساره رقم‌های مورد مطالعه اندازه گیری شد. نمونه‌ها در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگه-داری شدند.

محاسبات آماری

پس از ثبت داده‌ها در نرم افزار EXCEL و تبدیل داده به روش جذری، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

ضد عفونی و استقرار جوانه‌ها

عاری سازی از پاتوژن: مطابق نتایج تجزیه واریانس (جدول۳)، واکنش رقم‌های مختلف بسته به فاکتورهای ضد عفونی سطحی متغیر بود. در بین فاکتورهای مختلف ضدعفونی سطحی، زمانی که ریزنمونه‌ها قبل از فاکتور در زیر آب جاری شستشو داده شدند، کم‌ترین درصد آلودگی را داشتند و روند کاهش آلودگی حاکی از آن بود که افزایش غلظت هیپوکلریت سدیم و افزایش زمان غوطه‌وری در الکل تاثیر گذارتر بوده است (شکل ۱). کم‌ترین میزان آلودگی در رقم Cool Water و پس از آن در رقم Full House مشاهده شد. زمانی که ریز نمونه‌ها قبل از فاکتور ضدعفونی سطحی در زیر آب جاری شستشو داده شدند، کم‌ترین درصد آلودگی را داشتند و این امر بیان‌گر تاثیر مثبت شستشو با آب جاری است، روند کاهش آلودگی در تمامی ارقام حاکی از آن است که افزایش غلظت هیپوکلریت سدیم و افزایش زمان غوطه‌وری در الکل تاثیر گذار بوده است.

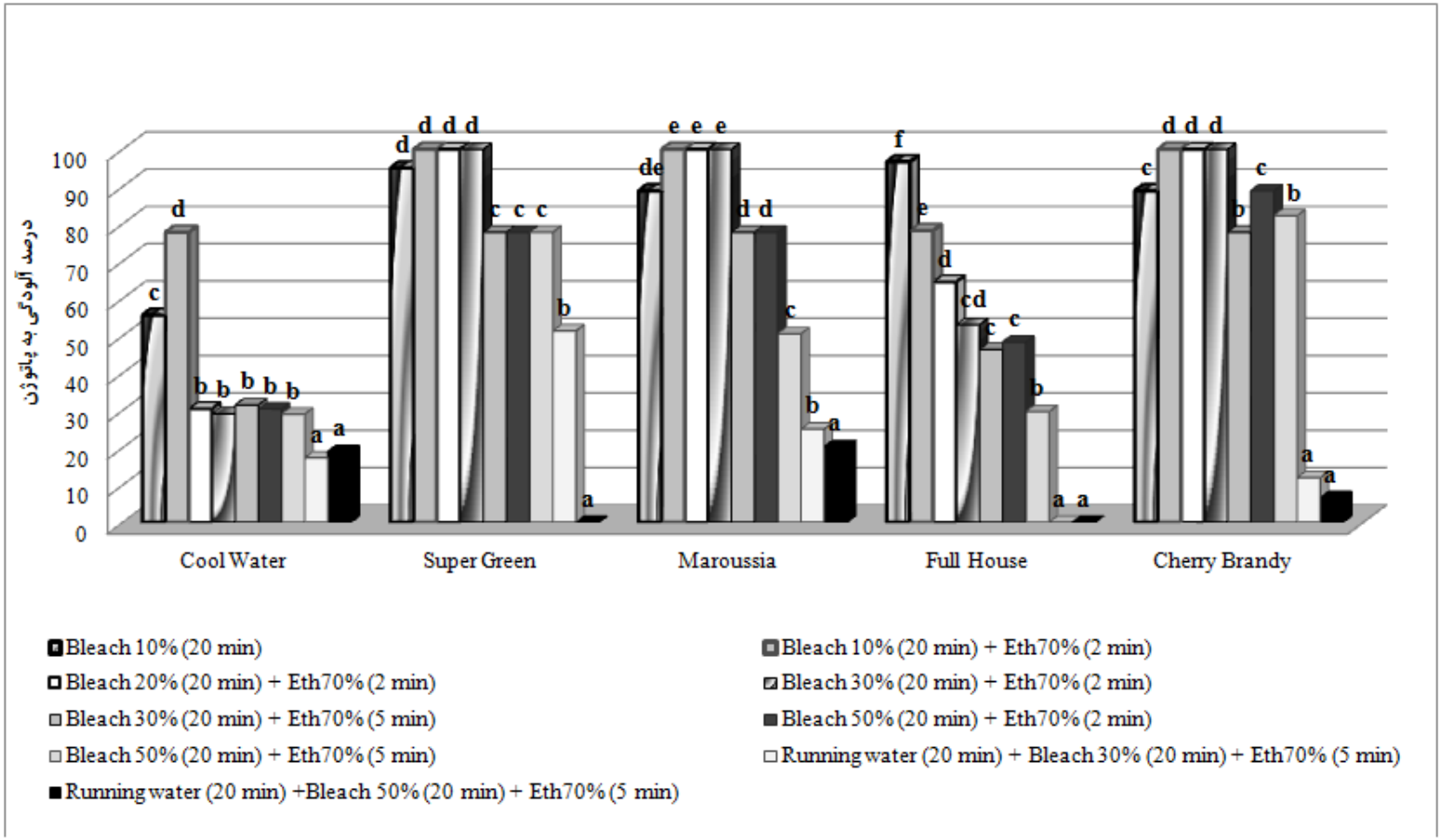
لازم به‌ذکر است با این که در رقم‌های Supper Green، Maroussia و Cherry Brandy درصد آلودگی در تمامی تیمارها، بسیار بالا بوده است ولی فاکتور شستشو با آب و پس غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۵۰٪ و در ادامه ۵ دقیقه اتانول ۷۰٪ توانست درصد آلودگی را به تقریب به صفر برساند. به نظر می‌رسد ژنوتیپ نقش به‌سزایی در چگونگی تاثیر مواد ضدعفونی سطحی دارد، به‌طور مثال رقم Cool Water در تمامی تیمارها از کم‌ترین آلودگی برخوردار بود. امری واضح به-نظر می‌رسد که میزان واکس سطحی، کوتیکول، خار و کرک روی برگ‌ها و ساقه وابسته به ژنوتیپ است (Gudin, 2000; Julien, 2004 and Korban, 2007) و هر قدر میزان کرک و یا واکس سطحی در رقمی کم‌تر باشد، سطح تماس مواد ضدعفونی سطحی افزایش یافته و اثرگذاری آن‌ها نیز بهبود می‌یابد. در عین حال شستشو با آب جاری و مواد مویان خود با از بین بردن آلودگی‌هایی همانند گرد و غبار و حتی نازک کردن لایه مومی پوشاننده سطح برگ‌ها و ساقه‌ها ضریب احتمال تماس مواد سترون ساز را با ریزنمونه افزایش می‌دهد. نتایج این بررسی نیز موید این مطلب می‌باشد.

درصد رشد ریز نمونه‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها (جدول ۴) نشان‌داد که درصد رشد جوانه‌های رقم‌های مختلف یک هفته پس از کشت در محیط استقرار اولیه، متفاوت بود. درصد رشد، تنها در بهترین فاکتورهای ضدعفونی سطحی (شماره ۸ و ۹) مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که غلظت هیپوکلرید سدیم بر رشد جوانه‌ها تاثیر گذاشته است. اثر متقابل فاکتور ضد عفونی سطحی × رقم نیز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود.

به‌نظر می‌رسد افزایش مدت زمان غوطه‌وری در الکل و غلظت بیش‌تر هیپوکلرید سدیم علاوه بر تاثیر مثبت بر رفع آلودگی، به رشد بهتر ریزنمونه‌ها نیز کمک نموده است (شکل۲).

هیپوکلریت سدیم سبب اکسید شدن سلول‌های میکروارگانیسم‌ها شده و بیش‌تر اجزای اصلی سلول، از جمله لیپیدها، پروتئین ها و DNA را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Sana *et al.* 2006 & Jang *et al.* 2008).

اتانول، ماده‌ای دهیدراته کننده بوده که باعث تخریب غشای سلولی، واسرشت شدن سریع پروتیین‌ها و در ادامه برهم خوردن متابولیسم سلول می‌شود (Larson and Morton, 1991 & Cronmiller *et al.* 1999).



شکل ۱: نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل رقم× ضد عفونی سطحی بر درصد آلودگی به پاتوژن. مطابق آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشند.

Figure 1: Interaction effect of genotype × surface disinfection on percentage of infected explant. Means with different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ according to Dunn's multiple comparison

جدول ۳: تجزیه واریانس اثر ضدعفونی سطحی بر درصد آلودگی ریزنمونه ها

Table 3: Analysis of variance of surface disinfection on percentage of explants infected

Source	DF	Mean Square
		Explants infection %
Cultivar	4	1.414 **
Disinfection	8	3.998 **
Disinfection × Cultivar	32	0.228 **
Error	90	0.013
CV	-	4.43

**:significant differences at 1% probability level

**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

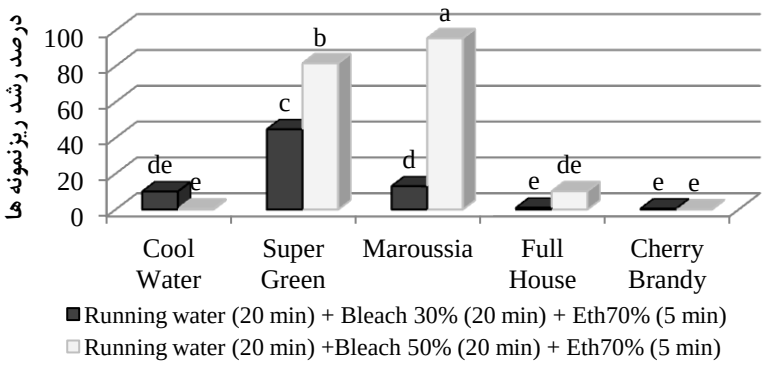
جدول ۴: تجزیه واریانس اثر ضدعفونی سطحی بر درصد رشد ریزنمونه‌ها

Table 4: Analysis of variance of surface disinfection treatments on percentage of explants growth

Source	DF	Mean Square
		Explants growth %
Cultivar	4	3.695 **
Disinfection	1	0.797 **
Disinfection × Cultivar	4	0.924 **
Error	20	0.006
CV	-	4.46

**:significant differences at 1% probability level

**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۲: نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × تیمارهای ضد عفونی سطحی بر درصد رشد ریزنمونه. مطابق آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند

Figure 2: Interaction effect of genotype and disinfection treatments on percentage of explants growth. Means with different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ according to Dunn's multiple comparison.

لذا، می‌توان چنین نتیجه گرفت که کاربرد متناوب این دو ماده سبب تخریب بهتر سلول باکتری‌ها و پاتوژن‌ها شده و غلظت و زمان بالاتر تیمار، اثر بخشی آن‌ها را بهبود بخشیده است. البته اثر سمیت آن‌ها بر بافت و مقاومت بافت را نیز نباید از نظر دور داشت. رشد باکتری‌ها منجر به انسداد آوندی می‌شود (Bleeksma and Van Doorn, 2003; Loubaud and van Doorn, 2004) لذا، حذف موفق آن‌ها می‌تواند به باز بودن بهتر آوندها و در نتیجه انتقال بهتر آب و مواد غذایی از محیط کشت نیز کمک شایانی نموده و رشد ریزنمونه‌ها را بهبود بخشد. تنها رقم Cool Water نسبت به فاکتور غلظت کم‌تر هیپوکلرید سدیم و غوطه‌وری کم‌تر در اتانول، بهتر پاسخ داد که می‌تواند ناشی از حساسیت بیش‌تر این رقم در واکنش به سمیت و کشندگی این مواد باشد. در عین حال تفاوت مقدار لایه مومی و کرک‌های سطحی واریته‌ها با هم (Zlesak, 2006;

(Nybom, 2009)، بر چگونگی نفوذ الکل و هیپوکلریت سدیم تاثیر گذاشته در نتیجه واکنش جوانه‌ها متفاوت خواهد بود.

پرآوری شاخساره‌ها

درصد پرآوری شاخساره: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که درصد پرآوری ارقام مختلف با هم تفاوت‌های معنی‌داری داشته و نوع فاکتور نیز بی‌تاثیر نیست. در عین حال که اثر متقابل رقم × تنظیم‌کننده رشد نیز در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۵ و شکل ۳). در بین فاکتورهای مختلف پرآوری شاخه می‌توان این‌طور اظهار نظر کرد که تنظیم‌کننده رشد BA موثرترین تنظیم‌کننده رشد در این مرحله بوده و هر قدر که از میزان آن کم شده است از میزان پرآوری نیز کاسته شده است.

حتی در ترکیب با تنظیم‌کننده رشد NAA نیز زمانی که نسبت بین این دو تنظیم‌کننده رشد به نفع BA بالاتر باشد پرآوری از درصد بیش‌تری برخوردار است. نتایج به دست آمده، گزارش‌های منتشر شده قبلی را تایید می‌کند (Asadi *et al.*, 2009; Azadi *et al.*, 2007; Debener and Oyant, 2009; Jabbarzadeh and Khosh-Khui, 2005; Janarthanam and Seshadri, 2008; Pati *et al.*, 2006).

درصد رشد شاخساره: میزان رشد شاخساره‌ها در محیط‌های مختلف کشت، تحت تاثیر رقم، تنظیم کننده رشد و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت (جدول ۵). تنظیم کننده رشد BA در رشد شاخساره‌ها بیش‌ترین تاثیر را داشت و با کاهش میزان آن، رشد نیز کاهش کمی نشان داد. در عین حال واکنش رقم‌های مختلف را نیز نسبت به ترکیب تنظیم‌کننده رشد، نمی‌توان نادیده گرفت (جدول ۶).

میانگین طول شاخساره: میانگین طول شاخساره‌ها در رقم‌های مختلف و فاکتورهای مورد بررسی، متفاوت بود (جدول ۵). در عین حال، واکنش رقم‌ها نیز به فاکتورهای به کاربرده شده، متفاوت بود. محیط‌های کشت عاری از تنظیم کننده رشد و یا حاوی مقدار کم BA، بیش‌ترین تاثیر را در رشد طولی شاخساره‌ها داشتند (جدول ۶).

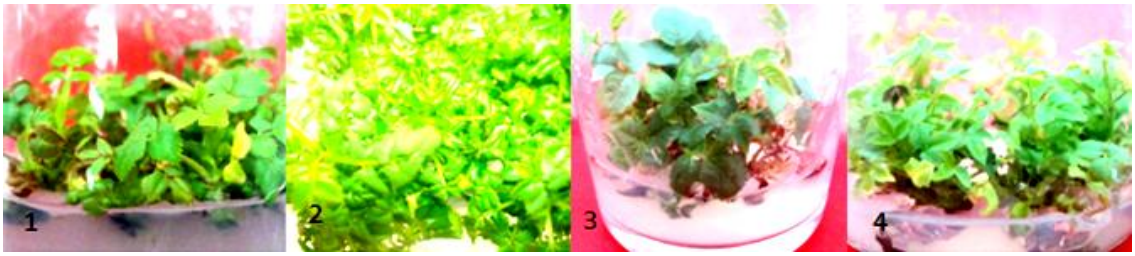
جدول۵: تجزیه واریانس اثر تیمارهای پرآوری بر صفات اندازه گیری شده

Table 5: Analysis of variance of proliferation treatments on measured traits

Source	DF	Mean Square			
		Explants proliferation%	Shoot growth%	Mean of shoot per explants	Mean of shoot length
Cultivar	4	2.91 **	2587.01 **	0.097 **	0.13 **
Plant growth regulators	7	4.68 **	2210.71 **	0.125 **	0.3 **
Plant × Cultivar growth regulators	28	1.21 **	1094.68 **	0.423 **	0.074 **
Error	80	0.006	207.09	0.0001	0.007
CV	—	4.16	23.79	3.16	5.79

**:significant differences at 1% probability level

**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۳: نمونه‌هایی از پرآوری شاخساره‌های رقم «Maroussia» در برخی سطوح تنظیم کننده‌های رشد.

Figure 3:‘Maroussia’ shoot proliferation under some plant growth regulator treatments.

جدول ۶: مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × مقادیر تنظیم کننده رشد بر روی صفات مورد اندازه گیری در مرحله پرآوری شاخساره‌ها.

Table 6: Interaction effect of genotype and shoot proliferation media on measured traits in proliferation stage.

Cultivar	Media composition	Explants proliferation%	Shoot growth%	Mean of shoot per explants	Mean of shoot length (cm)
Cool Water	No Plant growth regulators	0.0 j	37.14 efg	0.0 m	13.6 a
	BA (0.55 µM) + NAA (0.0 µM)	0.0 j	66.7 bcd	0.0 m	10 cd
	BA (0.55 µM) + NAA (0.54 µM)	25 f	66.6 bcd	0.3 klm	5 fgh
	BA (0.55 µM) + NAA (0.054 µM)	38.3 de	66.6 bcd	0.6 hij	3.6 hijklm
	BA (1.11 µM) + NAA (0.0 µM)	0.0 j	31.43 g	0.0 m	3.3 hijklm
	BA (1.11 µM) + NAA (0.54 µM)	0.33 j	31.1 g	0.36 jkl	1.3 m
	BA (1.11 µM) + NAA (0.054 µM)	39.6 de	60 bcdef	0.3 klm	2 jklm
	BA (2.22 µM) + NAA (0.27 µM)	71.6 b	86.6 ab	1.6 d	5 fgh
Supper Green	No Plant growth regulators	0.0 j	66.7 bcd	0.0 m	8 de
	BA (0.55 µM) + NAA (0.0 µM)	23.3 fg	60 bcdef	0.6 hij	4 fghijk
	BA (0.55 µM) + NAA (0.54 µM)	15 ghi	46.6 cdefg	0.2 lm	2.6 hijklm
	BA (0.55 µM) + NAA (0.054 µM)	0.0 j	33.3 fg	0.0 m	1.6 klm
	BA (1.11 µM) + NAA (0.0 µM)	72.5 b	100 a	2.1 b	9.6 cd
	BA (1.11 µM) + NAA (0.54 µM)	44.2 cd	87.7 ab	1.01 efg	6.3 ef
	BA (1.11 µM) + NAA (0.054 µM)	71.6 b	87.7 ab	2.39 a	5 fgh
	BA (2.22 µM) + NAA (0.27 µM)	71.8 b	86.7 ab	1.6 d	4.6 fghi
Maroussia	No Plant growth regulators	19.8 fgh	81.1 ab	0.29 klm	11 bc
	BA (0.55 µM) + NAA (0.0 µM)	64.5 b	85.7 ab	1.76 cd	2.16 jklm
	BA (0.55 µM) + NAA (0.54 µM)	50.4 c	95.2 a	1.14 ef	6.3 ef
	BA (0.55 µM) + NAA (0.054 µM)	26.4 f	52.3 cdefg	1.19 lm	4.3 fghij
	BA (1.11 µM) + NAA (0.0 µM)	68.8 b	95.2 a	1.9 bc	12.6 ab
	BA (1.11 µM) + NAA (0.54 µM)	17.4 fgh	33.3 fg	1.13 lm	1.3 m
	BA (1.11 µM) + NAA (0.054 µM)	6.9 ij	40 defg	0.06 lm	1.5 lm
	BA (2.22 µM) + NAA (0.27 µM)	82 a	73.3 abc	1.2 e	6.16 efg
Full house	No Plant growth regulators	0.0 j	63.8 bcde	0.0 m	5 fgh
	BA (0.55 µM) + NAA (0.0 µM)	17.1 fgh	62.8 bcde	0.16 lm	6.3 ef
	BA (0.55 µM) + NAA (0.54 µM)	37.1 de	74.4 abc	0.8 ghi	4 fghijk
	BA (0.55 µM) + NAA (0.054 µM)	0.0 j	46.66 cdefg	0.0 m	2.3 ijklm
	BA (1.11 µM) + NAA (0.0 µM)	24.2 fg	85.7 ab	0.21 lm	3.6 hijklm
	BA (1.11 µM) + NAA (0.54 µM)	0.0 j	27.62 g	0.0 m	2.6 hijklm
	BA (1.11 µM) + NAA (0.054 µM)	12.8 hi	46.6 cdefg	0.12 lm	1.6 klm
	BA (2.22 µM) + NAA (0.27 µM)	45 cd	73.3 abc	0.8 ghi	4 fghijk
Cherry Brady	No Plant growth regulators	0.0 j	40 defg	0.0 m	3.3 hijklm
	BA (0.55 µM) + NAA (0.0 µM)	35.5 e	65.5 bcd	0.87 fgh	1.6 klm
	BA (0.55 µM) + NAA (0.54 µM)	0.0 j	26.66 g	0.0 m	2.3 ijklm
	BA (0.55 µM) + NAA (0.054 µM)	0.0 j	26.66 g	0.0 m	1.3 m
	BA (1.11 µM) + NAA (0.0 µM)	35.1 e	45.7 cdefg	0.84 gh	7.3 e
	BA (1.11 µM) + NAA (0.54 µM)	0.0 j	33.3 fg	0.0 m	2.3 ijklm
	BA (1.11 µM) + NAA (0.054 µM)	21.1 fgh	62.2 bcde	0.52 ijk	1.3 m
	BA (2.22 µM) + NAA (0.27 µM)	52.6 cd	66.6bcd	0.8 ghi	3.8 ghijkl

مطابق آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند.

Means with different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ according to Dunn's multiple comparison.

میانگین تعداد شاخساره‌های تولیدی: رقم، تنظیم کننده‌های رشد و اثر متقابل آن‌ها بر تعداد شاخساره‌های پرآوری شده تاثیر معنی‌دار داشتند (جدول ۵). در بین فاکتورهای تنظیم کننده رشد به کار برده شده، هر قدر میزان BA افزایش یافته بر میزان تولید شاخساره نیز اضافه شده است، هر چند که واکنش ارقام کاملا یکسان نیست (جدول ۶). با در نظر گرفتن تمامی موارد مورد بررسی در مرحله پرآوری، می‌توان گفت که ژنوتیپ نقش به‌سزایی در این مرحله ایفا می‌کند، سریع‌الرشدی و قدرت رشد رقم‌ها احتمالاً سبب پاسخ بهتر آن‌ها به کشت درون شیشه‌ای می‌شود که با نتایج به‌دست آمده هم‌خوانی دارد (Carelli and Echeverrigaray, 2002 & Pati *et al.* 2006).

تکثیر و پرآوری و ریشه‌زایی شاخساره در کشت درون شیشه‌ای تحت تاثیر عوامل زیادی از جمله گونه، ژنوتیپ، رقم، محیط کشت، نمک‌های معدنی، مواد آلی، کربوهیدرات-ها، تنظیم کننده‌های رشد و شرایط محیطی قرار می‌گیرد که از این بین، نقش نسبت اکسین به سایتوکنین از همه مهم‌تر است (Pati *et al.* 2005b; Pati *et al.* 2006; George *et al.* 2008b and George *et al.*, 2008a). لذا، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در شرایط کشت درون شیشه‌ای، استقرار، رشد و پرآوری ارقام دارای قدرت رشد بهتر، بسیار مطلوب‌تر می‌باشد. در عین حال تاثیر ترکیب تنظیم‌کننده رشدی بر تقویت رشد و پرآوری ریزنمونه‌ها امری واضح است (Asadi *et al.* 2009; Mohapatra *et al.* 2005; Azadi *et al.* 2007 and Debener and Oyant, 2009).

القای ریشه در شاخساره‌ها: نوع رقم بر ریشه‌زایی تاثیر مستقیم دارد و رقم‌هایی که از رشد بهتری برخوردارند با توجه به این-که شاخساره‌های قوی‌تر و بزرگ‌تری نیز تولید می‌کنند می‌توانند در محیط ریشه‌زایی به فاکتورها واکنش بهتری نشان دهند. در عین حال، می‌توان گفت که اندازه ریزنمونه بر ریشه‌زایی نیز تاثیر به‌سزایی دارد (شکل ۳-۴). بررسی همبستگی این دو صفت نشان داد که ($P\leq$۰/۰۱۵) (R^2=+۰/۹۵) بین اندازه شاخساره و درصد ریشه‌زایی همبستگی بالا و مثبتی دیده می‌شود و شاخساره‌های بزرگ-تر و قوی‌تر، ریشه‌زایی مطلوب‌تری نیز خواهند داشت. جدا از این که برخی از رقم‌ها مثل Cherry Brady احتمالا جزء دسته ارقام سخت ریشه‌زا هستند که به فاکتورهایی با غلظت بالای تنظیم‌کننده‌های رشد القا کننده ریشه نیاز دارند (شکل ۴). تولید ریشه در گیاهان تحت تاثیر سنتز، متابولیسم، انتقال و مسیرهای انتقال علایم اکسین می‌باشد (George *et al.* 2008c). گزارش شده تیمار سلول‌های گیاهی با اکسین سبب تنظیم‌های پیش برنده یا کاهنده بیان ژن‌ها می‌شود (Weijers and Ju¨rgens, 2004). اغلب نتایج، بیان‌گر تاثیر مثبت IAA در ترکیب با NAA و IBA در غلظت کم-تری از نمک‌ها، بر ریشه‌زایی گل‌های رز می‌باشد (Asadi *et al.* 2009; Azadi *et al.* 2007; Bredmose *et al.* 2005; Hameed *et al.* 2006; Pati *et al.* 2005a; Pati *et al.* 2006 and Shabbir *et al.*, 2009).

سپاسگزاری

نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بابت تامین اعتبارات (طرح پژوهشی ۳۳۵) و امکانات آزمایشگاهی این مطالعه و نیز پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران جهت تامین تسهیلات انجام این تحقیق، کمال قدردانی و سپاس‌گزاری را دارند.

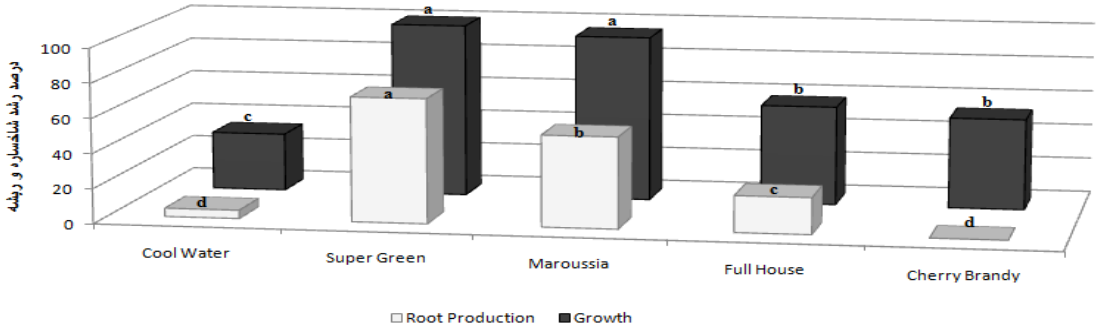
جدول۷: تجزیه واریانس اثر تیمار القای ریشه در شاخساره‌ها

Table 7: Analysis of variance of root induction treatment in shoots

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد ریشه زایی	درصد رشد شاخساره
Cultivar	4	1.8**	2496.55**
Error	10	0.0129	81.634
CV	-	5.51	13.36

**: اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant differences at 1% probability level



شکل ۴: مقایسه میانگین القای ریشه بر درصد رشد شاخساره‌ها و درصد تولید ریشه. مطابق آزمون دانکن، میانگین‌های دارای حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند.

Figure 4: Mean comparison of root induction on shoot growth and root production percentage. Means with different letter are significantly different at $p \leq 0.05$ according to Dunn's multiple comparison.

شکل ۵: ریشه‌زایی رقم‌های دارای پاسخ مطلوب (A: Cool Water; B: Super Green; C: Maroussia; D: Full House)

Figure 5: Root induction in well responsive genotypes (A, Cool Water; B, Super Green; C, Maroussia; D, Full House).

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۵-۶ متن انگلیسی مراجعه شود.

In vitro Culture Improvement of Five Cut Rose (*Rosa hybrid* L.) Cultivars

Yari, F., Mousavi, A., Mostofi, Y., Zamani, Z., Seyedi, M., Motallebi, Azar, A. and Laimer, M.

Abstract

In vitro culture of plants offers high capacity for multiplication, maintenance and manipulation of modern cultivars. Five commercial cut rose cultivars in Iran (Cherry Brandy, Cool Water, Full House, Maroussia and Super Green) were evaluated in this study. Nodal stem segments (2 cm) were surface sterilized with commercial bleach (10-50%) for 20 min and 70% ethanol (v/v) for 2-5 min and cultured on MS medium. Various concentrations of 6-benzyladenine (BA) (0 -0.55 -1.11 -2.22 µM) and naphthalene acetic acid (NAA) (0- 0.054- 0.27- 0.54 µM) were used for shoot proliferation of new establishments. Two types of auxin, NAA (5.4 µM) and IBA (9.9 µM) were tested for root induction. Higher percentage of aseptic shoots was obtained by 50% commercial bleach and 5 minute of 70% ethanol pretreatment. Significant difference was observed between shoot proliferation rates (0.0- 82%) of cultivars and all cultivars had satisfactory multiplications on 2.22 µM BA and 0.27µM NAA combinations. The rate of produced root (0- 71.4%) differed between cultivars.

Keywords: Disinfection, Proliferation, Root induction

References

Asadi, A. A., Vedadi, C., Rahimi, M. and Naserian, B. (2009). Effect of plant growth hormones on root and shoot regeneration In rose (Morrasia) under in-vitro conditions. *Bioscience Research* 6(1): 40-45.

Azadi, P., Khosh-Khui, M., Beyramizadeh, E. and Bagheri, H. (2007). Optimization of factors affecting in vitro proliferation and rooting of Rosa hybrida L. cv. 'Rafaela'. *International Journal of Agricultural Research* 2(7): 626-631.

Bleeksma, H. C. and Van Doorn, W. G. (2003). Embolism in rose stems as a result of vascular occlusion by bacteria. *Postharvest Biology and Technology* 29(3): 335-341.

Bredmose, N., Kristiansen, K., Nørbæk, R., Christensen, L. and Hansen-Møller, J. (2005). Changes in Concentrations of Cytokinins (CKs) in Root and Axillary Bud Tissue of Miniature Rose Suggest that Local CK Biosynthesis and Zeatin-Type CKs Play Important Roles in Axillary Bud Growth. *Journal of Plant Growth Regulation* 24(3): 238-250.

Carelli, B. P. and Echeverrigaray, S. (2002). An improved system for the in vitro propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturae* 92(1): 69-74.

Cronmiller, J. R., Nelson, D. K., Salman, G., Jackson, D. K., Dean, R. S., Hsu, J. J. and Kim, C. H. (1999). Antimicrobial efficacy of endoscopic disinfection procedures: a controlled, multifactorial investigation. *Gastrointestinal Endoscopy* 50(2): 152-158.

Davies, D. R. (1980). Rapid propagation of roses in vitro. *Scientia Horticulturae* 13(4): 385-389.

Debener, T. and Oyant, L. H.-S. (2009).Genetic Engineering and Tissue Culture of Roses. In *Genetics and Genomics of Rosaceae*, Vol. 6, 393-409 (Eds K. M. Folta and S. E. Gardiner). Springer New York.

Elliott, R. F. (1970). Axenic culture of meristem tips of Rosa multiflora. *Planta* 95(2): 183-186.

George, E. F., Hall, M. A. and Klerk, G.-J. D. (2008a).The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In *Plant Propagation by Tissue Culture*, 65-113 (Eds E. F. George, M. A. Hall and G.-J. D. Klerk). Springer Netherlands.

George, E. F., Hall, M. A. and Klerk, G.-J. D. (2008b).The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In *Plant Propagation by Tissue Culture*, 115-173 (Eds E. F. George, M. A. Hall and G.-J. D. Klerk). Springer Netherlands.

George, E. F., Hall, M. A. and Klerk, G.-J. D. (2008c).Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In *Plant Propagation by Tissue Culture*, 175-204 (Eds E. F. George, M. A. Hall and G.-J. D. Klerk). Springer Netherlands.

Gudin, S. (2000). Rose: genetics and breeding. *Plant Breeding Review* 17: 59-189

Hameed, N., Shabbir, A., Ali, A. and Bajwa, R. (2006). *In vitro* micropropagation of disease free rose (*Rosa indica* L.). *Mycopath* 4(2): 35-38.

Jabbarzadeh, Z. and Khosh-Khui, M. (2005). Factors affecting tissue culture of Damask rose (Rosa damascena Mill.). *Scientia Horticulturae* 105(4): 475-482.

Jacobs, G., Allan, P. and Bornman, C. H. (1970a). Tissue culture studies on rose: Use of shoot tip explants III. *Auxin: Gibberelin Effects. Agroplantae* 2: 45-50.

Jacobs, G., Allan, P. and Bornman, C. H. (1970b). Tissue culture studies on rose:Use of shoot-tip explants II. *Cytokinin: Gibberelin Effects. Agroplantae* 2: 25-28.

Janarthanam, B. and Seshadri, S. (2008). In vitro manipulations of *Rosa bourbonianal* L. *Acta Horticulturae (ISHS)* 769: 357-370.

Jang, H. H., Ann, S. H., Kim, M. D. and Kim, C. W. (2008). Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to Actinobacillus ureae. *Process Biochemistry* 43: 225-228.

Julien, D. (2004). Defining modern roses. *American Rose Annual* 38(18): 22-27.

Khosh-Khui, M. and Teixeira da Silva, J. A. (2006). In vitro culture of the Rosa species. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 2: 514-526.

Korban, S. S. (2007).Roses. In *Transgenic Crops VI*, Vol. 61, 227-239 (Eds E.-C. Pua and M. R. Davey). Springer Berlin Heidelberg.

Larson, E. L. and Morton, H. E. (1991).Disinfection, Sterilization and Preservationon. In *Alcohols*.

Loubaud, M. and van Doorn, W. G. (2004). Wound-induced and bacteria-induced xylem blockage in roses, Astilbe, and Viburnum. *Postharvest Biology and Technology* 32(3): 281-288.

Mohapatra, A., Rout, G. R. and Das, P. (2005). Rapid clonal propagation from nodal explants and in vitro flowering of three rose cultivars. *Propagation of Ornamental Plants* 5(4): 219-223.

Nybom, H. (2009).Introduction to *Rosa*. In *Genetics and Genomics of Rosaceae*, Vol. 6, 339-351 (Eds K. M. Folta and S. E. Gardiner). Springer New York.

Pati, P., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P. (2005a).Micropropagation of *Rosa damascena* and & *R. bourboniana* in liquid cultures. In *Liquid Culture Systems for <i>in vitro</i> Plant Propagation*, 373-385 (Eds A. K. Hvoslef-Eide and W. Preil). Springer-Verlag.

Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M. and Ahuja, P. S. (2005b). Micropropagation, protoplast culture and its implications in the improvement of scented rose. *Acta Horticulturae* 547: 147-158.

Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P. S. (2006). In vitro propagation of rose--a review. *Biotechnology Advances* 24(1): 94-114.

Reist, A. (1985). Culture in vitro en pipiniere de rosiers: Une alternative au bouturage ou au greffage des varietes? *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture* 17: 361-364.

Rout, G. R., Debata, B. K. and Das, P. (1990). In vitro clonal multiplication of roses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 60: 311-318.

Rout, G. R., Mohapatra, A. and Jain, S. M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24(6): 531-560.

Sana, B., Ghosh, D., Saha, M. and Mukherjee, J. (2006). Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-Proteobacterium isolated from the marine environment of the *Sundarbans*. *Process Biochemistry* 41(1): 208-215.

Shabbir, A., Hameed, N., Ali, A. and Bajwa, R. (2009). Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa Indica* L.). *Pakistan Journal of Botany* 41(6): 2877-2882.

Weijers, D. and Ju¨rgens, G. (2004). Funneling auxin action: specificity in signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 687-693.

Zlesak, D. (2006).Rose. In *Flower Breeding and Genetics*, 695-740 (Ed N. Anderson). Springer Netherlands.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 17-26= ۱۷-۲۶).