DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2014.5277

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۰۰-۸٤ (۱۳۹۳)

بررسی کشت بساک در گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.) و رز مینیاتوری

کیوان مهدوی ماشکی[۱]، احمد معینی[۲*] و مختار جلالی جواران[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
۲- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، پست الکترونیک: moieni_a@modares.ac.ir
۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۱

چکیده

امروزه تولید گیاهان هاپلوئید با استفاده از روشهای بیوتکنولوژی، به‌عنوان روشی سریع و کارآمد برای تولید لاین‌های خالص مورد توجه است. در این میان، آندروژنز به‌دلیل بالا بودن تعداد زیاد میکروسپورها در یک بساک، مؤثرترین روش به حساب می‌آید. در تحقیق حاضر اثر ترکیب محیط کشت بر کشت بساک در دو اکوتیپ گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.) (کاشان و آذران) و یک اکوتیپ رز مینیاتوری (ساناز) مورد مطالعه قرار گرفت. در اکوتیپ کاشان اثر متقابل محیط کشت H1 در مرحله تک‌هسته‌ای میانی بالاترین میزان کالوس‌زایی را داشت. همچنین آزمایش بررسی اثر نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم نشان داد که تیمارهای حذف نیترات آمونیوم و دو برابر کردن نیترات پتاسیم، کالوس‌زایی بالاتری داشتند. به‌علاوه، دو نمک کلرید کلسیم و نیترات کلسیم در رز مینیاتوری ساناز از کالوس‌زایی بالاتری برخوردار بودند. اسیدهای آمینه نقش مؤثری بر صفت درصد کالوس‌زایی بساک داشتند و گلایسین، گلوتامین و کازئین هیدرولیزات از سایر اسیدهای آمینه بهتر بودند. همچنین ساکارز نسبت به سوربیتول، قند مناسبتری جهت کالوس‌زایی بساک بود و با جایگزینی ساکارز توسط سوربیتول میزان کالوس‌زایی کاهش یافت. نتایج شمارش کروموزومی و فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های کالوس‌های حاصل، تتراپلوئید (۲۸ کروموزوم) بودند.

واژه‌های کلیدی: گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.)، رز مینیاتوری، محیط کشت، کشت بساک، کالوس‌زایی، اسیدهای آمینه.

مقدمه

گل رز به‌عنوان ملکه گل‌ها از عهد باستان مورد توجه بشر بوده‌است. در حال حاضر گل رز یکی از محبوبترین گل‌های جهان است و از لحاظ میزان تولید در صدر قرار دارد. گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.) از گونه‌های مهم رز در ایران است که از گذشته به‌منظور تهیه گلاب و روغن‌های معطر مورد توجه بوده‌است. علی‌رغم سابقه زیاد کشت و کار گل‌محمدی در ایران، اصلاح ژنتیکی بسیار محدودی بر روی آن انجام شده است. ارقام مدرن رز (*Rosa hybrida*) تریپلوئید و تتراپلوئید هستند، بنابراین استفاده از آنها در تلاقی‌ها ممکن است بذرهای قابل رویش ایجاد نکند. عمدتاً برنامه‌های اصلاحی رز روی اصلاح خصوصیات زینتی آنها ازجمله رنگ، اندازه و نگهداری کیفیت غنچه‌ها و پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی متمرکز شده‌است. در گذشته اصلاح خصوصیات مطلوب به‌وسیله روشهای کلاسیک انجام می‌شد، اما

محدودیت‌هایی در این تکنیک‌ها وجود دارد؛ ازجمله این‌که، خزانه ژنی رز هیبرید برای بعضی از خصوصیات مانند مقاومت به بیماریهای قارچی محدودیت دارد. به‌دلیل تفاوت سطح پلوئیدی والدین، تلاقی‌ها با ناسازگاری همراه هستند، در حالی‌که اصلاح خصوصیاتی مانند یکنواختی رشد و همزمانی گلدهی که صفاتی چندژنی هستند از طریق تلاقی امکان‌پذیر است (Rout *et al.*, 1999). تتراپلوئیدی در ارقام مهم رز، آنالیز ژنتیکی و انتقال ژن را به آنها، به‌خصوص از گونه‌های دیپلوئید، مشکل کرده‌است (Meynet *et al.*, 1996). تلاقی بین گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید ایجاد تریپلوئیدهای عقیم می‌کند. کوشش‌هایی در ارتباط با دو برابر کردن کروموزوم‌ها از طریق استفاده از کلشی‌سین صورت گرفته، اما ضعف شدید در باززایی گیاه به‌دلیل تعداد زیاد کروموزم‌ها و وقوع بالای شیمر، استفاده از این روش را محدود کرده‌است (Roberts *et al.*, 1990). هنگامی‌که تلاقی بین گونه‌ای در رز با عدم موفقیت همراه شد، محققان بر آن شدند تا نسبت به تولید گیاه هاپلوئید از گیاه تتراپلوئید (در حالی‌که قادر به تولید گل و گرده باشد) اقدام نمایند و سپس از دی‌هاپلوئید حاصل در تلاقی با ارقام وحشی (دیپلوئید یا تریپلوئید) استفاده کنند (Meynet *et al.*, 1996). تولید گیاه هاپلوئید و به دنبال آن ایجاد دابلد هاپلوئید موجب کاهش دوره اصلاحی برای ایجاد لاین‌های هموزیگوت در گیاهان دگرگشن (مانند رز) که به‌عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های بعدی استفاده می‌شوند، می‌گردد (Jain *et al.*, 1996). از طرفی گیاهان هاپلوئید مضاعف‌شده، در نقشه‌یابی‌های ژنتیکی با استفاده از مارکرهای مولکولی، آنالیز QTL، مطالعات سیتوژنتیکی، انتقال ژن و اصلاح از طریق موتاسیون استفاده می‌شوند (Jain *et al.*, 1996). در تحقیقات قبلی، یک تیم فرانسوی موفق به ایجاد گیاه هاپلوئید از یک واریته رز با کمک پارتنوژنز از طریق تلقیح و گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده عقیم و سپس نجات جنین در شرایط درون شیشه‌ای شدند که نتیجه آن ایجاد یک رز دی‌هاپلوئید بود که قادر به تولید گل و گرده‌های بارور بود (Meynet *et al.*, 1996). در تحقیقات بعدی، این روش بهینه شده و تأثیر دوزهای مختلف پرتو گاما، فصل، دما، محیط مناسب برای عمل گرده‌افشانی، تأثیر ژنوتیپ پایه مادری، تأثیر القایی گرده و تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بررسی شد. سپس، القای کالوس در دو گونه رز تتراپلوئید انجام شد (Tabaeezadeh & Khosh-Khui, 1981)، که طی آن بساک‌ها در مراحل مختلف نمو در محیط‌های کشت با غلظت‌های مختلف اکسین و کینتین و تحت شرایط مختلف نوری کشت شدند و نتایج نشان داد که محیط کشت MS دارای IAA ۲mgl^{-1} و کینتین به مقدار ۰/٤mgl^{-1} بهترین پاسخ را در کشت بساک *R. damascena* داشته‌است، در حالی‌که محیط کشت دارای IAA ۷/۵mgl^{-1} و کینتین به مقدار ۰/۸ mgl^{-1} بهترین پاسخ را در *R. hybrida* داشته‌است. نتایج شمارش کروموزومی نشان داد که کالوس‌های حاصل هاپلوئید هستند. در تحقیقی دیگر، اثر مراحل مختلف نمو میکروسپور، پیش‌تیمار، عامل ژلی و نیترات نقره بر کالوس‌زایی رز مینیاتوری و رز هیبرید مورد مطالعه قرار گرفتند و بررسی سطح پلوئیدی کالوس‌های حاصل نشان داد که این کالوس‌ها هاپلوئید نیستند (راه‌پیما، ۱۳۸۵).

با توجه به اهمیت بالا و تجارت وسیع در رزها و همچنین ضرورت تولید ارقام در کوتاهترین زمان ممکن، لزوم انجام مجموعه‌ای از تحقیقات در راستای دستیابی به

گیاهان هاپلوئید در گونه‌های مختلف رز بسیار ضروریست. بنابراین در این تحقیق، اثر ترکیب محیط کشت به‌منظور امکان تولید کالوس یا جنین هاپلوئید در کشت بساک گیاهان گل‌محمدی و رز مینیاتوری مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

مواد گیاهی

در این تحقیق از دو اکوتیپ گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.) به نام‌های کاشان و آذران و یک اکوتیپ رز مینیاتوری به نام ساناز که در شرایط مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس واقع در اتوبان تهران- کرج کشت شده بودند استفاده شد.

تعیین مراحل مختلف نمو میکروسپور

برای تعیین مراحل مختلف نمو میکروسپور از میکروسکوپ Olympus BX 50 و رنگ لاکتوفنل آبی (Lactophenol Blue) استفاده شد. همچنین از طول کاسبرگ و رنگ بساک به‌عنوان مارکر مورفولوژیکی استفاده شد.

استریل کردن سطحی غنچه‌ها

در این پژوهش از اتانول ۷۰٪ و هیپوکلریت‌سدیم (NaClO، وایتکس) ۲/۵٪ (W/V) برای ضدعفونی غنچه‌ها استفاده شد. غنچه‌های برداشت شده، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ (W/V) و سپس به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ قرار داده شدند. غنچه‌ها پس از طی این مرحله، ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند.

محیط کشت‌های مورد استفاده

کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت Sigma یا Merck تهیه شدند. در این پژوهش از چند محیط کشت شامل: MS (Murashige & Skoog, 1962)، H1 (Owen & Miller, 1996)، CHB، GD (Gresshoff & Doy, 1972) و NN (Nitsch & Nitsch, 1969) استفاده شد.

در تمام آزمایش‌ها، بعد از تهیه محیط کشت و تنظیم pH= ۵/۸، محیط‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۲ بار اتوکلاو کرده و سپس در شرایط استریل، به میزان ۵ml در هر پتری‌دیش یک‌بار مصرف استریل (۱۵mm × ۵۵) توزیع شدند و در صورت وجود مواد حساس به اتوکلاو در محیط کشت، محیط کشت‌ها، با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲µm فیلتر استریل شدند.

آزمایش‌ها

همه آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار (هر تکرار یک پتری‌دیش با ۱۰ بساک) انجام شدند. آزمایش‌ها با ترکیب هورمونی 2,4-D به مقدار $2mgl^{-1}$ و کینتین به مقدار $0/5mgl^{-1}$ انجام شدند. در محیط‌های کشت جامد از عامل ژلی آگار-آگار به مقدار ۰/۷۵٪ استفاده شد. پتری‌دیش‌های کشت شده در انکوباتور با دمای ۲۵°C و تاریکی به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. در این تحقیق پنج آزمایش به شرح زیر انجام شد:

آزمایش اول: بررسی نوع و حالت محیط کشت در مراحل مختلف نمو میکروسپور بر کشت بساک گل‌محمدی (اکوتیپ کاشان)

در این آزمایش سه فاکتور مورد بررسی قرار گرفتند که عبارت بودند از: فاکتور اول؛ مراحل مختلف نمو میکروسپور در سه سطح (مرحله تتراد، مرحله تک‌هسته‌ای میانی و مرحله آخر تک‌هسته‌ای)، فاکتور دوم؛ نوع محیط کشت در ۵ سطح (MS، H1، CHB، GD، NN)، فاکتور سوم؛ حالت محیط کشت در دو سطح (جامد و مایع).

آزمایش دوم: بررسی اثر نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم بر کشت بساک گل‌محمدی و رز مینیاتوری

در این آزمایش دو فاکتور مورد بررسی قرار گرفتند که عبارت بودند از: فاکتور اول؛ نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم در ٦ سطح (نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم در محیط پایه H1، حذف توأم نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم، حذف نیترات پتاسیم، حذف نیترات آمونیوم، دو برابر کردن نیترات آمونیوم و دو برابر کردن نیترات پتاسیم)، فاکتور دوم؛ اکوتیپ در سه سطح (اکوتیپ آذران، اکوتیپ کاشان و اکوتیپ ساناز).

از آزمایش‌های دوم به بعد از محیط کشت پایه H1 استفاده شد.

آزمایش سوم: بررسی اثر نمک‌های مختلف کلسیم بر کشت بساک گل‌محمدی و رز مینیاتوری

در این آزمایش سه فاکتور مورد بررسی قرار گرفتند که عبارت بودند از: فاکتور اول؛ نوع نمک کلسیم در ۳ سطح (کلرید کلسیم، نیترات کلسیم و سولفات کلسیم)؛ فاکتور دوم؛ غلظت کلسیم در ۳ سطح (mgl^{-1} ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰) و فاکتور سوم؛ اکوتیپ (اکوتیپ آذران، اکوتیپ کاشان و اکوتیپ ساناز). از آنجایی که سه نوع نمک کلسیم مورد استفاده دارای مولکول‌های آب متفاوت بودند، بنابراین محاسبات برای گذاشتن تیمارهای فوق براساس ماده خالص انجام شد.

آزمایش چهارم: بررسی تأثیر اسیدهای آمینه بر کشت بساک گل‌محمدی و رز مینیاتوری

در این آزمایش دو فاکتور مورد بررسی قرار گرفتند، شامل فاکتور اول؛ نوع اسیدهای آمینه در ٦ سطح (گلایسین، گلوتامین، سرین، پرولین، آلانین و کازئین هیدرولیزات) و فاکتور دوم؛ اکوتیپ در ۳ سطح (اکوتیپ آذران، اکوتیپ کاشان و اکوتیپ ساناز).

آزمایش پنجم: بررسی اثر نوع منبع هیدرات کربن بر کشت بساک گل‌محمدی و رز مینیاتوری

در این آزمایش دو فاکتور مورد بررسی قرار گرفتند، شامل فاکتور اول؛ ترکیب قندی در ۷ سطح (جدول ۱) و فاکتور دوم؛ اکوتیپ در ۳ سطح (اکوتیپ آذران، اکوتیپ کاشان و اکوتیپ ساناز).

جدول ۱- تیمارهای مورد مطالعه در آزمایش بررسی اثر منبع هیدرات کربن محیط کشت بر کشت بساک گل‌محمدی و رز مینیاتوری

شماره تیمار	تیمار (مول)
T_1	۰/۱ ساکارز
T_2	۰/۰۹ ساکارز + ۰/۰۱ سوربیتول
T_3	۰/۰۷ ساکارز + ۰/۰۳ سوربیتول
T_4	۰/۰۵ ساکارز + ۰/۰۵ سوربیتول
T_5	۰/۰۳ ساکارز + ۰/۰۷ سوربیتول
T_6	۰/۰۱ ساکارز + ۰/۰۹ سوربیتول
T_7	۰/۱ سوربیتول

صفت مورد مطالعه

در کلیه آزمایش‌ها، پس از طی ۳۰ روز از کشت، از صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها به شرح ذیل داده‌برداری انجام شد.

$$\text{درصد کالوس‌زایی بساک} = \frac{\text{تعداد بساک‌های دارای کالوس}}{\text{تعداد کل بساک‌های کشت شده}} \times ۱۰۰$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS19 و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD و برای رسم شکل‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. در کلیه آزمایش‌ها برای تبدیل داده‌ها از تبدیل جذری و برای گزارش نتایج در جدول‌های مقایسه میانگین، از میانگین داده‌های واقعی استفاده شده‌است.

تعیین سطح پلوئیدی کالوس‌های بدست آمده از کشت بساک با استفاده از روش شمارش کروموزومی

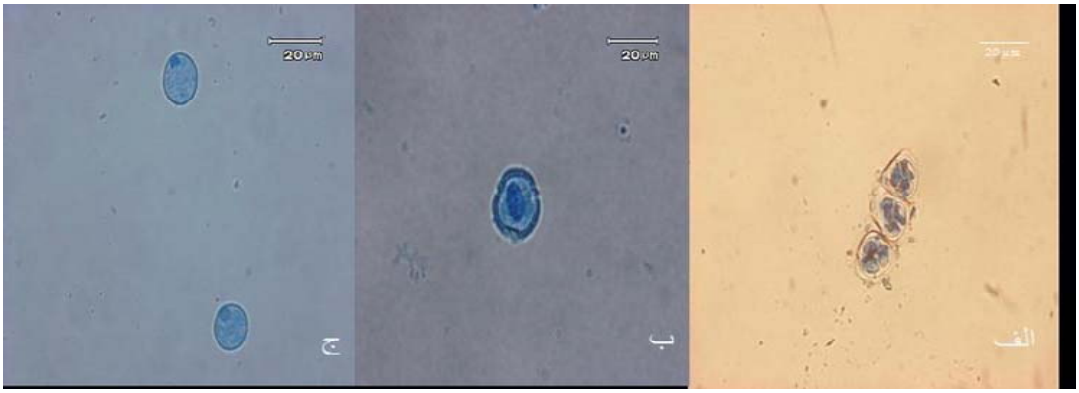
در این روش جهت متوقف کردن سلول‌های در حال تقسیم در مرحله متافاز کالوس‌های بدست آمده توسط محلول کلشی‌سین ۰/۰۵٪ به مدت ٤ ساعت در دمای اتاق پیش‌تیمار شدند. پس از این مرحله، نمونه‌ها به محلول تثبیت‌کننده (الکل ۹۵٪ و اسیداستیک به نسبت ۱:۳) حداقل به مدت ۲٤ ساعت منتقل شدند. سپس جهت هیدرولیز، کالوس‌ها در محلول HCl ۱ نرمال به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦۰°C قرار گرفتند. برای رنگ‌آمیزی از رنگ اورسئین ۲٪ به مدت ۳ ساعت استفاده شد. پس از طی این مرحله، شمارش کروموزومی با استفاده از لنز ۱۰۰ میکروسکوپ Olympus Bx 50 انجام گردید.

تعیین سطح پلوئیدی کالوس‌های بدست آمده از کشت بساک با استفاده از روش فلوسایتومتری

برای تعیین سطح پلوئیدی سلول‌های کالوس‌های حاصل، از دستگاه فلوسایتومتری مدل Partec PA1 استفاده شد. در این روش نمونه کالوس را در داخل یک پتری‌دیش کوچک قرار داده و ٤۰۰µl از محلول آنزیمی (ترکیبی از آنزیم‌های هضم‌کننده دیواره‌های سلولی شامل سلولاز و پکتیناز)، روی آنها ریخته شد. سپس با استفاده از تیغ تیز و ضربات عمودی و محکم بر روی نمونه‌ها در جهت‌های مختلف، بافت برش خورده و با این کار هضم آنزیمی تسریع شد. سپس نمونه از صافی‌هایی با منافذی به قطر ۵۰µm عبور داده شد تا ضایعات حذف گردند و بعد با ۱٦۰۰ml محلول رنگی اختصاصی DNA به نام DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) سلول‌ها رنگ‌آمیزی شدند. پس از مدت ۲ الی ۳ دقیقه، نمونه‌ها درون دستگاه قرار گرفته و با عبور تک سلول‌ها از جلو آشکارساز دستگاه، علاوه‌بر شمارش تعداد سلول‌ها، مقدار DNA آنها نیز تعیین شد. بر این اساس و بر مبنای Gain تعریف شده برای نمونه‌ها، پیک‌های مربوط توسط دستگاه معلوم شد. از جعفری (٤/٤۸pg = 2c، ۲۲ = 2n، Petrosel) به‌عنوان گیاه شاهد برای سنجش سطح پلوئیدی استفاده شد. سطح پلوئیدی از روی عدد حاصل از تقسیم Mode جعفری به Mode رز مشخص شد.

نتایج

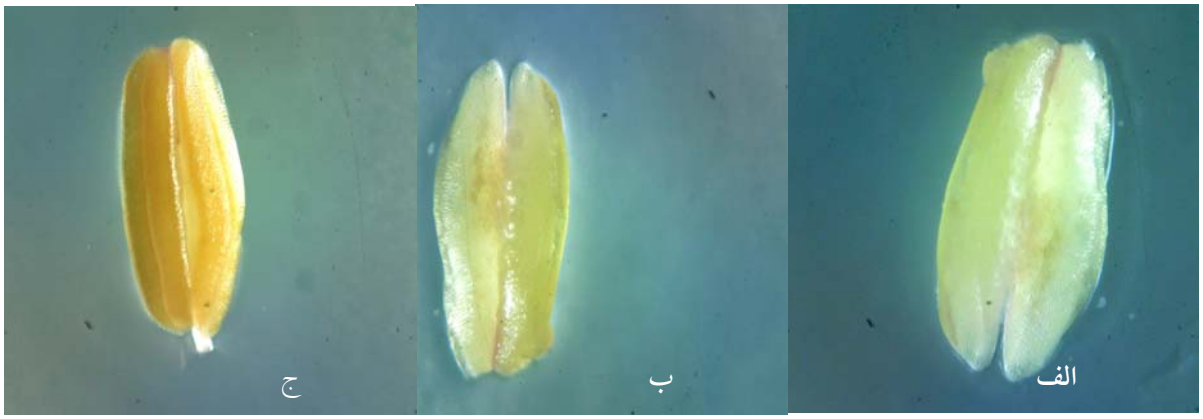
استفاده از رنگ لاکتوفنل آبی به خوبی نمو میکروسپور در سه مرحله تتراد، تک‌هسته‌ای میانی و آخر تک‌هسته‌ای را نشان داد (شکل ۱). استفاده از این رنگ در گیاه توت‌فرنگی نیز بهترین نتیجه را به همراه داشته‌است (ملکی‌چره، ۱۳۸۸).



شکل ۱- مراحل نمو میکروسپور در گل‌محمدی (اکوتیپ کاشان)
الف- مرحله تتراد، ب- مرحله تک‌هسته‌ای میانی، ج- مرحله آخر تک‌هسته‌ای

برای تعیین مراحل نمو میکروسپور از مارکر مورفولوژیکی طول کاسبرگ و رنگ بساک استفاده شد. غنچه‌ها در اندازه‌های مختلف طول کاسبرگ مورد بررسی قرار گرفتند. هنگامی که طول کاسبرگ‌ها بین ۱۵-۱۷mm بود میکروسپورها در مرحله تتراد قرار داشتند. اگر طول کاسبرگ‌ها بین ۱۸-۲۰mm بود میکروسپورها در مرحله اوایل تک‌هسته‌ای تا اواسط مرحله تک‌هسته‌ای قرار داشتند و اگر طول کاسبرگ ۲۰-۲۲mm بود میکروسپورها در مرحله آخر تک‌هسته‌ای بودند، در ضمن در این مرحله اندکی بازشدگی بین کاسبرگ‌ها مشاهده شد (شکل ۲). از آنجایی که در یک غنچه همه بساک‌ها در یک مرحله نموی نیستند، توجه به رنگ بساک‌ها به‌منظور شناسایی مرحله نمو مناسب جهت کشت بساک ضروری به‌نظر می‌رسد و مشاهده شد که بساک‌های دارای مرحله تتراد به رنگ سبز بودند، در حالی‌که بساک‌های دارای مرحله تک‌هسته‌ای میانی به رنگ سبز متمال به زرد بودند و بساک‌های دارای مرحله آخر تک‌هسته‌ای زرد رنگ بودند. در شکل ۳، بساک‌ها از نظر رنگ مقایسه شده‌اند.

شکل ۲- غنچه‌های گل‌محمدی (اکوتیپ کاشان) در سه اندازه مختلف



شکل ۳- مقایسه سه نوع بساک از نظر رنگ در گل‌محمدی (اکوتیپ کاشان)

الف- سبز، ب- سبز متمایل به زرد، ج- زرد

جدول ۲- تجزیه واریانس برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در گل‌محمدی (اکوتیپ کاشان)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
مرحله نمو (A)	۲	۱٤/۲۸۲ **
محیط کشت (B)	٤	۹/۷۲۵ **
حالت محیط کشت (C)	۱	۰/۳۹۳ ns
A×B	۸	۱/۲۳۳ *
A×C	۲	۰/۱۳۷ ns
B×C	٤	۰/٤۷۹ ns
A×B×C	۸	۰/٤۱۷ ns
خطا	٦۰	۰/٤۷۲
C.V. (٪)		٪۱۳/۹۸

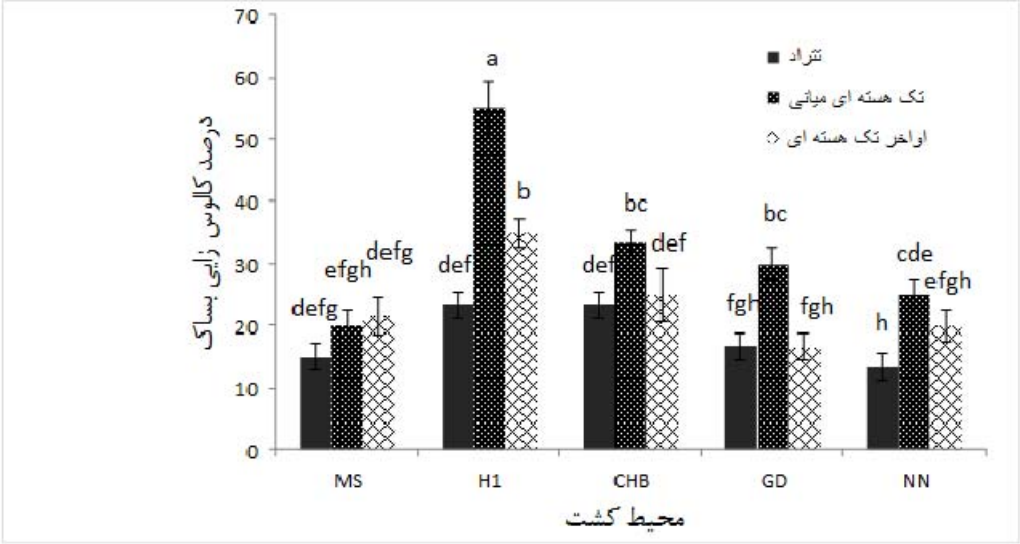
* و **: به‌ترتیب وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار

اثرات مرحله نمو میکروسپور و نوع محیط کشت در سطح ۱٪ و اثر متقابل آنها در سطح ۵٪ بر درصد کالوس‌زایی بساک‌ها، معنی‌دار بودند (جدول ۲).

به‌علت معنی‌دار شدن اثر متقابل مرحله نمو میکروسپور با نوع محیط کشت (A×B)، مقایسه میانگین برای اثرات ساده انجام نشد، زیرا در حالتی که اثر متقابل معنی‌دار می‌شود نمی‌توان در مورد اثرات ساده بحث کرد و اثرات اصلی تحت تأثیر اثر متقابل قرار می‌گیرند. مطابق شکل ٤ بیشترین میزان کالوس‌زایی (۵۵٪)، در محیط کشت H1 و مرحله نمو تک‌هسته‌ای میانی بدست آمده‌است.

به‌استثناء محیط کشت MS، در سایر محیط‌های کشت مرحله تک‌هسته‌ای میانی بالاترین میزان کالوس‌زایی را به همراه داشته‌است. در شکل ۵، کالوس‌زایی بساک‌ها در سه اکوتیپ مورد مطالعه نشان داده شده‌است.



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر متقابل مرحله نمو میکروسپور و محیط کشت برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در گل‌محمدی (اکوتیپ کاشان)

شکل ٥- کالوس‌زایی بساک

الف- گل‌محمدی (اکوتیپ کاشان) ب- گل‌محمدی (اکوتیپ آذران)، ج- رز مینیاتوری (اکوتیپ ساناز)

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر اکوتیپ و نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در دو اکوتیپ گل‌محمدی و رز مینیاتوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
اکوتیپ (A)	۲	۸/۱۲۵ **
نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم (B)	۵	۲۵/۰٦۵ **
A×B	۱۰	۱/٤۰٦ ns
خطا	۳٦	۱/۰۰۷
C.V. (٪)		٪۱۱/۲٤

**: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪

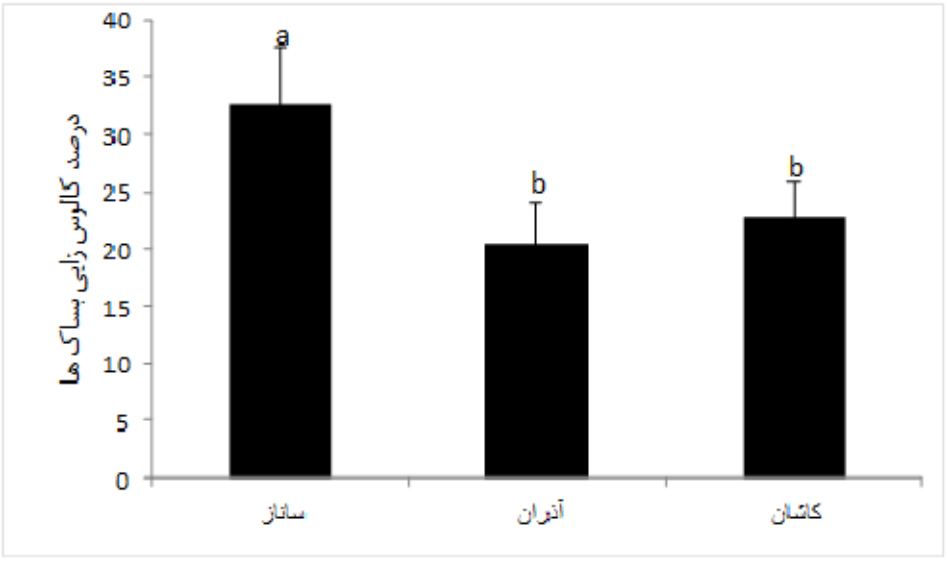
ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار

نتایج آزمایش دوم نشان داد که اثر اکوتیپ و نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم، بر میزان کالوس‌زایی بساک‌ها در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۳).

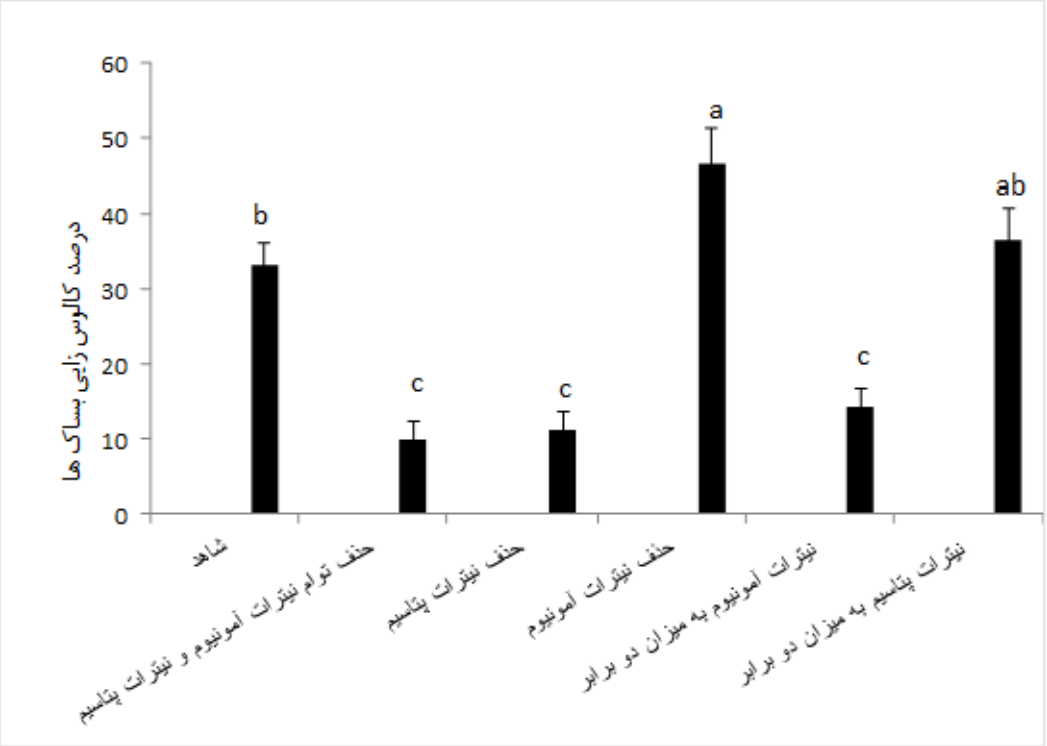
نتایج نشان داد که رز مینیاتوری ساناز بالاترین میزان کالوس‌زایی (۳۲/۷۸٪) را داشته‌است، اما بین اکوتیپ‌های آذران و کاشان اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ٦). مقایسه میانگین اثر نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم، نشان داد که حذف نیترات آمونیوم بالاترین میزان کالوس‌زایی (٤٦/٦٧٪) را به همراه داشت و با دو برابر شدن میزان نیترات پتاسیم (۳٦/٦۷٪) اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۷).

آزمایش سوم نشان داد که اثرات اکوتیپ، نوع نمک کلسیم محیط کشت و اثر متقابل آنها، در سطح ۱٪ معنی‌دار هستند، اما اثر غلظت کلسیم و سایر اثرات متقابل معنی‌دار نیست (جدول ٤). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ و نوع نمک کلسیم محیط کشت نشان داد که نیترات کلسیم و کلرید کلسیم در رز مینیاتوری بالاترین میزان کالوس‌زایی (به‌ترتیب ٤۲/۲۲ و ۳٦/٦۷٪) را القاء کرده‌است و بین این دو نمک اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۸).

نوع اسیدهای آمینه بر صفت درصد کالوس‌زایی بساک در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۵). تیمارهای گلایسین، گلوتامین و کازئین هیدرولیزات بالاترین میزان کالوس‌زایی را داشتند (به‌ترتیب ۵۰، ٤٦/٦۷ و ٤٦/٦۷٪) و بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۹).



شکل ٦- مقایسه میانگین اثر اکوتیپ برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در دو اکوتیپ گل‌محمدی و رز مینیاتوری



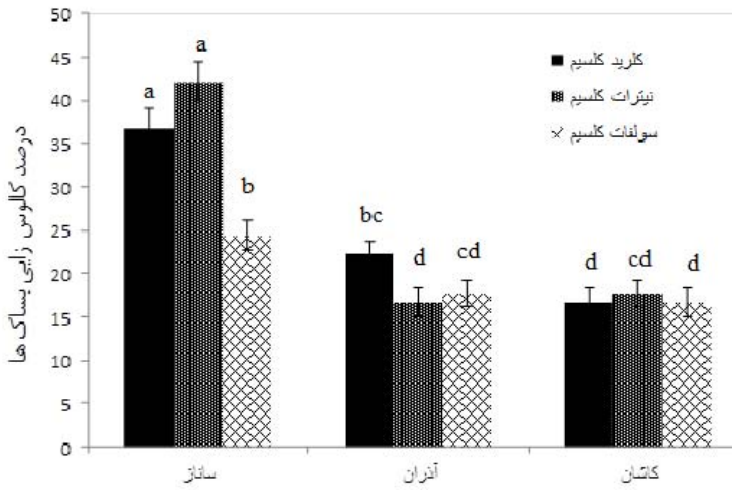
شکل ۷- مقایسه میانگین اثر نسبت نیترات آمونیوم به نیترات پتاسیم برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در دواکوتیپ گل‌محمدی و رز مینیاتوری

جدول ٤- تجزیه واریانس اثرات اکوتیپ، نوع و غلظت نمک کلسیم محیط کشت برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در دو اکوتیپ گل‌محمدی و رز مینیاتوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
اکوتیپ (A)	۲	۲۳/۳۲۳ **
نوع نمک کلسیم (B)	۲	۲/٤۹٦ **
غلظت کلسیم (C)	۲	۰/۳۰۹ ns
A×B	٤	۲/۱٦٦ **
A×C	٤	۰/۲۳۲ ns
B×C	٤	۰/۱۱۷ ns
A×B×C	۸	۰/۰۷۸ ns
خطا	٥٤	۰/۳۸۸
(٪) C.V.		٪۱۱/۹٦

**: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ و نوع نمک کلسیم محیط کشت برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در دو اکوتیپ گل‌محمدی و رز مینیاتوری

جدول ۵- تجزیه واریانس اثرات اکوتیپ و اسید آمینه برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در دو اکوتیپ گل‌محمدی و رز مینیاتوری

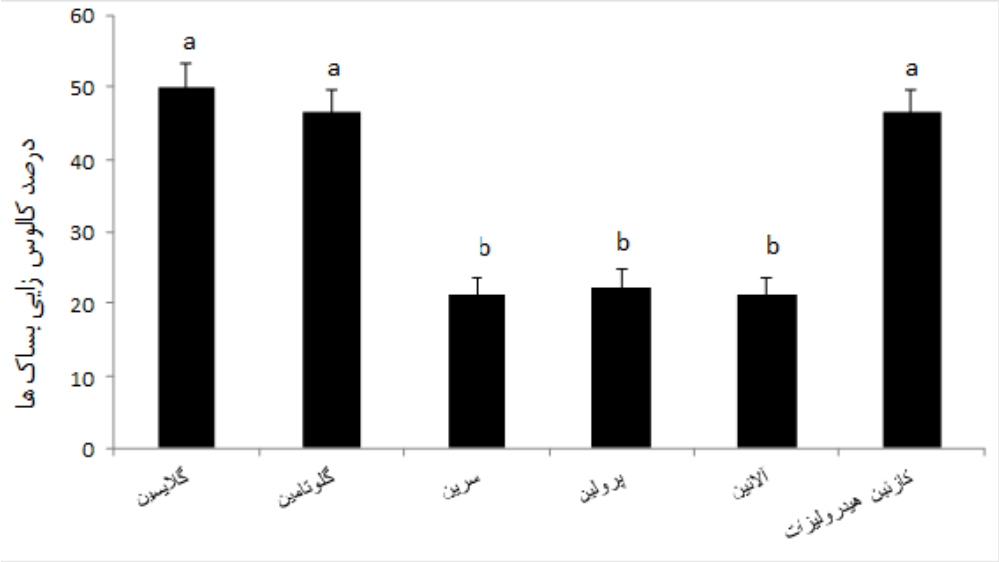
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
اکوتیپ (A)	۲	۰/٤٥٥ ns
اسید آمینه (B)	٥	١٤/٥٠٠ **
A×B	١٠	۰/٢٦٠ ns
خطا	٣٦	۰/٧٢٠
C.V. (٪)		٪١٤/٧١

**: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ١٪
ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار

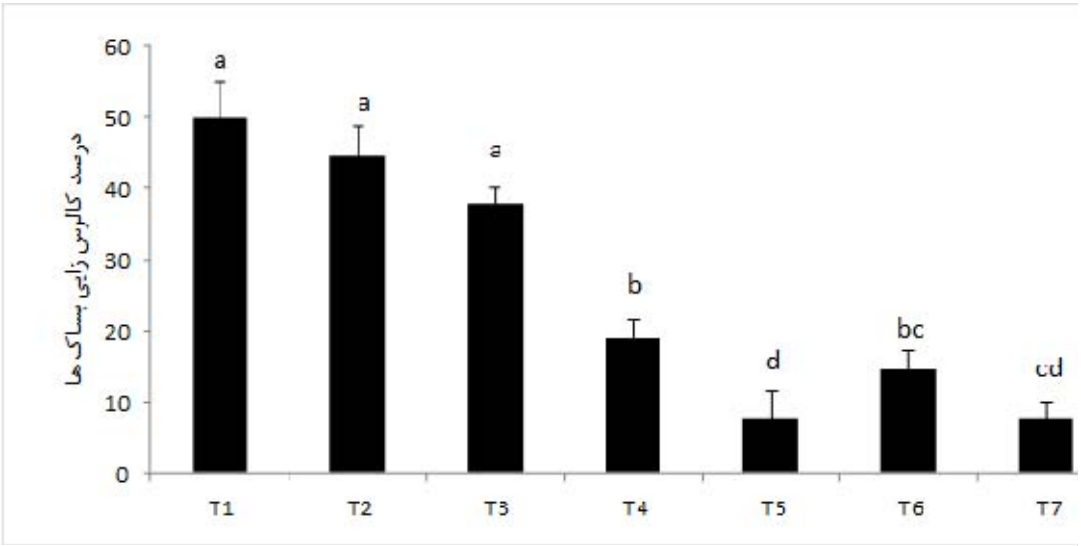
جدول ٦- تجزیه واریانس اثرات اکوتیپ و ترکیب قندی برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در دو اکوتیپ گل‌محمدی و رز مینیاتوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
اکوتیپ (A)	۲	۰/٣٢٢ ns
ترکیب قندی (B)	٦	٣٤/٩٩٨ **
A×B	١٢	١/٣٦٦ ns
خطا	٤٢	١/٧٠٦
C.V. (٪)		٪١٥/٠٨

**: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ١٪
ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار



شکل ۹- مقایسه میانگین اثر اسیدهای آمینه برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در دو اکوتیپ گل‌محمدی و رز مینیاتوری

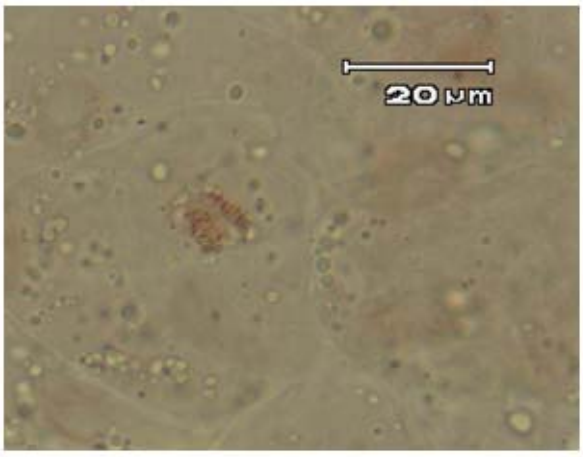


شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر ترکیب قندی برای صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در دو اکوتیپ گل‌محمدی و رز مینیاتوری

T۱ (ساکارز به مقدار ۰/۱ مول)، T۲ (ساکارز به مقدار ۰/۰۹ مول و سوربیتول به مقدار ۰/۰۱ مول)، T۳ (ساکارز به مقدار ۰/۰۷ مول و سوربیتول به مقدار ۰/۰۳ مول)، T٤ (ساکارز به مقدار ۰/۰۵ مول و سوربیتول به مقدار ۰/۰۵ مول)، T۵ (ساکارز به مقدار ۰/۰۳ مول و سوربیتول به مقدار ۰/۰۷ مول)، T٦ (ساکارز به مقدار ۰/۰۱ مول و سوربیتول به مقدار ۰/۰۹ مول)، T۷ (سوربیتول به مقدار ۰/۱ مول)

اثر ترکیب قندی بر صفت درصد کالوس‌زایی بساک‌ها در سطح ۱٪ معنی‌دار بود، اما اثر اکوتیپ و اثر متقابل اکوتیپ و ترکیب قندی معنی‌دار نبود (جدول ٦). سه تیمار T۱ (ساکارز به مقدار ۰/۱ مول)، T۲ (ساکارز به مقدار ۰/۰۹ مول و سوربیتول به مقدار ۰/۰۱ مول) و T۳ (ساکارز به مقدار ۰/۰۸ مول و سوربیتول به مقدار ۰/۰۲ مول)، بالاترین درصد کالوس‌زایی بساک‌ها را داشتند (به‌ترتیب ۵۰، ٤٤/٤٤ و ۳۷/۷۸٪) و با کاهش میزان ساکارز، میزان کالوس‌زایی کاهش یافت (شکل ۱۰).

نتایج حاصل از شمارش کروموزومی نشان داد که کالوس‌های حاصل از کشت بساک، تتراپلوئید (۲n = ٤x = ۲۸) بودند (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- شمارش کروموزومی انجام شده روی سلول‌های کالوس حاصل از کشت بساک گل‌محمدی (اکوتیپ کاشان)

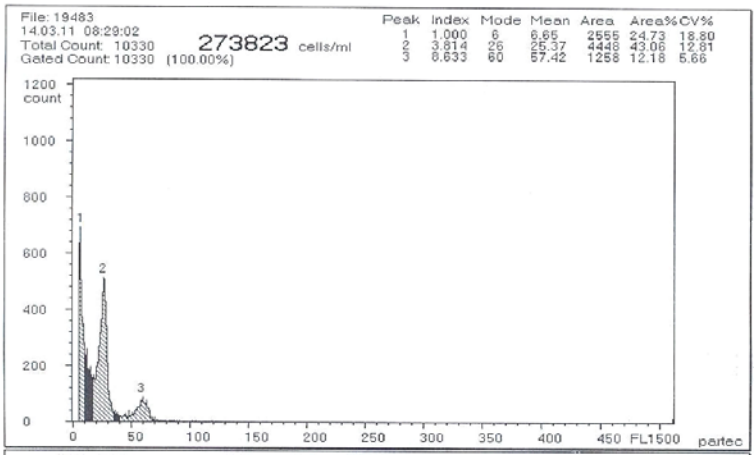
(عکس تهیه شده توسط میکروسکوپ Olympus Bx 50 با بزرگنمایی ۱۰۰)

همچنین نتایج بدست آمده از آنالیز فلوسایتومتری کالوس‌ها نشان داد که سطح پلوئیدی کالوس‌های بدست‌آمده از تیمارهای مختلف همانند گیاهان مادری تتراپلوئید بودند و کالوس دی‌هاپلوئید (دیپلوئید) بدست نیامد. نمونه‌هایی از این آنالیزها در شکل ۱۲ نشان داده شده‌اند. همان‌طور که از شکل مشخص است، سه پیک توسط دستگاه ثبت می‌شود که پیک دوم مربوط به جعفری و پیک سوم مربوط به رز مینیاتوری یا گل‌محمدی می‌باشد. چنانچه Mode قرائت شده جعفری را به Mode رز یا گل‌محمدی تقسیم کنیم و عدد حاصل چیزی در حدود ۰/٥-۰/٤ شود، مشخص می‌شود که سطح پلوئیدی نمونه مورد آزمون، تتراپلوئید بوده‌است که این مورد در تمام نمونه‌های مورد آزمون صادق بود. به‌طور مثال در شکل ۱۲ قسمت الف، عدد Mode مربوط به جعفری ۲٦ و عدد مربوط به اکوتیپ کاشان ۵۸ می‌باشد و حاصل تقسیم ۰/٤٤ بدست می‌آید که نشان می‌دهد نمونه مورد نظر تتراپلوئید است.

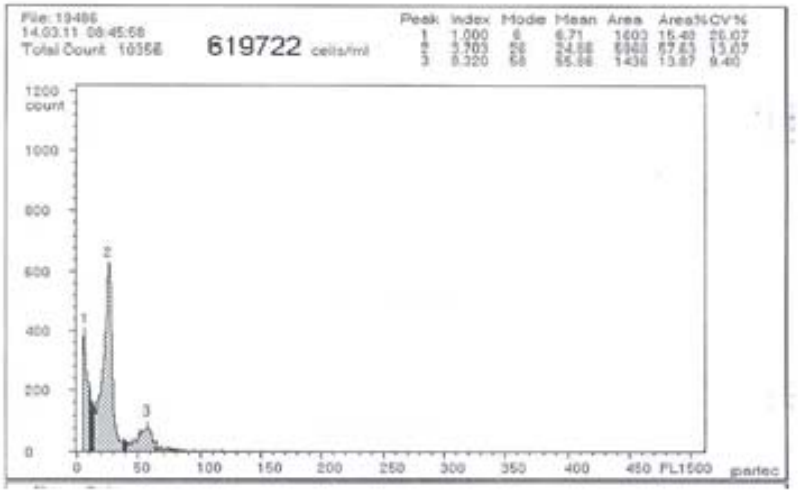
بحث

در بسیاری از گیاهان، مرحله تک‌هسته‌ای بهترین پاسخ به کشت بساک را به همراه داشته‌است. در توت‌فرنگی، مراحل تک‌هسته‌ای و آخر تک‌هسته‌ای بالاترین پاسخ را به جنین‌زایی داشته‌است (ملکی‌چره، ۱۳۸۸). در رز مینیاتوری و رز هیبرید نیز مرحله تک‌هسته‌ای بهترین مرحله جهت تولید کالوس از بساک، معرفی شده‌است (راه‌پیما، ۱۳۸۵). همچنین در تطابق با یک تحقیق (Tabaeezadeh & Khosh-khui, 1981) روی کشت بساک رز، تحقیق حاضر نشان داد که بهترین مرحله نمو میکروسپور برای کالوس‌زایی زمانیست که کاسبرگ‌ها بسته بوده یا با فاصله بسیار کم از هم باز شده باشند. چنین نمونه‌هایی در اوایل فصل رویش گیاه یعنی در ماه‌های فروردین و اردیبهشت از فراوانی بیشتری

برخوردارند و با نزدیک شدن به انتهای فصل نمونه‌های برداشت شده دارای پاسخ‌دهی کمتری هستند. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایش اول، در سایر آزمایشها، از محیط کشت H1 و مرحله تک‌هسته‌ای میانی استفاده شد.



الف



ب

شکل ۱۲- نتایج فلوسایتومتری کالوس‌های بدست آمده؛ الف- گل‌محمدی (اکوتیپ کاشان)، ب- رز مینیاتوری

پیک ۱: سلول‌های مرده و غیرقابل استفاده، پیک ۲: گیاه جعفری به‌عنوان استاندارد، پیک ۳: نمونه کالوس گل‌محمدی یا رز مینیاتوری

یون آمونیوم به‌عنوان یک منبع نیتروژن به راحتی توسط گیاه جذب شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد. جذب یون آمونیوم برای گیاه ارجحیت دارد، زیرا تبدیل یون نیترات به یون آمونیوم که نیازمند انرژی است دیگر لازم نیست. رشد گیاهان کشت شده در حالتی که غلظت بالای یون آمونیوم وجود دارد غیریکنواخت و نامنظم است و حتی در این شرایط، بالا بودن میزان یون نیترات نیز مانع از رشد غیرعادی نمی‌شود. ممانعت از رشد

ممکن است در اثر تغییرات pH نباشد، اما قطعاً تجمع بیش از حد یون‌های آمونیوم سمّیت به همراه دارد (Mott *et al.*, 1985). محیط‌های دارای غلظت بالای آمونیوم باعث ممانعت از سنتز کلروفیل II و فتوسنتز می‌شوند (Arnozis *et al.*, 1988). در تحقیق حاضر به‌نظر می‌رسد که حضور یون آمونیوم اثر مناسبی روی پاسخ‌دهی کشت بساک‌ها نداشته است، به‌طوری که با کاهش یا حذف نیترات آمونیوم، کالوس‌زایی بساک‌ها به شکل معنی‌داری افزایش پیدا کرده‌است. حذف نیترات آمونیوم در کشت بساک جو و جایگزینی آن توسط اسید آمینه گلوتامین، تأثیر معنی‌داری بر پاسخ‌دهی بساک و تولید گیاه هاپلوئید داشته‌است (Olsen, 1987).

در مطالعه‌ای روی گندم مشاهده شده‌است که نیترات کلسیم، اثر بازدارنده‌ای بر جنین‌زایی سوماتیکی داشته‌است ولی سولفات کلسیم و کلرید کلسیم اثر تحریک‌کنندگی بر جنین‌زایی سوماتیکی داشتند (Mahalakshmi *et al.*, 2007). از طرفی یون نیترات معدنی سبب افزایش میزان سنتز سیتوکینین‌ها می‌شود (Hedden & Thomas., 2006). شاید افزایش در میزان بیوسنتز سیتوکینین سبب تحریک مداوم سلول‌ها به تقسیم سلولی می‌شود و سلول‌ها فرصتی برای رفتن به سمت جنین‌زایی (تمایز) را ندارند و در نتیجه کالوس‌زایی رخ می‌دهد. همچنین در تحقیقی دیگر، صرف‌نظر از تولید جنین یا کالوس، پیش‌تیمارهای کلسیمی باعث افزایش میزان پاسخ‌دهی بساک‌های توت‌فرنگی (رقم پاروس) شدند (ملکی‌چره، ۱۳۸۸).

اسیدهای آمینه به‌عنوان منبع نیتروژن کاهش یافته، در کشت بافت‌های مختلف گیاهی و نیز میکروسپورهای ایزوله شده، مورد استفاده قرار می‌گیرند. پرولین و گلوتامین کالوس‌زایی را در کشت میکروسپورهای برنج‌های ارقام ژاپنی تحریک کردند. همچنین این اسیدهای آمینه میزان باززایی گیاه سبز را در برنج افزایش دادند (Bhojwani & Razdan, 1996). در تحقیق دیگری گزارش شد که مخلوطی از اسیدهای آمینه شامل: گلوتامین، آرژنین، سیستئین، گلایسین و آسپارژین (هر کدام به میزان ۱mM)، نرزایی را در خیار به‌خوبی تحریک کردند (Ashok Kumar & Murthy, 2003).

قند سوربیتول که یک قند الکل است در خانواده Rosaceae به وفور یافت می‌شود، اما در تحقیق حاضر به هر میزان که جایگزین ساکارز شد میزان تولید کالوس از بساک کاهش یافت. در گندم، مشخص شده که میزان ٦٪ ساکارز باعث تحریک کالوس‌زایی می‌شود و از تکثیر بافت سوماتیکی جلوگیری می‌کند (Quyang, 1986). همچنین در توتون برای جنین‌زایی از میکروسپورها، غلظت ٦٪ ساکارز بهتر بود (Sopory Munshi, 1996). همچنین در کشت بساک گیاهان توت‌فرنگی و سیب که دو جنس از خانواده Rosaceae هستند، منبع هیدرات کربن مورد استفاده ساکارز معرفی شد (Owen & Miller, 1996؛ Zhang & Lespinasse, 1992).

نتایج حاصل از شمارش کروموزومی سلول‌های کالوس‌های بدست آمده با نتایج حاصل از تحقیقات Tabaeezadeh و Khosh-khui (۱۹۸۱)، مطابقت نداشت. فرضیاتی جهت توجیه عدم دستیابی به کالوس‌های هاپلوئید وجود دارد. این احتمال وجود دارد که سلول‌های تتراپلوئید دیواره بساک، منشأ سلول‌های کالوس‌ها بوده‌اند، یا اینکه سلول‌های کاهش نیافته میکروسپوری، به‌عنوان منشأ احتمالی سلول‌های کالوس‌های تولید شده بوده‌اند.

براساس بررسی منابع و نتایج تحقیق حاضر می‌توان گفت که آندروژنز در جنس رز بسیار سخت و دشوار است و نیازمند آزمایش‌های بیشتری جهت بررسی مجموعه عوامل مؤثر بر آن در گونه‌های جنس رز می‌باشد و با توجه به اهمیت فوق‌العاده رزها در سطح بین‌المللی و سهم بسیار بالای آنها در تجارت گل‌های زینتی، انجام تحقیقات مستمر در این زمینه ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

از اساتید محترم گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس که اینجانب را در انجام این تحقیق یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع مورد استفاده

- راه‌پیما، س.، ۱۳۸۵. بررسی کشت بساک در رز (رز هیبرید و رز مینیاتوری). پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران.
- ملکی‌چره، ج.، ۱۳۸۸. بررسی کشت بساک برخی از ارقام توت‌فرنگی (*Fragaria* × *ananassa*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران.
- Arnozis, P.A., Nelemans, J.A. and Fidenegg, G.R., 1988. Phosphoenolpyrovate Carboxylase activity in plants grown with either NO_3^- or NH_4^+ as inorganic nitrogen source. Journal of Plant Physiology, 132: 23-27.
- Ashok Kumar, H.G. and Murthy, H.N., 2003. Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 78(3): 201-208.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K., 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier, Amsterdam, The Netherland, 766p.
- Gresshoff, P.M. and Doy, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta, 107(2): 161-170.
- Hedden, P. and Thomas, S.G., 2006. Plant Hormone Signaling (Annual Plant Reviews, Volume 24). Blackwell Publishing Ltd, 372p.
- Jain, S.M., Sopory, S.K. and Veilleux, R.E., 1996. *In vitro* Haploid Production in Higher Plant (Volume1: Fundamental Aspects and Methods). Springer, The Netherland, 356p.
- Mahalakshmi, A., Singla, B., Khurana, J.P. and Khurana, P., 2007. Role of calcium-calmodulin in auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329). Plant Cell, Tissue Organ Culture, 88(2): 167-174.
- Meynet, J., Botton, E., Eychene, J. and Aime, F., 1996. Optimization of a method for the haploidization of cultivated roses. Acta Horticulture, 424: 399-401.
- Mott, R.L., Cordts, J.M. and Larson, A.M., 1985. Nitrogen and growth regulator effects on shoot and root growth of soybean *in vitro*. Tissue Culture in Forestry and Agriculture, 32: 336-337
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15(3): 473-497.
- Nitsch, J.P. and Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. Science, 163(3862): 85-87.
- Olsen, F.L., 1987. Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. Carlsberg Research Communications, 52(6): 393-404.
- Owen, H,R. and Miller, A.R., 1996. Haploid plant regeneration from anther cultures of three north American cultivars of strawberry (*Fragaris* x *ananassa* Duch.). Plant Cell Reports, 15(12): 905-909.
- Quyang, J.W., 1986. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*: 26-41. In: Hu, H. and Yang, H.Y., (Eds.). Haploid in Higher Plant *in vitro*. Springer, Beijing, 211p.
- Roberts, A.V., Lloyd, D. and Short, K.C., 1990. *In vitro* procedures for the induction of tetraploidy in a diploid rose. Euphytica, 49: 33-38.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Mottley, J. and Das, P., 1999. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. Scientia Horticulturae, 81(3): 201-228.
- Sopory, S.K. and Munshi, M., 1996. Anther culture: 145-176. In: Jain, S.M., Sopory, S.K. and Veilleux, R., (Eds.). *In vitro* Haploid Production in Higher Plants (Volume 1), Kluwer Academic Publishers, 356p.
- Tabaeezadeh, Z. and Khosh-Khui, M., 1981. Anther culture of *Rosa*. Scientia Horticuiturae, 15: 61-66.
- Zhang, Y.X. and Lespinasse, Y., 1992. Haploidy: 55-75. In: Hammerschlag, F.A. and Litz, R.E., (Eds.). Biotechnology of Perennial Fruit Crops. The Netherland, 550p.

Investigation on anther culture in Damask rose (*Rosa damascene* Mill.) and miniature rose (*Rosa chinesis*)

K. Mahdavi Mashaki[1], A. Moieni[2*] and M. Jalali Javaran[1]

1- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, E-mail: moieni_a@modares.ac.ir

Received: September 2011 Revised: April 2012 Accepted: July 2012

Abstract

Rose is known as the queen of flowers. Rosa damask (*Rosa damascena* Mill.) is utilized as a main source of rose oil and rose water in Iran. Biotechnology methods are considered as a fast and efficient way to produce haploid plants and pure lines. Among the different methods, androgenesis is considered as the most effective procedure, due to its high quantity of microspores in the anthers. In the present study, the effect of medium composition was evaluated on anther culture in two ecotypes of Damask rose, and miniature rose. The results showed that the interaction between H1 medium and mid-uninucleate stage produced the highest callogenesis in Damask rose, Kashan ecotype. Furthermore, the results showed that removing ammonium nitrate and doubling potassium nitrate in the medium produced higher callogenesis. In miniature rose, the medium containing calcium chloride and calcium nitrate produced higher callogenesis. Also, the amino acids improved callogenesis in anther culture of Damask rose, and miniature rose. Moreover, glycine, glutamine and casein hydrolysate were more effective than other studied amino acids. Sucrose was a better sugar compared to sorbitol for callogenesis in the studied genotypes. The chromosome counting and flowcytometery results illustrated that the produced calli were tetraploid (28 chromosomes).

Key words: *Rosa damascena* Mill., miniature rose, medium, anther culture, callogenesis, amino acids.