Archive of SID

بررسی کال زایی و باززایی جهت ایجاد تنوع ژنتیکی در ژنوتیپهای مختلف گل محمدی (*Rosa damascena* L.)

لیلا میرجانی*، میترا امام و سیدرضا طبایی عقدایی

تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۶

چکیده

گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) از مهم ترین گونه‌های معطر است که دارای خواص دارویی و اثرات درمانی می‌باشد. در این تحقیق، بررسی باززایی جهت ایجاد تنوع ژنتیکی بر روی ۱۸ ژنوتیپ مختلف گل محمدی صورت گرفت. القای کالوس بر قطعات برگ، گلبرگ، میله و گوشوارک برگ ژنوتیپهای مزبور انجام گردید. کشت ریزنمونه‌ها روی محیط MS نیمه جامد با غلظتهای مختلف هورمونی انجام گردید. میزان کل کال‌زایی در هر ژنوتیپ اندازه‌گیری شد و داده‌های حاصل در قالب یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سیستم SPSS مورد تجزیه واریانس قرار گرفت و مقایسه میانگینها با آزمون دانکن انجام شد. بین ژنوتیپها اختلاف معنی‌داری در سطح $P\leq$۰/۰۱ مشاهده شد و همچنین نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان داد که ژنوتیپهای استانهای آذربایجان شرقی و غربی دارای کمترین پتانسیل کال‌زایی و ژنوتیپ اصفهان ۶ بیشترین پتانسیل کال‌زایی بر روی محیط منتخب کال زایی شامل MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kinetin و ۵ میلی‌گرم در لیتر PCPA (mono chloro phenoxy acetic acid) می‌باشند. جهت باززایی از محیطهای کشت پایه MS، B5 و DKW به همراه هورمونهای متنوع در غلظتهای مختلف استفاده گردید. از بین این هیجده ژنوتیپ فقط در کالوسهای به وجود آمده از ساقه ژنوتیپ اصفهان۴ در محیط MS+3mg/l BA باززایی صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصل، باززایی در گل محمدی تحت تأثیر ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد قرار می‌گیرد و استفاده بهینه از این فاکتورها در نیل به اندام‌زایی مناسب و باززایی گیاه از کالوس در جهت ایجاد و به کارگیری تنوع سوماکلونی، امری ضروری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گل‌محمدی *Rosa damascena* Mill.، اندام‌زایی، باززایی، کالوس، ژنوتیپ و تنظیم‌کننده‌های رشد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ ، پست الکترونیکی: mirjani@rifr-ac.ir

مقدمه

گل محمدی از تیره Rosaceae و جنس *Rosa* نام علمی آن *Rosa damascena* Mill. می‌باشد. طبق نظر برخی از گیاه شناسان این درختچه هیبریدی از *R. gallica* × *R. centifolia* می‌باشد (۱۳). گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) یکی از گونه‌های ارزشمند گیاهی است که در بسیاری از کشورهای دنیا از جمله ایران، بلغارستان، ترکیه، هند، امریکا، انگلستان و ژاپن سابقه کشت و کار دیرینه دارد. این گونه جزء مهم ترین رزهای دنیای قدیم است که علاوه بر جنبه زینتی از جنبه‌های دیگری نیز مانند تولید اسانس و رایحه جذاب، دارا بودن خواص دارویی گل و میوه آن مورد توجه است. گل محمدی به صورت وحشی و خودرو در مناطق مختلفی از جهان شامل سوریه، قفقاز، مراکش و اندلس (اسپانیا) رویش دارد (۶). هدف از اصلاح گیاهان دارویی ومعطر افزایش کمیت و کیفیت آن دسته از مواد مؤثره در این گیاهان است که در صنایع دارویی از اهمیت خاصی برخوردار است. از این‌رو ارتقاء کمیت و

www.SID.ir

Archive of SID

کیفیت متابولیتها و مواد مؤثره موجود در سلولهای این گیاهان از اهمیت بسیاری برخوردار است (۳). محدودیت استفاده از روشهای اصلاحی مرسوم و پیشرفت قابل توجه در زمینه‌های سلولی و مولکولی استفاده از بیوتکنولوژی گیاهی را اجتناب ناپذیر نموده است. برای به کارگیری موفقیت‌آمیز بیوتکنولوژی گیاهان ازطریق انتقال ژنتیکی (۱۱ و ۲۸) و هیبریداسیون سوماتیکی جهت اصلاح گیاهان، استفاده از سیستمهای باززایی از قبیل کشت بافت، سلول و پروتوپلاست مورد نیاز است. هر چند هنوز به کارگیری این تکنولوژیها در اصلاح رزها صورت نگرفته است و گزارشهای کمی در مورد مطالعات بر هیبریداسیون سوماتیکی (۱۹) موجود است.

یکی از دلایل اصلی این محدودیت، مشکل باززایی این گیاهان از کالوسهای به دست آمده از قسمتهای مختلف رز با پتانسیل جنین‌زایی است. زیرا کالوسهای جنین‌زا به آسانی توانایی تولید جنین سوماتیک نرمال را در طی بازکشت از دست می‌دهند. بنابراین ایجاد روش مؤثر برای باززایی گیاه از این ساختارهای غیر نرمال ضروری است (۲۹).

در کشت پروتوپلاست رز، به علت مشکل بودن کشت پروتوپلاست‌ها از منابع دیگر کشتهای سوسپانسیون سلولی با پتانسیل جنین‌زایی به عنوان منابع پروتوپلاست استفاده گردیده است (۱۷ و ۱۹). هرچند از این طریق نیز به علت از دست رفتن پتانسیل جنین‌زایی نرمال در طی کشت مشکل وجود دارد. در تحقیق جالب توجهی که توسط Pati و Sharma (۲۰۰۴) برروی نقش ریزازدیادی و کشت پروتوپلاست در اصلا ح گل محمدی صورت گرفت، توسط قطعات تک گره تولید گیاهچه های ریشه دار شده و همچنین در محیط MS حاوی 2,4D (۱۰-۱ میکرومولار)، NAA (۱۰-۱ میکرومولار)، BAP (۱۰-۱ میکرومولار) کالوسهای ترد و شکننده از ساقه و قطعات آن تشکیل گردید (۲۵).

Pati و Path (۲۰۰۱) برای به دست آوردن کالوس در گل محمدی، تیمارهای هورمونی ۱۰-۱ میکرومولار NAA،۱۰-۱ میکرومولار 2,4D و ۱۰-۱ میکرومولار BA را به کار برده و کالوسهایی با مشخصات سبز روشن، فشرده، سخت و گره‌دار به دست آوردند که طی ۴ تا ۶ هفته به حداکثر اندازه خود رسیدند (۲۶).

Ishioka و Tanimoto (۱۹۹۰) کالوسهایی را در محیط MS حاوی ۱۰ میکرومولار NAA از ریزنمونه‌های ساقه رز بلغاری به دست آوردند و با حذف نیترات آمونیوم و افزودن ایندول استیک اسید و بنزیل آدنین موفق به ایجاد جوانه روی کالوس شدند، تعداد جوانه‌ها به طور معنی‌داری با افزایش یون کلسیم افزایش یافت (۱۴).

Tabaeezadeh و Khoshkhui (۱۹۸۱) کشت بساک گونه تتراپلوئید *R. damascene* را بررسی کرده و اثر غلظتهای مختلف اکسین و سیتوکینین بر مراحل نموی مختلف گلها مورد مطالعه قرار دادند که در نتیجه آن محیط MS کامل محتوی هورمونهای ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر kin و ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA را به عنوان بهترین محیط برای ایجاد کالوس گزارش کردند (۱۵).

گرچه گزارشهای متنوع مؤفقیت‌آمیزی در مورد القای جنین‌زایی سوماتیک در رز وجود دارد، ولی آنها به ژنوتیپهای خاصی محدود می‌شود. بنابراین یک پروتکل خاص برای القای جنین‌زایی سوماتیک در رز وجود ندارد که بتواند برای تمام ژنوتیپهای آن به کار گرفته شود (۱۰). طی تحقیق دیگری که توسط Murphy و همکاران (۱۹۷۹) صورت گرفته است، سلولهای کشت داده شده گل محمدی یک مقاومت غیرقابل انتظار در محیط کشت سلولی نسبت به خسارت حاصل از امواج ریزموج (۲۵۴nm) فرابنفش نشان داده‌اند که میزان DNA و محتوی کروموزومی آنها نسبت به گیاه والدی بیشتر بود و همچنین میزان ترکیبات پلی فنولیک و فلاونوئیدهای اصلی را بیشتر تولید می‌کردند (۲۳). در تحقیق دیگری که توسط Murphy و همکاران

www.SID.ir

Archive of SID

(۱۹۸۱) انجام گرفته است، میزان مقاومت و حساسیت سلولهای کشت داده شده گل محمدی نسبت به نمک (NaClO3) اندازه‌گیری شده، نور UV (۲۵۴nm) در حضور ۴- متوکسی متیل تیروکسیلان، مقاومت سلولها را نسبت به نمک مزبور بالا آورده و همچنین مشخص گردید که سلولهای حساس در تبدیل کلرات به کلریت نقش داشته‌اند (۲۲).

این تحقیق به منظور بررسی پتانسیل باززایی در این گونه جهت امکان ایجاد تنوع به خصوص در جهت بالا بردن میزان مواد مؤثره و مقاومت به تنشهای محیطی صورت گرفت.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپهای مورد مطالعه

ردیف	ژنوتیپ	منشأ
۱	آشرق۱	آذربایجان شرقی
۲	آغرب۱	آذربایجان غربی
۳	اردبیل۱	اردبیل
۴	اصفهان۹	جنوب غربی کاشان
۵	اصفهان۱۰	جنوب شرقی کاشان
۶	سمنان۲	سمنان
۷	بلوچستان۱	سیستان و بلوچستان
۸	فارس۱	فارس
۹	کهگیلویه۱	کهگیلویه و بویراحمد
۱۰	گلستان۱	گلستان
۱۱	گیلان۱	گیلان
۱۲	اراک ۱	مرکزی
۱۳	یزد۲	یزد
۱۴	اصفهان۲	جنوب غربی کاشان
۱۵	اصفهان۴	غرب کاشان
۱۶	اصفهان۵	جنوب غربی کاشان
۱۷	اصفهان۶	جنوب شرقی کاشان
۱۸	اصفهان۸	جنوب غربی کاشان

مواد و روشها

مواد گیاهی: در این پژوهش ۱۸ ژنوتیپ مختلف گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) مورد مطالعه قرار گرفت که این ژنوتیپها قبلاً از مناطقی با شرایط متفاوت آب و هوایی در ۲۸ استان کشور جمع‌آوری گردیده و در مزرعه گل محمدی واقع در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع در ۱۵ کیلومتری شمال غربی تهران به طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۰ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۴۴ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۳۳۰ متر از سطح دریا، کشت گردیده بود (جدول ۱).

استقرار و بازکشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت: ریزنمونه‌ها شامل شاخه، برگ، گلبرگ، میله و گوشوارک برگ ۱۸ ژنوتیپ بودند. قبل از قرار دادن ریزنمونه در محیط، در مورد شاخه ۱ تا ۲ میلی‌متر از انتهای قاعده آن قطع گردید.

کال‌زایی: در ابتدا جهت کال‌زایی از محیط کشت MS (۲۱) حاوی ترکیبهای مختلف هورمونی استفاده گردید (جدول ۲).

شکل ۱- نقشه محل جمع‌آوری ژنوتیپهای مختلف *Rosa damascena* Mill.

همچنین برای حذف ترشحات فنولی ریزنمونه‌ها ۰/۰۱ گرم در لیتر pvp به محیط کشت اضافه گردید. در انتهای هر ماه نمونه‌های آلوده و نکروزه حذف و نمونه‌های سالم واکشت شدند و در این زمان، گزارشی از میزان کال‌زایی، نکروزه شدن و آلودگی نمونه‌ها تهیه و تنظیم شد. میزان کل کال‌زایی در هر ژنوتیپ اندازه‌گیری شد و داده‌های حاصل

www.SID.ir

Archive of SID

در یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه واریانس قرار گرفت و مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن انجام گردید. بعد از اینکه بهترین محیط جهت کال‌زایی برای ۸ ژنوتیپ مشخص شد سایر ژنوتیپها در این محیط بهینه، کشت گردیدند. جهت بررسی میزان کال‌زایی، نمونه‌ها در دو تیمار تاریکی و روشنایی قرار گرفتند و سپس داده‌های حاصل بر اساس جمعیتهای مختلف و ترکیبهای هورمونی متفاوت در یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند.

جدول ۲- بهترین ترکیبهای مختلف هورمونی مورد استفاده در محیط کشت MS به کار گرفته شده در القای کالوس در ژنوتیپهای مختلف گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

ردیف	محیط
۱	(MS+5mg/l PCPA+1 mg/l Kin)
۲	(MS+9mg/l PCPA+1 mg/l Kin)
۳	(MS+10mg/l NAA+0.1mg/l BA+3 mg/l 2,4-D)
۴	(MS+4mg/l 2,4-D)

باززایی: پس از دوبار بازکشت جهت اندام‌زایی از محیطهای کشت پایه MS و B5 و DKW (۹) به همراه هورمونهای متنوع در غلظتهای مختلف شامل IBA (۰/۱-۲ mg/l)، Kinetin (۰/۰۵ -۶ mg/l)، NAA (۰/۵ -۳ mg/l)، BA (۰/۰۲ mg/l)، 2,4D (۰/۵-۴ mg/l)، TDZ (۰/۱-۵ mg/l)، GA3 (۰/۵-۳ mg/l)، IAA (۰/۱-۲ mg/l)، Zeatin (۰/۵-۶mg/l)، 2ip (۱-۲ mg/l) و ABA (۲-۴ mg/l) استفاده گردید.

نتایج

جهت بررسی میزان کال‌زایی در دو تیمار تاریکی و روشنایی به عنوان نمونه، ۳ ژنوتیپ (سمنان۲، اصفهان۲ و اصفهان۶) مورد آزمون قرار گرفت. سپس داده‌های حاصل تجزیه واریانس گردید (جدول۳).

جدول۳- تجزیه واریانس میزان کال‌زایی گل محمدی در تاریکی و روشنایی

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (ss)	میانگین مربعات (ms)
ژنوتیپ	۲	۱۵۱۰/۸۰	۷۵۵/۴۰*
روشنایی	۱	۴۸۰۳۲/۴۴	۴۸۰۳۲/۴۳ **
هورمون	۳	۲۴۵۳/۷۰	۸۱۷/۹۰ *
ژنوتیپ* روشنایی	۲	۴۶۸/۵۹	۴۷۰/۲۸ns
ژنوتیپ* هورمون	۶	۲۱۸۸/۱۵	۳۶۴/۶۹ns
روشنایی* هورمون	۳	۴۲۱۸/۵۴	۱۴۰۶/۱۸**
ژنوتیپ* روشنایی*هورمون	۶	۲۱۲۸/۶۹	۲۳۴/۲۹ns

ns ، * و** به ترتیب عبارتند از عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

اختلاف معنی‌دار مشاهده شده در میزان کال‌زایی در تاریکی و روشنایی بیانگر این است که در تاریکی میزان کال‌زایی بیشتر از روشنایی می‌باشد و همچنین بین ژنوتیپها نیز در میزان کال‌زایی اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید و در بین ترکیبات مختلف هورمونی محیط نیز اختلاف معنی‌داری در میزان کال‌زایی دیده شد، پس نوع ترکیبات هورمونی محیط کشت و ژنوتیپ هم علاوه بر تاریکی در میزان کال‌زایی مؤثر است. البته در بین جداکشتهای مختلف نیز برگها تنها در تاریکی کال‌زایی کردند، در نتیجه ژنوتیپهای مورد بررسی دیگر تنها در تاریکی جهت

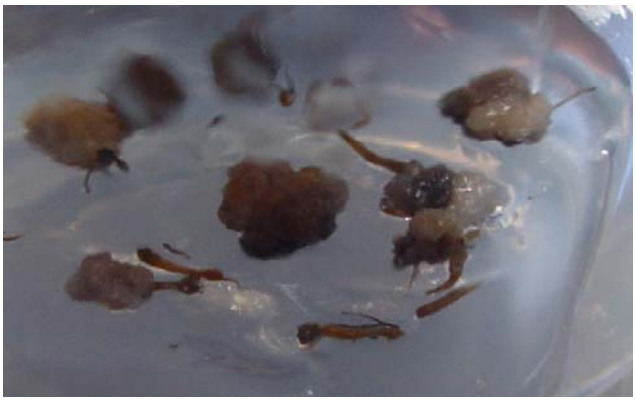
www.SID.ir

Archive of SID

کال‌زایی برده شد. از نظر میزان کل کال‌زایی (جدول۴) تأثیر ژنوتیپ، ترکیبات هورمونی و نیز اثر متقابل آنها معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۱) بود. بنابراین ژنوتیپهای مورد مطالعه نسبت به ترکیبهای هورمونی واکنش متفاوتی نشان دادند.

شکل ۲- ایجاد کالوس از گلبرگ ژنوتیپ یزد۲ در محیط MS+9mg/l PCPA+1 mg/l Kin

شکل ۳- القای کال‌زایی در گوشوارک‌های ژنوتیپ گلستان۱ در محیط B5+2mg/l 2,4D+1.5 mg/l Zeatin



شکل ۴- ایجاد کالوس از میله ژنوتیپ اصفهان۹ در محیط B5+2mg/l 2,4D+1.5 mg/l Zeatin

شکل ۵- القای کال‌زایی در برگهای گلستان۱ در محیط MS+5mg/l PCPA+1 mg/l Kin

شکل ۶- القای کال‌زایی در ساقه بلوچستان۱ درمحیط B5+2mg/l 2,4D+1.5 mg/l Zeatin

شکل ۷- القای کال‌زایی در ساقه اصفهان۴ درمحیط B5+2mg/l 2,4D+1.5 mg/l Zeatin

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۸- القای کال‌زایی در ساقه بلوچستان۱ درمحیط MS+5mg/l PCPA+1 mg/l Kin

شکل ۹- القای کال‌زایی در ساقه اصفهان۹ درمحیط MS+5mg/l PCPA+1 mg/l Kin

جدول ۴- مجموع مربعات حاصل از تجزیه واریانس تیمارها بر اساس اثر نوع ترکیب هورمونی و ژنوتیپها به طور جداگانه در میزان کل کال‌زایی.

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (ss)	میانگین مربعات(ms)
ژنوتیپ	۷	۴۶۲۵۶	۶۶۰۸**
ترکیب هورمونی	۳	۲۱۹۸/۵۳	۷۳۲/۸۵**
تکرار	۲	۳۱۳/۴۰	۱۵۶/۷۰ ns
ژنوتیپ* ترکیب هورمونی	۲۱	۱۹۷۱۶/۰۱	۹۳۸/۸۵**

* و** به ترتیب عبارتند از اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

مقایسه میانگینهای میزان کل کال‌زایی بر حسب ژنوتیپهای مختلف ($P\leq$۰/۰۵) (جدول۵) نیز نشان داده که ژنوتیپ اصفهان۶ در یک دسته جدا و ژنوتیپهای اصفهان۱۰، سمنان۲، اصفهان۲ با هم در یک دسته و اصفهان۹ در دسته‌ای جدا، اردبیل۱ و آشرق۱ نیز در یک دسته و همچنین آشرق۱ با آغرب۱ نیز در یک دسته قرار گرفتند. همان طور که مشاهده می‌شود بیشترین میزان کال‌زایی مربوط به ژنوتیپ اصفهان۶ و کمترین آن هم مربوط به ژنوتیپهای آشرق۱ و آغرب۱ بوده است. در نتیجه به‌طورکلی می‌توان گفت ژنوتیپهای استانهای آذربایجان شرقی و غربی دارای کمترین و ژنوتیپ اصفهان۶ دارای بیشترین پتانسیل کال‌زایی می‌باشند.

جدول ۵- دسته‌بندی میانگینهای میزان کل کال زایی بر اساس ژنوتیپهای متفاوت با آزمون Duncan در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۵

ردیف	ژنوتیپ	میانگین میزان کل کال زایی
۱	اصفهان۶	۶۳/۳a
۲	اصفهان۱۰	۵۰/۱۸b
۳	سمنان۲	۴۸/۸۷b
۴	اصفهان۲	۴۳/۵۷b
۵	اصفهان۹	۳۱/۴۵c
۶	اردبیل۱	۱۴/۴۳d
۷	آشرق۱	۷/۹۵de
۸	آغرب۱	۱/۷۶e

مقایسه میانگینهای میزان کل کال‌زایی بر حسب ترکیبات مختلف هورمونی ($P\leq$۰/۰۵) (جدول۶) نیز نشان داده که محیط MS+4mg/l 2,4D تنها در یک دسته جدا قرار گرفته و کمترین تأثیر را در میزان کال‌زایی به نسبت بقیه داشته است.

www.SID.ir

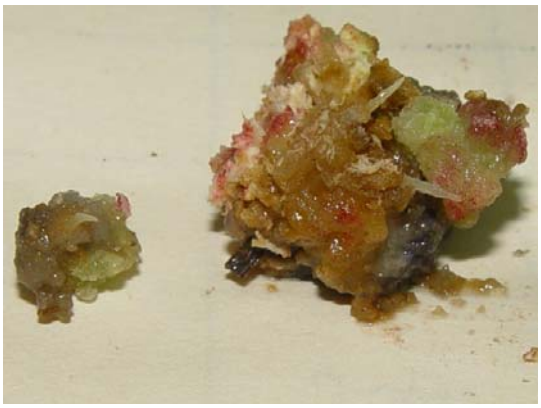
Archive of SID

جدول ۶- دسته‌بندی میانگینهای میزان کل کال زایی بر اساس ترکیب هورمونی به طور جداگانه با آزمونDuncan در سطح احتمال $P\leq$۰/۰۵

ردیف	ترکیب هورمونی	میانگین
۱	(MS+5mg/l PCPA+1 mg/l Kin)	۳۸/۴۲a
۲	(MS+9mg/l PCPA+1 mg/l Kin)	۳۴/۸۲a
۳	(MS+10mg/l NAA+0.1mg/l BA+3 mg/l 2,4D)	۳۴/۵۶a
۴	(MS+4mg/l 2,4D)	۲۵/۴۶b

در شکلهای زیر نمونه‌هایی از کال‌زایی جداکشتهای مختلف ژنوتیپهای متفاوت آورده شده است.

باززایی: همان طور که ذکر شد، جهت باززایی از تیمارهای مختلفی استفاده گردید، اما فقط در بعضی از موارد اندام ساقه مانند و ریشه دیده شد. به عنوان مثال در شکل۱۰ از جداکشت ساقه ژنوتیپ اصفهان۴ در محیط MS+5mg/l PCPA+1 mg/l Kin شروع اندام‌زایی دیده می‌شود. از همان جداکشت ساقه ژنوتیپ اصفهان۴ در محیطB5+2mg/l 2,4D+ 1.5mg/l Zeatin+vitamin اندام ساقه مانند نیز مشاهده گردید (شکل ۱۱).

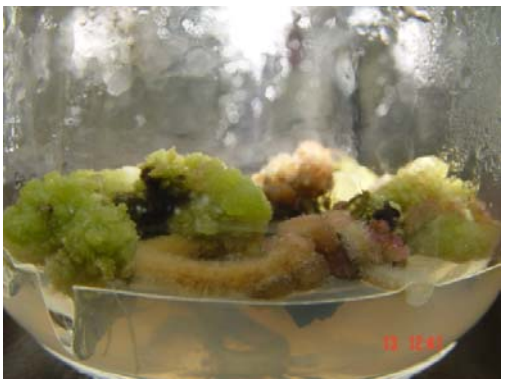


شکل ۱۰- شروع اندام‌زایی در جداکشت ساقه ژنوتیپ اصفهان۴

از کالوس القایی از ریزنمونه‌های ساقه ژنوتیپ اصفهان ۱۰ در محیط MS ریشه به دست آمد (شکل ۱۲). همچنین ایجاد ریشه در کالوس القایی از گلبرگ ژنوتیپ یزد ۲ دیده شد (شکل۱۳).

و بالاخره بهترین اندام‌زایی در ژنوتیپ اصفهان۹ و اصفهان۴ مشاهده شد. القای کال‌زایی از ریزنمونه ساقه ژنوتیپ اصفهان۹ در محیط MS+10mg/l NAA+0.1mg/l BA+3 mg/l 2,4Dصورت گرفت، سپس چندین بار بازکشت انجام شد

شکل ۱۱- اندام ساقه مانند در جداکشت ساقه ژنوتیپ اصفهان۴



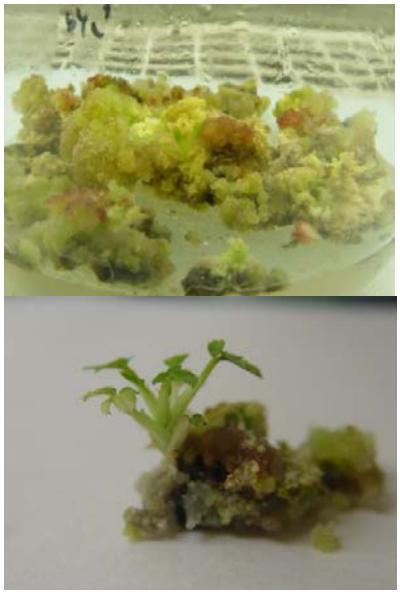
شکل ۱۲- ایجاد ریشه در کالوس القایی از ساقه ژنوتیپ اصفهان

شکل ۱۳- ایجاد ریشه در کالوس القایی از گلبرگ ژنوتیپ یزد ۲

www.SID.ir

Archive of SID

در نهایت در محیط باززایی MS+6mg/l BA +2mg/l Kinitin 2,4D +2 mg/l چندین ساقه به همراه برگ دیده شد (شکل۱۴).



شکل۱۴- اندام‌زایی در جداکشت ساقه ژنوتیپ اصفهان۹

اما القای کالزایی از ریزنمونه ساقه در ژنوتیپ اصفهان ۴ در محیط کالزایی MS+5mg/l PCPA+1 mg/l Kin به دست آمد بعد از آن چندین بار بازکشت و سپس شوک گرسنگی به مدت ۴ ماه به آن داده شد. آنگاه در محیط باززایی MS+3mg/l BA انتقال و بعد از ۲ هفته باززایی مشاهده گردید (شکل ۱۵).

در نهایت گیاه باززایی شده در محیط BA+0.01mg/l IBA MS+3mg/l تکثیر گردید تا برای اهداف بعدی مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۱۶).

شکل۱۵- باززایی در جداکشت ساقه ژنوتیپ اصفهان۴

شکل ۱۶- تکثیر گیاه باززایی شده

اما در همین ژنوتیپ پس از القای کالزایی و شوک گرسنگی جنین‌زایی نیز در زیر میکروسکوپ مشاهده گردید (شکل ۱۷) ولی پس از مدتی از بین رفت.

شکل۱۷- جنین‌زایی در جداکشت ساقه ژنوتیپ اصفهان۴

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

همان طور که گفته شد تیمار تاریکی جهت کال‌زایی مناسب‌تر بود و همسو با مشاهدات Canli (۲۰۰۳) می‌باشد که تیمار تاریکی برگها را برای شکل‌گیری کالوس در رزها بسیار مهم گزارش کرده بود (۵).

Memon و همکاران (۲۰۰۱) از میان گره *Rosa indica* بر روی محیط MS تغییر یافته با غلظتهای مختلف IBA و NAA کالوس به دست آوردند. در این بررسی کالوسها در همان محیط پایه و همچنین محیط پایه B5 ولی با هورمونهای متفاوت دیگر به دست آمدند (۲۰). Kim و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که جداکشتهای برگ *Rosa hybrida* کشت شده بر روی محیط کشتی با غلظت پایین NAA و 2.4D (۰/۱ mg/l) به میزان کم باعث القای کالوس می‌گردد و غلظت بالای هورمونهای NAA+Kin تولید کالوسهای حجیم می‌کند (۱۶). نتایج مشابهی نیز توسط Pirniakan و همکاران (۲۰۱۴) به دست آمد (۴ و ۲۷). در حالی‌که در این تحقیق *Rosa damascena* در غلظتهای بالای NAA و 2,4-D و همچنین غلظت بالای PCPA و Kin کالوس تشکیل داد. در طی تحقیق دیگری بر ریزنمونه های رز گالیکا، رضانژاد و همکاران (۱۳۹۲) با استفاده از غلظت(۲–۳ mg/l) 2.4D و BA (۱ mg/l) تحریک کالوس زایی بر جداکشتهای مختلف این گیاه را شاهد بودند (۲).

از بین هجده ژنوتیپ به کار گرفته شده در این پژوهش فقط در کالوسهای به وجود آمده از ساقه ژنوتیپ اصفهان۴ در محیط MS+3mg/l BA باززایی صورت گرفت. همچنین در طی تحقیقی توسط اطرشی و همکاران (۱۳۹۳) کالوس زایی مناسب از ریزنمونه کوتیلدون بر محیط کشت مشابه این تحقیق به دست آمد (۱).

کالوسهای ریشه‌زا از بافتهای سوماتیک *Rosa hybrida* و *Rosa chinesis minima* به میزان زیادی به دست آمده است (۱۳). که در این بررسی نیز میزان زیادی کالوسهای ریزوژن در ژنوتیپ اصفهان ۱۰ به دست آمد.

همچنین گزارشهایی در مورد ایجاد کالوسهای جنین‌زا با استفاده از ریزنمونه برگ (۸) و ریزنمونه میله پرچم (۲۴) داده شده است ولی کالوسهای القایی از این ریزنمونه‌ها در گل محمدی جنین‌زا نبودند.

همچنین بین ریزنمونه‌های انتخاب شده ساقه، برگ، میله، گوشوارک و گلبرگ بیشترین اندام‌زایی در ساقه دیده شد. نتایج این بررسی تا حدی با یافته‌های Chi-ni و Schuyler (۱۹۹۶) همسویی نشان می‌دهند که با استفاده از غلظت بالای 2,4-D به اندام‌زایی و حتی سلولهای جنینی از جداکشت برگ دست یافته‌اند و همچنین با انتقال کالوس ریزوژن به محیط باززایی شامل TDZ وGA3 به میزان کمی شاخه‌زایی و جنین‌زایی رسیدند (۷).

Pirniakan و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از غلظت ۱ mg/l هورمون TDZ بهترین نتایج را در تولید کالوسهای جنین‌زا در رز مینیاتوری هفت رنگ به دست آوردند (۴ و ۲۷) و Zakizadeh و همکاران (۲۰۰۸) غلظتهای بالای هورمون TDZ (۵–۱۰ mg/l) را در تولید کالوسهای جنین‌زا مؤثر دانستند (۳۱). اما استفاده از هورمون TDZ (۰/۱–۵ mg/l) در مورد گل محمدی تأثیری بر روی باززایی نداشت.

دست آوردهای این بررسی مبنی بر استفاده از ترکیب هورمونهای مختلف برای نیل به اندام‌زایی در توده‌های گل محمدی از نقاط مختلف با موفقیتهای Xiangian و همکاران (۲۰۰۲) در دست‌یابی به اندام‌زایی بر کالوس حاصل از برگ دو کولتیوار مختلف هیبرید رز بر محیط کشت دارای هورمونهای TDZ وGA3 و BA همسو می‌باشد (۳۰). همچنین مطالعه بر روی جنین‌زایی سوماتیک چهار کولتیوار .*Rosa hybrida* L نشان داد که درصد کال زایی بین کولتیوارها تفاوت معنی‌داری داشت و تیمار هورمونی شامل BA ۰/۵mg/l و NAA ۰/۳mg/l بالاترین میزان جنین‌زایی را داشته است (۲۷). مقایسه

www.SID.ir

Archive of SID

میانگینهای میزان کل کال‌زایی *Rosa damascena* بر حسب ژنوتیپهای مختلف نیز نشان داد تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود دارد. بدین ترتیب دستورالعمل واحدی برای تمامی ژنوتیپهای گل محمدی جهت کال زایی و باززایی به دست نیامده است و تأثیر ژنوتیپ در این بین حائز اهمیت است.

Visessuwan و همکاران (۱۹۹۷) از جنین نارس به دست آمده از هیبرید بین *Rosa hybrida* L. cv. Gelb Dagmer و *Hastrap* * *R. chinesis* var. mutabilis کالوس به دست آوردند و هر یک ماه به مدت دو سال روی همان محیط بازکشت کردند و سپس روی محیط باززایی ساختار شبه جنین و سپس گیاهچه به دست آوردند (۲۹). اما در این طرح کالوسها ۴ ماه در همان محیط کال‌زایی باقی ماندند و در این زمان کاملاً قهوه‌ای شدند و سپس جنین‌زایی مشاهده گردید. قهوه‌ای شدن در این آزمایش ممکن است عامل ایجاد بافت جنین‌زای سوماتیکی باشد که توسط گرسنگی ایجاد شده است (۱۸) و ممکن است مکانیسم زنده‌مانی گیاه در پاسخ به موقعیتهای بحرانی باشد. این حالت مرگ کالوس می‌تواند منجر به تولید سلولهایی گردد که باعث ایجاد جنینهای سوماتیکی می‌گردند (۱۰).

Estabrooks و همکاران (۲۰۰۷) گزارش دادند که کالوسها پس از ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی تولید جنین می‌کنند ولی در این طرح شوک سرمایی داده شد ولی جنینی به دست نیامد (۱۰).

به طور کلی گزارشهای محدودی از باززایی و شکل‌گیری جنین سوماتیک در بیشتر رزها وجود دارد، اما بیشتر دست آوردها غیر قابل تکرار بوده و یا فقط در معدودی از ژنوتیپها با درصد پایینی اتفاق می‌افتند. در آزمایش حاضر نیز همان طور که گفته شد بر حسب نوع جداکشت و همچنین نوع محیط در میزان کال زایی تفاوت وجود داشت و از یک قانون کلی پیروی نمی‌کردند. به همین دلیل دنبال کردن یک روش مشخص امکان پذیر نبود و مجبور به انجام همه آزمایشها بر روی کالوسهایی با منشاهای متفاوت بوده و در میان هیجده ژنوتیپ مورد بررسی تنها چهار ژنوتیپ اصفهان ۱۰، اصفهان ۴، اصفهان ۹ و یزد ۲ اندام‌زایی نشان دادند و تنها در دو ژنوتیپ اصفهان ۴، اصفهان ۹ آن هم در دو محیط کاملاً متفاوت باززایی صورت گرفت.

بر اساس نتایج حاصل، باززایی در گل محمدی تحت تأثیر ژنوتیپ، ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد قرار می‌گیرد و استفاده بهینه از این فاکتورها در باززایی جهت ایجاد و به کارگیری تنوع سوماکلونی، امری ضروری می‌باشد.

منابع

۱- اطرشی ، م.کوثرمرادی، ۱۳۹۳، بررسی کالوس زایی و اندامزایی غیرمستقیم گیاه فلفل دلمه ای (*Capsicum annuum*) در شرایط کشت درون شیشه ای. مجله پژوهشهای گیاهی. جلد ۲۷. شماره ۳. صفحات: ۳۴۶-۳۵۵.

۲- رضانژاد، ف. طراحی، ر، ۱۳۹۲، اثر نور و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر کالوس زایی و تجمع انتوسیانین در کالوسهای حاصل از جداکشتهای مختلف در (*Rosa galica'*). مجله پژوهشهای گیاهی. جلد ۲۶. شماره ۲. صفحات: ۱۹۵-۱۸۴.

۳- واترمن، هی.، ۱۳۷۹، گیاهان اسانس دار، ترجمه: بقالیان، کامبیز و نقدی بادی، حسنعلی.، انتشارات شهر اندرز.

۴- ویشلقی، ن.، جلالی جواران، م. و معینی، ا. ۱۳۸۹. باززایی رز مینیاتوری هفت رنگ (*Rosa hybrida*,. cv 'Tanbakeda') از جنینهای سوماتیکی. مجله علوم باغبانی ایران. دوره ۴۱. شماره ۴. صفحات:۳۵۷-۳۴۷.

5- Canli, F.A., 2003. Effect of dark and TDZ on callus formation of rose leaf explant. Pakistan Journal of Biological Sciences, 6(19):1672-1674.

6- Chevallier, A., 1996. The Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersely, London, UK.

www.SID.ir

Archive of SID

7- Chi-ni Hsia and Schuyler S. Korban, S., 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinesis* minima. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 44:1-6

8- De Wit, J.C., Esendam, H.F., Honkanen, J.J., Tuominen, U., 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration of flowering plants in rose. Plant Cell Reports. 9:456–458.

9- Driver, J. A., and Kuniyuki, H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut root stocks (*J. hindsii* × *J. regia*). HortScience, 19:507-509.

10-Estabrooks, T., Browne, R. and Dong, Z., 2007. 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid promotes somatic embryogenesis in the rose cultivar 'Livin' Easy' (*Rosa* sp.). Plant Cell Reports, 26:153–160

11- Firoozabady, E., lvloy, Y., Courtney-Gutterson,N.. Robinson. K.,1994. Biotechnology.,12: 609-613.

12- Guenther, E., 1952. The Essential Oils. Vol.5, Robert E. Krieger Publishing Company Malabar, Florida, USA

13- Hsia, C. and Korban, S., 1996. Organogenesis and somatic embrogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinesis minima*. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 44:1-6.

14- Ishioka, I., Tanimoto, S., 1990. Plant regeneration from Bulgarian rose callus. Plant Cell, Tissues and Organ Culture, 22: 197-199.

15- Jabbarzadeh, Z. Khosh – Khui. M., 2005. Factors affecting tissue culture of Damask rose, Scientia Horticulture, 105(4): 475-482.

16- Kim, C. K., Chung, J. D., Jee, S. K., Oh, J. Y., 2003. Somatic embryogenesis from *in vitro* grown leaf explants of *Rosa hybrida* L. Journal of Plant Biotechnology, 5, 161-4.

17- Krishnamurthy, K. V., Hendre, R.R.. Godbole, D.A., Kulkarni, V.M., Mascarenhas, A.F.. Jagannathan, V, 1979. Plant Science Letters., 15: 135-137

18- Lee EK, Cho DY, Soh WY., 2001. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. Plant Cell Reports. 20(5): 408-415.

19- Matthews, D., Mottley, J., Yokoya, K., Roberts, A.V., 1994. In "Biotechnology in Agriculture and Forestry" Vol. 29. Plant Protoplasts and Genetic Engineering (ed. by Bajaj, Y.P.S), p. 146-160,Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

20- Memon, N.A., E. Mckyes, M.S. Soomro, I.D.M. Koondhar., 2001. Regeneration of roses via nodal segments *in vitro*. Sindy University. Research. Journal. (Sci. Ser.), 33: 31-34.

21- Murashige,T.and Skoog,F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. .Physiologia Plantarum, 15:437-494

22- Murphy, T. and Imbrie, C., 1981. Induction and characterization of chlorate resistance strain of *R. damascena* cultured cell.Plant Physiology, 67(5):910-916.

23- Murphy, T., Hamilton, C., 1979, A strain of *R. damascena* cultured cells resistant to ultra violet radation. Plant Physiology, 64:936-947.

24- Noriega, C. and Sondahl, M.R., 1991. Somatic embryogenesis in *hybrid tea roses*. Biotechnology. 9:991-993.

25- Pati, P. K., Sharma, M., 2004. Micropropagation and protoplast culture, ISHS Acta Horticulture, Vol. 547 III

26- Pati, P., Path, S., 2001. *In vitro* propagation of Rosa, Biotechnology Advances, 24: 94-114.

27- Pirniakan, B., Kalantari, S., Babalar, M., 2014. Somatic embryogenesis from leaf & petiole explants of some Rosa hybrida L. cultivars. International Journal of Biosciences. Vol. 5, No. 11, p. 1-7.

28- Van der Mark, F., Pijnacker-Hordijk, J.P.,Varga, G.A.1., de Vries, D.P., Dons, J.J M., 1990. Journal of Genetic- & Breeding., 44: 263-268.

29- Visessuvvan, R., Kawai, T. and Mii., M., 1997. Plant Regeneration from Cell Suspension Culture Derived from Immature Embryo of Rose. Plant Biotechnology, 14(1), 29-33.

30- Xiangian Li, Sergei F. Krasnyanski and Schuyler S. Korban., 2002. Organogenesis and Somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Rosa*. Journal of plant physiology. 159(3):313-319.

31- Zakizadeh, H., Debnea, T., Sriskandarajah, S., Frello, S. and Serek, M., 2008. Regeneration of Miniature Potted Rose (*Rosa hybrida* L.) via somatic Embryogenesis. European Journal of Horticultural Science, 73(3), 111-117.

www.SID.ir

Archive of SID

Callus induction and regeneration of different accessions for genetic variation of *Rosa damascene* Mill.

Mirjani L., Emam M. and Tabaei- Aghdaei S.R.

Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

*Rosa damascen*es Mill. is a most important aromatic plant that it has pharmacies properties'. In this research regeneration of 18 different accessions was studied for genetic diversity production. Callus induction was achieved on leaf, petiole, stipule and filament sections of these accessions. Culture of explants was done on semi solid MS medium supplemented with growth regulator(s) in different concentrations of 2, 4- D, IBA, NAA, PCPA, Kinetin and BAP. Total callus induction about each accession was measured and these data were analyzed at randomized complete design by using of SPSS software (2006). Averages were compared by Duncan's multiple rang test. Genotypes showed significant differences ($P<0.01$) for callus induction. Also, lowest and highest callus induction was observed repeatedly in genotypes of Azerbaijan (western and eastern) and Isfahan 6 that last, cultured on MS medium contained 1 mg/l Kinetin and 5 mg/l PCPA. The media such as B5, DKW and MS with different ranges of growth regulators were used for regeneration. Within 18 accessions, regeneration of callus was done at stem explants of Isfahan 4 accession in MS medium with 3mg/l BA. The results emphasized on genotype, kind of explants and concentration of growth regulators as key factors in regeneration of *Rosa damascene* and optimal application of these factors was necessary for soma clonal variation followed by organogenesis and regeneration from callus.

Key words: *Rosa damascenes* Mill, Organogenesis, Callus, accession and Growth regulators

www.SID.ir