مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۹، شماره ۱، سال ۱۳۹۲

«مقاله کوتاه علمی»

اثر پیش‌تیمارهای دمائی و شیمیائی بر روی کالوس‌زایی در کشت بساک گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.) و رز هفت‌رنگ (*Rosa hybrida*)

Effect of Thermal and Chemical Pre-treatment on Callogenesis of Anther Culture in Damask Rose (*Rosa damascene* Mill.) and Hybrid Tea Rose *(Rosa hybrida)*

داود کیانی[۱]، احمد معینی[۲] و مریم جعفرخانی[۳]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس، تهران (نگارنده مسئول)
۳- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲۱

کیانی، د.، معینی، ا.، و جعفرخانی، م. ۱۳۹۲. اثر پیش‌تیمارهای دمائی و شیمیائی بر روی کالوس‌زایی در کشت بساک گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.) و رزهفت‌رنگ (*Rosa hybrida*). **مجله به‌زراعی نهال و بذر** ۲-۲۹ (۱): ۱۴۷-۱۴۳.

رزها علاوه بر مصارف زینتی، یکی از گل‌های مهم مورد استفاده برای صنایع عطرسازی، دارویی و غذایی هستند. تقاضاهای جدیدی که در صنعت رز وجود دارد، استفاده از روش‌ها و راهکارهای نوین در برنامه‌های به‌نژادی آن را ضروری می‌کند (Gudin, 2000).یکی از راهکارهای انتقال صفات مطلوب انجام تلاقی‌های بین گونه‌ای می‌باشد. تلاقی بین گونه‌ای در رز به علت تفاوت در سطوح پلوئیدی رزهای وحشی واصلاح شده با موفقیت همراه نبوده و در حالیکه می‌توان با استفاده از روش‌های نوین نسبت به تولید گیاه دی‌هاپلوئید از گیاه تتراپلوئید اقدام نموده و سپس از دی‌هاپلوئیدهای حاصل در تلاقی با ارقام وحشی دیپلوئید استفاده کرده و ژن مورد نظر را از گونه‌های دی‌هاپلوئید به ارقام تتراپلوئید انتقال داد (Meynet *et al.*,1996). به طور کلی در شرایط آزمایشگاهی از سه روش نرزایی، ماده‌زایی و حذف کروموزومی برای تولید گیاهان هاپلوئید استفاده می‌شود

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: moieni_a@modares.ac.ir

(Kasha *et al.*,1995) . برای القای نرزایی، تیمارهای تنشی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Reynolds, 1997; Touraev *et al.*,2001). از تنش‌های رایج می‌توان تنش‌های سرمایی، گرمایی و غذایی را نام برد (Touraev *et al.*,2001). با توجه به موفقیت استفاده از روش هاپلوئیدی از طریق نرزایی در اصلاح بعضی از گیاهان، متأسفانه تاکنون این روش در گونه‌های جنس رز موفقیت‌آمیز نبوده است. در پژوهش حاضر اثر چند پیش‌تیمار دمایی و شیمیایی بر کالوس‌زایی در کشت بساک گیاهان گل‌محمدی و رز هفت رنگ مورد بررسی قرار گرفت.

در این پژوهش از دو اکوتیپ گل‌محمدی (*Rosa damascena* Mill.) کاشان و آذران و همچنین یک رقم رز هیبرید (*Rosa hybrida*) ، رز هفت‌رنگ رشد یافته در شرایط مزرعه استفاده شد. برای تعیین مراحل مختلف نموی میکروسپور از رنگ لاکتوفنل آبی استفاده گردید. همچنین از طول کاسبرگ و رنگ بساک به عنوان شاخص‌های مورفولوژیکی استفاده شد. غنچه‌های برداشت شده، جهت ضدعفونی به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ (W/V)و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد قرار داده شدند. سپس سه بار با آب مقطر استریل آبشویی شدند. کشت بساک‌ها در محیط کشت H1 (Own and Miller, 1996) حاوی ترکیب هورمونی 2,4-D به مقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر و کینتین به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر انجام شد. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار (هر تکرار از یک پتری‌دیش (۱۵ × ۶۰ میلی متر) با ۱۰ بساک تشکیل می‌شد) انجام شدند. در محیط‌های کشت جامد از آگار-آگار به مقدار ۷/۵ گرم در لیتر استفاده شد. همچنین در محیط‌های کشت جامد، تنظیم pH بعد از افزودن آگار-آگار انجام شد و در نهایت پتری‌دیش‌های کشت شده در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تاریکی به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند.

فاکتورهای مورد مطالعه درآزمایش‌های انجام شده

• آزمایش بررسی مراحل مختلف نموی میکروسپور

فاکتور اول) مراحل مختلف نموی میکروسپور در سه سطح

فاکتور دوم) رقم در سه سطح (اکوتیپ آذران، اکوتیپ کاشان، رز هفت‌رنگ)

• آزمایش بررسی اثر پیش‌تیمارهای گرمایی و مانیتول – گرمایی

فاکتور اول) پیش‌تیمار در سه سطح (گرما ، مانیتول-گرما و شاهد (بدون پیش‌تیمار))

فاکتور دوم) رقم در سه سطح (اکوتیپ آذران، اکوتیپ کاشان، رز هفت‌رنگ)

فاکتور سوم) مدت زمان اعمال پیش‌تیمار در

چهار سطح (۱، ۲، ۳ و۴ساعت)

• آزمایش بررسی اثر پیش‌تیمارهای سرمایی و مانیتول–سرمایی

فاکتور اول) پیش‌تیمار در سه سطح (سرما، مانیتول – سرما و شاهد (بدون پیش‌تیمار))

فاکتور دوم) رقم در سه سطح (اکوتیپ آذران، اکوتیپ کاشان، رز هفت‌رنگ)

فاکتور سوم) مدت زمان اعمال پیش‌تیمار در چهار سطح (۱، ۲، ۳ و۴ روز)

• آزمایش بررسی پیش‌تیمارهای گرمایی وسرمایی پس از کشت اولیه بساک‌ها در محیط کشت H1

فاکتور اول) پیش تیمار در سه سطح (گرما، سرما و شاهد (بدون پیش‌تیمار))

فاکتور دوم) رقم در سه سطح (اکوتیپ آذران، اکوتیپ کاشان، رز هفت‌رنگ)

فاکتور سوم) مدت زمان در سه سطح (۳، ۵ و ۷ روز)

به منظور بررسی تأثیر سرما و گرما بر کشت بساک غنچه‌هایی با ساقه‌های به طول حدود ۱۰ سانتی‌متر تهیه و قاعده ساقه‌ها در یک ظرف محتوی آب قرار گرفته وسپس به ترتیب در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد و در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در مدت زمان‌های مختلف قرار داده شدند. برای اعمال پیش تیمار مانیتول- سرما و نیز مانیتول- گرما، محلول۰/۳ مولار مانیتول تهیه شد و سپس غنچه‌هایی با ساقه‌های به طول حدود ۱۰ سانتی‌متر تهیه و قاعده ساقه‌ها در محلول مانیتول قرار گرفت و بر اساس پیش‌تیمارهای سرما و گرما، به ترتیب در دماهای ۴ و ۳۰ درجه سانتیگراد در مدت زمان‌های مختلف قرار داده شدند.

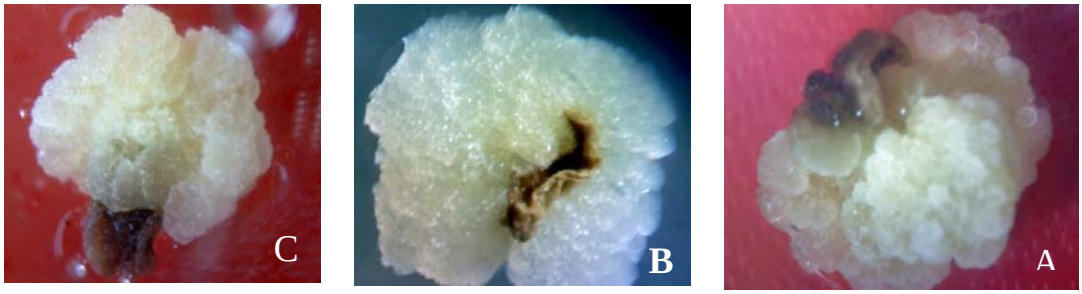
بررسی مراحل مختلف نموی میکروسپور بر کشت بساک در گیاهان گل‌محمدی و رز هفت‌رنگ نشان داد زمانی که میکروسپورها در مرحله اوایل تک هسته‌ای تا تک هسته‌ای میانی بودند، زمانی که هسته تقریباً در وسط میکروسپور قرار داشت بساک‌ها دارای بیشترین درصد (۳۷/۷٪) تولید کالوس‌بودند. در بررسی اثر پیش‌تیمارهای گرما و مانیتول- گرما بر روی کشت بساک گیاهان گل‌محمدی و رز هفت‌رنگ نتایج نشان داد که از نظر تولید کالوس، رز هفت‌رنگ به طور معنی‌داری پاسخ‌دهی بالاتری نشان داد و شاهد دارای پاسخ‌دهی بهتری (۳۳/۳۳٪) نسبت به پیش‌تیمارهای گرما و مانیتول –گرما بود.

درآزمایش بررسی اثر پیش‌تیمار ترکیبی سرما و مانیتول- سرما بر روی کشت بساک گل‌محمدی و رز هفت‌رنگ نتایج نشان داد که رز هفت‌رنگ با استفاده از پیش‌تیمار سرما- مانیتول، بیشترین میزان تولید کالوس بساک‌ها (۲۸/۶٪) را داشت. همچنین نتایج مشخص کرد که بین اکوتیپ‌های گل‌محمدی در مدت زمان‌های مختلف اعمال پیش‌تیمار، اختلاف معنی‌داری در پاسخ‌دهی به کشت بساک وجود نداشت. اما در رز هفت‌رنگ در صورتیکه که پیش‌تیمارها به مدت سه روز

اعمال شدند بیشترین میزان تولید کالوس (۴۱/۱۱٪) مشاهده شد. همچنین در دو اکوتیپ گل‌محمدی، اعمال سه روز پیش تیمار سرما بهترین تولید کالوس (۱۰٪) را نشان داد. اما بالاترین میزان تولید کالوس(۲۳/۳٪) مربوط به زمانی بود که پیش‌تیمار مانیتول- سرما در مدت زمان سه روز اعمال شد.

به طور کلی در تمام پیش تیمارها، مدت زمان سه روز بیشترین تولید کالوس را ایجاد کرد. در آزمایش بررسی پیش‌تیمارهای گرما و سرما بر روی کشت بساک گل‌محمدی و رز هفت‌رنگ پس از کشت اولیه بساک‌ها در محیط کشت H1، نتایج نشان داد که پیش‌تیمار سرما دارای بالاترین میزان تولید کالوس (۲۳/۱۷٪) بود. نتایج مشخص نمود که بین مدت زمان‌های اعمال پیش‌تیمار در رقم‌های مختلف نیز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و در اکوتیپ گل‌محمدی کاشان مدت پنج روز در اکوتیپ گل‌محمدی آذران، مدت هفت روز پیش‌تیمار دارای بالاترین میزان تولید کالوس به ترتیب (۱۸/۸۸٪) و (۱۳/۳۳٪) بودند. در رز هفت‌رنگ، تمام مدت زمان‌های پیش‌تیمار شامل: سه، پنج و هفت روزتقریباً تولید کالوس یکسانی (به ترتیب ۳۳/۳۳٪، ۳۳/۳۳٪ و ۲۵/۵۵٪) داشتند.

نتایج این آزمایش نشان داد که در گل محمدی و رز هفت‌رنگ اگر بساک‌ها از ابتدا به مدت چهار روز در محیط کشت اصلی کشت شده و سپس پیش‌تیمار سرمایی بر آنها اعمال شود نتیجه بهتری حاصل می‌شود. همچنین نتایج بدست آمده از آنالیز فلوسایتومتری و شمارش کروموزومی کالوس‌های بدست آمده در گیاهان رز هفت‌رنگ و گل‌محمدی مشخص کرد که کالوس‌های بدست آمده از تیمارهای مختلف از نظر سطح‌پلوئیدی، همانند گیاهان مادری تتراپلوئید بودند و کالوس دی‌هاپلوئید (دیپلوئید) حاصل نشد (شکل ۱). علت این امر می‌تواند نوع تیمارهای اعمال شده و یا اثر ژنوتیپ باشد. همچنین این احتمال وجود دارد که کالوس‌ها از سلول‌های دیواره بساک منشا گرفته باشند. به طور کلی آزمایش‌های انجام شده، نشان دادند که بساک‌هایی که میکروسپورهای آنها در مرحله اوایل تک‌هسته‌ای تا تک‌هسته‌ای میانی بودند، بیشترین درصد تولید کالوس را داشتند. همچنین اثر پیش تیمارسرمایی بر تولید کالوس‌موثرتر بود و بیشترین تولید کالوس‌در شرایطی بدست آمد که بساک‌ها ابتدا در محیط کشت اصلی (H1)، کشت شدند و سپس پیش تیمار بر روی آنها اعمال شد. این نوآوری می‌تواند زمینه بسیار خوبی برای تحقیقات بعدی محققین باشد.



شکل ۱- کالوس‌های بدست آمده از کشت بساک: گل‌محمدی اکوتیپ کاشان (A)؛ اکوتیپ گل‌محمدی آذران (B) و رز هفت‌رنگ (C).

Fig. 1. Cali obtained from anther culture: Damask Rose; ecotypes of Kashan (A); Azaran (B) and Hybrid Tea Rose (C).

واژه‌های کلیدی: رز، گل‌محمدی، آندروژنز، کشت بساک، پیش‌تیمار و کالوس‌زایی.

References

Gudin, S. 2000. Rose: Genetics and breeding. Pp. 159-189. In: J. Janick (ed.) Plant Breeding Reviews, Vol. 17. John Wiley & Sons, Inc.

Kasha, K. J., Yao, Q., Simion, E., Hu, T., and Oro, R. 1995. Production and application of doubled haploids in crops. Pp. 23-37. In: Proceedings of The International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement.

Meynet, J., Barrade, R., Dulos, A., and Siadous, R. 1996. Diploid plants of roses obtained by parthenogenisis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds. Agronomie 2: 169-175.

Own, H. R., and Miller, A. R. 1996. Haploid plant regeneration from anther culture of three American cultivars of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). Plant Cell Reports 15: 905-909.

Reynolds, T. L. 1997. Pollen embryogenesis. Plant Molecular Biology 33: 1–10.

Touraev, A., Pfosser, M., and Heberle-Bors, E. 2001. The microspore: a haploid multipurpose cell. Advances in Botanical Research 35: 53-109.