افزایش پرآوری شاخساره رز رقم 'Boulevard' *Rosa x hybrida* در شرایط درون شیشه ای با استفاده از مواد محرک رشد

فرانک مستشار[۱]، لیلا سمیعی[۲*]، پژمان آزادی[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی....، دانشگاه آزاد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران

[۲*]عضو هیات علمی گروه پژوهشی گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[۳]عضو هیات علمی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[*]نویسنده مسئول:samiei@um.ac.ir

چکیده

رزها یکی از زیباترین گل‌ها در جهان محسوب می‌شوند و دارای کاربردهای بسیار متنوعی می‌باشند. تعداد ارقام رز در جهان در حال افزایش است و تکنیک کشت بافت روش مناسبی جهت تکثیر این ارقام محسوب می‌شود. در این تحقیق اثر مواد محرک رشد مانند سدیم نیتروپروساید و نیترات نقره بر میزان پرآوری رز رقم Boulevard در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های جوانی جانبی رز در معرض تیمارهای SNP (۷/۵، ۱۵ و ۳۰ میکرومولار) و نیترات نقره (۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) به همراه شاهد قرار گرفتند. نتایج نشان داد که SNP تاثیر بسیار مثبتی بر شاخص‌های پرآوری گیاه داشت. بالاترین میزان پرآوری شاخساره (۴/۶ شاخساره به ازاء هر ریزنمونه) و تولید برگ (۱۰۰/۷ برگ) در تیمار ۱۵ میکرومولار SNP در مقایسه با شاهد (۱/۴۵ شاخساره و ۱۴/۷ برگ) بدست آمد.

غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر میزان پرآوری شاخساره تاثیری نداشت منتهی درصد تولید کالوس در تیمارهای حاوی نیترات نقره از بقیه تیمارها کمتر بود. در مجموع بر اساس نتایج بدست آمده، SNP می‌تواند به عنوان ماده محرک رشد بسیار موثر در بهبود پرآوری شاخساره رز شناخته شود.

کلمات کلیدی: سدیم نیتروپروساید، شاخص‌های پرآوری، نیترات نقره، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

رزها از مهمترین گیاهان گلدار در جهان محسوب می‌شوند. این گیاهان از گذشته به عنوان گل شاخه بریده، گیاه گلدانی و فضای سبز استفاده می‌شده‌اند. امروزه تعداد بسیار زیادی از ارقام رز در دنیا اصلاح شده است و تعداد آنها در حال افزایش می‌باشد. با توجه به اینکه تکنیک‌های سنتی برای تکثیر ارقام رزهای اصلاح شده بسیار کند و زمان بر است امروزه استفاده از تکنیک‌های نوین تکثیر مانند کشت بافت برای این گیاهان بسیار حایز اهمیت است (Grémiaux et al., 2016). از مزایای کشت بافت پتانسیل تولید انبوه گیاهان یکنواخت و سالم با کارایی بالا می‌باشد (Carrillo-Bermejo et al., 2019). تا کنون از این تکنیک برای تکثیر تعداد زیادی از گیاهان زینتی استفاده شده است (Davoudi Pahnekolayi, Samiei, Tehranifar, and Shoor, 2015; Nunes et al., 2018; Samiei, Panhehkolayi, Mirshahi, and Karimian, 2018).

یکی از عواملی که موفقیت کشت بافت را تضمین می کند افزایش راندمان تکثیر و همچنین تولید گیاهان با کیفیت بالا می‌باشد. بدین منظور استفاده از مواد محرک رشد در کنار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت بافت می‌تواند موثر باشد و منجر به افزایش کارایی این تکنیک شود (de Oliveira Timoteo et al., 2019). تا کنون از مواد مختلفی مانند پلی‌آمین‌ها، انواع اسیدهای آمینه و مواد شیمیایی محرک رشد جهت افزایش کارایی تکنیک ریزازدیادی استفاده شده است (Faria et al., 2017; Sathish et al., 2018; Venkatachalam et al., 2017; Vetchinnikova, Kuznetsova, and Titov, 2015). سدیم نیتروپروساید یکی از ترکیبات مهم تولید کننده نیتریک اکساید در گیاهان

IrHC2019

می‌باشد. نیتریک اکساید به عنوان یک مولکول فعال زیستی در بسیاری از واکنش‌های بیولوژیکی گیاه از جمله جوانه‌زنی بذور، رشد شاخساره و تعویق پیری موثر است (Libourel, Bethke, De Michele, and Jones, 2006; Neill, Desikan, Clarke, Hurst, and Hancock, 2002). از دیگر موادی که نقش مهمی در افزایش کارایی گیاهان در کشت بافت می‌تواند داشته باشد نیترات نقره است. این ماده از تجمع اتیلن در ظروف کشت بافت که می‌تواند منجر به اختلالاتی در رشد شود جلوگیری می‌کند (Steinitz, Barr, Tabib, Vaknin, and Bernstein, 2010). گزارشاتی مبنی بر افزایش کارایی رشد گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از نیترات نفره بدست آمده است (Panigrahi, Dholu, Shah, and Gantait, 2018; Taha and Hassan, 2016). هدف از انجام این تحقیق ارزیابی اثر محرک‌های رشد سدیم نیتروپروساید و نیترات نقره بر کارایی پرآوری در شرایط درون شیشه‌ای رز رقم boulevard بود.

مواد و روش‌ها

ابتدا شاخه‌هایی رز حاوی ۲-۳ جوانه از شاخه‌های گل دار رز رقم بولیوارد از گلخانه تجاری رز تهیه شد. سپس شاخه‌ها به مدت یک ساعت در زیر آب جاری قرار داده شدند. پس از آن ضدعفونی قطعات شاخه با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت و سپس سه مرحله آبشویی به مدت ۵ دقیقه برای هر مرحله انجام شد. پس از آن قطعات ریزنمونه به طول یک سانتی‌متر هر کدام حاوی یک جوانه تهیه شد و در محیط کشت موراشیگ واسکوک (MS) حاوی سدیم نیتروپروساید (SNP) به مقادیر ۷/۵، ۱۵ و ۳۰ میکرومولار و نیترات نقره به مقادیر ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار به طور جداگانه کشت گردید. لازم به ذکر است که در تمامی محیط‌های کشت از تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین به غلظت ۱/۵ میلی گرم بر لیتر و همچنین نفتالین استیک اسید به میزان ۰/۱ میلی گرم بر لیتر استفاده شد. پس از گذشت یک ماه فاکتورهای پرآوری شاخساره شامل میانگین طول شاخساره، تعداد شاخساره، تعداد برگ، درصد شاخه‌زایی، درصد تشکیل کالوس در انتهای شاخساره ثبت گردید. سپس ریزنمونه‌ها در محیط جدید با ترکیب مشابه واکشت شدند و پس از گذشت یک ماه دیگر نیز فاکتورهای ذکر شده مجددا اندازه‌گیری شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها میانگین دو اندازه‌گیری در نظر گرفته شد. تجزیه تحلیل داده‌های با روش آنالیز واریانس با کمک نرم افزار SPSS 23 صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از روش دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش نشان داد که محرک‌های رشدی سدیم نیتروپروساید و نیترات نقره اثرات معنی‌داری بر تعداد شاخساره، تعداد برگ و درصد کالوس‌زایی در رز داشتند (جدول ۱). تعداد شاخساره در تمام سطوح SNP در مقایسه با شاهد افزایش یافت. در حقیقت میانگین بالاترین تعداد شاخساره در غلظت ۱۵ میکرومولارSNP با تولید ۴/۶ عدد شاخساره به ازای هر ریزنمونه در مقایسه با ۱/۴۵ عدد شاخساره در محیط شاهد بدست آمد. نیترات نقره تاثیری در پرآوری شاخساره نداشت و از این لحاظ تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد. مواد محرک رشد تاثیری بر طول شاخساره نداشتند. بیشترین تعداد برگ نیز در محیط SNP بدست آمد. گیاهچه‌های تولید شده در محیط حاوی SNP و همچنین در محیط شاهد ریشه تولید نکردند. هر چند که در تمامی تیمارهای نیترات نقره شاخساره‌های تولید شده ریشه تولید نمودند. بیشترین درصد کالوس‌زایی نیز در تیمار های حاوی SNP مشاهده شد که در مقایسه با شاهد و غلظت‌های مختلف نیترات نقره به طور معنی‌داری بیشتر بود.

نتایج این تحقیق نشان داد که SNP تاثیر مثبتی بر پرآوری شاخساره در رز دارد. SNP در حقیقت ماده‌ای است که در محیط کشت نیتریک اکساید تولید می‌کند. مشخص شده است که سایتوکینین‌ها نیز منجر به تحریک تولید نیتریک اکساید در گیاه می‌شوند. در نتیجه می توان اثرات مثبت SNP را به فعالیت شبه سیتوکینینی آن نسبت داد (Sarropoulou and Maloupa, 2017). سایر محققین نیز به اثرات مثبت SNP در محیط کشت بافت برخی از گیاهان اشاره کرده‌اند (Kalra and Babbar, 2012; Sarropoulou, Maloupa, and Culture, 2017). نشان داده شده که نیترات

IrHC2019

نقره در شرایط درون شیشه‌ای به دلیل ممانعت از سنتز اتلین میتواند نقش موثری در کشت بافت گیاهان داشته باشد (Kumar, Parvatam, and Ravishankar, 2009). هرچند در این آزمایش اثرات مثبتی بر رشد ریزنمونه‌ها نشان نداد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از SNP می‌تواند نقش مثبتی در پرآوری شاخساره‌های رز رقم Boulevard در شرایط درون شیشه‌ای داشته باشد.

جدول ۱- تاثیر مواد محرک رشد بر شاخص‌های پرآوری گل رز شاخه بریده رقم Boulevard

تیمارها	تعداد شاخساره	تعداد برگ	کالوس‌زایی (درصد)	طول شاخساره (سانتی‌متر)
control	1.45 c	14.75 c	66 b	3.2
SNP 7.5 µM	2.2 bc	64.5 b	100 a	2.8
SNP 15 µM	4.6 a	100.7 a	100 a	3.25
SNP 30 µM	3.05 b	78.35 ab	100 a	3.35
AgNo3 75 µM	1.6 c	33.15 c	33 b	2.25
AgNo3 150 µM	1.4 c	37.4 c	33 b	3.2
AgNo3 300 µM	1.15 c	24.6 c	66 b	2.3

منابع

Carrillo-Bermejo, E. A., Herrera-Alamillo, M. A., González-Mendoza, V. M., Pereira-Santana, A., Keb-Llanes, M. A., Castaño, E.,Rodríguez-Zapata, L. C. (2019). Comparison of two different micropropagation systems of Saccharum officinarum L. and expression analysis of PIP2; 1 and EIN3 genes as efficiency system indicators. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 136(2), 399-405 .

Davoudi Pahnekolayi, M., Samiei, L., Tehranifar, A., and Shoor, M. (2015). The effect of medium and plant growth regulators on micropropagation of Dog rose (Rosa canina L.). Journal of Plant Molecular Breeding, *3*(1), 61-71 .

de Oliveira Timoteo, C., Paiva, R., dos Reis, M. V., Claro, P. I. C., da Silva, D. P. C., Marconcini, J. M., Culture, O. (2019). Silver nanoparticles in the micropropagation of Campomanesia rufa (O. Berg) Nied. 1-10 .

Faria, G. A., Felizardo, L. M., Ferreira, A. F. A., Rocha, P. S., Suzuki, A. N., SOUZA, A. d. S. de Morais, A. R. (2017). Concentrations of silver nitrate in the in vitro development and conservation of Passiflora gibertii NE Brown. J Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em periódico indexado .

Grémiaux, A., Girard, S., Guérin, V., Lothier, J., Baluška, F., Davies, E., . . . Vian, A. (2016). Low-amplitude, high-frequency electromagnetic field exposure causes delayed and reduced growth in Rosa hybrida. Journal of plant physiology, 190, 44-53 .

Kalra, C., and Babbar, S. B. (2012). Stimulatory and period-specific effect of nitric oxide on in vitro caulogenesis in Albizzia lebbeck (L (.Benth. J Acta physiologiae plantarum, 34(1), 387-392 .

Kumar, V., Parvatam, G., and Ravishankar, G. A. (2009). AgNO3: a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. Electronic Journal of Biotechnology, 12(2), 8-9 .

Libourel, I. G ,.Bethke, P. C., De Michele, R., and Jones, R. L. (2006). Nitric oxide gas stimulates germination of dormant Arabidopsis seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. Planta, 223(4), 813-820 .

Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., and Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. J Journal of experimental botany, 53(372), 1237-1247 .

Nunes, S., Sousa, D., Pereira, V. T., Correia, S., Marum, L., Santos, C., and Dias, M. C. (2018 .(Efficient protocol for in vitro mass micropropagation of slash pine. In Vitro CellularDevelopmental Biology-Plant, *54*(2), 175-183 .

Panigrahi, J., Dholu, P., Shah, T. J., and Gantait, S. (2018). Silver nitrate-induced in vitro shoot multiplication and precocious flowering in Catharanthus roseus (L.) G. Don, a rich source of terpenoid indole alkaloids. J Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 132(3), 579-584 .

IrHC2019

Samiei, L., Panhehkolayi, M. D., Mirshahi, H., and Karimian, Z. (2018). A simple and efficient micropropagation protocol for New Guinea Impatiens (Impatiens hawkeri). J Journal of Environmental Biology, 39(4), 454-458 .

Sarropoulou, V., and Maloupa, E. (2017). Effect of the NO donor "sodium nitroprusside"(SNP), the ethylene inhibitor "cobalt chloride"(CoCl 2) and the antioxidant vitamin E "α-tocopherol" on in vitro shoot proliferation of Sideritis raeseri Boiss. and Heldr. subsp. raeseri. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 128(3), 619-629.

Sarropoulou, V., Maloupa, E. J. P. C., Tissue, and Culture, O. (201 .(۲Effect of the NO donor "sodium nitroprusside"(SNP), the ethylene inhibitor "cobalt chloride"(CoCl 2) and the antioxidant vitamin E "α-tocopherol" on in vitro shoot proliferation of Sideritis raeseri Boiss. and Heldr. subsp. raeseri. 128(3), 619-629 .

Sathish, D., Vasudevan, V., Theboral, J., Elayaraja, D., Appunu, C., Siva, R., and Manickavasagam, M. (2018). Efficient direct plant regeneration from immature leaf roll explants of sugarcane (Saccharum officinarum L.) using polyamines and assessment of genetic fidelity by SCoT markers. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 54(4), 399-412 .

Steinitz, B., Barr, N., Tabib, Y., Vaknin, Y., and Bernstein, N. (2010). Control of in vitro rooting and plant development in Corymbia maculata by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion. Plant cell reports, *29*(11), 1315-1323 .

Taha, R. A., and Hassan, S. (2016). Studies on silver nitrate impact on jojoba in vitro culture. J International Journal of PharmTech Research, 9(8), 77-83 .

Venkatachalam, P ,.Jinu, U., Gomathi, M., Mahendran, D., Ahmad, N., Geetha, N., and Sahi, S. V. (2017). Role of silver nitrate in plant regeneration from cotyledonary nodal segment explants of Prosopis cineraria (L.) Druce.: A recalcitrant medicinal leguminous tree. J Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 12, 286-291 .

Vetchinnikova, L., Kuznetsova, T., and Titov, A. (2015). Effect of BAP on growth, amino acid content and lipid fatty acid composition of curly birch in vitro shoots. Paper presented at the VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155.

IrHC2019

Improving in vitro proliferation of *Rosa* x *hybrida* 'Boulevard' using growth stimulant materials

Faranak Moastashar[1], Leila Samiei [2*], Pejman Azadi [3]
[1] Ms.c student, Department of Biotechnology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran
[2*] Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[3] Department of Genetic Engineering, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
[*]*Corresponding Author: samiei@um.ac.ir*

Abstract

Roses are one of the most beautiful flowers in the world which have a wide variety of applications. The number of Rose cultivars in the world is increasing and tissue culture technique is a very appropriate way to reproduce these valuable cultivars. In this research, the effect of growth stimulants such as sodium nitroprusside and silver nitrate on the proliferation of Rosa x hybrid 'Boulevard' in vitro conditions was investigated. Following the sterilization procedures, nodal explants were exposed to SNP (7.5, 15 and 30 µM) and silver nitrate (75, 150 and 300 µM) treatments. Based on the obtained results, SNP represented a very positive impact on proliferation indices. The maximum regenerated shoot (4.6 shoots per explant) and leaf number (100.7 leaves) were obtained in 15 µM SNP treatment compared to control (1.45 shoots and 14.7 leaves). Various levels of silver nitrate did not affect the shoot regeneration. The percentage of callus induction was significantly lower compared to SNP treated explants. Overall, based on the obtained results, SNP can be considered as a very effective growth stimulant to improve the shoot regeneration rate in Rosa hybrid 'Boulevard'.

***Keywords*:** Sodium nitroprusside, Proliferation indices, Silver nitrate, *In vitro* culture.

IrHC2019