بررسی تاثیر پیش تیمار، غلظت و نوع نیتروژن محیط کشت بر روی کشت بساک رز

سارا السادات راه پیما (۱)، احمد معینی (۱) و مریم جعفرخانی کرمانی (۲)

۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات، ۲- کرج، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

در این تحقیق اثر پیش تیمارهای سرمایی، گرمایی، مانیتول و نیز تاثیر تغییراتی در میزان و نوع نیتروژن محیط کشت بر روی کشت بساک تعدادی از ارقام تجاری رز (*Rosa hybrida*) بررسی شده است. این بررسی طی یک آزمایش فاکتوریل با ۳ فاکتور پیش تیمار در ۵ سطح (بدون پیش تیمار، پیش تیمار سرمایی، گرمایی، مانیتول (۰/۳ مول) و مانیتول-سرما)، رقم در۳ سطح (little chief, Lawinia و Chrysler Imperial) و محیط کشت در ۵ سطح (محیط کشت پایه MS، افزایش پرولین و گلوتامین به محیط کشت پایه (MSP)، افزایش تنها کازئین هیدرولیزات به محیط کشت پایه (MSC))، کاهش نیتروژن معدنی و کاهش آهن محیط کشت پایه (TNI)، کاهش نیتروژن معدنی و نیتروژن آلی محیط کشت پایه(TNP)) انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین میزان کالوس زایی مربوط به رقم Little chief با پیش تیمار مانیتول در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴ روز (پیش تیمار مانیتول) و یا در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته (پیش تیمار مانیتول- سرما)، همچنین محیط کشت TNP با پیش تیمار مانیتول- سرما و نیز با رقم Little chief بوده است.

واژه های کلیدی: رز، رز هیبرید، کشت بساک، کالوس زایی،پیش تیمار.

مقدمه:

اعمال تیمارهای فیزیکی و شیمیایی (تنش‌های مختلف) مثل پیش تیمار دمایی پایین یا بالا، شوک اسمزی و گرسنگی قند در طی دوره تکوینی دانه‌های گرده، می‌تواند در تحریک نرزایی موثر بوده یا برای القاء نرزایی در تعدادی از گیاهان ضروری باشد. با این حال، نوع و مدت زمان استفاده از این پیش تیمارها، ممکن است با نوع گونه یا حتی واریته متفاوت باشد (Bhojwani *et al*., 2001 ; Bhojwani and Razdan, 1996). شوک اسمزی با استفاده از مانیتول از جمله پیش تیمار هایی است که می‌تواند برای القای نرزایی استفاده شود (Roberts- Oehlschlager and Dunwell, 1990; Wei *et al*., 1984). برای این منظور، در این تحقیق تاثیر پیش تیمار مانیتول بر روی کشت بساک رز مورد بررسی قرار گرفته است.

همچنین در بررسیهای گوناگون بر روی ارقام مختلف گیاهی مشخص شده که با تغییراتی در عناصر ماکرو و میکرو محیط کشت پایه، می توان به القای نرزایی کمک کرد، از جمله با کاهش نیتروژن معدنی (Chuang *et al*., 1978; Chen *et al*., 1982; Raina and Irfan, 1998; Chu *et al*., 1975; Salehi, 2003) و افزایش نیتروژن آلی.

(Bhojwani and. Razdan, 1996) از این رو در تحقیق حاضر، اثر این عوامل نیز بر روی نرزایی رز بررسی شده است.

مواد و روش ها:

این بررسی در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی (CRD) انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی عبارت بودند از: فاکتور اول، پیش تیمار در ۵ سطح (بدون پیش تیمار،پیش تیمار سرمایی، گرمایی، مانیتول و مانیتول – سرما)، فاکتور دوم رقم در ۳ سطح (little chief, Lawinia و Chrysler Imperial)، و فاکتور سوم ترکیب محیط کشت در ۵ سطح (MS, MSC, MSP, TNP, TNI) که متعاقباً توضیح داده می شوند. در این تحقیق از بساک های ۳ رقم تجاری hybrid tea و رز مینیاتوری شامل ارقامLittle chief, Lawinia, Chrysler Imperial استفاده شد. بساک ها از غنچه هایی که شروع به باز شدن کرده بودند و از گیاهانی که در شرایط گلخانه، در گلدان نگهداری می شدند تهیه شدند. پیش تیمار در ۵ سطح شامل بدون پیش تیمار و پیش تیمار سرمایی، گرمایی، مانیتول و مانیتول–سرما بود که بر روی ژنوتیپهای فوق اعمال شد. به منظور بررسی تأثیر سرما بر روند کالوس‌زایی بساک ها، غنچه‌هایی با ساقه‌هایی به طول حدود ۱۰ سانتی‌متر انتخاب، در داخل دستمال مرطوب وسپس فویل آلومینیومی پیچیده و در حالی که قاعده ساقه ها در یک ظرف آب بودند، در یخچال در دمای ۴°C به مدت ۷ الی ۱۰ روز قرار داده شدند. جهت اعمال پیش تیمار گرمایی، غنچه‌هایی با ساقه‌های به طول حدود ۱۰ cm را مطابق پیش‌تیمار سرمایی، در داخل دستمال مرطوب و سپس در داخل فویل آلومینیومی پیچیده و قاعده ساقه ها را در یک ظرف آب قرار داده و بعد از آن در ۳۰°C به مدت ۴ روز قرار داده شدند. جهت بررسی پیش‌تیمار گرسنگی، ابتدا محلول مانیتول استریل M ۰/۳ را تهیه و سپس این محلول را در داخل پتری دیش های به قطر ۶ سانتی‌متر توزیع و سپس بساک ها از غنچه ها جدا شده و در این محلول قرار داده شدند، و نهایتاً پتری دیش ها در شرایط تاریکی نگهداری شدند. همچنین، تعدادی از پتری دیش ها به مدت ۴ روز در دمای ۲۵°C و تعدادی به مدت یک هفته در یخچال با دمای ۴°C، نگهداری شدند و بعد از سپری شدن مدت پیش تیمار، بساک ها به محیط کشت منتقل شدند و پس از یک ماه، درصد کالوس زایی بساک ها، اندازه گیری شد.

نتایج و بحث

در رقم Lawinia، بیشترین میزان کالوس زایی مربوط به پیش تیمار مانیتول در دمای ۲۵ °C بوده و در رقم Chrysler imperial، بین میانگین اعمال پیش تیمار مانیتول، مانیتول- سرما و عدم استفاده از پیش تیمار، تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود. اثر متقابل پیش تیمار و محیط کشت و نیز رقم و محیط کشت نشان داده شده است. بیشتربین میزان کالوس زایی مشاهده شده مربوط به ترکیب پیش تیمار مانیتول–سرما با محیط کشت های TNP و TNI و نیز ترکیب رقم Little chief در محیط کشت TNP بوده است. بر اساس گزارشات مختلفی که در ارتباط با بکارگیری پیش تیمارهای گوناگون بر روی تحریک نرزایی در گیاهان مختلف توسط محققین، ارائه شده است، به کارگیری پیش تیمارهای فیزیکی از جمله شوک اسمزی و گرسنگی در طی دوره تکوینی دانه های گرده (Bhajwani and Razdan, 1996 ; Bhajwani *et al*., 2001) و شیمیایی (Konzak *et al*., 2000)، می تواند در تحریک

نرزایی مؤثر باشد. در تحقیق حاضر نیز، اعمال پیش تیمارهای گوناگون روی کالوس زایی بساک مؤثر بود. استفاده از پیش تیمار مانیتول ($mol.L^{-1}$ ۰/۳) به طور معنی داری موجب افزایش کالوس زایی شد. هنگامی که بساکها مستقیماً و بدون اعمال پیش تیمار کشت می شدند، معمولاً مدتی بعد از کشت، تغییر رنگ می دادند و به رنگهای قهوه ای تیره تا سیاه در می آمدند و کالوس زایی در آنها بسیار کم بود، همچنین به نظر می رسید در این حالت کالوسها بیشتر از محل میله بساک و یا از دیواره های بساک منشاء گرفته اند (شکل ۳). اما در هنگام استفاده از پیش تیمار مانیتول ($mol.L^{-1}$ ۰/۳)، منشاء کالوسها تغییر یافته و معمولاً بساک ها باز شده و کالوسها از داخل بساک خارج شده اند. اگر به محل خروج گرده ها در هنگام گرده افشانی رز دقت شود (شکل۴) مشاهده می شود که در هنگام استفاده از مانیتول، کالوسها بیشتر از ناحیه ای که گرده ها در هنگام گرده افشانی از آنجا خارج می شوند، منشاء گرفته اند. این حالت به وضوح در رقم Lawinia مشاهده شد (شکل ۵). با توجه به منابع موجود در زمینه استفاده از پیش تیمار مانیتول، میتوان تا حدودی چنین تغییراتی را توجیه کرد. نگهداری بساکها به مدت چند روز در محلول مانیتول، در ابتدا می تواند تا حدودی چربی های سطحی بساک را که ممکن است اکسید شدن آنها در برابر هوا، که موجب سیاه شدن بساک می شود و مانعی در برابر کالوس زایی می باشد، شسته و کاهش دهد و موجب کمتر شدن تیرگی بساکها بعد از کشت شود و درصد کالوس زایی افزایش یابد. ثانیاً، مانیتول می تواند باعث القاء گرسنگی شود و میکروسپورهایی که از دیواره بساک جدا شده‌اند، می‌توانند در محیط کشت کال‌زایی یا جنین‌زایی، زنده مانده و کالوس یا جنین تولید کنند. عقیده بر این است که مانیتول باعث گرسنگی شده و موجب می‌گردد تا انرژی میکروسپورها روی ادامه مراحل تکوینی تمرکز یابد. چون در این مرحله سلول‌ها قادر به استفاده از مانیتول به عنوان منبع کربن نیستند، بنابراین تیمار مانیتول باعث سردرگمی سلول‌ها شده و آنها را وادار به تولید جنین و کالوس از میکروسپور می‌کند (Genovesi and Yingling, 1994).

منابع:

Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. (1996). Plant tissue culture. Theory and practice. A revised Edition. Elsevier. Amestrdam.

Bhojwani, S. S., Pande, H. and Raina, A. (2001). Factors affecting androgenesis in indica rice. http://geb.unigiessen. de/geb/volltexte/2003/1238/pdf/FestschriftNeumann_06.pdf

Borch, K., Williams M. H. and Hoyer L. (1996). Influence of simulated transport on post harvest longevity of three cultivars of miniature potted rose. Acta Horticulture, 424: 175-180.

Chen, C. M., Chen, C. C. and Lin, M. H. (1982). Genetic analysis of anther derived plants of rice. J. Hered. 73: 49-52.

Crespel, L., Chirollet, M., Durel, C.E., Zhang, D., Meynet, J. and Gudin, S. (2002). Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in Rosa using AFLP markers. Springer-Verlag

Chu, C. C., wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C. Yin, K. C. Chu, C. Y., and Bi, F. y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia. Sinica .5: 659-668

Chuang, C. C., Ouyang, T. W., Chia, H., Chou, S. M. and Ching. C. K. (1978). A set of potato media for wheat anther culture, p. 51-56. In: preceding of Symposium on Plant Tissue Culture, Science Press, Beijing.

Douglas, A. J. (1985). The production of strawberry plant by androgenesis. M. Agriculture. Science Thesis University College Dubling. In: In vitro Haploid Production in Higher Plants. Mohan Jain, S . Sopory, S. K. Veilleux, R. E. 1996. First Edition . Netherland . Vol: 3. 345p.

Genovesi, A. D. and Yingling, R. A. (1994). Isolated microspore and anther culture of corn. Http://www.nal.usda.Gov/bic/biotech-patents/ 1994 patents/ 05322789 .htmL.

Konzak, C.F., Polle, E.A., Liu, W.and Zheng Y. (2000). Methods for generating doubled-haploid plants. Published international patentn application. PCT/US99/19498.

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.

Mohan Jain, S . Sopory, S. K. Veilleux, R. E. (1996). In vitro Haploid Production in Higher Plant. First Edition . Netherland . Vol: 1. 345p.

Paime, J.G., P. Semeniuk and R.N. Stewart. (1966). Roses and blackspot. 1. Pathogenicity to excised leaflets of Diplocarpon rosae from seven geographic locations. Phytopath. 56 - 1277-82.

Pertwee, J. 1995 . Production and marketing of roses. Second Edition. Pathfast Publishing. Frinton on Sea. U.K., 127p.

Effects of Pretreatment, Concentration and type of Nitrogen Source on Rose Anther Culture

Abstract:
In this study, the effects of some pretreatments, concentration and type of nitrogen source in medium on rose (*Rosa hybrida*) anther culture have been investigated. The experiment was carried out in a 3 factorial experiment. Three studied factors consisted of anther pretreatment (control, heat, cold, mannitol and cold-mannitol), cultivar (Lawinia, Little chief, Chrysler Imperial) and medium (MS, MSP: MS + L-Prolin and Glutamine, MSC: MS + casein hydrolysate, TNP: MS + $^1/_2$ mineral nitrogen + L-Prolin and Glutamine, TNI: MS + $^1/_2$ mineral nitrogen + 10 µM $FeSO_4$ and 100 µM Na_2EDTA). Callogenesis trait was determined after 1 month. The results showed that the highest callogenesis was obtained by cv. Little chief together with mannitol pretreatment in 20 ºC for 4 days or cold-mannitol pretreatment at 4 ºC for a week in darkness, and also medium TNP together with cold-mannitol pretreatment and interaction between TNP and cv. Little chief.

Key words: Rose, *Rosa hybrida*, Anther culture, callus induction, pretreatment.