بررسی تاثیر مکان‌یابی، شرایط ضدعفونی و استقرار در کشت بافت گیاه رز رقم آتوپیا

سید مهدی سالاری*[۱]، کاظم کمالی علی‌آباد[۲]، آفاق تابنده ساروی[۳]، مهدی رضاییان[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد (گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه یزد، ایران)

[۲]دانشیار (گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه یزد، ایران)

[۳]استادیار(گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه یزد، ایران)

[۴]استادیار (پردیس فنی و مهندسی، دانشکده مهندسی کامپیوتر، دانشگاه یزد، ایران)

نویسنده مسئول: * S.M.Salari@Stu.Yazd.ac.ir

چکیده

در این تحقیق، عکس‌العمل بخش‌های مختلف گیاه شامل قسمت انتهایی، میانی و بخش پایینی جهت ریزازدیادی گیاه رز رقم آتوپیا (*Rosa hybrid*. Cv. atopia)در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و فاکتورهای رشدی آن‌ها با هم مقایسه شد. برای انجام آزمایش قطعاتی از ساقه به طول تقریبی ۲ سانتی‌متر برای کشت اولیه انتخاب شد. برای ضدعفونی از کلرید جیوه ۰/۱ درصد در زمانهای مختلف شامل ۶ ، ۷ و ۸ دقیقه استفاده و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت، به محیط کشت MS تغییر شکل یافته با کلات آهن Fe-EDDHA به غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد منتقل شدند. در این تحقیق فاکتورهای طول گیاه، طول شاخه، تعداد برگ، درصد قهوه‌ای‌شدن، درصد مرگ گیاهچه و درصد آلودگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که اثر موقعیت ریز نمونه و زمان ضدعفونی برای همه تیمارها معنی‌دار بود ولی اثر آهن در هیچ یک از تیمارها اثر معنی‌داری نداشت. در نمونه‌های با موقعیت انتهایی، طول گیاه، طول شاخه و تعداد برگ کمتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشتند. بهترین زمان ضدعفونی ۶ دقیقه بود که بیشترین طول گیاه، طول شاخه و تعداد برگ به دست آمد. مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها نشان داد که ترکیب ۶ دقیقه ضدعفونی با یک گرم در لیتر کلرید جیوه در موقعیت میانی ریز نمونه در هر یک از غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ گرم در لیتر کلات آهن بیشترین طول را ایجاد کرد. نتایج مقایسات میانگین نیز نشان داد که موقعیت نمونه انتهایی بیشترین درصد مرگ گیاهچه و موقعیت پایین گیاه، کمترین مقدار این صفت را نشان داد. بیشترین درصد قهوه‌ای شدن در موقعیت پایینی گیاه مشاهده شد و بیشترین درصد آلودگی در جوانه‌های میانی اختصاص داشت.

واژه‌های کلیدی: قهوه‌ای شدن، کشت‌بافت، کشت‌درون‌شیشه‌ای، کلرید جیوه، گیاه زینتی.

مقدمه

جنس رز با تعداد زیادی گونه متعلق به خانواده *Rosaceae* است (Shah *et al.*, 2021). گل رز از مهمترین گیاهان زینتی جهان است که به گل‌های شاخه بریده معروف است از آن‌ها در صنایع غذایی و گیاهی استفاده می‌شود (Ozel and Arslan, 2002). تکثیر رویشی گیاهان به دلایل آسان و راحت‌تر بودن تکثیر، گزینش و نگهداری کلون‌ها، کوتاه کردن زمان رشد زایشی و کنترل مراحل رشد و ریخت‌شناسی نسبت به تکثیر زایشی گیاهان مزیت دارد (خوشخوی، ۱۳۸۹). تولید گیاهان یکنواخت و یک فرم، تولید گیاهان عاری از ویروس و امراض، اصلاح نباتات و بهبود کیفیت محصول و حفظ ژرم پلاسم فقط با کشت بافت و کشت درون شیشه‌ای امکان پذیر است (Babu *et al.*, 2016). ریز ازدیادی با استفاده از جوانه‌ها و بخش گره‌ها در مراحل مختلف صورت می‌گیرد. اصلاح پروتکل‌ها جهت نرخ بالای پرآوری شاخه و توسعه اثر روش‌های مهم و مفید در گذشته اهمیت زیادی پیدا کرده است. مایع استاتیک محیط کشت برای پرآوری شاخه‌ها و القای ریشه در رز مهم است (Pati *et al.*, 2006). تولید داخلی بوته‌های رز عاری از آفات و امراض، نه تنها می‌تواند از خروج ارز از کشور و آلودگی گلخانه‌ها به آفات جدید جلوگیری کند بلکه قادر است اشتغال‌زایی بالایی ایجاد نماید (حاجیان و همکاران،

۱۳۹۴). تکثیر محل نمونه‌گیری و انتخاب قسمت‌های مناسب برای کشت نیز در موفقیت تکثیر با روش کشت بافت دارای اهمیت ویژه‌ای است که تحت عنوان مکان‌یابی گفته می‌شود (کمالی‌علی‌آباد، ۱۳۹۸). واریته آتوپیا با قطر گل ده سانتی‌متر با اندازه بزرگ و طول ساقه ۶۰-۹۰ سانتی‌متر و تعداد گلبرگ ۵۰-۴۰ عدد که در گروه گل‌های پرپر قرار می‌گیرد می‌تواند ۱۳۰ شاخه گل در متر مربع در سال تولید داشته باشد. هدف از انجام این تحقیق تولید پایه‌های یکنواخت رز هیبرید از طریق کشت بافت است.

مواد و روش‌ها

جهت مطالعه اثر زمان‌های مختلف ضدعفونی و محیط کشت MS تغییر شکل یافته روی رز هیبرید رقم Utopia پژوهشی به روش کشت بافت در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. شاخه‌های گل رز پیوندی رقم آتوپیا از گلخانه با بوته‌های ۳ ساله انتخاب و برداشت شد. بعد از حذف برگ‌ها، شاخه‌ها به آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه یزد منتقل گردید. محلول غذایی پایه MS تغییر شکل یافته از محلول‌های غذایی پایه و کلات آهن کاملاً محلول در آب در دو سطح ۰/۰۵ گرم در لیتر و ۰/۱ گرم در لیتر تهیه شد. شاخه‌ها به سه قسمت ابتدایی، میانی و انتهایی تقسیم شده و سپس ریز نمونه‌ها به طول تقریبی ۲ سانتی‌متر که دارای جوانه سالم بودند قطع شدند. سپس با آب و یک قطره مایع ظرفشویی به مدت ۱۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی قرارداده شد و بعد از چندین بار شستشو با آب به زیر هود استریل به همراه محیط‌های ضد عفونی و محیط‌های کشت منتقل شد. ریزنمونه‌ها در زمانهای ۶، ۷ و ۸ دقیقه با کلرید جیوه ۰/۱ درصد ضدعفونی شدند و سپس سه بار در آب مقطر استریل حاوی ۰/۱ درصد آنتی‌اکسیدانت شستشو داده شد و در شیشه‌های شفاف حاوی محیط کشت، کشت گردید. سپس شیشه‌های کشت به اتاق رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد بعد از ۲ روز جوانه‌ها شروع به رشد کردند و بعد از گذشت ۵ تا ۷ روز برگ‌ها ظاهر شدند بعد از ۱۵ روز طول گیاه و طول شاخه‌ها با خط‌کش با واحد سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. تعداد برگ‌ها، تعداد نمونه قهوه‌ای شده، آلوده و مرگ گیاهچه نیز شمارش شد. جوانه‌های جدید بعد از قطع شدن به محیط‌های جدید منتقل شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از روش کلموگروف اسمیرونوف تست شد. جهت مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. برای انجام کلیه تجزیه و تحلیل‌ها از نرم‌افزار SPSS Statistics 22 و برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که اثر موقعیت ریزنمونه و زمان ضدعفونی بر همه صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود اما اثر آهن بر هیچ یک از این صفات اثر معنی‌داری نشان نداد، جدول ۱. همچنین اثر متقابل موقعیت نمونه در زمان ضدعفونی و غلظت آهن در زمان ضدعفونی بر هیچ‌یک از صفات مورد مطالعه معنی‌دار نبود. در حالی‌که اثر متقابل موقعیت ریز نمونه در غلظت آهن بر صفات طول گیاه و طول شاخه معنی‌دار بود اما بر صفت تعداد برگ تاثیر معنی‌داری نداشت. در خصوص اثر متقابل سه‌تایی موقعیت نمونه در زمان ضدعفونی در غلظت آهن نیز نتایج گویای اثر معنی‌دار آن بر صفت طول گیاه بود اما بر سایر صفات اثر معنی‌داری نداشت،جدول۱.

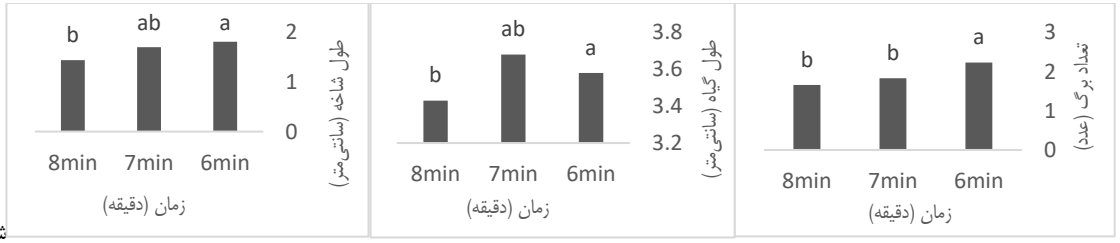
جدول ۱- نتایج تجزیه و تحلیل واریانس اثر تیمارهای مورد مطالعه بر صفات مورفولوژیک.

منابع تغییر	درجه آزادی	طول گیاه	طول شاخه	تعداد برگ
موقعیت ریزنمونه	۲	۲۴/۰۰**	۲۰/۴۶**	۶۲/۱۷**
زمان ضدعفونی	۲	۴/۳۹*	۳/۶۵*	۱۰/۰۰*
غلظت آهن	۱	۰/۳۱ ns	۰/۷۳ ns	۰/۰۶ ns
موقعیت ریزنمونه در زمان ضدعفونی	۴	۰/۹۳ ns	۰/۳۹ ns	۲/۰۵ ns
موقعیت ریزنمونه در غلظت آهن	۲	۲/۷۴*	۳/۱۴*	۰/۷۹ ns
غلظت آهن در زمان ضدعفونی	۲	۱/۸۸ ns	۰/۷۲ ns	۱/۲۰ ns
اثر متقابل	۴	۲/۷۳*	۲/۲۲ ns	۳/۰۴ ns
خطا	۲۶۴	۰/۸۱	۱/۰۲	۱/۵۳

**، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و بدون اختلاف معنی‌داری.

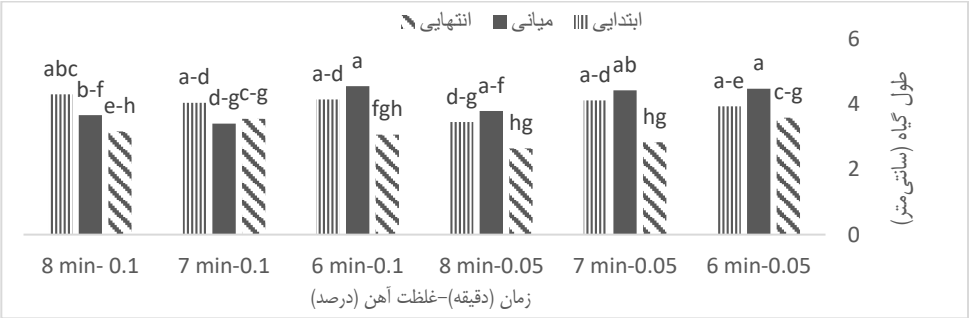
نتایج مقایسات میانگین نشان داد که نمونه‌های حاصل از موقعیت انتهایی نسبت به سایر نمونه‌ها به طور معنی‌دار دارای طول گیاه، طول شاخه و تعداد برگ کمتری در شکل ۱ بودند.همچنین زمان ضد عفونی ۶ دقیقه بیشترین طول گیاه، طول شاخه و تعداد برگ را تولید نمود، شکل ۲.

شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین اثر موقعیت ریزنمونه بر طول گیاه، طول شاخه و تعداد برگ.



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین اثر موقعیت ریزنمونه بر تعداد برگ ، طول گیاه و طول شاخه.

نتایج مقایسه میانگین اثر سه‌تایی فاکتورهای مورد بررسی نیز نشان داد که ترکیب تیمارهای موقعیت میانی-زمان ضدعفونی ۶ دقیقه و غلظت آهن ۰/۱ گرم در لیتر همچنین ترکیب تیمارهای موقعیت میانی-زمان ضدعفونی ۶ دقیقه و غلظت آهن ۰/۰۵ گرم در لیتر بیشترین طول گیاه را ایجاد نمودند، شکل ۳. در مجموع براساس نتایج تحقیق حاضر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که نمونه گیری از موقعیت میانی و زمان ضد عفونی ۶ دقیقه بهترین نتیجه را به همراه داشت.



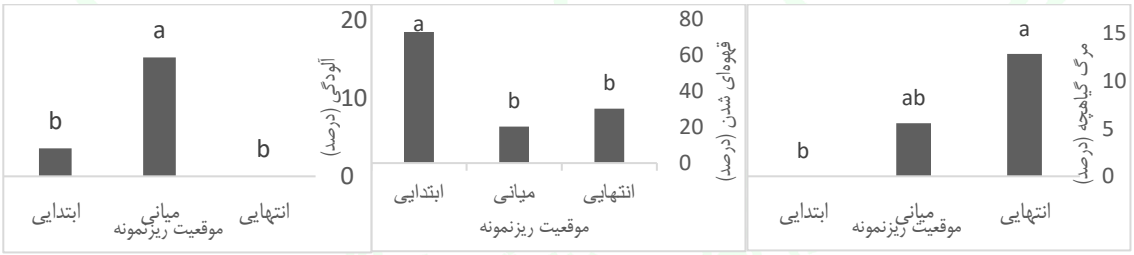
شکل۳- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل موقعیت ریزنمونه، زمان ضدعفونی و غلظت آهن بر صفت طول گیاه.

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس جدول ۲ نشان داد که اثر موقعیت نمونه بر همه صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود اما اثرات زمان ضدعفونی و غلظت آهن همچنین اثرات متقابل این عوامل بر هیچ‌یک از صفات مورد مطالعه معنی‌دار نبود.نتایج مقایسات میانگین در شکل ۴ نیز نشان داد که موقعیت نمونه انتهایی بیشترین درصد مرگ گیاهچه و موقعیت نمونه ابتدایی کمترین مقدار این صفت را نشان داد. همچنین بیشترین درصد قهوه‌ای‌شدن در موقعیت نمونه ابتدایی مشاهده شد و بیشترین درصد آلودگی به موقعیت نمونه میانی اختصاص داشت.

جدول ۲: نتایج تجزیه و تحلیل واریانس اثر تیمارهای مورد مطالعه بر استقرار و زنده‌مانی نمونه‌ها.

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد قهوه‌ای شدن	درصد مرگ گیاهچه	درصد آلودگی
موقعیت ریزنمونه	۲	۱۴۰۰۰/۴۲**	۷۳۹/۶۸*	۱۱۴۷/۶۸*
زمان ضدعفونی	۲	۲۱۷۵/۰۲ ns	۱۶/۵۷ ns	۷۱۸/۵۱ ns
غلظت آهن	۱	۹۶۹/۵۱ns	۲۵۸/۷۸ ns	۹۰/۷۴ ns
موقعیت ریزنمونه در زمان ضدعفونی	۴	۹۵۰/۵۸ ns	۱۹۸/۴۵ ns	۴۸۳/۷۹ ns
موقعیت ریزنمونه در غلظت آهن	۲	۹/۵۹ ns	۲۵۸/۷۸ ns	۴۴/۹۰ ns
غلظت آهن در زمان ضدعفونی	۲	۳۳۳/۴۰ ns	۷۳/۸۲ ns	۱۶۸/۵۱ ns
اثر متقابل	۴	۲۶۱/۰۸ ns	۵۰/۰۰ ns	۱۸۱/۰۱ ns
خطا	۳۶	۷۰۷/۷۰	۱۴۵/۵۱	۲۵۲/۷۷

**، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح ۰/۰۱، معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و بدون اختلاف معنی‌داری.



شکل۴- نمودار مقایسه میانگین اثر موقعیت ریزنمونه بر درصد مرگ گیاهچه ، درصد قهوه‌ای‌شدن و درصد آلودگی.

نتایج نشان داد که اثرات محیط کشت‌های مختلف بر پارامتر تعداد برگ در سطح یک‌درصد معنی‌دار می‌باشد. محیط کشت MS بهترین محیط کشت برای مرحله استقرار ریزنمونه‌های گل رز می‌باشد (شکری و همکاران، ۱۳۹۲). در پژوهشی پنج رقم گل رز شاخه بریده تجاری مورد ارزیابی قرار گرفتند که بیشترین درصد شاخه‌های عاری از آلودگی در تیمار ۵۰ درصد هیپوکلریت سدیم تجاری و اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه به دست آمد (یاری و همکاران، ۱۳۹۰). ضدعفونی سطحی با پیش فرو بردن در قارچ کش M- Topsin و استفاده پی‌در پی از $HgCl_2$ و هیپوکلریت سدیم و همچنین ترشح فنولیک با استفاده از محلول ۱٪ اسید سیتریک کنترل می‌شود (Shah *et al.*, 2021). ریز نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با آب مقطر شستشو شدند و سپس با قارچکش کاربندازیم (Bavitin) ۰/۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند و سپس در کلرید جیوه ۱ درصد به مدت ۶ دقیقه قرار گرفتند. در نتیجه آلودگی ۱۰۰ درصد کنترل شد. وقتی زمان قارچکش نصف شد ۷۵ درصد استقرار به دست آمد. و موقعی که کلرید جیوه و کاربندازیم هر دو ۱۰ دقیقه استفاده شد ریزنمونه‌ها مرگ و میر بالایی را نشان دادند (Kajla *et al.*, 2018). در مجموع بر اساس نتایج تحقیق حاضر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در رقم‌های مختلف متفاوت است.

منابع

حاجیان، س.، علیزاده‌اجیرلو، س. و زارع‌نهندی، ف. ۱۳۹۴. تاثیر BAP و TIBA بر روی پرآوری شاخساره در کشت درون شیشه‌ای رز رقم فول‌هوس. نشریه علوم باغبانی، ۲۹: ۱۱۸-۱۱۱.

خوشخوی، م. ۱۳۸۹. گیاه افزایی (ازدیاد نباتات) مبانی و روش‌ها. جلد اول. مرکز نشر دانشگاهی شیراز.

شکری، ص.، بابایی، ع.، احمدیان، م. و حسامی، ش.۱۳۹۲. مقایسه ی محیط کشت های مختلف گل رز رقم دولسویتا در شرایط درون شیشه‌ای. اولین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار، تهران.

کمالی‌علی‌آباد، ک. ۱۳۹۸. تجربیات علمی و عملی کشت بافت گیاهی. انتشارات نوید حکمت.

یاری، ف.، موسوی، ا.، مستوفی، ی.، زمانی، ذ.، سیدی، س.م.، مطلبی، ع. و لایمر، م. ۱۳۹۰. بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای پنج رقم گل رز شاخه بریده. مجله فناوری زیستی در کشاورزی، ۱۰: ۲۶-۱۷.

Babu, K.N., Samsudeen, K., Minoo, D., Geetha, P., Ravindran, P.N. 2016. 4Tissue Culture and Biotechnology of Ginger. Ginger: The Genus Zingiber, 181.

Kajla, S., Kala, S., Kumar, A., Mir, H., Singh, M.K. 2018. Effect of Growth Regulators on in vitro Shoot Multiplication and Plant Regeneration of Rosa hybriad L. from Nodal Explants. International Journal of Current Microbiology and Applied Science,7: 3804-11.

Ozel, C.A., Arslan, O. 2006. Efficient micropropagation of English shrub rose “Heritage” under in vitro conditions. International Journal of Agriculture and Biology, 5: 626-629.

Pati, P.K., Rath, S.P., Sharma, M., Sood, A., Ahuja, P.S. 2006. In vitro propagation of rose-a review. Biotechnology advances, 24(1): 94-114.

Shah, M.H., Ur Rahman, R., Mahmood, A., Usman, M., Bibi, S. 2021. Morphological characterization, multivariate analysis and micropropagation of hybrid rose (*Rosa indica* L.) germplasm. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 58(1): 51-59.

An investigation the effect of Topophysis, sterilization, and establishment conditions in tissue culture of *Rosa hybrid* cv. Utopia

Seyed Mahdi Salari[1*], Kazem Kamali Aliabad[2], Afagh Tabande Saravi[3], Mehdi Rezaeian[4]
[1*] Master Science Student of Agricultural Biotechnology, Department of Arid land and Desert Management, Faculty of Natural Resources, Yazd University, Yazd, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Arid land and Desert Management, Faculty of Natural Resources, Yazd University, Yazd, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Environment, Faculty of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran.
[4] Assistant Professor, Computer Engineering Department, Yazd University, Yazd, Iran.
Corresponding Author: S.M.Salari@Stu.Yazd.ac.ir

Abstract

In this research, the reaction of different parts of the plant, including the terminal, middle, and down buds for micropropagation of *Rosa hybrid* (cv. Utopia) under in vitro conditions was studied, and their growth factors were compared with each other. A part of shoot approximately 2 cm long was selected for establishment stage, for explant sterilization, 0.1% mercuric chloride was used at different times including 6, 7 and 8 minutes, and after three times washing by sterile double distilled water having 100 mg/l citric acid as an antioxidant, transported to modified MS. In this culture medium, Iron chelate modified to 0.05 to 1%. In this experiment, some factors like shoot length, plant length, leaf number, percentage of browning, percentage of dead plants and contamination percentage were studied. The results of analysis of variance showed that the effect of explant position on plant and sterilization time was significant for all treatments, but the iron modification had no significant effect on any treatments. So that by using terminal bud as an explant, the results showed, plant less length, less shoot length and less leaf number than other plants. Also, the results indicated, 6 min of sterilization is the best time. Comparison of the mean interaction of the treatments showed, the highest dead plants obtained by the combination of 6 minutes of sterilization with 1 g/l of mercuric chloride in middle shoots. While using $HgCl_2$ in concentrations of 0.05 and 0.1 g/l of iron chelate produces the maximum shoot length. The results of mean comparisons also showed that the position of the terminal bud showed the highest percentage of dead plants and using down part of the plant showed the lowest. The highest percentage of browning was observed in the base of the plant and the highest percentage of contamination was observed in the middle part of the main plant.

***Keywords*:** Browning, Mercuric chloride, In vitro culture, Ornamental plant, Tissue culture.