پنجمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، دانشکده کشاورزی
۲۸-۲۷ بهمن ماه ۱۳۸۹

بررسی باززایی غیر مستقیم در رز

لیلا پورحسینی *[۱]، مریم جعفرخانی کرمانی[۲] ، علی اکبر حبشی[۲] و احمد خلیقی[۳]

۱-دانشجوی دکترای دانشگاه علوم و تحقیقات ، ۲- عضو هیات علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی جهاد کشاورزی، ۳- عضو هیات علمی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول: لیلا پورحسینی، lpourhosseini@gmail.com

چکیده

بهنژادی رز از طریق سنتی با استفاده از تلاقی و انتخاب صورت می‌گیرد. این روش‌ها با توجه به وجود هتروزیگوسیتی بالا و منابع ژنی محدود، آنطورکه باید نتوانسته‌اند جوابگوی نیازهای اصلاحی رز باشند. روش‌های مهندسی ژنتیک برای بهنژادی رز بسیار مناسب هستند، زیرا امکان انتقال و تغییر ژن‌ها را به طور هدفمند فراهم می‌کنند.اما انتقال ژن رز نیازمند این است که پروتوکلهای معتبر و قابل اطمینانی برای کشت درون شیشه و باززایی گیاهان تراریخت شده در دسترس باشد. در این آزمایش به این منظور بررسی باززایی مستقیم از برگهای درون شیشه ای رز رقم 'Black Baccara' سه نوع ریز نمونه تهیه شد: قطعه بالایی حاصل برش افقی برگچه ، قطعه پایینی حاصل برش افقی برگچه و قطعه حاصل از برش عمودی برگچه. ریز نمونه ها پس از خراش دهی بر روی محیط های کشت حاوی تیمارهای مختلف هورمونی قرار گرفتند. محیط MS با غلظتهای مختلف هورمونی 2,4,-D (0, 10, 20, 40, 80(µM و 2,4,5-T (0, 10, 20, 40,80 در ترکیب با NAA (1µM) بکار برده شد. ریز نمونه ها به مدت ۵ هفته در تاریکی نگاه داشته شدند. پس از ظهور کالوس های جنین زا آماربرداری شده و به محیط باززایی MS حاوی10 µM TDZ قرار گرفتند. نتایج نشان داد که محیط های کشت حاوی 2,4,-D کالوسهای جنین زا و در نهایت جنین های رویشی یا سوماتیکی بیشتری نسبت به محیط های حاوی 2,4,5-T تولید کردند.

مقدمه

رز ها (*Rosa spp.*) یکی از مهمترین محصولات گلدار در جهانند و ارزش تجاری بالایی در زمینه های زینتی، دارویی و آرایشی دارند .تکنولوژی کشت بافت امروزه در در رزها اهمیت فوق العاده ای پیدا کرده است .اولین استفاده مهم تکنیک کشت بافت برای تکثیر سریع گیاهان و تولید انبوه آنها بوده و در سال های اخیر تکنولوژی کشت بافت برای دستورزی ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است که دارای پتانسیل منحصر به فردی برای تکمیل روش های مرسوم اصلاح می باشد. باززایی گیاهان در محیط درون شیشه مهم ترین قدم برای اعمال موفقیت آمیز برنامه های مهندسی ژنتیک در این گیاه می باشد (Pati *et al*., 2004). انتقال ژن رز نیازمند این است که پروتوکلهای معتبر و قابل اطمینانی برای کشت درون شیشه و باززایی گیاهان تراریخت شده در دسترس باشد(۱۶). به هر حال طیف وسیعی از ریز نمونه ها و روشهای آزمایشی که با گونه ها و کولتیوارهای مختلف رز بکار گرفته شده اند، گویای این مطلب است که حصول به یک روش کلی غیر وابسته به کولتیوار به منظور انتقال ژن و باززایی در رز بسیار سخت است (Ibrahim and Debergh, 2001). این موضوع توسط مطالعات مختلف بیشتر تایید شده است که نشان می‌دهند واریته های مختلف رز به پروتوکلهای مختلف باززایی، نیاز دارند (Korban., 2006; Kim et al., 2004; Estabrooks et al., 2007).

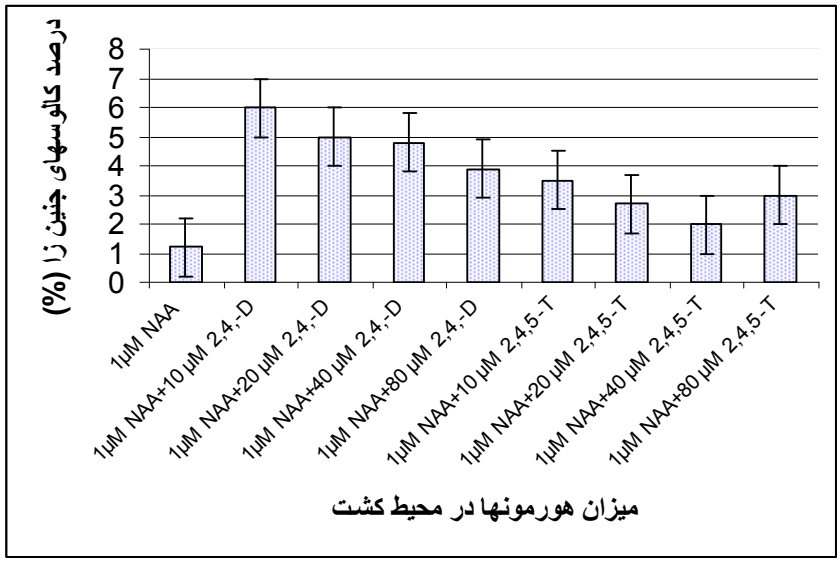
مواد و روش‌ها

در این آزمایش از رز رقم 'Black Baccara' به منظور بررسی باززایی مستق غیر مستقیم استفاده شد.

به منظور باززایی مستقیم از برگهای رز درون شیشه ای سه نوع ریز نمونه تهیه شد: قطعه بالایی حاصل برش افقی برگچه ، قطعه پایینی حاصل برش افقی برگچه و قطعه حاصل از برش عمودی برگچه. ریز نمونه ها پس از خراش دهی بر روی محیط های کشت حاوی تیمارهای مختلف هورمونی قرار گرفتند. محیط MS با غلظتهای مختلف هورمونی (0, 10, 20, 40, 80(μM) 2,4,-D و 2,4,5-T (0, 10, 20, 40,80 در ترکیب با NAA (1μM) بکار برده شد. ریز نمونه ها به مدت ۵ هفته در تاریکی نگاه داشته شدند. پس از ظهور کالوس های جنین زا آماربرداری شده و به محیط باززایی MS حاوی10 μM TDZ قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که ریز نمونه های حاصل از برش عمودی برگچه نسبت به سایر ریز نمونه ها، بیشترین میزان کالوسهای جنین زا را تولید کردند اما اختلاف در حد معنی داری نبود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که محیط های کشت حاوی **2,4,-D** کالوسهای جنین زا و در نهایت جنین های رویشی یا سوماتیکی بیشتری نسبت به محیط های حاوی **2,4,5-T** تولید کردند. همچنین بیشترین تعداد کالوسهای جنین زا در محیط حاوی ۱۰ ماکرو مول**2,4,-D** و ۱ ماکرومول **NAA** بدست آمد.



نمودار ۱- درصد کالوس جنین زای حاصل از غلظتهای مختلف هورمونی

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد که به منظور دستیابی به کالوسهای جنین زا در رز کولتیوار 'Black Baccara' برای استفاده در مطالعات بهنژادی نظیر انتقال ژن و موتاسیون زایی بهترین ترکیب هورمونی در محیط کشت MS استفاده از 2,4,-D و NAA می باشد.

منابع

1. Estabrooks, T., Browne, R., and Zhongmin, D. (2007). 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid promotessomatic embryogenesis in the rose cultivar 'Livin' Easy' (Rosa sp.). Plant Cell Reports26, 153–160.
2. Kim, C.K., Chung, J.D., Park, S.H., Burrell, A.M., Kamo, K.K., and Byrne, D.H. (2004). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Rosa hybrida using the green fluorescentprotein (GFP) gene. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78, 107–111.
3. Korban S.S. (2006) Somatic embryogenesis in rose: gene expression and genetic transformation. In: Mujib A, Samaj J (eds) Somatic embryogenesis. Plant cell monographs, vol 2. Springer, Berlin Heideblerg New York, pp 247–257.
4. Li, X.Q., Krasnyanski, S.F., and Korban, S.S. (2002). Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa. Journal of Plant Physiology 159, 313–319.

Study of Indirect Regeneration of Rosa hybrida cv.'Black Baccara')

Leila Pourhosseini[1*], Maryam Jafarkhani Kermani[2] 2, Aliakbar Habashi[2] , Ahmad Khalighi[3]
1.Science and Research Univercity
2. Biotechnology Research Institue of Iran
3. Tehran University
***Email:lpourhosseini@gmail.com**

Abstract:
Rose breeding by conventional methods; largely based on intra- and inter-specific hybridization is difficult. Genetic improvements of rose cultivars are possible through inducing mutations and gene transfer by genetic engineering. A general prerequisite for these approaches is to establish an efficient plant regeneration system. In the present research, indirect shoot regeneration (upper and basal sections of horizontal cut leaves and vertical cut leaf along the midrib) of *Rosa hybrida* cv. Black Baccara were used. For indirect shoot regeneration the basal MS media supplemented with different concentrations of 2,4,-D (0, 10, 20, 40, 80 μM) and 2,4,5-T (0, 10, 20, 40, 80 μM) in combination with NAA (1μM) were compared. The explants were kept in the dark for 5 weeks prior to recording of the data. In shoot regeneration experiments, medium containing 2 μM BAP was used. Results established an efficient regeneration system for use in future gene transformation programs.

Keywords: Indirect Regeneration, Rose, 2,4,-D, 2,4,5-T