بسم الله الرحمن الرحيم

نوع نشریه: دستورالعمل فنی
نام نشریه: راهنمای به‌نژادی گل رز با روش نجات جنین
نویسندگان: مریم جعفرخانی کرمانی، زهرا السادات حسینی، مریم عبدالمحمدی
ویراستار علمی: دکتر مهران عنایتی‌شریعت‌پناهی
ویراستاران ادبی: دکتر حسن رهنما و عصمت جعفری‌نژاد
طراحی: محمد جداری
تهیه شده در: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
شمارگان:۳۰
نوبت انتشار: اول
سال انتشار: ۱۳۹۷
مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۵۴۸۵۳ به تاریخ ۱۳۹۷/۱۰/۲۷ است

راهنمای به‌نژادی گل رز

با روش نجات جنین

دکتر مریم جعفرخانی کرمانی

زهرالسادات حسینی، مریم عبدالمحمدی

فهرست مطالب

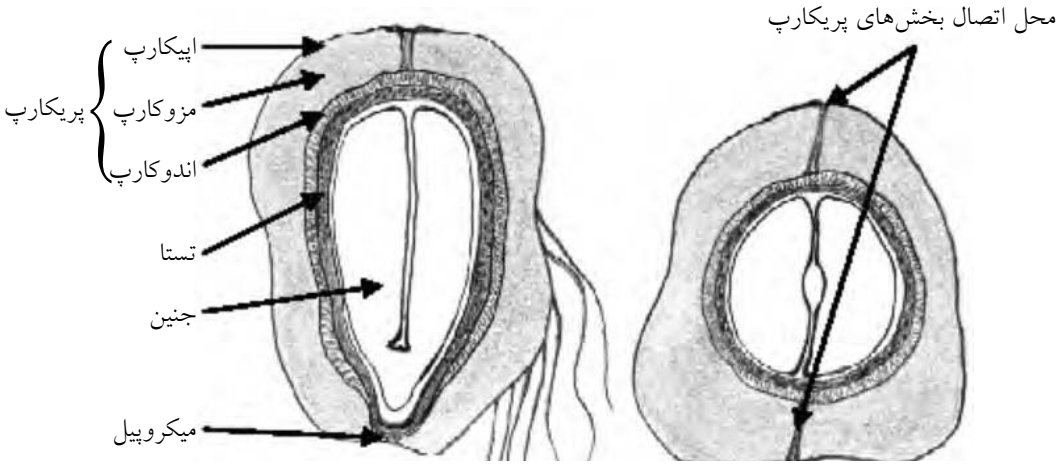
مقدمه ۱
بررسی منابع ۲
روش نجات جنین در شرایط درون‌شیشه‌ای ۳
انجام تلاقی (هیبریداسیون) ۵
مواد و روش‌ها ۵
جمع‌آوری دانه گرده گیاهان والد پدری ۵
اخته کردن گل والد مادری ۵
گرده‌افشانی و انجام تلاقی ٦
جمع‌آوری میوه و بذر ۷
ضدعفونی کردن میوه و بذر ۷
حذف پوسته‌های بذر و خارج کردن جنین ۸
طرز تهیه محیط کشت جنین و گیاهچه‌ها ۸
طرز تهیه محلول‌های ذخیره عناصر پرمصرف و کم‌مصرف محیط کشت MS ۸
محلول ذخیره آهن ۱۰
محلول ذخیره ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه ۱۰
محلول ذخیره هورمون‌ها ۱۰
طرز تهیه محیط کشت MS ۱۱
کشت جنین‌ها بر روی محیط بهینه ۱۱
مرحله پرآوری گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین‌ها ۱۲
مرحله ریشه‌دهی گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین‌ها ۱۳
سازگاری گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین‌ها ۱۳
نتیجه‌گیری ۱٤
فهرست منابع ۱۵

۱- مقدمه

هر ساله تقاضای مداوم از سوی مصرف‌کنندگان و پرورش‌دهندگان گل رز برای داشتن ارقام جدید، به‌نژادگران را بر آن داشته تا برای تولید ارقام جدید با ایجاد یا بهبود صفاتی نظیر شکل و رنگ جدید گل و میوه، داشتن رایحه بیشتر گل، مقاوت به آفات و بیماری‌ها، مقاومت به تنش‌های خشکی و شوری و غیره تلاش نمایند. در طراحی یک برنامه به‌نژادی موفق، باید تکثیر جنسی در تعداد زیادی گل صورت گیرد و پس از جوانه‌زنی بذور هیبریدهای حاصل، انتخاب برای معرفی یک رقم جدید به بازار تجاری انجام شود. بنابراین به‌نژادگران باید در هر تلاقی تعداد زیادی نتاج تولید کنند. اما در برنامه‌های به‌نژادی گل رز، سقط جنین‌های نابالغ در بذور حاصل از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای و در موارد خاص هیبریدهای درون‌گونه‌ای به دلیل عدم جوانه‌زنی و یا به علت توانایی جوانه‌زنی بسیار کم، که معمولاً به شدت هتروزیگوتی (ناخالصی) ژنتیکی در این گیاهان بستگی دارد، باعث کاهش کارایی برنامه‌های به‌نژادی می‌شود. امروزه استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی یک بخش مهم و ضروری به‌نژادی گیاهان تلقی شده و می‌تواند گامی مؤثر در پیشبرد و سرعت بخشیدن به برنامه‌های به‌نژادی به شمار آید. یکی از این روش‌ها نجات جنین می‌باشد، که یک روش برای کشت جنین نارس، تحت شرایط ضدعفونی شده، روی محیط کشت در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. کشت جنین برای کوتاه کردن چرخه‌های به‌نژادی و به عنوان روشی مؤثر برای غلبه بر موانع موجود بر جوانه‌زنی بذور و تولید موفق گیاهان هیبرید بکار گرفته می‌شود.

۲- بررسی منابع

تکثیر جنسی گل رز شامل ترکیب یاخته‌های جنسی نر و ماده و تشکیل بذر می‌باشد که با به وجود آمدن ژنوتیپ‌های جدید همراه است. تلاقی جنسی باید در تعداد زیادی گل صورت گیرد و پس از جوانه‌زنی بذور هیبریدهای حاصل، انتخاب برای معرفی یک رقم جدید به بازار تجاری انجام می‌شود. بنابراین به‌نژادگران باید در هر تلاقی تعداد زیادی نتاج تولید کنند. اما در بعضی از برنامه‌های به‌نژادی، جنین‌های نابالغ حاصل از تلاقی‌های درون و بین‌گونه‌ای به دلیل موانع مکانیکی مانند پریکارپ چوبی و ضخیم که اطراف جنین را در برگرفته است و از رشد و نمو آن جلوگیری می‌کند، سقط می‌شوند. این نوع کاهش جوانه‌زنی بذر ناشی از پوسته سفت و سخت آن می‌باشد که مانع ورود آب و اکسیژن به داخل بذر می‌شود و این نوع بذور را بذرهای سخت می‌نامند. بذر برخی گیاهان گل‌دهنده شامل پریکارپ، تستا و جنین می‌باشد. پریکارپ از سه لایه اپیکارپ (لایه چوبی و سخت)، مزوکارپ (لایه میانی) و اندوکارپ (لایه فیبری بسیار سخت و نفوذ ناپذیر) تشکیل شده است. داخل پریکارپ، جنین سفید رنگ در یک پوشش چسبنده و نازک به نام تستا پیچیده شده است (شکل ۱). تستا معمولاً به رنگ قهوه‌ای یا برنزه است. تستا در واقع دارای ۲ لایه می‌باشد شامل: لایه بیرونی قهوه‌ای رنگ و لایه درونی سفید رنگ و دارای حالت چسبندگی می‌باشد. به نظر می‌رسد حضور پریکارپ سخت و ضخیم به عنوان یک مانع فیزیکی، از نفوذ آب به درون بذر و رشد جنین جلوگیری کرده و مانع جوانه‌زنی بذر می‌شود. همچنین عدم جوانه‌زنی بذور ممکن است مربوط به رکود فیزیولوژیکی باشد. اکثر بذرهای تازه برداشت شده گیاهان مناطق معتدله دارای رکود فیزیولوژیکی هستند که این به دلیل حضور هورمون‌های گیاهی و بازدارنده‌های رشد در داخل بافت‌هایی که جنین را احاطه کرده‌اند، می‌باشد که از جوانه‌زنی جلوگیری می‌کنند. تحریک جوانه‌زنی در بذور مانند خیساندن طولانی مدت در آب، خراش‌دهی (اسکاریفیکاسیون) و یا قرار دادن در معرض اکسیژن و یا استفاده از تیمار اسید از جمله راهکارهای ارائه شده برای برطرف کردن این موانع هستند. نفوذ آب در پوسته بذر (پریکارپ و تستا) باعث حل شدن بازدارنده‌های رشد می‌شود اما روی ترکیبات بازدارنده جوانه‌زنی در درون جنین، اثری ندارد. آبسزیک اسید (ABA) به عنوان بازدارنده اصلی در جوانه‌زنی بذور رز و تعداد فراوانی از دیگر گونه‌ها شناخته شده است. امروزه استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی به عنوان یک بخش مهم و ضروری به‌نژادی گیاهان تلقی شده و می‌تواند گامی مؤثر در پیشبرد و سرعت بخشیدن به برنامه‌های به‌نژادی به شمار آید. روش نجات جنین درون‌شیشه‌ای که در آن جنین در شرایط کاملاً استریل و ضدعفونی شده بر روی محیط کشت قرار می‌گیرد، می‌تواند ضمن غلبه بر موانع موجود بر جوانه‌زنی بذور و تولید موفق نتاج حاصل از هیبریدهای درون و بین‌گونه‌ای دوره‌های به‌نژادی را به طور چشم‌گیری کوتاه نماید.



شکل ۱- مورفولوژی بذر گل رز (برگرفته از Zlesak, 2006)

۲-۱- روش نجات جنین در شرایط درون‌شیشه‌ای

کارایی روش‌های به‌نژادی از طریق تلاقی می‌تواند با پیدا کردن روشی برای غلبه بر موانع جوانه‌زنی و افزایش جوانه‌زنی بهبود یابد. روش‌های بیوتکنولوژی به عنوان راه‌حل مهمی برای تکثیر متداول رز و سیستم‌های به‌نژادی به وجود آمده است. برای بدست آوردن نتاج حاصل از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای و یا درون‌گونه‌ای، در حالتی که بعد از گرده‌افشانی لقاح صورت می‌گیرد اما آندوسپرم رشد نمی‌کند و در نتیجه از رشد و نمو جنین نیز به دلیل کمبود مواد مغذی جلوگیری شده و باعث سقط شدن جنین می‌شود، روش نجات جنین بسیار کارآمد می‌باشد. نجات جنین یک روش برای حذف کردن پریکارپ و پوسته تستا از اطراف جنین و کاشتن جنین تحت شرایط گندزدایی شده، روی محیط کشت می‌باشد (Gudin, 2000). روش نجات جنین منابع هورمونی و بازدارنده‌های رشد موجود در بافت‌های اطراف جنین را حذف می‌کند و به جنین اجازه می‌دهد روی محیط غذایی مصنوعی رشد و نمو کند. این روش با دو هدف صورت می‌گیرد:

۱- کشت جنین‌های بالغ و کمک به کوتاه کردن دوره جوانه‌زنی بذر بوسیله برطرف کردن خواب بذر

۲- کشت جنین‌های نابالغ که نجات جنین اولیه نامیده می‌شود.

به دلیل وجود ناسازگاری و دور بودن فاصله گیاه‌شناسی بین والدین، جنین قادر به رشد و بالغ شدن نمی‌باشد و در مراحل اولیه رشد از بین می‌رود. هدف از این کار رشد کردن جنین روی محیط کشت مصنوعی و جلوگیری

از سقط‌شدن آن می‌باشد (Gudin, 1993). در بعضی از تلاقی‌های درون‌گونه‌ای یا بین‌گونه‌ای (درون جنس) بافت‌های مغذی (آندوسپرم) از نمو جلوگیری می‌کنند و موجب سقط جنین می‌شوند. این جنین‌ها می‌توانند نجات داده شوند و با کشت کردن روی محیط کشت در شرایط درون شیشه، به طور کامل رشد کنند تا قادر به جوانه‌زنی شوند. نجات جنین در خانواده Rosaceae برای اولین بار در سال ۱۹۳۳ در مورد هیبرید بین گیلاس و هلو انجام شد (Bridgen, 1994). در رز نجات جنین، با استفاده از جنین‌های بالغ برای اولین بار در سال ۱۹٤٦ و استفاده از جنین‌های نابالغ در سال ۱۹۹٤ انجام شد (Gudin, 1993). روش نجات جنین برای بدست آوردن هیبریدهای بین‌گونه‌ای *R. rugosa Thunb* × *R. Foetida Herrm* بکار گرفته شده است (Gudin and Mouchotte, 1995). همچنین روش نجات جنین برای بدست آوردن هیبریدهای درون‌گونه‌ای بین واریته‌های رزهای جدید انگلیسی *R. hybrida Heritage* به طور مؤثر استفاده شده است (Marchant *et al*., 1993). موهاپاترا و روت (Mohapatra and Rout, 2005)، برای جوانه‌زنی بذور دو هیبرید حاصل از تلاقی رزهای فلوریباندا، به نام‌های Arunima و Shocking Blue از روش نجات جنین استفاده کردند و به ترتیب ۸٦ و ۸۷/۳ درصد جوانه‌زنی در محیط کشت MS ۱/۲حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 گزارش کردند. همچنین روش نجات جنین برای جنین‌های نابالغ بدست آمده از تلاقی دو گونه شیپوری *Zantedeschia aethiopica* و *Zantedeschia hybrida* به کار برده شد و محیط کشت مناسب، MS ۱/۲ دارای یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 برای جوانه‌زدن جنین‌ها گزارش شد (Kubo *et al*., 2006). همچنین از روش نجات جنین جهت شکستن رکود بذر و کوتاه کردن زمان جوانه‌زنی تا تولید گیاهچه بر روی بذور زردآلو (*Prunus armenica* L. Hacihaliloglu) استفاده شد (Yildirim *et al*., 2007). روش نجات جنین در تولید گیاهان هاپلوئید، به صورت تلاقی با گرده اشعه دیده که فاقد باروری می‌باشد، استفاده می‌شود. پس از انجام تلاقی و تولید بذر و در نهایت کشت جنین و جوانه‌زنی، گیاه هاپلوئید حاصل می‌شود (Meynet *et al*., 1994). همچنین روش نجات جنین برای تولید گیاهان هاپلوئید حاصل از تلاقی گندم (والد مادری) × ذرت (والد پدری) و همچنین ذرت (والد اصلی) × ذرت (لاین القایی هاپلوئیدی به عنوان پدر) مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. پس از انجام تلاقی و تولید بذر و در نهایت کشت جنین و جوانه‌زنی، گیاه هاپلوئید حاصل می‌شود. روش نجات جنین در افزایش جوانه‌زنی بسیار مؤثر بوده و اگر جنین‌ها بدون آسیب‌دیدگی از پوسته بذر خارج شوند شانس جوانه‌زنی آن‌ها حتی تا ۱۰۰ درصد افزایش پیدا خواهد کرد.

۲-۲- انجام تلاقی (هیبریداسیون)

انتخاب والدین بر اساس صفات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و ژنتیکی از جمله میزان عملکرد، مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، بازارپسندی و غیره انجام می‌شود.

۳- مواد و روش‌ها

۳-۱- جمع‌آوری دانه گرده گیاهان والد پدری

در صبح زود بساک‌ها از روی گل‌هایی که هنوز به طور کامل شکوفا نشده‌اند، برداشت شده و در درون شیشه‌های مربایی تمیز برای مدت ۲٤ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲±۲۳) در محلی خشک نگهداری می‌شوند تا گرده‌ها بالغ شده و از کیسه بساک خارج شوند و برای گرده‌افشانی مصنوعی هدفمند آماده گردند. روی هر شیشه نام والد گرده دهنده به همراه تاریخ برداشت بساک نوشته می‌شود.

۳-۲- اخته کردن گل والد مادری

گل‌های ماده در مرحله غنچه، برای اخته کردن انتخاب می‌شوند. ابتدا همه گلبرگ‌ها را از محور گل جدا کرده و سپس با استفاده از قیچی کوچک بساک‌ها که در این مرحله از نمو گل نارس هستند، برای جلوگیری از خودگرده‌افشانی حذف می‌نمایند. در نهایت روی کلاله گل‌ها، با پاکت کاغذی مخصوص به‌نژادی که به هوا نفوذپذیر بوده و عایق رطوبت می‌باشد، پوشانده می‌شود تا از گرده‌افشانی ناخواسته توسط باد و حشرات جلوگیری شود (شکل۲).

شکل ۲- آماده سازی والد مادری گل رز، **الف**- حذف کردن گلبرگ‌ها از گل، **ب**- حذف کردن پرچم‌ها از اطراف کلاله

۳-۳- گرده افشانی و انجام تلاقی

معمولاً در صبح زود قبل از طلوع کامل خورشید، عمل گرده‌افشانی مصنوعی انجام می‌شود (شکل ۳). هنگامی که روی سطح کلاله مایع شفاف و چسبنده‌ای مشاهده گردد، نشان‌دهنده آمادگی کلاله برای پذیرش دانه گرده است. در این زمان با قرار دادن گرده‌های از قبل آماده شده توسط یک قلموی نقاشی باریک تمیز، عمل گرده‌افشانی هدفمند انجام می‌شود. برای اطمینان از عدم اختلاط دانه‌های گرده ارقام مختلف با یکدیگر، لازم است در هنگام گرده‌افشانی برای هر والد گرده‌دهنده یک قلموی مخصوص استفاده شود (هر قلمو بعد از انتهای کار با الکل شسته شود). پس از گذاشتن دانه گرده بر روی کلاله برای جلوگیری از گرده‌افشانی ناخواسته توسط حشرات و باد، ساقه گل را با پاکت مخصوص پوشانده و تاریخ تلاقی و نام والدین، به ترتیب والد مادری و سپس والد گرده‌دهنده مانند (G × M) روی برچسب مخصوص نوشته شده و به ساقه گل آویزان می‌گردد. در کل عمل گرده‌افشانی برای هر گل ۲ تا ۳ بار بسته به وجود مایع شفاف روی کلاله، به صورت متناوب تکرار می‌شود تا حداکثر میزان بذر تولید شود. در نهایت پس از گذشت یک هفته از تاریخ انجام تلاقی پاکت‌ها از روی کلاله حذف می‌شوند.

شکل ۳- گرده‌افشانی گل رز، **الف**- قرار دادن دانه گرده بر روی کلاله، **ب**- پوشاندن کلاله با پاکت مخصوص

۳-٤- جمع‌آوری میوه و بذر

پس از انجام تلاقی، میوه‌ها بر روی بوته‌ها یا درختان مادری شروع به رشد می‌نمایند. میوه‌های رسیده در آزمایشگاه کشت بافت، ضدعفونی سطحی شده و بذور آن‌ها خارج می‌گردد (شکل ٤). لازم به ذکر است که بذور در جنس رز معمولاً بعد از ۷ تا ۸ هفته رسیده و آماده انتقال به آزمایشگاه کشت بافت هستند.

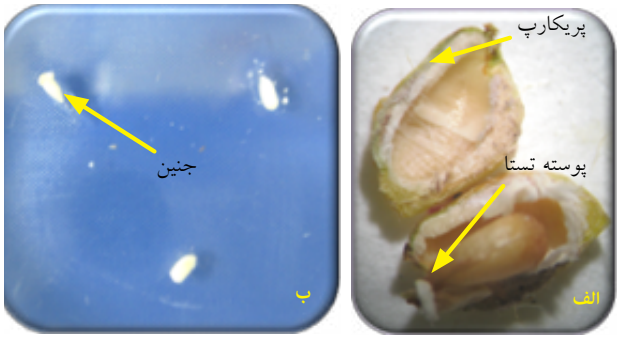
شکل٤- تشکیل میوه پس از گرده‌افشانی در گل رز، **الف**- میوه رز حاصل از تلاقی، **ب**- بذور رز کشت جنین در محیط درون‌شیشه

۳-۵- ضد عفونی کردن میوه و بذر

برای ضدعفونی کردن ابتدا میوه‌ها با آب و چند قطره مایع شست‌وشو، شسته شده تا گرد و غبار آن‌ها زدوده شود و سپس زیر هود لامینار تحت شرایط استریل با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی می‌شوند. آنگاه یک دوره آب‌شویی با آب مقطر استریل انجام شده و میوه‌ها به محلول هیپوکلریت سدیم با ۲/۵ درصد کلر فعال منتقل شده و محلول به آرامی به مدت ۳۰ دقیقه هم زده می‌شود. سپس میوه‌ها توسط آب مقطر استریل ۳ بار و در هر بار به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو می‌شوند. پس از آن میوه‌ها در داخل پتری‌دیش استریل قرار گرفته و با استفاده از پنس و اسکالپل استریل میوه‌های ضدعفونی‌شده برش داده شده و بذور از داخل آن‌ها خارج می‌شود. پس از طی این مراحل بذور در داخل شیشه‌های استریل ریخته شده و برای انجام نجات جنین آماده می‌شوند.

۳-٦- حذف پوسته‌های بذر و خارج کردن جنین

جهت مسلح کردن چشم برای بهتر دیدن بذور و جلوگیری از آسیب رسیدن به جنین در حین برش پوسته بذر از بینوکولار استفاده می‌شود. این دستگاه به خوبی با الکل ضدعفونی گردیده و در زیر هود لامینار قرار می‌گیرد. سپس بذور در زیر عدسی بینوکولار قرار گرفته و با استفاده از پنس و اسکالپل استریل پوسته‌های بذر شامل پریکارپ بسیار سخت و چوبی و همچنین تستای قهوه‌ای رنگ از اطراف جنین جدا می‌شود (شکل ۵). جنین در گیاهان مختلف به رنگ‌های مختلف است.



شکل ۵- آماده سازی جنین گل رز، **الف**- پوسته پریکارپ شکاف داده شد، **ب**- جنین خارج شده از پوسته بذر

پس از خارج کردن جنین‌ها از داخل بذر، آن‌ها را بر روی محیط کشت مناسب کشت نموده و برای رشد و جوانه‌زنی در فیتوترون با دمای ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۲±٦۰ درصد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار می‌دهند.

۳-۷- طرز تهیه محیط کشت جنین و گیاهچه‌ها

محیط کشت پایه مورد استفاده برای کشت جنین‌ها معمولاً شامل MS ۱/۲ (Murashige and Skoog, 1962) است.

۳-۷-۱- طرز تهیه محلول‌های ذخیره عناصر پرمصرف و کم مصرف محیط کشت MS

مقادیر مورد نیاز برای تهیه محلول پایه عناصر پرمصرف را طبق جدول ۱ وزن نموده و در یک بشر محتوی آب مقطر به ترتیبی که در جدول آورده شده، اضافه نمایید. به صورتی که ابتدا اولین ماده را درون آب

مقطر ریخته و پس از حل شدن کامل آن، ماده بعدی اضافه شود. این عمل تا اضافه نمودن آخرین ماده ادامه می‌یابد. پس از حل شدن کامل مواد، حجم نهایی محلول با آب مقطر به یک لیتر رسانده می‌شود. محلول در یخچال نگهداری شده و برای تهیه یک لیتر محیط کشت، ۵۰ میلی‌لیتر از این محلول مورد استفاده قرار می‌گیرد. محلول ذخیره عناصر کم مصرف نیز مانند محلول پایه عناصر پرمصرف تهیه می‌شود. بدین ترتیب که هر یک از مواد را طبق جدول ۲ وزن نموده و به طور جداگانه در بشر محتوی آب مقطر ریخته می‌شود. هر ماده پس از حل شدن کامل ماده قبلی اضافه می‌شود و پس از حل شدن کامل آخرین ماده حجم نهایی محلول با آب مقطر به یک لیتر رسانده و سپس آن را در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری و برای تهیه یک لیتر محیط کشت ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول مورد استفاده قرار می‌گیرد.

جدول ۱- مواد مورد نیاز برای تهیه محلول پایه عناصر پرمصرف در محیط کشت MS (20X)

نام ماده	غلظت در محلول ذخیره (mgl^{-1})
NH_4NO_3	۳۳۰۰۰
KNO_3	۳۸۰۰۰
$CaCl_2.2H_2O$	۸۸۰۰
KH_2PO_4	۳٤۰۰
$MgSO_4.7H_2O$	۷٤۰۰

جدول ۲- مواد مورد نیاز برای تهیه محلول مادر عناصر کم‌مصرف در محیط کشت MS (100X)

نام ماده	غلظت در محلول ذخیره (mgl^{-1})
KI	۸۳
H_3BO_3	٦۲۰
$MnSO_4.4H_2O$	۱٦۹۰
$ZnSO_4.7H_2O$	۸٦۰
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۲۵
$CuSO_4\ 5H_2O$	۲/۵

۳-۷-۲- محلول ذخیره آهن

به دلیل اینکه آهن به شکل کلوروسولفات نمی‌تواند به صورت فرو برای مدت طولانی در محیط کشت حفظ شود و در دسترس بافت‌ها قرار گیرد، لذا آهن را به صورت کلات شده با EDTA (Ethylen Diamin Tetra Acetic acid) تهیه و مورد استفاده قرار می‌دهند. برای تهیه محلول ۲۰X ابتدا ۷٤٥/۲ میلی‌گرم از سدیم اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید ($Na_2EDTA.2H_2O$) را وزن و در ٤۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر آب حل کرده و بعد ۵۷۷ میلی‌گرم از سولفات آهن ($FeSO_4.6H_2O$) را در ظرفی جدا در ٤۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و بعد از حل شدن کامل، به طور همزمان دو محلول را داخل ظرف یک لیتری ریخته و کل حجم محلول را با آب مقطر به یک لیتر می‌رسانند. در روش دوم، ۷۳٤ میلی‌گرم از ماده FeNaEDTA را وزن کرده و در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب حل کرده که محلول ۲۰X حاصل می‌شود. این محلول را در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرده و برای هر لیتر ۵۰ میلی‌لیتر از محلول استفاده می‌نمایند. باید توجه کرد محلول پایه آهن نسبت به نور حساس است و رسوب می‌دهد، بنابراین حتماً ظرف محتوی محلول پایه آن باید به طور کامل با فویل پوشیده شود.

۳-۷-۳- محلول ذخیره ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه

هر یک از ویتامین‌ها ابتدا به طور جداگانه وزن و در آب مقطر حل می‌شوند. مقدار۲۰ میلی‌گرم گلایسین[1] در ٤۰ میلی‌لیتر آب مقطر و مقادیر ۵ میلی‌گرم از نیکوتینیک اسید[2] و پیرودکسین[3] و تیامین[4] نیز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شوند. محلول‌های گلیسین، پیروکسین و نیکوتینیک اسید در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. به ازای هر لیتر محیط ٤ میلی‌لیتر گلایسین، ۲ میلی‌لیتر تیامین و ۱۰ میلی‌لیتر نیکوتینیک اسید و پیرودوکسین استفاده می‌شود. ویتامین میواینوزیتول به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به صورت پودری وزن و به محیط اضافه می‌شود.

۳-۷-٤- محلول ذخیره هورمون‌ها

تمام هورمون‌ها شامل NAA، BAP، GA_3 و IBA با غلظت ۱۰ میلی‌مولار با حلال NaOH و یا الکل ۵۰ درصد ساخته می‌شوند. هر یک از هورمون‌ها به اندازه ۰/۱ وزن مولکولی‌شان بر حسب میلی‌گرم به طور جداگانه وزن و در حلال حل شده، سپس حجم‌شان با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر (برای غلظت ۱۰ میلی‌مولار) در یک فالکون رسانده شود. به عنوان مثال برای BAP که دارای وزن مولکولی ۲۲۵/۲۵ است

1- Glysine
2- Nikotinic acid
3- Pyridoxine
4- Tiamine

۲۲/۵ میلی‌گرم برداشته شده و در چند قطره NaOH حل کرده و با آب مقطر حجم آن را به ۱۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم که غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار خواهد شد. برای غلظت نهایی ۱ میکرومولار باید ۱۰۰ میکرولیتر در لیتر استفاده شود. تمامی این هورمون‌ها را می‌توان در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

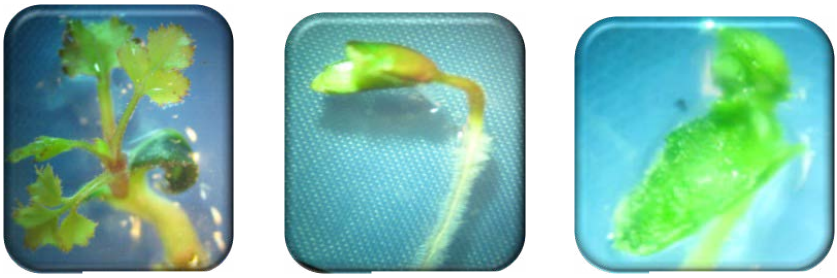
۳-۸- طرز تهیه محیط کشت MS

برای تهیه یک لیتر محیط کشت MS ابتدا ۵۰۰ -۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر را در یک ارلن ریخته و سپس مواد عناصر کم مصرف و پرمصرف به ترتیب و با توجه به غلظت‌های مورد نیاز (ذکر شده در بالا) در حجم‌های مشخص شده به آن افزوده می‌گردد. ساکارز در غلظت ۳۰ گرم، برای هر لیتر محیط کشت MS مورد نیاز است که به طور مستقیم به محیط کشت اضافه می‌شود. بعد از افزایش ویتامین‌ها و آهن، حجم محیط فوق را با آب مقطر به یک لیتر رسانده و pH محیط کشت با سود و اسید کلریدریک یک نرمال و ۰/۱ نرمال حدود ۵/۸-۵/۷ تنظیم می‌شود. به منظور جامد نمودن محیط کشت، ۷ گرم آگار (Plant agar) به یک لیتر محیط اضافه شده و محلول حاصل با توجه به اینکه در چه ظرفی ریخته شود پس از اضافه کردن آگار به دو صورت اتوکلاو می‌شود: برای کشت جنین محیط کشت در پتری‌دیش‌های ٦ سانتی‌متری پخش و برای رشد و تکثیر گیاهچه‌ها محیط کشت در شیشه‌های مربایی پخش می‌شود. برای پخش محلول کشت در پتری‌دیش استریل شده، ابتدا محلول در ارلن یک لیتری اتوکلاو شده و سپس در زیر هود تحت شرایط استریل پخش و پس از سرد شدن محیط، درب پتری‌دیش‌ها را بسته و با لایه‌ای از نوار پارافیلم بسته می‌شود. در حالتی که محیط کشت در شیشه‌های مربایی پخش می‌شود، پس از اضافه کردن آگار ارلن حاوی محلول کشت را گرم کرده تا آگار به طور کامل حل شود. در طی این مدت محلول چند بار به هم زده شده و پس از حل شدن کامل آگار و شفاف شدن، محیط در شیشه‌های مربایی برای کشت پخش می‌شوند. شیشه‌های مربایی حاوی محیط کشت با اتو کلاو در دمای ۱۲٦ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل می‌شوند.

۳-۹- کشت جنین‌ها بر روی محیط بهینه

جنین‌ها بر روی محیط بهینه که معمولاً برای گیاهان مختلف با اندکی تغییر قابل پیش‌بینی است، کشت می‌شوند. در بسیاری از گیاهان محیط کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و یا ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 استفاده می‌شود. پس از

کشت کردن جنین‌ها در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت، آن‌ها را در فیتوترون با دمای ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری می‌نمایند. شکل ٦ رشد جنین‌ها را در ۳ هفته اول پس از انتقال به محیط جنین‌زایی نشان می‌دهد.



شکل ٦- مراحل جوانه‌زنی جنین گل رز در طی ۳ هفته پس از کشت

۳-۱۰- مرحله پرآوری گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین‌ها

بعد از گذشت ۳ هفته پس از کشت جنین‌ها، آن‌ها به طور کامل جوانه زده و برای ادامه رشد و تکثیر به محیط پرآوری منتقل می‌شوند. در این مرحله از محیط کشت MS حاوی ۲ میکرومولار هورمون BAP استفاده می‌شود و ریزنمونه‌ها در فیتوترون با دمای ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری می‌شوند (شکل ۷). واکشت گیاهچه‌ها هر یک ماه یکبار صورت می‌گیرد.

شکل ۷- مرحله پرآوری گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی جنین گل رز

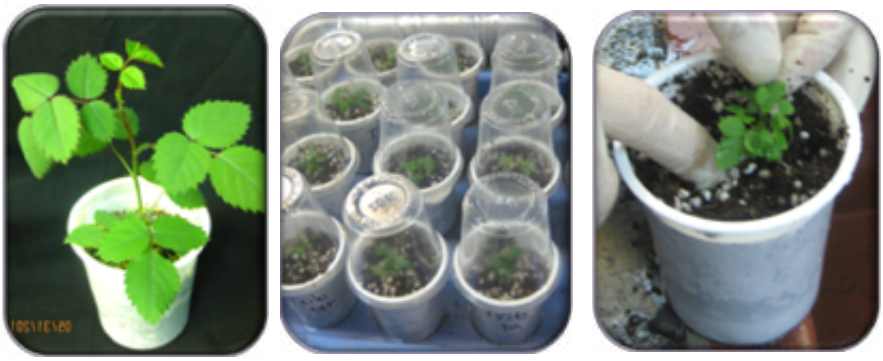
۳-۱۱- مرحله ریشه‌دهی گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین‌ها

ابتدا گیاهچه‌ها ۳ هفته در محیط MS بدون هورمون کشت می‌شوند تا ارتفاع کافی پیدا کنند و بعد به محیط ریشه‌زایی حاوی ۰/۲۵ میکرومولار IBA و ۰/۲۵ میکرومولار NAA انتقال داده می‌شوند. ریشه‌ها پس از ۳ هفته ظاهر شده و معمولاً در هفته چهارم به طور کامل تشکیل می‌شوند (شکل ۸).

شکل ۸- مرحله ریشه‌زایی گیاهچه‌های گل رز در محیط کشت

۳-۱۲- سازگاری گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین‌ها

در این مرحله گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از محیط کشت جدا شده و به محیط خارج از شیشه منتقل می‌شوند. به این منظور پیت و پرلیت به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط شده و در آون با دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳ ساعت استریل می‌شوند. لیوان‌های یک‌بار مصرفی که ته آن‌ها سوراخ کوچکی ایجاد شده با این مخلوط پر شده و گیاهچه‌های ریشه‌دار در آن مستقر می‌گردند (شکل ۹). برای درپوش لیوان‌ها ،لیوان یکبار مصرف شفاف استفاده می‌شود و هر ۲ روز یکبار یک سوراخ ته لیوان‌های درپوش ایجاد می‌شود تا به تدریج گیاهچه‌ها با محیط بیرون سازگار شوند و در نهایت لیوان‌ها برداشته می‌شوند. طی این مدت گیاهچه‌ها در گلخانه در دمای ۲±۲۰ و رطوبت ۷۰-۶۰ درصد نگهداری می‌شوند. در این مرحله هر یک هفته در میان از کود مایع قطره طلا به میزان ۵ میلی‌گرم در لیتر برای تغذیه گیاهچه‌ها استفاده می‌شود.



شکل ۹- مرحله سازگاری گیاهچه‌های گل رز از محیط درون شیشه‌ای به گلخانه

٤- نتیجه‌گیری

مهم‌ترین مانع موجود در برنامه‌های به‌نژادی رز از طریق تلاقی، درصد بسیار پایین جوانه‌زنی بذور می‌باشد، روش نجات جنین یک روش کارا برای حذف این مانع می باشد. در این نشریه، راهنمای کاربردی روش نجات جنین در گل رز با معرفی بهترین زمان برای انجام تلاقی و برداشت بذر و همچنین چگونگی خارج کردن جنین از بذر و کشت آن در محیط مناسب ارائه شد. محیط کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و یا ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به عنوان محیط بهینه برای کشت جنین‌های گل رز معرفی گردید. لازم به ذکر است که روش نجات جنین در افزایش جوانه‌زنی بسیار مؤثر بوده و اگر جنین‌ها بدون آسیب دیدگی از پوسته بذر خارج شوند شانس جوانه‌زنی آن‌ها حتی تا ۱۰۰ درصد افزایش پیدا خواهد کرد.

۵- فهرست منابع

Bridgen, MP (1994). A review of plant embryo culture. HortScience. 29(11): 1243-1246.
Gudin, S (1993). Embryo rescue in *Rosa hybrida* L. Euphytica. 72(3): 205-212.
Gudin, S (2000). Rose: genetics and breeding. Plant breeding reviews. 17: 159-190.
Gudin, S and Mouchotte, J (1995). Integrated research in rose improvement-a breeder›s experience. In II International Rose Symposium. 424: 285-292.
Kubo, T, Inaba, K and Mori, G (2006). Embryo culture for the production of interspecific hybrids in Zantedeschia. Journal of community cooperative research center, Senshu Univ.1: 35-38.
Marchant, R, Power, JB, Davey, MR and Chartier-Hollis, J (1993). Embryo rescue, for the production of F_1 hybrids, in English rose. Euphytica. 74(3): 187-193.
Meynet, J, Barrade, R, Duclos, A and Siadous, R (1994). Dihaploid plants of roses (*Rosa x hybrida*, cv ‹Sonia›) obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds. Agronomie. 14(3): 169-175.
Mohapatra, A and Rout, GR (2005). Study of embryo rescue in floribunda rose. Plant cell, tissue and organ culture. 81(1): 113-117.
Murashige, T and Skoog, F (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473-497.
Yildirim, H, Tilkat, E, Onay, A and Ozen, HC (2007). *In vitro* embryo culture of apricot, *Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloğlu. International Journal of Science and Technology. 2(2): 99-104.
Zlesak, DC (2006). Rose, Rosa × hybrida. Chapter 26. In: Anderson. Flower breeding and genetics. Springer. Dordrecht. 695-738.

توضیح در خصوص علامات اختصاری به کار برده شده در این نوشتار:

MS medium	Murashige and Skoog medium
BAP	6-Benzylaminopurine
GA3	Gibberellic acid
NAA	α-naphthalene acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid