مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۱، شماره ۴، ۱۳۸۹ (۳۵۷-۳۴۷)

بازایی رز مینیاتوری هفت رنگ (*Rosa hybrida*,. cv 'Tanbakeda') از جنین‌های سوماتیکی

ندا ویشلقی[۱]، مختار جلالی جواران[۲]* و احمد معینی[۳]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
(تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۲۰ - تاریخ تصویب: ۸۹/۱۱/۲٤)

چکیده

رز یکی از مهمترین گیاهان زینتی است. هدف از انجام این تحقیق تولید جنین‌های سوماتیکی و سپس باززایی کامل گیاه رز از جنین‌های سوماتیکی می‌باشد. به این ترتیب بعد از کشت جوانه‌های جانبی گل رز هفت رنگ در محیط درون شیشه، برگ‌های مناسب آنها به عنوان ریزنمونه اولیه انتخاب گردیدند و برای کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C کشت شدند. از بین ۳۸ تیمار هورمونی در محیط MS و ۱٦ تیمار هورمونی در محیط B5، محیط‌های شامل ۳ mg/l و۲ هورمون 2,4-D و ۰/۵ mg/l هورمون NAA در محیط MS و محیط شامل ۵ mg/l هورمون 2,4-D و همچنین محیط شامل ۰/۵ mg/l هورمون 2,4-D و ۲/۵ mg/l هورمون NAA و ۰/۵ mg/l هورمون کینتین در محیط B5 بهترین محیط‌ها برای تولید کالوس بودند که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند. سپس در مرحله بعد کالوس‌های تولید شده در محیط MS حاوی ۲ mg/l هورمون 2,4-D تحت تأثیر هشت تیمار هورمونی در محیط MS در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C جهت تولید جنین قرار گرفتند، که محیط کشت حاوی ۱ mg/l هورمون TDZ، بهترین نتیجه را برای جنین‌زایی داشت. جنین‌های مناسب، برای باززایی گیاه به محیط کشت MS با پنج تیمار هورمونی منتقل شدند و نتایج نشان داد که محیط کشت حاوی ۲ mg/l هورمون BAP، بالاترین میزان باززایی گیاه سالم را داشته است. نوساقه‌های باززایی شده جهت ریشه‌زایی به محیط کشت MS با سه تیمار هورمونی منتقل شدند که اختلاف معنی‌داری بین این تیمارها وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: **باززایی گیاه، جنین سوماتیکی، رز رقم هفت رنگ (*Rosa hybrida*,. cv 'Tanbakeda').**

مقدمه

گل رز یکی از گیاهان زینتی مهم در دنیا و ایران محسوب می‌شود. این گیاه از مهمترین انواع گل‌های شاخه بریده و گلدانی بوده و ارزش تجاری بسیار بالایی در بین گیاهان زینتی دارد. اهمیت گل رز تا به آنجاست که گل شاخه بریده رز از لحاظ میزان تولید و ارزش اقتصادی، در بین تمام گل‌های شاخه بریده، جایگاه نخست را به خود اختصاص داده است. به همین دلیل امروزه کشت بافت، ریزازدیادی و انتقال ژن در این گیاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بر اساس مطالعات انجام شده دستورالعمل عمومی و غیروابسته به ژنوتیپ در ارتباط با گیاه زینتی رز، برای تولید کالوس و کالوس‌های جنین‌زا تاکنون گزارش نشده است، این درحالی است که کالوس‌های جنین‌زا بهترین ریزنمونه

* نویسنده مسئول: مختار جلالی جواران
E-mail: Jalali.mokhtar@gmail.com

برای انتقال ژن و باززایی گیاه معرفی شده‌اند (Firoozabady et al., 1994; Rout et al., 1991; Van der salm et al., 1996). به طور کلی درصد باززایی کامل گیاه از کالوس‌های جنین‌زا بسیار پایین بوده و در آزمایش‌های مختلف، بالاترین درصد، ۳۷٪ ذکر شده است (Firoozabady et al., 1994; Noriega et al., 1991; Van der salm et al., 1996)، همچنین در انتخاب ریزنمونه‌های اولیه برای کالوس‌زایی تنوع زیادی وجود دارد و به طورکلی کالوس‌زایی با استفاده از برگ‌های گیاهان درون‌شیشه‌ای و برگ‌های گیاهان مزرعه‌ای و گلخانه‌ای و میان گره‌های ساقه و ریشه‌های تولید شده در شرایط درون‌شیشه‌ای و گلبرگ‌ها و میله پرچم گیاهان، گزارش شده است (Korban, 2005; Zakizadeh et al., 2008; Murali et al., 1996; Kintzios et al., 1999; Rout et al., 1991; Van der salm et al., 1996). اکثر گزارش‌ها نشان دادند که استفاده از انواع اکسین در تولید کالوس از برگ‌های درون‌شیشه‌ای مؤثر بوده است، و در این گزارش‌ها به کار بردن غلظت‌های متنوعی از هورمون 2,4-D[1] در تولید کالوس اشاره شده است (Hsia et al., 1996; Zakizadeh et al., 2008). نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف در مورد تولید جنین نشان می‌دهد که استفاده از هورمون BAP[2] به همراه هورمون NAA[3] در تولید کالوس‌های جنین‌زا مؤثر بوده است (Firoozabady et al., 1994; Rout et al., 1991). همچنین در برخی گزارش‌ها به کار بردن هورمون‌های نظیر GA_3[4] و 2,4-D و Zeatin در روند تولید کالوس‌های جنین‌زا نقش به سزایی داشته است (Noriega et al., 1991; Van der salm et al., 1996). باززایی گیاه کامل رز از کالوس‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۹۷ گزارش شده است (Hill, 1997). باززایی گیاه از جنین یا کالوس معمولاً با استفاده از یک محیط کشت واحد امکان‌پذیر نیست و به محیط کشت دومی نیاز است (Zakizadeh et al., 2008). در بیشتر گزارش‌ها ارائه شده تاکنون محیط کشت به کار رفته برای باززایی گیاه، محیط پایه MS[5] بوده است (Kunitak et al., 1993; Marchant et al., 1996; Kintzios et al., 1999; Kintzios et al., 2000; Dohm et al., 2001; Kim et al., 2003). نتایج حاصل از بسیاری گزارش‌ها نشان می‌دهد که به کار بردن هورمون BAP به همراه اکسین‌هایی نظیر IAA[6] و IBA[7] بهترین ترکیب برای باززایی گیاه بوده است (Marchant et al., 1996; Van der salm et al., 1996; Kintzios et al., 1999; Kintzios et al.,2000; Dohm et al., 2001). همچنین در پژوهشی از هورمون BAP به تنهایی برای باززایی گیاه استفاده شده است (Kim et al., 2003). در بعضی از گزارش‌ها از هورمون GA_3 برای باززایی گیاه استفاده شده است (Rout et al., 1991; Kim et al., 2003).

به طور کلی با توجه به اهمیت این گیاه زینتی و لزوم دستیابی به ارقام جدید، تولید جنین‌های سوماتیکی که تنها ریزنمونه قابل استفاده در روش‌های انتقال ژن (به ویژه روش آگروباکتریوم) و باززایی گیاهان تراریخته رز است، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. لذا در این تحقیق سعی بر آن شده که دستورالعملی به منظور تولید هر چه بهتر کالوس و سپس تولید جنین‌های سوماتیکی از کالوس و تولید گیاه کامل از جنین‌های سوماتیکی ارائه شود.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی کردن نمونه‌ها

برای بررسی کالوس‌زایی، جوانه‌های جانبی رز هفت رنگ رشد یافته در شرایط باغ، تهیه و ضدعفونی گردیدند. برای ضدعفونی، ابتدا نمونه‌ها زیر آب جاری به مدت یک ساعت شستشو داده شدند و سپس در آب حاوی چند قطره مایع ظرف‌شویی روی شیکر به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. در مرحله بعد، نمونه‌ها در محلول سفیدکننده خانگی با ۵٪ کلر فعال به مدت ۱۵ دقیقه غوطه ور شدند. بعد از این مرحله، نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در محلول سفیدکننده خانگی با ۳٪ کلر فعال به مدت ۱۵

1. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2. 6-benzylaminopurine
3. 1-naphthaleneacetic acid
4. Gibberellic Acid
5. Murashige and Skoog, 1962
6. 3-indol-3-acetic acid
7. Indole Butiric Acid

دقیقه ضد عفونی شدند و در مرحله آخر ۳ مرتبه با آب استریل به ترتیب به مدت ۱ و ۳ و ۵ دقیقه آب‌کشی انجام شدند. مواد گیاهی ضدعفونی شده، در محیط کشت MS حاوی ۰/۰۹۶mg/l آهن (FeEDDHA) و بدون هورمون کشت و پس از ۳۰ روز، در باز کشت اول به همان محیط کشت قبلی حاوی ۲ mg/l هورمون BAP و ۰/۵ mg/l هورمون NAA منتقل شدند (شکل ۱a).

مرحله تولید کالوس

وقتی جوانه‌ها به اندازه کافی رشد کرده و برگ‌ها به اندازه مناسب رسیدند (در روز ۲۸ تا ۳۰)، برگ‌های سه برگچه‌ای جدا شدند. روی ریزنمونه‌های برگی خراش‌هایی به صورت عرضی ایجاد شد، به طوری که این شیارها از رگبرگ میانی اصلی عبور کنند. سپس نمونه‌ها در پتری‌دیش‌های یکبار مصرف (به قطر ۱۰ سانتی‌متر) در محیط کشت‌های MS و B5 شامل تیمارهای هورمونی مندرج در جدول‌های ۱ و ۲ کشت شدند (شکل ۱b) و کشت‌ها با هدف کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند و سپس یادداشت‌برداری لازم برای صفات مورد

جدول ۱- تیمارهای هورمونی محیط کالوس‌زایی رز در محیط کشت B5 (mg/l)

شماره تیمار	2,4-D	هورمون NAA	KIN	شماره تیمار	2,4-D	هورمون NAA	KIN
۱	۰/۵	-	-	۹	۰/۵	۲/۵	۰/۵
۲	۱	-	-	۱۰	۰/۵	۲/۵	۱/۵
۳	۲	-	-	۱۱	۲	۱/۵	۲
۴	۳	-	-	۱۲	۲	۱/۵	۰/۵
۵	۴	-	-	۱۳	۲	۱/۵	۱/۵
۶	۵	-	-	۱۴	۱/۵	۲/۵	۰/۵
۷	۶	-	-	۱۵	۱/۵	۲/۵	۱/۵
۸	۰/۵	۲/۵	۲	۱۶	۱/۵	۲/۵	۲

جدول ۲- تیمارهای هورمونی کالوس‌زایی رز در محیط کشت MS (mg/l)

شماره تیمار	هورمون 2,4-D	NAA	شماره تیمار	2,4-D	هورمون NAA	KIN
۱	۲	-	۲۰	۴	۲	-
۲	۴	-	۲۱	۵	۰/۵	-
۳	۶	-	۲۲	۵	۱	-
۴	۸	-	۲۳	۵	۲	-
۵	۱۰	-	۲۴	۶	۰/۵	-
۶	۵	-	۲۵	۶	۱	-
۷	۱۲/۵	-	۲۶	۶	۲	-
۸	۱۵	-	۲۷	۲	-	۰/۵
۹	۱۷/۵	-	۲۸	۲	-	۱
۱۰	۲۰	-	۲۹	۲	-	۲
۱۱	۲۵	-	۳۰	۳	-	۰/۵
۱۲	۲	۰/۵	۳۱	۳	-	۱
۱۳	۲	۱	۳۲	۳	-	۲
۱۴	۲	۲	۳۳	۴	-	۰/۵
۱۵	۳	۰/۵	۳۴	۴	-	۱
۱۶	۳	۱	۳۵	۴	-	۲
۱۷	۳	۲	۳۶	۵	-	۰/۵
۱۸	۴	۰/۵	۳۷	۵	-	۱
۱۹	۴	۱	۳۸	۵	-	۲

مطالعه شامل: درصد کالوس‌زایی، اندازه کالوس، رنگ کالوس و کیفیت کالوس انجام شد. به این ترتیب که مقدار تولید کالوس برحسب میانگین هر تیمار محاسبه شده و سپس به صورت درصد در آمده است. صفت اندازه کالوس بر حسب میلی‌متر با استفاده از کاغذ شطرنجی اندازه‌گیری شد. دو صفت رنگ کالوس و کیفیت کالوس که صفت‌های کیفی هستند بر اساس گروه‌بندی تعیین شده و سپس برای آنالیز آماری برای هر گروه درجه‌بندی مشخصی در نظر گرفته شده است. کالوس‌های به دست آمده از محیط کشت حاوی ۲ mg/l هورمون 2,4-D و ۰/۵ mg/l هورمون NAA انتخاب شده و به مدت ۱ ماه در همان محیط کشت جدید (حاوی ۳ mg/l هورمون 2,4-D و ۰/۵mg/l هورمون NAA) در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C بازکشت شدند.

مرحله تولید جنین‌های سوماتیکی

در مرحله بعد کالوس‌هایی که به اندازه مناسب برای جنین‌زایی رسیده بودند، انتخاب شده و به محیط‌های کشت جنین‌زایی سوماتیکی شامل هشت تیمار هورمونی متفاوت در محیط کشت MS منتقل شده و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C به مدت ۴۵ روز نگهداری شدند (جدول ۳).

جدول ۳- تیمارهای هورمونی جنین‌زایی سوماتیکی در محیط کشت MS (mg/l)

شماره تیمار	TDZ[1]	هورمون GA_3	BAP
۱	۰	۰	۰
۲	۰/۵	۰	۰
۳	۱	۰	۰
۴	۲	۰	۰
۵	۰	۱	۰/۵
۶	۰	۳	۰/۵
۷	۰	۰/۵	۱
۸	۰	۰/۵	۳

مرحله باززایی جنین‌های سوماتیکی

جنین‌های سوماتیکی به دست آمده به منظور تولید نوساقه به ۵ تیمار مختلف محیط کشت (جدول ۴)، منتقل شدند.

1. Thidiazuron

جدول ۴- تیمارهای هورمونی نوساقه‌زایی در محیط کشت MS (mg/l)

شماره تیمار	هورمون NAA	BAP
۱	۰	۱
۲	۰	۲
۳	۰	۳
۴	۰/۲	۱
۵	۰/۲	۲

مرحله ریشه‌زایی

در مرحله آخر، نوساقه‌های برگدار معمول جهت ریشه‌زایی به محیط‌های کشت ریشه‌زایی با سه تیمار هورمونی مختلف (جدول ۵) منتقل شدند.

جدول ۵- تیمارهای هورمونی ریشه‌زایی در محیط کشت MS (mg/l)

شماره تیمار	هورمون NAA	IAA
۱	۱	۰/۱
۲	۲	۰/۱
۳	۳	۰/۱

مرحله سازگاری با شرایط برون شیشه‌ای

بعد از ریشه‌زایی، گیاهچه‌های سالم به پرلایت استریل منتقل شدند و بعد از دو هفته سازگاری با شرایط برون‌شیشه‌ای، به گلدان‌های مناسب در گلخانه با ۱۶ ساعت روشنایی (دمای ۲۴°C) و هشت ساعت تاریکی (دمای ۱۸°C) انتقال یافتند.

آنالیز آماری

در آزمایش کالوس‌زایی شش نمونه برگی در هر پتری قرار گرفت که نمونه‌هایی که تولید کالوس کردند شمارش و به صورت درصد مشخص شدند. در آزمایش‌های تولید جنین‌های سوماتیکی چهار نمونه کالوس در هر پتری قرار داده شد که جنین‌های حاصل با استفاده از استرومیکروسکوپ مشخص و شمارش شدند و نتایج به صورت درصد محاسبه شدند. در مرحله نوساقه‌زایی چهار نمونه جنین‌دار روی محیط قرار گرفتند و درصد نمونه‌هایی که ساقه در آنها تولید شده به تفکیک ساقه‌های معمول و غیرمعمول مشخص شدند. در مرحله ریشه‌زایی ساقه‌های تولید شده معمول روی محیط ریشه‌زایی قرار گرفتند و گیاهچه‌های ریشه‌دار

شمارش و به صورت درصد محاسبه شدند. در تمام مراحل هر پتری به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد و ۴ پتری از هر تیمار در آنالیزهای آماری مورد محاسبه قرار داده شدند. تجزیه داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات در مرحله کالوس‌دهی با استفاده از نرم‌افزار SPSS13 انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها ازآزمون دانکن استفاده شد. برای تجزیه داده‌های کیفی از دو روش ناپارامتری Mann-withny و Kurskal-wallis استفاده شد که از روش Mann-withny برای تعیین وجود اختلاف بین تیمارها در صفات کیفی به صورت کلی (مقایسه همه تیمارها با هم) و از روش Kurskal-wallis برای مقایسه دو به دوی تیمارها برای تعیین گروه تیمارها استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری جنین‌زایی با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

جدول ۶- تجزیه واریانس صفات درصد کالوس‌دهی و اندازه کالوس در محیط کشت MS

منابع تغییرات	درصد کالوس‌زایی		اندازه کالوس‌ها	
	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات
ترکیب تیماری	۳۷	۸/۱۹۱**	۳۷	۳/۳۹۵**
اشتباه	۲۰۸	۶/۰۸۰	۲۱۱	۱/۸۷۳

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۷- تجزیه واریانس صفات درصد کالوس‌دهی و اندازه کالوس‌ها در محیط کشت B5

منابع تغییرات	درصد کالوس‌زایی		اندازه کالوس‌ها	
	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات
ترکیب تیماری	۱۵	۳/۳۵۹**	۱۵	۱۰/۹۰۳**
اشتباه	۸۴	۱/۲۶۷	۸۲	۲/۵۹۲

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

نتایج

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس در مرحله کالوس‌زایی مشخص شد که بین تیمارهای هورمونی اعمال شده در دو صفت درصد کالوس‌دهی و اندازه کالوس در هر دو محیط کشت MS و B5 در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول‌های ۶ و ۷). بر اساس جداول مقایسه میانگین‌ها، تیمارهای هورمونی ۱۲و ۱۵ (که به ترتیب حاوی ۳ mg/l و۲ هورمون 2,4-D و ۰/۵ mg/l هورمون NAA) در محیط MS و تیمارهای هورمونی ۶ و ۹ (که به ترتیب محیط اول حاوی ۵ mg/l هورمون 2,4-D و محیط دوم حاوی ۰/۵ mg/l هورمون 2,4-D و ۲/۵ mg/l هورمون NAA و ۰/۵ mg/l هورمون کینتین) در محیط B5 به عنوان برترین محیط‌ها برای صفات درصد کالوس‌دهی و اندازه کالوس بر حسب میلی‌متر تعیین شدند (جدول‌های ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱).

بر اساس تجزیه داده‌های کیفی، در محیط کشت MS تیمار ۱۲ (حاوی ۲mg/l هورمون 2,4-D و ۰/۵mg/l هورمون NAA) و در محیط B5 تیمار هورمونی ۹ (حاوی ۰/۵mg/l هورمون 2,4-D و ۲/۵mg/l هورمون NAA و ۰/۵mg/l هورمون کینتین) برای دو صفت رنگ کالوس و کیفیت کالوس برترین تیمارها معرفی شدند. همچنین در مقایسه سایر تیمارها با تیمارهای برتر درمحیط MS، تیمارهای ۴ و ۱۳ و ۱۴ و ۱۵ و ۱۶ و ۱۷ و ۱۸ و ۱۹ و ۲۵ و ۲۶ در مقایسه با تیمار ۱۲ از لحاظ تولید رنگ کالوس اختلاف معنی‌دار نداشتند و با این تیمار در یک گروه قرار گرفتند. همچنین تیمارهای ۷ و ۱۳ و ۱۵ و ۱۶ و ۱۷ و ۱۸ و ۱۹ و ۳۲ و ۳۷ نیز در مقایسه با تیمار ۱۲ از نظر تولید کیفیت کالوس اختلاف معنی‌داری نداشتند و در یک گروه قرار گرفتند. در محیط B5 تیمارهای ۴ و ۵ در مقایسه با تیمار برتر ۹ اختلاف معنی‌داری نداشتند و از لحاظ تولید رنگ در یک گروه قرار گرفتند و بین تمام تیمارها از لحاظ تولید کیفیت کالوس اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ۸- مقایسه میانگین صفت درصد کالوس‌زایی در محیط کشت B5

شماره تیمار	میانگین تولید کالوس	شماره تیمار	میانگین تولید کالوس
۱	۲/۲۲ bc	۹	۴ a
۲	۲/۶۶ abc	۱۰	۱/۶۶ c
۳	۳/۵ ab	۱۱	۲/۶۶abc
۴	۳ abc	۱۲	۲/۶ abc
۵	۱/۸۳ c	۱۳	۲ bc
۶	۳/۸a	۱۴	۲/۲bc
۷	۱/۷۱ c	۱۵	۲/۱۶ bc
۸	۲/۵abc	۱۶	۱/۸c

جدول ۹- مقایسه میانگین صفت درصد کالوس‌زایی در محیط کشت MS

شماره تیمار	میانگین تولید کالوس	شماره تیمار	میانگین تولید کالوس
۱	۰/۷۳۲ a-d	۲۰	۰/۵۸۳۳ c-i
۲	۰/۵۰ e-k	۲۱	۰/۳۰۵۶ j-m
۳	۰/۳۸۱۰ h-m	۲۲	۰/۵۹۵۲ c-i
۴	۰/۲۶۶۷k-m	۲۳	۰/۴۰۴۸ h-l
۵	۰/۱۶۷۲ m	۲۴	۰/۵۰ e-k
۶	۰/۷۲۲۲ a-e	۲۵	۰/۴۰ h-l
۷	۰/۵۵۵۶ d-j	۲۶	۰/۳۳۳۳ i-m
۸	۰/۲۸۵۷ k-m	۲۷	۰/۴۴۴۴ g-l
۹	۰/۴۰۴۸ h-l	۲۸	۰/۴۱۶۷ h-l
۱۰	۰/۲۵۰۰ lm	۲۹	۰/۴۷۶۲f-l
۱۱	۰/۳۳۳۳ i-m	۳۰	۰/۲۶۶۷ k-m
۱۲	۰/۹۱۶۷ a	۳۱	۰/۴۱۶۷ h-l
۱۳	۰/۶۱۶۷ c-i	۳۲	۰/۲۷۷۸ k-m
۱۴	۰/۷۹۱۷ a-c	۳۳	۰/۵۴۴۸ d-j
۱۵	۰/۸۹۵۸ ab	۳۴	۰/۴۱۶۷ h-l
۱۶	۰/۶۱۹۰ c-h	۳۵	۰/۳۳۳۳ i-m
۱۷	۰/۶۶۶۷ c-g	۳۶	۰/۴۴۴۴ g-l
۱۸	۰/۶۹۰۵ b-f	۳۷	۰/۵۲۲۸ d-k
۱۹	۰/۵۰ e-k	۳۸	۰/۴۰۴۸ h-l

جدول ۱۰- مقایسه میانگین صفت اندازه کالوس در محیط کشت B5

شماره تیمار	اندازه کالوس (mm)	شماره تیمار	اندازه کالوس (mm)
۱	۲/۵۷ c	۹	۶/۵۶ a
۲	۳/۲۰ c	۱۰	۳/۰۴ c
۳	۳/۰۹ c	۱۱	۲/۵۳c
۴	۲/۹۹ c	۱۲	۲/۳۷ c
۵	۳/۶۳ bc	۱۳	۳/۸۹ bc
۶	۵/۶ab	۱۴	۱/۹۹c
۷	۴ bc	۱۵	۲/۵۱ c
۸	۳/۹۹bc	۱۶	۳/۳۶bc

جدول ۱۱- مقایسه میانگین صفت اندازه کالوس در محیط MS

شماره تیمار	میانگین اندازه کالوس (mm)	شماره تیمار	میانگین اندازه کالوس (mm)
۱	۲/۴۶ c-e	۲۰	۳/۱۲ b-e
۲	۲/۲۰ c-e	۲۱	۳/۲ b-e
۳	۲/۳۲ c-e	۲۲	۳/۴ a-e
۴	۱/۸۵ e	۲۳	۲/۹۷ c-e
۵	۲ de	۲۴	۲/۷۶۷ c-e
۶	۳/۵۱ a-e	۲۵	۲/۷۸۲c-e
۷	۲/۴۲ c-e	۲۶	۲/۱۵ c-e
۸	۲/۳۴ c-e	۲۷	۳/۸۴ a-d
۹	۲/۱۵۲c-e	۲۸	۲/۵۵ c-e
۱۰	۳/۰۸ b-e	۲۹	۲/۴۱c-e
۱۱	۲/۸۳ c-e	۳۰	۳/۹۳ a-c
۱۲	۴/۸۶ ab	۳۱	۳/۱۳ b-e
۱۳	۳/۰۲۲ c-e	۳۲	۲/۸۶ c-e
۱۴	۲/۷۶۳ c-e	۳۳	۲/۹۰ c-e
۱۵	۴/۹۸ a	۳۴	۲/۶۸c-e
۱۶	۲/۷۸۵ c-e	۳۵	۲/۴۹ c-e
۱۷	۳/۹۷a-c	۳۶	۳/۶۳ a-e
۱۸	۲/۶۷ c-e	۳۷	۲/۹۲ c-e
۱۹	۳/۰۲۴c-e	۳۸	۳/۰۷ b-e

به طور کلی رشد کالوس‌ها در ماه اول کم و به صورت پراکنده بود (شکل 1c)، به نحوی که بعد از انتقال به محیط جنین‌زایی تغییرات لازم در آنها دیده نشد. لذا همانطور که قبلاً اشاره شد کالوس‌ها برای مدت یک ماه دیگر به محیط کشت جدید با مقدار بیشتر هورمون اکسین منتقل شدند. سپس با انتقال کالوس‌هایی با اندازه مناسب (شکل 1d) به محیط کشت جنین‌زایی که فاقد اکسین و حاوی هورمون TDZ بود، رنگ کالوس‌ها تیره‌تر شده و همچنین سلول‌ها فشرده‌تر شدند. بعد از سه هفته از قرار دادن کالوس‌ها در محیط کشت جنین‌زایی، ساختارهای پیش جنین با سطح براق و کروی تشکیل شدند (شکل 1e). به طور کلی بعد از گذشت ۴۵ روز از انتقال کالوس‌ها به محیط کشت جنین‌زایی، ساختارهای پیش‌جنینی به جنین تبدیل شدند که رشد و نمو جنین‌ها کاملاً قابل تشخیص بود (شکل 1f).

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشخص شد که بین تیمارهای مختلف هورمونی از نظر تولید

جنین اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول۱۲). همچنین با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین تولید جنین در هر تیمار (جدول ۱۳) مشخص شد که تیمار T۳ (حاوی ۱mg/l هورمون TDZ) بالاترین میزان تولید جنین را داشته است.

جدول ۱۲- تجزیه واریانس صفت جنین‌زایی در کالوس‌های رز

منابع تغییرات	صفت تولید جنین	
	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۷	۲۷**
اشتباه	۳۲	۳۲

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۱۳- مقایسه میانگین صفت جنین‌زایی در کالوس‌های رز

تیمار محیط کشت	میانگین جنین‌زایی در تیمار
T۱	۰/۲ bc
T۲	۱/۲ abc
T۳	۲/۴ a
T۴	۱/۸ ab
T۵	۰/۶ bc
T۶	۱/۴ abc
T۷	۰ c
T۸	۰ c

نتایج حاصل از انتقال جنین‌ها به محیط‌های باززایی گیاه نشان داد که، اکثر نمونه‌های منتقل شده به محیط باززایی به صورت غیرمعمول رشد کردند (شکل ۱i). همچنین برخی از جنین‌ها بعد از انتقال به محیط باززایی گیاه حالت‌هایی از شیشه‌ای شدن از خود نشان دادند (شکل ۱h). اما برخی از نمونه‌های منتقل شده در محیط حاوی ۲mg/l هورمون BAP به صورت معمول رشد کردند به نحوی که بعد از گذشت ۱ ماه، برگ و ساقه در آنها کاملاً قابل تشخیص بودند (شکل ۱j). به دلیل معمول نبودن بسیاری از نمونه‌ها مقایسات میانگین بین تیمارها انجام نشد و فقط تیمار تولیدکننده گیاهان معمول که تیمار محیط کشت ۳ (حاوی ۲mg/l هورمون BAP) بود مشخص شد. گیاهچه‌های معمول تولید شده که به محیط کشت ریشه‌زایی منتقل شده بودند، تقریبا در تمام تیمارهای ریشه‌زایی، ریشه تولید کردند (شکل ۱k) و اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ریشه‌زایی وجود نداشت. بعد از تولید ریشه، گیاهچه‌های معمول به پرلایت منتقل شدند (شکل ۱l) و بعد از ۲ هفته سازگاری با شرایط برون شیشه‌ای به گلدان‌های مناسب در گلخانه با ۱۶ ساعت روشنایی (دمای ۲۴°C) و ۸ ساعت تاریکی (دمای ۱۸°C) انتقال یافتند.

بحث

گیاه رز امروزه یکی از مهمترین گیاهان زینتی است، به همین دلیل تحقیقات زیادی در ارتباط با اصلاح این گیاه و تولید رقم‌های جدید آن صورت می‌گیرد. اما به دلیل وجود سطوح پلوئیدی مختلف در این گیاه امکان استفاده از روش‌های کلاسیک اصلاحی همانند تلاقی محدود خواهد شد. لذا به نظر می‌رسد که یکی از بهترین روش‌ها در تولید ارقام جدید استفاده از فن‌آوری مهندسی ژنتیک از طریق انتقال ژن باشد و چون این گیاه مصرف خوراکی ندارد بسیاری از ملاحظات در زمینه انتقال ژن در ارتباط با این گیاه وجود نخواهد داشت. همچنین به دلیل دو لپه‌ای بودن این گیاه، استفاده از آگروباکتریوم در تحقیقات انتقال ژن بسیار شایع است. به همین دلیل در راستای بهره‌وری از روش‌های انتقال ژن با آگروباکتریوم نیاز به ریزنمونه اولیه با ویژگی‌های مناسب، برای تلقیح مطرح می‌شود. از میان تمام ویژگی‌های مورد بررسی، توانایی باززایی و تولید گیاه کامل از ریزنمونه اولیه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به نحوی که بعد از مراحل تلقیح، امکان باززایی گیاه تراریخته وجود داشته باشد. در ارتباط با گیاه زینتی رز، تاکنون گزارشی در ارتباط با باززایی مستقیم گیاهچه از برگ، لپه‌ها، ساقه، کالوس و دیگر قسمت‌های گیاه ارائه نشده است و مهمترین ریزنمونه برای باززایی کامل گیاه، جنین‌های سوماتیکی معرفی شده است. ولی تاکنون گزارشی از این موفقیت روی گیاه رز مینیاتوری رقم هفت رنگ گزارش نشده است.

در این تحقیق به منظور تولید کالوس‌های مناسب، غلظت‌های مختلفی از هورمون 2,4-D به کار گرفته شد، با توجه به اینکه نمی‌توان از تأثیر ژنوتیپ‌های مختلف بر میزان کالوس‌زایی صرف نظر کرد؛ این تحقیق نشان داد که استفاده از غلظت‌های زیاد این هورمون (۱۰mg/l به بالا) در تولید کالوس در این رقم رز مینیاتوری بی‌فایده

است. این در حالی است که گزارش‌ها نشان می‌دهد بالا رفتن غلظت این هورمون در رابطه با کالوس‌زایی بسیاری از ارقام رز مینیاتوری مؤثر بوده و تا ۱۰۰٪ تولید کالوس را به همراه داشته است (Zakizadeh et al., 2008). ریزنمونه‌های اولیه به منظور تولید کالوس در محیط‌های حاوی مقدار زیاد هورمون 2,4-D بعد از ۲ هفته سیاه شده و از بین رفتند. اما غلظت‌های پائین‌تر این هورمون، کالوس‌های مناسبی تولید کردند که برای مراحل بعدی این تحقیق به کار گرفته شدند. در تائید نتایج حاصل از این تحقیق، گزارش‌های دیگر نیز، افزایش مقدار هورمون 2,4-D را در تولید کالوس‌ها بی‌نتیجه دانستند (Van der salm et al., 1996; Li et al., 2002). به کار بردن غلظت‌های پائین از انواع هورمون‌های اکسین (IBA, IAA, NAA, 2,4-D) به تنهایی یا همراه با هورمون‌های سیتوکینن به طور موفق در تولید کالوس در بسیاری از ژنوتیپ‌های رز گزارش شده است (Derks et al., 1995; Arene et al., 1993; Rout et al.,1991; Noriega et al., 1991; Van der salm et al., 1996; Murali et al., 1996; Hsia et al., 1996; Dohm et al., 2001; Kintzios et al., 1999). همچنین در برخی گزارش‌ها به کار بردن غلظت‌های بالایی از این هورمون در تولید کالوس‌های مناسب، مؤثر بوده است (Zakizadeh et al., 2008; Li et al., 2002). اما تحقیق حاضر به کاربردن همزمان دو هورمون اکسین در غلظت کم را برای کالوس‌زایی مناسب دانست. همچنین نتایج حاصل نشان داد بالا رفتن غلظت هورمون 2,4-D، علاوه بر مقدار کالوس تولید شده بر کیفیت و رنگ کالوس‌ها هم اثر منفی داشته و منجر به شیشه‌ای شدن و کاهش فشردگی در سلول‌های کالوس شد و همچنین رنگ کالوس‌ها از کرم رنگ به قهوه‌ای متمایل شد که در مراحل بعد هیچ گونه جنین‌زایی در این کالوس‌ها مشاهده نشد. همانطور که قبلاً ذکر شد در روند تولید جنین‌های سوماتیکی از کالوس‌ها، کالوس‌های مناسب (فشرده و کرم رنگ با اندازه مناسب) به محیط کشت جدید حاوی هورمون TDZ و یا BAP به همراه GA_3 منتقل شدند، که استفاده از غلظت ۱mg/l هورمون TDZ بهترین نتایج را در تولید کالوس‌های جنین‌زا در پی داشت. این در حالی است که Zakizadeh et al. (2008) استفاده از غلظت‌های بالا هورمون TDZ (۵-۱۰mg/l) را در تولید کالوس‌های جنین‌زا مؤثر دانستند (Zakizadeh et al., 2008). نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که استفاده از هورمون TDZ نسبت به دیگر هورمون‌ها تأثیر بیشتری در جنین‌زایی سوماتیکی گیاه رز داشته است که ممکن است به خاطر پایداری بیشتر هورمون TDZ نسبت به سایر هورمون‌ها در بافت‌های گیاهی باشد(Mok et al., 2000). Li et al. (2002) با به کار بردن غلظت‌های متنوعی از هورمون TDZ (۰/۵-۱۰mg/l) نتایج خوبی را در جنین‌زایی سوماتیکی گیاه رز به دست آوردند. برخلاف گزارشی که در سال ۱۹۹۶ ادعا کرد بازکشت متوالی کالوس‌ها در همان محیط کشت اولیه حاوی اکسین منجر به تولید جنین‌های سوماتیکی خواهد شد (Marchant et al., 1996)، Zakizadeh et al. (2008) نشان دادند که باقی ماندن کالوس‌ها در همان محیط اولیه و بازکشت‌های متوالی تأثیری در تولید جنین‌های سوماتیکی نداشته و تنها منجر به قهوه‌ای شدن و در نتیجه از بین رفتن کالوس‌ها شده است و تنها با قرار گرفتن کالوس‌ها در محیط سیتوکینن دار جنین‌های سوماتیکی به وجود آمدند (Zakizadeh et al., 2008). به طور کلی به نظر می‌رسد که شروع تشکیل پیش جنین‌ها به صورت غیرقابل مشاهده از محیط‌های اولیه حاوی اکسین‌ها بوده و با انتقال این کالوس‌ها به محیط‌های کشت حاوی سیتوکینن، پیش جنین‌ها به جنین تبدیل شدند و تغییرات آنها کاملاً قابل مشاهده شدند، به طوری که با انتقال کالوس‌ها به محیط کشت حاوی غلظت‌های بالایی از هورمون TDZ به تنهایی و یا همراه با هورمون GA_3، میزان تولید جنین‌های سوماتیکی افزایش یافت (Hsia et al., 1996; Li et al., 2002). همچنین استفاده از محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های کم هورمون TDZ، نیز منجر به تولید جنین‌های سوماتیکی شد (Visessuwan et al., 1997). به طور کلی سه نوع از کالوس‌های جنین‌زا در نمونه‌های رز مشاهده شده‌اند: ۱) کالوس‌های کاملا فشرده زرد رنگ، ۲) کالوس‌های ترد و شکننده زرد رنگ، ۳) کالوس‌های ترد و شکننده سفید رنگ (که به نظر می‌رسد در اثر بازکشت‌های متوالی کالوس‌های نوع اول به دست آمدند). نتایج

بسیاری از گزارش‌ها نشان دادند که کالوس‌های ترد و شکننده در مراحل بعدی به صورت غیر معمول رشد خواهند کرد (Zakizadeh et al., 2008). به همین علت این نوع از کالوس‌ها در این مرحله از آزمایش حذف شده و به مراحل بعدی، منتقل نشدند. نتایج گزارشی نشان داده بود که کالوس‌هایی با میزان آب بالا در مراحل بعدی ساقه‌های غیرمعمول ایجاد خواهند کرد (Visessuwan et al., 1997)، که این گونه کالوس‌ها معمولاً در اثر به کار بردن غلظت بالایی از انواع هورمون‌ها به دست آمدند (Jimenez, 2005). همچنین به نظر می‌رسد که رشد غیرمعمول در تمامی ژنوتیپ‌های رز گزارش شده و تقریباً اجتناب‌ناپذیر بوده است (Dohm et al., 1997). در بسیاری از گزارش‌ها ارائه شده تاکنون محققین جنین‌های سوماتیکی را برای یک مرحله بلوغ به محیط حاوی هورمون ABA منتقل کردند که به نظر می‌رسد حضور هورمون ABA در بلوغ جنین‌ها و سازگاری آنها با استرس مؤثر است، اما مکانیسم‌های مولکولی و بیوشیمیایی این تغییرات تاکنون به طور کامل شناخته نشده‌اند (Noriega et al., 1991; Marchant et al., 1996; Murali et al., 1996; Li et al; 2002). اما در این تحقیق کالوس‌ها بعد از تولید جنین‌های سوماتیکی مستقیماً به محیط باززایی نوساقه منتقل شدند تا گیاه کامل تولید کنند. به طور کلی در این مرحله دو نوع ساقه معمول و غیرمعمول مشاهده شد. Zakizadeh et al. (2008) بعد از انتقال جنین‌های سوماتیکی به محیط کشت حاوی NAA ۰/۲mg/l و ۴mg/l BAP توانستند تا ۷۰٪ ساقه‌های معمول تولید نمایند. در گزارش دیگری ۱۲٪ ساقه‌های معمول در *R . hybrida* با استفاده از محیط MS حاوی ۰/۵ BAP و ۰/۱ GA_3 به دست آمد (Rout et al., 1991). همچنین گزارش‌های زیادی به کار بردن هورمون BAP را نشان دادند (Marchant et al., 1995; Kintozios et al., 1999; Visessuwan et al., 1997). به طور کلی حضور هورمون BAP در بسیاری از گیاهان برای تقسیم سلولی، رشد جوانه‌های جانبی، رشد سطح برگ، جوانه‌زنی بذر و ... مؤثر دانسته شده است (Mok et al., 2000). در این تحقیق نیز هورمون BAP نقش اساسی در رشد گیاه و ساقه‌ها داشت. البته این نکته حائز اهمیت است که ایجاد تعادل هورمونی برای رشد معمول ساقه‌ها مورد نیاز است. همچنین به نظر می‌رسد که استفاده از غلظت‌های بالای هورمون BAP باعث کاهش سرعت جوانه‌زنی و نمو در جنین‌های سوماتیکی شده است (Marchant et al., 1996). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از ۲mg/l هورمون BAP در ساقه‌دهی جنین‌ها بسیار مؤثر بود. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده و گزارش‌های ارائه شده تاکنون به نظر می‌رسد حضور هورمون BAP برای جوانه‌زنی جنین‌ها و رشد ساقه‌ها در جنین‌های سوماتیکی ضروری است. همچنین نقش هورمون GA_3 در بسیاری از گونه‌های گیاهی به عنوان شروع‌کننده جوانه‌زنی با غلبه بر خواب بذر عنوان شده است، همچنین گفته شده که اثر مثبتی در رشد ساقه‌ها دارد (Davies, 1995)، در حالی که جنین‌های سوماتیکی دارای خواب نیستند (Dodeman et al., 1997; Feher et al., 2003). بنابراین حضور هورمون GA_3 برای جنین‌زایی در جنین‌های سوماتیکی که دارای مرحله خواب نیستند ضروری به نظر نمی‌رسد. اما همانطور که بسیاری از گزارش‌ها حضور این هورمون را در این مرحله مفید دانستند، ممکن است در رشد ساقه‌ها اثرگذار باشد (Zakizadeh et al., 2008). تقریباً تمامی گزارش‌هایی که تا کنون ارائه شده نشان می‌دهند که در مرحله ریشه‌زایی گیاهچه‌ها حضور انواع اکسین‌ها نتایج خوبی را در بر خواهد داشت (Zakizadeh et al., 2008). نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد حضور هورمون‌های اکسین در ریشه‌زایی بسیار مؤثر بود.

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق دستورالعمل مناسب در جهت تولید جنین‌های سوماتیکی از کالوس‌های این رقم رز مینیاتوری و در ادامه باززایی گیاهان معمول از جنین‌های سوماتیکی است که از این دستورالعمل می‌توان در دیگر کارهای اصلاحی، به خصوص روش‌های مهندسی ژنتیک بهره برد. از جمله مهمترین روش‌های مهندسی ژنتیک انتقال ژن است، که جنین‌های سوماتیکی ریزنمونه اصلی برای تلقیح با اگروباکتریوم و همچنین تفنگ ژنی معرفی شدند. همچنین باززایی گیاه کامل از جنین‌های سوماتیکی اصلی‌ترین مرحله در تولید گیاهان تراریخته خواهد بود.

شکل ۱- a: رشد جوانه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای، b: قرار گرفتن برگ‌ها در محیط کشت کالوس‌زایی، c: رشد کالوس‌ها در ماه اول، d: رشد کالوس‌ها در ماه دوم، e: تشکیل ساختارهای پیش جنینی کاملاً کروی با سطوح براق، f: رشد پیش جنین‌ها و تشکیل ساختارهای جنینی، g: باززایی جنین‌ها، h: شیشه‌ای شدن جنین‌ها در محیط کشت باززایی، i: رشد گیاهچه به صورت غیرمعمول، j: رشد گیاهچه‌ها به صورت معمول k : تولید ریشه در گیاهچه‌های رشد کرده، l: انتقال گیاهچه‌های کامل به گلدان.

REFERENCES

1. Arene, L., Pellegrino, C. & Gudin, S. A. (1993). Comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida L cv* Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues. *Euphytica*, 71, 83 – 90.
2. Davies, P. J. (1995). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: Davies, P. J. (Ed) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. Kluwer, Dordrecht, pp 1–12.
3. Derks, F. H. M., Dijk, A. J., Van Hänisch Ten Cate, C. H., Florack, D. E. A., Dubois, L. A. M. & de Vries D. P. (1995). Prolongation of vase life of cut roses via introduction of genes coding for antibacterial activity, somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation, *Acta Horticultureae*, 405, 205-209.
4. Dodeman, V. L., Ducreux, G. & Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48, 1493-1509.
5. Dohm, A., Ludwig, C., Nehring, K. & Debener, T. (2001). Somatic embryogenesis in roses. *Acta Horticultureae*, 547, 341– 7.
6. Feher, A., Pasternak, T. P. & Dudits, D. (2003) . Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 74, 201-228.

7. Firoozabady, E., Moy, Y., Courtney-Gutterson, N. & Robinson, K. (1994). Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue. *Biotechnology*, 12, 609-613.
8. Hill, G. P. (1967). Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose. *Nature*, 216, 596-7.
9. Hsia, C. & Korban, S. S. (1996). Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis* minima. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 44, 1-6.
10. Kim, C. K., Chung, J. D., Jee, S. K. & Oh, J. Y. (2003). Somatic embryogenesis from *in vitro* grown leaf explants of *Rosa hybrida* L. *Journal of Plant Biotechnology*, 5, 161-4.
11. Kintzios, S., Manos, C. & Makri, O. (1999). Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa sp*.). *Plant Cell Reports*, 18, 467-472
12. Korban, S. S. (2005). Somatic Embryogenesis in Rose:Gene Expression and Genetic Transformation *Plant Cell Monogr*, (2), 247-257.
13. Kunitake, H., Imamizo, H. & Mii, M. (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rose (*Rosa rugosa Thunb*). *Plant Science*, 90, 187-94.
14. Li, X., Krasnyanski, S. & Korban, S. S. (2002). Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa. Journal of Plant Physiology*, 159, 313-319.
15. Marchant, R., Davey, M. R., Lucas, J. A. & Power, J. B. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration in Floribunda rose (*Rosa hybrida* L.) cvs Trumpeter and Glad Tidings. *Plant Science*, 120, 95-05.
16. Mok, M. C., Martin, R. C. & Mok, D. W. S. (2000). Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. In vitro cell. *Plant Biology*, 36, 102-107.
17. Murali, S., Sreedhar, D. & Lokeswari, T. S. (1996). Regeneration through somatic embryogenesis in *Rosa hybrida L cv Arizona I hybrid tea*, *Euphytica*, 91, 271-5.
18. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15, 472–497.
19. Noriega, C. & Sondahl, M. R. (1991). Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. *Biotechnology*, 9, 991–993.
20. Rout, G. R., Debata, B. K. & Das, P. (1991). Somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 27, 65–69.
21. Van der Salm, T. P. M., van der Toorn, C. J. G., Hanischten cate, C. H. & Dons, H. J. M. (1996). Somatic embryogenesis and shoot regeneration from excised adventitious roots of the rootstock *Rosa hybrida* cv. Money Way. *Plant Cell Reports*, 15, 522–526.
22. Visessuwan, R., Kawai, T. & Mii, M. (1997). Plant regeneration systems from leaf segment culture through embryogenic callus formation of *Rosa hybrida* and *R. canina*. *Breeding Science*, 47, 217-222.
23. Zakizadeh, H., Debnea, T., Sriskandarajah, S., Frello, S. & Serek, M. (2008). Regeneration of Miniature Potted Rose (*Rosa hybrida* L.) via somatic Embryogenesis. *European Journal of Horticultural Science*, 73(3), 111-117.