

Evaluation of hormone content in transgenic rose (*Rosa hybrida* L.) with *etr1-1* gene treated by ethylene and gibberellin

Faezeh Khatami

*Corresponding author. Ph.D. Student, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, P.O. Box: 1571914911, Tehran, Iran. Email: std_khatami@khu.ac.ir

Farzaneh Najafi 

Associate Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, P.O. Box: 1571914911, Tehran, Iran. Email: najafi_f@khu.ac.ir

Fataneh Yari 

Assistant Professor, Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology, P.O. Box: 33535111, Tehran, Iran. Email: f.yari@irost.ir

Ramazan Ali Khavari-Nejad 

Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. Email: ra.khavarinejad@gmail.com

Abstract

Objective

Roses are one of the most important cut flowers in the world and therefore many studies have focused on keeping post-harvest quality and longevity. Ethylene is one of the major factors that limits post-harvest longevity. Therefore, genetic manipulation has been considered to reduce the adverse effects of this hormone and the present research investigates transgenic roses containing the mutant *etr1-1* gene. In addition, according to antagonist effects, the change of gibberellin concentration to ethylene in favor of higher gibberellin concentration in the present research has been studied.

Materials and methods

The content of phytohormones in long-lasting line (transgenic) and control (non-transgenic) after application of ethylene (0 and 1 $\mu\text{L L}^{-1}$) and gibberellin (80 mg L^{-1}) treatments were investigated in bud and half-open stages. Application of ethylene treatment was performed by injecting pure gas into polyethylene bags by syringe. For the application of gibberellin treatment, cut flowers were placed in gibberellin solution at the desired concentration. The treatments were applied for 24 hours and samples were taken from the outermost ring of petals. Experiments were conducted as factorial in a completely randomized design with four replications in order to measure phytohormones.

Results

The results showed a decrease in the amount of gibberellin, benzyl adenine and indole acetic acid hormones and an increase in the amount of abscisic acid and ethylene hormones in bud and half-open stages in long-lasting line were significant compared to the control. In addition, the highest content of gibberellin, indole acetic acid and benzyl adenine hormones and the lowest content of ethylene and abscisic acid belongs to the GA₃-treated long-lasting line.

Conclusion

Therefore, *etr1-1* gene appears to be the right candidate for delaying ethylene-dependent aging in sensitive flowers and with GA₃ treatment could be considerably improved longevity by reduction of oxidative damage.

Key words: Cut rose, Ethylene, Genetic manipulation, Gibberellin.

Citation: Khatami F, Najafi F, Yari F, Khavari-Nejad RA (2020) Evaluation of hormone content in transgenic rose (*Rosa hybrida* L.) with *etr1-1* gene treated by ethylene and gibberellin. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (2), 1-20.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (2), 1-20.

DOI: 10.22103/jab.2020.14982.1181

Received: January 30, 2020; Accepted March 7, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

بررسی میزان هورمون‌های گل سرخ تراریخته با ژن *etr1-1* تحت تیمارهای اتیلن و

جیبرلین

فائزه خاتمی

*نویسنده مسئول: دانشجوی دکتری، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کدپستی: ۱۵۷۱۹۱۴۹۱۱، تهران،

ایران. ایمیل: std_khatami@khu.ac.ir

فرزانه نجفی

دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کدپستی: ۱۵۷۱۹۱۴۹۱۱، تهران، ایران. ایمیل:

najafi_f@khu.ac.ir

فتانه یاری

استادیار، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، کدپستی: ۳۳۵۳۵۱۱۱، تهران، ایران. ایمیل:

f.yari@irost.ir

رمضانعلی خاوری‌نژاد

استاد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کدپستی: ۱۵۷۱۹۱۴۹۱۱، تهران، ایران. ایمیل:

ra.khavarinejad@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۷

چکیده

هدف: گل سرخ از مهم‌ترین گل‌های شاخه بریده دنیا بوده که تا کنون مطالعات زیادی برای حفظ کیفیت و ماندگاری پس از برداشت آن انجام شده است. از عوامل اصلی محدود کننده ماندگاری در مرحله پس از برداشت می‌توان به هورمون اتیلن اشاره نمود. لذا دست‌ورزی ژنتیکی به منظور کاهش اثرات نامطلوب این هورمون مورد توجه بوده و در پژوهش حاضر، گل‌های سرخ تراریخته حاوی ژن جهش‌یافته *etr1-1* مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین با توجه به اثرات آنتاگونیستی، تغییر غلظت هورمون جیبرلین نسبت به اتیلن به نفع بالاتر بردن غلظت جیبرلین در مطالعه اخیر مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: میزان فیتوهورمون‌های لاین ماندگار (تراریخته) و شاهد (غیر تراریخته) پس از اعمال تیمارهای اتیلن (صفر و L⁻¹ ۱ μL و جیبرلین (۸۰ mg L⁻¹) در مراحل غنچه تجاری و نیمه باز بررسی شدند. اعمال تیمار اتیلن با تزریق گاز خالص به داخل کیسه‌های پلی‌اتیلنی توسط سرنگ انجام شد. جهت اعمال تیمار جیبرلین، گل‌های شاخه بریده در محلول جیبرلین با غلظت مورد نظر قرار داده شدند. تیمارها به مدت ۲۴ ساعت اعمال گردید و نمونه‌برداری از بیرونی‌ترین ردیف گلبرگ‌ها انجام شد. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار به منظور اندازه‌گیری میزان فیتوهورمون‌ها اجرا شد.

نتایج: نتایج نشان داد که کاهش در میزان هورمون‌های جیبرلین، بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید و افزایش در میزان هورمون آبسزیک اسید و اتیلن در مراحل غنچه و نیمه‌باز در لاین ماندگار نسبت به شاهد معنی‌دار بود. همچنین، بیشترین میزان هورمون‌های جیبرلین، بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید و کمترین میزان اتیلن و آبسزیک اسید مربوط به لاین ماندگار در تیمار با جیبرلین بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج موجود به نظر می‌رسد که ژن *etr1-1* می‌تواند کاندیدای مناسبی، جهت به تأخیر انداختن فرایند پیری وابسته به اتیلن در گل‌های حساس باشد که همراه با تیمار جیبرلین از طریق کاهش خسارت اکسیداتیو ماندگاری را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد.

کلید واژه‌ها: اتیلن، جیبرلین، دست‌ورزی ژنتیکی، گل سرخ شاخه بریده.

مقدمه

پیری گل‌های سرخ شاخه بریده توسط عوامل متعددی تنظیم می‌شود که با دست‌ورزی هر کدام از این عوامل می‌توان طول عمر را تا حدودی تنظیم نمود و از این طریق ماندگاری آن‌ها را افزایش داد. عمر گلدانی از زمان برداشت گل تا ظهور یکی از علائم پیری در گل اعم از خمیدگی گردن، ریزش گلبرگ‌ها، سیاه‌شدگی و از دست دادن تورژسانس گلبرگ‌ها با واحد روز بیان می‌شود (Hassan 2014). از عوامل اصلی محدود کننده ماندگاری در مرحله پس از برداشت می‌توان به هورمون اتیلن اشاره نمود. لذا دست‌ورزی‌های ژنتیکی در مسیرهای بیوستتزی و پیام‌رسانی اتیلن به‌منظور کاهش اثرات نامطلوب این هورمون مورد توجه بوده است. در حال حاضر مسیر بیوستتزی اتیلن و چرخه یانگ در گیاهان عالی به تفصیل بررسی شده است (Yang and Hoffman 1984). بر اساس این چرخه، اتیلن از اسید آمینه متیونین به کمک آنزیم‌های ۱-آمینو سیکلو پروپان ۱-کربوکسیلیک اسید سنتاز و ACC اکسیداز سنتز می‌گردد. پس از سنتز، مولکول گازی اتیلن توسط پذیرنده‌های پروتئینی موجود در شبکه آندوپلاسمی سلول گیاهی دریافت و سپس رونویسی و ترجمه ژن‌های پایین دست فعال می‌شود (Iqbal et al. 2017; Kim et al. 2011). در پی فعالیت این ژن‌ها، پیری و مرگ سلول و اندام‌های گیاهی مشاهده می‌گردد (Rani and Singh 2014).

به طور خلاصه، پاسخ به اتیلن توسط یک خانواده پنج عضوی شامل ETR1^۱، ETR2، ERS1^۲، ERS2 و EIN4^۳ هدایت می‌گردد (Rani and Singh 2014; Schmitzer et al. 2010). این پذیرنده‌ها مشابه پذیرنده‌های هیستیدین کینازی "دوجزئی" در پروکاریوت‌ها می‌باشند و از لحاظ ساختاری به دو زیر خانواده یک (ETR1 و ERS1) و دو (ETR2، ERS2) و EIN4 تقسیم می‌گردند. در مسیر مطالعات انجام شده مربوط به پیام رسانی اتیلن، ابتدا انتقال ژن جهش یافته *etr1-1* به گیاه مدل *Arabidopsis* انجام شد و تقریباً گیاهان تراریخته حاصل به طور کامل نسبت به اتیلن غیرحساس شدند (Chang et al. 1999; Bovy et al. 1993). علاوه بر این، با انتقال ژن جهش یافته *etr1-1* از گیاه مدل *Arabidopsis* به بسیاری از گل‌های زینتی همچون اطلسی، میخک، گل استکانی و کالانکوه کاهش حساسیت به اتیلن و افزایش ماندگاری گیاهان تراریخته مشاهده شد (Sanikhani et al. 2008; Sriskandarajah et al. 2010; Bovy 1999; Gubrium et al. 2000). ابتدا از پیشبر عمومی یا همه جایی *CaMV35S*، برای انتقال ژن جهش یافته *etr1-1* استفاده کردند که علاوه بر کاهش حساسیت به اتیلن، سبب کاهش تشکیل ریشه‌های نابه‌جا در گیاهان تراریخته نیز گردید. ریشه‌زایی ضعیف در گیاهان تراریخته، تکثیر و نگهداری آن‌ها را با مشکل روبرو ساخت. بنابراین برای افزایش ماندگاری بدون اثرات جانبی از پیشبر بافت اختصاصی گل، *fbp1*، استفاده کردند. چرا که این پیشبر منجر به بیان ژن جهش یافته *etr1-1* به طور انحصاری در گل گردید. همچنین سایر ژن‌های مسیر پیام رسانی اتیلن نیز نقش مهمی در پیشبرد فرآیند پیری ایفا می‌کنند. در این راستا، مشاهده شد که گیاهان تراریخته *Arabidopsis* با ژن جهش یافته *EIN2*، توانایی پاسخ به هورمون اتیلن را نداشتند (Mou and Scorza 2011). در عین حال تراریختی برخی گیاهان همچون گل داوودی با دیگر پذیرنده‌های اتیلن نظیر ژن جهش یافته *ERS* نیز انجام شده است (Netam 2018). اگرچه گیاهان تراریخته مذکور نسبت به اتیلن واکنش کم‌تری نشان داده‌اند، اما این کاهش در مقایسه با گیاهان تراریخته با ژن *etr1-1* چشمگیر نبوده است (Iqbal et al. 2017; Olsen et al. 2015). بنابراین به نظر می‌رسد در مسیر ترارسانی پیام اتیلن، پذیرنده *ETR1* جهت دست‌ورزی ژنتیکی به منظور افزایش ماندگاری گل‌های حساس به اتیلن ضروری و کافی باشد. علاوه بر این، گزارش شده است که شکوفایی گل‌ها توسط هورمون‌های اتیلن و جیبرلین بصورت آنتاگونیستی تنظیم می‌گردد. به گونه‌ای که، کاربرد پس از برداشت *GA₃*، (رایج‌ترین نوع جیبرلین‌ها)، ماندگاری گیاهان زینتی همچون ساندروسونیا، آلسترومریا، داوودی، ژربرا، گلابول، لاله و گل سرخ را از طریق کاهش بیوسنتز اتیلن افزایش می‌دهد (Emongor 2004; Ma et al. 2018). گزارش شده است که جیبرلین‌ها، با کاهش فعالیت پروتئازها، از تجزیه‌ی پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند. همچنین، با جلوگیری از افزایش pH سلولی و نشست یون‌ها و حفظ انسجام غشای سلول موجب تأخیر در فرآیند پیری می‌شوند. جیبرلین‌ها با افزایش هیدرولیز نشاسته و ساکارز به قندهای ساده همچون گلوکز و فروکتوز، سبب باز شدن گل‌ها و تأخیر در ریزش، تغییر

۱. Ethylene Receptor1
۲. Ethylene Response Sensor 1
۳. Ethylene Insensitive4
۴. Floral binding protein

رنگ و پیری گلبرگ‌ها می‌شوند. علاوه بر این، افزایش این قندهای احیایی منجر به افزایش پتانسیل اسمزی سلول‌ها شده، بنابراین، توانایی آن‌ها را در جذب آب و حفظ آماس سلولی افزایش می‌دهند و باعث افزایش محتوای آب گل‌ها و تأخیر در پلاسیده شدن گلبرگ‌ها می‌گردند (Rani and Singh 2014). پیری گلبرگ‌ها تحت تأثیر هورمون آبسزیک اسید هم در گل‌های حساس و هم غیر حساس به اتیلن مشاهده شده است. به طوری که در گل‌های حساس، عملکرد هورمون آبسزیک اسید وابسته به اتیلن است. گزارش شده است که در گل میخک، هورمون آبسزیک اسید منجر به افزایش بیوسنتز اتیلن و تسریع پیری گلبرگ‌ها شده است. تیمار آبسزیک اسید در مرحله پس از برداشت گل‌های شاخه بریده میخک، سبب افزایش میزان آبسزیک اسید درونی شده و به دنبال آن پیری رخ می‌دهد. افزایش میزان تولید اتیلن، دو روز پس از افزایش آبسزیک اسید درونی مشاهده شد. به گونه‌ای که پیری القا شده توسط آبسزیک اسید با کاربرد بازدارنده فعالیت اتیلن همچون تیوسولفات نقره به تعویق افتاد (Iqbal et al. 2017; Ma et al. 2018). در گل‌های غیر حساس به اتیلن، آبسزیک اسید به عنوان هورمون اصلی در تسریع فرآیند پیری نقش دارد که مطالعات بیشتری در این راستا مورد نیاز است. گزارشات متعددی مبنی بر تأثیر هورمون سیتوکینین در تأخیر فرآیند پیری در گلبرگ‌ها وجود دارد (Gupta and Dubey 2018; Ma et al. 2018). مشاهده گردیده است که سیتوکینین موجب تأخیر فرآیند پیری در برخی از گیاهان زینتی همچون گل سرخ، میخک، نرگس، زنبق و داوودی شده است (Ma et al. 2018). سیتوکینین‌ها با تأثیر بر بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیکی همچون مهار تولید اتیلن، تشکیل رادیکال‌های آزاد، حفظ نفوذپذیری غشا، تعادل آبی سلول و نیز کاهش متابولیسم پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها، تأخیر فرآیند پیری را به دنبال دارند (Rani and Singh 2014). نقش هورمون اکسین در پیری گلبرگ‌ها هنوز به طور کامل شناخته نشده است. شواهد نشان می‌دهد که اکسین‌ها در غلظت‌های مختلف سبب تسریع و یا به تعویق انداختن فرآیند پیری می‌شوند که این پاسخ‌ها به گونه گیاهی بستگی دارند. گزارش شده است که اکسین در آغاز فرآیند پیری در برخی از گیاهان حساس به اتیلن نظیر ارکید و میخک دخیل می‌باشد و تولید اتیلن را تحریک می‌نماید و بدین ترتیب فرآیند پیری را تسریع می‌کند. همچنین نقش اکسین در به تعویق انداختن فرآیند پیری گلبرگ در زنبق نیز ثابت شده است (Iqbal et al. 2017; Ma et al. 2018). لذا به نظر می‌رسد از یک سو می‌توان با دست‌ورزی ژنتیکی مسیر پیام رسانی اتیلن و از دیگر سو با افزایش میزان جیبرلین به بهبود ماندگاری در گل سرخ کمک نمود. هدف از این پژوهش، مطالعه میزان هورمون‌های گیاهی در لاین‌های تراریخته (ماندگار) و غیر تراریخته (شاهد) پس از اعمال تیمارهای اتیلن (در دو سطح صفر و $1 \mu\text{L L}^{-1}$) و جیبرلین (80 mg L^{-1}) در دو مرحله غنچه تجاری و نیمه باز در قالب آزمایش فاکتوریل بود تا در آینده بتوان تیمارهای مناسبی در مرحله پس از برداشت جهت افزایش ماندگاری این رقم از گل سرخ معرفی نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: لاین ماندگار (ترا ریخته) و شاهد (غیر ترا ریخته) در مرحله غنچه تجاری با قطر تقریباً یکسان (حدود ۳-۴ سانتی‌متر) از گلخانه تحت قرارداد با سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. لازم به ذکر است لاین ماندگار بر مبنای هدف دست‌ورزی ژنتیکی انجام شده، لاینی است که ضمن حفظ کلیه صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک رقم اولیه در بین سایر لاین‌های ترا ریخته طول عمر بیشتری داشته باشد (Khatami et al. 2018). لازم به یادآوری است که از گل سرخ رقم "Vendetta" (تهیه شده از یک شرکت تجاری به نام اسکرور^۵ در کشور هلند) جهت ترا ریختی استفاده گردیده است و ترا ریختی از طریق هم کشتی با *Agrobacterium tumefaciens* سویه AGL0 دارای پلاسمید pBEO210، انجام شده است. پلاسمید مذکور حاوی ژن *etr1-1* و ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک کانامایسین (*nptII*) تحت کنترل پیشبر بافت اختصاصی گل، *fbp1* بوده است (Bovy et al. 1999). گل سرخ ترا ریخته حاوی ژن *etr1-1* تحت عنوان "Fatan" نام‌گذاری شده بود (Yari 2016). پس از انتقال لاین ماندگار و شاهد به آزمایشگاه، برای یکسان کردن اندازه شاخه‌ها، انتهای آن‌ها در زیر آب مجدداً بریده شد، به طوری که طول هر شاخه گل به 0.5 ± 30 سانتی‌متر رسید و همه برگ‌ها بجز سه برگ بالایی حذف شدند. در تمام مدت آزمایش گل‌ها در شرایط کنترل شده با دمای 2 ± 25 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 5 ± 70 درصد و شرایط نوری ۱۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه با استفاده از لامپ‌های مهتابی سفید و تنگستن، با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Hamidi Imani et al. 2012). در ادامه با توجه به نوع آزمایش‌ها که در ذیل ذکر شده است، تیمارها اعمال و اندازه‌گیری‌ها انجام شد.

تیمارهای اتیلن و جیبرلین: بدین منظور گل‌های شاخه بریده لاین ماندگار و شاهد پس از برش مجدد به طول 5 ± 35 سانتی‌متر و حذف تمامی برگ‌ها به جز سه برگ بالایی، تحت تیمارهای جیبرلین (80 mg L^{-1}) یا اتیلن (صفر و $1 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$) قرار گرفتند. لازم به ذکر است که محلول نگهدارنده پایه، آب مقطر در نظر گرفته شد. جهت اعمال تیمار اتیلن، گل‌ها درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی با ضخامت ۶۰ میکرومتر و حجم ۷ لیتر که نفوذپذیری آن‌ها نسبت به اکسیژن و بخار آب به ترتیب $7800 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1} \text{ atm}^{-1}$ و $18 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1} \text{ atm}^{-1}$ در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و همچنین حاوی ۱ میلی‌لیتر KOH یک مولار برای جذب دی‌اکسیدکربن تنفسی می‌باشند، بسته بندی شدند. برای اعمال تیمار اتیلن از تزریق گاز خالص به داخل کیسه‌های پلی‌اتیلنی توسط سرنگ مخصوص بهره گرفته شد ($1 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$). در مقابل، به درون برخی کیسه‌های پلی‌اتیلنی، گاز اتیلنی تزریق نشد (صفر $1 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$). جهت اعمال تیمار جیبرلین، گل‌های شاخه بریده در محلول جیبرلین با غلظت 80 mg L^{-1} قرار گرفتند. تیمارها به مدت ۲۴ ساعت اعمال گردید و نمونه‌برداری از بیرونی‌ترین ردیف گلبرگ‌ها در دو مرحله نموی غنچه و نیمه باز

۵. Schreurs

انجام شد (شکل ۱). سپس نمونه‌ها به منظور بررسی میزان فیتوهورمون‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Sheng-hui et al. 2011). آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد.



شکل ۱. مراحل نموی مورد مطالعه، الف) غنچه و ب) نیمه باز.

Figure 1. Studied developmental stages, (A) bud and (B) half-open.

سنجش میزان اتیلن: نمونه برداری جهت اندازه‌گیری اتیلن، ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمارها انجام شد. بدین صورت که برای هر تیمار، یک شاخه گل درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی ۷ لیتری با شرایط فوق‌الذکر قرار گرفت و پس از ۲ ساعت، توسط یک سرنگ مخصوص از هوای داخل کیسه‌ها نمونه‌گیری شد. سپس هوای موجود در آن‌ها در طی ۳ دقیقه به درون لوله‌های ونوجکت خلاء کشیده شدند و تا زمان اندازه‌گیری، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری اتیلن، ۱۰۰ میکرولیتر از هوای لوله‌های ونوجکت خلاء با سرنگ برداشته و به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مدل Agilent 6890N مجهز به آشکارگر FID و ستون موئین (طول ۵۰ متر، قطر ۰/۵۳ میلی‌متر) تزریق و سطح زیر منحنی مربوطه قرائت گردید. سپس با توجه به معادله منحنی استاندارد، میزان اتیلن موجود در هوای تزریق شده تعیین گردید و نهایتاً مقدار اتیلن موجود در نمونه‌ها محاسبه و با واحد نانولیتتر بر گرم در ساعت بیان شد. با توجه به تنظیمات دستگاه، از دماهای ۱۸۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب در بخش‌های تزریق، ستون و آشکارگر و گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت ۶/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده گردید (Xue et al. 2008). محاسبه میزان اتیلن با استفاده از فرمول زیر انجام گرفت:

$$EP \text{ (nl g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}\text{)} = E \times V \times 60 / \text{FW} \times h$$

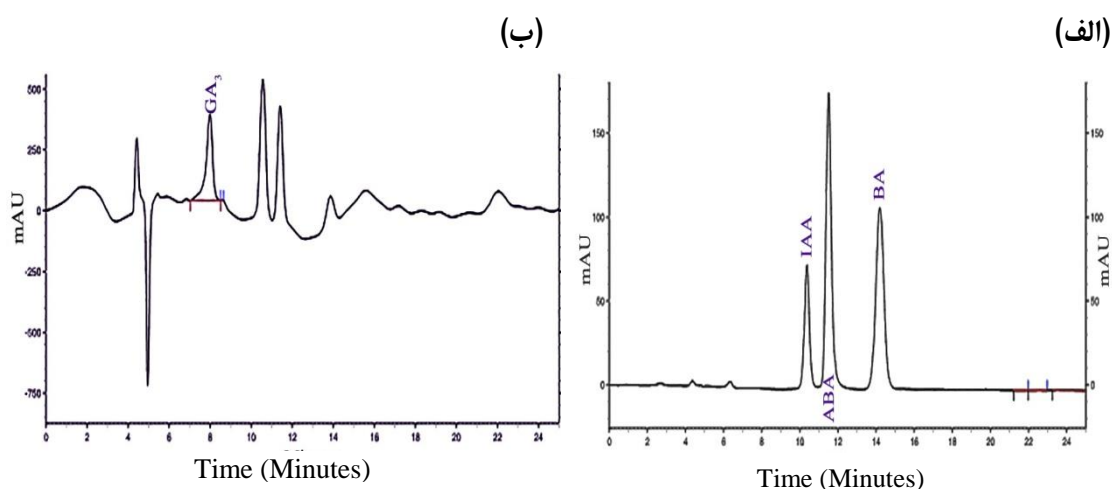
EP: مقدار اتیلن تولیدی توسط بافت‌های گیاهی E: مقدار اتیلن شناسایی شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (میکرولیتر در لیتر)

V: حجم کیسه پلی‌اتیلنی (لیتر) h: مدت زمان قرار دادن نمونه‌ها در کیسه پلی‌اتیلنی (ساعت)

FW: وزن تر شاخه گل (گرم)

آزمون طیف سنجی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا: سنجش سایر هورمون‌های گیاهی شامل جیبرلین،

بنزیل آدنین، آبسزیک اسید و اکسین توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. بدین منظور، ۰/۵ گرم از بافت تر گلبرگ در نیتروژن مایع ساییده و سپس پودر حاصل در ۱۰ میلی‌لیتر متانول خالص حل شد. نمونه‌ها به فالكون‌هایی که با فویل کاملاً پوشیده بودند، منتقل شدند. تمامی مراحل انجام واکنش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی بود. سپس نمونه‌ها، به مدت ۲ ساعت در دستگاه سونیکاتور با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از صاف کردن نمونه‌ها با کاغذ واتمن شماره ۲، محلول حاصل به مدت ۲-۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. مجدداً در ۱۰۰ میکرولیتر متانول حل و سپس عصاره حاصل بعد از عبور دادن از فیلتر ۰/۲ میکرومتر به دستگاه HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) با ستون C18 (4.6 mm x 250 mm, pore size 5 Mm, fitted with a sentry guard column) تزریق شد. فاز متحرک، متانول و اسید استیک ۰/۶۷ درصد (pH 3.0) در حالت ایزوکراتیک (۵۰:۵۰) با شدت جریان ۰/۸ میلی-لیتر در دقیقه بوده و شناسایی در طول موج‌های ۲۷۰ نانومتر برای فیتوهورمون‌های بنزیل آدنین، آبسزیک اسید، ایندول استیک اسید و ۲۲۰ نانومتر برای جیبرلین انجام گردید. حجم تزریق به دستگاه، ۱۰ میکرولیتر و زمان هر واکنش ۳۰ دقیقه بود (El-Nabarawy et al. 2018). استانداردهای مورد استفاده شامل جیبرلین (GA₃)، بنزیل آدنین (BA)، آبسزیک اسید (ABA) و ایندول استیک اسید (IAA) می‌باشد که در شکل‌های ۲، الف و ب آمده است.



شکل ۲. کروماتوگرام استانداردهای هورمون‌های گیاهی (الف) IAA: ایندول استیک اسید، ABA: آبسزیک اسید، اسید، BA: بنزیل آدنین و (ب) GA₃: جیبرلین می‌باشد.

Figure 2. Chromatogram of phytohormone standards (A), IAA: Indole Acetic Acid, ABA: Absciscic acid, BA: Benzyladenine, and (B) GA₃: Gibberellin.

۶. High Performance Liquid Chromatography

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار آزمایشگاهی اجرا شد. داده‌های حاصل توسط نرم افزار SAS (ویرایش ۹/۱) مورد تجزیه قرار گرفتند و همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردیدند.

نتایج

میزان اتیلن: نتایج جدول ۱ بیانگر معنی‌دار بودن اثرات سه گانه لاین، هورمون و زمان در سطح احتمال یک درصد است. همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد، الگوی تولید اتیلن در گل‌های سرخ شاخه بریده در مرحله نیمه‌باز نسبت به غنچه در لاین ماندگار و شاهد مشابه بود؛ گرچه تولید اتیلن در لاین ماندگار کمتر از شاهد بود. تیمارهای اتیلن و جیبرلین به ترتیب سبب افزایش و کاهش در میزان اتیلن در هر دو لاین شدند. به طوری که بیشترین مقدار تولید اتیلن در لاین شاهد در مرحله نیمه باز به هنگام تیمار با اتیلن مشاهده شد ($6/982 \text{ nL g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). علاوه بر این، کمترین مقدار تولید اتیلن در لاین ماندگار به هنگام تیمار با جیبرلین در مرحله غنچه مشاهده گردید ($0/677 \text{ nL g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (شکل ۳)

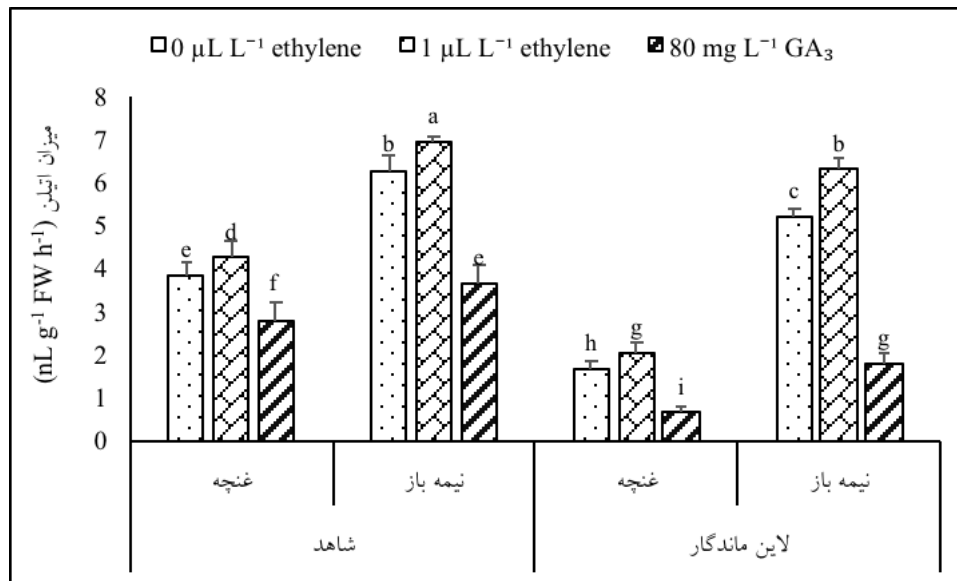
جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس میزان اتیلن در لاین‌های گل سرخ

Table 1. The results of variance analysis of ethylene content in rose lines

میانگین مربعات میزان اتیلن MS of ethylene	درجه آزادی df	منابع تغییر S. O. V.
820.79**	1	لاین‌های گل سرخ rose lines
27722.97**	2	هورمون hormone
28836.06**	1	زمان time
5179.34**	2	لاین‌های گل سرخ × هورمون rose lines × hormone
495.99**	1	لاین‌های گل سرخ × زمان rose lines × time
2582.66**	2	هورمون × زمان time × hormone
1533.24**	2	لاین‌های گل سرخ × هورمون × زمان rose lines × hormone × time
58.10	36	خطا error
10.32	-	ضریب تغییرات (درصد) CV%

*, ** و ^{ns} به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح پنج، یک درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

*, ** and ^{ns} denote significant differences at $p \leq 0.05$, 0.01 and no significant, respectively.



شکل ۳. میزان اتیلن در لاین ماندگار و شاهد در مراحل نموی مختلف و تحت تاثیر هورمون‌های مورد بررسی. حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد است.

Figure 3. Ethylene content in long-lasting line and wild type at different developmental stages and under the effect of studied hormones. Different letters represent significant differences at $p \leq 0.05$.

میزان سایر هورمون‌های گیاهی: نتایج جدول ۲ بیانگر معنی‌داری اثرات سه گانه لاین، هورمون و زمان بود. مطابق شکل ۴، کاهش تولید جیبرلین، بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید در گل‌های سرخ شاخه بریده در مرحله نیمه‌باز نسبت به غنچه در لاین ماندگار و شاهد مشاهده شد؛ اگرچه در لاین شاهد نسبت به لاین ماندگار میزان این هورمون‌ها در مراحل نموی مشابه کمتر بود. نتایج نشان می‌دهند که تیمارهای اتیلن و جیبرلین به ترتیب منجر به کاهش و افزایش معنی‌دار میزان جیبرلین، بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید شدند (شکل‌های ۴ الف، ب و ج). طوری که میزان آن‌ها در لاین شاهد در تیمار با اتیلن در مرحله نیمه باز کمترین مقدار و در لاین ماندگار در مرحله غنچه در تیمار با جیبرلین بیشترین مقدار بود. مطابق شکل ۴، افزایش تولید هورمون آبسیزیک اسید در گل‌های سرخ شاخه بریده در مرحله نیمه‌باز نسبت به غنچه در لاین ماندگار و شاهد مشاهده شد؛ اگرچه در لاین شاهد نسبت به لاین ماندگار میزان این هورمون در مراحل نموی مشابه بیشتر بود. همچنین نتایج نشان داد که تیمارهای اتیلن و جیبرلین به ترتیب منجر به افزایش و کاهش معنی‌دار میزان هورمون آبسیزیک اسید شدند، طوری که میزان آبسیزیک اسید در لاین شاهد در تیمار با اتیلن در مرحله نیمه باز بیشترین مقدار و در لاین ماندگار در مرحله غنچه در تیمار با جیبرلین کمترین مقدار بود (شکل ۴، د). شکل ۵، کروماتوگرام یک نمونه گیاهی را نشان می‌دهد.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس سایر هورمون‌های گیاهی در لاین‌های گل سرخ

Table 2. The results of variance analysis of other phytohormones in rose lines

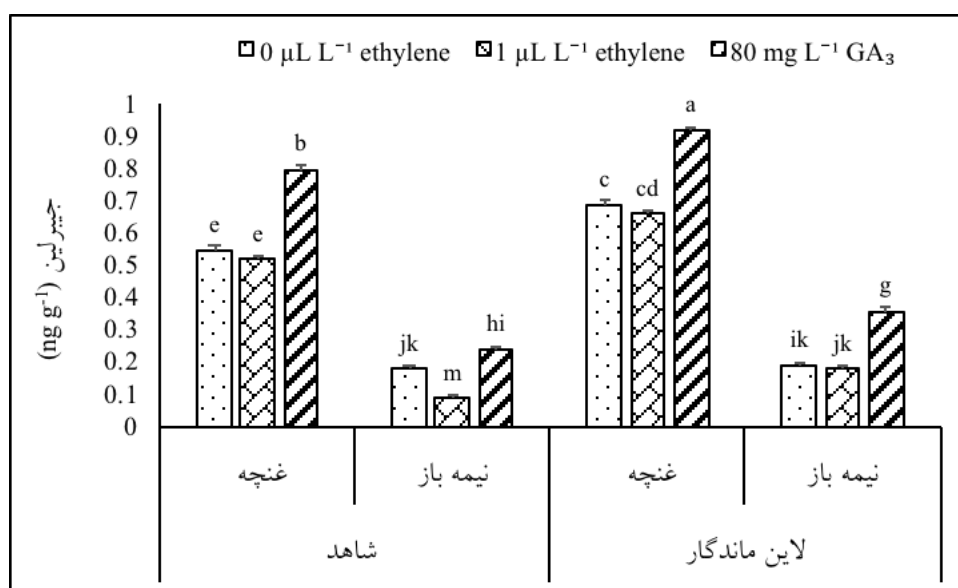
میانگین مربعات				درجه آزادی	S. O. V. منابع تغییر
آبسزیک اسید Abscisic acid	ایندول استیک اسید Indole acetic acid	بنزیل آدنین Benzyladenine	جیبرلین Gibberellin	df	
0.031**	0.032**	0.057**	0.11**	1	لاین‌های گل سرخ rose lines
0.098**	0.104**	0.104**	0.092**	2	هورمون hormone
1.38**	1.39**	1.37**	1.16**	1	زمان time
0.35**	0.004**	0.008**	0.002**	2	لاین‌های گل سرخ × هورمون rose lines × hormone
0.03**	0.003**	0.004**	0.006**	1	لاین‌های گل سرخ × زمان rose lines × time
0.04**	0.003**	0.004**	0.005**	2	هورمون × زمان × time × hormone
0.04**	0.006**	0.005**	0.005**	2	لاین‌های گل سرخ × هورمون × زمان rose lines × hormone × time
0.002	0.00007	0.0002	0.0005	36	خطا error
3.46	2.05	3.41	5.49	-	ضریب تغییرات (درصد) CV%

*, ** و ns به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح پنج، یک درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

*, ** and ns denote significant differences at $p \leq 0.05$, 0.01 and no significant, respectively.

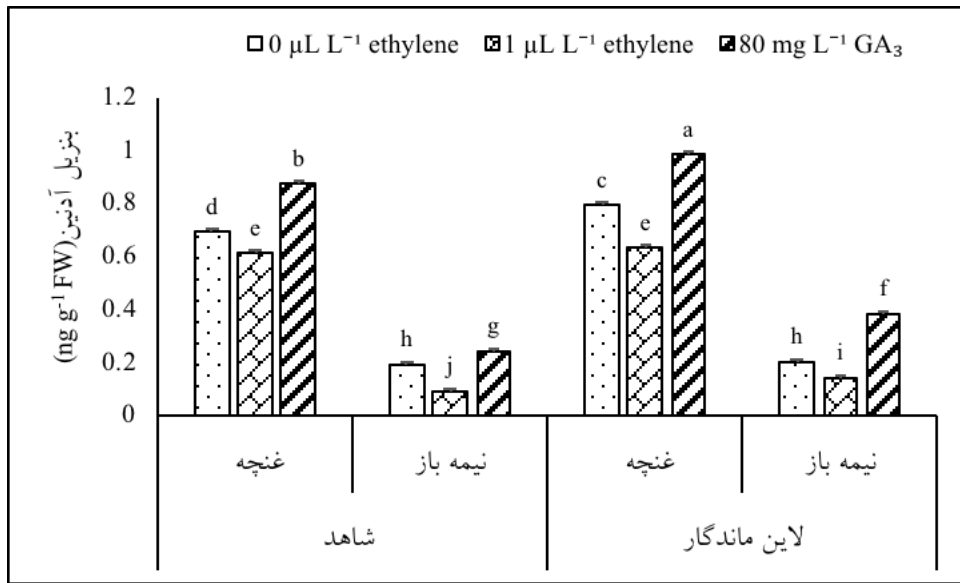
A

(الف)



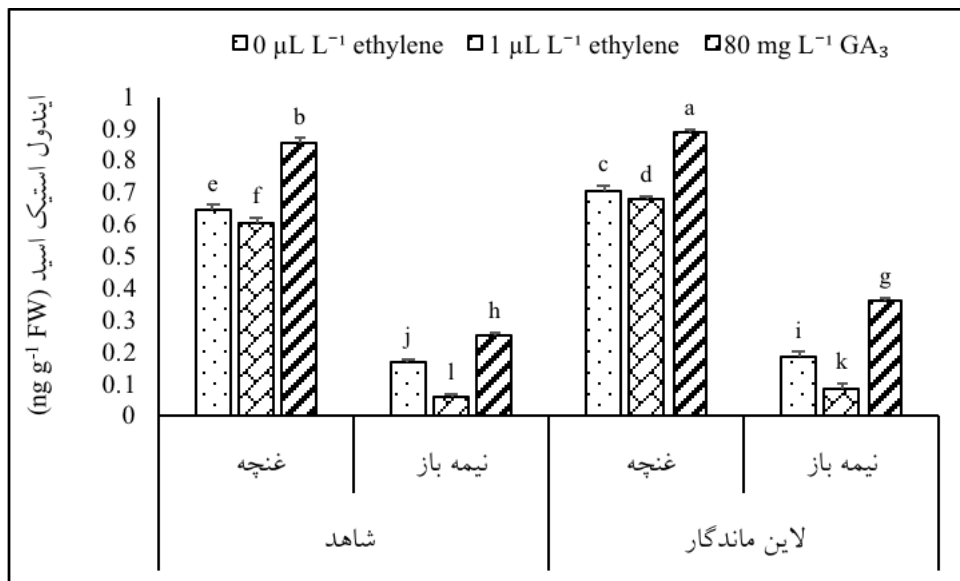
B

(ب)



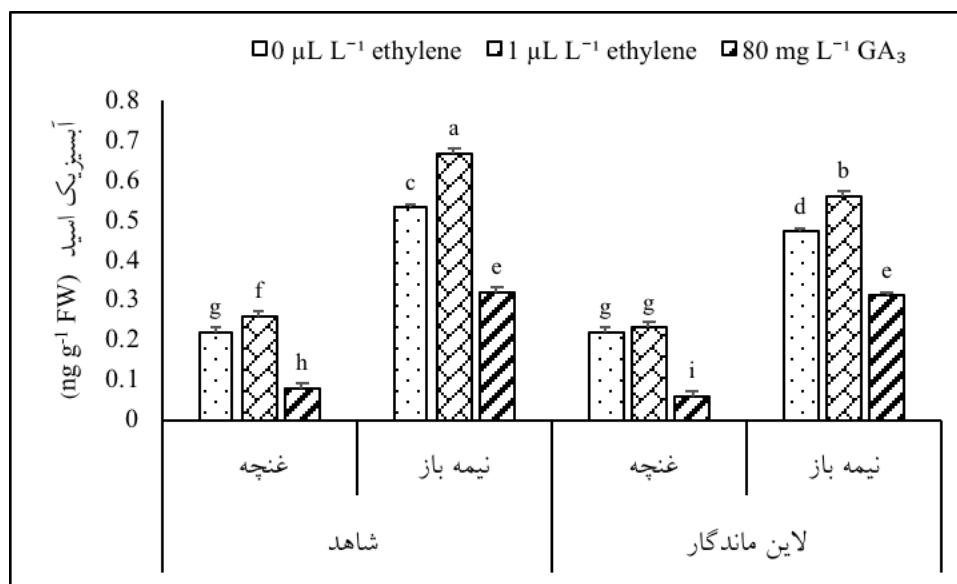
C

(ج)



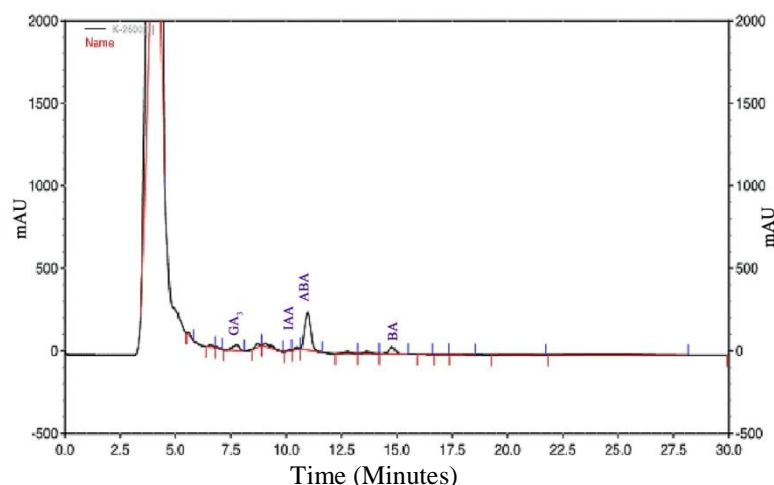
D

د



شکل ۴. میزان هورمون‌های گیاهی (الف) جیبرلین، (ب) بنزیل آدنین، (ج) ایندول استیک اسید و (د) آبسزیک اسید در لاین ماندگار و شاهد در مراحل نمو مختلف و تحت تاثیر هورمون‌های مورد بررسی. حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد است.

Figure 4. Content of phytohormones (A) Gibberellin, (B) Benzyladenine, (C) Indole acetic acid and (D) Abscisic acid in long-lasting line and wild type at different developmental stages and under the effect of studied hormones. Different letters represent significant differences at $p \leq 0.05$.



شکل ۵. کروماتوگرام یک نمونه گیاهی که با توجه به استانداردها مورد آنالیز قرار گرفته است.

Figure 5. Chromatogram of a plant sample that was analyzed according to the standards.

کیفیت مناسب و طول عمر پس از برداشت از عوامل کلیدی در تجارت گل سرخ می‌باشند. به نظر می‌رسد که اتیلن عامل اصلی کاهش طول عمر بسیاری از گل‌های شاخه بریده و تسریع فرآیند پیری در آن‌هاست (Ma et al. 2018; Morgan 2011). نقش اتیلن در باز شدن گل‌ها، از مهم‌ترین جنبه‌های اقتصادی گیاهان زینتی است. گزارش‌های متعددی مبنی بر تنظیم شکوفا شدن بسیاری از گل‌ها مانند میخک، اطلسی، ارکید، شمعدانی و گل سرخ تحت تاثیر اتیلن وجود دارد (Müller and Stummann 2003; Van Doorn 2002; Woltering and Van Doorn 1988). علاوه بر این، گزارش شده است که باز شدن گل‌های سرخ شاخه بریده تحت تاثیر هورمون اتیلن وابسته به رقم می‌باشد (Ma et al. 2005). به گونه‌ای که استفاده از اتیلن بیرونی در ارقام مختلف گل سرخ سبب تحریک، مهار و یا عدم باز شدن گل می‌شود (Ma 2006; Macnish et al. 1994; Reid et al. 1989; Yamamoto et al. 2010). اغلب ارقام تجاری شاخه بریده گل سرخ در شرایط بهینه به مدت ۸ روز از عمر گلدانی برخوردار می‌باشند، این در حالی است که بسیاری از مصرف کنندگان، ارقام دارای طول عمر طولانی را می‌پسندند. اخیراً، طیف گسترده‌ای از دستکاری ژنتیکی به منظور کاهش حساسیت به اتیلن استفاده شده است که در این میان چشم‌یافته *etr1-1*، نقش غالبی در عدم حساسیت به اتیلن خارجی و داخلی داشته و بدین ترتیب در افزایش طول عمر گل نسبت به سایر استراتژی‌ها موثرتر می‌باشد (Da Silva 2015; Olsen et al. 2015). به گونه‌ای که مشاهده شده است پیری گل‌ها در نیمی از گیاهان تراریخته با *etr1-1* نسبت به شاهد حداقل ۶ روز به تاخیر افتاده است (Ma et al. 2018). در این راستا گزارشات متعددی مبنی بر افزایش ماندگاری گیاهان تراریخته با ژن *etr1-1* همچون کالانکوه، گل استکانی، میخک و گل سرخ در شرایط پس از برداشت نسبت به گیاهان شاهد وجود دارد (Gubrium et al. 2000; Sanikhani et al. 2008; Sriskandarajah et al. 2010; Khatami et al. 2018). علاوه بر اتیلن، هورمون آبسزیک اسید نیز در تسریع فرآیند پیری گل‌ها نقش دارد. مشاهده شده است که افزایش میزان آبسزیک اسید در گونه‌های گل سرخ، میخک و اطلسی منجر به افزایش تولید اتیلن درونی شده و تسریع فرآیند پیری را به همراه داشته است (Ma et al. 2018). علاوه بر این، گزارش شده است که مداخله هورمون‌های اتیلن و آبسزیک اسید در تسریع فرآیند پیری گل سرخ و میخک، از طریق مهار بیوستنز هورمون جیبرلین می‌باشد. گزارشات متنوعی از نقش هورمون‌های جیبرلین و سیتوکینین در تاخیر فرآیند پیری گل‌ها در دست می‌باشد. مشاهده شده است که تیمار با GA_3 ، پرکاربردترین جیبرلین، به صورت محلول نگهدارنده ماندگاری گل‌های شاخه بریده همچون ساندروسونیا، میخک، گل شیپوری، ژربرا و گل سرخ را افزایش داده است (Emongor 2004; Eason 2002; Lu et al. 2001; Onoue et al. 2000; Skutnik et al. 2014). تاثیر جیبرلین‌ها در به تعویق انداختن پیری می‌تواند به دلیل کاهش در بیوستنز هورمون‌های اتیلن یا آبسزیک اسید باشد. گزارش شده است که تیمار جیبرلین از طریق مهار ژن $RhHB1$ ^۷ منجر به

۷. Homeodomain-leucine zipper I transcription factor

افزایش ماندگاری در گل‌های سرخ شاخه بریده گردیده است. همچنین هورمون‌های اتیلن و آبسزیک اسید سبب پیری پیش از موعد گلبرگ‌های گل سرخ و افزایش بیان RhHB1 شدند (Lu et al. 2014). (Lu et al. 2014) نقش RhHB1 را در اثر آنتاگونیستی هورمون‌های جیبرلین و اتیلن در گل‌های سرخ گزارش کردند. به عبارت بهتر هورمون اتیلن در جایگاه تنظیمی RhHB1-RhGA20ox1 فرآیند پیری را تسریع می‌نماید. بیان ژن GA20ox، منجر به تولید آنزیم جیبرلین ۲۰-اکسیداز در مسیر بیوستتری هورمون جیبرلین شده که تحت تاثیر تیمارهای اتیلن یا آبسزیک اسید کاهش می‌یابد. تیمار جیبرلین با مهار ژن RhHB1، این کاهش القا شده را برطرف می‌نماید. به عبارت بهتر مهار RhHB1 سبب افزایش بیان ژن GA20ox می‌شود (Lu et al. 2014). همچنین، کاربرد پاکلوبوترازول^۸ به‌عنوان مهار کننده بیوستتر هورمون جیبرلین، تسریع فرآیند پیری در بسیاری از گونه‌های گیاهی را به همراه داشته است. مشاهده شده است که پاکلوبوترازول با مهار سنتز جیبرلین و افزایش بیان RhHB1، پیش‌سازهای موجود در مسیر ترپنوئیدی را به سمت تولید آبسزیک اسید هدایت می‌کند (Soumya et al. 2017). از طرف دیگر گزارش شده است که اتیلن با انباشتگی پروتئین‌های DELLA^۹، مهار کننده پاسخ جیبرلین، نیز می‌تواند فرآیند پیری را تسریع نماید. همانند جیبرلین‌ها، گزارش‌های متعددی مبنی بر تاثیر سیتوکینین‌ها در تاخیر فرآیند پیری در گلبرگ‌ها وجود دارد. مشاهده گردیده است که سیتوکینین موجب تاخیر فرآیند پیری در برخی از گیاهان زینتی همچون گل سرخ، میخک، نرگس، زنبق و داوودی شده است (Ma et al. 2018). گزارش شده است که سیتوکینین‌ها با کاهش میزان آبسزیک اسید درونی، در خنثی نمودن آثار آن در تسریع فرآیند پیری نقش دارند. از دیگر سو تاثیر سیتوکینین‌ها در به تعویق انداختن فرآیند پیری می‌تواند به دلیل ایجاد تغییر در مسیر پیام‌رسانی هورمون اتیلن باشد (Ma et al. 2018; Salleh et al. 2016). چرا که با اعمال تیمار سیتوکینین در گیاهان اطلسی و داوودی، میزان حساسیت آن‌ها به اتیلن و تولید اتیلن درونی کاهش یافت. همچنین گزارش شده است که به هنگام پیری گلبرگ‌های اطلسی، اتیلن موجب سرعت بخشیدن به فرآیند تجزیه سیتوکینین شد و کاربرد ۶-متیل پورین به‌عنوان مهار کننده عملکرد سیتوکینین اکسیداز، سبب مهار تولید اتیلن و به تعویق انداختن پیری گل گردیده است (Salleh et al. 2016; Van Doorn and Woltering 2008). علاوه براین، تراریختی گیاهان اطلسی و گل سرخ با ژن IPT^{۱۰} که یک ژن کلیدی در بیوستتر سیتوکینین می‌باشد، تحت کنترل پروموتور SAG12^{۱۱}، سبب تضعیف حساسیت به اتیلن و تاخیر پیری در گلبرگ‌های آن‌ها گردیده است (Zaky 2013; Chang et al. 2003). گزارشات فوق‌الذکر رابطه آنتاگونیستی اتیلن و آبسزیک اسید را با هورمون‌های جیبرلین و سیتوکینین نشان می‌دهند. نقش هورمون اکسین در پیری گلبرگ‌ها هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. نتایج حاصل از پژوهش حاضر تائیدی بر گزارشات ارائه شده است و موید افزایش میزان تولید اتیلن در مرحله نیمه‌باز نسبت به غنچه می‌باشد، گرچه در لاین ماندگار به‌طور چشمگیری در مقایسه با لاین شاهد خواه در

۸. Paclobutrazl

۹. Aspartate-glutamate-leucine-leucine-alanine or D-E-L-L-A in the single letter amino acid code

۱۰. Isopentenyl transferase

۱۱. Senescence-associated genes

تیمار با اتیلن خواه در تیمار با جیبرلین کاهش نشان داده است (شکل ۳). لذا می‌توان گفت که در گل‌های حساس به اتیلن همچون گل سرخ، دست‌ورزی ژن جهش‌یافته *etr1-1* نقش مؤثری در بهبود و افزایش ماندگاری گل با استناد به کاهش تولید اتیلن داشته است. کاهش در میزان هورمون‌های جیبرلین، بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید و افزایش در میزان هورمون آبسزیک اسید در مرحله نیمه‌باز نسبت به غنچه در لاین ماندگار نسبت به لاین شاهد معنی‌دار بود که این را می‌توان به کاهش حساسیت آن به اتیلن نسبت داد (شکل ۴). علاوه بر این، تیمار جیبرلین کاهش تولید اتیلن را در لاین ماندگار نسبت به شاهد دو چندان نموده است (شکل ۳). از یک سو انتقال ژن *etr1-1* به گل سرخ سبب کاهش حساسیت به اتیلن گردیده و از دیگر سو با تاثیر بر میزان سایر هورمون‌ها توانسته است طول عمر گل را تا دو برابر افزایش دهد. با توجه به افزایش ماندگاری و کاهش قابل توجه در تولید اتیلن در لاین ماندگار همراه با رشد و فنوتیپ نرمال (Khatami et al. 2015; Khatami et al. 2018) در مقایسه با شاهد، لاین تراریخته تحت عنوان "گل سرخ غیر حساس به اتیلن" نامگذاری شد.

منابع

خاتمی فائزه؛ نجفی فرزانه؛ یاری فتانه؛ خاوری نژاد رضاعلی (۱۳۹۷) ژن *etr1-1* کاندید برتر جهت دست‌ورزی ژنتیکی مسیر پیام رسانی علامت هورمون اتیلن در گل سرخ. مجله پژوهش‌های گیاهی جلد ۳۱، شماره ۱.

خاتمی فائزه؛ نجفی فرزانه؛ یاری فتانه؛ خاوری نژاد رضاعلی (۱۳۹۵) بررسی تغییرات سوماکلونال در لاین‌های تراریخته گل رز. نهمین کنگره علوم باغبانی ایران، اهواز.

یاری فتانه (۱۳۹۵) فرآیند رز ماندگار غیرحساس نسبت به اتیلن حاوی ژن موتانت *ETR1-1*. ثبت اختراع ایرانی: ۹۵۷۶۰.

References

- Bovy AG, Angenent GC, Dons HJM, van Altvorst AC (1999) Heterologous expression of the Arabidopsis *etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. *Mol Breed* 5, 301-308.
- Chang C, Kwok SF, Bleeker AB, Meyerowitz EM (1993) Arabidopsis ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Sci* 262, 539-544.
- Chen JC, Johnson F, Clark DG et al. (2003) Potential application of virus-induced gene silencing (VIGS) in flower senescence studies. VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants 669, 147-152.
- Da Silva JAT (2015) Ornamental cut flowers: physiology in practice. *Floriculture Ornamental Biotech* 124-140.

- Eason JR (2002) *Sandersonia aurantiaca*: An evaluation of postharvest pulsing solutions to maximize cut flower quality. *New Zeal J Crop Hort* 30, 273-279.
- El-Nabarawy MA, El-Kafafi EH, Abo El-Enien HE, Salama MK (2018) Senescence of rose flowers 2-regulation aging and prolong their vase life. *Zagazig J Agric Res* 45, 869-890.
- Emongor VE (2004) Effects of gibberellic acid on postharvest quality and vase life of gerbera cut flowers (*Gerbera jamesonii*). *J Agron* 3, 191-195.
- Gubrium EK, Clevenger DJ, Clark DG et al. (2000) Reproduction and horticultural performance of transgenic ethylene-insensitive petunias. *J Am Soc Hortic Sci* 125, 277-281.
- Gupta J, Dubey RK (2018) Factors affecting post-harvest life of flower crops. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 7, 548-557.
- Hamidi Imani M, Hashemabadi D, Kaviani B, Zarchini M (2012) Effect of sodium benzoate on longevity and ethylene production in cut Rose (*Rosa hybrida* L. cv. Avalanche) Flower. *Eur J Exp Biol* 2, 2485-2488.
- Hassan FAE (2014) Longevity and postharvest quality of *Rosa hybrida* L. cv "Happy Hour" cut flowers as affected by silver thiosulphate (STS) treatment. *Sci Agric* 5, 85-91.
- Iqbal N, Khan NA, Ferrante A et al. (2017) Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Front Plant Sci* 8, 1-19.
- Khatami F, Najafi F, Yari F, Khavari-Nejad RA (2018) ETR1-1, A suitable candidate for genetic manipulation in rose (*Rosa hybrida* L.) ethylene signal transduction pathway. *J Plant Res* 31, 1, xx-xx (In Persian).
- Khatami F, Najafi F, Yari F, Khavari-nejad RA (2015) The study of somaclonal variations in transgenic rose lines. 9th congress of Iranian Horticultural Science, Ahvaz (In Persian).
- Kim H, Helmbrecht EE, Stalans MB et al. (2011) Ethylene receptor Ethylene receptor1 domain requirements for ethylene responses in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 156, 417-429.
- Lu P, Zhang C, Liu J (2014) RhHB1 mediates the antagonism of gibberellins to ABA and ethylene during rose (*Rosa hybrida*) petal senescence. *Plant J* 178, 578-590.
- Ma N, Cai L, Lu W et al. (2005) Exogenous ethylene influences flower opening of cut roses (*Rosa hybrida*) by regulating the genes encoding ethylene biosynthesis enzymes. *Sci China Life Sci* 48, 434-444.
- Ma N, Ma C, Liu Y et al. (2018) Petal senescence: a hormone view. *J Exp Bot* 1-14.
- Ma N, Tan H, Liu X et al. (2006) Transcriptional regulation of ethylene receptor and CTR genes involved in ethylene-induced flower opening in cut rose (*Rosa hybrida*) cv. Samantha. *J Exp Bot* 57, 2763-2773.

- Macnish AJ, Leonard RT, Borda AM, Nell TA (2010) Genotypic variation in the postharvest performance and ethylene sensitivity of cut rose flowers. *Hortic Sci* 45, 790-796.
- Morgan PW (2011) Another look at interpreting research to manage the effects of ethylene in ambient air. *Crop Sci* 51, 903-913.
- Mou B, Scorza R (2011) *Transgenic horticultural crops: challenges and opportunities*. 1st Edition.
- Müller R, Stummann BM (2003) Genetic regulation of ethylene perception and signal transduction related to flower senescence. *Food Agric Environ* 1, 87-94.
- Netam N (2018) Improving ornamental's vase life through molecular approaches: A review. *J Pharmacogn Phytochem* 7, 1687-1691.
- Olsen A, Lutken H, Hegelund JN, Muller R (2015) Ethylene resistance in flowering ornamental plants—improvements and future perspectives. *Hortic Res* 2, 1-9.
- Onoue T, Mikami M, Yoshioka T et al. (2000) Characteristics of the inhibitory action of 1,1-dimethyl-4-(phenylsulfonyl) semicarbazide (DPSS) on ethylene production in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *Plant Growth Regul* 30, 201-207.
- Rani P, Singh N (2014) Senescence and postharvest studies of cut flowers: A critical Review. *J Trop Agric Sci* 37, 159-201.
- Reid MS, Evans RY, Dodge LL, Mor Y (1989) Ethylene and silver thiosulphate influence opening of cut rose flowers. *J Am Soc Hortic Sci* 114, 436-440.
- Salleh FM, Mariotti L, Spadafora ND et al. (2016) Interaction of plant growth regulators and reactive oxygen species to regulate petal senescence in wall flowers (*Erysimum linifolium*). *BMC Plant Biol* 16.
- Sanikhani M, Mibus H, Stummann BM, Serek M (2008) *Kalanchoe blossfeldiana* plants expressing the *Arabidopsis etr1-1* allele show reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep* 27, 729-737.
- Schmitzer V, Veberic R, Osterc G, Stampar F (2010) Color and phenolic content changes during flower development in groundcover rose. *J Am Soc Hortic Sci* 135, 195-202.
- Sheng-hui L, Xiao-ping Z, Guang-ming S (2011) Changes in endogenous hormone concentrations during inflorescence induction and development in pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) by ethephon. *Afr J Biotechnol* 10, 10892-10899.
- Skutnik E, Lukaszewska A, Serek M, Rabiza J (2001) Effect of growth regulators on postharvest characteristics of *Zantedeschia aethiopica*. *Postharvest Biol Technol* 21, 241-246.
- Soumya PR, Kumar P, Pal M (2017) Paclobutrazol: A novel plant growth regulator and multi-stress ameliorant. *Indian J Plant Physiol* 22, 267-278.

- Sriskandarajah S, Mibus H, Serek M (2010) Introduction of ethylene insensitivity in *campanula carpatica* flowers by genetic manipulation with *Etr1-1*. In: Proc. 6th International Postharvest Symposium. (eds.): Erkan, M. and Aksoy, U. Acta Hort 877, 1111-1114.
- Van Doorn WG (2002) Effect of ethylene on flower abscission: a survey. Ann Bot 89, 689–693.
- Van Doorn WG, Woltering EJ (2008) Physiology and molecular biology of petal senescence. J Exp Bot 59, 453-480.
- Woltering EJ, Van Doorn WG (1988) Role of ethylene in senescence of petals morphological and taxonomical relationships. J Exp Bot 39, 1605-1616.
- Xue J, Li Y, Tan H et al. (2008) Expression of ethylene biosynthetic and receptor genes in rose floral tissues during ethylene-enhanced flower opening. J Exp Bot 59, 2161-2169.
- Yamamoto K, Komatsu Y, Yokoo Y, Furukawa T (1994) Delaying flower opening of cut roses by *cis*-propenyl phosphonic acid. J Jap Soc Hortic Sci 63, 159-166.
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu Rev Plant Physiol 35, 155-189.
- Yari F (2016) The process of long life rose insensitive to ethylene with *etr1-1* mutant gene. Iranian Patent: 95760 (In Persian).
- Zaky AA (2013) Effect of pre- and post-harvest treatments on flower longevity of cut rose cv. 'GRAND PRIX'. Egypt J Agric Res 91, 1009-1021.