# اثر شدت‌های مختلف نوری بر کالوس‌زایی و میزان رنگیزهٔ کالوس‌ها در جداکشت‌های گلی و رویشی گل محمدی (*Rosa damascena* Miller.) و گل سرخ مینیاتور (*Rosa miniature*)

**سمیه عبدی راد[*1]، فرخنده رضانژاد[2]، خسرو منوچهری کلانتری[3]**

[1] فارغ التحصیل مقطع کارشناسی ارشد، بخش زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[2] **دانشیار** بخش زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[3] **استاد** بخش زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: 1390/08/10، تاریخ پذیرش: 1390/11/29

## چکیده

در این پژوهش، اثر نور و تاریکی بر کالوس‌زایی جداکشت‌های رویشی (برگ، دمبرگ و ساقه) و گلی (گلبرگ، بساک و مادگی) و میزان رنگیزه‌های (کلروفیل و آنتوسیانین) کالوس‌ها در دو گونه‌ی *Rosa damascena* Mill. و *Rosa miniature* مقایسه شده است. ریزنمونه های سترون روی محیط MS که غلظت‌های مختلف 6 بنزیل آمینوپورین (BAP) و 2 و 4 دی کلروفنوکسی استیک اسید (2, 4-D) به آن اضافه گردیده بود، کشت شده و در شدت نوری 1000، 2000 لوکس و تاریکی تیمار شدند. در مرحله تولید کالوس از جداکشت‌های گل محمدی، غلظت‌های 4 میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و 1/5 میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین بازدهی را داشتند. بر عکس در گل سرخ مینیاتور جداکشت های مختلف در فرایند کال زایی نسبت به غلظت های مختلف هورمونی به شکل متنوعی پاسخ دادند. در همهٔ جداکشت‌ها، نور، بنیان گذاری کالوس را به تاخیر انداخت و تاریکی روند کالوس زایی را بسیار تسریع نمود. به علاوه، کال‌زایی جداکشت‌های رویشی در هر دو گونه زودتر از جداکشت‌های گلی شروع شد. قابل ذکر است که بنیان گذاری کالوس از ریز نمونه‌های گلی ورد مینیاتور یک هفته زودتر از گل محمدی آغاز گردید. نرخ رشد کالوس نیز در جداکشت‌های ورد مینیاتور بیشتر از ورد محمدی مشاهده شد. بررسی میزان کلروفیل و آنتوسیانین کالوس‌ها نشان داد که در تاریکی، تولید و تجمع این رنگدانه ها بسیار کم و در نور این مقدار به شکل قابل توجهی افزایش می‌یابد. در گل محمدی کالوس‌های برگی و در گل سرخ مینیاتور کالوس‌های ساقه‌ای بیشترین مقدار کلروفیل و در هر دو گونه، کالوس‌های دمبرگی و بساکی کمترین مقدار را در خود ذخیره کردند. همچنین میزان آنتوسیانین در کالوس های گلبرگ و مادگی هر دو گونه بیشتر از کالوس دیگر ریزنمونه ها بود در حالی که کمترین مقدار در کالوس بساک و دمبرگ گل سرخ مینیاتور و بساک گل محمدی مشاهده شد.

**واژه‌های کلیدی:** *کشت بافت، کالوس، کلروفیل، آنتوسیانین، گل محمدی، گل سرخ مینیاتور.*

[*] نویسنده مسئول: سمیه عبدی راد تلفن: 09175375788 Email: abdirad_60@yahoo.com

**مقدمه**

گل سرخ محمدی در بیشتر مناطق و استان-های کشور، به‌خصوص آذربایجان، اصفهان، کرمان و فارس سابقه کشت و کار دارد. از ورد محمدی در تهیه‌ی گلاب، اسانس، مربا، در طراحی فضای سبز برای پرچین و به صورت تک تک و در طب سنتی نیز برای درمان اسهال، دردهای روماتیسمی و ناهنجاری‌های خونی و گلودرد استفاده می‌شود (Jabbarzadeh, 2003). به علاوه، گلبرگ آن به دلیل داشتن تانن، قابض است و دم کرده آن، برطرف کننده نفخ شکم، تپش قلب، کم‌خوابی، اسهال خونی و معمولی، حالت تهوع، التهاب و غم و اندوه می‌باشد. گلاب نیز در طب سنتی برای دردهای روماتیسمی، معدوی، قلبی، تقویت اعصاب، و رفع برخی سردردها، حالت تهوع و بیهوشی کاربرد دارد. ترکیبات موثرهٔ شناخته شدهٔ آن شامل مقداری تانن، اسید گالیک، اسانس، اسیدهای چرب و مواد رنگی در گلبرگ و اسیدآسکوربیک (ویتامین C) در میوه می‌باشد (Kafi and Riyazi, 2001; Mahmood *et al.*,1996; Boskabady *et al.*, 2006; Rakhshandeh and Hosseini, 2006).

گل سرخ مینیاتور نیز، یکی دیگر از گونه‌های فراوان ورد است که به دلیل زیبایی‌های منحصر به فردش، مردم‌پسند، محبوب و تجاری می‌باشد. ورد مینیاتور بومی ایران نیست ولی در کشور ما طرفداران بسیاری دارد. در مناطق مختلف دنیا انواع واریته‌های این ورد زیبا در طیف وسیعی از رنگ‌ها و طرح‌ها، زینت بخش گل‌خانه‌ها، پارک-ها، فضای سبز و گل‌فروشی‌ها است. گلبرگ بعضی از واریته‌های آن دارای مقادیری عطر و اسانس است و مانند دیگر گونه‌های گل سرخ از خواص دارویی، خوراکی و آرایشی برخوردار است. ازدیاد این دو گونه از ورد به وسیله بذر، پاجوش، سخت تیل (قلمه چوب سخت)، نیمه سخت تیل (قلمه چوب نیمه سخت)، پیوند و کوپیوند (پیوند جوانه) صورت می گیرد (Horn, 1992; Hudson *et al.*,2002; Jabbarzadeh and Khosh-Khui, 2005). روش های سنتی افزایشی (قلمه و کوپیوند) نه تنها بسیار کند و زمان‌بر می-باشند، بلکه مشکلاتی همچون محدودیت در گیاه مادری و زمان تولید نیز وجود دارد. تولید انبوه در زمان کوتاه (در تمام فصول)، دستکاری‌های ژنتیکی مفید، تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش از کالوس و تکثیر گونه‌های مردم پسند از مزایای روش کشت بافت[1] می‌باشد و می‌تواند بازارگل را رونق بیشتری بخشد. یکی دیگر از مزایای استفاده از این روش، یکسان و استاندارد بودن اسانس-های تهیه شده از گل محمدی تولید شده در شیشه[2] است که در بازار جهانی از اهمیت بسزایی برخوردار است (Jabbarzadeh, 2003).

کلروفیل، رنگدانه‌ای سبزرنگ است که نور را جذب کرده و در فتوسنتز گیاهان نقش اصلی را ایفا می‌کند. مطالعه‌ی بافت‌های کلروفیلی برای بررسی سطوح متابولیسمی، سلامت و بیماری گیاه و همچنین تعیین میزان رشد اتوتروفی صورت می‌گیرد (Hildebrandt *et al*,. 1963). میزان کلروفیل ارتباط مستقیم با سلامت و شادابی

1Tissue Culture
2 *In Vitro*

گیاه دارد و ابزار قدرتمند و موثری برای مطالعه تأثیرات تنش‌های مختلف و شرایط متغیر محیطی روی فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان می‌باشد (Schneider, 2005). به دلیل پایین بودن سمیت آنتوسیانین، از آن به عنوان رنگ‌کننده‌ی مواد غذایی استفاده می‌شود (Timberlake and Henry, 1986). در سال‌های اخیر اثرات فارماکولوژیکی آن در پایین آوردن شاخص‌های آتروژنیکی، کاهش سطوح تری‌گلیسریدها و اسیدهای چرب، مهار سرعت رشد تومورهای سرطانی در بدن مشخص شده است (Igarashi and Inagaki 1991). در این پژوهش توانایی کالوس‌زایی جداکشت‌های مختلف (ساقه، برگ، دمبرگ، گلبرگ، بساک و مادگی) و همچنین محتویات کلروفیلی و آنتوسیانینی در کالوس‌های دو گونه گل سرخ (گل محمدی، *Rosa damascena* Mill. و گل سرخ مینیاتور *Rosa miniature*) مطالعه شده است.

اگر چه مطالعات مختلفی بر کشت درون شیشه این دو گونه ورد صورت گرفته است (Seeni and Gnanam, 1981; Banthorpe and Barrow, 1983; Salehi and Khosh-Khui, 1996; pati *et al*., 2005)، اما مطالعات مروری ما نشان داد که مقایسه انواع جداکشت‌ها و بررسی میزان کلروفیل و آنتوسیانین کالوس‌های حاصل از آن‌ها انجام نشده است، بنابراین در این مطالعه، این مقایسه صورت گرفته، بدین منظور که بهترین جداکشت ها و بهینه ترین شرایط برای تولید کالوس و سنتز رنگدانه ها تحقیق و بررسی شود.

## مواد و روش‌ها

### انتخاب و آماده‌سازی جداکشت[1]ها

ساقه‌ها، برگ‌ها، دمبرگ ها و اجزای گلی (گلبرگ، مادگی و بساک) گل سرخ محمدی و گل سرخ مینیاتور با دقت با محلول شوینده (مایع ظرفشویی) شسته و به مدت 30 دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. گندزدایی مطابق مراحل زیر انجام شد: اتانول 70 درجه به مدت 30 ثانیه تا یک دقیقه، محلول 20-15 درصد سدیم-هیپوکلریت و محلول یک گرم در لیتر کلرید جیوه ($Hg_2Cl_2$) به مدت 4-3 دقیقه، 5-3 بار شستشو با آب مقطر سترون، بریدن بخش‌های انتهایی و قهوه‌ای شده و غوطه‌ور شدن در محلول 100 میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین و تتراسایکلین به مدت 15 دقیقه.

### آماده سازی محیط و کشت ریز نمونه‌ها

جداکشت‌های مختلف در محیط MS (Murashige and Skoog) حاوی ویتامین‌ها، ساکارز (30 گرم در لیتر)، پلی وینیل پیرولیدون (10 میلی‌گرم در لیتر) و آگار (9-8 گرم در لیتر) قرار گرفتند. این محیط پایه با غلظت‌های مختلفی از بنزیل آمینوپورین (0/1، 0/5، 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر) و 2 و 4 دی کلروفنوکسی استیک اسید (2, 4-D) (1، 2، 3 و 4 میلی‌گرم در لیتر) تکمیل و بررسی شد. کشت‌ها در دمای $25\pm1$ °C در تیمار تاریکی و تناوب نوری 16 ساعتی با شدت های 1000 و 2000 لوکس (لامپ‌های فلورسنت)

1 Explant

نگهداری شدند. واکشت ریزنمونه‌ها به محیط کشت تازه و مشابه، هر 25 روز یک بار انجام گردید.

## استخراج کلروفیل

برای سنجش میزان کلروفیل، 50 میلی‌گرم از کالوس‌های تازه‌ی 20، 40، 60 و 80 روزه در هاون چینی با 10 میلی‌لیتر استون 80 درصد سائیده شد. سانتریفیوژ در دور 4000g به مدت 15 دقیقه انجام گرفت و جذب محلول رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موجهای، 647 و 663 نانومتر خوانده شد. غلظت رنگیزه‌های کلروفیلی با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (Kaul and Sabhrwal, 1974; Clairmont *et al.*,1986):

$$Chla = (12.25A_{663} - 2.79A_{647})$$
$$Chlb = (21.21A_{647} - 5.1A_{663})$$
$$ChlT = Chla + chlb$$

## استخراج آنتوسیانین

از روش موری[1] (Mori *et al.*, 1993) به منظور اندازه گیری مقدار آنتوسیانین‌های کالوس ها استفاده شد. 100 میلی‌گرم از کالوس تازه هر یک از ریزنمونه‌ها با 10 میلی لیتر متانول اسیدی (متانول خالص واسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی 100 به 1) به طور کامل سائیده شد. محلول مورد نظر، به مدت 24 ساعت در تاریکی و در دمای 25 درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس به مدت 15 دقیقه با دور 4000g سانتریفیوژ و جذب محلول بالایی در طول موج 530 نانومتر اندازه گیری شد. برای محاسبه غلظت، ضریب خاموشی (ε) 33000 سانتیمتر بر مول درنظرگرفته شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از فرمول زیر بدست آمد:

$$A = \varepsilon bc$$

در این رابطه A = جذب، b = عرض کووِت که برابر با 1 سانتی متر است و c= غلظت آنتوسیانین بر حسب مول بر گرم وزن تر کالوس می‌باشد (Mori *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1999).

## بررسی آماری

در این آزمایش که با استفاده از روش فاکتوریل و طرح کاملاً تصادفی اجرا شد، هر پتری (15 عدد جداکشت) به عنوان یک تکرار و هر تیمار دارای سه تکرار بود. مقایسه میانگین‌ها وآنالیز واریانس با استفاده از آزمون دانکن توسط نرم‌افزار SPSS و با ضریب اطمینان 95% انجام شد.

## نتایج

در این پژوهش ترکیبی از غلظت‌های مختلف هورمونی به منظور بهینه‌سازی فرایند کالوس‌زایی، استفاده شد که ریزنمونه‌های دو گونه‌ی مورد آزمایش، پاسخ‌های متفاوتی نشان دادند. بیشترین بازدهی در کالوس‌زایی جداکشت-های گل محمدی در غلظت‌های 4 میلی‌گرم در لیتر 2 و 4 دی کلروفنوکسی استیک اسید (2, 4-

1 Mori

D) و 1/5 میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) رخ داد. در این ترکیب هورمونی 75/53، 82/20، 95/53، 77/80، 88/86 و 60 درصد موفقیت در کالوس‌زایی به ترتیب در دمبرگ، برگ، ساقه، گلبرگ، مادگی و بساک گل محمدی مشاهده شد. به استثنای گلبرگ که در نسبت 3 به 1 2, 4-D به BAP نیز بازدهی نسبتا خوبی داشت (55/53 درصد موفقیت)، فرایند کال‌زایی در بقیه جداکشت‌ها و در دیگر محیط‌های مورد تحقیق موفقیت چشمگیری (معنی‌دار) کسب نکرد (جدول 1).

بررسی کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف ورد مینیاتور در ترکیب‌های مختلف هورمونی BAP و 2, 4-D نشان داد که بر خلاف جداکشت‌های گل محمدی که همگی در نسبت 4 به 1/5 توفوردی به بنزیل‌آمینوپورین پاسخ یکسان و بالایی نشان دادند، در گل سرخ مینیاتور نسبت های مختلف تاثیرات متفاوتی بر ریزنمونه‌های مختلف داشتند. میزان کالوس‌زایی برگ و دمبرگ در نسبت های 4 به 1/5 و 3 به 1 (میلی گرم بر لیتر) توفوردی به بنزیل آمینوپورین، نسبت به جداکشت های دیگر، بالا و به ترتیب در برگ برابر 97/80 و 86/67 و در دمبرگ‌ها 73/33 و 91/13 درصد بود. بیشترین بازدهی در کالوس-زایی ساقه در نسبت های 3 به 1 و 2 به 0/5 به ترتیب با 97/73 و 91/13 درصد مشاهده شد. کال‌زایی گلبرگ نیز در نسبت های غلظتی 3 به 1، 2 به 0/5 و 4 به 1/5 2, 4-D به BAP، به ترتیب برابر 66/67، 57/80 و 55/53 درصد بود.

همچنین بهترین بازدهی در فرایند کالوس‌زایی مادگی (86/67) در محیط کشت MS با 3 میلی گرم در لیتر 2, 4-D و 1 میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد، در حالی که پینه زایی بساک‌های گل سرخ مینیاتور در ترکیب‌های هورمونی مختلف تفاوت معناداری نشان نداد (جدول 2). تاریکی، نور 1000 و 2000 لوکس عوامل محیطی موثری بودند که برکالوس‌زایی و میزان رنگیزه های کالوس اثر معنی‌دار گذاشتند. نتایج بنیان گذاری[1] کالوس در جداکشت‌های گلی (گلبرگ، مادگی و بساک) و نوشاخه‌ای (برگ، دمبرگ و ساقه) هر دو گونه تحت تاثیر این عوامل محیطی در زمان‌های مختلف نشان داده شده است (جدول‌های 3 و 4).

شروع کالوس زایی همه‌ی ریزنمونه‌های هر دو گونه‌ی مورد مطالعه، در تاریکی سریع‌تر از نور صورت گرفت. بدین صورت که در هفته اول درصد بسیاری بالایی ازجداکشت‌های رویشی (برگ، دمبرگ و ساقه) دو گونه‌ی ورد که در تاریکی قرار داشتند، بنیان گذاری کالوس را آغاز کردند در حالی‌که در ریز نمونه‌های گلی (گلبرگ، بساک و مادگی) به همراه همه‌ی جداکشت‌هایی که در نور قرار داشتند، واکنش محسوسی آغاز نشده بود. جداکشت‌های گلی ورد مینیاتور در هفته‌ی دوم و جداکشت‌های گلی ورد محمدی در هفته‌ی سوم بنیان گذاری کالوس را در تاریکی آغاز کردند. نور 1000 و 2000 لوکس بنیان

1 Initiation

گذاری را تا هفته‌های بعدی به تاخیر انداخت (جدول‌های 3 و 4).

**جدول 1- بررسی غلظت های مختلف هورمون های BAP و 2, 4-D بر پینه‌زایی ریزنمونه های مختلف گل محمدی (*Rosa damascena*).**

**Table 1- Effects of BAP and 2, 4-D ratio on callogenesis of different explants of *R. damascena*.**

| تنظیم کننده‌های رشد (میلی‌گرم در لیتر) Plant Growth Regulators ($mg\ l^{-1}$) | | جداکشت ها Explants | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BAP | 2, 4-D | بساک Anther | مادگی Pistil | گلبرگ Petal | ساقه Stem | برگ Leaf | دمبرگ Petiole |
| 1.5 | 4 | 60.00%± 3.00 bcde | 88.86%± 1.20 A | 77.80%± 1.85 Abc | 95.53%± 0.67 A | 82.20%± 0.88 ab | 75.53%± 1.45 Abcd |
| 1.0 | 3 | 28.86%± 1.53 gh | 62.20%± 1.20 Bcde | 55.53%± 1.20 Cdef | 62.20%± 1.76 Bcde | 55.53%± 0.88 cdef | 48.86%± 0.88 Efgh |
| 0.5 | 2 | 31.13%± 0.67 fgh | 60.00%± 0.58 Bcde | 28.86%± 1.53 Gh | 51.73%± 1.76 Defg | 44.46%± 0.67 efgh | 38.40%± 0.67 Efgh |
| 0.1 | 1 | 26.66%± 1.00 gh | 57.80%± 0.88 Cde | 24.46%± 0.67 H | 51.73%± 1.45 Defg | 55.53%± 0.88 cdef | 48.86%± 0.33 Efgh |

**جدول 2- بررسی غلظت های مختلف هورمون های BAP و 2, 4-D بر پینه‌زایی ریزنمونه های مختلف گل سرخ مینیاتور (*Rosa miniature*).**

**Table 2- Effects of BAP and 2, 4-D ratio on callogenesis of different explants of *R. miniatur*e.**

| تنظیم کننده‌های رشد (میلی‌گرم در لیتر) Plant Growth Regulators ($mg\ l^{-1}$) | | جداکشت Explants | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BAP | 2, 4-D | بساک Anther | مادگی Pistil | گلبرگ Petal | ساقه Stem | برگ Leaf | دمبرگ Petiole |
| 1.5 | 4 | 53.33%± 0.58 defg | 37.80%± 1.20 fg | 55.53%± 0.88 Cdef | 48.87%± 0.88 Defg | 97.80%± 0.33 A | 73.33%± 1.20 Bc |
| 1.0 | 3 | 60.00%± 0.58 cde | 86.67%± 0.58 ab | 66.67%± 0.58 Cd | 97.73%± 0.33 A | 86.67%± 1.45A b | 91.13%± 0.33 Ab |
| 0.5 | 2 | 40.00%± 0.58 efg | 44.47%± 0.88 efg | 57.80%± 0.88 Cdef | 91.13%± 0.88 Ab | 46.67%± 0.58 defg | 37.80%± 1.20 Fg |
| 0.1 | 1 | 33.33%± 1.53 g | 42.2%± 0.88 efg | 33.33%± 1.53 G | 57.80%± 0.88 Cdef | 51.33%± 1.20 defg | 42.20%± 1.45 Efg |

**جدول 3- اثر تاریکی و نور بر زمان تشکیل کالوس در انواع جداکشت‌های ورد محمدی (*Rosa damascena*)**

**Table 3- Effects of dark and different light intensities on callus initiation of different explants in *R. damascena*.**

| شدت نور (لوکس) Light intensity (lux) | Explants جداکشت | | | | | | زمان (هفته) Time (week) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | دمبرگ Petiole | برگ Leaf | ساقه Stem | گلبرگ Petal | بساک Anther | مادگی Pistil | |
| تاریکی Dark | 77.78%± 1.85 abcd | 84.44%± 1.33 Ab | 97.78%± 0.33 A | 0 o | 0 o | 0 o | هفته اول First week |
| 1000 | 8.89%± 0.88 klmno | 20.00%± 1.15 Ijklmno | 28.89%± 0.88 hijkl | 0 o | 0 o | 0 o | |
| 2000 | 26.67%± 1.53 ijklm | 20.00%± 0.58 Ijklmno | 15.56%± 0.33 jklmno | 0 o | 0 o | 0 o | |
| تاریکی Dark | 77.78%± 1.85 abcd | 84.44%± 1.33 Ab | 97.78%± 0.33 a | 8.89%± 0.33 klmno | 6.67%± 0.58 Lmno | 6.67%± 0.00 Lmno | هفته دوم Second week |
| 1000 | 17.78%± 0.33 ijklmn | 26.67%± 1.53 Ijklm | 35.56%± 1.33 ghij | 4.44%± 0.33 mno | 2.22%± 0.33 No | 4.44%± 0.33 Mno | |
| 2000 | 26.67%± 1.53 ijklm | 20.00%± 0.58 Ijklmno | 31.11%± 0.88 hijk | 6.67%± 0.58 lmno | 4.44%± 0.33 mno | 0 o | |
| تاریکی Dark | 77.78%± 1.85 abcd | 84.44%± 1.33 Ab | 97.78%± 0.33 a | 55.56%± 0.88 defg | 51.11%± 1.20 efgh | 82.22%± 1.76 Abc | هفته سوم Third week |
| 1000 | 60.00%± 1.53 cdef | 66.67%± 0.58 Bcde | 80.00%± 0.58 abc | 24.44%± 1.20 ijklmn | 20.00%± 1.00 ijklmno | 31.11%± 1.20 Hijk | |
| 2000 | 64.44%± 1.77 bcde | 64.44%± 1.20 Bcde | 73.33%± 1.53 bcde | 28.89%± 0.88 hijkl | 28.89%± 0.88 hijkl | 40.00%± 1.15 Fghi | |

**جدول 4- اثر تاریکی و نور بر زمان تشکیل کالوس در انواع جداکشت‌های ورد مینیاتور ( *Rosa miniature*)**

**Table 4- Effects of dark and different light intensities on callus initiation of different explants in *R. miniature*.**

| شدت نور (لوکس) Light intensity (lux) | Explants جداکشت | | | | | | زمان (هفته) Time (week) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | دمبرگ Petiole | برگ Leaf | ساقه Stem | گلبرگ Petal | بساک Anther | مادگی Pistil | |
| تاریکی Dark | 84.44%± 0.88 Ab | 91.11%± 0.33 Ab | 97.78%± 0.33 a | 6.67%± 0.58 hi | 6.67%± 0.00 hi | 13.33%± 0.58 Efgh | هفته اول First week |
| 1000 | 20.00%± 0.58Defgh | 24.44%± 0.88 defg | 17.18%± 0.33 efgh | 4.44%± 0.33 hi | 11.11%± 0.33 fghi | 6.67%± 0.00 Hi | |
| 2000 | 8.89%± 0.33 Ghi | 11.11%± 0.67 fghi | 8.89%± 0.33 ghi | 0i | 8.89%± 0.33 ghi | 4.44%± 0.33 Hi | |
| تاریکی Dark | 84.44%± 0.88 Ab | 91.11%± 0.33 Ab | 97.78%± 0.33 a | 64.44%± 0.88 c | 86.67%± 0.58 ab | 91.11%± 0.88 Ab | هفته دوم Second week |
| 1000 | 20.00%± 0.58Defgh | 24.44%± 0.88 defg | 17.18%± 0.33 efgh | 4.44%± 0.33 hi | 11.11%± 0.33 fghi | 6.67%± 0.00 Hi | |
| 2000 | 17.78%± 1.20 Efgh | 11.11%±. 67 fghi | 11.11%± 0.33 fghi | 8.89%± 0.33 ghi | 8.89%± 0.33 ghi | 11.11%± 0.33 Fghi | |
| تاریکی Dark | 84.44%± 0.88 Ab | 91.11%± 0.33 Ab | 97.78%± 0.33 a | 86.67%± 0.58 ab | 86.67%± 0.58 ab | 91.11%± 0.88 Ab | هفته سوم Third week |
| 1000 | 86.67%± 0.58 Ab | 75.56%± 1.20 Bc | 77.78%± 0.88 bc | 24.44%± 1.20 defg | 20.00%± 1.00 defgh | 31.11%± 1.20 De | |
| 2000 | 80.00%± 1.15 Bc | 66.67%± 1.53 C | 75.56%± 1.20 bc | 35.56%± 1.20 d | 26.67%± 0.58 def | 33.33%± 0.58 De | |

نرخ رشد[1] کالوس (حجم کالوس در زمان معین) در همه‌ی جداکشت‌های دو گونه مقایسه گردید. نتایج نشان داد که پینه‌های 20 روزه (20 روز پس از بنیان گذاری)، بهترین نمونه‌ها برای تشخیص بهتر نرخ رشد در دو گونه بودند (نتایج زمان‌های دیگر نشان داده نشده است). کالوس-های 20 روزه‌ی گل سرخ مینیاتور نسبت به گل محمدی حجم بیشتر و در نتیجه نرخ رشد بالاتری داشتند (شکل‌های 1 و 2). کالوس‌زایی در بساک بر اساس شکل 2، تفاوت قابل توجهی را بین دو گونه نشان نمی‌دهد.

در هر دو گونه، تاریکی مانع تشکیل رنگدانه های آنتوسیانین و کلروفیل شده و نور این فرایند را القا و راه‌اندازی نمود. برخلاف گل محمدی، در ورد مینیاتور، به استثنای کالوس‌های برگی و ساقه‌ای که در این دو نوع افزایش میزان کلروفیل در نور 2000 لوکس مشاهده شد، سایر کالوس‌ها، بین دو شدت نوری، تفاوت معنی داری نشان نمی‌دهند. به‌علاوه میزان رنگیزه‌ی آنتوسیانین کالوس‌های گل سرخ مینیاتور و گل محمدی (ورد محمدی) به دست آمده از شدت-های نوری 2000 نیز در مقایسه با شدت 1000 لوکس افزایش قابل توجهی نشان داد (شکل‌های 3، 4، 5 و 6).

در هر دو شدت نوری، با گذر زمان از 20 روز به 80 روز مقادیر کلروفیلی افزایش یافته است به جز در کالوس دمبرگ گل سرخ مینیاتور و کالوس‌های برگی، ساقه‌ای و گلبرگی ورد محمدی که بین دوره‌های زمانی 60 و 80 روزه تفاوت محسوسی دیده نمی‌شود (در 60 روز به حد ماکزیمم می‌رسند). همچنین با افزایش سن به 80 روز، میزان رنگیزه آنتوسیانین کالوس های در معرض نور نیز افزایش یافت (به استثنای کالوس-های 60 روزه‌ی برگ و ساقه گل سرخ مینیاتور که در 60 روز، میزان بیشینه‌ی رنگیزه را نشان دادند) (شکل های 3، 4، 5 و 6).

مطالعه‌ی میزان سبزینه در گل سرخ مینیاتور نشان می‌دهد که مقدار این رنگیزه در کالوس ساقه (1/72 میلی گرم کلروفیل بر گرم کالوس) و سپس برگ (1/65 میلی گرم کلروفیل بر گرم کالوس) از همه بیشتر و در بساک (1/27 میلی گرم کلروفیل بر گرم کالوس) و دمبرگ (1/26 میلی گرم کلروفیل بر گرم کالوس) از همه کمتر است. میزان کلروفیل درگلبرگ و مادگی نیز به ترتیب در حدود 1/51 و 1/48 میلی‌گرم در گرمِ کالوس می‌باشد. این مقادیر در گل محمدی، در کالوس برگ (1/60 میلی گرم بر گرم کالوس) از همه بیشتر و در بساک (0/88 میلی‌گرم بر گرمِ کالوس) از همه کمتر است. پس از برگ بیشترین مقدار به ساقه، گلبرگ، مادگی و دمبرگ تعلق دارد که به ترتیب برابر با 1/33، 1/26، 1/25 و 1/21 می‌باشند (شکل های 3 و 5).

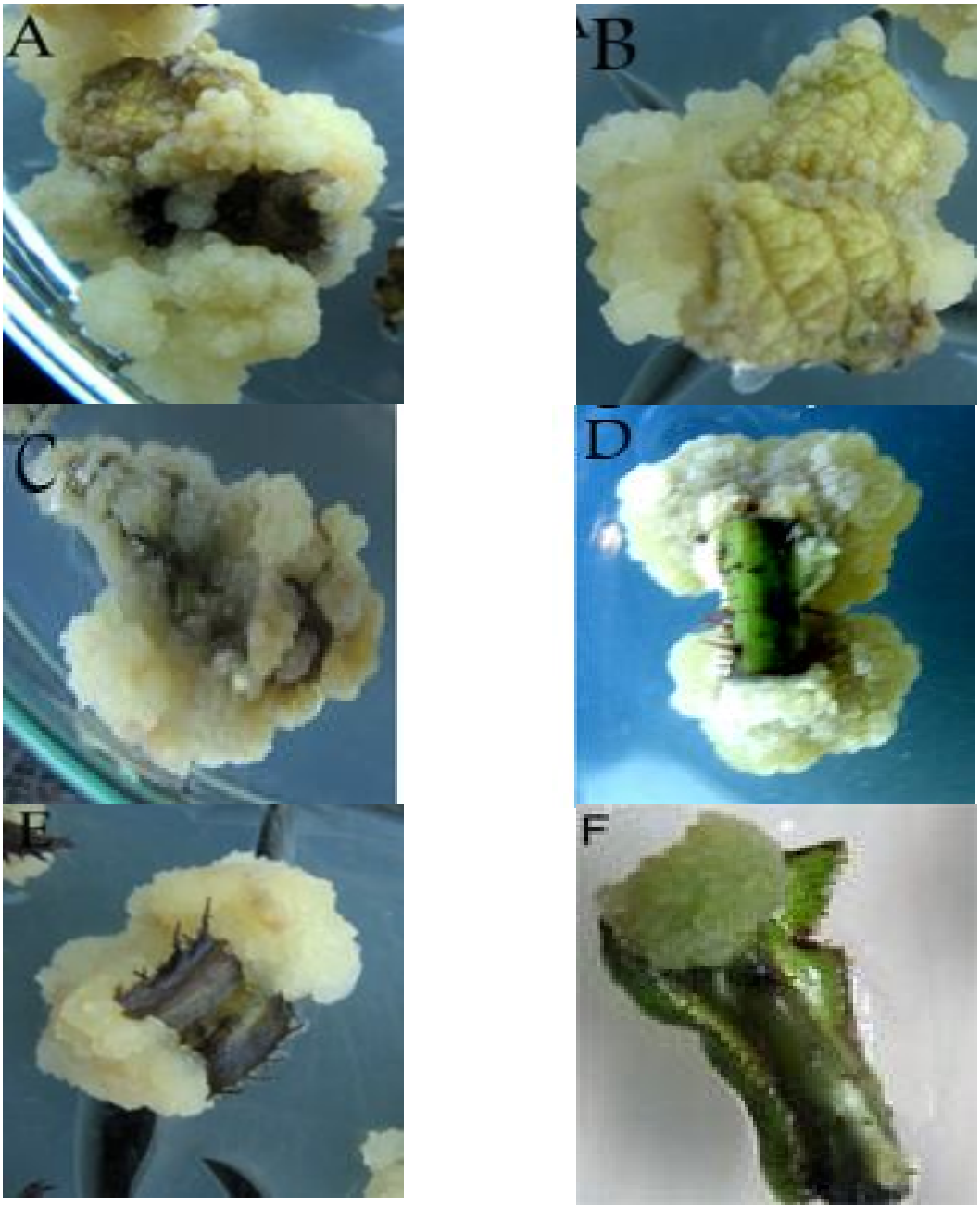
میزان آنتوسیانین در کالوس گلبرگ (78 میکرومول در هر گرم کالوس) و مادگی (69 میکرومول در هر گرم کالوس) گل سرخ مینیاتور نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بیشتر و در دمبرگ (44/34 میکرومول در هر گرم کالوس) و بساک

1 Growth Rate

(40/23 میکرومول در هر گرم کالوس) از همه کمتر بود. کالوس‌های حاصل از برگ و ساقه نیز به ترتیب با ذخیره کردن حدود 59 و 56/34 میکرومول آنتوسیانین بر گرم کالوس حدواسط بودند. پینه‌های مشتق از گلبرگ و مادگی گل محمدی نیز به ترتیب با ذخیره‌ی حدود 66/70 میکرومول و 41/16 میکرومول آنتوسیانین در هر گرم کالوس بیشترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. کمترین میزان آن در دمبرگ (13/57) مشاهده شد. هر گرم از کالوس‌های حاصل از ساقه، بساک و برگ نیز به ترتیب حدود 25/20، 23/95 و 19/39 میکرومول آنتوسیانین در خود ذخیره کردند (شکل های 4 و 6).

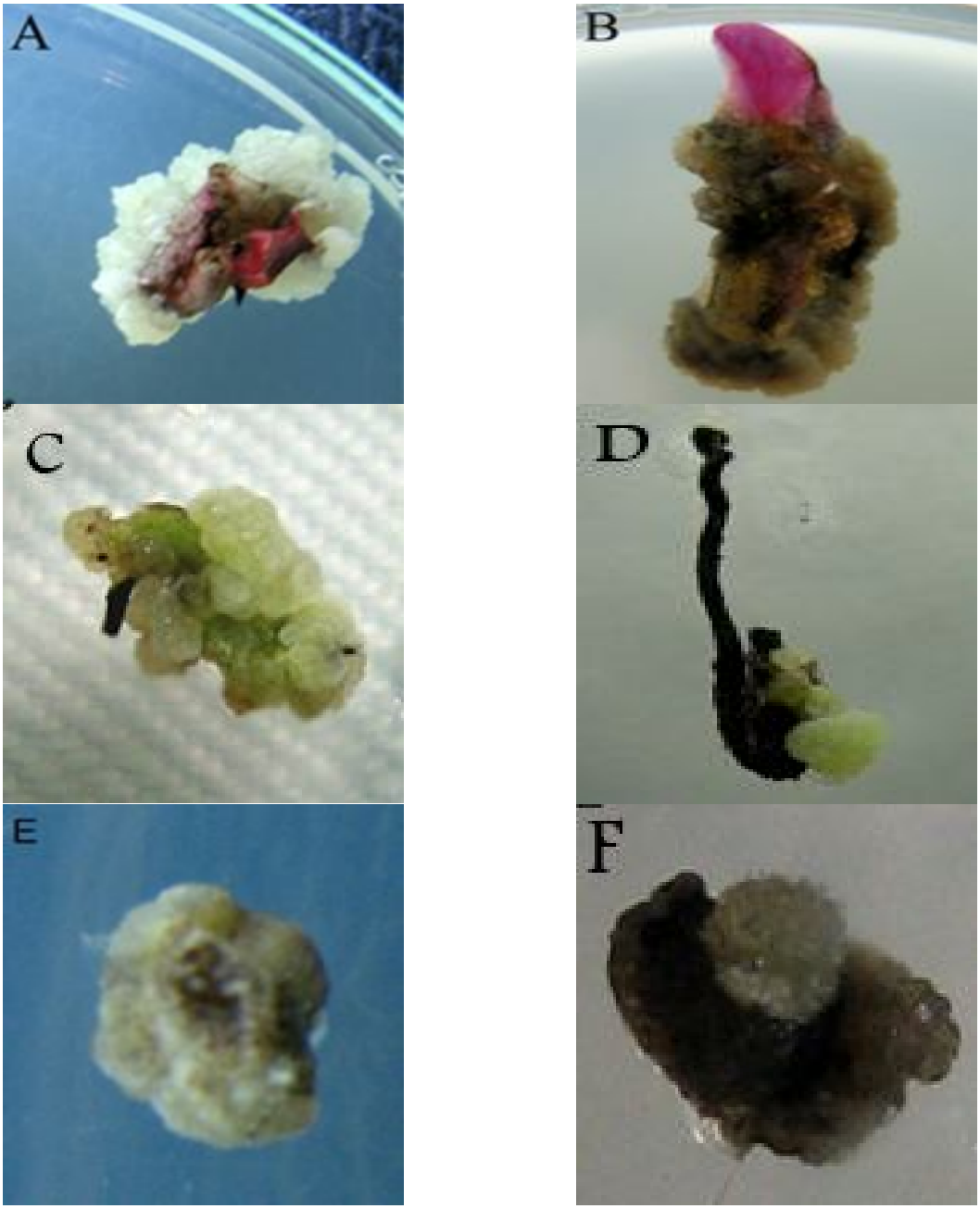
**بحث**

کالوس‌زایی جداکشت‌ها در محیط MS انجام شد. این محیط پایه برای کشت در شیشه‌ی بسیاری از گیاهان مناسب است (Murashige and Skoog, 1962; Vaezi and Kakhki, 2001; Pati *et al*., 2005). در این پژوهش، دو گونه‌ی مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف هورمونی واکنش‌های متفاوتی نشان دادند. کالوس‌زایی جداکشت‌های گل سرخ مینیاتور در مقایسه با گل محمدی در ترکیب‌های مذکور، بازدهی موفق‌تری داشتند. به نظر می‌رسد که ریزنمونه های ورد مینیاتور در فرایند تولید کالوس، انعطاف بیشتری از خود نشان داده و نسبت به ورد محمدی ساده-تر و راحت‌تر کالوس‌زایی می‌کنند. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها اصلی ترین فاکتورهای رشد در روش کشت بافت هستند که نوع و غلظت موثر آنها در جداکشت‌ها و نیز در جنس‌ها، گونه‌ها و رقم‌های مختلف متفاوت است (Rout *et al*., 1992; Hill, 1967; Lloyd *et al*., 1988; Hsia and Korban, 1996; Salehi and Khosh-Khui, 1996). اغلب مطالعات نشان می‌دهد به طور معمول از میان اکسین‌ها، توفوردی، برای تمایززدایی و تولید کالوس موثرتر می باشد و BAP نیز نسبت به دیگر سیتوکینین‌ها در تولید و رشد پینه کارایی بالاتری دارد (Dixon and Gonzales, 1996). گزارشات بسیاری مبنی بر استفاده از BAP و 2, 4-D به عنوان اصلی ترین تنظیم کننده‌های رشد در فرایند کالوس‌زایی وجود دارد (Lloyd et al.,1988; Burger *et al*.,1990; Arene *et al*.,1993; Hsia and Korban, 1996; Prasertsongskun, 2003; Islam *et al*., 2005; Pontaroli and Camadro, 2005; Wang and Bao, 2007; Yi-xun *et al*., 2009). القای کال‌زایی در واریته‌های مختلف گیاهان، تنوع زیادی نشان داده و براساس پژوهش‌های حاضر، به نظر می‌رسد که غلظت-های هورمونی در حد زیادی وابسته به ژنوتیپ هستند (Islam *et al*., 2005).



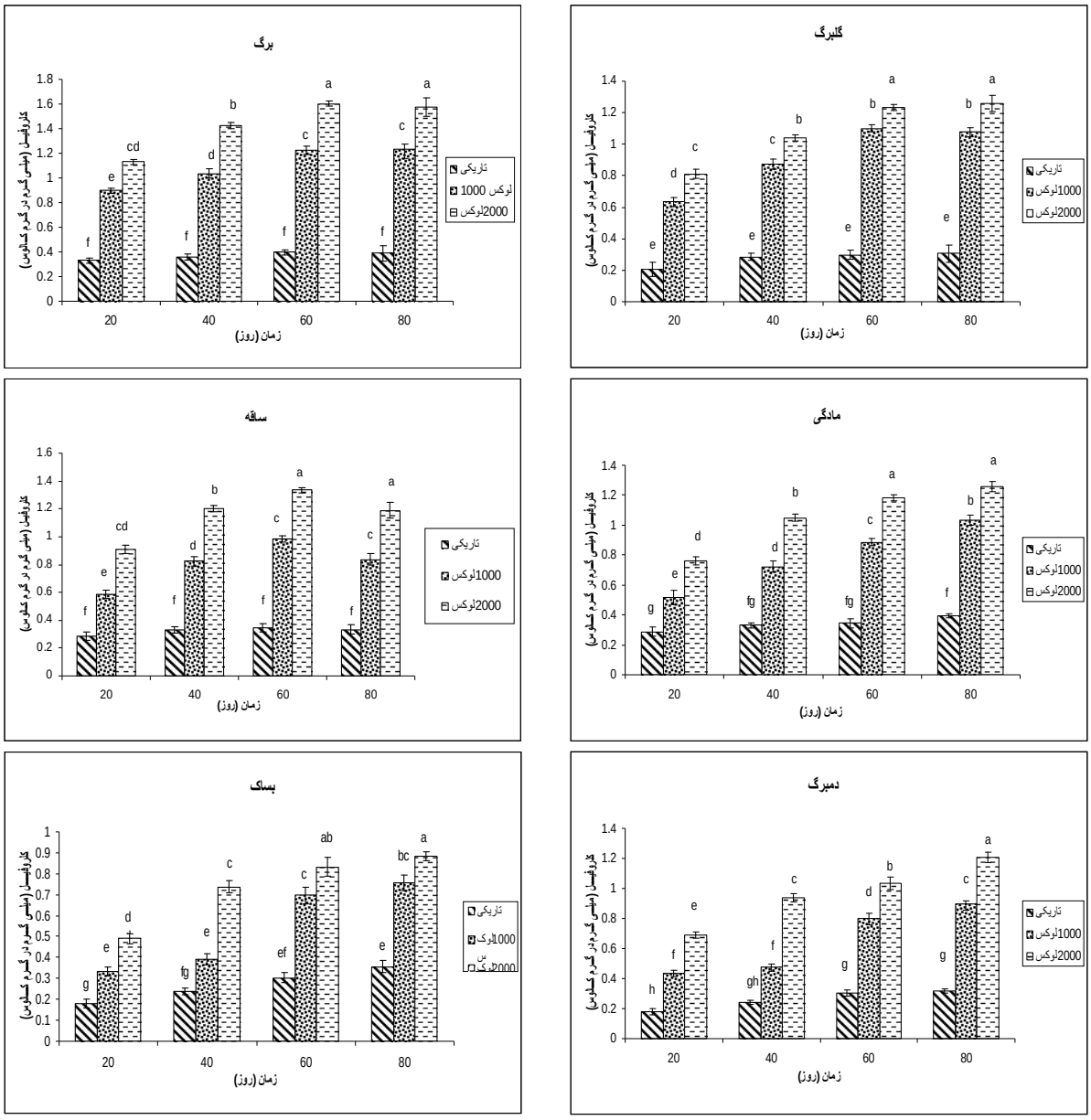

**شکل 1- مقایسه‌ی نرخ پینه‌زایی (بر اساس حجم کالوس در زمان معین) جداکشت‌های شاخه‌ای (برگ، ساقه و دمبرگ) دو گونه‌ی گل محمدی و گل سرخ مینیاتور، 20 روز پس از بنیان گذاری کالوس. A: برگ گل سرخ مینیاتور، B: برگ گل محمدی، C:ساقه گل سرخ مینیاتور، D:ساقه گل محمدی، E: دمبرگ گل سرخ مینیاتور ، F:دمبرگ گل محمدی، (A، B و E: بزرگنمایی x2/5)، (D و C: بزرگنمایی x1/5 )، (F: بزرگنمایی x3/5).**

**Figure 1- Comparison of growth rate of vegetative or shoot explants in *R. miniature* and *R. damascena*, 20 days after callus initiation. A: leaf of *R. miniature*, B: leaf of *R. damascena*, C: stem of *R. miniature*, D: stem of *R. damascena*, E: petiole of *R. miniature*, F: petiole of *R. damascena*.**



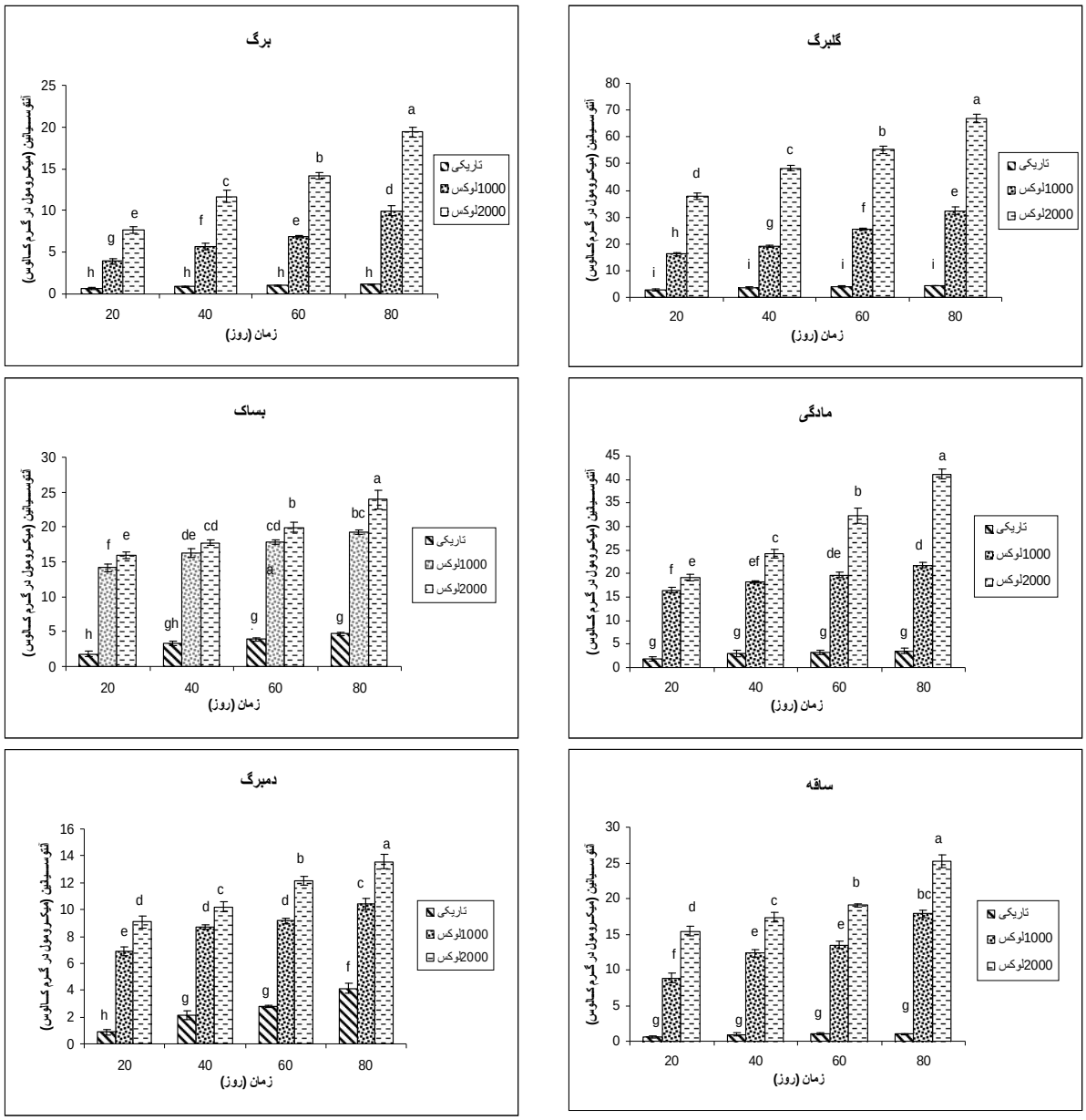

**شکل 2- مقایسه‌ی نرخ پینه‌زایی (بر اساس حجم کالوس در زمان معین) جداکشت‌های گلی (گلبرگ، مادگی و بساک) دو گونه‌ی گل محمدی و ورد مینیاتور، 20 روز پس از بنیان گذاری کالوس. A: گلبرگ ورد مینیاتور، B: گلبرگ گل محمدی، C: مادگی ورد مینیاتور ، D: مادگی گل محمدی، E: بساک ورد مینیاتور ، F: بساک گل محمدی، (A: بزرگنمایی2×x)، (D و C: بزرگنمایی 9×x)، (B: بزرگنمایی 5×x)، (E: بزرگنمایی 12×x)، (F: بزرگنمایی 15×x).**

**Figure 2- Comparison of growth rate of floral explants in *R. miniature* and *R. damascena*, 20 days after callus initiation. A: petal of *R. miniature*, B: petal of *R. damascena*, C: pistil of *R. miniature*, D: pistil of *R. damascena*, E: anther of *R. miniature*, F: anther of *R. damascena*.**



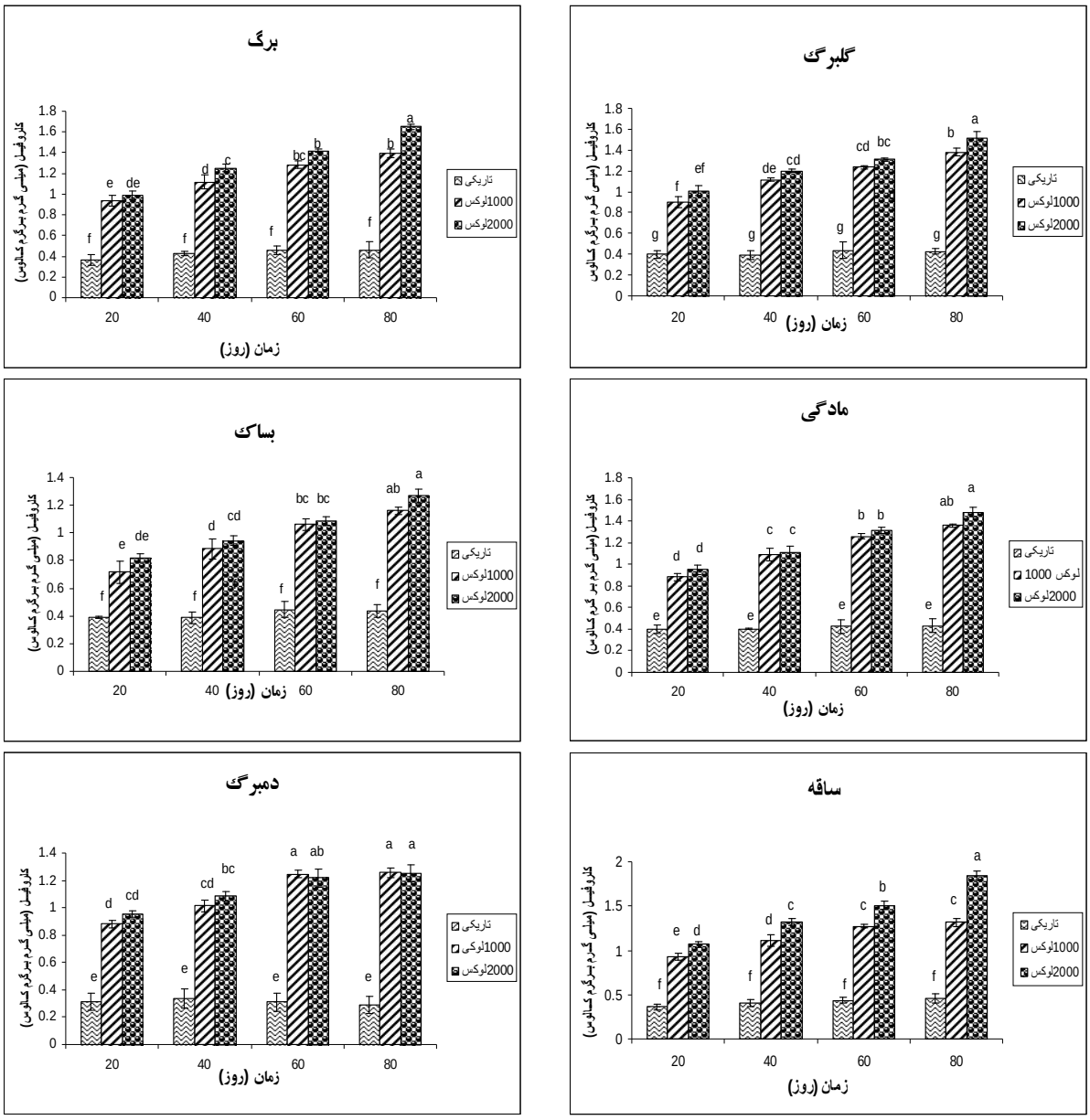

**شکل 3- اثر تاریکی، نور 1000 و 2000 لوکس بر میزان کلروفیل کالوس برگ، ساقه، دمبرگ، بساک، گلبرگ و مادگی گل محمدی (*Rosa damascena*) در 20، 40، 60 و 80 روز پس از بنیان گذاری کالوس (با ضریب اطمینان 95%).**

**Figure 3- Effects of dark and light (1000 and 2000 lux) on chlorophyll content of calli from leaf, petiole, stem, pistil, petal and anther explants of *Rosa damascen*a during 20, 40, 60 and 80 days after callus initiation.**



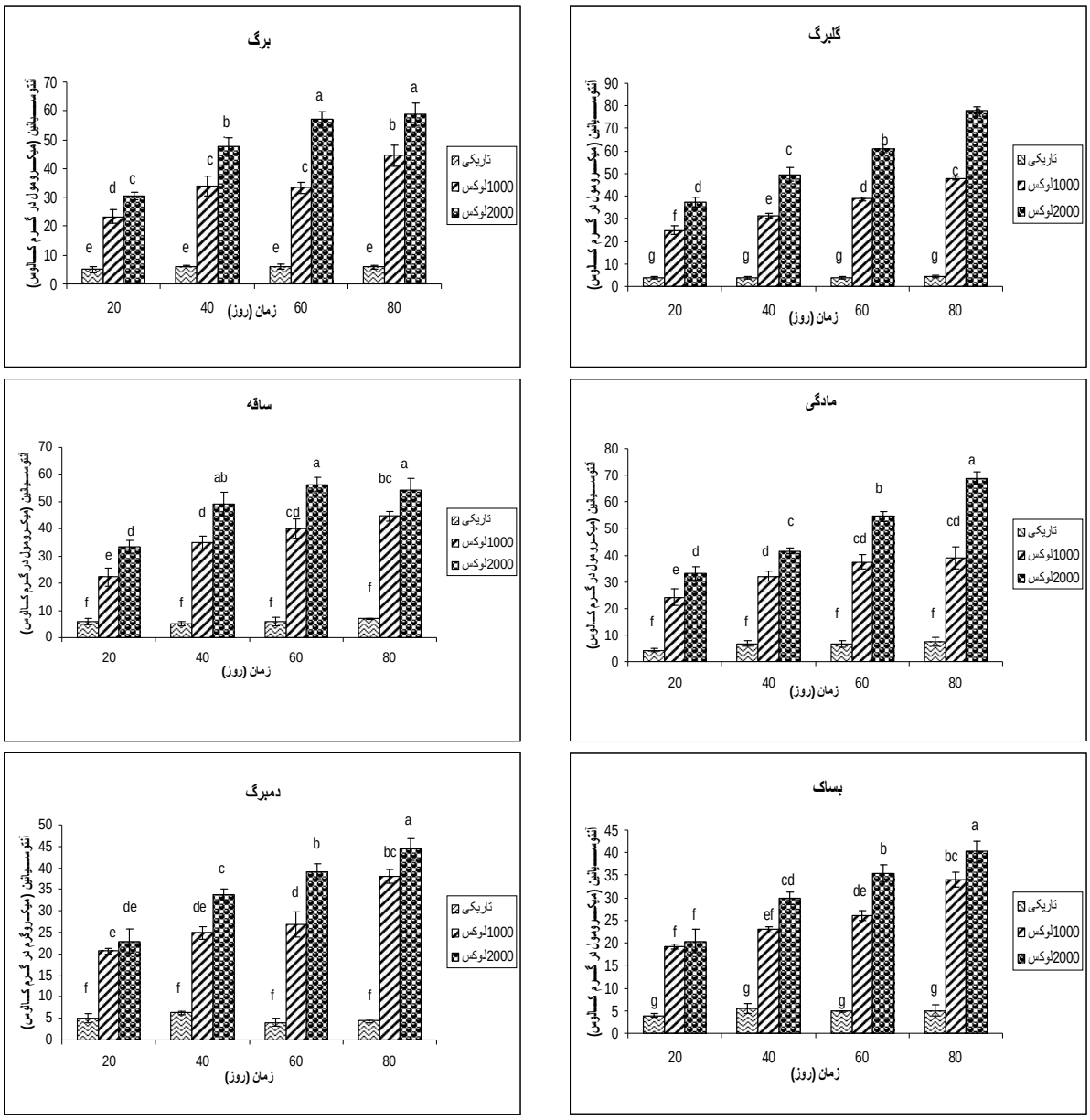

**شکل 4- اثر تاریکی، نور 1000 و 2000 لوکس بر میزان آنتوسیانین کالوس برگ، ساقه، دمبرگ، بساک، گلبرگ و مادگی گل محمدی (*Rosa damascena*) در 20، 40، 60 و 80 روز پس از بنیان گذاری کالوس (با ضریب اطمینان 95%).**

**Figure 4- Effects of dark and light (1000 and 2000 lux) on anthocyanin content of calli from leaf, petiole, stem, pistil, petal and anther explants of *Rosa damascen*a during 20, 40, 60 and 80 days after callus initiation.**




**شکل 5- اثر تاریکی، نور 1000 و 2000 لوکس بر میزان کلروفیل کالوس برگ، ساقه، دمبرگ، بساک، گلبرگ و مادگی گل سرخ مینیاتور (*Rosa miniature*) در 20، 40، 60 و 80 روز پس از بنیان گذاری کالوس (با ضریب اطمینان 95%).**

**Figure 5- Effects of dark and light (1000 and 2000 lux) on chlorophyll content of calli from leaf, petiole, stem, pistil, petal and anther explants of *Rosa miniature* during 20, 40, 60 and 80 days after callus initiation.**




**شکل 6- اثر تاریکی، نور 1000 و 2000 لوکس بر میزان آنتوسیانین کالوس برگ، ساقه، دمبرگ، بساک، گلبرگ و مادگی گل سرخ مینیاتور (*Rosa miniature*) در 20، 40، 60 و 80 روز پس از بنیان گذاری کالوس (با ضریب اطمینان 95%).**

**Figure 6- Effects of dark and light (1000 and 2000 lux) on anthocyanin content of calli from leaf, petiole, stem, pistil, petal and anther explants of *Rosa miniatur*e during 20, 40, 60 and 80 days after callus initiation.**

بررسی بنیان گذاری کالوس که به معنای مشاهده‌ی اولین تورم سلولی در جداکشت می-باشد، در ریزنمونه‌های مختلف دو گونه‌ی مورد آزمایش تحت شرایط تاریکی و روشنایی نشان داد که در هر دو گونه، جداکشت‌های رویشی در معرض تاریکی، در هفته‌ی اول، کالوس‌زایی را با

درصد بالایی آغاز کردند و نور این رخداد را تا هفته‌های بعدی به تاخیر انداخت. به علاوه، در تاریکی، جداکشت‌های زایشی گل سرخ مینیاتور در هفتهٔ دوم و جداکشت‌های گل محمدی در هفته‌ی سوم، بنیان‌گذاری بالای کالوس را نشان دادند. در نور، این جداکشت‌ها مشابه شرایط تاریکی کالوس‌زایی را با تاخیر شروع کردند. بنابراین، تاریکی و جداکشت‌های رویشی، اثر تحریکی روی القای کالوس‌زایی در فاصله‌ی زمانی کوتاه‌تر داشتند. گزارشات بسیاری وجود دارد که تاریکی را به عنوان عامل موثر در شروع کال‌زایی معرفی نمودند (Nakamura *et al.*, 1999; Asano *et al.*, 2001; Prasertsongskun, 2003; Islam *et al.*, 2005; Pontaroli and Camadro, 2005). در پژوهشی (Tabaeezadeh and Khosh-Khui, 1980) که تولید کالوس از بساک‌های دو گونه‌ی *Rosa damascena* و *Rosa hybrid* با موفقیت انجام شد، گزارش گردید که نه تنها نور، برای تحریک و تشکیل کالوس ضروری نمی باشد بلکه این فرایند را مهار می کند. گزارشات دیگری نیز مبنی بر اثر ممانعتی نور بر کالوس‌زایی در گیاهان دیگر وجود دارد. در پژوهش دیگری گزارش شد که در حضور نور، فعالیت IAA اکسیداز افزایش یافته که سبب تغییر در تعادل اندوژنی بین اکسین و سیتوکینین گشته و تحریک کالوس‌زایی را کاهش و به تاخیر می‌اندازد (Gasper *et al.*, 1989). القای کالوس‌زایی در واریته‌های مختلف گیاهان، تنوع زیادی نشان داده وبر اساس پژوهش‌های انجام شده تاکنون، به نظر می‌رسد که این فرایند به فعل و انفعالات ژنوتیپی مرتبط بوده و برای واریته‌های مختلف اختصاصی عمل می‌کند (Birsin *et al.*, 2001; Islam *et al.*, 2005).

گزارشی مبنی بر مقایسه جداکشت‌ها در این دو جنس وجود ندارد. به نظر می‌رسد که پتانسیل پرتوانی و میزان تمایز اندام‌ها و در نتیجه توانایی تمایززدایی آنها که در اندام‌های گلی (گلبرگ، بساک و مادگی) و نوشاخه‌ای متفاوت است، عامل موثری در تفاوت زمان بنیان گذاری کالوس در جداکشت‌های مختلف باشد. قابل ذکر است که در فرایند بنیان گذاری کالوس، ابتدا تمایززدایی و سپس تقسیم و رشد انجام می‌شود که انجام و سرعت این فرایندها به نوع گونه‌ی گیاهی و نوع جداکشت‌های مختلف بستگی دارد.

مطالعه‌ی نرخ رشد نشان داد که کالوس‌های 20 روزه‌ی گل سرخ مینیاتور نسبت به گل محمدی حجم بیشتر و در نتیجه نرخ رشد بالاتری داشتند به غیر از بساک که در دو گونه تفاوت محسوسی نشان نداد. احتمال می‌دهیم نوع گونه‌ی گیاهی و ژنوتیپ که تاثیر قابل توجه آن در بالا نیز ذکر شد، در ایجاد این ویژگی، عامل موثری باشد و به طور کلی گل سرخ مینیاتور در فرایند ریز افزایی[1]، کال زایی، بنیان گذاری و نرخ رشد کالوس موفقیت بیشتری نشان داد.

محتویات کلروفیلی و آنتوسیانینی کالوس‌های سفید رنگ رشد یافته در تاریکی، نسبت به انواعی که تحت نور 1000 و 2000 لوکس قرار داشتند، بسیار کم و ناچیز بود در حالی‌که کالوس‌

1 Micropropagation

های در معرض نور، غلظت‌های قابل توجهی از این رنگدانه ها را در سلول‌های خود ذخیره کردند. مقایسه‌ی جداکشت‌ها در گل محمدی نشان داد که کالوس برگ در مقایسه با سایر جداکشت‌ها بیشترین و بساک و دمبرگ کمترین میزان کلروفیل را دارا بودند. کلروفیل کالوس جداکشت‌های ساقه، گلبرگ و مادگی حدواسط این میزان بود. به طور مشابه در گل سرخ مینیاتور نیز کالوس‌های ساقه‌ای، برگی، مادگی و گلبرگی نسبت به دمبرگ و بساک محتوی غلظت‌های بیشتری از کلروفیل بودند. همچنین میزان آنتوسیانین کال‌های گلبرگ و مادگی هردو گونه نسبت به سایر جداکشت ها بیشتر بودند. به طور کلی کالوس‌ها نسبت به نور و تاریکی پاسخ‌های متفاوتی نشان می‌دهند و محتویات رنگدانه‌ای آنها یکی از عواملی است که بسیار وابسته به نورمی-باشد. نور، بر روی فرایند نمو کلروپلاست و در نتیجه بر میزان کلروفیل موثر است. به‌طور کلی، تولید کلروپلاست از پیش‌کلروپلاست (پروپلاست) یک پروسه وابسته به نور است که در اثر کمبود نور به مسیر دیگری مانند تشکیل اتیوپلاست منحرف می‌گردد (Schoefs, 2000). واسیل[1] و هیلدربرانت[2] (1965) گزارشاتی مبنی بر پاسخ متفاوت بافت‌ها و اندام‌های مختلف به مسیر تولید کلروفیل در نور دارند که دلیلی بر تایید نتایج به دست آمده، می باشد (Vasil and Hildebrandt, 1965). براساس مشاهدات ثبت شده در این پژوهش، کالوس جداکشت‌های گل سرخ مینیاتور در تولید و ساخت کلروفیل تواناتر از گل محمدی می باشند که این تفاوت به همراه تفاوت‌های قبلی (بنیان گذاری و نرخ رشد کالوس)، مربوط به تفاوت‌های ژنتیکی و گونه‌ای-می باشند.

مطالعه‌ی دو گونه نشان داد که در هر دو شدت نوری، محتویات آنتوسیانینی کالوس‌ها نسبت به تاریکی افزایش قابل توجهی دارد. بیوسنتز آنتوسیانین در بافت‌های گیاهی یا وابسته به نور است و یا به‌وسیله‌ی آن تسهیل و افزایش می‌یابد (Vinterhalter *et al.*, 2007; Simoes *et al.*, 2009; Ram *et al.*, 2011). نور یک سیگنال مهم نموی در گیاهان است که بر تجمع آنتوسیانین‌ها (محصول رنگین و نهایی مسیر پلی فنولیک) به‌واسطه‌ی فعال کردن فاکتورهای رونویسی که مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها را تنظیم می‌کنند، موثر است (Irani and. Grotewold, 2005; Vinterhalter *et al.*, 2007). آنزیم مهم مسیر سنتز فلاونوئیدها، چالکون سینتاز (CHS) می‌باشد که به وسیله‌ی نور، پس از یک فاز تاخیری چند ساعته فعال می‌گردد یعنی برای فعال‌سازی آنها به چند ساعت نور نیاز دارد. این ویژگی اثر نور در بیوسنتز فلاونوئیدها از جمله آنتوسیانین‌ها را نشان می‌دهد (Irani and Grotewold, 2005). همچنین گزارشات زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد، جنس‌ها، گونه‌ها و حتی واریته‌های یک گونه واکنش‌های متفاوتی را نسبت به مراحل مختلف کشت بافت و تولید

1 Vasil
2 Hildebrandt

رنگدانه‌ها نشان می‌دهند (Salehi and Khosh-Khui, 1996; Pati *et al*., 2005).

## نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از مراحل مختلف نشان داد که تمامی فاکتورهای مقایسه ای و مورد تحقیق در این پژوهش (تعیین نسبت های هورمونی مناسب، بنیان گذاری کالوس، نرخ رشد کالوس و میزان سنتز رنگیزه ها) هم در سطح جداکشت و هم در سطح گونه ای، تفاوت معنی دار داشته و وابسته به ژنوتیپ، نوع سلول، بافت، و اندام و همچنین پتانسیل پرتوانی و میزان تمایز آن ها (تفاوت در توانایی تمایززدایی) است. در این پژوهش نور به عنوان عامل بازدارنده در بنیان گذاری کال ها و عامل تحریک کننده در سنتز کلروفیل و آنتوسیانین معرفی شد.

## سپاس گذاری

با تشکر فراوان از جناب آقای دکتر علی مصطفوی عضو هیئت علمی گروه شیمی دانشگاه شهید باهنر کرمان و جناب مهندس معاذاللهی و پرسنل زحمت‌کش کارخانه‌ی گلاب زهرا که در مراحل مختلف این پژوهش، همکاری صمیمانه مبذول داشتند.

منابع

Arene L, Pellegrino, C, Gudin, SA (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.

Asano S, Ohtsubo S, Nakajima M, Kusunoki M, Kaneko K, Katayama H, Nawa Y (2001). Production of anthocyanins by habituated cultured cells of nyoho strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). Food Science Technology Research 8: 64–69.

Banthorpe DV, Barrow SE (1983). Monoterpene biosynthesis in extracts from cultures of *Rosa damascena*. Phytochemistry 22: 2727–2728.

Birsin MA, Onde S, Ozgen M (2001). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of oat (*Avena sativa* L.). Turkish Journal Biology 25: 427–434.

Boskabady MH, Kiani S, Rakhshandeh H (2006). Relaxant effects of *Rosa damascena* on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s). Journal of Ethnophurmacology 106: 377–382.

Burger DW, Liu L, Zary KW, Lee CI (1990). Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L. Plant Cell Tissue Organ Culture 21: 147–152.

Clairmont KB, Hagar WG, Davis EA (1986). Manganese toxicity to chlorophyll synthesis in tobacco callus. Plant Physiology 80: 291–293.

Dixon RA, Gonzales RA (1996). Plant Cell Culture : A Practical Approach. 2nd Ed. IRL Press, pp. 1–230, ISBN 0-19-963402-5.

Gasper T, Penel C, Thorpe T, Greppin H (1982). Peroxidases: A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. University of Geneva press, Geneva, Switzerland.

Hildebrandt AC, Wilmar JC, Johns AJ, Riker H (1963). Growth of edible chlorophyllous plant tissue *in vitro*. American Journal of Botany 50: 248–254.

Hill GP (1967). Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose. Nature 216: 596–597.

Horn W (1992). Micropropagation of roses, In: Bajaj YPS (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Foresty. Springer-Verlag, Germany. pp. 320–342.

Hsia C, Korban SS (1996). Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis* minima. Plant Cell Tissue and Organ Culture 44: 1–6.

Hudson TH, Dale EK, Davies FT, Geneve RL (2002). Plant propagation principles and practices. 6th ed Prentice Hall of India Private Limited. New Delhi, India. pp. 1–770.

Igarashi K, Inagaki, K (1991). Effects of the major anthocyanin of wild grape (*Vitis coignetiae*) on serum lipid levels in rats. Agricultural and Biological Chemistry-Journal 55: 285–287.

Irani NG, Grotewold E (2005). Light-induced morphological alteration in anthocyanin-accumulating vacuoles of maize cells. BMC Plant Biology 20 (5): 7.

Islam MM, Ahmed M, Mahaldar D (2005). *In Vitro* callus induction and plant regeneration in seed explants of Rice (*Oryza Sativa* L.). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 1: 72–75.

Jabbarzadeh Z (2003). Effective factors on micropropagation of Damask rose. MS.c. Thesis, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Jabbarzadeh Z, Khosh-Khui M (2005). Factor affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). Scientia Horticulturae 105: 475–482.

Kafi M, Riyazi Y (2001). Culture of Damask rose and production of Golab. Nashre Parchin, Iran.

Kaul K, Sabharwal PS (1974). Kinetin-induced changes in a-aminolevulinic acid dehydratase of tobacco callus. Plant Physiology 54: 644–648.

Lloyd D, Roberts AV, Short KC (1988). The induction *in vitro* of adventitious shoots in Rosa. Euphytica 37: 31–36.

Mahmood N, Piacente S, Pizza C, Barke A, Khan IA, Haj AJ (1996). The Anti-HIV activity and mechanisms of action of puru compounds isolated from *Rosa damascena*. Biochemical and Biophysical Research Communications 229: 73–79.

Mori T, Sakurai M, Shigeta J, Yoshida K, Kondo T (1993). Formation of anthocyanins from cells cultured from different parts of strawberry plants. Journal of Food Science 58: 788–792.

Murashige T, Skoog FA (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15: 473–497.

Nakamura M, Takeuchi Y, Miyanaga K, Seki M, Furusaki Sh (1999). High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus. Biotechnology Letters 21: 695–699.

Pati PK, Rath SP, Sharma M, Sood A, Ahuja PS (2005). *In vitro* propagation of rose—a review. Biotechnology Advances. Available online at www.sciencedirect.com.

Pontaroli AC, Camadro EL (2005). Plant regeneration after long term callus culture in clones of *Asparagus officinalis* L. Biocell 29: 313–317.

Prasertsongskun S (2003). Plant regeneration from callus culture of vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash). Songklanakarin Journal of Science Technology 25: 637–642.

Rakhshandeh H, Hosseini M (2006). Potentiation of pentobarbital hypnosis by *Rosa damascena* in mice. Indian Journal Exprimental Biology 44: 910–912.

Ram M, Prasad KV, Kaur C, Singh SK, Arora A, Kumar S (2011). Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. Plant cell, tissue and organ culture 104: 171–179.

Rout GR, Debata BK, Das P (1992). *In vitro* regeneration of shoots from callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora. Indian Journal Exprimental Biology 30: 15–18.

Salehi H, Khosh-Khui M (1996). Micropropagation of miniature rose cultivars. Iran Agricalture Research 15: 51–67.

Schneider F (2005). Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa sp*. L.) and globe artichoke (*Cynara scolymus* L.), Ph.D. Thesis. Technical University Munich, Freising. Germany. 145.

Schoefs B (2000). The formation of chlorophyll from chlorophyllide in leaves containing proplastids is a four-step process. the FEBS Journals 458: 243–246.

Seeni S, Gnanam A (1981). Relationship between chlorophyll concentration and photosynthestic potential in callus cells. Plant and Cell Physiology 22: 1131–1135.

Simoes C, Bizarri CHB, da Silva CL, de Castro TC, Coutada LCM, da Silva AJR, Albarello N, Mansur E (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. Plant Physiology and Biochemistry 47: 895–903

Tabaeezadeh Z, Khosh-Khui M (1981). Anther culture of Rosa. Scientia Horticulturae 15: 61–66.

Timberlake CF, Henry BS (1986). Plant pigments as natural food colors. Endeavour 10: 31.

Vaezi K (2001). Micropropagation of Narvane Rana by Tissue culture. Nashriye Daneshgahe Tarbiyat Moallem 11: 3–4.

Vasil IK, Hildebrandt AC (1965). Growth and chlorophyll production in plant callus tissues grown *in vitro*. Planta 68: 69–82.

Vinterhalter B, Ninkovic S, Kozomara, Vinterhalter D (2007). Carbohydrat nutrition and anthocyanin accumulation in light grown and etiolated shoot cultures of carob (*Ceratonla siliqual*). Archives of Biological Sciences 59: 51–56.

Wang J, Bao MZ (2007). Plant regeneration of pansy (*Viola wittrockiana*) ‘Caidie’ via petiole-derived callus. Scientia. Horticulturae 111: 266–270.

Yi-xun Y, Ling L, Juan-xu L, Jing W (2009). Plant regeneration by Callus-mediated protocorm-like body induction of *Anthurium andraeanum*. Horticultural and Agricultural Science in China 8: 572–577.

# The Effect of Different Light Intensities on Callogenesis and Calli Pigments Content of Shoot and Floral Explants of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa miniature*

**Abdirad S.[*1], Rezanejad F.[2], Kalantari K.F.[3]**

[1] MSc Student, Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2 Associate Professor, Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3 Professor, Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

## Abstract

This study was conducted to compare the ability of callus production between shoot (leaf, petiole and stem) and flower (petal, pistil and anther) organs, as well as chlorophyll and anthocyanin accumulation in calli obtained from these explants in dark and light in *Rosa miniature* and *Rosa damascena*. Miniature rose and damask rose have become increasingly popular and economically important in recent years. *In vitro* regeneration method has a great commercial value in the rose propagation industry. The sterilized explants were cultured in modified MS medium supplemented by various concentrations of 2, 4-D (1, 2, 3, and 4 $mg.l^{-1}$) and BAP (0.1, 0.5, 1 and 1.5 $mg.l^{-1}$). The samples were kept under 1000 and 2000 lux white light intensities and dark. Combinations of 4 mg $l^{-1}$ 2, 4-D and 1.5 mg $l^{-1}$ BAP in *Rosa damascena* were the most suitable treatments for callus production whereas various explants of *Rosa miniature* had different response to different growth regulator combinations. In the dark, callus initiation was quicker compared to the light. In addition, callus production of shoot explants were begun faster than floral ones. Callus initiation of floral explants from *Rosa miniature* occurred in $2^{th}$ week after culturing, whereas in *Rosa damascena* observed in $3^{th}$ week. The growth rate of calli from all explants (except anther) of *Rosa miniature* was more than *Rosa damascena*. The dark grown calli contained very low chlorophyll and anthocyanin concentrations whereas these contents increased remarkably at 1000 and 2000 lux (especially 2000 lux) light intensity. Leaf calli in *Rosa damascena* and stem calli in *Rosa miniature* produced maximum values of chlorophyll pigments whereas in both, anther and petiole calli had minimum amounts. The calli obtained of petal and pistil explants accumulated high concentration of anthocyanin pigments whereas the lowest values recorded from anther and petiole calli in *Rosa miniature* and petiole calli in *Rosa damascena*.

**Keywords**: *Callus, Chlorophyll, Anthocyanin, Dark, Light, Rosa damascena, Rosa miniature.*

[*] Corresponding Author: Abdirad S. Tel: 09175375788 Email: abdirad_60@yahoo.com