مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره هشتم، زمستان ۱۳۹۳ (۵۵-۴۷)

Crop Biotech.
Winter (2015) 8: 47-55.

طراحی، ساخت و استفاده از سیستم غرقاب موقت برای ریزازدیادی *Rosa damascena* Mill.

علی بوش[۱]، احمد معینی[۲*]، حمید دهقانی[۳]، زهرا موحدی[٤]

۱، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۲، ۳، دانشیاران، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ٤، استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۹- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵)

Design, Fabrication and the Use of Temporary Immersion System for Micropropagation of *Rosa damascena* Mill.

Ali Boosh[1], Ahmad Moieni[2*], Hamid Dehghani[3], Zahra Movahedi[4]

1, M.Sc., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 2, 3, Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 4, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

(Received: Dec. 10, 2014 -Accepted: Mar. 16, 2015)

چکیده

بیورآکتورهای گیاهی می‌توانند هزینه‌های ریزازدیادی را کاهش داده و روش تکثیر را از نظر اقتصادی توجیه‌پذیر کنند. در این پژوهش برای ریزازدیادی گیاه گل محمدی، بیوراکتوری از نوع سیستم غرقاب موقتی، طراحی و ساخته شد و به منظور بهینه‌سازی این سیستم، آزمایش‌هایی جهت بررسی انواع شیلنگ مورد استفاده در سیستم، اندازه ظروف و بسترهای مختلف داخل ظروف انجام شدند. همچنین، سیستم غرقاب موقتی با محیط‌های کشت جامد و مایع دارای پل کاغذی مقایسه شدند. بطورکلی نتایج نشان داد که سیستم غرقاب موقتی با شیلنگ سفید سیلیکونی با میانگین تولید ۱۱ نوساقه در هر ریزنمونه، بیشترین تعداد نوساقه را تولید کرده است. همچنین سیستم غرقاب موقتی با بطری شیشه‌ای ml ٦۰۰، بیشترین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه را در مقایسه با سایر تیمارها داشت (۱۰/۳٦ نوساقه). نتایج آزمایش دیگری نشان داد که سیستم غرقاب موقتی بدون بستر با میانگین تولید ۱۰/۷٦ بهترین پاسخ را داشته است. سیستم غرقاب موقت همچنین به طور معنی داری تعداد نوساقه بیشتری در هر ریزنمونه را در مقایسه با محیط های کشت جامد و مایع تولید کرد (به ترتیب ۱۰/٦٦، ۲/٥٦ و ٥/٦٦ نوساقه).

واژه‌های کلیدی: گیاه گل محمدی، بیوراکتور، ریزازدیادی، نوساقه زایی.

Abstract

The plant bioreactors can be used for *in vitro* plant propagation and leading to a decrease in the costs of micropropagation. In this research, a simple bioreactor including a temporary immersion system was designed and made for Damask rose micropropagation. To optimize this system, the effects of the tube type, container size and different substrates were investigated in the independent experiments. Also, the temporary immersion system was compared with the solid and liquid media. Results showed that the highest number of the shoots in the temporary immersion system were obtained by the use of the white tube (11 shoots per explant), 600 ml glass container (10.36 shoots per explant) and without any substrate (10.76 shoots per explant). Also, temporary immersion system was significantly better than the solid and liquid media for shoot production (10.66, 2.56 and 5.66, respectively).

Keywords: *Rosa damascena* Mill., Bioreactor, Micropropagation, Shoot Regeneration.

* نویسنده مسئول: احمد معینی
E-mail: moieni_a@modares.ac.ir

مقدمه

گیاه .*Rosa damascena* Mill از قدیمی‌ترین گیاهان خانواده رز می‌باشد که استفاده از آن به گذشته‌ای دور باز می‌گردد. خواص دارویی و اثرات درمانی این گیاه در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است و طی پژوهش‌هایی بر وجود خواص ضدباکتریایی، میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در روغن فرار گیاه گل محمدی تأکید شده است (Bonga and Aderkas, 1992; Achuthan *et al*., 2003; Ozkan *et al*., 2004). این گیاه ابتدا ناشناخته و وحشی بوده و هنوز هم به صورت خودرو و وحشی در قفقاز، سوریه، مراکش و اسپانیا رویش دارد (Gaault and Synge, 1971). استفاده از پاجوش، روش رایج تکثیر این گیاه است اگرچه از طریق قلمه نیز امکان پذیر است. امروزه ریزازدیادی از طریق کشت بافت یکی دیگر از روش‌های تکثیر محسوب می‌شود که به طرق مختلف از جمله با استفاده از بیوراکتور می‌تواند انجام شود. در حقیقت به کشت سلول، بافت یا اندام گیاهی در محیط کشت و در مقیاس بزرگ و در شرایط کنترل شده و برنامه‌ریزی شده بیوراکتور اطلاق می‌شود .استفاده از بیوراکتور در تکثیر گیاهان، اولین بار در سال ۱۹۸۱ در گیاه بگونیا گزارش شد (Takayama and Akita, 1994). کاربرد بیوراکتورهای گیاهی در ریزازدیادی گیاهان می‌تواند این هزینه‌ها را کاهش داده و روش تکثیر را از نظر اقتصادی توجیه‌پذیر کند (Aitken-Christie *et al*., 1995). در حقیقت بخش اعظم هزینه‌های جاری ریزازدیادی، به‌خصوص در کشورهای پیشرفته مربوط به دستمزد می‌باشد و بسیاری از آزمایشگاه‌ها مشغول تحقیق در این مورد هستند که چگونه می‌توان با کاهش تعداد زیرکشت‌های، هزینه تولید را پائین آورد. استفاده از ظروف کشت بزرگ و محیط کشت مایع می‌تواند به مکانیزه کردن ریزازدیادی و کاهش هزینه آن کمک کند (Vishnevestsky *et al*., 1997). سیستم غرقاب موقتی[1] برای اولین مرتبه توسط Alvard (1993) توسعه یافت. کشت در محیط غذایی مایع با استفاده از یک سیستم غوطه‌ورسازی موقت با تعداد دفعات متفاوت غوطه‌ورسازی، سیستم غرقاب موقتی یا بیوراکتور تناوبی نامیده می‌شود که برای بهبود کیفیت گیاه و افزایش نرخ تکثیر در بسیاری از گیاهان استفاده می‌شود (Alvard, 1995). ریزازدیادی در محیط کشت مایع دارای مزیت‌های زیادی از جمله کاهش هزینه‌های تولید، افزایش میزان سرعت رشد و یکنواختی در محیط کشت نسبت به محیط کشت جامد می‌باشد، اما بزرگترین عیب و مشکل این روش آبدار شدن[2] یا شیشه ای شدن مواد گیاهی است. در سیستم غرقاب موقتی محیط کشت مایع به صورت موقت و تناوبی در تماس با مواد گیاهی قرار می‌گیرد که این روش باعث کاهش میزان شیشه‌ای شدن مواد گیاهی می‌شود. همچنین به علت کاهش تعداد ظروف کشت، افزایش میزان رشد و نمو و بهره‌برداری از گیاه، نیاز به تعداد نیروی متخصص کمتر و حذف هزینه‌های عامل ژلی، باعث کاهش هزینه‌های تولید شده و در بعضی از کشورها تجاری‌سازی شده است (Smittinan, 2001). در ایران تکثیر گیاه گل محمدی به صورت سنتی (قلمه و پاجوش) انجام می‌گیرد و با وجود اهمیتی که این گیاه در ایران و دنیا دارد، کارهای کمی در زمینه تکثیر آن از طریق کشت بافت انجام شده است. برای حفظ و توسعه کشت ارقام برتر این گیاه (از لحاظ اسانس تولیدی و سایر خصوصیات مطلوب به ویژه مرتبط با گل)، انجام آزمایشاتی جهت تکثیر انبوه آن از طریق کشت بافت بسیار ضروری است.

در روش رایج ریزازدیادی با استفاده از محیط کشت جامد نیاز به تعداد زیادی ظرف شیشه‌ای،

1. Temporary Immersion System (TIS)
2. Hyperhydricity

عامل ژلی و تعدادی نیروی متخصص برای کشت است که منجر به افزایش هزینه‌های تولید می‌شود (Debergh, 1983). در حالی که ممکن است بتوان این هزینه ها را با استفاده از بیوراکتور کاهش داد. لذا در این پژوهش بیورآکتوری از نوع سیستم غرقاب موقتی طراحی و ساخته شد و به منظور بهینه‌سازی این سیستم، آزمایشاتی جهت بررسی انواع شیلنگ مورد استفاده سیستم، اندازه ظروف و بسترهای مختلف داخل ظروف انجام شد. همچنین سیستم غرقاب موقتی با محیط های کشت جامد و مایع مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

به منظور ریزازدیادی *Rosa damascena* Mill. در سیستم غرقاب موقت، ابتدا این سیستم طراحی و ساخته شد. دستگاه سیستم غرقاب موقت ساخته شده از قسمت‌های مختلفی تشکیل می‌شد شامل: ۱- شیلنگ‌های قابل اتوکلاو کردن (برای اتصال ظروف مورد نظر) ۲- فیلتر هوا قابل اتوکلاو کردن (برای جلوگیری از ورود آلودگی از طریق هوا) ۳- پمپ هوا (برای ایجاد فشار هوای مورد نظر) ۴- تایمر (برای تنظیم مدت زمان غرقاب محیط کشت) و ۵- دریچه‌های مغناطیسی (برای خروج هوا). در حقیقت این دستگاه ساخته شده، بیوراکتور تناوبی از نوع BIT یا Twin Flasks System بود (Escalona *et al.*, 1999).

نحوه کارکرد سیستم غرقاب موقت (بیوراکتور تناوبی) به این شرح می‌باشد که این سیستم دارای دو ظرف شیشه‌ای یا پلاستیکی (قابل اتوکلاو کردن) است که محیط کشت در یک ظرف و مواد گیاهی در ظرف دیگر قرار می‌گیرند. فشار هوایی که از پمپ خارج می‌شود از طریق شیلنگ به سطح محیط کشت، وارد می‌شود و در نتیجه محیط کشت از طریق شیلنگ دیگری به ظرف دوم منتقل می‌شود. ظرف دوم که موادگیاهی در آن قرار دارند برای مدت زمان مشخص در تماس با محیط کشت مایع قرار می‌گیرد. سپس بعد از اتمام مدت زمان تعریف شده، پمپ دوم شروع به کار می‌کند و محیط کشت را به ظرف اول برمی‌گرداند. با برنامه دادن به زمان‌سنج‌هایی (تایمر) که در مسیر پمپ‌ها قرار گرفته‌اند، مدت زمان غرقاب کردن و فاصله زمانی بین دو غرقاب کردن متوالی تنظیم می‌شود. لازم به ذکر است که هوای اضافی که مربوط به کارکردن پمپ‌ها می‌شود، از دریچه‌های مغناطیسی خارج می‌شود. پس از ساخت دستگاه، چند آزمایش با هدف بهبود ریزازدیادی در این سیستم به شرح ذیل انجام شد:

در کلیه آزمایش‌ها، ریزنمونه‌ها شامل نوساقه‌های دارای جوانه جانبی و تقریبا به طول ۲ و قطر ۱ سانتی‌متر بودند که بعد از ضدعفونی در محیط کشت پایه MS تغییر یافته جامد برای مدت ۱۵ روز کشت شدند. سپس ریزنمونه‌های رشد کرده به سیستم غرقاب موقت منتقل شدند. در همه آزمایش‌ها از محیط کشت پایه تغییر یافته (Mahmoudi *et al.*, 2012)، حاوی BAP ۴ $mg\ l^{-1}$ استفاده شد. در محیط کشت جامد از ۷ $g\ l^{-1}$ آگار-آگار استفاده شد. شاهد در همه آزمایش‌ها یکسان بود و از یک بطری شیشه‌ای ۲۵۰ ml با همان ترکیب محیط کشت و به صورت جامد تشکیل می‌شد. همچنین کلیه آزمایش‌ها با ۳ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

آزمایش اول: بررسی انواع شیلنگ در سیستم غرقاب موقت

در این آزمایش از شیلنگ‌های سفید سیلیکونی و مشکی برای مقایسه استفاده شد. همچنین از محیط کشت جامد به عنوان شاهد استفاده گردید.

آزمایش دوم: بررسی اندازه ظروف در سیستم غرقاب موقت

در این آزمایش تیمارها عبارت بودند از بطری شیشه‌ای ۶۰۰ ml، بالن شیشه‌ای ۵ لیتری و بطری

شیشه‌ای ml ۲۵۰ با محیط کشت جامد (شاهد).

آزمایش سوم: بررسی بسترهای مختلف در سیستم غرقاب موقت

در این آزمایش از بستر فویل آلومینیوم، ماسه، سیستم غرقاب موقت بدون بستر، محیط کشت جامد (شاهد) استفاده شد.

آزمایش چهارم: بررسی مقایسه‌ای سیستم غرقاب موقت با محیط های کشت کلاسیک جامد و مایع

تیمارهای این آزمایش به شرح ذیل بودند:

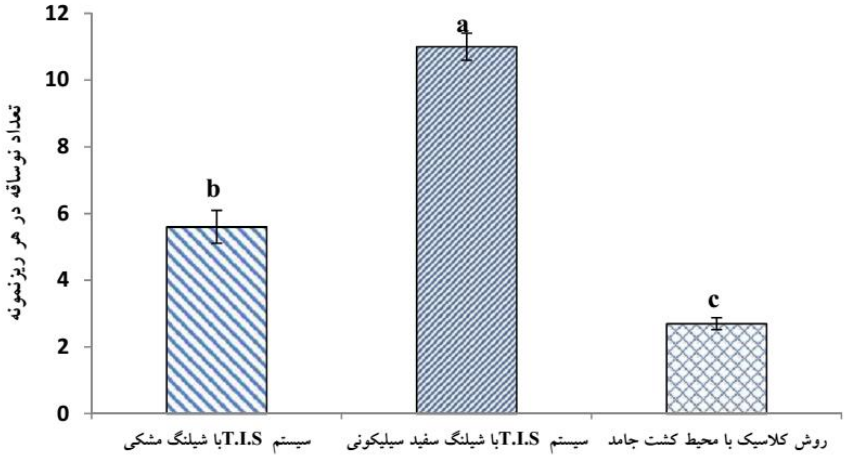
- سیستم غرقاب موقت (T.I.S) با استفاده از بطری شیشه‌ای ml ۶۰۰ و بدون بستر و حاوی ml ۲۵۰ محیط کشت
- محیط کشت مایع حاوی پل کاغذی در ظروف شیشه‌ای ml ۲۵۰ حاوی ml ۱۰۰ محیط کشت
- محیط کشت جامد در ظروف شیشه‌ای ml ۲۵۰ حاوی ml ۱۰۰ محیط کشت

در تمام آزمایش‌ها، اثرات تیمارها بر روی مهم‌ترین صفت ریزازدیادی یعنی تعداد نوساقه در هر ریزنمونه بعد از ۳۰ روز بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز شده و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش‌ها نشان داد که ریزنمونه‌ها به‌خوبی در سیستم غرقاب موقت مستقر شده و از رشد و نمو خوبی برخوردار بودند و نتایج آزمایش‌ها به تفکیک ارائه می‌شوند.

آزمایش اول: تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف بین سیستم غرقاب موقت با شیلنگ سفید سیلیکونی، شیلنگ مشکی و محیط کشت جامد (شاهد) در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۱) نشان داد که سیستم غرقاب موقت با شیلنگ سفید سیلیکونی با میانگین ۱۱ نوساقه در هر ریزنمونه بیشترین تعداد نوساقه را داشته و سیستم غرقاب موقت با شیلنگ مشکی با میانگین ۵/۶۳ نوساقه در هر ریزنمونه، تعداد نوساقه کمتری را در مقایسه با شیلنگ سفید تولید کرده است. بطور کلی مقایسه میانگین تیمارها حاکی از آن است که سیستم غرقاب موقت صرف نظر از نوع شیلنگ، از شاهد (محیط کشت جامد) بهتر بوده است.



شکل ۱- مقایسه میانگین نوع سیستم کشت برای صفت متوسط تعداد نوساقه تولید شده در هر ریزنمونه

از عوامل برتری سیستم غرقاب موقتی بر محیط کشت جامد می‌توان از مایع بودن محیط کشت و تماس موقت و متوالی آن با مواد گیاهی، امکان جذب مواد غذایی توسط همه قسمت‌های گیاه و همچنین ورود هوای تازه و بویژه تاثیر مثبت آن روی فتوسنتز نام برد.

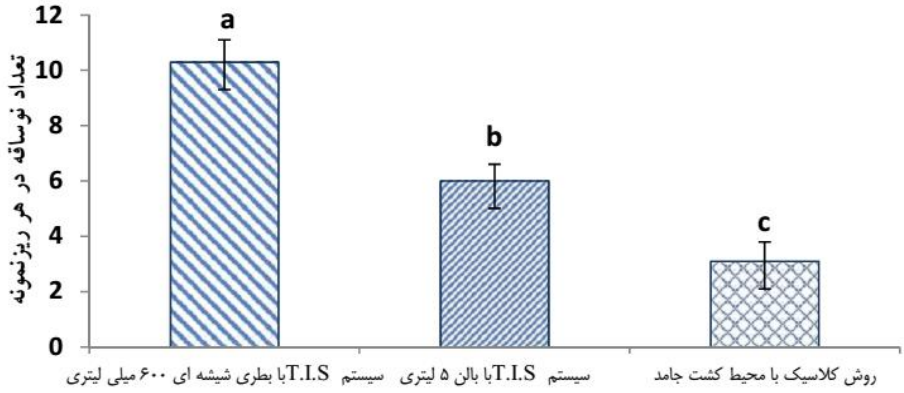
از علت‌های برتری شیلنگ سفید سیلیکونی در سیستم غرقاب موقتی بر شیلنگ مشکی را می‌توان به این علت دانست که شیلنگ‌های سفید بعد از اتوکلاو کردن سیستم، موادی را به محیط کشت ترشح نمی‌کنند و در نتیجه تغییری در pH محیط کشت و کیفیت آن ایجاد نمی‌شود. شیلنگ‌های مشکی در هنگام اتوکلاو کردن و بعد از آن موادی را به درون محیط کشت ترشح می‌کنند که این مواد باعث کاهش pH محیط کشت از ۵/۷ به ۴ می‌شوند. کاهش pH و اثرات مواد ترشح شده از شیلنگ مشکی باعث کاهش نوساقه‌زایی در سیستم با شیلنگ مشکی نسبت به سیستم دارای شیلنگ‌های سیلیکونی سفید می‌شود.

آزمایش دوم: در آزمایش قبل مشاهده شد که شیلنگ سفید سیلیکونی بهترین شیلنگ مورد استفاده در سیستم غرقاب موقتی است. لذا در سایر آزمایش‌ها از سیستم غرقاب موقت با شیلنگ سفید سیلیکونی استفاده شد.

نتایج تجزیه واریانس آزمایش دوم نشان داد که بین سیستم غرقاب موقت با بطری شیشه‌ای ml ۶۰۰، سیستم غرقاب موقت با بالن شیشه‌ایی ۵ لیتری و محیط کشت جامد (شاهد) اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۲) نشان داد که سیستم غرقاب موقت با بطری شیشه‌ای ml ۶۰۰ با میانگین ۱۰/۳۶ نوساقه در هر ریزنمونه، بیشترین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه را داشته و شاهد (محیط کشت جامد) با میانگین ۳ نوساقه در هر ریزنمونه کمترین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه را داشته است.

در این آزمایش، نیز، هر دو سیستم غرقاب موقت برتر از شاهد (محیط کشت جامد) بودند. همچنین سیستم غرقاب موقت با بطری شیشه‌ایی ml ۶۰۰ در مقایسه با بالن شیشه‌ای ۵ لیتری نتایج بهتری داشت. از علت‌های آن می‌توان به این نکته اشاره نمود که در ظرف بالن شیشه‌ای ۵ لیتری، در فاصله زمانی بین هر دو غرقاب، یعنی زمانی که گیاه نباید در تماس با محیط کشت باشد، مقداری محیط کشت در کف ظرف کشت باقی می‌ماند که باعث شیشه‌ای شدن مواد گیاهی و در نتیجه کاهش تعداد نوساقه در هر ریزنمونه می‌شد.

این در حالی است که در بطری شیشه‌ای ml ۶۰۰، همه محیط کشت از ظرف حاوی ریزنمونه ها خارج شده و هیچ محیط کشتی در فاصله زمانی بین هر دو غرقاب کردن در تماس با ریزنمونه‌ها نبود و در نتیجه مشکلی برای ریز نمونه‌ها ایجاد نمی‌شد و به همین دلیل، تعداد نوساقه‌ها در بالن شیشه‌ای ۵ لیتری از بطری شیشه‌ای ml ۶۰۰ کمتر بوده است.



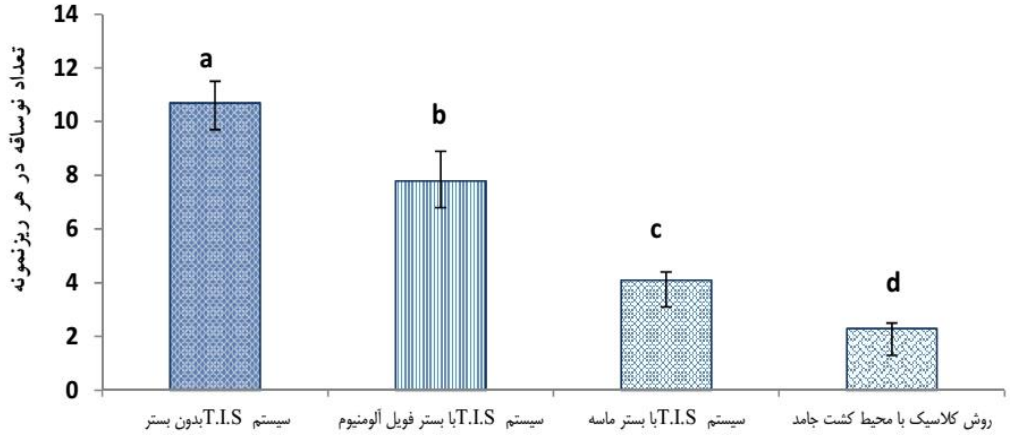
شکل۲- مقایسه میانگین ظروف مختلف برای صفت متوسط تعداد نوساقه تولید شده در هر ریز نمونه

به‌طور کلی، حجم ظرف در سیستم غرقاب موقتی از روش‌های مرسوم کشت بافت بزرگتر می‌باشد و در بعضی گیاهان، بزرگ بودن ظرف محیط کشت اثر مثبتی در نرخ تکثیر آنها دارد و در بعضی از گیاهان هم اثری ندارد. در گیاه مرزه، بزرگ بودن ظرف محیط کشت اثر مثبتی در ریزازدیادی گیاه داشته است. ظروف کوچک باعث تراکم زیاد گیاه در ظرف کشت می‌شود که طویل شدن نوساقه‌ها را کاهش داده است (Kruerger *et al*., 2007).

آزمایش سوم: تجزیه واریانس این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف بستر کشت، اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۳) نشان داد که سیستم غرقاب موقت بدون بستر با میانگین ۱۰/۷۶، بیشترین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه را داشت و شاهد (محیط کشت جامد) با میانگین ۲/۳۳، کمترین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه را داشت. در سیستم غرقاب موقت بدون بستر به علت اینکه تمام قسمت‌های ریزنمونه در تماس با محیط کشت مایع بوده و تمام ریزنمونه با هورمون و مواد غذایی مستقیماً تماس داشته و نیز به علت اینکه ریزنمونه‌ها به صورت افقی قرار می گیرند، باعث شده که اثر غالبیت انتهایی از بین رفته و اکثر مریستم‌های جانبی خفته موجود در جوانه‌های کشت شده فعال شده و نوساقه تولید کنند.

سیستم غرقاب موقت حاوی بستری از جنس فویل آلومینیومی، بعد از سیستم بدون بستر، بیشترین میانگین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه (۸/۱) را داشت. وجود بستر آلومینیومی به صورت یک پل و کشت ریزنمونه ها به صورت عمودی در آن باعث شده بود که نوساقه‌های فرعی و جانبی تولید شده، همه از قسمت پائینی نوساقه های اصلی باززایی شده بوجود آیند که علت آن را می‌توان به تماس نداشتن همه ارتفاع نوساقه های اصلی با محیط کشت مایع در هنگام غرقاب شدن دانست. لازم به ذکر می‌باشد که وجود بستر کشت، علاوه بر افزایش حجم کار، میزان آلودگی را نیز افزایش می‌دهد.

وجود بستر ماسه اگرچه از شاهد (محیط کشت جامد) بهتر بود اما به دلیل آلودگی زیاد در این حالت و بسیار سخت بودن کشت در داخل لامینار ایرفلو (به علت پخش شدن ماسه‌ها در هنگام کشت و عدم امکان قرار گرفتن شیلنگ برگشت محیط کشت در کف ظرف) نمی‌توان آن را جزء بسترهای مناسب دانست.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر نوع بستر در سیستم غرقاب موقتی روی صفت متوسط تعداد نوساقه تولید شده در هر ریز نمونه

در اکثر گزارش‌ها روی ریزازدیادی توسط سیستم غرقاب موقت، از بستر استفاده نشده است. در واقع سیستم غرقاب موقتی بدون بستر است و باید مواد گیاهی به صورت آزاد در ظرف مورد نظر قرار بگیرند. البته جهت جنین‌زایی با استفاده از این سیستم از بسترهایی با جنس پروپیلن و پلیمرها استفاده شده است (Winkelmann *et al*., 2004). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که وجود بستر باعث می‌شود که کیفیت گیاهچه‌های حاصله کمی بهتر از گیاهان بدست آمده در سیستم بدون بستر باشد.

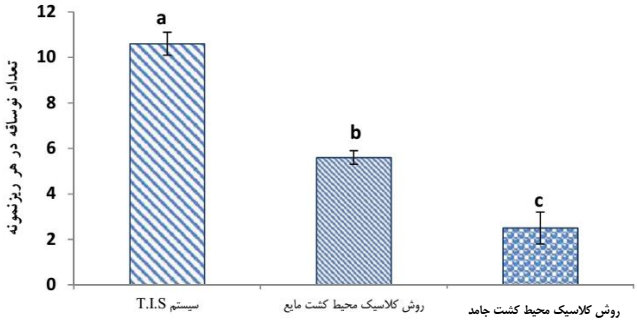
آزمایش چهارم: در این آزمایش، مقایسه‌ای بین سیستم غرقاب موقتی با روش کلاسیک با استفاده از محیط‌های کشت جامد و مایع دارای پل کاغذی انجام شد. تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای مختلف نوع کشت اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشته است.

نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴) نشان داد که تیمار سیستم غرقاب موقتی با میانگین ۱۰/۶۶ نسبت به سایر تیمارها بیشترین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه را داشته و محیط کشت جامد با میانگین ۲/۵۶ کمترین تعداد نوساقه در هر ریزنمونه را داشت.

محیط کشت مایع دارای پل کاغذی نیز تعداد نوساقه‌های بیشتری نسبت به محیط کشت جامد تولید کرده است به دلیل اینکه محیط کشت مایع در مقایسه با محیط کشت جامد، مواد غذایی را بهتر در اختیار ریزنمونه‌ها قرار می دهد.

در محیط کشت جامد، به دلیل سیال نبودن، بعد از مدتی مواد غذایی در مکانی که ریزنمونه در تماس با محیط کشت جامد بوده تمام و یا کم می‌شود و در نتیجه باعث کاهش رشد ریزنمونه در محیط کشت جامد نسبت به محیط کشت مایع شود و ضمناً در محیط کشت جامد میزان تماس ریزنمونه با محیط کشت در حداقل ممکن قرار دارد.

اکثر گزارشات نشان می‌دهند که سیستم غرقاب موقتی از روش کلاسیک کشت در محیط های کشت مایع و جامد بهتر بوده و نرخ تکثیر و سرعت رشد در این سیستم بسیار بیشتر از دیگر روش‌های مرسوم در کشت بافت می‌باشد (Preil, 1991).



شکل ۴- مقایسه میانگین روش کشت روی صفت متوسط تعداد نوساقه تولید شده در هر ریزنمونه

به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که از سیستم غرقابی موقت به‌خوبی می‌توان جهت ریزازدیادی گیاه گل محمدی استفاده نمود. همچنین به علت کاهش تعداد ظروف کشت، افزایش میزان رشد و نمو، نیاز به تعداد کمتر نیروی متخصص و حذف هزینه های عامل ژلی، باعث کاهش هزینه تولید شده و روش تکثیر را از نظر اقتصادی توجیه‌پذیر کرده است. این سیستم برتری‌هایی نسبت به سایر روش‌های کشت بافت دارد از جمله اینکه می‌توان تعداد زیادی گیاهچه در مقیاس زیاد تولید کرد، در هر زمان به راحتی می‌توان محیط کشت را تغییر داد، گیاهانی که ترکیبات فنولی زیادی دارند در این سیستم بهتر رشد می‌کنند و هوای وارد شده در افزایش رشد و نمو و تولید وزن خشک گیاه تأثیر زیادی دارد. همچنین جهت استفاده بهینه از این روش بهتر است که سیستم غرقابی با استفاده از شیلنگ سیلیکونی سفید و بدون بستر انجام شود. به عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان اظهار داشت که سیستم غرقابی موقت در مقایسه با محیط‌های کشت کلاسیک جامد و مایع از پتانسیل خوبی برای نوساقه‌زایی برخوردار است و با انجام آزمایشات تکمیلی می توان به خوبی از این سیستم در ریزازدیادی گیاه گل محمدی استفاده نمود.

شکل ۵- سیستم غرقاب موقت استفاده شده برای ریزازدیادی *Rosa damascena* Mill.

REFERENCES

Achuthan CR, Babu BH, Padikkala J (2003) Antioxidant and hepatoprotective effects *of Rosa damascena.* Pharm. Biol., 41: 357-361.

Aitken-Christie J, Kozai T, Takayama S (1995) Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. In: J. Aitken-Christie, *et al*. (eds.), Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands pp. 1-18.

Alvard D (1995) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant Cell, Tiss. and Organ Cult. 32:55-60.

Bonga JM, Aderkas PV (1992) *In vitro* culture of roses. Klawer Academic

Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
Debergh PC (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant, 59: 270-6.
Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep. 18: 743-748.
Gault M , Synge PM (1971). The dictionary of roses in colour. Rainbird References Books, London, UK.
Krueger S, Robacker C , Simonton W (2007) Culture of *Amelanchier* × *grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 27: 219-226.
Mahmoudi Noodezeh H, Moieni A, Baghizadeh F (2012) *In vitro* propagation of the Damask rose (Rosa damascena Mill.). In vitro Cellular and Development Biology-Plant. 48: 530-538.
Ozkan G, Sagdic O, Baydar NG, Baydar H (2004) Antioxidant and antibacterial activities of *Rosa damascena* flower extracts. Food Sci. Technol. Int., 10: 277-281.
Preil W (1991). Application of bioreactors in plant propagation. In: Micropropagation: Technology and application. Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H (Editors.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 425-455.
Smittinan T (2001) Flora of Thailand (in Thai). Thailand: Royal Forestry Department. Suharson, O. (1995). *In vitro* culture of several new cultivars of rose. J. Biol. Indones. 1(3): 65-71.
Takayama S, Akita M (1994) The types of bioreactors used for shoots and embryos. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 39: 147-156.
Vishnevetsky J, Azizbekova N, Ziv M, Lilien-Kipnis H (1997) Development of the bulb and inflorescence in outdoor grown *Nerine sariensis*. Acta Hort. (ISHS) 430:147-154
Winkelmann T, Meyer L, Serek M (2004) Germination of encapsulated somatic embryos of *Cyclamen persicum*. Hortic Sci 39:1093-1097.