



تأثیر موقعیت جوانه و تنظیم کننده‌های رشد بر ریزافزایی گل محمدی^۱

The Effect of Bud Position and Growth Regulators on the Micropropagation of *Rosa damascena* Mill.

محمدباقر حسن پور اقدم*، اصغر ابراهیم زاده، محمد علی اعظمی، ستار ملکیان، مهرداد صالح زاده و لمیا وجودی
مهربانی

چکیده

به منظور بررسی تأثیر موقعیت جوانه و تنظیم کننده‌های رشد بر ریزافزایی گل محمدی سه آزمایش جداگانه انجام شد. در آزمایش اول تأثیر موقعیت جوانه (جوانه انتهایی، بالادست، میانی و پایین ساقه) و تیمارهای BAP (۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر) و TDZ (۰/۰۵ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر) به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA بر باززایی گیاه در محیط کشت MS مطالعه شد. نتایج نشان داد که طول شاخساره و تعداد برگ زیر تأثیر برهمکنش موقعیت جوانه و تنظیم کننده‌های رشد قرار گرفت. بیشترین طول شاخساره در قسمت بالادست، میانی و پایین ساقه در تیمارهای ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر NAA + BAP و قسمت بالادست ساقه و جوانه انتهایی در تیمار ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر تیدیاورون + NAA مشاهده شد. در آزمایش دوم تأثیر غلظت‌های صفر، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ میلی گرم در لیتر Kin و BAP بر طول شاخساره و تعداد برگ گیاه ارزیابی شد. بیشترین طول شاخساره در ۴/۵ میلی گرم در لیتر Kin و BAP به همراه NAA مشاهده شد. در مرحله ریشه‌زایی از غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۲ میلی گرم در لیتر اکسین‌های IBA و NAA استفاده شد. بالاترین درصد ریشه‌زایی و طول ریشه در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد. در مجموع پاسخ ریزازدیدی به موقعیت‌های مختلف جوانه متناقض و متفاوت بود، اما تنظیم کننده‌های رشد تأثیر مثبتی بر ریزازدیدی گل محمدی داشتند.

واژه‌های کلیدی: تیدیاورون، ۶- بنزیل آمینو پورین، ریشه‌زایی، نفتالن استیک اسید.

مقدمه

ایران با داشتن اقلیم متنوع و در نتیجه وجود رویشگاه‌های گوناگون، دارای بیش از ۸۰۰۰ گونه گیاهی است که در بین آن‌ها دستکم ۲۳۰۰ گونه دارویی وجود دارد. با وجود این ذخیره ژنتیکی منحصر به فرد، شوربختانه کشورمان به جایگاه اصلی خود در زمینه تولید و صادرات گیاهان دارویی دست نیافته است (۱۴، ۲۴).

گل محمدی با نام علمی *Rosa damascena* Mill از تیره وردسانان، یکی از مهم‌ترین گونه‌های رز محسوب می‌شود. این گیاه استفاده فراوانی در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی و اشتغال‌زایی، توسعه صادرات غیرنفتی و طراحی فضای سبز دارد (۱۴، ۱۹، ۱۱). ارزش اقتصادی و دارویی گل محمدی به‌خاطر اجزای اسانس با ارزش آن (سیترونلول، ژرانیول، ان نونادکان و غیره) می‌باشد (۱۲). قابل بیان است که با وجود اهمیتی که گیاه گل محمدی در ایران دارد، به روش سنتی افزایش می‌یابد. از مهم‌ترین دشواری‌های افزایش سنتی گیاه می‌توان به هزینه‌بر و زمان‌بر بودن روش سنتی، محدودیت پایه مادری برای تهیه قلمه و باززایی

۱- تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۴

۲- به ترتیب دانشیاران و دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه، دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی دانشگاه شیراز و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (hassanpouraghdam@gmail.com).

ضعیف ریشه‌های نابجا از قلمه اشاره کرد. امروزه از روش کشت بافت برای تولید گیاهان سالم در سطح انبوه استفاده می‌شود. روش‌های متفاوت باززایی درون‌شیشه‌ای می‌توانند سبب بهبود صنعت افزایش این گیاه ارزشمند شوند. در ایران کارهای پژوهشی کمی در زمینه افزایش گل‌محمدی از راه کشت بافت انجام شده است. بنابراین کشت بافت و فنون ریزافزایی روش جایگزین مناسبی برای افزایش نژادگان‌های برتر گل‌محمدی می‌باشد (۱۹). در یک پژوهش انجام شده در گل‌محمدی مشخص شد که بالاترین درصد باززایی گیاه در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) در شرایط درون‌شیشه‌ای به دست آمد و بالاترین درصد ریشه‌زایی در محیط برون‌شیشه‌ای حاصل شد (۳). یکی از دشواری‌های اساسی در افزایش درون‌شیشه‌ای گل‌محمدی تولید ریشه می‌باشد. ریشه‌زایی در نتیجه فرآیندهای زیست‌شیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه اتفاق افتاده و در کنترل فاکتورهای مختلف ژنتیکی، رشدی، تنظیم‌کننده‌های رشدی، ترکیب‌های فنولی، نورگاه و شدت نور می‌باشد (۱۹). نتایج بررسی انجام شده در گل‌محمدی نشان داد که استفاده از ایندول بوتیریک اسید (IBA) موجب افزایش تعداد و طول ریشه و درصد ریشه‌زایی گل‌محمدی شد (۱۹). بررسی دیگری در گل‌محمدی نشان داد که نژادگان و نوع هورمون‌های مورد استفاده در باززایی و ریشه‌زایی گیاه نقش مهمی در پرآوری و ریشه‌زایی گیاه داشتند. استفاده از غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید موجب افزایش درصد ریشه‌زایی گل‌محمدی شد (۴). از دیگر دشواری‌های مطرح شده در باززایی و ریشه‌زایی گل‌محمدی می‌توان به عدم تولید ریشه، قهوه‌ای شدن نمونه‌ها و عدم تولید پینه اشاره نمود که همه عوامل ذکر شده موجب عدم موفقیت در تولید انبوه گیاه می‌شود (۸). بنابراین، هدف از بررسی حاضر ارزیابی ریزازدیادی گل‌محمدی با استفاده از ریزنمونه‌های جوانه حاصل از قسمت‌های مختلف ساقه نژادگان مراغه تحت تاثیر تیمار تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسینی و سایتوکینینی بود تا زمینه‌ساز افزایش انبوه این گیاه ارزشمند در کشور فراهم شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در پژوهش حاضر از باغ دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه تهیه شد. ساقه‌های به طول شصت سانتی‌متر از گیاه جدا و به ۴ قسمت تقسیم شد که شامل جوانه انتهایی، بخش‌های بالادست (بخش زیری جوانه انتهایی)، میانی و پایین ساقه تقسیم شدند. گندزایی سطحی با استفاده از مایع ظرف‌شویی انجام شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند. بعد از گندزایی سطحی، نمونه‌ها در زیر هود لامینار با الکل ۷۰٪ به مدت ۴۰ ثانیه گندزایی شد. بعد از گندزایی، ریزنمونه‌ها به اندازه ۰/۸ تا ۱ سانتی‌متری برش داده شدند و در شیشه‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS (۵) کشت شدند.

نمک‌ها، ویتامین‌های مورد استفاده در محیط کشت MS و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (2,4-D, IBA, NAA, BAP, TDZ, Kin) مورد استفاده در بررسی حاضر از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. از شکر معمولی برای تامین منبع کربن کشت‌ها استفاده شد. برای جامد کردن محیط کشت از هشت گرم در لیتر آگار-آگار استفاده شد. پی‌اچ محلول غذایی بین ۵/۷-۵/۸ تنظیم شد. محیط کشت آماده شده در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. بعد از کشت نمونه‌ها، در مرحله باززایی، ظروف شیشه‌ای به اتاق رشد و زیر لامپ فلورسنت (با شدت نور حدود ۲۰۰۰ لوکس، نورگاه ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) منتقل شدند. نمونه‌ها در اتاقک رشد در دمای ۱۹ درجه سلسیوس در تاریکی و ۲۴ درجه سلسیوس در روشنایی نگهداری شدند. زیرکشت نمونه‌ها هر دو هفته یکبار در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در هر مرحله از رشد گیاه انجام شد. لازم به ذکر است که عمل واکشت نمونه‌ها دو مرتبه در طی آزمایش تکرار شد.

تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در باززایی گیاه

در اولین مرحله استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت تاثیر موقعیت جوانه (انتهایی، بخش‌های بالادست، میانی و پایین) و دو تیمار تنظیم‌کننده رشد BAP (۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و تیدیازورن (TDZ) (۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) به همراه سطح ثابت نفتالن استیک اسید (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بر باززایی گیاه، مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه داده‌های حاصل از آزمایش باززایی گیاه با ۱۶ ترکیب تیماری به صورت فاکتوریل بر مبنای طرح به طور کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار SPSS انجام شد.

در آزمایش دوم به منظور بررسی اثرهای تنظیم کننده‌های رشد بر باززایی گیاه، نمونه‌های حاصل از مرحله اول بدون توجه به موقعیت جوانه به محیط کشت MS حاوی سطح ثابت (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) NAA به همراه غلظت‌های صفر، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر کنتین (Kin) و BAP منتقل شد. در این مرحله ویژگی‌هایی مانند طول شاخساره، تعداد برگ و تعداد برگ کم‌سبزینه مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه آماری این بخش بر مبنای طرح به‌طور کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد.

جدول ۱- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در محیط باززایی.

Table 1. Plant growth regulators used in the regeneration medium.

تنظیم کننده‌های رشد (میلی‌گرم در لیتر) مورد استفاده در محیط کشت موراشیگی و اسکوگ			
Growth regulators (mgL ⁻¹) used in MS medium			
TDZ		BAP	موقعیت جوانه
0.1	0.05	5	Bud position
			قسمت بالادست ساقه
			Distal end
0.1	0.05	5	قسمت میانی ساقه
			Middle part
0.1	0.05	5	قسمت پایین ساقه
			Proximal end
0.1	0.05	5	جوانه انتهایی
			Shoot tip

بررسی درصد پینه‌زایی از ریزنمونه‌های دمبرگی گل محمدی

در این آزمایش ریزنمونه‌های دمبرگی از شاخساره‌های رشد کرده در شرایط درون‌شیشه‌ای تهیه گردید. چون ریزنمونه‌ها از شاخساره‌های رشد یافته در شرایط درون‌شیشه‌ای تهیه شده بودند نیاز به گندزدایی نمونه‌ها نبود. ریزنمونه‌ها پس از برش در زیر هود لامینار در محیط کشت MS کشت گردیدند. تیمارهای استفاده شده در این مرحله از آزمایش شامل ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و 2,4,D بود. در این مرحله ویژگی‌هایی مانند درصد پینه‌زایی، درصد پینه قهوه‌ای شده، وزن تر و قطر پینه مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه‌گیری وزن تر و قطر پینه زمانی انجام شد که تغییر قابل توجهی در قطر و وزن این اندام‌ها اتفاق نیفتاد. در این مرحله از آزمایش از ۶ ترکیب تیماری در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با سه تکرار برای واکاوی ویژگی‌ها استفاده شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ انجام شد.

تهیه محیط کشت ریشه‌زایی

از تنظیم کننده‌های رشد 2,4,D، IBA و NAA با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS برای ریشه‌زایی استفاده شد. کشت‌ها در اتاق رشد با دمای ۲۴-۱۹ درجه سلسیوس و در فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. در این آزمایش ارزیابی و یادداشت‌برداری کشت‌ها بعد از گذشت ۳۰ روز انجام گرفت. در این مرحله، ویژگی‌هایی مانند تعداد ریشه، متوسط طول ریشه در هر ریزنمونه و درصد شاخساره‌های ریشه‌دار شده یادداشت‌برداری شدند. بعد از یادداشت‌برداری ویژگی‌ها، شاخساره‌های ریشه‌دار شده به لیوان‌های کاغذی حاوی پرلایت منتقل و با پلاستیک‌های شفاف پوشانده شدند. گیاهچه‌ها هر ۲ روز یک مرتبه با آب افشانده شدند و بعد از گذشت ۲۰ روز گیاهچه‌ها به بستر کشت حاوی کوکوپیت و پرلایت (به نسبت ۵:۱) در گلخانه (دمای ۲۷-۲۸ درجه سلسیوس) منتقل شدند. تجزیه آماری این بخش از پژوهش بر مبنای طرح به‌طور کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها بر مبنای آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ انجام شد.

واکاوی داده‌ها

در تمامی مراحل آزمایش حاضر برای هر تیمار ۵ ریزنمونه در هر تکرار در ظرف‌های منفرد کشت شد. واکاوی آماری طرح در هر بخش با توجه به طرح مورد استفاده انجام شد. در بررسی حاضر از تبدیل جذری در موارد لازم برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد. داده‌های حاصل از آزمایش توسط نرم افزار SPSS واکاوی شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی تاثیر موقعیت جوانه (قسمت ابتدایی، میانی، بالادست ساقه و جوانه انتهایی) و تیمارهای مختلف

تنظیم‌کننده رشد در ریزازدیادی گل محمدی**طول شاخساره‌های تولید شده در هر ریزنمونه**

طول شاخساره زیر تاثیر برهمکنش موقعیت جوانه و تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفت. نتایج نشان داد کاربرد غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA موجب افزایش طول شاخساره در قسمت بالادست، میانی و پایین ساقه گیاه شد. در گیاهان تیمار شده با تیدیا زورون بیشترین طول شاخساره در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در نمونه‌های حاصل از قسمت بالادست ساقه و جوانه انتهایی مشاهده شد (جدول ۲) (شکل ۲ بخش A-D). کمترین طول شاخساره در بخش پایین ساقه با ترکیب تیماری ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، قسمت‌های میانی، پایین و جوانه انتهایی ساقه در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد (جدول ۲). نتایج بررسی انجام شده در رزماری نشان داد که بیشترین طول ریزنمونه در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد (۱۷). افزایش و پرآوری شاخساره‌ها در کشت درون‌شیشه‌ای زیر تاثیر عوامل متعددی مانند رقم، گونه، نژادگان، نمک‌های معدنی، نوع محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت، مواد آلی و شرایط نگهداری کشت‌ها قرار دارد که از بین این فاکتورها نسبت اکسین به سیتوکینین از اهمیت بیشتری در پرآوری و رشد بعدی گیاهچه‌ها برخوردار است (۱۶). نسبت مناسب اکسین و سیتوکینین در محیط کشت موجب بهبود استقرار، رشد و پرآوری ریزنمونه‌ها خواهد شد (۶). با توجه به این که BAP باعث افزایش تقسیم یاخته‌ای می‌شود می‌توان گفت نسبت بالای BAP به NAA در طول شدن گیاهچه‌ها مؤثرتر از نسبت‌های کمتر این تنظیم‌کننده رشد بود (۶). پیش از این نیز گزارش شده است که بیشترین رشد طولی ریزنمونه‌های گل محمدی از محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد که در راستای تأیید نتایج این پژوهش می‌باشد (۲۲). طول شاخساره متاثر از پتانسیل‌های ژنتیکی گیاه مادری، تعادل هورمونی، نمک‌های غذایی محیط کشت، موقعیت جوانه، نسبت کربن به نیتروژن و فرآورده‌های فتوسنتزی تجمع یافته در نمونه می‌باشد. مانند بیشتر گیاهان مورد آزمون در شرایط درون‌شیشه‌ای، طول شاخساره در آزمایش حاضر نیز متاثر از تمام مولفه‌های بالا بوده و زیر تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت.

تعداد برگ تولید شده در هر ریزنمونه

تعداد برگ تولید شده تحت تاثیر برهمکنش موقعیت جوانه و تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفت. ریزنمونه‌های قسمت میانی و پایین ساقه در ترکیب هورمونی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و قسمت بالادست ساقه و پایین ساقه با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد برگ را تولید نمودند (جدول ۲). ریزنمونه جوانه انتهایی در ترکیب تیماری ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA دارای کمترین تعداد برگ بود (جدول ۲) که شاید دلیل آن کاهش رشد طولی ساقه در این ریزنمونه بود که موجب کاهش تولید برگ گردید. نتایج بررسی حاضر با نتایج Tabesh و همکاران (۲۲) در این زمینه همخوانی دارد (۲۲). در بررسی اثر غلظت‌های متفاوت BAP بر افزایش درون‌شیشه‌ای ارقام مختلف رز مشخص شد که این ارقام ضریب ازدیاد متفاوتی در غلظت‌های یکسان BAP نشان دادند (۲). همچنان که طول شاخساره متأثر از تیمارهای مورد استفاده در آزمایش بود انتظار براین است که با تغییر در طول شاخساره‌ها و تعداد میان‌گره‌ها، تعداد برگ‌های ریزنمونه پرآوری شده نیز تحت تاثیر قرار گیرند. مؤلفه‌های ژنتیکی، بالانس هورمونی تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده، ترکیب و غلظت محیط رشد نمونه، ابعاد

ریز نمونه، ابعاد ظرف و غیره می‌توانند تعداد برگ را مانند مؤلفه‌های مرتبط با شاخساره‌های تولید شده زیر تاثیر قرار دهند. در آزمایش حاضر این صفت متأثر از موقعیت جوانه و تنظیم کننده‌های رشدی مورد استفاده بوده و به شدت مورد انتظار بود.

جدول ۲- اثرهای برهمکنش موقعیت جوانه و تنظیم کننده‌های رشد بر طول شاخساره و تعداد برگ گل محمدی.

Table 2. The interaction effects of bud position and growth regulators on the shoot length and leaf number of *Rosa damascena*.

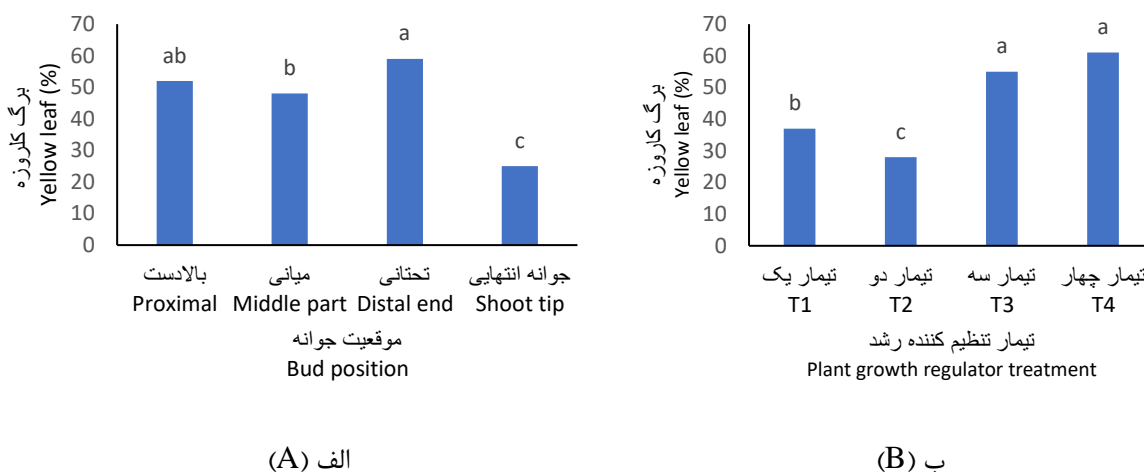
مکان قرارگیری نمونه Bud position	تنظیم کننده‌های رشد Growth regulators (mgL ⁻¹)	طول شاخساره Shoot length (mm)	تعداد برگ Leaf number
قسمت بالادست ساقه Distal end	0.1 NAA + 2.5 BAP	24 ^{ab}	12 ^{b-d}
قسمت میانی ساقه Middle part	0.1 NAA + 2.5 BAP	29 ^a	16 ^{ab}
قسمت پایین ساقه Proximal end	0.1 NAA + 2.5 BAP	29 ^a	15 ^{a-c}
جوانه انتهایی Shoot tip	0.1 NAA + 2.5 BAP	11 ^c	9 ^e
قسمت بالادست ساقه Distal end	0.1 NAA + 5 BAP	30 ^a	17 ^a
قسمت میانی ساقه Middle part	0.1 NAA + 5 BAP	27 ^a	14 ^{b-d}
قسمت پایین ساقه Proximal end	0.1 NAA + 5 BAP	26 ^a	15 ^{a-c}
جوانه انتهایی Shoot tip	0.1 NAA + 5 BAP	15 ^b	11 ^{cd}
قسمت بالادست ساقه Distal end	0.1 NAA + 0.05 TDZ	27 ^a	13.4 ^{b-d}
قسمت میانی ساقه Middle part	0.1 NAA + 0.05 TDZ	9 ^{cd}	6.5 ^f
قسمت پایین ساقه Proximal end	0.1 NAA + 0.05 TDZ	7 ^{de}	7 ^f
جوانه انتهایی Shoot tip	0.1 NAA + 0.05 TDZ	25 ^{ab}	4 ^g
قسمت بالادست ساقه Distal end	0.1 NAA + 0.1 TDZ	20 ^b	11 ^{de}
قسمت میانی ساقه Middle part	0.1 NAA + 0.1 TDZ	8 ^{cd}	6 ^f
قسمت پایین ساقه Proximal end	0.1 NAA + 0.1 TDZ	6 ^{de}	7 ^f
جوانه انتهایی Shoot tip	0.1 NAA + 0.1 TDZ	5 ^e	3.5 ^g

Similar letters in the columns indicate no significant differences based on LSD test.

حرف‌های مشابه در ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار براساس آزمون LSD می‌باشد.

درصد برگ کم‌سبزینه در هر ریزنمونه

اثر مستقل موقعیت جوانه و تنظیم‌کننده رشد روی صفت درصد برگ کم‌سبزینه، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۱). با توجه به نتایج حاصل از نمودار ۱ (الف) در بین ریزنمونه‌های برداشت شده از موقعیت‌های مختلف ساقه، بیشترین درصد برگ کم‌سبزینه مربوط به ریزنمونه قسمت پایین و قسمت بالادست ساقه بود. کمترین درصد برگ کم‌سبزینه نیز مربوط به جوانه انتهایی ساقه بود. نتایج حاصل از شکل ۱ (ب) نشان داد که کمترین درصد برگ کم‌سبزینه مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که TDZ نسبت به BAP سبب تشدید کم‌سبزینگی برگ گردید. براساس پژوهش‌های Huettman و همکاران (۹)، محیط کشت MS پایه حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP دارای کمترین درصد برگ کلروزه و محیط کشت حاوی TDZ دارای بیشترین درصد برگ کم‌سبزینه بود. به نظر می‌رسد BAP با به تأخیر انداختن پیری برگ، افزایش باز شدن روزنه‌ها و تولید بیشتر کلروفیل تأثیر مثبتی بر کاهش زردی برگ‌ها دارد. کم‌سبزینگی برگ در شرایط درون‌شیشه‌ای پاسخ عادی گیاه به تغییر محیط رشدی بوده و تا حدودی مورد انتظار می‌باشد. هرچه فراوانی و شدت این موضوع کمتر باشد کارایی افزایش و پرآوری افزون‌تر خواهد بود. از این رو، قابل درک است که تیمارهای مورد استفاده به میزان متفاوتی این نابسامانی مهم را زیر تأثیر قرار می‌دهند. نتایج حاصل از این صفت کمابیش مورد انتظار و قابل پیش‌بینی بود.



T1: 0.1 mgL⁻¹ NAA + 2.5 1 mgL⁻¹ BAP; T2: 0.1 mgL⁻¹ NAA + 5 1 mgL⁻¹ BAP; T3: 0.1 mgL⁻¹ NAA + 0.5 1 mgL⁻¹ TDZ; T4: 0.1 mgL⁻¹ NAA + 0.1 mgL⁻¹ BAP

Fig 1. Mean comparisons of the effect of bud position (A) and growth regulators (mgL⁻¹) (B) on the leaf chlorosis of *Rosa damascena*. Similar letters on bars are not significant based on LSD test.

شکل ۱- مقایسه میانگین موقعیت جوانه (الف) و تنظیم‌کننده‌های رشد (ب) بر کم‌سبزینگی برگ گل محمدی. حرف‌های مشابه در بالای گراف‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار براساس آزمون LSD می‌باشد.

آزمایش دوم: بررسی ریزازدیادی گل محمدی بدون در نظر گرفتن موقعیت جوانه

در این آزمایش اثر ۷ ترکیب تیماری مختلف روی ویژگی‌هایی مانند میانگین طول شاخساره‌ها، تعداد برگ و درصد برگ کلروزه بدون در نظر گرفتن موقعیت جوانه، مورد بررسی قرار گرفت.

طول شاخساره‌های تولید شده در هر ریزنمونه

نتایج حاصل از جدول ۳ نشان داد که بیشترین طول شاخساره مربوط به تیمار ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و Kin به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. کمترین طول شاخساره در تیمارهای ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و تیمار شاهد حاصل شد. در پژوهشی روی گل محمدی مشخص شد که کاربرد ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP موجب افزایش پرآوری گیاه گردید (۱۱). در پژوهش Carelli و همکاران (۵) مشخص شد که در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، اگرچه میزان

پراوری افزایش یافت اما رشد طولی گیاهچه‌ها به‌صورت چشمگیری کاهش یافت. باززایی و ایجاد شاخساره اغلب به تیمار همزمان اکسین و سایتوکنین نیاز دارد. اکسین به تنهایی نمی‌تواند روند افزایش طول گیاهچه‌ها را تسریع کند، اما اگر به مقدار کم استفاده شود، اثر بازدارنده مقادیر زیاد سایتوکنین بر رشد طولی گیاهچه‌ها را خنثی نموده و روند رشد ساقه‌ها را به حالت عادی باز می‌گرداند (۲۱). در بررسی انجام شده در گل رز مشخص شد که غلظت ۳ میکرومول BAP به همراه ۰/۹ میکرومول جیبرلین موجب افزایش باززایی گیاه شد (۲۳). بدون در نظر گرفتن موقعیت جوانه نیز، تغییر در طول شاخساره ریزنمونه‌های پراوری شده در شرایط درون شیشه‌ای به‌طور کامل منطقی به‌نظر می‌رسد. در این موضوع نیز باز مؤلفه‌های فیزیولوژیک، زیست‌شیمیایی، پتانسیل ژنتیکی ریزنمونه و سایر مؤلفه‌های مرتبط با افزایش درون شیشه‌ای همچون ترکیب، نوع محیط کشت و به ویژه مقدار و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده تاثیر فراوانی روی این صفت خواهند داشت و در آزمایش حاضر نیز همین نتیجه مورد انتظار بود.

جدول ۳- تاثیر ترکیب تیماری BAP و Kin بر طول شاخساره، تعداد برگ و درصد برگ کلروزه گل محمدی.

Table 3. The effects of BAP and Kin treatment combinations on the shoot length, leaf number and the chlorosis of *Rose damascena*.

تنظیم کننده رشد Growth regulator	درصد برگ کم‌سبزینه Chlorotic leaf percentage	تعداد برگ Leaf number	طول شاخساره Shoot length (mm)
شاهد Control	75 ^a	9 ^e	12 ^e
0.1 NAA + 1.5 BAP	60 ^b	14 ^d	16 ^{c-e}
0.1 NAA + 3 BAP	35 ^e	16 ^{cd}	14 ^e
0.1 NAA + 4.5 BAP	30 ^e	17 ^b	26 ^{ab}
0.1 NAA + 1.5 Kin	55 ^{bc}	13 ^d	16.5 ^{cd}
0.1 NAA + 3 Kin	46 ^{cd}	16.5 ^{bc}	23 ^{bc}
0.1 NAA + 4.5 Kin	30 ^e	20 ^a	28 ^a

Similar letters in the columns indicate no significant differences based on LSD test.

حرف‌های مشابه در ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار براساس آزمون LSD می‌باشد.

تعداد برگ در هر ریزنمونه

بیشترین تعداد برگ مربوط به تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin با میانگین ۲۰ برگ برای هر شاخساره بود. کمترین میزان برگ تولیدی برای هر ریزنمونه نیز مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۹ برگ برای هر شاخساره بود (جدول ۲). براساس جدول ۳ بیشترین طول شاخساره (۲۸ میلی‌متر) در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد. از این رو، به‌نظر می‌رسد با توجه به افزایش رشد طولی در این تیمار، بیشترین تعداد برگ نیز در آن مشاهده شود. نتایج حاصل از بررسی حاضر با نتایج پژوهش‌های Pati و همکاران (۱۶) همخوانی دارد. در بررسی‌های قبلی در گل محمدی نیز مشخص شده بود که کاربرد غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر BA موجب افزایش پراوری گیاه شد (۷). همچنان که در آزمایش اول نیز بیان شد، تعداد برگ جدای از موقعیت جوانه و تنها با استناد به پتانسیل رشدی و تعداد انشعاب‌های نمونه‌های پراوری شده پاسخ متناسبی به مؤلفه‌های متعدد مورد استفاده در ریزازدیادی بوده و در آزمایش حاضر نیز مشاهده گردید.

درصد برگ کم‌سبزینه در هر ریزنمونه

نتایج حاصل از جدول ۳ نشان داد که تیمار شاهد دارای بیشترین درصد برگ کم‌سبزینه (۷۵ درصد) در بین تیمارها بود. کمترین تعداد برگ کم‌سبزینه در تیمارهای ۴/۵ میلی‌گرم در کینتین و بنزیل آمینو پیورین مشاهده شد (جدول ۳). کم‌سبزینه‌گی برگ‌ها از دشواری‌های کشت‌های درون شیشه‌ای است. ترشح ترکیب‌های فنولی از قسمت برش یافته ریزنمونه و انتشار آن‌ها به محیط کشت باعث مسدود شدن آوندها شده و در نتیجه جذب مواد غذایی با مشکل مواجه خواهد شد و منجر به کم‌سبزینه شدن و قهوه‌ای شدن برگ خواهد شد (۸). همچنین عواملی مانند رشد سریع گیاهچه‌ها در محیط MS به‌دلیل مقادیر بالای نیترات، تماس گیاهچه‌ها با دیواره شیشه‌های کشت، تجمع رطوبت در انتهای برگ‌ها، زیرکشت کردن با فواصل طولانی و در

نتیجه کمبود برخی از عناصر غذایی می تواند از جمله عوامل کمسبزینه شدن برگها در شرایط درون شیشه‌ای باشد. تنش حاصل از این عوامل باعث فعالیت چرخه تولید اتیلن در گیاهچه‌ها شده و در مراحل پیشرفته سبب کمسبزینه شدن و تخریب بافت در برگ‌ها می‌شود (۲۵). مشابه آزمایش اول، جدا از موقعیت جوانه، کمسبزینه‌گی برگ در حد قابل قبولی که میزان پرآوری را کاهش محسوسی ندهد متأثر از مؤلفه‌های آزمایشی بوده و این میزان اندازه‌گیری شده به‌طور کامل منطقی و قابل انتظار بود.

بررسی ویژگی‌های مرتبط با پینه‌زایی از ریزنمونه‌های دم‌برگی گل محمدی

در این آزمایش اثرهای ۶ تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر ویژگی‌هایی مانند درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌ها، درصد پینه‌های قهوه‌ای شده، وزن تر پینه و قطر پینه ریزنمونه‌های دم‌برگی گل محمدی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴).

جدول ۴- تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد پینه‌زایی، درصد پینه قهوه‌ای، وزن تر پینه و قطر پینه در گل محمدی.
Table 4. The effects of growth regulators on the callogenesis percent, percentage of callus browning, callus fresh weight and callus diameter in *Rose damascena*.

تنظیم‌کننده رشد Growth regulator	قطر پینه callus diameter (mm)	وزن تر پینه Callus fresh weight (g)	درصد قهوه‌ای شدن پینه Callus browning (%)	درصد پینه‌زایی Callogenesis (%)
0.5 BAP + 4 NAA	1.1 ^{bc}	0.01 ^{bc}	11 ^a	10 ^{bc}
1 BAP + 4 NAA	0.5 ^c	0.005 ^c	12 ^a	5 ^c
2 BAP + 4 NAA	1.3 ^{bc}	0.015 ^{bc}	10 ^a	11 ^{bc}
0.5 BAP + 4 2.4-D	0.8 ^{bc}	0.007 ^{bc}	11 ^a	4 ^c
1 BAP + 4 2.4-D	4.5 ^a	0.045 ^a	6 ^b	70 ^a
2 BAP + 4 2.4-D	3 ^{ab}	0.028 ^{ab}	8 ^{ab}	58 ^{ab}

Similar letters in the columns indicate no significant differences based on LSD test.

حرف‌های مشابه در ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار براساس آزمون LSD می‌باشد.

درصد پینه‌زایی و درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها

نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که بیشترین درصد پینه‌زایی در تیمارهای حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. کمترین درصد پینه‌زایی در تیمارهای ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. با توجه به مقایسه میانگین‌ها می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بین اکسین‌های به‌کار رفته در این آزمایش تیمارهای حاوی 2,4-D بالاترین سطوح تولید پینه را به خود اختصاص دادند و تیمارهای حاوی NAA از لحاظ صفت پینه‌زایی در جایگاه بعدی قرار گرفت. کمترین درصد قهوه‌ای شدن در تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. در سایر تیمارهای آزمایشی قهوه‌ای شدن نمونه‌ها مشاهده شد. اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها از مهم‌ترین فاکتورهای رشد و پینه‌زایی در کشت درون شیشه‌ای به‌شمار می‌روند که نوع و غلظت مؤثر آن‌ها در ریزنمونه‌های مختلف بسته به جنس گیاه و رقم متفاوت می‌باشد (۲۰). ریزنمونه‌ها بعد از ۲۰ روز نگهداری در شرایط تاریکی، تغییر شکل داده و فرایند پینه‌زایی در اثر تاریکی تحریک و شکل گرفت. گزارش‌های زیادی وجود دارند که نشان می‌دهند شرایط تاریکی فرایند پینه‌زایی را تحریک و سرعت تشکیل آن را بیشتر می‌کند (۱۰). در بررسی انجام شده توسط Rout و همکاران (۲۰) گزارش شد که نه تنها نور برای تحریک و تشکیل پینه ضروری نمی‌باشد، بلکه مانعی برای تشکیل پینه به‌دلیل افزایش فعالیت ایندول استیک اسید اکسیداز است (۲۰). فعالیت این آنزیم سبب تغییر در تعادل بین اکسین و سایتوکینین درون‌زا در گیاه شده و تولید پینه را کاهش می‌دهد. افزایش ترشح ترکیب‌های فنولی و قهوه‌ای شدن پینه‌ها موجب کاهش در تعداد پینه‌های سالم شده و در ادامه درصد باززایی و اندام‌زایی از پینه‌ها با کاهش مواجه می‌شود. میزان پینه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف، اولین پاسخ فیزیولوژیکی به مؤلفه‌های کشت درون شیشه‌ای بوده و انتظار می‌رود که ریزنمونه‌هایی با پتانسیل بالا از لحاظ این صفت، در زمان اندک و با نرخ بالاتری قادر به تولید پینه‌های مناسب برای پرآوری در مراحل بعد خواهند بود. در مرحله بعد، پینه‌زایی به‌شدت به مؤلفه‌های محیط رشد ریزنمونه، بالانس تنظیم‌کننده‌های رشد و مقادیر غلظت‌های نسبی هر یک از این تنظیم‌کننده‌ها در تکامل با هم وابسته است. با در نظر گرفتن

همه استدلال‌های بالا در آزمایش حاضر نیز پینه‌زایی و هم چنین زنده ماندن پینه‌ها و میزان افت به واسطه قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها به میزان زیادی زیر تاثیر عوامل ذکر شده قرار گرفتند.

قطر و وزن تر پینه

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمارهای حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دارای بیشترین قطر و وزن تر پینه بودند (جدول ۴). تفاوتی از نظر قطر پینه بین سایر تیمارهای مورد استفاده مشاهده نگردید (جدول ۴). این نتایج نشان می‌دهند استفاده از 2,4-D در مقایسه با NAA قطر پینه بیشتری تولید کرد. با توجه به این که 2,4-D نسبت به NAA اکسین قوی‌تری است، طبیعی به نظر می‌رسد که تیمار نمونه‌ها با 2,4-D، پینه‌ها را از لحاظ اندازه و شکل ظاهری بزرگتر نماید (۱۸). نتایج مشابهی در خصوص افزایش وزن تر پینه در اثر کاربرد تنظیم کننده‌های رشد در گیاه دارویی *Withania somnifera* توسط Adhikari و همکاران (۱) گزارش شد. اکسین‌ها در غلظت زیاد سبب افزایش طول یاخته و افزایش تقسیم یاخته‌ای و وزن پینه می‌شوند (۱). فرایند پینه‌زایی در ریزنمونه‌ها به مجموع سطوح هورمونی درون‌زاد و برون‌زاد (هورمون‌های اضافه شده به محیط کشت) بستگی دارد (۱). قطر و وزن تر پینه رابطه تنگاتنگی با فرایند پینه‌زایی و میزان رشد پینه‌ها دارند. در این مورد نیز پتانسیل ذاتی ریزنمونه‌های مختلف مهم‌ترین مؤلفه تأثیرگذار بر مقادیر کمی این صفت خواهد بود. ولیکن همه مؤلفه‌های محیط کشت اعم از نوع محیط کشت، ترکیب تنظیم کننده‌های رشد، غلظت نمک‌ها، نوع ریزنمونه، مدت‌زمان ایستایی ریزنمونه‌ها در محیط رشد و فراوانی زیرکشت‌ها هم در رسیدن به مقادیر مطلوب به این صفت مؤثر هستند.

ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای گیاهچه‌ها

با وجود اینکه در آزمایش‌های مقدماتی از تیمارهای متعددی برای ریشه‌زایی استفاده شد، تنها در دو تیمار (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA) ریشه‌زایی مشاهده گردید. بنابراین، تنها نتایج حاصل از این دو تیمار در بررسی حاضر بیان گردید (جدول ۵). در این آزمایش ویژگی‌هایی مانند درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. بررسی مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۵) نشان داد که بین تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۷۰ درصد ریشه‌زایی و تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۳۰ درصد ریشه‌زایی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. بیشتر گیاهچه‌ها در محیط کشت ریشه‌زایی به مرور زمان کیفیت خود را از دست داده و حالت کم‌سبزینه و قهوه‌ای به‌خود گرفتند. احتمال می‌رود کم‌سبزینه شدن و قهوه‌ای شدن بافت گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای با عواملی مانند ترشح ترکیب‌های فنولی، مسدود شدن آوندها و عدم جذب مواد غذایی، رطوبت زیاد، عدم جذب کلسیم و فعالیت چرخه تولید اتیلن در گیاهچه‌ها در ارتباط باشد (۸). نتایج بررسی انجام شده در رزماری نشان داد که بیشترین طول ریشه در محیط کشت حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر IBA (با قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ریشه‌زایی) حاصل شد (۱۷). چنین به نظر می‌رسد که کاربرد IBA نقش مهمی در نمو یاخته‌های کوتیلدونی و ریشه‌های موئی داشته باشد (۱۷).

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه تحت تیمار تنظیم کننده‌های رشد اکسینی در گیاه گل محمدی.

Table 5. Mean comparison for the the rooting percentage, root number and root length of *Rosa damascena* affected by auxin type growth regulators.

تیمار Treatment	طول ریشه Root length	تعداد ریشه Root number	درصد ریشه‌زایی Rooting percentage
۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA 0.1mgL ⁻¹ IBA	8 ^a	2.5 ^a	70 ^a
۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA 0.2mgL ⁻¹ NAA	2 ^b	1.4 ^b	30 ^b

Similar letters in the columns indicate no significant differences based on LSD test.

حرف‌های مشابه در ستون‌ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار براساس آزمون LSD می‌باشد.

لقای ریشه‌زایی در گونه‌ها و واریته‌های رز به‌ویژه گونه‌های گل محمدی بسیار مهم است و ریشه‌زایی یکی از دشوارترین مراحل ریزازدیادی گل محمدی به‌شمار می‌رود. تاکنون فعالیت‌های گسترده‌ای برای غلبه بر این مشکل صورت گرفته است. ریشه‌زایی با اکسین‌های مختلف به رقم گیاه بستگی دارد. گل محمدی از جمله گونه‌های اسانس‌دار رز می‌باشد و ریشه‌زایی آن نسبت به ارقام

و گونه‌های زینتی رز دشوارتر است (۸). ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گل محمدی در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌تواند تحت تأثیر عوامل متعددی نظیر برهمکنش شرایط درون‌شیشه‌ای، عوامل بیرونی، رقم، سن، اندازه گیاهچه، نوع محیط کشت، نمک‌های معدنی، کربوهیدرات‌ها، زغال فعال، تنظیم‌کننده‌های رشد، ظرف کشت و عوامل فیزیکی مثل نور، دما و رطوبت باشد (۱۲). مشکل دیگری که بیشتر پژوهشگران با آن مواجه بودند از بین رفتن گیاهچه‌ها در محیط کشت ریشه‌زایی به دلیل تولید مواد فنولی از محل برش نمونه بود که موجب کاهش درصد ریشه‌زایی موفق گیاهچه‌ها شد (۸). در پژوهشی گزارش شده است که عدم ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای به دلیل تأثیر بیش از اندازه هورمون سائتوکینین است (۹). سن و اندازه گیاهچه‌ها در ریشه‌زایی قلمه‌های رز بسیار مهم است (۲۰). در پژوهش انجام شده در رز، بهترین سن را ۶ هفته، بهترین اندازه ریزنمونه را ۱/۲-۵/۵ سانتی‌متر و بهترین تیمار را غوطه‌ور کردن گیاهچه‌ها پیش از انتقال به محیط کشت ریشه‌زایی در محلول یک میلی‌گرم در لیتر IBA به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه معرفی کردند. گل محمدی از جمله گیاهانی است که سخت ریشه‌زا تلقی شده و ریشه‌زایی این گیاه در شرایط معمول و درون‌شیشه‌ای همیشه با چالش همراه بوده است. ریشه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای مهم‌ترین و چالشی‌ترین مرحله در فرآیند تولید از راه کشت بافت گل محمدی می‌باشد. به نظر می‌رسد که عدم تعادل هورمونی، پاسخ‌کند ریزنمونه‌ها به فرآیند القا و آغازش نمو ریشه‌های جدید و همچنین به احتمال قوی بافت ویژه آناتومیکی شاخسارهای این گیاه موانع عمده ریشه‌زایی سخت و اندک این گیاه در آزمایش حاضر می‌باشند.

تعداد ریشه و طول ریشه گیاهچه

تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با میانگین تولید ۲/۵ ریشه و ۸ میلی‌متر طول ریشه‌چه نسبت به تیمار NAA برتری داشت (جدول ۵) (شکل ۲ قسمت G، H). نتایج بررسی انجام شده در گل محمدی نشان داد که استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA موجب بهبود ریشه‌زایی گیاه شد (۱۵). در پژوهش انجام شده توسط Genova و همکاران (۸) مشخص شد که به ازای هر ریزنمونه ۲/۷۱ عدد ریشه در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد که از نظر تعداد ریشه با نتایج بررسی حاضر مشابهت دارد. در پژوهش دیگری در رز گزارش شد که بالاترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (۲۳). در پژوهش انجام شده در رز مشخص شد که استفاده از IBA (۱۰۰ میکرومول) به مدت ۱۲ ساعت در محیط کشت موجب افزایش تعداد و طول ریشه شد (۱۳).

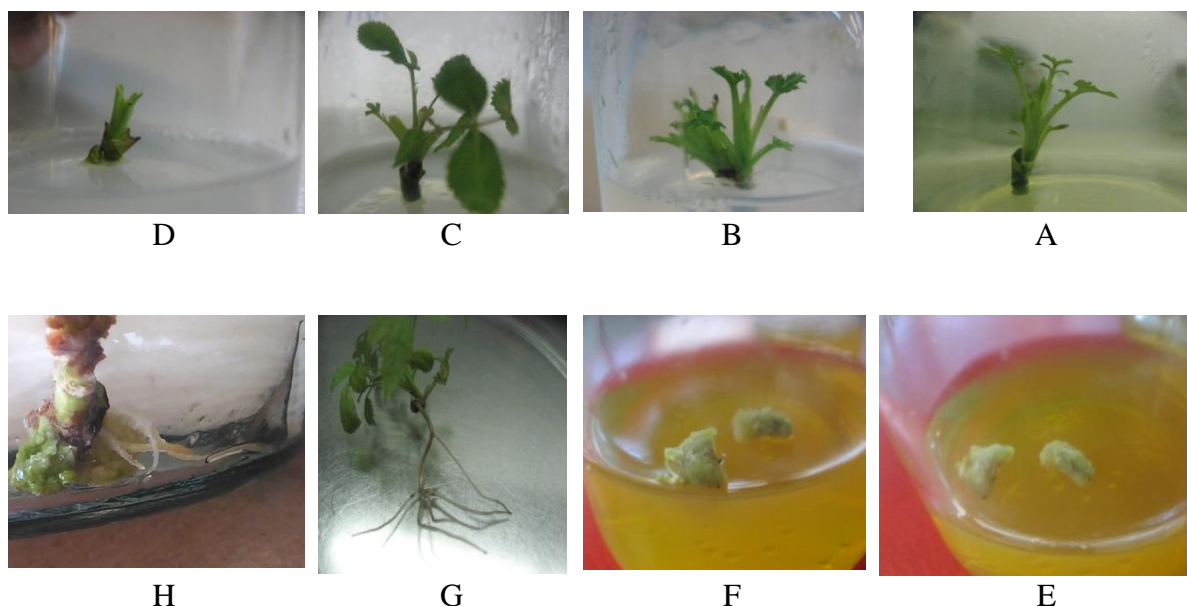


Fig. 2. The *Rosa damascena* plants grown in vitro. Fig. A-D plants regenerated from the diverse bus positions (proximal, middle, distal and shoot tip). Fig. E and F shows callus induction from the petiole explant and Fig. G and H is related to the rooting stage of explants.

شکل ۲- گیاهان گل محمدی رشد کرده در شرایط درون‌شیشه‌ای. تصاویر A-D مربوط به باززایی گیاه از موقعیت‌های مختلف جوانه (قسمت فوقانی، میانی، پایین و جوانه انتهایی)، تصاویر E و F القای پینه از ریزنمونه دمبرگی، تصاویر G و H مربوط به مرحله ریشه‌زایی از ریزنمونه‌ها.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از بررسی انجام شده نشان داد که موقعیت جوانه و تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد باززایی گیاه را تحت تاثیر قرار دادند و بیشترین طول شاخساره در تیمارهای ۲/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA در بخش‌های بالادست، میانی و پایین ساقه مشاهده شده و تیمار ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA در قسمت‌های بالادست و جوانه انتهایی ساقه موجب افزایش رشد طولی شاخساره شد. نتایج بررسی انجام شده در خصوص تاثیر تیمارهای مختلف تنظیم کننده‌های رشد بدون در نظر گرفتن اثر موقعیت جوانه نیز نشان داد که بیشترین طول شاخساره در تیمارهای ۴/۵ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۴/۵ میلی گرم در لیتر Kin به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد که نشان دهنده موثر بودن غلظت بالای هر دو تیمار در فرایند باززایی گیاه است. ارزیابی اثرهای تنظیم کننده‌های رشد در تولید پینه نشان داد که بالاترین درصد پینه‌زایی در تیمار ۴ میلی گرم در لیتر 2.4-D به همراه ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد و کمترین درصد قهوه‌ای شدن پینه در تیمار ۴ میلی گرم در لیتر 2.4-D به همراه ۱ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد که نشان می‌دهد این تیمار نسبت به سایر تیمارها نقش موثری در کاهش قهوه‌ای شدن نمونه داشته است. نتایج نشان داد که بالاترین درصد ریشه‌زایی و طول ریشه در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد.

References

منابع

- Adhikari, S.R. and B. Pant. 2013. Induction and proliferation of *in vitro* mass of callus of *Withania somnifera* (L.) Ann. Res. Plant Sci. 1 (3): 58 – 61.
- Arnold, N.P., M.R. Binns, N.N. Barthakur and D.C. Cloutier. 1992. A study of the effect of growth regulators and time of plantlet harvest on *in vitro* multiplication rate of hardy and hybrid tea roses. J. Hort. Sci. 67: 727-35.
- Badzhelova, V. and V. Bozhanova. 2018. Efficient protocol for *in vitro* clonal propagation of *Rosa amascena* Mill. and its comparison with conventional propagation method. Bulg. J. Crop Sci. 55(6): 37-44.
- Baiest, M.M.H., S.N. Azimi, N. Mortazavi and H. Mohammadi. 2013. Study of the effects of different concentration of IBA and 2.4.D on the rooting *Rosa damascene* cuttings. National Symposium of Passive Defence in Agricultural Section, Qeshm. (In Persian).
- Carelli, B.P. and S. Echeverrigary. 2002. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. Sci. Hort. 92: 64 – 74
- Debener, T. and L.H.S. Oyant. 2009. Genetic engineering and tissue Culture of Roses. Plant Physiol. 6: 393 – 409.
- Doina, C., A. Fira, O. Borsai, M. Hart, C. Sisea, R. Pop and D. Pamfil. 2017. Micropropagation of *Rosa damascena* Mill: the effects of gelling agents on the multiplication stages and acclimatization. Agri. Sci. Practice. 3(4): 56-63.
- Ginova, A., I. Tsvetkov and V. Kondakova. 2012. *Rosa damascena* Mill. An overview for evaluation of propagation methods. Bulg. J. Agr. Sci. 18: 545 – 556.
- Huettman, C.A. and J.E. Preece. 2000. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plan Cell Tissue Organ. Cult. 33: 105 – 119.
- Islam, M. M., M. Ahmed and D. Mahaldar. 2005. In Vitro callus induction and plant regeneration in seed explants of Rice (*Oryza Sativa* L.). Res. J. Agr. Biol. 72 – 75.
- Khosh-Khui, M. 2014. Biotechnology of Scented Roses: A Review. Int. J. Hort. Sci. Tech. 1(1): 1-20.
- Kornova, K.M. and J. Michailova. 2000. Study of *in vitro* rooting of Kazanlak oil-Bearing (*Rosa damascena* Mill.). J. Essent. Oil Res. 6: 485 – 492.
- Kumar, A., A. Soda, U. Palni, A. Gupta and L. Mankok Palni. 2001. Micropropagation of *Rosa damascena* Mill. from mature bushes using thidiazuron. J. Hort. Sci. Biotech. 76(1): 30-34.
- Omidbaigi, R. 1995. Approaches to Production and Processing of Medicinal Plants. Fekr-e-Roz Publication, P.P. 283. (In Persian).
- Omidi, M. And A. Yadollahi. 2016. Factors affecting *in vitro* propagation efficiency of three genotype of *Rosa damascena*. J. Bio. Nat. 6(2): 78-87.
- Pati, P.K., M. Sharma, A. Sood and P.S. Ahuja. 2009. Micropropagation of *Rosa damascena* and *R. bourboniana* in liquid cultures. Bio. Plant. 48: 609 – 611.
- Peivandi, M., L. Kazemi and A. Majd. 2015. The effects of different cytokinins on the proliferation of *Lavandula vera*. J. Plant Res. (Iran. J. Biol.). 28 (2): 257-263. (In Persian).
- Piri, K.H., M. Hasandokht and R. Abrishami. 2006. Plant tissue culture guide. Plant. Cell. Tissue. Organ. Culture. 33: 105 – 119.

19. Ranjbar, A. and A. Nourollah. 2016. Improving the rooting of two *Rosa damascene* genotypes cutting. Flower Ornam Plants, 2(1): 59-68. (In Persian).
20. Rout, G.R., A. Mohapatra and S. Mohan Jain. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnol. Adv. 24: 531-560.
21. Sabri, N. 1994. Cytogenetic and electro pheretic study of the taxon, Vinca; tissue and cell culture, for the production of alkaloid chemotypes, MSc thesis. Tarbiat Modares University. Iran. (In Persian).
22. Tabesh, F., M. Jafarkhani Kermani, S.M. Khayam Nekuie and A. Mosavi. 2013. *In vitro* propagation of damask rose (*Rosa damascena* cv. Isphan). Ann. Biol. Sci. 4(8): 134 – 138.
23. Wojtania, A., and B. Matysiak. 2018. In vitro propagation of Rosa Konstacin (R. Rugos × R. Beggerana) a plant with high nutritional and pro-health value. Folia. Hort. 30(2): 259-567.
24. Zarghari A. 1988. Medicinal Plants. Tehran University Publication. Volume 2. PP. 248. (In Persian).
25. Zoulfaghari-nasab, R., M. Khosrou-shahli, V. Grigourian and A.R. Motalebi Azar. 2004. Investigation of in vitro propagation of Apricot × Plum natural hybrids. Iranian J. Hort. Sci. Tech. 5(5): 81-92. (In Persian).

The Effect of Bud Position and Growth Regulators on the Micropropagation of *Rosa damascena* Mill.

M.B. Hassanpouraghdam, A. Ebrahimzadeh, M.A. Aazami, S. Malekian, M. Salehzadeh and L. Vojodi Mehrabani¹¹

Several experiments were conducted to study the effects of bud position and plant growth regulators on the micropropagation of *Rosa damascena*. In the first experiment, the effects of bud localities (the proximal, middle, distal and shoot tip), BAP (2.5 and 5 mgL⁻¹), TDZ (0.05 and 0.1mgL⁻¹) and NAA (0.1 mgL⁻¹) were studied on the regeneration of plant. The highest shoot length in the distal, middle and proximal bud locations was attained by 2.5 and 5 mgL⁻¹ BAP + 0.1 mgL⁻¹ NAA. For the proximal and shoot tips, the top data was related to 0.05 mgL⁻¹ of TDZ + 0.1 mgL⁻¹ NAA. In the second experiment, Kin and BAP (0, 1.5, 3 and 4.5 mgL⁻¹) treatment combinations were tested on the regeneration potential without considering bud location. The highest shoot length belonged to 4.5 mgL⁻¹ of BA and BAP. For the rooting stage; 0.1, 0.2 and 2 mgL⁻¹ of NAA and IBA were examined and the highest rooting percentage and root length was recorded for 0.1 mgL⁻¹ IBA. In conclusion, the in vitro regeneration response was controversy for the bud location. However, the growth regulators had promising effects on the regeneration of *Rosa damascena*.

Keywords: BAP (6- benzyl amino purine), NAA, TDZ, Rooting.

1. Associate Professors and Former M.Sc. Student of Horticultural Science, University of Maragheh, PhD student of Plant Pathology, Shiraz University and Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, respectively.

* Corresponding Author, Email: (hassanpouraghdam@gmail.com).