

تأثیر موقعیت جوانه و تنظیم کننده های 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 کننده های 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 کننده های 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 تیمدiazورون + NAA مشاهده شد. در آزمایش دوم تأثیر غلظت های 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 ریشه زایی از غلظت های ۰/۱، ۰/۲ و ۲ میلی گرم در لیتر اکسین های IBA و NAA استفاده شد. بالاترین درصد ریشه زایی و طول ریشه در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد. در مجموع پاسخ ریزازدیادی به موقعیت های مختلف جوانه متناقض و متفاوت بود، اما تنظیم کننده های رشد تأثیر مثبتی بر ریزازدیادی گل محمدی داشتند.

واژه های کلیدی: تیمدiazورون، ۶- بنزیل آمینو پورین، ریشه زایی، نفتالن استیک اسید.

مقدمه

ایران با داشتن اقلیم متنوع و در نتیجه وجود رویشگاه های 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 مهم ترین گونه های رز محسوب می شود. این گیاه استفاده فراوانی در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی و اشتغال زایی، توسعه صادرات غیرنفتی و طراحی فضای سبز دارد (۱۴، ۱۹، ۱۱). ارزش اقتصادی و دارویی گل محمدی به خاطر اجزای اسانس با ارزش آن (سیترونلول، ژرانیول، ان نونادکان و غیره) می باشد (۱۲). قابل بیان است که با وجود اهمیتی که گیاه گل محمدی در ایران دارد، به روش سنتی افزایش می یابد. از مهم ترین دشواری های افزایش سنتی گیاه می توان به هزینه بر و زمان بر بودن روش سنتی، محدودیت پایه مادری برای تهیه قلمه و باززایی

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 ریزباززایی 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 به‌دست 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. گندزدایی سطحی با استفاده از مایع ظرف‌شویی انجام شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند. بعد از گندزدایی سطحی، نمونه‌ها در زیر هود لامینار با الکل ۷۰٪ به مدت ۴۰ ثانیه گندزدایی شد. بعد از گندزدایی، 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 به‌طور 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 به‌منظور بررسی اثرهای تنظیم‌کننده‌های 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- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در محیط باززایی.

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

تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی گرم در لیتر) مورد استفاده در محیط کشت موراشیگی و اسکوگ				
Growth regulators (mgL ⁻¹) used in MS medium				
TDZ		BAP		موقعیت جوانه
				Bud position
0.1	0.05	5	2.5	قسمت بالادست ساقه
				Distal end
0.1	0.05	5	2.5	قسمت میانی ساقه
				Middle part
0.1	0.05	5	2.5	قسمت پایین ساقه
				Proximal end
0.1	0.05	5	2.5	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 تنظیم‌کننده‌های 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 افشانه 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 میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA موجب افزایش طول شاخساره در قسمت بالادست، میانی و پایین ساقه گیاه شد. در گیاهان تیمار شده با تیدیاوزورون بیشترین طول شاخساره در غلظت ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی گرم 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 میلی گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA، قسمت‌های میانی، پایین و جوانه انتهایی ساقه در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA حاصل شد (جدول ۲). نتایج بررسی انجام شده در رزماری نشان داد که بیشترین طول ریزنمونه در محیط حاوی ۲ میلی گرم 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 طولی 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 میلی گرم 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 میلی گرم بر لیتر BAP + ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و قسمت بالادست ساقه و پایین ساقه با غلظت ۵ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد برگ را تولید نمودند (جدول ۲). ریزنمونه جوانه انتهایی در ترکیب تیماری ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر TDZ + ۰/۱ میلی گرم 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

ریزنمونه، ابعاد ظرف و غیره می‌توانند تعداد برگ را مانند مؤلفه‌های مرتبط با شاخساره‌های تولید شده زیر تأثیر 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*.

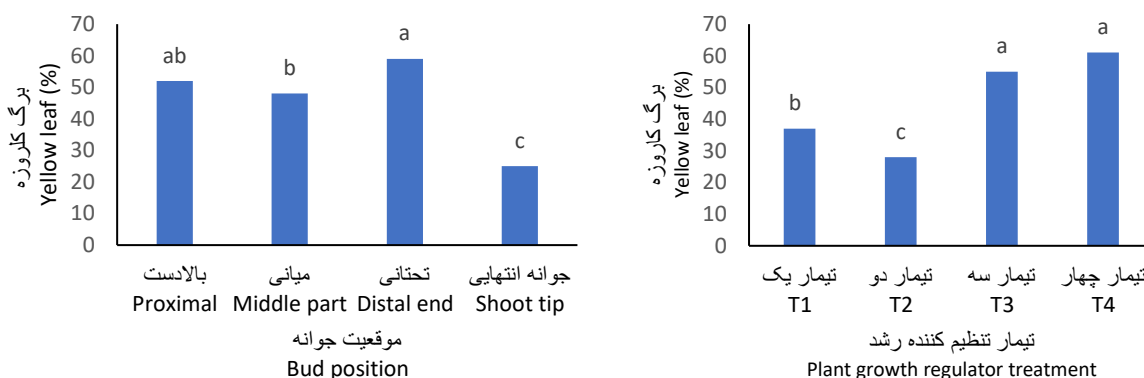
مکان قرارگیری نمونه Bud position	تنظیم کننده‌های رشد Growth regulators (mgL ⁻¹)	طول شاخساره Shoot length (mm)	تعداد برگ Leaf number
قسمت بالادست ساقه Distal end	0.1 NAA + 2.5 BAP	24 ^{ab}	12 ^{b-d}
قسمت میانی ساقه Middle part	0.1 NAA + 2.5 BAP	29 ^a	16 ^{ab}
قسمت پایین ساقه Proximal end	0.1 NAA + 2.5 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 Huettelman 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.



(A) الف

(B) ب

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 (mgL⁻¹) (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 گیاهچه ها به صورت چشمگیری کاهش یافت. باززایی و ایجاد شاخساره اغلب به تیمار همزمان اکسین و سایتوکنین نیاز دارد. اکسین به تنهایی نمی تواند روند افزایش طول گیاهچه ها را تسریع کند، اما اگر به مقدار کم استفاده شود، اثر بازدارنده مقادیر زیاد سایتوکنین بر رشد طولی گیاهچه ها را خنثی نموده و روند رشد ساقه ها را به حالت عادی باز می گرداند (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 ریزنمونه های پراوری شده در شرایط درون شیشه ای به طور کامل منطقی به نظر می رسد. در این موضوع نیز باز مؤلفه های فیزیولوژیک، زیست شیمیایی، پتانسیل ژنتیکی ریزنمونه و سایر مؤلفه های مرتبط با افزایش درون شیشه ای همچون ترکیب، نوع محیط کشت و به ویژه مقدار و نسبت تنظیم کننده های رشدی مورد استفاده تأثیر فراوانی روی این صفت خواهند داشت و در آزمایش حاضر نیز همین نتیجه مورد انتظار بود.

جدول ۳- تأثیر 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 کم سبزینه 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.

حرف های مشابه در ستون ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار براساس آزمون LSD می باشد.

تعداد برگ در هر ریزنمونه

بیشترین تعداد برگ مربوط به تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA + ۴/۵ میلی گرم 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 میلی متر) در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA + ۴/۵ میلی گرم در لیتر Kin مشاهده شد. از این رو، به نظر می رسد با توجه به افزایش رشد طولی در این تیمار، بیشترین تعداد برگ نیز در آن مشاهده شود. نتایج حاصل از بررسی حاضر با نتایج پژوهش های Pati و همکاران (۱۶) همخوانی دارد. در بررسی های قبلی در گل محمدی نیز مشخص شده بود که کاربرد غلظت ۴ میلی گرم 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 انشعاب های نمونه های پراوری شده پاسخ متناسبی به مؤلفه های متعدد مورد استفاده در ریزازدیادی بوده و در آزمایش حاضر نیز مشاهده گردید.

درصد برگ کم سبزینه در هر ریزنمونه

نتایج حاصل از جدول ۳ نشان داد که تیمار شاهد دارای بیشترین درصد برگ کم سبزینه (۷۵ درصد) در بین تیمارها بود. کمترین تعداد برگ کم سبزینه در تیمارهای ۴/۵ میلی گرم در کینتین و بنزیل آمینو پیورین مشاهده شد (جدول ۳). کم سبزیگی برگ ها از دشواری های کشت های درون شیشه ای است. تشریح ترکیب های فنولی از قسمت برش یافته ریزنمونه و انتشار آن ها به محیط کشت باعث مسدود شدن آوندها شده و در نتیجه جذب مواد غذایی با مشکل مواجه خواهد شد و منجر به کم سبزینه شدن و قهوه ای شدن برگ خواهد شد (۸). همچنین عواملی مانند رشد سریع گیاهچه ها در محیط MS به دلیل مقادیر بالای نیترات، تماس گیاهچه ها با دیواره شیشه های کشت، تجمع رطوبت در انتهای برگ ها، زیرکشت کردن با فواصل طولانی و در

نتیجه کمبود برخی از عناصر غذایی می تواند از جمله عوامل کمسبزینه شدن برگها در شرایط درون شیشه ای باشد. تنش حاصل از این عوامل باعث فعالیت چرخه تولید اتیلن در گیاهچه ها شده و در مراحل پیشرفته سبب کمسبزینه شدن و تخریب بافت در برگها می شود (۲۵). مشابه آزمایش اول، جدا از موقعیت جوانه، کمسبزینه گی برگ در حد قابل قبولی که میزان پرآوری را کاهش محسوسی ندهد متأثر از مؤلفه های آزمایشی بوده و این میزان اندازه گیری شده به طور کامل منطقی و قابل انتظار بود.

بررسی ویژگی های مرتبط با پینه زایی از ریزنمونه های دمبرگی گل محمدی

در این آزمایش اثرهای ۶ تنظیم کننده رشد گیاهی بر ویژگی هایی مانند درصد پینه زایی ریزنمونه ها، درصد پینه های قهوه ای شده، وزن تر پینه و قطر پینه ریزنمونه های دمبرگی گل محمدی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴).

جدول ۴- تاثیر تنظیم کننده های رشد بر درصد پینه زایی، درصد پینه قهوه ای، 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*.

تنظیم کننده رشد Growth regulator	قطر پینه callus diameter (mm)	وزن تر پینه Callus fresh weight (g)	درصد قهوه ای شدن پینه Callus browning (%)	درصد پینه زایی 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.

حرف های مشابه در ستون ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار براساس آزمون LSD می باشد.

درصد پینه زایی و درصد قهوه ای شدن ریزنمونه ها

نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین داده ها (جدول ۴) نشان داد که بیشترین درصد پینه زایی در تیمارهای حاوی ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D، مشاهده شد. کمترین درصد پینه زایی در تیمارهای ۴ میلی گرم در لیتر NAA + ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد. با توجه به مقایسه میانگین ها می توان نتیجه گیری کرد که بین اکسین های به کار 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 پینه زایی در جایگاه بعدی قرار گرفت. کمترین درصد قهوه ای شدن در تیمار ۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد. در سایر تیمارهای آزمایشی قهوه ای شدن نمونه ها مشاهده شد. اکسین ها و سایتوکینین ها از مهم ترین فاکتورهای رشد و پینه زایی در کشت درون شیشه ای به شمار می روند که نوع و غلظت مؤثر آن ها در ریزنمونه های مختلف بسته به جنس گیاه و رقم متفاوت می باشد (۲۰). ریزنمونه ها بعد از ۲۰ روز نگهداری در شرایط تاریکی، تغییر شکل داده و فرایند پینه زایی در اثر تاریکی تحریک و شکل گرفت. گزارش های زیادی وجود دارند که نشان می دهند شرایط تاریکی فرایند پینه زایی را تحریک و سرعت تشکیل آن را بیشتر می کند (۱۰). در بررسی انجام شده توسط Rout و همکاران (۲۰) گزارش شد که نه تنها نور برای تحریک و تشکیل پینه ضروری نمی باشد، بلکه مانعی برای تشکیل پینه به دلیل افزایش فعالیت ایندول استیک اسید اکسیداز است (۲۰). فعالیت این آنزیم سبب تغییر در تعادل بین اکسین و سایتوکینین درون زرا در گیاه شده و تولید پینه را کاهش می دهد. افزایش ترشح ترکیب های فنولی و قهوه ای شدن پینه ها موجب کاهش در تعداد پینه های سالم شده و در ادامه درصد باززایی و اندام زایی از پینه ها با کاهش مواجه می شود. میزان پینه زایی ریزنمونه های مختلف، اولین پاسخ فیزیولوژیکی به مؤلفه های کشت درون شیشه ای بوده و انتظار می رود که ریزنمونه هایی با پتانسیل بالا از لحاظ این صفت، در زمان اندک و با نرخ بالاتری قادر به تولید پینه های مناسب برای پرآوری در مراحل بعد خواهند بود. در مرحله بعد، پینه زایی به شدت به مؤلفه های محیط رشد ریزنمونه، بالانس تنظیم کننده های رشد و مقادیر غلظت های نسبی هر یک از این تنظیم کننده ها در تکامل با هم وابسته است. با در نظر گرفتن

همه استدلال های بالا در آزمایش حاضر نیز پینه زایی و هم چنین زنده ماندن پینه ها و میزان افت به واسطه قهوه ای شدن ریزنمونه ها به میزان زیادی زیر تاثیر عوامل ذکر شده قرار گرفتند.

قطر و وزن تر پینه

مقایسه میانگین داده ها نشان داد که تیمارهای حاوی ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۴ میلی گرم 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 می دهند 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 قوی تری است، طبیعی به نظر می رسد که تیمار نمونه ها با 2,4-D پینه ها را از لحاظ اندازه و شکل ظاهری بزرگتر نماید (۱۸). نتایج مشابهی در خصوص افزایش وزن تر پینه در اثر کاربرد تنظیم کننده های رشد در گیاه دارویی *Withania somnifera* توسط Adhikari و همکاران (۱) گزارش شد. اکسین ها در غلظت زیاد سبب افزایش طول یاخته و افزایش تقسیم یاخته ای و وزن پینه می شوند (۱). فرایند پینه زایی در ریزنمونه ها به مجموع سطوح هورمونی درون زاد و برون زاد (هورمون های اضافه شده به محیط کشت) بستگی دارد (۱). قطر و وزن تر پینه رابطه تنگاتنگی با فرایند پینه زایی و میزان رشد پینه ها دارند. در این مورد نیز پتانسیل ذاتی ریزنمونه های مختلف مهم ترین مؤلفه تأثیر گذار بر مقادیر کمی این صفت خواهد بود. ولیکن همه مؤلفه های محیط کشت اعم از نوع محیط کشت، ترکیب تنظیم کننده های رشد، غلظت نمک ها، نوع ریزنمونه، مدت زمان ایستایی ریزنمونه ها در محیط رشد و فراوانی زیرکشت ها هم در رسیدن به مقادیر مطلوب به این صفت مؤثر هستند.

ریشه زایی درون شیشه ای گیاهچه ها

با وجود اینکه در آزمایش های مقدماتی از تیمارهای متعددی برای ریشه زایی استفاده شد، تنها در دو تیمار (۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA) ریشه زایی مشاهده گردید. بنابراین، تنها نتایج حاصل از این دو تیمار در بررسی حاضر بیان گردید (جدول ۵). در این آزمایش ویژگی هایی مانند درصد ریشه زایی، تعداد و طول ریشه ها اندازه گیری شد. بررسی مقایسه میانگین داده ها (جدول ۵) نشان داد که بین تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA با ۷۰ درصد ریشه زایی و تیمار ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA با ۳۰ درصد ریشه زایی تفاوت معنی داری مشاهده شد. بیشتر گیاهچه ها در محیط کشت ریشه زایی به مرور زمان کیفیت خود را از دست داده و حالت کم سبزینه و قهوه ای به خود گرفتند. احتمال می رود کم سبزینه شدن و قهوه ای شدن بافت گیاهچه ها در شرایط درون شیشه ای با عواملی مانند ترشح ترکیب های فنولی، مسدود شدن آوندها و عدم جذب مواد غذایی، رطوبت زیاد، عدم جذب کلسیم و فعالیت چرخه تولید اتیلن در گیاهچه ها در ارتباط باشد (۸). نتایج بررسی انجام شده در رزماری نشان داد که بیشترین طول ریشه در محیط کشت حاوی ۳۰۰ میلی گرم در لیتر IBA (با قرارگیری نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ریشه زایی) حاصل شد (۱۷). چنین به نظر می رسد که کاربرد IBA نقش مهمی در نمو یاخته های کوتیلدونی و ریشه های موئی داشته باشد (۱۷).

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد ریشه زایی، تعداد ریشه و طول ریشه تحت تیمار تنظیم کننده های 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 ریشه زایی Rooting percentage
۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA 0.1mgL ⁻¹ IBA	8 ^a	2.5 ^a	70 ^a
۰/۲ میلی گرم 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.

حرف های مشابه در ستون ها بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار براساس آزمون LSD می باشد.

القای ریشه زایی در گونه ها و واریته های رز به ویژه گونه های گل محمدی بسیار مهم است و ریشه زایی یکی از دشوارترین مراحل ریزازدیادی گل محمدی به شمار می رود. تاکنون فعالیت های گسترده ای برای غلبه بر این مشکل صورت گرفته است. ریشه زایی با اکسین های مختلف به رقم گیاه بستگی دارد. گل محمدی از جمله گونه های اسانس دار رز می باشد و ریشه زایی 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 سایتوکینین 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 ۵/۵-۱/۲ 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 Ginova 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).

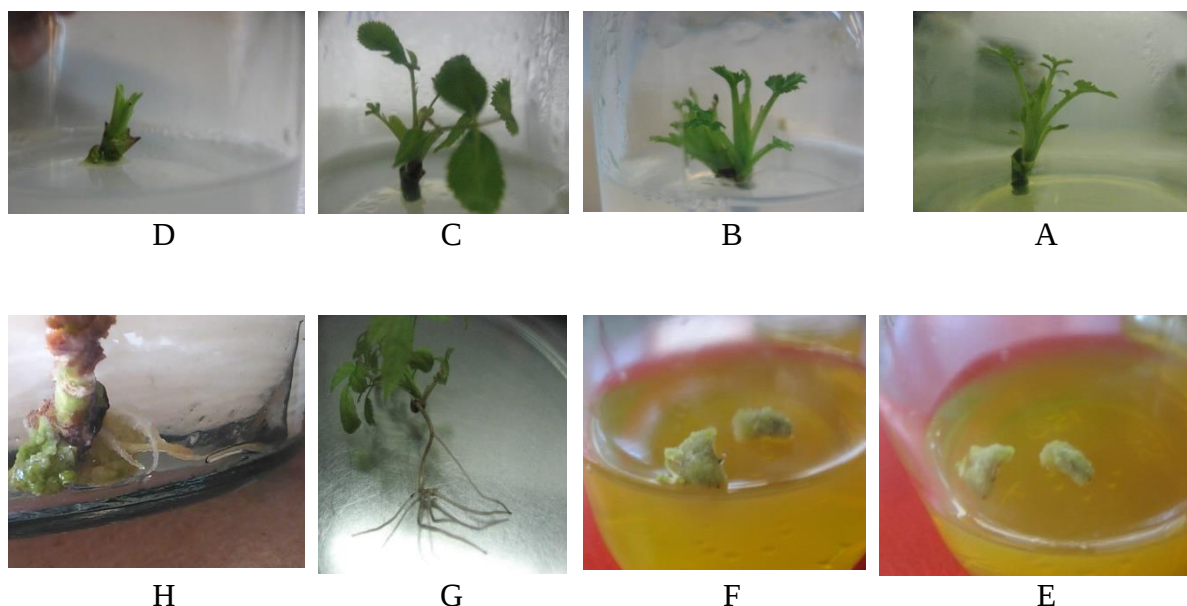


Fig. 2. The *Rosa damascena* plants grown in vitro. Fig. A-D plants regenerated from the diverse bus positions (proximal, middle, distal and shoot tip). Fig. E and F shows callus induction from the petiole explant and Fig. G and H is related to the rooting stage of explants.

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 تأثیر 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 ۰/۵ 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 تأثیر 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).
- Omid, 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 phoretic 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).