نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و سوم، شماره چهارم، ۱۳۹۵
http://jopp.gau.ac.ir

اثر نوع هورمون و غلظت محیط پایه بر جوانه‌زنی و پرآوری ریز نمونه‌های رز ساناز (*Rosa chinensis* var. Elvis)

***مهدی درودی[۱]، محمّدرضا واعظی‌کاخکی[۲] و اکبر صفی‌پور افشار[۳]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، ایران، [۲]استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران، [۳]استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۷/٤؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۱۱/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: گل رز به‌عنوان ملکه گل‌ها از عهد باستان مورد توجه بشر بوده است. در حال حاضر یکی از محبوب‌ترین گل‌های جهان است و از لحاظ میزان تولید در صدر قرار دارد. رز ساناز یکی از انواع رزهای زینتی است که امروزه به مقدار گسترده‌ای در فضای سبز و پارک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. رز ساناز (*Rosa chinensis* var. Elvis) یکی از چندین گونه رز کشور ماست که پایه‌های آن را به‌وسیله روش‌های سنتی تکثیر و در بازار به فروش می‌رسانند. از آن‌جایی‌که تولید آن از طریق روش‌های سنتی با محدودیت زمانی و کمبود پایه‌های پیوندی همراه است، این تحقیق، به‌دنبال تعیین شرایط بهینه ریزازدیادی گونه رز رقم ساناز از طریق کشت بافت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: جوانه‌های جانبی و انتهایی شاخه‌های تهیه شده از نهال‌های پرورش یافته در گلدان به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. محیط‌های مورد بررسی جهت پرآوری و باززایی شامل محیط MS، MS/2 و MS/4 بود. هورمون‌های در این آزمایش هورمون ٦- بنزیل‌آمینوپورین (BAP) با غلظت‌های ۰، ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر و هورمون ایندول اسید بوتیریک (IBA) با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد که هر تکرار شامل ۵ ریزنمونه بود.

*مسول مکاتبه: Hdarroudi@gmail.com

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بستر MS دارای بیشترین درصد باززایی و ترکیب تیمار بستر MS تمام غلظت، همراه با ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بیشترین باززایی را به‌خود اختصاص می‌دهد. بیشترین مقدار شاخه‌زایی در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. ترکیب تیمار محیط پایه MS/4 همراه با ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط پایه MS/4 همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین شاخه‌زایی را از خود نشان دادند. محیط MS/4 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP دارای کمترین و محیط MS فاقد هورمون، بیشترین طول شاخه را داشتند. شاخه‌های تولیدی با موفقیت ریشه‌دار شدند. سپس گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به شرایط خارج از آزمایشگاه منتقل و سازگار شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که محیط پایه MS محیط مناسبی برای گونه رز ساناز می‌باشد. گونه ساناز در غلظت‌های نسبتاً بالای سیتوکینین (BAP) از باززایی و شاخه‌زایی نسبتاً بالایی برخوردار است. با افزایش میزان سیتوکینین محیط تعداد شاخه‌های ایجاد شده افزایش یافت اما طول شاخه‌ها کاهش یافت. بیشترین رشد شاخه‌ها در محیط فاقد هورمون اتفاق افتاد.

واژه‌های کلیدی: رز ساناز، طول شاخه، سیتوکینین، پرآوری

مقدمه

گل رز به‌عنوان ملکه گل‌ها از زمان عهد باستان مورد توجه بشر بوده است (۳). گل سرخ از تیره Rosaceae بیش از ۱۰۰ گونه را در بر داشته، که بالغ بر ۲۰ هزار رقم تجاری آن اصلاح و به دنیا معرفی شده است (۹) (۱۵). از آن‌جایی که تولید رز از طریق روش‌های سنتی با محدودیت زمانی و کمبود پایه‌های پیوندی همراه است (۱۰)؛ استفاده از روش ریزازدیادی روبه افزایش است. در مورد کشت بافت گونه‌های مختلف جنس رز تحقیقات نسبتاً زیادی در داخل و خارج کشور انجام شده است از جمله می‌توان به شیرزادیان خرم‌آبادی و لطفی (۲۰۰۳) اشاره نمود که اقدام به تکثیر رز الیزابت (*Rosa hybrida* var. Queen Elizabeth) به‌روش کشت بافت نمودند. ایشان بیشترین میزان شاخه‌زائی در محیط غذایی MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و پس از سومین واکشت به‌دست آوردند. مطلوب‌ترین درصد ریشه‌زایی (۷۵ درصد) در محیط MS تغییر یافته حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به‌دست آمد (۲۳). خسروی و همکاران (۲۰۰۷) اقدام‌به تهیه دستورالعمل تکثیر انبوه رز هیبرید آیس‌برگ (*Rosa hybrida* cv. Iceberg) نمودند. بیشترین میانگین تعداد شاخه جانبی (۱۰/۱) و برگ سبز (۲٦) برای هر ریزنمونه در یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۹۳ میلی‌گرم در لیتر NAA پس از ۲۱ روز به‌دست آمد (۱٤). بیشترین تعداد ریشه (٤/۳۵) و طول ریشه (۰/۸۲ سانتی‌متر) در محیط MS/4 به‌دست آمد. مطالعه‌ای در مورد *Rosa moschata* برای تعیین عوامل مؤثر بر ریزازدیادی این‌گونه به‌وسیله خوش‌خوی و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. نتایج نشان داد که بستر MS/2 بهترین بستر برای ریزازدیادی است. مقایسه TDZ، BAP و کینتین نشان داد که TDZ بهترین تنظیم‌کننده رشد برای تکثیر شاخه است. بالاترین درصد تکثیر با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌دست آمد. بهترین بستر جهت تولید ریشه ریزقلمه‌ها با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA +۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4,D به‌دست آمد (۱۳). مهدوی ماشکی و همکاران (۲۰۱٤) اقدام به کشت بساک گل محمدی و رز مینیاتوری نمودند. نتایج نشان داد، در اکوتیپ کاشان جایگزینی نیترات‌کلسیم با نیترات‌آمونیم باعث افزایش میزان کالوس‌دهی گردید. در رز مینیاتوری اسیدهای آمینه نقش مؤثری بر صفت درصد کالوس‌زایی بساک داشتند و گلایسین، گلوتامین و کازئین هیدرولیزات از سایر اسیدهای آمینه بهتر بودند. همچنین ساکارز نسبت به سوربیتول، قند مناسبتری جهت کالوس‌زایی بساک بود و با جایگزینی ساکارز توسط سوربیتول میزان کالوس‌زایی کاهش یافت (۱٦).

در مطالعه‌ای، یداللهی و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی اثر عناصر غذایی و هورمون بر رشد و شاخه‌زایی گل محمدی پرداختند. نتایج نشان داد افزایش نیتروژن بستر کاشت باعث افزایش رشد شاخه‌ها و تعداد برگ آن شد. از نظر تعداد شاخه بین غلظت‌های هورمونی مورد استفاده تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین بین تیمارهای مختلف نیز تفاوتی از نظر ریشه‌زایی مشاهده نشد (۲۷). ریزازدیادی *Rosa clinophylla* از طریق کشت درون شیشه‌ای جوانه محوری به‌وسیله میرسا و کاکرابارتی (۲۰۰۹) استانداردسازی شد. نتایج نشان داد، سیتوکینین به‌تنهایی قادر به ایجاد جوانه‌زنی می‌باشند. اما رشد مناسب‌تر آن‌ها و افزایش تعداد آن‌ها در ترکیب با GA_3 به‌دست آمد. نیترات نقره در جلوگیری از خشکیدگی شاخه و زردشدن برگ‌ها مؤثر بود. زغال فعال در تمام مراحل از جمله ریشه‌دهی مؤثر بود. مقدار ۹۰ درصد ریشه‌دهی در بستر MS/2 که یک میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲۵۰ میلی‌گرم زغال فعال اضافه شده بود، به‌دست آمد (۱۸). با توجه‌به محدودیت‌های تکثیر از طریق قلمه و سایر روش‌های ازدیاد این‌گونه، تعیین شرایط بهینه تکثیر گونه رز رقم ساناز (*Rosa chinensis* var. Elvis) از طریق کشت بافت به‌منظور کاهش هزینه‌های تکثیر آن، یکی از مهمترین اهداف این مطالعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ابتدا ۳۰ عدد گلدان رز (*Rosa chinensis* var. Elvis) تهیه گردید. به‌منظور مشابهت ریزنمونه‌ها و همچنین ایجاد شاخه‌های جوان، شاخه‌های اولیه این گل‌ها قطع شد تا شاخه‌های جدید، همسن و جوان‌تر تولید گردد. سپس، شاخه‌های جدید قبل از چوبی شدن، جدا شده و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافتند. ریزنمونه‌ها طوری از شاخه‌ها برش داده شد که هر یک از آن‌ها دارای حداقل یک جوانه جانبی باشد. این کار همراه با حذف خارها و برگ‌ها صورت گرفت، به‌شکلی که هر ریزنمونه بین ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر طول داشتند. ریزنمونه‌ها، به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول آب ولرم و مایع ظرفشویی پیش تیمار ضدعفونی شدند تا هر گونه آلودگی ظاهری از روی ریزنمونه‌ها پاک شود. ریزنمونه‌ها با آب جاری به خوبی شستشو داده شدند.

تیمار ضدعفونی مورد استفاده شامل محلول اتانل ۷۰ درصد به‌مدت ۲۰ ثانیه، سپس محلول هیپوکلریدسدیم (NaClO) ۵ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه و در انتها، شستشو در آب مقطر استریل سه مرتبه بود.

تیمارهای مورد استفاده جهت بررسی میزان درصد باززایی بدین‌صورت بود که غلظت‌های مختلف هورمون ٦- بنزیل آمینوپورین (BAP) (۰، ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) در حضور غلظت‌های مختلف هورمون ایندول بوتیریک اسید (IBA) (۰، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در غلظت‌های مختلف محیط غذایی MS (MS، MS/2 و MS/4) مورد بررسی قرار گرفت (در کل ٤٨ ترکیب تیمار). آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. در هر تکرار ۵ نمونه گیاهی وجود داشت. در مجموع ۷۲۰ ریزنمونه در داخل شیشه‌ها کشت گردید. بررسی میزان شاخه‌زایی نیز با استفاده از محیط‌های مرحله باززایی انجام شد. طرح آزمایش همانند مرحله باززایی بود. صفات مورد بررسی در این آزمایش تعداد شاخه و طول شاخه‌های آن‌ها بود.

محیط‌های تهیه شده دارای ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار بودند. pH محیط‌ها با استفاده از NaOH و HCl در ۵/۷ الی ۵/۸ تنظیم شد. استریل کردن محیط‌های تهیه شده، با استفاده از اتوکلاو با فشار ۱/۲ اتمسفر و زمان ۱۵ دقیقه انجام شد. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود نوری ١٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی که با استفاده از لامپ‌های فلورسنت سرد تأمین می‌شد، نگهداری شدند. واکاشت‌ها هر چهار هفته یکبار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ١٦ انجام شد. پس از تعیین همگنی و نرمالیتی داده‌ها، برای مقایسات کلی از آزمون تجزیه واریانس و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد. برای تجزیه تحلیل درصد باززایی داده‌ها ابتدا تبدیل $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ انجام شد سپس تجزیه و تحلیل انجام شد.

نتایج و بحث

طبق جدول تجزیه واریانس، نوع محیط پایه بر درصد جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها معنی‌دار بود سایر عوامل تأثیر معنی‌داری بر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها نداشتند (جدول ۱). نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین ترکیب تیمارهای مختلف از نظر درصد جوانه‌زنی وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس عوامل مورد بررسی تحت تأثیر تیمارهای مختلف.

Table 1. The analysis of variance results of factors under different treatments.

میانگین مربعات MS			درجه آزادی Df.	منابع تغییرات
طول شاخه Shoot length	پرآوری Proliferation	درصد جوانه‌زنی Germination percent		
58.262**	0.780 ns	3.852**	2	نوع بستر (A) Media (A)
4.057**	0.039 ns	0.082ns	3	غلظت اکسین (B) (Auxin) (B)
29.137**	136.212**	0.029 ns	3	سیتوکینین (C) Cytokinin (C)
0.308 ns	0.359 ns	0.011 ns	6	A×B
1.256**	0.403 ns	0.018 ns	6	A×C
0.604*	0.209 ns	0.007 ns	9	B×C
0.414 ns	0.312 ns	0.034 ns	18	A×B×C
27%	25%	30%		ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variance (%)

** و * به‌ترتیب بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد و ns عدم معنی‌داری.

n.s. Non significant, * Significant in 5%probability, ** Significant in 1% probability.

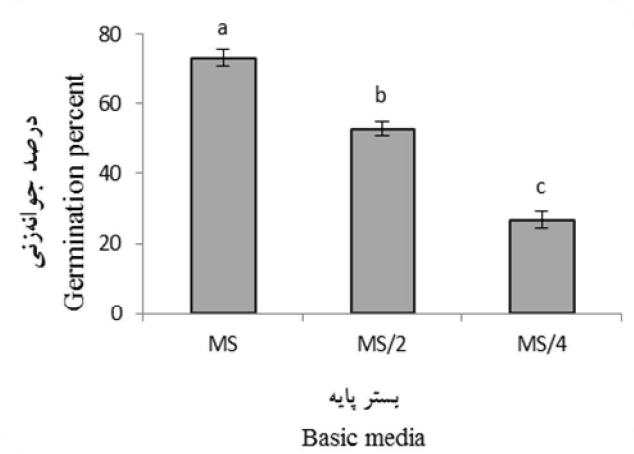
جدول ۲- نتایج آزمون تجزیه واریانس عوامل مورد بررسی تحت تأثیر ترکیب تیمارهای مختلف.

Table 2. The analysis of variance results of factors under different treatments.

ضریب تغییرات Coefficient of variance	میانگین مربعات MS	درجه آزادی df	منبع تغییرات Variable
30.4%	1244.4**	47	درصد جوانه زنی Germination percent
27%	11.001**	47	پرآوری Proliferation
30%	5.291**	47	طول شاخه Shoot length

علامت ** بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۱ درصد.

** Significant in 1% probability.



شکل ۱- مقایسه درصد جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف.

Figure 1. Comparison of germination percent in different treatments.

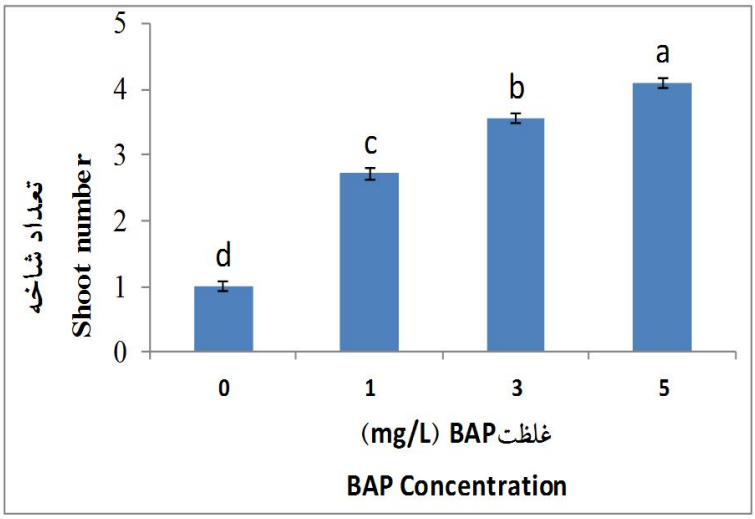
در تحقیق حاضر محیط پایه MS نتایج مناسبی در باززایی ریزنمونه‌های رز ساناز از خود نشان داد که به‌نظر می‌رسد بیشتر به فرم دسترسی و مقدار جذب نیتروژن به‌وسیله گیاه ارتباط داشته باشد. در اکثر تحقیقات انجام شده روی جنس رز همانند تحقیق حاضر، محیط پایه MS را به‌عنوان محیط پایه مناسب برای تکثیر تشخیص داده‌اند که از جمله می‌توان به شیرزادیان‌خرم‌آبادی و لطفی (۲۰۰۳) روی رز الیزابت[1]، صالحی و خوش‌خوی (۲۰۰۳) در ارقام رز مینیاتور[2]، عصاره و همکاران (۲۰۰۷) روی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)، هونگ (۱۹۹۶) روی *Rosa chinensis*، میرسا و کاکرابارتی (۲۰۰۹) روی *Rosa clinophylla* و خوش‌خوی و همکاران (۲۰۱۰) روی *Rosa moschata* اشاره نمود که از محیط MS برای ریزازدیادی گونه‌های مختلف رز استفاده نموده‌اند (۲۳، ۲۲، ۲۰، ۸، ۱۸، ۱۳). نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها نشان داد که در محیط پایه MS با غلظت کامل، بیشترین درصد جوانه‌زنی و محیط MS یک چهارم، کمترین درصد جوانه‌زنی (به‌ترتیب ۷۳ و ۲۷ درصد) مشاهده شد (شکل ۱). به‌نظر می‌رسد که رز ساناز در مقابل کاهش عناصر غذایی و هیدرات کربن حساس بوده و با کاهش غلظت عناصر غذایی بستر کشت، باززایی آن کاهش می‌یابد.

1- *Rosa hybrida* var. Queen Elizabeth
2- *Rosa chinensis* Jacp. var. minima Rehd

در مورد رز *Rosa clinophylla* عنوان شده که اگر ریزنمونه‌ها در بستر MS/2 یا MS/4 باقی گذاشته شوند (طی ۱۵ روز)، علی‌رغم رشد ریشه‌ها گیاهچه‌ها زرد شده و نهایتاً خشک می‌شوند (۱۸).

مقایسه میانگین درصدجوانه‌زنی ریزنمونه‌ها بین ترکیب تیمارهای مختلف نشان داد که بستر MS تمام غلظت، همراه با ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بیشترین و بستر پایه MS/4 همراه با ۰/۱ یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP کمترین درصدجوانه‌زنی را داشتند (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها نشان‌داد که ترکیب تیمار بستر MS تمام غلظت، همراه با ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بیشترین درصد جوانه‌زنی را دارا بودند که به‌نظر می‌رسد تحت تأثیر هم نوع غلظت بستر و هم مقدار هورمون حاصل شده است. در این مورد کریمی و همکاران (۲۰۰۵) اشاره دارند که ترکیب مواد معدنی و حساسیت ریزنمونه را تنظیم‌کننده‌های رشد تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲). این فرضیه نیز در مطالعه جنین‌زایی سوماتیکی برنج تأیید شده است (۲٦).

شاخه‌زایی: طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) غلظت‌های مختلف BAP اختلاف معنی‌داری در مقدار شاخه‌زایی گیاهچه‌ها ایجاد نمودند. سایر عوامل تأثیر معنی‌داری بر مقدار شاخه‌زایی نداشتند (جدول ۱). نتایج بررسی‌ها بین ترکیب تیمارهای مختلف نشان داد بین ترکیب تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد شاخه ایجاد شده وجود دارد (جدول ۲).



شکل ۲- مقایسه مقدار شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها در بسترهای مختلف.

Figure 2. Comparision of produced shoot numbers of explants in different media.

مقایسه میانگین شاخه‌زایی تحت تأثیر هورمون BAP نشان‌داد که بیشترین مقدار شاخه‌زایی در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین مقدار شاخه‌زایی در بستر فاقد هورمون به‌دست آمد (شکل ۲). برای تکثیر شاخه‌ها در کشت بافت از سیتوکینین‌ها استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر نیز از هورمون BAP در مرحله تکثیر ریزنمونه‌ها استفاده شد. نقش و اثر BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخه‌های جدید است. نتایج بررسی مقدار شاخه‌زایی تحت تأثیر هورمون BAP نیز نشان داد که با افزایش غلظت هورمون، بر مقدار شاخه‌زایی افزوده شده است. هورمون سیتوکینینی مورد استفاده در این تحقیق (٦- بنزیل آمینو پورین) جز ترکیبات آمینو می‌باشد. شواهد زیادی در سودمندی این ترکیبات آمینو اضافه شده به بستر کاشت وجود دارد. این ترکیبات می‌توانند باعث افزایش تقسیم سلولی، تمایز، رشد و توسعه شاخه‌های چندتایی در شرایط درون شیشه‌ای شوند (٢٤). توماس و همکاران، (٢٠٠١) نیز گزارش نموده‌اند که سیتوکینین‌ها از آدنین مشتق شده‌اند و فرآیند ریخت‌زایی را به‌وسیله تحریک سنتز DNA و افزایش تقسیم سلولی بر سلول‌های تمایز نیافته تسریع می‌کنند (٢٥). در این تحقیق بیشترین شاخه‌زایی در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد که با نتایج کارلی و اچوریگارا (٢٠٠٢) در مورد ارقام رز که در ۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین شاخه‌زایی را داشتند، همخوانی دارد (٤). خسروی و همکارن (٢٠٠٧) در تکثیر انبوه رز هیبرید آیس برگ (*Rosa hybrida* cv. Iceberg) بیشترین میانگین تعداد شاخه جانبی، ١٠/١ عدد، و برگ سبز، ٢٥ عدد، برای هر ریزنمونه را در ٤ میکرومولار BAP و ٠/٥ میکرومولار NAA به‌دست آوردند (١٤). عصاره و همکاران (٢٠٠٧) در تکثیر گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) گزارش نمودند که بهترین ترکیب تنظیم کننده رشد، BAP با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و TDZ با غلظت ٠/١ میلی‌گرم در لیتر بوده است (٢٠).

نتایج مقایسه میانگین شاخه‌زایی نشان داد که ترکیب تیمار محیط پایه MS/4 همراه با ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط پایه MS/4 همراه با ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین تیمارها در تولید شاخه (٤/٢٥) بودند. ترکیب تیمارهایی که فاقد هورمون BAP بودند، صرف‌نظر از نوع محیط پایه و غلظت هورمون IBA کمترین مقدار تولید شاخه (یک شاخه از هر ریزنمونه) را به‌خود اختصاص داده بودند (جدول ۵). به احتمال زیاد تولید شاخه بیشتر به‌دلیل حساسیت بیشتر رز ساناز به هورمون‌های سیتوکینینی در مقایسه با میزان عناصر غذایی محیط پایه می‌باشد. مطالعه‌ای در مورد *Rosa muschata* برای تعیین عوامل مؤثر بر تکثیر این‌گونه به‌وسیله

خوش‌خوی و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. نتایج نشان داد که بستر MS/2 بهترین بستر برای تکثیر است (۱۳).

میانگین طول شاخه: طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر ساده و دوگانه تیمارها بر طول شاخه معنی‌دار بود. بررسی ترکیب تیمارهای مختلف نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ترکیب تیمارهای مختلف از نظر میانگین طول شاخه ایجاد شده وجود دارد (جدول ۲).

نتایج نشان داد که با کاهش غلظت محیط پایه از طول شاخه نیز کاسته شد که به‌خاطر کاهش مواد غذایی در دسترس ریزنمونه‌ها بود و گیاهچه‌ها مقدار کمتری از عناصر غذایی برای تخصیص به رشد طولی خود در اختیار داشتند. محیط MS از عناصر پرمصرف و کم‌مصرف و هیدرات‌کربن بیشتری برخوردارند که این عناصر به‌خصوص نیتروژن، فسفر و پتاسیم نقش اساسی در رشد گیاه دارند (۷).

نتایج همچنین نشان داد که با افزایش غلظت اکسین به بستر کشت، از طول شاخه گیاهچه‌ها کاسته شده است و گیاهچه‌های فاقد هورمون IBA از طول شاخه بیشتری برخوردارند در توضیح این موضوع عنوان شده که هورمون‌های اکسینی افزوده شده به محیط در مرحله پرآوری در تسریع رشد یا صدور شاخه‌های جدید اثری ندارند ولی به مقدار کم در رشد عمومی گیاه موثرند. به‌علاوه استفاده از این هورمون در مرحله پرآوری به‌منظور خنثی کردن اثر غلظت بالای سیتوکینین است، چون اثر استرس دهنده سیتوکینین بر رشد شاخه‌ها را تقلیل داده و رشد طبیعی شاخه را میسر می‌سازد. در واقع به رشد عمومی گیاه تعادل می‌بخشد (۷).

نتایج مقایسه میانگین طول شاخه‌ها در غلظت‌های مختلف BAP نیز نشان داد که با افزایش غلظت هورمون BAP از طول ریزنمونه کاسته شده است. بیشترین طول شاخه در بستر فاقد هورمون و کمترین طول شاخه در ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. همانند تحقیق حاضر در تحقیق کارلی و اچوریگارا (۲۰۰۲) و درودی و همکاران، (۲۰۱۵) در مورد انگور فرنگی خراسانی با افزایش غلظت BAP تعداد شاخه افزایش یافت ولی طول شاخه کم شد (٤، ۵). نقش و اثر BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک شاخساره‌های جدید است؛ بنابراین با افزایش غلظت BAP در محیط شاخساره‌های بیشتر اما کوتاه‌تر تولید می‌شود (۱۷). افزایش طول شاخه با کاهش غلظت هورمون BAP در هر سه ژنوتیپ مورد بررسی رز نیز گزارش شده است (۱). مرحله طویل شدن به مقدار زیادی به غلظت‌های بالاتر تنظیم‌کننده‌های رشد حساس است (۱۱).

نتایج بررسی میانگین طول شاخه‌ها تحت تأثیر اثر متقابل نوع بستر و غلظت هورمون BAP نشان

داد که نمونه‌ها در محیط پایه MS کامل فاقد هورمون، دارای بیشترین طول شاخه و در محیط MS/4 حاوی غلظت‌های ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، کمترین طول را دارا بودند (جدول ۳). به‌نظر می‌رسد به‌دلیل این‌که در بستر با غلظت کامل ریزنمونه‌ها دسترسی بهتری به عناصر غذایی دارند و از طرفی در غلظت‌های بالاتر BAP ضریب تکثیر بالاتر و در نتیجه شاخه بیشتری تولید می‌شود در نتیجه مقدار ماده غذایی تخصیص داده شده به‌وسیله گیاهچه به هر شاخه برای رشد کمتر است. ترکیبات مواد معدنی حساسیت ریزنمونه‌ها را به تنظیم‌کننده‌های رشد تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲). در بستر MS کامل غلظت عناصر پرمصرف و کم‌مصرف بیشتر است. از جمله پتاسیم که عنوان شده انتشار دیگر عناصر معدنی مانند نیتروژن، فسفر و کربن را تحت تأثیر قرار می‌دهد و جابجایی فراورده‌های فتوسنتزی را افزایش می‌دهد در نتیجه کیفیت شاخه‌ها را بهبود می‌بخشد (٦). رشد نهایی شاخه با مقدار فسفات اولیه در کشت متناسب است (۲۸). فسفات در القاء و رشد شاخه‌ها نقش دارد (۲).

بررسی میانگین طول شاخه‌ها تحت تأثیر اثر متقابل غلظت IBA و غلظت هورمون BAP نشان داد که در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP دارای کمترین طول شاخه و محیط فاقد هورمون بیشترین طول را دارا بودند (جدول ٤). همان‌طور که در قسمت‌های قبلی اشاره شد، سیتوکینین‌ها باعث افزایش شاخه‌زایی و کاهش رشد طولی شاخه‌ها می‌شوند و اکسین‌ها در مرحله پرآوری نقش ایجاد تعادل و کاهش اثر سیتوکینین‌ها دارند، در اینجا با توجه به مقدار نسبتاً بالای هورمون BAP، هورمون اکسین هم نتوانست تأثیری در کاهش اثر سیتوکینینی BAP داشته باشد. ولی در محیط فاقد هورمون با توجه‌به این که هورمون BAP در محیط وجود نداشت، نتوانست از غالبیت انتهایی ریزنمونه‌ها و در نتیجه از رشد طولی ریزنمونه‌ها جلوگیری کند. روزیک و لازیک (۲۰۰٦) نیز همانند تحقیق حاضر اثر مثبت اکسین بر صفات تکثیر *R. nigrum* مشاهده ننمودند (۲۱). افزودن ۱mg/L NAA به محیط حاوی ۰/۵ mg/L BA، باعث کاهش ضریب تکثیر شاخه‌ها در *Ribes nigrum* شد؛ بدون این‌که تأثیر مثبت در طول شاخه و کیفیت آن‌ها ایجاد نماید (۲۱). به‌طور مشابه اورلیکاوسکا، (۱۹۸٤) گزارش نمود که *Ribes nigrum* نسبت به افزودن اکسین به بستر پرآوری به‌طور معکوسی صرف‌نظر از نوع و غلظت پاسخ داده است (۱۹).

نتایج بررسی میانگین طول شاخه‌ها تحت تأثیر ترکیب تیمارهای نشان داد که در محیط MS/4 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP دارای کمترین طول شاخه و محیط MS فاقد هورمون بیشترین طول را دارا بودند (جدول ۵). کاهش میزان طول شاخه‌ها به‌نظر می‌رسد به‌خاطر

نقش هورمون BAP در کاهش غالبیت انتهایی و افزایش میزان شاخه‌زایی و همچنین کاهش میزان عناصر غذایی در محیط یک چهارم غلظت MS می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت سیتوکینین و بستر کاشت برمیانگین طول شاخه.

Table 3. Comparison interaction of Cytokinin and Auxin concentration and media strength on shoot length.

طول شاخه Shoot length	BAP (mg/L)	بستر Media
4.2 ± 0.08 [a]	0	MS
3.7 ± 0.07 [b]	1	
3.33 ±0.08 [c]	3	
3.15 ±0.08 [c]	5	
3.7 ± 0.08 [b]	0	MS/2
2.6 ± 0.09 [d]	1	
2.5 ± 0.09 [de]	3	
2.2± 0.09 [ef]	5	
3.3 ± 0.13 [c]	0	MS/4
1.9 ± 0.1 [fg]	1	
1.7 ± 0.13 [g]	3	
1.62 ±0.13 [g]	5	

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها می‌باشد.

Means in each column, with at least one similar letter are not significant different.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت اکسین و سیتوکینین بر میانگین طول شاخه‌ها.

Table 4. Comparison interaction of Cytokinin and Auxin concentrations on shoot length means.

طول شاخه Shoot length	BAP(mg/L)	IBA(mg/L)
4.17± 0.1 [a]	0	0
3.08± 0.1 [cd]	1	
2.8± 0.1 [cde]	3	
2.5± 0.11 [efg]	5	
3.44± 0.12 [bc]	0	0.1
3± 0.11 [bc]	1	
2.6± 0.11 [def]	3	
2.4± 0.12 [efg]	5	
3.54± .11 [bc]	0	0.3
2.48± 0.12 [def]	1	
2.45± 0.12 [efg]	3	
2.27± 0.11 [fg]	5	
3.74± 0.12 [b]	0	0.5
2.5± 0.11 [efg]	1	
2.18± 0.11 [fg]	3	
2.11± 0.12 [g]	5	

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها می‌باشد.

Means in each column, with at least one similar letter are not significant different.

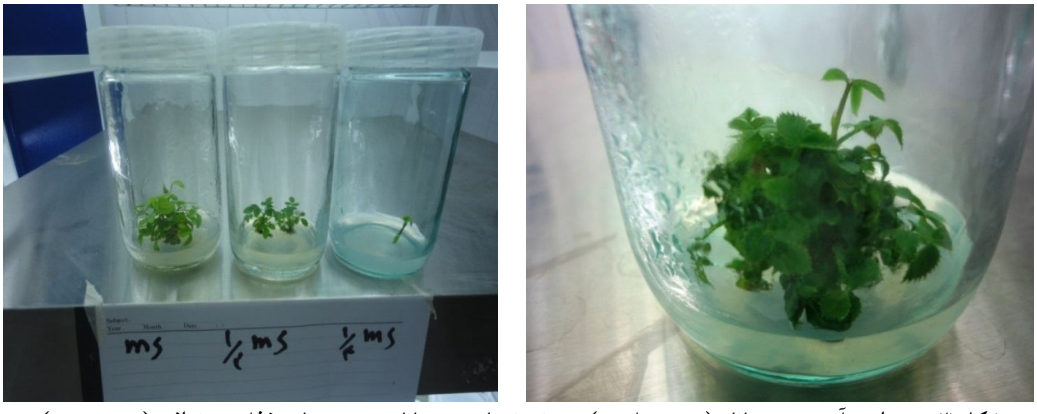
جدول ۵- مقایسه میانگین ترکیب تیمارهای مختلف بر صفات مورد بررسی.

Figure 5. Comparison interactions of media, IBA and BAP concentration on studied factors.

طول شاخه Length of shoot	تعداد شاخه Number of shoot	درصد جوانه‌زنی Germination percent	BAP(mg/L)	IBA(mg/L)	بستر Media
5.1± 0.16 ^{a}	1 ± 0.22 ^{i}	66.7 ±6.7 $^{a-d}$	0	0	MS
3.96± 0.14 ^{bc}	2.67± 0.2 $^{e-h}$	80 ±0 ^{ab}	1		
3.8± 0.14 ^{bcd}	3.46± 0.19 $^{a-f}$	86.7 ±6.7 ^{a}	3		
3.08± 0.14 $^{b-i}$	4.08± 0.2 ^{ab}	80 ±11.55 ^{ab}	5		
3.64± 0.15 $^{b-f}$	1± 0.21 ^{i}	73.3 ±6.66 ^{abc}	0	0.1	
4.1± 0.14 ^{ab}	3.42± 0.2 $^{a-f}$	80 ±0 ^{ab}	1		
3.4± 0.16 $^{b-g}$	4.1± 0.22 ^{ab}	66.7 ±6.7 $^{a-d}$	3		
3.3± 0.15 $^{b-h}$	3.9± 0.21 ^{ab}	73.3 ±6.66 ^{abc}	5		
3.9± 0.15 ^{bcd}	1± 0.21 ^{i}	73.3 ±6.66 ^{abc}	0	0.3	
3.53± 0.14 $^{b-f}$	2.91± 0.2 ^{ns}	80 ±11.55 ^{ab}	1		
3.17± 0.14 $^{b-h}$	3.5± 0.2 $^{a-f}$	80 ±0.0 ^{ab}	3		
3.22± 0.15 $^{b-h}$	4.18± 0.21 ^{ab}	73.3 ±13.3 ^{abc}	5		
4.1± 0.16 ^{ab}	1± 0.22 ^{i}	73.3 ±17.64 ^{abc}	0	0.5	
3.39± 0.15 $^{a-f}$	2.82± 0.21 $^{d-h}$	73.3 ±13.3 ^{abc}	1		
2.97± 0.17 $^{b-k}$	3.77± 0.23 ^{abc}	60 ±0 $^{a-e}$	3		
2.97±0.17 $^{b-k}$	4.1± 0.25 ^{ab}	53.3 ±13.3 $^{a-f}$	۵		
4±0.17 ^{ab}	1± 0.23 ^{i}	60 ±11.55 $^{a-e}$	0	0	MS/2
3± 0.16 $^{b-j}$	2.9± 0.22 $^{c-h}$	66.7 ±6.7 $^{a-d}$	1		
2.77± 0.19 $^{d-m}$	3.57± 0.26 $^{a-e}$	46.7 ±6.7 $^{b-f}$	3		
2.55±0.17 $^{e-o}$	4.22± 0.23 ^{ab}	60 ±0 $^{a-e}$	5		
3.85 ± 0.16 ^{bcd}	1± 0.22 ^{i}	66.7 ±13.3 $^{a-d}$	0	0.1	
2.97± 0.19 $^{b-k}$	2.57± 0.26 ^{fgh}	46.7 ±6.7 $^{b-f}$	1		
2.64±0.17 $^{e-n}$	3.56± 0.23 $^{a-e}$	60 ±11.55 $^{a-e}$	3		
2.23± 0.2 $^{h-o}$	4.17± 0.29 ^{ab}	40 ±0 $^{c-f}$	5		
3.3± 0.18 $^{b-h}$	1± 0.25 ^{i}	53.3 ±6.7 $^{a-f}$	0	0.3	
2.19±0.19 $^{h-o}$	2.43± 0.27 ^{gh}	46.7 ±6.7 $^{b-f}$	1		
2.6±0.19 $^{e-o}$	3.71± 0.26 $^{a-d}$	46.7 ±6.66 $^{b-f}$	3		
2.04±0.18 $^{i-o}$	4.12± 0.25 ^{ab}	53.3 ±6.66 $^{a-f}$	5		
3.62±0.18 $^{b-e}$	1.13± 0.25 ^{i}	53.3 ±6.66 $^{a-f}$	0	0.5	
2.41±0.18 $^{f-o}$	2.75± 0.25 $^{e-h}$	53.3 ±13.3 $^{a-f}$	1		
2±0.19 $^{i-o}$	3.29± 0.27 $^{a-g}$	46.7 ±6.7 $^{b-f}$	3		
1.88±0.19 $^{j-o}$	4.14± 0.27 ^{ab}	46.7 ±6.7 $^{b-f}$	5		
3.41± 0.21 $^{b-f}$	1± 0.29 ^{i}	40 ±11.55 $^{c-f}$	0	0	MS/4
2.28± 0.22 $^{g-o}$	2.4± 0.31 ^{gh}	3.33 ±6.66 ^{def}	1		
1.85±0.25 $^{k-o}$	3.75± 0.35 $^{a-d}$	26.7 ±6.66 ^{ef}	3		
1.77±0.25 $^{l-o}$	4.25± .35 ^{a}	26.7 ±13.3 ^{ef}	5		
2.83± 0.29 $^{c-l}$	1± 0.4 ^{i}	20 ±11.5 ^{f}	0	0.1	
1.95±0.25 $^{i-o}$	2.75± 0.35 $^{e-h}$	26.7 ±6.66 ^{ef}	1		
1.77±0.25 $^{l-o}$	3.25± 0.35 $^{b-g}$	26.7 ±6.66 ^{ef}	3		
1.7±0.25 ^{mno}	3.75± 0.35 $^{a-d}$	26.7 ±17.6 ^{ef}	5		
3.37±0.25 $^{b-g}$	1± 0.35 ^{i}	26.7 ±13.3 ^{ef}	0	0.3	
1.72±0.25 $^{l-o}$	2.75± 0.35 $^{e-h}$	26.7 ±6.66 ^{ef}	1		
1.6±0.25 ^{no}	3.25± 0.35 $^{b-g}$	26.7 ±6.66 ^{ef}	3		
1.55±0.25 ^{no}	4 ± 0.35 ^{ab}	26.7 ±17.6 ^{ef}	5		
3.5± 0.29 $^{b-f}$	1± 0.4 ^{i}	20 ±11.5 ^{f}	0	0.5	
1.7±0.25 $^{l-o}$	2.25± 0.35 ^{h}	26.7 ±13.3 ^{ef}	1		
1.6±0.25 ^{no}	3.5± 0.35 $^{a-f}$	26.7 ±6.66 ^{ef}	3		
1.5±0.25 ^{o}	4.25± 0.35 ^{a}	26.7 ±17.6 ^{ef}	5		

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها می‌باشد.

Means in each column, with at least one similar letter are not significant different.



شکل ۳- مرحله پرآوری رز ساناز (سمت راست)، ریزنمونه‌های رز ساناز در بسترهای غذایی مختلف (سمت چپ).

Figure 3. Proliferation stage of Sanaz rose (right picture), Sanaz rose explants in different media (left picture).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که محیط پایه MS محیط مناسبی برای گونه رز ساناز می‌باشد. گونه ساناز در غلظت‌های نسبتا بالای سیتوکینین (BAP) از باززایی و شاخه‌زایی نسبتاً بالایی برخوردار است. با افزایش میزان سیتوکینین محیط تعداد شاخه‌های ایجاد شده افزایش یافت اما طول شاخه‌ها کاهش یافت. در این آزمایش بیشترین رشد شاخه‌ها در محیط فاقد هورمون اتفاق افتاد.

منابع

1. Arnold, N., Binns, P., Barthakur, M.R. and Clouter, D.C. 1992. A study of growth regulator and time of plantlet harvest on the *in vitro* multiplication rate of hardy and hybrid tea Rose. J. Hortic. Sci. 67: 6. 727-735.
2. Bar-Yousef, B., Kafkafi, U. and Bresler, E. 1995. Uptake of phosphorus by plants growing under field conditions: Theoretical model and experimental determination of its parameters. J. Soil Sci. 36: 783-800.
3. Caliskan, M., and Agaoglu, Y.S. 2009. Molecular Characterization of Rose Genotypes (*Rosa sp*.) based on RAPD-PCR. Field Crop. Cent. Res. Inst. 18: 1-2. 36-42.
4. Carelli, B.P. and Echeverrigaray, S. 2002. An improved system for the in vitro propagation of rose cultivars. Sci. Hort. 92: 69–74.
5. Darroudi, H., Akbarinia, M., Safarnejad, A., Hosseini, S.M. and Hajian Shahri, M. 2015. Micropropagation of *Ribes khorasanicum* species by tissue culture.

Iran. J. Range. Forest. Plant Breed. Genet. Res. 23: 1.65–76. (In Persian)
6. Goncalves, S., Correia, P.J., Martins-Loucao, M.A., and Romano, A. 2005. A new medium formulation for *In vitro* rooting of carob tree based on leaf macronutrients concentrations. Biol. Plantarum. 49: 2. 277-280.
7. Hajnajjari, H. 1994. Micropropagation. Research Institute of Forest and Rangelands Press. First press. 173p. (In Persian)
8. Hong, Z. 1996. Tissue culture of *Rosa chinensis* var Floribunda. Forest. Res. 7: 2. 41- 45.
9. Horn, W.A.H. 1992. Micropropagation of rose. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *Biotech in* Agri and Forest. 4: 320-324.
10. Jabbarzadeh, Z., and Khush-Khui, M. 2005. Factor affecting tissue culture of damask Rose (*Rosa damascena* Mill.). Sci. Hort. 105: 475-482.
11. Kadota, M. and Niimi, Y. 2003. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity on *In vitro* pear cultivar shoots. Plant Cell Tiss. Org. 72: 261–265.
12. Karimi, M., De Meyer, B. and Hilson, P. 2005. Modular cloning in plant cells. Trends Plant Sci. 10: 103–105.
13. Khosh-Khui, M, Honarvar, M. and Javidnia, K. 2010. The first report on *in vitro* culture of Musk rose. Acta Hort. 870: 213–218.
14. Khosravi, P., Jafarkhani Kermani, M., Nematzadeh, G.H. and Bihamta, M. 2007. A protocol for mass production of *Rosa hybrida* cv. Iceberg through *in vitro* propagation. Iran. J. Biotechnol. 5: 2. 100-104. (In Persian)
15. Kim, C.K., Oh, J.Y., Jee, S.O. and Chung, J.D. 2003. *In vitro* micropropagation of *Rosa hybrida* L. J. Plant Biotech. 5: 2. 115-119.
16. Mahdavi Mashaki, K., Moieni, A. and Jalali Javaran, M. 2014. Investigation on anther culture in Damask rose (*Rosa damascene* Mill.) and miniature rose (*Rosa chinesis*). Iran. J. Med. Arom. Plant. 30: 1. 84 – 100. (In Persian)
17. Mahdvian, M., Bozari, N. and Abdollahi, H. 2010. Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative Mahlab rootstock (SL-64). Seed Plant Improv. J. 26: 1. 15-26. (In Persian)
18. Misra, P. and Chakrabarty, D. 2009. Clonal propagation of *Rosa clinophylla* Thory. Through axillary Bud culture. Sci. Hort. 119: 212- 216.
19. Orlikowska, T. 1984. Micropropagation of Roodknop cv. black currant. Fruit Sc. Rep. 11: 1. 5-17.
20. Osareh, M.H., Ghorbanly, M., Mamaghani, B., Ghamarizare, A. and Shahrzad, Sh. 2007. Effects of culture media and plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of Damask rose (*Rosa damascene* Mill). Pajohesh and Sazandegi (Agro. Hort.). 72: 45-57. (In Persian)
21. Ruzic, D. and Lazic, T. 2006. Micro propagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars. Agric. Conspec. Sci. 71: 4. 149-153.

22. Salehi, H. and Khosh-Khuy, M. 2003. Callus induction and growth in Miniature Rose *(Rosa chinensis* Jacp. var. minima Rehd). J. Hortic. Sci. Biotech. 3: 1-2. 67-72.
23. Shirzad Khorram abadi, R. and Lotfi, N. 2003. micropropagation of *Elizabeth Rose* using *in vitro* tissue culture. Pajohesh and Sazandegi (Agro. Hort.). 15: 2. 62-67. (In Persian)
24. Sotiropoulos, T.E., Mouhtaridou, G.N., Thomidis, T.V, Tsirakoglou, K.N, Dimassi, I. and Therios, N. 2005. Effects of different N-sources on growth, nutritional status, chlorophyll content, and photosynthetic parameters of shoots of the apple rootstock MM 106 cultured *In vitro*. Biol. Plantarum. 49: 2. 297-299.
25. Tomas, W., Motyka, V., Strnad, M. and Schmulling, T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinins. Sci. Hort. 6: 36-39.
26. Toriyama, K. and Hinata, K. 1995. Cell suspension and protoplast culture in rice. J. Plant Sci. 41: 283-279.
27. Yadollahi, A., Omidi, M. and Eftekhari, M. 2015. Effect of nutrient medium and concentrations of plant growth regulators on micropropagation of *Rosa damascena* Mill. cv. 'Kashan'. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants. Sanremo, Italy .19-24 April.
28. Zheng-Hua, Y. 2002. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 53: 183-202.