Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 47, No 4, Winter 2017 (773-784)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.117729.713

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۷، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۵ (ص ۷۸۴-۷۷۳)

بهینه‌سازی مراحل افزایش درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

محمد امیدی[۱]، عباس یداللهی[۲*]، نوراله احمدی[۲] و فرهاد بیرانوند[۱]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۸/۵)

چکیده

گل‌محمدی یکی از مهم‌ترین گیاهان معطر در ایران و جهان است. اسانس استخراج‌شده از گلبرگ این گل در داروسازی، صنایع آرایشی و بهداشتی و همچنین غذایی استفاده می‌شود. استفاده از روش‌های معمول برای افزایش این گیاه با دشواری‌هایی چون انتقال عامل‌های آلودگی و محدود بودن گیاه مادری همراه است. با توجه به برتری‌های روش‌های افزایش درون شیشه‌ای نسبت به روش‌های رایج، این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر انواع مختلف محیط کشت با سطوح هورمونی متفاوت برای بهبود افزایش درون شیشه‌ای و کنترل سبزردی (کلروز) نوساقه‌ها انجام شد. محیط کشت‌های MS و MS تغییریافته (mMS0، mMS1، mMS2، mMS3، mMS4 و mMS5) در این پژوهش استفاده شد. قطعه‌های گره‌ای حاوی ۱ تا ۲ جوانهٔ جانبی در محیط کشت MS با سطوح مختلف هورمونی برای استقرار کشت شدند. برای نوساقه‌زایی به محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA منتقل شده و آنگاه برای ریشه‌زایی در محیط کشت‌های MS 1/2 و LS با سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA کشت شدند. بهترین تیمار برای افزایش شمار نوساقه‌های گل‌محمدی محیط کشت مایع mMS0 حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود. بیشترین میزان سبزینهٔ (کلروفیل) برگ‌ها نیز در محیط کشت mMS0 مشاهده شد. همچنین بیشترین درصد ریشه‌زایی مربوط به ژنوتیپ گالیکا در محیط کشت 1/2MS دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، سبزینه، هورمون، BAP، IBA.

Improvement of *in vitro* micro propagation of *Rosa damascena* genotypes

Mohamad Omidi[1], Abbas Yadollahi[2*], Noorollah Ahmadi[2] and Farhad Beyranvand[1]
1, 2. M. Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
(Received: Feb. 17, 2015 - Accepted: Oct. 27, 2015)

ABSTRACT

Rosa damascena is one of the most important Aromatic plants in the world. The extracted oil from the petals of the flowers is used in the pharmaceutical, cosmetic and food industries. Traditional methods to propagate this plant have problems such as transfer of pollution agents and limited native plants. Due to more advantages of the *in vitro* proliferation in compared to traditional methods, this study designed to evaluate impression different medium cultures with diverse hormone levels to improve the proliferation and control of shoots chlorosis. In this research we used medium cultures of MS and mMS (mMS0, mMS1, mMS2, mMS3, mMS4 and mMS5). In order to establishment in MS medium, nodal segments containing 1 or 2 lateral buds were cultured. For regenerating the shoots, mediums with different concentrations of 1 and 2 mg/l BAP and 0.2 mg/l IBA were supplied, then plantlets were transferred to the rooting medium (1/2 MS and LS) with different levels of IBA (1 and 2 mg/l). The best treatment to increase the number of rose shoots was mMS medium containing 1.5 mg/l of BAP and 0.2 mg/l of IBA. The highest chlorophyll content of leaves was observed in mMS medium. *Gallica* plantlets produced the highest percentage of rooting on 1/2 MS with 2 mg/l of IBA.

Keywords: BAP, chlorophyll, hormone, IBA, micropropagation.

* Corresponding author E-mail: yadollah@modares.ac.ir Tel: + 98 912 200 8162

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گل محمدی با نام علمی *Rosa damascena* Mill. از خانوادهٔ *Rosaceae* به‌عنوان گیاهی معطر شهرت دارد. عادت رشدی این گیاه به شکل درختچه‌ای خزان‌کننده است. از جمله مهم‌ترین ویژگی گیاه‌شناسی گل‌محمدی وجود گل‌آذین دیهیم با ۹-۳ گل و گاهی بیشتر است. گل‌ها روی شاخه‌های یک‌ساله تشکیل شده و در اوایل صبح آغاز به باز شدن می‌کنند. گل محمدی دورهٔ گلدهی کوتاهی دارد و به‌طورمعمول یک‌بار در سال گل می‌دهد، البته برخی از رقم (واریته)ها همیشه گل‌ده هستند. میوهٔ آن هیپ[1] نامیده می‌شود و پس از ریزش گلبرگ‌ها به‌صورت کوزه‌ای شکل در انتهای شاخه باقی مانده و در هنگام رسیدن به رنگ قرمز در می‌آید (Pal *et al.*, 2013). منشأ این گیاه هنوز مشخص نیست ولی بیشتر محققان مبدأ آن را کشورهای بلغارستان، ایران، ترکیه و هند می‌دانند. در مجموع به نظر می‌رسد که گل محمدی نیز مانند دیگر گونه‌های رز از خاورمیانه به کشورهای اروپایی برده شده است. گل محمدی به‌صورت خودرو و وحشی در قفقاز، سوریه، اسپانیا و مراکش و ایران یافت می‌شود. اهمیت گل‌محمدی در عطر و اسانس آن است، به‌طوری‌که بخش اعظم اسانس تولیدشده از آن در صنایع عطرسازی استفاده می‌شود (Babu *et al.*, 2002). گل‌محمدی و فرآورده‌های آن افزون بر ایران در ایتالیا، یونان و کشورهای عربی در صنایع آرایشی و بهداشتی استفادهٔ فراوانی دارد. از گلبرگ‌های گل محمدی به‌عنوان گیاه دارویی در درمان افسردگی، کنترل التهاب، مسکن ملایم، کنترل کلسترول خون و همچنین در صنعت عطرسازی و آرایشی بهداشتی و غذایی استفاده می‌شود (Achutan *et al.*, 2003; Sagdic, 2004). ترکیه و بلغارستان جز بزرگ‌ترین تولیدکنندگان روغن فرار از گل‌محمدی هستند (Boskabady *et al.*, 2011). این گیاه به‌طورمعمول در ایران از راه قلمه و پاجوش افزایش می‌شود، اما ازآنجایی‌که این روش‌ها نیاز به زمان بیشتری برای افزایش دارند و همچنین امکان تولید گیاهان یکنوخت و سالم دشوار است لذا با توجه به افزایش نیاز به تولید و پیشرفت‌های حاصل در صنعت، بایستی از روش‌های نوین افزایش مانند کشت بافت در تولید این گیاه را به کار برد تا افزون بر تولید انبوه نهال آن، در زمان و منابع صرفه‌جویی شود. کشت بافت به‌عنوان یک روش پذیرفته‌شده در علوم کشاورزی اهمیت خاصی دارد؛ زیرا می‌توان در فضای محدود و در هر زمان اقدام به تولید گیاه سالم و بدون بیماری کرد (Onesto, 1996). یکی از مهم‌ترین برتری‌های کشت درون شیشه‌ای افزایش سریع رقم‌های برتر در کمترین زمان، سرعت بخشیدن به کارهای اصلاحی و تولید رقم‌های جدید است. نونهال‌های رز تولیدشده از کشت‌بافت نوساقه‌های بیشتری تولید می‌کنند و گل‌های مناسب‌تری برای تولید به‌عنوان گل شاخه بریده دارند (George *et al.*, 1984). بهینه‌سازی روش‌های ریزازدیادی گل محمدی به‌عنوان یک گام مهم در بهبود و افزایش تولید اسانس از این گیاه است.

با انجام پژوهش‌های چندی روی ریزازدیادی گل محمدی توسط کومار و همکاران مشخص شد که محیط MS دارای غلظت ۳-۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تأثیر را بر پرآوری نمونه‌های گل محمدی دارد (Kumar *et al.*, 2001). استفاده از غلظت ۲-۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط MS بهترین تیمار برای افزایش گل‌محمدی در شرایط درون شیشه است (Khosh-Khui & Jabarzadeh, 2005). برخی محققان گزارش کرده‌اند که با کاهش غلظت نمک‌های آمونیوم (NH4 NO3، (NH4)2 SO4) محیط کشت MS میزان پرآوری بیشتر می‌شود (Bressan et al., 1982; Valles & Boxus, 1985). با یک و نیم برابر کردن غلظت آمونیوم نیترات و کلسیم کلرید در محیط کشت MS می‌توان پرآوری نوساقه‌های گل‌محمدی را افزایش داد (Noodezh *et al.*, 2012). بر پایهٔ گزارش‌های ارائه‌شده ریزنمونه‌های گل محمدی را می‌توان در محیط 1/2MS به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ریشه‌دار کرد (Mameghani *et al.*, 2010). از ترکیب NAA و IBA به‌منظور ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گل‌محمدی استفاده شده است (Sauor *et al.*, 1985).

1. Hip

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای تهیهٔ ریز نمونه از قطعه‌های ۱ تا ۲ سانتی‌متری گره‌های ساقهٔ ژنوتیپ‌های کاشان، کازانلیک[1] و رز گالیکا (’توسکانی ساپرب‘)[2] موجود در گلخانه‌های تحقیقاتی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد. برای این منظور شاخه‌های فصل جاری انتخاب و به آزمایشگاه، انتقال یافتند و درنهایت برگ‌ها از ناحیهٔ انتهای دم‌برگ جدا شده و شاخه‌ها به‌صورت قطعه‌های تک جوانه‌ای در آمدند.

ضدعفونی ریزنمونه‌ها

برای حذف آلودگی‌های سطحی از مایع ظرفشویی تجاری به مدت پانزده دقیقه و شستشو با آب جاری به مدت سی دقیقه استفاده شد. پس‌ازآن نمونه‌ها با استفاده از کاپتان دو در هزار به مدت پانزده دقیقه و سپس غوطه‌ورسازی در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد حاوی دو تا سه قطره توین ۲۰ در زیر لامینار ایرفلو به مدت پنج دقیقه سترون (استریل) شدند و سپس دو بار با آب مقطر سترون شستشو داده شده و درنهایت با اسیدسیتریک اتوکلاو شده به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای دو بار به زمان‌های دو و سه دقیقه به‌منظور جلوگیری از ترشح ترکیب‌های فنولی شستشو شدند.

انتخاب و آماده‌سازی محیط‌های کشت

آزمایش ۱- استقرار ریزنمونه‌ها

به‌منظور استقرار ریزنمونه‌ها از محیط کشت‌های MS با سطح‌های هورمونی ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده شد. شمار تکرار دوازده و در هر تکرار یک ریزنمونهٔ گیاهی قرار داشت و آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. عامل‌ها شامل دو سطح هورمونی ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و یک سطح ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و سه ژنوتیپ کاشان،کازانلیک و گالیکا بودند. ویژگی‌های فیزیولوژیکی بیست روز پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت‌های مختلف با سطح‌های هورمونی متفاوت ارزیابی شد. درصد استقرار از راه تقسیم شمار ریزنمونه‌های استقراریافته به شمار کل ریزنمونه‌های کشت‌شده در هر تیمار ارزیابی شد.

آزمایش ۲- رشد و پرآوری نوساقه‌ها

در این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر کودهای شیمیایی نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم بر رشد و پرآوری نوساقه‌های گل محمدی و انجام مقایسه از محیط کشت‌های MS تغییریافته (mMS0 (شاهد)، mMS1، mMS2، mMS3، mMS4 و mMS5) استفاده شد (جدول ۱). با توجه به پاسخ‌دهی اندک ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS استاندارد از محیط کشت mMS0 به‌عنوان شاهد در این آزمایش استفاده شد. نوساقه‌های به‌دست‌آمده از رشد جوانهٔ جانبی در مرحلهٔ استقرار برای تعیین بهترین محیط کشت به‌منظور افزایش پرآوری و کاهش سبزردی (کلروز) برگ‌ها به محیط‌های پرآوری انتقال یافتند. شمار تکرار پانزده و در هر تکرار یک ریزنمونهٔ گیاهی قرار داشت و آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. عامل‌های ارزیابی‌شده شامل شش محیط کشت (جدول ۱) با سه ژنوتیپ کاشان، کازانلیک و گالیکا بودند. با توجه به هدف آزمایش که انجام مقایسه بین محیط کشت‌های یادشده بود محیط کشت mMS0 به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در این آزمایش وزن پینهٔ (کالوس) تولیدشده از انتهای هر نوساقه نیز ارزیابی شد. همچنین تأثیر دو محیط کشت MS و mMS0 با سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای افزایش پرآوری بررسی شد. همچنین برای تعیین تأثیر شکل محیط کشت از محیط کشت mMS0 به‌صورت مایع و جامد حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP استفاده شد که از پل‌های کاغذی برای قرارگیری ریزنمونه‌ها در محیط مایع کمک گرفته شد. شرایط رشد شامل اتاقک رشد دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۴ درجهٔ سلسیوس داشت.

یک ماه پس از کشت نوساقه‌ها، ویژگی‌های فیزیولوژیکی ارزیابی شدند. میزان سبزینهٔ (کلروفیل) کل در برگ‌های نوساقه‌های تولیدشده با استفاده از

1. Kazanlik
2. Gallica var. Tuscany superb

www.SID.ir

Archive of SID

دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتوفتومتر) ارزیابی و با روش Arnon (1949)، محاسبه شد. برای این منظور از ۰/۱ گرم برگ رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد. ویژگی‌های اندازهٔ طول نوساقه، شمار نوساقه، شمار برگ، شمار گره و وزن کالوس نیز ارزیابی شدند. به‌منظور ارزیابی شاخص کیفیت؛ کیفیت نوساقه‌ها از عدد ۱ تا ۵ رتبه‌بندی به‌طوری‌که بیشترین عدد کیفیت بهتر را داشت. این رتبه‌بندی بر پایهٔ فراسنجه‌های رویشی مانند: شیشه‌ای شدن، بافت مرده (نکروزه) شدن انتهای شاخه، سطح برگ، زرد شدن و کیفیت برگ انجام شد (Arab *et al.*, 2014).

جدول ۱. معرفی محیط کشت‌های MS تغییریافته (mMS0، mMS1، mMS2، mMS3، mMS4 و mMS5)

Table 1. Introduction of modified MS medium (mMS0, mMS1, mMS2, mMS3, mMS4, mMS5)

Concentration of other elements	NH_4NO_3/KNO_3 mg l-1	Type of medium	
1200/1900	mMS0*	$MgSO_4$	190
		KH_2PO_4	170
		$CaNO_3$	600
1000/1500	mMS1	In all medium concentration the other	
1320/1520	mMS2	elements similar basal MS medium	
1450/1750	mMS3		
1980/2280	mMS4		
2475/1900	mMS5		

* غلظت عناصر $MgSO_4$، KH_2PO_4 و $CaNO_3$ تنها در محیط کشت mMS0 تغییریافته است. $CaNO_3$ جایگزین $CaCl_2$ در محیط کشت mMS0 شده است.

* The concentration of $MgSO_4$, KH_2PO_4 and CaNO3 just modified in mMS0. CaNO3 and CaCl2 were replaced in mMS0 medium.

آزمایش ۳- ریشه‌زایی

نوساقه‌های به‌دست‌آمده از مرحلهٔ افزایش که ارتفاعی در حدود ۸ تا ۱۰ سانتی‌متر داشتند به‌منظور ریشه‌زایی در محیط کشت‌های 1/2MS و LS[1] (که شامل: ۱۸۰/۵۴ میلی‌گرم در لیتر سولفات منیزیوم، ۳۳۲/۰۲ میلی‌گرم در لیتر کلرید کلسیم، ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر اسید مولیبدیک، بدون سدیم EDTA و دیگر عنصرها در غلظت همسان محیط کشت MS استاندارد بود) کشت شدند (Linsmair and Skoog, 1965). برای این منظور از سه سطح ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده شد. شمار تکرار ده و یک گیاهچه به‌عنوان واحد نمونهٔ گیاهی در هر ظرف کشت قرار گرفت. این آزمایش نیز به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی طراحی و اجرا شد. عامل‌ها شامل دو نوع محیط کشت 1/2MS و LS و سه سطح هورمونی ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و دو ژنوتیپ کاشان و کازانلیک بودند. پس از کشت، شیشه‌ها به مدت یک هفته در شرایط تاریکی به جهت تشکیل سرآغازه‌های ریشه قرار گرفتند و سپس به شرایط استاندارد اتاق رشد منتقل شدند. در همهٔ محیط‌های کشت از ۷ گرم آگار و ۳۰ گرم شکر استفاده شد. pH محیط‌های کشت در حدود ۵/۸ تنظیم شد. برای سترون کردن، محیط‌ها به مدت بیست دقیقه در فشار ۱/۲ بار و دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس اتوکلاو شدند. شمار ریشه، درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌های تولیدشده در محیط کشت ریشه‌زایی نیز پس از گذشت سه هفته از کشت اندازه‌گیری شد.

سازگاری

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به‌منظور سازگار شدن با شرایط برون شیشه‌ای پس از حذف آگار به شیشه‌های بزرگ‌تر منتقل شدند. به‌منظور تهیهٔ بستر کشت در این شیشه‌ها از قرص‌های تجاری جی‌فی‌پات و محیط کشت 1/2MS که عنصرهای غذایی درشت (ماکرو) و ریز (میکرو) داشت، استفاده شد. نمونه‌ها در شرایط اتاق رشد سترون به مدت سه هفته نگهداری شدند تا به شرایط جدید سازگار شوند.

تجزیهٔ داده‌ها

به‌منظور تجزیهٔ داده‌ها از نرم‌افزارهای SAS 9.2 و MINITAB 16 استفاده شد و میانگین مربعات در سطح ۱ و ۵ درصد ارزیابی و تجزیه‌وتحلیل شد.

1. Linsmair-Skoog's (LS)

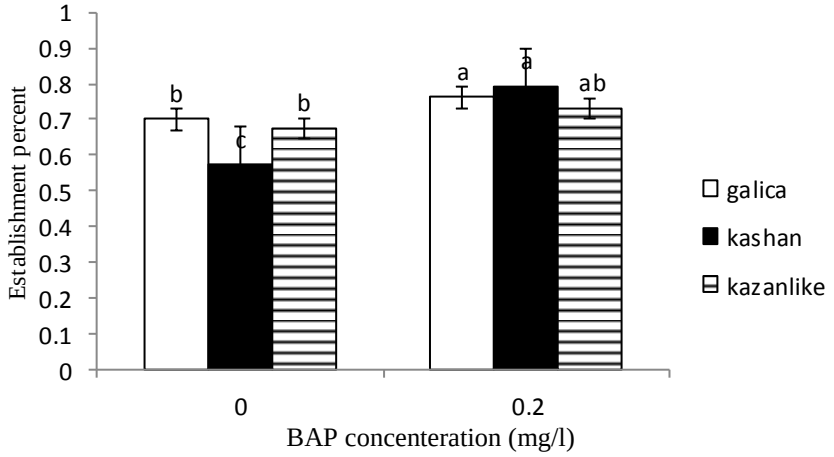
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

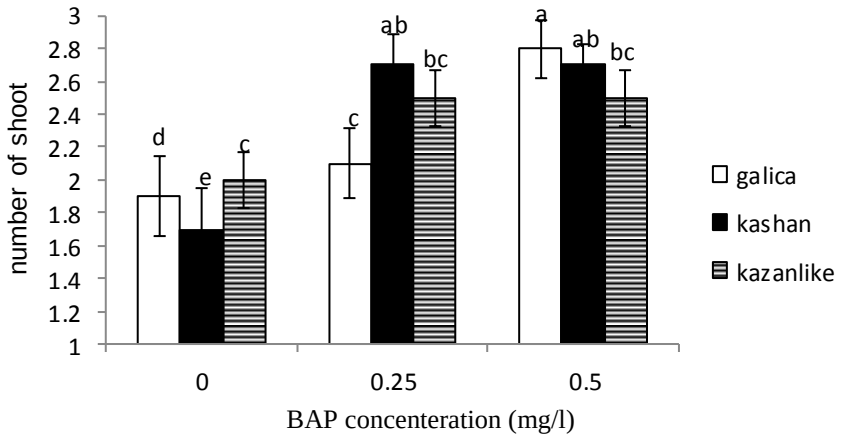
نتایج مربوط به آزمایش ۱- استقرار ریزنمونه‌ها

در این تحقیق بهترین محیط کشت برای استقرار سه ژنوتیپ کاشان، کازانلیک و گالیکا محیط MS استاندارد حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA شناخته شد (شکل ۱). همچنین محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین میانگین شمار نو ساقه را تولید کرد (شکل ۲).



شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف IBA بر میزان استقرار ژنوتیپ‌های گل محمدی

Figure1. Effect of IBA concentrations on *in vitro* establishment of Damask rose cultivars.



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف BAP بر شمار نوساقه‌های ژنوتیپ‌های گل محمدی

Figure 2. Effect of BAP concentrations on shoot regeneration of Damask rose cultivars.

نتایج آزمایش ۲- رشد و پرآوری نو ساقه‌ها

با توجه به جدول مقایسهٔ میانگین (جدول ۲)، نوع محیط کشت بر همهٔ ویژگی‌های ارزیابی‌شده معنی‌دار بود به‌طوری‌که بهترین نوساقه‌ها در محیط کشت mMS0 به‌دست آمدند. بیشترین طول نوساقه در محیط کشت mMS0، mMS5 و محیط کشت mMS4 مشاهده شد. همچنین نوساقه‌های تولیدشده در محیط کشت mMS0 و mMS5 بیشترین کیفیت را داشتند. نوساقه‌هایی که در دیگر محیط‌ها کشت‌شده بودند، سبزردی شدیدی نشان دادند (جدول ۲). درصورتی‌که نوساقه‌های رشدکرده در محیط کشت mMS0، میزان پرآوری بیشتری داشتند و در حدود دو ماه بدون سبزردی باقی ماندند. ریزنمونه‌هایی که در محیط کشت MS کشت شدند پس از گذشت حدود دو هفته نشانه‌های سبزردی و بافت

www.SID.ir

Archive of SID

مرده شدن انتهایی را نشان دادند و از بین رفتند. ولی نوساقه‌های رشد یافته در محیط mMS0 به رشد خود ادامه دادند. بیشترین وزن پینهٔ تشکیل‌شده در انتهای هر نوساقه در محیط کشت mMS2 مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲. اثر محیط کشت بر شاخص‌های ریخت‌شناختی ارزیابی‌شده

Table 2. Effect of medium culture on morphological characteristics

Medium	Number of leaves	Shoot length (cm)	Number of shoots	Number of nodes	Callus weight (mg)	Quality index
mMS0	$0.56^{b} \pm 4.6$	$0.18^{a} \pm 1.3$	$0.09^{a} \pm 1.9$	$0.25^{a} \pm 2.0$	$0.19^{a} \pm 0.68$	$0.34^{a} \pm 3.1$
mMS1	$0.40^{ab} \pm 3.5$	$0.21^{a} \pm 1.2$	$0.28^{a} \pm 1.7$	$0/36^{b} \pm 2.0$	$0.10^{ab} \pm 0.3$	$0.31^{ab} \pm 2.2$
mMS2	$0.44^{b} \pm 2.13$	$0.14^{b} \pm 0.5$	$0.09^{ab} \pm 1.6$	$0.15^{b} \pm 0.7$	$0.06^{b} \pm 0.16$	$0.32^{b} \pm 3.6$
mMS3	$0.40^{a} \pm 4.8$	$0.18^{a} \pm 1.1$	$0.25^{ab} \pm 1.3$	$0.25^{a} \pm 2.0$	$0/06^{b} \pm 0.16$	$0.32^{b} \pm 2.0$
mMS4	$0.30^{ab} \pm 3.7$	$0.14^{a} \pm 1.3$	$0.12^{b} \pm 1.2$	$0.12^{ab} \pm 1.3$	$0.08^{ab} \pm 0.37$	$0.39^{ab} \pm 2.7$
mMS5	$0.36^{ab} \pm 3.6$	$0.13^{a} \pm 1.3$	$0.20^{ab} \pm 1.4$	$0.16^{ab} \pm 1.6$	$0.09^{ab} \pm 0.28$	$0.23^{ab} \pm 2.9$

* حرف‌های متفاوت نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن است.

* Means followed by different letters within columns are significantly different at $P \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test.

بیشترین شمار نوساقه در محیط کشت mMS0 با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد (جدول ۳). همچنین بیشترین میزان سبزینهٔ کل ارزیابی‌شده، در نوساقه‌های رشدکرده در محیط کشت mMS0 مشاهده شد و در بین سه ژنوتیپ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳).

بالاترین سطح سبزینه را ژنوتیپ گالیکادر محیط کشت mMS0 نشان داد که اختلاف آماری معنی‌دار با دو ژنوتیپ دیگر در همین محیط کشت و نیز محیط استاندارد ندارد و کمترین سبزینه را ژنوتیپ کازانلیک در محیط کشت MS استاندارد داشت که اختلاف آماری معنی‌دار با ژنوتیپ کاشان در هر دو محیط کشت ندارد (شکل ۳).

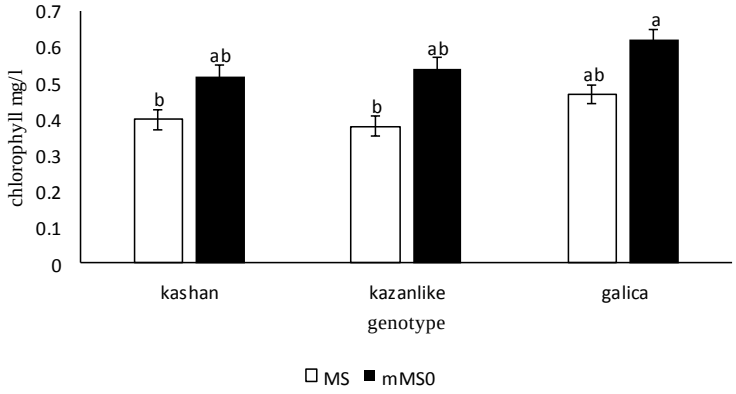
جدول ۳. مقایسهٔ میانگین شمار نوساقه و میزان سبزینه در آزمایش بررسی محیط کشت‌های MS و mMS0

Table 3. Mean comparison for number of shoot and chlorophyll in two different medium (MS and mMS0)

Genotype	Medium	Chlorophyll	Number of shoot
Kashan	MS	0.41 ± 0.02^{b}	1.9 ± 0.31^{ab}
	mMS0	0.52 ± 0.11^{ab}	2.4 ± 0.25^{a}
Kazanlike	MS	0.38 ± 0.10^{b}	1.2 ± 0.24^{ab}
	mMS0	0.54 ± 0.16^{ab}	2.4 ± 0.24^{a}
Galica	MS	0.47 ± 0.09^{ab}	0.2 ± 0.31^{b}
	mMS0	0.62 ± 0.017^{ab}	2.7 ± 0.24^{a}

* حرف‌های متفاوت نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن است.

* Means followed by different letters within columns are significantly different at $P \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test.



شکل ۳. اثر متقابل ژنوتیپ و محیط کشت بر میزان سبزینهٔ برگ‌های گل‌محمدی

Figure 3. Interaction of rose cultivar and medium on leaf chlorophyll of Damask Rose

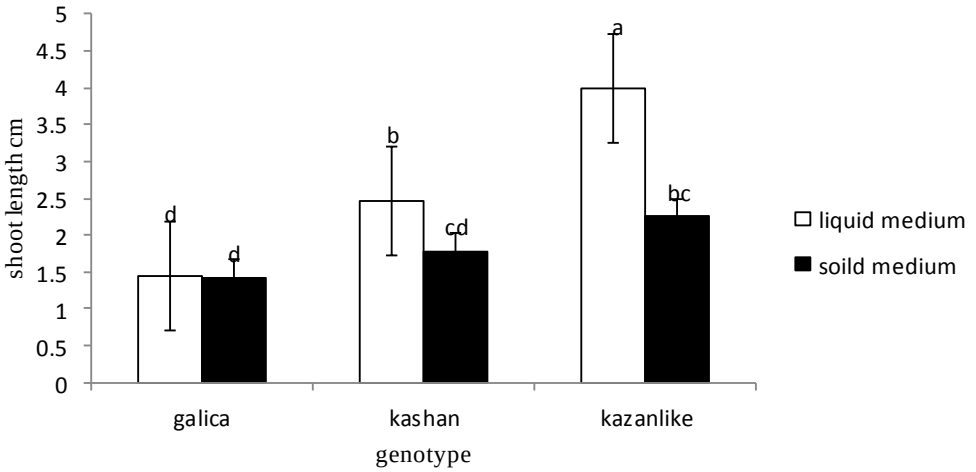
www.SID.ir

Archive of SID

نوساقه‌های تولیدشده در محیط کشت مایع کیفیت بیشتری نسبت به محیط جامد با همین ترکیب هورمونی داشتند و رشد بیشتری به همراه تولید نوساقه را نشان دادند (شکل ۴). بیشترین شمار نوساقه در محیط کشت mMS0 حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به دست آمد که در آن از پل‌های کاغذی و آلومینیومی برای نگهداری ریزنمونه‌ها استفاده شده بود (شکل ۵).

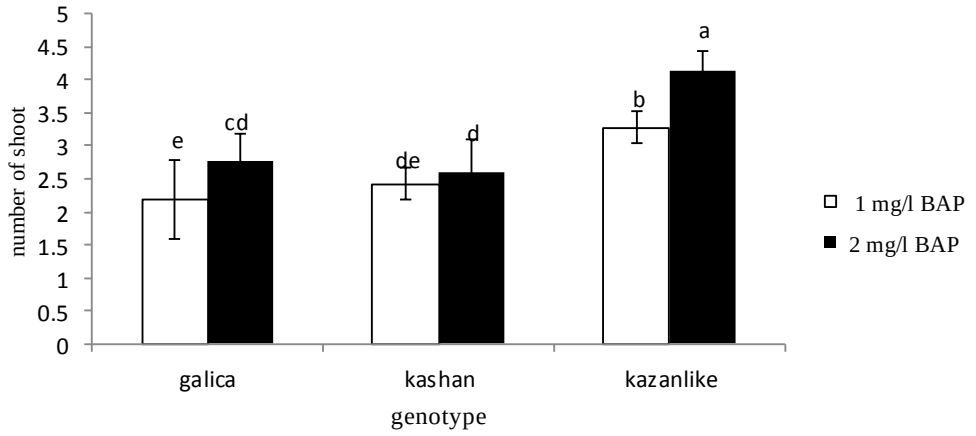
نتایج آزمایش ۳- ریشه‌زایی

تأثیر ژنوتیپ بر سه عامل شمار ریشه، طول ریشه و میانگین ریشه‌زایی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. نتایج نشان می‌دهد که تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA بیشترین شمار ریشه را موجب می‌شود (شکل ۶). اثر متقابل ژنوتیپ و هورمون بر درصد متوسط ریشه‌زایی معنی‌دار بود. نوساقه‌هایی که در محیط کشت 1/2MS برای ریشه‌زایی کشت شده بودند نسبت به آن‌هایی که در محیط کشت LS کشت شده بودند درصد ریشه‌زایی بیشتری را داشتند (شکل ۷). بیشترین شمار و طول ریشه‌ها را ژنوتیپ گالیکا داشت و کمترین طول ریشه مربوط به ژنوتیپ کاشان بود (شکل ۸). همچنین نوساقه‌هایی که در هر دو محیط کشت شاهد کشت شده بودند هیچ‌گونه ریشه‌زایی نداشته و در نتیجه داده‌برداری صورت نگرفت.



شکل ۴. اثر متقابل ژنوتیپ و نوع محیط کشت mMS0 بر طول نوساقه‌های گل محمدی

Figure 4. Interaction of rose cultivar and mMS0 medium on shoot length of Damask rose cultivars

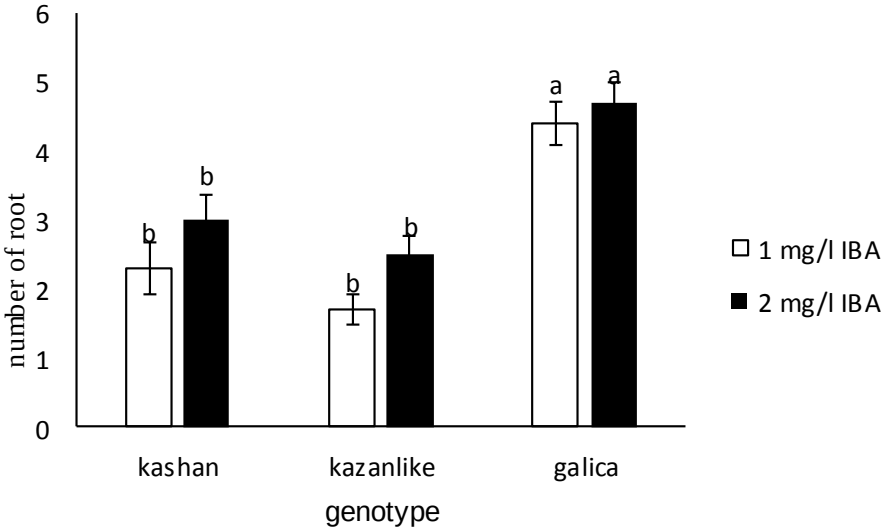


شکل ۵. اثر متقابل ژنوتیپ و غلظت تنظیم‌کنندهٔ BAP بر شمار نوساقه‌های تشکیل‌شدهٔ گل محمدی

Figure 5. Interaction of rose cultivar and BAP concentration on *in vitro* generated number of shoots of Damask rose.

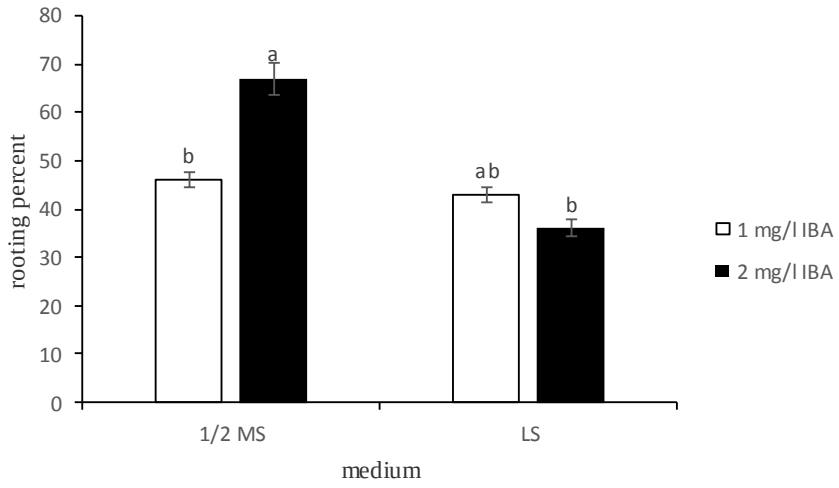
www.SID.ir

Archive of SID



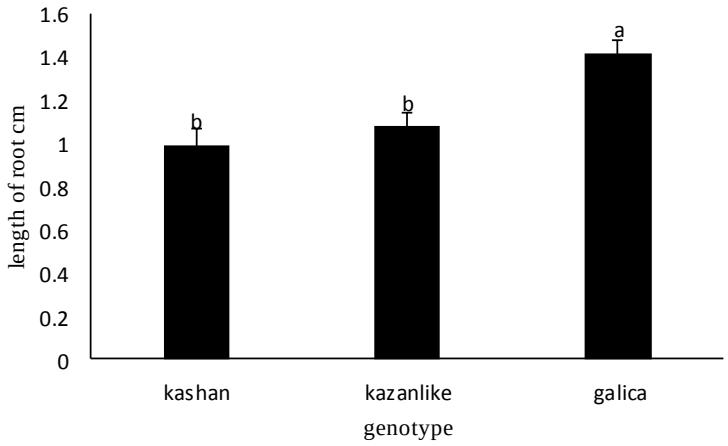
شکل ۶. اثر متقابل ژنوتیپ و غلظت IBA بر شمار ریشهٔ نوساقه‌های گل محمدی

Figure 6. Interaction of rose cultivar and IBA on number of *in vitro* generated roots of Damask rose.



شکل ۱ . اثر متقابل محیط کشت و غلظت IBA بر درصد ریشه‌زایی نوساقه‌های گل محمدی

Figure 7. Interaction of medium and IBA on rooting percent of Damask rose.



شکل ۸. تأثیر ژنوتیپ بر طول ریشه‌های تولیدشدهٔ نوساقه‌های گل محمدی

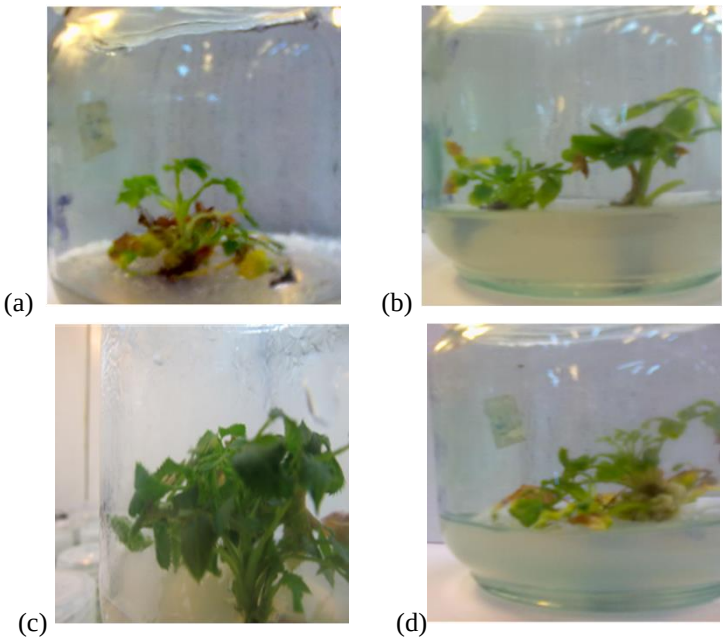
Figure 8. Effect of genotype on rooting of Damask rose shoots.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این پژوهش تأثیر محیط کشت‌های مختلف بر رشد و میزان پرآوری نوساقه‌های گل‌محمدی بررسی شد. نتایج نشان داد که نوساقه‌های رشدکرده در محیط کشت mMS0 بهترین کیفیت و پرآوری را داشتند و همچنین ریزنمونه‌های که در این محیط به دست آمدند، از نظر ارتفاع اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها نداشتند (جدول ۲). این نتیجه می‌تواند به‌این‌علت باشد که درواقع با جایگزین کردن کلسیم در محیط کشت می‌توان به میزان زیادی رشد را افزایش داد و از سبزردی (زردی) نوساقه‌ها جلوگیری کرد (شکل ۹). همچنین با کاهش سطح آمونیوم در این محیط کشت از بروز اثرگذاری سمی آن جلوگیری شد ،زیرا این یون ازنظر شعاع یونی با پتاسیم برابر است و از جذب آن جلوگیری می‌کند و درنتیجه با کاهش دادن آمونیوم می‌توان قابلیت در دسترس بودن پتاسیم را افزایش داد (Ishoka & Tanimoto, 1990). با کاهش سطح سولفات منیزیم به حدود دوسوم میزان اولیه در محیط کشت mMS0 (جدول ۱) از بروز سبزردی ناشی از زیاد بودن منیزیوم جلوگیری شد. نتایج تحقیقات پیشین نشان داده که استفاده از محیط کشت WPM در مقایسه با محیط کشت MS به علت اینکه میزان آمونیوم کمتری را دارد موجب افزایش تولید پینه‌های سبزتر از ساقهٔ ریزنمونه‌ها شده است (Farhangi-sabet & Behboodi, 2004). گزارش شده که میزان بالای آمونیوم به علت کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز و گلوتامات سنتاز که در تولید اسیدهای آمینه دخالت دارند موجب کاهش طول نوساقه‌ها می‌شود (Shirdel *et al.*, 2013). در پژوهشی که توسط Nodezh et al. (2012) انجام پذیرفت، از محیط کشت A19 که همسان با تیمار mMS5 در جدول ۱ این پژوهش است، برای افزایش نوساقه‌های گل‌محمدی استفاده شد که در این محیط کشت میزان آمونیوم نیترات و پتاسیم نیترات نسبت به محیط کشت استاندارد MS دو برابر شد که نشان‌دهندهٔ اهمیت نسبت آمونیوم به نیترات است. همچنین گزارش شده است که کاهش نسبت آمونیوم به نیترات در محیط کشت موجب افزایش پرآوری نوساقه‌ها شد (Nodezh *et al.*, 2012). بررسی‌ها نشان می‌دهد که با کاهش غلظت آمونیوم به نیترات، شمار جوانه‌های تشکیل‌شده از پینه افزایش می‌یابد که این مسئله می‌تواند مربوط به سوخت‌وساز (متابولیسم) نیتروژن باشد (Ishoka & Tanimoto, 1990). افزایش غلظت اکسین‌ها در محیط کشت موجب سبزردی و بافت مرده شدن در نوساقه‌های رز می‌شود (Razavizadeh & Ehsanpoor, 2008).



شکل ۹. نوساقه‌های رشدیافته در محیط کشت (a) mMS4، (b) mMS3، (c) mMS0، (d) mMS1

Figure 9. new shoots were grown in medium (a) mMS4; b) mMS3; c) mMS0; d) mMS1)

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش ارتفاع نوساقه‌های رشد یافته در محیط کشت مایع نسبت به محیط کشت جامد اختلاف معنی‌داری داشته و در محیط کشت مایع ارتفاع بیشتری داشتند (شکل ۴). همچنین این نوساقه‌ها دارای توانایی افزایش بیشتر و دارای کیفیت بهتری نسبت به نمونه‌های کشت شده در محیط کشت جامد بودند که این می‌تواند به این دلیل باشد که محیط کشت مایع می‌تواند موجب افزایش سطح تماس محیط کشت با ریزنمونه‌ها، افزایش تهویه و رقیق شدن مواد فنولی خارج‌شده از انتهای ریزنمونه‌ها شود که درنتیجه نوساقه‌هایی باکیفیت و عملکرد بیشتری ایجاد می‌شود (Debergh, 1983; Ziv & Halevy, 1983). استفاده از محیط کشت MS مایع و یا استفاده از آگار کمتر در کشت درون شیشه‌ای گل‌محمدی موجب پرآوری بهتر و رشد بیشتر ریزنمونه‌ها شده است که این خود تابع ژنوتیپ‌های مختلف گل‌محمدی بود (Tabesh *et al*., 2013). استفاده از سامانهٔ کشت موقت و یا مایع موجب افزایش شمار نوساقه‌ها نسبت به کشت جامد شده و همچنین گیاهان تولیدی از این روش کیفیت بهتری نسبت به گیاهان تولیدی در محیط جامد داشتند (Persson, 2012).

استفاده از ترکیب‌های اکسینی به‌منظور ریشه‌دار کردن نوساقه‌های رز توسط محققان زیادی بررسی شده است (Azadi *et al*., 2007). محققان گزارش کرده‌اند که القایی ریشه و سازوکارهای مربوط به ایجاد ریشه در گیاهان، به فعالیت‌های ترکیب‌های اکسینی ارتباط دارد (George *et al*., 2008c). بیشترین درصد ریشه‌زایی در نوساقه‌های رز هنگام استفاده از محیط کشت MS ۱/۲ به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA به دست آمد که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد (Razavizadeh & Ehsanpour, 2008). برخی محققان بهترین محیط برای ریشه‌دار کردن گیاهچه‌های تولیدشدهٔ رز را محیط 1/2MS به همراه ۲ تا ۵ میکرومول IBA بیان کرده‌اند (Xing *et al*., 2010). در پژوهشی دیگر برای ریشه‌دار کردن نوساقه‌های رز، محیط کشت 1/2MS به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌عنوان بهترین محیط انتخاب‌شده است (Baig *et al*., 2013). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که بهترین محیط و ترکیب هورمونی برای ریشه‌دار کردن نوساقه‌های گل‌محمدی استفاده از محیط کشت 1/2MS به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA است که با نتایج این بررسی همخوانی دارد و منجر به ریشه‌دار شدن حدود ۸۰ درصد از ریزنمونه‌ها می‌شود (Salekjalali, 2012)؛ بنابراین می‌توان بهترین محیط کشت برای ریشه‌زایی نوساقه‌های گل‌محمدی را محیط 1/2MS به همراه ۱ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA دانست.

نتیجه‌گیری

بهترین محیط کشت برای استقرار ریزنمونه‌های گل‌محمدی محیط کشت MS است. با توجه به بررسی‌های انجام‌شده بهترین تیمار محیط کشت برای جلوگیری از سبزردی و افزایش شمار نوساقه‌های گل‌محمدی، محیط کشت mMS0 حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۲ IBA است. همچنین هنگامی‌که از محیط کشت mMS0 به حالت مایع استفاده شد، نوساقه‌های با کیفیت بهتر و طول بلندتر تولید شد. بنابراین توصیه می‌شود برای داشتن گیاهچه‌های با توان رشد بهتر از محیط کشت مایع به همراه تنظیم‌کنندهٔ رشد BAP استفاده شود. نتایج نشان داد که با استفاده از محیط کشت 1/2MS به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA بیشتر نوساقه‌های گل‌محمدی ریشه‌زایی موفقی خواهند داشت.

REFERENCES

1. Attia, O. A. & Adel, E. E.-T. (2012). *In vitro* propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Al-Taif Rose plant. *African Journal of Biotechnology*, 11(48), 10888-10893.
2. Azadi, P., Khosh-Khui, M., Beyramizadeh, E. & Bagheri, H. (2007). Optimization of Factors Affecting in vitro Proliferation and Rooting of *Rosa hybrida* L. cv.'Rafaela'. *International Journal of Agricultural Research*, 2(7), 67-72.
3. Achuthan, C., Babu, B. & Padikkala, J. (2003). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Rosa damascena*. *Pharmaceutical biology*, 41(5), 357-361.

www.SID.ir

Archive of SID

4. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
5. Arab, M. M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S. & Ghojah, S. M. (2014). Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G× N15 (hybrid of almond× peach) vegetative rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(2), 81-87.
6. Baig, M. M. Q., Hafiz, I. A., Hussain, A., Ahmad, T. & Abbasi, N.A. (2013). An efficient protocol for in vitro propagation of *Rosa gruss* an teplitz and *Rosa centifolia*. *African Journal of Biotechnology*, 10(22), 4564-4573.
7. Babu, K.G., Singh, B., Joshi, V.P. & Singh, V. (2002). Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(2), 136-140.
8. Boskabady, M.H., Shafei, M.N., Saberi, Z. & Amini, S. (2011). Pharmacological effects of *Rosa damascena*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(4), 295.
9. Bressan, P., Kim, Y., Hyndman, S., Hasegawa, P. & Bressan, R. (1982). Factors affecting invitro-propagation of rose. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107(6), 979-990.
10. Debergh, P. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, 59(2), 270-276.
11. Davies, D. (1980). Rapid propagation of roses in vitro. *Scientia Horticulturae*, 13(4), 385-389.
12. Farhangi-sabet, M. & Behboodi, B. S. (2004). The Study of Biotechnology and Callus Formation on *Rosa damasceana* Mill. in the Kashan Region. In Proceeding of *IV Int. Iran and Russia conf. in agriculture and natural resources*.-Shahrekord, Iran (pp. 91-97).
13. George, E. F. & Sherrington, P. D. (1984). *Plant propagation by tissue culture*: Exegetics Ltd.
14. George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G. -J. (2008). Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors Plant propagation by tissue culture (pp. 175-204): *Springer*.
15. Ishioka, N. & Tanimoto, S. (1990). Plant regeneration from Bulgarian rose callus. *Plant cell, tissue and organ culture*, 22(3), 197-199.
16. Kumar, A., Sood, A, Palni, T., Gupta, A. K. & Palni, L. (2001). Micropropagation of *Rosa damascena Mill*. from mature bushes using thidiazuron. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76(1), 30-34.
17. Khosh-Khui, M. & Jabbarzadeh, Z. (2005). *Effects of several variables on in vitro culture of damask rose (Rosa damascena Mill.).* Paper presented at the IV *International Symposium on Rose Research and Cultivation* 751.
18. Kornova, K., Michailova, J. & Astadjov, N. (2000). Application of In Vitro Techniques for Propagation of Rosa Kazanlika Top. (*Rosa Damascena* Var. Trigintipetala). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 14(2), 78-81.
19. Mamaghani, B. A., Ghorbanli, M., Assareh, M. H. & Zare, A. G. (2010). In vitro propagation of three Damask Roses accessions. *Iran. J. of Plant Physiol*, 1(2), 85-94.
20. Noodezh, H.M., Moieni, A. & Baghizadeh, A. (2012). In vitro propagation of the Damask rose (*Rosa damascena Mill*.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5), 530-538.
21. Linsmaier, E. M. & Skoog F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures.*Physiol. Plant*, 18, 100-127.
22. Onesto, J., Poupet, R. & Julien, P. (1986). Production de potees fleuries de rosier a partir de plantules obtenues par multiplication in vitro conforme. Automne 1983 printemps 1984. *Cahiers du CNIH*.
23. Pati, P. K., Sharma, M., Sood, A. &Ahuja, P. S. (2005). Micropropagation of *Rosa damascena* and *R. bourboniana* in liquid cultures Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer. (pp. 373-385).
24. Pal, P. K. & Singh, R. D. (2013). Understanding crop-ecology and agronomy of Rosa damascena Mill. for higher productivity. *Australian Journal of Crop Science*, 7(2), 196.
25. Persson, J. (2012). *Evaluation of a new type of temporary immersion system (TIS) bioreactors for plant micropropagation*. Second cycle, A2E. Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences (SLU).
26. Razavizadeh, R. & Ehsanpour, A. (2008). Optimization of in vitro propagation of *Rosa hybrida* L. cultivar black red. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 3(1), 96-99.
27. Sauer, A., Walther, F. & Preil, W. (1985). Different suitability for *invitro*-propagation of rose cultivars. *Gartenbauwissenschaft*, 50(3), 133-138.
28. Shirdel, M., Motallebi-Azar, A., Matloobi, M. & Zaare-Nahandi, F. (2013). Effects of nodal position and growth regulators on in vitro growth of Dog Rose (*Rosa canina*). *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 3(1), 9-17.

www.SID.ir

Archive of SID

29. Salekjalali, M. (2012). Phloroglucinol, BAP and NAA enhance axillary shoot proliferation and other growth indicators *in vitro* culture of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.). *Advances in Environmental Biology*, 6(7), 1944-1949.
30. Sagdiç, O., Baydar, N. & Baydar, H. (2004). Note: Antioxidant and antibacterial activities of *Rosa damascena* flower extracts. *Food Science and Technology International*, 10(4), 277-281.
31. Tabesh, F., Kermani, M. J., Nekouei, M. K., Mousavi, A. & Khalighi, A. (2013). *In vitro* propagation of damask rose (*Rosa damascena* cv. Ispahan). *Annals of Biological Research*, 2013, 4(8), 134-138.
32. Valles, M. & Boxus, P. H. (1985). Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars. In *Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants 212* (pp. 611-618).
33. Xing, W., Bao, M., Qin, H. & Ning, G. (2010a). Micropropagation of *Rosa rugosa* through axillary shoot proliferation. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 52(2), 69-75.
34. Ziv, M. & Halevy, A. (1983). Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. *HortScience*, 18(4), 434-436.

www.SID.ir