Crop Biotech.
Vol.2, No. 2, Spring and Summer 2012

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره دوم، بهار و تابستان ۱۳۹۱ (۹۵-۸۷)

ازدیاد درون‌شیشه‌ای واریته City of Leads رز (*Rosa hybrida* cv. City of leads) از طریق کشت جوانه جانبی

عباس سعیدی[۱] *، ندا ایروانی[۲] و امیر رضا زارع کاریزی[۳]
۱، ۲، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۳، گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۲)

In vitro Propagation of *Rosa hybrid* cv. City of Leads via Nodal Segments

A. SAIDI[1]*, N. IRVANI[2] AND A. R. ZARE[3]
1, 2, Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, 3, Biotechnology Department of Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
(Received: Jan. 21, 2012 - Accepted: Feb. 21, 2012)

چکیده

یک روش تکثیر درون‌شیشه‌ای کارآمد به‌منظور تکثیر گونه *Rosa hybrida* واریته City of Leads از طریق تکثیر جوانه‌جانبی بررسی گردید. در ابتدا ریزنمونه‌ها به‌منظور استقرار بر روی دو محیط کشت MS و Van der salm در ترکیب با غلظت‌های مختلف هورمون‌های BA و NAA کشت گردیدند. بیشترین درصد استقرار ریزنمونه‌ها (۱۰۰ درصد) و تعداد نوساقه‌ها (۳/۴ نوساقه در هر ریزنمونه) در محیط Van der salm حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. در مرحله بعدی به‌منظور بهبود سرعت تکثیر، نوساقه‌ها بر روی محیط کشت Van der salm حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱/۲۵، ۱/۵ و ۱/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌تنهایی و یا در ترکیب با ۰، ۰/۰۳، ۰/۰۶ و ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت گردیدند. بیشترین تعداد نوساقه‌ها (۹/۶ نوساقه در هر ریزنمونه) بر روی محیط حاوی ۱/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شد. رشد طولی نوساقه‌ها بر روی محیط Van der salm حاوی ۰، ۰/۱۰، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌تنهایی و یا همراه با، ۰/۰۳، ۰/۰۶ و ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA بررسی شد. بهترین تیمار جهت رشد طولی نوساقه‌ها تیمار حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. نوساقه‌ها به‌منظور ریشه‌زایی به محیط‌های ریشه‌زایی حاوی هورمون‌های IBA و NAA انتقال یافتند. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۹۳/۰ درصد) در تیمار هورمونی حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد، با این حال تیمار هورمونی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین طول ریشه (۶/۱ سانتی‌متر) را ایجاد نمود. گیاهان ریشه‌دارشده با موفقیت سازگار گردیدند. این گیاهان به‌طور طبیعی در گلخانه رشد نمودند.

واژه‌های کلیدی: رز، BA، IBA، ریزازدیادی، محیط کشت Van der salm، ریشه‌زایی، City of leads

Abstract

An efficient *in vitro* propagation protocol of *Rosa hybrida Cv. City of leads* by axillary shoot proliferation from nodal segments of mature plants was developed. Explants were cultured on two medium formulations, namely Murashige and Skoog (MS) and Van der salm supplemented with various concentrations of N6- benzyladenine (BA) and α-naphthalene acetic acid (NAA). The best explant establishment (100%) and shoot number (3.4 axillary shoots/ explant) was achieved in Van der salm medium supplemented with 2 mg l^{-1} BA and 0.05 mg l^{-1} NAA. Multiple shoots were induced from shoot tips cultured on agar based Vander salm medium containing BA (0, 0.5, 1.25, 1.5 and 1.75 mg l^{-1}) alone or in combination with NAA (0, 0.03, 0.06 and 0.09 mg l^{-1}). The highest number of proliferated shoots (9.6 shoot per explants) was obtained with 1.75 mg l^{-1} BA plus 0.03 mg l^{-1} NAA. Elongation of the induced shoots was achieved on Van der salm basal medium containing 0, 0.01, 0.05 and 0.1 mg l^{-1} BA alone or in combination with 0, 0.03, 0.06 and 0.09 mg l^{-1} NAA. The best treatment for shoot elongation was obtained with 0.01 mg l^{-1} BA plus 0.09 mg l^{-1} NAA. Elongated shoots were excised and transferred into rooting medium containing auxins NAA or IBA. The highest percentage of root induction (93.0 %), was obtained on Van der salm medium supplemented with 0.05 mg l^{-1} NAA. However, the highest root elongation (6.1 cm) was achieved on Van der Salm medium containing 0.5 mg l^{-1} IBA. Rooted plantlets were successfully acclimatized in soil. These *in vitro*-raised plants grew normally in greenhouse and their natural habitat without showing any morphological variations.

Keywords: Micro-propagation, Van der Salm medium, *Rosa hybrida* Cv. City of leads

*نویسنده مسئول: عباس سعیدی
E-mail:abbas.saidi@gmail.com

مقدمه

رز گیاهی است از خانواده گل‌سرخیان (Rosaceae) که در بخش‌های وسیعی از کره زمین با شرایط آب و هوایی بسیار متفاوت از مناطق سرد شمالی تا مناطق نیمه‌گرمسیری پراکنده می‌باشند. رزها در فرم‌های مختلف بوته‌ای، درختچه‌ای، بالارو و رونده و به‌صورت‌های خزان‌پذیر و بی‌خزان وجود دارند. همچنین رزها بیشترین تنوع را در شکل و نوع، حالت گل، اندازه، رنگ و رایحه دارند (Vu *et al*. 2006). رزها در زمره یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی جهان می‌باشند. این گیاهان علاوه بر این که یک گیاه باغچه‌ای بسیار با اهمیت می‌باشند، برای تولید گل‌های شاخه بریده، تولید پایه‌های مقاوم و همچنین به‌عنوان منبعی برای تولید اسانس رز کاربرد دارند (Jain and Ochatt. 2010). رقم City of leads از دسته رزهای بوته‌ای به‌شمار می‌رود که گل‌های فراوان به‌صورت خوشه‌ای تولید می‌کنند. این رقم مقاوم به سرما می‌باشد و بنابراین گیاه بسیار مناسبی برای باغچه‌ها است و همچنین نسبت به رزهای هیبرید چای به مراقبت کمتری نیاز دارند.

رزها به‌طور سنتی به‌وسیله روش‌های تکثیر رویشی همچون قلمه‌زدن و پیوند تکثیر می‌گردند (Carelli and Echeverrigaray. 2002). بذرها معمولاً برای تکثیر گونه‌ها، ارقام جدید و برای تولید پایه‌ها استفاده می‌شوند (Horn. 1992). اگرچه تکثیر به‌وسیله اندام‌های رویشی یک تکنیک غالب در تکثیر رزها می‌باشد، با این حال هنوز سلامتی و عاری از بیماری‌بودن گیاهان حاصل از این روش‌ها قابل تایید نیست. علاوه بر این وابستگی به فصل، هزینه بالای تکثیر، کار پرزحمت و سرعت تکثیر آهسته از دیگر محدودیت‌های موجود در روش‌های سنتی تکثیر می‌باشند (Pati*et al*. 2006).

برجسته‌ترین خصوصیت روش‌های تکثیر درون‌شیشه‌ای قدرت تکثیر بسیار زیاد در فاصله زمانی اندک و تولید گیاهان عاری از بیماری می‌باشد. همچنین از آن‌جایی‌که این روش قادر به تکثیر بسیار سریع واریته‌های جدید در مدت زمان کوتاهی می‌باشد، در اصلاح واریته‌های جدید رز بسیار حائز اهمیت است. امروزه در سطح دنیا تقاضا برای استفاده از رزهای تکثیرشده از طریق کشت‌بافت برای تولید گل‌های شاخه‌بریده بسیار افزایش یافته است، زیرا رزهای کشت‌بافتی متراکم‌تر هستند، شاخه‌های بیشتری تولید می‌کنند و در بعضی مواقع عملکرد تولید گل در آن‌ها بیشتر است. همچنین، از رزهای کوتاه حاصل از کشت‌بافت برای تولید گیاهان گلدانی نیز استفاده می‌گردد، چون آن‌ها سرعت رشد سریع‌تر، گل‌دهی بیشتر و شاخه‌های کوتاه‌تری را نسبت به گیاهان تولیدشده به روش‌های سنتی تولید می‌نمایند (Pati*et al*. 2006).

پس از گزارشات Skirvin and Chu (1979) و Hasegawa (1979) بر روی ریزازدیادی *Rosa hybrid* L. تحقیقات متعددی درباره جنبه‌های مختلف تکثیر تجاری این گونه رز از طریق ریزازدیادی به‌وسیله جوانه‌جانبی (Marcelis van Acker and Scholten. 1995; Singh and Syamal.1999; Ibrahim and Debergh. 2001; Kim *et al*. 2003a; Kavand. 2011; Khosravi. 2007)، باززایی از طریق کشت کالوس (Hsia and Korban. 1996)، جنین‌زایی سوماتیکی (Noriega and Sondahl. 1991; Kim *et al*. 2003b) و گلدهی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای (Wang *et al*. 2002) در ارقام مختلف بررسی شده است.

با این وجود کاربردهای تجاری این بررسی‌ها بسیار محدود می‌باشد. زیرا نتایج بسیار متناقض و سرعت تکثیر کم در بسیاری از ارقام مهم رز به‌دست آمده است (Carelli and Echeverrigaray. 2002). همچنین تفاوت‌های بسیار زیادی در نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، محیط‌های کشت و غلظت‌های مختلف عناصرغذایی در ارقام

مختلف رز مشاهده می‌گردد (Pati *et al*. 2006). همین دلایل باعث می‌شود تا علی‌رغم مطالعات انجام‌شده، مطالعات جدیدی بر روی ارقام دیگر صورت پذیرد. بر این اساس در این بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نوع محیط کشت بر نوساقه‌زایی، ریزازدیادی و ریشه‌زایی *Rosa hybrid* Cv. City of leads بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

انتخاب ریزنمونه و ضدعفونی

سرشاخه‌های رز در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۹ از پایه‌های مادری سالم گونه *Rosa hybrid* واریته City of Leads در باغ گیاه‌شناسی پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی انتقال یافتند. در آزمایشگاه قسمت میانی شاخه‌ها در قطعات ۳-۲ سانتی‌متری حاوی حداقل یک جوانه‌جانبی بریده شده و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری همراه با چند قطره مایع ظرفشویی توئین شستشو گردیدند. ریزنمونه‌های رز در لامینار ایرفلو ابتدا به‌مدت ۳۰ ثانیه با الکل ۷۰ درصد و سپس به‌مدت ۶ دقیقه با محلول ۰/۱ درصد کلریدجیوه ($HgCl_2$) ضدعفونی گردیدند. در نهایت ریزنمونه‌های ضدعفونی‌شده ۳ مرتبه با آب‌مقطر استریل به‌طور کامل شستشو داده شدند.

مرحله استقرار

به‌منظور استقرار، ریزنمونه‌های رز در دو محیط کشت پایه MS و Van der salm، (Van der Salm *et al*. 1994) حاوی غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به‌تنهایی و یا در ترکیب با هورمون‌های NAA در غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کشت گردیدند. یک ماه پس از کشت درصد تشکیل نوساقه‌ها براساس درصد نوساقه‌های تولیدشده به کل ریزنمونه‌های کشت‌شده و تعداد نوساقه‌ها براساس مجموع تعداد نوساقه‌های تولیدشده بر کل تعداد ریزنمونه‌های باززاشده بررسی شدند.

ریزازدیادی نوساقه‌ها

تکثیر نوساقه‌ها در محیط کشت Van der salm حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱/۲۵، ۱/۵ و ۱/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌تنهایی و یا در ترکیب با ۰، ۰/۰۳، ۰/۰۶ و ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام شد. بیست و یک روز پس از کشت تعداد و طول نوساقه‌ها در تیمارهای مختلف بررسی شدند.

مرحله رشد طولی

به‌منظور رشد طولی نوساقه‌های تولیدشده در مرحله تکثیر، نوساقه‌ها با طول یکسان (تقریباً ۱ سانتی‌متر) به محیط کشت Van der salm همراه با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP به‌تنهایی و یا در ترکیب با ۰، ۰/۰۳، ۰/۰۶ و ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA انتقال یافتند. یک ماه پس از کشت طول نوساقه‌ها براساس میانگین مجموع طول نوساقه‌ها به کل تعداد نوساقه‌های کشت‌شده بررسی گردیدند.

ریشه‌زایی نوساقه‌ها

به‌منظور ریشه‌زایی از محیط کشت Van der salm در ترکیب با غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از هورمون‌های NAA و IBA استفاده شد. یک ماه پس از کشت درصد ریشه‌زایی براساس درصد نوساقه‌های ریشه‌دارشده به کل نوساقه‌های کشت‌شده و تعداد ریشه‌ها در هر نوساقه براساس میانگین تعداد ریشه‌های تولیدشده در هر تیمار بررسی شد.

شرایط کشت

به تمامی محیط‌های کشت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به‌عنوان منبع کربن و ۷ گرم در لیتر آگار افزوده شد. pH محیط‌های کشت قبل از افزودن آگار روی ۵/۸ تنظیم گردید. محیط‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱/۲ کیلوپاسکال

به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. تمام کشت‌ها در اتاق رشد تحت شرایط دمایی ۲۳±۲°C و در فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. همچنین عمل زیرکشت به فواصل هر ۲۱ روز یک‌بار انجام شد.

سازگاری گیاهان

گیاهان ریشه‌دارشده به‌کمک پنس به‌آرامی از آگار جدا شده و پس از شستشوی ریشه گیاه با آب ولرم، در گلدان کوچکی با ترکیبی از پرلیت، کودحیوانی و خاک زراعی استریل با نسب ۲:۱:۲ کشت شدند. گلدان‌ها با مقدار کمی آب‌مقطر مه‌پاش شدند. سپس برای حفظ حداکثر رطوبت، روی گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی پوشانده شده و به ژرمیناتور منتقل شدند. جهت انجام سازگاری تدریجی و به‌منظور تهویه بهتر در ۴ روز اول هر چند ساعت یک بار سرپوش را برداشته و اندکی مه‌پاش انجام شد. در هفته دوم جهت سازگارشدن گیاهان با محیط بیرون منافذی در سرپوش ایجاد شد و پس از چهار هفته سرپوش‌ها به‌طور کامل برداشته شدند.

آنالیز داده‌ها

داده‌های به‌دست‌آمده در آزمایش فاکتوریل و با طرح پایه کامل تصادفی با ۴ تکرار در هر تیمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در هر تکرار ۱۰ ریزنمونه رز در شیشه‌های کشت با حجم ۴۰۰ سی‌سی که حاوی ۳۰-۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت بودند، کشت گردیدند. تجزیه آماری طرح با استفاده از نرم‌افزار MSTATC صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن نشان داد که تفاوت معنی‌داری در درصد تشکیل و تعداد نوساقه‌ها در دو محیط کشت MS و Van der salm استفاده شده وجود دارد (جدول ۱). همچنین غلظت هورمون BA به‌تنهایی و یا در ترکیب با NAA نیز تأثیر معنی‌داری بر درصد تشکیل نوساقه‌ها و تعداد آن‌ها بر روی محیط‌های استقرار داشت. افزایش غلظت BA تا ۲ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش درصد شاخه‌زایی بر روی محیط Van der salm شد، اما با افزایش غلظت این هورمون به ۳ میلی‌گرم در لیتر به‌طور معنی‌داری درصد تشکیل نوساقه‌ها کاهش یافت. بررسی‌های انجام‌شده در *Rosa hybrida* ارقام Duftwolke و Iseta نشان داد که BA در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین درصد شاخه‌زایی را ایجاد نمود. همچنین در *Rosa hybrida* رقم Iceberg بیشترین تعداد شاخه‌ها و برگ‌های جدید در محیط حاوی ۴µm هورمون BA و ۰/۵µm هورمون NAA تولید گردید (Khosravi. 2007). افزودن هورمون NAA به محیط‌های کشت باعث افزایش درصد تشکیل شاخه‌ها در هر دو محیط شد، با این حال افزایش غلظت این هورمون از ۰/۰۵ به ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری بر درصد تشکیل شاخه‌ها در هر دو محیط نداشت، در حالی‌که تعداد نوساقه‌ها با افزایش غلظت NAA کاهش یافت (جدول ۱). بیشترین درصد شاخه‌زایی و تعداد نوساقه‌ها (به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۳/۴ نوساقه در هر ریزنمونه) بر روی محیط کشت Van der Salmحاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. مشابه با این نتایج در یک بررسی اثر سه اکسین NAA، IBA و IAA را در ترکیب با BA بر تکثیر رز بررسی نمودند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که NAA بیشترین تأثیر را بر ریزازدیادی رز دارد (Vijaya *et al*. 1991).

در محیط‌های کشت MS در اکثر تیمارهای هورمونی دو هفته پس از کشت، زردشدن و ریزش برگ‌ها و در برخی موارد نکروزه‌شدن جوانه انتهایی مشاهده شد. اما در محیط‌های Van der Salm،

حتی یک ماه پس از کشت نیز ریزش برگ و زردشدن مشاهده نشد. در محیط کشت Van der Salm به‌جای FeEDTA از FeEDDHA به‌عنوان منبع آهن استفاده شده است و سایر عناصر وغلظت‌ها کاملاً شبیه به محیط کشت MS می‌باشد. اثر برتر FeEDDHA در مقایسه با FeEDTA بر تکثیر و جلوگیری از زردشدن و نکروزه‌شدن رزها قبلاً در *Rosa hybrid* L. گزارش شده است (Vander Salm *et al*. 1994).

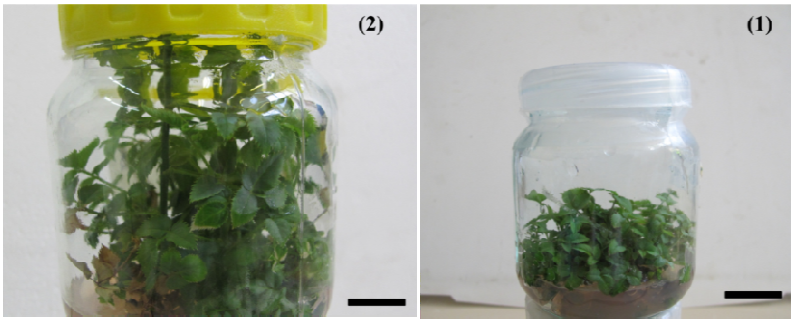
جدول ۱- اثر نوع محیط کشت و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد استقرار و تعداد نوساقه‌های تولیدشده پس از یک ماه از کشت

تعداد نوساقه‌ها		درصد تشکیل نوساقه‌ها		تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (mg/l)	
MS	Van der salm	MS	Vander salm	NAA	BAP
1.0i	1.2hi	60.6f	63.6f		0
1.5gh	1.7fg	85.0de	86.0cd		1
1.8ef	1.8ef	85.0de	90.6bc		2
2.1e	2ef	80.3e	82.0de		3
1.0i	1.0i	35.3i	45.0g	0.05	0
2.5d	2.8b-d	100.0a	100.0a	0.05	1
3.1b	3.4a	90.6bc	100.0a	0.05	2
2.8bc	2.9bc	92.6b	92.3b	0.05	3
1.1i	1.5gh	37.3hi	40.3gh	0.1	0
2.0e	2.5d	90.6bc	100.0a	0.1	1
2.6cd	2.9bc	86.0cd	100.0a	0.1	2
2.6cd	2.9bc	80.3e	86.6cd	0.1	3

حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند.

در مرحله بعدی به‌منظور تکثیر سریع، نوساقه‌های رشدیافته در محیط‌های استقرار از قطعات کشت‌شده جدا و به محیط‌های ریزازدیادی انتقال یافتند. افزایش غلظت BA باعث افزایش تعداد نوساقه‌ها شد. همچنین با افزایش غلظت NAA از ۰ به ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر تعداد نوساقه‌ها کاهش یافت. هرچند در برخی از تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). بر این اساس بیشترین تعداد نوساقه‌ها (۹/۶ نوساقه در هر ریزنمونه) در محیط کشت واندرسالم حاوی ۱/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر NAA ایجاد شد (شکل۱-۱). نقش برجسته BA در غلظت ۱۰-۰ میلی‌گرم در لیتر در تکثیر بسیاری از واریته‌های رز مورد تایید قرار گرفته است، هر چند غلظت و ترکیب این هورمون با انواعی از اکسین‌ها بر درصد و تعداد نوساقه‌ها در واریته‌های مختلف بسیار متفاوت است (Pati*et al*. 2006; Hasegawa. 1980).

با وجود افزایش تعداد نوساقه‌ها با افزایش غلظت BA طول آن‌ها کاهش یافت. برعکس با افزایش هورمون NAA افزایش در طول نوساقه‌ها مشاهده شد. بنابراین بیشترین طول نوساقه‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (جدول ۲). همچنین با افزایش غلظت NAA همراه با تولید نوساقه‌ها در انتهای بریدشده آن‌ها تشکیل کالوس نیز مشاهده شد.



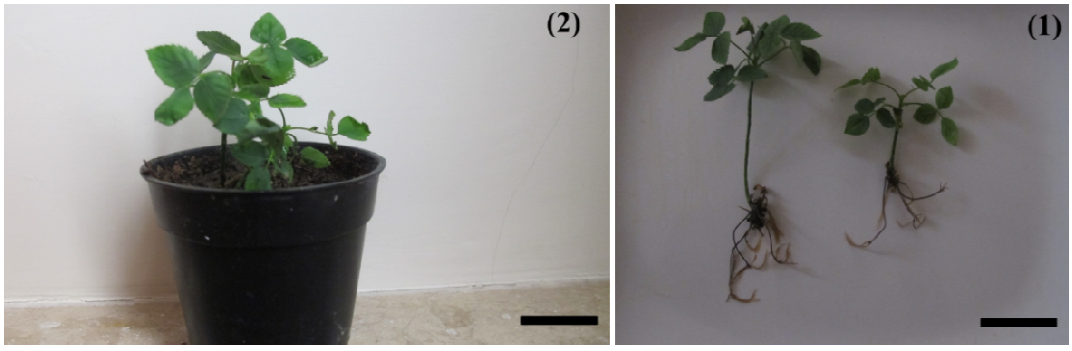
شکل ۱- تکثیر واریته *City of leads* رز از طریق جوانه‌جانبی. a) ریزازدیادی رز در تیمار هورمونی حاوی ۱/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA. b) رشد طولی نوساقه‌ها بر روی محیط‌کشت حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA (مقیاس= ۱ سانتی‌متر).

جدول ۲- اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تکثیر رز بر روی محیط‌کشت Van der Salm پس از ۳۰ روز از کشت

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی(mg/l)		تعداد نوساقه‌ها	طول نوساقه‌ها (cm)
BA	NAA		
0.5	0	2.1h	2.9b
0.5	0.03	2.6h	3.1b
0.5	0.06	2.4h	3.8a
0.5	0.09	2.0h	4.1a
1.25	0	5.6f	1.6d-h
1.25	0.03	7.2d	1.9c-e
1.25	0.06	6.4e	2.2c
1.25	0.09	5.7f	2.3c
1.5	0	4.4g	1.2hi
1.5	0.03	4.7g	1.5e-h
1.5	0.06	4.5g	1.8d-f
1.5	0.09	4.1g	2.0cd
1.75	0	8.2c	1.0i
1.75	0.03	9.6a	1.3g-i
1.75	0.06	9.1ab	1.4f-i
1.75	0.09	8.9b	1.7d-g

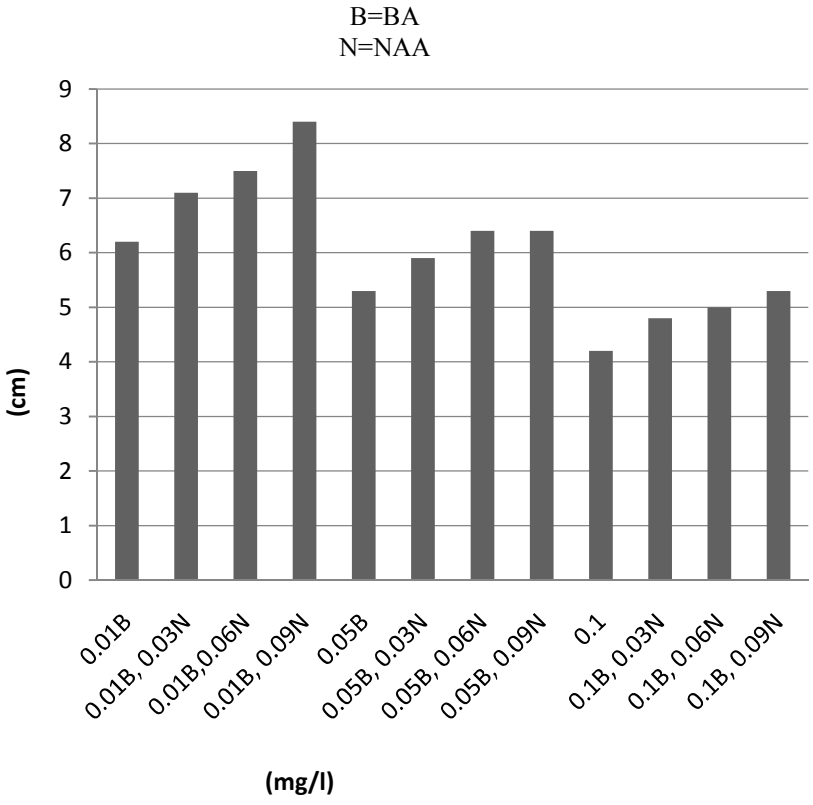
حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند.

نوساقه‌های تولیدشده در مرحله ریزازدیادی اکثراً دارای طول بسیار کوتاهی بودند، بنابراین به‌منظور رشد طولی به محیط‌های کشت با غلظت‌های کم BA (۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) به‌تنهایی و یا در ترکیب با غلظت‌های ۰، ۰/۰۳، ۰/۰۶ و ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA انتقال یافتند. نتایج نشان داد که افزایش غلظت BA در این محیط‌ها نیز باعث کاهش طول نوساقه‌ها شد، همچنین افزایش NAA باعث افزایش طول نوساقه‌ها شد (شکل ۳). به‌طوری‌که بیشترین طول (۸/۴ سانتی‌متر) نوساقه‌ها در محیط حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (شکل ۲). افزایش طول نوساقه‌ها با کاهش غلظت BA در گونه‌هایی از رز گزارش شده است (Ma *et al*. 1996).



شکل ۲- ریشه‌زایی و سازگاری واریته رز *City of leads*. ۱) گیاهچه‌های ریشه‌دارشده پس از خروج از محیط. ۲) گیاهچه سازگارشده تحت شرایط گلخانه پس از ۲ ماه رشد در خاک (مقیاس = ۰/۵ سانتی‌متر).

به‌منظور ریشه‌زایی نوساقه‌هایی که طولی بین ۹-۷ سانتی‌متر داشتند به محیط کشت Van derSalm حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از هورمون‌های NAA و IBA انتقال یافتند. اولین نشانه‌های ریشه‌زایی یک هفته پس از کشت در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. در محیط Van der Salm بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در ۶۳/۰ درصد از نوساقه‌ها ریشه‌ها تولید شدند. افزایش غلظت NAA به بیش از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش درصد تشکیل ریشه‌ها شد. درحالی‌که با افزایش غلظت IBA درصد ریشه‌زایی نیز افزایش یافت. با این حال بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (شکل ۲). در *Rosa hybrida* cv. Improved Blaze بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمار هورمونی حاوی ۰/۰۳ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (Hasegawa. 1979). همچنین مشابه با نتایج ما در *Rosa hybrid* رقم‌های Tropicana و Bridal Pink، *Rosa canina* و *Rosa damascene* بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (Khosh-Khui and Sink. 1982). با افزایش غلظت هر دو هورمون NAA و IBA تعداد ریشه‌ها افزایش یافت. به‌طوری‌که بیشترین تعداد ریشه‌ها در محیط Van derSalm حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA ایجاد شد (جدول ۳). در محیط‌های ریشه‌زایی هیچ‌گونه کالوسی مشاهده نشد. همچنین در محیط‌های ریشه‌زایی خصوصاً در تیمارهای حاوی IBA گیاهان به‌دست‌آمده سه ماه بدون‌واکشت کاملاً شاداب و بدون زردشدن برگ‌ها بودند.



شکل ۳- اثر ترکیبات مختلف BA و NAA بر رشد طولی نو ساقه‌های رز

حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند.

جدول ۳- اثر NAA و IBA بر ریشه‌زایی نوساقه‌های رز پس از ۴ هفته از کشت

تعداد ریشه‌ها	درصد ریشه‌زایی	تنظیم‌کننده های رشد گیاهی (mg/l)	
		IBA	NAA
3.2g	63.0g		0
3.7f	72.3e		0.01
4.1e	93.0a		0.05
4.0e	81.3c		0.1
4.6d	76.3d		0.5
4.6d	66.0f	0.01	
4.9c	72.0e	0.05	
5.3b	84.6b	0.1	
6.1a	80.0c	0.5	

حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند.

تعدادی از گیاهان سالم در مرحله سازگاری پس از چند روز به‌دلیل پوسیدگی از بین رفتند. اما در نهایت ۸۵ درصد گیاهان زنده ماندند و به گلخانه انتقال یافتند (شکل۲).

سازگاری موفقیت‌آمیز گیاهان تکثیرشده از طریق کشت‌بافت و انتقال آن‌ها به شرایط مزرعه مرحله بسیار حساسی از تولید تجاری رز می‌باشد. در بررسی‌های صورت گرفته سازگاری رزهای کشت‌بافتی بسیار سخت گزارش شده است زیرا بسیار از آن‌ها در اثر خشک‌شدن سریع و یا پوسیدگی گیاهان به‌دلیل رطوبت بالا از بین می‌روند (Pati *et al*. 2006).

در این بررسی تکثیر گونه *Rosahybrid* Cv. City of leads با استفاده از تیمارهای هورمونی BA و NAA درمحیط‌های MS و Van der Salm بررسی گردید. در مجموع محیط کشت Van der Salm حاوی ۱/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد نوساقه‌ها را تولید نمود. بیشترین طول نوساقه‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. همچنین بیشترین ریشه‌زایی در محیط حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA ایجاد شد. نتایج حاصل در این بررسی نشان داد که تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نوع محیط کشت بر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی *Rosa hybrid* Cv. City of leads مؤثر بوده و می‌توان به‌منظور تکثیر و تولید سریع، ارزان و بدون وابستگی به فصل گیاهان عاری از بیماری رز استفاده نمود.

سپاسگزاری

از همکاری سرکار خانم دکتر کرمانی عضو هیات علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران جهت تهیه ریزنمونه و همچنین مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و از همکاران محترمی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Carelli BP, Echeverrigaray S (2002) An improved system for the *in vitro*propagation of rose cultivars. ScientiaHorticulturae. 92: 69–74.

Hasegawa PM (1979) In vitro propagation of rose. Horticulture Science. 14: 610–612.

Horn WAH (1992) Micropropagation of rose (*Rosa* L.). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 20, High-tech and micropropagation IV. Springer,

Germany, pp 320–342.

Hsia C, Korban SS(1996) Organogenesis and somatic embryogenesis incallus cultures of *Rosa hybrida and Rosa chinensis* minima. PlantCell Tissue and Organ Culture.44: 1– 6.

Ibrahim R, Debergh PC (2001) Factors controlling highefficiency adventitious bud formation and plantregeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosahydrida* L.). ScientiaHorticulturae. 88: 41–57.

Jain SM, Ochatt SJ (2010) *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, INC, USA.

Kavand S, Kermani MJ, Haghnazari A, Khosravi P, Azimi MR (2011) Micropropagation and medium-term conservation of Rosa Pulverulenta. ActaScientiarum. Agronomy. 33(2): 297-301.

Kim KC, Chung JD, Jee SO, Oh JY (2003b) Somatic embryogenesis from *in vitro* grown leaf explants of *Rosa hydrida* L. Journal of Plant Biotechnology. 5: 161–164.

Kim KC, Oh JY, Jee SO, Chung JD (2003a) *In vitro*micropropagation of *Rosa hybrida* L. Journal of Plant Biotechnology. 5: 115–119

Khosh-Khui M, Sink KC (1982) Rooting enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. Scientia Horticulturae.17: 371– 376.

KhosraviP, JafarkhaniKermani M, Nematzadeh GA, Bihamta MR (2007) A protocol for mass production of *Rosa hybrida* cv. Iceberg through *in vitro* propagation. Iranian Journal of Biotechnology. 5 (2): 100- 104.

MA Y, Byrne DH, Chen J (1996) Propagation of rose species *in vitro.In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 32:103-108.

Marcelis van Acker CAM, Scholten HJ (1995) Development of axillary budsof rose *in vitro*. Scientia Horticulturae. 63: 47– 55.

Noriega C, Sondahl MR (1991) Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. Biotechnology. 9: 991–993.

Pati PK, Rath SP, Sharma M, Sood A, Ahuja PS (2006) *In vitro* propagation of rose-a review. Biotechnology Advances.24: 94– 114.

Singh SK, Syamal MM (1999) Critical studies on the effect of growth regulators on *in vivo* shoot proliferation in *Rosa hybrida* L. cv Sonia for micropropagation. J ApplHorticLucknow. 1: 91– 93.

Skirvin RM, Chu MC, (1979) *In vitro* propagation of 'Forever Yours' rose.Horticulture Science. 14: 608–610.

Van der Salm TPM, van der Toorn CJG, Hanisch ten Cate CH, Dubois LAM, De Vries DP, Dons HJM (1994) Importance of the iron chelate formula for micropropagation of Rosa hybrida L dMoneywayT. Plant Cell Tissue and Organ Culture.37:73-77.

VuNH, Anh PH, Nhut DT (2006) The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. ''First Prize''. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 87: 315-320.

Wang GY, Yuan MF, Hong Y (2002) *In vitro* flower induction in roses.*In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 38: 513-518.