T.M.U.

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی

بهینه‌سازی پرآوری گیاه گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

در شرایط درون شیشه‌ای

نگارنده:

حبیبه حسابی

استاد راهنما:

دکتر احمد معینی

استاد مشاور:

دکتر امین باقی‌زاده

تیر۱۳۹۰

بهینه‌سازی پرآوری گیاه گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

در شرایط درون شیشه‌ای

چکیده:

گل محمدی با نام علمی .*Rosa damascena* Mill، یکی از مهمترین گونه‌های رز معطر محسوب می‌شود. اهمیت بالای اقتصادی، بالاخص به خاطر تولید گلاب و روغن‌های معطر، این گیاه را یکی از مهمترین محصولات زینتی-تجاری کرده است. سریع‌ترین روش تکثیر گیاه گل محمدی می‌تواند روش ریزازدیادی - باشد که پتانسیل تولید فراوان گیاهان سالم و عاری از بیماری را دارد. با توجه به ارزش این گیاه، در این تحقیق، جهت ارائه پروتکل مناسبی برای کشت درون شیشه‌ای آن، از جوانه‌های جانبی پایه‌های بالغ در فصول مختلف سال برداشت شد و در هر مرحله از ریزازدیادی (استقرار، پرآوری و ریشه‌زایی)، تیمارهای مختلف محیط کشت، هورمونی و همچنین ترکیبات تیماری مختلف مورد آزمایش قرار گرفت. مناسب‌ترین فصل سال جهت نمونه‌گیری، پاییز و اوایل زمستان معرفی شد و همچنین نتایج نشان داد که محیط کشت مناسب جهت مرحله استقرار، محیط MSتغییر یافته مایع حاوی پل کاغذی فاقد هورمون بود و همان محیط کشت با ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ، بیشترین و بهترین کیفیت نوساقه را در مرحله پرآوری تولید کرد. نوساقه‌های تولید شده به محیط‌های ریشه‌زایی منتقل شدند و در نهایت محیط کشت MSتغییر یافته (T_{21})فاقدNH_4NO_3که عناصر ماکرو آن به ۱/۲ کاهش یافته بود، بستر کشت مایع حاوی پل کاغذی و فاقد زغال فعال، دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر NAAو ۱۵ گرم در لیتر شکر، به عنوان محیط کشت بهینه برای ریشه-زایی درون شیشه‌ای این گیاه معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: گل محمدی(*Rosa damascena* Mill)، ریزازدیادی درون شیشه‌ای، پرآوری، ریشه‌زایی.

فصل اول

مقدمه

مقدمه:

گل محمدی با نام علمی *Rosa damascena* Mill. از خانواده Rosaceae، یکی از مهمترین گونه‌های رز محسوب می‌شود. علیرغم اهمیت فوق‌العاده‌ای که گیاه گل محمدی دارد، در ایران و در دنیا کارهای کمی در زمینه تکثیر آن از طریق کشت بافت انجام شده است، این گیاه استفاده فراوانی در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی دارد. توسعه کشت این گیاه می‌تواند نقش بسیار بسزایی در اشتغال‌زایی و رفع نیازهای صنایع مختلف داخلی و نیز در صادرات غیر نفتی کشور داشته باشد.رزها، جزوء مهمترین گیاهان در عرصه تولید و پرورش گل و گیاهان زینتی می‌باشند و به شکل‌های مختلف در بازارهای داخلی و بین‌المللی عرضه می-شوند. اهمیت آن تا جایی است که گل شاخه بریده رز از نظر میزان تولید و ارزش اقتصادی در بین تمام گل‌های شاخه بریده، جایگاه نخست را به خود اختصاص داده است.

علاوه بر جایگاه و اهمیت ویژه رزها در صنعت گل و گیاهان زینتی ، از دیر باز گلبرگ این گیاهان به عنوان منشاء طبیعی عطر و اسانس مورد توجه بوده است و ارزش اقتصادی بالایی دارد. در این مورد، بین گونه-های متعدد جنس رز، تنها چند گونه عمده در تولید و فرآوری روغن‌های فرار رز مطرح می‌باشند، که از بین آنها گل محمدی به عنوان گیاهی ارزشمند در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفته است. ترکیه و بلغارستان بزرگترین تولید کنندگان روغن فرار گل‌محمدی (R. damascene) شناخته شده‌اند (Kovats, 1987).

گل‌محمدی در ابتدا ناشناخته و وحشی بود و هنوز هم به ندرت به صورت خودرو در قفقاز، سوریه، مراکش و اسپانیا رویش دارد. درباره منشاءگلمحمدی نظرات مختلفی وجود دارد ، عده‌ای معتقدند که منشاء آن کشورهای بلغارستان، ترکیه، ایران، هند، اوکراین، کانادا، آمریکا، انگلستان و ژاپن می‌باشد. اما برخی از گزارش‌ها، خاورمیانه را به عنوان منشاء این گیاه یاد می‌کنند (Saakov *etal*, 1973;Beales *et al*., 1998;Rusanov *et al*., 2005) .

گلبرگ‌های گلمحمدی قرن‌هاست که مصرف خوراکی دارد. بوعلی‌سینا، دانشمند ایرانی در قرن چهارم هجری از این گیاه گلاب استخراج کرد و مورد استفاده دارویی قرار داد. در قرون وسطی و عهد رنسانس از عصاره بدست آمده از تقطیر محلول حاصل از گل محمدی برای درمان افسردگی استفاده می‌کردند.

در مجموع فرآورده‌های گلمحمدی خواص درمانی همانند ضدالتهاب، مسکن ملایم، ضدافسردگی، کاهنده میزان کلسترول خون، قابض ملایم، خواص ضدباکتریایی و میکروبی می‌باشد، همچنین کاربرد زیادی در صنعت عطرسازی، آرایشی و بهداشتی و غذایی دارد (Mahood *et al*., 1996; Achuthan *et al*. 2003 ; Ozkan *et al.*,2004).

با وجود اهمیتی که گلمحمدی دارد در دنیا برای تکثیر آن از طریق کشت بافت تلاش‌های کمی صورت گرفته است. تکثیر این گیاه در ایران به صورت سنتی (قلمه و پاجوش) می‌باشد ، حال آن که روش‌های سنتی برای تولید گیاه سالم و عاری از بیماری نامطمئن هستند . همچنین تکثیر گیاه به این روش‌ها محدود به فصل می‌باشد که به همین خاطر سرعت تکثیر و تولید کاهش می‌یابد. با توجه به رشد صنعت و پیشرفت علم و اهمیت زمان، استفاده از تکنیک‌ها و ابزاری که باعث صرفه جویی در زمان، هزینه و نتایج بهتر شود ضروری است. کشت بافت تکنیکی است در جهت تسریع تکثیر، به خصوص در کشاورزی که اهمیت خاصی یافته است. روش کشت بافت علاوه بر صرفه جویی در زمان، در فضایی کوچک‌تری امکان تکثیر گیاهان را فراهم می‌آورند.

مهم‌ترین مزیت‌های کشت بافت به صورت تجاری عبارت است از: تکثیر سریع رقم‌های برتر، افزایش ظرفیت تولید در زمان کوتاه، گیاه عاری از بیماری، سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام جدید، تولید چند نسل در سال، همچنین رزهای کشت بافتی نسبت به گیاهانی که به روش سنتی تکثیر شده‌اند نوساقه‌زایی بیشتری داشته و همچنین گل‌های مناسب‌تری برای تولید گل‌های شاخه بریده دارند (Onesto *et al*., 1985).

در پایان برای توسعه کشت گونه‌های برتر گیاه رز (از جهت اسانس تولیدی و فرآورده‌های دیگر آن) همچنین معرفی پروتکل مناسب جهت تولید و تکثیر این گیاه به صورت صنعتی، انجام آزمایشاتی برای کشت بافت گیاه رز اهمیت فراوان دارد. محمودی (۱۳۸۷) از محیط کشت فاقد هورمون در مرحله استقرار استفاده کرد و سپس با زیرکشت‌های مختلف در محیط‌های حاوی مقادیر مختلف هورمون‌های BAP,

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- تاریخچه، منشاء پیدایش و پراکنش گل محمدی

بیش از ۲۰۰ گونه و ۱۸۰۰۰ رقم، از جنس Rosa متعلق به خانواده Rosaceae و زیر خانواده Rosoideae وجود دارند(Gudin, 2000). این گونه‌ها بیشتر به صورت درختچه هستند و برگهای پایا و خزان کننده دارند و در نواحی معتدل نیمکره شمالی پراکنده شده‌اند (Horn, 1992).

گل محمدی[۱] از قدیمی ترین گیاهان خانواده رزاسه که استفاده از آن به گذشته دور باز می‌گردد. این گیاه ابتدا به صورت وحشی بوده و هنوز هم به صورت خودرو در قفقاز، سوریه، مراکش و اسپانیا رویش دارد (Saakov *etal*., 1973 ; Beales *et al*., 1998 ;Rusanov *et al*., 2005).درباره تاریخچه و منشاء پیدایش گل محمدی گزارش‌های مختلفی وجود دارد. عده ای معتقدند که کشورهای بلغارستان، ترکیه، ایران، هند، کانادا، آمریکا و ژاپن منشاء آن می‌باشند. در مجموع به نظر می‌رسد که گل محمدی نیز مانند برخی از گونه‌های خانواده رز، از خاورمیانه به اروپای شرقی معرفی شده است (Saakov *et al*., 1973 Beales *et al*., 1998 ;Rusanov *et al*., 2005).

بر اساس گزارش ها، استخراج گلاب در اواخر قرن هفتم میلادی در ایران آغاز شده است و سپس در قرن چهاردهم به قسمت‌های از امپراتوری عثمانی و آسیای صغیر گسترش یافته است. گزارش ابن خالدون هم حاکی از این است که در قرون هشتم و نهم میلادی، گلاب یکی از اقلام تجاری ایران بوده که به هند و چین صادر می‌شده است. از اوایل قرن دهم میلادی، صنایع مربوط به فرآوری گل محمدی در ایران و به خصوص در شیراز متمرکز گردید. این صنعت به تدریج از ایران به هند، عربستان و شمال آفریقا گسترش و به اسپانیا نیز منتقل شد(Saakov *et al*., 1973 ; Beales *et al*., 1998 ;Rusanov *et al*., 2005).

۲-۲- گیاه شناسی گل محمدی

گل محمدی با نام علمی *Rosa damascena* Mill. از شاخه گیاهان گلدار، زیر شاخه نهاندانگان، رده دولپه-ای‌ها، زیر رده Rosidea، راسته Rosales، خانواده Rosaceae، زیر خانواده Rosoideae، جنس Rosa و گونه damascena می‌باشد (کافی و ریاضی، ۱۳۸۰). این گیاه به شکل درختچه خزان کننده، دارای ساقه‌های

۱-Damask rose

به نظر می‌رسد که گل محمدی نوعی دو رگه حاصل از گونه‌های R. gallica و R. caninaمی‌باشد. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۰ میلادی در ژاپن صورت پذیرفته است، سه گونه R. moschata، R. gallica و R. fedschenkoanaبه عنوان والدین گل محمدی شناخته شده‌اند(Gault *et al*., 1975).

۲-۳- خصوصیات کروموزومی

رزهای وحشی اغلب دیپلوئد (2n=2x=14) می‌باشند، در حالی که رقم های زراعی رز به طور عمده تتراپلوئید (2n=4x=28) هستند. البته سطوح دیگر پلوئیدی مانند پنتاپلوئیدی و هگزاپلوئیدی هم در جنس رز دیده می‌شود. تعداد کروموزوم‌های پایه در رز از ۲ تا ۸ عدد متفاوت است و در گل محمدی، ۷ عدد (2n=4x=28) می‌باشد (Rout *et al*., 1999).

۲-۴- موارد استفاده و خواص دارویی گل محمدی

رزها از مهمترین گیاهان در عرصه تولید و پرورش گیاهان زینتی می‌باشند و به شکل‌های مختلفی (گل شاخه بریده، گیاه گلدانی و باغی) در بازار های داخلی و بین المللی عرضه می‌شوند. اهمیت رزها به قدری است که از حیث میزان تولید و ارزش اقتصادی، در بین تمام گل‌های شاخه بریدنی، جایگاه اول را به خود اختصاص داده‌اند. علاوه بر این، گلبرگ این گیاهان به عنوان منشاء طبیعی عطر و اسانس مورد توجه بوده است، به گونه‌ای که روغن فرار رز که اصطلاحاً رزاتو نامیده می‌شود، به عنوان یک محصول اقتصادی ارزشمند در صنایع عطر و اسانس مطرح است (Kovats, 1987). فقط تعدادی از گونه‌های رز به طور عمده در تولید و فرآوری روغن‌های فرار رز مطرح می‌باشند (Antonelli *et al*., 1997). این گونه‌ها شامل *Rosa moschata*Herrm.، *Rosa damascene* Mill، *Rosa centifolia*، *Rosa rugosa*، *Rosa gallica*می‌باشند که در نقاط

گلبرگ‌های گل محمدی از قرن ها قبل مصرف خوراکی داشته‌اند. بوعلی‌سینا، دانشمند ایرانی در قرن چهارم هجری، از این گیاه گلاب استخراج کرده و مورد استفاده دارویی قرار داده است (Wisniewska, 2001). در قرون وسطی و عهد رنسانس از عصاره بدست آمده از تقطیر محلول حاصل از پخت گل محمدی در درمان افسردگی استفاده می‌شده است (Smittinan, 2011; Bongo, 1992).

روغن فرار گل محمدی در عطر درمانی[۳] همچنین به عنوان مسکن ملایم، ضد افسردگی، ضد التهاب، کاهنده کلسترول خون، قابض ملایم، کاهنده التهاب و درد چشم به کار می‌رود (Wisniewska, 2001، کافی و ریاضی، ۱۳۸۰).

خواص دارویی و اثرات درمانی گل محمدی در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است و طی پژوهش-هایی بر وجود خواص ضدباکتریایی، میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در روغن فرار گل محمدی تاکید شده است (Bonga, 1992; Achuthan *et al*., 2003; Ozkan *et al*., 2004).

۲-۵- سطح زیر کشت و اهمیت اقتصادی

سطح زیر کشت گل محمدی در ایران بیش از ۱۰۰۰۰ هکتار می‌باشد که حدود ۷۹۰۰هکتاراز این سطح را گیاهان بارور و باقیمانده را باغ های جوان تشکیل می دهند. این گیاه در استان‌های آذربایجان، اصفهان، مرکزی، کرمان، فارس، چهارمحال و بختیاری، همدان، سمنان و گرگان سابقه کشت دارد. اما بیشتر سطح زیر کشت مربوط به استان های آذربایجان شرقی، اصفهان، فارس، کرمان می‌باشد. متوسط عملکرد گل (وزن تر)، در حدود ۲/۵ تن در هکتار و میزان تولید کشور حدود ۲۰ هزار تن برآورد می‌شود (جدول۲-۱)، که به صورت سنتی و صنعتی به فرآورده‌هایی چون گلاب، عطر و اسانس تبدیل و به بازارهای داخلی و خارجی عرضه می‌گردند (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۸).

۱-Rose essential oil
۱-Aromatherapy

علاوه بر مصرف داخلی، فرآورده‌هایی چون گلاب با قیمت بیش از یک دلار برای هر لیتر و اسانس (روغن فرار) با قیمتی در حدود۳۰۰۰-۸۰۰۰ دلار برای هر لیتر (بر حسب کیفیت اسانس) در بازارهای جهانی عرضه می‌شوند. همچنین، علاوه بر صادرات گلاب و اسانس، گل خشک نیز از اقلام صادراتی مهم گل محمدی محسوب می‌شود (بی نام الف، ۱۳۸۶؛ بی نام ب، ۱۳۸۶؛ بی نام ج، ۱۳۸۷).

در ایران تکثیر این گیاه به صورت سنتی (قلمه و پاجوش) انجام می‌گیرد و با وجود اهمیتی که گیاه گل محمدی در ایران و دنیا دارد، کارهای کمی در زمینه تکثیر آن از طریق کشت بافت انجام شده است. در نتیجه، برای حفظ و توسعه کشت ارقام برتر این گیاه (از لحاظ اسانس تولیدی و سایر خصوصیات مطلوب)، اهمیت انجام آزمایشاتی در مورد تکثیر آن از طریق کشت بافت بسیار مهم است.

جدول۲-۱- وضعیت تولید گل محمدی در ایران (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۸)

استان	سطح زیر کشت (هکتار)			میزان تولید گل تر (تن)
	نهال	بارور	جمع	
آذربایجان غربی	۲۶	۹۴۶	۹۷۲	۳۳۲۱
آذربایجان شرقی	۲۲	۱۴	۳۶	۵۱
اردبیل	۱۰	۱	۱۱	۵
اصفهان	۱۷۷	۱۱۵۷	۱۳۳۴	۲۸۳۶
تهران	۴	۴	۸	۲۵
چهارمحال وبختیاری	۳	۰	۳	۱۵
خراسان جنوبی	۲۴	۳۳	۵۷	۷۱
خراسان رضوی	۱۰۳	۲۵۸	۳۶۱	۵۹۵

سمنان	۲	۶	۸	۱۰
فارس	۱۲۵	۵۹۳۳	۶۰۵۸	۸۳۵۰
قزوین	۴	۲۲	۲۶	۱۲
قم	۰	۱۱	۱۱	۲۲
کردستان	۶	۱۷	۲۳	۲۴
کرمان	۲۶۵	۲۳۷۳	۲۶۳۸	۵۶۸۷
کرمانشاه	۱۷۰	۳۳۷	۵۰۷	۱۱۷۵
لرستان	۲۰	۱۲	۳۲	۱۱
مازندران	۲	۱۰	۱۲	۳۱
مرکزی	۲۰	۱۶۰	۱۸۰	۱۹۶
همدان	۰	۵۸	۵۸	۵۷
یزد	۹	۷۴	۸۳	۱۲۰
جنوب استان کرمان	۶۷	۲۴۳	۳۱۰	۲۴۴
جمع کل	۱۰۵۹	۱۱۶۶۹	۱۲۷۲۸	۲۲۸۵۸

۲-۶- تاریخچه کشت بافت رز

رز، گیاهی خودگشن است کهفقطبذوررزهایوحشی،گیاهانحقیقیتولیدمی‌کنند.این گیاه، معمولا از طریق رویشی، مانند قلمه زدن، خواباندن و پیوند زدن تکثیر می‌شود. اگرچه از بذور برای تولید ارقام جدید و تولید نهال بذری نیز استفاده می‌شود. این روش‌های سنتی برای تولید گیاه سالم و عاری از بیماری نامطمئن هستند. همچنین وابسته به فصل است که در نتیجه سرعت تکثیر و تولید کاهش می‌یابد.

مهمترین مشخصه‌های برتر استفاده از کشت بافت جهت تکثیر عبارتند از:

۱- تکثیر سریع ارقام برتر و گیاه مادری و همچنین افزایش ظرفیت تولید در مدت زمان کوتاه
۲- تولید گیاه عاری از بیماری

۲- تسریع برنامه‌های اصلاحی جهت تکثیر واریته‌های جدید
۴- توانایی تولید چند نسل در طول یک سال، (Dhawan and Bhowani, 1986).

مزیت دیگر کشت بافت این است که گیاهان در این روش نسبت به روش سنتی شاخه‌زایی زیادتری دارند (Mathews *et al*., 1994). در تحقیقی بیان شده که، با استفاده از این روش می‌توان از یک گیاه رز۴۰۰۰۰۰ گیاه تولید کرد (Martin, 1985).

تاریخچه کشت بافت رز به سال ۱۹۴۵ برمی‌گردد ، که در آن زمان نوبکورت و کوفلر[۴] موفق شدند که از جوانه، کالوس و ریشه بگیرند. در سال ۱۹۴۶، لامنتس[۵] برای اولین بار استفاده از کشت جنین را در اصلاح رز گزارش کرد. مطالعات بر روی کشت سلول، سوسپانسیون سلولی و کالوس‌ها برای پی بردن به تمایز و باززایی، توسط نیکل و تولک[۶] در سال ۱۹۵۹ و همچنین وینستن[۷] و همکاران در سال ۱۹۶۲ آغاز شد. اولین گزارش تولید نوساقه از کشت کالوس یک هیبرید چای-رز"The Doctor"، توسط هیل[۸](۱۹۷۶) ارائه گردید. اولین منابع در مورد ریز ازدیادی رز متعلق به جاکوب و همکاران(۱۹۶۹ و ۱۹۷۰a,b) و الیوت (۱۹۷۰)، به ترتیب بر روی رقم Superstar در*R. hybrida* و *R. multiflora*، می‌باشد، که جاکوب از کشت

۱-Nobecourt and Kofler
۲-Lamment
۳-Nickell and Tulecke
۴-Weinstein
۵-Hill

کشت جوانه انتهایی و جانبی رز توسط محققین زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است (Elliot, 1970; Graifenberg *et al*., 1975; skirvin *et al*., 1979a; skirvin *et al*., 1979b; Barve *et al*., 1984).

محیط کشت MS، رشد و پرآوری خوبی را در تکثیر رز نشان داده است، هر چند برخی از پژوهشگران از محیط‌های MSهمراه با ویتامین‌های اضافی نیز استفاده نموده‌اند (Edwin *et al*., 1984).

در پژوهشی برای ارزیابی ۷ رقم رز، کشت جوانه جانبی، میزان هورمون‌ها و شرایط محیط کشت مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت و محیط کشت MSغنی شده با هورمون‌های ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA[۹]و ۲ میلی‌گرم در لیترBAP[۱۰] به عنوان بهترین محیط کشت انتخاب شدند (Davies, 1980).

در تحقیق دیگری، طی مطالعاتی که بر روی ۱۱ رقم رز، نشان داده است که میزان زیاد سیتوکینین و جیبرلین سبب باززایی نوساقه بر روی کالوس تولید شده در محیط کشت می‌شود (Khosh-Khui *et al*., 1982b). طی آزمایشاتی که به بررسی گونه‌های رزهای قدیمی و جدید اختصاص داده شد، بیان گردیده که گل محمدی که جزء گونه‌های رز قدیمی می‌باشد، با استفاده از جوانه جانبی و انتهایی، پرآوری خوبی نشان داده است (Khosh-Khui *et al*., 1982a).

در تحقیق دیگری روی ریزازدیادی گل محمدی، نتایج خوبی با استفاده از ریز نمونه‌های تک جوانه‌ای بدست آمده است (قربانی و همکاران، ۱۳۷۹). در آزمایش دیگری به بررسی اثر تیدیازورون[۱۱] بر روی گل محمدی پرداخته شده که نتایج خوبی داشته است (Kumar *et al*., 2001). بردبار در سال ۱۳۸۵ نیز با استفاده از جوانه جانبی گل محمدی، نتایج خوبی را در مرحله پرآوری نوساقه بدست آورد.

بطور کلی عوامل مختلفی بر روی ریزازدیادی تاثیر می‌گذارند. مدروز[۱۲] و انریکز[۱۳] بیان داشتند که جوانه-هایی که از ساقه‌های نرم تهیه می‌شوند پاسخ بهتری می‌دهند. روت[۱۴] و همکاران (۱۹۸۹) و بریسان[۱۵]و

۱-α –Naphthalene acetic acid
۲-6 –Benzylaminopurine
۳-Thidiazuoron
۴-Mederos
۵-Enriquez
۶-Rout
۷-Bressan

مدروز و انریکز (۱۹۸۷) گزارش کردند که وجود قطعات دمبرگ باقیمانده در کنار جوانه‌ها بر روی ریزنمونه‌های گره‌ای، مانع از رشد نوساقه‌ها می‌گردد. صالحی[۱۶] و خوش خوی[۱۷] (۱۹۹۷) بیان داشتند که طول و قطر ریزنمونه نقش موثری در ریزازدیادی و رشد نوساقه‌های رز مینیاتوری (R. chinensis cv. Minima) دارد و بهترین طول ریزنمونه را ۹ تا ۱۰ میلی‌متر و قطر آن را ۳ تا ۳/۵ میلی‌متر گزارش کردند اما چنین همبستگی در مورد *Rosadamascene* و *Rosa bourboniana* مشاهده نشد(pati, 2002). آلخنو[۱۸] و ویسوتسکی[۱۹] (۱۹۸۶) گزارش کردند زمانی که ریزنمونه‌ها در وضعیت افقی بر روی محیط کشت قرار می‌گیرند رشد نوساقه‌ها و میزان نوساقه‌زایی از هر جوانه، نسبت به کشت عمودی ریزنمونه‌ها ۲ برابر می‌شود که علت آن جذب بیشتر مواد غذایی توسط ریزنمونه می‌باشد چون ریزنمونه‌ها در این حالت از دو طرف در تماس با محیط کشت هستند.

۲-۷- استریل کردن سطحی مواد گیاهی

در ابتدا باید اطلاعات کاملی در رابطه با موقعیت فیزیولوژیکی و حساسیت گونه‌های گیاهی به عوامل بیماریزای مختلف داشته باشیم. خوش خوی و سینک (۱۹۸۲)، اسکیروین و چو (۱۹۷۹) و هاسگاوا[۲۰] (۱۹۷۹) عمل کردن استریل جوانه‌های انتهایی را با استفاده از هیپوکلریت سدیم (۵/۲۵٪) همراه با Tween 20 یا TritonX (0.1%) برای ۵ تا ۱۰ دقیقه و سپس شستشوی آن‌ها با آب مقطر استریل، انجام دادند. بردبار(۱۳۸۵) جوانه‌های جانبی گل محمدی را با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه و سپس ۱۰ دقیقه

۱-Salehi
۲-Khosh-khui
۳-Alekhno
۴-Vysotskii
۵-Hasegawa

۲-۸- تکثیر نوساقه[۲۱]

موفقیت در ریزازدیادی تا حد زیادی به این مرحله وابسته است. عوامل متفاوتی به شرح زیر بر روی تکثیر نوساقه رز تاثیرگذار هستند:

۲-۸-۱- گونه/ ژنوتیپ/ واریته

هورن[۲۲] (۱۹۹۲)، تاثیر واضح ژنوتیپ را بر ریزازدیادی درون شیشه‌ای واریته‌های مختلف Floribundaو Tea rose Hybrid نشان داد. در رقمSuperstar، ۵/۱±۰/۱۸ و رقم Tropicana، ۴/۴±۰/۲۷ نوساقه در هر دوره زیرکشت ۴ هفته‌ای تشکیل شد. همچنین برسان[۲۳] و همکاران (۱۹۸۲) پاسخ‌های متفاوتی به BAPرا در دو رقم R.hybrida گزارش کردند. در غلظت‌های پایین، نمو گره‌های جانبی در رقم Gold Glow تحریک شده، اما در رقم Improved Blaz این طور نبود. مطالعات نشان داده که ژن‌ها مسئول افزایش تعداد جوانه‌های اولیه و تکثیر نوساقه هستند. علاوه بر این، درگیر بودن ژنی در تغییر در سطوح هورمون‌ها نیز گزارش شده است (Tantikanjana *et al.*, 2001).

۲-۸-۲- محیط کشت

محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (۱۹۶۲) یا MS[۲۴]، معمول‌ترین محیط کشت استفاده شده در تکثیر رز است. دیویس (۱۹۸۰) گزارش کرد که محیط کشت MSاستاندارد، بهترین نرخ تکثیر نوساقه در ارقام

۶-Shoot multiplication
۱-Horn
۲-Bressan
۳-Murashige and Skoog

پیتت و مانکوسین (۱۹۸۲) از محیط کشت LS[۲۵]به همراه هورمون‌های 0.1 mg/l IAA و 0.5 mg/l BAPبرای نوساقه‌زایی اولیه استفاده کردند. دیگر محیط‌های کشت مانند گامبورگ، لی و دفوساد[۲۶]توسط آلخنو[۲۷] و ویسوتسکی (۱۹۸۶) مورد استفاده قرار گرفت. در مورد گل محمدی نیز محیط‌های کشت MSو 1/2MS طی آزمایشات مختلف بررسی شده‌اند (Ishioka *et al.*, 1990، قربانی و همکاران ۱۳۷۹).

جدول ۲-۲- مثال‌هایی از تغییر در نمک‌های پایه محیط‌کشت‌های استفاده شده برای کشت گونه‌ها و ارقام مختلف رز (Pati et al.,2006)

Species or cultivars	Basic salt	Process	Reference
Rosa	Knop and Berthelot	Callus culture	Jacobes et al. 1968
R. manetti Hort. And R. hybrida L. 'Tropicana'	MS, SH	Callus culture	Khosh-Khui and Sink 1982b
R. hybrida	Quoiron and Lepoivere salts	Axillary branching	Valles and Boxus 1987a
R. hybrida cvs 'White Dream', 'Darling' and 'Goldy'	Druart salts	Callus culture	Valles and Boxus 1987b
R. hybrida 'Baronesse'	Quoiron and Lepoivere salts	Shoot multiplication	Carelli and Echeverrigaray 2002
'Trumpeter' and 'Glad Tidings'	SH	Embryogenesis	Marchant et al. 1996
Kardinal	MS, SH	Embryogenesis	Kamo et al. 2005

۴-Linsmair and Skoog
۵-Gamborg, Lee and De fossard
۶-Alekhno

۲-۸-۳- نمک‌های معدنی و ترکیبات آلی

برخی از محققین اظهار داشته‌اند که کاهش نمک‌های آمونیوم محیط کشت، سبب پرآوری بهتری می‌شود (Bressan *et al.*,1982; Curir *et al.*, 1986; Valles and Boxus, 1987, Avarm is *etal.*, 1982;) البته در تحقیق دیگری، زمانی که نسبت یون NO_3به یون NH_4از ۱/ ۰به ۳ افزایش یافته، تعداد نوساقه در هر ریزنمونه افزایش یافت (Hyndman *et al.*, 1982).

همچنین دیویس (۱۹۸۰) تاثیر غلظت‌های مختلف نمک‌های غذایی، بر تکثیر هفت رقم R. Hybridaرا گزارش کرد. او همچنین میزان $(NH4)_2SO_4$ را کاهش داد اما متوجه شد که، نمک‌ها تغییر نیافته محیط کشت MSبهترین نتیجه را می‌دهند.

زرد شدن برگ‌ها و نکروز شدن جوانه انتهایی را با ۲ برابر کردن غلظت کلسیم محیط کشت، می‌توان کنترل کرد(Podwyszynska and Olszewski, 1995). هر چند که افزایش غلظت Fe, Mg, Ca, Mn در محیط کشت به طور قابل توجهی باعث بهبود کیفیت نوساقه‌های کوچک می‌شود. همچنین مشاهده شد که در مقایسه با FeEDTA، ترکیبFeEDDHA[۲۸] عملکرد بهتری را درR. hybrida نشان می‌دهد (van der Salm *et al.*, 1994).

۲-۸-۴- کربوهیدرات

در تحقیقی، اثرات چند منبع کربوهیدرات شامل گلوکز، ساکارز، مانیتول، سوربیتول و گالاکتوز در مورد چند رقم رز مورد آزمایش قرار گرفت و نتیجه‌گیری شد که کشت‌های حاوی گلوکز و ساکارز، ساقه‌های بلندتری تولید کردن و نیز ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به عنوان بهترین منبع کربوهیدرات شناخته شد (Carelli *et al.*, 2002). در تحقیقات دیگری نیز میزان بهینه ساکارز ۳۰ گرم در لیتر گزارش شده است (Salehi *et al.*, 1996).

همچنین دیویس (۱۹۸۰)، بیان داشت که غلظت‌های ۴ تا ۵٪ ساکارز برای کشت‌های جوانه‌های انتهایی هفت واریته رز، بهتر است (Marcelis van Acker and Scholten, 1995;Carelli *etal* ., 2002).

1- Ethylenediamine di-o-hydroxyphenytacetic acid

۲-۸-۵- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت استقرار و پرآوری

وجود BAP(۱۰—۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت برای تحریک رشد جوانه و تکثیر نوساقه برای *R. hybrida* ضروری است (Hasegawa, 1980; Wulster and Sacalis, 1980).

برسان و همکاران (۱۹۸۲) اثر بیشتر BAPرا در مقایسه با 2-isopentyladenine (2-ip)جهت تکثیر *R. hybrida* گزارش کردند. نتایج آزمایش نشان داد که اضافه کردن IAA، نه تکثیر نوساقه را تحریک می‌کند و نه مانع آن می‌شود و این درست در نقطه مقابل اثر BAPقرار دارد.

کافی و همکاران (۱۳۸۳)، بهترین پرآوری نوساقه را در محیط کشت مایع MSبا تیمار هورمونی ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BAPو ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAAبرای رقم آذران و بدون NAAبرای رقم قمصر بدست آورند و بیشترین میانگین نوساقه در هر دو رقم ۲/۶۶ بود.

پتی و همکاران (۲۰۰۱)، غلظت بهینه BAPجهت تکثیر نوساقه*R. damascene*و *R. bourboniana*را ۱/۱ میلی-گرم در لیتر بیان داشتند.

کورس[۲۹] و همکاران (۱۹۹۲) بیان داشتند که تیمارهای دارای اتیلن، تکثیر نوساقه را در غلظت 5ppm، افزایش‌می‌دهند.

هورن[۳۰] (۱۹۹۲) نیز گزارش کرد که، افزایش سطح اتیلن به طور قابل ملاحظه‌ای پیری را افزایش می‌دهد و این در حالی است که رشد نوساقه را کاهش می‌دهد اما تعداد نوساقه و وزن تازه را افزایش می‌دهد.

نوساقه‌های اولیه *R. damascene* cv. Jwala در محیط کشت القاء (1/2 MS +۳٪ ساکارز+ 6.8µM TDZ[۳۱]+ 0.27µM NAA+ 17.7µM $AgNO_3$) کشت شدند و پس از ۲۱ روز به محیط کشت باززایی (Pati *et al*., 2003; MS + 2.25µM BA+ 0.054 µM NAA) منتقل شدند. برای تکثیر رزهای مینیاتوری، BAPبه میزان ۱/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه غلظت‌های کم اکسین‌ها، توسط صالحی و خوش‌خوی (۱۹۹۶) پیشنهاد شده است.

۱-Kevers
۲-Horn
۳-Thidiazuron

کشت گونه *R. damascene*روی محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZو یا در ادامه کشت بر روی محیط کشت دارای TDZبرای ۳۲ تا ۴۸ هفته، باعث تکثیر نوساقه به میزان زیاد شده است، و بعد از آن دوره رشد روی محیط کشت حاوی BAPادامه یافته است (Kumar *et al*., 2001).

در آزمایش دیگری، ترکیبی از ۲/۵ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر BAPو ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBAتیمار بسیار مناسبی برای تکثیر گل محمدی بوده است(Jabbarzadeh and Kosk-Khui, 2005).

۲-۸-۶- حالت محیط کشت و pHآن:

نرخ تکثیر بالایی در مورد *R. damascene*و *R. bourboniana*، زمانی که از فیتاژل در محیط کشت آن‌ها استفاده شد، مشاهده شده است (Pati *et al*., 2009). هر چند که پاسخ بهتر در محیط کشت مایع ساکن، شاید به دلایل زیر باشد:

(۱) تماس بهتر ریزنمونه‌ها و محیط کشت مایع که باعث می‌شود سیتوکینین‌ها و دیگر مواد غذایی قابل دسترس‌تر باشند(Debergh, 1983).

(۲) مواد مترشحه از ریزنمونه‌ها در محیط کشت مایع رقیق می‌شوند (Ziv and Halevy,1983).

(۳) هوادهی کافی به محیط کشت مایع، متعاقباً باعث افزایش رشد و تکثیر می‌شود (Ibrahim, 1994).

از pHبین ۵/۸-۵/۴ توسط محققین مختلف استفاده شده است (مثال‌ها در جدول ۲-۳).

جدول ۲-۳- مثال‌هایی از pH های مختلف برای کشت درون شیشه‌ای گونه‌ها و ارقام مختلف رز

(Pati *et al*., 2006)

Speicies or cultivars	pH	Reference
R. hybrida ‘King’s Ransom’, ‘ Plentiful’, ‘Parade’,	5.5	Davies 1980