بررسی اثر آهن، نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی محیط کشت بر باززایی دو گونه رز *Rosa canina* و *Rosa beggeriana* در شرایط این ویترو

مریم مرادیان[۱]، عبدالرضا باقری[۲*]، سید حسن مرعشی[۲]، سید حسین نعمتی[۳] و احمد شریفی[۱]

[۱] خراسان رضوی، جهاد دانشگاهی، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی

[۲] دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی

[۳] دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۲۲

چکیده

دو گونه *Rosa canina* و *Rosa beggeriana* به علت دارا بودن خصوصیات مطلوب از جمله رشد سریع و معطر بودن اهمیت قابل توجهی دارند. با توجه به مشکلات تکثیر رز از طریق روش‌های سنتی، استفاده از روش های ریزازدیادی توصیه شده است. از جمله مشکلات کشت این ویترو نیز می توان به پدیده زردشدگی برگ ها اشاره نمود. لذا در این پژوهش جهت افزایش سبزینگی برگ‌ها دو آزمایش طراحی شد. در آزمایش اول محیط کشت MS تغییر یافته (آهن به مقدار سه برابر (۸/۳۴ میلی گرم در لیتر) و ۳۰ میلی گرم در لیتر نیترات نقره) به همراه دو نوع هورمون BAP و TDZ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش اول نشان داد، بیشترین درصد سبزینگی برگ‌ها در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و آهن سه برابر بود (۴۲/۶ درصد). طراحی آزمایش دوم بر روی نوع آهن (Fe-EDDHA و FeSO4) موجود در محیط کشت MS به همراه ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام شد. نتایج نشان داد استفاده ترکیبی از (Fe-EDDHA و FeSO4) توانسته بیشترین درصد سبزینگی برگ‌ها (۶۷/۱۵ درصد)، طول شاخه (۳/۹۲ سانتی‌متر) و وزن خشک (۰/۰۳گرم) را تولید نماید. گیاهچه‌های باززایی شده به منظور ریشه‌زایی به محیط کشت‌های ۱/۲MSجامد و مایع حاوی ۴۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA، ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA انتقال یافتند. بیشترین تعداد ریشه تولید شده (۹/۱) و طول ریشه (۳/۴ سانتی‌متر) در محیط کشت جامد مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: *Rosa canina* ، *Rosa beggeriana* ، ریزازدیادی، ریشه‌زایی، تنظیم کننده های رشد گیاهی، Fe-EDDHA

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۳۰۰۶۰۵۵ ، پست الکترونیکی: abagheri@um.ac.ir

مقدمه

رز یکی از مهمترین گل‌های شاخه بریده تجاری است که به علت دارا بودن تنوع فراوان در زیستگاه و خصوصیات گیاهشناسی آن، محبوب ترین گل در جهان است (۱۱). بدلیل مقاومت بالای تعدادی از پایه‌ها به خشکی، سرما و تنش‌های زیستی، اکثر ارقام رز موجود در بازار، از جوانه‌های پیوند شده بر روی پایه تولید شده‌اند. گونه *Rosa canina* که نسترن وحشی نام دارد در ایران نیز پرورش داده می‌شود و تقریبا ۹۵ درصد از گل‌های رز بر روی این پایه پیوند می‌شوند (۲). این گونه بدلیل دارا بودن خصوصیات مطلوب از جمله پر رشد بودن، سازگاری با ارقام متعدد به منظور پیوند، سیستم ریشه‌ای قابل انعطاف و گسترش‌یافته، قابلیت رشد در طیف وسیعی از خاک‌ها، قدرت بالای رشد، سهولت پیوند جوانه‌ها و سهولت تکثیر یکی از بهترین پایه‌های گل سرخ در دنیا است (۱۰).

نسترن وحشی بیشتر بومی اروپا، آفریقای شمالی و آسیای جنوب غربی است و در شمال شرقی آمریکا به صورت اهلی شده یافت می‌شود (۱). در ایران نیز در مناطق مختلف گرگان، مازندران، گیلان، همدان، اصفهان، ایلام، خراسان و تهران به طور وسیع پرورش داده می‌شود (۱). همچنین این گیاه ارزش تجاری بالایی در زمینه‌های زینتی، دارویی و آرایشی دارد. گونه *Rosa beggeriana* که رز سفید نام دارد درختچه‌ای پر شاخه، به ارتفاع ۲ تا ۲/۵ متر است. از لحاظ پراکنش، بیشتر بومی ایران، افغانستان، پاکستان و ترکمنستان است و در ایران بیشتر در استان‌های خراسان، گرگان، فارس، اصفهان و سمنان پراکنده می‌باشد (۵).

رزها به فرم‌های مختلف بوته‌ای، درختچه‌ای، رونده و به صورت‌های خزان‌پذیر و یا غیرخزان وجود دارند و تا حد زیادی از لحاظ اندازه، شکل، رایحه و رنگ گل متفاوت هستند (۱۶). این گیاهان با هدف تولید درختچه‌های گلدار، رزهای باغی، گل‌های شاخه بریده، گیاهان گلدانی و تولید عطر اصلاح شده‌اند (۳۵). در جهان، سطح کلی زیر کشت رزهای شاخه بریده و گلدانی بیش از ۱۶ هزار هکتار و در فضای باز ۳ هزار هکتار تخمین زده شده است (۹). رزها عموما به وسیله روش‌های تکثیر رویشی مانند قلمه زدن، خوابانیدن و پیوند تکثیر می‌شوند. از بذور معمولا برای تکثیر گونه‌ها، ارقام جدید و تولید پایه‌ها استفاده می‌شود (۱۷). اگرچه روش‌های رویشی تکثیر، یک روش عمده در تکثیر رزها می‌باشد، اما سالم بودن و نداشتن بیماری گیاهان تولید شده با این روش، مورد تردید است. علاوه بر این، وابستگی روش‌های سنتی تکثیر به فصل و سرعت تکثیر آهسته از دیگر محدودیت‌های موجود در این روش-ها می‌باشند (۲۸). در طول دهه اخیر تکثیر تجاری رز از طریق کشت این ویترو اهمیت بسیار یافته است. کشت این ویترو یکی از ابزارهای کلیدی در بیوتکنولوژی گیاهی است که در سطح وسیع برای تکثیر کلون های گیاهی استفاده می‌شود و به حفظ تنوع کمک می‌کند. همچنین برای تکثیر واریته‌های جدید، تولید پایه برای پیوند در مقیاس وسیع، تکثیر سریع و در فاصله زمانی کوتاه و تولید گیاهان عاری از بیماری مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲، ۲۸، ۳۳). بنابراین کشت این ویترو یک روش جایگزین برای تکثیر گیاهان می‌باشد و هر ساله میلیون‌ها پایه از این گیاه با این روش تکثیر می‌شوند. ریزازدیادی گل رز توسط پژوهشگران زیادی با استفاده از کشت جوانه جانبی و مریستم انتهایی انجام شده است (۲۸، ۳۵، ۳۶، ۳۹). برای کشت بافت رز بیشتر از محیط‌های کشت MS (Murashige and Skoog) و VS (Van der salm) (۱۳، ۲۵، ۲۶) و در موارد معدودی از محیط‌های کشت SH (Schenk and Hilderbrandt) و WPM (Woody plant medium) (۵، ۲۰) استفاده شده است. در بررسی‌های مختلف کاربرد همزمان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی سیتوکینین و اکسین در القای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی موثر گزارش شده است (۳، ۲۵، ۲۶). اگر چه برخی از گزارش-ها حاکی از زردی برگ‌ها در رزهای تولید شده به این روش می‌باشد. طبق گزارش کریستنسن و همکاران (۲۰۰۸) در تکثیر *Hibiscus rosa-sinensis* L در شرایط این ویترو، نکروزه شدن نوک ساقه و ریزش برگ‌ها در محیط کشت VS با افزایش سطح کلسیم از ۳ میلی مولار (غلظت پایه MS) به ۹ میلی مولار و سه برابر نمودن غلظت آهن از ۹۸ میکرومولار به ۲۹۵ میکرومولار برطرف شد. علاوه بر این وزن خشک، اندازه طول شاخه‌ها محتوای کلروفیل و سطح برگ‌ها افزایش پیدا کرد (۱۳). در بررسی تکثیر *Rosa clinophylla* Thory با استفاده از ریزنمونه جوانه جانبی (۲۵) و نیز شاخه‌زایی پایه *R. indica* در شرایط این ویترو (۳۰) به منظور رفع مشکل نکروزه شدن نوک ساقه و ریزش برگ‌ها به ترتیب از مقادیر ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و ۳۰ میلی گرم در لیتر نیترات نقره استفاده شد. لذا در این تحقیق، اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع محیط کشت به منظور باززایی و افزایش

میزان سبزینگی برگ‌ها در دو گونه *R. canina* و *R. beggeriana* در شرایط این ویترو بررسی شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: پاجوش‌های ریشه‌دار رز در اردیبهشت ماه سال ۹۲ از پایه‌های مادری سالم دو گونه وحشی رز *R. canina* و *R. beggeriana* از منطقه بینالود (به **موقعیت جغرافیایی** 36°03′23″N 59°20′46″E)، از توابع شهرستان مشهد واقع در استان خراسان رضوی، جمع آوری و سپس در گلخانه جهاد دانشگاهی واحد مشهد به داخل گلدان منتقل شدند. بعد از رشد، شاخه‌های گره دار آن‌ها به عنوان ریزنمونه مورد بررسی قرار گرفت.

ضدعفونی و استقرار جوانه‌ها: پس از برش قطعات ساقه گره دار به طول ۲ الی ۵ سانتی‌متر از ساقه‌های جوانه دار گیاهان سالم و قوی گونه‌های مورد نظر و حذف برگ‌ها، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری همراه با چند قطره مایع ظرفشویی شستشو داده شدند. ریزنمونه‌ها با استفاده محلول رقیق شده وایتکس تجاری، حاوی ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم و چند قطره توئین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی گردیدند. در نهایت در زیر هود لامینار ۳ مرتبه با آب مقطر استریل به طور کامل شستشو داده شدند. برای بررسی اثر هورمون و نمک‌ها بر باززایی و میزان افزایش سبزینگی برگ‌ها دو آزمایش طراحی شد. در آزمایش اول پس از برش مجدد انتهای قطعات، ریزنمونه‌ها در محیط کشت پایه MS تغییر یافته (۸/۳۴ میلی گرم در لیتر آهن و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره) بهمراه ۱ میلی گرم در لیتر BA یا ۰/۵ میلی گرم در لیتر TDZ در ترکیب با ۰/۵میلی‌گرم در لیتر NAA قرار گرفتند. در آزمایش دوم نیز به منظور بررسی اثر نمک‌ها بر سبزینگی برگ‌ها، ریزنمونه‌ها در محیط کشت جامد MS، محیط کشت MS تغییریافته حاوی آهن سه برابر، محیط کشت MS تغییریافته حاوی آهن و کلسیم سه برابر و محیط کشت MS تغییریافته حاوی کلات آهن (Fe-EDDHA) به تنهایی یا در ترکیب با سولفات آهن) حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA کشت گردید. ۴۵ روز پس از کشت، درصد شاخه‌زایی، درصد سبزینگی برگ‌ها، تعداد گیاهچه تولید شده، طول شاخه و وزن خشک نمونه‌ها ارزیابی شد. تمامی محیط‌های کشت باززایی حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به عنوان منبع کربن و ۷ گرم در لیتر آگار بودند و pH محیط کشت قبل از افزودن آگار روی ۵/۸ تنظیم گردید. محیط کشت‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. نمونه‌ها در اتاق رشد تحت شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سانتی گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی نگه داری شدند و هر ۴ هفته یکبار واکشت شدند.

ریشه‌زایی گیاهچه‌ها: به منظور ریشه‌زایی، از دو نوع محیط کشت ۱/۲MS جامد و مایع تغییریافته حاوی کلات آهن Fe-EDDHA در ترکیب با ۸/۳۴ میلی گرم در لیتر آهن محیط کشت MS به همراه ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر BA، ۱ میلی گرم در لیتر IBA، ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده شد. دو ماه پس از کشت، درصد ریشه‌زایی بر اساس درصد گیاهچه‌های ریشه دار شده، تعداد ریشه تولید شده در هر گیاهچه و طول ریشه مورد بررسی قرار گرفت.

سازگاری گیاهان: در مرحله سازگاری، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به آرامی از آگار جدا شده و پس از شستشوی ریشه گیاه با آب ولرم، در لیوان‌های کوچک حاوی بستر کوکوپیت و پیت ماس به نسبت مساوی ۱:۱ کشت شدند. به منظور تامین رطوبت لازم جهت حفظ و نگهداری گیاهچه‌ها از لیوان‌های شفاف به عنوان درپوش استفاده شد. بعد از آن، پس از گذشت دو هفته، برای سازگاری تدریجی گیاهان با رطوبت و زهکشی مناسب، سوراخ‌هایی در انتها و لبه خارجی درپوش‌ها ایجاد شد.

بعد از گذشت سه هفته به منظور سازگاری بهتر گیاهچه‌ها با شرایط محیطی، درپوش‌ها به صورت نیمه بر روی لیوان‌ها قرار گرفتند. در هفته چهارم درپوش‌ها برداشته شدند و گیاهان به تدریج با شرایط محیطی سازگار شدند. گیاهچه‌های سازگار شده در اوایل بهار به گلخانه با شرایط نوری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و درجه حرارت (۲۵ الی ۲۸ درجه سانتی گراد) منتقل شدند.

آنالیز داده‌ها: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTATC صورت گرفت و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

اثر ترکیب هورمونی و محیط کشت بر بازایی دو گونه رز *R. canina* و *R. beggeriana*: در آزمایش اول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که دو گونه مورد بررسی از لحاظ تعداد گیاهچه تولید شده، طول شاخه، وزن خشک گیاهچه و درصد شاخه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی داری می‌باشند. ولی از لحاظ دوام سبزینگی برگ‌ها بین دو گونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

اثر نوع هورمون BA و TDZ بر میزان سبزینگی برگ‌ها و طول شاخه در سطح ۵ درصد معنی دار بود، در حالی که از لحاظ تعداد گیاهچه تولید شده، وزن خشک و درصد شاخه‌زایی بین این دو تنظیم کننده رشد گیاهی، تفاوت معنی داری دیده نشد.

اثر محیط کشت (آهن سه برابر و نیترات نقره) نیز بر درصد سبزینگی برگها، طول شاخه، وزن خشک و درصد شاخه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود. ولی از لحاظ تعداد گیاهچه تولید شده در دو محیط کشت تفاوت معنی داری مشاهده نشد. (جدول ۳). در بررسی اثر متقابل هورمون و محیط کشت بر میزان دوام برگ‌های سبز، بیشترین درصد سبزینگی برگ‌ها (۵۴/۳ درصد) در محیط کشت حاوی ۸/۳۴ میلی گرم در لیتر آهن و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA مشاهده شد (جدول ۴). ولی از لحاظ تعداد گیاهچه تولید شده، طول شاخه، وزن خشک و درصد شاخه‌زایی تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت بر خصوصیات رشدی دو گونه *R. canina* و *R. beggeriana* در شرایط این ویترو

محیط کشت	تعداد گیاهچه	طول شاخه (سانتی‌متر)	وزن خشک (گرم)	درصد شاخه‌زایی
30mg/l AgNo3	۰/۹ a	۳/۰ a	۰/۰۳ a	۹۴/۳ a
8.34 mg/l Fe-EDTA	۱/۱ a	۲/۴ b	۰/۰۲ b	۷۸/۸ b

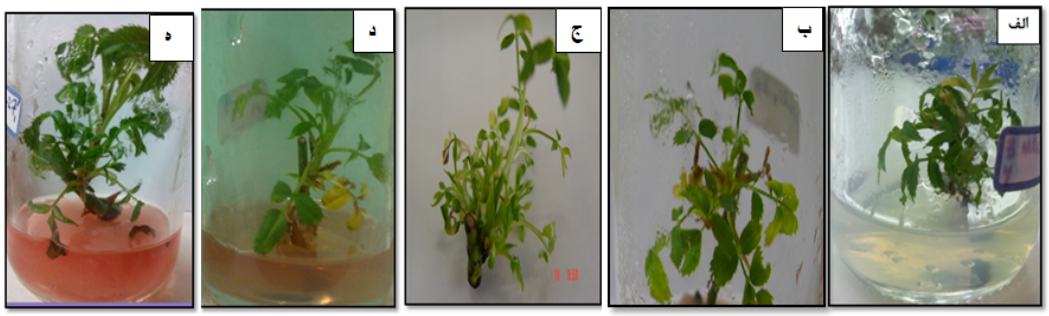
میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون و نوع محیط کشت بر خصوصیات رشدی دو گونه *R. canina* و *R. beggeriana* در شرایط این ویترو

محیط کشت	تنظیم کننده رشد گیاهی	تعداد گیاهچه	سبزینگی برگ‌ها (درصد)	طول شاخه (سانتی‌متر)	وزن خشک (گرم)	درصد شاخه‌زایی
30mg/l AgNo3	1mg/l BA	۰/۹ a	۲۹/۷ b	۲/۷ a	۰/۰۲ a	۹۴/۳ a
3× Fe-EDTA	1mg/l BA	۱/۳ a	۵۴/۳ a	۲/۲ a	۰/۰۱۵ a	۷۷/۳ a
30mg/l AgNo3	0.5mg/l TDZ	۰/۹ a	۲۰/۷ b	۳/۲ a	۰/۰۲۶ a	۹۴/۳ a
3× Fe-EDTA	0.5mg/l TDZ	۰/۸ a	۲۵/۳ b	۲/۷ a	۰/۰۱۷ a	۸۰/۳ a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

اثر محیط کشت بر سبزینگی برگ‌ها در دو گونه رز *R. canina* و *R. beggeriana*: تجزیه و تحلیل داده‌ها در آزمایش دوم نشان داد که بین نمک‌های مورد استفاده، از نظر سبزینگی برگ‌ها، طول شاخه و وزن خشک تفاوت معنی داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$) بطوری که در محیط-های کشت جامد MS، MS تغییر یافته حاوی آهن سه برابر، حاوی آهن و کلسیم سه برابر و واجد ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلات آهن Fe-EDDHA بدون سولفات آهن، دو هفته پس از کشت، زرد شدن ریزنمونه‌ها و ریزش برگ‌ها و در برخی موارد نکروزه شدن جوانه انتهایی مشاهده شد و نمونه‌ها به تدریج از بین رفتند (شکل ۱). اما با اضافه کردن Fe-EDDHA به محیط کشت پایه MS حتی یک ماه پس از کشت نیز ریزش برگ و زرد شدن مشاهده نشد. همچنین ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی این نوع کلات آهن، رشد رویشی بیشتری داشتند. در تحقیق حاضر، ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی کلات آهن Fe-EDDHA سبزتر بودند، بطوری که بیشترین درصد سبزینگی برگ‌ها (۶۷/۱ درصد)، طول شاخه (۳/۹ سانتی‌متر) و وزن خشک (۰/۰۳ گرم) در محیط کشت حاوی این نوع کلات به همراه سولفات آهن مشاهده شد. در حالی که از لحاظ تعداد گیاهچه تولید شده و درصد شاخه‌زایی بین نمک‌های مورد استفاده تفاوت معنی‌داری دیده نشد. اما زمانی که کلات آهن Fe-EDDHA به تنهایی و بدون سولفات آهن به کار رفت، کمترین میزان درصد سبزینگی برگ (۲۸/۱) را ایجاد کرد. در پژوهش حاضر، زمانی که در محیط کشت MS، غلظت آهن و کلسیم سه برابر شد، میزان سبزینگی برگ‌ها نسبت به زمانی که فقط غلظت آهن سه برابر شد کمتر بود. همچنین رشد شاخه‌ها کاهش پیدا کرد.



شکل ۱- اثر محیط کشت بر میزان تولید برگ سبز در گونه *R. canina* در شرایط این ویترو الف) محیط کشت پایه MS ب) محیط کشت MS تغییریافته حاوی آهن و کلسیم سه برابر ج) محیط کشت پایه MS حاوی آهن سه برابر د) محیط کشت MS تغییریافته حاوی Fe-EDDHA بدون سولفات آهن ه) محیط کشت MS تغییریافته حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر Fe-EDDHA.

اثر متقابل گونه و محیط کشت از لحاظ تعداد گیاهچه تولید شده و وزن خشک در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود. بطوری که مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین تعداد گیاهچه تولید شده (۱/۸) و بیشترین وزن خشک (۰/۰۴۷ گرم) در محیط کشت حاوی کلات آهن Fe-EDDHA واجد سولفات آهن در گونه *R. canina* مشاهده شد (جدول ۵).

اثر محیط کشت بر ریشه‌زایی دو گونه رز *R. canina* و *R. beggeriana*: به منظور ریشه‌زایی، گیاهچه‌هایی با طول ۲ تا ۴ سانتی‌متر به محیط کشت ۱/۲MS جامد و مایع (۱۵،۲۱) حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر Fe-EDDHA، و ۱ میلی گرم در لیتر IBA، ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر BA و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال یافتند (۳۱). اولین نشانه‌های ریشه‌زایی دو هفته پس از

کشت در محیط ۱/۲MS جامد در گونه *R. canina* مشاهده شد. دو گونه مورد بررسی از لحاظ تعداد ریشه تولید شده، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی تفاوت معنی داری داشتند (P<۰/۰۵). بیشترین تعداد ریشه تولید شده (۷/۲)، طول ریشه (۲/۸ سانتی‌متر) و درصد ریشه‌زایی (۹۴/۳ درصد) در گونه *R. canina* مشاهده شد (جدول ۶).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل گونه و نوع نمک بر خصوصیات رشدی دو گونه *R. canina* و *R. beggeriana* در شرایط این ویترو

گونه	محیط کشت	تعداد گیاهچه	سبزینگی برگ‌ها (درصد)	طول شاخه (سانتی‌متر)	وزن خشک (گرم)	درصد شاخه‌زایی
R. beggeriana	MS	۱/۱ab	۴۲/۷a	۱/۶۲a	۰/۰۰۸b	۸۸/۶۶a
	MS+3Fe-EDTA+3$CaCl_2$	۰/۷b	۳۲/۰۲a	۱/۴a	۰/۰۰۶b	۶۰/۶۶a
	MS+3Fe-EDTA	۰/۸b	۴۹/۴۴a	۱/۹a	۰/۰۱b	۷۷/۳۳a
	MS+100mg/l Fe-EDDHA+ No $FeSo_4$	۱/۱ab	۲۴/۳۴a	۲/۵۲a	۰/۰۱۲b	۱۰۰a
	MS+100mg/l Fe-EDDHA	۰/۹b	۶۰/۱۹a	۳/۲۵a	۰/۰۲ab	۸۸/۶۶a
R. canina	MS	۱/۴ab	۵۶/۶۳a	۲/۱۸a	۰/۰۲ab	۱۰۰a
	MS+3Fe-EDTA+3$CaCl_2$	۱/۴ab	۴۸/۹۷a	۲/۲۳a	۰/۰۲ab	۱۰۰a
	MS+3Fe-EDTA	۱/۸a	۵۹/۲۴a	۲/۵۶a	۰/۰۲ab	۷۷/۳۳a
	MS+100mg/l Fe-EDDHA+ No $FeSo_4$	۰/۸b	۳۱/۷۸a	۲/۹۳a	۰/۰۲ab	۷۷/۳۳a
	MS+100mg/l Fe-EDDHA	۱/۸a	۷۴/۱۲a	۴/۵a	۰/۰۴۷a	۱۰۰a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر گونه بر ریشه‌زایی دو گونه *R. canina* و *R. beggeriana* پس از ۴ هفته از کشت در شرایط این ویترو

گونه	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)	درصد ریشه‌زایی
R. beggeriana	۲/۷ b	۱/۱ b	۶۹/۰ b
R. canina	۷/۲ a	۲/۸ a	۹۴/۳ a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

تعداد ریشه‌های تولید شده در نمونه‌های کشت یافته در دو محیط کشت ۱/۲MS مایع و جامد تفاوت معنی‌داری داشت و بیشترین تعداد ریشه تولید شده (۵/۵) در محیط کشت جامد دیده شد (جدول ۷). اگرچه از لحاظ طول ریشه و درصد ریشه‌زایی تفاوتی بین دو محیط کشت مشاهده نشد. همانطور که ذکر شد اولین نشانه‌های ریشه‌زایی در محیط کشت جامد مشاهده شد. علاوه بر این، طول مدت ریشه‌زایی در محیط کشت جامد در

مقایسه با محیط کشت مایع کوتاهتر بود، بطوری که حدود ۴۵ درصد گیاهچه‌ها پس از گذشت دو هفته در محیط کشت جامد ریشه دادند (۱۵).

جدول ۷- مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر ریشه‌زایی دو گونه *R. canina* و *R. beggeriana* پس از ۴ هفته از کشت در شرایط این یترو

محیط کشت	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)	درصد ریشه‌زایی
Ms/2جامد	۵/۸ a	۲/۲ a	۸۴/۵ a
Ms/2مایع	۴/۱ b	۱/۷ a	۷۸/۸ a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

سازگاری گیاهچه‌ها: در مرحله سازگاری حدود ۹۴ درصد گیاهان درگونه *R. canina* و حدود ۶۹ درصد گیاهان در گونه *R. beggeriana* در بستر حاوی پیت ماس و کوکوپیت سازگار شدند و به گلخانه انتقال یافتند (شکل ۲).

شکل ۲- ریشه‌زایی و سازگاری در گونه *R. canina* الف) گیاهچه‌ی ریشه‌دار شده در محیط کشت MS۱/۲ جامد تغییریافته حاوی کلات آهن Fe-EDDHA ب) گیاهچه سازگار شده تحت شرایط گلخانه یک ماه پس از رشد در خاک.

بحث

در آزمایش اول که بررسی اثر ترکیب هورمونی و محیط کشت بر بازایی دو گونه رز *R. canina* و *R. beggeriana* انجام شد، گونه *R. canina* از لحاظ رشدی نسبت به گونه *R. beggeriana* بهتر بود و بیشترین تعداد گیاهچه تولید شده (۱/۸)، طول شاخه (۳/۳ سانتی متر)، وزن خشک (۰/۰۲۸ گرم) و درصد شاخه‌زایی (۹۴/۳ درصد) در این گونه مشاهده شد (جدول ۱). اختلاف معنی دار بین ارقام مختلف گونه رز محمدی (*Rosa damascene* Mill.) از لحاظ میزان تکثیر و رنگ برگ توسط نیکبخت و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است (۲۷). همچنین در پژوهشی که پاولوسکا (۲۰۱۱) برای پرآوری پنج گونه وحشی رز لهستانی شامل *R. canina*، *R. agrestis*، *R. rubiginosa*، *R. tomentosa* و *R. dumalis* در شرایط این ویترو انجام داد مشخص شد که گونه‌های مورد نظر، از نظر قدرت باززایی و میزان تکثیر تفاوت معنی‌داری داشتند بطوری که گونه *R. tomentosa* دارای قدرت باززایی و رشد کمتری نسبت به سایر گونه‌ها بود (۲۹). در بررسی اثر نوع هورمون، ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی هورمون BA دارای بیشترین درصد سبزینگی برگ‌ها (۴۲/۱ درصد) بودند (جدول ۲). اگر چه هورمون TDZ باعث افزایش طول شاخه (۳ سانتی‌متر) شد و ریزنمونه‌ها

رشد بیشتری داشتند ولی بعد از گذشت ۴ هفته از کشت، ریزنمونه‌ها زرد شده و رشدی نداشتند.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر گونه بر خصوصیات رشدی دو گونه *R. canina* و *R. beggeriana* در شرایط این ویترو

گونه	تعداد گیاهچه	سبزینگی برگ‌ها (درصد)	طول شاخه (سانتی‌متر)	وزن خشک (گرم)	درصد شاخه‌زایی
R. beggeriana	۰/۸ b	۳۱/۲ a	۲/۲ b	۰/۰۱۵ b	۷۸/۸ b
R. canina	۱/۸ a	۳۷/۷ a	۳/۳ a	۰/۰۲۸ a	۹۴/۳ a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

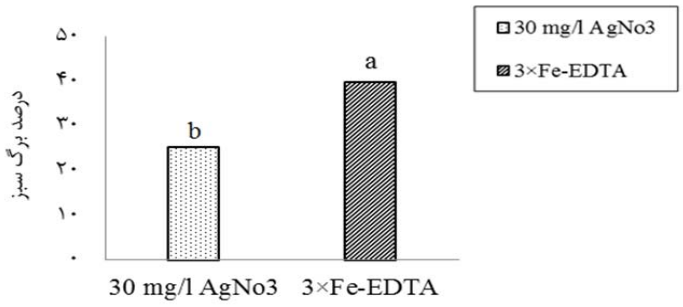
جدول ۲- مقایسه میانگین اثر نوع تنظیم کننده رشد گیاهی بر خصوصیات رشدی دو گونه *R. canina* و *R. beggeriana* در شرایط این ویترو

تنظیم کننده رشد گیاهی	تعداد گیاهچه	سبزینگی برگ‌ها (درصد)	طول شاخه (سانتی‌متر)	وزن خشک (گرم)	درصد شاخه‌زایی
۱ میلی‌گرم در لیتر BA	۱/۱ a	۴۲/۱ a	۲/۵ b	۰/۰۲ a	۸۵/۸ a
۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ	۰/۹ a	۲۶/۸ b	۳/۰ a	۰/۰۲۳ a	۸۷/۳ a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

طی بررسی های انجام شده در زمینه اثر هورمون ها در کشت بافت گیاهان، هورمون TDZ به عنوان قویترین سیتوکینین برای کشت بافت گونه‌های چوبی گزارش شده است. اما ترکیب آن با دیگر تنظیم کننده‌های رشد موثرتر از استفاده از آن به تنهایی است (۱۸). هورمون BA نیز یکی از موثرترین تنظیم کننده‌های رشد در تکثیر شاخه‌ها و فعال شدن جوانه جانبی به شمار می‌آید (۲۲، ۳۸). نتایج مشابهی توسط بیاناتی و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی ریزازدیادی *Rosa hybrida* رقم Black Baccara گزارش شد که بر اساس آن، بین سطوح مختلف هورمون BA (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر) بر باززایی، محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BA باعث تولید حداکثر تعداد گیاهچه (۳/۵۶) شد (۶). در آزمایش انجام شده توسط کاویانی و همکاران (۱۳۹۶) بر روی ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گونه‌ای از ارکیده در حال انقراض (*Orchis catasetum*) ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت MS حاوی هورمون BA بیشترین باززایی را نشان دادند (۴). هورمون BA نیز موثرترین هورمون در تکثیر و پرآوری سه رقم گل سرخ شاخه بریده (*R. hybrida* L.) در شرایط این ویترو گزارش شده است بطوری که حتی غلظت‌های ناچیز آن برای القای رشد در جوانه‌ها ضروری بود (۶).

محیط کشت حاوی آهن سه برابر نسبت به نیترات نقره بیشترین درصد سبزینگی برگ‌ها (۴۲/۶ درصد) را داشت (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر محیط کشت بر میزان سبزینگی برگ‌ها در دو گونه *R. beggeriana* و *R.canina* در شرایط این ویترو.

هر چند محیط کشت حاوی نیترات نقره دارای میانگین طول شاخه (۳ سانتی‌متر)، وزن خشک (۰/۰۲۷ گرم) و درصد شاخه‌زایی (۹۴/۳) بیشتری نسبت به آهن سه برابر بود اما تاثیر چندانی در برطرف شدن زردی برگ‌ها نداشت بطوری که بعد از واکشت اول، ریزنمونه‌ها شروع به زرد شدن کردند و با وجود اینکه رشد زیادی داشتند به تدریج از بین رفتند. ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی آهن سه برابر اگرچه از رشد کمی برخوردار بودند ولی سبزتر بودند و هر ریزنمونه بیش از یک گیاهچه تولید کرد. با این وجود در آزمایشات مختلف تیمار نیترات نقره در برطرف شدن زردی برگ‌ها موثر گزارش شده است. برای مثال میسرا و همکاران (۲۵) برای تکثیر *Rosa clinophylla* Thory با استفاده از ریزنمونه جوانه جانبی و نیز پراتیش و کومار (۳۰) در شاخه‌زایی پایه *R. Indica* در شرایط این ویترو، به ترتیب از مقادیر ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و ۳۰ میلی گرم در لیتر نیترات نقره به منظور رفع مشکل نکروزه شدن نوک ساقه و ریزش برگ‌ها استفاده کردند. در حالی که در پژوهش حاضر، وجود حتی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره در محیط کشت تاثیری در سبزینگی برگ‌ها نداشت. همچنین اثر متقابل گونه و محیط کشت از لحاظ تعداد گیاهچه تولید شده در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود بطوری که بیشترین تعداد گیاهچه (۱/۴) در گونه *R. canina* و محیط کشت حاوی آهن سه برابر مشاهده شد.

کریستنسن و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر آهن و هورمون BA بر تکثیر *Hibiscus rosa-sinensis* L در شرایط این ویترو نشان دادند که در محیط کشت حاوی ۲/۲ میکرومولار BA، سه برابر کردن غلظت آهن از ۹۸ میکرومولار محیط کشت پایه MS به ۲۹۵ میکرومولار، موجب افزایش محتوای کلروفیل و سطح برگ می‌شود (۱۳).

ازنظر اثر محیط کشت بر سبزینگی برگ‌ها در دو گونه رز *R. canina* و *R. beggeriana*، بررسی صورت گرفته بر روی ریزازدیادی گونه *Rosa hybrida* L نیز همانند پژوهش کنونی، حاکی از تاثیر این کلات در جذب بهتر آهن از محیط کشت، عدم نکروزه شدن برگ‌ها و رشد بهتر ریزنمونه‌ها در محیط کشت پایه MS بوده است (۳۷).واندر سالم و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند افزایش غلظت عناصر کم مصرف از جمله آهن و کلسیم در محیط کشت به طور قابل توجهی منجر به رشد شاخه‌های جدید در ریزنمونه‌های *R. hybrida* شده است و کلات Fe-EDDHA به عنوان منبع آهن در مقایسه با Fe-EDTA در رشد ریزنمونه‌ها موثرتر بوده است (۳۷). همچنین در بررسی اثر نوع کلات آهن بر پرآوری درون شیشه‌ای سه رقم گل سرخ شاخه بریده (*R. hybrida* L.) شاخساره‌های تولید شده در محیط کشت حاوی Fe-EDDHA رشد رویشی بیشتری را نشان دادند و سبزتر بودند (۴) که با نتایج آزمایش فوق مطابقت داشت. در تکثیر *R. persica* (این ویترو) توسط جعفرخانی کرمانی و همکاران (۲۰۱۰)، نشان داده شد که برخی از رزها به یون کلسیم بیشتری از آنچه در محیط کشت پایه وجود دارد، نیاز دارند. نتایج این محققان نشان داد که کمبود کلسیم نیز منجر به نکروزه شدن نوک ساقه و شیشه‌ای شدن ساقه و بافت برگ می‌شود، آن‌ها تلاش نمودند تا این اثرات را با افزایش کلسیم کلرید در محیط کشت کنترل نمایند. اگرچه به دلیل عوارض جانبی و سمی این نمک برای گیاه، از کلسیم گلوکونات بجای کلسیم کلرید استفاده کردند (۱۹). در پژوهش حاضر، زمانی که در محیط کشت MS، غلظت آهن و کلسیم سه برابر شد، میزان سبزینگی برگ‌ها نسبت به زمانی که فقط غلظت آهن سه برابر شد کمتر بود. همچنین رشد شاخه‌ها کاهش پیدا کرد. این نتیجه مطابق با نتایج آزمایش برقچی و آلدرسون (۱۹۹۶) بود که کاهش تکثیر شاخه ها در کشت این ویتروی *Pistacia vera* L. را

با افزایش غلظت کلسیم در محیط کشت گزارش کردند (۷).

طبق گزارش ابراهیم و همکاران (۲۰۰۰) در ریزازدیادی *Maranta leuconeura* رقم Kerchoviana در شرایط این ویترو نیز محیط کشت جامد MS به عنوان بهترین محیط جهت رشد سریعتر و بیشتر در هر دو مرحله شاخه‌زایی و ریشه‌زایی تعیین شد. علاوه بر این روت و همکاران (۱۹۹۰) گزارش کردند ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در گونه *R. hybrid* در محیط کشت جامد نسبت به مایع بهتر بوده است و ساکارز نیز به عنوان یک تنظیم کننده پتانسیل اسمزی، نقش حیاتی در القای ریشه‌زایی دارد (۳۲). بر اساس نتایج رحمان و همکاران (۱۹۹۲) در بررسی اثر ترکیبات محیط کشت بر روی ریشه‌زایی رز رقم Tajmahal در شرایط این ویترو، محیط کشت حاوی ۴۰ گرم در لیتر ساکارز بیشترین درصد ریشه‌زایی، طول ریشه و حداکثر طول شاخه را به همراه داشته است. نتایج این پژوهشگران نیز نشان داد تشکیل ریشه‌های نابجا به انرژی زیادی نیاز دارد و حضور سطح معینی از ساکارز برای تولید ریشه‌های نابجا و ریشه‌زایی بهتر ضروری بوده است (۳۱). تاثیر مثبت افزایش سطح ساکارز و حضور غلظت‌های پایین نمک روی ریشه‌زایی گیاه گردو در شرایط این ویترو نیز توسط دریور و کونیوکی (۱۹۸۴) نیز گزارش شده است (۱۴). طبق گزارش خوشخوی و سینک (۱۹۸۲) محیط کشت MS با نصف غلظت نمک‌ها منجر به القاء ریشه‌زایی در *R. hybrida* رقم Bridal Veil شده است (۲۱).

سازگاری موفقیت آمیز گیاهان تکثیر شده و انتقال آن‌ها به گلخانه یک گام حیاتی برای تولید تجاری در شرایط این ویترو است. با وجود این سازگاری رز سخت گزارش شده است زیرا اکثر آن‌ها به دلیل خشک شدن سریع گیاهچه و یا حساسیت آن‌ها به بیماری‌های ناشی از رطوبت بالا از بین می‌روند (۲۳). بیاناتی و همکاران نشان دادند سازگاری ریزنمونه‌های *Rosa hybrida* cv. Black Baccara در مخلوط حاوی پیت ماس و خاک (۱:۱) موفقیت آمیز بوده است (۸).

نتیجه گیری کلی

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که در هر دو گونه رز مورد بررسی (*R. canina* و *R. beggeriana*)، محیط کشت MS تغییریافته حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلات آهن Fe-EDDHA و ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA بهمراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین درصد برگ سبز را تولید می‌نماید. بیشترین طول شاخه در محیط کشت MS تغییریافته حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره و ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بهمراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. بیشترین درصد ریشه‌زایی در گونه *R. canina* در محیط کشت ۱/۲MS جامد تغییریافته حاوی کلات آهن Fe-EDDHA به همراه هورمون BA به مقدار ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر و ترکیب هورمونی شامل ۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۴۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل، نوع تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع نمک محیط کشت بر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی هر دو گونه رز *R. canina* و *R. beggeriana* موثر بوده است. از نتایج این تحقیق می‌توان به منظور تولید پایه برای پیوند در مقیاس وسیع، تکثیر سریع و ارزان و تولید گیاهان عاری از بیماری استفاده نمود.

سپاسگزاری

از همکاری گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد در فراهم آوردن فضای آزمایشگاهی مناسب و امکانات لازم جهت انجام این آزمایش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱-بیگم فقیر، م. (ترجمه). ۱۳۸۰. تیره‌های متداول گیاهان گلدار. میکائیل هیکی و کلیوکینگ، انتشارات دانشگاه گیلان.

۲-خلیقی، ا. ۱۳۶۸. پرورش گیاهان زینتی ایران. انتشارات روز بهان، تهران.

۳-عصاره، م. قربانعلی، م. الوردی ممقانی، ب. قمری زارع، ع. و شهرزاد، ش. ۱۳۸۵. اثر محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر تکثیر درون شیشه‌ای گل محمدی (*Rosa damascenae* Mill) مجله پژوهش و سازندگی، (۷۲): ۴۵ – ۵۱.

۴-کاویانی، ب. نگهدار، ن. باکر، ا. و مسافر، ن. ۱۳۹۶. ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گونه‌ای از ارکید در حال انقراض (*Orchis catasetum*) توسط پروتوکورم: اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نانوکلات آهن مجله زیست شناسی ایران، (۱): ۲۱۵–۲۲۵.

۵-مظفریان، و. ا. ۱۳۸۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. چاپ چهارم انتشارات فرهنگ معاصر، تهران.

۶-یاری، ف. موسوی، ا. مستوفی، ی. سیدی، س. م. زمانی، ز. و لایمر، م. ۱۳۹۲. اثر تنظیم کننده های رشد گیاهی و نوع کلات آهن بر پرآوری و ریشه زایی درون شیشه ای سه رقم گل سرخ شاخه بریده (*Rosa hybrida* L.) مجله زیست شناسی ایران، (۱): ۹۹–۱۱۰.

7-Barghchi, M. and Alderson, P.G. 1996. The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L. *in vitro*. Plant Growth Regulation, 20: 31–35.

8-Bayanati, M. and Mortazavi, S.N. 2013. Micropropagation from cultured nodal explants of *Rosa hybrida* cv. Black Baccara. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4: 1381-1385.

9-Brichet, H. 2003. Distribution and Ecology. In: Roberts, A.V. Debener, T., and Gudin S. (eds), Encyclopedia of Rose Science. London, Elsevier Academic Press: 199–227.

10-Buck, G.J. 1978. rose rootstocks. HortScience, 13: 601-602.

11-Cairns. T. 2001. The Geography and History of the Rose. American Rose Annual, 18-29.

12-Canli, F.A. and Kazaz S., 2009. Biotechnology of roses: Progress and future prospects, 167-183.

13-Christensen, B. Sriskandarajah, S. Serek, M. and Muller, R. 2008. *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. Plant Cell Tissue Organ Culture, 93: 151-161.

14-Driver, J.A. and Kuniyuki, A. H. 1984. *In vitro* propagation of Paradox Walnut root stock. Horticulture Science, 19: 507-509.

15-Ebrahim, M.K.H. and Ibrahim, A.I. 2000. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv Kerchoviana. Scientia Horticulturae, 86: 211-21.

16-Horn, W.A.H. 1992. Micropropagation of rose. In: Bajaj, Y.P.S (ed.), Agriculture and Forestry, Vol. 4. Berlin, Springer-Verlag . 320–324.

17- Horn. W.A.H. 1992. Micropropagation of rose (*Rosa* L). Biotechnology in agriculture and forestry, vol 20, High-tech and micropropagation IV. Springer, Germany. 320-342.

18-Huetteman, C.A. and Preece, J. E. 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 33: 105-119.

19-Jafarkhani Kermani. M. Khosravi. P. and Kavand. S. 2010. Optimizing *in vitro* propagation of *Rosa persica.* Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1: 44-51.

20-Kim, S.W. Jin Oh, M., and Liu, J. R. 2009. Plant regeneration from the root-derived embryonic tissues of *Rosa hybrida* L. cv. Charming via a combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Biotechnol, 3: 341-345.

21-Khosh-khui, M. and Sink, K.C. 1982. Rooting enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. Scientia Horticulturae, 17: 371-376.

22-Khosravi. P. Jafarkhani Kermani, M. Nematzadeh, G. A. and Bihamta, M. R. 2007. A protocol for mass production of *Rosa hybrida* cv. Iceberg through *in vitro* propagation. Iranian Journal of Biotechnology, 5: 100-104.

23-Messeguer. J. Mele. E. 1986. Acclimation of *in vitro* micropropagated roses. In: Somers, D.A., Gegenbrach, B.G., Biesboer, D.D., Hackett, W.P., and Grenn, C.E. Eds. Abstracts of the VI international congress of plant tissue and cell culture, Univ Minnesota. 236.

24-Misra, P. and Chakrabarty, D. 2009. Clonal propagation of *Rosa clinophylla* Thory. through axillary bud culture. Scientia Horticulturae, 119: 212-216.

25-Moallem, S. Behbahani, M. Mousavi, E. and Karimi. N. 2012. Direct regeneration of *Rosa Canina* through tissue culture. Trakia Journal of Sciences, 10: 23-25.

26-Nakudom, N. Kanchanapoom. K. and Kanchanapoom, K. 2009. Micropropagation from cultured nodal explants of rose (*Rosa hybrid* L. cv. 'Perfume Delight'). Songklanakarin Journal Sciences Technology, 31: 583-586.

27-Nikbakht, A. Kafi, M. Mirmasoudi, M. and Babalar, M. 2005. Micropropagation of Damask Rose (*Rosa damascene* Mill.) cvs Azaran and Ghamsar. International Journal of Agriculture and Biology, 7: 535- 538.

28-Pati, P.K. RathS, P. Sharma, M. Sood, A. and Ahuja, P.S. 2006. *In vitro* propagation of rose: a review. Biotechnology Advances, 24: 94-114.

29-Pawłowska, B. 2011**.** The effect of BA and GA_3 on the shoot multiplication of *in vitro* cultures of Polish wild roses. Folia Horticulturae**,** 23: 145-149**.**

30-Pratheesh, P.T. and Kumar, M.A. 2012. *In vitro* flowering in *Rosa indica* L. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 2: 196-200.

31-Rahman, S. M. Hossain, M. Rafiul Islam, A. K.M. and Joarder, O. I. 1992. Effects of media composition and culture conditions on *in vitro* rooting of rose. Scientia Horticulturae, 52: 163-169.

32-Rout, G.R. Debata, B.K. and Das, P. 1990. *In vitro* clonal multiplication of roses. Proceedings of the National Academy of Sciences India, 60: 311-318.

33-Rout, G.R. Mohapatra, A. and Mohan Jain, S. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advance, 24: 531-560.

34-Rout, G.R. Samantaray, S. Mottley, J. and Das, P. 1999. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. Scientia Horticulturae, 81: 201–228.

35-Short, K.C. and Roberts, A.V. 1991. *Rosa* spp. (roses): *In vitro* culture, micropropagation, and the production of secondary products .in medicinal and aromatic plants III. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 377-397.

36-Skirvin, R.M. Chu, M.C. and Young, H.J. 1990. Rose. In: Ammirato, P.V. Evans, D.R. Sharp, W.R. and Bajaj, Y.P.S.(eds), Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5. New York, McGraw Hill. 716–743.

37-Van der Salm, T.P.M. Van der Toorn, C.J.G. Hanisch ten Cate, C.H, Dubois, L.A.M, De Vries, D.P, and Dons, H.J.M. 1994. Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. Moneyway. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 37: 73 – 7.

38-Vijaya, N. Satyanarayana, G., Prakash, J., and Pierik, R. L. M. 1991. Effect of culture media and growth regulators on *in vitro* propagation of rose. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 12: 209-214.

39-Yan, M. Byrne, D.H. and Jing, C. 1996. Propagation of rose species *in vitro*. *In vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant, 32: 103–108.

Effect of media composition and plant growth regulators on *in vitro* regeneration of *Rosa canina* and *Rosa beggeriana*

Moradian M.[1], Bagheri A.R.[2], Marashi S.H.[2], Nemati S.H.[3] and Sharifi A.[1]

[1] Dept. of Ornamental Plant Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Research: ACECR, Razavi Khorasan Province, Mashhad, I.R. of Iran

[2] Dept. of Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, I.R. of I.R. of Iran

[3] Dept. of Horticultural Sciences and landscape, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

Two species of Rosa, *Rosa canina* and *Rosa beggeriana*, are widely propagated due to their rapid growth and good fragrance. Considering propagation problems of rose flower through traditional ways, in vitro micropropagation methods are recommended. One of the problems of in vitro cultures of Rosa species is yellowing of leaves. Therefore, in the present study, two experiments were designed in order to increase greenery of leaves in in vitro cultures of *R. canina* and *R. beggeriana*. In the first experiment, the effects of modified MS basal medium (containing 8.34 mg/L $FeSO_4$ and 30 mg/L $AgNO_3$) and two types of plant growth regulators, BAP and TDZ, were studied. According to the results, the highest greenery percentage of leaves was observed in the medium containing 1 mg/L of BA and 8.34 mg/L $FeSO_4$ (42.6%). The second experiment was designed to study the effects of two types of iron ($FeSO_4$ and Fe-EDDHA) in MS medium containing, 1 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA. Results showed that combinational use of $FeSO_4$ and Fe-EDDHA resulted in the highest greenery of leaves (67.15%), branch length (3.92cm) and dry weight (0.03g). Rooting of regenerated plantlets in solid $^1/_2$MS medium containing 0.25 mg/L BA, 1 mg/L IBA, 0.1 mg/L NAA and 40 g/L sucrose, showed the highest number of roots per plantlet (9.1) and root length (4.03 cm).

Key words: Fe-EDDHA, plant growth regulator, Micropropagation, Rooting, *Rosa canina*, *Rosa beggeriana*.