به نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۳ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه‌های ۱۹۱-۲۰۰

ریزازدیادی ختمی چینی در شرایط درون‌شیشه‌ای

فاطمه فیضی[۱]، موسی موسوی[۲]*، مهرانگیز چهرازی[۲]

۱. کارشناس ارشد باغبانی (گل و گیاهان زینتی) گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۰۶/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۹/۰۷

چکیده

به منظور بررسی ریزازدیادی ختمی چینی در شرایط درون‌شیشه‌ای، سه آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار، در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. در آزمایش اول محیط پایه مناسب مشخص شد. آزمایش دوم بهترین غلظت هورمون BAP جهت القای شاخه و آزمایش سوم بهترین نوع و غلظت هورمون ریشه‌زایی مشخص شد. مقایسه میانگین آزمایش اول نشان داد که بیشترین میانگین طول شاخساره، تعداد برگ، وزن تر و وزن خشک شاخساره در محیط VS نسبت به سایر محیط‌ها مشاهده شد. مقایسه میانگین آزمایش دوم نشان داد که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP بیشترین میانگین طول شاخساره، تعداد برگ، وزن تر و وزن خشک شاخساره نسبت به سایر غلظت‌ها را داشت. مقایسه میانگین آزمایش سوم نشان داد که غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA بیشترین میانگین درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه نسبت به سایر غلظت‌ها را داشت.

کلیدواژه‌ها: بنزیل آمینوپورین، پزآوری، ختمی چینی، ریشه‌زایی، محیط VS

* نویسنده مسئول Email: mousa_mousawi@yahoo.com

مقدمه

ختمی چینی (با نام علمی *Hibiscus rosa sinensis*) از شاخه گیاهان گلدار، زیرشاخه نهاندانگان، رده دولپه‌ای‌ها، راسته پنیرک‌سانان، تیره پنیرکیان و سرده ختمی است که اولین بار به نام کارل فن لینه نام‌گذاری شده است [۹]. تکثیر ختمی چینی از طریق رویشی یک تکنیک عمده به شمار می‌رود، اما سالم بودن و عاری بودن گیاهان از بیماری قابل اطمینان نیست. تکنیک کشت بافت یک روش مناسب برای تکثیر سریع گیاهان عاری از ویروس است [۲۳].

روش کشت بافت دارای مزایای زیادی است، زیرا امکان رشد سریع و تولید باکیفیت بالای گیاهان را می‌دهد و ابزار مناسبی برای رسیدن به اهدافی است که در شرایط کشت در محیط طبیعی دستیابی به آنها دشوار می‌باشد. امروزه ریزازدیادی یکی از مهم‌ترین بخش‌های زیست فناوری گیاهی است که جنبه کاربردی و تجاری پیدا کرده است [۱۴].

یکی از مهمترین مراحل ریزازدیادی مرحله پرآوری شاخه است، زیرا تهیه شاخساره‌های مناسب برای ریشه‌زایی از ریزنمونه‌ها برای تکثیر انبوه از این مرحله آغاز می‌شود. سرعت پرآوری متأثر از تنظیم‌کننده‌های گیاهی به‌خصوص سایتوکینین‌ها می‌باشد. حضور سایتوکینین به پرآوری نمونه‌ها در محیط کشت کمک می‌کند [۱۱]. تنظیم کننده‌های رشد و ترکیبات محیط کشت، عوامل کلیدی برای تکثیر در شیشه و باززایی هستند [۸]. سیتوکینین‌ها نقش بسیار مهمی در رشد و تمایز بافت‌ها دارند و باعث توسعه سلول می‌شوند. سیتوکینین‌ها در تقسیم یاخته‌ها در بافت‌های گیاهی نقش کلیدی داشته به گونه‌ای که تقسیم یاخته را از طریق تأثیر بر عواملی که عبور یاخته از چرخه تقسیم یاخته‌ای را مهار می‌کنند، کنترل می‌نماید. این هورمون علاوه بر آنکه سرعت تقسیم را تنظیم می‌کند، رشد جوانه‌های جانبی را نیز تحریک می‌نماید. سیتوکینین‌ها در غلظت کم (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) باعث تولید کالوس و در غلظت‌های بیشتر (۱۰-۱ میلی‌گرم در لیتر) شاخه‌زایی را تحریک می‌نمایند [۱۴]. بنزیل آمینو پورین (BAP) تنظیم‌کننده رشدی است که بیش از سایر سایتوکینین‌ها در کشت بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد. هورمون BAP مؤثرترین تنظیم‌کننده رشد در تحریک پرآوری شاخه است [۲۶]. سیتوکینین‌هایی نظیر بنزیل آمینوپورین با تحریک تقسیم سلولی باعث رشد و شاخه‌زایی بهتر در ریزنمونه‌ها می‌شود [۱۲].

ریشه‌زایی ریزقلمه‌ها در کشت درون‌شیشه‌ای یکی از ملاک‌های موفقیت در ریزازدیادی هر گیاه محسوب می‌شود. ریشه‌زایی توسط عوامل مختلفی نظیر وجود تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط، ترکیب نمک‌های پایه، ژنوتیپ و شرایط کشت کنترل می‌شود. برای بیشتر گونه‌ها، وجود اکسین برای انگیزش ریشه‌زایی لازم است. نسبت اکسین به سیتوکینین جهت القاء و رشد ریشه مهم می‌باشد با افزایش اکسین و کاهش سیتوکینین، ریشه‌ها تشکیل می‌شوند [۴]. هدف از انجام پژوهش حاضر، تهیه دستورالعملی بهینه جهت تکثیر درختچه ختمی چینی در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به منظور ریزازدیادی ختمی چینی، پژوهشی در سه آزمایش مجزا در قالب طرح کاملاً تصادفی در 10 تکرار، در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران در سال ۹۴-۱۳۹۳ انجام شد.

آزمایش اول: بررسی نوع محیط پایه مناسب

برای انجام این آزمایش از محیط کشت‌های MS، VS و WPM محتوی ۰/۵ میکرومولار بنزیل آمینو پورین (BAP)، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و سه گرم در لیتر ژل‌رایت جهت پرآوری ریزنمونه‌های ختمی چینی استفاده گردید. پس از ۴ هفته شاخص‌های رشدی موردنظر (شامل تعداد برگ، طول شاخساره، وزن تر و وزن خشک شاخساره) اندازه‌گیری شدند.

آزمایش دوم: بررسی اثر هورمون BAP بر پرآوری شاخساره

برای انجام این آزمایش، از محیط کشت VS با چهار غلظت متفاوت از هورمون BAP (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی-گرم در لیتر) جهت پرآوری ختمی چینی استفاده شد. پس از ۲۱ روز شاخص‌های رشدی موردنظر (شامل طول شاخساره، تعداد برگ، وزن تر و وزن خشک شاخساره) اندازه‌گیری شدند.

آزمایش سوم: بررسی اثر هورمون‌های ریشه‌زایی

برای انجام این آزمایش از محیط کشت ۱/۲VS با سه غلظت متفاوت از هورمون‌ها (شامل شاهد، ۰/۱NAA، ۰/۲NAA، ۰/۴NAA، ۰/۱IBA، ۰/۲IBA و ۰/۴IBA میلی‌گرم بر لیتر) جهت ریشه‌زایی ختمی چینی استفاده شد. پس از ۲۱ روز شاخص‌های رشدی مورد نظر (درصد ریشه زایی، تعداد ریشه و طول ریشه) اندازه‌گیری شدند.

برای هر سه آزمایش، ریزنمونه‌های مورد استفاده شامل قطعات تک‌گره‌ای (نودال سیگمنت[1]) به طول ۲-۱/۵ سانتی‌متر بودند. مراحل ضدعفونی شامل استفاده از اتانل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و ۳ بار آبشویی با آب مقطر استریل به مدت ۵ دقیقه بوده است. تمام مراحل ضدعفونی ریزنمونه‌ها زیر هود لامینار انجام گردید.

پس از آماده‌سازی محیط‌های غذایی هر کدام از آزمایش‌های فوق، pH آن‌ها بر روی ۵/۷ تنظیم گردید و پس از اضافه نمودن آگار به وسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵psi ضدعفونی شدند. شرایط آنکوباسیون مورد استفاده جهت نگهداری کشت‌ها در هر سه آزمایش دمای ۱ ± ۲۵ و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود.

نتایج و بحث

آزمایش اول: نوع محیط پایه

نتایج تجزیه واریانس آزمایش اول نشان داد که نوع محیط پایه بر شاخص‌های طول شاخساره، تعداد برگ و وزن خشک در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود و شاخص وزن تر در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). جدول مقایسه میانگین‌ها نشان داد که حداکثر طول شاخساره، تعداد برگ، وزن تر و وزن خشک مربوط به محیط VS و کمترین آن در محیط WPM مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱ . نتایج تجزیه واریانس آزمایش نوع محیط پایه مناسب ریزازدیادی ختمی چینی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		طول شاخساره	تعداد برگ	وزن تر	وزن خشک
نوع محیط پایه	۲	۴/۲۴۶**	۲۴/۱۸**	۰/۷۲۲*	۰/۰۱۵**
خطا	۲۴	۰/۵۲۴	۲/۴۹	۰/۱۳۱	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (٪)		۴/۱	۳/۳	۴	۳/۴

** – معنی‌دار در سطح ۱ درصد

* – معنی‌دار در سطح ۵ درصد

ns – عدم معنی‌داری

1. Nodal Sigment

جدول ۲ . مقایسه میانگین آزمایش انواع محیط پایه

محیط کشت	طول شاخساره	تعداد برگ	وزن تر	وزن خشک
VS	۲/۷۷۶[a]	۷/۲۰[a]	۱/۳۰۷[a]	۰/۱۹۹[a]
MS	۱/۴۲۲[b]	۳/۵۳۲[b]	۰/۷۹۹[b]	۰/۱۱۴[b]
WPM	۱/۰۱۶[b]	۳/۲۶۴[b]	۰/۵۶۲[b]	۰/۰۹۹[b]

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون برای هر عامل اختلاف معنی‌داری ندارند.

شکل ۱. ریزنمونه‌های ختمی چینی در محیط کشت‌های مختلف

بهترین نوع محیط پایه بر پرآوری گیاهچه ختمی چینی به محیط VS (MS حاوی کلات آهن FeEDDHA) تعلق یافت، به‌طوری‌که محیط VS باعث افزایش معنی‌داری در طول شاخساره، تعداد برگ، وزن تر و وزن خشک شد. نتایج این آزمایش با تحقیقات [۶] روی ختمی چینی، [۲۵] روی رز، [۱۳] روی رز، [۱۹] روی بادام تلخ و [۳] روی رز مطابقت دارد. دلایل متعددی برای مؤثرتر واقع بودن کلات آهن FeEDDHA نسبت به کلات آهن FeEDTA در محیط کشت MS بر بهبود شاخص‌های رشدی گیاه وجود دارد که در ادامه به آن‌ها اشاره خواهد شد [۱۶]. در زمینه خصوصیات لازم برای مؤثر بودن کلات‌ها گزارش کرد که تأثیر کلات‌ها به وسیله توانایی بقاء در محلول خاک، توانایی رقابت با کاتیون‌های دیگر و توانایی آزادسازی و انتقال آهن به گیاه تعیین می‌شوند.

بسیاری از فرمول‌های استاندارد محیط کشت بافت، حاوی FeEDTA به عنوان منبع آهن هستند و حساسیت این نوع کلات آهن به نور، سبب جایگزین کردن این نوع کلات آهن با منابع آهن دیگر در بسیاری از گیاهان حساس به کلروز آهن شده است. در بررسی تأثیر کلات آهن FeEDDHA در مقایسه با کلات آهن FeEDTA گزارش دادند که تثبیت آهن در کلات آهن FeEDTA به دلیل جایگزینی با Ca^{2+} و Zn^{2+} آن کمتر است و به سرعت رسوب می‌شود در مقابل آهن موجود در کلات آهن FeEDDHA به دلیل ثبات و استحکام کلات از رسوب آهن حتی زمانی‌که pH بیشتر از ۹ باشد، جلوگیری می‌کند. جذب آهن در ریزنمونه‌هایی که در تماس با محیط کشت هستند، نسبتاً به آرامی رخ می‌دهد [۱ و ۱۵]. بنابراین استفاده از شکل‌های پایدار آهن برای گیاهان باعث رشد بهتر آن‌ها می‌شود.

نور تغییراتی را در FeEDTA ایجاد می‌کند که موجب کاهش قابلیت دسترسی آهن و تخریب IAA می‌شود، از آنجایی‌که FeEDTA ترکیبی است که در محیط کشت بافت نور را جذب می‌کند، بیشترین احتمال این است که موجب تخریب اکسین شود [۵]. شاخساره‌ها در محیط‌های حاوی FeEDDHA قدرت رشد رویش جوانه‌های بیشتری را نشان دادند. قدرت رویش جوانه‌ها، رابطه مستقیمی با تغذیه مطلوب ریزمغذی‌ها به‌خصوص نوع کلات آهن دارد که می‌تواند بیانگر جذب بهتر آهن و نقش مؤثر آن در ساختمان کلروفیل و فتوسنتز بهتر، در این شاخساره‌ها باشد.

نتایج تحقیقات بر روی ختمی چینی نشان داد که بالاترین میانگین طول شاخه، تعداد برگ، وزن تر و خشک شاخه، میزان کلروفیل و تعداد شاخساره در محیط کشت MS همراه با FeEDDHA (VS) در مقایسه با MS همراه با FeEDTA به‌دست آمد [۶]. بهترین محیط پرآوری برای رز محیط VS نسبت به محیط‌های MS و WPM است، به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخه و ارتفاع شاخه در محیط کشت VS به‌دست آمد و کمترین مقدار تعداد شاخه و ارتفاع شاخه در محیط کشت WPM به‌دست آمد [۳]. نتایج دیگر تحقیقات، محیط VS را در تمام شاخص‌های مورد ارزیابی در آزمایش بهترین محیط نسبت به محیط‌های MS و WPM نشان داد و به دلیل بالاتر بودن قدرت یونی در محیط کشت WPM نسبت به محیط‌های MS و VSکمترین مقدار در تمام شاخص‌ها مربوط به این محیط کشت بود [۱۳].

بنابراین باتوجه به موارد فوق کلات آهن FeEDDHA توانسته با افزایش میزان حلالیت آهن در محیط رشد گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای میزان بیشتری آهن در اختیار گیاه قرار داده و مسلماً با فراهم شدن آهن مورد نیاز در ساختمان کلروفیل، باعث بهبود شاخص‌های رویشی رشد شده است زیرا آهن در فرایند فتوسنتز در واکنش‌های اکسیداسیونی و احیاء به‌واسطه حضور پروتئین‌های حاوی آن از قبیل سیتوکروم‌ها و فرودوکسین‌ها نقش دارد. در اثر کمبود آهن، انتقال الکترون فتوسنتزی کاهش یافته که این امر موجب کاهش تثبیت دی‌اکسیدکربن و کاهش غلظت نشاسته و کربوهیدرات‌های محلول در گیاهان در طی دوره رشد رویشی شده و از این طریق موجب کم شدن تولید ماده خشک گیاهی یا کاهش رشد سبزینه‌ای گیاه می‌شود [۱۷].

آزمایش دوم: شاخه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس آزمایش دوم نشان داد که غلظت‌های مختلف BAP بر شاخص‌های طول شاخساره، تعداد برگ، وزن تر و وزن خشک در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بالاترین طول شاخساره مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و کمترین آن مربوط به شاهد مشاهده شد (جدول ۴). بین غلظت‌های صفر و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین تعداد برگ مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP با میانگین ۴/۹۱ برگ به ازای ریزنمونه و کمترین آن مربوط به شاهد با میانگین ۲/۱ برگ به ازای ریزنمونه مشاهده شد. بین غلظت‌های صفر و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین وزن تر مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP با میانگین ۰/۳۹۴ و کمترین آن مربوط به غلظت شاهد با میانگین ۰/۰۷۴ گرم مشاهده شد. بین غلظت‌های ۰/۲۵ و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین وزن خشک مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP با میانگین ۰/۰۴۷ و کمترین آن مربوط به غلظت شاهد با میانگین ۰/۰۰۷ گرم مشاهده شد. بین غلظت‌های صفر و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۳ . نتایج تجزیه واریانس آزمایش اثر غلظت‌های مختلف BAP بر روی شاخه‌زایی ختمی چینی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		طول شاخساره	تعداد برگ	وزن تر	وزن خشک
غلظت BAP	۳	۱۶/۷۵۸۲**	۱۷/۲۹۹**	۰/۱۸۱۸۲**	۰/۰۰۴۱**
خطا	۳۶	۰/۲۰۵۵	۰/۲۷۶۵	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۰۱۳
ضریب تغییرات (٪)		۱/۵	۱/۶	۲/۶	۵/۴

** – معنی‌دار در سطح ۱ درصد

* – معنی‌دار در سطح ۵ درصد

ns – عدم معنی‌داری

جدول ۴ . مقایسه میانگین آزمایش شاخه‌زایی ختمی چینی

لظت‌های مختلف BAP	طول شاخساره	تعداد برگ	وزن تر	وزن خشک
۰	۱/۷۳^{c}	۲/۱^{c}	۰/۰۷۴^{c}	۰/۰۰۳۵^{c}
۰/۲۵	۱/۸۶^{c}	۲/۲۲^{c}	۰/۱۶۵^{b}	۰/۰۰۷۳^{c}
۰/۵	۴/۴۱^{a}	۴/۹۱^{a}	۰/۳۹۴^{a}	۰/۰۴۷^{a}
۱	۳/۴۵^{b}	۳/۵۱^{b}	۰/۲۱۸^{b}	۰/۰۲۷^{b}

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون برای هر عامل اختلاف معنی‌داری ندارند.

شکل ۲ . ریزنمونه‌های کشت شده در غلظت‌های مختلف هورمون BAP از بالا به پایین به‌ترتیب غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۰/۲۵ و ۰ میلی‌گرم بر لیتر

مرحله ریزازدیادی با مرحله پرآوری شکل می‌گیرد، زیرا تهیه شاخساره‌های مناسب برای ریشه‌زایی از این ریزنمونه‌ها بوده و تکثیر انبوه ریزنمونه‌ها از این مرحله آغاز می‌شود. سرعت پرآوری متأثر از تنظیم‌کننده‌های گیاهی به‌خصوص سایتوکینین‌ها بوده است. حضور سایتوکینین به پرآوری نمونه‌ها در محیط کشت کمک می‌کند [۲۰]. هورمون BAP مؤثرترین تنظیم‌کننده رشد در تحریک پرآوری شاخه است [۲۶]. سیتوکینین‌های نظیر بنزیل آمینوپورین با تحریک تقسیم سلولی باعث رشد و شاخه‌زایی بهتر در ریزنمونه‌ها می‌شود [۱۲]. سیتوکینین‌ها در غلظت بالا سبب تحریک تولید ساقه‌های نابه‌جا می‌شوند و غالبیت انتهایی را حذف می‌کنند. البته کاربرد مقادیر بالای آن سبب ایجاد ناهنجاری‌های ژنتیکی در بافت‌ها می‌شود. سیتوکینین‌ها نقش‌های متعددی در کنترل نمو گیاه بازی می‌کنند و در تحریک مستقیم یا غیرمستقیم ابتدای شاخه بسیار مؤثر هستند. به هرحال، مکانیسم عمل آن‌ها در سطح مولکولی مشخص نیست. در اغلب شرایط سنتز RNA را فعال کرده و سنتز پروتئین‌ها را تحریک می‌کنند و اغلب آنزیم‌ها را فعال می‌کنند. سایتوکینین‌ها همراه با اکسین‌ها در تنظیم چرخه سلولی در سلول‌های گیاهان شرکت می‌کنند. سایتوکینین‌ها احتمالاً سیکلین نوع D (D_3) را تحریک می‌کنند و بنابراین پیشرفت چرخه سلولی از G_1 به S انگیخته می‌شود و احتمالاً انتقال از G_2 به M با تحریک بیان ژن CDC_2 به‌واسطه هیستون H_1 کیناز و تحریک دفسفوریلاسیون آن به‌وسیله Cdc^{25} صورت می‌گیرد. در غیاب آن‌ها مرحله متافاز میتوز به طور قابل ملاحظه‌ای طولانی می‌شود [۱۰].

آزمایش سوم: ریشه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس آزمایش سوم نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون‌های ریشه‌زایی بر شاخص‌های درصد ریشه-زایی، طول ریشه و تعداد ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). مقایسه میانگین‌های نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی مربوط به غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA با میانگین ۱۰۰ و کمترین آن مربوط به شاهد با میانگین ۳۳ درصد مشاهده شد (جدول ۶). بین غلظت‌های ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر IBA با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و همچنین ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر NAA و شاهد از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین طول ریشه مربوط به غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA با میانگین ۱۰/۸۶ و کمترین آن مربوط به شاهد با میانگین ۱/۵۵ سانتی‌متر مشاهده شد. بین غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و همچنین ۰/۴ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین تعداد ریشه مربوط به غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA با میانگین ۶۰/۸ و کمترین آن مربوط به شاهد با میانگین ۱/۳۸ عدد مشاهده شد. بین غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۵ . نتایج تجزیه واریانس آزمایش ریشه‌زایی ختمی چینی در شرایط درون‌شیشه‌ای

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد ریشه‌زایی	طول ریشه	تعداد ریشه
هورمون	۶	۵۹۱۷/۲۱**	۱۰۳/۴۱**	۳۰۰۹/۲۴**
خطا	۶۳	۱۶۴/۷۲	۰/۲۴۲	۹/۶۸
ضریب تغییرات (٪)		۲/۲	۸/۱	۸/۸

* – معنی‌دار در سطح ۵ درصد
** – معنی‌دار در سطح ۱ درصد
ns – عدم معنی‌داری

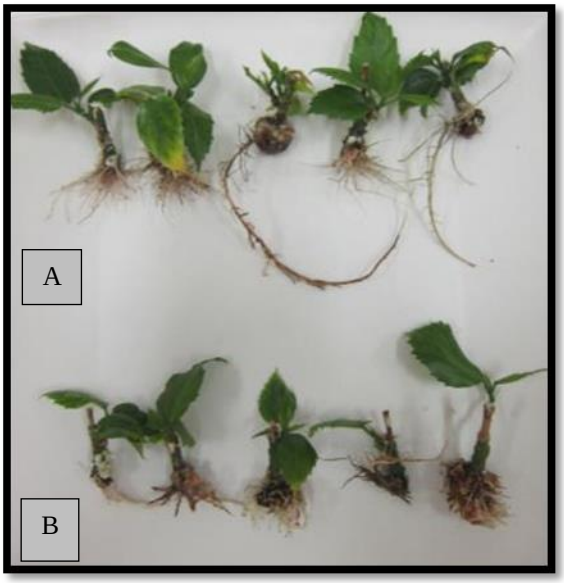
جدول ۶ . مقایسه میانگین آزمایش ریشه‌زایی ختمی چینی در شرایط درون‌شیشه‌ای

هورمون‌های ریشه‌زایی	درصد ریشه‌زایی	طول ریشه	تعداد ریشه
۰	۳۳^{d}	۱/۵۵^{d}	۱۰/۳۸^{f}
۰/۱IBA	۷۶/۲^{b}	۷/۸۵^{b}	۴۰^{c}
۰/۲IBA	۱۰۰^{a}	۱۰/۸۶^{a}	۶۰/۸^{a}
۰/۴IBA	۵۲/۸^{c}	۷/۳۹^{b}	۴۹/۳^{b}
۰/۱NAA	۴۶/۲^{cd}	۷/۴۴^{b}	۳۷/۸۹^{c}
۰/۲NAA	۴۹/۵^{c}	۳/۸۹^{c}	۲۹/۱۱^{d}
۰/۴NAA	۳۳^{d}	۳/۴^{c}	۱۸/۸۳^{e}

** – معنی‌دار در سطح ۱ درصد

* – معنی‌دار در سطح ۵ درصد

ns – عدم معنی‌داری



شکل ۳ . ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده در هورمون IBA :A **و** NAA :B

عموماً محیط کشت مورد استفاده برای تحریک ریشه‌زایی نیاز به نمک‌های کمتری نسبت به محیط شاخه‌زایی دارد. در واقع با کاهش غلظت عناصر پرمصرف، فشار اسمزی محیط کاهش یافته و این کاهش اسمزی گیاه را وادار می‌کند تا با ایجاد ریشه و تارهای کشنده، اقدام به جذب املاح و مواد غذایی از محیط کند [۲۲]. به نظر می‌رسد برهمکنش عناصر غذایی در غلظت بالا اثر منفی بر ریشه‌زایی شاخه‌ها داشته و اثر هورمون‌های ریشه‌زایی را از بین می‌برد. در این تحقیق، بهترین نتایج در محیط کشت VS۱/۲ با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد،

به‌طوری‌که در این غلظت بیشترین میانگین درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه مشاهده شد. بیشترین ریشه‌زایی دورگه هلو × بادام با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد [۷]. کاهش یافتن غلظت عناصر به‌طور قابل توجهی ریشه‌زایی را افزایش می‌دهد و استفاده از ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط ۱/۲ MS بهترین ترکیب برای ریشه‌زایی در داوودی است [۲۱]. برای ریشه‌دار کردن نوشاخه‌های رز *Rosa rugosa* از غلظت‌های مختلف هورمون IBA استفاده و گزارش شد که بالاترین درصد ریشه‌زایی روی محیط کشت MS۱/۲ با کاربرد ۲/۵ تا ۵ میکرومول IBA به‌دست آمد [۲۴].

القای ریشه در شاخه‌های در حال رشد چه به طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق تنظیم‌کننده‌های رشد مصنوعی یا پس از حذف سایتوکینین‌ها از محیط کشت، بستگی به گونه و رقم دارد. از طرف دیگر، توانایی تولید ریشه، بستگی به برهم‌کنش فاکتورهای بیرونی و درونی دارد. اغلب پژوهشگران موفق به ریشه‌دار کردن شاخه‌های پرآوری شده کشت بافتی در محیط‌های حاوی غلظت‌های پایین IBA، IAA و NAA شده‌اند [۲ و ۱۸]. تولید ریشه در گیاهان تحت تأثیر سنتز، متابولیسم، انتقال و مسیرهای انتقال علایم اکسین می‌باشد [۱۰].

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر حمایت مالی از این تحقیق قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Andreu JS, Jorda J and Juarez M (1991) Reactions of FeEDTA and FeEDDHA applied to calcareous soils. In Iron nutrition and interactions in plants. Springer Netherlands. Pp. 57-62.

2. Azadi P, Khosh-Khui M, Beyramizadeh E and 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): 626-631.

3. Bayanati M and Mortazavi SN (2013) Mass propagation of Rosa hybrid cv. Black baccara by periodical bioreactor. International Journal of Agriculture: Research and Review. 3(2): 241-245.

4. Carpenter WJ and Cornell JA (1992) Auxin application duration and concentration govern rooting of Hibiscus stem cuttings. Journal of the American Society for Horticultural Science. 117(1): 68-74.

5. Castillo B, Smith MAL, Madhavi DL and Yadava UL (1997) Interactions of irradiance level and iron chelate source during shoot tip culture of *Carica papaya* L. HortScience. 32(6): 1120-1123.

6. 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 and Organ Culture. 93(2): 151-161.

7. Cos JD, Frutos R and Garcia J (2004) *In vitro* rooting study of the peach-almond hybrid GF677. Acta Horticulture. 658: 623-627.

8. Dimassi-Theriou K (1994) *In vitro* propagation of cv. Kalamon olives (*Olea europaea* L.). Advances Horticulture. 8: 185-189.

9. Ghaffar FRA and El-Elaimy IA (2012) *In vitro*, antioxidant and scavenging activities of *Hibiscus rosa sinensis* crude extract. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2(01): 51-58.

10. George EF (2008) Plant propagation by tissue culture. 3th Edition, (eds.), 175-281. Springer.

11. Govinden-Soulange J, Boodia N, Dussooa C, Gunowa R, Deensah S, Facknath S and Rajkomar B (2009) Vegetative propagation and tissue culture regeneration of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle). World Journal of Agricultural Sciences. 5(5): 651-661.

12. Khaleghi A, Sahraroo A, Rasoulnia IN and Ataei R (2008) *In vitro* propagartion of *Alstromeria* cv. Fuego. American Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science. 3: 492-497.

13. Khosravi P, Jafarkhani Kermani M, Nematzadeh GA and 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.

14. Lambardi M and Rugini E (2003) Micro Propagation of Olive (*Olea europaea* L.). In: MicroPropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Academic Publisher Netherland, Editor: Daniel Mohan Bienstock, Katsuaki Ishii (Editor), ISBN-13:9781402011351. Pp. 621-646.

15. Lucena JJ, Manzanares M and Garate A (1992) A test to evaluate the efficacy of commercial Fe-chelates. Journal of Plant Nutrition. 15(10): 1553-1566.

16. Lucena JJ (2003) Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in strategy I plants. Journal of Plant Nutrition. 26(10-11): 1969-1984.

17. Marschner H (1995) Functions of mineral nutrients: macronutrients. Mineral Nutrition of Higher Plants. 87(2): 379-396.

18. Rout GR, Mohapatra A and Jain SM (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances. 24(6): 531-560.

19. Shibli RA, Mohammad MJ and Ajlouni ZI (2002) Growth and micronutrient acquisition of in vitro grown bitter almond and sour orange in response to iron concentration from different iron chelates. Journal Plant Nutrition. 25: 1599-1606.

20. Singh SK, Misra RL and Ranjan JK (2012) *In vitro* shoot regeneration from cormel derived callus of gladiolus and bio-hardening of plantlets. Indian Journal of Biotechnology. 11(1): 99-104.

21. Skirvin RM, Chu MC and Young HJ (1990) Rose. Handbook of plant cell culture. 96(5): 716-743.

22. Torkashvand AM and Shadparvar V (2012) Rooting in *hibiscus rosa-sinesis* (Yellow doublehybrid) by indole butyric acid and rooting substrates. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences. 9(3): 194-198.

23. Torres KC (1989) Tissue culture techniques for Horticulturel Crops. Published by Van, No. Strand Reinhold, NewYork. 88(4): 100-107.

24. Xing W, Bao M, Qin H and Ning G (2010) Micropropagation of *Rosa rugosa* through axillary shoot proliferation. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 52(2): 69-75.

25. Van der Salm TP, Van der Toorn CJ, Ten Cate CHH, Dubois LA, De Vries DP and Dons HJ (1994) Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L.'Moneyway'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 37(1): 73-77.

26. Vijaya N and Satyanarayana G (1991) Effect of culture media and growth regulators on *in vitro* propagation of rose. In Horticulture - New technologies and applications. Springer Netherlands. Pp. 209-214.