ریزازدیادی گیاه نرگس (*Narcissus tazetta* L.) تحت تیمارهای هورمونی متفاوت و انتقال به خاک گیاهچه‌ها

سیده حمیرا سلیمانی[1*]، فرانسواز برنارد[2] و سمیه فاضلی نژاد[2]

[1]ایران، شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[2] ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۳

چکیده

گیاه نرگس *Narcissus tazetta* L. از خانواده لیلیاسه، گیاهی است که علی‌رغم تقاضای زیاد در بازار، تکثیر رویشی بسیار کندی دارد. به منظور تکثیر سریع، در این مطالعه ریزازدیادی گیاه نرگس از طریق کشت بافت تحت تاثیر هورمون های متفاوت و انتقال به خاک گیاهچه‌ها بررسی گردید. ریزازدیادی این گیاه در سه مرحله القا اندام‌های هوایی، تکثیر آنها و تولید پیاز و ریشه از قطعات جداکشت صورت گرفت. نتایج نشان داد بهترین محیط برای القا اندام‌های هوایی محیط MS تغییریافته دارای ۴ میلی-گرم بر لیتر BAP و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA است و درصورت انتقال اندام‌های هوایی القا شده به محیط MS دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشترین تکثیر حاصل شد. با انتقال این اندام‌ها به محیط کشت MS دارای ۹٪ ساکارز و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA حداکثر تعداد پیازها به دست آمد که پس از گذشت ۴ ماه قطر آنها به ۲۰-۱۲ mm رسید. ریشه‌های تولید شده در قاعده پیازها، در این محیط نسبت به محیط دیگر (محیط فاقد هورمون)، کوتاه و ضخیم‌تر بودند. گیاهان پیازدار حاصل با سالیسیلیک‌اسید تیمار و به خاک منتقل شدند و در خاک تحت تاثیر قارچ‌کش کاربندازیم قرار گرفتند. کاربندازیم موجب افزایش درصد زنده‌مانی گیاهان (۱۰۰٪) شد ولی سالیسیلیک‌اسید تاثیری بر روی موفقیت انتقال به خاک نداشت. تعداد بالای پیازهای به دست آمده و درصد بالای بقای گیاهان باززایی شده در خاک نشان می‌دهد ریزازدیادی یک روش مناسب جایگزین برای کشت سنتی است.

واژه های کلیدی: گیاه نرگس، ریزازدیادی، تولید پیاز، هورمون‌ها، انتقال به خاک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۵۳۶۴۸۱ ، پست الکترونیکی: moho_plant@qodsiau.ac.ir

مقدمه

گیاه نرگس با نام علمی *Narcissus tazetta* L. از خانواده لیلیاسه گیاهی زینتی و معطر است که بلحاظ دارا بودن خواص دارویی بسیار مورد توجه می‌باشد. گیاه نرگس ضداسپاسم، مخدر، مسهل، ضد سرطان و دارای فعالیت anti-HIV- 1 است. ویژگی دیگر گیاه نرگس آلکالوئیدهای متعددی است که از آن استخراج می‌شود (۴، ۸، ۱۳). ریزازدیادی (Micropropagation) از کاربردهای مهم کشت بافت است. در ریزازدیادی اندام خاصی از گیاه جدا و بعنوان قطعه جدا کشت در محیط کشت قرار داده می‌شود. بر روی این قطعات جدا کشت به‌کمک نسبت بین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین اندام خاصی القا می‌شود. ایجاد گیاهان عاری از ویروس، تولید گیاهان هاپلوئید، هیبریداسیون بوسیله ادغام پروتوپلاست‌ها، انتقال DNA، ایجاد موتاسیون و تولید متابولیت‌های ثانویه به‌کمک این روش صورت می‌گیرد (۲۴). ریزازدیادی روشی سریع، ساده، آسان و اقتصادی برای تکثیر گیاهان پیازدار است (۶،

۱۸، ۱۹) و بخاطر مزیت‌هایی که دارد بعنوان یک روش متداول جهت تکثیر رویشی، توجه بسیاری را جلب نموده است (۱۶، ۲۶). گیاه نرگس یکی از گیاهان پیازدار زینتی مهم است که علاقه مردم جهان به آن سبب تقاضای زیاد و برداشت کنترل نشده این گیاه می‌شود (۱۸). تکثیر رویشی نرگس با سرعت متوسط سالیانه تولید ۱/۶ پیاز دختر به ازای یک پیاز مادر بسیار کند صورت می‌گیرد. بنابراین از طریق تکثیر رویشی، پیازهای برداشت شده در هر سال جبران نمی‌شود (۱۵) و این در حالی است که با استفاده از روش ریزازدیادی، از یک پیاز نرگس طی ۴ تا ۵ سال ۱۲۰۰ پیاز حاصل می‌گردد (۱۹). از سویی، مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که بسیاری از ارقام تجاری نرگس بوسیله ویروس آلوده می‌شوند که موجب کاهش ۳۰ درصدی محصول پیاز آن می‌شود (۵). بنابراین جهت تکثیر سریع و تولید گیاهان عاری از ویروس، کشت گیاه نرگس در شرایط *in vitro* *بسیار* مورد توجه می باشد.

تاکنون مطالعه ای در ایران بر روی ریزازدیادی گیاه نرگس صورت نگرفته است. هدف این پژوهش بهینه سازی شرایط ریزازدیادی این گیاه و تولید تعداد پیازهای بیشتر است. در کشت *in vitro* گیاهان پیازدار، تشکیل پیاز سودمند است زیرا دیگر نیازی به مرحله سازگاری نیست و همچنین پیازهای حاصل به سادگی قابل جابه‌جایی بوده، می توان آنها را مدت طولانی در یخچال ذخیره نمود و این پیازها عاری از ویروس و سایر بیماری‌ها می‌باشند (۱۱). از اینرو بمنظور تهیه تعداد پیازهای بیشتر در شرایط *in vitro*، از آنجا که تشکیل پیاز در قاعده اندام هوایی صورت می-گیرد، ابتدا ضروری است که شرایط کشت مناسب برای تکثیر اندام هوایی فراهم شود. بنابراین در این مطالعه تاثیر محیط‌های کشت و هورمون‌های متفاوت بر روی القا، تکثیر اندام‌های هوایی، تکثیر پیازها و تولید ریشه بررسی می‌شود. مرحله انتقال به خاک یک مرحله اساسی در ریزازدیادی است. گیاهچه‌ها برای سازگاری به شرایط خارج از شیشه به پیش تیمارهایی نیاز دارند (۱۶، ۱۸). از اینرو اثر پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید و تیمار قارچ‌کش بر موفقیت انتقال به خاک و بقای گیاهچه‌های باززایی شده بررسی می‌گردد.

مواد و روشها

تهیه قطعه جداکشت: پیازهای گیاه *Narcissus tazetta* در مرحله قبل از گلدهی از روستای ضیابر از توابع بندر انزلی جمع‌آوری شدند و بعنوان منبع قطعه جداکشت مورد استفاده قرار گرفتند. ضد عفونی پیازها با کمک اتانول ۸۰ ٪ (v/v) و هیپوکلریت سدیم ۲٪ صورت گرفت. قطعات جداکشت به صورت دو فلسی‌هایی به ابعاد تقریبی یک سانتی‌متر مربع متصل به ۲-۱ میلی‌متر کپه تهیه گردید.

محیط کشت القاء (Induction medium) اندام هوایی: جهت القا شاخه، شش محیط کشت مختلف شامل دو نوع محیط پایه MS (Murashig & Skoog) و MS تغییریافته (modified Murashig & Skoog) و ترکیبات هورمونی متفاوت مورد استفاده قرار گرفت (جدول۱). اختلاف دو محیط پایه در جدول ۲ آمده است. لازم به ذکر است سایر ترکیبات محیط MS تغییریافته مشابه محیط MS است. pH محیط‌ها روی ۶ تنظیم شد و پس از افزودن آگار (۶ گرم بر لیتر) در اتوکلاو استریل شدند. بر روی محیط‌های کشت در هر شیشه ۵ قطعه جداکشت از ناحیه کپه قرار گرفت. پس از ۶ هفته اندام‌های هوایی به محیط‌های جدید با همان ترکیب‌های قبلی واکشت شدند و پس از ۱۲ هفته، تعداد و ارتفاع شاخه‌ها محاسبه گردید.

جدول ۱- ترکیبات محیط‌های القاء شاخه (I). mMS: MS تغییریافته

محیط القاء	محیط پایه	هورمون (میلی‌گرم بر لیتر)	
		NAA	BAP
I_1	MS	۱	۲
I_2	MS	۰/۱۲	۲
I_3	MS	۰/۱۲	۴
I_4	mMS	۱	۲
I_5	mMS	۰/۱۲	۲
I_6	mMS	۰/۱۲	۴

جدول ۲- ترکیبات پایه محیط‌های MS و mMS (MS تغییریافته)

ترکیبات	مقادیر (میلی‌گرم بر لیتر)	
	mMS	MS
KH_2PO_4	-	۱۷۰
NaH_2PO_4	۳۰۰	-
Nicotinic acid	۵	۰/۵
Pyridoxine-HCl	۱	۰/۵
Thiamine-HCl	۰/۵	۰/۱
vitamine-free Caseinehydrolysate	۱۰۰۰	–

محیط کشت تکثیر (Proliferation medium): جهت افزایش تعداد اندام‌های هوایی القاء شده درمرحله قبل، محیط‌های تکثیر P_2 (محیط MS دارای ۲ میلی‌گرم بر لیترBAP و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA) و P_5 (محیط MS تغییریافته دارای ۲ میلی‌گرم بر لیترBAP و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA) تهیه شد و دسته اندام‌های هوایی پس از تقسیم به قطعاتی شامل دو اندام هوایی و ارتفاع ۲ سانتی-متر در این محیط‌ها قرار گرفتند و هر ۶ هفته یکبار واکشت شدند. ۶ هفته پس از انتقال، تعداد و ارتفاع آنها محاسبه گردید.

محیط تولید پیاز (Bulb Production medium): دسته اندام‌های هوایی که در قاعده برگ‌های آنها پیازهای کوچکی بود، کوتاه و به محیط‌های تولید پیاز B_1 (MS دارای ۹٪ ساکارز و ۷ گرم بر لیتر آگار) و B_2 (MS دارای ۹٪ ساکارز ، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۷ گرم بر لیتر آگار) منتقل شدند. پس از ۷۰ روز تعداد و قطر پیازها و تعداد و ارتفاع ریشه‌ها محاسبه گردید.

تمام کشت‌ها درون اتاق رشد با دمای ۲۵°C، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۲۲۰۰ لوکس شدت روشنایی قرار گرفتند.

انتقال به خاک: جهت انتقال به خاک ابتدا پیازها از محیط کشت خارج و با آب مقطر شسته شدند. بمنظور بقای بیشتر، پیازها قبل از انتقال به خاک بمدت یک ساعت در غلظت ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک‌اسید و پس از انتقال به خاک تحت تیمار قارچ‌کش کاربندازیم (Carbendazim) قرار گرفتند. گیاهان در خاکی مخلوط از خاک باغچه، ماسه، کود چای و قارچ با نسبت (۵ به ۱) با پرلیت درون گلدان‌های پلاستیکی قرار گرفتند. گلدان‌ها ابتدا جهت حفظ رطوبت با درپوش پلاستیکی پوشیده و با فاصله دو روز یک بار آبیاری شدند. پس از یک ماه درپوش برداشته شد و گلدان‌ها بمدت یک ماه در اتاق رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۵°C قرار گرفتند.

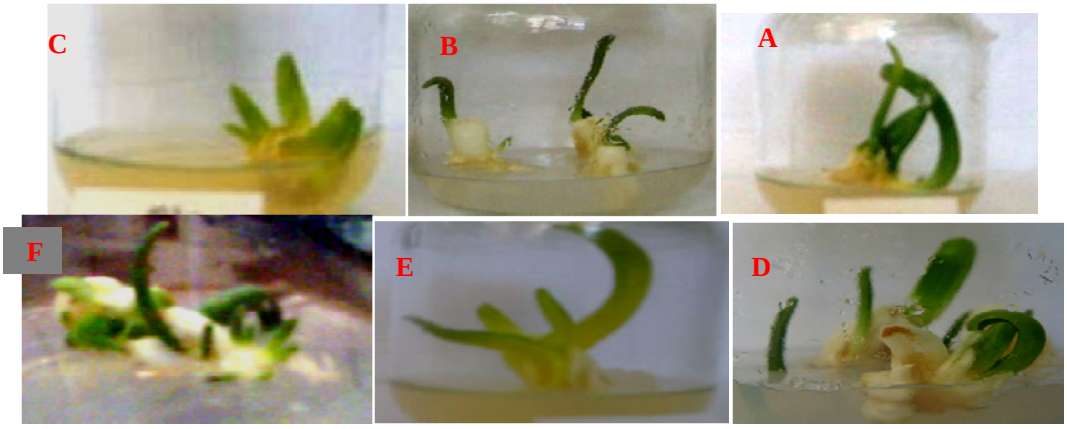
آزمایشات به صورت طرح کاملا تصادفی و با ۴ تکرار (البته بخش انتقال به خاک با ۱۶ تکرار) انجام شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS-11 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از ANOVA آنالیز و گروه‌بندی میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری ۵ ٪ انجام شد.

نتایج

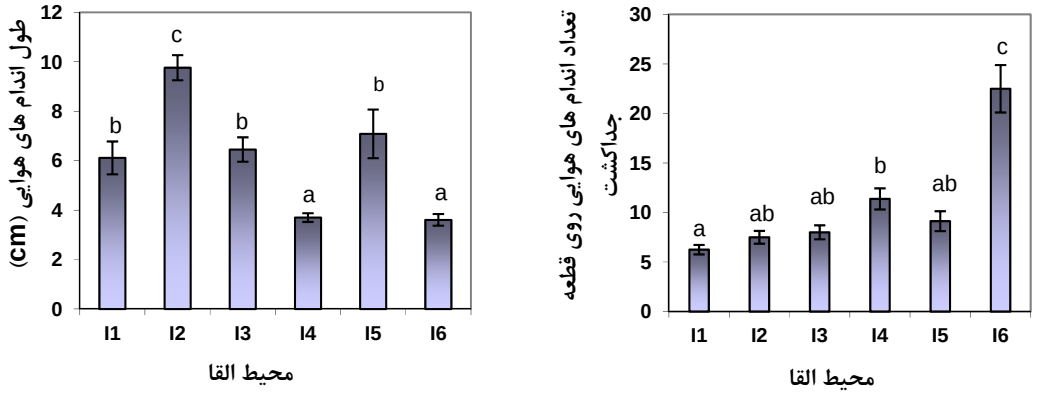
مرحله القاء: سه هفته پس از انتقال قطعات جداکشت به محیط‌های کشت القاء، تمام دوفلسی‌ها دچار تورم قابل ملاحظه ای شدند و یک ماه بعد، از بین دوفلس در محیط های کشت I_2 و I_5 اندام‌های هوایی خارج گردید. در سایر محیط‌ها اندام‌های هوایی بر روی قطعات جداکشت بسیار کمتر بود و با تاخیر تشکیل شد. پس از دوازده هفته تعداد اندام‌های هوایی حاصل بر روی یک قطعه جداکشت در محیط‌های مختلف محاسبه گردید (نمودار ۱ سمت راست). آنالیز داده‌ها مشخص نمود تاثیر نوع محیط پایه (MS یا MS تغییریافته) ، مقدار هورمون BAP (۲ یا ۴ میلی گرم بر لیتر) و همچنین بر هم‌کنش آنها بر تعداد اندام‌های هوایی معنی‌دار است. در محیط کشت MS تغییر-یافته نسبت به MS و همچنین در غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP نسبت به غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر، اندام‌های هوایی بیشتری بر روی قطعات جداکشت ایجاد شد. اثر هورمون NAA بر روی تعداد اندام‌های هوایی معنی‌دار نبود. در تصویر ۱ اندام‌های هوایی القاء شده در محیط‌های کشت مشاهده می‌گردد. نتایج نشان داد که نوع

محیط پایه (MS تغییریافته یا MS) و مقادیر تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر ارتفاع اندام‌های هوایی نیز به طور معنی‌داری اثر می‌گذارد (نمودار ۱ سمت چپ).

مرحله تکثیر: با توجه به اینکه گیاهک‌های حاصل شده بر روی قطعات جداکشت در محیط‌های القاء I_2 و I_5 فرم طبیعی و بهتری داشتند، از این دو محیط بعنوان محیط‌های تکثیر استفاده گردید و این دو محیط بترتیب P_2 و P_5 نامیده شدند. محاسبه تعداد اندام‌های هوایی نشان داد که نوع محیط تکثیر اثری در تعداد اندام‌های هوایی نداشت. در حالی‌که برهم‌کنش نوع محیط القاء و محیط تکثیر بر تعداد اندام‌های هوایی موثر بود (نمودار ۲ سمت راست). بیشترین تکثیر زمانی صورت گرفت که اندام‌های هوایی از محیط I_6 شامل MS تغییریافته، ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA به محیط P_2 منتقل شدند (تصویر ۲). نوع محیط القاء و همچنین برهم‌کنش محیط القاء و محیط تکثیر، اثر قابل توجهی بر طول اندام‌های هوایی داشت (نمودار ۲ سمت چپ).

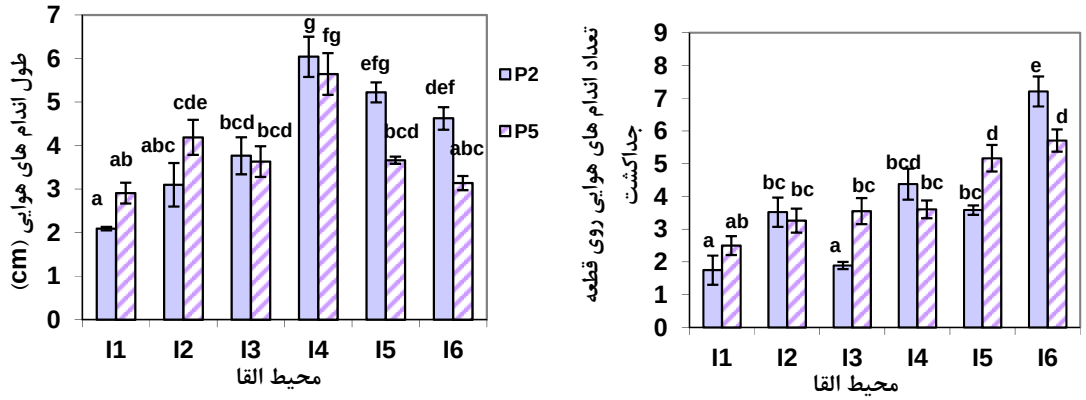


تصویر ۱- القا اندام‌های هوایی در محیط‌های A: MS با BAP + NAA (۱+ ۲)میلی‌گرم بر لیتر B: MS با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر C: MS با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۴) میلی‌گرم بر لیتر D: MS تغییریافته با BAP + NAA (۱+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر E: MSتغییریافته با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر F: MS تغییریافته با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۴) میلی‌گرم بر لیتر



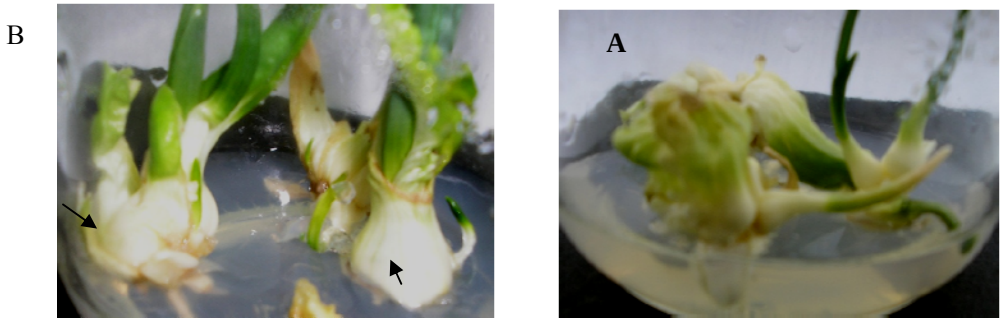
نمودار ۱- تاثیر محیط‌های کشت القاء بر سمت راست: تعداد و سمت چپ: طول اندام‌های هوایی القاء شده بر روی قطعات جداکشت پیاز گیاه نرگس پس از ۱۲ هفته (n=4) I1: MS با BAP + NAA (۱+ ۲)میلی‌گرم بر لیتر I2: MS با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر I3: MS با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۴) میلی‌گرم بر لیتر I4: MS تغییریافته با BAP + NAA (۱+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر I5: MS تغییریافته با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر I6: MS تغییریافته با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۴) میلی‌گرم بر لیتر

تصویر۲- تکثیر اندام‌های هوایی در محیط تکثیر MS با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر انتقال‌یافته از محیط‌های القای
A: MS با BAP + NAA (۱+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر B: MS تغییریافته با BAP + NAA (۱+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر
C: MS تغییریافته با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۴) میلی‌گرم بر لیتر

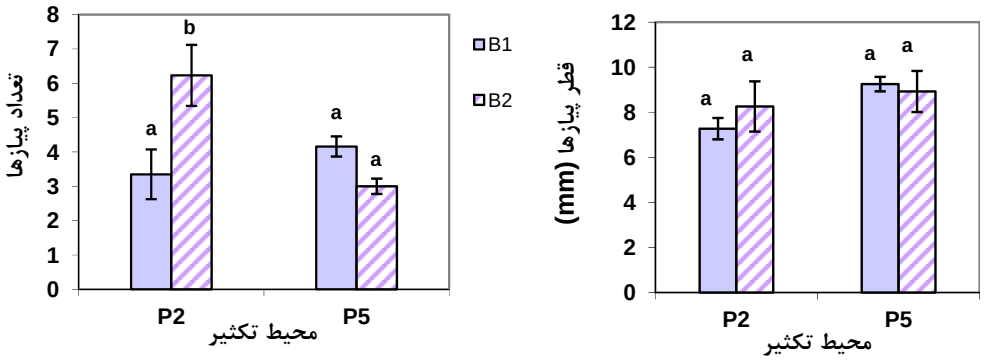


نمودار ۲- تاثیر محیط‌های کشت القا (I) و تکثیر(P) بر سمت راست: تعداد و سمت چپ : طول اندام‌های هوایی ایجاد شده گیاه نرگس ۶ هفته پس از انتقال به محیط تکثیر I1: MS با BAP + NAA (۱+ ۲)میلی‌گرم بر لیتر I2: MS با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر I3: MSبا BAP + NAA (۰/۱۲+ ۴) میلی‌گرم بر لیتر I4: MS تغییریافته با BAP + NAA (۱+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر I5: MS تغییریافته با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر I6: MS تغییریافته با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۴) میلی‌گرم بر لیتر

مرحله تشکیل پیاز: وقتی دسته اندام‌های هوایی بمدت ۱۰ هفته بر روی محیط‌های تکثیر P_2 و P_5 قرار گرفتند، در قاعده برگ‌ها پیازهای بسیار کوچک ظاهر شد. در محیط P_2، ۶۲/۵ درصد برگ‌ها و در محیط P_5، ۵۶ درصد برگ‌ها دارای پیاز شدند. با توجه به اثر سوکروز در نمو پیازها (۱۸) دسته‌های برگی با تعداد معین پیاز به محیط‌های B_1 و B_2 انتقال یافتند. نوع محیط تشکیل پیاز (B_1 و B_2) و نوع محیط تکثیری که اندام‌های هوایی از آنجا منتقل شده است تاثیری بر تعداد پیازها نداشت. اما برهم‌کنش آن‌ها در تعداد پیازها اثری معنی‌دار داشت. به طوری که بیشترین تعداد پیازها زمانی حاصل شد که اندام‌های هوایی از محیط P_2 به محیط B_2 با ترکیب (MS شامل ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۹٪ ساکارز) انتقال یافت ($P<0.05$) (نمودار ۳ سمت چپ و تصویر ۳). نوع محیط تکثیری که اندام‌های هوایی از آنها به محیط‌های تشکیل پیاز منتقل شده‌اند و نوع محیط تشکیل پیاز و برهم‌کنش آن‌ها، اثری در قطر پیازها نداشت. هفتاد روز پس از انتقال به محیط تولید پیاز، قطر تمام پیازها بین ۹/۵- ۶/۵ میلی‌متر و بلحاظ ظاهری مشابه پیاز-های طبیعی گیاه نرگس بود (نمودار ۳ راست). کشت مجدد بر روی محیطی تازه با همان ترکیب قبلی بمدت هفتاد روز، سبب افزایش اندازه پیازها شد به طوری که قطر آنها به ۲۰-۱۲ میلی‌متر رسید. همچنین پیازهای کوچک (bulblets) در کنار این پیازها تشکیل شد که در تصویر ۳ مشخص است.



تصویر ۳- A: پیازها در محیط تشکیل پیاز دارای ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA B: تشکیل bulblet در کنار پیازها (فلش‌ها نشان می‌دهند)



نمودار۳- تاثیر محیط‌های تکثیر (P) و تشکیل پیاز (B) بر سمت راست: قطر و سمت چپ: تعداد پیازهای ایجاد شده در قاعده برگ‌های ریزازدیادی شده گیاه نرگس هفتاد روز پس از انتقال P_2: MS با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر P_5: MS تغییریافته با NAA + BAP (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر B_1 : MS بدون هورمون B_2 : MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA

تشکیل ریشه‌ها: قرار گرفتن پیازها بمدت هفتاد روز در محیط تشکیل پیاز، موجب تشکیل ریشه در قاعده پیازها شد. این ریشه‌ها همان‌گونه که در تصویر ۴ مشخص است قطور و طویل بودند. آنالیز داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش نوع محیط تشکیل پیاز و نوع محیط تکثیر به طور معنی-داری در تعداد ریشه ها تاثیر داشت. به‌طوری‌که با انتقال پیازها از محیط P_5 به محیط B_1 بیشترین تعداد ریشه ایجاد شد($P< 0.001$) (نمودار ۴ سمت راست). همچنین نوع محیط تشکیل پیاز اثری معنی‌دار بر طول ریشه‌ها داشت درحالی‌که نوع محیط تکثیر بر طول ریشه‌ها تاثیری نداشت. ریشه‌هایی که در قاعده پیازهای کشت شده در محیط B_2 تشکیل شد کوتاه و ضخیم‌تر بودند. بیشترین طول ریشه، در محیط B_1 حاصل شد، خواه این پیازها از محیط‌های تکثیر P_2 یا P_5 به آن منتقل شده بودند (نمودار ۴ سمت چپ و تصویر ۴).

انتقال به خاک: تصویر ۵ گیاهان انتقال‌یافته به خاک را نشان می‌دهد. درصد زنده‌مانی گیاهان انتقال‌یافته به خاک پس از یک، دو و سه ماه محاسبه شد. نتایج نشان داد که تیمار سالیسیلیک اسید تاثیری در موفقیت انتقال به خاک ندارد. اما تیمار کاربندازیم به‌طور معنی‌داری باعث افزایش درصد زنده‌مانی گیاهان نسبت به شاهد می‌شود ($P<0.05$). تحت تاثیر این قارچ‌کش طی سه ماه صد درصد گیاهان زنده می‌مانند(جدول۳).

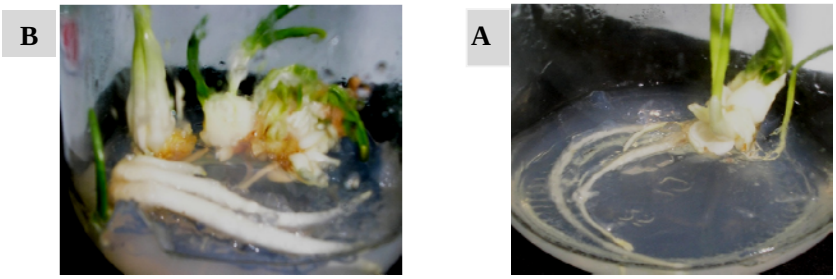
بحث

مطابق نتایج حاصل از این پژوهش مشخص شد که در *Narcissus tazetta* القا اندام‌های هوایی به مقادیر هورمون

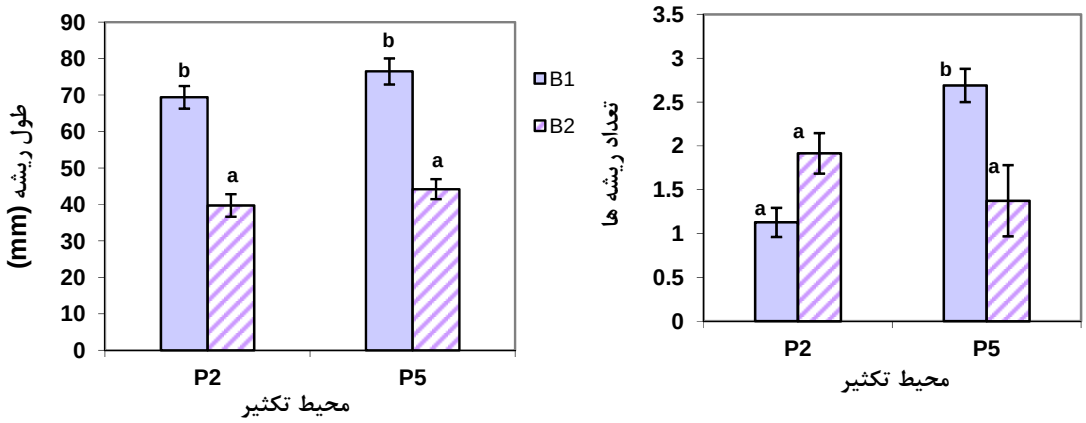
NAA وابسته نبوده ولی مقادیر هورمون BAP در القا مؤثر است. به طوری که در حضور مقادیر بالاتر هورمون(۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP) اندام‌های هوایی بیشتری القا می‌گردد که با نتایج Santos و همکاران (۱۸) کاملاً تطابق دارد.

جدول ۳- درصد زنده‌مانی گیاهان ریزازدیادی شده نرگس پس از انتقال به خاک تحت پیش تیمار سالیسیلیک اسید و تیمار کاربندازیم

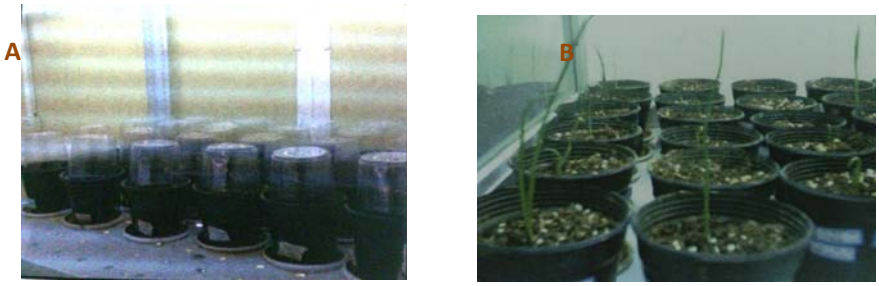
تیمار	ماه اول	ماه دوم	ماه سوم
شاهد	۷۵	۷۵	۸۷/۵
سالیسیلیک‌اسید	۶۸/۷۵	۶۲/۵	۵۶/۲۵
کاربندازیم	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰



تصویر۴ – تولید ریشه در محیط‌های تشکیل پیاز A: MS بدون NAA B: MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA



نمودار۴- تاثیر محیط‌های تکثیر(P) و تشکیل پیاز(B) بر سمت راست : تعداد و سمت چپ : طول ریشه‌های تولید شده در قاعده پیازهای ریزازدیادی شده گیاه نرگس هفتاد روز پس از انتقال P_2: MS با BAP + NAA (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر P_5: MS تغییریافته با NAA + BAP (۰/۱۲+ ۲) میلی‌گرم بر لیتر B_1 : MS بدون هورمون B_2 : MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA



تصویر ۵- گیاهان نرگس انتقال‌یافته به خاک A: بمنظور حفظ رطوبت با درپوش پوشیده شده‌اند B: پس از برداشتن درپوش C: پیازهای شاهد پس از یک‌ماه D: پیازهای تحت تیمار کاربنداریم پس از یک‌ماه E: پیازهای تحت پیش تیمار سالیسیلیک‌اسید پس از یک‌ماه

آنها گزارش نمودند که مقدار اکسین تأثیری بر القا اندام-هوایی *N. bulbocodium* ندارد ولی نوع اکسین مهم است. در گیاه *Crinum* نیز BAP در القاء اندام هوایی مؤثر بوده ولی NAA اثر بازدارنده دارد و بیشترین تعداد شاخه در حضور ۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP و فقدان NAA حاصل می‌گردد (۲۳). همچنین بلندی و همکاران (۱) نشان دادند که بیشترین تعداد شاخه در ریزازدیادی پایه رویشی GF677 در تیمار ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و بدون حضور NAA تولید می‌شود.

نتایج حاضر نشان داد بر خلاف تعداد اندام‌های هوایی القاء شده، طول آنها تحت تأثیر هر دو هورمون سیتوکینین و اکسین قرار می‌گیرد. به‌طوری‌که با افزایش مقادیر BAP و NAA طول برگ‌ها کاهش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های Torres & Carlis (۲۲) همخوانی دارد. بررسی‌های آنها مشخص نمود که تعداد اندام‌های هوایی القا شده در گیاه *Camellia sasanqua* فقط تحت تأثیر سیتوکنین قرار می-گیرد درحالی‌که افزایش طول آنها وابسته به هر دو هورمون اکسین و سیتوکینین می‌باشد. در گیاه *Myrica* نیز در غلظت های کمتر کینتین طول اندام‌های هوایی افزایش می یابد ولی بطور قابل‌توجهی تعداد آنها کاسته می‌شود (۷). یاری و همکاران (۲) نیز در مطالعه بر روی رقم Vendetta گل سرخ یافتند کاربرد ۴/۴ میکرومولار BA همراه با ۰/۲۷ میکرومولار NAA بیشترین طول شاخه را ایجاد می‌کند. مطالعه گیاهان جهش‌یافته تنباکو و آرابیدوپسیس که بترتیب مقادیر کم و زیاد سیتوکینین را بیان می کنند، مشخص نمود که سیتوکینین‌ها تشکیل مریستم‌های شاخه‌ای را القا می‌کنند و باعث ایجاد سلول‌های برگی بیشتری می‌شوند. این در-حالی است که این هورمون موجب کاهش اندازه آنها می-گردد. Werner و همکاران (۲۵) نتیجه گرفتند که سیتوکینین از طریق تغییر سرعت تقسیم سلولی و رشد سلول‌ها در نواحی مریستمی اثرات خود را اعمال می‌کند (۱۷، ۲۵).

به نظر می رسد عامل دیگری که بر تعداد و طول اندام‌های هوایی القا شده موثر است، نوع محیط پایه می‌باشد. برخی گونه‌ها پاسخ مشابهی به تمام محیط‌ها می‌دهند و سایر گونه‌ها محیط خاصی را جهت رشد و تکثیر قطعات جدا-کشت ترجیح می‌دهند. نتایج پژوهش حاضر نیز مشخص نمود که در محیط MS تغییریافته نسبت به محیط MS تعداد بیشتری اندام هوایی القا می‌شود ولی طول آنها کوتاه-تر می‌باشد. یکی از اختلافات دو محیط این است که در محیط MSتغییریافته، KH_2PO_4 جایگزین NaH_2PO_4 شده است. افزودن KH_2PO_4 به محیط، سبب رشد رویشی بهتر می‌شود (۱۱). Haque و همکاران (۱۱) عنوان نمودند که افزودن ۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ترکیب KH_2PO_4 به محیط کشت گیاه سیر، موجب افزایش تعداد شاخه و ریشه می‌شود ولی طویل شدن اندام‌های هوایی را ممانعت نموده و وزن تر آنها را کاهش می‌دهد که با نتایج مطالعه حاضر در مورد گیاه *N. tazetta* کاملاً مطابقت دارد. یکی دیگر از اختلافات دو محیط این است که در محیط MS تغییریافته

کازئین هیدرولیزات افزوده شده است. گاهی عصاره‌های گیاهی و عصاره مخمر بعنوان مکمل به محیط کشت افزوده می‌شوند از جمله آنها می توان به کازئین هیدرولیزات اشاره نمود که اثرات محرک مشابه شیره نارگیل دارد (۹). Ahmad و Anis (۳) مشاهده نمودند افزودن کازئین هیدرولیزات به محیط کشت گیاه *Cucumis sativus* موجب افزایش تعداد اندام‌های هوایی می‌شود. اثرات کازئین هیدرولیزات به علت دارا بودن نیتروژن آلی (مخلوطی از آمینواسیدها) می‌باشد (۲۱). این نتایج با پژوهش حاضر همخوانی دارد.

در مطالعه حاضر اثر NAA بر تولید پیاز گیاه نرگس مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این هورمون بر تعداد و قطر پیازها تأثیری ندارد که با نتایج Santos و همکاران (۱۸) همخوانی دارد. این درحالی است که در گونه *N. jonquilla* و در گیاه سیر در حضور NAA تعداد و قطر پیازها افزایش می‌یابد (۱۰، ۱۴). بنابراین تأثیر این هورمون بستگی به گونه گیاهی دارد.

نتایج این پژوهش نشان داد وجود هورمون NAA تأثیری بر تعداد ریشه ندارد که این نتایج با یافته‌هایNagakubo و همکاران(۱۴) مطابقت دارد. این محققین بیان کردند در گیاه *Allium sativum* هم در حضور هورمون NAA و هم در فقدان آن ریشه دهی در قاعده پیازها می‌تواند صورت پذیرد. Chow و همکاران (۱۰) با مطالعه بر روی دو رقم گیاه *N. jonquilla* یافتند که پاسخ آنها به هورمون NAA متفاوت است. به‌طوری‌که در رقم Hawera بیشترین تعداد ریشه در محیط MS فاقد NAA و در رقم St.Kaverne در محیط MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA حاصل می‌گردد. اما نتایج پژوهش حاضر نشان داد که NAA بر طول ریشه به طور معنی‌داری مؤثر می‌باشد. به‌طوری‌که در حضور NAA ریشه‌ها ضخیم، قطور و کوتاه‌تر می‌شوند و در غیاب این هورمون ریشه‌ها طویل و نازک‌تر می‌باشند. این نتایج با مشاهدات Santose و همکاران (۱۸) در مورد گیاه *N. bulbocodium* کاملا مطابقت دارد. کمترین وزن پیاز برای انتقال به خاک ۰/۲۵ گرم است که در این تحقیق رعایت شد (۲۰). در صورتی که انتقال به خاک موفقیت‌آمیز باشد، افزایش طول، تعداد، سطح و ضخامت برگ‌ها، افزایش رشد ساقه‌ها و ریشه‌ها حاصل می‌شود (۱۲) که در پژوهش حاضر نیز مشاهده گردید. در این مطالعه استفاده از تیمار قارچ‌کش باعث موفقیت بیشتر انتقال به خاک می‌شود که با نتایج Santose و همکاران (۱۸) همخوانی دارد. آنها گزارش نمودند که در صورت تیمار با قارچ‌کش درصد زنده‌مانی گیاهان *N. bulbocodium* ۹۵٪ می‌باشد.

نتیجه‌گیری

هدف این پژوهش تکثیر سریع و تولید تعداد بیشتر پیاز-های گیاه نرگس به‌کمک کشت بافت در مدت زمان کوتاه بود که نتایج نشان داد بهترین محیط برای القای اندام‌های هوایی بر روی قطعات جداکشت محیط MS تغییریافته دارای ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA است که با انتقال این اندام‌ها به محیط MS دارای ۲میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشترین تعداد اندام‌های هوایی حاصل می‌شود. سپس برای تولید بیشترین تعداد پیاز، اندام‌های هوایی باید در محیط MS شامل ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۹٪ ساکارز قرار گیرند. با این روش در مدت ۷ ماه تعداد قابل-توجهی پیاز از یک پیاز مادر می‌توان به دست آورد که این گیاهان باززایی‌شده پس از انتقال به خاک در صورت تیمار با قارچ‌کش صد درصد بقا خواهند داشت. بنابراین روش حاضر می‌تواند برای این گیاه دارویی مهم بعنوان روشی سریع و اقتصادی استفاده شود.

منابع

۱- بلندی الف ر.، حمیدی ح.، رضاقلی ع الف. ۱۳۹۵. تأثیر محیط کشت و هورمون بر تکثیر پایه رویشی GF677 در کشت درون شیشه ای. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۹ ، شماره ۱، ۱۴-۱.

۲- یاری ف.، موسوی الف.، مستوفی ی.، سیدی س. م.، زمانی ذ.، 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. جلد ۲۶ ، شماره ۱، ۱۱۰-۹۹.

3- Ahmad, N.; Anis, M.; 2005; *In vitro* Mass Propagation of *Cucumis sativus* L. from Nodal Segments; Turk. J. Bot., 29, 237-240.

4- Arrigoni, O.; De Gara, L.; Pacilla, C.; 1997; Lycorine: a powerful inhibitor of L- galactono - γ - Lantone dehydrogenase activity; J. Plant Physiol., 150, 362-364.

5- Asjes, C.J.; 1996; Control Situation of Virus diseases in *Narcissus* in the Netherlands, Acta Hort., 432, 166-74.

6- Bergonon, S.; Codina, C.; Bastida , J. ; 1992 ; The shake liquid culture as an alternative way to the multiplication of *Narcissus* plants; Acta Hort., 325 , 447-51.

7- Bhatt, I. D.; Dhart, U.; 2004; Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch. – Ham. Ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya; African J. of Biotechnology, 3, 534 - 40.

8- Bi, Y.R.; Yung, K.M.; Wong, Y.S.; 1998; Physiological effects of narciclasine from the mucilage of *Narcissus tazetta* L. bulbs; Plant Sci., 135, 103-108.

9- Butenko, R.G.; 1968; In: Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis, Jeruslem, 40-45.

10- Chow, Y.N.; Selby, C.; Harvey, B.M.R.; 1992; Stimulation by sucrose of *Narcissus* bulbil formation *in vitro*; J. Hort. Scri. ; 67, 289-93.

11- Haque, M. SH.; Wada, T.; Hattori, K.; 2003; Effect of sucrose, mannitol and KH_2PO_4 on proliferation of root tip derived shoots and subsequent bulblet formation in Garlic; Asian J. Plant Sci., 2, 903-908.

12- Kadleček, P.; Tichá, I.; Čapková, V.; Schäfer, C.; 1998; Acclimatization of micropropagated tobacco plantlets. - In: Garab, G. (ed.): Photosynthesis: Mechanisms and Effects. Vol. V. PP. 3853-3856. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston –London.

13- Lopez, S.; Armand-ugon, M.; Bastida, J.; 2003; Anti-human immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) activity of Lectins from *Narcissus* species; Planta Med., 69, 109-12.

14- Nagakubo, T.; Takaichi, M.; Oeda, K.; 1997: Micropropagation of *Allium sativum* L. (Garlic), In: Bajaj, Y.P.S (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 39, Springer–Verlag Berlin, 1-19.

15- Rees, A.R.; 1969; The initiation and growth of *Narcissus* bulbs; Ann. Bot., 33, 277-88.

16- Rukiye, T.; 2003; Rooting and acclimatization of *in vitro* micropropagated snowdrop (Galanthus ikariae baker.) bulblets; akdeniz üniversitesi ziraat fakültesi dergisi; 16(2),121-126.

17- Rupp, H. M.; Frank, M.; Werner, T.; Strnad, M.; Schmülling, T.; 1999; Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing Arabidopsis thaliana indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem; The Plant J.,18(5), 557-63.

18- Santos , J.; Santos , I.; Salema , R.; 1998; *In vitro* production of bulbs of *Narcissus bulbocodium* flowering in the first season of growth; Scientica Horticulture, 76, 205-17.

19- Squires, W.M.; Langton, F.A.; 1990; Potential and limitation of *Narcissus* micropropagation: an experimental evaluation; Acta Hort., 266, 67-77.

20- Steinitz, B.; Yahel, H.; 1982; *In vitro* propagation of *Narcissus tazetta*; Hort. Sci., 17, 333-4.

21- Straus, J.; 1960; Maize endosperm tissue grown *in vitro*: Development of a synthetic medium; Am. J. Bot., 47, 641- 46.

22- Torres, K. C.; Carlisi, J. A.; 1989; Shoot and root organogenesis of *Camellia sasanqua*; Plant Cell Rep., 5, 381-384.21.

23- Ulrich, M. R.; Davies, F. T.; Koh, Y. Ch.; Duray, Sh. A.; Egilla, J.N.; 1999; Micropropagation of *Crinum* 'Ellen Bosanquet' by tri-scales; Scientia Horticulturae, 82, 95-102.

24- Vasil, I.K.; 1984; Cell culture and Somatic cell genetics of plants, Vol (2), Academic press, INC.

25- Werner, T.; Motyka, V.; Strnad, M.; Schmülling, T.; 2001; Regulation of plant growth by cytokinin; Proc. Natl. Acad. Sci., 28, 98(18), 10487-92.

26- Wickremesinhe, E.R.M.; Holcomb, E.J.; Arteca, R.N.; 1994; A practical method for the production of flowering easter lilies from callus cultures; Sci. Hort., 60, 143-52 .

Micropropagation of *Narcissus tazetta* L. treated with different hormones and transfer of plantlets to the soil

Soleimani S.H.[1] , Bernard F.[2] and Fazeli Nejad S.[2]

[1] Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahr-e- Qods Branch, Islamic Azad University, Shahr-e- Qods, I.R. of Iran

[2] Dept. of Botany, Faculty of Biology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Narcissus tazetta L. of the Liliaceae family, despite the high demand market has very slow vegetative propagation. For the rapid propagation, in this study micropropagation of *Narcissus* under different hormones and soil transfer of plantlets was investigated. Micropropagation of this plant was done in three procedures: induction, proliferation and bulb production from explants. It was found that the best medium for shoot induction is modifiedMS+ 4 mg l^{-1} BAP +0.12 mg l^{-1} NAA and shoot clumps which were cultured on the MS+2 mg l^{-1} BAP +0.12 mg l^{-1} NAA medium, showed the most proliferation. Transferring these shoot clumps to MS+ 9% sucrose + 0.1 mg l^{-1} NAA medium resulted in maximum bulbs production. After 4 months, the bulbs were 12–20 mm in diameter. In this medium, roots were thicker and shorter than the ones grown without NAA. The bulbous plants treated with salicylic acid and transferred to soil and then treated with Carbendazim fungicide. Carbendazim increased survival percent (100%) but salicylic acid did not have any effect on success of transferring to soil. The high number of bulbs and high percentage of survival of regenerated plants in soil indicated that micropropagation is an effective alternative method compare to traditional method.

Key words: *Narcissus tazetta*, Micropropagation, Bulb production, Hormones