بررسی کشت بافت نرگس (*Narcissus tazetta*) با کمک هورمونهای BA وIAA

معصومه احمدی مجد (١)، حسن ساری‌خانی (٢)، مهرداد چایی‌چی (٣) عبدالکریم کاشی (٤)
١- دانشجوی کارشناسی‌ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ٢- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ٣- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، ٤- استاد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.

این پژوهش به منظور بررسی روش های ضدعفونی و ریزازدیادی نرگس گونه *Narcissus tazetta* انجام گرفت. بدین منظور پیازهای این گونه نرگس از شمال کشور جمع آوری شد و پس از تیمارهای مختلف گندزدایی سطحی، ریزنمونه های دوفلسی پیاز در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) کشت شدند. نمونه ها پس از کشت، در اتاقک رشد با شرایط ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی و دمای ۱°C± ۲۵ نگهداری شدند. کمترین میزان آلودگی در تیمار قرار دادن پیاز در آب گرم ۵۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه و استفاده از هیپوکلریت سدیم مشاهده شد. برای بررسی شاخه زایی از هورمون بنزیل آدنین در چهار سطح (۰ ، ۰/۵ ، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) استفاده شد. سپس برای افزایش شاخه زایی از هورمون ایندول استیک اسید در چهار سطح (۰ ، ۰/۵ ، ۱ و۲ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر BA استفاده شد. صفات طول برگ و تعداد پیازچه پس از ٤ و ٦ هفته اندازه گیری شد. نتایج نشان داد اثر هورمون BA بر رشد طولی برگ ها در سطح احتمال یک درصد معنی دار شده و تولید پیازچه پس از ٦ هفته در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شد. بیشترین رشد طولی برگ ها با میانگین ٢/٦٥ سانتی متر در محیط کشت حاوی ٢ میلی گرم در لیتر BA و کمترین رشد طولی برگ ها با میانگین ۰/۷۹سانتی متر در تیمار شاهد مشاهده شد که با غلظت های ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی داری نداشت. اثر هورمون IAA در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر BA بر رشد طولی برگ ها و تولید پیازچه معنی دار نشد و در بین غلظت های مختلف هورمون IAA اختلاف معنی دار مشاهده نگردید. استفاده از هورمون سایتوکینین برای تحریک رشد، افزایش رشد طولی برگها و تحریک به تولید پیازچه مؤثر بود.

مقدمه:

نرگس از گیاهان زینتی ارزشمند و متعلق به خانواده تک لپه‌ای آماریلیداسه و یکی از ٦ جنس بزرگ گل‌های پیازدار در جهان است که پس از لاله در مقام دوم کشت و کار قرار دارد و به عنوان گل شاخه بریده و گیاه گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (دی هرتوق و همکاران، ١٩٩٦). سرعت ازدیاد جنسی و رویشی نرگس بسیار کند است و ممکن است در طی یک سال پیازهای دختری بسیار کمی تولید کند، به طوری که تخمین زده شده است که ۳۰- ۲۵ سال طول می‌کشد تا پیازهای کافی برای فروش در سطح تجاری تولید شود (سیج و همکاران،۲۰۰۰). ازدیاد جنسی از طریق بذر، روش استفاده شده توسط بهنژادگران است که برای تولید نتاج جدید در بعضی از گونه‌های نرگس مورد استفاده قرار می‌گیرد (هانکس،۲۰۰۲). همه پیازهای تولید شده قابلیت گلدهی ندارند و فقط پیازهای درشت گل خواهند داد. تعدادی از پیازها نیز به علت آلودگی و پوسیدگی صفحه پایگاهی از بین میروند. بعضی از پیازها باید یک دوره رکود را بگذرانند تا به گلدهی برسند بنابراین فاصله بین کاشت پیاز و به دست آوردن پیازهای استاندارد برای گلدهی بسیار طولانی است (هانکس، ١٩٧٩). ازدیاد نرگس به کمک روش‌های دوفلسی و قاشی با موفقیت انجام شده است (هانکس و همکاران،١٩٨٣). ریزازدیادی با استفاده از هورمون‌های اکسین و سایتوکینین و ریزنمونه‌های مختلف مانند فلس‌های دوتایی، ساقه گل‌دهنده، برگ و کالوس در تعدادی از گونه‌های نرگس سبب بهبود تکثیر این گیاه شده است (سانتوز و همکاران، ١٩٩٨ و سیج و همکاران،٢٠٠٠). کشت بافت یکی از تکنیک‌هایی است که منجر به تولید گیاهان عاری از آلودگی شده و تعداد زیادی گیاهچه از یک گیاه واحد با این روش به دست می آید. همچنین پیازهای حاصل از کشت بافت سریعتر به گلدهی می‌رسند (سانتوز و همکاران، ١٩٩٨). در این

پژوهش روش‌های ضدعفونی و ریزازدیادی نرگس *N.tazetta* با کمک هورمونهای بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید بررسی شده است.

مواد و روش‌ها:

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان انجام شد. برای انجام این پژوهش پیازهای نرگس گونه *N. tazetta* از گلخانه‌ای در شمال کشور تهیه گردید. در این آزمایش از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار به عنوان محیط کشت پایه استفاده شد. pH محیط کشت قبل از اضافه کردن آگار روی ۰/۱± ۵/۷ تنظیم شد و پس از حل شدن آگار به میزان ۳۰ میلی‌لیتر در شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری توزیع گردید و در شرایط دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. برای شروع عملیات کشت، پیازها ابتدا به طور کامل تمیز شده، فلس‌های چروکیده و نامطلوب حذف، و پیازها با مایع ظرفشویی شسته شدند و تیمارهای مختلف گندزدایی سطحی مورد بررسی قرار گرفت. در اولین تیمار از اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲٪ و ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه و ۵ دقیقه استفاده شد. در دومین تیمار از آب $40^{°c}$ به مدت ۲۰ دقیقه و هیپوکلریت سدیم مانند تیمار قبل استفاده شد. در سومین تیمار پیازها پس از تیمار آب گرم $55^{°c}$ به مدت ۱۰ دقیقه، در محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از برش به مدت ۸ دقیقه با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی سطحی شدند. پس از جدا کردن قسمت‌های لزج، ریزنمونه‌های دو فلسی (دو فلس و جوانه وسط آنها با قسمتی از صفحه پایگاهی) به صورت عمودی به گونه‌ای که صفحه پایگاهی درون محیط کشت قرار گیرد، کشت شدند. برای بررسی شاخه‌زایی از هورمون بنزیل آدنین (BA) در ٤ غلظت (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. سپس برای افزایش رشد گیاهچه‌های بدست آمده از هورمون ایندول استیک اسید (IAA) در چهار غلظت (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین استفاده شد. هر دو آزمایش فوق در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و دو شیشه در هر تکرار و سه گیاهچه در هر شیشه انجام شدند و در زمان‌های ٤ و ٦ هفته پس از کشت صفات طول برگ و تعداد پیازچه اندازه‌گیری شدند. تجزیه آماری داده‌های رشدی گیاهچه ها توسط نرم افزار SAS صورت گرفت و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث:

کمترین میزان آلودگی در تیمار سوم مشاهده شد. در این تیمار ماده لزجی که از فلس‌های پیاز خارج می‌شد خیلی کمتر شد و احتمال آن وجود دارد که حرارت باعث از بین رفتن یا کمتر شدن تولید این ماده شده است. نتایج نشان داد اثر BA بر رشد طولی برگ‌ها پس از ٤ و ٦ هفته در سطح احتمال یک درصد و تولید پیازچه پس از ٦ هفته در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. بیشترین رشد طولی برگ‌ها با میانگین ۲/٦۵ سانتی متر در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و کمترین رشد طولی برگ‌ها در تیمار شاهد مشاهده شد (۰/۷۹ سانتی‌متر) که تیمار شاهد با تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار نداشت. کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین باعث رشد جوانه‌ها و در نهایت تولید پیازچه گردید. در تیمارهای شاهد و ۰/۵ میلی‌مولار هیچ پیازچه‌ای تولید نشد (جدول ۱). اثر غلظت‌های مختلف هورمون IAA در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بر رشد طولی برگ‌ها پس از ٤ و ٦ هفته و تولید پیازچه پس از ٦ هفته معنی‌دار نشد (داده ها آورده نشده اند). در بسیاری از گیاهان پیازدار ریزنمونه‌های دو فلسی پیاز برای تولید پیازچه استفاده شده است و تولید موفق گیاهچه از فلس‌های دوتایی در نرگس (سانتوز و همکاران، ۱۹۹۸) گونه‌های لیلیوم (هان و همکاران، ۲۰۰۵) و کرتانتوس (موران و همکاران، ۲۰۰۳) گزارش شده است. در پژوهش حاضر استفاده از ریزنمونه‌های دوفلسی پیاز نتیجه مطلوبی را داشت. تولید پیازچه و رشد گیاهچه در محیط کشت MS بسیار کند بود اما استفاده از سایتوکینین برای تحریک رشد، افزایش

رشد طولی برگ‌ها و تحریک به تولید پیازچه موثر بود به طوریکه غلظت بالای آن باعث تولید تعداد مطلوب پیازچه گردید. به طور کلی سایتوکینین‌ها پرآوری و تولید پیازچه را افزایش می دهند. همچنین به دلیل تاثیر بر تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلولی باعث رشد طولی بهتر گیاهچه‌ها می‌شود که با نتایج به دست آمده در گیاه کرتانتوس و سلیویا (ران و سیمپسون، ۲۰۰۵) مطابقت دارد. در بین سایتوکینین‌ها BA به علت تأثیر زیاد آن در تشکیل شاخه نابجا به میزان زیادی در پژوهش‌های درون شیشه‌ای در گیاهان مختلف به کار رفته است (هان و همکاران، ۲۰۰۵). در خصوص تولید پیازچه پس از ٤ هفته در هیچ تیماری پیازچه تولید نشد و پس از ٦ هفته پیازچه‌ها روی برگ‌های پیر به وجود آمدند. به نظر می‌رسد برای تولید پیازچه، گیاهچه‌ها باید مدت زمان بیشتری در محیط کشت قرار گیرند که این امر با نتایج سانتوز مطابقت دارد که در یک دوره ۷۰ روزه، پیازچه‌های کوچک روی برگ‌های پیر به وجود آمدند.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف هورمون BA بر رشد طولی برگ‌ها و تولید پیازچه.

غلظت BA	رشد طولی برگ ها (سانتی‌متر)		تولید پیازچه
(میلی‌گرم در لیتر)	پس از ٤ هفته	پس از ٦ هفته	پس از ٦ هفته
۰	۰/٦۷b	۰/۷۹ b	۰/ ۰b
۰/۵	۱/۱۸ b	۱/۳۵ b	۰/۰ b
۱	۱/۲۲ b	۱/٦۷ b	۰/۲۵ ab
۲	۲/۲۷a	۲/٦۵a	۰/۵۰ a

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون چند دامنه‌ای دانکن است

(الف)

(ب)

شکل ۱- الف- پیازچه‌های تولید شده در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیترIAA ، ۸ هفته پس از کشت. ب- گیاهچه‌های تولید شده در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA پس از ٦ هفته.

منابع:

Han, B.H., Yae, B.W., Yu, H. J., & Peak, K.Y. 2005. Improvement of *in vitro* micro propagation of Lilium oriental hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. Scientia Horticulturae, 103: 351-359.

Hanks, G.R. 2002a. Commercial production of Narcissus bulbs. In: G.R. Hanks (ed), Narcissus and Daffodil. Taylor & Francis Inc., pp: 53-131.

Moran, G.P., Calque, R.,Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. 2003. Mass propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. Scientia Horticulturae, 98:49-60.

Ran, Y., & Simpson, S. 2005. *In vitro* propagation of the genus *Clivia*. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 81: 239 -242.

Sage, D.O., Lynn, J., & Hamatt, N. 2000. Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne. Plant Science, 150: 209- 216.

Santos, J., Santos, I., & Salema, R. 1998. *In vitro* production of bulbs of *Narcissus bulbocodium* flowering in the first season of growth. Scientia Horticulturae, 76: 205-217.

study of micropropagation Narcissus with BA and IAA

Abstract:
The present research was carried out in order to investigate the methods of surface disinfection and micropropagation in *Narcissus tazetta* ornamental plant. For this purpose, The bulbs of *N. tazetta* species were collected from the north of Iran and after surface disinfection, bulb twin-scale explants were cultured on MS medium. after culture explants were maintained in growth room at at 25 ± 1 ˚ c and under a 16 h per day photoperiod. The lowest contamination rate was observed for 10 min 55 ˚ c hot water treatment followed by sodium hypochlorite. In order to shoot proliferation BA at four concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mg/l) was used. Then, for more shoot proliferation IAA at four concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mg/l) in combination with the BA (2mg/l) was used. The leaf growth and number of bulblet were measured 4 and 6 weeks after culture. The results showed the significant effect of BA on leaf length at the 1% and bulblet production after 6 weeks at the 5%. The highest leaf length with mean of 2.65 cm was obtained in MS medium containing 2mg/l BA. The lowest leaf length with mean of 0.79 cm was observed in control treatment which showed not significant differences with 0.5 and 1 mg/l concentrations BA. The effect of IAA in combination with 2mg/l BA on leaf length and bulblet production was not significant. there was no significant difference among the IAA concentrations. The use of cytokinin for growth, the leaf growth increase and bulblet produce is effect.
Key words: Narcissus, micropropagation, BA, IAA.