DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2012.3052

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۳۶۹-۳۵۶ (۱۳۹۱)

بررسی اثر ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر تولید کالوس و شاخساره‌زایی در نرگس شیراز (*Narcissus tazetta* L.)

نسیم ایران‌پاک[۱]*، سپیده کلاته جاری[۲] و سیامک کلانتری[۳]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
پست الکترونیک: n_Iranpak@yahoo.com
۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۹

چکیده

نرگس شیراز با نام علمی *Narcissus tazetta* L. متعلق به جنس Narcissus و تیره Amaryllidacea بومی ایران می‌باشد. گل‌های زیبای این گیاه در فصول پاییز و زمستان علاوه بر ارزش زینتی، به علت معطر بودن و تولید اسانس از ارزش دارویی بالایی نیز برخوردار است. از این‌رو تکثیر سریع و تولید تعداد زیادی گیاه در مدتی کوتاه در این گل زیبای بومی و دارویی مورد توجه می‌باشد. تکثیر سنتی این گیاه با روش تقسیم سوخ می‌باشد که روشی پُرهزینه و وقت‌گیر است. کشت درون شیشه‌ای این گیاه به‌منظور تولید کالوس و امکان استخراج مواد مؤثره از کالوس و به‌منظور تولید گیاهچه‌های کامل برای کاربرد زینتی و دارویی از اهمیت خاصی برخوردار است. از این‌رو در این آزمایش امکان تولید کالوس از ریزنمونه‌های مختلف نرگس شیراز بررسی شد و همچنین امکان تکثیر گیاه با استفاده از ریزنمونه‌های پیاز مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های برگ و فلس از قاعده سوخ تهیه شدند و پس از گندزدایی به محیط کشت پایه MS منتقل شدند. ترکیب‌های هورمونی جهت القاء کالوس (پینه) از فلس سوخ شامل غلظت‌های مختلفی از NAA و 2,4-D همراه BAP بود. جهت القای کالوس (پینه) از قاعده برگ، محیط کشت پایه MS همراه با غلظت‌های مختلفی از مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA در ترکیب با BAP مورد استفاده قرار گرفت. همچنین جهت القاء شاخه از قاعده سوخ، محیط کشت MS همراه با غلظت‌های مختلفی از مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA و IBA همراه BAP بود. به همه محیط‌های کشت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار اضافه شد. ریزنمونه‌ها جهت تولید کالوس در شرایط تاریکی و جهت تولید شاخساره در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نتایج آزمایش نشان داد ریزنمونه‌های سوخ در تیمار هورمونی NAA ۶ mgl^{-1} در محیط کشت MS بیشترین میزان کالوس را تولید کردند که ۳۵٪ از ریزنمونه‌ها کالوس با قطر ۸ mm تولید کردند و جهت تولید شاخه بهترین تیمار هورمونی BA (۲ mgl^{-1}) و IBA (۱ mgl^{-1}) بودند که بیشترین تعداد شاخساره (۲ عدد) را با طول ۵ mm تولید کردند. در این محیط کشت میزان باززایی شاخساره‌ها از ریزنمونه‌ها ۵۰٪ بود. البته ریزنمونه‌های قاعده برگ در تیمارهای مختلف هورمونی هیچ کالوسی را تولید نکردند.

واژه‌های کلیدی: نرگس شیراز (*Narcissus tazetta* L.)، ریزازدیادی، تنظیم‌کننده رشد، شاخساره‌زایی، کالزایی.

مقدمه

گل نرگس یکی از گیاهان پیازی زینتی مناطق معتدل است. نرگس شیراز با نام علمی *Narcissus tazetta* L. از خانواده آماریلیداسه، گیاهی تک‌لپه و چندساله است (Heath & Heath, 2001). جنس *Narcissus* شامل ٦٥ گونه و ۲۰۰۰۰ رقم هیبرید و ٢٦ گونه وحشی می‌باشد (Blanchard, 1990) که یکی از مهمترین گونه‌ها، نرگس تازتا با پوشش گل مسطح و تاج گل نیمه‌کروی می‌باشد (Heath & Heath, 2001). تکثیر این گیاه به دو روش غیرجنسی (تقسیم سوخ) و جنسی (بذر) می‌باشد و چون تکثیر اصلی آن به‌وسیله سوخ می‌باشد و تکثیر به این روش بسیار کُند است. بنابراین از طریق تکثیر رویشی تعداد پیازهایی که جدید تولید می‌شود و جهت تکثیر گیاه استفاده می‌شود کم است، از این‌رو جهت تکثیر با سرعت زیاد و همچنین تولید گیاهان عاری از بیماری تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه بسیار مورد توجه می‌باشد (Rees, 1969). گل‌ها در برخی از گونه‌های نرگس بسیار معطر می‌باشند و نرگس شیراز از آن جمله است. از عطر گل‌ها در صنایع عطرسازی استفاده می‌شود که از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار می‌باشد (Barrett & Pannell, 1999). البته نرگس‌هایی که برای استحصال عطر کاشته می‌شوند عبارتند از: نرگس شیراز، پوتیکوس و جان کوئیلا که ترکیب‌های موجود در اسانس گل آنها شامل مونوترپن‌ها، پارافین‌ها، فنل‌ها، آلدئیدها، استرها و الکل‌ها می‌باشند. اما ترکیب‌هایی که بخش مهم عطر و بوی گل را تشکیل می‌دهند استرها، اترها و فنل‌ها می‌باشند. گیاه برای جلوگیری از تبخیر آب اسانس را می‌سازد. اسانس این گیاه علاوه بر مصرف در صنایع عطرسازی، در صنعت دارویی نیز کاربرد دارد و خاصیت ضدباکتری و ضدتورم دارد (Ehret *et al.*, 1992). پژوهش‌های مختلفی در مورد ترکیب‌های شیمیایی اسانس نرگس انجام شده‌است. Sakai (۱۹۷۹) ترکیب‌های اسانس گونه *N. tazetta* را مورد بررسی قرار داد و ترکیب‌های زیادی ازجمله ایندول و پارا–سیمن را پیدا کرد. با توجه به اینکه تولید کالوس در این گیاه اهمیت خاصی دارد و از طرفی انگیزش کالوس در این گیاه بسیار مشکل است، پژوهش‌های اندکی در دنیا جهت تولید کالوس در گونه‌های مختلف نرگس انجام شده‌است. در پژوهشی برای پینه‌زایی ریزنمونه‌ها از پیاز نرگس، محیط کشت MS با ترکیب‌های هورمونی ٦ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با تاریکی سبب تسریع در تشکیل بافت پینه گردید (Sage, 2005). پژوهش‌های انجام شده نشان داد که محیط کشت MS و شرایط تاریکی بر روی کشت درون شیشه‌ای قاعده برگ گلایل سبب تسریع در تشکیل بافت پینه گردید (Wilfret, 1971). تحقیقات نشان داد که برای پینه‌زایی از کشت قطعات پیاز در کشت درون شیشه‌ای سیر، اکسین‌های 2,4-D (۰/۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، 2,4,5-T (۰/۳ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) و Picloram (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) کاربرد دارند (Nagasawa & Finer, 1988). پژوهش‌های انجام شده نشان داد که برای پینه‌زایی پیازهای توپر گلایل در کشت درون شیشه‌ای، NAA ٤ میلی‌گرم در لیتر و BAP ۲ میلی‌گرم در لیتر کاربرد دارند (Sinha & Roy, 2002). تحقیقاتی که جهت تولید شاخساره از ریزنمونه‌های سوخ در سیر انجام شد نشان داد که محیط کشت MS همراه با هورمون‌های NAA (۱ mgl^{-1}) و BA (۲ mgl^{-1}) اثر مطلوبی دارند (Roksana *et al.*, 2002). در پژوهشی که جهت تولید شاخساره از پیاز لیلیوم در محیط کشت MS انجام شد، مشاهده شد که در ترکیب هورمونی NAA (۰/۵ mgl^{-1}) و BA (۲ mgl^{-1}) تولید

شاخساره افزایش پیدا کرد (Han *et al*., 2004). هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان تولید کالوس از ریزنمونه‌های برگ یا فلس‌های سوخ و نیز امکان تولید شاخساره از ریزنمونه‌های فلس سوخ با استفاده از ترکیب‌های هورمونی مختلف بود.

مواد و روشها

سوخ‌های گیاه نرگس شیراز از محل رویش طبیعی در شیراز جمع‌آوری گردیدند و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه به‌منظور ضدعفونی، ابتدا ریشه‌ها، برگ‌ها و فلس‌های خشک از پیازها جدا شده و سپس پیاز کامل، در قارچ‌کش کاپتان ۵٪ به مدت ۳ ساعت ضدعفونی گردید و در انبار سرد با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای ضدعفونی قطعات جدا کشت پیازها ابتدا پیازها در آب و صابون به مدت نیم ساعت غوطه‌ور شده و پس از شستشو در آب مقطر به مدت ۳ ساعت در دمای ٤٤ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار گرفته و بعد در زیر لامینار در اتانول ۷۲٪ به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی گردید، سپس به مدت ۲ دقیقه در کلرید جیوه ۰/۱٪ همراه با دو قطره توئین ۲۰ قرار گرفتند و در نهایت ۳ مرتبه آب‌شویی با آب مقطر استریل انجام شد. پس از خشک نمودن آنها بین کاغذ صافی، قطعات جدا کشت پیاز به صورت دو فلسی‌هایی به ابعاد تقریبی یک سانتی‌مترمربع متصل به کپه تهیه گردید. جهت تهیه ریزنمونه برگی ابتدا سوخ‌ها از وسط برش داده شدند و ٤-۳ برگ وسط سوخ همراه با کپه از آن جدا شد. برای ضدعفونی، ابتدا برگ‌ها در آب و صابون به مدت نیم ساعت غوطه‌ور شد، سپس با آب مقطر شستشو داده شدند و جهت ضدعفونی در شرایط استریل به زیر لامینار منتقل شدند. در زیر لامینار برگ‌ها ابتدا در اتانول ۷۲٪ به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفته سپس در کلرید جیوه ۰/۱٪ همراه با دو قطره توئین ۲۰ به مدت ۲ دقیقه قرار گرفت و نهایتاً سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. جهت القاء کالوس، ریزنمونه‌های برگ و سوخ به‌صورت ۲ تایی همراه با طبق و جهت القاء شاخه، ریزنمونه سوخ‌های دو فلسی بر روی محیط کشت پایه MS همراه با مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی کشت شدند. جهت القاء کالوس از قاعده سوخ تیمارهای هورمونی شامل NAA، 2,4-D و BAP (جدول ۱) و جهت القاء کالوس از قاعده برگ تیمارهای هورمونی شامل NAA و BAP بودند (جدول ۱). جهت القاء شاخه از قاعده سوخ تیمارهای هورمونی شامل IBA، NAA همراه BA بود (جدول ۲). به همه محیط‌های کشت gl^{-1} ۳۰ ساکارز و gl^{-1} ۸ آگار اضافه شد و pH روی ۵/۷-۵/٦ تنظیم شد. صفات مورد ارزیابی جهت تولید کالوس شامل درصد کالزایی، اندازه کالوس و قطر کالوس و جهت تولید شاخه درصد باززایی ریزنمونه‌ها، تعداد شاخه و طول شاخه بود. ریزنمونه‌ها جهت تولید شاخساره جهت پرآوری و تولید شاخه‌های بیشتر دو مرتبه واکشت شدند (جدول ۲). نتایج حاصل از رشد آنها در هر مرحله واکشت، بعد از یک‌ماه ارزیابی و ثبت شد. شرایط اتاقک رشد جهت نگهداری ریزنمونه‌ها دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، جهت تولید کالوس شرایط تاریکی و جهت تولید شاخساره فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با استفاده از لامپ‌های فلورسنت سفید بود. این آزمایش با طرح پایه کاملاً تصادفی در ٦ و ٤ تکرار و ۳ ریزنمونه در هر تکرار انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و MSTAT و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ انجام گردید.

جدول ۱- ترکیب‌های هورمونی مختلف مورد استفاده جهت تشکیل پینه از قاعده برگ و فلس نرگس در محیط کشت MS

تیمارهای هورمونی مورد استفاده	میزان مصرف (mgl^{-1}) ریزنمونه فلس	میزان مصرف (mgl^{-1}) ریزنمونه برگ
NAA	٦	٦
NAA	٨	٨
2,4-D	١	–
NAA + BA	٤ + ٠/١	٤ + ٠/١
NAA + BA	٤ + ٠/٥	٤ + ٠/٥
NAA + BA	٢ + ٠/١	٢ + ٠/١
NAA + BA	–	٢ + ٠/٥

جدول ۲- ترکیب‌های هورمونی در محیط کشت MS جهت استقرار و پرآوری ریزنمونه‌های فلس سوخ در نرگس شیراز

تیمارهای هورمونی مورد استفاده	میزان مصرف (mgl^{-1})
BA+IBA	٢ + ١
BA+NAA	٢ + ٠/٢٥
BA+NAA	٢ + ٠/١٢
BA+NAA	٤ + ٠/١٢
BA+NAA	٤ + ٠/٥

نتایج

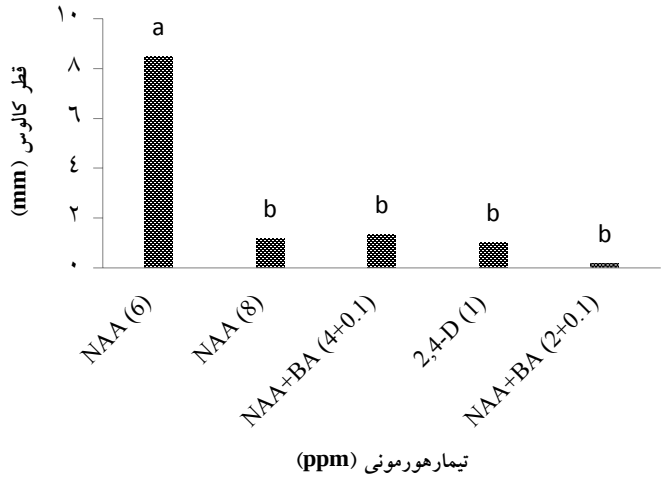
اثر تیمارهای هورمونی بر کالزایی ریزنمونه‌ها

در جدول تجزیه واریانس فقط قطر کالوس در بین تیمارهای هورمونی در سطح ۱٪ معنی‌دار بود و سایر صفات مورد ارزیابی در تیمارهای هورمونی مختلف با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳). در بین تیمارهای هورمونی مختلف بیشترین قطر کالوس در تیمار هورمونی ٦ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد که متوسط قطر کالوس در هر ریزنمونه ۸ mm بود و با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. قطر کالوس در سایر تیمارهای هورمونی که شامل NAA با غلظت بالاتر و یا NAA در ترکیب با سیتوکنین BA یا تیمار هورمونی 2,4-D بود تفاوت معنی‌داری نداشت و تیمارهای مذکور اثر قابل‌توجهی در رشد کالوس ایجاد نکردند و قطر کالوس در همه این تیمارها کمتر از ۲ mm بود. (شکل ۱ و ۸). در تیمارهای هورمونی ٦ NAA mgl^{-1} و ۸ NAA mgl^{-1} (۳۵٪) کالزایی مشاهده شد که با سایرتیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی در محیط کشت MS بر قطر کالوس از فلس سوخ

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد کالزایی	قطر کالوس	اندازه کالوس
تیمار هورمونی	٤	۱۲/٦۳ ns	۳/۱۰ **	۰/٤۳ ns
خطای آزمایشی	۲۵	۱۲/۹۰	۰/۷۲	۰/۷۲
کل	۲۹	–	–	–

**: معنی‌دار در سطح ۱٪ و ns: عدم اختلاف معنی‌دار



شکل ۱- اثر تیمارهای هورمونی بر قطر کالوس در محیط کشت MS فلس نرگس

اثر تیمارهای هورمونی بر شاخساره‌زایی در مرحله استقرار

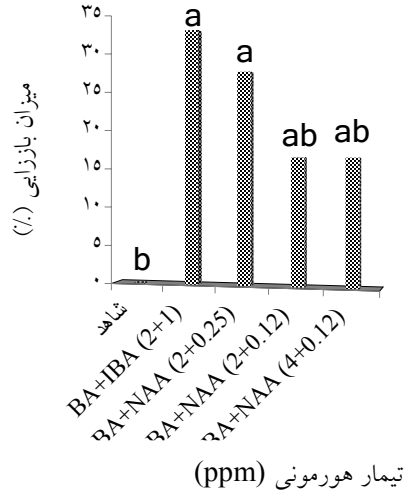
در جدول تجزیه واریانس بین تیمارهای هورمونی صفات درصد باززایی، تعداد و طول شاخه در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ٤). به‌نحوی که بیشترین درصد باززایی (۳۳٪) در تیمارهای هورمونی BA + IBA (۱ + ۲) و BA + NAA (۰/۲۵ + ۲) میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که نسبت به سایر تیمارهای هورمونی تفاوت معنی‌دار وجود نداشت، اما با شاهد تفاوت معنی‌دار داشت که از بین غلظت‌های مختلف IBA فقط غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث باززایی شاخساره شد و بقیه غلظت‌ها اثری در باززایی نداشتند و همان یک غلظت آنالیز شد (جدول ۳). همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود غلظت NAA تأثیر بسزایی در باززایی شاخساره‌ها داشت، به‌طوری‌که در غلظت ($۰/۲۵ mgl^{-1}$) NAA بیشترین میزان باززایی شاخساره‌ها مشاهده شد، اما در غلظت‌های کمتر ($۰/۱۲ mgl^{-1}$) میزان باززایی کاهش یافت. همچنین غلظت BA نیز در باززایی شاخساره مؤثر بود و باززایی بیشتری در غلظت ($۲ mgl^{-1}$) مشاهده شد. بیشترین تعداد شاخه (۱ عدد) در تیمار BA + NAA

(۱ + ۲) میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که نسبت به سایر تیمارهای هورمونی تفاوت معنی‌دار وجود نداشت، اما با شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۳). در مورد اثر هورمون‌ها بر تعداد شاخساره همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود BA در ترکیب با غلظت ($۰/۲۵ mgl^{-1}$) NAA نسبت به غلظت‌های کمتر ($۰/۱۲ mgl^{-1}$) اثر بیشتری در افزایش تعداد شاخه داشت. BA به‌علاوه IBA نیز ترکیب مؤثری جهت افزایش تعداد شاخساره در این گیاه بود. بیشترین طول شاخه (۳ mm) مربوط به تیمارهای هورمونی BA + IBA (۱ + ۲) و BA + NAA (۰/۲۵ + ۲) میلی‌گرم در لیتر بود که نسبت به سایر تیمارهای هورمونی تفاوت معنی‌داری نداشت، اما با شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (شکل‌های ٤ و ۸). همان‌طور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود بیشترین طول شاخه مربوط به غلظت BA ($۲ mgl^{-1}$) بود که در ترکیب با غلظت NAA ($۰/۲۵mgl^{-1}$) بیشترین طول شاخه را نشان داد.

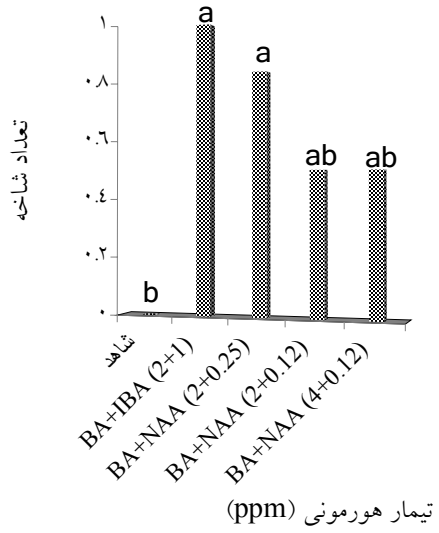
جدول ٤- تجزیه واریانس تیمارهای هورمونی در محیط کشت MS بر میزان باززایی شاخساره در ریزنمونه فلس سوخ

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول شاخه	تعداد شاخه	درصد باززایی
تیمار هورمونی	٤	۰/۱۹ *	۱۵/۹۷ *	۹٦۱/۹۵ *
خطای آزمایشی	۲۵	۰/۰۹	۷/۳۰	٤۲۸/۳٤
کل	۲۹	-	-	-

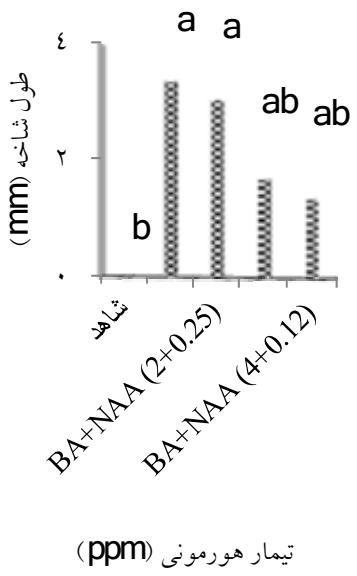
*: معنی‌دار در سطح ۵٪



شکل ۲- اثر تیمارهای هورمونی بر درصد باززایی قاعده سوخ نرگس در محیط کشت MS



شکل ۳- اثر تیمارهای هورمونی بر تعداد شاخه قاعده سوخ نرگس در محیط کشت MS



شکل ٤- اثر تیمارهای هورمونی بر طول شاخه قاعده سوخ نرگس در محیط کشت MS

اثر تیمارهای هورمونی بر شاخساره‌زایی در مرحله پرآوری

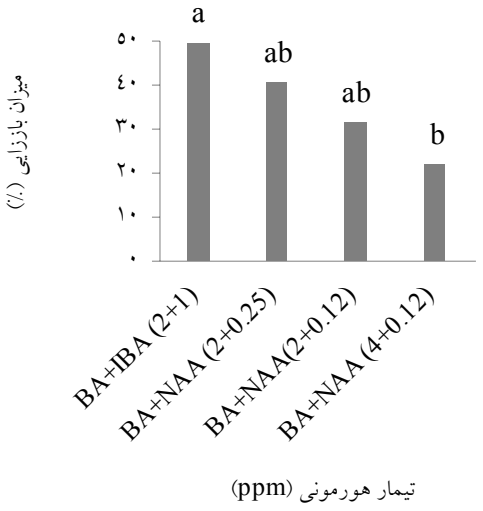
در جدول تجزیه واریانس، بین تیمارهای هورمونی صفت میزان باززایی و تعداد شاخه در سطح ۵٪ و طول شاخه در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. همچنین در واکشت‌ها میزان باززایی، تعداد و طول شاخه در سطح ۱٪ معنی‌دار بودند. اثر متقابل تیمار هورمونی در واکشت‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۵). در مرحله پرآوری، شاخه‌های حاصل از

مرحله استقرار، مجدداً در همان تیمارهای هورمونی مرحله استقرار دو بار واکشت شدند و هر بار اندام‌های هوایی پس از یک ماه تعداد و ارتفاع شاخه‌ها محاسبه گردید. در بین تیمارهای هورمونی واکشت شده، بیشترین میزان باززایی (۵۰٪) مربوط به تیمار هورمونی BA + IBA (۱ + ۲) میلی‌گرم در لیتر بود که تفاوت معنی‌دار با تیمارهایی که تقریباً میزان باززایی بالایی داشتند نداشت، ولی با تیمار هورمونی BA + NAA (۰/۱۲ + ٤) که کمترین باززایی را داشت تفاوت معنی‌داری وجود داشت (شکل ۵). غلظت ($۲ mgl^{-1}$) BA در باززایی شاخساره مؤثر بود. بیشترین تعداد شاخه (۱/٤عدد) در هر ریزنمونه مربوط به تیمار هورمونی BA + IBA (۱ + ۲) میلی‌گرم در لیتر بود و کمترین تعداد شاخه در تیمار BA + NAA (۰/۱۲ + ٤) مشاهده شد (شکل ٦). در مورد اثر هورمون‌ها بر تعداد شاخساره همان‌طور که در شکل ٦ مشاهده می‌شود BA در ترکیب با غلظت ($۰/۲۵ mgl^{-1}$) NAA نسبت به غلظت کمتر ($۰/۱۲ mgl^{-1}$) NAA اثر بیشتری در افزایش تعداد شاخه داشت. BA به‌علاوه IBA نیز ترکیب مؤثری جهت افزایش تعداد شاخساره‌ها در این گیاه بود. بیشترین طول شاخه مربوط به تیمارهای هورمونی BA + IBA (۱ + ۲) و BA + NAA (۰/۲۵ + ۲) میلی‌گرم در لیتر بود که تفاوت معنی‌دار بین آنها وجود نداشت (شکل ۷). همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود بیشترین طول شاخه مربوط به غلظت ($۲ mgl^{-1}$) BA بود که در ترکیب با IBA و غلظت ($۰/۲۵ mgl^{-1}$) NAA نسبت به غلظت کمتر ($۰/۱۲ mgl^{-1}$) بیشترین طول شاخه را داشت. بیشترین میزان باززایی (٦۰٪) مربوط به واکشت اول بود که تفاوت معنی‌دار با واکشت دوم و مرحله استقرار داشت. بیشترین تعداد شاخه (۲ عدد) مربوط به واکشت اول بود که با واکشت دوم و مرحله استقرار تفاوت معنی‌دار داشت و در واکشت اول بیشترین طول شاخه ٦ mm بود که تفاوت معنی‌دار با واکشت دوم و مرحله استقرار داشت.

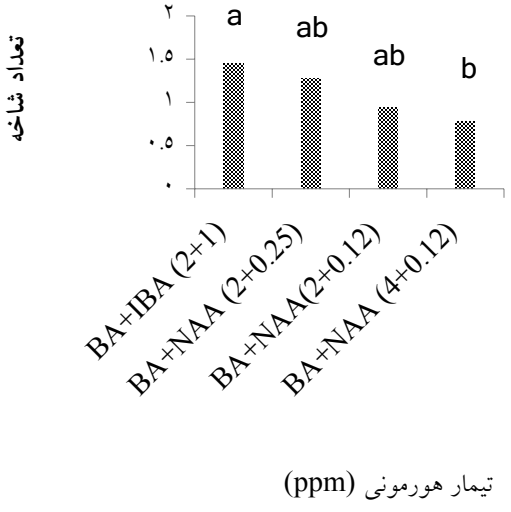
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی و واکشت‌ها بر میزان باززایی، تعداد و طول شاخه

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی	تعداد شاخه	طول شاخه
تیمار هورمونی	۳	۲۱/۳۸ *	۰/۲۷ *	۲/٦۰ **
واکشت	۲	۹٤/۸٤ **	۱/۱۵ **	۵/٦۰ **
تیمار هورمونی × واکشت	٦	۳/۲۲ ns	۰/۰۲ ns	۰/۲۷ ns
خطای آزمایشی	٦۰	۷/٦٦	۰/۱۳	۰/٤۸
کل	۷۱	–	–	–

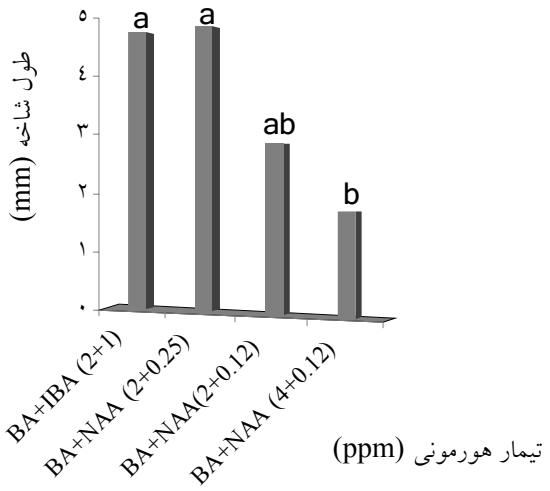
**: معنی‌دار در سطح ۱٪، *: معنی‌دار در سطح ۵٪، ns: عدم اختلاف معنی‌دار



شکل ۵- اثر تیمارهای هورمونی بر میزان باززایی در محیط کشت MS قاعده سوخ نرگس



شکل ٦- اثر تیمارهای هورمونی بر تعداد شاخه در محیط کشت MS قاعده سوخ نرگس



شکل ۷- اثر تیمارهای هورمونی بر طول شاخه در محیط کشت MS قاعده سوخ نرگس

بحث

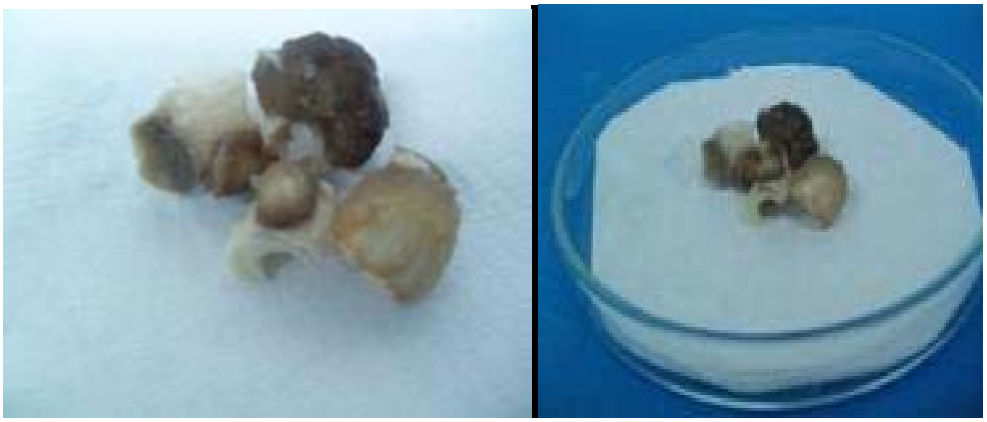
طبق نتایج حاصل از این تحقیق، شروع کالزایی با تأخیر صورت گرفت. از میان تنظیم‌کننده‌های رشد، NAA به‌عنوان یک اکسین پایدار در انگیزش و رشد پینه در نرگس نقش مهمی دارد. ولی ترکیب اکسین NAA همراه با یک سیتوکنین (BAP) تأثیری در افزایش درصد کالزایی یا رشد کالوس نداشت. نوع اکسین و غلظت آن تأثیر زیادی در قطر کالوس داشت، به‌طوری‌که در غلظت NAA ٦ mgl^{-1}، بیشترین قطر کالوس مشاهده شد، اما اکسین 2,4-D اثر مهمی در رشد کالوس نداشت. در این آزمایش مشاهده شد که کالوس‌های تشکیل شده در محیط کشت حاوی تیمار هورمونی NAA + BA (۰/۱ + ۲) و 2,4-D ۱ میلی‌گرم در لیتر با گذشت زمان سیاه شدند که نتایج بدست آمده با نتایج Sinha و Roy (۲۰۰۲) بر روی گیاه گلایل از ریزنمونه پیاز توپر با تیمار هورمونی 2,4–D ۱ میلی‌گرم در لیتر مطابقت داشت. بررسی‌های آنها مشخص نمود که ریزنمونه‌های پیاز توپرگلایل با این غلظت هورمونی به سمت سیاه شدن پیش رفتند، ولی کالوس در تیمار هورمونی ٦ میلی‌گرم در لیتر NAA بعد از یک‌ماه از زمان کشت همچنان رنگ کرم رنگ خود را حفظ نمود و قابلیت رشد و نمو داشت. بنابراین استفاده از اکسین NAA به تنهایی رشد کالوس و بقای آن را در محیط کشت افزایش داد. کشت بافت در تک‌لپه‌ای‌ها به‌مراتب سخت‌تر از دولپه‌ای‌ها می‌باشد، اما باززایی به نوع اندام و میزان هورمون وابسته است (Kamo *et al*., 1990) که در این آزمایش نیز چنین امری مشاهده شد. ناصری (۱۳۷۷) مشاهده کرد که گیاهان جوان در نرگس فقط می‌توانند از ریزنمونه‌های دو فلسی همراه با مریستم قاعده‌ای سوخ ایجاد شوند و کالوس در نرگس به سختی تولید می‌شود. مقدار کالوس و رشد آن به سطوح هورمونی که در آغاز استفاده شده، بستگی دارد. در این آزمایش در همه تیمارها کالزایی به سختی و با تأخیر شروع شد. پینه‌ها در آغاز زرد طلایی بود، اما کم‌کم پینه‌ها قهوه‌ای شدند، به‌خصوص وقتی از هورمون 2,4-D جهت

القاء کالوس استفاده شد. بنابراین هورمون 2,4-D به دلیل اثر نامطلوب در رشد و بقاء کالوس در نرگس مناسب نیست. برای افزایش کیفیت پینه بدست آمده می‌توان از ترکیب‌های دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد و شرایط فیزیکی نیز استفاده کرد که نتایج بدست آمده با نتایج بیات و همکاران (۱۳۸۷) بر روی گیاه زنبق مطابقت داشت. این در حالی بود که ریزنمونه‌ها با تیمار هورمونی 2,4-D همراه یا بدون BA به سمت قهوه‌ای شدن پیش رفت. نتایج آزمایش نشان داد که بهترین تیمار هورمونی برای القاء کالوس، ٦ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت MS بود که ریزنمونه‌ها کالوس با قطر ۸ mm تولید کردند. البته ریزنمونه‌های قاعده برگ در تیمارهای مختلف هورمونی هیچ کالوسی را تولید نکردند.

نتایج نشان داد که سه هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، تمام ریزنمونه‌های دو فلسی دچار تورم قابل‌ملاحظه‌ای شدند، اما اندام هوایی در تیمارهای هورمونی BA + IBA (۱ + ۲) و BA + NAA (۰/۲۵ + ۲) میلی‌گرم در لیتر، از سایر غلظت‌های هورمونی ایجاد شد، به عبارتی مرحله القای شاخه در سایر غلظت‌های هورمونی طولانی‌تر بود. نتایج حاصل از تیمارهای هورمونی مختلف برای القاء شاخساره از پیاز منجر به این نتیجه‌گیری شد که در گیاه نرگس القاء اندام‌های هوایی به مقادیر هورمون NAA وابسته بود، اما مقادیر هورمون BAP در القاء مؤثرتر است، به‌طوری‌که در حضور مقادیر هورمون BAP (mgl^{-1} ۲) اندام‌های هوایی بیشتری القاء می‌گردد که با نتایج Santos و همکاران (۱۹۹۸) همخوانی دارد. آنها گزارش نمودند که مقدار هورمون BA و NAA مورد استفاده تأثیر بسزایی بر القاء اندام هوایی *N. bulbocodium* داشته، به‌طوری‌که در صورت استفاده از BA + IBA (۱ + ۲) میلی‌گرم در لیتر اندام هوایی بیشتری القاء شد. همچنین در Amaryllis، BAP با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر تعداد اندام‌های هوایی القاء شده را افزایش داد (Custers & Bergervoet, 1992). Roksana و همکاران (۲۰۰۲) گزارش نمودند که BAP ۲ میلی‌گرم در لیتر و نوع اکسین (IBA) میزان باززایی و تعداد اندام‌های هوایی القاء شده را در *Allium sativum* در محیط کشت MS افزایش داد. همان‌طور که در بخش نتایج مشاهده شد، طول اندام‌های هوایی تحت تأثیر هر دو هورمون سیتوکنین و اکسین قرار گرفت. این نتایج با یافته‌های Torres و Carlisi (۱۹۸۹) همخوانی دارد. بررسی‌های آنها مشخص نمود که طول اندام‌های هوایی القاء شده در گیاه *Camellia* در محیط کشت حاوی هر دو هورمون اکسین و سیتوکینین افزایش یافت، در صورتی‌که Nhut و همکاران (۲۰۰٤) گزارش نمودند که در گلایل تعداد و طول اندام‌های هوایی القاء شده فقط تحت تأثیر سیتوکنین قرار می‌گیرد. نتایج نشان داد که بهترین محیط کشت برای شاخساره‌زایی MS با تیمارهای هورمونی BA + IBA (۱ + ۲) و BA + NAA (۰/۲۵ + ۲) میلی‌گرم در لیتر بود که بیشترین تعداد شاخساره (میانگین۱ عدد) را با طول ۳ mm تولید کرد. در این محیط کشت میزان باززایی شاخساره‌ها از ریزنمونه‌ها (۳۳٪) بود.

در پرآوری همانند مرحله استقرار غلظت و هورمون BA تأثیر زیادی در افزایش تعداد و طول اندام‌های هوایی داشت. همچنین غلظت و نوع هورمون NAA و IBA تأثیر بسزایی در افزایش باززایی، تعداد و طول اندام‌های هوایی داشت، به‌طوری که بالاترین باززایی، تعداد و طول شاخه در پرآوری در غلظت بالاتر (mgl^{-1} ۰/۲۵) NAA اتفاق افتاد. نتایج نشان داد که بهترین تیمار

هورمونی در پرآوری BA + IBA (۱+۲) میلی‌گرم در لیتر بود که بیشترین تعداد شاخساره (۲ عدد) را با طول ۵ mm تولید کرد. در این محیط کشت میزان باززایی شاخساره‌ها (۵۰٪) بود.



الف

ب

شکل ۸- الف) کالوس حاصل شده از فلس سوخ با تیمار هورمونی ٦ میلی‌گرم در لیتر NAA
ب) تولید شاخه از فلس سوخ با تیمار هورمونی BA+IBA (۱+۲) میلی‌گرم در لیتر

نتیجه‌گیری کلی

مطابق نتایج این تحقیق محیط کشت MS همراه با تیمار هورمونی ٦ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین نتیجه را در القای کالوس در ریزنمونه‌های سوخ ایجاد کرد که در این تیمار هورمونی ریزنمونه‌ها ۳۵٪ کالزایی داشتند و کالوسی با قطر متوسط ۸ mm تولید کردند و کالوس علاوه بر رشد مطلوب در این محیط کشت، شیری رنگ نیز باقی ماند و علائم قهوه‌ای شدن که در سایر تیمارهای هورمونی مشاهده شد در اینجا دیده نشد. جهت تولید کالوس از قاعده برگ در بین تیمارهای هورمونی مختلف نتیجه‌ای حاصل نشد.

جهت القاء شاخه از ریزنمونه سوخ محیط کشت MS با تیمار هورمونی BA + IBA (۱ + ۲) میلی‌گرم در لیتر و BA + NAA (۰/۲۵ + ۲) بود که بیشترین تعداد شاخساره (۲ عدد) را با طول ۵ mm تولید کرد. در این محیط‌های کشت میزان باززایی شاخساره‌ها از ریزنمونه‌ها به‌ترتیب BA + IBA (۱ + ۲) و BA + NAA (۰/۲۵ + ۲)، ۵۰٪ و ٤۰٪ بود.

منابع مورد استفاده

- بیات، ح.، خوشخوی، م. و عرب، م.، ۱۳۸۷. بررسی انگیزش پنبه از ریزنمونه های برگ در زنبق مردابی بومی ایران. کنفرانس بین‌المللی بیولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ۲۱- ۱۹ مرداد: ۳۱۹.
- ناصری، م.م.، ۱۳۷۷. تولید گلهای پیازی (ترجمه). انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، ۲٦۱ صفحه.
- Barrett, S.C.H. and Pannell, J.R., 1999. Metapopulation dynamics and mating system evolution in plants: 74-100, In: Hollingworth, P.M., Bateman, R.M. and R.J., (Eds.). Gornalleds, Molecular systematic and plant Evolution (vol 57). Taylor and Francis, London, 485p.
- Blanchard, J.W., 1990. Narcissus: A Guide to Wild Daffodils. Alpine Garden society, Uk, 203p.
- Custers, J.B.M. and Bergervoet, J.H.W., 1992. Differences between Nerine hybrids in micropropagation potential. Scientia Horticulturae, 52(3): 247-256.
- Ehret, C., Maupetit, P. and Petrzilka, M., 1992. New organoleptically important constituents of Narcissus absolute. Journal of Essential Oil Research, 4: 41-47.
- Han, B.H., Yu, H.J., Yae. B.W. and Peak, K.Y., 2004. In vitro micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Georgia' by shoot formation as influenced by addition of liquid medium. Scientia Horticultruae, 103: 39-49.
- Heath, B. and Heath, B., 2001. Daffodils: for North American Gardens. Bright Sky Press, 144p.
- Kamo, K., Chen, J. and Lawson, R., 1990. The establishment of cell suspension cultures of gladiolus that regenerate plants. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 26(4): 425-430.
- Nagasawa, A. and Finer, J.J., 1988. Induction of Morphogenic callus cultures from leaft issue of Garlic. Horticultural Science, 23(6): 1068-1070.
- Nhut, D.T., da Silva, J.A.T. and Paek, K.Y., 2004. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of Gladiolus by liquid shake culture. Scientia Horticulturae, 102(4): 407-414
- Rees, A.R., 1969. The initiation and growth of narcissus bulbs. Annals of Botany, 33(2): 277-288.
- Roksana, R., Alam, M.F., Islam, R. and Hossain, M.M., 2002. In vitro bulblet formation from shoot apex in garlic (*Allium sativaum* L.). Journal of. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 12(1): 11-17.
- Sage, D.O., 2005. Propagation and protection of flower Bulbs: current Approaches and future prospects, with special reference to Narcissus. Acta Horticulturae, 673: 323-335.
- Sakai, T., 1979. Study of essential oil constituents by capillary column GC/MS. Shitsuryo Bunseki, 27: 202R.
- Santos, J., Santos, I. and Salema, R., 1998. In vitro production of bulbs of Narcissus bulbocodium flowering in the first season of growth. Scientia Horticulturae, 76(3-4): 205-217.
- Sinha, P. and Roy, K., 2002. Plant regeneration through invitro cormel formation from callus culture of *Gladiolus primulinus* Baker. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 12(2): 139-145.
- Torres, K.C. and Carlisi, J.A., 1989. Shoot and root organogenesis of *Camellia sasanqua*. plant cell Reports, 5: 381-384.
- Wilfret, G., 1971. Shoot-tip culture of *Gladiolus*: An evaluation of nutrient media for callus tissue development. Florida Agricultural Experiment stations Journal, 4139: 389-393.

Effects of explant and plant growth regulators on callus induction and shoot formation in *Narcissus tazetta* L.

N. Iranpak[1*], S. Kalateh Jari[2], S. Kalantari[3]

1*- Corresponding author, Msc. Student, Department of Horticultural Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran, E-mail: n_Iranpak@yahoo.com
2- Department of Horticultural Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
3- Department of Horticultural Science, College of Agriculture, the University of Tehran, Karaj, Iran

Received: December 2010 Revised: February 2011 Accepted: February 2011

Abstract

Narcissus tazetta L., belonging to Amaryllidacea, is an endemic species to Iran. Beautiful flowers of this plant in autumn and winter, in addition to the ornamental value, have high medicinal value due to the aromatic properties and essential oil production. Thus, the rapid proliferation and production of many plants of the mentioned species in a short time is considered. Conventional propagation relies upon bulb division method which is a costfull & time consuming method. In vitro micropropagation of *Narcissus tazetta* is of utmost importance in callus induction and extraction medicinal compounds from callus and production of complete plantlets for ornamental and medicinal uses. In this research, the possibility of callus induction from different explants of *Narcissus tazetta* and possibility of plant propagation using bulb explants were investigated. The effects of BA with NAA or 2.4-D at different concentrations in MS medium were evaluated for callus induction of *Narcissus tazetta* through twin scale or leaf plate explants. Adventitious shoots were induced on twin- scale explants taken from the basal plate region of bulbs on MS medium containing BA with IBA or NAA. All media were supplemented with 30 gl^{-1} Sucrose & 8 gl^{-1} Agar. For callus induction, cultures were maintained in dark at 25 ºc and for shoot formation 16 h light and 8 h dark at 25ºc were used. Based on the results, 35% of twin- scale explants produced callus with the average of 8 mm diameter. Callus was not produced in leaf scale explants. The highest number of shoots (2) with elongated stems (5 mm lenght) were obtained in twin- scales cultured in MS medium with 2 mgl^{-1} BA + 1 mgl^{-1} IBA. In this treatment, regeneration rate of the explants was 50%.

Key words: *Narcissus tazetta* L., micropropagation, growth regulators, shoots formation, callus formation.