تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۶ شماره ۴، زمستان ۹۲

# بررسی ریزازدیادی نرگس شیراز (*Narcissus tazetta* L.) با استفاده از ریزنمونه برگ

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

۱*- **نویسنده مسؤول:** دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی، گروه علوم باغبانی واحد علوم تحقیقات تهران (r-iranpak@yahoo.com)

۲- استادیار گروه علوم باغبانی واحد علوم تحقیقات تهران

۳- استادیار علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۳

## چکیده

**در این تحقیق به منظور بررسی ریزازدیادی نرگس شیراز از ریزنمونه های برگ استفاده شد. ریزنمونه های برگ پس از گندزدایی، جهت استقرار به محیط کشت پایه MS همراه با غلظت های مختلفی از IBA یا NAA همراه با BA منتقل شدند. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره با میانگین ۳ شاخساره در هر ریزنمونه و طویل ترین شاخساره ها با طول تقریبی ۲٤ میلی متر در محیط کشت دارای ۲ میلی گرم در لیتر BA همراه با یک میلی گرم در لیتر IBA و ٤ میلی گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد. در این دو تیمار هورمونی ۱۰۰٪ ریزنمو نه ها شاخساره تولید کردند. در مرحله پرآوری، ریزنمونه ها در محیط کشت پایه MS دارای غلظت های مختلفی از BA در ترکیب با NAA یا IBA کشت شدند. بهترین تیمار هورمونی جهت پرآوری شاخساره های نرگس، ترکیب BA به میزان ۲ میلی گرم در لیتر همراه IBA به میزان ۱ میلی گرم در لیتر بود که بالاترین درصد باززایی ریزنمونه ها (۱۰۰٪)، بیشترین تعداد شاخساره (میانگین ۳ عدد) و طویل ترین شاخساره ها را با میانگین ۲۰ میلی متر در هر واکشت، در بین تیمارها تولید کرد.**

***کلید واژه ها: نرگس، ریزازدیادی، ، ریز نمونه برگ***

### مقدمه

گل نرگس یکی از گیاهان پیازی زینتی مناطق معتدل است. نرگس از زیر رده تک لپه ایها، متعلق به راسته Asparagales و تیره آماریلیداسه می باشد (دودسان و همکاران[۱]، ۱۹۹۷) منشا گیاه *N. tazetta* در ناحیه مدیترانه ، آفریقای شمالی، آسیا و اروپا می باشد. در ایران این گیاه در شمال کشور و اکثر مناطق جنوبی بخصوص فارس، بهبهان و بوشهر می روید (ناصری، ۱۳۷۷). امروزه اهمیت نرگس در درجه اول به عنوان گل شاخه بریده می باشد و سپس به عنوان گیاه گلدانی کاربرد دارد (هرت و همکاران[۲]، ۱۹۹۲). گل نرگس به خاطر زیبایی و در برخی ژنوتیپ ها به خاطر تولید عطر از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار می باشد. از سوخ آن نیز در درمان تب ، آبسه و بیماری های پوستی و همچنین در درمان بیماری های عصبی از جمله آلزایمر استفاده می شود (سلیمانی ، ۱۳۸۶). تکثیر نرگس به دو صورت جنسی (بذر) و غیر جنسی (تقسیم سوخ) می باشد. روش جنسی تنها برای اهداف اصلاحی به منظور تولید ارقام جدید استفاده می شود و روش غیر جنسی از طریق پیازچه ها که هر ساله در پای پیاز مادری تشکیل می شود انجام می گیرد. از معایب تکثیر غیر جنسی احتمال انتقال عوامل بیماری زا از پیازهای مادری بیمار، به پیازهای دختری، سرعت تکثیر کم و تولید تعداد کمی پیاز جدید از پیاز مادری در واحد زمان و هزینه نسبتا زیاد را

1 - Dodson *et al.*
2- Ehret *et al.*

می توان نام برد. امروزه تکثیر درون شیشه ای نرگس بسیار مورد توجه می باشد زیرا با استفاده از این روش امکان همگروه سازی گیاه، کوتاه کردن زمان، تولید تعداد زیادی گیاه در زمان کوتاه و نیز ایجاد پایه های عاری از بیماری می باشد (ناصری، ۱۳۷۷ و سوری و همکاران[1]، ۱۹۹۹). پژوهش ها نشان داده است که تولید شاخساره در ریزنمونه های برگ نرگس در محیط کشت MS حاوی فسفات پتاسیم ۳۰۰ میلی گرم در لیتر افزایش یافت (چو و همکاران[2]، ۱۹۹۳). در پژوهشی برای تولید شاخساره از کشت قاعده برگ گیاه نرگس، از بین غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد NAA و BAP تنها ترکیب NAA به مقدار ۰/۱ میلی گرم در لیتر و BAP به مقدار۱ میلی گرم در لیتر مناسب بود (چو و همکاران، ۱۹۹۳) . در بررسی غلظت های مختلف IBA در ترکیب با BAP برای تولید شاخساره از قاعده برگ لیلیوم، ترکیب هورمونی ۰/۶ میلی گرم در لیتر IBA و ۱ میلی گرم در لیتر BAP نتایج مطلوبی به همراه داشت (لینگ فی و همکاران[3]، ۲۰۰۸). این تحقیق با هدف بررسی ترکیب هورمونی های مختلف جهت استقرار و پرآوری ریزنمونه های برگ نرگس شیراز و معرفی بهترین ترکیب هورمونی جهت تکثیر درون شیشه ای این گیاه انجام شد.

## مواد و روش ها

سوخ های گیاه نرگس در خرداد ماه از یک تولید کننده تجاری در شیراز خریداری شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. سوخ ها در سرد خانه در دمای ۴°c نگهداری شدند. جهت انجام آزمایش ابتدا سوخ ها در گلدان کشت شدند تا برگ کافی جهت تهیه ریزنمونه برگی را تولید کنند. جهت رویش و رشد برگ ها، گلدان ها در نور و دمای ۲۵°c قرار گرفتند. بعد از اینکه سوخ ها برگ تولید کردند از گلدان خارج شده و مورد استفاده قرار گرفتند. جهت تهیه ریزنمونه برگی ابتدا سوخ ها از وسط برش داده شدند و ۳-۴ برگ وسط سوخ همراه با طبق، از سوخ جدا شده و ضدعفونی شدند. برای ضدعفونی، ابتدا برگ ها در آب و صابون به مدت ۳۰ دقیقه غوطه ور شدند و سپس با آب شستشو داده شدند و جهت ضدعفونی در شرایط استریل به زیر لامینار منتقل شدند. در زیر لامینار برگ ها 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 استریل شدند و نهایتا سه مرتبه و هر بار ۱۰ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس جهت خشک شدن روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند. ریزنمونه ها با اسکالپل به قطعات ۲ برگی همراه با قسمتی از طبق به ابعاد یک سانتی متری تقسیم شدند و جهت استقرار در محیط کشت پایه MS همراه با مواد تنظیم کننده رشد قرار گرفتند. تیمارهای هورمونی شامل غلظت های مختلفی از IBA و NAA همراه با BA بود (جدول ۱). به همه محیط های کشت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار اضافه شد و pH روی ۵/۷ - ۵/۶ تنظیم شد. ریزنمونه ها داخل شیشه های حاوی ۴۰ cc محیط کشت قرار گرفتند. ارزیابی ریزنمونه ها یکماه بعد از قرار گرفتن آن ها در شرایط استقرار انجام شد. صفات مورد ارزیابی شامل درصد باززایی شاخساره از هر ریزنمونه، تعداد شاخه و طول شاخه در هر ریزنمونه بود. ریزنمونه ها جهت پرآوری در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلفی از هورمون های IBA و NAA همراه با BA قرار گرفتند. ترکیب هورمونی و مقادیر هورمون ها در (جدول ۲) آمده است. ریزنمونه ها در این مرحله هر ۴ هفته یکبار واکشت شدند و واکشت ۳ مرتبه انجام شد. نتایج حاصل از رشد آنها شامل درصد باززایی شاخساره از هر ریزنمونه، تعداد و طول شاخساره در هر ریزنمونه در هر مرحله واکشت، بعد از یک ماه ارزیابی و ثبت شد. . شرایط اتاقک رشد جهت نگهداری ریزنمونه ها دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، روشنایی ۱۶ ساعت و ۸

1- Suri *et al.*
2- Chow *et al.*
3- lingfei *et al.*

ساعت تاریکی با شدت نوری ۱۰۰۰۰ لوکس بود که با لامپ های فلورسنت سفید تامین می شود. این آزمایش با طرح پایه کاملا تصادفی در ۴ تکرار و ۳ ریزنمونه در هر تکرار انجام گردید و در مرحله پرآوری آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور تیمار و واکشت انجام شد و اثر متقابل تیمار و واکشت نیز محاسبه شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS و MSTATC انجام گرفت و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ انجام گرفت.

**جدول ۱- غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد در مرحله استقرار برگ های نرگس شیراز در محیط کشت MS**

| تنظیم کننده های رشد ( میلی گرم در لیتر) |
|---|
| شاهد ۰ + ۰ |
| ۱ $mgl^{-1}$ BA + 0/1 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۱ $mgl^{-1}$ BA + 0/5 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۲ $mgl^{-1}$ BA + 0/1 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۲ $mgl^{-1}$ BA + 0/12 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۲$mgl^{-1}$ BA + 0/25 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۲$mgl^{-1}$ BA + 0/5 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۲$mgl^{-1}$ BA + 1 $mgl^{-}$ NAA |
| ۲$mgl^{-1}$ BA + 1 $mgl^{-1}$ IBA |
| ۴$mgl^{-1}$ BA + 0/1 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۴$mgl^{-1}$ BA + 0/12 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۴$mgl^{-1}$ BA + 0/25 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۴$mgl^{-1}$ BA + 0/5 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۴$mgl^{-1}$ BA + 1 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۴$mgl^{-1}$ BA + 1 $mgl^{-1}$ IBA |
| ۴$mgl^{-1}$ BA + 2 $mgl^{-1}$ IBA |

**جدول ۲- غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد مورد استفاده در مرحله پرآوری نرگس شیراز**

| تنظیم کننده های رشد (میلی گرم در لیتر) |
|---|
| ۲ $mgl^{-1}$BA + 0/12 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۲ $mgl^{-1}$ BA + 0/25 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۲ $mgl^{-1}$ BA + 0/5 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۲ $mgl^{-1}$ BA + 0/1 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۲ $mgl^{-1}$ BA + 1 $mgl^{-1}$ IBA |
| ۴ $mgl^{-1}$ BA + 1 $mgl^{-1}$ IBA |
| ۴ $mgl^{-1}$ BA + 0/12 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۴ $mgl^{-1}$ BA +0/25 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۴ $mgl^{-1}$BA + 0/5 $mgl^{-1}$ NAA |
| ۴ $mgl^{-1}$ BA + 1 $mgl^{-1}$ NAA |

## نتایج و بحث

**مرحله استقرار:**

با توجه به مقایسه میانگین ها، محیط های کشت حاوی ۱ میلی گرم در لیتر IBA + ۲ میلی گرم در لیتر BA، ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA + ۴ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA + ۲ میلی گرم در لیتر BA بیشترین میزان باززایی شاخه را از ریزنمونه ها داشت (جدول ۳، شکل ۱). البته غلظت های مختلفی از IBA در ترکیب با BA جهت استقرار ریزنمونه ها استفاده شد که از بین آنها تنها غلظت ۱ میلی گرم در لیتر IBA در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر BA باعث باززایی شاخساره شد و بقیه غلظت ها هیچ شاخساره ای را در ریزنمونه های برگی کشت شده ایجاد نکردند. محیط کشت فاقد هورمون (شاهد) نیز هیچ شاخساره ای را در ریزنمونه ها تولید نکرد که این امر به لزوم استفاده از فیتوهورمون ها جهت استقرار ریزنمونه های برگی نرگس شیراز اشاره می کند (سوری و همکاران، ۱۹۹۹). در ریزازدیادی ریزنمونه های سوخ نرگس *Narcissus bulbocodium* باززایی به میزان ۱۰۰٪ را در محیط کشت MS همراه با هورمون های ۰/۱۲ میلی گرم در لیتر NAA + ۲ میلی گرم در لیتر BA، ۰/۱۲ میلی گرم در لیتر NAA + ۴ میلی گرم در لیتر BA و ۱ میلی گرم در لیتر IBA + ۲ میلی گرم در لیترBA گزارش نمودند. در تحقیق حاضر همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود در ترکیب هورمونی BA+NAA ، غلظت ۰/۱۲ میلی گرم در لیتر NAA نسبت به غلظت بالاتر آن (۰/۲۵ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با ۲ یا ۴ میلی گرم در لیتر BA باززایی کمتری ایجاد نمود اما نتایج مربوط به درصد باززایی در ترکیب ۱میلی گرم در لیتر IBA + ۲ میلی گرم در لیتر BA با نتایج تحقیق مذکور مطابقت داشت.

چو و همکاران (۱۹۹۳) گزارش نمودند که اکسین NAA و مقادیر بالای BA تاثیر زیادی بر القاء اندام هوایی گیاه نرگس رقم Hawera و Keverne داشتند ولی در مقادیر مختلف اکسین القاء اندام هوایی تفاوت معنی داری نداشت. نتایج این آزمایش نیز نشان داد که مقادیر بیشتر هورمون BA اثر بیشتری بر باززایی شاخساره ها داشت ولیکن در این آزمایش مقادیر هورمون NAA نیز در میزان باززایی موثر بود بطوریکه در غلظت های کمتر این هورمون میزان باززایی بیشتری داشت که با نتایج چو و همکاران (۱۹۹۳) مطابقت ندارد علت این امر را می توان در تفاوت ارقام مورد آزمایش دانست و مقادیر داخلی هورمون های گیاهی در ارقام مختلف متفاوت است. در کشت برگ های دو رقم آلسترومریا در کشت درون شیشه ای با ترکیب هورمونی یکسان مشاهده شد که درصد باززایی شاخساره از ۸۸٪ تا ۴۳٪ در دو رقم متفاوت بود که این امر بیانگر پاسخ متفاوت ارقام نسبت به تیمار هورمونی یکسان و محیط کشت مشابه در شرایط کشت درون شیشه ای است. بنابراین با استفاده از یک روش کشت مشابه با تیمارهای هورمونی یکسان، پاسخ های متفاوتی در گونه ها و ارقام مختلف در شرایط کشت درون شیشه ای مشاهده می شود که نشانگر این است که هر ژنوتیپی به تیمار مناسب جهت باززایی در شرایط کشت درون شیشه ای نیز دارد (ناگاساوا و فینر[1]، ۱۹۸۸).

با توجه به اینکه میزان هورمون های درونی گیاهان مختلف با یکدیگر متفاوت است لذا در بین غلظت های هورمونی مختلف در محیط کشت تنها غلظت ها و ترکیبات هورمونی که با هورمون های داخلی ریزنمونه سازگاری و تعادل داشته باشند، اثرات موثر و مطلوبی در ریزازدیادی ایجاد می کنند (لین و همکاران[2]، ۲۰۰۰). مقایسات میانگین اثر تیمارهای هورمونی مختلف در محیط کشت MS بر تعداد شاخه حاصل از ریزنمونه های برگ نرگس شیراز نشان داد که در محیط های کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۱ میلی گرم در

1- Nagasawa & Finer
2- Lin *et al.*

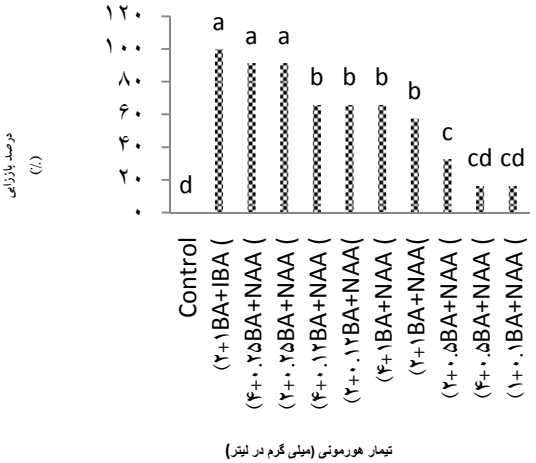
**جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارهای هورمونی در محیط کشت MS بر میزان باززایی قاعده برگ نرگس**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | طول شاخه | تعداد شاخه | درصد باززایی |
|---|---|---|---|---|
| تیمار هورمونی | ۱۰ | ۶/۲۵** | ۰/۵۵** | ۴۶۱۳/۴۲** |
| خطای آزمایشی | ۳۳ | ۰/۱۴ | ۰/۰۲ | ۱۴۳/۳۰ |
| کل | ۴۳ | _ | _ | _ |

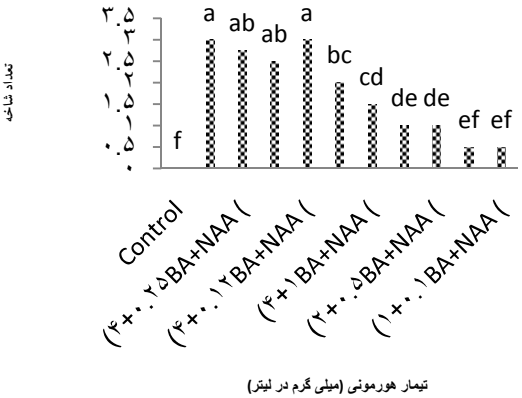
** = معنی دار در سطح ۱٪

لیتر IBA، ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیترNAA، ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۴ میلی گرم در لیتر BA+ ۰/۱۲ میلی گرم در لیترNAA بیشترین تعداد شاخه با میانگین ۳ شاخه در هر ریزنمونه ایجاد شد (شکل ۲). در این آزمایش تعداد بیشتری شاخه در غلظت های بالاتر BA (۲و ۴ میلی گرم در لیتر) نسبت به غلظت کمتر آن (۱ میلی گرم در لیتر) مشاهده شد. در غلظت های بالای BA تقسیم سلولی بیشتری انجام می شود. با توجه به نقش سیتوکنین در تقسیم سلول و تولید جوانه جانبی تولید تعداد بیشتر شاخه در غلظت های بالاتر سیتوکنین با اثر شناخته شده برای سیتوکنین مطابقت دارد (حجازی، ۱۳۷۹).

ناگاساوا و فینر (۱۹۸۸) گزارش نمودند که مقادیر بالای ۲ میلی گرم در لیتر BA و اکسین با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر NAA میزان باززایی و تعداد اندام های هوایی را در قاعده برگ *Allium sativum* افزایش داد که نتایج این آزمایش نیز با نتایج تحقیق فوق مطابقت دارد. مقایسه میانگین اثر تیمارهای هورمونی بر طول شاخه نشان داد که طولانی ترین شاخه ها در محیط های کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BA +۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA تولید شدند (شکل۳). با توجه به اینکه یکی از اثرهای شناخته شده و بارز غلظت های بالای سیتوکنین در محیط کشت، کاهش طول شاخساره است و در عین حال اکسین موجب افزایش طول سلول و در نتیجه افزایش طول اندام های هوایی گیاه می باشد (حجازی و آرتکا، ۱۳۷۹) شاید بتوان نتیجه این تحقیق را در مورد افزایش طول شاخه اینطور توجیه نمود که غلظت بالای سیتوکنین BA (۴ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با غلظت نسبتا بیشترNAA (۰/۲۵) یا غلظت بالای BA (۲ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با غلظت نسبتا زیاد اکسین (۱ میلی گرم در لیتر) بر اثر تحریک تقسیم سلولی ناشی از حضور سیتوکنین و اکسین در غلظت های مناسب و تحریک رشد طولی سلولها موجب افزایش طول شاخساره ها شده است. البته تحقیقات دیگری که در زمینه اثر سیتوکنین بر طول شاخساره گیاهان مختلف انجام شده دلالت بر کاهش طول شاخساره با افزایش غلظت سیتوکنین دارد (شفیعی و همکاران، ۱۳۸۷ و جعفری و همکاران، ۱۳۸۸).



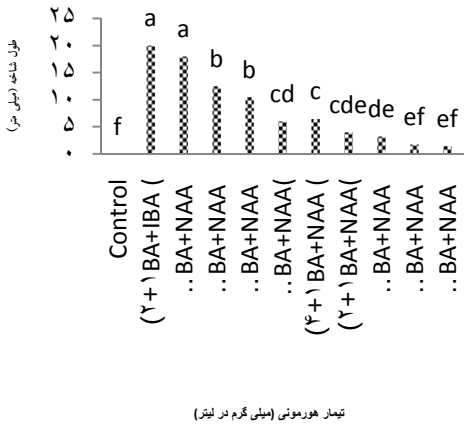

**شکل ۱- اثر تیمارهای هورمونی بر میزان باززایی شاخساره از قاعده برگ نرگس شیراز در مرحله استقرار در محیط کشت MS**




**شکل ۲- اثر تیمارهای هورمونی بر تعداد شاخه از ریزنمونه قاعده برگ نرگس شیراز در مرحله استقرار در محیط کشت MS**

## مرحله پرآوری:

در مرحله پرآوری شاخساره های حاصل از مرحله استقرار در محیط کشت MS حاوی هورمون های مختلف، ۳ مرتبه و هر چهار هفته یکبار واکشت شدند و نتایج حاصل از رشد آنها در هر مرحله واکشت بعد از یکماه ارزیابی و ثبت شد. بر اساس جدول تجزیه واریانس مشخص گردید که اثر تیمارهای هورمونی، واکشت و اثرات متقابل آنها بر میزان باززایی، تعداد و طول شاخه در سطح ۱٪ معنی دار بود (جدول۴).




**شکل ۳- اثر تیمارهای هورمونی بر طول شاخه حاصل از قاعده برگ نرگس شیراز در مرحله استقرار درمحیط کشت MS**

نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد که در بین تیمارهای هورمونی مورد استفاده جهت واکشت ریزنمونه ها، بیشترین باززایی شاخه ( ۱۰۰٪)، در تیمارهای هورمونی۲ میلی گرم در لیتر BA +۱ میلی گرم در لیتر IBA، ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد و کمترین باززایی شاخه ( ۲۰٪)، مربوط به ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA+ ۱میلی گرم در لیتر BA بود (جول ۴، شکل۴). نتایج این آزمایش نشان داد که غلظت NAA تاثیر زیادی در باززایی شاخساره های درون شیشه ای داشت بطوریکه در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان باززایی شاخساره مشاهده شد ولیکن در غلظت های کمتر ۰/۱۲ میلی گرم در لیتر یا بیشتر از آن (۰/۱، ۰/۵, ۱ میلی گرم در لیتر) میزان باززایی شاخه کاهش یافت. همچنین غلظت BA نیز در باززایی شاخساره موثر بود و باززایی بیشتری در غلظت های بالاتر (۲و۴ میلی گرم در لیتر) نسبت به غلظت های کمتر آن ۱میلی گرم در لیتر مشاهده شد.

نتایج مقایسه میانگین در مورد اثر تیمارهای هورمونی بر طول شاخه در مرحله پرآوری نشان داد که بیشترین طول شاخه ۲۴ میلی متر مربوط به تیمار هورمونی۲ میلی گرم در لیتر BA + ۱ میلی گرم در لیتر IBA بود که تفاوت معنی دار با سایر تیمارهای هورمونی داشت (شکل۶). نتایج مقایسات میانگین در بررسی بین واکشت ها نشان داد که ببیشترین میزان باززایی اندام های هوایی با ۸۰٪، مربوط به واکشت اول و دوم بود ولیکن در واکشت سوم میزان باززایی کاهش یافت البته با وجود کاهش باززایی در واکشت سوم، باززایی از مرحله استقرار بیشتر بود و میزان باززایی در مرحله استقرار کمترین مقدار بود (شکل۷). بیشترین تعداد شاخه (۳ عدد)، مربوط به واکشت اول بود که با سایر واکشت ها و مرحله استقرار تفاوت معنی دار وجود داشت (شکل ۸).

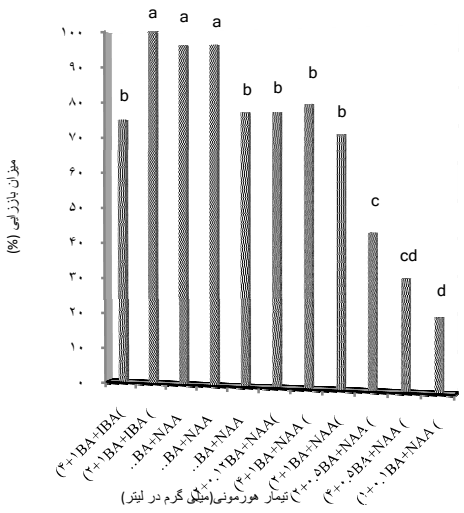
**جدول ٤- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارهای هورمونی، مقایسه واکشت ها در قاعده برگ نرگس**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | درصد باززایی | تعداد شاخه | طول شاخه |
|---|---|---|---|---|
| تیمار هورمونی | ۱۰ | ۱۱۳۴۰/۸۸** | ۱۲/۲۶** | ۸۰۱/۴۱** |
| واکشت | ۳ | ۶۴۳۴/۵۶** | ۱۰/۱۱** | ۳۶۹/۶۸** |
| تیمار هورمونی×واکشت | ۳۰ | ۸۶۳/۶۱** | ۰/۸۳** | ۴۳/۸۵** |
| خطای آزمایشی | ۱۳۲ | ۲۲۳/۷۰ | ۰/۲۹ | ۲/۱۳ |
| کل | ۱۷۵ | | | |

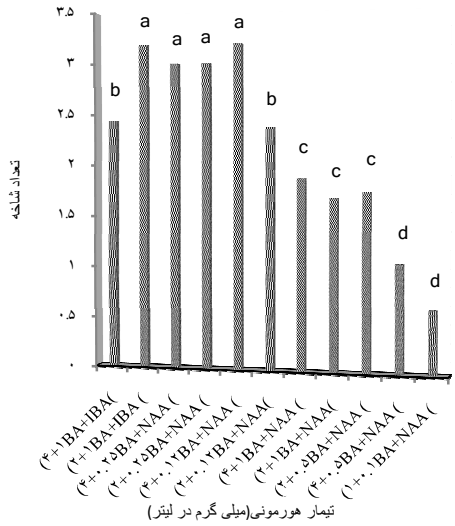
** = معنی دار در سطح ۱٪

طول شاخه ها بتدریج با افزایش واکشت ها کاهش یافت. شاخه ها در مرحله استقرار کوچک بودند (طول ۲۰ میلی متر) ولیکن در واکشت ها اندازه آنها افزایش یافت (بترتیب با ۲۲، ۲۴ و ۲۵ میلی متر در واکشت های اول تا سوم) (شکل۹). در مقایسه میانگین بین تیمارهای هورمونی و واکشت، بیشترین میزان باززایی ۱۰۰٪، مربوط به تیمارهای هورمونی ۲میلی گرم در لیتر BA +۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۱ میلی گرم در لیتر IBA بود. در این تیمارها میزان باززایی شاخه ها در ۳ مرحله واکشت انجام شده در این آزمایش ثابت بود و کاهش نیافت. در سایر تیمارها همانطور که در شکل ۱۰ ملاحظه می شود باززایی بتدریج با افزایش واکشت ها کاهش یافت. بطور کلی تیماری که موجب شود در بین واکشت ها ثبات سرعت پرآوری مثل درصد باززایی، طول و تعداد شاخه حفظ شود تیمار برتر جهت پرآوری ریزنمونه ها محسوب می شود زیرا ریزنمونه ها توانایی رشد و باززایی را در طی واکشت همچنان حفظ می نمایند (سوری و همکاران، ۱۹۹۹).

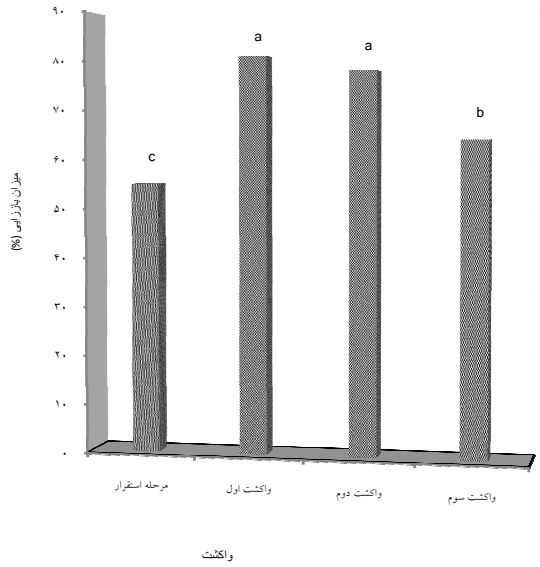
در این آزمایش ریزنمونه ها در تیمار۴ میلی گرم در لیتر BA + ۱ میلی گرم در لیتر IBA، در مرحله استقرار، رشدی نداشتند ولیکن تیمار فوق اثر مطلوبی در رشد ریزنمونه ها داشت بطوریکه ریزنمونه ها ظرفیت پرآوری خود را بعد از ۳ مرحله واکشت همچنان حفظ کردند. مقایسه میانگین بر همکنش واکشت و تیمارهای هورمونی بر تعداد شاخه نشان داد که تعداد شاخه ها در بین واکشت ها در تیمارهای هورمونی مختلف متغیر بود.




**شکل ٤- اثر تیمارهای هورمونی بر میزان باززایی در مرحله پرآوری از قاعده برگ نرگس در محیط کشت MS**

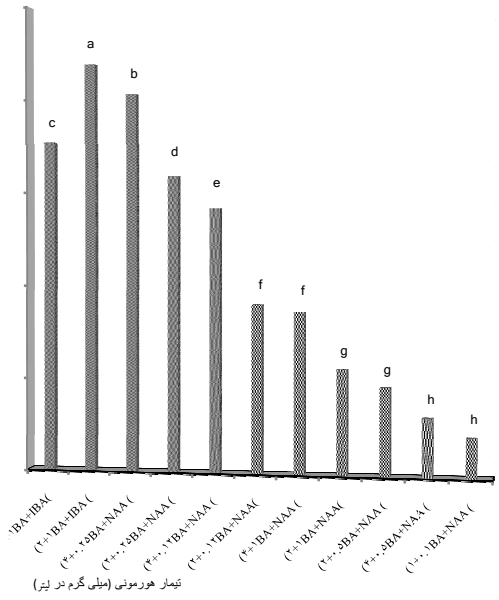



**شکل ۵- اثر تیمارهای هورمونی بر تعداد شاخه در مرحله پرآوری از قاعده برگ نرگس در محیط کشت MS**

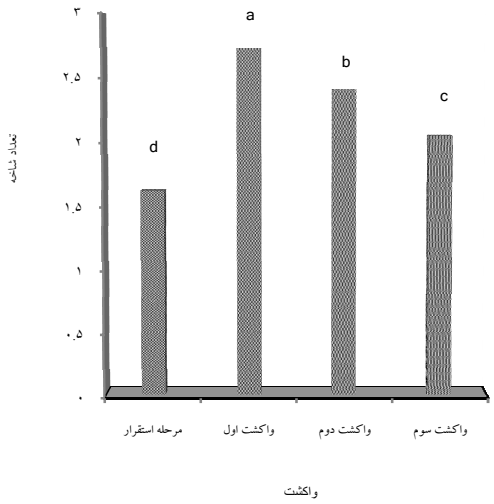



**شکل ٦- اثر تیمارهای هورمونی بر طول شاخه در مرحله پرآوری از قاعده برگ نرگس در محیط کشت MS**

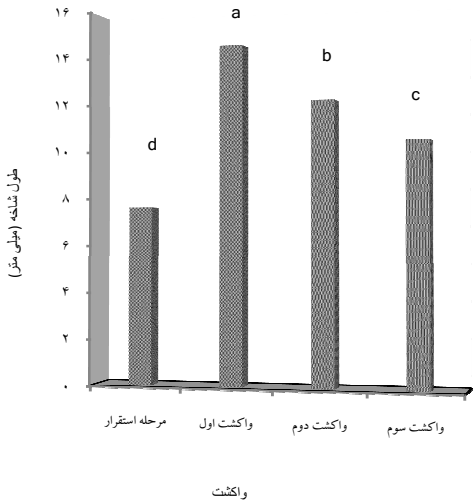
تیمارهای هورمونی که از غلظت های مختلف ۲ میلی گرم در لیتر BA +۱ میلی گرم در لیتر IBA، ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA، ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA، ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۱۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۱۲ میلی گرم در لیترNAA استفاده شد ترکیب موثری جهت افزایش تعداد شاخساره ها در این گیاه بود. در تیمارهای هورمونی فوق تعداد شاخه در واکشت های مختلف نسبتا ثابت بود و از نظر آماری تفاوت معنی داری در بین واکشت های مختلف وجود نداشت ولیکن در بقیه تیمارها با افزایش واکشت تعداد شاخه ها کاهش یافت. همچنین با کاهش غلظت ۱ میلی گرم در لیتر BA نیز تعداد شاخساره کاهش یافت (شکل۱۱). افزایش سرعت پرآوری با تشکیل تعداد شاخه بیشتر در هر ریزنمونه در غلظت های بالای BA توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (شفیعی و همکاران، ۱۳۸۷). در مورد اثر واکشت ها و تیمارهای هورمونی بر طول شاخساره ها،تایج نشان داد که طول شاخساره در تیمارهای




**شکل ۷- مقایسه اثر واکشت ها بین مرحله پرآوری با مرحله استقرار بر میزان باززایی در کشت قاعده برگ نرگس**




**شکل ۸- مقایسه اثر واکشت ها بین مرحله پرآوری با مرحله استقرار بر تعداد شاخه در کشت قاعده برگ نرگس**

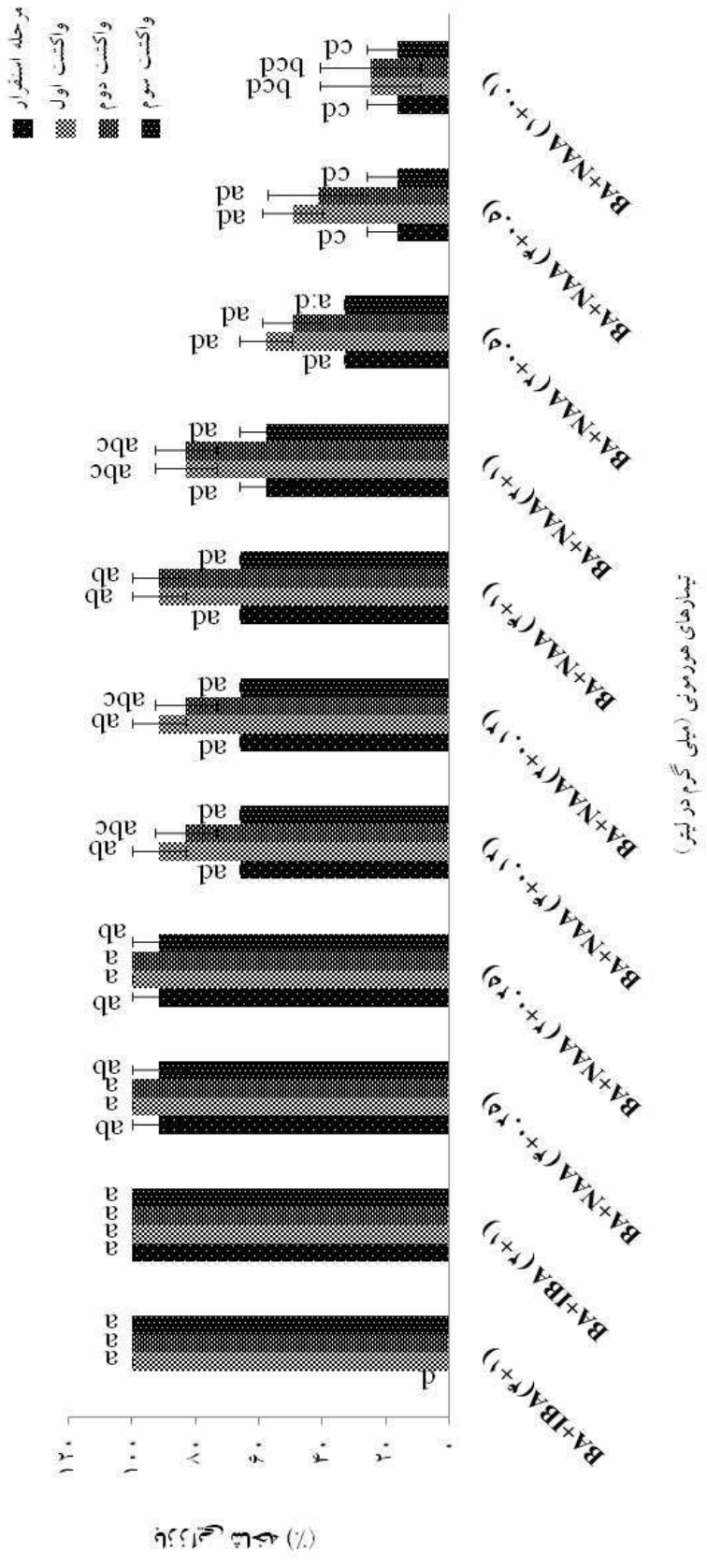



**شکل ۹- مقایسه اثر واکشت ها بین مرحله پرآوری با مرحله استقرار بر طول شاخه درکشت قاعده برگ نرگس**

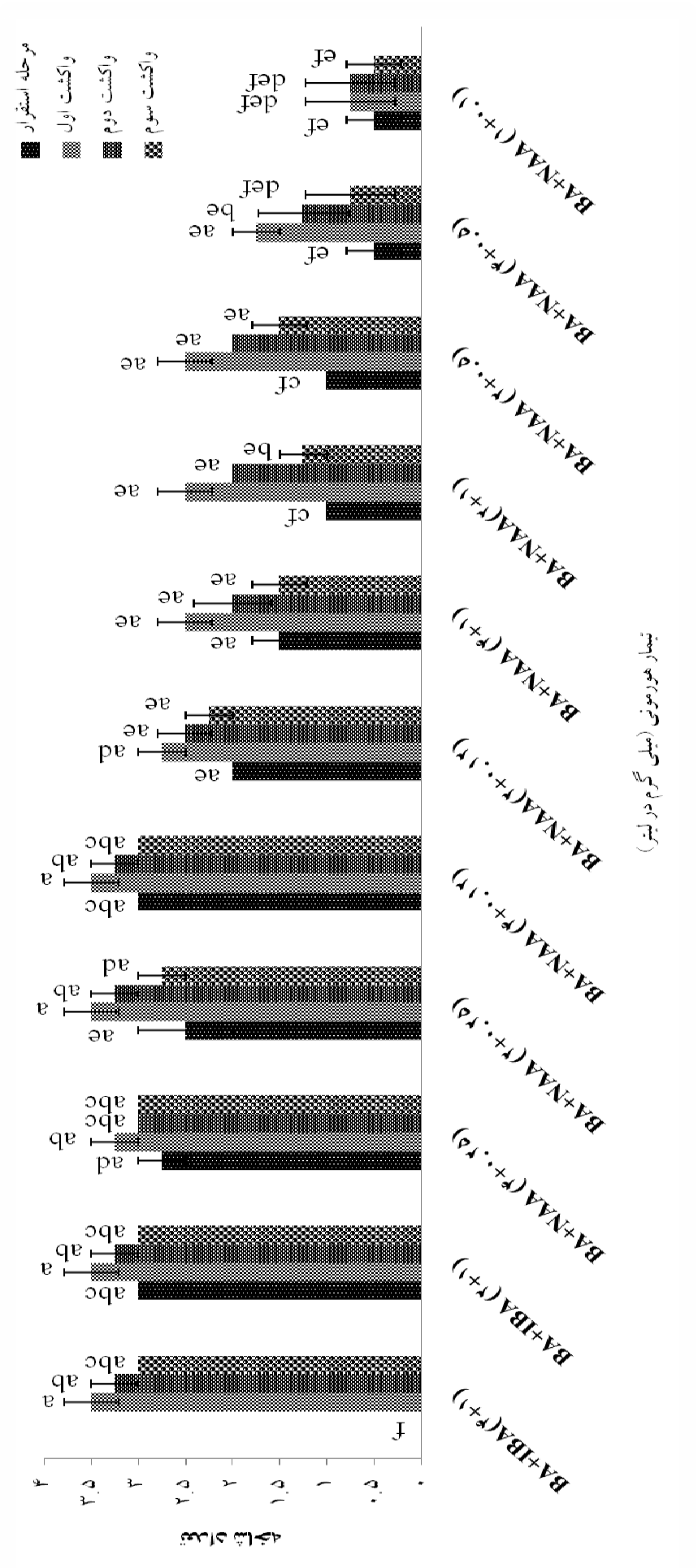
هورمونین ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۱ میلی گرم در لیتر IBA ، ۲ میلی گرم در لیتر BA +۱ میلی گرم در لیتر IBA، ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA، ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۱۲ میلی گرم در لیتر NAA در واکشت های مختلف از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشت و شاخه ها در این تیمارها رشد مطلوبی را در مرحله پرآوری داشتند البته در تیمار۴ میلی گرم در لیتر BA + ۱ میلی گرم در لیتر IBA شاخساره ها در مرحله استقرار رشدی نداشتند ولیکن در واکشت ها شاخساره ها به خوبی رشد کرده و در طی واکشت ها نیز توانایی رشد خود را حفظ کردند ولی در سایر تیمارهای فوق بین واکشت ها با مرحله استقرار تفاوت معنی داری وجود نداشت و در هر ۴ مرحله کشت بیشترین طول شاخه وجود داشت بخصوص در واکشت اول طول شاخه ها نسبت به واکشت های دیگر بلندتر بود. (شکل۱۲). در نهایت نتایج مرحله پرآوری ریزنمونه ها نشان داد که بهترین تیمارهای هورمونی جهت پرآوری ریزنمونه های نرگس تیمارهای هورمونی۲ میلی گرم در لیتر BA +۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA می باشند هر چند در تیمارهایی که غلظت BA، ۴ میلی گرم در لیتر بود در ترکیب با غلظت های مختلف NAA یا IBA نیز نتایج مطلوبی به دست آمد ولیکن غلظت های کمتر هورمون BA که نتایج مشابهی با غلظت های بالاتر داشت، به دلیل صرفه اقتصادی توصیه می شود.

## نتیجه گیری

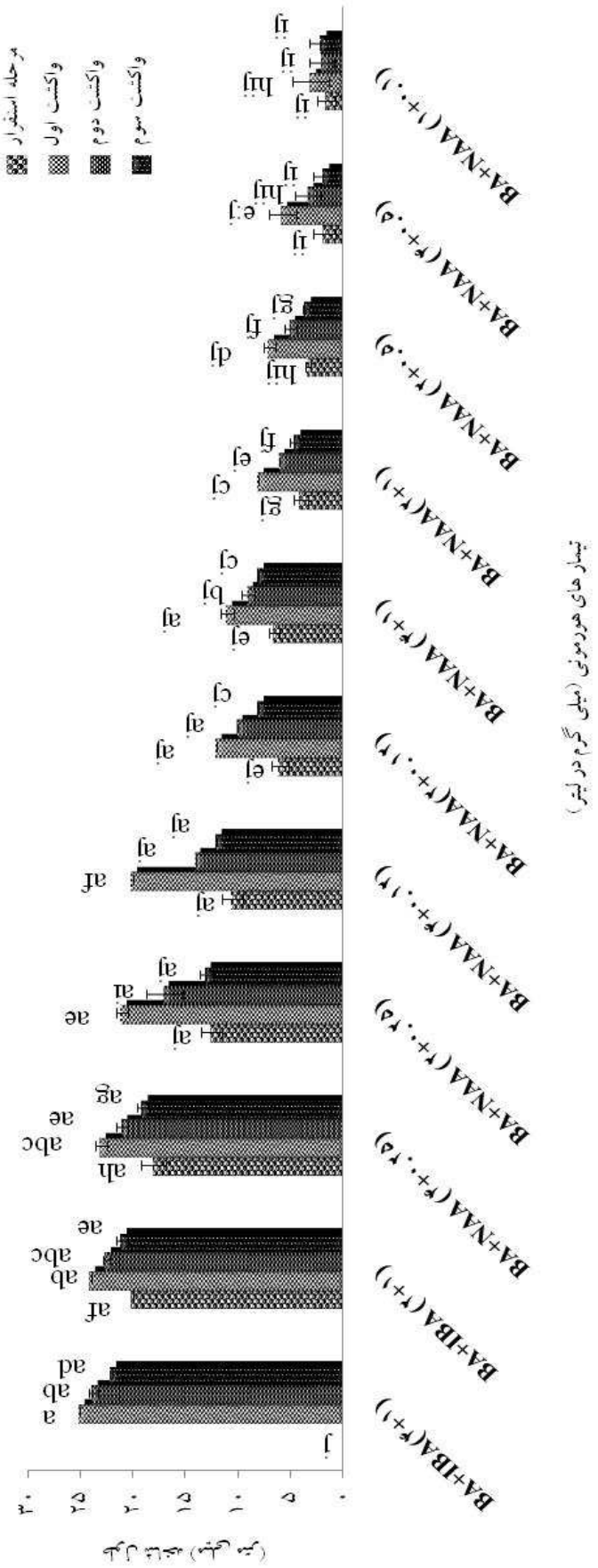
ریزازدیادی در گیاهان پیازدار روشی متداول جهت تکثیر رویشی محسوب می شود زیرا علاوه بر افزایش سرعت تکثیر، گیاهانی عاری از بیماری نیز تولید می گردد اما با توجه به اینکه برگ اندام هوایی است و نسبت به سوخ آلودگی کمتری دارد و در کشت بافت ضدعفونی راحت تری دارد و با توجه به اینکه درکشت بافت به منظور ازدیاد از هر سوخ چندین ریزنمونه برگی به دست می آید که گیاهان حاصل از این ریزنمونه ها شبیه به گیاه مادری می باشد لذا مطابق با نتایج حاصل از این مقاله، ریزازدیادی نرگس شیراز از طریق ریزنمونه برگ می تواند به عنوان روشی موثر قابل انجام باشد البته




**شکل ۱۰- اثر متقابل تیمارهای هورمونی و واکشت ها بر میزان باززایی شاخساره از کشت قاعده برگ نرگس شیراز در محیط کشت MS**




**شکل ۱۱- اثر متقابل تیمارهای هورمونی و واکشت ها بر تعداد شاخه از کشت قاعده برگ نرگس شیراز در محیط کشت MS**




**شکل ۱۲- اثر متقابل تیمارهای هورمونی و واکشت ها بر طول شاخه از کشت قاعده برگ نرگس شیراز در محیط کشت MS**

الف ب

**شکل ۱۳- گیاهچه های حاصل شده از قاعده برگ نرگس الف) تیمار هورمونی ۱میلی گرم در لیتر IBA+ ۲ میلی گرم در لیتر BA ب) تیمار هورمونی ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA + ۲ میلی گرم در لیترBA**

تا کنون در ایران تحقیقی مبنی بر تکثیر درون شیشه ای این گیاه از طریق ریزنمونه برگی انجام نشده است. در این تحقیق از برگ همراه با قسمتی از طبق جهت ریزنمونه استفاده و آزمایش به منظور ریزازدیادی و اندام زایی مستقیم انجام شد. با توجه به نتایج به دست آمده بهترین تیمار هورمونی در مرحله استقرار ۲ میلی گرم در لیتر BA +۱ میلی گرم در لیتر IBA، ۴ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA در محیط کشت MS بود که بیشترین تعداد شاخساره (۳عدد) را با طول ۲۰ میلی متر و میزان باززایی صددرصد تولید کردند. غلظت بالای BAP ( ۲و ۴ میلی گرم در لیتر) تاثیر زیادی بر میزان باززایی، تعداد و طول شاخه داشت و نوع هورمون اکسین IBA و NAA با غلظت های کمتر بیشترین باززایی را داشتند. بهترین تیمار هورمونی در مرحله پرآوری ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA بودند که بیشترین تعداد شاخساره (۳ عدد) را با طول به ترتیب ۲۵ و ۲۴ میلی متر و میزان باززایی صددرصد تولید کردند.

## منابع


۱. جعفری، آ.، حمیداوغلی، ی. و فتوحی،ر. ۱۳۸۸. ریزازدیادی میوه کیوی (*Actinidia deliciosa*) با استفاده از ریزنمونه های جوانه جانبی. مجله علوم باغبانی، صص ۲۹۹- ۳۰۶.

۲. حجازی، ا. (م). آرتکا، ر.، (مولف). ۱۳۷۹. کاربرد مواد رشد گیاهی. دانشگاه تهران. تهران. چاپ اول، صص ۱-۳۶.

۳. سلیمانی، ح. ۱۳۸۶. ریزازدیادی گیاه نرگس و بررسی برخی آلکالویید ها در گیاه طبیعی و ریزازدیادی شده، دکتر فرانسواز برنارد، دکتر محسن امینی. دکتری (ph.D.). دانشگاه واحد علوم و تحقیقات، صص ۳۰-۳۳.

۴. شفیعی، م. حمید اوغلی، ی. فتوحی، ر. و فتاحی، ج. ۱۳۸۷. اثرات محیط های کشت بر روی پرآوری شاخساره گیاه سرخس بوستونی. مجله علوم باغبانی، صص ۱۳۹- ۱۵۲.

۵. ناصری، م. ۱۳۷۷. تولید گلهای پیازی. مؤلف: دی هرتاق. آستان قدس رضوی. مشهد. چاپ اول، ۲۶۱ ص.

6. Chow, Y., Selby, C., and Harvey, B.M.R. 1993. Basal plate tissue in Narcissus bulb and in shoot clump cultures: Its structure and role in organogenic potential of single leaf cultures. Department of Agriculture Botany, 71: 437-443.

7. Dodson, H., Arroy, Bergstrom, G., and Groth, I. 1997. Inter specific variation in floral fragrances within the genus Narcissus (Amaryllidaceae). Biochemical Systematic and Ecology, 25: 685-706.

8. Ehret, C., Maupetit, P., and Petrzilka, M. 1992. New organoleptically important constituents of Narcissus absolute. Journal of Essential Oil Research, 4: 41-47.

9. LingFei, X., FengWang, M., and Dong, L. 2008. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou Lily (*Lilium davidii* var. Unicolor), Journal of Scientia Horticulture, 119: 458-461.

10. Lin, H., Dejeu, M., and Jacobsen, E. 2000. The application of leafy explant micropropagation protocol in enhancing the multiplication efficiency of Alstromeria, Scientia Horticulture, 307-318.

11. Nagasawa, A., and Finer, J. 1988. Induction of morphogenic callus cultures from leaf tissue of garlic. Horticulture Science, 23(6): 1068-1070.

12. Suri, S., Jain, S., and Ramawat, G. 1999. Plantlet regeneration and bulbil formation *in vitro* from leaf and stem explants of curculigo orchioides, an endangered medicinal plant. Scientia Horticulture, 79: 127- 134.