مقاله کوتاه فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد بیست و یکم/ شمارهٔ دوم/ صفحات ۱۳۳-۱۴۲/ پاییز و زمستان ۱۴۰۰
DOI: 10.22084/PPT.2022.20781.1972

بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای سوخ نرگس (*Narcissus tazetta* L.)

Optimization of *In Vitro* Culture Conditions of Narcissus Bulb (*Narcissus tazetta* L.)

سیده مهدیه خرازی[1*]، احمد شریفی[1] و آزاده خادم[2]

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵
(مقاله کوتاه پژوهشی)

چکیده

گیاه نرگس (*Narcissus tazetta* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان سوخ‌دار گلدار می‌باشد که ازدیاد سنتی آن از طریق تقسیم سوخ می‌باشد که روشی پرهزینه و وقت‌گیر است. لذا کاربرد تکنیک‌های جدید کشت درون‌شیشه‌ای می‌تواند به افزایش ضریب ازدیاد این گیاه زینتی کمک نماید. از این رو پژوهشی در قالب دو آزمایش جداگانه انجام شد. در آزمایش اول اثر موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری بر میزان باززایی فلس‌های جفتی گیاه نرگس در محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA، در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایش دوم به بررسی اثر انواع مختلف اکسین بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی نرگس پرداخته شد. بدین‌منظور از محیط‌کشت ½MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، IBA، IAA و محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد استفاده گردید. نتایج نشان داد کاربرد لایه‌های مختلف فلسی سوخ نرگس تأثیر معنی‌داری بر تعداد و قطر سوخک باززا شده داشت. در واقع کاربرد لایه‌های فلسی داخلی‌تر سوخ منجر به افزایش تعداد سوخک باززا شده گردید ولی قطر سوخک باززا شده کاهش یافت. با توجه به این‌که قطر و تعداد سوخک باززا شده، هر دو عامل مهمی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای می‌باشند، لذا با در نظر گرفتن این نکته، کاربرد فلس جفتی گروه یک و دو جهت ازدیاد سوخ نرگس توصیه می‌گردد. هم‌چنین یافته‌های پژوهش حاضر برتری محیط‌های کشت ½MS فاقد تنظیم‌کننده رشد و حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد IAA را در رابطه با ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی نرگس نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ریشه‌زایی، قطر سوخک، موقعیت فلس جفتی، نرگس

۱ و ۲. به‌ترتیب استادیار و مربی، گروه بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
*: نویسنده مسئول Email: ma_kharrazi@jdm.ac.ir

مقدمه

نرگس با نام علمی *Narcissus tazetta* L. گیاهی تک‌لپه، سوخ دار، از خانواده *Amaryllidaceae* می‌باشد که به خاطر عطر بسیار مطبوعشان معروف شده‌اند. ازدیاد طبیعی این گیاه در طبیعت از طریق بذر و سوخک‌های پاجوش می‌باشد. با این حال هیبریدها، اغلب پلی‌پلوئید بوده و توانایی تولید بذر ندارند و به‌طور رویشی ازدیاد می‌شوند (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹). از سوی دیگر سرعت ازدیاد رویشی طبیعی پیاز تقریباً ۱/۶ برابر در سال است (*ریز*[1]، 1992).

برای تسریع در ازدیاد رویشی نرگس روش فلس جفتی و روش قطعه‌قطعه کردن ارائه شده است. این دو روش عملکرد بهتری نسبت به روش طبیعی دارند (*وریبورق*[2]، 1986؛ *هانکس*[3]، 1993). با این حال با کاربرد تکنیک‌های کشت بافت می‌توان به ضریب ازدیاد بالاتری نیز دست یافت. جهت کشت درون شیشه‌ای نرگس از قسمت‌های مختلف این گیاه به‌عنوان ریزنمونه استفاده می‌شود. اما بهترین ریزنمونه قطعات فلس جفتی یا قطعات کوچک برش خورده پیاز می‌باشد (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹). گزارشاتی مبنی بر تفاوت در پتانسیل باززایی لایه‌های مختلف فلسی در گیاهان سوخ‌دار مختلف ارائه شده است (*رایس*[4] و همکاران، 2011؛ *لیان*[5] و همکاران، 2009)، که نشان می‌دهد انتخاب لایه فلسی مناسب تأثیر بسزایی در سرعت ازدیاد گیاهان سوخدار دارد. بنابراین یکی از اهداف اصلی پژوهش حاضر بررسی اثر موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری بر میزان باززایی سوخک از ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس می‌باشد تا از این طریق بتوان به حداکثر ضریب ازدیاد در شرایط کشت درون شیشه‌ای رسید.

از سوی دیگر ایجاد سیستم ریشه‌ای قوی به‌منظور رشد و نموی سریع گیاهچه‌های کشت بافتی در شرایط برون‌شیشه‌ای اهمیت ویژه‌ای دارد. عوامل متعددی بر فرایند ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی در شرایط درون شیشه‌ای تأثیرگذار می‌باشند (*ورما*[6]، 2012؛ *راناشینگ*[7] و همکاران، 2006؛ *سوسا*[8] و همکاران، 2006؛ *کاردوسا* و *داسیلوا*[9]، 2012)، که ازجمله مهم‌ترین آن‌ها حضور انواع مختلف تنظیم‌کننده رشد اکسین در ترکیب محیط‌کشت می‌باشد (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۸؛ *امانی*[10] و همکاران، 2015). لذا چنانچه سوخک‌های باززا شده از سیستم ریشه‌ای مطلوبی برخوردار نباشند، این امر می‌تواند تأثیر نامطلوبی بر میزان سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی داشته باشد. لذا در بخشی دیگر از تحقیق حاضر به بررسی اثر انواع مختلف تنظیم‌کننده رشد اکسین بر ریشه‌زایی سوخک های باززا شده نرگس در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جهت اجرای این پژوهش، سوخ نرگس (*Narcissus tazetta* L.) بعد از خشک شدن قسمت‌های هوایی گیاه از گلخانه‌ای در مجتمع طوس گل در نزدیکی شهرستان گل‌بهار استان خراسان رضوی جمع‌آوری گردیدند. پس از انتقال سوخ‌ها، ابتدا فلس‌های آسیب دیده حذف گردیدند و سپس سوخ‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و چند قطره مایع‌شوینده رایج شستشو داده شدند. پس از این مرحله، از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و سپس از محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید. در پایان مدت ضدعفونی، ریزنمونه‌ها ۳ مرتبه با آب‌مقطر استریل آبکشی شدند.

پس از اتمام شستشو، فلس‌های خارجی سوخ‌ها که در مواجه با ماده گندزدا آسیب دیده بودند جدا و سوخ‌ها با استفاده از چاقوی جراحی (اسکالپل) به‌صورت شعاعی به ۸ قطعه‌ی مساوی برش داده شدند، به‌طوری‌که هر قطعه دارای بخش صفحه پایگاهی بود. سپس به‌منظور بررسی اثر موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری، قطعات برش خورده به ۵ نمونه فلس جفتی تقسیم و گروه‌بندی شدند، به‌طوری‌که در گروه یک، خارجی‌ترین نمونه‌های فلس جفتی و در گروه پنج، داخلی‌ترین نمونه‌های فلس جفتی قرار گرفتند. به‌عبارت‌دیگر، فلس‌ها از خارج به داخل به گروه‌های فلس جفتی گروه ۱، فلس جفتی گروه ۲، فلس جفتی گروه ۳، فلس جفتی گروه ۴ و فلس جفتی گروه ۵ تقسیم شدند و هرکدام از آن‌ها به‌عنوان یک تیمار در نظر گرفته شد.

از محیط‌کشت جامد MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA، ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار استفاده شد. قبل از افزودن آگار، pH محیط‌کشت در ۵/۷ تنظیم شد و سپس محیط‌کشت‌ها در ویال‌هایی (با حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر) به‌میزان ۱۵ میلی‌لیتر توزیع و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اُتوکلاو استریل شدند. شایان‌ذکر است که ترکیب

1. Rees
2. Vreeburg
3. Hanks
4. Rice
5. Lian
6. Verma
7. Ranasinghe
8. Sousa
9. Cardoso and da Silva
10. Amani

تنظیم‌کننده رشدی محیط‌کشت بر اساس نتایج پژوهش خرازی و همکاران (۱۳۹۸ الف) بر روی گیاه نرگس انتخاب گردید. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. در پایان آزمایش صفاتی همچون تعداد سوخک باززا شده، قطر سوخک باززا شده و ارتفاع گیاهچه باززا شده موردارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۵ تکرار و ۳ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد و در هر پلات آزمایشی تعداد ۲ ریزنمونه فلس جفتی به عنوان ریزنمونه کشت گردید.

آزمایش دوم: بررسی کاربرد تنظیم‌کننده رشد اکسین در ریشه‌زایی سوخک‌ها: جهت بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف اکسین بر ریشه‌زایی گیاه نرگس، از سوخک‌های تشکیل شده در مرحله ازدیاد استفاده گردید. سوخک‌ها در محیط‌کشت جامد ½MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده‌های رشد NAA، IBA، IAA و محیط‌کشت ½MS فاقد تنظیم‌کننده رشد، ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار کشت گردیدند. قبل از افزودن آگار، pH محیط‌کشت در ۵/۷ تنظیم شد و سپس محیط‌کشت‌ها در ویال‌هایی (با حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر) به‌میزان ۱۵ میلی‌لیتر توزیع و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اُتوکلاو استریل شدند. شرایط نگهداری ریزنمونه‌ها همانند آزمایش قبل بود. پس از گذشت چهار هفته عکس‌العمل نمونه‌ها ازجمله تعداد ریشه تولیدی، طول ریشه تولیدی و درصد ریشه‌زایی موردبررسی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۸ تکرار و ۳ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد و در هر پلات آزمایشی تعداد ۲ سوخک به‌عنوان ریزنمونه کشت گردید.

جهت انجام تجزیه‌وتحلیل‌های آماری ابتدا آماده‌سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Jump 8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثر موقعیت فلس جفتی بر تعداد سوخک باززا شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیش‌ترین تعداد سوخک باززا شده در ریزنمونه‌های فلس جفتی گروه ۵ با میانگین ۷/۲ عدد سوخک مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها داشت. از سوی دیگر کم‌ترین میزان آن در ریزنمونه‌های فلس جفتی گروه یک با میانگین ۱/۲ عدد سوخک حاصل شد. در واقع ریزنمونه‌های حاصل از فلس‌های جفتی لایه‌های داخلی‌تر سوخ، تعداد سوخک بیش‌تری نسبت به لایه‌های خارجی‌تر سوخ تولید نمودند.

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری بر میانگین مربعات صفات موردارزیابی در مرحله پرآوری

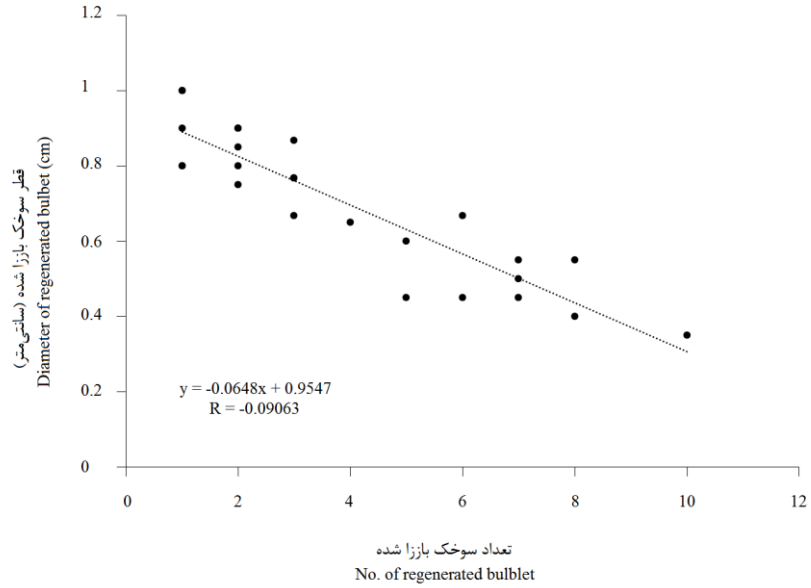
Table 1: Analysis of variance of the effect of twin scale position on mother bulb on the mean squares of traits evaluated in the breeding stage

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	تعداد سوخک باززا شده No. of regenerated bulblet	قطر سوخک باززا شده Diameter of regenerated bulblet	ارتفاع گیاهچه باززا شده Height of regenerated plantlet
تیمار Treatment	4	40.70**	0.18**	4.33**
خطا Error	20	0.56	0.008	0.24

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**: Significant at 1%

اندازه‌گیری قطر سوخک باززا شده بیانگر تأثیر معنی‌دار موقعیت فلس جفتی بر این پارامتر بود. سوخک‌های باززا شده از ریزنمونه‌های فلس جفتی گروه یک و دو، بیش‌ترین قطر سوخک باززا شده را به خود اختصاص دادند و با سایر ریزنمونه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. کم‌ترین قطر سوخک باززا شده از ریزنمونه‌های فلس جفتی گروه پنج حاصل شد. بررسی داده‌ها نشان می‌دهد که یک رابطه همبستگی منفی (R= -۰/۹۰) بین صفات تعداد و قطر سوخک باززا شده وجود دارد (شکل ۱). بدین ترتیب که در فلس‌های جفتی گروه یک تعداد سوخک کم‌تر و با قطر بیش‌تر و در فلس‌های جفتی گروه پنج، تعداد سوخک بیش‌تر و با قطر کم‌تر ایجاد گردید (جدول ۲ و شکل ۲).



شکل ۱: رابطه بین قطر و تعداد سوخک باززا شده
Fig. 1: Relationship between diameter and number of regenerated bulblets

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نیز بیانگر تأثیر معنی‌دار نوع ریزنمونه بر ارتفاع گیاهچه باززا شده بود (جدول ۱). سوخک‌های باززا شده از فلس‌های جفتی داخلی‌تر سوخ ارتفاع کم‌تری را به خود اختصاص دادند و اختلاف معنی‌داری با فلس‌های جفتی گروه یک و دو داشتند. از سوی دیگر بیش ترین ارتفاع گیاهچه باززا شده با کاربرد فلس‌های جفتی گروه یک حاصل شد که اختلاف معنی‌داری با سایر ریزنمونه‌ها داشت (جدول ۲ و شکل ۲).

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد در شرایطی که تعداد سوخک کم‌تری تشکیل گردد، رقابت بین سوخک‌ها بر سر جذب مواد غذایی کاهش می‌یابد و در نتیجه وزن سوخک‌های تولیدی افزایش می‌یابد (معمار مشرفی و همکاران، ۱۳۸۱). تفاوت مورفولوژیکی بین فلس‌های بیرونی، میانی و داخلی سوخ نشان می‌دهد که فلس‌های جفتی تهیه شده از این بخش‌ها می‌توانند پاسخ متفاوتی را ایجاد نمایند (*رایس* و همکاران، 2011). تحقیقات انجام شده بر روی گیاهان لیلیوم (سوسن) و سوسن چلچراغ نشان می‌دهد که فلس‌های تهیه شده از لایه‌های خارجی و میانی سوخ دارای قابلیت باززایی بیش‌تری می‌باشند و سوخک‌های قطورتری در مقایسه با لایه‌های داخلی‌تر سوخ تولید می‌کنند. آنالیز محتوای درونی کربوهیدرات فلس‌ها بیانگر بالاتر بودن محتوای کربوهیدرات لایه‌های فلسی خارجی و میانی در مقایسه با لایه‌های داخلی‌تر سوخ می‌باشد (*پارک*[1]، 1994؛ *پاداشت دهکائی*[2] و همکاران، 2006). در پژوهش حاضر نیز کاربرد فلس‌های جفتی حاصل از لایه‌های خارجی‌تر سوخ منجر به تولید سوخک‌های قطورتری گردید.

نتایج پژوهش *پارک* (1994) روی ازدیاد ارقام مختلف لیلیوم نشان داد که در تمامی ارقام موردبررسی، سوخک‌های تولید شده از لایه‌های خارجی و میانی سوخ، در مقایسه با لایه‌های داخلی سوخ، وزن بیش‌تری را به خود اختصاص دادند. *یانگ* و *سانگ*[3] (2013) نیز قابلیت تمایز فلس‌های خارجی، میانی و داخلی سوخ لیلیوم را موردارزیابی قرار دادند و نتایج پژوهش آن ها نشان داد که فلس‌های میانی قابلیت تمایز بیش‌تری نسبت به سایر فلس‌ها داشتند. با این‌حال، در تحقیق دیگری که بر روی گیاه لیلیوم رقم 'Gelria' انجام شد، کاربرد فلس‌های تهیه شده از لایه‌های خارجی سوخ، جهت ازدیاد گیاه لیلیوم توصیه گردید (*یانگوون* و *بیانگ وون*[4]، 2006). در مطالعه صورت گرفته توسط *یانگ*[5] و همکاران (2021) بر کشت درون شیشه‌ای گیاه سوسن داوید (*Lilium davidii*)، مشخص گردید که موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری تأثیر معنی‌داری بر میزان باززایی ریزنمونه‌ها داشت، به‌طوری‌که بیش‌ترین تعداد شاخساره باززا شده از ریزنمونه‌های حاصل از فلس‌های بیرونی سوخ مادری حاصل شد و فلس‌های تهیه شده از بخش پایینی سوخ نسبت به بخش‌های میانی و بالایی پتانسیل باززایی بیش‌تری را از خود نشان داد.

1. Park
2. Padasht Dehkaei
3. Yang and Song
4. YongKweon and Byungwoon
5. Yang

جدول ۲: مقایسه میانگین اثر موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری بر صفات موردارزیابی در مرحله پرآوری
Table 2: Effect of twin scale position on the mother bulb on evaluated traits at proliferation phase

موقعیت فلس جفتی Twin scale position	تعداد سوخک باززا شده No. of regenerated bulblet	قطر سوخک باززا شده (سانتی‌متر) Diameter of regenerated bulblet (cm)	ارتفاع گیاهچه باززا شده (سانتی‌متر) Height of regenerated plantlet (cm)
فلس جفتی گروه یک Twin scale group 1	1.2 d	0.87 a	3.50 a
فلس جفتی گروه دو Twin scale group 2	1.8 d	0.87 a	2.60 b
فلس جفتی گروه سه Twin scale group 3	3.2 c	0.73 b	1.88 c
فلس جفتی گروه چهار Twin scale group 4	5.8 b	0.53 c	1.34 c
فلس جفتی گروه پنج Twin scale group 5	7.2 a	0.46 c	1.30 c

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند
Means followed by the same letters in each column are not significantly different by LSD test at $p<0.05$

شکل ۲: اثر موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری بر سوخک‌های باززا شده (به‌ترتیب از راست به چپ: فلس جفتی گروه ۱، فلس جفتی گروه ۲، فلس جفتی گروه ۳، فلس جفتی گروه ۴ و فلس جفتی گروه ۵)
Fig. 2: Effect of twin scale position on the mother bulb on regenerated bulblet (Right to left: Twin scale group 1, Twin scale group 2, Twin scale group 3, Twin scale group 4 and Twin scale group 5, respectively)

رایس و همکاران (2011) طی پژوهشی اثر موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری را بر تعداد سوخک تولید شده در گیاه برانسویجیا آندولاتا (از خانواده آماریلیداسه) موردبررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها بیانگر عدم اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود، با این حال کاربرد فلس‌های جفتی میانی نتایج بهتری را در پی داشت. در مطالعه *رایس* و همکاران (2011) عنوان گردید که فلس‌های جفتی میانی سوخ، ضخیم و قطور می‌باشند و نسبت به فلس‌های نازک و باریک از ذخایر غذایی بیش‌تری برخوردار می‌باشند. تفاوت در سطوح نیتروژن و قند قابل حل در فلس‌های داخلی و خارجی سوخ لیلیوم نیز گزارش شده است (*تاکایاما* و *میساوا*، 1980). فلس‌های جفتی حاصل از داخلی‌ترین لایه‌های سوخ، بسیار نازک و باریک هستند و به‌علت نازک بودن، سطوح آن‌ها به سرعت خشک می‌گردد و درنتیجه قابلیت تولید سوخک در این نوع ریزنمونه‌ها کاهش می‌یابد (*رایس* و همکاران، 2011). با این حال پژوهش *کالکیو*[1] و همکاران (2002) بر روی گیاه *Eucrosia stricklandii* (از خانواده آماریلیداسه) پاسخ متفاوتی را در پی داشت، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان باززایی از ریزنمونه‌های حاصل از داخلی‌ترین لایه‌های سوخ گزارش گردید.

شواهد پژوهش *رایس* و همکاران (2011) حاکی از قابلیت باززایی ضعیف فلس‌های جفتی حاصل از خارجی‌ترین لایه‌های سوخ برانسویجیا آندولاتا (از خانواده آماریلیداسه) بود که دلیل آن تأثیر نامطلوب کلریدجیوه بر فلس‌های سوخ عنوان گردید. زیرا در مطالعه آن‌ها جهت ضدعفونی سوخ‌ها از ماده گندزدای بسیار قوی (کلریدجیوه) استفاده گردید و تماس مستقیم لایه‌های خارجی سوخ با کلریدجیوه باعث آسیب شدید به این لایه‌ها گردید و در نتیجه قابلیت باززایی آن‌ها نسبت به سایر لایه‌ها کاهش یافت. درحالی‌که در پژوهش حاضر، از مواد گندزدایی نظیر الکل و هیپوکلریت سدیم استفاده گردید. این مواد در مقایسه با کلریدجیوه آسیب کم‌تری به بافت‌های سوخ وارد می‌کنند و درنتیجه تأثیر منفی کم‌تری بر قابلیت باززایی فلس‌ها خواهند داشت. هم‌چنین در این پژوهش، جهت تهیه ریزنمونه‌ها، ابتدا خارجی‌ترین لایه سوخ که در تماس با ماده گندزدا آسیب دیده بود، حذف گردید و سپس ریزنمونه‌های فلس جفتی از بخش‌های مختلف سوخ تهیه گردید.

1. Colque

پیئریک و *ایپل*[1] (1977) عنوان نمودند که افزایش اندازه ریزنمونه (چه از لحاظ طولی و چه از لحاظ عرضی)، منجر به افزایش میزان باززایی در ریزنمونه‌های فلسی گیاه نرین (از خانواده آماریلیداسه) گردید. با توجه به این‌که لایه‌های فلسی خارجی سوخ نسبت به لایه‌های داخلی‌تر، سطح مقطع بیش تری را به خود اختصاص می‌دهند، حاوی ذخایر غذایی بیش تری نیز می‌باشند که وجود این ذخایر غذایی به افزایش قابلیت باززایی و تولید سوخک‌های قوی‌تر کمک می‌نماید.

در پژوهشی که بر روی گیاه لیلیوم انجام شد، مشخص گردید که فلس‌های تهیه شده از لایه‌های خارجی سوخ نسبت به لایه‌های میانی و داخلی از لحاظ باززایی، عملکرد بهتری از خود نشان دادند (*لیان* و همکاران، 2009). گزارش شده است که تفاوت در میزان باززایی لایه‌های فلسی سوخ، به‌علت محتوای درونی تنظیم کننده‌های رشد آن‌ها می‌باشد. به‌عبارت دیگر محتوای نسبی تسریع‌کننده‌ها و کندکننده‌های رشدی در لایه‌های فلسی سوخ، در این امر دخیل می‌باشد و پتانسیل باززایی فلس‌ها از طریق تعادل بین این دو نوع تنظیم‌کننده رشد داخلی کنترل می‌گردد (جین[2] و همکاران، 2004).

نتایج مطالعه *یاناگاوا* و *اوساکی*[3] (1996) بر کشت درون شیشه‌ای گیاه آماریلیس نشان داد که بیش‌ترین درصد باززایی از فلس‌های تهیه شده از لایه‌های خارجی سوخ حاصل گردید و کم‌ترین میزان آن به ریزنمونه‌های تهیه شده از لایه‌های داخلی سوخ اختصاص داشت که با نتایج پژوهش حاضر مطابق می باشد. در پژوهشی که بر روی گیاه آماریلیس انجام شد، مشخص گردید بیش‌ترین وزن سوخک تولیدی، از فلس‌های جفتی تهیه شده از لایه‌های خارجی سوخ حاصل گردید (*جینتاپاکورن*[4]، 1998). در مطالعه دیگری تأثیر موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری و تنظیم‌کننده‌های رشدی بر کشت درون شیشه‌ای گیاه آماریلیس موردارزیابی قرار گرفت و نتایج حاکی از تأثیر مطلوب‌تر ریزنمونه‌های حاصل از فلس‌های جفتی خارجی سوخ نسبت به فلس‌های جفتی داخلی سوخ بود، به طوری‌که سوخک‌هایی با قطر بیش‌تر و ارتفاع بیش‌تر تولید نمودند (خرازی و همکاران، ۱۳۹۸ ب). میزان رشد سوخک‌ها وابسته به محتوای ذخایر غذایی موجود در فلس‌های جفتی می‌باشد (*رایس* و همکاران، 2011). ازآنجایی‌که فلس‌های تهیه شده از لایه‌های خارجی سوخ در مقایسه با لایه‌های داخلی سوخ، بزرگ‌تر می‌باشند، بنابراین حاوی ذخایر غذایی بیش‌تری می‌باشند. لذا سوخک‌های تولید شده از این ریزنمونه‌ها، وزن بیش‌تری را نیز به خود اختصاص می‌دهند.

پس از ازدیاد ریزنمونه‌های فلس جفتی، مرحله ریشه‌زایی موردارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده گروه‌های مختلف فلس جفتی تأثیر معنی‌داری بر تعداد ریشه تولیدی داشتند ($p\leq0/01$). کاربرد محیط‌کشت ½MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد IAA منجر به تولید بیش ترین تعداد ریشه تولیدی شد. با این حال تفاوت معنی‌داری با محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد از این لحاظ نداشت. از سوی دیگر کم‌ترین تعداد ریشه تولیدی در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط‌کشت ½MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد NAA حاصل شد (جدول ۴).

اندازه‌گیری طول ریشه تولیدی نیز بیانگر تأثیر معنی‌دار تیمار تنظیم‌کننده‌های رشدی بر این پارامتر بود ($p\leq0/01$). طویل‌ترین ریشه‌های تولیدی در محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد مشاهده شد و با سایر تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی تفاوت معنی‌داری داشت. کوتاه‌ترین ریشه‌های تولیدی نیز در محیط‌کشت ½MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA حاصل شد. با این حال تفاوت معنی‌داری با محیط‌های کشت ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IBA و IAA نداشت (جدول ۴).

در پایان آزمایش درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا شده نیز موردارزیابی قرار گرفت و نتایج حاکی از تأثیر معنی‌دار تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی بر این پارامتر بود. بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی به‌ترتیب در محیط‌های کشت ½MS فاقد تنظیم‌کننده رشد (۷۸ درصد) و حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد IAA (۷۵ درصد) حاصل شد. از سوی دیگر کم‌ترین درصد ریشه‌زایی در گیاهچه‌های کشت شده در محیط‌های کشت ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IBA و NAA مشاهده شد (جدول ۴).

1. Pierik and Ippel
2. Jin
3. Yanagawa and Osaki
4. Jintapakorn

جدول ۳: تجزیه واریانس اثر نوع تنظیم‌کننده رشد بر میانگین مربعات صفات موردارزیابی در مرحله ریشه‌زایی
Table 3: Analysis of variance of the effect of PGR type on mean squares of evaluated traits at rooting phase

درصد ریشه‌زایی Rooting (%)	طول ریشه تولیدی Root length	تعداد ریشه تولیدی No. of root	درجه آزادی df	منبع تغییرات S.O.V.	
0.29**	2.06**	9.70**	3	Treatment	تیمار
0.001	0.25	1.95	29	Error	خطا

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد
**: Significant at 1%

جدول ۴: مقایسه میانگین اثر نوع تنظیم‌کننده رشد بر صفات موردارزیابی در مرحله ریشه‌زایی
Table 4: Effect of plant growth regulator type on evaluated traits at rooting phase

درصد ریشه‌زایی Rooting (%)	طول ریشه تولیدی (سانتی‌متر) Root length (cm)	تعداد ریشه تولیدی No. of root	نوع تنظیم‌کننده رشد Type of PGR
75a	0.73b	3.25a	1 mg/l IAA
44b	0.31b	1.77bc	1 mg/l IBA
42b	0.24b	0.56c	1 mg/l NAA
78a	1.33a	2.00ab	Without hormone

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند
Means followed by the same letters in each column are not significantly different by LSD test at p<0.05

سلیمانی و همکاران (۱۳۹۸) گزارش کردند که کاربرد محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA در مقایسه با محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد باعث تولید ریشه‌های کوتاه‌تر در سوخک‌های کشت بافتی نرگس گردید. در پژوهش حاضر نیز کوتاه‌ترین ریشه‌ها در محیط‌کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد NAA حاصل شد که با نتایج پژوهش سلیمانی و همکاران (۱۳۹۸) مطابق می‌باشد. سیدیکو[1] و همکاران (2007)، محیط‌کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA را جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی آماریلیس توصیه نمودند. هم‌چنین در پژوهش صورت گرفته بر روی گیاه سوسن داوید (*Lilium davidii*)، کاربرد محیط‌کشت ½MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA جهت ریشه‌زایی سوخک‌های باززا شده توصیه گردید (*یانگ* و همکاران، 2021). این درحالی است که نتایج پژوهش حاضر نشان داد کاربرد تنظیم‌کننده رشد NAA پاسخ مناسبی را از لحاظ ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی نرگس ایجاد نکرد.

در تحقیق *لی*[2] و همکاران (2004) کاربرد محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد، جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا شده نرین (ازخانواده آماریلیداسه) در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای توصیه گردید. در مطالعه صورت گرفته بر روی گیاه آماریلیس، مشخص گردید که کاربرد محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد نتیجه مطلوبی را جهت ریشه‌زایی گیاهچه های باززا شده آماریلیس در پی داشت (خرازی و همکاران، ۱۳۹۸). *امانی* و همکاران (2015) از ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی مختلفی جهت ریشه‌زایی سوخک‌های آماریلیس استفاده نمودند و در تمامی تیمارها ریشه‌زایی به‌خوبی صورت گرفت. آن‌ها عنوان نمودند چنانچه هدف تنها ریشه‌زایی نمونه‌های کشت بافتی باشد، کاربرد محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد نتیجه مطلوبی را در پی خواهد داشت که با نتایج پژوهش حاضر نیز مطابق می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد کاربرد لایه‌های مختلف فلسی سوخ نرگس تأثیر معنی‌داری بر تعداد و قطر سوخک باززا شده داشت. در واقع کاربرد لایه‌های فلسی داخلی‌تر سوخ منجر به افزایش تعداد سوخک باززا شده گردید ولی قطر سوخک باززا شده کاهش یافت. با توجه به این‌که قطر و تعداد سوخک باززا شده، هر دو پارامتر مهمی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای می باشند، لذا با در نظر گرفتن این نکته، کاربرد فلس جفتی گروه یک و دو جهت ازدیاد سوخ نرگس توصیه می‌گردد. هم‌چنین یافته‌های پژوهش حاضر برتری محیط‌های کشت ½MS فاقد تنظیم‌کننده رشد و حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد IAA را در رابطه با ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی نرگس نشان داد. با این‌حال با توجه به این‌که ریشه‌های تولیدی در محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد نسبت به محیط‌کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد IAA طویل‌تر بودند و از سوی دیگر با کاربرد محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد، هزینه‌های تولید در شرایط کشت بافت در مقایسه با کاربرد محیط‌کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد کاهش می‌یابد، لذا کاربرد محیط‌کشت ½MS فاقد تنظیم‌کننده رشد جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی نرگس در شرایط درون‌شیشه‌ای توصیه می‌شود.

1. Siddique
2. Lee

منابع

خرازی، م.، تهرانی‌فر، ع.، شریفی، ا. ۱۳۹۸ الف. بررسی اثر تیمار گرمایی و قارچ کش بر کنترل آلودگی کشت درون‌شیشه‌ای سوخ نرگس (*Narcissus tazetta* L.). مجله علوم باغبانی، ۳۳ (۳): ۳۷۷-۳۸۶.

خرازی، م.، تهرانی‌فر، ع.، شریفی، الف.، نعمتی، ح. و باقری، ع. ۱۳۹۸ ب. ارزیابی پتانسیل باززایی لایه‌های مختلف فلسی پیاز آماریلیس (*Hippeastrum* × *johnsonii*) تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ۱۱ (۴): ۱-۱۸.

سلیمانی، ح.، برنارد، ف. و فاضلی‌نژاد، س. ۱۳۹۸. ریزازدیادی گیاه نرگس (*Narcissus tazetta* L.) تحت تیمارهای هورمونی متفاوت و انتقال به خاک گیاهچه‌ها. مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۲ (۲): ۳۴۳-۳۵۴.

شریفی، ا.، مشتاقی، ن. و باقری، ع. ۱۳۸۹. کشت بافت گیاهی کاربردی، چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد ۴۷۹ صفحه.

معمارمشرفی، م.، معینی ا. و توسلیان ا. ۱۳۸۱. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، BAP، ریزنمونه، موقعیت‌های مختلف فلس و دوره نوری بر کشت بافت گل سوسن چلچراغ. مجله علوم زراعی ایران، ۴ (۴): ۲۵۳-۲۶۱.

Amani, S., Zarei, H., Azar, A. M. and Mashayekhi, K. 2015. Micropropagation of *Hippeastrum hybridum*. Cumhuriyet Science Journal, 36 (4): 594-605.

Cardoso, J. C. and Teixeira da Silva, J. A. 2012. Micropropagation of Gerbera using chlorine dioxide (ClO_2) to sterilize the culture medium. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 48: 362-368.

Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. and Codina, C. 2002. Micropropagation of the rare *Eucrosia stricklandii* (Amaryllidaceae) by twin-scaling and shake liquid culture. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 77 (6): 739-743.

Hanks, G. R. 1993. Narcissus. In: Le Nard, M. and De Hertogh, A. A. (eds), The Physiology of Flower Bulbs. Elsevier, Amsterdam. pp. 463-558.

Jin, S., Yang, L., Lv, P. and Zhou, B. 2004. Changes of endogenous hormones in *Lilium pumilum*. Journal of Northeast Forestry University, 33 (1): 20-22.

Jintapakorn, W. 1998. Growth and development of amaryllis bulb. Master Science (Horticulture). Thesis/Independent study abstract - Chiang Mai University, Thailand, 126 p.

Lee, S. Y., Ahn, J. H. and Park, Y. J. 2004. Effects of growth regulators and sucrose concentrations on the bulblet formation through *in vitro* culture of scale segment in *Nerine bowdenii*. Journal of Plant Biotechnology, 31 (2): 139-143.

Lian, T., Qun-Xian, D., Yong-Qing, W., Lu, L., Shi-Feng, L., Qing-Chun, Z., Jian-Xin, L. and Xiu-Lan, L. V. 2009. Studies on the technique of tissue culture and rapid propagation of bulbils from *Lilium* regale. Plant Sciences Research, 2 (2): 14-19.

Padasht Dehkaei, M. T., Khalighi, A., Naderi, R. and Mousavi, A. 2006. Effects of Temperature, Propagation Media and Scale Position on Bulblet Regeneration of Chelcheragh Lily (*Lilium ledebouri* Boiss.) by Scaling Method. Seed and Plant Improvment Journal, 22 (3): 383-397.

Park, N. 1994. August. Effect of temperature, scale position, and growth regulators on the bulblet formation and growth during scale propagation of *Lilium*. International Symposium on the Genus Lilium, 414: 257-262.

Pierik, R. L. M. and Ippel, B. J. 1977. Plantlet formation from excised bulb scale segments of Nerine. Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes, 78: 197-202.

Ranasinghe, R. A. T. D., Abayagunawardana, A. G. N. I., Hettiarachchi, H. I. D. D. and Eeswara, J. P. 2006. *In vitro* flower induction in gerbera. Tropical Agricultural Research, 18: 1-10.

Rees, A. R. 1992. Ornamental Bulbs, Corms and Tubers. Crop Production Science in Horticulture I. Commonwealth Agricultural Bureau. Wallingford, UK. 218 p.

Rice, L. J., Finnie, J. F. and Van Staden, J. 2011. *In vitro* bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. South African Journal of Botany, 77 (2): 305-312.

Siddique, M. N. A., Sultana, J., Sultana, N. and Hossain, M. M. 2007. *Ex vitro* establishment of in vitro produced plantlets and bulblets of hippeastrum (*Hippeastrum hybridum*). International Journal of Sustainable Crop Production, 2: 22-24.

Sousa, C. M., Santos, R. P. and Miranda, R. M. 2006. Optimization of salts concentration of medium MS in the micropropagation of gerbera, var. Ornela. Agronomia, 40: 52-58.

Takayama, S. and Misawa, M. 1980. Differentiation in *Lilium bulbscales* grown in vitro. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. Physiologia Plantarum, 48 (1): 121-125.

Verma, O. P. 2012. Standardization of auxin concentration for root induction in *Chrysanthemum morifolium*. Advances in Applied Science Research, 3 (3): 1449-1453.

Vreeburg, P. J. M. 1986. Chipping of Narcissus: a quicker way to obtain large numbers of small round bulbs. Acta Horticalture, 177: 579-584.

Yang, L., Chao, L., Su, X., Wang, C. Dong, C. Chen, S. 2021. High-frequency in vitro plantlet regeneration in *Lilium davidii* var. unicolour Salisb, an important edible and medicinal plant, and confirmation of genetic fidelity of regeneration plantlets using ISSR markers. Plant Biotechnology Report, 15: 435-446.

Yang, L. P. and Song, X. H., 2013. Tissue culture system construction of *Lilium lancifolium* Thunb. Journal of Agricultural University of Hebei, 36: 17-21.

Yanagawa, T. and Osaki, T. 1996. In vitro propagation of bulblets and elimination of viruses by bulb-scale cultures of *Hippeastrum hybridum* bulbs. Plant Tissue Culture Letters, 13 (2): 147-152.

YongKweon, Y. and ByungWoon, K. 2006. Effects of scale position and cutting condition on bulblet growth in perforated polyethylene film bag in scaling of *Lilium longiflorum* 'Gelria'. Korean Journal of Horticultural Science and Technology, 24 (2): 279-284.

Optimization of *In Vitro* Culture Conditions of Narcissus Bulb (*Narcissus tazetta* L.)

Kharrazi[1*], M., Sharifi[1], A. and Khadem[2], A.

Abstract

Narcissus tazetta L. is one of the most important flowering bulbous plants that are traditionally propagated by bulb splitting which is a costly and time-consuming method. Therefore, the application of in vitro culture techniques can help to increase the reproduction coefficient of this ornamental plant. So, the study was conducted in two separate experiments. In the first experiment, the effect of twin scales position on the mother bulb on the regeneration of twin scales of Narcissus were investigated in MS medium containing 1mg/l BA in combination with 0.2mg/l NAA in a completely randomized design. In the second experiment, the effect of different types of auxin on rooting of Narcissus plantlets was investigated. For this purpose, ½MS medium containing 1 mg/L NAA, IBA, IAA and hormone-free medium was used. The results showed that the application of different layers of Narcissus twin scales had a significant effect on the number and diameter of regenerated bulblet. In fact, application of the inner scales of mother bulb led to an increase in the number of regenerated bulblet, but the diameter of regenerated bulblet decreased. Since the diameter and number of regenerated bulblet are both important parameters during in vitro culture conditions, it is recommended to use twin scales group one and two for propagation of Narcissus bulb. The results of this study also showed the superiority of hormone-free ½MS medium and ½MS medium containing 1 mg/l IAA for rooting of Narcissus tissue culture plantlets.

Keywords: Rooting, Bulblet diameter, Twin scales position, Narcissus

1 and 2. Assistant Professor and Instructor, Respectively, Horticultural Plants Biotechnology Department, Industrial Biotechnology Institute, ACECR- Mashhad Branch, Mashhad, Iran

*: Corresponding author Email: ma_kharrazi@jdm.ac.ir