Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 3, Autumn 2021 (689-699)
DOI: 10.22059/ijhs.2020.306068.1820

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۴۰۰ (ص ۶۹۹-۶۸۹)

نشریه پژوهشی:

بررسی تولید انبوه گیاهچه‌های ارکیده فالانوپسیس رقم شاخه بریده Detroit از طریق کشت درون‌شیشه‌ای اندام‌های رویشی

خسرو بالی لاشکی[۱]، هدایت زکی‌زاده[۲*] و جمالعلی الفتی[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/٤/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۱۱)

چکیده

ارکیده‌ها از معروف‌ترین گیاهان زینتی در جهان هستند. از مهم‌ترین چالش‌های تولید ارکیده‌ها، دشواری ازدیاد آن‌ها است از این رو ریزازدیادی به عنوان روش تکثیر آن کاربرد دارد. در این مطالعه ریزازدیادی تجاری گیاه ارکیده *Phalaenopsis amabilis* cv. Detroit با استفاده از اندام‌های رویشی انجام شد. ابتدا گره‌های روی ساقه گل، جهت باززایی مستقیم در محیط کشت MS با غلظت‌های متفاوتی از NAA و BAP کشت شدند و گیاهچه‌های حاصل جهت ریشه‌زایی در محیط کشت ½MS حاوی غلظت‌های مختلفی از IAA و NAA و زغال فعال قرارداده شدند. برگ‌های استریل گیاهچه‌ها نیز در محیط کشت ½MS دارای BAP، NAA و TDZ جهت بررسی قابلیت باززایی و تولید مستقیم جنین‌های بدنی کشت شدند. نتایج نشان داد موثرترین غلظت جهت باززایی گیاهچه در محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ٤ میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد. بیشترین تعداد ریشه از تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. بیش‌ترین پروتوکورم از تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ به دست آمد. میزان زنده‌مانی گیاهچه‌های باززایی شده از ریزنمونه گره‌های روی ساقه گل ۸٤/۹۳ درصد بود. در نهایت، بالاترین سازگاری گیاهچه‌ها (۹۰/۲ درصد) در محیط حاوی کوکوپیت و زغال فعال با نسبت ۱ به ۱ به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، پروتوکورم، سازگاری.

The study of large scale *Phalaenopsis amabilis* cv. Detroit plantlets production through *in vitro* culture of the vegetative organs

Khosro Balilashaki[1], Hedayat Zakizadeh[2*] and Jamal-Ali Olfati[3]
1, 2, 3. Ph. D. Candidate, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
(Received: Jul. 19, 2020 - Accepted: Nov. 1, 2020)

ABSTRACT

Orchids are one of the most popular plants in the world. Because of its hard propagation as most important problem, micropropagation technique has been employed recently. In this study, commercial micropropagation of orchid *Phalaenopsis* cut flower "Detroit" was done by vegetative tissue. First, nodal explants of *Phalaenopsis amabilis cv.* Detroit flower stalks cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentration of NAA and BAP for direct regeneration and the obtained planlets were cultured on ½ MS medium supplemented with different combination of NAA, IAA and activated charcoal for rooting. The sterile leaves of plantlets were cultured on ½ MS medium containing NAA, BAP and TDZ for evaluation of regeneration and direct production of somatic embryos. Results showed that effective concentration for plantlet regeneration obtained in MS medium containing 1 mg/l NAA and 4 mg/l BAP. The highest number of root produced in 2 mg/l NAA. The highest number of protocorms obtained at 3 mg/l TDZ. The plants survived rates from nodal flower stalk explants was 84.93%. At the end, the highest plantlets acclimatization (90.20 %) was in medium containing cocopeat and activated charcoal (1: 1).

Keywords: Acclimatization, plant growth regulators, protocorm, regeneration.

* Corresponding author E-mail: zakizadeh@guilan.ac.ir

مقدمه

امروزه کشت بافت به‌عنوان ابزاری برای تکثیر و تولید اقتصادی و حتی بهبود و اصلاح بسیاری از گیاهان ارزشمند مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mckey *et al*., 2010; Reed, 2001). هدف از ریزازدیادی گیاهان، تولید انبوه گیاهان یکنواخت و شبیه به گیاه مادری و نیز حفظ ژنوتیپ آن‌ها از طریق کشت بافت و سلول می‌باشد. در مورد گیاه ارکیده که دارای صنعتی میلیون دلاری در بازار جهانی گل و گیاهان زینتی می‌باشد، اولین روش‌های کشت بافت و ریزازدیادی با کشت گره‌های روی ساقه گل *Phalaenopsis* شروع و با کشت جوانه انتهایی برای به‌دست آوردن گیاهان عاری از ویروس و نیز برطرف کردن مشکل جوانه‌زنی بذرهای ارکیده ادامه یافت (Saya *et al*., 2008; Chugh *et al*., 2009). چندین مطالعه روی ریزازدیادی جنس *Phalaenopsis* که یکی از محبوب‌ترین گیاهان ارکیده شاخه بریده و گلدانی در صنعت گل و گیاهان زینتی می‌باشد صورت گرفته است (Thomas, 1992; Balilashaki *et al*., 2014; Kosir *et al*., 2004; Hong *et al*., 2010). پروتوکورم‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم از ریزنمونه‌های متفاوت تولید شوند. در مطالعه‌ای از بیوراکتور برای باززایی گیاهچه از برگ‌های حاصل از کشت گره‌های روی ساقه گل برای القاء و تکثیر پروتوکورم (PLB) استفاده شد (Young *et al.,* 2000). در آزمایشی موفق شدند کالوس و پروتوکورم‌ها را به‌طور مستقیم از بذر ارکیده *Paphiopedilum* القاء کنند (Long *et al*., 2010). در پژوهشی اثر منابع متفاوت از کربوهیدرات‌ها شامل گلوگز، فروکتوز، لاکتوز، ساکاروز، مالتوز و سوربیتول روی کارایی پروتوکورم بدنی از طریق کشت سوسپانسیون سلولی ارکیده *Phalaenopsis* بررسی شده است، در این تحقیق گلوکز به‌عنوان بهترین منبع کربوهیدرات، بالاترین کارایی را در تشکیل اندام‌های کورم مانند داشت و لاکتوز در هیچ یک از آزمایش‌ها تشکیل اندام‌های کورم مانند و کالوس‌زایی نقشی نداشت. در همین بررسی محققین بیان کردند که BA در غلظت کم باعث القاء و تکثیر کالوس و در عین حال باز دارنده تشکیل اندام‌های کورم مانند می‌باشد (Tokuhara & Mii, 2003). در مطالعه دیگری با تغییر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد منجر به پرآوری و ریشه‌زایی گیاه دارویی پنیرباد (Ghahremani *et al*., 2020) و گل ساعتی (Jafari *et al*., 2020) گردیدند مطالعات نشان می‌دهد که TDZ در ترکیب با اکسین برای تشکیل اندام‌های کورم مانند از بخش‌های مختلف برگ گیاه انتخاب خوبی می‌باشد (Niknejad *et al*., 2013). باززایی مستقیم شاخه از گره‌های روی ساقه گل *Phalaenopsis* روی ۶ محیط کشت بررسی و عنوان شد که ترکیبات محیط کشت القاء، باززایی و تعداد گیاهچه تولیدی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Kosir *et al*., 2004). در آزمایشی بیان شد که ریزنمونه‌هایی که از گره‌های روی ساقه گل‌های جوان گرفته شده دارای پتانسیل بالاتری برای کشت می‌باشند و زمانی که در محیط کشت MS افزوده شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA کاشته شدند، ۳۵ درصد کالوس‌زایی بیش‌تری نسبت به ریزنمونه‌های حاصل از بوته‌های مسن‌تر نشان دادند (Tan *et al*., 2011). با توجه به مطالب بالا و ذکر این نکته که رقم مورد مطالعه در این پژوهش به‌دلیل عدم تولید بذر، تنها با استفاده از اندام‌های غیرجنسی قابلیت ریزازدیادی را دارا می‌باشد، لذا در صورت موفقیت در تولید تجاری آن با استفاده از تکنیک کشت بافت ضمن جلوگیری از واردات گیاهچه‌های آن از خارج کشور، بررسی و بهینه کردن روش‌های درون شیشه‌ای برای باززایی و تولید گیاهچه می‌تواند مدل خوبی برای تولید دیگر رقم‌های شاخه بریده ارکیده *Phalaenopsis* در مقیاس تجاری باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و محیط کشت

برای انجام این پژوهش از دو محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) و ½MS استفاده شد. همچنین از BAP و TDZ به‌عنوان ترکیبات سایتوکینینی و IAA و NAA به‌عنوان ترکیبات اکسینی استفاده شد. همه‌ی ابزارهای کار، محیط‌های کشت و آب مقطر با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۲۰ کیلو پاسکال (Kpa) به‌مدت پانزده دقیقه سترون

شدند. پس از کشت، همه ریزنمونه‌ها استفاده شده در این پژوهش به اتاقک رشد دارای دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و طول دوره روشنایی شانزده ساعت نور و هشت ساعت تاریکی با استفاده از لامپ‌های فلورسنت سرد منتقل و نگهداری شدند. برای کشت ریزنمونه ها از شیشه‌های کشت پانصد میلی‌لیتری معروف به شیشه مربایی استفاده گردید. به‌منظور مطالعه‌ی ریزازدیادی از پایه‌های مادری *Phalaenopsis amabilis* cv. Detroit استفاده شد که از شرکت Anthora کشور هلند خریداری و در گلخانه تخصصی پرورش ارکیده فالانوپسیس واقع در شهرستان نوشهر پرورش داده می‌شدند (شکل ۳-a).

آزمایش اول: بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر شاخه‌زایی گره‌های روی ساقه گل

در ابتدا شاخه گل‌هایی که حداقل دو گلچه آن باز شده بود از روی بوته‌ها جدا و پس از قطع گلچه‌ها گره‌های موجود بر روی ساقه گل به طول ۶-۵ سانتی‌متر بریده و در محلول حاوی یک درصد قارچکش بنومیل و یک قطره توئین ۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. ریز نمونه‌ها سپس با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و به‌دنبال آن توسط سفیدکننده تجاری با غلظت ۳۵ درصد نسبت حجمی (یک و نیم درصد سدیم هیپوکلریت) به‌مدت ۱۵ دقیقه گندزدایی و در نهایت در سه بازه زمانی ۵ دقیقه‌ای با آب مقطر شسته شدند. در مرحله بعد دو طرف گره‌ها به این دلیل که در مرحله گندزدایی آسیب دیده بودند، به اندازه ۱/۵ سانتی‌متر جدا شده و پس از حذف براکته‌های روی جوانه‌ها، گره‌ها به‌صورت افقی برای باززایی گیاهچه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی BAP و NAA به‌ترتیب (۱و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر)، BAP و NAA (۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، BAP و NAA (۳ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر)، BAP و NAA (۴ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، BAP و NAA (۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، BAP و NAA (۶ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و شاهد بدون تنظیم‌کننده رشد، کشت شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار در محیط کشت‌های مشابه واکشت شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تکرار (هر تکرار حاوی ۱ ریزنمونه) برای هر تیمار اجرا گردید. طول دوره آزمایش تا داده‌برداری به‌مدت شش ماه طول کشید و تعداد گیاهچه‌های تولیدی به ازای هر ریزنمونه مورد شمارش قرار گرفت.

آزمایش دوم: بررسی ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از گره‌های روی ساقه گل

به این دلیل که گیاهچه‌های حاصل از کشت گره‌های روی ساقه گل تمایل چندانی برای القاء و تولید ریشه در محیط کشت شاخه‌زایی از خود نشان ندادند، گیاهچه‌های تولید شده در محیط کشت ½MS با غلظت‌های مختلف NAA، IAA و زغال فعال، (۱- شاهد بدون تنظیم‌کننده‌های رشد و زغال فعال، ۲- یک میلی‌گرم در لیتر زغال فعال، ۳- دو میلی‌گرم در لیتر زغال فعال، ۴- یک میلی‌گرم در لیتر IAA ، ۵- دو میلی‌گرم در لیتر IAA، ۶- یک میلی‌گرم در لیتر NAA، ۷- دو میلی‌گرم در لیتر NAA) برای ریشه‌زایی قرار داده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تکرار (هر تکرار حاوی ۱ ریزنمونه) برای هر تیمار اجرا گردید. سه ماه بعد از کشت ریزنمونه ها از نظر تعداد ریشه تولیدی مورد مطالعه قرار گرفتند.

آزمایش سوم: بررسی باززایی برگ‌های استریل حاصل از گیاهچه‌های تولیدی از گره‌های روی ساقه گل

برگ‌های استریل به‌دست آمده از گیاهچه‌های حاصل از کشت گره‌های روی ساقه گل، بدون ایجاد برش و دقیقا در نقطه‌ای که به ساقه متصل بودند، از گیاهچه‌ها جدا و در محیط کشت ½MS حاوی غلظت‌های متفاوت TDZ (۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، BAP و NAA به‌ترتیب (۳ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر)، BAP و NAA به‌ترتیب (۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، BAP و NAA (۷ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر)، BAPو NAA (۱۰ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و محیط کشت شاهد کشت شدند (شکل ۳). لازم به ذکر است ریزنمونه‌های مورد استفاده قبل از مرحله ریشه‌زایی گیاهچه‌ها استخراج شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار در محیط کشت‌های مشابه واکشت شدند. پس از تولید گیاهچه از ریزنمونه‌ها و ظاهرشدن برگ و

ریشه‌های آن، برای رشد و توسعه بیش‌تر، گیاهچه‌ها از محیط کشت اصلی خارج و به محیط کشت ½MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد که تنها حاوی یک گرم در لیتر زغال فعال بود انتقال داده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تکرار (هر تکرار حاوی ۱ ریزنمونه) برای هر تیمار اجرا گردید. با گذشت پنج ماه از کشت تعداد گیاهچه های تولیدی و زرد شده به ازای هر ریزنمونه مورد شمارش قرار گرفت.

آزمایش چهارم: بررسی سه بستر کشت متفاوت و نوع ریزنمونه استفاده شده برای سازگاری گیاهچه‌ها با محیط برون شیشه‌ای

گیاهچه‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ استریل و گره‌های روی ساقه گل زمانی که به اندازه مناسب برای سازگاری با محیط برون شیشه‌ای رسیدند، از درون شیشه‌ها خارج شده و برای حذف آگار و محیط کشت از ریشه‌ها با آب ولرم شسته شدند و به‌مدت یک دقیقه در قارچ‌کش بنومیل یک درصد قرار گرفتند و در نهایت برای مقایسه بهترین بستر سازگاری در سه بستر کشت ۱- کوکوپیت و زغال فعال (با نسبت۱:۱)، ۲- پوکه صنعتی، ۳- پرلیت، کشت شدند. با توجه به این که ارکیده *Phalaenopsis* گیاهی دارزی می‌باشد و ریشه‌های آن برای رشد گلدان‌های شفاف و محیط‌های متخلخل را می‌پسندد به‌جای گلدان‌های معمولی از سبدهای پلاستیکی میوه که خود جزو مواد ضایعاتی می‌باشد، استفاده شد. ابعاد این سبدها ۳۰×۴۵ با ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر بود. گیاهچه‌ها پس از کاشت در گلخانه‌ای با پوشش پلاستیکی و رطوب بالای ۷۰ درصد و دمای ۲۵ درجه روز و ۲۰ درجه سانتی‌گراد در شب با ۱۴ ساعت روشنایی قرار داده شدند. گیاهان روزانه یک بار آبیاری و دو مرتبه در طول هفته با کود کریستالون ۱۸-۱۸-۱۸ تغذیه شدند و در نهایت ۵ هفته پس از سازگاری تعداد گیاهچه‌های سالم در هر بستر کشت ثبت شدند. به ازای هر تیمار برای سازگاری ۲۰ گیاهچه به‌عنوان تکرار مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

در این آزمایش از طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تکرار به ازای هر تیمار استفاده شد. ارزش میانگین تیمارهای متفاوت با ANOVA نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و تفاوت بین میانگین هر تیمار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

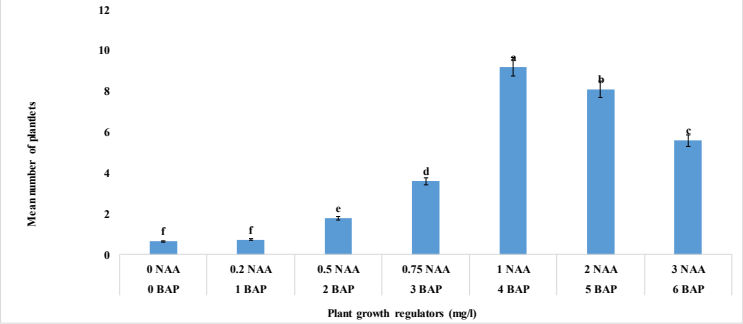
نتایج و بحث

نتایج آزمایش اول، تولید گیاهچه از گره‌های روی ساقه گل

نتایج حاصل شده تفاوت معنی‌داری را در تعداد گیاهچه تولیدی نشان دادند (جدول ۱). بیش‌ترین تعداد گیاهچه (۹/۲۰) در محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و نیز کم‌ترین میزان از تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (شکل ۳). پژوهشگران در بررسی باززایی مستقیم گیاهچه از گره‌های روی ساقه گل ارکیده *Phalaenopsis* گزارش نمودند که برای ازدیاد سریع تعداد زیاد شاخه رویشی بهتر است از محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شود (Kosir *et al*., 2004). اثرات مثبت ترکیب BAP و NAA را در ازدیاد هم‌گروهی ارکیده *Aerides odorata* Lour از ریزنمونه‌های مختلف نشان داد که اثرات هم‌افزایی این دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی می‌تواند در ریزازدیادی ارکیده‌ها موثر باشد (Devi *et al*., 2013). در این پژوهش نیز استفاده ترکیبی از دو تنظیم‌کننده رشد BAP و NAA اثر رضایت‌بخشی داشت. ترکیب و غلظت مناسب NAA و BAP در محیط کشت برای ریزازدیادی در تولید تجاری ارکیده‌های *Phalaenopsis* و *Doritaenopsis* می‌تواند موثر و مفید باشند (Tokuhara & Mii, 1993). در پژوهشی دیگر مشاهده شد، که TDZ به تنهایی و یا در ترکیب با 2,4-D در القای تکثیر شاخه از ریزنمونه‌های گره ساقه ارکیده *Paphiopedilum* موثر است (Chen *et al*., 2002). نتایج کشت ریزنمونه گره‌های روی ساقه گل برای بازایی مستقیم شاخه *Phalaenopsis violacea* در بستر حاوی سه نوع سیتوکینین مختلف TDZ، BAP و زآتین نشان داد که BAP بیش‌ترین درصد شاخه‌ها را از گره ساقه گل تولید کرد (Subramaniam *et al*., 2009).

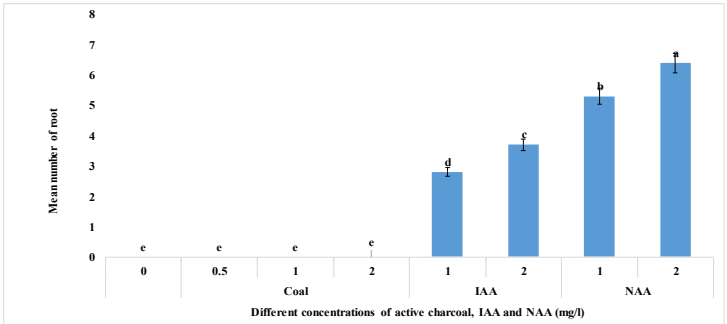
نتایج آزمایش دوم، ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از گره‌های روی ساقه گل

گیاهچه‌های حاصل از کشت گره‌های روی ساقه گل قابلیت کمی برای تولید ریشه از خود نشان دادند. بنابراین برای یافتن بهترین تیمار در تولید ریشه، این گیاهچه‌ها بر روی محیط کشت ½MS همراه با غلظت‌های مختلفی از زغال فعال و ایندول استیک اسید و نفتالین استیک اسید کشت شدند (شکل ۲). نتایج نشان داد محیط کشت ½MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین تعداد ریشه‌های القاء شده (۶/۴) برای هر گیاهچه را داشت. هر چند در تیمار ۲ میلی‌گرم IAA تعداد ریشه‌ها کم‌تر بود، اما ریشه‌ها و برگ‌ها طویل‌تر از تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA شدند. در آزمایشی، اثبات شده که ریشه‌های تشکیل شده از تیمار IAA طویل‌تر و نازک‌تر از تیمار NAA می‌باشند (Hossain *et al.*, 2009). در آزمایش حاضر، با افزایش غلظت NAA (۲ میلی‌گرم در لیتر) تعداد ریشه‌های تشکیل شده نیز افزایش یافت، اما رشد قسمت سبزینه گیاه به‌شدت کاهش یافت که در شکل (i.۳) قابل رویت می‌باشد. در آزمایشی بهترین ریشه‌زایی درون شیشه‌ای از شاخه‌های *Renantheraim schootiana* در بستر حاوی ۵/۴ میکرو مولار NAA و ۱ درصد زغال فعال مشاهده کردند (Seeni & Latha, 1992). بین دو تنظیم‌کننده رشد اکسین مورد استفاده (NAA و IAA)، کارایی NAA برای القاء ریشه بیش‌تر و مناسب‌تر می‌باشد (Paudel & Pant, 2012; Kong *et al.*, 2007). در این آزمایش با توجه به ویژگی‌های مشاهده شده در گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA پیشنهاد می‌شود زیرا هم تعداد ریشه‌ها مناسب است و هم گیاهچه‌ها از رشد مناسبی برخوردار بودند. گرچه در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ریشه بیش‌تری تولید شد، اما هم رشد گیاهچه‌ها محدود ماند و هم ریشه‌ها ضخیم و کوتاه بودند که سبب می‌شود گیاهچه، مناسب برای سازگاری با محیط گلخانه نباشد.



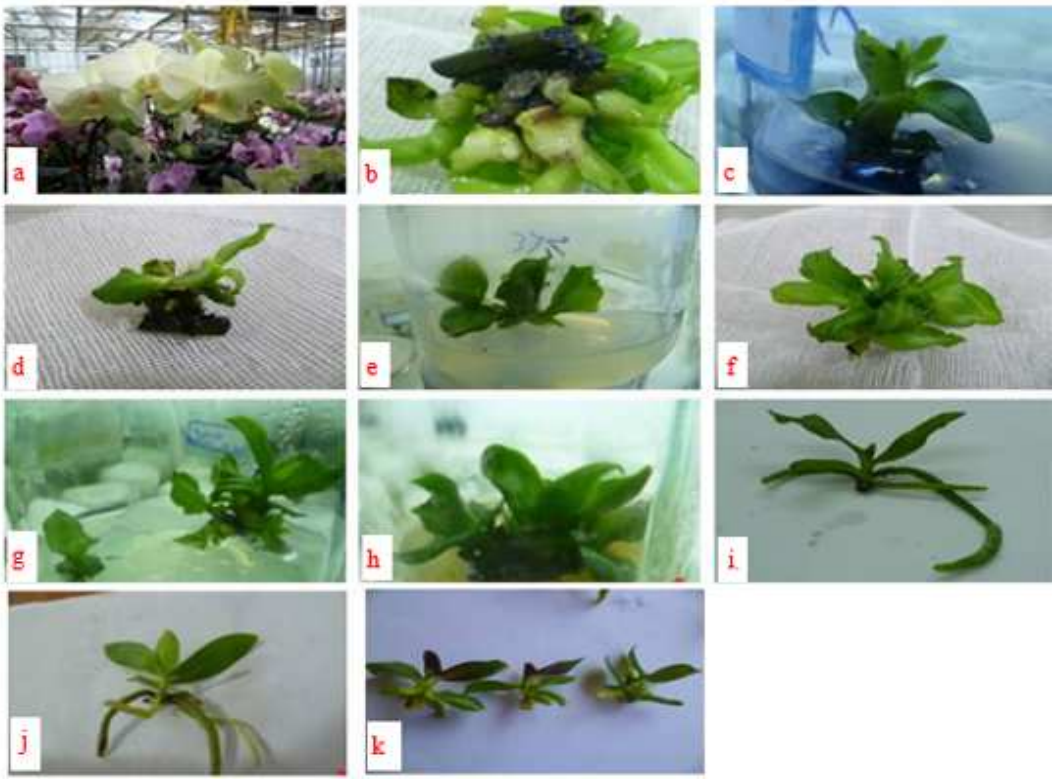
شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل نفتالین استیک اسید و بنزیل‌آمینوپورین بر تعداد گیاهچه باززایی شده ارکیده فالانوپسیس رقم Detroit از ریزنمونه گره‌ها.

Figure 1. Mean comparison interaction effect of NAA and BAP on plantlet number regeneration of *Phalaenopsis amabilis cv. Detroit* from nodes explant.



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر ایندول استیک اسید، نفتالین استیک اسید و زغال فعال بر تعداد ریشه‌های باززایی شده در گیاهچه‌های ارکیده فالانوپسیس رقم Detroit باززایی شده از ریزنمونه گره.

Figure 2. Mean comparison effect of IAA, NAA and active charcoal on root number regenerated of *Phalaenopsis amabilis cv. Detroit* from node explant.

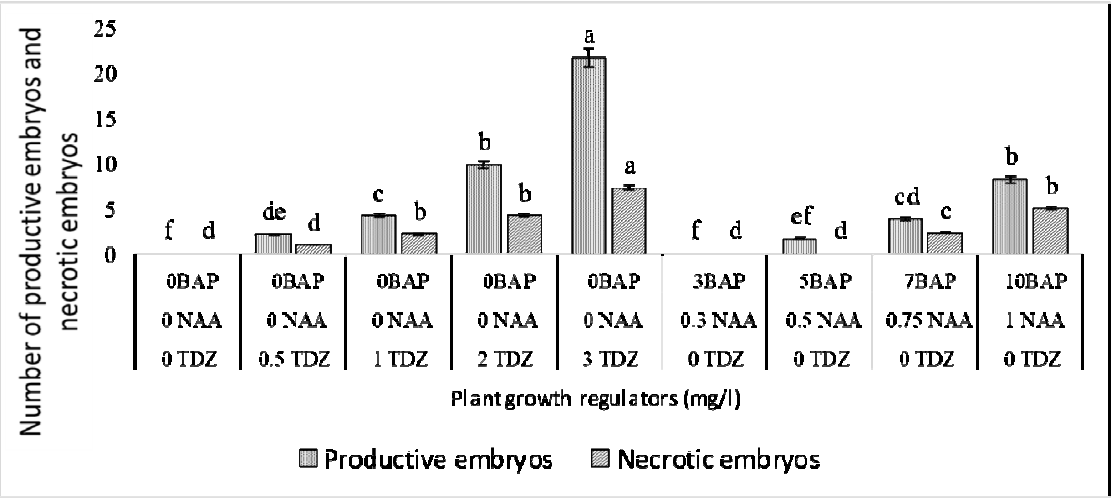


شکل ۳. a) تصویر ارکیده فالانوپسیس رقم Detroit، b) نحوه ظهور پروتوکورم ها از جوانه‌های روی گره ساقه گل، c) عملکرد ریزنمونه کشت شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، d) گیاهچه‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۲میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، e) گیاهچه‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۳میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، f) گیاهچه‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۴میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA. g) گیاهچه‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، h) گیاهچه‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۶ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA ، i) گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA ، j) گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA، k) گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA.

Figure 3. a) Detroit orchid, b) Protocorm regeneration from nodes, c) Performance of explants culturing on medium with 1 mg.L^{-1}BA and 0/2 mg.L^{-1}NAA, d) Plantlets regeneration on medium with 2 mg.L^{-1}BA and 0/5 mg.L^{-1}NAA, e) Plantlets regeneration on medium with 3 mg.L^{-1}BA and 0/75 mg.L^{-1}NAA, f) Plantlets regeneration on medium with 4 mg.L^{-1}BA and 1 mg.L^{-1}NAA, g) Plantlets regeneration on medium with 5 mg.L^{-1}BA and 2 mg.L^{-1}NAA, h) Plantlets regeneration on medium with 6 mg.L^{-1}BA and 3 mg.L^{-1}NAA, i) Rooted plantlet on medium with 1 mg.L^{-1}IAA, j) Rooted plantlet on medium with 2 mg.L^{-1}IAA, k) Rooted plantlet on medium with 1 mg.L^{-1}NAA.

نتایج آزمایش سوم، باززایی برگ‌های استریل حاصل از گیاهچه‌های تولیدشده از کشت گره‌های روی ساقه گل

در این آزمایش برگ‌های استریل گیاهچه‌های حاصل از کشت گره‌های روی ساقه گل پس از جداسازی در محیط کشت (½MS) محتوی غلظت‌های مختلف NAA، BAP و TDZ کشت شدند (شکل ۴). تشکیل اندام‌های کورم مانند (پروتوکورم) به‌طور مستقیم از سطح برگ در مدت ۶ هفته پس از کشت مشاهده شد. در این آزمایش مشخص شد که قسمت‌های ابتدای برگ‌ها یعنی جایی‌که برگ‌ها به ساقه‌ها می‌چسبند، قابلیت بیش‌تری را نسبت به نوک برگ‌ها در تولید جنین سوماتیکی از خود نشان دادند. تعدادی از جنین‌های تولیدی در برخی از تیمارها تمایل به نکروز (زردی) یا قهوه‌ای شدن نشان دادند که این با میزان و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی رابطه مستقیم داشت. بیش‌ترین تعداد جنین‌های بدنی (۲۱/۶) به‌طور مستقیم از تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ حاصل شد.



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل بنزیل آمینوپورین، نفتالین استیک اسید و تیدیازرون بر تعداد پروتوکورم‌های تولیدی و نکروزه گیاهچه‌های ارکیده فالانوپسیس رقم Detroit حاصل از برگ‌های استریل.

Figure 4. Mean comparison interaction effect of BAP, NAA and TDZ on number of productive protocorms and necrotic protocorms of *Phalaenopsis amabilis cv. Detroit* from sterile leaves.

در مطالعه‌ای تنظیم‌کننده TDZ نسبت به BAP و NAA قابلیت بالاتری را برای تولید اندام کورم مانند از خود نشان داد، اما با بالارفتن مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد به‌ویژه TDZ تعداد جنین‌های زرد شده نیز افزایش یافت (Chen & Chang, 2006). در گزارشی بیان شد که TDZ توانایی بیش‌تری در جنین‌زایی از ریزنمونه برگی ارکیده فالانوپسیس نسبت به تنظیم‌کننده‌های دیگر دارد (Gow *et al*., 2008).

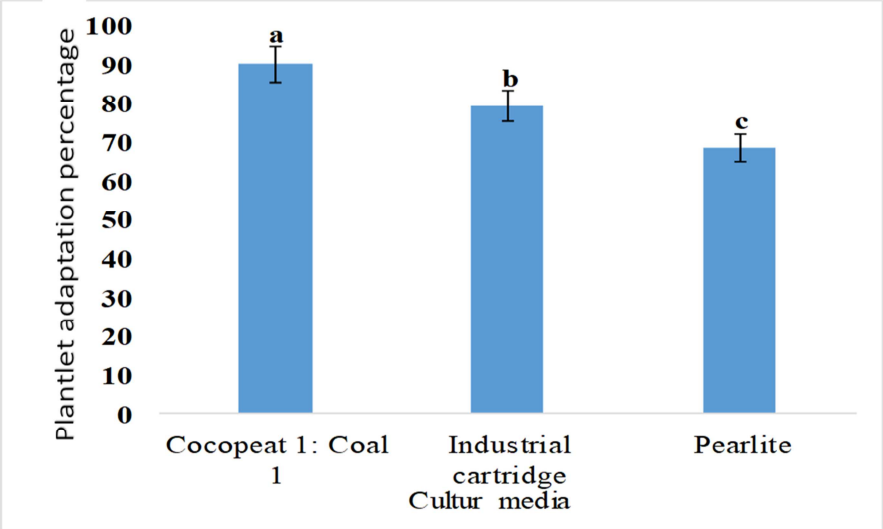
در این آزمایش بررسی محیط کشت حاوی BAP و NAA نشان دادند که در غلظت‌های پائین توانایی کمی برای جنین‌زائی دارند و برای القاء جنین‌های بدنی باید از غلظت‌های بالاتری از این دو تنظیم‌کننده استفاده نمود و با توجه به عملکرد، مقدار مصرف و تعداد جنین‌های تولیدی نسبت به تنظیم‌کننده رشد TDZ مناسب نمی‌باشند. با افزایش غلظت BAP و NAA میانگین تشکیل جنین‌های بدنی افزایش یافت و بالاترین نرخ باززایی از ریزنمونه برگی با استفاده از BAP (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) حاصل شد (شکل ۷). گیاهچه‌های تولید شده از ریزنمونه برگ استریل در نهایت به محیط کشت (½MS) با ۱ گرم در لیتر زغال فعال در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی برای توسعه و تشکیل گیاهچه بهتر انتقال داده شدند.

نتایج آزمایش چهارم، سه بستر کشت متفاوت و نوع ریزنمونه استفاده‌شده بر سازگاری گیاهچه‌ها با محیط برون شیشه‌ای

گیاهچه‌های تولید شده از ریزنمونه‌های گره و برگ با ارتفاع بیش از ۴ سانتی‌متر و دارای چهار برگ پس از خارج شدن از شیشه‌های کشت به سبدهای سازگاری منتقل و در شرایط گلخانه‌ای نگه‌داری شدند. اثر ترکیب‌های متفاوت بستر کشت بر روی سازگاری گیاهچه‌های تولیدی از ریزنمونه‌های متفاوت در این پژوهش نشان داد که ترکیب کوکوپیت و زغال با نسبت حجمی ۱ به ۱ بهترین اثر را در زنده‌مانی گیاهچه‌ها (۹۰/۲۰ درصد) داشت و ضعیف‌ترین بستر نیز پرلایت (۶۸/۵ درصد) تشخیص داده شد و بستر پوکه صنعتی نیز (۷۹/۵ درصد) در حد متوسطی بود (شکل ۵). بسترهای کشت با مهیاکردن شرایط مناسب از لحاظ زهکشی، تامین هوای ریشه و عناصر جهت رشد و توسعه گیاهان دارای اهمیت فراوان می‌باشند. در آزمایشی گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از کشت ریزنمونه‌های بذر، گره‌های روی دمگل و برگ‌های استریل برای سازگاری در دو محیط مختلف از نظر ترکیب گلدانی بررسی و نشان دادند که ریزنمونه گره و محیط کشت حاوی کوکوپیت و زغال با نسبت ۵ به

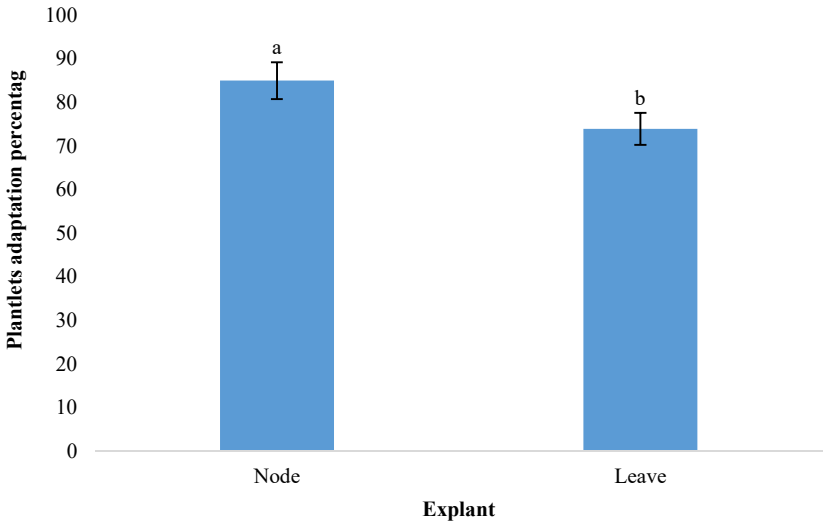
۱ حجمی بالاترین میزان زنده‌مانی را داشتند (Balilashaki *et al.*, 2014).

میانگین زنده‌مانی گیاهچه‌های تولیدشده از ریزنمونه گره‌های روی ساقه گل با تعداد ۸۴/۹۳ بالاتر از گیاهچه‌های حاصل از نمونه برگ استریل (۷۳/۸۷) بود (شکل ۶). یکی از علت‌هایی که می‌توان برای سازگاری بهتر گیاهچه‌های حاصل از گره‌های روی دمگل ذکر کرد این است که چون این گیاهچه‌ها مرحله ریشه‌زایی جداگانه‌ای در محیط ریشه‌زایی که محتوای اکسین بوده را داشته‌اند ریشه‌ها و اندام‌های هوایی به مراتب بهتری نسبت به ریزنمونه‌های حاصل از برگ استریل را دارا بودند که این امر باعث نتیجه بهتر در مرحله سازگاری شد.



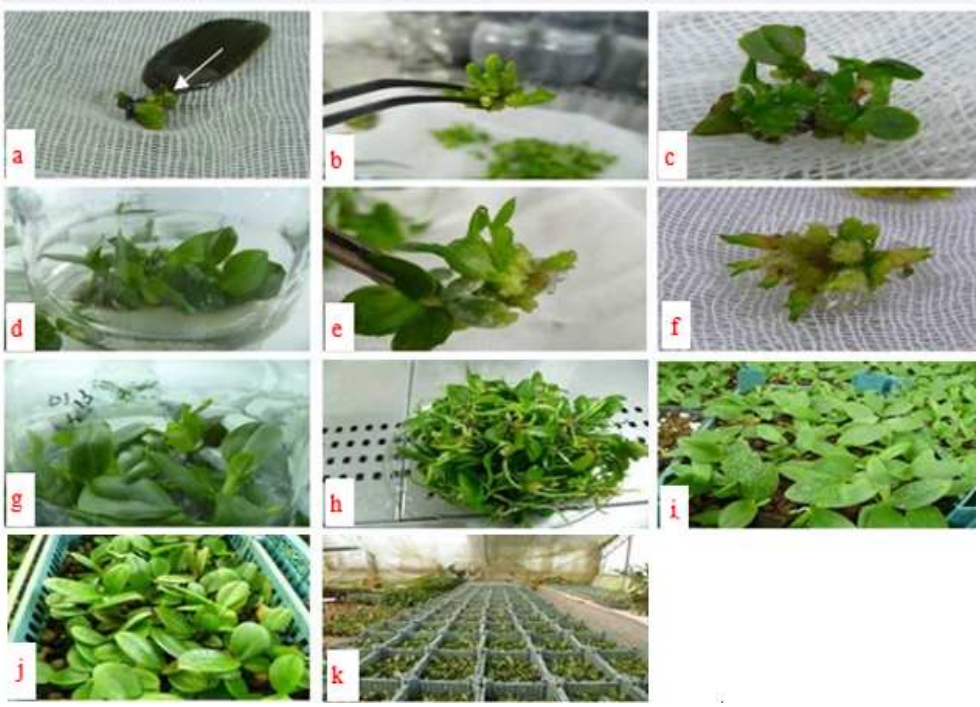
شکل ۵. مقایسه میانگین اثر بستر کشت بر سازگاری گیاهان باززایی شده ارکیده فالانوپسیس رقم Detroit از ریزنمونه گره و برگ.

Figure 5. Mean comparison effect of culture medium composition on plantlets regenerated adaptation of *Phalaenopsis amabilis cv. Detroit* from node and leaf explant.



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه بر سازگاری گیاهان باززایی شده ارکیده فالانوپسیس رقم Detroit.

Figure 6. Mean comparison effect of explant type on adaptation of plantlets regenerated of *Phalaenopsis amabilis cv. Detroit*.



شکل ۷. a) نشان دادن پتانسیل قسمت انتهایی برگ‌ها در تولید پروتوکورم، b) گیاهچه‌های تولید شده از طریق کشت بر روی محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ، c) گیاهچه‌های تولید شده بر روی محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ، d) گیاهچه‌های تولید شده بر روی محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ، e) گیاهچه‌های تولید شده بر روی محیط کشت حاوی ۷ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۷۵میلی‌گرم در لیتر NAA، f) گیاهچه‌های تولید شده بر روی محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، g) اندازه مناسب گیاهچه‌ها جهت سازگاری با محیط برون شیشه‌ای، h) خارج نمودن گیاهچه‌ها از شیشه‌های کشت و انتقال به گلخانه جهت سازگاری با محیط گلخانه، i) گیاهچه‌های حاصل از برگ‌های استریل کشت شده در بستر کشت حاوی کوکوپیت و ذغال با نسبت حجمی ۱ به ۱ دو ماه پس از انتقال، j) گیاهچه‌های حاصل از گره‌های روی ساقه گل کشت شده در بستر کشت حاوی لیکا دو ماه پس از انتقال، k) تولید انبوه گیاهچه‌های حاصل از برگ‌های استریل آماده جهت کشت در گلدان‌های نشائی.

Figure 7. a) Demonstrate the potential of the end of the leaves in the production of protocorm, b) Plantlets regeneration by cultivation on medium with 1 mg.L^{-1}TDZ, c) Plantlets regeneration on medium with 2 mg.L^{-1}TDZ, d) Plantlets regeneration on medium with 3 mg.L^{-1}TDZ, e) Plantlets regeneration on medium with 7 mg.L^{-1}BAP and 0/75 mg.L^{-1} NAA, f) Plantlets regeneration on medium with 10 mg.L^{-1}BAP and 1 mg.L^{-1} NAA, g) The right size of plantlet adaptation to ex vitro condition, h) Moving plantlets from in vitro condition and transfer to greenhouse for adaptation to greenhouse condition, i) Plantlets regenerated from sterile leaves culturing on medium with Cocopeat + Coal 1:1, two month after transfer, j) Plantlets regenerated from node on flower stalk, cultured in media with Leca, two month after transfer, k) Large scale production plantlets regenerated from sterile leaves, for culturing in square pots.

نتیجه‌گیری کلی

روش‌های به‌دست آمده در این تحقیق می‌تواند برای تولید تجاری گیاهچه از اندام‌های رویشی ارکیده شاخه بریده رقم Detroit استفاده شود. نتایج حاصل از این آزمایش بیانگر آن بود که سیتوکینین‌های مورد مطالعه کارایی خوبی را در القاء مستقیم جنین‌های بدنی در هر دو ریزنمونه مورد بررسی نشان دادند. روش باززایی مستقیم که در این تحقیق استفاده شد، روش مطلوبی برای تکثیر غیرجنسی تشخیص داده شد و با استفاده از تکثیر پروتوکورم‌ها می‌توان مدت زمان لازم برای تولید گیاه از ریزنمونه‌ها را کوتاه نمود. بنابراین نتایج این آزمایش را می‌توان به‌عنوان یک پروتکل برای ریزازدیادی تجاری رقم‌های دیگر ارکیده فالانوپسیس پیشنهاد نمود. همچنین قابل ذکر است که روش تکثیر از برگ‌های استریل حاصل از کشت گره‌های روی ساقه گل مناسب‌تر از ریز نمونه گره‌های روی ساقه گل تشخیص داده شد و این به‌علت قدرت باززایی بالا، عدم نیاز به گندزدایی ریزنمونه ها، تولید مستقیم ریشه توسط گیاهچه‌های تولیدی و حذف مرحله ریشه‌زایی می‌باشد. همچنین قابل ذکر است که بستر کوکوپیت و زغال فعال می‌تواند محیط مناسبی برای سازگاری گیاهچه‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای باشد.

REFERENCES

1. Balilashaki, K., Naderi, R., Kalantari, S. & Vahedi, M. (2014). Efficient *in vitro* culture protocols for propagating *Phalaenopsis* 'Cool Breeze'. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 24,191-203.
2. Chen, Y., & Piluek, C. (1995). Effects of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis. Plant Growth Regulation*, 16(1), 99-101.
3. Chen, J., & Chang, W.C. (2006). Direct Somatic embryogenensis and plant regeneration from leaf explants *Phalaenopsis*. Bioplant, 50, 169-173.
4. Chen, T. Y., Chen, J. T. & Chang, W. C. (2002). Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(6), 595-597.
5. Chugh, S., Guha, S. & Rao, I. U. (2009). Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 507-520.
6. Devi, H. S., Devi, S. I. & Singh, T. D. (2013). High frequency plant regeneration system of *Aerides odorata* Lour. through foliar and shoot tip culture. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 169.
7. Ghahremani, A., Ganji, M., Tatari, M. & Khosroyar, M. (2020). Effect of type and concentration of growth regulators on the proliferation and marcotting of *Withania coagulans* medical plant. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 51 (2): 287-294 (in Farsi).
8. Gow, W. P., Chen, J. T. & Chang, W. C. (2008). Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(4), 507-512.
9. Hong, P. I., Chen, J. T. & Chang, W. C. (2010). Shoot development and plant regeneration from protocorm-like bodies of *Zygopetalum mackayi*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plan*t, 46(3), 306-311.
10. Hossain, M. M., Sharma, M. & Pathak, P. (2009). Cost effective protocol for in vitro mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.–a medicinally important orchid. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 444-453.
11. Jafari, M., Daneshvar, M. & Lotfi-Jalalabadi, A. (2020). Direct organogenesis of passion flower (*Passiflora caerulea* L.) via leaf and petiole explants. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 49 (2): 375-382 (in Farsi).
12. Ket, N. V., Hahn, E. J., Park, S. Y., Chakrabarty, D. & Paek, K. Y. (2004). Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biologia Plantarum*, 48(3), 339-344.
13. Kong, Q., Yuan, S. Y. & Végvári, G. Y. (2007). Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* Rchb. f. *International Journal of Horticultural Science*, 13(1), 61-64.
14. Košir, P., Škof, S. & Luthar, Z. (2004). Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. *Acta agriculturae Slovenica*, 83(2), 233-242.
15. Long, B., Niemiera, A. X., Cheng, Z. Y. & Long, C. L. (2010). *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101(2), 151-162.
16. McKey, D., Elias, M., Pujol, B. & Duputié, A. (2010). The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist*, 186(2), 318-332.
17. Mok, M. C., Mok, D. W. S., Armstrong, D. J., Shudo, K., Isogai, Y. & Okamoto, T. (1982). Cytokinin activity of N-phenyl-N′-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry*, 21(7), 1509-1511.
18. Niknejad, A., Kadir, M.A. & Kadzimin, S.B. (2013). *In vitro* plant regeneration from protocorms-like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantea* (*Epidendroideae: Orchidaceae*). *African Journal of Biotechnology*, 10(56), 11808-11816.
19. Paudel, M. R. & Pant, B. (2012). *In vitro* plant regeneration of *Esmeralda clarkei* Rchb. f. via protocorm explant. *African Journal of Biotechnology*, 11(54), 11704-11708.
20. Reed, B. M. (2001). Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo-Letters*, 22(2), 97-104.
21. Saya, R. A., Mankessi, F., Toto, M., Marien, J. N. & Monteuuis, O. (2008). Advances in mass clonal propagation of *Eucalyptus urophylla× E. grandis* in Congo. *Bois & Forets des Tropiques*, 297, 15-25.
22. Seeni, S. & Latha, P. G. (1992). Foliar regeneration of the endangered red vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29(3), 167-172.
23. Subramaniam, S., Balasubramaniam, V., Poobathy, R., Sreenivasan, S. & Rathinam, X. (2009). Chemotaxis movement and attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to *Phalaenopsis violacea* orchid tissues: An assessment of early factors influencing the efficiency of gene transfer. *Tropical Life Sciences Research*, 20(1), 73-81.

24. Tan, B. C., Chin, C. F. & Alderson, P. (2011). Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(3), 457-463.
25. Tanaka, M. & Sakanishi, Y. (1980). Clonal propagation of *Phalaenopsis* through tissue culture. In Proceeding. *9th World Orchid Conference, Bangkok*, 21 May 1987, pp. 215-221.
26. Thomas, S. H. (1992). Demand overpaces production of the optimum orchid. *Greenhouse Growers*, 11, 56-59.
27. Tokuhara, K. & Mii, M. (1993). Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports*, 13(1), 7-11.
28. Tokuhara, K. & Mii, M. (2003). Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(6), 635-639.
29. Young, P. S., Murthy, H. N. & Yoeup, P. K. (2000). Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(1), 67-72.