12th Iranian Horticultural Science Congress
September 05-08 2021
۱۴ لغایت ۱۷ شهریورماه ۱۴۰۰
دوازدهمین کنگره علوم باغبانی ایران

(بررسی پروتوکورم زایی بدنی ارکیده فالانوپسیس در محیط کشت های جامد)

آیلار محمدپور باروق[۱]، شیرین دیانتی دیلمی*[۱]، علی فدوی[۲]
[۱] گروه باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
[۲] گروه فناوری صنایع غذایی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران
* ایمیل نویسنده مسئول: dianati@ut.ac.ir

چکیده

عدم امکان تکثیر غیرجنسی ارکیده فالانوپسیس به شیوه های معمول، بالا بودن هزینه های تولید و تکثیر نشاء آن به دلیل وابسته بودن به سیستم های کشت درون شیشه ای و استفاده از تنظیم کننده های رشد گران قیمت مانند تیدیازورون برای تولید جنین های بدنی، یافتن و معرفی روش های ساده و ارزان برای تکثیر غیرجنسی این گیاه، می تواند راهکاری ارزشمند و مورد توجه برای تولید کنندگان تجاری آن باشد که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ریزنمونه های پروتوکورمی فالانوپسیس در هشت تیمار محیط کشت شامل ۱/۲ ام اس (شاهد)، فاست تغییر یافته و محیط های ساده کم هزینه دست ساز (محیط های یک تا شش) در سه تکرار، کشت شدند. سه ماه پس از کشت، وزن تر و خشک، حجم، تعداد و محتوای کربوهیدرات پروتوکورم ها ثبت شد. نتایج نشان دهنده اثر مثبت استفاده از قند ها به صورت ترکیبی، روی پروتوکورم زایی بود. با توجه به بیشترین میزان پروتوکورم زایی (۱۳۴ عدد) و کاهش ۷۴ درصدی هزینه های کشت در محیط شش دارای ترکیب قند های فروکتوز و ساکارز، این تیمار به عنوان ارزان قیمت ترین محیط کشت جامد جهت پروتوکورم زایی ارکیده های فالانوپسیس بدون نیاز به استفاده از مواد تنظیم کننده رشد، شناخته شد.

مقدمه

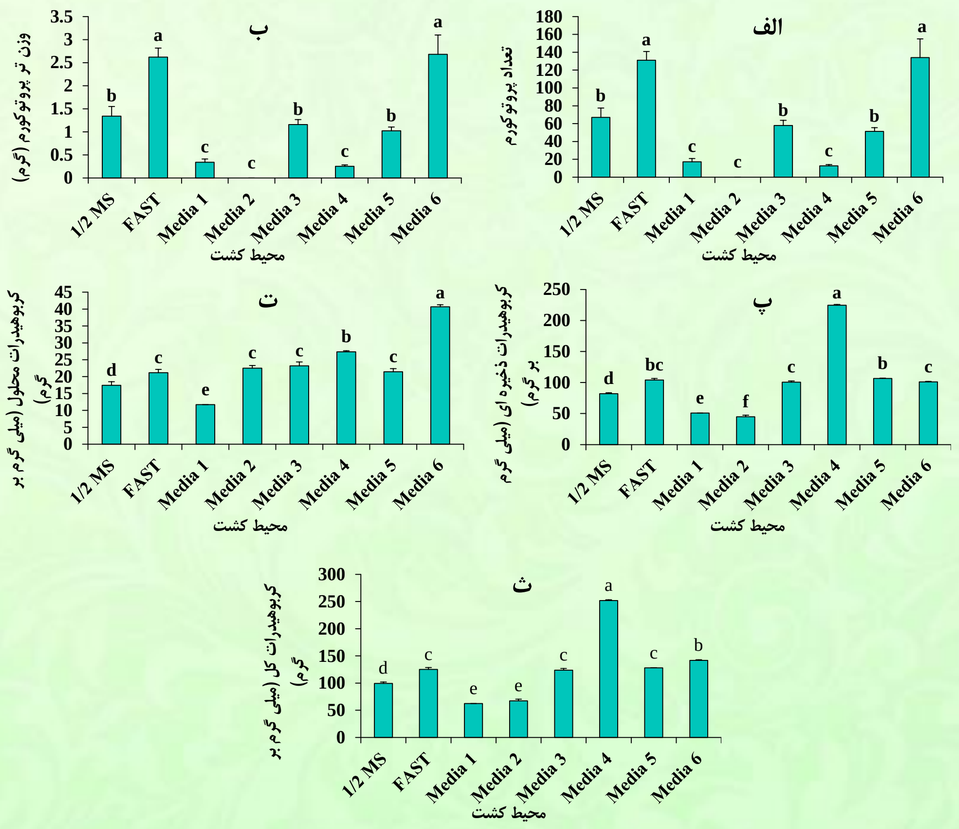
فالانوپسیس با ارزش اقتصادی بالا، یکی از محبوب ترین ارکیده های تک پا موجود در بازار جهانی محسوب می شود (Naderi *et al.*, 2021). بهترین روش تکثیر غیرجنسی این ارکیده، تولید جنین های بدنی به صورت پروتوکورم های شبه بدنی در سیستم کشت درون شیشه ای و با افزودن مواد تنظیم کننده رشد به محیط های کشت، می باشد (Hamada *et al.*, 2010). گزارش شده است که استفاده از محلول های کودی (NPK) به عنوان نمک های معدنی به دلیل دارا بودن میزان مواد مغذی کم تر، جایگزین کردن مواد طبیعی مانند شیر نارگیل، عصاره سیب زمینی و یا پودر موز به جای ویتامین ها و مواد افزودنی (Romeida *et al.*, 2018) و استفاده از عصاره مخمر ها و گیاهان مانند عصاره ذرت و پاپایا به عنوان جایگزین ارزان قیمت تنظیم کننده های رشد (Huh *et al.*, 2016)، می تواند در کاهش هزینه های کشت مؤثر واقع شوند. در این پژوهش سعی شد تا با جایگزین کردن مواد طبیعی و ارزان قیمت به عنوان هر یک از مواد تشکیل دهنده محیط های کشت، محیط کشتی ارزان قیمت بدون استفاده از مواد تنظیم کننده رشد برای پروتوکورم زایی در سطح تجاری، معرفی نمود.

مواد و روش ها

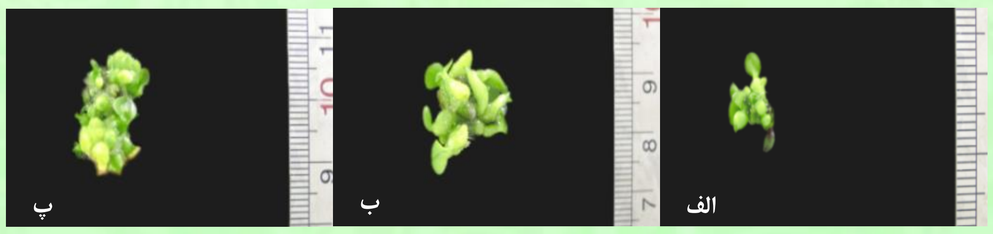
در این پژوهش ابتدا بذر های ارکیده *Phalaenopsis amabilis*‘Anthura Beijing’ تحت شرایط استریل در محیط نیم غلظت موراشیگ و اسکوگ جامد دارای ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، کشت شدند. سه ماه پس از کشت، محیط های کشت جامد شامل نیم غلظت ام اس، فاست تغییر یافته و محیط های دست ساز دارای عناصر اصلی نیتروژن، پتاسیم و فسفر (که با نام محیط های یک تا شش مشخص شده اند) به عنوان تیمار های آزمایش تهیه شدند. افزودنی ها شامل پودر موز و ذغال فعال به محیط های کشت سه تا شش و در نهایت آگار به تمام محیط های کشت افزوده شد. همه محیط ها جهت سترون شدن به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر، قرار گرفتند و با پایین آمدن دمای آن ها، هر یک به مقدار ۳۰ میلی لیتر، در ظروف جار ۳۰۰ میلی لیتری توزیع شدند. یک هفته بعد از توزیع محیط های کشت، پروتوکورم های پنج میلی متری در هشت تیمار با سه تکرار و هر تکرار دارای پنج عدد ریزنمونه (به وزن ۰/۱ گرم) در قالب طرح کاملا تصادفی، کشت شدند. سپس ظروف کشت شده، به شرایط رشدی داخل اتاقک کشت با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد، طول مدت ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و تحت نور سفید لامپ های فلئوروسنت دارای طیف ۴۰۰– ۷۰۰ نانومتر و با شدت نور ۲۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه منتقل و به مدت سه ماه نگهداری شدند. در مدت سه ماه هر ۳۰ روز یکبار واکشت ریزنمونه ها صورت گرفت و سه ماه پس از کشت صفات مورفولوژی از جمله وزن تر و خشک، حجم و تعداد پروتوکورم ها و صفات بیوشیمیایی شامل محتوای کربوهیدرات محلول، ذخیره ای و کل پروتوکورم، ثبت شد. ارزیابی غلظت کربوهیدرات محلول به روش یم و ویلز (Yemm and Willis, 1954) و کربوهیدرات ذخیره ای به روش مک کردی و همکاران با استفاده از ۰/۱ گرم بافت خشک پروتوکورم ها انجام شد (McCready *et al.*, 1950). سپس جذب نوری آن ها به ترتیب در طول موج های ۶۲۵ و ۶۳۰ نانومتر ثبت و از منحنی استاندارد گلوکز استفاده شد.

نتایج و بحث

طبق نتایج نامبیار و همکاران (Nambiar *et al.*, 2012)، دلیل عمده افزایش پروتوکورم زایی در دو محیط کشت فاست و شش، به دلیل وجود قند فروکتوز به همراه ساکارز است. زیرا سرعت هیدرولیز قند ساکارز نسبت به جذب آن در مقایسه با قند فروکتوز سریع تر است به همین دلیل تاثیر آن بر پروتوکورم زایی نسبت به فروکتوز کمتر می شود. همچنین وجود پودر موز و ذغال فعال در محیط شش سبب افزایش وزن تر و خشک پروتوکورم نسبت به تیمار فاست شده است، زیرا موز منبع غنی از پتاسیم، آهن، ویتامین و آمینواسید ها است بنابراین نقش مهمی در تحریک رشد پروتوکورم ها ایفا می کند. علاوه بر آن وجود قند های ساده در موز سبب بالارفتن محتوای قند محیط کشت و افزایش وزن پروتوکورم می شود، به همین دلیل محتوای کربوهیدرات کل تیمار های دارای پودر موز (محیط های سه تا شش)، از دیگر تیمار ها بیشتر بوده است. ذغال فعال نیز به دلیل قدرت جذب بالا نسبت به ترکیبات زائد و بازدارنده محیط های کشت، اثرات منفی احتمالی عصاره موز را خنثی و در پروتوکورم زایی تأثیر می گذارد. در محیط چهار وجود تنش به دلیل کمبود عناصر ریز مغذی و ویتامین ها، باعث شده است که گیاه مقدار کمتری از قند مورد نیاز خود را مصرف و مقدار بالایی از آن را ذخیره کند به همین دلیل بیشترین محتوای کربوهیدرات ذخیره ای را به خود اختصاص داده است. در محیط کشت دو بالا بودن تنش ناشی از کمبود مواد غذایی سبب کاهش میزان پروتوکورم زایی شده است. یافته های حاصل با نتایج آکتر و همکاران، مطابقت دارد (Akter *et al.*, 2007).



شکل ۱- بررسی صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی پروتوکورم های رشد یافته در محیط کشت های جامد مختلف



شکل ۲- پروتوکورم زایی ریزنمونه های کشت شده در محیط های کشت الف) نیم غلظت ام اس، ب) فاست، پ) شش

منابع

Akter, S.,Nasiruddin, K.,Khaldun, A. 2007. Organogenesis of Dendrobium orchid using traditional media and organic extracts. Journal of Agriculture & Rural Development, 30-35.
Hamada, K.,Shimasaki, K.,Ogata, T.,Nishimura, Y.,Nakamura, K.,Oyama-Egawa, H.,Yoshida, K. 2010. Effects of spectral composition conversion film and plant growth regulators on proliferation of Cymbidium protocorm like body (PLB) cultured in vitro. Environmental Control in Biology, 48(3): 127-132.
Huh, Y.S.,Lee, J.K.,Nam, S.Y.,Paek, K.Y.,Suh, G.U. 2016. Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of Cypripedium macranthos Sw. with organic additives. Journal of Plant Biotechnology, 43(1): 138-145.
McCready, R.M.,Guggolz, J.,Silviera, V.,Owens, H.S. 1950. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. Analytical Chemistry, 22(9): 1156-1158.
Naderi Boldaji, H.,Dianati Dylami, Sh.,Aliniaeifard, S.,Norouzi, M. 2021. Efficient Method for Direct Embryogenesis in Phalaenopsis Orchid. International Journal of Horticultural Science and Technology, 8(1): 37-50.
Nambiar, N.,Tee, C.S.,Maziah, M. 2012. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocormlike bodies in Dendrobium Alya Pink. Plant OMICS, 5(1): 10-18.
Romeida, A.,Supanjani, Sinaga, S.S. 2018. Low-cost media for in vitro multiplication and development of Protocorm Like Bodies (PLBs) of Eulophia graminea Orchid. International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology, 8(1): 78-84.
Yemm, E.,Willis, A. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical journal, 57(3): 508-514.