تأثیر فاز محیط کشت و مواد افزودنی روی جوانه‌زنی غیرهمزیست بذر فالانوپسیس در شرایط درون‌شیشه‌ای

فرید عبدل‌زاده*[۱]، شیرین دیانتی دیلمی[۲]، ساسان علی‌نیائی‌فرد[۳]، مسعود میرمعصومی[۴]

[۱*]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

[۲] استادیار، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

[۳]استادیار، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

[۴] مربی، گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم دانشگاه تهران

*نویسنده مسئول: farid.abdolzadeh@gmail.com

چکیده

در این پژوهش به بررسی تأثیر نوع محیط‌کشت و مواد افزودنی جوانه‌زنی غیرهمزیست بذر حاصل از گرده‌افشانی دستی ارکیده فالانوپسیس رقم جینان در شرایط درون‌شیشه‌ای پرداخته شد. کپسول‌ها (میوه) ۱۲۰ روز پس از تلقیح و قبل از شکاف خوردن برداشت شدند. مواد اضافی از کپسول‌ها جدا شده و شستشو داده شدند. سپس ضدعفونی آن‌ها زیر هود لامینار انجام گرفت. درنهایت، کپسول‌ها به‌صورت طولی برش داده شده و بذرهای میکروسکوپی آن‌ها خارج و در محیط‌کشت ½Ms (در دو فاز جامد و مایع) دارای پپتون، شیرنارگیل و ترکیب این دو ماده کشت شدند. تمامی کشت‌ها در طول روز ۱۶/۸ تاریکی/روشنایی و دمای ۲±۲۵ نگهداری شدند. نتایج این پژوهش نشان داد، برای جوانه‌زنی بذر محیط مایع برتر از محیط جامد و پپتون بهترین ماده افزودنی بود و استفاده از ترکیب این دو فاکتور با ۹۶٪ جوانه‌زنی بذر همراه بود و می‌تواند برای تولید سریع و انبوه پروتوکورم مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پپتون، پروتوکورم، رقم جینان، شیرنارگیل، کپسول.

مقدمه

تیره ارکیده با دارا بودن ۸۰۰ جنس و بیش از ۲۵۰۰۰ گونه یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهان گل‌دار است که در صنعت گلکاری دارای ارزش اقتصادی بالایی بوده و به‌صورت گل بریده یا گیاه گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه کشت‌بافت یکی از روش‌هایی است که برای تولید انبوه کاربرد بسیاری دارد (Johnson and Kane, 2007). در بین جنس‌های این تیره، فالانوپسیس[۱] به دلیل داشتن شکل گل زیبا و رنگ‌های متنوع محبوب‌ترین جنس این تیره می‌باشد (Wu and Doris, 2012). در طبیعت ارکیده‌ها با بذر تکثیر می‌شوند که در نبود قارچ‌های مایکوریزا به میزان کافی جوانه‌زنی ندارند. بذر ارکیده متفاوت از بذر سایر گیاهان گل‌دار است، آن‌ها بسیار ریز و گرد مانند بوده و در تعداد زیاد داخل کپسول رشد می‌کنند و فاقد بافت ذخیره‌ای هستند. جوانه‌زنی غیرهمزیست بذر روشی مناسب برای انجام کارهای اصلاحی و برنامه‌های اقتصادی به‌ویژه در گیاهان با دوره نونهالی طولانی نظیر ارکیده‌ها می‌باشد. در این تکنیک جوانه‌زنی بذرهای ارکیده در شرایط درون‌شیشه‌ای و با استفاده از محیط‌کشت مشخص با تأمین کربوهیدرات، مواد معدنی و ویتامین‌ها انجام می‌گیرد (Ziv and Naor, 2006). در این پژوهش به بررسی و مقایسه تأثیر محیط‌کشت ½MS در دو فاز جامد و مایع و مواد افزودنی شامل پپتون و شیرنارگیل به‌صورت جداگانه و مخلوط در میزان جوانه‌زنی رقم جینان پرداخته شد.

[1] *Phalaenopsis*

مواد و روش‌ها

گیاه والد

برای انجام گرده‌افشانی و تولید بذر، از هیبرید فالانوپسیس (شکل۱) پرورش‌یافته در گلخانه‌های منطقه ورامین تهران استفاده شد. این رقم، باتوجه به قدرت تولید کپسول و بازارپسندی محصول، برای انجام آزمایش انتخاب شد. ۱۲۰ روز پس از تلقیح، کپسول‌ها برداشت شدند و پس از شستشو و استریل، نهایتاً در محیط‌کشت پایه ½MS کشت شدند.

استریل کپسول

کپسول‌های بدست آمده از تلقیح فالانوپسیس رقم جینان از گیاه جدا شده و ابتدا بخش‌های اضافی آن تمیز و با آب شستشو داده شدند. برای استریل سطحی داخل هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ (با ماده فعال ۲٪) به مدت۱۰ دقیقه غوطه‌ور شده و پس از آن با آب مقطر اتوکلاو شده ۳ بار و هرکدام به مدت دو دقیقه آبکشی شدند. در آخر کپسول‌ها را به مدت ۱۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ فرو برده و بعد از خارج کردن به‌سرعت از روی شعله عبور داده شدند. پس از اتمام استریل، کپسول‌ها داخل ظروف پتری از قبل استریل شده قرار گرفت.

محیط‌کشت

محیط‌کشت پایه استفاده شده در این پژوهش ½MS به دو صورت جامد و مایع (بدون ماده جامدکننده) بود. سایر افزودنی‌ها، شامل ۳٪ ساکارز، ۲ گرم در لیتر پپتون و ۱۵٪ شیرنارگیل که به‌صورت جداگانه و ترکیبی مورد استفاده قرار گرفتند. برای جامد کردن محیط‌کشت از ۰/۷٪ آگار استفاده شد. محیط‌کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ کیلوپاسکال به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. بذرها با برش طولی از کپسول خارج و به‌طور میانگین۳۰۰-۲۰۰ بذر در هریک از ظروف کشت شد و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت نگهداری شدند. سرعت جوانه‌زنی با ۳هفته بعد از کشت و از فرمول (n/ تعداد بذر جوانه‌زده تا روز nام = سرعت جوانه‌زنی،n تعداد روز گذشته از آغاز جوانه‌زنی) و درصد جوانه‌زنی از طریق نسبت تعداد بذر جوانه‌زده به کل بذور کشت شده در هریک از ظروف اندازه‌گیری شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح یک درصد انجام شد.

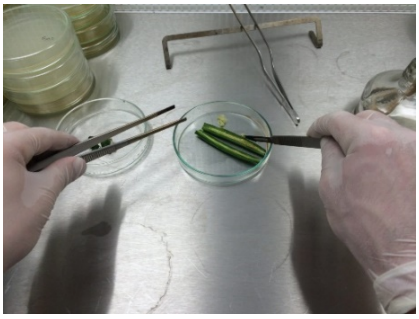
نتایج

جدول ۱- تجزیه واریانس سرعت و درصد جوانه‌زنی

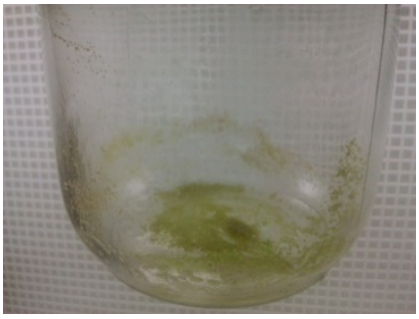
منابع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (DF)	میانگین مربعات (MS)	
		درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی
محیط‌کشت (a)	۱	۲۸۳/۲۲**	۴۴۲/۵۳**
مواد افزودنی (b)	۲	۲۱۶/۲۲**	۳/۳۷**
محیط‌کشت*مواد افزودنی	۲	۵۳/۶۶*	۰/۸۲*
خطا (e)	۱۲	۹/۱۱	۰/۱۴۲
ضریب تغییرات (cv)	-	۷/۰۵	۷/۰۵

به ترتیب * و ** معنی‌دار در سطح ۵٪ و معنی‌دار در سطح ۱٪

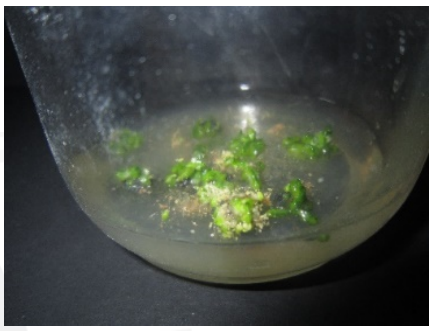
. الف) فالانوپسیس رقم جینان



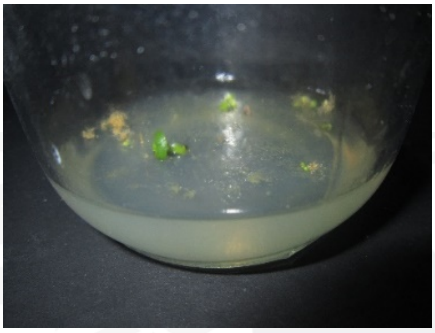
ب) برش طولی کپسول و استخراج بذر.



ج) جوانه‌زنی بذر در محیط‌کشت مایع



ت) نمو پروتوکورم.



پ) جوانه‌زنی بذر در محیط‌کشت جامد.

محیط‌کشت

سرعت و درصد جوانه‌زنی در محیط مایع غنی‌شده با پپتون علاوه بر اینکه بر محیط جامد برتری نشان داد با محیط‌کشت مایع دارای شیرنارگیل و حالت مخلوط نیز تفاوت معنی‌داری داشت (جدول۲).

مواد افزودنی

نتایج بدست آمده مؤید برتری استفاده از پپتون نسبت به شیرنارگیل و مخلوط دو ماده برای سرعت و درصد جوانه‌زنی می‌باشد. درحالی‌که بین استفاده از شیرنارگیل و حالت مخلوط تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. براساس نتایج محیط‌کشت جامد دارای شیرنارگیل کمترین تأثیر را روی درصد جوانه‌زنی داشت (جدول۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل به روشLSD

تیمار		سرعت جوانه‌زنی	درصد جوانه‌زنی
A	b		
محیط مایع	شیرنارگیل	۹/۵^{b}	۷۶^{b}
	پپتون	۱۱/۵۸^{a}	۹۲/۶^{a}
	مخلوط	۹/۸۳^{b}	۷۸/۶^{b}
محیط جامد	شیرنارگیل	۰/۱۶۶^{c}	۱/۲۳^{c}
	پپتون	۰/۸۳^{c}	۶/۶۶^{c}
	مخلوط	۰/۱۶۶^{c}	۱/۳۳^{c}

محیط مایع (a_1) و محیط جامد (a_2). شیرنارگیل (b_1)، پپتون (b_2) و مخلوط (b_3) می‌باشد. میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون دارای تفاوت معنی‌دار براساس($p<0.05$) LSD

نتایج و بحث

پس از ۳ هفته جوانه‌زنی بذرهای موجود در محیط مایع مشاهده شد و بیشترین میزان جوانه‌زنی ۷ هفته بعد از کشت و در همین محیط بود درحالی‌که شرایط در محیط جامد کاملاً متفاوت بود و تا هفته هشتم هیچ‌گونه جوانه‌زنی بذر دیده نشد. پیش از این محیط ½MS غنی شده با شیرنارگیل و پپتون بهترین محیط‌کشت برای جوانه‌زنی بذر ارکیده فالانوپسیس معرفی شده بود (Shekarriz *et al*., 2014). در پژوهشی بهترین محیط‌کشت برای جوانه‌زنی ارکیده *Hoffmannseggella cinnabarina* محیط KC معرفی شد (Suzuki *et al*., 2012). در گزارش دیگری بالاترین درصد جوانه‌زنی بذر ارکیده *Paphiopedilum* در محیط‌کشت ½MS اتفاق افتاد (Zeng *et al*., 2012). در بررسی تأثیر ۶ نوع محیط‌کشت در جوانه‌زنی ارکیده *Habenaria macroceratitis* بالاترین درصد جوانه‌زنی در محیط KC و لیندمن گزارش شد (Stewart and Kane, 2006). در پژوهشی که روی جوانه‌زنی و نمو پروتوکورم ارکیده *Cephalanthera falcate*، که یک ارکیده خاکزی است، انجام گرفت محیط‌کشت ND برای نمو پروتوکورم نتیجه بهتری به همراه داشت (Yamazaki and Miyoshi, 2006). بیشترین درصد جوانه‌زنی ارکیده *Dendrobium* در محیط‌کشت ½MS و MS بود (Vasudevan and Staden, 2010). در پژوهشی برای جوانه‌زنی بذر *Dendrobium* Chao Praya Smile، از محیط‌کشت KC تغییریافته استفاده شد (Hee *et al*., 2007). در اغلب تحقیقات مذکور از محیط‌کشت جامد برای جوانه‌زنی استفاده شده است. نتایج این پژوهش نشان داد محیط مایع دارای پپتون در مقایسه با محیط جامد سرعت و درصد جوانه‌زنی بالاتری داشت.

منابع

Zeng, S., Wua, K., Da Silva, J.A.T., Zhang, J., Chen, Z., Xia, N., Duan, J. 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of Paphiopedilum wardii Sumerh., an endangered terrestrial orchid. Scientia Horticulturae 138, 198–209.

Hee, K.H., Yeoh, H.H. and Loh, C.S. 2007. In vitro flowering and in vitro pollination: methods that will benefit the orchid industry. 14 Science Drive 4, Singapore 117543.

Johnson, T.R. and Kane, M.E. 2007. Asymbiotic germination of ornamental *Vanda*: in vitro germination and development of three hybrids. Plant Cell Tiss Organ Cult 91:251–261.

Shekarriz, P., Kafi, M., Dianati, S. and Mirmasoumi, M. 2014. Coconut Water and Peptone Improve Seed Germination and Protocorm Like Body Formation of Hybrid *Phalaenopsis*. Agric. sci. dev., Vol (3), No (10). pp. 317-322.

Stewart, S.L. and Kane, M.E. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell Tiss Organ Cult.

Suzuki, R.M., Moreira, V.C., Pescador, R. and Ferreira W.d.M. 2012. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.

Vasudevan, R. and Staden, J.V. 2010. Fruit harvesting time and corresponding morphological changes of seed integuments influence in vitro seed germination of *Dendrobium* nobile Lindl. Plant Growth Regul.

Wu, Po-Hung. and Doris, C.N.Ch. 2012. Cytokinin treatment and flower quality in *Phalaenopsis* orchids: Comparing N-6-benzyladenine, kinetin and 2-isopentenyl adenine. African Journal of Biotechnology Vol. 11(7).

Yamazaki, J. and Miyoshi, K. 2006. In vitro Asymbiotic Germination of Immature Seed and Formation of Protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). Annals of Botany 98: 1197–1206.

Ziv, M. and Naor, V. 2006. Flowering of Geophytes in vitro. Propagation of Ornamental Plants Vol. 6, № 1, 2006: 3-16.