بررسی تاثیر سن جنین‌های نارس ارکیده در میزان جوانه‌زنی غیرهمزیست درون شیشه‌ای با کمک تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

حسین پیری*[۱] و منصور فاضلی رستم پور[۲]
[۱*]استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه ولایت ایرانشهر، سیستان و بلوچستان
[۲]استادیار مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سیستان، زاهدان
*نویسنده مسئول: h.piri@velayat.ac.ir

چکیده

در این تحقیق بذور نارس *Aerides multiflora* در سه مرحله رشدی مختلف (۱۶، ۱۸ و ۲۰ هفته پس از گرده افشانی)، بر روی محیط کشت اختصاصی Mitra و همکاران همراه با انواع تنظیم کننده های رشد گیاهی نظیر IAA, IBA, Kin در شرایط کاملا" استریل کشت گردیدند. برای تعیین بالاترین نرخ جوانه زنی، القاء کالوس، تشکیل و تمایزیابی پروتوکورم، آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار انجام و با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده ها، در مرحله اول کشت، تیمارهای (IAA ($1mgl^{-1}$)، IAA+IBA ($0.5+0.5mgl^{-1}$) و IAA+Kin ($0.5+0.5mgl^{-1}$) بهترین غلظت و ترکیب برای جوانه زنی با حدود 70.00 درصد بودند. برای ایجاد اسفرول، تیمار IAA+IBA ($0.5+0.5mgl^{-1}$) بهترین بود، در حالیکه برای توسعه و تمایزیابی پروتوکورم، تیمارهای IBA+Kin ($0.5+0.5mgl^{-1}$) و IAA+Kin ($0.5+0.5mgl^{-1}$) با اختلاف معنی داری در مقایسه با شاهد موثرترین بودند. در مرحله دوم کشت، تیمارهای بهینه جهت جوانه زنی IBA+Kin ($0.5+0.5mgl^{-1}$) و IAA+IBA ($0.5+0.5mgl^{-1}$) بترتیب با ۸۸,۷۵ و ۸۶,۰۰ درصد و میانگین مدت زمان ۲۰,۲۵ و ۲۱,۰۰ روز ثبت شدند و این روند تا مرحله توسعه و تمایزیابی پروتوکورم ادامه یافت. در مرحله سوم کشت، بالاترین درصد جوانه‌زنی با ۱۰۰ درصد تا مرحله رشد، توسعه و تمایزیابی پروتوکورم نیز در دو تیمار IAA+IBA ($0.5+0.5mgl^{-1}$) و IBA+Kin ($0.5+0.5mgl^{-1}$) مشاهده گردید. این تحقیق ثابت نمود که افزایش درصد جوانه‌زنی و سایر تغییرات مورفولوژیکی تا مرحله تمایزیابی پروتوکورم ارتباط مستقیمی با افزایش سن بذر و غلظت و ترکیب تنظیم کننده های رشد در این گونه داشت.

کلید واژه ها: اسفرول، پروتوکورم، محیط کشت M، تنظیم کننده های رشد گیاهی

مقدمه

بذر ارکیده بسیار ریز، بطول ۱ - ۲ و عرض ۰/۵ – ۱ میلی متر و فاقد مواد غذائی، که در کشت طبیعی جواب نمی‌دهد. بذر از یک پوسته ضخیم و یک جنین ۱۰۰ سلولی تشکیل شده است. بذور تمایز نیافته اند بطوریکه فاقد کوتیلدون، ریشه‌چه و یا حتی آندوسپرم می‌باشند. محیط کشت مناسب این ویترو (In Vitro)، جوانه زنی جنین های نابالغ را فراهم می سازد (Arditti, 1967). *Aerides multiflora* یکی از جنس‌های معروف می‌باشد که به دلیل شکل گل‌آذین، به دم روباهی (Fox-tail) شهرت دارد. این جنس دارای ۶۰ گونه است، که همگی اپی فیتیک (رورست) هستند. در لیست گیاهان در حال انقراض (IUCN) قرار گرفته است (Agoo et al., 2009). از این گل بیشتر بعنوان گل بریده و گیاه گلدانی استفاده می شود.
در پژوهش حاضر، از محیط کشت پایه میترا و همکاران (Mitra et al., 1976) بهمراه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف (Plant Growth Regulators) استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، کپسول ها در سه مرحله رشدی متفاوت برداشت و بعد از تمیز نمودن سطحی، داخل فلاسک ۲۵۰ میلی لیتری، در زیر شیر آب جاری بمدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از شستشو به زیر هود لمینار ایر فلو منتقل گردیدند

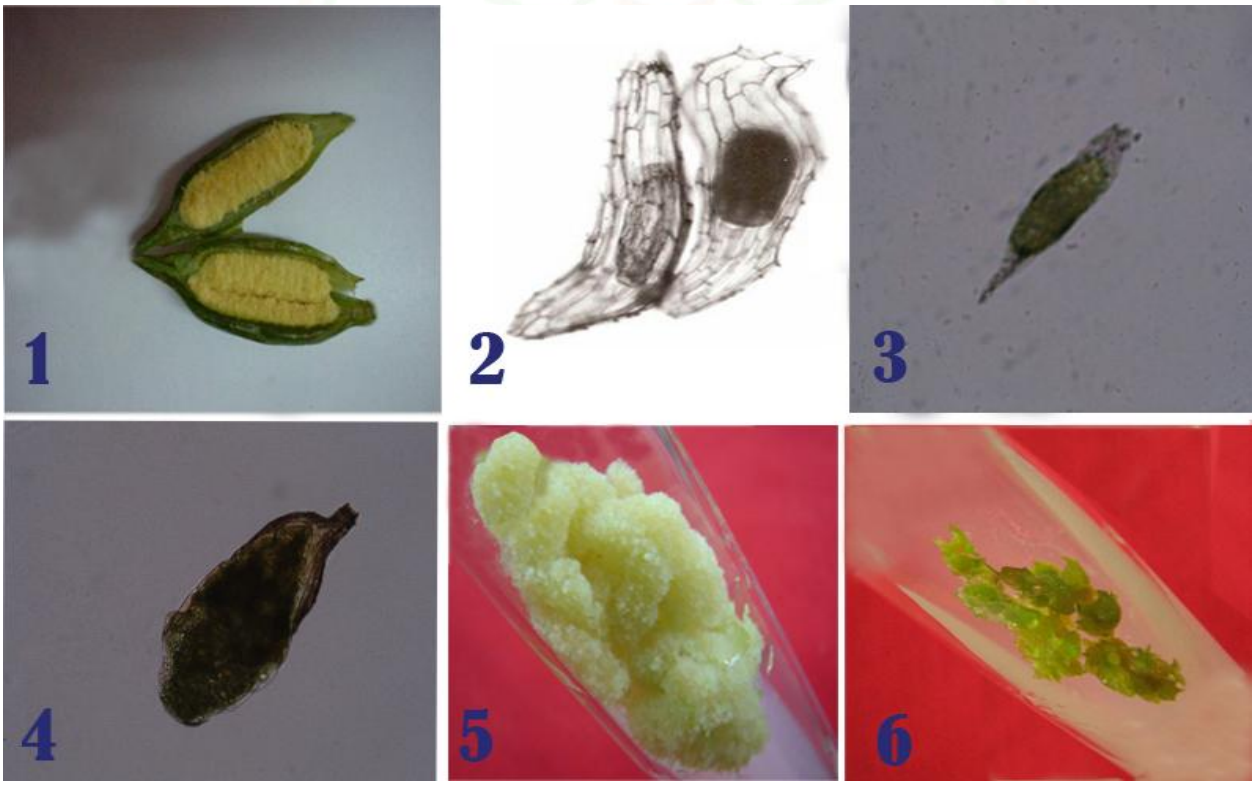
IrHC2019

و تیمارهای لازم در شرایط کاملا" استریل جهت از بین بردن قارچها، باکتریها و انواع میکرو ارگانیزمها و عوامل بیماریزا اعمال و پس از اینوکلوشن (Inoculation) و اینکوبشن (Incubation) دیتابرداری بصورت روزانه جهت مقایسه و آنالیز صورت گرفت (Kauth et al., 2008; Mihaljevic et al., 2013).

نتایج و بحث

نقش تنظیم کننده های مختلف رشد گیاهی (PGRs) و سایر افزودنی‌ها جهت تسهیل در جوانه‌زنی و افزایش رشد و توسعه سایر تغییرات مورفولوژیکی بر روی خیلی از گلهای ارکیده بررسی و مطالعه شده است از جمله ارقام (Kauth et al., 2008) *Calopogon tuberosus* و *Rhynchostylis retusa* (Piri et al., 2010)، *Acampe papillosa* (Piri et al., 2013) که در تمامی آنها نقش تنظیم کننده های رشد در تسریع و تسهیل جوانه‌زنی تا باززایی پروتوکورم مشهود می باشد.

نتایج سه مرحله کشت بذور نشان داد که درصد جوانه‌زنی و سایر تغییرات مورفولوژیکی با افزایش سن بذر، بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش داشت. نتایج پژوهش مشابهی که Parab و Krishnan (2012) بر روی جوانه‌زنی بذور دو گونه *Aerides maculosa* (۵ - ۱۰ هفته بعد از گرده افشانی) و *Rhynchostylis retusa* (۱۰ - ۲۰ هفته بعد از گرده‌افشانی) جهت القاء کالوس و تولید پروتوکورم انجام دادند، نشان داد که استفاده از تنظیم کننده‌های مختلف رشد گیاهی نظیر BA و NAA و دیگر افزودنی‌های آلی مانند آب نارگیل و زغال فعال تاثیر قابل ملاحظه‌ای در بالا بردن نرخ جوانه‌زنی تا مرحله تشکیل پروتوکورم دارند. در این تحقیق نیز کمترین درصد جوانه‌زنی، بیشترین مدت زمان جهت جوانه‌زنی و سایر تغییرات مورفولوژیکی در هر ۳ مرحله کشت، در تیمارهای شاهد ثبت گردید، که مبین تاثیر تمام غلظت‌ها و نسبت‌های هورمونی در افزایش درصد جوانه‌زنی، تسریع در جوانه‌زنی و تسهیل روند رشد، تشکیل و تمایزیابی پروتوکورم می باشد. روند جوانه‌زنی تا مرحله تمایزیابی پروتوکورم، در شکل‌های ۱-۶ به وضوح نشان داده شده است.



کپسول حاوی بذور نارس در مرحله ۲۰ هفته بعد از گرده‌افشانی، ۲. رویان دارای ذخیره مواد غذایی (20x)، ۳. متورم شدن رویان پس از یک هفته(20x)، ۴. اسفرول (10x) پس از دو هفته، ۵. تشکیل کالوس و سنتز کلروفیل، ۶. توسعه و تمایزیابی پروتوکورم

IrHC2019

با توجه به نتایج حاصله میتوان گفت، درصد موفقیت بسته به سن نمونه گیاهی، نوع هورمون مورد استفاده، نسبت و ترکیب دو نوع اکسین و نسبت اکسین به سایتوکنین و بالعکس متفاوت می باشد.

منابع

Agoo, E. m. G., Cootes, J., Colamco, A.J., de Vogel, E.F. and Tiu, D. (2009) *Aerides multiflora*, in ICUN 2009. IUCN red list of threatened species. Version (2009) 1.

Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. Botanical review Journal, 33, 1-97.

Kauth, P. J., Johnson, T. R., Stewart, S. L. and Kane, M. E. 2008. A classroom exercise in hand pollination and *in vitro* asymbiotic orchid seed germination. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 93:223–230.

Mihaljevic, I., Dugalic, K., Tomas, V., Viljevac, M., Pranjic A., Cmelik, Z. and Puskar, B. Jurkovic, Z. 2013. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of 'Oblacinska' sour cherry. The Journal of Agricultural Science. 58(2): 117-126.

Mitra, G. C., Prasad, R. N. and Roychowdhary, A. 1976. Inorganic salts and differentiation of protocorms in seed-callus of an orchid and correlated changes in its free amino acid content. Indian Journal of Experimental Biology, 14: 350–351.

Parab, G. V. and Krishna, S. 2012. Rapid *in vitro* mass multiplication of orchids *Aerides maculosa* Lindl. And *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. from immature seeds. Indian Journal of Biotechnology, 11: 288-294.

Piri, H., Promila, P., Bhanwra, R. K. and Vij, S. P. 2010. A cost effective medium for embryo culture of a floriculturally important orchid, *Rhynchostylis retusa* BL. P. 86. National conference on orchid: systematic and diversity analysis for conservation and sustainable utilization, 19-21 March. 2010, Kosi-Katarmal, 263-643, G.B. Plant Institute of Himalayan Environment and Development, Almora, India.

Piri, H., Pathak, P. and Bhanwra, R. K. 2013. Asymbiotic germination of immature embryos of a medicinally important epiphytic orchid *Acampe papillosa* (Lindl.) Lindl. African Journal of Biotechnology, 12(2): 162-167.

The Study on Effect of an Orchid Immature Embryos Age on in vitro Asymbiotic Germination Frequency by Plant Growth Regulators

Hossein Piri*[1], and Mansour Fazeli Rostampour
Agriculture and Environmental Department, Velayat University of Iranshahr, Iranshahr
Sistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Zahedan
*Corresponding Author: h.piri@velayat.ac.ir

Abstract

In this research the immature embryo of *Aerides multiflora* Rxb. were inoculated in three different developmental stages (16, 18 & 20 weeks after pollination) on Mitra medium enriched with a variety of plant growth regulators to determine the highest germination frequency, callus induction, protocorm formation and differentiation, a randomized complete design with four replications was performed and analyzed using SAS statistical software. Based on the results of data analysis, in the 1st stage of inoculation, IAA(1mgl^{-1}), IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1}) and IAA+ Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) treatments were the best concentration and composition for germination frequency with about 70.00%. IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1}) was the best treatment for spherule formation, while IBA+KN(0.5+0.5mgl^{-1}) and NAA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) enhanced protocorm development and differentiation, which was significantly different in comparison with the control. At the 2nd stage of inoculation, IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) and IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1}) treatments were recorded with 88.75 & 86.00 percent, respectively, and the average time was 20.25 and 21.00 days. This process was continued until the stage of development and differentiation of the protocorm. At the 3rd stage, the highest germination percentage with 100% and subsequent protocorm development and differentiation was observed in IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1}) & IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) treatments. This research that germination frequency and subsequent morphologically changes till protocorm development and differentiation had direct relationship with age of seeds in this species. This study proved that the increase in germination percentage and other morphological changes to the stage of differentiation of protocorm was directly related to the increase of seed age, the concentration and composition of plant growth regulators in this species.

Key words; Spherule, M medium, PGRs, Protocorms

IrHC2019