بهبود تکثیر و باززایی اندام‌های پروتوکورم مانند (PLB) توسط امواج فراصوت در کشت درون شیشه‌ای ارکیده فالانوپسیس

حسن پیرانی[۱]، علیرضا بابایی*[۲]، نیما احمدی[۳]
[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
[۲و۳] دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
*نویسنده مسئول: arbabaei@modares.ac.ir

چکیده

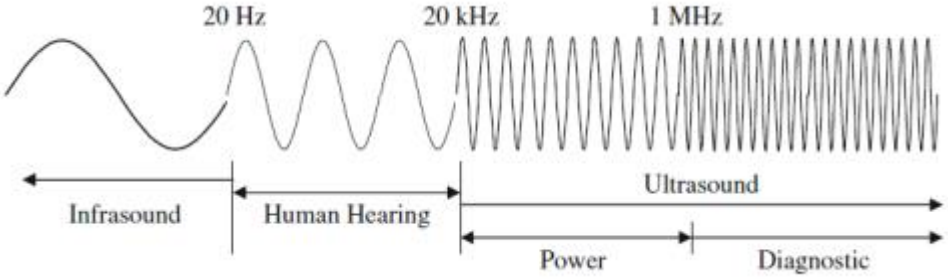
امواج فراصوت یک محرک فیزیکی خاص است که اثرات فیزیولوژیکی مختلفی دارد. استفاده از سونیکیشن یا اولتراسوند باعث بهبود رشد و نمو در چندین گونه گیاهی شده است. در این مطالعه اثر چندین زمان تابش از امواج فراصوت (۰، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ دقیقه) بر تکثیر و جنین‌زایی مستقیم ریزنمونه‌های برگی ارکیده فالانوپسیس مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. نتایج نشان داد که امواج فراصوت تاثیر معنی‌داری بر صفات مورد مطالعه داشت. بیشترین درصد باززایی (۵۱/۸ ٪) در تیمار ۲/۵ دقیقه امواج فراصوت و کمترین میزان درصد باززایی اندام‌های پروتوکورم مانند (PLB) در تیمار ۷/۵ دقیقه تابش امواج فراصوت با میزان (۱۹/۶ ٪) مشاهده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که بیشترین تعداد PLB نیز در تیمار ۲/۵ دقیقه از امواج فراصوت با میزان ۱۰/۲ عدد بدست آمد.

کلمات کلیدی: ارکیده فالانوپسیس، امواج فراصوت، اندام‌های پروتوکورم مانند (PLB)، کشت بافت

مقدمه

خانواده ارکیداسه یکی از بزرگترین و جذاب‌ترین خانواده‌های گیاهان گلدار محسوب می‌شود که بیش از ۸۸۰ جنس و ۲۵۰۰۰ گونه را در بر می‌گیرد و به طور گسترده‌ای در سرتاسر دنیا پراکنده شده‌اند و بیشترین تنوع آنها در مناطق استوایی است (Givnish *et al.*, 2015). از آنجایی که رشد ارکیده فالانوپسیس (*Phalaenopsis* Orchid) بسیار کند و طولانی است، روش‌های تکثیر رویشی و سنتی ارکیده اغلب دارای کارایی پایینی هستند. از این رو تولید و تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه به منظور تولید گیاهان کاملا یکسان و تکثیر در مقیاس وسیع استفاده می‌شود. روش‌های مختلفی برای تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه ارائه شده است .به منظور بهینه سازی و بهبود روش‌های موجود اخیرا استفاده از ابزارهای بیوتکنولوژی موجود، مورد بهره برداری قرار گرفته است. یکی از این روش‌ها استفاده از امواج فراصوت است که اثرات آن در تعداد زیادی از مطالعات گزارش شده و مورد بررسی قرار گرفته است (Y. Liu et al., 2003a). فرکانس امواجی که در محدوده شنوایی انسان قرار دارند بین ۲۰ هرتز تا ۲۰ کیلو هرتز می‌باشد. امواج فراصوت امواجی هستند که بالای ۲۰ کیلو هرتز فرکانس دارند و همانند امواج فروصوت توسط گوش انسان غیر قابل تشخیص هستند (de São José *et al.*, 2014). طیف امواج صوتی در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

IrHC2019



شکل «۱» طیف امواج صوتی (Feng *et al.*, 2011)

در طول چند دهه‌ی گذشته محققان بسیاری تأثیرات بیولوژیکی مختلفی را نسبت به تیمار امواج فراصوت توصیف کرده‌اند. محققان با بررسی تاثیر امواج صوتی در گیاهان زراعی مانند گندم، برنج، گوجه فرنگی، خیار و سایر گیاهان گزارش شده، دریافتند که امواج صوتی به عنوان یک تنظیم کننده رشد عمل می‌کنند و می‌توانند به عنوان یک پتانسیل بالقوه در ارتقاء رشد گیاهان مورد استفاده قرار گیرند (Mohanta, 2018). امواج فراصوت می‌توانند باعث افزایش سیالیت دیواره سلولی و غشای پلاسمایی، رشد و تقسیم سلولی شوند. این افزایش در میزان تقسیم سلولی می‌تواند یکی از مکانیسم‌های اصلی ارتقاء رشد گیاه توسط امواج صوتی باشد (Mohanta, 2018). در آزمایشی تاثیر امواج فراصوت بر روی نمونه‌های تک جوانه‌ای سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت که ۲۴ ساعت بعد از تیمار امواج فراصوت، رشد شاخه‌ها به سرعت افزایش یافت، اما رشد و نمو ریشه به دلیل کاهش سطح آسکوربیک اسید کاهش یافت. در انتهای دوره واکشت، یعنی ۴ هفته بعد از تیمار صوت‌دهی، طول شاخه‌ها نسبت به نمونه‌های شاهد ۲۰ درصد بیشتر شده بودند و همچنین وزن تر شاخه‌ها نیز ۲۴ درصد بیشتر از شاخه‌های نمونه‌های شاهد بود که این مسئله نشانگر اثر طولانی مدت تیمار صوت‌دهی است (Dobránszki *et al.*, 2017). در آزمایش دیگری بر روی ارکیده *Dendrobium officinale*، تیمار امواج فراصوت توانست تبدیل PLB[1] به شاخه را افزایش دهد که به دلیل افزایش نسبت هورمونی سایتوکینین به اکسین بود (Wei *et al.*, 2012). با بررسی‌های انجام شده، در خصوص تاثیر امواج فراصوت در ریزازدیادی ارکیده فالانوپسیس یافته‌های تحقیقاتی معدود و غیرکاملی به دست آمد و از آنجایی که در کشور ما واحدهای کشت بافتی متعددی در حال فعالیت هستند که بر اساس یک دستورالعمل فنی از پیش تعیین شده فعالیت خود را پیش می‌برند و به دلیل نبود بخش تحقیق و توسعه در کنار فعالیت‌های خود فاقد نوآوری بوده و قدرت رقابت با سایر تولید کنندگان را نخواهند داشت. از این رو اعمال تیمار امواج فراصوت در کشت بافت ارکیده فالانوپسیس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه باغبانی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. گیاهچه‌های درون شیشه‌ای ارکیده فالانوپسیس به عنوان گیاه مادری انتخاب شدند. در این آزمایش محیط کشت ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) به همراه ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، و ۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ، به عنوان محیط پایه برای جنین زایی ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. پی‌اچ محیط کشت با استفاده از KOH و HCl بر روی ۵/۸ تنظیم گردید و سپس محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. ریزنمونه‌های برگی ارکیده فالانوپسیس در شرایط استریل زیر هود با ابعاد ۱×۰/۵ سانتیمتر برش داده شد و در محیط مایع در داخل ظروف شیشه‌ای انتقال داده شدند. سپس با استفاده از حمام اولتراسوند با فرکانس ۴۰ کیلو هرتز تحت دوره‌های متفاوت تابش (۰، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ دقیقه) با امواج فراصوت قرار گرفتند. پس از آن ریزنمونه‌ها در محیط ½ MS کشت شده و در شرایط

[1] protocorm-like bodies

IrHC2019

نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شرایط دمایی ۲±۲۵ و رطوبت نسبی ۶۰ درصد نگهداری شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. درصد باززایی اندام‌های پروتوکورم مانند در ۶۰ روز پس از کشت بررسی شد و ۶۰ روز، زمان بهینه برای نمونه گیری تعیین شد (Teixeira da silva and dobránszki, 2013).

نتایج و بحث

از بین تمامی ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت، گاها برخی ریزنمونه‌ها رشد نکرده و یا تولید پروتوکورم نمی‌کنند، از این رو ریزنمونه‌هایی که تولید پروتوکورم کرده‌اند به صورت درصد پروتوکورم‌زایی محاسبه شد. نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس آزمایش (جدول ۱) نشان داد که تاثیر زمان‌های متفاوت تابش امواج فراصوت در سطح احتمال یک درصد بر میزان پروتوکورم‌زایی ریزنمونه‌ها معنی‌دار بود. نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس آزمایش (جدول ۱) نشان داد که تاثیر شدت‌های متفاوت از امواج فراصوت در سطح احتمال یک درصد بر تعداد پروتوکورم در هر ریزنمونه معنی دار بود.

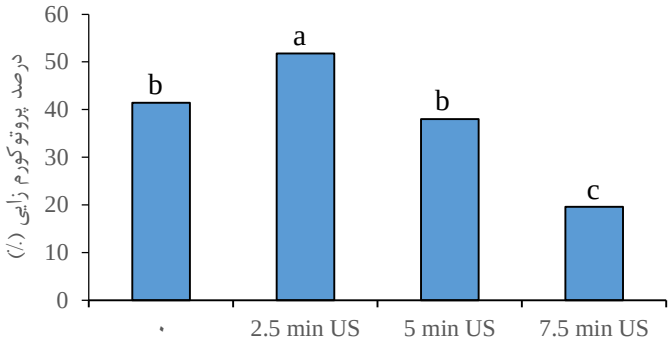
جدول«۱» تجزیه واریانس درصد پروتوکورم‌زایی و تعداد پروتوکورم در ریزنمونه‌های برگی ارکیده فالانوپسیس تحت تاثیر امواج فراصوت

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد پروتوکورم زایی	تعداد پروتوکورم در ۲ ماه پس از کشت
تیمار (Treatment)	۳	۹۰۰/۳۳۳۳**	۲۵/۷۳۳۳**
خطای آزمایش (Error)	۱۶	۱۳/۷۰	۳/۱۲۵۰
درصد ضریب تغییرات (C.V.%)	-	۹/۸۱۷۹	۲۲/۶۶۳۶

ns، *، ** به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال۵ درصد و معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.

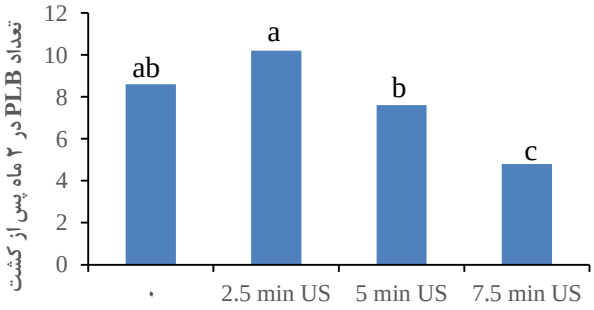
مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مدت زمان کم تابش امواج فراصوت می‌تواند باعث افزایش پروتوکورم‌زایی ریزنمونه‌های برگی ارکیده فالانوپسیس گردد و بیشترین پروتوکورم‌زایی ریزنمونه‌ها در تیمار ۲/۵ دقیقه تابش امواج فراصوت به میزان ۵۱/۸ درصد مشاهده شد و کمترین میزان پروتوکورم‌زایی در تیمار ۷/۵ دقیقه تابش امواج فراصوت با مقدار ۱۹/۶ درصد بدست آمد (شکل ۱).

IrHC2019



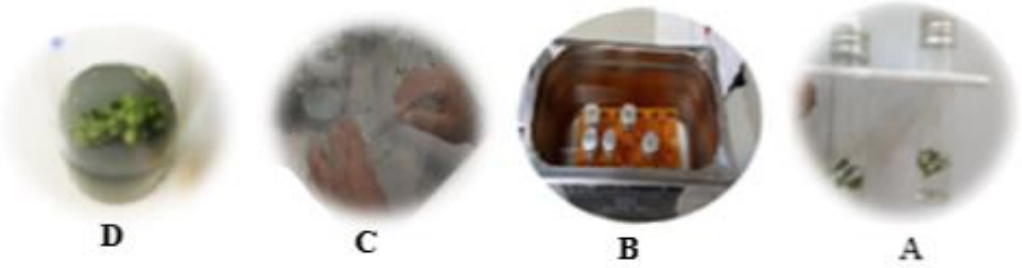
شکل «۱» درصد پروتوکورم‌زایی ریزنمونه‌های برگی ارکیده فالانوپسیس در ۲ ماه پس از کشت، تحت تاثیر زمان‌های متفاوت تابش امواج فراصوت. میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد پروتوکورم در ۲ ماه پس از کشت در تیمار ۲/۵ دقیقه امواج فراصوت با متوسط ۱۰/۲ عدد در هر ریزنمونه بدست آمد و دارای اختلاف معنی داری نسبت به دیگر تیمارها به جز تیمار شاهد بود (شکل۲).



شکل«۲» تعداد پروتوکورم در ریزنمونه‌های برگی ارکیده فالانوپسیس در ۲ ماه پس از کشت تحت تاثیر زمان‌های متفاوت تابش امواج فراصوت. میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند.

IrHC2019



شکل«۳»مراحل انجام آزمایش: A) تهیه ریزنمونه‌ها B) تابش امواج فراصوت C) آماده سازی و کشت نمونه‌ها D) تشکیل اندام‌های پروتوکورم مانند (PLB)

نتایج این آزمایش در رابطه با تاثیر مثبت امواج فراصوت بر رشد و تکثیر، با نتایج گزارش شده توسط سایر محققین بر روی هویج و برنج همسو است (Liu *et al*., 2003). در این تحقیقات افزایش و القای فعالیت آنزیم‌ها، تعدیل متابولیسم و تشدید انتقال مواد از علل افزایش رشد تحت تاثیر امواج فراصوت بیان شده است (Bochu *et al*., 1998). در ارکیده سیمبیدیوم نیز استفاده از امواج فراصوت، باعث افزایش درصد باززایی اندام‌های پروتوکورم مانند (PLB) نسبت به نمونه‌های شاهد شد (da Silva and Dobránszki, 2015).

منابع

Bochu, W., Yoshikoshi, A. and Sakanishi, A. 1998. Carrot cell growth response in a stimulated ultrasonic environment. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 12 (2): 89-95.

de São José, J.F.B., de Andrade, N.J., Ramos, A.M., Vanetti, M.C.D., Stringheta, P.C. and Chaves, J.B.P. 2014. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. Food Control, 45: 36-50.

da Silva, J.A.T. and Dobránszki, J. 2015. Sonication (ultrasound) affects in vitro growth of hybrid Cymbidium. Botanica Lithuanica, 20 (2): 121-130.

Dobránszki, J., Asbóth, G., Homoki, D., Bíró-Molnár, P., da Silva, J.A.T. and Remenyik, J. 2017. Ultrasonication of in vitro potato single node explants: Activation and recovery of antioxidant defence system and growth responses. Plant Physiology and Biochemistry, 121: 153-160.

Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V. and Weiss, J. 2011. Ultrasound technologies for food and bioprocessing, Vol. 1. Springer pp.

Givnish, T.J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S.P., Hunter, S.J., Zuluaga, A., Iles, W.J., Clements, M.A., Arroyo, M.T. and Leebens-Mack, J. 2015. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. Proceedings of. Royal Society B, 282 (1814): 20151553.

Liu, Y., Takatsuki, H., Yoshikoshi, A., Wang, B. and Sakanishi, A. 2003a. Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H+-ATPase activity of aloe arborescens callus cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 32 (2): 105-116.

Mohanta, T.K. 2018. Sound wave in plant growth regulation: a review of potential biotechnological applications. JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences, 28 (1).

Wei, M., Yang, C.-y. and Wei, S.-h. 2012. Enhancement of the differentiation of protocorm-like bodies of Dendrobium officinale to shoots by ultrasound treatment. Journal of Plant Physiology, 169 (8): 770-774.

IrHC2019

Improvement of proliferation and regeneration of protocorm-like bodies (PLB) by ultrasound in *invitro* culture of *phalaenopsis* orchids

Hassan Pirani[1], Alireza Babaei[1*] , Nima Ahmadi[1]

[1]University of Tarbiat Modares, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Tehran, Iran

[*]*Corresponding Author: arbabaei@modares.ac.ir*

Abstract

Ultrasound is a special physical stimulus that has a variety of physiological effects. The use of ultrasound or sonication has been shown to stimulate growth and development of several plant species. In this study, four periods of time (0, 2.5, 5 and 7.5 min) were examined for their effects on direct somatic embryogenesis of leaf explants of a *Phalaenopsis* sp. Experiments were performed in Completely Randomized Design (CRD) with 3 replications at Tarbiat Modares University (TMU). Results showed that ultrasound had significant effects on studied characteristics. The highest percentage of regeneration (51.8 %) was observed in 2.5 min ultrasound while the lowest one (19.6%) was observed in 7.5 min treatment of ultrasound. The results show that the most PLB number (10.2) was observed in 2.5 of ultrasound.

Keywords: *Phalaenopsis* orchid, Protocorm - Like Bodies (PLB), Tissue culture, Ultrasound

IrHC2019