محیط مناسب جهت انگیزش رویا ن بدنی در ارکیده خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia*)

شیرین مرادی [1*]، شیرین دیانتی دیلمی[2]، مصطفی عرب[3]، کورش وحدتی [4]

1- نویسنده مسئول*: دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح گیاهان باغبانی، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت (shirinmoradi@ut.ac.ir)، 2، 3 و 4 – اعضائ هیات علمی گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت

چکیده

رویان‌زایی مستقیم ارکیده ی خربقی معمولی با استفاده از ریز نمونه‌های مختلف برگ ، ساقه، ریشه و پروتوکورم، در محیط‌های کشت مختلف (1/2 MS ,1/4 MS ,1/8MS , Fast) در دو سطح مختلف هورمون BA (0 و 3 میلی گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت معنی داری بین محیط های کشت مشاهده نشد. در بین ریز نمونه‌ها، ریزنمونه پروتوکورمی با میانگین کل17/63 رویان در هر تیمار بهترین نتیجه را داشتند. همچنین استفاده از 3 میلی گرم در لیتر هورمون BA تاثیر مثبتی بر رویان‌زایی داشت. اثر متقابل بین ریزنمونه و استفاده از هورمون BA کاملا معنی دار بود و ریزنمونه پروتوکورمی دارای تیمار هورمون BA با میانگین کل 17/63 بیشترین نتیجه را به همراه داشت.

کلید واژه : رویان زایی بدنی مستقیم ، محیط کشت درون شیشه ای، بنزیل آمینوپورین(BA)،ثعلب بومی ایران

مقدمه

ارکیده‌های خاکروی مناطق معتدله دسته ی مهمی از ارکیده‌ها هستند که به عنوان گل‌های چند ساله‌ی باغچه‌ای و با پتاسیل بالا برای تولید گل گلدانی و شاخه بریده توانسته‌اند درسال‌های اخیر توجه دنیای باغبانی را به خود جلب کنند(رانباخ[1] ، 2007).

ارکیده خربقی معمولی با نام علمی *Epipactis veratrifolia* از دسته ارکیده‌های خاکروی معتدله و از جمله ثعلب های بومی ایران است. این گیاه پایا ، دارای قامتی افراشته و بندرت آویخته، غالبا بسیار قوی ومحکم با ارتفاع 120-150 سانتی متر با برگ های سبز مات و ریزوم ریشه‌زا و نازک و بدون کرک، با گل‌هایی مجتمع در گل آذین ایستاده، براکته‌های برگی شکل، ، بصورت سر نیزه ای باریک و گلپوشی با تقسیمات استکانی، با انتهای همگرا و تقریبا گسترده، کاسبرگ‌های رنگین و نا هم‌قد و گلبرگ های تخم-مرغی زرد که گلی زیبا و جذاب و دارای پتاسیل مناسب برای عرضه به عنوان گل گلدانی و حتی شاخه بریده اینجاد می کند (قهرمان ، 1377).

مشکل بزرگ در مسیر تکثیر گیاهان خانواده ارکیده، وجود بذرهای ریز و رویان‌های نابالغ است که برای جوانه‌زنی نیازمند همزیستی با قارچ‌های مایکوریزا هستند. تحقیقات بیشماری درمورد جوانه‌زنی غیرهمزیست بذر گونه‌های مختلف ارکیده در محیط درون شیشه‌ای صورت گرفته که موجب تجاری شدن تولید برخی از آنها شده است. ارکیده‌ها بر اساس سهولت کار تکثیر به سه گروه عمده تقسیم می‌شوند. دسته ی اول ارکیده‌های دارزی گرمسیری هستند که نسبت به سایر ارکیده‌ها آسان‌تر تکثیر می‌شوند. گروه بعدی ارکیده‌های خاکروی گرمسیری هستندکه تکثیر آنها نسبت به گروه اول کمی دشوارتر است و در نهایت ارکیده‌های خاکروی مناطق معتدله قرار دارند که سخت‌کارترین ارکیده‌ها از نظر تکثیرهستند. علی رغم سختی‌های مربوط به یافتن و استفاده از قارچ‌های مناسب، درصد پایین جوانه‌زنی و نیز وقوع مشکلاتی مانند تنوع در نتایج که از نظر باغبانی مطلوب نیست، همچنان کشت همزیست بذر در شرایط آزمایشگاهی، کارآمدترین راه حل برای این تکثیر این گروه درنظر گرفته می‌شود. از سوی دیگر با تمام پیشرفت‌هایی که برای ریزازدیادی و کشت درون شیشه‌ای برای برخی ارکیده های دارزی گرمسیری بصورت انبوه در سطح

[1] Rännbäck

تجاری به دست آمده نتایج اندکی در مورد ارکیده های خاکروی مناطق معتدله حاصل شده است. در نتیجه باتوجه به وجود بازار و تقاضا و با در نظرگرفتن مشکلات عمده و سختی کار، یافتن یک روش مناسب برای تکثیر ارکیده‌ها می‌توان ارزشی بی مانند داشته باشد و اهمیت کار را دوچندان می‌کند (جورجنسن و همکاران[1]،1998). متاسفانه تکثیر اندک، قیمت بالا و وجود تقاضای علاقمندان در بازار، سبب جمع آوری آنها از طبیعت در نتیجه کاهش تعداد و حتی رویارویی برخی از گونه‌ها با انقراض و نابودی شده است. با این تفاصیل درچشم انداز آینده تمام تلاش‌ها بر این است که با یافتن راه کارهای آسان برای تکثیر ارکیده‌ها، موجب کاهش قیمت و نجات آنها از انقراض گردد (رانباخ ، 2007).

رویان زایی بدنی با دارا بودن پتاسیل بالا برای ریز ازدیادی در مقیاس وسیع به ویژه برای گیاهان چوبی و گیاهان دارای چرخه تولید مثل خاص(همانند ارکیده‌ها) و همچنین مناسب بودن برای مهندسی ژنتیک و ایجاد گیاهان تراریخت، سیستمی بسیار کارآمد برای باززایی گیاهان محسوب می‌شود(آگاروال[2]، 2004). عوامل بسیاری بر رویان زایی بدنی تاثیر گذار است، اما محیط کشت انگیزشی مناسب و استفاده از تنظیم کننده‌های رشد متداول ترین راه برای رویان زایی بدنی محسوب می‌شود.لذا هدف این پژوهش بررسی مقدماتی محیط‌های کشت درون شیشه‌ای و ریز نمونه‌های مختلف و استفاده از تنظیم کننده رشد، برای انگیزش و یافتن شرایط بهتر برای القای رویان‌زایی در این گونه‌ی بومی و ریزازدیای و تکثیرانبوه کلون‌های آن در سطح وسیع است.

مواد و روش ها

1- مواد گیاهی

در این پژوهش از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای حاصل از بذر ارکیده خربقی معمولی که در محیط کشت فاست[3] کشت و رشد نموده بودند و هر ماه واکشت می‌شدند، به عنوان گیاه پایه استفاده شد. به عنوان ریز نمونه از برگ کامل، تک گره ساقه، یک سانتی متر انتهای ریشه و طوقه این گیاهان استفاده شد. پرتوکرم های حاصل از بذر نیز به عنوان ریز نمونه ی مورد استفاده قرار گرفتند .

2-محیط و شرایط کشت

برای انجام آزمایش از چهار محیط کشت مختلف شامل:Fast , 1/8MS, 1/4 MS ,1/2 MS ، دو سطح 0 و 3 میلی گرم در لیتر هورمون BA استفاده شد. ریز نمونه‌های برگی به دو صورت رو به بالا و رو به پایین کشت شد.

3-طرح آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل درقالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. در این طرح از سه فاکتور در سه تکرار و در مجموع 120 پتری استفاده شد. تعداد رویان های تولید شده در هر واحد آزمایشی (4قطعه در هر تکرار) مربوط به هر تکرار به عنوان داده ثبت گردید. تمامی داده‌ها در نرم افزار آماری SAS 9/0 تجزیه و مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح α=0/05 انجام شد.

نتایج و بحث

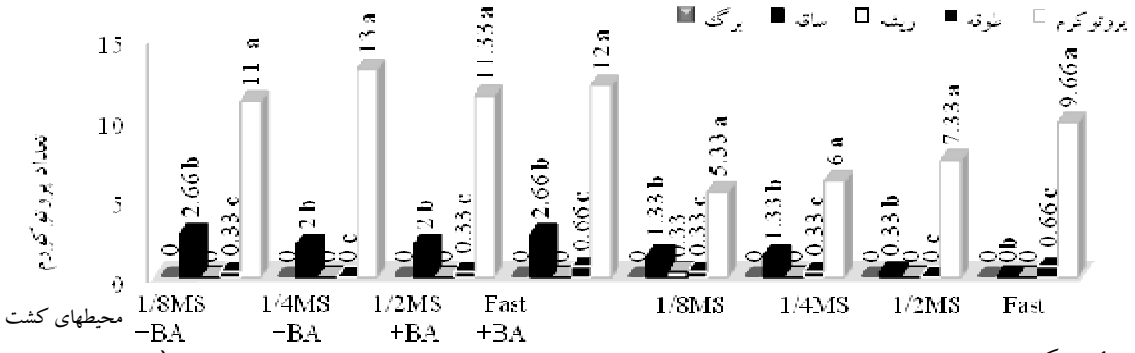
دو هفته پس از کشت، شروع رویان زایی بر روی ریزنمونه‌ها مشاهده شد. داده‌ها با شمارش تعداد رویان‌ها در هر ریز نمونه به صورت هفتگی یادداشت برداری شد و پس از 6 هفته داده های نهایی ثبت گردید.

محیط‌های کشت از نظر رویان‌زایی تفاوت معنی‌دار نداشتند. اما نوع ریزنمونه، هورمون و اثر متقابل بین هورمون و ریز نمونه‌ها کاملا معنی‌دار شد. ریز نمونه‌های پروتوکورمی (میانگین تولید پروتوکورم 17/63) با اختلاف کاملا معنی‌دار نسبت به سایرین،

[1] Jorgensen, et al
[2] Agarwall
[3] Fast

بیشترین میزان رویان را تولید نمودند و ریز نمونه‌های ساقه(5/806) و طوقه(2/391) با اختلاف معنی‌دار نسبت به یکدیگردر مراتب بعدی قرار گرفتند. اثر متقابل بین استفاده از هورمون BA و ریز نمونه پرتوکورمی (میانگین 13) از همه بیشتر بود (نمودار1) .

استفاده از هورمون BA (3 میلی‌گرم در لیتر) تاثیری مثبت بر رویان زایی بدنی مستقیم این گونه داشت. این نتیجه مؤید نتایج گو و همکارانش [1](2008)است که به تاثیر مثبت هورمون BA بر رویان زایی بدنی حاصل از ریزنمونه‌های برگی ارکیده فالانوپسیس [2] اشاره کرده‌اند. در گزاراشات اخیرماهدران[3] و همکاران (2012) ، به اثر مثبت استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BA بر رویان زایی مستقیم ریزنمونه‌های پرتوکورمی ارکیده سیمبیدیوم[4] اشاره نموده‌اند



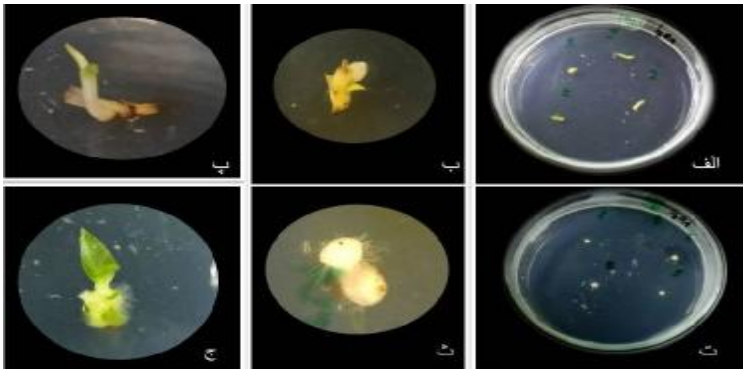
نمودار 1: میانگین تولید رویان با استفاده از ریز نمونه های مختلف در محیط‌های کشت فاقد ویا دارای هورمون BA (اثرمتقابل سه فاکتور)

نایاک و همکاران[5] (2005) درمورد ارکیده دندروبیوم[6] و تکسیرا داسیلوا و همکاران[7] (2006) درمورد ارکیده سیمبیدیوم از پرتوکوروم به عنوان ریزنمونه‌ی بسیار پرتوان برای تولید رویان یاد کرده و با استفاده از لایه های نازک پرتوکورمی به شیوه‌ی برش لایه نازک[8] موفق به تولید رویان های بدنی شدند . در این پژوهش نیز ریزنمونه ی پروتوکورمی بهترین نتیجه را به همراه داشت که مؤید نتایج پژوهش‌های مذکور است.

شلا و همکاران[9] (2004) در ارکیده دندروبیوم و نیز کالیموتا و همکاران[10] (2006) در ارکیده وانیلا[11] از ریزنمونه گره‌ی ساقه استفاده نموده و رویان بدنی تولیدکردند،که نتایج این پژوهش نیز مؤید آنها بودو ریزنمونه ی ساقه (میانگین کل تولید پروتوکورم 5/8)با اختلاف معنی دار دومین ریزنمونه ی پرتوان بعد از پرتوکورم قرار گرفت.

در نهایت 60 روز پس از کشت، گیاهچه های حاصل از رویان‌ها بدنی به محیط کشت فاست فاقد هورمون منتقل شدند.

[1] Gow , et al.
[2] Phalaenopsis
[3] Mahendran
[4] Cymbidium
[5] Nayak,et al.
[6] Dendrobium
[7] Teixeira da Silva, et al.
[8] Thin cell layer
[9] Sheela et al
[10] Kalimuthu et al
[11] vanilla



شکل 1: الف ریزنمونه های ساقه، ب – مرحله اولیه ایجاد رویان بدنی (پروتوکورم) از ساقه، پ-رشد رویان بصورت گیاهچه (پروتوکورم برگدار) ،

ت-ریزنمونه‌های پروتوکورمی، ث- مرحله اولیه ایجاد رویان بدنی (پروتوکورم ثانویه) ، ج- رشد رویان بدنی ثانویه (پروتوکورم برگدار)

Best medium for somatic embryogenesis induction in *Epipactis veratrifolia*

Shirin Moradi[1*], Shirin Dianati Daylami[2], Mostafa Arab[3], Kourosh Vahdati[4]

1-*Corresponding author: M.Sc. student, Dept. of Horticultural Sciences, Aburayhan University College, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran.(shirinmoradi@ut.ac.ir) 2,3,4- Instructor, Associate Prof. and Prof., Dept. of Horticultural Sciences, Aburayhan University College, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran

Abstract

In this study, regeneration of *Epipactis veratrifolia* via direct somatic embryogenesis was investigated. Five different types of explants (leaf, stem, crown, root) from *in vitro* seedlings and seed-derived protocorms were used. two levels of 6-benzyl aminopurine (0 and 3 mg/l) and four different culture media (1/2 MS, 1/4 MS ,1/8MS , Fast) were examined. There were no significant differences in somatic embryogenesis among medium treatments. protocorm explants, by 17.63 embryo in each explants had significantly higher response than others. Interaction between BA and different explants was significant and protocorm explants have highest embryogenesis frequency in all media contain BA (3 mg/l).

Kaywords: Direct somatic embryogenesis, *In vitro* culture media, Iran native Orchid, 6-benzyl aminopurine (BA)

Refrence

- قهرمان ، احمد. عطار، ف. (1377). تنوع زیستی گونه های گیاهان ایرانی . جلد اول . موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.
- Agarwal, L.S., Knawark, Sharma Dr. 2004. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* .L.Scientia Hort.102:359-368
- Gow, P.W., J.T. Chen and WC. Chang . 2008. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explantsof *Phalaenopsis* orchids. Acta Physiol Plant. 30:507-512
- Jorgensen, Bo., I. Andersen, F .Torben . 1998. Hardy and half hardy terrestrial orchids as potential new pot plant, proc Third Im Symp .on new Horticulture crops, Acta Hort.454 ISHS
- Kalimuthu, K., R.Senthikumar, N. Murugalatha . 2006. Regeneration and mass multiplication of Vanilla planifolia Andr a tropical orchid. Curr. Sci. 91: 1401–1403.
- Mahendran,G., V. Narmatha Bai.2012. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of Cymbidium bicolor Lindl. Scientia Horticulturae .135 :40–44
- Nayak,N.R., S.P.Rath, S.Patnaik.2005.In vitro propagation of three epiphytic orchids, Cymbidium aloifolium (L.) Sw., Dendrobium aphyllum (Roxb.) Fisch. And Dendrobium moschatum (Buch.-Ham.) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. Sci. Hortic. 71: 243–250.
- Rännbäck, L.M.,.2007.Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium* spp., Bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture programme, (ISSN 1652-1579)

- Sheela, V.L., K.Rajmohan, S.Anita , S.Sarada. 2004. Effect of growth regulators on development and multiplication of protocorm like bodies in Dendrobium cv Sonia. J. Orchid Soc. India 18: 21–23.
- Teixeira da Silva, J.A., N. Singh, M. Tanaka. 2006. Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid Cymbidium (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plants. Plant Cell Tissue Org. Cult. 84: 135–144.