ریزازدیادی توسط IBA و Kin و القای تتراپلویید توسط کلشی‌سین در ارکید فالانوپسیس

محسن محمدی[۱]، بهزاد کاویانی[۲*] (نویسنده مسئول) و شهرام صداقت‌حور[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران،ruyaniran@yahoo.com

۲*- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، b.kaviani@yahoo.com

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، sedaghathoor@yahoo.com

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۹

Micropropagation by IBA and Kin and tetraploid induction by colchicine in *Phalaenopsis amabilis*

Mohsen Mohammadi[1], Behzad Kaviani[2*](Corresponding author) and Shahram Sedaghathoor[3]

1- Ph.D Student, Department of Horticultural Science, Agriculture college, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, ruyaniran@yahoo.com

2*-Associate Professor, Department of Horticultural Science, Agriculture college, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, b.kaviani@yahoo.com

3-Associate Professor, Department of Horticultural Science, Agriculture college, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, sedaghathoor@yahoo.com

Received: May 2020 Accepted: October 2020

چکیده

یکی از مهم‌ترین ارکیدهای جهان، فالانوپسیس (*Phalaenopsis amabilis*) است که حدود ۷۰ درصد از بازار جهانی ارکیدها را به خود اختصاص داده است. این گیاه به صورت گلدانی و شاخه‌بریده مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای ریزازدیادی این ارکید از ریزنمونه‌ی اجسام شبه-پروتوکورم (PLBs)، محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی؛ ایندول-۳-بوتیریک اسید (IBA) در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر و کینتین (Kin) در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. نتایج نشان داد که بالاترین طول برگ (٤/١٠ سانتی‌متر) در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin، بیشترین تعداد برگ (۵/۲۵) در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA همراه با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin، و بالاترین طول ریشه (٦/٨٥ سانتی‌متر) در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin، به‌دست آمد. برای القای پلی‌پلوئیدی، از PLBs به عنوان ریزنمونه و از کلشی‌سین در ٤ سطح (صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ درصد) به مدت ۷۲ ساعت به عنوان عامل ضدمیتوز استفاده شد. نتیجه‌ی آنالیز فلوسایتومتری و صفات مورفولوژیکی و آناتومیکی نشان داد که استفاده از غلظت ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین باعث القای گیاهان تتراپلویید شد.

کلمات کلیدی: پلی‌پلوییدی، تکثیر درون‌شیشه‌ای، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، عامل ضدمیتوز، گیاهان زینتی

Abstract

One of the most important orchids in the world is *Phalaenopsis amabilis* which has allocated around 70% of orchid global market. This plant was used as pot plant and cut flower. Protocorm-like bodies (PLBs) explant, MS culture medium, and plant growth regulators; indole-3-butyric acid (IBA) in concentrations of 0, 0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/l and kinetin (Kin) in concentrations of 0, 0.5, 1, 2 and 3 mg/l were used for this orchid. Results showed that the highest leaf length (4.10 cm) in treatment of 1 mg/l IBA along with 2 mg/l Kin, maximum leaf number (5.25) in treatment of 0.2 mg/l IBA along with 1.5 mg/l Kin, and the highest root length (6.85 cm) in treatment of 0.2 mg/l IBA along with 1 mg/l Kin were obtained. PLBs as explant and colchicine in 4 levels (0, 0.05, 0.1 and 0.15%) for 72 h as antimitotic agent were used to induce polyploidy. Result of flow cytometery analysis and morphological and anatomical traits showed that the use of 0.15% colchicine caused to induce tetraploid plants.

Keywords: Antimitotic agent, *In vitro* proliferation, Ornamental plants, Plant growth regulators, Polyploidy

مقدمه و کلیات

ارکید فالانوپسیس (*Phalaenopsis amabilis*) از خانواده‌ی ثعلب (Orchidaceae) به عنوان یک گیاه گلدانی و شاخه‌بریده ارزش تجاری ویژه‌ای در صنعت گلکاری دارد. ازدیاد برون‌شیشه‌ای ارکیدها به دلایل مختلف از جمله عدم یک‌شکلی گیاهان حاصل و القای تنوع سوماکلونال معمولا انجام نمی‌شود. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، تکثیر درون‌شیشه‌ای یک راه حل مناسب است. فنون درون‌شیشه‌ای همچنین برای حفاظت از گیاهان در حال انقراض و تکثیر انبوه آنها در سراسر جهان در حال انجام است (Engelmann, 2011). انواع ارکیدها به ویژه ارکیدهای نادر و در حال انقراض با استفاده از انواع ریزنمونه‌ها به ویژه پروتوکورم و اجسام شبه‌پروتوکورم (PLBs) و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از جمله نفتالین استیک اسید (NAA)، ایندول-۳-بوتیریک اسید (IBA)، تیدیازورون (TDZ)، کینتین (Kin)، ٦-بنزیل آدنین (BA) و ٦-بنزیل آمینو پورین (BAP) تکثیر شده‌اند (Teixeira da Siva 2006; Roy *et al*., 2011; Panwar *et al*., 2012; Zeng *et al*., 2012; Baker *et al*., 2014; Kaviani *et al*., 2017). ریزازدیادی ارقام مختلف فالانوپسیس با استفاده از انواع ریزنمونه‌ها از جمله پروتوکورم و PLBs و انواع تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی و سیتوکینینی انجام شده است (Park *et al*., 2002; Kuo *et al*., 2005; Luo *et al*., 2009). یکی از فرآیندهای تکاملی در گیاهان به ویژه گیاهان زینتی، القای پلی‌پلوییدی است. این پدیده به صورت طبیعی و مصنوعی انجام می‌شود. در اغلب اوقات، گیاهان پلی‌پلویید کیفیت بهتری نسبت به اجداد دیپلویید خود دارند و فنوتیپ جدیدی را نشان می‌دهند. تغییر سطح پلوییدی به‌صورت موفقیت‌آمیزی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان به‌منظور توسعه انواع نوترکیب و همچنین تولید ارقام برتر در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است. در واقع پلی‌پلوییدی، پتانسیل ژنتیکی والدین را برای تولید گیاهان جدید و مطلوب افزایش می‌دهد. از پلی‌پلوییدی در باغبانی به‌عنوان یک ابزار اصلاحی در صفاتی مانند اندازه گیاه، ضخامت برگ و اندازه گل استفاده شده است (Shao and Chen, 2003). افزایش سطح کروموزومی می‌تواند به‌صورت برون‌شیشه‌ای یا درون‌شیشه‌ای و به روش‌های مختلف صورت گیرد. با این وجود استفاده از عوامل شیمیایی ضدمیتوزی، کارایی و کاربرد گسترده‌تری دارد. از ترکیبات ضدمیتوزی به ویژه کلشی‌سین و اوریزالین برای القای پلی‌پلوییدی استفاده شده است. موفقیت یک روش القای پلی‌پلوییدی به نوع، غلظت و مدت زمان اثر عامل پلی‌پلوییدکننده، همچنین نوع گونه‌ی گیاهی و اندام مورد استفاده بستگی دارد. به منظور تعیین سطح پلوییدی، از روش‌های غیرمستقیم نظیر ویژگی‌های مورفولوژیکی (اندازه‌ی برگ، طول و قطر ساقه، اندازه‌ی گل، اندازه‌ی بذر و دانه‌ی گرده)، ویژگی‌های آناتومیکی (اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های روزنه، تراکم سلول‌های روزنه در واحد سطح، تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در اپیدرم برگ) و همچنین از روش‌های مستقیم (شمارش تعداد کروموزوم و فلوسایتومتری) استفاده می‌شود. در برخی

مطالعات استفاده‌ی موفقیت‌آمیز از کلشی‌سین و اوریزالین برای تبدیل اشکال دیپلویید به تتراپلویید در ارکیدهایی مانند *Dendrobium*، *Odontioda*، *Cymbidium*، *Vanda*، *Phalaenopsis* و *Cattleya* در شرایط درون‌شیشه‌ای و برون‌شیشه‌ای گزارش شده است (Miguel and Leonhardt, 2011; Vichiato *et al*., 2014; Yenchon and Te-chato, 2014; Huy *et al*., 2019). هدف از پژوهش حاضر، استفاده از غلظت‌های مختلف Kin و IBA برای ریزازدیادی با استفاده از ریزنمونه‌ی PLBs و استفاده از کلشی‌سین برای القای پلی‌پلوییدی در ارکید فالانوپسیس بود.

فرآیند پژوهش

ریزازدیادی

منبع گیاهی، محیط کشت و تیمارها: PLBs سالم و استریل‌شده‌ی (به طول ۱-۰/۵ سانتی‌متر) ارکید فالانوپسیس (*Phalaenopsis amabilis*) از پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی هیرکان واقع در شهر آمل تهیه گردید. این PLBs به‌عنوان ریزنمونه برای ریزازدیادی در محیط کشت قرار گرفتند. در این تحقیق از محیط کشت جامد MS (موراشیک و اسکوگ، ۱۹۶۲) استفاده شد. به‌منظور ارزیابی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد روی رشد و باززایی PLBs، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA (صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و Kin (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) به‌صورت تکی یا در ترکیب با هم کشت شدند. در این تحقیق از ۲۵ تیمار، برای هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار سه ریزنمونه استفاده شد.

شرایط نگهداری ریزنمونه‌ها: پس از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، ظروف کشت در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲٤ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰-۷۰ درصد و دوره‌ی نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از انتقال ریزنمونه‌های کشت‌شده به اتاقک رشد، کنترل روزانه به منظور بررسی تغییرات در رشد و نمو و باززایی ریزنمونه‌ها انجام گرفت و هر ١٤ روز یک‌بار اقدام به واکشت شد.

صفات اندازه‌گیری‌شده: بعد از حدود ٦٠ روز اثر تنظیم‌کننده‌های رشد روی رشد و توسعه‌ی PLBs با بررسی صفات طول برگ، تعداد برگ و طول ریشه ارزیابی شد.

پلی‌پلوییدی

مواد گیاهی: در این تحقیق از گیاهچه‌های کامل پنج‌ماهه ارکید فالانوپسیس، تولیدشده از PBLs در شرایط درون‌شیشه‌ای، به‌عنوان ماده‌ی اولیه استفاده شد.

القای پلی‌پلوییدی: گیاهچه‌های کامل داخل بابل‌راکتور ۵۰۰ میلی‌لیتری قرار گرفتند و این بابل‌راکتور با میزان مورد نظر از محلول کلشی‌سین پر شد. گیاهچه‌ها برای هر غلظت و هر تکرار داخل آنها قرار گرفتند. به ازای هر بابل‌راکتور، محلول غذایی هوگلند نصف غلظت و کلشی‌سین (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد) برای ۷۲ ساعت وجود داشت.

شرایط کشت: بعد از پایان دوره‌ی تیمار، تمام گیاهان به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شسته شدند و در بارک‌های ۹ میلی‌متری استریل‌شده با بخار ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کاشته شدند (بارک‌ها بعد از استریل‌شدن تا

دمای اتاق خنک شدند و بعد کاشت صورت گرفت). گلدان‌های استفاده‌شده سایز ۱۵ بود و ۵ گیاهچه در هر گلدان کاشته شدند.

فلوسایتومتری: روش فلوسایتومتری برای تشخیص سطوح پلوییدی استفاده شد. فلوسایتومتری با استفاده از سل‌آنالایز مدل فکسکالیبور انجام شد. برای انجام فلوسایتومتری، حدود ۰/۰۲ گرم بافت گیاهی با بافر LB01، چاپینگ شد. سپس برای صاف‌کردن، نمونه‌ها از غربال سلولی با مش ۱۰۰ و ٤٥ میکرومتری عبور داده شدند. بلافاصله بعد از عبور از مش نایلون ٤٥ میکرومتری و ریختن سوسپانسیون، هسته‌های سلول استخراج‌شده در یک لوله جدید ریخته شدند و به آن RNAase و رنگ PI (رنگی که DNA را در دستگاه آشکار می‌سازد) با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. بعد از اضافه کردن این مواد، نمونه حدود نیم ساعت انکوبه شد (در دمای اتاق و تاریکی). سپس این هسته‌ها به دستگاه تزریق شدند.

هیستوگرام‌های حاصل مورد ارزیابی القای پلی‌پلوییدی قرار گرفتند.

مشاهدات مورفولوژیکی و آناتومیکی: تعداد برگ‌ها ۲ ماه بعد از تیمار با کلشی‌سین شمارش شد. یک لایه‌ی نازک از بافت اپیدرم پشت برگ و از سطح دور از محور برگ توسط چسب نواری جدا شد و رنگ‌آمیزی گردید. لام‌ها برای دیدن اندازه‌ی روزنه در زیر میکروسکوپ نوری قرار گرفتند (استاندارد ٤، زایس، آلمان). برای هر بوته ۳ لام تهیه شد و طول ۱۰ سلول محافظ روزنه روی هر اسلاید با استفاده از نرم‌افزار Image Analyzer Digitizer اندازه‌گیری شد. تعداد کلروپلاست موجود در هر سلول محافظ نیز شمارش گردید.

شرایط سازگاری: گیاهچه‌های ریشه‌دارشده در هر دو روش ریزازدیادی و القای پلی‌پلوییدی با موفقیت در گلخانه سازگار شدند. گلدان‌ها با لیکا، پیت‌ماس و پرلیت (به نسبت ۱: ۱: ۱) پر شدند (شکل ۱).سازگاری طی ٤ تا ٦ هفته و با رطوبت ۸۰ درصد به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی (CRD) اجرا شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای مقایسه‌ی میانگین تیمارهای مختلف از آزمون LSD استفاده گردید.

نتایج و بحث

ریزازدیادی: اثر Kin و IBA به‌تنهایی و در ترکیب با هم روی تعداد برگ، طول برگ و طول ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار گردید. مقایسه میانگین صفات (جدول ۱) نشان داد که محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بهترین محیط کشت برای تحریک رشد طولی برگ (٤/۱۰ سانتی‌متر) بود. محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA نیز برای تحریک طول برگ به میزان ۳/٦۳ سانتی‌متر، تیمار مناسبی بود (جدول ۱، شکل ۱). نتایج حاصل نشان داد که تنظیم‌کننده‌های رشد با هم اثر فزاینده دارند. کمترین طول برگ (۱/٦۰ سانتی‌متر) در گیاهان شاهد به دست آمد. مقایسه میانگین صفات در

مورد تعداد برگ (جدول ۱) آشکار کرد که بیشترین تعداد برگ (۵/۲۵) در محیط کشت غنی‌شده با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin همراه با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA به دست آمد. محیط‌های کشت حاوی غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin در ترکیب با سه غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA تولید بیش از ٤ برگ را تحریک کردند (جدول ۱). نتایج حاصل نشان از مناسب‌بودن غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin در تحریک تولید برگ دارد. نگاهی به جدول ۱ نشان می‌دهد که تیمارهای حاوی ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بدون حضور Kin رشد طولی مناسبی از ریشه را تحریک کردند. در این تیمارها طول ریشه بیش از ۵ سانتی‌متر بود. اگرچه، بالاترین طول ریشه (٦/۸۵) در محیط کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin همراه با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA به دست آمد. در مطالعه‌ی حاضر، استفاده‌ی ترکیبی از غلظت‌های مناسبی از Kin و IBA باعث تشکیل تعداد مناسب برگ از PLBs کشت‌شده در محیط کشت MS، بدون تشکیل کالوس شد. مشابه این یافته‌ها توسط Roy و همکاران (۲۰۱۱) روی ارکید واندا (*Vanda coerulea*) گزارش شد. در بیشتر ارکیدها حضور سیتوکینین‌ها به‌تنهایی ازدیاد شاخه و برگ‌ها را تحریک می‌کند (Mahendran and Normatha, 2009). در همین راستا، Maridass و همکاران (۲۰۱۰) در کشت درون‌شیشه‌ای ارکید دندروبیوم (*Dendrobium nanum*) مشاهده کردند که بیشترین میزان شاخه و برگ در محیط کشت MS حاوی BAP و BA به‌تنهایی تولید شد. تشکیل و تکثیر برگ‌ها با نوع و غلظت سیتوکینین مورد استفاده ارتباط نزدیکی دارد (Amoo *et al*., 2014). Bektas and Sokmen (۲۰۱٦) نیز در مطالعه‌ی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ی ارکید سراپیاس (*Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq.) بیان کردند که در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BA بیشترین برگ تولید گردید. در ارکید دندروبیوم (*Dendrobium huoshanese*) گزارش شده است که Kin در تکثیر گیاهچه، تولید برگ و شاخه از PLBs نسبت به سایر سیتوکینین‌های مورد استفاده بسیار مؤثرتر بود و بهترین پاسخ در محیط غنی‌شده با ۲۰ میلی‌مولار Kin مشاهده شد (Luo *et al*., 2009). هورمون Kin همچنین برای تکثیر شاخه و برگ در تعدادی دیگر از ارکیدها استفاده شده است (Saiprasad *et al*., 2004; Malabadi *et al*., 2005; Martin and Madassery, 2006; Panwar *et al*., 2012). تمایز شاخه و برگ‌های متعدد از PLBs با حضور غلظت‌های مناسب اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در برخی ارکیدهای دیگر مانند *Cymbidium*، *Catasetum* و *Phalaenopsis* گزارش شد (Mahendran and Normatha, 2009; Baker *et al*., 2014; Kaviani *et al*., 2017). مطابق با یافته‌های این تحقیق، مطالعه روی ارکید دندروبیوم (*Dendrobium nobile*) نشان داد که وقتی PLBs در محیط کشت MS حاوی هر دوی سیتوکینین و اکسین رشد کنند، بالاترین میزان اندام‌زایی (شاخه و برگ) (۹۲/٦ درصد) انجام شد (Bhattacharyya *et al*., 2016). Rahman و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی ریزازدیادی نوک ساقه‌ی ارکید واندا (*Vanda tessellata* L.) در محیط کشت

MS با غلظت‌های ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، به این نتیجه رسیدند که چنین ترکیبی باعث افزایش تعداد برگ شد. در ازدیاد درون‌شیشه‌ای دندروبیوم (*Dendrobium* sp.) با استفاده از ریزنمونه‌ی برگ نشان داده شد که بیشترین تعداد برگ در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بعد از ٦۰ روز به دست آمد (Goswami *et al*., 2015). Nongdam and Tikendra (۲۰۱٤) نیز در ازدیاد درون‌شیشه‌ای ارکید دندروبیوم (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) از طریق بذر نشان دادند که بیشترین تعداد برگ (۹/٦۳) در محیط کشت MS به‌همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که در اغلب موارد تنظیم کننده‌های رشد وقتی به‌صورت ترکیبی به‌کار می‌روند مؤثرتر عمل می‌کنند. طبق مطالعات انجام شده، IBA برای القای ریشه‌زایی مؤثرتر از Kin بود. نتایج مشابهی توسط برخی محققان با مطالعه روی ارکیدهایی مانند ساتیریوم (*Satyrium nepalense* D. Don) و دندروبیوم (*Dendrobium nobile*) گزارش شد (Mahendran and Normatha, 2009; Bhattacharyya *et al*., 2016).

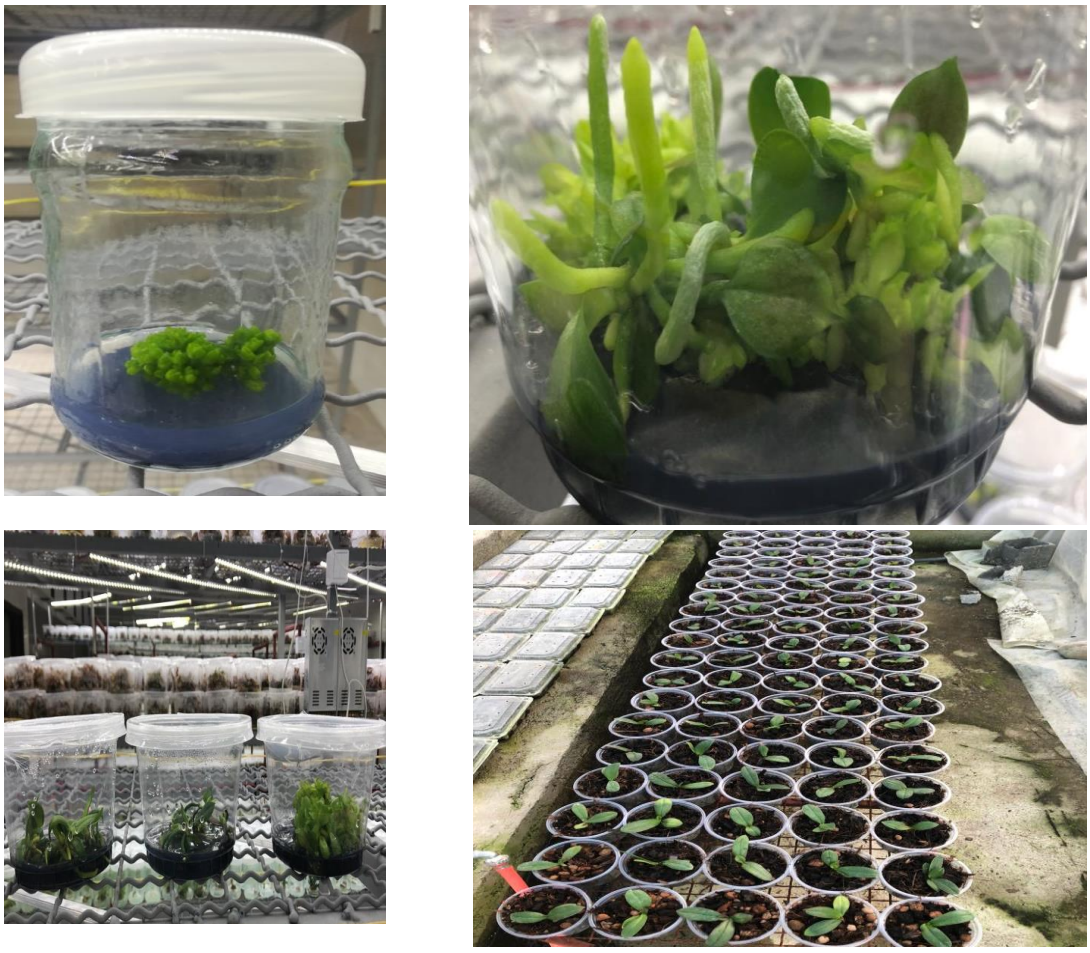
در تحقیقات Bhattacharyya و همکاران (۲۰۱٦)، بالاترین میزان ریشه‌زایی (۸٦ درصد یا ٥/٤ عدد ریشه در هر شاخه) در محیط کشت حاوی۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA بعد از ۸ هفته به‌دست آمد و در آزمایش Mahendran and Normatha (۲۰۰۹)، بالاترین تعداد ریشه در هر شاخه (٦/٤۰ عدد) در غلظت ۹/۸٤ میکرومولار IBA حاصل گردید. اثربخشی IBA در ریشه‌زایی برخی از ارکیدهای دیگر مانند وانیل (*Vanilla planifolia*) (Giridhar *et al*., 2001)، سیمبیدیوم (*Cymbidium alofolium* L. SW) (Nayak *et al*., 2002)، سیمبیدیوم (*Cymbidium pendulum*) (Nongdam *et al*., 2006)، ساتیریوم (*Satyrium nepalense*) (Mahendran and Normatha, 2009)، واندا (*Vanda teres*) (Firoz Alam *et al*., 2010) و اولوفیا (*Eulophia nuda* Lindl) (Panwar *et al*., 2012) گزارش گردید. در تحقیقی دیگر، بالاترین میزان ریشه‌زایی و بلندترین طول ریشه در ارکید دندروبیوم (*Dendroboum nobile*) در محیط کشت غنی‌شده با ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد (Paromik *et al*., 2016). مطالعه روی ریزازدیادی ارکید کاتاستوم نشان داد که بالاترین طول ریشه (۱۹۳/٤ میلی‌متر) در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد (Baker *et al*., 2014). اثر مثبت Kin و IBA روی تعداد و طول ریشه به دلیل القای آغازش ریشه توسط اکسین و تحریک رشد و تقسیم سلولی توسط سیتوکینین می‌باشد، همچنین خود اکسین نیز در فرآیند تقسیم سلولی نقش دارد.

جدول ۱- مقایسه‌ی میانگین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی روی طول برگ، تعداد برگ و طول ریشه‌ی گیاه ارکید فالانوپسیس (*Phalaenopsis amabilis*).

Table 1- Mean comparison of the effect of different concentrations plant growth regulators on leaf length, leaf number and root length of orchid Phalaenopsis (*Phalaenopsis amabilis*)

IBA × Kin (میلی‌گرم بر لیتر)	طول برگ (سانتی‌متر)	تعداد برگ	طول ریشه (سانتی‌متر)
۰ × ۰	۱/۶۰h	۲/۵۰d-g	۳/۳۰hi
۰ × ۰/۵	۲/۱۳e-h	۳/۸۰bcd	۳/۱۰i
۰ × ۱	۲/۱۳d-h	۲/۹۰c-g	۳/۵۰f-i
۰ × ۲	۲/۹۰b-e	۲/۲۱fg	۴/۷۰bcdef
۰ × ۳	۲/۲۲c-h	۲/۸۳d-g	۳/۳۰hi
۰/۱ × ۰	۱/۸۸f-h	۲/۱۰g	۴/۲۰b-i
۰/۱ × ۰/۵	۲/۳۵c-h	۳/۱۸c-g	۳/۹۰c-i
۰/۱ × ۱	۲/۴۳c-h	۳/۱۰c-g	۵/۱۲bcd
۰/۱ × ۱/۵	۲/۳۰c-h	۴/۱۲a-c	۴/۴۴b-h
۰/۱ × ۲	۱/۸۰gh	۳/۰۰c-g	۴/۲۰b-i
۰/۲ × ۰	۲/۳۳c-h	۲/۶۰efg	۵/۲۵b
۰/۲ × ۰/۵	۲/۴۲c-h	۳/۸۰bcd	۴/۲۲b-i
۰/۲ × ۱	۳/۱۰a-d	۳/۷۰b-e	۶/۸۵a
۰/۲ × ۱/۵	۲/۸۰b-g	۵/۲۵a	۵/۱۰bcd
۰/۲ × ۲	۳/۷۰ab	۳/۷۰b-e	۴/۸۵bcde
۰/۵ × ۰	۲/۲۰d-h	۲/۸۰d-g	۵/۲۰b
۰/۵ × ۰/۵	۲/۳۳c-h	۳/۵۰b-e	۴/۴۴b-h
۰/۵ × ۱	۲/۹۰a-e	۳/۷۰b-e	۵/۱۵bc
۰/۵ × ۱/۵	۳/۶۳ab	۴/۶۰ab	۴/۶۰b-g
۰/۵ × ۲	۲/۱۵c-h	۳/۲۲c-g	۳/۳۵g-i
۱ × ۰	۲/۳۰c-h	۲/۹۰d-g	۳/۶۸e-i
۱ × ۰/۵	۲/۱۳d-h	۳/۱۳c-g	۴/۲۰b-i
۱ × ۱	۲/۸۳b-f	۳/۱۰c-g	۳/۸۰d-i
۱ × ۱/۵	۳/۲۱a-c	۴/۶۰ab	۳/۸۰d-i
۱ × ۲	۴/۱۰a	۳/۲۰c-e	۴/۱۰b-i

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف همسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف IBA و Kin روی ریزازدیادی ارکید فالانوپسیس (*Phalaenopsis amabilis*). A) PLBs تولیدشده؛ B) PLBs در حال رشد؛ C) رشد متفاوت طول و تعداد برگ در محیط‌های کشت غنی‌شده با هورمون‌ها؛ D) سازگاری گیاهچه‌ها در شرایط برون‌شیشه‌ای.

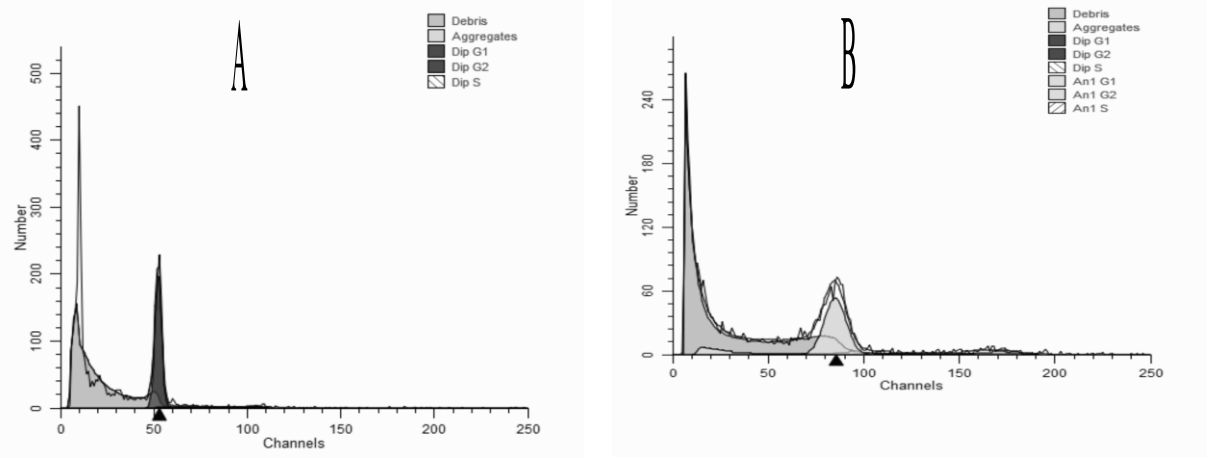
Fig 1- Effect of different concentrations of IBA and Kin on micropropagation of *Phalaenopsis amabilis*. A) Produced PLBs; B) Growing PLBs; C) Different growth of length and number of leaf in culture media enriched by hormones; D) Acclimatization of plantlets in *ex vitro* conditions.

پلی‌پلوییدی: گیاهچه‌های ۵ ماهه‌ی ارکید فالانوپسیس از PLBs رشدیافته در شرایط درون‌شیشه‌ای، در معرض غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد) برای ۷۲ ساعت همراه با NP-40 به‌عنوان سورفاکتانت قرار گرفتند. درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های تیمارشده با کلشی‌سین در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت. گیاهچه‌های زنده‌مانده از تمام تیمارها در گلدان کشت شدند و از نظر وجود پلی‌پلوییدی با پارامترهای مختلف ارزیابی شدند. بعد از گذشت ۲ ماه از تیمار با کلشی‌سین، تتراپلوییدها به‌دست آمدند (شکل ۲). هیچ تتراپلوییدی با تیمار کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد به‌دست نیامد. وقتی که پلی‌پلوییدی توسط فلوسایتومتری تعیین شد، هیستوگرام‌ها، دیپلوییدها (شاهد) و تتراپلوییدها را نشان دادند. تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری برای تعیین مقدار DNA و تایید حضور پلی‌پلوییدها از برگ گیاهچه‌های زنده‌مانده تیمارشده با پروپیدیم یدید، ۶۰

روز پس از تیمار با کلشی‌سین انجام شد. با استفاده از تیمار شاهد (دیپلویید) سطح پلوییدی DNA برای گیاهچه‌های تیمارشده دیگر تعیین شد. هیچ پلی‌پلوییدی در تیمار شاهد مشاهده نگردید. هیستوگرام فلوسایتومتری ۲ پیک واضح از محتوای DNA هسته‌ای را در گیاهان تیمارشده با ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین نشان داد که بیان می‌کند این گیاهان، تتراپلویید هستند. مشاهدات مورفولوژیکی و آناتومیکی برای تایید نتایج به‌دست آمده از فلوسایتومتری مورد استفاده قرار گرفت. افزایش در صفات تعداد برگ، طول سلول‌های نگهبان روزنه و تعداد کلروپلاست در سلول‌های نگهبان روزنه در گیاهان پلی‌پلوییدشده با تیمار کلشی‌سین نسبت به دیپلوییدهای شاهد مشاهده گردید (جدول ۲).

تفاوت‌های صفات مورفولوژیکی و آناتومیکی بین گیاهان شاهد دیپلویید و تتراپلویید معنی‌دار بود. تتراپلوییدها بیشترین تغییر را در شدت رنگ نشان دادند، و دارای برگ سبز تیره بودند. طول سلول‌های نگهبان روزنه یک معیار مناسب برای تأیید القای پلوییدی است. بیش‌ترین تعداد برگ (٤/٢٨)، بالاترین طول سلول‌های نگهبان روزنه (٤٨/٨٠ مایکرومتر) و بیشترین تعداد کلروپلاست در سلول‌های نگهبان روزنه (٧٨/٩٠) از گیاهان تتراپلویید القاشده با کلشی‌سین ۰/۱۵ درصد بدست آمدند (جدول ۲). یکی از باارزش‌ترین ابزارهای زیست‌فناوری در صنعت باغبانی به‌ویژه در زمینه‌ی گیاهان زینتی، القای پلی‌پلوییدی است. عموما گیاهان زینتی پلی‌پلویید نسبت به والدین دیپلویید، از کارایی بالاتری برخوردارند و زیباترند. از کلشی‌سین برای القای پلی‌پلوییدی در انواع گیاهان از جمله گیاهان زینتی استفاده شده است. گیاهان پلی‌پلوییدشده عمدتا پارامترهای کمی و کیفی ارتقا یافته‌ای را به نمایش گذاشتند. القای پلی‌پلوییدی به عوامل مختلفی از جمله نوع و غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار بستگی دارد. استفاده‌ی موفقیت‌آمیز از کلشی‌سین برای القای پلی‌پلویید در انواع ارکیدها گزارش شده است (Atichart and Bunnag, 2007; Zhang and Hao, 2010; Sarathum *et al*., 2010). Alan و همکاران (۲۰۰۷) اظهار داشتند که کلشی‌سین نسبت به سایر مواد آنتی‌میکروتوبول، قدرت کمتری در جلوگیری از تشکیل توبولین گیاهی داشته و به‌منظور جلوگیری از تشکیل میکروتوبولین، استفاده از غلظت‌های بالاتر کلشی‌سین توصیه شد. نتایج به‌دست آمده در القای پلی‌پلوییدی در ارکید دندروبیوم (*Dendrobium secundum* (Bl.)) توسط غلظت‌های مختلف کلشی‌سین مشابه نتایج این تحقیق بود (Atichart and Bunnag, 2007). به‌منظور بهبود عملکرد ارکید هیبرید کاتلیا (*Cattleya intermedia* var. Orlata) از تیمار کلشی‌سین در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد به‌مدت زمان ٦، ١٢، ١٨ و ٢٤ ساعت روی پروتوکورم‌های ۷ هفته‌ای استفاده شد. نتایج نشان داد که تیمار ۰/۵ درصد کلشی‌سین به‌مدت ٦ ساعت، مؤثرترین تیمار بود (Tuwo and Indrianto, 2016). مقایسه‌ی طول سلول‌های نگهبان روزنه یک روش اقتصادی، مؤثر و ساده برای شناسایی

پلی‌پلوییدها از دیپلوییدهاست (Huy *et al*., 2019). این روش برای شناسایی خصوصیات ژنتیکی ارکیدهای *Epidendrum*، *Dendrobium*، *Cymbidium*، *Phalaenopsis*، *Odontioda*، *Calanthe* استفاده شد (Russell, 2004; Chen *et al*., 2009; Miguel and Leonhardt, 2011). ارزیابی پلوییدی با اندازه‌گیری سلول‌های نگهبان روزنه به پرورش‌دهندگان این امکان را می‌دهد تا بتوانند جداسازی اولیه‌ی پلی‌پلوییدها را بدون سرمایه‌گذاری در زمان و مکان برای جمعیت‌های زیاد انجام دهند. این روش به زمان کمتری نیاز دارد و تجزیه و تحلیل ساده و سریع تعداد زیادی از گونه‌ها و ارقام را امکان‌پذیر می‌کند (Chen *et al*., 2009; Dhooghe *et al*., 2011)، امّا برای دست‌یابی به نتایج دقیق‌تر این روش باید در ترکیب با سایر روش‌های مدرن استفاده شود (Huy *et al*., 2019). در مطالعه‌ی حاضر، نتایج به‌دست آمده با نتایج حاصل از روش‌های مختلف تعیین میزان پلوییدی، مطابقت داشت و سطح پلوییدی گیاهان تیمارشده و تیمار نشده را تأیید کرد.



شکل ۲- هیستوگرام آنالیز فلوسایتومتری مربوط به هسته‌های جداشده از برگ گیاهچه‌های ۵ ماهه‌ی ارکید فالانوپسیس (*Phalaenopsis amabilis*) تیمارشده با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین برای ۷۲ ساعت. چپ: دیپلویید؛ راست: تتراپلویید.

Fig 2. Histogram of flow cytometry analysis related to isolated nuclei from five-months plantlets of *Phalaenopsis amabilis* treated with concentrations 0.05, 0.1 and 0.15% colchicine for 72 h. Left: diploid; right: tetraploid.

جدول ۲- **مقایسه‌ی میانگین اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین روی تعداد برگ، طول سلول‌های نگهبان روزنه و تعداد کلروپلاست گیاه ارکید فالانوپسیس (*Phalaenopsis amabilis*).**

Table 2- Mean comparison of the effect of different concentrations of colchicine on leaf number, stomata guard cells length and chloroplast number of *Phalaenopsis amabilis*

غلظت کلشی‌سین (درصد)	تعداد برگ	طول سلول‌های نگهبان روزنه (مایکرومتر)	تعداد کلروپلاست
۰/۰۰	۲/۲۲[c]	۳۳/۵۰[c]	۴۰/۶۸[d]
۰/۰۵	۳/۳۳[b]	۳۵/۳۰[cd]	۵۰/۴۱[c]
۰/۱۰	۳/۳۸[b]	۳۹/۱۰[b]	۶۹/۳[b]
۰/۱۵	۴/۲۸[a]	۴۸/۸۰[a]	۷۸/۹۰[a]

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف همسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

نتیجه‌گیری کلی

ریزازدیادی نقش مهمی در تکثیر گیاهان از جمله گیاهان زینتی ایفا می‌کند. تولید تعداد زیادی گیاه در مقیاس وسیع، خطر انقراض گیاهان را کاهش می‌دهد. در پژوهش حاضر، بیشترین تعداد برگ در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA همراه با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به دست آمد. پلی‌پلوییدی نقش موثر و انکارناپذیری در تکامل گیاهان و گونه‌زایی ایفا می‌کند. پرکاربردترین ماده ضد میتوز برای القای پلی‌پلوییدی در گیاهان، کلشی‌سین است. در مطالعه حاضر، استفاده از غلظت ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین باعث القای گیاهان تتراپلویید شد.

منابع

1) Alan, A.R., W. Lim, M.A. Mutschler and E.D. Earle. 2007. Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.). Plant Sci. 173: 25–31.
2) Amoo, S.O., A.O. Aremu, M. Moyo, L. Szucova, K. Dolezal and J. van Staden. 2014. Physiological effects of a novel aromatic cytokinin analogue in micropropagated *Abe arborescens* and *Harpagophytum procumbens*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 116: 17–26.
3) Atichart, P. and S. Bunnag. 2007. Polyploid induction in *Dendrobium Secundum* (Bl.) Lindl. By *in vitro* techniques. Thai J. Agric. Sci. 40: 91–95.
4) Baker, A., B. Kaviani, Gh. Nematzadeh and N. Negahdar. 2014. Micropropagation of *Orchis catasetum* - A rare and endangered orchid. Acta Sci. Polo. Hort. Cult. 73 (2): 197–205.
5) Bektas, E. and A. Sokmen. 2016. *In vitro* seed germination, plantlet growth, tuberization and synthetic seed production of *Serapias vomeraceae* (Burm.f.) Briq. Turk. J. Bot. 40: 584–594.
6) Bhattacharyya, P., S. Kumaria and P. Tandon. 2016. High frequency regeneration protocol for *Dendrobium nobile:* A model tissue culture approach for propagation of medicinally important orchid species. South Afr. J. Bot. 104: 232–243.
7) Chen, W.H., C.Y. Tang and Y.L. Kao. 2009. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 98: 229–238.
8) Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104: 359–373.
9) Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 47: 5–16.
10) Firoz Alam, M., P. Sinha and M. Lokman Hakim. 2010. Micropropagation of *Vanda teres* (Roxb) Lindle. protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants. Humana Press Springer Protocols, UK, pp. 400.
11) Giridhar, P., B. Obul Reddy and G.A. Ravishankar. 2001. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia*. Current Sci. 81 (9): 1166–1170.
12) Goswami, K., S. Yasmin, K.M. Nasiruddin, F. Khatum and J. Akte. 2015. *In vitro* regeneration of *Dendrobium* sp. of orchid using leaf tip as explant. J. Environ. Sci. Nat. Res. 8 (2): 75–78.
13) Huy, N.P., D.T.T. Tam, V.O. Luan, H.T. Tung, V.T., Hien, H.T.M. Ngan, P.N. Duy and D.T. Nhut. 2019. *In vitro* polyploid induction of *Paphiopedilum*

bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497.

23) Nayak, N.R., S. Sahoo, S. Patnaik and S.P. Rath. 2002. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium alofolium* (L.) SW. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceas). Sci. Hort. 94: 107–116.

24) Nongdam, P. and L. Tikendra. 2014. Establishment of an efficient *in vitro* regeneration protocol for rapid and mass propagation of *Dendrobium chrysontoxum* Lindl. using seed culture. The Sci. World J. 2: 48–55.

25) Nongdam, P., C. Nirmala and R. Tewari. 2006. *In vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* orchids via embryo culture. Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol. 7: 145–150.

26) Panwar, D., K. Ram and H.N. Shekhawat. 2012. *In vitro* propagation of *Eulophia nuda* Lindl. an endangered orchid. Sci. Hort. 139: 46–52.

27) Park, S.Y., E.C. Yeung, D. Chakrabarty and K.Y. Peak. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis hybrida* using thin-section culture. Plant Cell Rep. 21: 46–51.

28) Paromik, B., K. Suman and T. Pramod. 2016. High frequency regeneration protocol for *Dendrobium nobile*: A model tissue culture approach for propagation of medicinally important orchid species. South Afr. J. Bot. 104: 232–243.

29) Rahman, S.M., F.M. Hasan, R. Das, S.M. Hossain and M. Rahman. 2009. *In vitro* micropropagation of orchid (*Vanda tessellatal* L.) from shoot tip explant. J. Biol. Sci. 17: 139–144.

30) Roy, A.R., R.S. Patel, V.V. Patel, S. Sajeev and B.C. Deka. 2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an *villosum* using colchicine. Sci. Hort. 252: 283–290.

14) Kaviani, B., N. Negahdar, A. Baker and N. Mosafer. 2017. *In vitro* micropropagation of an endangered orchid species (*Orchis catasetum*) through protocorms: the effect of plant growth regulators and iron Nano-chelate. Plant Res. 30 (1): 215–225.

15) Kuo, H.I., J.T. Chen and W.C. Chang. 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* ‘Little Steeve’. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 41: 453–456.

16) Luo, J.P., C. Wawrosch and B. Kopp, 2009. Enhanced micropropagation of *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Sheng through protocorm-like bodies: the effect of cytokinins, carbobydrate sources and cold pretreatment. Sci. Hort. 123: 258–262.

17) Mahendran, G. and V. Normatha. 2009. Mass propagation of *Satyrium nepalense* D. Don, A. medicinal orchid via seed culture. Sci. Hort. 119: 203–207.

18) Malabadi, R.B., G.S. Mulgund and N. Kallappa. 2005. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. J. Plant Physiol. 162: 473–478.

19) Maridass, M., R. Mahesh, G. Raju, A. Benniamin and K. Muthuchelian. 2010. *In vitro* propagation of *Dendrobium nanum* through rhizome bud culture. Intl. J. Biol. Technol. 1 (2): 50–54.

20) Martin, K.P. and J. Madassery. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. Sci. Hort. 108: 95–99.

21) Miguel, T.P. and K.W. Leonhardt. 2011. *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin. Sci. Hort. 130 (1): 314–319.

22) Murashige, T. and Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and

endangered orchid. Sci. Hort. 128: 325–331.
31) Russell, G. 2004. Stomatal guard cell measurements using leaf prints. Certified Senior Advisor J. 4: 137–139.
32) Saiprasad, G.V.S., P. Raghveer, S. Khetarpal and R. Chandar. 2004. Effect of various polyamines on production of protocorm-like bodies in orchid, *Dendrobium* 'Sonia'. Sci. Hort. 100: 161–168.
33) Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantiviwat and M. Nanakorn. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. Eur. J. Hortic. Sci. 75 (3): 123–127.
34) Shao, J. and C. Chen. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 75 (3): 241–246.
35) Teixeira da silva, J.A., N. Singh and M. Tanaka. 2006. Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidanceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 84: 135–144.
36) Tuwo, M. and A. Indrianto. 2016. Improvement of orchid *Cattleya* hybrid (*Cattleya intermedia var. Orlata*) by colchicines treatment *in vitro*. Modern Appl. Sci. 10 (71): 83–89.
37) Vichiato, M.R., M. Pasqual, F.A. Rodrigues and D.M. Castro. 2014. Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Crop Breed. Appl. Biotechnol. 14 (3): 154–159.
38) Yenchon, S. and S. Te-chato. 2014. Polypolidy induction of *Dendrobium formosum* by colchicine treatment *in vitro*. Acta Hortic. 1025 (12): 81–88.
39) Zeng S., K. Wua, J.A. Teixeira da Silva, J. Zhanga, Z. Chena, N. Xiaa and J. Duan. 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. Sci. Hort. 138: 198–209.
40) Zhang, W. and H. Hao. 2010. Tetraploid *Vanilla planifolia* alters morphological characteristics and improves fruit quality. Sci. Hort. 125 (3): 396–400.