Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

Introducing inexpensive *in vitro* solid culture medium for producing high quality *Phalaenopsis* orchid plantlets

Aylar Mohammadpour Barough[1], Shirin Dianati Daylami[*2], Ali Fadavi[3], Sasan Aliniaeifard[4]

1. M.Sc. Student, Horticultural Sciences Ornamental Plants Trend, Dept. of Horticulture, Aburaihan Campus University of Tehran, Pakdasht, Iran. E-mail: mohammadpor.aylar@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Assistant Prof., Dept. of Horticulture, Aburaihan Campus University of Tehran, Pakdasht, Iran. E-mail: dianati@ut.ac.ir
3. Associate Prof., Dept. of Food Science Technology, Aburaihan Campus University of Tehran, Pakdasht, Iran. E-mail: afadavi@ut.ac.ir
4. Assistant Prof., Dept. of Horticulture, Aburaihan Campus University of Tehran, Pakdasht, Iran. E-mail: aliniaeifard@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 05.05.2021
Revised: 09.28.2021
Accepted: 02.02.2022

Keywords:
Anthocyanin,
Carbohydrate,
Mass production,
Maximum efficiency of photosystem II,
Protocorm

ABSTRACT

Background and Objectives: Orchids, especially *Phalaenopsis* orchids, are known as one of the most popular ornamental plants in the world markets. The use of *in vitro* cultivation system is the only way to produce these orchid plantlets. Producers of this plant have to buy and import it from foreign companies. Currently, increasing the costs of plantlet production and cultivation in the country, which requires the buy of imported chemicals for prepare *in vitro* culture media, has caused problems for domestic producers of this product. Therefore, making a suitable and low-cost culture medium to produce inexpensive and high-quality tissue culture seedlings on a commercial large scale was the main purpose for this study.

Materials and Methods: In this study, 5 mm protocorm explants were cultured in eight treatments of culture media (including 1/2 MS (control), FAST and six types of hand-made medium used of made in Iran inexpensive fertilizers with numbers one to six (M6 to M1) were named) and three replications in a completely randomized design. Explants were subcultured every 30 days and their total fresh weight was recorded. Also, three months after cultivation, some physiological traits (total fresh and dry weight, leaf and root dry weight), biochemical (concentration of photosynthetic pigments, anthocyanins and soluble, storage and total carbohydrates) and maximum efficiency of photosystem II were measured in plantlets.

Results: The results showed that plants grown in different culture media in all traits had a significant difference at the level of 1% probability. The highest total fresh and dry weight, photosynthetic pigments and the maximum efficiency of photosystem II, occurred in M5 and M6 culture media and the lowest in M2. Also, M6 with 155.7 and 1/2 MS 40.2 mg g^{-1}, respectively, had the highest and lowest total carbohydrate content. The highest (31.3 µmol g^{-1}) and lowest (14.9 µmol g^{-1}) anthocyanin content were observed in M2 and 1/2 MS culture media, respectively.

Conclusion: By adding banana powder and activated charcoal to M5 (300,000 Rials and 7.15 $) and M6 (440,000 Rials and 10.52 $)

inexpensive culture media compared to orchid conventional culture media (1/2 MS and FAST) and reducing *in vitro* cultivation costs 23% and 12%, respectively, were selected as suitable low-cost solid culture media for growth and development of *Phalaenopsis* orchid plantlets, which according to the biomass partitioning curve can be introduced M6 as an inexpensive and suitable culture medium due to the production of more well-formed plants in comparison of all culture media.

Cite this article: Mohammadpour Barough, Aylar, Dianati Daylami, Shirin, Fadavi, Ali, Aliniaeifard, Sasan. 2022. Introducing inexpensive *in vitro* solid culture medium for producing high quality *Phalaenopsis* orchid plantlets. *Journal of Plant Production Research*, 29 (2), 101-117.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2022.19083.2819
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

معرفی محیط کشت جامد درون‌شیشه‌ای ارزان برای تولید گیاهچه‌های پرکیفیت ارکیده فالانوپسیس

آیلار محمدپور باروق[۱]، شیرین دیانتی دیلمی*[۲]، علی فدوی[۳]، ساسان علی‌نیائی‌فرد[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد علوم و مهندسی باغبانی گرایش گیاهان زینتی، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: mohammadpor.aylar@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، استادیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: dianati@ut.ac.ir

۳. دانشیار گروه فناوری صنایع غذایی، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: afadavi@ut.ac.ir

۴. استادیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: aliniaeifard@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۵
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۳

واژه‌های کلیدی:
آنتوسیانین،
پروتوکورم،
تولید انبوه،
حداکثر کارایی فتوسیستم II،
کربوهیدرات

چکیده

سابقه و هدف: گیاهان ارکیده به‌ویژه ارکیده‌های فالانوپسیس به‌عنوان یکی از محبوب‌ترین گیاهان زینتی در بازارهای جهان شناخته می‌شوند. تنها راه تولید گیاهچه‌های این ارکیده استفاده از کشت درون‌شیشه‌ای است. تولیدکنندگان این گیاه مجبور به خرید و واردات آن از شرکت‌های خارجی هستند. در حال حاضر افزایش هزینه‌های تولید و پرورش گیاهچه‌ها در کشور که نیازمند خرید مواد شیمیایی وارداتی برای ساخت محیط‌های کشت درون‌شیشه‌ای است، موجب ایجاد مشکل برای تولیدکنندگان داخلی این محصول شده است. بنابراین ساخت محیط کشت مناسب و کم هزینه برای تولید نشاء کشت بافتی ارزان و پرکیفیت در مقیاس انبوه تجاری، انگیزه اصلی انجام پژوهش حاضر بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، پروتوکورم‌های پنج میلی‌متری به‌عنوان ریزنمونه در هشت تیمار محیط کشت نیم غلظت موراشیگ و اسکوگ (شاهد)، FAST و شش نوع محیط کشت دست‌ساز با استفاده از کودهای ارزان ساخت داخل کشور که با شماره‌های یک تا شش (M6 تا M1) نام‌گذاری شدند و در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی، کشت شدند. ریزنمونه‌ها هر ۳۰ روز یکبار واکشت شدند و وزن تر کل آن‌ها ثبت گردید. هم‌چنین سه ماه پس از کشت، برخی صفات فیزیولوژیک (وزن تر و خشک کل، وزن خشک برگ و ریشه)، زیست- شیمیایی

یافته‌ها: نتایج نشان داد که گیاهان کشت شده در محیط‌های کشت مختلف در تمامی صفات در

سطح احتمال یک درصد، دارای اختلاف معنی‌دار بودند. بیش‌ترین وزن تر و خشک کل، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و حداکثر کارایی فتوسیستم II، در محیط کشت‌های M5 و M6 و کم‌ترین آن‌ها در M2 اتفاق افتاد. هم‌چنین M6 با داشتن ۱۵۵/۷ و 1/2 MS با دارا بودن ۴۰/۲ میلی‌گرم بر گرم، به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین محتوای کربوهیدرات کل را به همراه داشتند. بیش‌ترین (۳۱/۳ میکرومول بر گرم) و کم‌ترین (۱۴/۹ میکرومول بر گرم) محتوای آنتوسیانین نیز به‌ترتیب در محیط کشت‌های M2 و 1/2 MS مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با افزودن پودرموز و ذغال فعال به محیط‌های کشت ارزان M5 (۳۰۰۰۰۰ ریال و ۷/۱۵ دلار) و M6 (۴۴۰۰۰۰ ریال و ۱۰/۵۲ دلار) در مقایسه با محیط‌های کشت معمول ارکیده (1/2 MS و FAST) و کاهش هزینه‌های کشت درون شیشه‌ای به‌ترتیب به مقدار ۲۳ و ۱۲ درصد به‌عنوان محیط کشت‌های جامد کم‌هزینه مناسب جهت رشد و پرورش گیاهچه‌های ارکیده‌های فالانوپسیس انتخاب شدند که با توجه به منحنی قسم‌بندی زیست توده می‌توان محیط کشت M6 را به‌دلیل تولید گیاهان خوش‌فرم‌تر در مقایسه با همه محیط‌های کشت به‌عنوان محیطی ارزان و مناسب معرفی نمود.

استناد: محمدپور باروق، آیلار، دیانتی دیلمی، شیرین، فدوی، علی، علی‌نیائی‌فرد، ساسان (۱۴۰۱). معرفی محیط کشت جامد درون‌شیشه‌ای ارزان برای تولید گیاهچه‌های پرکیفیت ارکیده فالانوپسیس. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۲۹ (۲)، ۱۱۷-۱۰۱.
DOI: 10.22069/JOPP.2022.19083.2819

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

ارکیده فالانوپسیس یکی از محبوب‌ترین ارکیده‌های دارزی[1] و تک پا[2] موجود در جهان محسوب می‌شود. این گیاهان به‌دلیل تنوع در رنگ، شکل و اندازه گل، دوره ماندگاری و عمر گلجایی طولانی، از لحاظ تجاری اهمیت دارند و به‌عنوان گیاه گلدانی و گل شاخه بریده در سطح تجاری تولید می‌شوند (۱). مشکل امروزی گیاهان ارکیده آن است که قیمت مواد مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت رایج برای تکثیر و تولید نشاء درون‌شیشه‌ای این گیاهان به‌ویژه در صورتی که از شرکت‌های معتبر تهیه شوند، بسیار گران است که این موضوع سبب کاهش تولید انبوه گیاهان ارکیده در سطح تجاری و افزایش قیمت فروش این گیاهان گردیده است (۲). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که جایگزین کردن موادی ارزان‌قیمت و طبیعی به‌جای موادی که در افزایش هزینه‌های محیط کشت تأثیر بالایی دارند، به گونه‌ای که مواد جایگزین تأثیر نامطلوبی بر گیاه تحت کشت نداشته باشند، در کاهش هزینه‌های کشت مؤثر خواهند بود (۳). در حال حاضر با توجه به وارداتی بودن نمک‌های معدنی می‌توان آن‌ها را یکی از عوامل مؤثر در افزایش هزینه محیط‌های کشت در نظر گرفت که تغییر مقادیر و نوع آن‌ها می‌تواند در کاهش هزینه‌های کشت بسیار مؤثر باشد (۴). استفاده از محیط‌های کشت قدیمی‌تر مانند وسین و ونت[3] و یا نودسون[4] و محلول‌های کودی (ان‌پی‌کا[5]) در نسبت‌های مختلف، به‌دلیل دارا بودن میزان مواد مغذی کم‌تر، در کاهش هزینه‌های محیط کشت بسیار مؤثر بودند (۵). ارکیده‌ها از جمله گیاهانی هستند که برای رشد خود، علاوه بر ویتامین‌ها به یکسری مواد افزودنی مانند پپتون[6] (پروتئین گوشت) و یا کازئین[7] (پروتئین شیر)، نیاز دارند. بنابراین برای ساخت محیط‌های کشت گیاهان ارکیده، این مواد نیز به همراه ویتامین‌ها به کار برده می‌شوند. استفاده از مواد طبیعی مانند شیر نارگیل، آب گوجه‌فرنگی و یا پودر موز، در ترکیب با ویتامین‌ها یا به تنهایی، می‌توانند جایگزین مناسبی برای ویتامین‌ها و مواد افزودنی در کم‌هزینه‌سازی محیط‌های کشت باشند (۶). به‌عنوان مثال استفاده از ۱۰ درصد عصاره موز برای ارکیده فالانوپسیس، سبب باززایی پروتوکورم‌های شبه بدنی (پروتوکورم‌زایی) از کشت نوک شاخه شده است که می‌تواند به‌دلیل دارا بودن عوامل محرک رشد، پپتیدها، آمینواسیدها، آمیدها و ویتامین‌های موز باشد (۷). آب مقطر و انواع قندهای آزمایشگاهی، از دیگر عوامل تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت ارکیده هستند. استفاده از آب و شکر معمولی نیز تا حدودی می‌تواند در کاهش هزینه‌های کشت مؤثر واقع شود (۸).

در پژوهش حاضر از مواد طبیعی، ارزان قیمت و داخلی برای ساخت محیط‌های کشت استفاده شد. هدف یافتن محیط کشتی بود که علاوه بر کاهش هزینه‌های کشت برای تکثیر و تولید انبوه گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای فالانوپسیس در سطح تجاری، گیاهانی با کیفیت رشدی بالا ایجاد نماید تا در صورت عدم واردات مواد شیمیایی گران‌قیمت به کشور، بتوان از مواد تولید داخل برای تولید انبوه گیاهچه‌های ارکیده استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش از پروتوکورم‌های سه‌ماهه (پنج میلی‌متری) درون‌شیشه‌ای ارکیده فالانوپسیس رقم بیجینگ (*Phalaenopsis amabilis*‘Anthura’ Beijing) به‌عنوان ریزنمونه برای کشت استفاده شد. تیمارها شامل محیط کشت جامد 1/2 MS، FAST و شش نوع محیط کشت ارزان دست‌ساز با استفاده از مواد شیمیایی ارزان تولید داخل بود که این شش

1- Epiphyte
2- Monopodial
3- Vacin and Went (VW)
4- Knudson
5- NPK
6- Peptone
7- Casein

محیط ارزان تأمین‌کننده عناصر اصلی نیتروژن، پتاسیم و فسفر بودند و با شماره یک تا شش (M1 تا M6) نام‌گذاری شدند (جدول ۱). پس از آماده‌سازی محیط‌های کشت، افزودنی‌ها شامل پودر موز و ذغال فعال به محیط‌های کشت M3 تا M6 و در نهایت آگار به تمام محیط‌های کشت افزوده شد (جدول ۱) و همه محیط‌ها جهت سترون شدن به‌مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر، قرار گرفتند. یک هفته بعد از توزیع محیط‌ها در ظروف کشت، پروتوکورم‌های پنج میلی‌متری به‌عنوان ریزنمونه روی هشت تیمار محیط کشت قرار داده شدند و پس از آن ظروف به شرایط رشدی کنترل شده داخل اتاقک کشت با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، طول مدت روشنایی ۱۶ ساعت و هشت ساعت تاریکی و تحت نور سفید لامپ‌های فلئوروسنت دارای طیف ۷۰۰–۴۰۰ نانومتر و با شدت نور ۲۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه منتقل و به‌مدت سه ماه نگهداری شدند.

جدول ۱- مقادیر و نوع عناصر شیمیایی مصرفی برای ساخت محیط‌های کشت جامد بر حسب میلی‌گرم بر لیتر.

Table 1. Amounts and type of chemical elements used for make solid culture media in milligrams per liter.

تیمار Treat								مقادیر یونی Ionic values
M6	M5	M4	M3	M2	M1	FAST	MS	
666	666	14.791	666	14.791	666	160	1650	NH_4^+
						320	3550	NO_3^-
666	666	14.791	666	14.791	666	240.01	2070.83	K^+
-	-	-	-	-	-	80	370	Mg^{2+}
1.13	30.925	-	-	-	-	81.13	400.925	SO_4^{2-}
666	666	14.791	666	14.791	666	80	170	$H_2PO_4^-$
–	-	-	-	-	-	80	439	Ca^{2+}
0.03	0.05	-	-	-	-	160.03	878.05	Cl^-
1	6.2	0.10565	-	0.10565	-	1	6.2	BO_3^{3-}
0.1	22.3	0.02113	-	0.02113	-	0.1	22.3	Mn^{2+}
1	8.6	0.02113	-	0.02113	-	1	8.6	Zn^{2+}
16	37.5	-	-	-	-	16	37.5	Na^+
-	0.25	-	-	-	-	-	0.25	MoO_4^{2-}
0.03	0.025	0.02113	-	0.02113	-	0.03	0.025	Cu^{2+}
-	0.025	-	-	-	-	-	0.025	Co^{2+}
0.03	-	-	-	-	-	0.03	-	Ni^+
0.01	0.83	-	-	-	-	0.01	0.83	I^-
16	37	0.10565	-	0.10565	-	16	37	Fe^{2+}
-	-	-	-	-	-	2000	2000	پپتون Peptone
14240	14240	14240	14240	-	-	-	-	پودر موز Banana powder
1000	1000	1000	1000	–	–	–	–	ذغال فعال Active charcoal
12000	30000	30000	30000	30000	30000	12000	30000	ساکارز Sucrose
5000	-	-	-	-	-	5000	-	فروکتوز Fructose
4800	4800	4800	4800	4800	4800	4800	4800	آگار Agar

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار دارای پنج عدد ریزنمونه پروتوکورم (به وزن ۰/۱ گرم) به‌عنوان واحد آزمایش، انجام شد. نمونه‌ها هر ۳۰ روز یکبار واکشت شدند و وزن تر کل و طول ریشه آن‌ها ثبت گردید (شکل ۳ و شکل ۴- الف). هم‌چنین سه ماه پس از کشت، صفات فیزیولوژیک شامل وزن تر و خشک کل، وزن خشک برگ و ریشه و طول ریشه، صفات زیست- شیمیایی از جمله غلظت کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین و کربوهیدرات محلول، ذخیره‌ای و کل و حداکثر کارایی کوآنتومی سامانه نوری دو[1]، مورد بررسی قرار گرفت.

وزن تر و خشک به گرم و با استفاده از ترازو آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد و خشک کردن نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه خشک‌کن[2] به‌مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. طول ریشه نیز به‌وسیله خط‌کش اندازه‌گیری شد. محاسبه قسم‌بندی زیست‌توده نمونه‌ها، با خشک کردن برگ و ریشه گیاهچه‌ها در دستگاه خشک‌کن، توزین آن‌ها و سپس مقایسه وزن خشک برگ و ریشه با رسم منحنی، صورت گرفت.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل به روش آرنون و همکاران با استفاده از ۰/۰۵ گرم از بافت تازه برگ گیاهچه‌ها انجام شد (۹). به این صورت که مقدار حاصل با ازت مایع در هاون چینی پودر و با دو میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد. غلظت کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئید به‌ترتیب با جذب نوری در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر[3] بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ و با استفاده از روابط یک تا چهار اندازه‌گیری شد که V و W به‌ترتیب نشان‌دهنده حجم و وزن نمونه‌ها بر حسب میلی‌لیتر و میلی‌گرم هستند (۱۰).

$$Chlorophyll\ a = \frac{(12/7\ A_{663} - 2/69\ A_{645}) \times V}{(1000 \times W)} \quad (۱)$$

$$Chlorophyll\ b = \frac{(22/9\ A_{645} - 4/68\ A_{663}) \times V}{(1000 \times W)} \quad (۲)$$

$$Chlorophyll\ a+b = Chlorophyll\ a + Chlorophyll\ b \quad (۳)$$

$$Carotenoids = A_{480} + [(0/114\ A_{663}) - (0/638\ A_{645})] \quad (۴)$$

آنتوسیانین به روش وگنر و با استفاده از ۰/۱ گرم بافت تازه برگ گیاهچه‌ها استخراج شد (۱۱). جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر، از رابطه پنج، تعیین شد. در این رابطه A نشان‌دهنده میزان جذب، ε نشان‌دهنده ضریب خاموشی (۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول)، b نشان‌دهنده عرض کوت و c نشان‌دهنده غلظت محلول بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تازه برگ، هستند.

1- Maximum Quantum Yield of photosystem II (QY- Max)
2- Oven
3- Spectrophotometer

$$A = \varepsilon bc \quad (۵)$$

ارزیابی غلظت کربوهیدرات محلول به روش مک کردی و همکاران (۱۲)، با استفاده از ۰/۱ گرم بافت خشک برگ و ریشه گیاهچه‌ها انجام شد. سپس جذب نوری آن در طول موج ۶۲۵ نانومتر ثبت و از منحنی استاندارد گلوکز استفاده شد. هم‌چنین برای اندازه‌گیری غلظت کربوهیدرات ذخیره‌ای، از رسوبات باقی‌مانده اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول استفاده شد و جذب نوری آن در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز ثبت گردید (۱۳).

جهت اندازه‌گیری حداکثر کارایی سامانه نوری II، از تصویربرداری فلورسنس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلورکم[1]، استفاده شد. به این صورت که ابتدا ریزنمونه‌های داخل ظروف کشت به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. پس از سازگاری در تاریکی، ریزنمونه‌ها بلافاصله جهت اندازه‌گیری حداکثر کارایی کوآنتومی، به زیر دستگاه منتقل شدند. تصویربرداری در تاریکی با استفاده از فلش‌های کوتاه انجام شد (۱۴). پس از رسیدن به حالت پایدار فلورسنس، دو گروه میانگین داده‌های تجزیه شده بر صفحه رایانه نمایان شدند. گروه اول مربوط به اندازه‌گیری‌های تحت‌تأثیر فلش‌های کوتاه در تاریکی است که با F_0 مشخص می‌شود و گروه دوم اندازه‌گیری فلورسنس کلروفیل حاصل شده از نور اشباع است که با F_m نشان داده می‌شود. با استفاده از این دو داده، میزان F_v و حداکثر کارایی سامانه نوری دو طبق روابط هفت و هشت محاسبه شد که میانگین داده‌های F_0 و F_m و انحراف معیار QY، به‌وسیله نرم‌افزار فلورکم نسخه هفت محاسبه شد (۱۵).

$$F_v = F_m - F_0 \quad (۷)$$

$$QY_{Max} = F_v F_m^{-1} = (F_m - F_0)F_m^{-1} \quad (۸)$$

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات، به‌وسیله نرم‌افزار آماری SAS 9.0، مورد تجزیه قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست آمده از تجزیه آماری داده‌ها نشانگر معنی‌دار بودن تفاوت بین محیط‌های کشت مختلف در تمامی صفات در سطح احتمال یک درصد بود. مقایسه میانگین داده‌ها در صفات مورد بررسی به‌شرح زیر است.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: بیش‌ترین محتوای کلروفیل و کاروتنوئید برگ ارکیده فالانوپسیس در محیط کشت‌های 1/2 MS (شاهد) (۱/۲۳ و ۰/۹۲ میلی‌گرم بر گرم)، FAST (۱/۲۵ و ۰/۹۴ میلی‌گرم بر گرم) و محیط کشت‌های ارزان M5 (۱/۲۱ و ۰/۸۸ میلی‌گرم بر گرم) و M6 (۱/۲۳ و ۰/۹۲ میلی‌گرم بر گرم) و کمترین آن‌ها در محیط کشت‌های ارزان M2 و M4 (به‌ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر گرم) بود (شکل ۱- الف تا ت). به‌نظر می‌رسد وجود عناصر ریزمغذی به‌ویژه آهن سبب افزایش شاخص‌های کلروفیل و کاروتنوئید در محیط‌های شاهد، FAST، M5 و M6 شده است. وجود آهن به‌دلیل کنترل

1- Handy FluorCam FC 1000- H (photon system instruments, PSI, Czech republic)

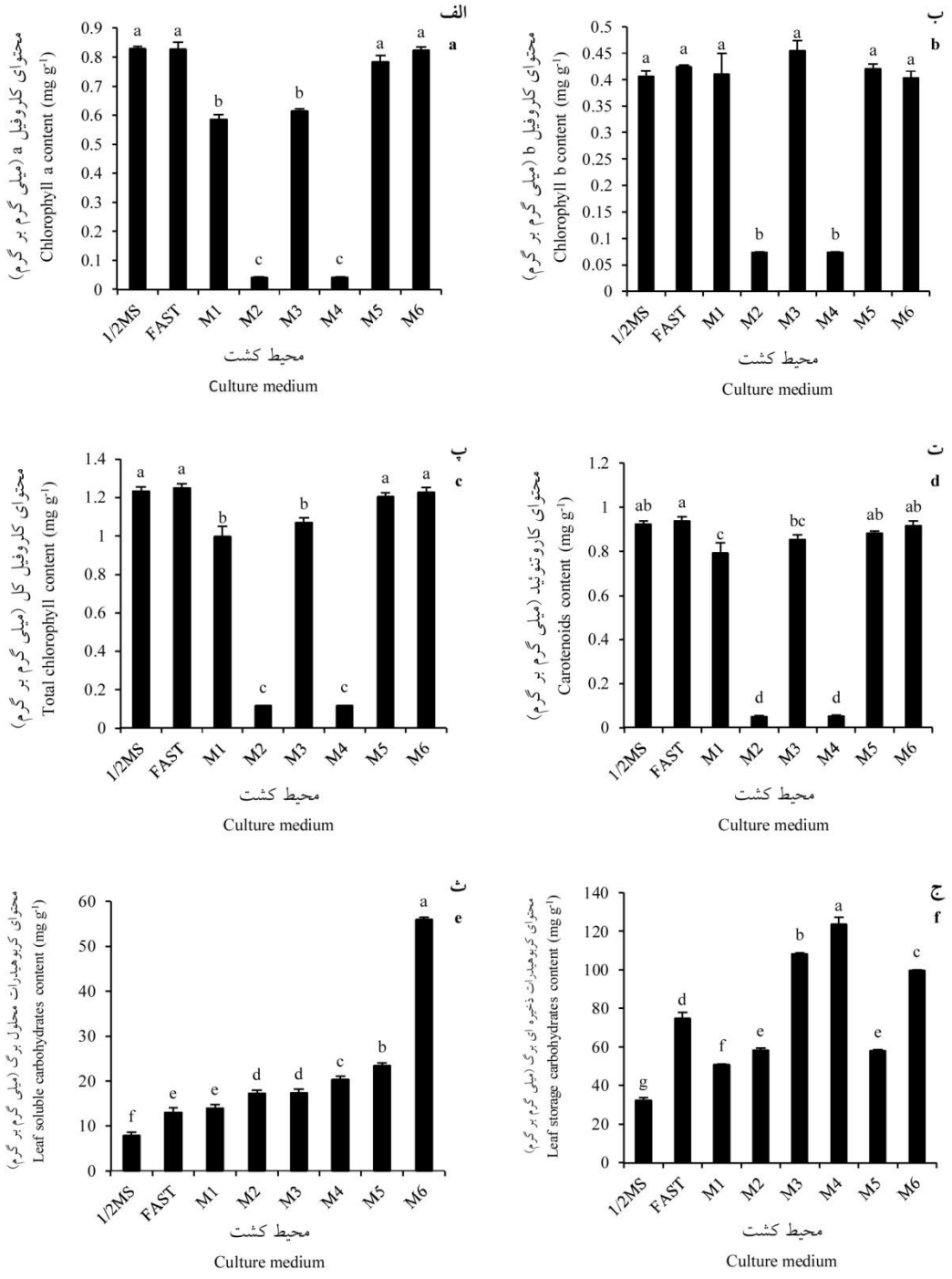
تشکیل گاما-آمینولوولنیک‌اسید[1] پیش‌ساز بیوسنتز کلروفیل و نیز یون پروتوپورفیرین[2] منیزیم آهن برای تشکیل پروتوکلروفیلید[3] در مسیر سنتز کلروفیل، ضروری است (۱۶). هم‌چنین در این تیمارها، ویتامین پیرودوکسین به‌عنوان عامل مؤثر در سنتز کلروفیل و کاروتنوئید نیز وجود داشته است (۱۷). در محیط‌های M2 و M4، عدم وجود بسیاری از عناصر ریزمغذی و ویتامین‌ها، سبب تنش در گیاه، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی، تخریب پیش‌ماده‌های سنتز کلروفیل، ممانعت از بیوسنتز کلروفیل‌های جدید، فعال شدن آنزیم‌های تجزیه‌کننده کلروفیل و تبدیل کاروتنوئیدها به سایر رنگدانه‌ها از جمله زآگزانتین و آنتوسیانین شده است که در نهایت محتوای کلروفیل و کاروتنوئید کاهش یافت (۱۸).

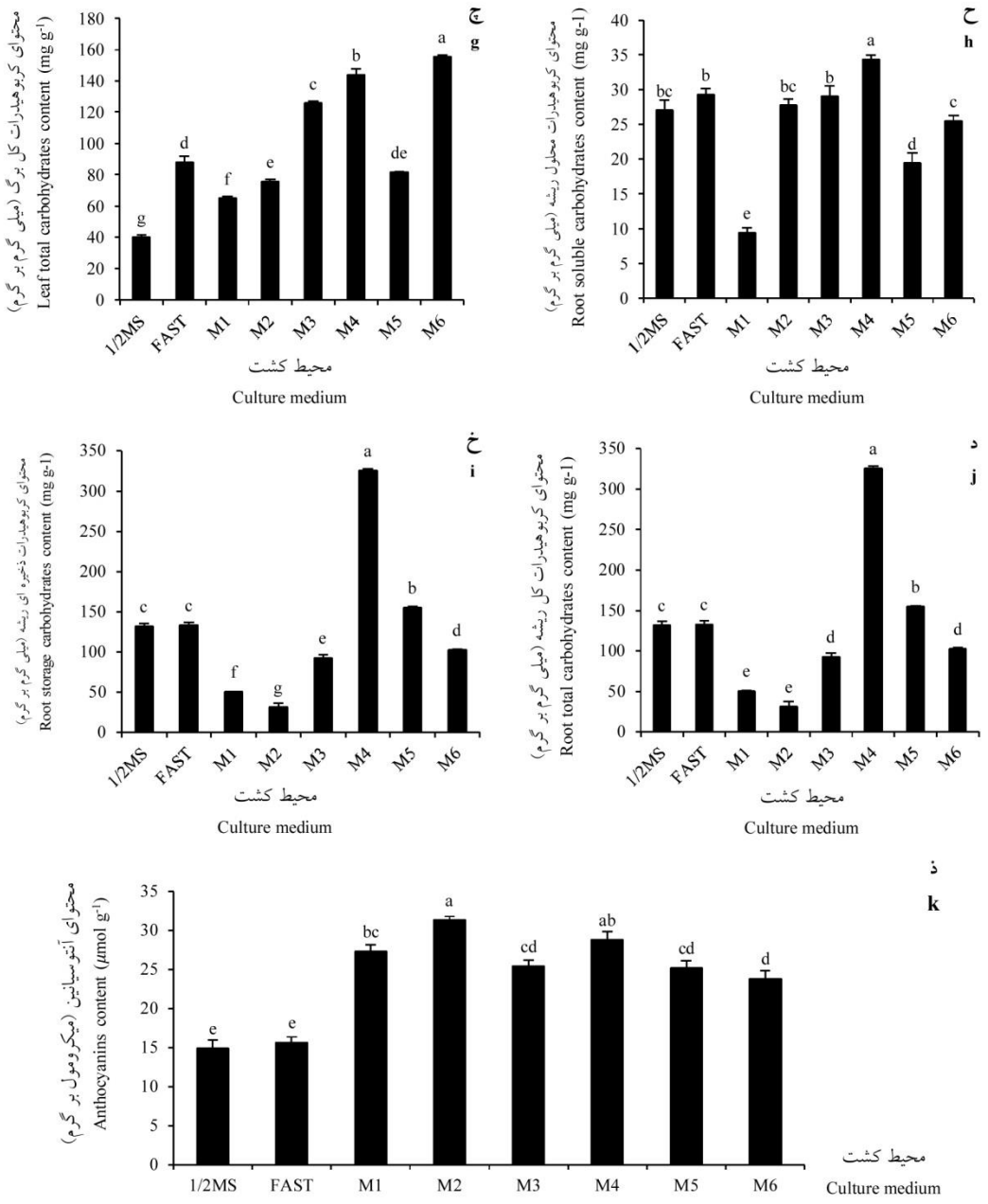
محتوای کربوهیدرات: محتوای کربوهیدرات کل برگ در محیط کشت ارزان M6 (۱۵۵/۶۸ میلی‌گرم بر گرم) بیش‌تر و در شاهد (۴۰/۲۲ میلی‌گرم بر گرم) نسبت به دیگر تیمارها کم‌تر بود (شکل ۱- ث تا چ). در این آزمایش تمامی محیط‌های کشت دارای قند ساکارز بودند و به محیط کشت‌های ارزان M3 تا M6 علاوه بر قند ساکارز، پودر موز جهت بهبود فرآیندهای رشدی گیاه، افزوده شده بود (جدول ۱). به‌همین دلیل محتوای کربوهیدرات کل برگ در تیمارهای دارای پودر موز، از دیگر تیمارها بیش‌تر بود. در M6 به‌دلیل استفاده از قندهای آزمایشگاهی ساکارز و فروکتوز و هم‌چنین پودر موز، محتوای کربوهیدرات کل نسبت به دیگر تیمارها بیش‌تر بود. گیاه قادر به استفاده از این مقدار بالای قند نیست، بنابراین مقداری از آن را به شکل کربوهیدرات محلول مصرف و مازاد آن را ذخیره می‌کند که سبب افزایش مقدار کربوهیدرات ذخیره‌ای در محیط کشت M6 شده است. در محیط کشت‌های M3 و M4، وجود تنش به‌دلیل کمبود عناصر ریزمغذی و ویتامین‌ها، باعث شده است که گیاه مقدار کم‌تری از قند مورد نیاز خود را مصرف و مقدار بالایی از آن را ذخیره کند. در شرایط تنش‌زا، گیاهان میزان کربوهیدرات خود را با کاهش سرعت انتقال مواد، توقف رشد و افزایش میزان سنتز ساکارز به‌دلیل فعال‌سازی آنزیم ساکارز فسفات سنتاز[4]، افزایش می‌دهند تا با تبدیل کردن آن‌ها به عوامل دفاعی، خود را در برابر شرایط تنش‌زا، مقاوم کنند (۱۶). محیط کشت‌های M1 و M2 نیز تحت تنش‌اند ولی عدم وجود پودر موز و نیز ذخیره میزان کم‌تری کربوهیدرات، باعث شد تا محتوای کربوهیدرات کل برگ آن‌ها پایین باشد. میزان کربوهیدرات کل برگ محیط FAST به‌دلیل وجود قندهای ساکارز و فروکتوز نسبت به دیگر محیط‌های فاقد قند میوه، بیش‌تر بود.

محتوای آنتوسیانین: محتوای آنتوسیانین برگ در محیط کشت‌های ارزان M2 (۲۷/۳ میکرومول بر گرم) و M4 (۲۸/۷۹ میکرومول بر گرم) بیش‌تر و در شاهد (۱۴/۸۷ میکرومول بر گرم) و FAST (۱۵/۶۶ میکرومول بر گرم) از دیگر تیمارها کم‌تر بود (شکل ۱- ح). گزارش شده است که در شرایط تنش‌زا گیاهان مقاوم به تنش جهت تقویت سیستم دفاعی خود، میزان کربوهیدرات موجود در خود را برای تولید عوامل دفاعی مانند رنگیزه‌های آنتوسیانین، افزایش می‌دهند. زیرا از نقش‌های اصلی آنتوسیانین‌ها می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی و محافظت از سامانه فتوسنتزی در برابر عوامل تنش‌زا اشاره نمود (۱۶). بنابراین به‌نظر می‌رسد در محیط‌های M2 و M4، به‌دلیل وجود تنش مقدار بیش‌تری از کربوهیدرات مورد نیاز گیاه ذخیره و مقداری کم‌تری از آن مصرف

1- δ-Aminolevulinic acid
2- Protoporphyrin
3- Protochlorophyllide
4- Sucrose-phosphate synthase

شده است و گیاه ارکیده با توجه به میزان تنش ایجاد شده، مقداری از کربوهیدرات تجمع یافته را صرف تولید آنتوسیانین کرده است. در محیط کشت‌های شاهد، FAST، M6 و M5 وجود ریزمغذی‌هایی مانند آهن، روی و منگنز که در ساختمان بسیاری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شرکت دارند، به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سبب تولید آنتوسیانین شده است (۷، ۱۹، ۲۰ و ۲۱).





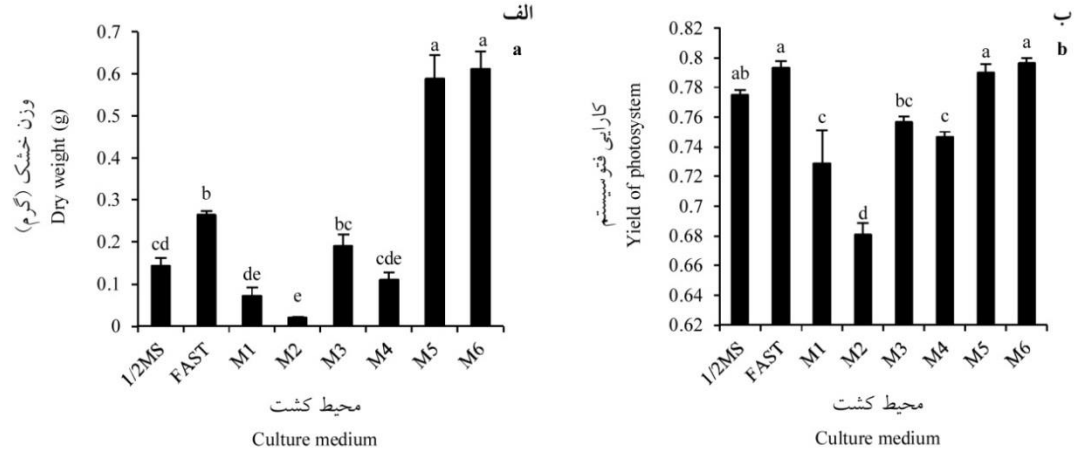
شکل ۱- بررسی صفات زیست- شیمیایی ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط کشت‌های جامد 1/2 MS، FAST، M1، M2، M3، M4، M5، M6 سه ماه پس از کشت.

Fig. 1. Investigation for biochemical traits of explants grown in 1/2 MS, FAST, M1, M2, M3, M4, M5, M6 solid culture media three months after cultivation.

حداکثر کارایی فتوسیستم II: بیش‌ترین کارایی فتوسیستم II در محیط کشت‌های M6 (۰/۸۰)، FAST (۰/۷۹)، M5 (۰/۷۹) و شاهد (۰/۷۸) و کم‌ترین آن در M2 (۰/۶۸)، M1 (۰/۷۳) و M4 (۰/۷۵) اتفاق افتاده است (شکل ۲- الف). آهن اتم مرکزی ساختار سیتوکروم[1] و مس اتم مرکزی ساختار پلاستوسیانین[2] است که بین فتوسیستم I و II زنجیره انتقال الکترون قرار دارند. هم‌چنین منیزیم نیز اتم مرکزی ساختار کلروفیل‌های a و b بوده که این رنگیزه‌ها در جذب نور و برانگیخته شدن الکترون‌ها در مراکز واکنش فتوسیستم‌ها نقش دارند (۲۲ و ۲۳). بنابراین وجود این عناصر در محیط‌های M6، M5، FAST و شاهد سبب بهبود فرآیند انتقال الکترون و افزایش فعالیت فتوسیستم‌ها شده است. علی‌رغم آن‌که فتوسیستم II تا حد زیادی نسبت به تنش مقاوم است، ولی با توجه به نتایج به‌دست آمده از محلول‌پاشی عناصر کم‌مصرف در شرایط تنش خشکی که سبب افزایش عملکرد کوآنتومی گیاه آفتابگردان[3] شد (۲۴)، تنش و کمبود عناصر ریزمغذی به‌ویژه آهن در محیط‌های M1، M2 و M4، مانع از انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون و در نهایت کاهش کارایی آن شد.

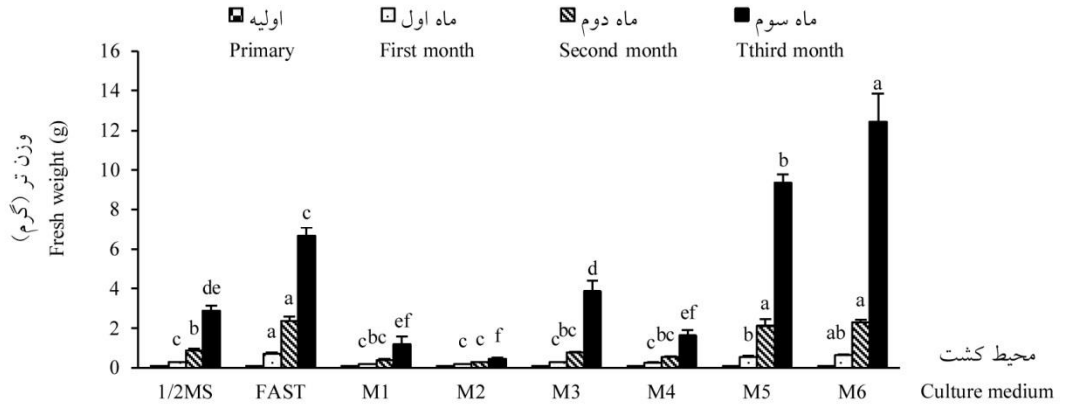
وزن تر و خشک کل: وزن تر و خشک کل به‌ترتیب در محیط کشت‌های M6 (۱۲/۴۵ و ۰/۶۱ گرم)، M5 (۹/۳۵ و ۰/۵۹ گرم)، FAST (۶/۶۹ و ۰/۲۷ گرم) و شاهد (۲/۹ و ۰/۱۴ گرم) نسبت به دیگر تیمارها بیش‌تر بود (شکل ۲- ب، شکل ۳ و شکل ۵). در این محیط‌های کشت جذب مواد غذایی مورد نیاز گیاه به‌میزان کافی، سبب افزایش رشد بخش‌های رویشی گیاه و درنهایت وزن تر و کل ریزنمونه‌ها شد. در محیط کشت‌های M6 و M5 وجود نیتروژن و فسفر به میزان بالا، پودر موز (محرک رشد) و ذغال فعال به‌دلیل جذب ترکیبات فنلی و خنثی کردن اثرات منفی احتمالی پودر موز، سبب شد تا وزن تر و خشک در این محیط‌های کشت نسبت به شاهد و FAST که فاقد این مواد بودند، بیش‌تر باشد. هم‌چنین میزان بالای این صفات در محیط ارزان M6 نسبت به M5 به‌دلیل وجود قندهای ساکارز و فروکتوز به همراه قند میوه است. وزن تر و خشک در محیط کشت‌های ارزان M2 (۰/۴۶ و ۰/۰۲ گرم)، M1 (۱/۲ و ۰/۰۷ گرم) و M4 (۱/۶۴ و ۰/۱۱ گرم) به‌دلیل تنش ناشی از کمبود مواد غذایی کاهش یافته است. گزارش شده است که گیاه برای مقابله در برابر عوامل تنش‌زا، میزان کربوهیدرات خود را افزایش می‌دهد که این موضوع سبب تجمع کربوهیدرات در گیاه و به‌دنبال آن خروج آب و یکسری عناصر کم‌مصرف به‌دلیل اختلاف فشار اسمزی ایجاد شده از گیاه می‌شود (۱۶). در این پژوهش منحنی تغییرات وزن تر کل از زمان کشت پروتوکورم‌ها تا سه ماه بعد از کشت صعودی بود (شکل ۳). نتایج پژوهش مشایخی و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که با نزدیک شدن به مراحل پایانی برداشت، سطح برگ میوه شلیل رقم رد گلد افزایش و به‌دنبال آن وزن تر و خشک برگ افزایش می‌یابد (۲۵).

1- Cytochrome b6f (cytb6f)
2- Plastocyanin
3- *Helianthus annus* L.



شکل ۲- بررسی صفات فتوسنتزی و فیزیولوژیک ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط کشت‌های جامد 1/2 MS، FAST، M1، M2، M3، M4، M5، M6 سه ماه پس از کشت.

Fig. 2. Investigation for photosynthetic and morphological traits of explants grown in 1/2 MS, FAST, M1, M2, M3, M4, M5, M6 solid culture media three months after cultivation.



شکل ۳- بررسی روند تغییرات وزن تر کل ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط کشت‌های جامد 1/2 MS، FAST، M1، M2، M3، M4، M5، M6 طی سه ماه.

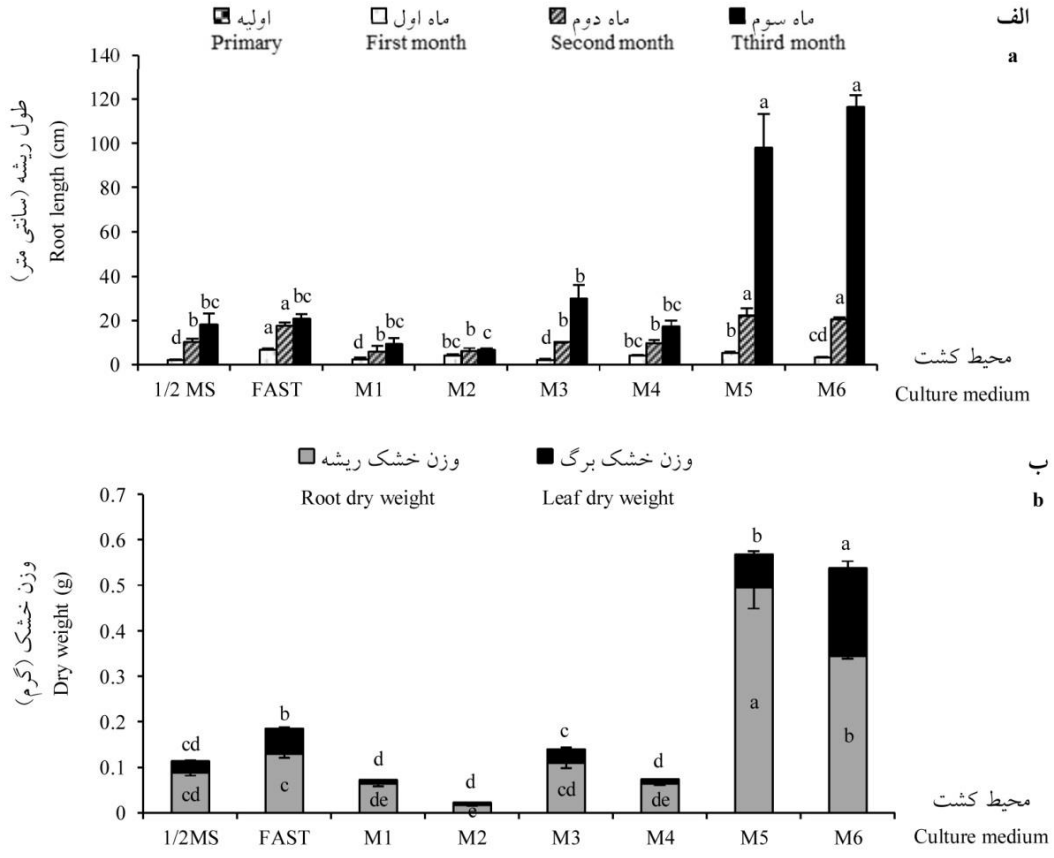
Fig. 3. Investigation of changing procedure in total fresh weight of explants grown in 1/2 MS, FAST, M1, M2, M3, M4, M5, M6 solid culture media, during three months.

توزیع زیست‌توده[1]: بیش‌ترین مقدار زیست‌توده به‌ترتیب در محیط کشت‌های ارزان M5 و M6 با اختلاف معنی‌دار نسبت به هم و هم‌چنین سایر تیمارها مشاهده شد و در محیط‌های M2، M1 و M4 کم‌ترین مقدار را داشت (شکل ۴- ب). بررسی قسم‌بندی زیست‌توده گیاهچه‌های ارکیده فالانوپسیس که متشکل از وزن خشک برگ و ریشه هستند، نشان داد که نسبت وزن خشک ریشه به برگ بیش‌تر است. زیرا با توجه به رابطه بین منبع و مخزن[2]، در گیاهچه‌های ارکیده ریشه‌ها نسبت به برگ‌ها به‌دلیل بیش‌تر بودن وزن آن‌ها (شکل ۴- ب) مخزن قوی‌تری بوده و بسیاری از کربوهیدرات تولید شده در برگ‌ها را به سمت خود جذب کرده‌اند. به همین دلیل محتوای کربوهیدرات ریشه‌ها نسبت به برگ‌ها بیش‌تر

1- Biomass partitioning

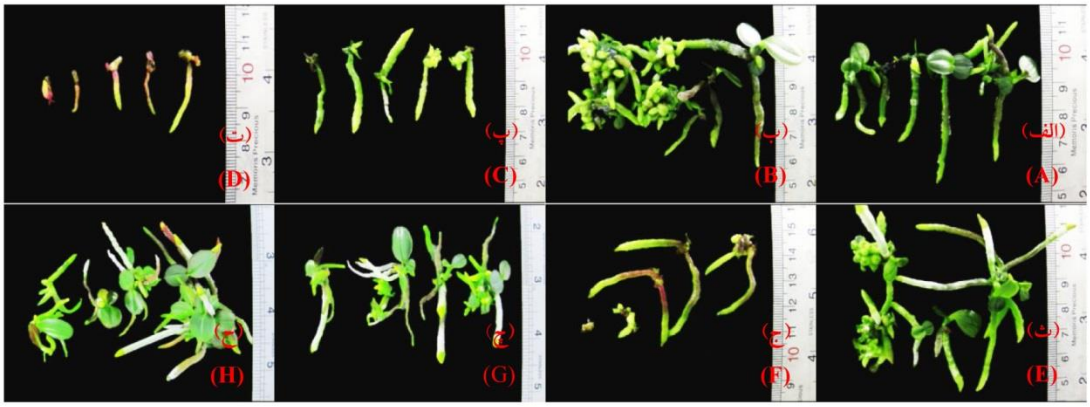
2- Source and sink relationship

بوده است (شکل ۱- ح تا د) و در نهایت ریشه میزان بیش‌تری از زیست‌توده گیاه را به خود اختصاص داده است (۲۶). بیش‌تر بودن وزن خشک ریشه در محیط‌های ارزان M5 و M6، باعث شد تا در مجموع مقدار کل زیست‌توده آن‌ها نسبت به دیگر تیمارها بالاتر باشد (شکل ۴- ب). کمبود مواد غذایی به میزان کم در محیط‌های کشت، می‌تواند باعث افزایش طول ریشه در بعضی از گیاهان ارکیده شود، زیرا به‌منظور جذب مواد غذایی مورد نیاز خود، طول ریشه را گسترش می‌دهند (۵). به همین دلیل طول ریشه در محیط کشت‌های ارزان M6 و M5 که تحت کمبود یکسری عناصر درشت‌مغذی هستند، نسبت به شاهد و FAST بیش‌تر بود (شکل ۴- الف). در محیط‌های ارزان M2، M1 و M4، وجود تنش ناشی از کمبود مواد غذایی سبب کاهش طول و وزن خشک ریشه و در نهایت کاهش زیست‌توده ریزنمونه‌ها شد (شکل ۴).



شکل ۴- بررسی روند تغییرات طول ریشه و قسم‌بندی زیست‌توده ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط کشت‌های جامد 1/2 MS، FAST، M1، M2، M3، M4، M5، M6.

Fig. 4. Investigation of changing procedure in root length and biomass partitioning of explants grown in 1/2 MS, FAST, M1, M2, M3, M4, M5, M6 solid culture media.



شکل ۵- رشد ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت‌های جامد 1/2 MS (الف)، FAST (ب)، M1 (پ)، M2 (ت)، M3 (ث)، M4 (ج)، M5 (چ) و M6 (ح)، سه ماه پس از کشت.

Fig. 5. Growth of explants cultivated in solid culture media 1/2 MS (A), FAST (B), M1 (C), M2 (D), M3 (E), M4 (F), M5 (G) and M6 (H).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده نشان داد که در محیط‌های ارزان M1 تا M4 که فقط دارای مواد درشت‌مغذی بودند، تنش ناشی از کمبود مواد غذایی ریزمغذی و ویتامین‌ها سبب کاهش وزن تر و خشک کل، توزیع زیست‌توده، رنگیزه‌های فتوسنتزی و حداکثر کارایی فتوسیستم II و افزایش میزان آنتوسیانین می‌گردد و در مجموع نمودار قسم‌بندی زیست توده نیز کارایی پایین‌تر آن‌ها نسبت به محیط‌های معمول کشت ارکیده (شاهد و FAST) را نشان داد. افزودن عناصر ریزمغذی، ویتامین‌ها، پودر موز و ذغال فعال در محیط‌های ارزان M5 و M6 باعث شد تا میزان این صفات و محتوای کربوهیدات کل افزایش و مقدار تولید موادی مانند آنتوسیانین که در شرایط کمبود و تنش در گیاه تشکیل می‌شوند، کاهش یابد. با توجه به بهتر بودن صفات اندازه‌گیری شده و کاهش هزینه‌های کشت درون‌شیشه‌ای ارکیده در محیط‌های M5 و M6، می‌توان این تیمارها را به‌عنوان محیط کشت‌های جامد کم‌هزینه مناسب جهت رشد ارکیده‌های فالانوپسیس در نظر گرفت. البته با توجه به منحنی قسم‌بندی زیست توده می‌توان محیط ارزان M6 را به‌دلیل ایجاد تعادل مناسب بین برگ و ریشه و هم‌چنین رشد مناسب و خوش‌فرم‌تر گیاهچه‌ها به‌عنوان مناسب‌ترین محیط کشت معرفی نمود.

منابع

1.Gnasekaran, P., Rathinam, X., Sinniah, U.R. and Subramaniam, S. 2010. A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBs) growth of *Phalaenopsis violacea* orchid. J. Phytol. 2: 1. 29-33.

2.Pereira, N.S., Ferreira, B.R.R., de Carvalho, E.M. and Damiani, C.R. 2018. Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the *in vitro* cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). J. Appl. Phycol. 30: 4. 2347-2358.

3.Daud, N., Taha, R.M., Noor, N.N.M. and Alimon, H. 2011. Potential of alternative gelling agents in media for the *in vitro* micro-propagation of *Celosia sp*. Int. J. Bot. 7: 2. 183-188.

4.Swamy, M.K., Mohanty, S.K. and Anuradha, M. 2014. The effect of plant

growth regulators and natural supplements on *in vitro* propagation of *Pogostemon cablin* Benth. J. Crop Sci. Biotechnol. 17: 2. 71-78.
5. do Valle Rego-Oliveira, L. and de Faria, R.T. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. Acta Sci. Agron. 27: 1. 1-4.
6. Pathak, P., Piri, H., Vij, S., Mahant, K. and Chauhan, S. 2011. *In vitro* propagation and mass scale multiplication of a critically endangered epiphytic orchid, *Gastrochilus calceolaris* (Buch.-Ham ex JE Sm.) D. Don. using immature seeds. Indian J. Exp. Biol. 49: 9. 711-716.
7. Akter, S., Nasiruddin, K. and Khaldun, A. 2007. Organogenesis of *Dendrobium* orchid using traditional media and organic extracts. J. Agric. Rural Dev. pp. 30-35.
8. Saraswathi, M.S., Uma, S., Kannan, G., Selvasumathi, M., Mustaffa, M.M. and Backiyarani, S. 2016. Cost-effective tissue culture media for large-scale propagation of three commercial banana (*Musa* spp.) varieties. J. Hort. Sci. Biotechnol. 91: 1. 23-29.
9. Arnon, A. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agron. J. 23: 1. 112-121.
10. Favetta, V., Colombo, R.C., Júnior, J.F.M. and de Faria, R.T. 2017. Light sources and culture media in the *in vitro* growth of the Brazilian orchid *Microlaelia lundii*. Semin. Cienc. Agrar. 38: 4. 1775-1784.
11. Wagner, G.J. 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiol. 64: 1. 88-93.
12. McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H.S. 1950. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. Analytical Chem. 22: 9. 1156-1158.
13. Yemm, E. and Willis, A. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochem. J. 57: 3. 508-514.
14. Genty, B., Briantais, J.M. and Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimi. Biophys. Acta. Gen. Subj. 990: 1. 87-92.
15. Aliniaeifard, S., Malcolm Matamoros, P. and van Meeteren, U. 2014. Stomatal malfunctioning under low VPD conditions: Induced by alterations in stomatal morphology and leaf anatomy or in the ABA signaling? Physiol. Plant. 152: 4. 688-699.
16. Hashemi Fadaki, E., Fakheri, B., MahdiNezhad, N. and Mohammadpour Vashvaei, R. 2018. Effects of nano and nano bio-fertilizer on physiological, biochemical characteristics and yield of roselle (*Hibisicus sabdariffa* L.) under drought stress. Agric. Crops Prod. 20: 1. 45-66. (In Persian)
17. Hossain, M.M., Sharma, M. and Pathak, P. 2009. Cost effective protocol for *in vitro* mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.- a medicinally important orchid. Engi. Life Sci. 9: 6. 444-453.
18. Musapour Yahyaabadi, H., Asghari Pour, M. and Basiri, M. 2016. The role of chitosan in improving salinity resistance by affecting some morphological and physiological characteristics of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). J. Sci. Technol. Greenhouse Cult. 7: 25. 165-174. (In Persian)
19. Cakmak, I. 2000. Tansley review no. 111: Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. New Phytol. 146: 2. 185-205.
20. Fathi Amir Khiz, K., Amini Dehqi, M. and Heshmati, S. 2015. Investigation for the effect of iron chelate on chlorophyll content, quantum efficiency of photosystem II and some biochemical traits in safflower under low irrigation conditions. Iranian Crop Sci. 46: 1. 137-145. (In Persian)
21. Rengel, Z. 1995. Carbonic Anhydrase Activity in Leaves of Wheat Genotypes Differing in Zn Efficiency. J. Plant Physiol. 147: 2. 251-256.

22.Garstka, M., Venema, J.H., Rumak, I., Gieczewska, K., Rosiak, M., Koziol-Lipinska, J., Kierdaszuk, B., Vredenberg, W.J. and Mostowska, A. 2007. Contrasting effect of dark-chilling on chloroplast structure and arrangement of chlorophyll–protein complexes in pea and tomato: plants with a different susceptibility to non-freezing temperature. Planta. 226: 5. 1165.

23.Romanowska, E., Drożak, A., Pokorska, B., Shiell, B.J. and Michalski, W.P. 2006. Organization and activity of photosystems in the mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. J. Plant Physiol. 163: 6. 607-618.

24.Babaian, M., Heidary, M. and Ghanbari, A. 2020. Effect of drought stress and foliar application of micro elements on physiological characteristics and nutrient uptake in sunflower (*Helianthus annus* L.). Iranian Crop Sci. 12: 4. 377-391. (In Persian)

25.Mashayekhi, K., Sadeghi, H., Akbarpour, V., Atashi, S., Ghasemi, Y. and Mousavizadeh, J. 2014. Carbohydrate changes of Red Gold cultivar leaves and fruits during the growing season in Gorgan climatic conditions. Hort. Sci. 28: 1. 1-9. (In Persian)

26.Smith, M.R., Rao, I.M. and Merchant, A. 2018. Source-Sink Relationship in Crop Plants and Their Influence on Yield Development and Nutritional Quality. Front. Plant Sci. 9: 1889.