اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تکثیر درون‌شیشه‌ای ارکید کاتاستوم و القای برون‌شیشه‌ای پلی‌پلوییدی توسط کلشی‌سین در ارکید دندروبیوم

سیده سارا ذکی‌زاده[۱]، بهزاد کاویانی[۲*](نویسنده مسئول) و داود هاشم‌آبادی[۳]

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

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

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

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۹

Effect of plant growth regulators on *in vitro* proliferation of orchid *Catasetum* and *in vivo* induction of polyploidy in orchid *Dendrobium* by colchicine

Seyedeh Sara Zakizadeh[1], Behzad Kaviani [2*] (Corresponding author) and Davood Hashemabadi[3]

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

Received: June 2020 Accepted: February 2021

Abstract

Orchids are one of most popular ornamental flowers in all over the world and their production has been turned to great industry in global flower trade. In this study, the effect of growth regulators on micropropagation of *Catasetum* has been explored due to the numerous advantages of micropropagation in comparison to other production methods. Also, in order to achieve desirable and marketable characteristics in *Dendrobium*, polyploid induction by colchicine was used. In micropropagation, protocorms of orchid were cultured as an explant in MS media containing different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) (0.00, 0.10, 0.20 and 0.50 mg/l) and kinetin (Kin) (0.00, 0.20, 0.50, 1.00 and 2.00 mg/l). Results indicated that the maximum leaf number and root number were obtained in plantlets grown on medium enriched with 1 mg/l Kin together with 0.5 mg/l IBA. In *in vivo* induction of polyploidy, fully 5-months-old orchid plantlets were plunged in different concentrations of colchicine solution (0.00, 0.05, 0.1 and 0.15%) with Nonident P-40 (NP-40) as a surfactant for 3 days. Flow cytometery analysis revealed that tetraploid plantlets were produced through treatment with 0.15% colchicine. Investigation of cytological and morphological traits confirmed the presence of tetraploidy in plantlets treated with 0.15% colchicine.

Keywords: Micropropagation, Orchid, Phytohormones, Tetraploidy

چکیده

ارکیدها از پرفروش‌ترین گل‌های زینتی در جهان هستند که تولیدشان به صنعتی بزرگ در تجارت جهانی گل تبدیل شده است. به خاطر مزایای زیاد ریزازدیادی نسبت به سایر روش‌های تولید، در این تحقیق به بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد روی ریزازدیادی ارکید کاتاستوم (*Catasetum* sp.) پرداخته شد. همچنین به منظور رسیدن به صفات مطلوب و بازارپسند در ارکید دندروبیوم (*Dendrobium* sp.) از القای پلی‌پلوییدی توسط کلشی-سین استفاده گردید. در ریزازدیادی، پروتوکورم ارکید به عنوان ریزنمونه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ایندول-۳-بوتیریک‌اسید (IBA) (صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و کینیتین (Kin) (۰، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد برگ و تعداد ریشه در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط غنی شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. در القای برون‌شیشه‌ای پلی‌پلوییدی، گیاهچه‌های کامل ۵ ماهه‌ی دندروبیوم در بابل رآکتورهای پر شده با غلظت‌های مختلف محلول کلشی‌سین (صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد) به مدت سه روز همراه با (NP-40) Nonident P-40 به عنوان سورفاکتانت، غوطه‌ور شدند. آنالیز فلوسایتومتری آشکار کرد که گیاهچه‌های تتراپلوییدی با تیمار ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین تولید شدند. بررسی صفات سایتولوژیک و مورفولوژیک، حضور تتراپلوییدی را در گیاهچه‌های تیمار شده با ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین تایید کرد.

کلمات کلیدی: تتراپلوییدی، ثعلب، ریزازدیادی، هورمون‌های گیاهی

فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران

سال ۱۳۹۹، دوره ۱۵، شماره ٤، صص ۵۹-٤۹

مقدمه و کلیات

ارکیدها به عنوان گیاهان گلدانی و شاخه بریده با عمر ماندگاری بالا در سراسر جهان پرورش داده می‌شوند. خانواده‌ی ارکید (Orchidaceae) از راسته‌ی ژیناندرالس (Gynandrales) با بیش از ۸۰۰ جنس و بیش از ۲۵۰۰۰ گونه یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌ی گیاهان گلدار نهان‌دانه است. تکثیر ارکیدها به صورت جنسی (بذر) و غیرجنسی (اندام‌های رویشی) انجام می‌شود. بذرهای ارکید ریز و فاقد آندوسپرم هستند و بدون کمک قارچ‌ها در طبیعت نمی‌توانند جوانه بزنند. از طرفی گیاهان حاصل از تکثیر جنسی، هتروزیگوت هستند و تفرق صفات را نشان می‌دهند. بنابراین، ازدیاد آن اغلب با استفاده از فنون کشت بافت گیاهی انجام می‌شود. بذرهای ارکید در محیط‌های کشت به آسانی جوانه می‌زنند، اما چون حدود هفت سال طول می‌کشد که گل دهند و گیاهان حاصل هتروزیگوت هستند، معمولاً از اندام‌های رویشی به ویژه پروتوکورم و اجسام شبه‌پروتوکورم (PLBs) به عنوان ریزنمونه استفاده می‌شود (Luo *et al.*, 2009). سیتوکینین‌ها از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشدی هستند که رشد گیاه از طریق PLBs را بهبود می‌بخشند (Nayak *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2009). ریزازدیادی با استفاده از انواع ترکیبات اکسینی از جمله نفتالین استیک اسید (NAA)، IBA، و سیتوکینینی از جمله تیدیازورون (TDZ)، Kin، ٦-بنزیل آدنین (BA) و ٦-بنزیل آمینو پورین (BAP) در بسیاری از جنس‌های ارکید انجام شده است (Teixeira da Siva 2006; Roy *et al.*, 2011; Panwar *et al.*, 2012; Baker *et al.*, 2014; Kaviani *et al.*, 2017). با توجه به اهمیت اقتصادی پرورش ارکید در دنیا، استفاده از فناوری‌های جدید در اصلاح این گل در جهت بازارپسندی آن می‌تواند نقش به‌سزایی در بازاریابی این محصول و تجارت آن در بازارهای بین‌المللی داشته باشد. یکی از این روش‌های اصلاحی، القای پلی‌پلوییدی است. پلی‌پلوییدی، در واقع استعداد و توانایی سلول در تغییر چرخه‌ی طبیعی است که در نتیجه‌ی آن سنتز DNA، مستقل از چرخه‌ی معمولی میتوز رخ می‌دهد و سلول وارد تقسیم طبیعی نمی‌شود. این پدیده سبب توقف تقسیم سلول و افزایش سطح پلوییدی و دو یا چند برابر شدن ژن‌ها می‌گردد. تغییر سطح پلوییدی به صورت موفقیت‌آمیزی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان به منظور توسعه‌ی انواع نوترکیب و همچنین تولید ارقام برتر در بسیاری از گونه‌های گیاهان از جمله گیاهان زینتی استفاده شده است. گیاهان پلی‌پلویید نسبت به انواع دیپلویید اغلب فنوتیپ‌های جدیدی را نشان می‌دهند. از جمله‌ی این ویژگی‌ها می‌توان به رشد رویشی بیشتر، برگ‌های ضخیم‌تر و گل‌های بزرگ‌تر اشاره کرد. القای پلی‌پلوییدی عمدتا با استفاده از ترکیبات شیمیایی ضد میتوز مانند اوریزالین، کلشی‌سین، اکسید نیتروز، پودوفیلین، تری‌فلورالین و آمیپروفوس‌متیل انجام می‌شود. در ارکیدها، تیمار پلی‌پلوییدی اغلب روی بذر، پروتوکروم و PLBs اعمال می‌گردد. 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 غیر مستقیم نظیر

ویژگی‌های مورفولوژیکی (اندازه‌ی برگ، طول و قطر ساقه، اندازه‌ی گل، اندازه‌ی بذر و اندازه‌ی دانه‌ی گرده)، ویژگی‌های آناتومیکی (اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های نگهبان روزنه، تراکم سلول‌های روزنه در واحد سطح، تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه در اپیدرم برگ) و همچنین از روش‌های مستقیم (شمارش تعداد کروموزوم و فلوسایتومتری) استفاده می‌شود. استفاده‌ی موفقیت‌آمیز از کلشی‌سین و اوریزالین برای تبدیل اشکال دیپلوییید به تتراپلوییید 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، بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد IBA و Kin روی ریزازدیادی ارکید کاتاستوم و اثر کلشی‌سین روی القای پلی‌پلوییدی ارکید دندروبیوم بود.

فرآیند پژوهش

ریزازدیادی

منبع گیاهی و محیط کشت مورد استفاده: پروتوکورم‌های سالم و استریل شده‌ی ارکید کاتاستوم (*Catasetum* sp.) به عنوان ریزنمونه برای ریزازدیادی استفاده شدند. در این تحقیق، از محیط کشت جامد MS (Murashige and Skoog, 1962) استفاده شد.

تیمارهای آزمایش: به منظور ارزیابی اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی روی رشد و باززایی پروتوکورم، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA (صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. بنابراین، این تحقیق دارای ۲۰ تیمار بود. برای هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار سه ریزنمونه استفاده شد.

شرایط نگهداری ریزنمونه‌ها: پس از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، شیشه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲٤ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۸۰-۷۰ درصد و دوره‌ی نوری ۱٦ 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 یک بار اقدام به واکشت شد.

صفات اندازه‌گیری‌شده: پس از حدود ٦٠ روز، اثر تنظیم‌کننده‌های رشد روی تعداد برگ و تعداد ریشه ارزیابی شد.

پلی‌پلوییدی

مواد گیاهی: در این تحقیق از گیاهچه‌های کامل پنج‌ماهه‌ی ارکید دندروبیوم (*Dendrobium* sp.)، تولید شده از PBLs در شرایط درون‌شیشه‌ای، به عنوان ماده‌ی اولیه استفاده شد. این گیاهچه‌ها فاقد حداقل ریشه برای شروع آزمایش بودند، بنابراین در پرلیت کاشته شدند. چرخه‌ی ریشه‌زایی با تیمار خشکی همراه بود (یک هفته بستر کشت مرطوب، سه روز خشکی) و این مرحله دو ماه به طول انجامید.

القای پلی‌پلوییدی: گیاهچه‌های کامل ۷ ماهه داخل بابل‌راکتورهای ۵۰۰ سی‌سی قرار گرفتند و این

بابل‌راکتورها با میزان مورد نظر محلول کلشی‌سین پر شدند. گیاهچه‌ها برای هر غلظت و هر تکرار داخل آنها قرار گرفتند. به ازای هر بابل‌راکتور، محلول غذایی هوگلند نصف غلظت، کلشی‌سین (۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۱۵ درصد) برای ۷۲ ساعت و چند قطره NP-40 به عنوان سورفاکتانت 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 استریل شده با بخار ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد کاشته شدند (بارک‌ها بعد از استریل شدن تا دمای اتاق خنک شدند و بعد کاشت صورت گرفت). گلدان‌های استفاده شده سایز ۱۵ بودند و ۵ گیاهچه در هر گلدان کاشته شد. برای پیشگیری از عوامل قارچی از تیمار رورال‌تی‌اس استفاده شد.

اندازه‌گیری صفات: برای بررسی سطح پلوییدی و ژنوم گیاهان حاصل از تیمار پروتوکورم‌ها با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین از روش فلوسایتومتری استفاده شد. این فن با استفاده از سل آنالایز مدل فکسکالیبور انجام شد. رنگ مورد استفاده برای برای آشکارسازی DNA در دستگاه، PI بود. داده‌های دستگاه فلوسایتومتری (هیستوگرام) با نرم‌افزارهای آماری ویژه‌ای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررسی صفات مورفولوژیکی از طول برگ و برای بررسی صفات سایتولوژیکی از طول و عرض سلول‌های نگهبان روزنه استفاده شد. طول برگ از نوک برگ تا پایه‌ی برگ که در آن به پیاز کاذب وصل می‌شود، محاسبه شد. برای بررسی روزنه‌ها، یک لایه‌ی نازک از بافت اپیدرم پشت برگ و از سطح دور از محور برگ توسط چسب نواری جدا شد و توسط رنگ آبی تولوییدن روی لام‌ها به همراه یک قطره آب رنگ‌آمیزی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی (CRD) انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد و به دنبال آن از LSD برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف استفاده شد.

نتایج و بحث

ریزازدیادی: محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین محیط برای تحریک تولید برگ (۱۲/۷۰ عدد در هر ریزنمونه) بود (جدول ۱، شکل ۱). اختلاف تعداد برگ‌های تولید شده در این تیمار نسبت به تیمارهای دیگر قابل توجه بود. این تعداد حدود ۳ برابر تعداد برگ‌های تولید شده در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد (کنترل) بود. بنابراین، کمترین تعداد برگ (٤/۱۰ عدد در هر ریزنمونه) در محیط کشت کنترل تولید شد. نتایج پژوهش حاضر آشکار کرد که در تمام تیمارهای فاقد هورمون Kin کمترین تعداد برگ تولید گردید. نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که اثر Kin و IBA به تنهایی و در ترکیب با هم روی تعداد برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. ترکیب محیط کشت اثر معنی‌داری روی توسعه و رشد ریشه دارد. همه‌ی تیمارهای تنظیم‌کننده‌ی رشد به‌صورت تکی و در ترکیب با هم روی تعداد ریشه اثرات معنی‌داری ($p< ۰/۰۱$) داشتند. در میان همه‌ی تیمارها، ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین اثر

را روی تشکیل ریشه (۸/۱۰ عـدد در هـر ریزنمونـه) داشت (جدول ۱). تولید ریشه در این محیط با محیط حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گـرم در لیتر IBA تفاوت معنی‌داری نداشت. در بیشتر مـوارد، حداقل تعداد ریشه در محیط کشت بدون IBA ثبـت شـــد. در میـــان همـــه غلظـــت‌هـــای IBA و Kin استفاده شده بـه صـورت جداگانـه، بیشـترین تعـداد ریشه (۷ عـدد در هـر ریزنمونـه) در محـیط کشـت حاوی ۰/۵ میلی‌گـرم در لیتـر IBA بـه دسـت آمـد.

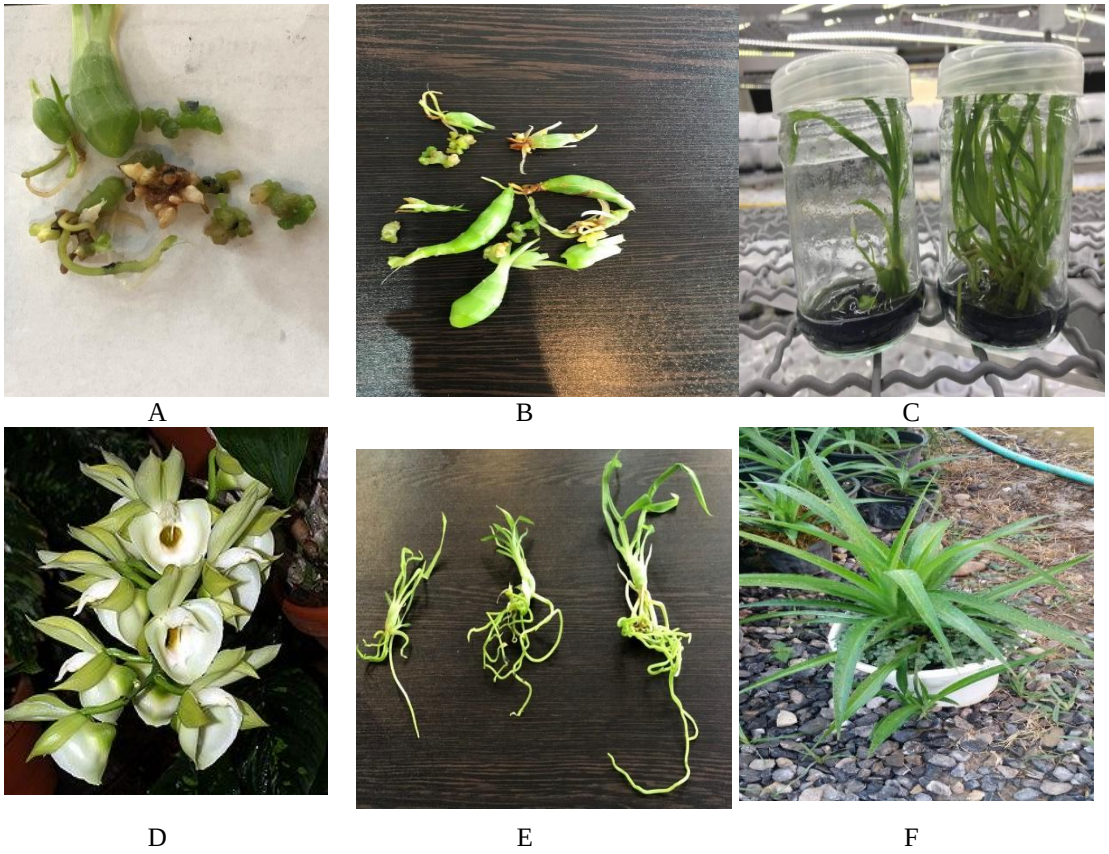
گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شرایط درون‌شیشه‌ای با موفقیت در گلخانه سازگار شدند. گلدان‌هـا بـا لیکـا، پیت ماس و پرلیـت (بـه نسـبت ۱: ۱: ۱) پـر شـدند (شکل ۱). سازگاری طی ٤ تا ٦ هفته و با رطوبت ۸۰ درصد به دست آمد و در این مرحله گیاهان ارتفـاعی حدود ۱۵-۱۰ سانتی‌متر داشتند (شکل ۱).

جدول ۱: مقایسه‌ی میانگین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی روی تعداد برگ و تعداد ریشه‌ی گیاه ارکید کاتاستوم (*Catasetum* sp.)

Table 1: Comparison of the average effect of different concentrations of plant growth regulators on the number of leaves and roots of orchid (*Catasetum* sp.)

Kin × IBA (میلی‌گرم بر لیتر)	تعداد برگ	تعداد ریشه
۰ × ۰	f-h٤/۱۰	d-g٤/۲۰
۰ × ۰/۱	h٤/۵۰	k-n٤/۱۰
۰ × ۰/۲	gh٤/٦۰	e-j٤/۹۰
۰ × ۰/۵	gh٤/۷۰	av/۰۰
۰/۲ × ۰	e-ho/٤۰	g-n٤/٦۰
۰/۲ × ۰/۱	d-ho/٦۰	h-n٤/٤۰
۰/۲ × ۰/۲	d-ho/۵۰	f-l٤/۸۰
۰/۲ × ۰/۵	c-ho/۷۰	av/۳۰
۰/۵ × ۰	b-h٦/۱۰	h-n٤/٤۰
۰/۵ × ۰/۱	bcv/۷۰	d-io/۱۰
۰/۵ × ۰/۲	b-h٦/۵۰	j-n٤/۳۰
۰/۵ × ۰/۵	b-h٦/۱۰	ab٦/٦۰
۱ × ۰	b۸/۱۰	mn۳/۹۰
۱ × ۰/۱	b-h٦/٦۰	e-k٤/۹۰
۱ × ۰/۲	b-ev/٤۰	cdeo/۷۰
۱ × ۰/۵	a۱۲/۱۰	a۸/۱۰
۲ × ۰	b-h٦/۵۰	i-n٤/٤۰
۲ × ۰/۱	b-g٦/۸۰	f-l٤/۸۰
۲ × ۰/۲	b-ho/۹۰	h-n٤/۵۰
۲ × ۰/۵	b-ho/۹۰	cdo/۸۰

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



شکل ۱: مراحل ریزازدیادی ارکید کاتاستوم (*Catasetum* sp.). A و B): پروتوکورم‌های تولید شده در محیط کشت؛ C) رشد و توسعه‌ی PLBs در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA و Kin (مقایسه‌ی تعداد برگ)؛ D) مقایسه‌ی تعداد ریشه در ۳ تیمار مختلف؛ E) یک گیاهچه‌ی سازگارشده در گلدان حاوی مخلوط لیکا، پیت ماس و پرلیت در گلخانه؛ F) ارکید در مرحله‌ی گلدهی

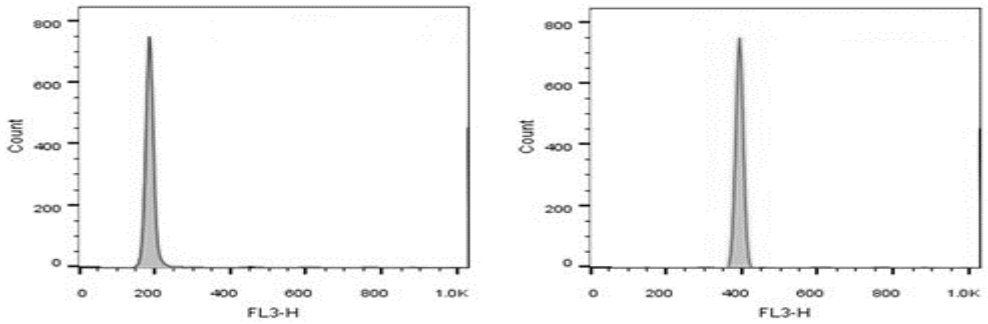
Fig 1: Stages of orchid (*Catasetum* sp.) micropropagation. A and B) Protocorms produced in culture medium. C) Growth and development of PLBs in MS culture media containing different concentrations of IBA and Kin (Comparison number of leavs). D) Comparison number of roots in 3 different treatments. E) A compatible seedling in a pot containing a mixture of Leica, Moss and Perlite in the greenhouse. F) Orchids in the flowering stage.

در مطالعه‌ی حاضر، افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد (Kin و IBA به تنهایی یا در ترکیب با هم) در غلظت‌های مناسب باعث رشد گیاهچه و تشکیل برگ از پروتوکورم کشت شده در محیط کشت MS گردید. مشابه این یافته‌ها توسط Roy و همکاران (2011) روی ارکید واندا (*Vanda coerulea*) گزارش شد. در این مطالعه، پروتوکورم‌ها به طور مستقیم چند شاخه را در محیط کشت غنی شده با سیتوکینین ایجاد کردند. در بیشتر ارکیدها حضور سیتوکینین‌ها به تنهایی ازدیاد شاخه و برگ‌ها را تحریک کرد (Mahendran and Normatha, 2009). در همین راستا، Maridass و همکاران (2010) که کشت درون‌شیشه‌ای ارکید (*Dendrobium nanum*) را با استفاده از ریزنمونه‌های جوانه‌ی ریزوم انجام دادند، مشاهده کردند بیشترین میزان شاخه و برگ در محیط کشت MS حاوی BAP به تنهایی (۰/۵ میکرومولار) تولید شد. تشکیل و تکثیر شاخه‌ها و

برگ‌ها با نوع و غلظت سیتوکینین مورد استفاده ارتباط نزدیکی دارد (Amoo *et al*., 2014). در ارکید دندروبیوم (*Dendrobium huoshanese*) گزارش شده است که Kin در تکثیر گیاهچه، تولید برگ و شاخه از PLB نسبت به سایر سیتوکینین‌ها مؤثرتر بود و بهترین پاسخ در محیط غنی شده 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). در بررسی ریزازدیادی نوک ساقه‌ی ارکید واندا (*Vanda tessellata* L.) در محیط کشت MS همراه 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 (Roy *et al*., 2011). 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 در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بعد از ٦٠ روز به دست آمد (Goswami *et al*., 2015). Nongdam and Tikendra (2014) نیز در ازدیاد درون‌شیشه‌ای ارکید دندروبیوم (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) از طریق بذر نشان دادند که بیشترین تعداد برگ (۹/٦٣) در محیط کشت MS به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده شد. بنابراین، در اغلب موارد تنظیم‌کننده‌های رشد وقتی به صورت ترکیبی به کار روند بسیار قوی‌تر و مؤثرتر عمل می‌کنند (Roy *et al*., 2011). این نتیجه در مطالعه‌ی ما نیز نشان داده شد. طبق مطالعات ما، Kin و IBA به تنهایی و نیز با هم اثر مثبت و معنی‌داری بر افزایش تعداد ریشه داشتند. هورمون IBA برای القای ریشه‌زایی مؤثرتر از Kin بود. مشابه یافته‌های این تحقیق، IBA منجر به بازده بالای ریشه از نظر میزان ریشه‌زایی و تعداد ریشه‌های القا شده در هر شاخه در ارکیدهای ساتیریوم (*Satyrium nepalense*) و دندروبیوم (*Dendrobium nobile*) شد (Mahendran and Normatha, 2009; Bhattacharyya *et al*., 2016). اثربخشی IBA در ریشه‌زایی برخی از ارکیدهای دیگر مانند وانیل (*Vanilla planifolia*) (Giridhar *et al*., 2001)، سیمبیدیوم (*Cymbidium alofolium* L.) (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)، بالبوفیلوم (*Bulbophyllum auricomum* L.) (Thet and Aye, 2018)، و اولوفیا (*Eulophia nuda*) (Panwar *et al*., 2012) گزارش گردید. مطالعه روی ریزازدیادی کاتاستوم نشان داد که بالاترین تعداد ریشه در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Baker *et al*., 2014). در مطالعه‌ی حاضر نیز اثر همکاری IBA و Kin در تحریک تولید ریشه‌ی بیشتر آشکار گردید.

القای برون‌شیشه‌ای پلی‌پلوییدی

گیاهچه‌های ۵ ماهه‌ی ارکید کاتاستوم از PLBs رشد یافته در شرایط درون‌شیشه‌ای، به مدت ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف کلشی‌سین قرار گرفتند. کاربرد کلشی‌سین در القای پلی‌پلوییدی در گیاهان تیمار شده مؤثر بود. با این وجود، از رشد و توسعه‌ی گیاهچه‌ها در تعدادی از تیمارهای آن جلوگیری شد و برخی از گیاهان در مراحل اولیه رشد از بین رفتند. بالاترین درصد پلی‌پلوییدی با تیمار کلشی‌سین ۰/۱۵ درصد به دست آمد. القای تتراپلوییدر در کاتاستوم توسط کلشی‌سین ۰/۱۵ درصد انجام شد (شکل ۲). هیچ تتراپلوییدی با تیمار کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد به دست نیامد. وقتی که پلی‌پلوییدی توسط فلوسایتومتری تعیین شد، هیستوگرام‌ها، دیپلوییدها (شاهد) و تتراپلوییدها را نشان دادند (شکل ۲). مشاهدات سایتولوژیکی و مورفولوژیکی برای تایید نتایج به دست آمده از فلوسایتومتری مورد استفاده قرار گرفت. افزایش در صفات طول برگ و طول و عرض سلول‌های نگهبان روزنه در گیاهان تتراپلویید شده با تیمار ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین نسبت به دیپلوییدهای شاهد دیده شد. طول سلول‌های نگهبان روزنه یک معیار مناسب برای تأیید القای پلوییدی است که با آنالیز فلوسایتومتری نشان داده شد. در این تحقیق در تمام تیمارهای کلشین‌سین طول سلول‌های نگهبان روزنه به طور معنی‌داری بیشتر از دیپلوییدهای تیمار نشده بود. بیش‌ترین طول سلول‌های نگهبان روزنه (۳۸/۱۵ مایکرومتر) از گیاهان تتراپلویید تیمار با کلشی‌سین ۰/۱۵ درصد به دست آمد (جدول ۲). از نظر عرض سلول نگهبان روزنه، گیاهچه‌های تتراپلویید از دیپلوییدها بلندتر، اما تفاوت معنی‌دار نبود. بالاترین طول برگ(۱ ۴۷/۰ میلی‌متر) با کلشی‌سین ۰/۱۵ درصد به دست آمد و کم‌ترین آن (۳۵/۳۵ میلی‌متر) در گیاهان شاهد اندازه‌گیری شد (جدول ۲).



شکل ۲: هیستوگرام فلوسایتومتری مربوط به هسته‌های جدا شده از برگ ارکید دندروبیوم (*Dendrobium* sp.). A) شاهد دیپلویید؛ B) تیمارشده با غلظت ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین برای ۷۲ ساعت.

Fig 2: Histogram of flow cytometry related to isolated nuclei from leaf of orchid *Dendrobium* sp. A) Diploid control; B) treated with concentration 0.15% colchicine for 72 h.

جدول ۲: مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین روی طول برگ و طول و عرض سلول‌های نگهبان روزنه ارکید دندروبیوم (*Dendrobium* sp.).

Table 2: Mean comparison of the effect of different concentrations of colchicine on leaf length and length and width of stomata guard of *Dendrobium* sp.

غلظت کلشی‌سین (درصد)	طول برگ (میلی‌متر)	طول سلول‌های نگهبان روزنه (مایکرومتر)	عرض سلول‌های نگهبان روزنه (مایکرومتر)
۰/۰۰	۳۵/۳۵^{b}	۳۰/۱۰^{c}	۲۷/۹۰^{a}
۰/۰۵	۳۸/۵۵^{b}	۳۳/۷۰^{bc}	۲۹/۸۵^{a}
۰/۱۰	۴۲/۸۰^{ab}	۳۵/۶۰^{ab}	۳۰/۲۰^{a}
۰/۱۵	۴۷/۱۰^{a}	۳۸/۱۵^{a}	۳۰/۴۰^{a}

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

پلی‌پلوییدی نقش مهمی در تکامل و گونه‌زایی گیاهان دارد و با تغییرات ساختاری، نموی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گسترده‌ای همراه است. بنابراین، می‌توان گفت که پلی‌پلوییدی با ایجاد تنوع در صفات مختلف، گزینه‌های جدیدی برای اصلاح‌گران فراهم می‌کند تا بسته به هدف‌شان که ممکن است دارویی، زینتی، مقاومتی و غیره باشد، گیاهان مطلوب را گزینش کنند. طبق مطالعه‌ی ما، با افزایش غلظت کلشی‌سین، طول برگ افزایش یافت. نتایج مشابه روی برخی ارکیدها گزارش گردید. کاربرد کلشی‌سین روی دو رقم ارکید فالانوپسیس (*Phalaenopsis*) نشان داد که طول برگ در تیمارهای بالاتر کلشی‌سین به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد و در بالاترین تیمار آن بالاترین طول برگ مشاهده شد (Azmi *et al.*, 2016; Soetopo and Hosnia, 2018). برخلاف یافته‌های ما، در نوعی رقم هیبرید ارکید واندا غلظت بالای کلشی‌سین و مدت زمان طولانی تیمار با آن باعث کاهش طول برگ نسبت به تیمار شاهد شد (Tuwo and Indrianto, 2016). در همین ارتباط، Chen و همکاران (2009) اظهار داشتند که گیاهچه‌های با سطح پلوییدی پایین‌تر از گیاهچه‌هایی که سطح پلوییدی بالاتر داشتند، سریع‌تر رشد کردند و دارای برگ‌های بزرگ‌تری بودند. طبق مشاهدات، در القای پلی‌پلوییدی توسط کلشی‌سین طول سلول‌های نگهبان روزنه به طور معنی‌داری افزایش یافت. این روش برای شناسایی خصوصیات ژنتیکی ارکیدهای *Epidendrum*، *Dendrobium*، *Cymbidium*، *Phalaenopsis*، *Odontioda* استفاده شد (Chen *et al.*, 2009; Miguel and Leonhardt, 2011). اندازه‌گیری ابعاد سلول‌های نگهبان روزنه برگ، یک روش کاربردی و اقتصادی برای تعیین سطح پلوییدی در خانواده‌ی ارکید است (Miguel and Leonhardt, 2011). برخی محققان این روش را برای اندازه‌گیری سطح پلوییدی موجود در *Cymbidium* (Russell, 2004)، *Calanthe* (Tahara and Kato, 2006)، *Paphiopedilum* (Watrous and Wimber, 1998) و *Phalaenopsis* (Chen *et al.*, 2009) به‌کار برده‌اند. عموما گیاهان زینتی پلی‌پلوییدی نسبت به والدین دیپلوییدی، از کارایی بالاتری برخوردارند و زیباترند.

نتیجه گیری کلی

برخی ارکیدها در حال انقراض هستند. ریزازدیادی یکی از فرآیندهای مهم در تکثیر گیاهان از جمله

گیاهان زینتی در حال انقراض ایفا می‌کند. تولید تعداد زیادی گیاه در مقیاس وسیع، خطر انقراض گیاهان را کاهش می‌دهد. در پژوهش حاضر، بیشترین تعداد برگ و تعداد ریشه در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط غنی شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. پلی‌پلوییدی نقش موثری در تکامل گیاهان و گونه‌زایی ایفا می‌کند. پرکاربردترین ماده ضد میتوز برای القای پلی‌پلوییدی در گیاهان، کلشی‌سین است. در مطالعه حاضر، آنالیز فلوسایتومتری آشکار کرد که گیاهچه‌های تتراپلویید با تیمار ۰/۱۵ درصد کلشی سین تولید شدند.

منابع

1) 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.
2) Azmi, T.K.K., D. Sukma, S.A. Aziz and M. Syukur. 2016. Polyploidy induction of moth orchid (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) by colchicine treatment on pollinated flowers. The J. Agric. Sci. 11 (2): 62–73.
3) 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.
4) 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.
5) 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.
6) 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.
7) 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.
8) 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.
9) 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 villosum* using colchicine. Sci. Hort. 252: 283–290.
10) 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.
11) 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.
12) Mahendran, G. and V. Normatha. 2009. Mass propagation of *Satyrium nepalense* D. Don, A. medicinal orchid via seed culture. Sci. Hort. 119: 203–207.
13) Malabadi, R.B., G.S. Mulgund and N. Kallappa. 2005. Micropropagation of

Dendrobium nobile from shoot tip sections. J. Plant Physiol. 162: 473–478.

14)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.

15)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.

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

17)Murashige, T. and Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497.

18)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.

19)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.

20)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.

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

22)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 endangered orchid. Sci. Hort. 128: 325–331.

23)Russell, G.. 2004. Stomatal guard cell measurements using leaf prints. Certified Senior Advisor J. 4: 137–139.

24)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.

25)Soetopo, L. and D. Hosnia. 2018. *In vivo* polyploid-induction by colchicine on orchids *Phalaenopsis pulcherrima* (Lindl.) J.J Smith. Biosci. Rese. 15 (2): 941–949.

26)Tahara, M. and M. Kato. 2006. Polyploidy and hybridization in *Habenaria* and *Calanthe*. Proc. World Orchid Hiroshima Sym. 79–82.

27)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.

28)Thet, H.S.Y. and T. Aye. 2018. *In vitro* plantlets production of *Bulbophyllum auricomum* L. 1st Myanmar- Korea Conference.

29)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.

30)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.

31)Yenchon, S. and S. Te-chato. 2014. Polypolidy induction of *Dendrobium formosum* by colchicine treatment *in vitro*. Acta Hortic. 1025 (12): 81–88.