گل و گیاهان زینتی (۱۳۹۹)، ۵ (۱): ۱۹-۲٤
مقاله کوتاه

اندام‌زایی درون شیشه‌ای ثعلب (*Orchis mascula* L.)

محمد رضا دهقانی مشکانی[۱]، نسیم زرین پنجه*[۱]، مجید قربانی نهوجی[۱]، جواد شقاقی[۲]

۱. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج

۲. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شاهد، تهران

✉ nassimzp@yahoo.com; zarinpanjeh@imp.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۳۰ ، تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲

چکیده

ثعلب با نام علمی *Orchis mascula* L. یکی از گونه‌های ارزشمند زینتی، دارویی، بومی و در حال نابودی است. در این پژوهش، از روش کشت بافت گیاهی برای حفظ این گیاه ارزشمند استفاده شده است. بدین ترتیب، برای اندام‌زایی درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌های پداژه‌نما پس از گندزدایی سطحی به محیط های مختلف ساقه زایی و سپس ریشه‌زایی شامل محیط کشت پایه OrchiMax (OM) به همراه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل BAP، NAA وIAA به تنهایی و در ترکیب با هم در غلظت‌های مختلف منتقل شدند. براساس نتیجه‌های به دست آمده بیشترین شاخه‌زایی (۱۰۰٪)، از کشت ریزنمونه پداژه‌نما در محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد و بیشترین ریشه‌زایی (۸۰٪) نیز مربوط به تیمار دارای IAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر بود.

واژه‌های کلیدی: *Orchis mascula* L.، کشت درون شیشه‌ای، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی.

مقدمه

ثعلب با نام علمی *Orchis mascula* L. از تیره Orchidaceae است که از بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهان گلدار دنیا دارای ۸۰۰ جنس و ۲۵۰۰۰ گونه می‌باشد (Chugh *et al.*, 2009). ثعلب یا ارکیدها، به عنوان یکی از تیره‌های مهم از گروه تک لپه‌ای‌ها هستند که از نظر ارزش‌های زیستی و گوناگونی گیاهی، اقتصادی و زیبا شناختی دارای اهمیت فراوانی بوده و به عنوان یک گیاه زینتی، دارویی و غذایی کاربرد داشته است و در بیشتر اکوسیستم‌های نیمه مرطوب و مرطوب از جمله جنگل‌های باز و درخت زارهای مناطق فوقانی کاسپینی گسترش دارند. ارکیدها به علت اهمیت و جایگاهشان در گوناگونی زیستی و همچنین ارزش‌های اقتصادی از اهمیت ویژه‌ای در بین گیاهان بومی و مجموعه فلور ایران برخوردارند و در مناطقی مانند آذربایجان، لرستان ، خوزستان، کردستان و سواحل دریای خزر به صورت خودرو رشد می کنند (Mozafarian, 2013; Zare *et al*., 2019; Ebrahimi *et al*., 2020).

این گونه اغلب در مراتع بالادست جنگل‌های کاسپینی و در اواخر بهار با گل‌هایی به رنگ صورتی تیره و گاهی روشن با محوری بلند نمایان می‌شود (Zare *et al.*, 2019). از آنجایی گونه‌های ثعلب بومی ایران از جمله *O. mascula* L. از گوناگونی

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2022-09-12]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1399.5.1.2.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.5.1.19]

زیستی بالایی برخوردارند، می‌توانند به عنوان منبع ژنتیکی غنی برای ایجاد تغییرهایی در ویژگی‌های ارزشمندی چون شمار گل در برنامه‌های بهنژادی با هدف‌های زینتی مورد استفاده قرار گیرند (Ebrahimi *et al*., 2020).

براساس پژوهش‌های تازه، جمعیت این گیاهان به علت کوچک شدن محدوده رویش طبیعی و جمع آوری‌های بی‌رویه به علت ارزش‌های زیبا شناختی و دارویی به شدت رو به کاهش است (Zare *et al*., 2019). مشکل بزرگ در مسیر افزایش گیاهان تیره ارکید، وجود بذرهای بسیار ریز و رویان‌های نابالغ و بدون آندوسپرم است که برای تنژگی به همزیستی قارچ- ریشه‌های ویژه خود نیاز دارند. پژوهش‌های بسیاری درمورد تنژگی غیرهمزیست بذرگونه‌های مختلف ارکید در محیط درون شیشه‌ای صورت گرفته که موجب تجاری شدن تولید برخی از آن‌ها شده است. با وجود این که پیشرفت‌هایی برای ریزافزایی و کشت درون شیشه‌ای برخی ارکیدهای دارزی گرمسیری به صورت انبوه در سطح تجاری به دست آمده، نتیجه‌های اندکی درمورد *O. mascula* L. به دست آمده است. این گیاه به دلیل افزایش کند و پراکنش محدود به شکل طبیعی کمیاب بوده و قسمت مورد استفاده گیاه که ریشه است، در صورت برداشت باعث از بین رفتن گیاه می‌شود. در نتیجه، برداشت‌های پیاپی آن از یک منطقه منجر به ریشه کنی آن گونه شده است. قیمت بالای این گیاه در بازارهای داخلی و بین المللی باعث افزایش درخواست بازار و در نتیجه برداشت بیشتر از مراتع و فشار بیشتر به گیاه می‌شود که در پایان شاهد انقراض این گونه خواهیم بود. در نتیجه تولید گیاهچه‌های قابل کشت و شروع کشت و کار باعث رفع نیاز بازار شده و می‌تواند ارزآوری مناسبی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از گیاه ثعلب به عنوان گیاه مادری برای تهیه ریزنمونه استفاده شده است. قسمت‌های برگ و پداژه‌نمالی گونه گفته شده به اندازه تقریبی پنج میلی‌متر به عنوان ریزنمونه انتخاب شدند. شستشوی سطحی و اولیه ریزنمونه‌ها با افزودن چند قطره مایع توین-۲۰[۲] و قرار دادن آن‌ها زیر آب جاری به مدت حدود نیم ساعت انجام شد. سپس ریزنمونه‌ها سه نوبت با آب مقطر شستشو و پس از آن برای گندزدایی به زیر دستگاه هود کشت بافت منتقل شدند. در این مرحله در آغاز از کلرید جیوه ۰/۱٪ و سپس از الکل ۷۰٪ به ترتیب به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه برای گندزدایی ریزنمونه‌ها استفاده شد. پس از پایان مرحله گندزدایی و با هدف حذف کامل ماده‌های گندزدا از سطح نمونه‌های گیاهی، ریزنمونه‌ها بی‌درنگ درون آب مقطر گندزدایی شده قرار داده شده و سه بار شستشو همراه با همزدن کامل انجام شد.

در مرحله ساقه‌زایی اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل BAP[۳] در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) و NAA[٤] در سه سطح (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر)، و در مرحله ریشه‌زایی اثر IAA[۵] در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) در محیط کشت پایه OM (Duchefa Biochemie B.V. Netherland) بر شاخص‌های شاخه‌زایی و ریشه‌زایی مورد بررسی قرار گرفت. به محیط کشت OM ۲ گرم در لیتر زغال فعال به همراه ۲ گرم در لیتر ترپیتون و ۲۰ گرم در لیتر سوکروز نیز افزوده شد. هورمون ها و ماده‌های شیمیایی از شرکت Sigma Aldrich Company (UK) خریداری شدند.

پس از تهیه محیط کشت، pH محیط بین ۵/٦ تا ۵/۸ تنظیم شد و در پایان میزان ۷ گرم در لیتر آگار به عنوان ماده ژله کننده استفاده شد. محیط‌های کشت و وسیله‌های مورد نیاز برای کشت درون شیشه‌ای زیر دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو گندزدایی شدند. ریزنمونه‌های کشت شده در مرحله شاخه‌زایی و ریشه‌زایی به اتاقک

۱- Protocorm ۲- Tween -20 ۳- 6-Benzylaminopurine ۴- 1-Naphtaleneacetic acid ۵- Indole-3-acetic acid

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2022-09-12]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1399.5.1.2.3]

[DOI: 10.52547/flowerjournal.5.1.19]

رشد با شرایط دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

تیمارها در مرحله شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه به طور کامل تصادفی با ۳ تکرار و ۵ ریز نمونه در هر شیشه مورد بررسی قرار گرفتند. برای واکاوی داده‌ها از نرم افزار SPSS (Ver. 15, USA) و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. تفاوت‌ها در سطح احتمال $P<۰/۰۱$ سنجیده شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱٪ صورت گرفت.

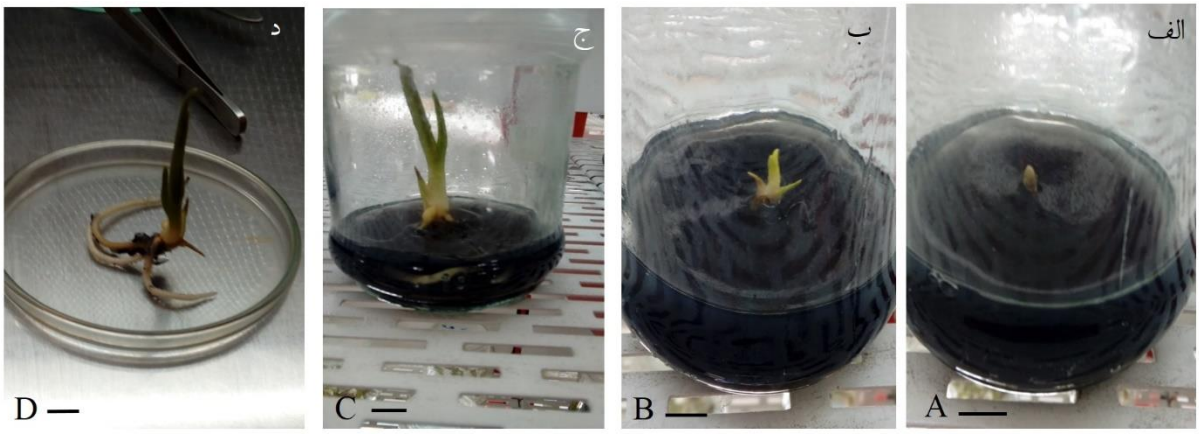
نتایج و بحث

از بین ریزنمونه‌های برگ و پداژه‌نمای کشت شده در تیمارهای مختلف شاخه‌زایی تنها ریزنمونه‌های پداژه‌نما پاسخ مثبت نشان دادند. ریزنمونه‌های برگ حتی پس از ٤ بار زیرکشت به فاصله زمانی ٤ هفته، همچنان بدون تغییر ماندند و در پایان سیاه شده و از بین رفتند. دو ماه پس از کشت ریزنمونه پداژه‌نما در محیط‌های کشت مختلف شاخه‌زایی، روی ریزنمونه‌ها، نوساقه جدید پدیدار شد. همه مراحل اندام‌زایی درون شیشه‌ای ثعلب در شکل ۱ نشان داده شده است. در پژوهش‌های پیشین از ریزنمونه‌های مختلفی برای افزایش درون شیشه‌ای گونه‌های مختلف ارکید استفاده شده است. هم از گیاه بالغ مادری و هم از گیاهچه‌های حاصل از تنژگی بذر درون شیشه تهیه شده‌اند. به عنوان مثال از ریزنمونه ریشه در افزایش درون شیشه‌ای گونه‌های ارکید همچون *Doritaenopsis* و *Rhynchostylis* استفاده شده است (Tsukazaki *et al.*, 2000). ریزنمونه برگ نیز برای کشت بافت بسیاری از گونه‌های ارکید مثل *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. و *Aerides maculosum* Lindl. استفاده شده است (Seeni & Latha, 2000; Murthy & Pyati, 2001). در مورد دیگر ریزنمونه‌ها از جمله نیساگ و پداژه‌نما نیز گزارش‌های فراوانی وجود دارد (Parthibhan *et al.*, 2015; Sheelavantmath *et al.*, 2000).

بر اساس نتیجه‌های به دست آمده بین تیمارهای مختلف (نوع، ترکیب و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی) از نظر درصد شاخه‌زایی تفاوت وجود داشت و میانگین درصد شاخه‌زایی در تیمارهای مختلف مورد بررسی، از ۲۰ تا ۱۰۰٪ بود. بیش‌ترین درصد شاخه‌زایی نیز مربوط به کاربرد BAP ۲ میلی گرم در لیتر و NAA ۰/۵ میلی گرم در لیتر بود (شکل ۲).

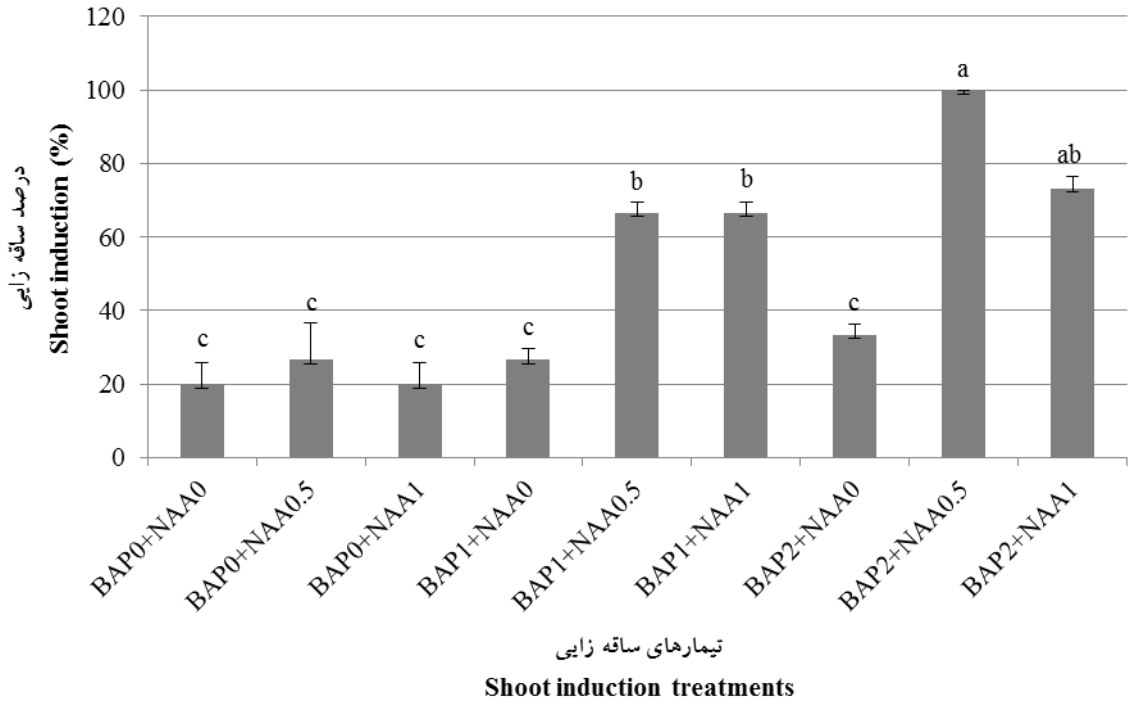
پس از گذشت دو ماه از انتقال شاخه‌های باززایی شده به درون محیط کشت‌های مختلف ریشه‌زایی، روی ریزنمونه‌ها ریشه ایجاد شد. نتیجه‌ها نشان داد که اثر هورمون IAA قابل توجه بوده است. میانگین درصد ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای پس از گذشت ۳۰ روز در تیمارهای مختلف مورد بررسی، از ۱۳ تا ۸۰٪ بوده است. بیشترین درصد ریشه‌زایی مربوط به تیمار کاربرد IAA ۱ میلی گرم در لیتر بود. شایان گفتن است که تیمار IAA ۲ میلی گرم در لیتر که درصد ریشه‌زایی ٦۰٪ را نشان داده است از نظر آماری تفاوت معنی داری با تیمار IAA ۱ میلی گرم در لیتر ندارد (شکل ۳).

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2022-09-12]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1399.5.1.2.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.5.1.19]



شکل ۱- اندام‌زایی درون شیشه‌ای ثعلب ؛ الف) کشت ریزنمونه پداژه‌نما در محیط کشت شاخه‌زایی، ب) انگیزش شاخه جدید روی ریزنمونه پداژه‌نما ج) رشد طولی شاخه د) انگیزش ریشه روی شاخه، خط مقیاس= ۱ سانتی متر.

Figure 1- *In vitro* organgenesis of *O. mascula* L.; A) Culturing of protcorm explant on shoot induction medium, B) Shoot induction, C) Shoot elongation, D) Root induction, scale bar= 1cm.



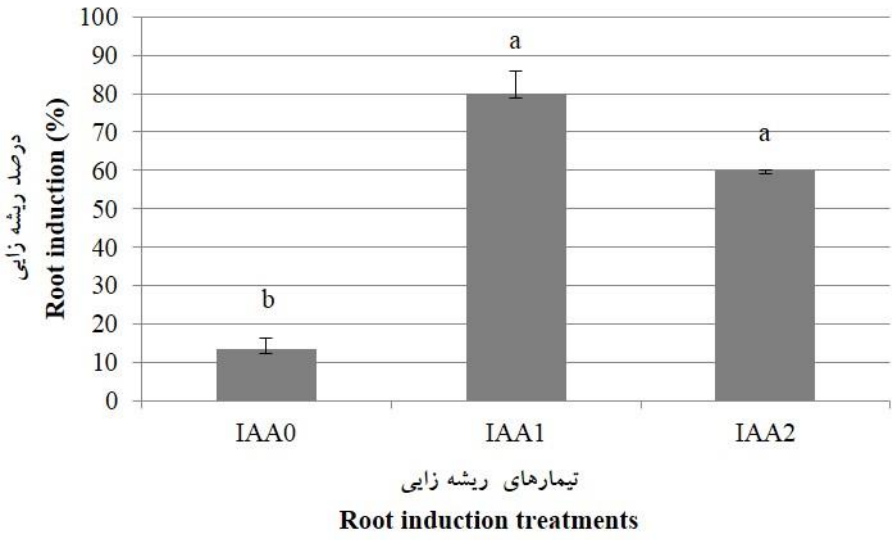
شکل ۲ - مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی در تیمارهای مختلف به کار رفته با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱٪.

Figure 2- Mean separation of shoot induction (%) in different treatments based on Duncan's test at 1% level.

در پژوهشی برای انگیزش رویان‌زایی بدنی گونه‌ای از ارکید *Rhynchostylis retusa* [L.] Blume. بیشترین میزان شاخه‌زایی از رویان‌های بدنی در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) به همراه ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر NAA حاصل شد. محیط کشت بهینه برای ریشه‌زایی نیز، محیط کشت نیم غلظت MS به همراه هورمون‌های IAA و

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2022-09-12]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1399.5.1.2.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.5.1.19]

IBAهرکدام به میزان ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر معرفی شد (Shahinul & Bhattacharjee, 2015). در پژوهشی دیگر در سال۲۰۱۰ با استفاده از ریزنمونه پداژه‌نما بهترین رویان‌زایی را در محیط نیم غلظت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/٤ میلـی‌گـرم در لیتر BAP به‌دست آوردند (Chung *et al.*, 2010). در پژوهشی دیگر در نوعی از ارکید *Oncidium* ریزنمونه گره با ٦۰٪ رویان‌زایی بهترین نتیجه را داشت (Chen *et al.*, 2000). در بررسی دیگری روی گونه ای ارکید با نام علمی *Dendrobium densiflorum* Lindl. مشخص شده است که ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای انگیزش نمونه‌های شبه پداژه‌نما (۱۵ عدد در ریزنمونه شاخه) طی ٦ هفته، بهترین تیمار بود (Luo *et al.*, 2007). نیم میلی گرم در لیتر[1]KIN نیز برای تشکیل نمونه‌های شبه پداژه‌نما مناسب بود. BAP در ترکیب با NAA برای دستیابی به بیشترین شمار نمونه‌های شبه پداژه‌نما در برخی بررسی‌ها پیشنهاد شده است (Kim & Kim, 2003). پداژه‌نما به عنوان ریزنمونه بسیار پرتوان برای تولید رویان در ارکیدهای *Oncidium* و *Dendrobium* گزارش شده است (Chung *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2007).



شکل ۳ – مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی در تیمارهای مختلف به کار رفته با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱٪

Figure 3- Mean separation of root induction (%) in different treatments based on Duncan test at 1% level.

نتیجه گیری

یافته های حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی چون BAP و NAA برای شاخه زایی و IAA برای ریشه زایی روی ریزنمونه های پداژه نمای گونه *O. mascula* تاثیر مثبت داشتند. با توجه به اهمیت ریزافزایی ارکیدهای کمیاب و در خطر نابودی، به دلیل ارزش تجاری و نگه داری آن ها و از آن جا که کارایی، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای گونه‌ها و رقم‌های مختلف ارکید، متفاوت است، پژوهش‌های دیگری برای بررسی دیگر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و اثر غلظت‌های مختلف آن‌ها بر درصد شاخه‌زایی و ریشه‌زایی پیشنهاد می‌شود.

۱- Kinetin

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2022-09-12]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1399.5.1.2.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.5.1.19]

منابع

Chen, Y.C., Chang, C., Chang, W.C. (2000). A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of Phalaenopsis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, *36*, 420-423.

Chugh, S., Guha, S., Rao, U. (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, *122*(4), 507-520.

Chung, H.G., Chen, J.T., Chang, W.C. (2005). Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* 'Chiengmai pink' and subsequent plant regeneration. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, *41*(6), 765-769.

Chung, H.G., Chen, J.T., Chang, W.C. (2007.) Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of Dendrobium. *Biologia Plantarum*, *51*(2): 346-350.

Chung, J.P., Huang, C.Y., Dai, T.E. (2010). Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Scientia Horticulturae*, *124*(4), 511-516.

Ebrahimi, A., Asadi, A.A., Rashidi Monfared, S., Sahebi, M., Rezaee, S., Khaledian, Y. (2020). Evaluation of phenotypic diversity of the endangered orchid (*Orchis mascula*): Emphasizing on breeding, conservation and development. *South African Journal of Botany, 132*, 1-12.

Ghorbani, A., Gravendeel, B., Naghibi, F., Boer, H.D. (2014). Wild orchid tuber collection in Iran: a wake-up call for conservation. *Biodiversity and Conservation*, *23*, 2749-2760.

Kim, M.S., Kim, J.Y. (2003). Micropropagation of *Dendrobium* hybrids through shoot tip culture. *Acta Horticulturae*, doi:10.17660/ActaHortic.2003.624.73.

Luo, J.P., Wang, Y., Zha, X.Q., Huang, L. (2008). Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindle. ex Wall. through protocorm-like bodies: effect of plant growth regulators and lanthanoids. *Plant Cell Tissue, and Organ Culture, 93*, 333-340.

Mozaffarian, V. (2013). *Trees and Shrubs of Iran*. Farhang Moaser Publisher. 1470p. (In Persian).

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473-497.

Murthy, H.N., Pyati, A.H. (2001). Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant, 3*, 223-226.

Parthibhan, S., Rao, M.V., Kumar, T.S. (2015). *In vitro* regeneration from protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley – An imperiled orchid. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *13*(2), 227-233.

Seeni, S., Latha, P.G. (2000). *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered blue Vanda. *Plant Cell Tissue, and Organ Culture*, *61*, 1-8.

Shahinul Islam, S.M., Bhattacharjee, B. (2015). Plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume. *Applied Biological Research, 17*(2), 158-165.

Sheelavantmath, S.S., Murthy, H.N., Pyati, A.N., Kumar, H.G.A., Ravishankar, B.V. (2000). *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. *Plant Cell Tissue, and Organ Culture, 60*, 151-154.

Tsukazaki, H., Mii, M., Tokuhara, K., Ishikawa, K. (2000). Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Reports*, *19*, 1160-1164.

Zare, H., Amini, T., Jafari Gorzin, B. (2019). Orchids and their biodiversity in Caspian habitats. *Iran Nature, 4*, 81-93 (In Persian).

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2022-09-12]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1399.5.1.2.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.5.1.19]

Flower and Ornamental Plants (2020), 5(1): 19-24
Short communications

In vitro organogenesis of Salep (*Orchis mascula* L.)

M. Dehghani Meshkani[1], N. Zarinpanjeh[1*], M. Ghorbani Nahooji[1], J. Shaghaghi[2]

1. Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahed University, Tehran
✉ nassimzp@yahoo.com; zarinpanjeh@imp.ac.ir

Abstract

Orchis muscula L. is one of the worthwhile ornamental, medicinal, native and endangered species in Iran. In this research, plant tissue culture method has been used to propagate this valuable plant. For *in vitro* organogenesis, protocorm explants were surface sterilized and then cultured on different shoot and root induction media based on OrchiMax (OM) medium, supplemented with plant growth regulators with different concentrations alone or in combination. Based on results, the most shoot induction (100%) was obtained from protocorm explants cultured on medium containing 2 mg L^{-1} BAP and 0.5 mg L^{-1} NAA and the highest root induction (80%) was belonged to the treatment of IAA at 1 mgL^{-1}.

Keywords: *Orchis mascula* L., *In vitro* culture, Shoot induction, Root induction.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2022-09-12]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1399.5.1.2.3]
[DOI: 10.52547/flowerjournal.5.1.19]