اثر نوع ریزنمونه، دوره نوری و قند بر ریزازدیادی ارکیده کاتاستوم *(Catasetum fimbriatum, L.)*

الهام محمدی، ویدا چالوی* و حسین مرادی

گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری صندوق پستی ۵۷۸، ساری، مازندران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۲/۰۲)

چکیده

هدف مطالعه حاضر بررسی اثر نوع ریزنمونه، شرایط نوری، نوع و غلظت کربوهیدرات‌ها بر ریزازدیادی و باززایی گیاهچه‌های ارکیده کاتاستوم در قالب دو آزمایش بود. آزمایش اول برای ارزیابی پرآوری گیاهچه‌های جانبی، با دو نوع ریزنمونه نوک شاخه و نوک ریشه در ترکیب با شرایط نوری متفاوت (روشنایی و تاریکی) در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده، تولید برگ و ریشه، تولید گیاهچه‌های جانبی و میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها تحت تاثیر نوع ریزنمونه و تیمار روشنایی و تاریکی قرار گرفت و از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ و ۵ ٪ معنی‌دار شد. بیشترین میانگین تعداد برگ (۲۱/٤ عدد) و تعداد ریشه (۵ عدد) در ریزنمونه شاخه و تیمار روشنایی و بیشترین میانگین تعداد گیاهچه‌های جانبی (۱۷/۸ عدد) در ریزنمونه ریشه و تیمار تاریکی مشاهده شد. در آزمایش دوم، اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول بر باززایی گیاهچه‌های ارکیده کاتاستوم بررسی شد. تیمارهای آزمایشی سه سطح ۲۰، ۳۰، ٤۰ گرم در لیتر ساکارز، دو سطح ۱۰/۰۸ و ۲۲ گرم در لیتر مانیتول در ترکیب با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و هم-چنین مانیتول به تنهایی به مقدار ۱۰/۰۸ گرم در لیتر بودند. بیشترین میانگین تعداد گیاهچه‌های جانبی تشکیل شده از هر ریزنمونه (۱۰/٤۸ عدد) در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بدست آمد. در تولید و رشد شبه‌کورم همه غلظت‌های مانیتول مناسب‌تر از ساکارز بود و بیشترین تعداد شبه کورم‌ها (۱/٥٤عدد) در تیمار ۱۰/۰۸ گرم در لیتر مانیتول بدست آمد. در جمع بندی کلی، بیشترین باززایی گیاهچه‌های جانبی در ریزنمونه ریشه و در تیمار تاریکی و با استفاده از ساکارز صورت گرفت.

کلید واژه: ارکیده کاتاستوم، باززایی، تاریکی، ساکارز، مانیتول، نوع ریزنمونه

مقدمه

خانواده ارکیده با داشتن ۸۰۰ جنس و ۲۵۰۰۰ گونه یکی از بزرگترین خانواده گیاهان گلدار است. ارکیده کاتاستوم یکی از مهمترین گیاهان خانواده ارکیده است که به صورت گیاه گلدانی و گل بریده به بازار عرضه می‌شود (Baker *et al.*, 2014). به دلیل هتروزیگوت بودن ارکیده‌ها، تکثیر با بذر سبب تنوع فنوتیپی می‌شود، بنابراین بهتر است که برای تکثیر هیبریدهای کم‌یاب و گونه‌های در معرض خطر مانند کاتاستوم از تکنیک کشت بافت استفاده شود (Chugh *et al.*, 2009). با بهره‌گیری از این روش می‌توان کلون‌های ارکیده را با کیفیت برتر و با احتمال ناچیز برای تغییرات ژنتیکی، بصورت انبوه در زمان کوتاه تولید نمود (Talukder *et al.*, 2003).

یکی از فاکتورهای موثر بر میزان و نوع رشد گیاه در محیط کشت بافت گیاهی حضور نور است (Suzuki *et al.*, 2010). شدت نور، دوره نوری و کیفیت نور از مهمترین عوامل فیزیکی موثر در رشد و نمو، شکل زائی، فتوتروپیسم، فتوسنتز و

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: v.chalavi@sanru.ac.ir

متابولیسم گیاه هستند (Mitsukuri *et al*., 2009). حضور نور با تغییر در میزان تولید تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و برخی از آنزیم‌ها، نوع و سرعت رشد را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از جمله تنظیم کننده‌هایی که میزان تولید آن‌ها در حضور و فقدان نور تغییر پیدا می‌کند و موجب تغییر فعالیت جوانه انتهایی می‌شود، دو تنظیم کننده اکسین و سیتوکنین است (Suzuki *et al*., 2010).

همچنین آنزیم پلی فنل اکسیداز از جمله آنزیم‌هایی است که در حضور و فقدان نور میزان تولید آن تغییر می‌کند. از آن جایی که میزان تولید این آنزیم بر ترکیبات فنولی اثرگذار است، می‌توان گفت حضور یا فقدان نور با اثربخشی بر روی تولید این آنزیم و به موجب آن با اثر بخشی بر میزان ترکیبات فنولی، بر کاهش یا افزایش آلودگی‌های باکتریایی در گیاه، میزان قهوه‌ای شدن بافت ریز نمونه‌ها و هم‌چنین بقای ریزنمونه‌ها اثرگذار است (Mitsukuri *et al*., 2009).

فزون بر فاکتورهای فیزیکی، ترکیبات شیمیایی نیز بر رشد و توسعه گیاه در محیط کشت بافت گیاهی موثرند. از جمله میتوان به نوع و میزان کربوهیدرات‌ها اشاره کرد (Gauchan, 2012). کربوهیدرات‌ها در تمایزیابی سلول‌ها و چرخه‌های بیوشیمیایی سلولی مانند فتوسنتز و تنفس نقش دارند (Nowak *et al*., 2004). به دلیل کمبود دی اکسید کربن در شرایط محیط کشت بافت گیاهی، میزان فتوسنتز بسیار پایین است که سبب ضعف توسعه برگ‌ها، محدودیت در تبادل گازها و کاهش رشد و نمو گیاه می‌شود. بنابراین کربوهیدرات-ها به عنوان منبع کربن برای رشد و نمو به محیط کشت بافت گیاهی افزوده می‌شوند (Rolland *et al*., 2002). کربوهیدرات-ها نه تنها انرژی مورد نیاز برای رشد سلول‌ها را فراهم می‌کنند، بلکه به عنوان مولکول‌های پیام‌دهنده (سیگنالی) هم عمل می-کنند. افزون بر این، در حفظ پتانسیل اسمزی محیط کشت بافت که بر سرعت رشد و تقسیم سلول‌ها اثر دارد، نیز موثرند (Gauchan, 2012).

ساکارز به عنوان قند اصلی برای جابجایی مواد در محیط کشت بافت گیاهی است. این قند با تجمع مواد مورد نیاز سلول ها، افزایش تقسیم سلولی میتوز، حفظ پتانسیل اسمزی و هیدرولیز سریع به مونوساکاریدها موجب تسریع فرآیند رشد شده و به عنوان بهترین منبع کربن برای کشت بافت گیاهی کاربرد دارد (Gibson 2000 ; Stasolla and Yeun, 2003). در محیط کشت بافت ارکیده کاتاستوم از غلظت‌های گوناگون کربوهیدرات ساکارز برای تامین کربن مورد نیاز برای رشد کالوس، شبه کورم و گیاهچه استفاده شده است (Peres *et al*., 2009). به عنوان مثال، غلظت بهینه ساکارز در محیط کشت بافت گیاهی به نوع گونه و مرحله رشدی ریزنمونه وابستگی دارد و در حالت عمومی بین ۲۰ تا ۳۰ گرم در لیتر می‌باشد (Baque *et al*., 2011). هم‌چنین گزارش شده است که استفاده از ساکارز در غلظت‌های بالاتر از ٦٠ گرم در لیتر در محیط کشت به دلیل عدم تعادل اسمزی می‌تواند تاثیر نامطلوبی در باززایی و رشد گیاه داشته باشد (Stasolla and Yeung, 2003). افزون بر ساکارز از مانیتول هم در کشت بافت ارکیده کاتاستوم استفاده شده است. مانیتول یک قند الکل ٦ کربنه است که در ذخیره انرژی و بازسازی NADPH (نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات) نقش دارد و به عنوان یک محافظ از استرس‌های محیطی در محیط کشت بافت گیاهی محسوب می‌شود (Leva *et al*., 2013). انرژی حاصل از کاتابولیسم مانیتول در محیط کشت بافت گیاهی آهسته‌تر از ساکارز انتقال پیدا می کند و بنابراین الگوی رشد گیاه آهسته‌تر می‌شود (Divakaran *et al*., 2006). این رشد آهسته باعث محافظت ریزنمونه‌ها در محیط کشت بافت گیاهی می‌شود و اجازه می‌دهد که گیاه بدون آسیب برای مدت زمان طولانی در محیط کشت بافت گیاهی باقی بماند (Divakaran *et al*., 2006).

نوع ریزنمونه می‌تواند بر باززایی در ارکیده‌ها که با تشکیل جوانه‌های رویشی همراه است اثر بگذارد (Peterson, 1975) . معمولا در ارکیده‌ها، سلول‌های ریزنمونه ریشه از توانایی کمتری برای تشکیل جوانه‌های رویشی به نسبت سلول‌های ریزنمونه شاخه برخوردارند، با این حال، جوانه زنی در بعضی از ارکیده‌ها با استفاده از ریزنمونه ریشه در شرایط طبیعی و محیط کشت بافت، بافت گزارش شده است

(Champaganat, 1971: Kerbauy, 1984a, 1984b). پس از جدا کردن قطعات ریشه و شاخه به عنوان ریزنمونه، ممکن است یک سری تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در این اندام‌ها رخ دهد و همچنین عوامل هورمونی، تغذیه‌ای و فاکتورهای محیطی هم می‌توانند بر روند و توانایی باززایی ریزنمونه‌های گوناگون اثر بگذارند (Colli and Kerbauy, 1993).

هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر تاریکی و روشنایی بر میزان رشد دو نوع ریزنمونه شاخه و ریشه ارکیده کاتاستوم در محیط کشت نیمه جامد و یافتن بهترین ریزنمونه و مناسب ترین شرایط نوری جهت پرآوری گیاهچه‌های جانبی است. هم‌چنین در این مطالعه مقایسه غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول (هر یک به تنهایی و یا در ترکیب با دیگری) بر تولید شبه‌کورم، تشکیل جوانه‌های نو، توسعه برگ و ریشه‌زایی ارکیده کاتاستوم در محیط کشت نیمه جامد مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال‌های ۹۵-۱۳۹٤ انجام شد. گیاهچه‌های استریل ارکیده کاتاستوم از شرکت اولین سبزآوران خزر واقع در شهرستان محمودآباد تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند (شکل۱). این گیاهان تا زمان اجرای طرح در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ٦۵ روز قرار گرفتند.

آزمایش اول: مقایسه پرآوری گیاهچه‌های ارکیده کاتاستوم با استفاده از دو نوع ریزنمونه نوک شاخه و نوک ریشه در دو نوع شرایط روشنایی و تاریکی در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی با ۵ تکرار و ۲ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. نوک شاخه و نوک ریشه به طول تقریبی ۱/۵-۱ سانتی‌متر به عنوان ریز نمونه استفاده شد.

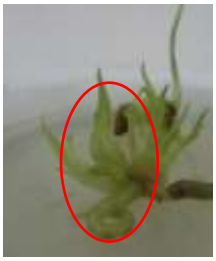
از محیط کشت نیمه جامد (۸ گرم در لیتر آگار) موراشی و اسکوگ حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۱۰۰ ماکرومولار بنزل آدنین ، ۱۰ ماکرومولار نفتالین استیک اسید و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز.به عنوان محیط پایه در کلیه کشت ها و تیمارها استفاده شد (Murashige and Skoog , 1962).

در تیمار روشنایی شیشه‌های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند و در تیمار تاریکی شیشه‌های کشت شده به طور کامل با کاغذ آلومینیومی و کاغذ کاهی پوشانده شده و به همان اتاقک رشد منتقل شدند. بعد از گذشت ٦۵ روز صفاتی مانند تعداد برگ‌ها و ریشه‌های تولید شده از ریزنمونه‌ها، تعداد گیاهچه‌های جانبی تازه تشکیل شده و تعداد گیاهچه‌های قهوه-ای شده در همه تکرارها شمارش و میانگین آن‌ها محاسبه و به ثبت رسید.

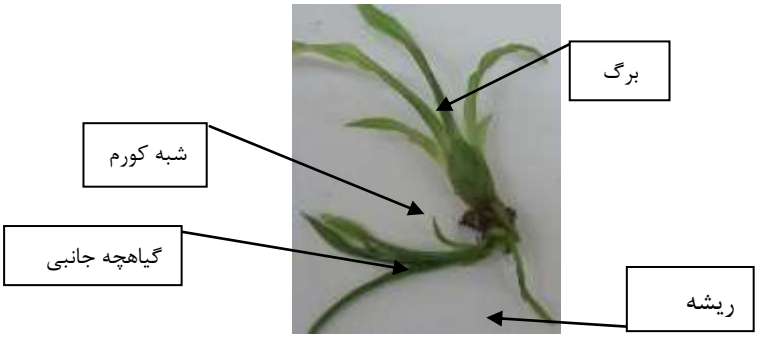
آزمایش۲: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف دو نوع کربوهیدرات ساکارز و مانیتول بر رشد و بازایی ارکیده کاتاستوم در قالب طرح کاملا تصادفی با ٦ تیمار و ۵ تکرار و ۵ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد.تیمارهای این آزمایش شامل ساکارز (۲۰، ۳۰ و ٤۰ گرم در لیتر)، مانیتول (۱۰/۰۸ و ۲۲ گرم در لیتر) به همراه ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و یک سطح ۱۰/۰۸گرم در لیتر مانیتول بود. ریزنمونه‌های مورد استفاده در این بخش، گیاهچه‌های اتیوله بدست آمده از تیمار تاریکی و ریزنمونه ریشه به طول تقریبی ۱-۱/۵ سانتی‌متر بودند (شکل۲).

محیط کشت مورد استفاده در این بخش شامل MS حاوی میواینوزیتول و ٦ تیمار مختلف ساکارز و مانیتول بود. ریزنمونه های کشت شده در شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ۹۰ روز صفات تعداد برگ‌های تولید شده، تعداد ریشه‌ها، تعداد شبه کورم‌ها و تعداد گیاهچه‌های نو شمارش شدند و میانگین آنها محاسبه و ثبت شد (شکل۳). اندازه‌گیری طول برگ‌ها، طول ریشه‌ها و هم-چنین طول و عرض شبه‌کورم‌های تشکیل شده نیز با استفاده از کولیس بر روی تمامی نمونه های هر تکرار انجام شد و میانگین آن‌ها به ثبت رسید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار MSTAT-c و آزمون LSD در سطح احتمال ۵

شکل۱- ارکیده کاتاستوم (*Catasetum fimbriatum*, L.) مستقر در محیط کشت بافت گیاهی



شکل۲- گیاهچه‌های بدست آمده از ریزنمونه نوک ریشه که در تیمار تاریکی به عنوان ریزنمونه در آزمایش دوم استفاده شدند.



شکل۳- نمایش بخش‌های گوناگون گیاهچه‌های تازه تشکیل شده ارکیده کاتاستوم پس از ۹۰ روز که برای شمارش تعداد برگ، ریشه، شبه کورم استفاده شدند.

درصد انجام شد و نمودارها به کمک نرم افزار اکسل رسم شدند.

نتایج و بحث

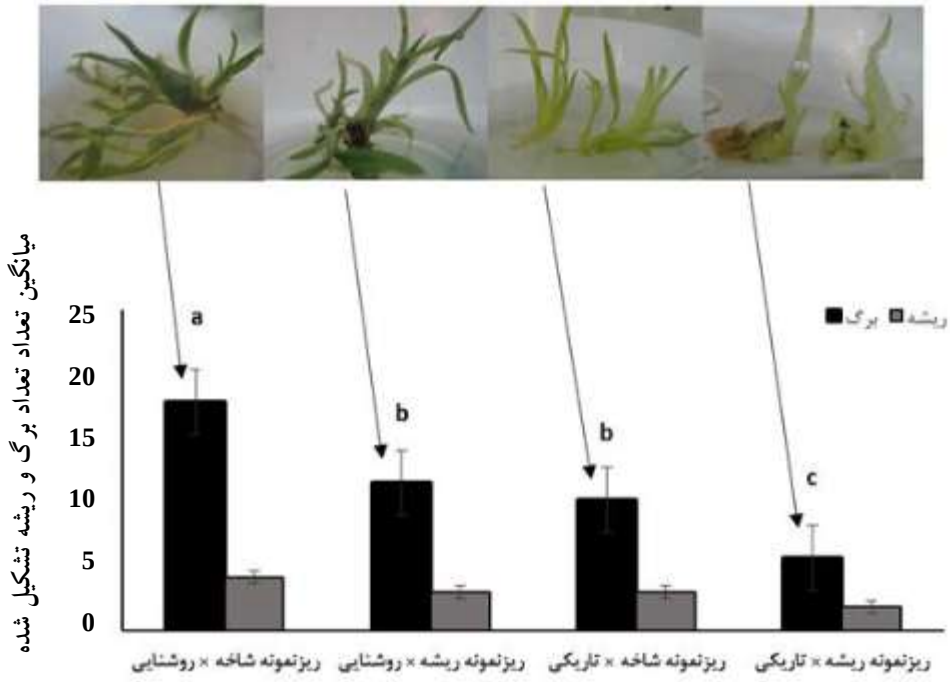
نتایج آزمایش اول: تعداد برگ، تعداد ریشه و تعداد گیاهچه های جانبی تشکیل شده از هر ریزنمونه ارکیده کاتاستوم تحت تاثیر نوع ریزنمونه و تیمار تاریکی و روشنایی قرار گرفت. میزان قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌ها تحت تاثیر تیمار روشنایی و تاریکی قرار گرفت.

تشکیل برگ و ریشه در حضور هر دو نوع تیمار روشنایی

جدول۱- تجزیه واریانس اثر تاریکی و روشنایی و نوع ریزنمونه بر صفات مختلف ارزیابی شده در ریزنمونه ارکیده کاتاستوم در محیط کشت بافت گیاهی

	درجه آزادی	تعداد برگ	تعداد ریشه	تعداد گیاهچه جانبی	قهوه‌ای شدن
نوع ریزنمونه (A)	۳	۲۱۱/۶۰**	٤/۹۰*	۱٤/٤۰**	۰/۱ ns
شرایط نوری (B)	۳	۱۲۲/۵۰**	٤/۹۰*	۲٤۰/۱۰**	۰/۱ ns
(A)×(B)	۳	۱۸۱/۷۸**	٦/۵۳**	۱٤٤/۰٦**	۱/۱۳*
خطا	۱٦	۲/٦	۰/۵۷	۱/٤۷	۰/۱
ضریب تغییرات	–	۱۰/۸٤	۲۲/۵٤	۱۱/۰۳	٦/۵۵

***: معنی داری در سطح احتمال ۵٪ ** : معنی داری در سطح احتمال ۱ ٪**



شکل ٤- اثر نوع ریزنمونه و تیمار تاریکی و روشنایی بر میانگین تعداد برگ و ریشه تشکیل شده از هر ریزنمونه پس از ٦۵ روز. حرف‌های همانند بر بالای میله‌ها نشانگر نبود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد هست.

و تاریکی و در هر دو نوع ریزنمونه شاخه و ریشه صورت گرفت ولی بین تعداد برگ و ریشه‌های تشکیل شده در تیمارهای مختلف، به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت (جدول۱). از بین ٤ نوع تیمار مختلف، ریزنمونه شاخه و تیمار روشنایی با داشتن بیشترین میانگین تعداد برگ (۲۱/٤ عدد) و تعداد ریشه (۵ عدد) مطلوب‌ترین اثرگذاری برای تولید برگ و ریشه را به خود اختصاص داد (شکل٤). کمترین میانگین تعداد برگ (٦/۸ عدد) و تعداد ریشه (۲/۲ عدد) در ریزنمونه ریشه و تیمار تاریکی مشاهده شد و اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که اختلاف بین دو نوع ریزنمونه مستقر شده در هر تیمار در تشکیل برگ و ریشه معنی‌دار بوده و تعداد برگ و ریشه‌هایی تشکیل شده از ریزنمونه شاخه در هر تیمار بیشتر از ریزنمونه ریشه بود (شکل ٤). در نهایت

موثرترین تیمار برای تولید برگ و ریشه، تیمار روشنایی و ریزنمونه شاخه شناخته شد.

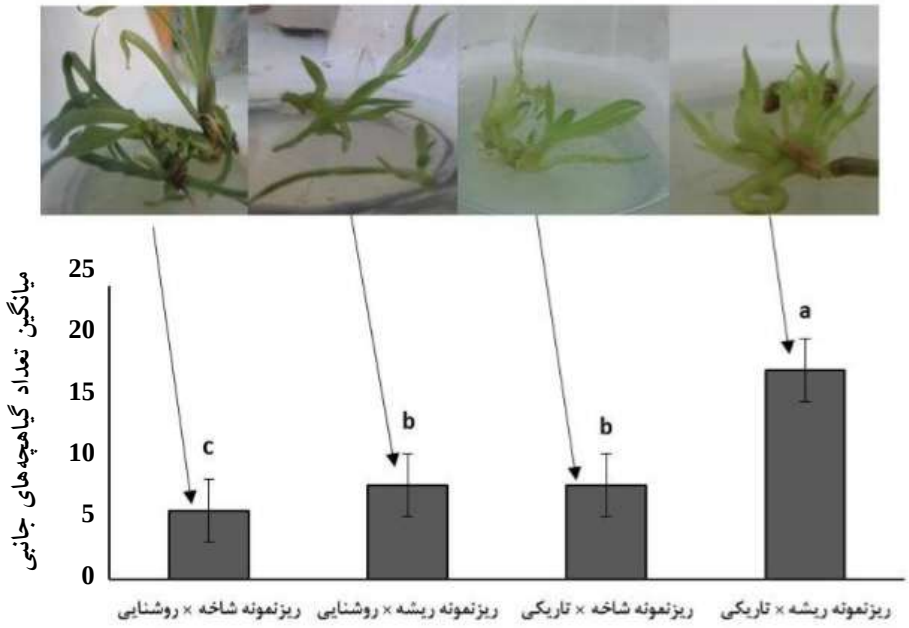
تولید گیاهچه‌های جانبی نیز مانند تشکیل برگ و ریشه تحت تاثیر نوع ریزنمونه و تیمار روشنایی و تاریکی قرار گرفت و از نظر آماری در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول۱). از بین ٤ نوع تیمار مختلف، تیمار تاریکی و ریزنمونه ریشه با میانگین ۱۷/۸ عدد گیاهچه بیشترین تعداد گیاهچه‌های جانبی تولید شده و تیمار روشنایی و ریزنمونه شاخه با میانگین ۵/۸ عدد گیاهچه کمترین تعداد گیاهچه جانبی را به خود اختصاص داده و اختلاف بین این دو تیمار با هم و با دیگر تیمارها معنی‌دار بود (شکل ۵). تعداد برگ و ریشه‌های تولید شده در دو تیمار روشنایی و ریزنمونه ریشه و تیمار تاریکی و ریزنمونه شاخه در مرتبه دوم قرار داشتند و اختلاف بین این تیمارها در تشکیل برگ و ریشه به لحاظ آماری معنی دار نبود (شکل۵). همچنین اختلاف بین دو نوع ریزنمونه مستقر شده در هر تیمار در تشکیل گیاهچه‌های جانبی مانند تشکیل برگ و ریشه معنی‌دار بود ولی برخلاف برگ و ریشه، تعداد جوانه‌های جانبی تشکیل شده از ریزنمونه ریشه در هر تیمار بیشتر از ریزنمونه شاخه بود (شکل ۵).

به طور کلی در باززایی ارکیده کاتاستوم عمدتا تعداد برگ و ریشه‌های تشکیل شده در حضور نور به نسبت تاریکی بیشتر، و بالعکس تعداد گیاهچه‌های جانبی تشکیل شده در شرایط تاریکی در مقایسه با شرایط روشنایی بیشتر بود. حضور نور میزان تولید تنظیم کننده‌های رشد را در بافت ریزنمونه‌های ارکیده کاتاستوم تغییر می‌دهد و این تغییرات باعث تغییر در میزان رشد ریزنمونه‌ها می‌گردد. در حضور نور نسبت سیتوکنین به اکسین جوانه انتهایی کاهش یافته و به دنبال آن غالبیت انتهایی سبب افزایش طول میانگره‌ها، تعداد و طول برگ‌ها و تولید کورم بیشتر و ممانعت از تشکیل گیاهچه‌های جانبی می‌شود. بنابراین تیمار تاریکی سبب بهبود تولید گره و جوانه جانبی می‌گردد (Suzuki *et al.*, 2004-2010). هم‌چنین، تعادل بین دو تنظیم کننده سیتوکنین و اکسین برای رشد و اندام‌زایی گیاهان در محیط کشت بافت گیاهی لازم است و با تنظیم تعادل نسبت سیتوکنین به اکسین می‌توان میزان شاخه-زایی و جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها را کنترل کرد (Shimizu-Sato *et al.*, 2009). از طرف دیگر در حضور نور فتوسنتز گیاه انجام می‌شود و انرژی مورد نیاز برای تولید برگ را فراهم می کند. در تاریکی به دلیل کمبود و یا فقدان رنگیزه‌های فتوسنتزی، معمولا گیاهانی اتیوله (سفیدرنگ) شده و توقف فتوسنتز سبب کاهش تولید برگ می‌شود (Rolland *et al.*, 2002).

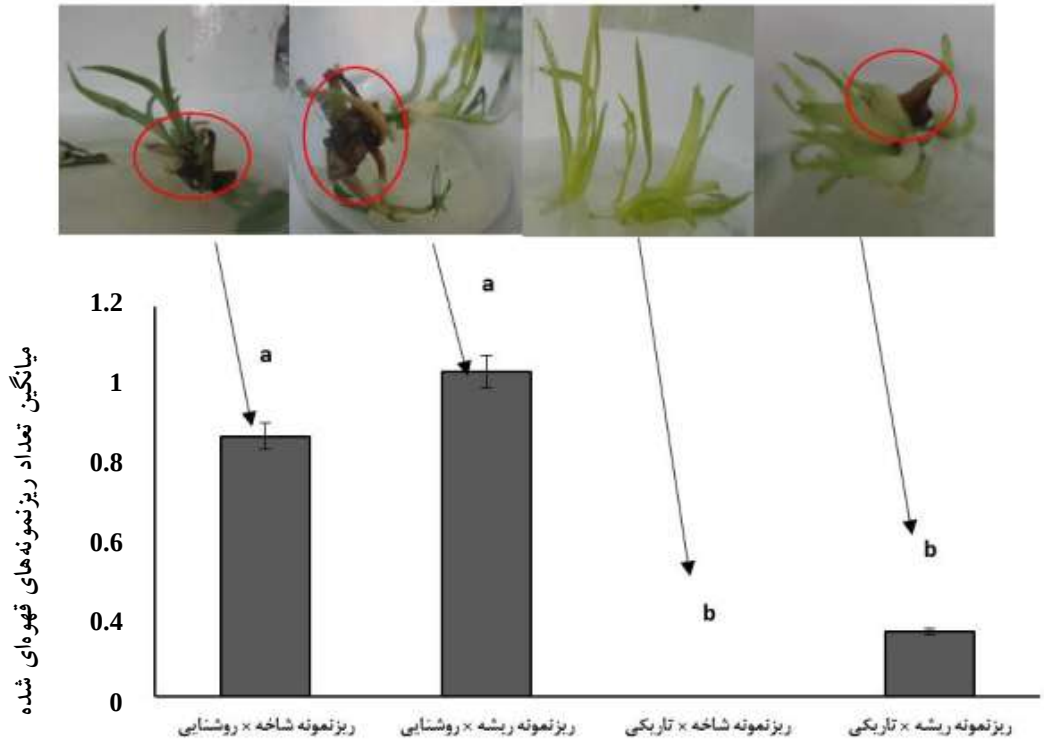
در رابطه با نوع ریزنمونه، در مطالعه حاضر بیشترین میزان تشکیل برگ و ریشه در ریزنمونه شاخه و بیشترین تعداد گیاهچه جانبی در ریزنمونه ریشه بدست آمد. حضور نور موجب افزایش انتقال و جذب مواد به شاخه و اندام های رویشی و کاهش انتقال به ریشه و اندام های زایشی می‌شود بنابراین برای تشکیل برگ و ریشه ریزنمونه شاخه مناسب‌تر از ریزنمونه ریشه عمل می‌کند (Begna *et al*., 2002).

بین تیمارها از نظر تعداد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ مشاهده شد (جدول ۱). ریزنمونه‌هایی که در تاریکی قرار داشتند، گیاهان سفید رنگ یا اتیوله تولید کردند و تنها تعداد کمی بافت قهوه‌ای در ریزنمونه‌های ریشه مشاهده شد. همانطور که در شکل ٦ آمده است سطح قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها بیشتر مربوط به تیمار روشنایی بوده و با اینکه تعداد بافت‌های قهوه‌ای شده در ریزنمونه ریشه به نسبت ریزنمونه شاخه بیشتر بود ولی اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار نبود.

در محیط کشت بافت گیاهانی مانند ارکیده *Habenaria radiata*، سیب، سیکلامن، گواوا و انبه نیز تیمار تاریکی باعث کاهش میزان قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌ها گردید (Sharma and Singh, 2002 : Meghwal *et al.*, 2001: Vang *et al*., 1994). دلیل کاهش سطح قهوه‌ای شدن ریزنمونه ها در تیمار تاریکی این است که گیاهان در محیط کشت بافت گیاهی نسبت به ترکیبات فنولی حساسیت بالایی دارند. تاریکی سبب کاهش فعالیت پلی فنل اکسیداز و حذف ترکیبات فنولی و کاهش میزان قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌ها می‌شود و کیفیت ریزنمونه‌های رشد کرده در محیط کشت را بهبود می‌بخشد (Sharma and Singh, 2002).



شکل۵- اثر نوع ریزنمونه و تیمار تاریکی و روشنایی بر میانگین تعداد گیاهچه‌های جانبی تولید شده از هر ریزنمونه پس از ٦٥ روز. حرف‌های همانند بر بالای میله‌ها نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد هست.



شکل ٦- اثر دو نوع تیمار تاریکی و روشنایی بر میانگین تعداد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده پس از ٦٥ روز. حرف‌های همانند بر بالای میله‌ها نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد هست.

جدول۲ -تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول بر متوسط رشد ریزنمونه کاتاستوم در محیط کشت بافت گیاهی پس از ۹۰ روز

	درجه آزادی	طول برگ	تعداد ریشه	طول ریشه	تعداد شبه کورم	طول شبه کورم	عرض شبه کورم	تعداد گیاهچه جانبی
تیمار	۵	۵٤۷/۰٦**	۲/۵۸**	۲۸٤/۹۱**	۰/۹۰**	۲۱۸/۷۸**	۲۸/۵۱**	٦٤/۱۵**
خطا	۲٤	۱/۳۵	۰/۰٦	۷/۰٦	۰/٤	۰/٤۳	۰/۲۰	۰/۵۱
ضریب تغییرات		۷/٦٦	۲۲/۱۲	۲۰/۳۳	۲۲/۷۵	۹/۰۲	۱۱/۳۰	۱۸/٤۰

: معنی داری در سطح احتمال ۱ ٪

نتایج آزمایش دوم: تعداد، طول برگ و ریشه‌های تولید شده، تعداد، طول و عرض شبه کورم‌های به وجود آمده و هم چنین تعداد گیاهچه‌های جانبی تشکیل شده از هر ریزنمونه ارکیده کاتاستوم پس از ۹۰ روز تحت تاثیر نوع و غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول و ترکیب آنها قرار گرفتند شدند (جدول ۲).

اثر نوع و غلظت کربوهیدرات روی تعداد و طول برگ و ریشه‌های تولید شده، اثر داشت (جدول ۲) تیمار ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با میانگین ۱۵/۷۲ عدد و ۳۱/۷٦ میلی‌متر بیشترین تعداد و طول برگ و هم‌چنین با میانگین ۲/۳٦ عدد و ۲۲/۱۷ میلی‌متر بیشترین تعداد و طول ریشه‌های تولید شده را به خود اختصاص داد.

همزمان با افزایش غلظت ساکارز و مانیتول و یا ترکیب شدن مانیتول با ساکارز، تعداد و طول برگ و ریشه‌های تولید شده کاهش یافت. با توجه به جدول ۳، اختلاف بین دو تیمار ٤۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲۲ گرم در لیتر مانیتول در ترکیب با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز در تعداد برگ، تعداد و طول ریشه‌های تولید شده از نظر آماری معنی دار نبود و کمترین تعداد برگ و کمترین تعداد و طول ریشه‌های تشکیل شده در این دو تیمار بدست آمد (جدول ۳).

اثر نوع و غلظت کربوهیدارت‌ها روی تعداد گیاهچه‌های تولید شده از نظر آماری در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول۳). تیمار۳۰ گرم بر لیتر ساکارز با میانگین ۱۰/٤۸ عدد گیاهچه از هر ریزنمونه بیشترین اثر گذاری را در مقایسه با تیمارهای دیگر داشته (شکل ۷) و به لحاظ آماری اختلاف معنی داری با دیگر تیمارها نشان داده است. به طوری که در غلظت‌های بالاتر از آن یعنی ٤۰ گرم در لیتر تعداد گیاهچه‌های حاصل شده در مقایسه با غلظت های ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر کاهش یافته است (شکل ۷).

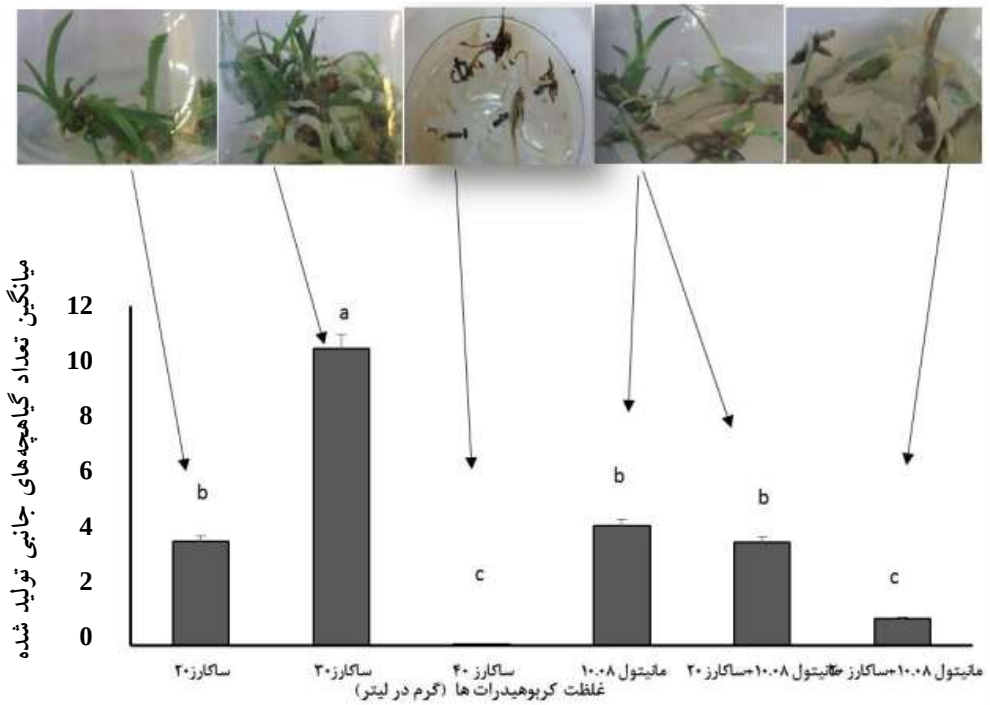
اختلاف بین سه تیمار ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱۰/۰۸ گرم در لیتر مانیتول به تنهایی و ۱۰/۰۸ گرم در لیتر مانیتول در ترکیب با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز در تشکیل گیاهچه جانبی از ریزنمونه‌ها به لحاظ آماری معنی دار نبود و این سه تیمار در تشکیل گیاهچه جانبی پس از تیمار ۳۰ گرم در لیتر ساکارز در مرتبه دوم قرار داشتند (شکل۷). که غلظت‌های پایین‌تر مانیتول اثر مطلوب‌تری در مقایسه با غلظت‌های بالاتر بر تعداد تولید گیاهچه جانبی داشته‌اند و در مجموع از نظر مقایسه کلی، بیشترین تعداد گیاهچه جانبی با میانگین ٤/۲٤ عدد در تیمار ۱۰/۰۸ گرم در لیتر مانیتول و پس از آن با میانگین ۳/٦٤ عدد در تیمار ۱۰/۰۸ گرم در لیتر مانیتول در ترکیب با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد و اختلاف بین این دو تیمار با هم معنی‌دار نبود. علاوه بر این ، کمترین تعداد گیاهچه‌های جانبی با میانگین ۰/۰٤ و ۰/۹٦ عدد به ترتیب در غلظت‌های ٤۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲۲ گرم در لیتر مانیتول در ترکیب با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد و این دو تیمار نسبت به هم اختلاف معنی داری نداشتند (شکل۷).

ساکارز موجب افزایش تقسیم سلولی میتوز، تجمع مواد مغذی مورد نیاز سلول‌ها و حفظ پتانسیل اسمزی شده و از این طریق سبب تسریع فرآیند رشد میگردد (Ekhlas, 2014). ساکارز با انتقال مواد در غشای پلاسمایی به عنوان یک منبع

جدول۳- اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول بر میانگین تعداد و طول برگ و ریشه‌های تولید شده از ریزنمونه ارکیده کاتاستوم پس از ۹۰ روز

تیمارها (گرم در لیتر)	تعداد برگ	طول برگ (mm)	تعداد ریشه	طول ریشه(mm)
ساکارز ۲۰ (گرم در لیتر)	٦^{b}	١٦/٦٩^{bc}	١/٣٢^{b}	١٧/٩٧^{b}
ساکارز ۳۰ (گرم در لیتر)	١٥/٧٢^{a}	٣١/٧٦^{a}	٢/٣٦^{a}	٢٢/١٧^{a}
ساکارز ٤٠ (گرم در لیتر)	٠/٥٢^{d}	٠/٨^{e}	٠/٢٨^{d}	٠/٨^{c}
مانیتول ١٠/٠٨ (گرم در لیتر)	٦/٣٦^{b}	١٨/١٠^{b}	١/٤٠^{b}	١٦/٦٨^{b}
مانیتول١٠/٠٨ + ساکارز ٢٠ (گرم در لیتر)	٣/٤^{c}	١٦/٠٨^{c}	١/١٢^{b}	١٠/٤٩^{c}
مانیتول٢٢ + ساکارز ٢٠ (گرم در لیتر)	١/١٢^{d}	٧/٨٢^{d}	٠/٦٢^{cd}	١٠/٢٧^{c}

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف متفاوت در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم دارند.



شکل۷- اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول بر میانگین تعداد گیاهچه‌های جانبی تولید شده از هر ریزنمونه ارکیده کاتاستوم پس از ۹۰ روز. حرف‌های همانند بر بالای میله‌ها نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

کربوهیدراتی بزرگ برای تولید انرژی سلول‌ها به کار می‌رود و غلظت اولیه آن در محیط کشت بافت گیاهی رشد و نمو را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Swamy *et al.*, 2010). حضور ساکارز در محیط باززایی ارکیده *Calanthe hybrids*، سبب افزایش تعداد، طول شاخه و برگ در مقایسه با محیط کشت بدون ساکارز شد (باکویی و همکاران ۲۰۱۱). در گزارش مذکور، در بین غلظت‌های مختلف به کار برده شده، غلظت ۱۵ تا ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بیشترین رشد شاخه و برگ را موجب شد که با نتایج ما مبنی بر این که تعداد و طول برگ و ریشه و تعداد گیاهچه های جانبی در حضور ساکارز و در غلظت ۳۰ گرم در لیتر بیشتر بود مطابقت دارد.

اگر چه حضور مانیتول میزان نکروزه شدن بافت ریزنمونه-

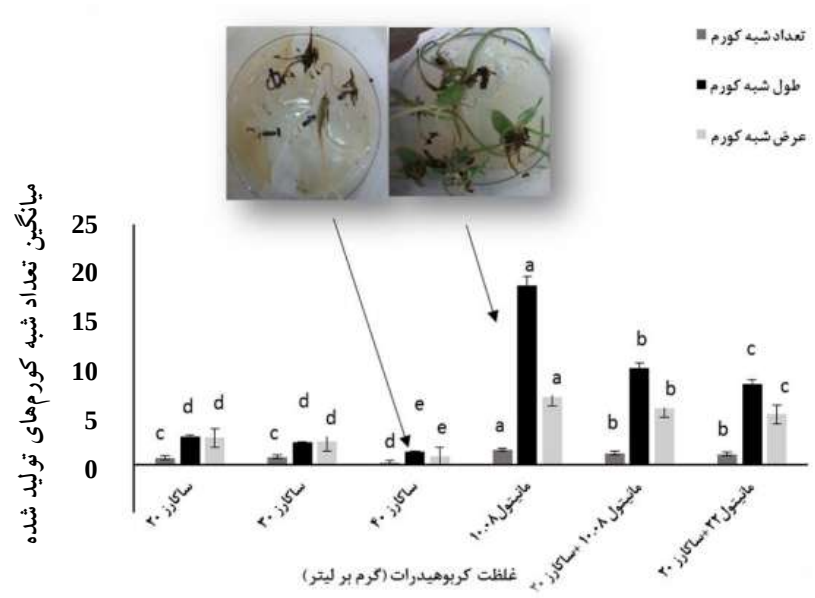
ها را در گیاه *Nauclea diderrichii* کاهش داد ولی از طرف دیگر حضور آن نقش مطلوبی بر تشکیل ریشه نداشت و رشد گیاه را آهسته تر کرد (Kouami, 2015). در محیط کشت گیاه وانیل (*Vanilla planifolia*) نیز حضور مانیتول سرعت رشد گیاه را خیلی آهسته کرد (Divakaran *et al*., 2006). بنابراین با توجه به رشد آهسته‌تر ریزنمونه‌ها در حضور مانیتول و قیمت بالاتر آن نسب به ساکارز، برای تولید برگ و ریشه مطلوب ارکیده کاتاستوم در محیط کشت بافت گیاهی ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر ترجیح داده می شود.

در مطالعه حاضر ، غلظت ۱۵ تا ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بیشترین رشد شاخه و برگ را موجب شد. با افزایش غلظت ساکارز و مانیتول تعداد و طول برگ و ریشه‌های تولید شده کاهش چشمگیری یافت و در ساکارز ٤٠ گرم در لیتر و مانیتول ۲۲ گرم در لیتر در ترکیب با ساکارز ۲۰ گرم در لیتر کمترین تعداد و طول برگ و ریشه بدست آمد (شکل٤). در بررسی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر ریزازدیادی موز، بالاترین تعداد و طول ریشه در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بدست آمد. گفته شده است که افزایش غلظت ساکارز بیشتر از ٤٠-٦٠ گرم در لیتر (بسته به نوع گیاه) به علت برهم‌زدن تعادل اسمزی، باززایی و رشد گیاه را دچار اختلال می‌کند (Wotavova *et al*., 2007;Stasolla and yung, 2003; Ekhlas 2014). غلظت‌های بالای ساکارز با ایجاد توقف در چرخه سلولی و محدودیت مواد مغذی می‌تواند باعث تاخیر در توسعه سلول‌های کشت شده شود (Gould *et al*., 1981; Wu *et al*., 2006) در این آزمایش کاهش طول برگ و ریشه در ساکارز ٤٠ گرم در لیتر را می‌توان به دلیل برهم خوردن تعادل اسمزی در محیط کشت نسبت داد. اثر منابع مختلف کربن و تنظیم کننده‌های رشد بر میزان رشد و بازایی *Dactylorhiza species* از خانواده ارکیده حاکی از آن بود که با افزایش غلظت ساکارز بیشتر از ۳۰ گرم در لیتر، رشد و تکثیر شاخه و جوانه‌ها کمتر شده است (Wotavova *et al*., 2007)

نوع و غلظت کربوهیدرات‌های مختلف در ریزازدیادی شبه‌کورم از ریزنمونه‌های ارکیده کاتاستوم اثرگذار است. اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول بر تعداد، طول و عرض شبه کورم‌های تولید شده در سطح احتمال ۱٪ معنی‌داری می‌باشد (جدول۲). تیمار مانیتول اثرگذاری بیشتر و مطلوب‌تری بر تشکیل شبه‌کورم داشت (شکل ۸). بین غلظت‌های مختلف مانیتول، غلظت‌های پایین‌تر آن نسبت به غلظت‌های بالاتر اثر مطلوب‌تری روی تعداد، طول و عرض شبه کورم‌های تولید شده داشته که بیشترین میانگین تعداد (۱/٥٤عدد)، طول (۱۸/۷۰ میلی متر) و عرض (۷/۰٥ میلی متر) آن مربوط به غلظت ۱۰/۰۸ گرم در لیتر مانیتول می‌باشد و این تیمار اختلاف معنی‌داری با تیمارهای دیگر نشان داد (شکل ۸).

تیمارهای مختلف مانیتول (شکل ۸) به لحاظ تعداد، طول و عرض شبه‌کورم نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان دادند و هم‌زمان با ترکیب شدن مانیتول با ساکارز و افزایش غلظت آن تعداد، طول و عرض شبه کورم‌های تولید شده کاهش یافت. بیشترین تعداد و اندازه شبه کورم‌ها مربوط به غلظت ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بود. با افزایش ساکارز تا سطح ٤٠ گرم در لیتر تعداد و اندازه شبه کورم‌ها به کمترین مقدار خود رسید (شکل۸). همه غلظت‌های مانیتول استفاده شده در این مطالعه برای تولید و رشد شبه‌کورم به نسبت ساکارز مناسب‌تر بوده و غلظت ۱۰/۰۸ گرم در لیتر مانیتول اثرگذاری مطلوب‌تری داشت.

اثر کربوهیدرات‌های مختلف بر میزان تشکیل شبه‌کورم از ریزنمونه‌های ارکیده شاهپرکی نشان داد که گلوکز یک کربوهیدرات مناسب برای تولید شبه کورم، ساکارز برای تشکیل کالوس و سوربیتول و مانیتول یک کربوهیدرات مطلوب برای رشد شبه‌کورم‌ها بودند (Tokuhara and Mii, 2003). زمانی که از قندهای مختلف به عنوان منبع کربن برای کشت*Grammatophyllum speciosum Blume* نیز استفاده شد، نتایج نشان داد که در محیط کشت حاوی گلوکز و ساکارز از تشکیل شبه کورم جلوگیری شد ولی در مقابل در محیط‌های کشت حاوی مانیتول و سوربیتول تعداد شبه‌کورم‌های تولید شده بیشتر و همچنین سبزتر بود (Pimsen and Kanchanapoom, 2011). در آزمایش حاضر استفاده از



شکل۸- اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول بر میانگین تعداد، طول و عرض شبه کورم‌های تولید شده از هر ریزنمونه ارکیده کاتاستوم پس از ۹۰ روز. حرف‌های همانند بر بالای میله‌ها نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد هست.

کربوهیدرات در محیط کشت بافت ارکیده کاتاستوم علاوه بر تاثیری که بر رشد و تولید گیاهچه و برگ داشته اثر به سزایی در تولید شبه‌کورم نیز داشته است. تعداد، طول و عرض شبه کورم‌های تولید شده در آزمایش انجام شده در همه غلظت‌های مانیتول بیشتر از ساکارز بود.

تاثیر مثبت مانیتول در رشد و تولید شبه‌کورم ارکیده می تواند با نقش مانیتول در فعالیت فیزیولوژیکی گیاهان در ارتباط باشد (Antensari *et al.*, 2014). از طرفی دیگر اثر مثبت مانیتول بر تولید و رشد گیاه را به دلیل هیدرولیز کند آن در مقایسه با ساکارز نسبت دادند، زیرا هیدرولیز آهسته قند منبع کربن در دسترس گیاه را محدود می‌کند و همین باعث ایجاد گرسنگی و یک فشار اسمزی منفی برای انتقال قند به گیاه می شود. به این صورت است که قندها از جایی که دارای غلظت بیشتری هستند به سمت بخشی که دارای قند کمتری است انتقال پیدا می‌کنند (Gheng *et al.*, 2006). شاید به همین دلیل مانیتول به نسبت ساکارز در تولید شبه کورم مناسب‌تر بود و سبب تولید بیشترین میانگین تعداد تولید شبه کورم دراین آزمایش گردید (شکل ۸). زمانی که مانیتول در ترکیب با ساکارز قرار گرفت به نسبت مانیتول به تنهایی تشکیل شبه کورم کمتر شد در نهایت می‌توان این طور گفت که از آن جایی که تولید شبه کورم به آهستگی صورت می‌گیرد ساکارز با هیدرولیز سریع نقش منفی و مانتیول نقش مثبتی در تولید شبه کورم دارند.

نتیجه گیری کلی

در پژوهش حاضر برخی از مهمترین عواملی که در ریزازدیادی ارکیده کاتاستوم اثر دارند مانند نوع ریزنمونه، شرایط روشنایی- تاریکی و هم‌چنین نوع و غلظت کربوهیدرات‌ها، مورد بررسی قرارگرفتند. با توجه به نتایج، تولید برگ، ریشه-زایی، تولید گیاهچه‌های جانبی نو و هم‌چنین میزان قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌ها در این آزمایش تحت تاثیر حضور نور و نوع ریزنمونه قرار گرفتند. از بین تیمارهای مختلف، ریزنمونه شاخه در شرایط روشنایی برای تولید برگ و ریشه بیشتر و ریزنمونه ریشه در شرایط تاریکی برای تولید گیاهچه های جانبی بیشتر مناسب‌ترین تیمارها بودند. علاوه بر تولید برگ و ریشه و تولید گیاهچه‌های جانبی سطح قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌ها نیز تحت تاثیر تاریکی و روشنایی قرار گرفت. در هر دو نوع ریزنمونه، سطح قهوه‌ای شدن در تیمار

تاریکی کمتر از تیمار روشنایی بود، لذا تیمار تاریکی برای افزایش کیفیت ریزنمونه‌ها مناسب‌ترین تیمار شناخته شد.

در آزمایش دوم با مقایسه پرآوری گیاهچه‌های ارکیده کاتاستوم در غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول، تولید برگ، ریشه زایی، تولید گیاهچه‌های جانبی نو و تشکیل شبه‌کورم از ریزنمونه‌های ارکیده کاتاستوم تحت تاثیر نوع و غلظت کربن بیرونی قرار گرفت. ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر برای تولید برگ، ریشه‌زایی و تشکیل گیاهچه‌های جانبی و مانیتول با غلظت ۱۰/۰۸ گرم در لیتر برای تولید و رشد شبه‌کورم مناسب‌ترین تیمارها بودند. غلظت‌های بالاترتاثیری بازدارنده بر باززایی داشت، چنان که با افزایش غلظت ساکارز به سطح ۴۰ گرم در لیتر، کمترین تعداد و طول برگ و ریشه، کمترین تعداد گیاهچه جانبی و کمترین تعداد، طول و عرض شبه کورم تولید شد. بنابراین با توجه به نتایج گزارش حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که تغییر در نوع ریزنمونه، شرایط نوری و نوع و میزان کربوهیدرات مصرفی، باعث تغییر در رشد و کیفیت گیاهچه‌ها می شود. عملکرد و رشد دلخواه در ریزازدیادی هر گونه و گاهی هر رقم گیاهی، نیازمند تهیه و بهینه سازی مواد و روش کار است و یافته‌های این آزمایش در مورد اثر نور، نوع ریزنمونه، نوع و غلظت کربوهیدرات برای بهینه سازی ریزازدیادی ارکیده کاتاستوم، جهت تولید انبوه می‌تواند مفید واقع شود.

منابع

Antensari F., Mariani T. and Wicaksono A. (2014) Micropropagation of *Phalaenopsis* R11 x R10 through somatic emberyogenesis method. Asian Journal of Applied Sciences 2: 145-150.

Baker A., Kaviani B., Nematzadeh G. and Negahdar N. (2014) Micropropagation of *Orchis catasetum*, A rare and endangered orchid. Acta Scientiarum Polonorom., Hortorum Cultus 13: 197-205.

Baque M. A., Shin Y. K., Lee E. J. and Paek K. Y. (2011) Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of Calanthe hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). Australian Journal of Crop Science 5: 1247-1254.

Begna S. H., Dwyer L. M., Cloutier D., Assemat L., DiTommaso A. and Zhou X. M. (2002) Decoupling of light intensity effects on the growth and development of C3 and C4 weed species through sucrose supplementation. Jornal of Exprimental Botany 53: 1935–1940.

Champagnat M (1971) Recherches sur la multiplication végétative de Neottia nidus-avis Rich. Annales des Sciences Naturelles Botanique et Biologie Végetale, 12: 209–248.

Colli S & Kerbauy GB (1993) Direct root tip conversion of *Catasetum* into protocorm-like bodies. Effects of auxin and cytokinin. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 33: 39–44.

Divakaran M., Babu K. N. and Peter K. V. (2006) Conservation of Vanilla species, *in vitro*. Scientia Horticulturae. 110: 175-180.

Ekhlas A. Morfeine. (2014) Effect of Sucrose and Glucose Concentrations on Micropropagation of Mus sp.cv. Grand Naine. Journal of Applied and Industrial Sciences 2: 58-62.

Gauchan D. P. (2012) Effect of different sugars on shoot regeneration of maize (*Zea mays L.*). Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology 8: 119-124.

Gheng, F. Y., Do Y. Y. Liauh Y. W., Chung J. P. and Huang P. L. (2006) Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of Oncidium *'Gower Ramsey'by* adjusting carbohydrate sources. Plant Science 170: 1133-1140.

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

Gibson, S. I. (2000) Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. Plant Physiology 124: 1532-1539.

Gould A. R., Everett N. P., Wang T. L. and Street H. E. (1981) Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. Protoplasma 106: 1-13.

Karam N.S. and M. Al-Majathoub. (2000) In vitro shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum.*Mill, Scientia Horticulturae 86: 323–333.

Kerbauy GB (1984a) Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of root tips of *Catasetum* (Orchidaceae). Z. Pflanzenphysiol. 113: 287–291.

Kerbauy GB (1984b) Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. Plant Cell Reporter. 3: 27–29.

Kouami K. O. K. and O. U. (2015) Influence of various carbohydrates on the in vitro micropropagation of Nauclea diderrichii (De Wild T. Durand) Merrill, an endangered forest species in Togo. African Journal of Biotechnology 14: 1283-1289.

Leva A., Sadeghi H. and Petruccelli R. (2013) Carbohydrates modulate the In Vitro growth of olive microshoots. I. the analysis of shoot growth and branching patterns. Journal of Plant Growth Regulation 32: 53-60.

Meghwal P.R.H.C., Sharma A.M., Goswami and Srivastava K.N. (2001) Effect of stock plant etiolation on in vitro phenol exudation during culture establishment of guava (*Psidium guajava L.)*. Indian Journal of Horticultural 58: 328–331.

Murashige T., and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissu cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nowak B., Miczyński K. and Hudy L. (2004) Sugar uptake and utilisation during adventitious bud differentiation on in vitro leaf explants of 'Wegierka Zwykła'plum (*Prunus domestica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 255-260.

Peres, L. E. P., Zsögön A. and Kerbauy G. B. (2009) Abscisic acid and auxin accumulation in *Catasetum fimbriatum* roots growing in vitro with high sucrose and mannitol content. Biologia Plantarum 53: 560-564.

Pimsen M. and Kanchanapoom K. (2011) Effect of Basal Media and Sugar Types on *in Vitro* Regeneration of *Grammatophyllum speciosum Blume*. Notulae Scientia Biologicae 3: 101-104.

Peterson, R. L., (1975) The initiation and development of root buds. In: The Development and Function of Roots. (eds. Torrey, J. G., Clarkson, D. T.) Pp. 125–161. Academic Press, New York.

Rolland F., Moore B. and Sheen J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Plant Cell 14: 185-205.

Sharma R. R. and Singh S. K. (2002) Etiolation reduces phenolic content and polyphenol oxidase activi at the pre-culture stage and in-vitro exudation of phenols from mango explants. Tropical Agriculture 79: 94-99.

Shimizu-Sato S., Tanaka M. and Mori H. (2009) Auxin–cytokinin interactions in the control of shoot branching. Plant Molecular Biology 69(4): 429-435.

Stasolla C. and Yeun E. C. (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 15-35.

Suzuki R.M., Kerbauy G.B. and Zaffari G.R. (2004) Endogenous hormonal levels and growth of dark incubated shoots of Catasetum fimbriatum. Journal of Plant Physiology. 161: 929–35.

Suzuki R. M., Kerbauy G. B., Pescador R., Purgatto E., Ceccantini G. C. and Ferreira W. D. M. (2010) Dark-induced hormone changes coincide with the resumption of light-inhibited shoot growth in *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). Journal of Plant Physiology 167: 375-381.

Swamy M. K., Sudipta K. M., Balasubramanya S. and Anuradha M. (2010) Effect of different carbon sources on in vitro morphogenetic response of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.). Journal of Phytology. 2: 11-17.

Talukder S. K., Nasiruddin K. M., Yasmin S., Hassan L. and Begum R. (2003) Shoot proliferation of *Dendrobium* orchid with BAP and NAA. Journal of Biological Sciences 3: 1058-1062.

Tokuhara K. and Mii M. (2003) Highly efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of Phalaenopsis orchids by adjusting carbohydrate sources. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant 39: 635-639.

Vaz A. P. A., Kerbauy G. B. and Figueiredo-Ribeiro R. C. (1998) Changes in soluble carbohydrates and starch partitioning during vegetative bud formation from root tips of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 105-111.

Wang Q. C., Tang H. Quan Y. and Zhou G. R. (1994) Phenol linduced browning and establishment of shoot-tip explnts of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear cultured in vitro. Journal of Horticultural Science 69: 833–839.

Wotavová-Novotná K., Vejsadová H. and Kindlmann P. (2007) Effects of sugars and growth regulators on in vitro growth of Dactylorhiza species. Biologia Plantarum 51: 198-200.

Wu C. H., Dewir Y. H., Hahn E. J. and Paek K. Y. (2006) Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. Journal of Plant Biology 49: 193-199.

Effect of explants type, light and polysaccharides on micropropagation of Catasetum orchid *(Catasetum fimbriatum*, L.)

Elham Mohamadi, Vida Chalavi* and Hossein Moradi

Department of Horticulture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, PO-Box 578, Sari,
(Received: 06/05/2017, Accepted: 28/02/2018)

Abstract

The aim of present study was to investigate the effect of explants types, in light and darkness condition on propagation of lateral plantlets and also to investigate the effect of type and concentrations of carbohydrates on the regeneration of *Catasetum* orchid plantlets in two experiments. First experiment for propagation of lateral plantlets was done with two types of explants, shoot tips and root tips, in combination with different lighting conditions (light and darkness) in completely randomized design with 5 replications. According to obtained results, the production of leaves, roots, lateral plantlets and the intensity of explant necrosis were affected by explants types and environmental conditions of light and darkness treatments and were statistically significant at ($p \leq 0.01$ & 0.05). The highest mean number of leaves (21.4), roots (5) were from shoot tip explants in light and the highest mean number of lateral plantlets (17.8) was observed in root explants in darkness. In second experiment, the effect of different concentrations of sucrose and mannitol was investigated on the regeneration of *Catasetum* orchid plantlets. Experimental treatments included three levels of sucrose, 20, 30, 40 g/l, two levels of mannitol, 10.08 and 22 g/l in combination with 20 g/l of sucrose and mannitol alone at 10.08 g/l concentration. The highest mean number of formed lateral plantlets from each explant was 10.48 which was obtained at 30 g/l sucrose concentration. For production and growth of protocorm like body, all mannitol concentrations were better than sucrose and the highest protocorm like body mean number (1.54) was produced in 10.08 g/l mannitol concentration. In general conclusion, the highest lateral plantlets regeneration occurred from root explants in darkness treatment by using sucrose.
Keywords: Orchid catasetum, Regeneration, Darkness, Sucrose, Mannitol, Explant type

Corresponding author, E-mail: v.chalavi@sanru.ac.ir