DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

# اثر طیف‌های مختلف نوری و محیط کشت‌های مختلف بر پارامترهای رشدی PLB گونه‌ای از ارکیده در حال انقراض (*Phalaenopsis pulcherrima*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

**کبری احمدی چاشمی[۱]، ولی اله قاسمی عمران[۲]*، راهله ابراهیمی[۱]، حسین مرادی[۳] و وحید عبدوسی[۱]**

[۱] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه تخصصی علوم باغبانی و زراعی

[۲] ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، موسسه ژنتیک و بیوتکنولوژی کشاورزی طبرستان، گروه زراعت

[۳] ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم زراعی و پژوهشکده فناوری‌های زیستی گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۳۰

## چکیده

لامپ‌های LED می‌توانند به عنوان جایگزین مفیدی برای کشت درون‌شیشه‌ای گونه‌های مختلف گیاهی استفاده شوند که نه تنها رشد و نمو گیاه را تسریع می‌کند، بلکه هزینه‌های روشنایی را نیز کاهش می دهند. در تحقیق حاضر، اثر تیمارهای مختلف نوری (نور فلورسنت (شاهد)، نور LED آبی، قرمز، ۷۰ درصد آبی، ۳۰ درصد قرمز، ۷۰ درصد قرمز، ۳۰ درصد آبی و نور SMD) بر نمو PLB (Protocorm-like bodies)، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، محتوای پروتئین و قندهای محلول گیاهچه‌های *Phalaenopsis pulcherrima* حاصل از ریزنمونه‌های پروتوکورم بر روی دو محیط کشت MS ½ و VW یک میلی گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌های رشد (BAP+IBA) یا بدون آن بررسی شدند. تیمارهای LED و SMD باعث بهبود تشکیل و رشد PLBها در مقایسه با لامپ‌های فلورسنت شدند که بالاترین میزان PLB و بیومس به ترتیب تحت تیمارهای LED آبی و قرمز ایجاد شدند. تحت تیمارهای نوری مشابه، بالاترین میزان PLBها و بیومس بر روی محیط کشت MS+IBA+BAP ½ بدست آمدند. در مقایسه با نور فلورسنت، لامپ‌های LED و SMD باعث افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی شدند. بین محیط کشت‌های بکار رفته، بالاترین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی بر روی محیط کشت MS+IBA+BAP ½ مشاهده شد. در مقایسه با نورهای فلورسنت، افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوای پروتئین و قندهای محلول تحت تیمارهای نوری LED و SMD مشاهده شد که بیشترین افزایش تحت تیمار نور آبی ثبت گردید، بنابراین، نتایج ما ثابت کردند که استفاده از LEDها می‌تواند یک راه عملی و مؤثر برای افزایش القای PLBها و بهبود رنگیزه‌های فتوسنتزی در کشت آزمایشگاهی *P. pulcherrima* باشند.

**واژه‌های کلیدی**: کشت بافت، ارکیده، لامپ LED، نور فلورسنت، PLB

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۳۲۸۳۶۲۱ ، پست الکترونیکی: Ghasemiomran@sanru.ic.ir

## مقدمه

خانواده ارکیداسه (Orchidaceae) با بیش از ۸۰۰ جنس و ۲۰۰۰ گونه، یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهان گلدار هستند که هم از نظر گل‌های شاخه بریده و هم از نظر گیاهان گلدانی در باغبانی بسیار مهم هستند (۱۹). در بسیاری از کشورها از جمله مالزی، سنگاپور، استرالیا، تایلند و ایران، گیاهان ارکیده به دلیل تنوع در شکل و رنگ گل در حال تبدیل شدن به یک صنعت میلیون دلاری هستند (۱۰). جنس *Phalaenopsis* (کلمه یونانی به معنای

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

شبیه شب پره) یکی از مهم‌ترین جنس‌ها در خانواده ارکیداسه است که شامل زیباترین گل‌های جهان می‌باشد (۲۰و ۲۳). گونه *Phalaenopsis pulcherrima* گونه‌ای معطر بومی آسیای جنوب شرقی است که در تمام طول سال گل می‌دهد (۹). تکثیر جنسی گونه‌های ارکیده به دلیل درصد بالای بذرهای عقیم و درصد جوانه‌زنی کم (کمتر از ۱ درصد) دشوار است (۲۷). از سوی دیگر، تولیدمثل غیرجنسی گیاهان ارکیده به دلیل تأثیر آن بر رشد گیاه مادر و زمان بر بودن، محدودیت‌های خود را دارد (۲۶). استفاده از کشت بافت می‌تواند هم محدودیت‌های موجود در تکثیر گیاه ارکیده را به میزان زیادی کاهش دهد و هم امکان تکثیر سریع گیاه ارکیده در مقیاس بزرگ را مهیا سازد. مطالعات مختلف ریزازدیادی و حفاظتی روی گیاهان ارکیده با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت انجام شده است که نشان می‌دهد رشد و نمو گیاه می‌تواند به طور مؤثر تحت تأثیر کیفیت و شدت نور در شرایط درون-شیشه‌ای باشد (۷، ۲۲و ۲۷). نور (از نظر شدت، کیفیت و مدت زمان تابش) یکی از مهم‌ترین عوامل تنظیم کننده رشد و نمو در گیاهان است و می‌تواند نقش مؤثری در ریخت‌زایی و در نتیجه تکثیر گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای داشته باشد (۷ و ۲۷). لامپ‌های فلورسنت معمولاً بعنوان منابع نور در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شوند که طیف وسیعی از طول موج‌های ۳۵۰-۷۵۰ نانومتر را ساطع می-کنند که اکثر آنها برای رشد گیاه غیرضروری و با کیفیت پایین هستند (۱۱). با این حال، لامپ‌های LED (Light-emitting diodes) به دلیل سطح کم انتشار حرارتی، ویژگی طول موج، عمر طولانی، تخریب کم و پهنای باند باریک می‌توانند بعنوان منبع نور جایگزین در کشت بافت گیاهی استفاده شوند. با حذف طول موج‌های نور غیرفعال فتوسنتزی، لامپ‌های LED می‌توانند به طور مؤثر رشد گیاه را در مقایسه با لامپ‌های فلورسنت بهبود ببخشند (۷). نورهای تک رنگ LED قرمز (۶۶۰ نانومتر)، آبی (۴۶۰ نانومتر)، سفید (۴۲۰ نانومتر) و ترکیبی از نورهای LED قرمز و آبی معمولاً در تکثیر گیاهان به صورت کشت بافت استفاده می‌شوند (۱۱). طول موج‌های مختلف لامپ LED می‌توانند پاسخ‌های فیزیولوژیکی، رشدی و مورفوژنتیک مختلفی را در گونه‌های مختلف گیاهی القاء کنند. بنابراین، ارزیابی اثرات نورهای LED مختلف بر رشد و تکثیر گونه‌های گیاهی ارزشمند در کشت بافت مورد توجه است (۷و ۲۷). در تحقیقی نشان داده شد که استفاده از نورهای قرمز/آبی (۱:۱) باعث القای تقسیم سلولی در گیاهان کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای در مقایسه با گیاهان کشت شده تحت نورهای فلورسنت یا نورهای تک رنگ شد (۱۲). با وجود اهمیت اقتصادی *Phalaenopsis pulcherrima*، نقش نورهای مختلف LED در باززایی و تکثیر گیاه مذکور در قالب کشت بافت تا به امروز مورد توجه قرارنگرفته است. از این رو، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات نورهای مختلف LED بر رشد، ریخت‌زایی و القای PLB در *P. pulcherrima* رشد یافته در شرایط درون-شیشه‌ای و کمک به بهینه‌سازی تکنیک‌های کشت بافت برای تکثیر در مقیاس بالای این ارکیده تجاری انجام شد.

## مواد و روشها

این پژوهش به منظور بررسی اثر طیف‌های نوری متفاوت و محیط‌های کشت مختلف بر رشد PLB ارکیده *P. pulcherrima* در محیط درون‌شیشه‌ای در آزمایشگاه کشت بافت موسسه ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. PLBهای سالم و گندزدایی‌شده ارکیده *P. pulcherrima* از شرکت گیاهان نیشا درون شیشه شمال واقع در شهرستان ساری تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور تولید PLB، میوه‌های گیاه (کپسول‌های بذر) که حاوی تعداد زیادی از بذرهای گیاه ارکیده می‌باشند، انتخاب شده و به محیط آزمایشگاهی منتقل شدند. به منظور ضدعفونی، کپسول‌ها پس از شست و شو با آب جاری به مدت ۲۰ دقیقه و سپس با الکل (اتانول) ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه با

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی شدند. در نهایت کپسول‌ها به الکل ۷۰ درصد آغشته شده و به مدت ۳۰ ثانیه زیر هود شعله‌ور شدند. پس از ضدعفونی، کپسول‌ها شکافته شده و بذرها به محیط کشت VW که از قبل استوک آنها تهیه شده و درون ظروف شیشه‌ای آماده شدند، منتقل شدند. شش ماه پس از کشت، PLB شکل گرفت و در این تحقیق مورد استفاده قرارگرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. فاکتورهای بکار رفته در این تحقیق شامل طیف‌های نوری مختلف در ۶ سطح (لامپ فلورسنت (شاهد)، نور LED قرمز ۱۰۰ درصد، نور LED آبی ۱۰۰ درصد، نور LED قرمز:آبی (۳۰:۷۰ درصد)، نور LED قرمز:آبی (۷۰:۳۰ درصد) و لامپ‌های SMD)( Surface Mount Device) و محیط کشت در چهار سطح (موراشیگ و اسکوگ (MS ½) بدون تنظیم کننده رشد، محیط MS ½ حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر تنظیم‌کننده‌های رشدی IBA (Indole-3-butyric acid) و BAP (Benzylaminopurine)، محیط کشت واسین و ونت (VW) بدون تنظیم کننده رشد و محیط VW حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر تنظیم‌کننده‌های رشدی IBA و BAP بود. به محیط‌های پایه MS ½ و VW، ذغال فعال شده (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، ساکارز (۲۵ گرم بر لیتر) و آگار (۷/۸ گرم بر لیتر) اضافه شد. pH محیط‌های کشت در ۵/۷ تنظیم شدند و در ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. برای ضدعفونی کردن، پروتوکورم‌ها ابتدا ۲۰ دقیقه زیر شیر آب قرارگرفتند و سپس ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و در ادامه، ۲ بار با آب مقطر استریل به خوبی شسته شدند. در هریک از ظروف شیشه‌ای کشت بافت، ۴ عدد ریزنمونه پروتوکروم قرارگرفت و در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۵ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند. فاصله نمونه‌ها با منبع نوری یکسان و ثابت با شدت ۴۰ میکرومولار بر مترمربع ثانیه تنظیم شدند. ۶۰ روز بعد از شروع کشت، نمونه‌برداری انجام شد و صفت‌های موردنظر مورد بررسی قرارگرفتند. یک هفته پس از کشت، تیمارها اعمال شدند. تعداد PLBها با استفاده از میکروسکوپ استرئو شمارش شدند. بعد از ثبت وزن‌تر نمونه‌ها، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و وزن خشک آنها ثبت گردید.

برای اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئیدها، ۰/۱ گرم بافت از نمونه‌ها در پنج میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد هموژن شده و بعد از انجام سانتریفیوژ با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، مایع فوقانی برداشته و حجم آن با استن به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در نهایت به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد و محتوای رنگیزه‌های کلروفیل *a*، *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها محاسبه شد (۱۴). محتوای قندهای محلول برگ براساس روش فنل-اسیدسولفوریک تعیین شد. دراین روش، ۰/۵ گرم از برگ-های تازه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد آسیاب شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره همگن‌شده با ۳ میلی‌لیتر انترون (۱۵۰ میلی‌گرم انترون در ۱۰۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۷۲ درصد) مخلوط گردید. عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. میزان قندهای محلول برگ با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز مشخص و بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید. برای استخراج عصاره آنزیمی، بافت تازه برگ (۰/۵ گرم) در یک میلی‌لیتر از بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.0) شامل کلرید پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، آسکوربات ۱ میلی‌مولار، بتا-مرکاپتواتانول ۵ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۰ درصد هموژن شد. از محلول رویی بعد از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه برای تعیین محتوای پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان استفاده شد. محتوای پروتئین طبق روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۳). فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب $H_2O_2$ در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. محلول واکنش

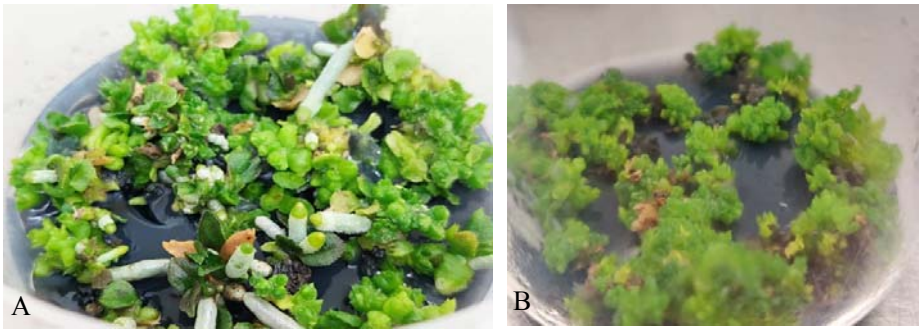
مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲
DOI: 10.22034/jpr.2023.2204

شامل عصاره آنزیمی، بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.0) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار بود (۱). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با قرائت جذب محلول واکنش شامل عصاره آنزیمی، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۱۳ میکرومولار و نیتروبلوتترازولیوم ۶۳ میکرومولار در طول موج ۵۶۰ نانومتر محاسبه گردید (۲). فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس میزان اکسیداسیون دیانیزیدین اکسید شده (3,3′-dianisidine dimethoxybenzidine) در طول موج ۴۶۰ نانومتر انجام شد. محلول واکنش شامل ۲۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH 5.0)، ۳ میلی‌مولار $H_2O_2$، یک میلی‌مولار دیانیزیدین و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. پس از تهیه کوکتل آنزیمی، واکنش با افزودن $H_2O_2$ شروع می‌شود و جذب دیانیزیدین اکسید شده در طول موج ۴۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۸).

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد انجام شد. رسم نمودارها با Excel صورت گرفت.

## نتایج

نتایج نشان داد که القای PLBها تحت تأثیر طیف‌های مختلف نوری و محیط‌های کشت مختلف قرار گرفت (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر طیف‌های مختلف نوری و محیط کشت‌های مختلف و اثر متقابل آنها بر حجم نمونه‌ها، تعداد PLB، تعداد برگ، وزن تر و خشک کل در سطح یک درصد معنی‌داری بود (جدول ۱). اثر ساده طیف‌های مختلف نوری نشان داد که بیشترین حجم نمونه، وزن تر و خشک کل تحت تیمار نوری قرمز حاصل شد، در حالی که، بیشترین تعداد PLB و برگ به ترتیب تحت تیمارهای نور آبی و نور لامپ SMD ایجاد شدند (جدول ۲). تأثیر ساده محیط کشت‌های مختلف نشان داد بیشترین حجم نمونه‌ها، PLB، تعداد برگ، وزن تر و خشک کل در ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت ½ MS همراه با هورمون‌های IBA و BAP در مقایسه با دیگر محیط کشت‌ها بدست آمد (جدول ۳). اثر متقابل تیمارها نشان دادند که بیشترین حجم نمونه در تیمارهای ½ MS+IBA+BAP همراه با نور آبی ۷۰ درصد، قرمز ۳۰ درصد و تیمار نور آبی (به ترتیب ۶/۷۳ و ۶/۳۵ سانتی‌متر مکعب) در مقایسه به دیگر تیمارها ثبت شد. بیشترین و کمترین تعداد PLB به ترتیب در تیمارهای ½ MS+IBA+BAP همراه با نور آبی (۱۶۵/۸ PLB در هر ریزنمونه) و VW+IBA+BAP همراه با نور فلورسانس (۲۶/۳ PLB در هر ریزنمونه) مشاهده شد. در مقایسه با دیگر تیمارها، بیشترین تعداد برگ از هر ریزنمونه و بیشترین وزن تر کل از ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت ½ MS+IBA+BAP همراه با نور LED قرمز و بیشترین وزن خشک کل تحت ½ MS+IBA+BAP همراه با نور آبی ۷۰ درصد/قرمز ۳۰ درصد حاصل شد (جدول ۴).




شکل ۱- القای PLBها از ریزنمونه‌های پروتوکورم بعد از ۶۰ روز از کشت درون‌شیشه‌ای *Phalaenopsis pulcherrima* روی محیط کشت MS

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

حاوی BAP+IBA (A) و محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد (B).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر طیف‌های مختلف نوری و محیط کشت‌های مختلف بر رشد و تکثیر *Phalaenopsis pulcherrima*

| | | میانگین مربعات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | درجه آزادی | حجم نمونه-ها | تعداد PLB | تعداد برگ در هر ریزنمونه | وزن تر کل ریزنمونه | وزن خشک کل ریزنمونه |
| طیف‌های نوری | ۵ | ۱۱$^{**}$ | ۱۱۳۴۱$^{**}$ | ۸۳$^{**}$ | ۰/۰۸$^{**}$ | ۰/۰۰۲$^{**}$ |
| محیط کشت | ۳ | ۶۰$^{**}$ | ۱۴۴۷۸$^{**}$ | ۳۵۲$^{**}$ | ۰/۳$^{**}$ | ۰/۰۱$^{**}$ |
| اثر متقابل تیمارها | ۱۵ | ۳$^{**}$ | ۱۱۲۵$^{**}$ | ۳۳$^{**}$ | ۰/۰۰۶$^{**}$ | ۰/۰۰۱$^{**}$ |
| خطا | ۷۲ | ۰/۱ | ۴/۶ | ۰/۲ | ۰/۰۰۰۲ | ۰۰۰۰۱۰ |
| ضریب تغییرات (٪) | | ۱۰/۷ | ۳/۲ | ۱۱/۳ | ۵/۹ | ۱۴/۲ |

** معنی‌داری در سطح یک درصد

جدول ۲- اثر ساده طیف‌های مختلف نوری بر رشد و تکثیر *Phalaenopsis pulcherrima*

| | حجم ریزنمونه (سانتیمتر مکعب) | تعداد PLB در هر ریزنمونه | تعداد برگ در هر ریزنمونه | وزن تر کل ریزنمونه (گرم) | وزن خشک کل ریزنمونه (گرم) |
|---|---|---|---|---|---|
| FLs | ۱/۷۶ d | ۳۹/۱۹ f | ۱/۰۰ f | ۰/۱۹۴ e | ۰/۰۱۳ d |
| SMD | ۲/۴۷ c | ۵۷/۸۱ d | ۷/۱۳ a | ۰/۳۲۳ b | ۰/۰۳۲ b |
| B | ۳/۴۳ b | ۱۰۸ a | ۳/۸۱ d | ۰/۲۱۵ d | ۰/۰۱۸ c |
| R | ۳/۶۸ a | ۶۵/۸۱ c | ۵/۳۸ b | ۰/۳۶۳ a | ۰/۰۳۵ a |
| 30R/70B | ۳/۲۳ b | ۸۸/۹۴ b | ۴/۸۸ c | ۰/۲۶۹ c | ۰/۰۳۷ a |
| 30B/70R | ۱/۸۴ d | ۴۴/۱۳ e | ۱/۹۴ e | ۰/۲۰۳ e | ۰/۰۱۴ d |

- مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

جدول ۳- اثر ساده محیط کشت‌های مختلف بر رشد و تکثیر *Phalaenopsis pulcherrima*

| | حجم ریزنمونه (سانتیمتر مکعب) | تعداد PLB در هر ریزنمونه | تعداد برگ در هر ریزنمونه | وزن تر کل ریزنمونه (گرم) | وزن خشک کل ریزنمونه (گرم) |
|---|---|---|---|---|---|
| ½ MS | ۳/۳۶ b | ۷۶/۶۷ b | ۲/۳۸ b | ۰/۲۸۸ b | ۰/۰۱۷ b |
| ½ MS + IBA + BAP | ۴/۶۲ a | ۹۷/۱۷ a | ۹/۷۵ a | ۰/۳۹۸ a | ۰/۰۵۵ a |
| VW | ۱/۰۵ d | ۴۲/۱۳ d | ۱/۷۱ c | ۰/۱۶۸ d | ۰/۰۱۲ d |
| VW + IBA + BAP | ۱/۹۱ c | ۵۳/۲۹ c | ۲/۲۵ b | ۰/۱۹۱ c | ۰/۰۱۵ c |

- مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر تیمارهای طیف‌های نوری مختلف و محیط کشت‌های مختلف و اثر متقابل تیمار بر محتوای رنگیزه‌های کلروفیل *a*، *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵).

اثر ساده طیف‌های مختلف نوری بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که بیشترین محتوای کلروفیل *a* و کلروفیل کل از ریزنمونه‌های کشت شده تحت تیمار نوری لامپ‌های SMD حاصل شدند درحالی‌که، بیشترین رنگیزه-

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

های کلروفیل *b* و کاروتنوئیدها به ترتیب تحت تیمارهای نوری ۷۰ درصد نور آبی، ۳۰ درصد نور قرمز و تیمار تک رنگ نور آبی حاصل شدند (جدول ۶).

جدول ۴- اثر متقابل طیف‌های مختلف نوری و محیط کشت‌های مختلف بر رشد و تکثیر *Phalaenopsis pulcherrima*

| محیط کشت | طیف‌های نوری | حجم ریزنمونه (سانتیمتر مکعب) | تعداد PLB در هر ریزنمونه | تعداد برگ در هر ریزنمونه | وزن تر کل ریزنمونه (گرم) | وزن خشک کل ریزنمونه (گرم) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ½ MS | FLs | ۱/۸۲ ± ۰/۲۷ jk | ۵۰/۵ ± ۱/۹ k | ۱/۰ ± ۰/۱ k | ۰/۲۲ ± ۰/۰۱ hi | ۰/۰۱۳ ± ۰/۰۰۱ ijk |
| | SMD | ۳/۷۰ ± ۰/۳۴ de | ۶۰/۳ ± ۳/۳ hi | ۶/۵ ± ۰/۶ e | ۰/۴۱ ± ۰/۰۲ c | ۰/۰۲۸ ± ۰/۰۰۳ de |
| | B | ۳/۸۳ ± ۰/۲۳ d | ۱۳۱/۵ ± ۲/۴ c | ۲/۳ ± ۰/۵ i | ۰/۲۴ ± ۰/۰۱ gh | ۰/۰۱۷ ± ۰/۰۰۱ hij |
| | R | ۴/۷۲ ± ۰/۲۴ c | ۷۱/۸ ± ۲/۸ g | ۱/۵ ± ۰/۶ jk | ۰/۳۷ ± ۰/۰۲ d | ۰/۰۱۷ ± ۰/۰۰۱ hij |
| | 30R/70B | ۳/۳۲ ± ۰/۷۰ ef | ۹۲/۸ ± ۲/۸ d | ۱/۵ ± ۰/۶ jk | ۰/۲۸ ± ۰/۰۲ f | ۰/۰۱۵ ± ۰/۰۰۱ ijk |
| | 30B/70R | ۲/۷۶ ± ۰/۲۹ gh | ۵۳/۳ ± ۱/۹ k | ۱/۵ ± ۰/۶ jk | ۰/۲۰ ± ۰/۰۱ i | ۰/۰۱۴ ± ۰/۰۰۱ ijk |
| ½ MS + IBA + BAP | FLs | ۳/۰۹ ± ۰/۳۶ fg | ۵۱/۰ ± ۱/۸ k | ۱/۰ ± ۰/۱ k | ۰/۳۰ ± ۰/۰۱ f | ۰/۰۲۳ ± ۰/۰۰۱ fg |
| | SMD | ۳/۷۷ ± ۰/۲۵ de | ۷۵/۵ ± ۱/۳ f | ۱۳/۸ ± ۰/۵ c | ۰/۴۸ ± ۰/۰۱ b | ۰/۰۵۵ ± ۰/۰۰۶ c |
| | B | ۶/۳۵ ± ۰/۴۱ a | ۱۶۵/۸ ± ۱/۷ a | ۹/۵ ± ۰/۶ d | ۰/۳۲ ± ۰/۰۲ e | ۰/۰۳۱ ± ۰/۰۰۱ d |
| | R | ۵/۳۷ ± ۰/۳۴ b | ۸۹/۵ ± ۱/۹ e | ۱۶/۰ ± ۰/۸ a | ۰/۵۰ ± ۰/۰۲ a | ۰/۰۹۰ ± ۰/۰۰۸ b |
| | 30R/70B | ۶/۷۳ ± ۰/۸۴ a | ۱۴۳/۵ ± ۲/۷ b | ۱۴/۵ ± ۰/۶ b | ۰/۴۷ ± ۰/۰۱ b | ۰/۱۰۵ ± ۰/۰۱۳ a |
| | 30B/70R | ۲/۴۲ ± ۰/۱۶ hi | ۵۷/۸ ± ۲/۱ ij | ۳/۸ ± ۰/۵ g | ۰/۳۳ ± ۰/۰۲ e | ۰/۰۲۴ ± ۰/۰۰۱ ef |
| VW | FLs | ۰/۸۶ ± ۰/۰۴ no | ۲۹/۰ ± ۲/۶ n | ۱/۰ ± ۰/۲ k | ۰/۱۰ ± ۰/۰۲ l | ۰/۰۰۸ ± ۰/۰۰۱ lm |
| | SMD | ۰/۷۲ ± ۰/۱۶ o | ۳۷/۰ ± ۰/۸ m | ۳/۸ ± ۰/۵ g | ۰/۲۰ ± ۰/۰۱ i | ۰/۰۲۰ ± ۰/۰۰۱ fgh |
| | B | ۱/۵۰ ± ۰/۰۸ klm | ۵۸/۳ ± ۲/۱ ij | ۲/۰ ± ۰/۰ ij | ۰/۱۵ ± ۰/۰۲ jk | ۰/۰۱۲ ± ۰/۰۰۱ jkl |
| | R | ۱/۲۴ ± ۰/۱۰ mn | ۴۳/۳ ± ۱/۵ l | ۱/۰ ± ۰/۱ k | ۰/۲۶ ± ۰/۰۲ g | ۰/۰۱۸ ± ۰/۰۰۱ ghi |
| | 30R/70B | ۱/۳۷ ± ۰/۱۴ klm | ۵۶/۸ ± ۲/۲ j | ۱/۰ ± ۰/۰ k | ۰/۱۶ ± ۰/۰۱ j | ۰/۰۱۲ ± ۰/۰۰۲ jkl |
| | 30B/70R | ۰/۶۴ ± ۰/۰۸ o | ۲۸/۵ ± ۱/۷ n | ۱/۵ ± ۰/۶ jk | ۰/۱۵ ± ۰/۰۱ jk | ۰/۰۰۴ ± ۰/۰۰۱ m |
| VW + IBA + BAP | FLs | ۱/۲۶ ± ۰/۱۴ lmn | ۲۶/۳ ± ۱/۰ n | ۱/۰ ± ۰/۰ k | ۰/۱۷ ± ۰/۰۳ j | ۰/۰۱۰ ± ۰/۰۰۱ kl |
| | SMD | ۱/۷۱ ± ۰/۱۵ jkl | ۵۸/۵ ± ۱/۷ ij | ۴/۵ ± ۰/۶ f | ۰/۲۰ ± ۰/۰۱ i | ۰/۰۲۳ ± ۰/۰۰۲ ef |
| | B | ۲/۰۵ ± ۰/۱۴ ij | ۷۶/۵ ± ۲/۴ f | ۱/۵ ± ۰/۶ jk | ۰/۱۵ ± ۰/۰۲ jk | ۰/۰۱۱ ± ۰/۰۰۱ kl |
| | R | ۳/۴۰ ± ۰/۳۴ def | ۵۸/۸ ± ۲/۸ ij | ۳/۰ ± ۰/۳ h | ۰/۳۲ ± ۰/۰۲ e | ۰/۰۱۵ ± ۰/۰۰۱ hijk |
| | 30R/70B | ۱/۵۱ ± ۰/۳۴ klm | ۶۲/۸ ± ۲/۸ h | ۲/۵ ± ۰/۶ hi | ۰/۱۷ ± ۰/۰۲ j | ۰/۰۱۵ ± ۰/۰۰۱ ijk |
| | 30B/70R | ۱/۵۲ ± ۰/۲۱ klm | ۳۷/۰ ± ۱/۸ m | ۱/۰ ± ۰/۰ k | ۰/۱۴ ± ۰/۰۱ k | ۰/۰۱۴ ± ۰/۰۰۱ ijk |

- مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

بررسی اثر تیمار ساده محیط کشت بر رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد بالاترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت ½ MS+IBA+BAP حاصل شدند درحالی‌که، کمترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی بر روی محیط کشت VW مشاهده شد (جدول ۷). اثر متقابل تیمارها نشان داد که بیشترین و کمترین میزان محتوای کلروفیل *a* به ترتیب، در تیمارهای ½ MS+IBA+BAP همراه با لامپ SMD و VW همراه با ۷۰ درصد نور قرمز، ۳۰ درصد نور آبی مشاهده شد (شکل A۲). بیشترین میزان محتوای کلروفیل *b* در تیمارهای

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲
DOI: 10.22034/jpr.2023.2204

MS+IBA+BAP ½ همراه با ۷۰ درصد نور آبی، ۳۰ درصد نور قرمز (۱۵ میکروگرم بر گرم وزن تر) و MS ½ همراه با لامپ SMD (۱۴ میکروگرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. با این حال، کمترین میزان کلروفیل *b* تحت تیمار VW همراه با ۷۰ درصد نور قرمز، ۳۰ درصد نور آبی (۲/۹ میکروگرم بر گرم وزن تر) حاصل شد (شکل B۲). بیشترین محتوای کلروفیل کل تحت تیمار MS ½ همراه با نور لامپ SMD مشاهده شد درحالیکه، کمترین میزان کلروفیل کل تحت تیمار VW همراه با ۷۰ درصد نور تک رنگ آبی، ۳۰ درصد نور تک رنگ قرمز ایجاد شد (شکل C۲). در مقایسه با تیمارهای بکار رفته، بیشترین میزان کاروتنوئیدها در ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط-کشت‌های MS+IBA+BAP ½ و MS ½ همراه با نور تک رنگ LED آبی به ترتیب به میزان ۱۰/۳ و ۸/۹ میکروگرم بر گرم وزن تر مشاهده شد و درحالیکه، کمترین میزان کاروتنوئیدها تحت تیمار VW+IBA+BAP همراه با نور فلورسانس ایجاد شدند (شکل D۲).

اثر تیمار طیف‌های مختلف نوری و تیمار محیط کشت و اثر متقابل آنها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز پراکسیداز)، محتوای پروتئین کل و قندهای محلول معنی‌دار بود ($P < 0.01$) (جدول ۸). اثر تیمار ساده طیف‌های مختلف نوری نشان داد که بالاترین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مورد بررسی در تحقیق حاضر تحت تیمار نوری LED آبی مشاهده شد.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر طیف‌های مختلف نوری و محیط کشت‌های مختلف بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی *Phalaenopsis pulcherrima* در کشت *این ویترو*

| | | میانگین مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | درجه آزادی | کلروفیل *a* | کلروفیل *b* | کلروفیل کل | کاروتنوئیدها |
| طیف‌های نوری | ۵ | ۳۱۳$^{**}$ | ۱۰۳$^{**}$ | ۶۴۷$^{**}$ | ۵۸$^{**}$ |
| محیط کشت | ۳ | ۳۴۳$^{**}$ | ۱۸۷$^{**}$ | ۱۰۳۵$^{**}$ | ۸۱$^{**}$ |
| اثر متقابل تیمارها | ۱۵ | ۳۳$^{**}$ | ۷$^{**}$ | ۵۸$^{**}$ | ۹$^{**}$ |
| خطا | ۷۲ | ۲/۲ | ۰/۳ | ۰/۴ | ۰/۱ |
| ضریب تغییرات (٪) | | ۳/۴ | ۷/۵ | ۳/۴ | ۷/۴ |

** معنی‌داری در سطح یک درصد

جدول ۶- اثر ساده طیف‌های مختلف نوری بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی *Phalaenopsis pulcherrima* در کشت *این ویترو*

| | کلروفیل *a* (میکروگرم بر گرم وزن تر) | کلروفیل *b* (میکروگرم بر گرم وزن تر) | کلروفیل کل (میکروگرم بر گرم وزن تر) | کاروتنوئیدها (میکروگرم بر گرم وزن تر) |
|---|---|---|---|---|
| FLs | ۸/۵۸ e | ۴/۸۹ e | ۱۳/۴۶ d | ۱/۴۲ e |
| SMD | ۱۸/۶۱ a | ۹/۷۳ b | ۲۸/۳۳ a | ۳/۱۵ d |
| B | ۹/۳۵ d | ۸/۳۰ c | ۱۷/۶۵ c | ۶/۲۷ a |
| R | ۱۴/۹۲ b | ۷/۱۷ d | ۲۲/۱۰ b | ۴/۵۰ b |
| 30R/70B | ۱۱/۵۸ c | ۱۰/۵۳ a | ۲۲/۱۱ b | ۳/۴۰ c |
| 30B/70R | ۶/۷۷ f | ۴/۲۷ f | ۱۱/۰۳ e | ۱/۲۳ f |

مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

جدول ۷- اثر ساده محیط کشت‌های مختلف بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی *Phalaenopsis pulcherrima* در کشت *این ویترو*

| | کلروفیل *a* (میکروگرم بر گرم وزن تر) | کلروفیل *b* (میکروگرم بر گرم وزن تر) | کلروفیل کل (میکروگرم بر گرم وزن تر) | کاروتنوئیدها (میکروگرم بر گرم وزن تر) |
|---|---|---|---|---|
| ½ MS | ۱۴/۳۳ b | ۹/۶۲ b | ۲۳/۹۵ b | ۴/۵۹ b |
| ½ MS + IBA + BAP | ۱۵/۴۲ a | ۱۰/۱۳ a | ۲۵/۵۴ a | ۵/۲۱ a |
| VW | ۸/۰۷ d | ۴/۶۸ d | ۱۲/۷۵ d | ۱/۶۴ d |
| VW + IBA + BAP | ۸/۷۲ c | ۵/۵۰ c | ۱۴/۲۱ c | ۱/۸۸ c |

- مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

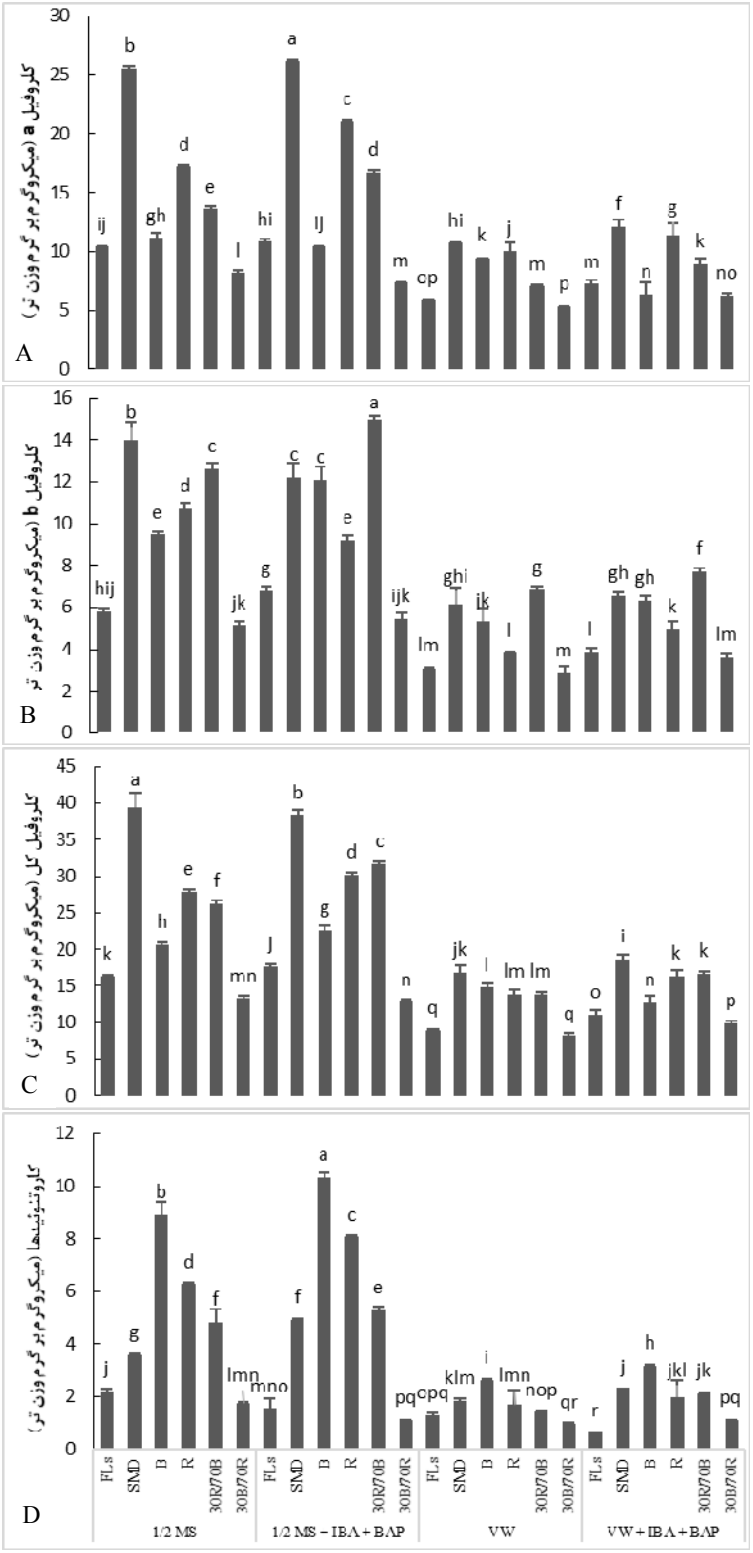
جدول ۸- تجزیه واریانس اثر طیف‌های مختلف نوری و محیط کشت‌های مختلف بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، محتوای پروتئین و قندهای محلول *Phalaenopsis pulcherrima* در کشت *این ویترو*

| | | میانگین مربعات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | درجه آزادی | کاتالاز | سوپراکسید دیسموتاز | پراکسیداز | محتوای پروتئین | قندهای محلول |
| طیف‌های نوری | ۵ | ۵۰۰۱$^{**}$ | ۶۵۸۶$^{**}$ | ۶۸۴$^{**}$ | ۶۴۹۵$^{**}$ | ۴۲$^{**}$ |
| محیط کشت | ۳ | ۴۱$^{**}$ | ۳۳$^{**}$ | ۱۶$^{**}$ | ۲۲۴$^{**}$ | ۰/۲$^{ns}$ |
| اثر متقابل تیمارها | ۱۵ | ۳۲$^{**}$ | ۱۱۲$^{**}$ | ۹۴$^{**}$ | ۸۹$^{**}$ | ۱$^{**}$ |
| خطا | ۷۲ | ۴/۵ | ۶/۲ | ۲/۸ | ۴/۴ | ۰/۲ |
| ضریب تغییرات (٪) | | ۳/۱ | ۲/۹ | ۴/۲ | ۲/۶ | ۳/۶ |

** معنی‌داری در سطح یک درصد، ns عدم معنی‌داری

تیمار نوری تک‌رنگ آبی همچنین باعث افزایش تجمع محتوای پروتئین کل و قندهای محلول در مقایسه با دیگر تیمارهای نوری شد (جدول ۹). اثر تیمارهای ساده محیط کشت‌های مختلف نشان دادند که بالاترین فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار MS ½ و بیشترین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و محتوای پروتئین کل تحت تیمار محیط کشت VW+IBA+BAP ½ مشاهده شد (جدول ۱۰). بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمارهای MS ½ و MS+IBA+BAP ½ همراه با نور تک رنگ آبی در مقایسه با دیگر تیمارها ثبت شد (شکل A۳). نتایج نشان دادند که بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز به ترتیب تحت تیمارهای VW+IBA+BAP همراه با نور تک رنگ آبی و VW همراه با نور تک رنگ آبی مشاهده شد (شکل B۳ و C). بیشترین و کمترین محتوای پروتئین کل به ترتیب تحت تیمارهای VW+IBA+BAP همراه با نور آبی تک رنگ و MS ½ همراه با نور تک رنگ قرمز حاصل شد (شکل A۴). بیشترین میزان قندهای محلول در تیمار VW+IBA+BAP همراه با نور آبی حاصل شد و کمترین قندهای محلول در ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت VW همراه با نور LED قرمز ایجاد شد (شکل B۴).

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲
DOI: 10.22034/jpr.2023.2204




شکل ۲- اثرات طیف‌های مختلف نوری و محیط کشت‌های مختلف بر محتوای کلروفیل *a* (A)، *b* (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئیدها (D) در گیاه *Phalaenopsis pulcherrima* در کشت این ویترو

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

جدول ۹- اثر ساده طیف‌های مختلف نوری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، محتوای پروتئین و قندهای محلول *Phalaenopsis pulcherrima* در کشت این ویترو

| | کاتالاز ( U/mg Pr) | سوپراکسید دیسموتاز (U/mg Pr) | پراکسیداز ( U/mg Pr) | محتوای پروتئین (میکروگرم بر گرم وزن تر) | قندهای محلول (میکروگرم بر گرم وزن تر) |
|---|---|---|---|---|---|
| FLs | ۵۴/۸۲ d | ۶۵/۸۵ f | ۳۲/۲۱ e | ۶۸/۵۷ e | ۱۰/۲۶ c |
| SMD | ۷۷/۱۴ c | ۸۱/۷۶ c | ۴۲/۹۰ b | ۷۷/۷۶ c | ۱۰/۰۷ c |
| B | ۹۰/۸۲ a | ۱۱۹/۷۶ a | ۵۰/۴۷ a | ۱۲۰/۰۳ a | ۱۳/۳۷ a |
| R | ۵۱/۲۵ e | ۷۰/۷۸ e | ۳۵/۲۲ d | ۶۸/۹۴ e | ۸/۸۷ e |
| 30R/70B | ۸۷/۰۲ b | ۱۰۰/۱۲ b | ۳۹/۴۷ c | ۹۴/۱۵ b | ۱۱/۱۸ b |
| 30B/70R | ۵۵/۵۶ d | ۷۸/۰۳ d | ۳۶/۲۹ d | ۷۲/۷۹ d | ۹/۲۵ d |

مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

جدول ۱۰- اثر ساده محیط کشت‌های مختلف بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، محتوای پروتئین و قندهای محلول *Phalaenopsis pulcherrima* در کشت *این ویترو*

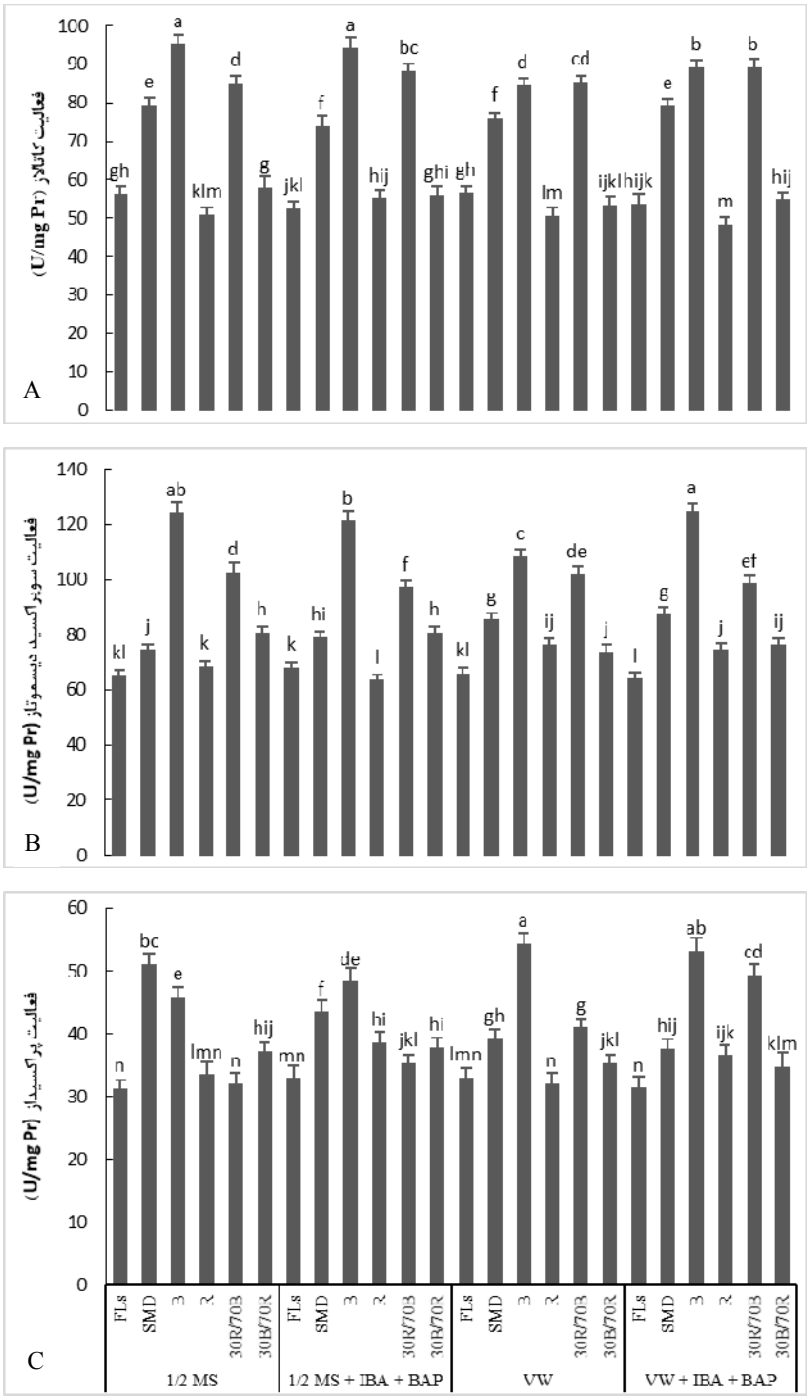
| | کاتالاز (U/mg Pr) | سوپراکسید دیسموتاز (U/mg Pr) | پراکسیداز (U/mg Pr) | محتوای پروتئین (میکروگرم بر گرم وزن تر) | قندهای محلول (میکروگرم بر گرم وزن تر) |
|---|---|---|---|---|---|
| ½ MS | ۷۰/۸۵ a | ۸۶/۰۷ b | ۳۸/۵۶ b | ۸۰/۹۶ c | ۱۰/۴۸ a |
| ½ MS + IBA + BAP | ۶۹/۹۷ ab | ۸۵/۰۹ b | ۳۹/۴۲ b | ۸۴/۸۷ b | ۱۰/۶۱ a |
| VW | ۶۷/۷۹ c | ۸۵/۳۶ b | ۳۹/۲۲ b | ۸۱/۵۱ c | ۱۰/۴۰ a |
| VW + IBA + BAP | ۶۹/۱۲ b | ۸۷/۶۸ a | ۴۰/۵۱ a | ۸۷/۴۸ a | ۱۰/۵۲ a |

- مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

## بحث

نور یکی از مهم‌ترین عوامل تنظیم‌کننده رشد گیاه از طریق گیرنده‌های نوری فعال تحت یک طول موج خاص نور است (۲۵). در سال‌های اخیر، با پیشرفت‌های ایجاد شده در طراحی انواع لامپ‌ها مانند لامپ‌های LED و SMD، مطالعات متعددی بر روی انواع گونه‌های گیاهی مختلف برای بررسی اثرات طیف‌های مختلف نوری برای کشت آزمایشگاهی انجام شده است. بنابراین، هدف این تحقیق بررسی اثر طیف‌های نوری مختلف بر رشد و نمو PLBها از ریزنمونه‌های پروتوکورم گیاه *P. pulcherrima* بر روی محیط‌های کشت‌های MS ½ و VW با استفاده از تنظیم-کننده‌های رشد یا بدون آن (IBA و BAP) می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که همه تیمارهای نوری باعث افزایش القای PLB، تعداد برگ و بیومس در مقایسه با نور فلورسنت شدند. بالاترین میزان القای PLB تحت تیمار نور تک رنگ LED آبی در مقایسه با دیگر تیمارهای نوری مشاهده شد با این‌حال، بیشترین وزن تر و خشک کل ریزنمونه تحت تیمار نوری قرمز ایجاد شد. در گزارشی، نشان داده شد که نور تک رنگ آبی در مقایسه با دیگر تیمارهای نوری باعث افزایش تمایز و تشکیل PLBها در *Oncidium* در شرایط درون‌شیشه‌ای شد (۳۵). به‌طور مشابهی، در گزارش دیگری نشان داده شد که نور تک رنگ LED آبی به صورت تنها یا همراه با نور تک رنگ LED قرمز باعث افزایش القا و رشد PLBها در گونه *Dendrobium kingianum* در شرایط درون‌شیشه‌ای در مقایسه با لامپ‌های فلورسنت شدند (۸).

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲
DOI: 10.22034/jpr.2023.2204




شکل ۳- اثرات طیف‌های مختلف نوری و محیط کشت‌های مختلف بر فعالیت آنزیم کاتالاز (A)، سوپراکسید دیسموتاز (B) و پراکسیداز (C) در گیاه *Phalaenopsis pulcherrima* در کشت *این ویترو*

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

مطالعات نشان داده است که طیف‌های مختلف نوری باعث تغییر تولید تنظیم کننده‌های رشدی در ریزنمونه‌ها می‌شوند (۳۳)، بنابراین، تغییرات مشاهده شده در القاء و رشد PLB-ها می‌تواند ناشی از تغییرات القاء شده در سطح تنظیم کننده‌های رشد در ریزنمونه‌ها باشد. گزارش شده است که نور تک رنگ آبی و یا به انضمام نور قرمز مؤثرتر در مقایسه با سایر تیمارهای نوری تأثیر بیشتری بر تشکیل PLB در *Phalaenopsis* دارند (۳۴). علاوه براین، در گزارش دیگری تأیید شده است که تک رنگ‌های LED آبی و قرمز رشد، توسعه و القای PLBها را در گیاهچه‌های *Oncidium* در مقایسه با سایر تک رنگ‌های LED (سبز و زرد) بهبود می‌بخشد (۲۱). بنابراین، این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از نور تک رنگ LED آبی و یا همراه با نور قرمز می‌تواند در القای PLBها در گیاهچه‌های *P. pulcherrima* نسبت به چراغ‌های فلورسنت و یا دیگر طیف‌های نوری مؤثرتر باشد. نتایج همچنین نشان داد که محیط کشت MS ½ در مقایسه با VW به طور مؤثرتری باعث افزایش القای PLBها و رشد و نمو ریزنمونه‌ها شد. علاوه براین، در هر دو محیط کشت، اضافه شدن تنظیم کننده‌های رشد (IBA و BAP) باعث افزایش بیشتر تولید PLBها شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که MS ½ همراه با IBA و BAP می‌تواند محیط کشت مناسبی برای تکثیر *P. pulcherrima* در شرایط درون‌شیشه‌ای باشد. افزایش در القای PLBها و رشد و نمو ریزنمونه گونه‌های مختلف ارکیده بر روی محیط کشت MS ½ نیز قبلا گزارش شده است (۶، ۲۴، ۳۲ و ۳۶). با اینحال، نشان داده شده است که محیط کشت VW برای تکثیر گونه‌های *Geodorum densiflorum* و *Hygrochilus parishii* در مقایسه با MS ½ مناسب‌تر می‌باشد (۳۱). وجود نیترات آمونیوم در محیط MS ½ ممکن است افزایش در رشد و نمو PLBها را توضیح دهد، زیرا آمونیوم به راحتی می‌تواند در مراحل اولیه توسعه جذب شود و رشد و نمو PLBها را به شدت تحت تأثیر قرار دهد (۲۴). علاوه بر این، محیط کشتMS ½ حاوی غلظت بالاتری از کلسیم است که برای سنتز دیواره سلولی و عملکرد غشاء و همچنین سیگنال‌دهی سلولی مورد نیاز است (۴). برخی از غلظت‌های عناصر کم مصرف در محیط کشت MS ½ (منگنز، روی، بور، ید، مولیبدن، مس و کبالت) بالاتر از محیط کشت VW است (۲۴و ۳۲)، که این تفاوت‌ها در غلظت نمک ممکن است منجر به تفاوت در رشد و نمو PLBها شود. نتایج همچنین نشان داد که کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشدی IBA و BAP باعث افزایش رشد و نمو PLBها شدند که نشان دهنده تأثیر مثبت این تنظیم‌کننده ها در تکثیر گیاه ارکیده *P. pulcherrima* در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد. نتایج مشابهی از بهبود تنظیم‌کننده‌های رشد IBA و BAP در تکثیر گیاهان ارکیده قبلاً نیز گزارش شده است (۱۶). بنابراین، نتایج این تحقیق نشان دادند که محیط کشت MS + IBA + BAP ½ همراه با نور تک رنگ آبی و یا ترکیبی از ۷۰ درصد آبی، ۳۰ درصد قرمز می‌تواند در تکثیر و ازدیاد گیاه ارکیده در حال انقراض *P. pulcherrima* از ریزنمونه‌های پروتوکورم در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد استفاده قرار بگیرد. نتایج نشان دادند که کاربرد طیف‌های مختلف نوری LED و SMD به طور مؤثری باعث افزایش سطح رنگیزه‌های فتوسنتزی در مقایسه با ریزنمونه‌های رشد یافته تحت نور فلورسنت شده‌اند که بیشترین افزایش کلروفیل‌های *a*، *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها به ترتیب تحت تیمارهای نوری SMD، ۷۰ درصد نور آبی، ۳۰ درصد نور قرمز، SMD و نور آبی مشاهده شد. اثرات القای نورهای تک رنگ LED بر بیوسنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط درون‌شیشه‌ای در چندین گونه گیاهی قبلاً گزارش شده است (۱۳، ۱۵ و ۱۸). به طور مشابهی، در تکثیر درون‌شیشه‌ای*Platycodon grandiflorum* نشان داد که کاربرد نورهای تک رنگ LED آبی به طور مؤثری باعث افزایش محتوای کلروفیل *a* و *b* شد. در گزارش دیگری، نشان داده شد که تیمار نوری آبی همراه نور قرمز به طور قابل‌توجهی باعث افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

در مقایسه با نور لامپ‌های فلورسنت شد (۲۷). نشان داده شده است که نور آبی نقش مهمی در فرایندهای مورفوژنز، توسعه کلروپلاست و سنتز کلروفیل دارد (۳۴). سطح رنگیزه‌های فتوسنتزی در محیط کشت ½ MS + IBA + BAP در مقایسه با دیگر محیط‌های کشت بالاتر بود که می‌تواند ناشی از غلظت عناصر ریزمغذی یا درشت مغذی محیط کشت MS باشد. بنابراین، محیط کشت ½ MS + BAP + IBA همراه با نورهای آبی و یا ترکیبی از نور آبی و قرمز می‌تواند تیمار مناسبی برای ایجاد سطح بالاتر رنگیزه-های فتوسنتزی در کشت درون‌شیشه‌ای *P. pulcherrima* باشد که متعاقباً در رشد سریع‌تر گیاه می‌تواند مؤثر باشد. نتایج ما همچنین نشان داد که تیمار نور آبی به تنهایی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز و همچنین محتوای پروتئین و قندهای محلول در مقایسه با دیگر تیمارهای نوری شد. با اینحال، اطلاعات کمی از مکانیسم نور آبی بر روی متابولیسم سیستم آنتی اکسیدانی گیاهان عالی در دسترس است. تنش اکسیداتیو جزء کلیدی تنش‌های محیطی است. پیشنهاد شده است که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معمولاً اولین خط دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود و باتوجه به نقش پراکسیداز در خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت پراکسیداز می‌تواند منعکس‌کننده فرایند مشابهی از استرس اکسیداتیو باشد (۵). علاوه براین، افزایش فعالیت کاتالاز می‌تواند برای حذف پراکسید هیدروژن مازاد در پراکسی-زوم‌ها و سیتوزول ضروری باشد. در نتیجه، مطالعه حاضر نشان داد که LED آبی ممکن است برای فعال کردن سیستم‌های دفاعی مختلف برای کاهش مقادیر بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال مطلوب‌تر باشد. گزارش شده است که از نظر متابولیکی، سنتز پروتئین و فعال شدن آنزیم‌ها در گیاهان عالی توسط نور آبی تحریک می‌شود (۳۰). تحقیقات نشان داده‌اند که اثر تنظیمی نور LED آبی بر فعالیت نیترات ردوکتاز، میزان مختلف آسیمیلاسیون نیتروژن بین گیاهان رشد یافته تحت نور آبی یا قرمز را ایجاد کرد (۱۷). علاوه براین، محتوای پروتئین در برگ‌های رشد یافته تحت نور آبی بیشتر از برگ‌های رشد یافته تحت نور قرمز هم سن بود. در مطالعه ما، مقادیر پروتئین محلول در PLB و برگ‌ها در تیمار نور آبی بالاترین میزان بود که نشان می‌دهد طیف آبی برای سنتز پروتئین سودمند است (۲۹).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که طیف‌های مختلف نوری پاسخ‌های متفاوتی را بر القاء و رشد PLBها و صفت‌های بیوشیمیایی گیاهچه‌های *P. pulcherrima* حاصل از ریزنمونه‌های پروتوکورم‌ها در دو محیط کشت ½ MS و VW با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد یا بدون آن ایجاد کردند. استفاده از نورهای مختلف LED به خصوص نور آبی و یا ۷۰ درصد آبی، ۳۰ درصد قرمز باعث افزایش القای PLBها از ریزنمونه‌های پروتوکورم *P. pulcherrima* در هر دو محیط ½ MS و VW در مقایسه با نور فلورسنت شد. تحت تیمارهای نوری مشابه، بیشترین تعداد و القای PLB از ریزنمونه‌های رشد یافته روی محیط کشت ½ MS به دست آمد که نشان می‌دهد محیط ½ MS برای تشکیل و رشد PLBها نسبت محیط VW مناسب‌تر است. بنابراین، بیشترین تعداد و القای PLBها از ریزنمونه‌ها پروتوکورم تحت نور تک رنگ آبی بر روی محیط ½ MS + IBA + BAP به دست آمد. با این حال، بیشترین تعداد برگ و زیست توده به ترتیب تحت تیمارهای نوری SMD و نور قرمز حاصل شد. استفاده از چراغ‌های LED و SMD همچنین باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و محتوای پروتئین کل در مقایسه با لامپ‌های فلورسنت شد. در مجموع نتایج ما نشان داد که استفاده از LED در مقایسه با نورفلورسنت راه عملی و موثری در افزایش القای PLBها و بهبود رنگدانه‌های فتوسنتزی در کشت آزمایشگاهی *P. pulcherrima* باشد.

## سپاسگزاری

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کمال تشکر و قدردانی را دارم.

## منابع


1- Abi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105, PP: 121-126.

2- Beauchamp, C., and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, Analytical Biochemistry, 44, PP: 276-287.

3- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, PP: 248–254.

4- Erfani, M., Miri, S. M., and Iormani, A., 2017. In vitro shoot proliferation and rooting of Garnem rootstock as influenced by basal media, plant growth regulators and carbon sources. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, 18(3&4), PP: 101-109.

5- Ghorbani, A., Pishkar, L., Roodbari, N., Pehlivan, N., and Wu, C., 2021. Nitric oxide could allay arsenic phytotoxicity in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by modulating photosynthetic pigments, phytochelatin metabolism, molecular redox status and arsenic sequestration. Plant Physiology and Biochemistry, 167, PP: 337–348.

6- 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, Journal of Phytology, 2(1), PP: 29-33.

7- Gupta, S. D., and Jatothu, B., 2013. Fundamentals and applications of light-emitting diodes LEDs in in vitro plant growth and morphogenesis. Plant Biotechnology Reports, 7, PP: 211–220.

8- Habiba, S.U., Kazuhiko, S., Ahasan, M.M., and Alam, M.M., 2014. Effects of different light quality on growth and development of protocorm-like bodies (PLBs) in *Dendrobium Kingianum* cultured *in vitro*. Bangladesh Research Publications Journal, 10(2), PP: 223-227.

9- Hu, X., Lan, S., Song, X., Yang, F., Zhang, Z., Peng, D., and Ren, M., 2021. Genetic divergence between two sympatric ecotypes of *Phalaenopsis pulcherrima* on Hainanisland, Diversity, 13, 446 p.

10- Khoddamzadeh, A.A., Sinniah, U. R., Kadir, M.A., Kadzimin, S.B., Mahmood, M., and Sreeramanan, S., 2011. In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson. Plant Growth Regulation, 65, 381 p.

11- Kim, S.J., Hahn, E.J., Heo, J.W., and Paek, K.Y., 2004. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *chrysanthemum* plantlets in vitro. Scientia Horticulturae, 101, PP: 143–151.

12- Kwon, A.R., Cui, H.Y., Lee, H.S., Shin, H.N., Kang, K.S., and Park, S.Y., 2015. Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*, Acta Physiologiae Plantarum, 37, 65 p.

13- Li, H., Tang, C., and Xu, Z., 2013. The effects of different light qualities on cannot be used (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis in vitro. Scientia Horticulturae, 150, PP: 117–124.

14- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. Methods in Enzymology, 148, PP: 350-381.

15- Lin, Y., Li, J., Li, B., He, T., and Chun, Z., 2011. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* in vitro, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 105, PP: 329–335.

16- Luo, J.P., Wang, Y., Zha, X.Q., and 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, PP: 333-340.

17- Maevskaya, S.N., and Bukhov, N.G., 2005. Effect of light quality on nitrogen metabolism of radish plants, Russian Journal of Plant Physiology, 52(3), PP: 304–310

18- Manivannan, A., Soundararajan, P., Halimah, N., Ko, C.H., and Jeong, B.R., 2015. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured in vitro. Horticulture,

DOI: 10.22034/jpr.2023.2204 مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲

Environment, and Biotechnology, 56, PP: 105–113.

19- Mayo-Mosqueda, A., García-Hernández, E., Noguera-Savelli, E., Cetzal-Ix, W., and Alatorre-Cobos, F., 2022. Advances in breeding, bioprospecting, and in vitro culture of *Laelia* orchid species, Horticulturae, 8, 103 p.

20- Mayr H. Orchid names and their meanings: Lubrecht & Cramer Limited, 1998.

21- Mengxi, L., Zhigang, X., Yang, Y., and Yijie, F., 2011. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 106, PP: 1–10.

22- Moradian, M., and Bagheri, A., 2019. Effect of media composition and plant growth regulators on in vitro regeneration of *Rosa canina* and *Rosa beggeriana*, Journal of Plant Research, 32(1), PP: 218-230.

23- Nash, N., 2003. Phalaenopsis primer: a beginner's guide to growing moth orchids. Orchids, 72: 906–913

24- Paul, S., Kumaria, S., and Tandon, P.,2012. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale in vitro regeneration of Dendrobium hookerianum, a threatened orchid of northeast India. AoB Plants, 2012:plr032.

25- Pierik, R., and Ballaré, C.L., 2021. Control of plant growth and defense by photoreceptors: from mechanisms to opportunities in agriculture, Molecular Plant, 14(1), PP: 61-76.

26- Ramírez-Mosqueda, M.A., and Iglesias-Andreu, L.G., 2016. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* jacks, In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant, 52, PP: 154-160.

27- Ramírez-Mosqueda, M.A., Iglesias-Andreu, L.G., and Luna-Sánchez, I.J., 2017. Light quality affects growth and development of in vitro plantlet of *Vanilla planifolia* Jacks, South African Journal of Botany, 109, PP: 288–293.

28- Ranieri, V.M., Zhang, H., Mascia, L., Aubin, M., Lin, C.Y., Mullen, J.B., Grasso, S., Binnie, M., Volgyesi, G.A., Eng, P., and Slutsky, A.S., 2000. Pressure-time curve predicts minimally injurious ventilatory strategy in an isolated rat lung model, Anesthesiology, 93(5), PP: 1320-8.

29- Seifi kalhor, M., 2017. Effects of blue light on photosynthesis of *Tradescantia virginiana* plants grown in different VPDs. Journal of Plant Research, 30(2), PP: 420-428.

30- Senge, M., and Senger, H., 1991. Adaptation of photosynthetic apparatus of Chlorella and Ankistrodesmus to blue and red light. Acta Botanica Neerlandica, 104, PP: 139–143.

31- Shadang, R., Dwivedi, P., Hegde, S.S., and Ahmed, N., 2007. Effects of different culture media on seed germination and subsequent in vitro development of protocorms of *Hygrochilus parishii* (Veith & Rchb.f.) Pfitz (Orchidaceae), Indian Journal of Biotechnology, 6, PP: 256-261.

32- Shekarriz, P., Kafi, M., Dianati Deilamy, S., and Mirmasoumi, M., 2014. Coconut water and peptone improve seed germination and protocorm like body formation of hybrid *Phalaenopsis*, Agriculture Science Developments, 3(10), PP: 317-322.

33- Suzuki, R.M., Kerbauy, G.B., Pescador, R., Purgatto, E., Ceccantini, G.C., 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, PP: 375-381.

34- Tanaka, M., Watanabe, T., Giang, D.T., Tanaka, M., Takamura, T., and Watanabe, H., 2001. Morphogenesis in the PLB segments of *Phalaenopsis* cultured under LED irradiation system (Abstract only), Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 70, 306 p.

35- Xu, Z.G., Cui, J., and Di, X.R., 2009. Effects of different spectral energy distribution on tissue culture of *Oncidium* in vitro, International Journal of Automation and Computing, 31, PP: 45–50.

36- Zeng, S., Wu, K., Teixeira da Silva, J.A., Zhang, J., Chen, Z., Xia, N., and Duan, J., 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid, Scientia Horticulturae, 138, PP: 198–209.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۱-۳۳۲ DOI: 10.22034/jpr.2023.2204

# The effect of different light spectra and culture media on PLB growth parameters of an endangered orchid species (*Phalaenopsis pulcherrima*) in *in-vitro* conditions

**Ahmadi Chashmi K.[1], Ghasemi Omran V.A.[2], Ebrahimi R.[1], Moradi H.[3] and Abdosi V.[1]**

**[1] Dept. of Horticultural Science and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.**

**[2] Dept. of Agronomy, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, I.R. of Iran**

**[3] Dept. of Horticultural Sciences, Crop Sciences College Research Institute of Medicinal Plant Biotechnologies (RIMPBio) Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I.R. of Iran**

## Abstract

Light-emitting diodes (LEDs) can be used as a useful alternative to *in vitro* culture of various plant species, which not only accelerates plantlet growth and development but also reduces illumination costs. Here, the effects of different light treatments (fluorescent (control), blue LED, red LED, 70% blue/30% red, 70% red/30% blue and SMD lights) on protocorm-like bodies (PLB) growth and development, photosynthetic pigments, antioxidant enzyme activity, and the content of protein and soluble sugars of *Phalaenopsis pulcherrima* obtained from protocorm explants on ½ MS (Murashige and Skoog) or VW (Vacin and Went) with or without growth regulators (IBA+BAP) were evaluated. The results showed that LED and SMD treatments improved the induction and growth of PLBs compared to fluorescent treatments, which had the highest numbers of PLBs and biomass under blue and red LED light, respectively. Under the same light treatments, the highest numbers of PLBs and biomass were obtained on ½ MS+IBA+BAP. Compared to fluorescent light, LED and SMD lights increased the content of photosynthetic pigments. Among the culture media used, the highest content of photosynthetic pigments was observed on ½MS+IBA+BAP. Compared with fluorescent treatment, a significant increase in the activity of antioxidant enzymes and the content of protein and soluble sugars was observed under LED and SMD treatments, with the largest increase recorded under blue LED. Therefore, our results proved that the use of LEDs can be a practical and effective way to increase the induction of PLBs and improve photosynthetic pigments in the *in vitro* culture of *P. pulcherrima*.

**Keywords**: Tissue culture, Orchid, LED lights, fluorescent light, protocorm-like bodies