به زراعی کشاورزی
دوره ۱۵ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۲
صفحه‌های ۱۷۷-۱۶۱

معرفی محیط کشت مناسب برای جوانه‌زنی غیرهم‌زیست ارکیدهٔ خاکروی خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia* Boiss.&Hohen)

شیرین دیانتی*[۱]، محسن کافی[۲]، مسعود میرمعصومی[۳]، ولی‌الله مظفریان[۴]، علیرضا سلامی[۵]

۱. مربی گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت- ایران
۲. استاد گروه مهندسی و علوم باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج- ایران
۳. مربی گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم دانشگاه تهران، تهران- ایران
۴. دانشیار باغ گیاه‌شناسی ملی، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، کرج- ایران
۵. استادیار گروه مهندسی و علوم باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج- ایران

تاریخ وصول مقاله: ۹۱/۱۲/۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۲/۳۱

چکیده

برای جوانه‌زنی بذر ارکیدهٔ خربقی معمولی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل با سه عامل شامل نوع محیط کشت در پنج سطح، دو نوع ترکیب قندی و استفاده از پپتون در دو سطح اجرا شد. از پنج نوع محیط کشت متفاوت با دو سطح تیمار قندی و دو سطح تیمار پپتون استفاده شد. نتایج نشان داد محیط‌های کشت مختلف می‌توانند روی درصد جوانه‌زنی و رشد بعدی پروتوکورم تأثیر معنی‌دار داشته باشند. از میان پنج محیط کشت مورد آزمایش، محیط کشت فاست بهترین تأثیر را روی درصد جوانه‌زنی و نیز رشد پروتوکورم‌ها دارد. اثر نوع تیمار قندی روی درصد جوانه‌زنی کاملاً معنی‌دار است، ولی روی رشد پروتوکورم معنی‌دار نیست. اثر تیمار پپتون نیز روی درصد جوانه‌زنی بذر و رشد پروتوکورم معنی‌دار است. نتیجهٔ نهایی نشان داد بهترین ترکیب برای جوانه‌زنی بذر(۴۹/۶٪) به‌صورت غیرهم‌زیست، محیط کشت تغییریافتهٔ فاست با پپتون و پنج گرم فروکتوز همراه با دوازده گرم ساکارز در لیتر (MFH2P2) و بهترین ترکیب برای رشد پروتوکورم‌ها (۱۷/۳میلی‌متر) محیط کشت تغییریافته فاست با پپتون و سی گرم ساکارز در لیتر (MFH1P2) است؛ بنابراین، می‌توان گفت نوع محیط، نوع قند و مواد آلی روی درصد جوانه‌زنی بذر به‌صورت غیرهم‌زیست و نوع محیط و مواد آلی روی رشد بعدی گیاهچه‌های پروتوکورمی این گونه تأثیر معنی‌دار دارند. همچنین، با استفاده از شرایط کشت درون‌شیشه‌ای می‌توان دورهٔ جوانه‌زنی و رشد این گیاه را در مقایسه با شرایط طبیعی به مدت قابل توجهی (حداقل دو سال) کاهش داد.

کلیدواژه‌ها: ارکیدهٔ بومی ایران، پپتون، ثعلب خاکروی، رشد پروتوکورم، کربوهیدرات، کشت درون‌شیشه‌ای.

* نویسنده مسئول Email: dianati@ut.ac.ir

۱. مقدمه

خانوادهٔ ارکیده (ثعلب)[1] یکی از خانواده‌های گیاهی بسیار بزرگ و متنوع در میان تک‌لپه‌ای‌هاست که با پراکنش هولارکتیک[2] حدود ۱۰ درصد از نهاندانگان را در بر می‌گیرد و حدود ۸۰۰ جنس و بیش از ۲۵۰۰۰ گونه دارد [٦، ١٦، ٢٩، ٥٢]. امروزه، صنعت تولید گل شاخه‌بریدهٔ ارکیده‌های تجاری در فروشگاه‌های محلی و بین‌المللی، بازاری بسیار مناسب دارد؛ به‌طوری که معرفی هیبریدهای جدید همراه با کشت و کار تجاری ارکیده‌ها به صنعتی پر سود در بسیاری از کشورها تبدیل شده و موجب شده است ارکیده‌ها رتبهٔ دوم محصولات گلدانی گلدار را در بازارهای عمده کسب کنند [٥٣]. به‌طور کلی ارکیده‌ها براساس شیوهٔ زندگی و بقایشان روی درختان، زمین و یا رشد روی صخره‌ها در سه گروه ارکیده‌های دارزی[3]، خاکروی[4] و سنگ‌زی[5] دسته‌بندی می‌شوند [٤٤]. تقریباً تمام گونه‌های ارکیده برای جوانه‌زنی و نمو، ارتباطی قوی با قارچ‌های مایکوریزا دارند و به همین دلیل بذر آن‌ها را به شیوهٔ معمول و مشابه سایر گیاهان نمی‌توان کشت و سبز کرد [١٥]. همین امر موجب برداشت گسترده و بیش از حد آن‌ها از طبیعت شده است [١٦]. این مسئله در کنار تخریب بحرانی رویشگاه‌ها بر اثر فعالیت‌های انسان‌ها، به ناپدیدشدن ارکیده‌ها از برخی نواحی طبیعی منجر شده است. از این نظر ارکیده‌ها از خانواده‌های گیاهی بسیار آسیب‌پذیر محسوب می‌شوند [٤١] و در دنیا از جمله گونه‌های در معرض خطر انقراض گزارش شده‌اند.

چرخهٔ زندگی ارکیده‌ها در شرایط طبیعی بسیار طولانی است و حدود پنج تا ده سال طول می‌کشد تا رشد کنند، گل دهند و بذر تولید کنند. این نرخ تکثیر پایین، نیاز به راهکاری کارآمد برای حفاظت از ارکیده‌ها را ضروری می‌کند. در بیشتر کشورها ارکیده‌های خاکروی به دلیل حساسیت بالاترشان به تغییرات محیطی، تحت حفاظت قرار گرفته‌اند [٤٢، ٥٦]. بسیاری از محققان جوانه‌زنی درون‌شیشه‌ای بذر را راهکاری برای حفاظت از ارکیده‌ها پیشنهاد کرده‌اند [٦، ٧، ١٩]، ولی جوانه‌زنی درون‌شیشه‌ای و برون‌شیشه‌ای[6] بذر بیشتر ارکیده‌های خاکروی به‌ویژه گونه‌های مربوط به مناطق معتدله همچنان بسیار مشکل است [٧، ٤٢، ٥٥] و بسیاری از گونه‌ها با استفاده از روش‌های غیرهم‌زیست نمی‌توانند جوانه‌زنی کنند. گونه‌های ارکیدهٔ مناطق معتدله، پوشش بذری قوی و ضد ورود آب و مواد غذایی دارند که گمان می‌رود عاملی تأثیرگذار بر دورهٔ اغلب طولانی رکود بذر و نیاز ویژه آن‌ها به هم‌زیستی با مایکوریزاهای ارکیدی در رویشگاه‌های طبیعی و نیز در شرایط مصنوعی باشد [٤٢،٩، ٥٥]. امروزه، تولید و کشت و کار ارکیده‌های خاکروی بومی به‌آرامی در حال افزایش است. از زمان پیشنهاد تکنیک جوانه‌زنی غیرهم‌زیست[7]، تعداد گونه‌های ارکیده‌ای که به‌صورت درون‌شیشه‌ای تولید شده‌اند افزایش یافته و این امکان فراهم شده است تا بسیاری از ارکیده‌های گرمسیری[8] به‌آسانی و بدون نیاز به استفاده از ساختار مایکوریزای هم‌زیست مربوط به خودشان[9] بتوانند در شرایط درون‌شیشه‌ای جوانه‌زنی کنند؛ ولی جوانه‌زنی ارکیده‌های خاکروی معتدله به دلیل نیازهای محیطی و مواد غذایی خاص، محدود به چند جنس باقی مانده است [٥٠] که

1. Orchidaceae
2. Holarctic distribution
3. Epiphytes
4. Terrestrials
5. Lithophytes

6. Ex vitro
7. Asymbiotic germination
8. Tropical orchids
9. Symbiotic mycorrhizal association

گونـــــه‌هـــــای Cypripedium [۳٦]، Spiranthes [۵۹]، Platanthera [٦۰] و Ophrys [۳۵] از گونـه‌هـای مطـرح محسوب می‌شوند. در حقیقت به نظر می‌رسد که بـه دلیـل وجود نیازهایی ویژه برای هر گونه[1]، داشتن تکنیکی واحـد برای جوانه‌زنی همهٔ آن‌ها مشکل‌تر از گونه‌های گرمـسیری است. انواع مقاوم به سرمای[2] ارکیده‌های خـاکروی از نظـر جوانه‌زنی سرسخت‌تر[3] هـستند و ممکـن اسـت الگوهـای پیچیدهٔ رکود را نیز داشته باشـند [۳۱]. بنـابراین، ایـن نـوع ارکیده‌ها، از نظر تکثیر بذری، از جمله گـروه‌هـای گیاهـان آلی مشکل محسوب می‌شوند. فراینـدهایی بـرای غلبـه بـر عواملی که گمان می‌رود از جوانه‌زنی جلوگیری می‌کنند نیز بررسی و آزمایش شده‌اند. برای مثال علاوه بر جوانـه‌زنـی هم‌زیست، جوانه‌زنی غیرهم‌زیست، استفاده از بذرهای بالغ و غیربـالغ، تیمارهـای روشـنایی و تـاریکی، تیمـار امـواج ماوراء صوت[4]، تیمارهای استریل‌کننده و خـراش‌دهـی[5] [۹، ٤۲] از جملهٔ این موارد هـستند. ایـن پـژوهش‌هـا تاحـدی موجب پیشرفت دانش محدود ما برای یافتن مکانیسم‌هـای کارآمـد بـرای رهـایی از رکـود و بهبـود جوانـه‌زنـی بـذر ارکیده‌های خاکروی شده است [۲٦، ۳۹، ۵۵]. مطالعه‌هـای قبلی نشان داده است که به‌طور کلـی هـیچ محـیط غـذایی واحدی برای جوانه‌زنی غیرهم‌زیست بذر برای همـهٔ انـواع ارکیده مناسب نیست [٤٦]. ارکیـده‌هـا تنـوع بیوشـیمیایی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی وسیعی دارند و طیفی از محیط‌های کشت بـرای تکثیـر هـر گونـه معرفـی شـده اسـت. حتـی محیط‌هایی به‌طور خاص برای جوانه‌زنی بذر ارکیده ابـداع شده است [۵]. امروزه، بـسیاری از گونـه‌هـا بـا اسـتفاده از روش‌های مرسوم غیرهم‌زیست جوانه می‌زننـد، ولـی آمـار متفاوتی از موفقیت در محـیط‌هـای کـشت گـزارش شـده است. محیط‌های مفید و موفق معرفی شده شامل وسـین و ونـــت [۳۲، ٤٦]، کیـــورتیس [۱۲]، فاســـت [۱۸، ۳۲]، موراشیگ و اسکوک [٤٦، ٤۷]، نودسون سـی [٤۷]، میـد و بـــالارد [۳۹]، نورســـتوگ [۳۲]، نـــیچ [۳۰، ٤٦]، میتـــرا و همکارانش [٤٦] و محیط کشت بذر و کشت مجـدد هیلـز [۱۰] هستند. محیط‌های کشت نودسون سی و موراشیگ و اسکوک از فرمول‌های معمول پرمصرف بـرای جوانـه‌زنـی غیـرهم‌زیـست بـذرهای ارکیـده هـستند [۸]. بـسیاری از محققان گزارش کرده‌اند که محیط‌های کشت مرسوم، برای ارکیده‌ها به‌ویژه برای گونه‌های معتدله خیلی غلـیظ هـستند و باید دو تا ده مرتبه رقیق‌تر شوند [۱۹، ۲۰، ٥٤]؛ بنابراین، به‌دلیل بالابودن مقادیر نیتروژن به‌ویژه فرم آمونیـومی آن در محیط موراشیگ و اسکوک، انواع چندبار رقیق‌شدهٔ آن نیـز بسیار استفاده شده است. محیط فاست کـه در سـال ۱۹۷٦، برای *Cypripedium* ایجاد شد [۱۸]، مـالمگرن[6] و BM کـه برای ارکیده‌های غرب اروپا [۳۸، ۵۵] ایجاد شدند و محیط کیورتیس [٤۱] از جمله محیط‌های با ارزشی است که آن را پژوهشگران برای رفع مشکلات کشت درون‌شیـشه‌ای بـذر برخی ارکیده‌های معتدلهٔ خاکروی تهیه کرده‌اند [۳۲].

ارکیدهٔ خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia; Syn. Helleborine veratrifolia; Epipactilis consimilis*) بـه زیر تیـرهٔ Neottioideae و زیـر قبیلـهٔ Cephalantherinae تعلـق دارد [۱، ۲، ۳]. ایـن گونـه از گـروه ارکیـده‌هـای خاکروی نواحی معتدلـه اسـت و در برخـی نـواحی ایـران شامل استان‌های آذربایجان غربی، تهران، خراسان، فـارس، کردسـتان، کرمانـشاه، کهگیلویـه و بویراحمـد، لرسـتان، هرمزگان و یزد به‌صورت خودرو رویش می‌کنـد. تـاکنون،

1. Species-specific requirements
2. Cold- hardy terrestrial orchids
3. More recalcitrant
4. Sonication
5. Scarification
6. Malmegren

دربارهٔ تکثیر، تولید، نگه‌داری و حفاظت این گونه پژوهشی در ایران انجام نشده است. بنابراین، به منظور یافتن روشی مناسب برای تکثیر انبوه آن به شیوهٔ کشت غیرهم‌زیست با هدف استفاده در کارهای اصلاحی و نیز حفاظت از ژرم‌پلاسم گیاهی، در این پژوهش محیط‌ها و تیمارهای مؤثر روی جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه‌های پروتوکورمی آن بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد گیاهی و استریل‌کردن

برای انجام این آزمایش از بذرهای ارکیدهٔ خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia*) استفاده شد. کپسول‌های رسیده در اوایل تیرماه قبل از شکافتن، از روی گیاه در رویشگاه طبیعی جمع‌آوری شدند. بذرها از درون کپسول‌ها خارج و تا زمان استفاده درون پاکت‌های کاغذی در دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. مدت زمان استریل‌کردن بذرها پانزده دقیقه با غوطه‌ورکردن آن‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم، با استفاده از سفیدکنندهٔ خانگی وایتکس با ۵/۲ درصد غلظت مادهٔ مؤثرهٔ کلر فعال، به غلظت ۱۳ درصد بود. سپس، بذرها با آب مقطر استریل سه‌بار و هربار به مدت دو دقیقه شست‌وشو شدند. زمان استریل‌کردن موجب رنگ‌زدایی بذرها نیز شد.

۲.۲. محیط و شرایط کشت

برای کشت بذرها از ظروف پتری شیشه‌ای استریل به ابعاد ۱۰۰×۲۰ میلی‌متر استفاده شد. برای مقایسهٔ اثر محیط‌های کشت روی جوانه‌زنی غیرهم‌زیست براساس محیط‌های پرمصرف ذکرشده در منابع علمی، از محیط تغییریافتهٔ فاست (MF)[1]، محیط موراشیگ و اسکوک (MS)[2]، محیط یک‌دوم غلظت موراشیگ و اسکوک (1/2MS)، محیط تغییریافتهٔ نودسون سی (MKC)[3] و محیط تغییریافتهٔ وسین و ونت (MV&W)[4] استفاده شد. تیمارهای قندی شامل سی گرم در لیتر ساکارز (H1) بودند که مخصوص محیط کشت موراشیگ و اسکوک است و همچنین، شامل پنج گرم فروکتوز همراه با دوازده گرم ساکارز در لیتر (H2) بودند که مخصوص محیط تغییریافتهٔ فاست است. تیمار نیتروژن آلی شامل استفاده از دو گرم در لیتر پپتون (P2) یا عدم استفاده از آن (P1) بود. pH محیط‌ها قبل از اتوکلاو روی پنج و نیم تنظیم و از هفت گرم در لیتر آگار برای جامدکردن استفاده شد. محیط‌ها در دمای یکصد و بیست و یک درجهٔ سانتی‌گراد به مدت بیست دقیقه اتوکلاو و پس از استریل‌شدن، به مقدار سی سی‌سی در هر پتری توزیع شدند.

پتری‌های حاوی بذر تا زمان تشکیل پروتوکورم‌های نوک‌دار در اتاق رشد دارای دمای ۲ ± ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در شرایط تاریک قرار گرفتند. با توجه به کندی و پراکندگی جوانه‌زنی که در منابع گزارش شده بود، برای اطمینان از نتایج درصد نهایی جوانه‌زنی بذرهای ارکیدهٔ خربقی و میزان رشد پروتوکورم‌ها چهار ماه بعد از کشت اندازه‌گیری شد.

۳.۲. طرح آماری

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با بیست تیمار، هریک در سه تکرار(سه پتری) و با کشت میانگین سیصد و پنجاه بذر در هر پتری انجام شد. در مجموع بذرها در شصت پتری حاوی انواع محیط کشت و تیمارهای مختلف قندی و پپتون کشت شدند و صفات روند جوانه‌زنی بذر و رشد پروتوکورم[5] در آن‌ها بررسی

1. Modified Fas
2. Murashige and Skoog
3. Modified Knudson C
4. Modified Vacin and Went
5. Protocorm

شد. برای محاسبهٔ جوانه‌زنی کل بذرهای کشت‌شده در هر پتری در ابتدای کشت شمارش و بذرهای جوانه‌زده به‌طور هفتگی شمرده شدند. در نهایت، از تعداد بذرهای جوانه‌زده در هفتهٔ هشتم نسبت به تعداد کل بذرهای کشت‌شده در سه پتری برای محاسبهٔ درصد جوانه‌زنی استفاده شد. رشد پروتوکروم‌ها با اندازه‌گیری طول نهایی پروتوکورم‌های در هر پتری در پایان هفتهٔ هشتم محاسبه شد. داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح α=۰/۰۵ مقایسه شدند.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. جوانه‌زنی

بذرهای ارکیدهٔ خربقی معمولی نیز همانند اکثر گونه‌های خاکروی معتدله جوانه‌زنی هم‌زمان نداشتند و بذرها به‌طور غیریکنواخت طی یک دورهٔ زمانی سه ماه جوانه زدند. چهار ماه پس از کشت، بیشترین میانگین جوانه‌زنی بذرها ٤٦/۹ درصد در محیط تغییریافتهٔ فاست دارای پنج گرم فروکتوز همراه با دوازده گرم ساکارز و دو گرم پپتون در لیتر و کمترین میانگین جوانه‌زنی ۱/۵ درصد در محیط کشت موراشیگ و اسکوک دارای سی گرم ساکارز همراه با دو گرم پپتون در لیتر بود (نمودار ۷). در این آزمایش، جنین بذرهای ارکیدهٔ خربقی معمولی حدود ده روز بعد از کشت متورم و اولین پروتوکورم‌های ریزوییددار نوک‌دار یک و نیم ماه پس از کشت مشاهده شدند. این پروتوکورم‌ها چهار ماه پس از کشت به شرایط روشنایی منتقل و یک هفته بعد، اولین برگ‌های کلروفیل‌دار سبزرنگ در آن‌ها مشاهده شد. پنج ماه بعد از کشت بذر، گیاهچه‌ها دارای دو تا سه برگ سبز بودند. مطالعات نشان داده است درصد بالایی از بذرهای Dactylorhiza maculata طی یک دورهٔ سه ماهه بعد از کشت جوانه زدند و بعد از این زمان افزایش جوانه‌زنی بسیار کم بود [٣٤]. بررسی منابع نشان می‌دهد تحقیق دربارهٔ جوانه‌زنی درون شیشه‌ای بذر ارکیده‌های خاکروی اغلب به‌دلیل دورهٔ قابل توجه زمانی مورد نیاز برای وقوع جوانه‌زنی فرایندی طولانی و کند است [١٤]. به‌عنوان نمونه بذرهای Eupophia cucullata، E. perersii و E. Streptoperata حداقل سه ماه بعد از کشت روی محیط MS جوانه زدند [٣٧]. مرحلهٔ جوانه‌زنی تا رشد پروتوکورم‌ها در گونه‌های مختلف جنس Epipactis حداقل دو سال طول می‌کشد و سه سال بعد از جوانه‌زنی بذر می‌توان گیاهچه‌های برگدار را در سطح زمین مشاهده کرد [٤٢]. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که با استفاده از شرایط کشت درون‌شیشه‌ای می‌توان دورهٔ جوانه‌زنی و رشد این گیاه را در مقایسه با شرایط طبیعی به مدت قابل توجهی (حداقل دو سال) کاهش داد.

۲.۳. محیط کشت

در این آزمایش، پروتوکورم‌ها چهار ماه بعد از کشت همچنان به رشد و نمو خود ادامه می‌دادند. بیشترین میانگین رشد پروتوکورم‌ها ۱۷/۳ میلی‌متر و مربوط به پروتوکورم‌های نوک‌داری بود که ریشه‌هایشان شروع به رشد کرده بودند. کمترین میزان میانگین رشد پروتوکورم‌ها ۱/۸ میلی‌متر بود. بنابراین، ممکن است مرگ جنین که در گزارش‌های دیگر به آن اشاره شده است، فقط تحت تأثیر نوع محیط کشت نباشد [٣٢]. به‌عنوان نمونه محققان مشاهده کردند که بعد از شانزده هفته کشت ارکیدهٔ دارزی *Encyclia boothiana* روی محیط کشت ارکیده لیندمن[1] و وسین و ونت تقریبا تمام گیاهچه‌های آن از بین رفتند و نتیجه گرفتند که نوع محیط کشت می‌تواند به‌طور معنی‌دار بقای پروتوکورم‌ها و رشد گیاهچه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد [٤٩].

1. Lindemann's Orchid medium

جدول ۱. مقایسهٔ ترکیبات محیط کشت‌های استفاده‌شده و اثر آن‌ها روی میانگین درصد جوانه‌زنی و رشد پروتوکورم‌ها

ردیف	نوع ماده (گرم)	محیط‌های کشت				
		MF	MS	1/2MS	MKC	MV&W
۱	N	۰/۰٦	۰/۸۵	۰/٤۳	۰/۳۲	۰/۱٤
۲	P	۰/۰۲	۰/۰٤	۰/۰۲	۰/۰٦	۰/۰۹
۳	K	۰/۱	۰/۸	۰/٤	۰/۲	۰/۲
٤	NO_3/NH_4	٤/۲	٦/٤	٦/٤	۲/۲	۱/۲
۵†	$N_{\text{غیرآلی}}$/پپتون	۰/۰۳۲	۰/٤۲٤	۰/۲۱۳	۰/۱۵۸	۰/۰۷۱
٦	نمک‌های غیرآلی (مواد ماکرو و میکرو) و ویتامین‌ها	۰/٦۵	٤/۷	۲/٤	۲/۳	۱/۵
مقایسهٔ میانگین	اثر روی جوانه‌زنی بذر(درصد)††	۲۹/۹۳^{a}	۵/۵۷^{c}	۷/۸۸^{c}	۲۰/۲۵^{b}	۱۸/٤٤^{b}
محیط‌های کشت	اثر روی رشد پروتوکورم (میلی‌متر)††	۱۰/۷^{a}	۳/۱^{c}	۵/۲^{b}	٤/۸^{b}	۲/۷^{c}

† این نسبت برای تیمارهای دارای دو گرم در لیتر پپتون به‌عنوان مادهٔ دارای نیتروژن آلی (تیمارهای P2) محاسبه شده است.

†† حروف غیرمشابه در ردیف، نشانهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح α=۰/۰۵ است.

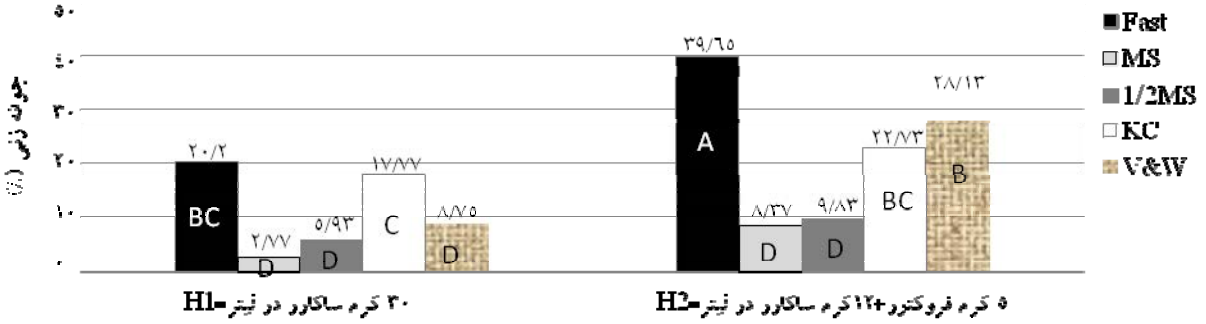
در این پژوهش اثر پنج نوع محیط کشت که از نظر نمک‌های معدنی متفاوت هستند، دربارهٔ جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های پروتوکورمی مقایسه شدند (جدول۱). نتایج آزمایش نشان داد که در مجموع اثر انواع محیط‌های کشت روی درصد جوانه‌زنی و نیز رشد پروتوکورم‌های این گونه کاملا معنی‌دار است. محیط کشت تغییریافتهٔ فاست با اختلاف کاملا معنی‌دار نسبت به سایر محیط‌های کشت، بهترین محیط برای جوانه‌زنی بذرها (۲۹/۹۳٪) بود و پس از آن به ترتیب محیط‌های تغییریافتهٔ نودسون سی (۲۰/۲۵٪) و تغییریافتهٔ وسین و ونت (۱۸/٤٤٪) بدون اختلاف معنی‌دار نسبت به هم قرار گرفتند (جدول۱). کمترین جوانه‌زنی نیز در محیط‌های موراشیگ و اسکوک (۵/۵۷٪) و نیز غلظت یک‌دوم آن (۷/۸۸٪) بدون اختلاف معنی‌دار نسبت به هم حاصل شد. به‌علاوه معلوم شد محیط کشت تغییریافتهٔ فاست با اختلاف کاملا معنی‌دار نسبت به سایر محیط‌ها، بهترین محیط برای رشد پروتوکورم‌ها (۱۰/۷۱میلی‌متر) نیز است. بعد از آن به ترتیب محیط‌های یک‌دوم موراشیگ و اسکوک (۵/۲ میلی‌متر) و تغییریافتهٔ نودسون سی (٤/۸ میلی‌متر) بدون اختلاف معنی‌دار نسبت به یکدیگر قرار دارند. محیط‌های موراشیگ و اسکوک (۳/۱ میلی‌متر) و تغییریافتهٔ وسین و ونت (۲/۷ میلی‌متر) بدون اختلاف معنی‌دار نسبت به یکدیگر محیط‌های نامناسبی برای رشد پروتوکورم‌ها بودند (جدول۱).

اغلب جمعیت‌های وحشی ارکیده‌های خاکروی در خاک‌هایی رشد می‌کنند که مقادیر یون‌های معدنی موجود در آن‌ها پایین است [۲۱]. به نظر می‌رسد اثر محیط کشت روی جوانه‌زنی و نمو ارکیده‌ها به جنس، گونه و ژنوتیپ آن‌ها بستگی دارد. مثلا مقایسهٔ محیط کشت KC با محیط MS نشان داد که در هر کدام از آن‌ها برخی ژنوتیپ‌ها نمو بهتری دارند [٤۵]. این مسئله می‌تواند ناشی از تفاوت نسبت مواد مختلف به‌ویژه نسبت‌های آمونیوم به نیترات در محیط‌های گوناگون نیز باشد [۳۲]. شاید غلظت پایین

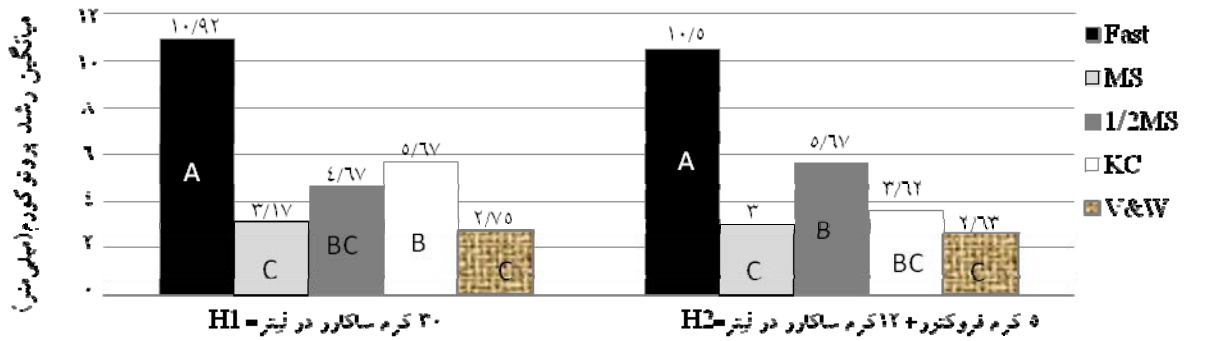
نمک‌های غیرآلی در محیط MF و غلظت بالای آن‌ها در محیط MS توجیهی برای اثر مثبت اولی و منفی دومی روی جوانه‌زنی بذرهای ارکیده خربقی باشد (جدول ۱)، ولی با دسته‌بندی سه محیط دیگر تطابق کامل ندارد. بنابراین، به نظر می‌رسد عواملی به غیر از غلظت کلی مواد غیرآلی نیز در جوانه‌زنی و رشد دخالت داشته باشد که در ادامه بررسی خواهد شد.

۳.۳. کربوهیدرات‌ها (قندها)

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که اثر نوع قند روی درصد جوانه‌زنی بذرها کاملا معنی‌دار است، ولی روی رشد پروتوکورم‌ها معنی‌دار نیست. بهترین نوع قند برای جوانه‌زنی بذرها ترکیب H2 (۲۱/۷٪) بود که با H1 (۱۱/۱٪) اختلاف کاملا معنی‌دار داشت. بررسی اثرات متقابل نشان داد که اثر متقابل محیط کشت و نوع قند روی درصد جوانه‌زنی کاملا معنی‌دار است، ولی روی رشد پروتوکورم‌ها معنی‌دار نیست. بهترین ترکیب برای جوانه‌زنی بذرها (۳۹/۶۵٪) محیط کشت MFH2 با اختلاف کاملا معنی‌دار نسبت به سایر ترکیبات محیطی ـ قندی بود. بهترین ترکیب برای رشد پروتوکورم‌ها محیط‌های کشت MFH1 (۱۰/۹۲میلی‌متر) و MFH2 (۱۰/۵ میلی‌متر) بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بودند (نمودارهای ۱، ۲).



شکل ۱. اثر متقابل محیط کشت و قند روی درصد جوانه‌زنی بذر.



شکل ۲. اثر متقابل محیط کشت و نوع قند بر میزان رشد پروتوکورم.

کربوهیدرات‌ها که طی جوانه‌زنی بذرها استفاده می‌شوند وظایفی را به عهده دارند. در درجهٔ اول کربوهیدرات‌های ذخیره‌شده به‌عنوان منبع انرژی برای حمایت از جوانه‌زنی و رشد دانهال‌ها عمل می‌کنند [٢٤]. علاوه براین کربوهیدرات‌ها می‌توانند به‌عنوان مولکول‌های سیگنال‌دهنده در تنظیم و یکپارچگی چند مسیر بیوشیمیایی مهم دخالت کنند که جوانه‌زنی، رکود بذر و حرکت مواد ذخیرهٔ بذر را تحت تأثیر قرار می‌دهند [٢٢]. به نظر می‌رسد که احتمالا کربوهیدرات‌های محلول به‌عنوان علائمی از تلقیح بذرهای آبگیری‌کردهٔ ارکیده‌ها توسط قارچ‌ها نیز باشند. البته شواهد بیشتری برای تأیید این مطلب مورد نیاز است [٥٨]. محققان نیاز به کربوهیدرات‌های بیرونی برای کشت درون‌شیشه‌ای بذر ارکیده‌ها را تقریبا به‌طور فراگیر توصیه کرده‌اند. هر گونه‌ای که بدون وجود کربوهیدرات بتواند جوانه‌زنی کند نیز بعد از جوانه‌زنی نمو محدودی دارد [٥١]. معلوم شده است با استفاده از قندهای مناسب می‌توان جوانه‌زنی درون‌شیشه‌ای بذر ارکیده‌ها را بدون استفاده از قارچ‌های مایکوریزایی (روش کشت غیرهم‌زیست) افزایش داد [٨]. در حضور مایکوریزا، پلی‌ساکاریدهایی همچون نشاسته یا سلولز برای آغاز جوانه‌زنی لازم هستند [٤٨]. در تکثیر غیرهم‌زیست درون‌شیشه‌ای، منو یا دی‌ساکاریدهایی مانند ساکارز، گلوکز یا فروکتوز ترجیح داده می‌شوند [٢٥] که معمولا در غلظت‌های بین پنج تا سی گرم در لیتر در محیط کشت به کار می‌روند.

تغییر غلظت کربوهیدرات‌ها طی اتوکلاو امکان‌پذیر است؛ ساکارز طی اتوکلاو، هیدرولیز می‌شود و ترکیبی از ساکارز، فروکتوز و گلوکز تولید می‌کند [٢٧]. گزارش شده است حضور گلوکز در محیط کشت، نرخ رشد گیاهچه‌ها را تحریک می‌کند [٢٦]، ولی اثر استفاده از نسبت‌های ترکیبی مختلف منو و دی‌ساکاریدها در محیط کشت ناشناخته است [٥٧]. بذرهای *Cypripedium reginae*، *Listera ovata*، *Goodyera repens*، *G. oblongifolia* و *Platanthera bifolia* همگی روی محیط آگار از جوانه‌زنی بازماندند، ولی روی محیط کشت دارای ساکارز یا گلوکز جوانه زدند. در طبیعت مادهٔ زمینهٔ تنفسی برای جوانه‌زنی گونه‌هایی که برای جوانه‌زنی درون شیشه‌ای به قندها نیاز دارند از بیرون، یعنی به وسیلهٔ حملهٔ قارچ‌های مایکوریزا یا مواد بستر آن‌ها تأمین می‌شود. در کشت‌های غیرهم‌زیست، قندهای محلول باید به شکلی در محیط کشت وجود داشته باشند که بذرها بتوانند به‌طور مستقیم آن‌ها را جذب کنند. درصد جوانه‌زنی گونه‌هایی که در آب جوانه می‌زنند، با مقدار ساکارز تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد [٥١]. بنابراین، می‌توان با توجه به نتایج و منابع فوق‌الذکر نتیجه گرفت که ارکیدهٔ خربقی معمولی مشابه آن گروه از ارکیده‌ها است که جوانه‌زنی آن تحت تأثیر وجود و نوع قند قرار می‌گیرد و برای جوانه‌زنی به قند آن هم از نوع ترکیبی شامل منو و دی‌ساکارید و یا احتمالا منوساکارید به تنهایی احتیاج دارد، ولی رشد بعدی آن به نوع قند خیلی وابسته نیست و تفاوت قندها به‌ویژه در حضور پپتون خیلی روی رشد پروتوکورم‌ها تأثیر ندارد.

٤.٣. نوع و میزان نیتروژن (آلی و معدنی) و سایر عناصر ماکروالمان (پتاسیم و فسفر)

به غیر از ترکیبات قندی نوع نیتروژن و غلظت آن می‌تواند نقش مهمی در جوانه‌زنی غیرهم‌زیست درون شیشه‌ای بذر ارکیده ایفا کند [١٢]. در صورت مقایسهٔ محیط‌های کشت براساس میزان نیتروژن کل غیرآلی، می‌توانیم محیط‌ها را از غلظت کم به زیاد به ترتیب MF، MV&W، MKC، 1/2MS و MS مرتب کنیم (جدول ١). مقایسهٔ ترتیب میزان نیتروژن کل غیرآلی محیط‌های مورد استفاده در آزمایش

نشان می‌دهد که این عامل می‌تواند در مورد گروه‌بندی اثر محیط‌های کشت بر درصد جوانه‌زنی به‌عنوان عاملی تأثیرگذار مد نظر قرار گیرد. این عامل در مورد محیط‌های MF، 1/2MS و MS به‌طور کامل و در مورد دو محیط تا حدی صادق است (جدول۱). به نظر می‌رسد بذرهای ارکیدهٔ خربقی در غلظت‌های پایین‌تر نیتروژن غیرآلی جوانه‌زنی بهتری دارند. خاک‌های رویشگاه‌های معمول ارکیده از نظر نیتروژن غیرآلی بسیار فقیر هستند [۲۱، ۵۱]. گزارش شده است در برخی گونه‌های اروپایی حضور نیتروژن غیرآلی کاملا از جوانه‌زنی جلوگیری می‌کند [٥٤، ٥٥]. این گزارش‌ها می‌تواند مؤید نتایج این آزمایش باشد. مقایسهٔ نسبت نیترات به آمونیوم محیط‌های کشت نشان می‌دهد محیط MF، با نسبت حدود چهار برابر، از این نظر محیطی متوسط است. براساس نتایج می‌توان گفت محیط‌های دارای نسبت یک تا چهار برابر (MF، MV&W و MKC) در مقایسه با محیط‌های دارای نسبت شش برابر (MS و 1/2MS) تأثیر بهتری در جوانه‌زنی دارند و در کل نسبت چهار برابر نیترات به آمونیوم (MF) برای جوانه‌زنی بذرها مناسب‌تر است (جدول۱). هم در مادهٔ زمینه طبیعی و هم در محیط کشت، نیتروژن می‌تواند به سه شکل شامل فرم اکسیدی (نیترات=NO_3^-)، فرم احیایی (نمک‌های غیرآلی آمونیوم=NH_4^+) و یا ترکیبات آلی وجود داشته باشد. مقادیر بالای آمونیوم بیرونی می‌تواند فعالیت گلوتامات دهیدروژناز[1] و در نتیجه افزایش ساخته‌شدن پروتئین در سلول‌های زنده را تحریک کند. فرم احیایی نیتروژن نیز فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز را تحریک می‌کند و نیترات جذب‌شده را قابل استفاده می‌سازد [۲۳].

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد گیاهچه‌های ارکیده در آغاز از نظر آنزیم‌های مربوط با متابولیسم نیتروژن کمبود دارند و این مسئله مانع استفادهٔ آن‌ها از نیترات بیرونی می‌شود [٤٢]. معمولا غلظت‌های بالای نمک‌های نیتروژنی برای جوانه‌زنی سودمند نیستند. بعضی نیز گزارش کرده‌اند که نیتروژن غیرآلی می‌تواند جوانه‌زنی را احتمالا به‌دلیل واکنش احیای پایین نیترات در طی جوانه‌زنی بذر و نمو اولیهٔ پروتوکورم محدود کند [۳۸، ٥٥]. به ارتباط منفی بین غلظت NO_3^- و درصد سبزشدن *Dactylorhiza majalis* نیز اشاره شده است [٤٣]. هنگام کاهش غلظت NH_4NO_3 افزایشی یکنواخت و ثابت در مورد درصد سبزشدن مشاهده شد [۱۷]. در مورد Orchis morio بالاتربودن غلظت نیتروژن کل غیرآلی و بخش NO_3^- ، موجب پایین‌تربودن درصد جوانه‌زنی شد [۱٥]. به نظر می‌رسد بذرهای *Bletilla striata* نیز غلظت‌های پایین نیتروژن غیرآلی و نیتروژن از نوع احیایی مانند NH_4^+ را ترجیح می‌دهند [۲۸]. براساس پژوهش‌ها انواع آمونیاکی نیتروژن نسبت به انواع نیتراتی مناسب‌ترند [۳۸]. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که میزان و نوع نیتروژن محیط کشت می‌تواند روی درصد جوانه‌زنی بذرهای ارکیدهٔ خربقی نیز مؤثر باشد و به احتمال زیاد افزایش یا کاهش نسبت نیترات به آمونیوم موجود در محیط از یک حد خاص می‌تواند روی درصد جوانه‌زنی آن اثری منفی بگذارد. بنابراین، برای رسیدن به جوانه‌زنی بهتر، لازم است نوع نیتراتی نیتروژن کم و نوع آمونیومی به مقدار مناسب نسبت به نوع نیتراتی در محیط‌های کشت وجود داشته باشد.

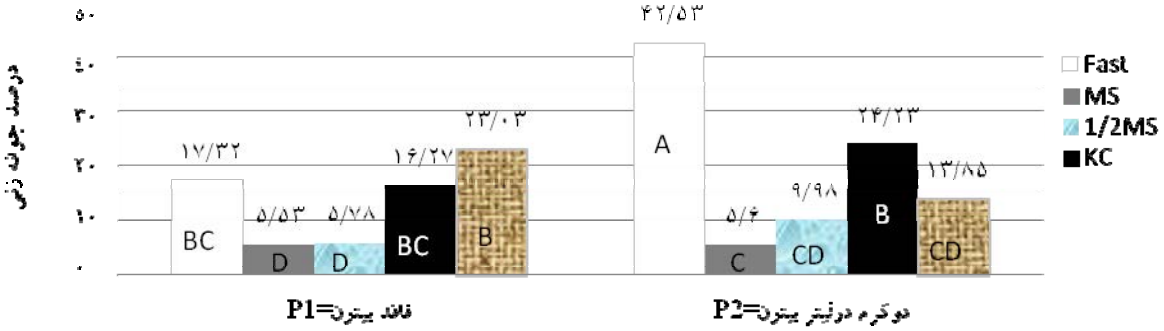
میزان پتاسیم موجود در محیط‌ها روند ترتیب اثر محیط‌ها روی جوانه‌زنی را کاملا توجیه می‌کند. محیط

1. Nitrate reductase enzymes

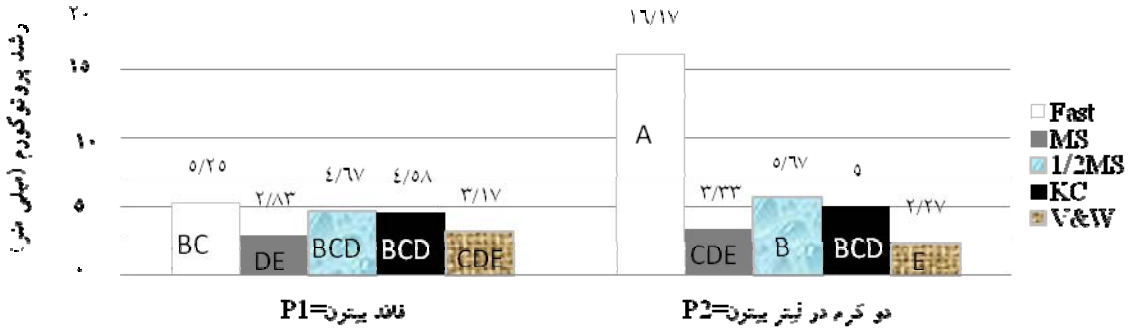
کشت MF با کمترین میزان پتاسیم بیشترین جوانه‌زنی را ایجاد کرده است و پس از آن بدون اختلاف معنی‌دار محیط‌های MKC و MV&W قرار دارند و نامناسب‌ترین محیط نیز دارای بیشترین میزان پتاسیم هستند (جدول۱). گزارش شده است غلظت یون‌ها به‌ویژه پتاسیم در رویشگاه‌های ارکیده‌های آمریکای شمالی پایین است؛ ولی در رویشگاه‌های ارکیده‌های اروپایی حدود ده برابر بیشتر از حد معمول است [٤٢]. میزان پتاسیم در خاک محل رویش ارکیدهٔ خربقی مورد آزمایش هشتاد و هفت میلی‌گرم در کیلوگرم و در آب محل رویش یک صدم میلی‌اکی‌والان در لیتر بود. بنابراین، احتمال دارد این نوع ارکیده مشابه گونه‌های آمریکای شمالی نیازمند پتاسیم بالا نباشد. البته در منابع به اثر میزان پتاسیم محیط کشت بر جوانه‌زنی بذر ارکیده‌ها اشاره‌ای نشده و اظهارنظر در مورد آن نیازمند آزمایش‌های بیشتر است.

در محیط‌های مورد آزمایش کمترین میزان فسفر به‌طور مشابه در محیط‌های MF و 1/2MS وجود دارد که بهترین محیط از نظر رشد پروتوکورم‌هاست و بیشترین میزان آن در محیط MV&W وجود دارد که محیطی نامناسب برای رشد پروتوکورم‌هاست. میزان این ماده با ترتیب اثر دو محیط دیگر روی رشد پروتوکورم‌ها نیز تطابق دارد (جدول۱). وجود فسفر در محیط کشت نیز می‌تواند رشد و نمو دان‌هال‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. بررسی اثرات غلظت‌های فسفات و نیتروژن در کشت غیرهم‌زیست پنج نوع ارکیدهٔ خاکروی بومی اروپایی نشان داد وزن تر پروتوکورم‌های *D. majalis* در حضور غلظت‌های بالای فسفات بیشتر از شاهد است. هرچند جوانه‌زنی *B. purpurea* در تمام محیط‌های آزمایش رخ داد، در محیط V&W که حاوی بیشترین میزان غلظت فسفات بود تعداد زیادی از دان‌هال‌ها به مرحلهٔ پیشرفته رسیدند، که احتمال دارد ناشی از نیاز به غلظت‌های بالای فسفر برای نمو گیاهچه‌ها باشد [۱۵]. در مورد ارکیدهٔ خربقی، میزان غلظت فسفر موجود در محیط‌ها با ترتیب آن‌ها از نظر رشد پروتوکورم تطابق کامل دارد. بنابراین، ممکن است این ارکیده از نظر نیاز به فسفر متفاوت باشد و فسفر کمتر موجب بهبود رشد پروتوکورم‌های آن شود.

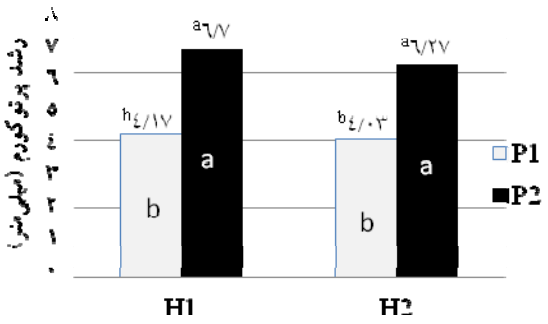
نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از دو گرم در لیتر پپتون در محیط‌های کشت روی درصد جوانه‌زنی بذرها و نیز رشد پروتوکورم‌ها کاملا معنی‌دار است. میانگین درصد جوانه‌زنی بذرها در محیط‌های دارای پپتون (۱۹/۲٤٪) در مقایسه با محیط‌های بدون پپتون (۱۳/۵۹٪) کاملا معنی‌دار بود. میانگین رشد پروتوکورم‌ها نیز در محیط‌های دارای پپتون (٦/٤۹ میلی‌متر) اختلاف کاملا معنی‌داری با محیط‌های بدون پپتون (٤/۱ میلی‌متر) داشت. اثر متقابل محیط کشت و استفاده از پپتون روی درصد جوانه‌زنی و نیز رشد پروتوکورم‌ها کاملا معنی‌دار است (نمودارهای ۳، ٤). بهترین ترکیب برای جوانه‌زنی بذر محیط کشت فاست تغییریافته دارای پپتون (MF P2) (٤۲/۵۳٪) با اختلاف کاملا معنی‌دار نسبت به سایر ترکیبات بود (نمودار ۳). بهترین ترکیب برای رشد پروتوکورم‌ها نیز محیط فاست تغییریافته دارای پپتون (MF P2) (۱٦/۱۷ میلی‌متر) با اختلاف کاملا معنی‌دار نسبت به سایر ترکیبات بود (نمودار ٤). اثر متقابل نوع قند و استفاده از پپتون روی درصد جوانه‌زنی و نیز رشد پروتوکورم معنی‌دار بود (نمودارهای ۵ و ٦). بهترین ترکیبات برای جوانه‌زنی بذر استفاده از ترکیب قندی پنج گرم فروکتوز و دوازده گرم ساکارز در لیتر همراه (۲٤/۱۸٪) یا بدون پپتون (۱۹/۳۱٪) بود. در مورد رشد پروتوکورم‌ها، محیط‌های دارای سی گرم ساکارز و دو گرم پپتون (٦/۷ میلی‌متر) بهترین رشد را ایجاد کردند.



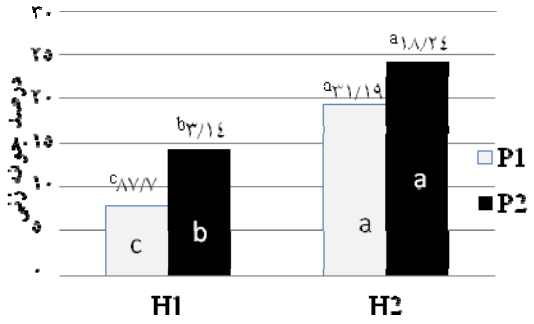
شکل ۳. اثر متقابل محیط کشت و پپتون روی درصد جوانه زنی بذر



شکل ٤. اثرمتقابل محیط کشت و پپتون روی رشد پروتوکورم



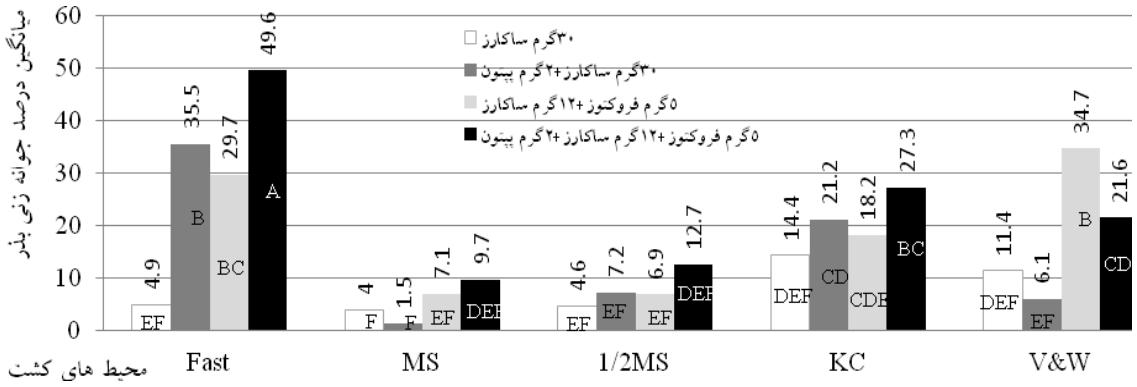
شکل ۵. اثرمتقابل قند و پپتون روی درصد جوانه‌زنی



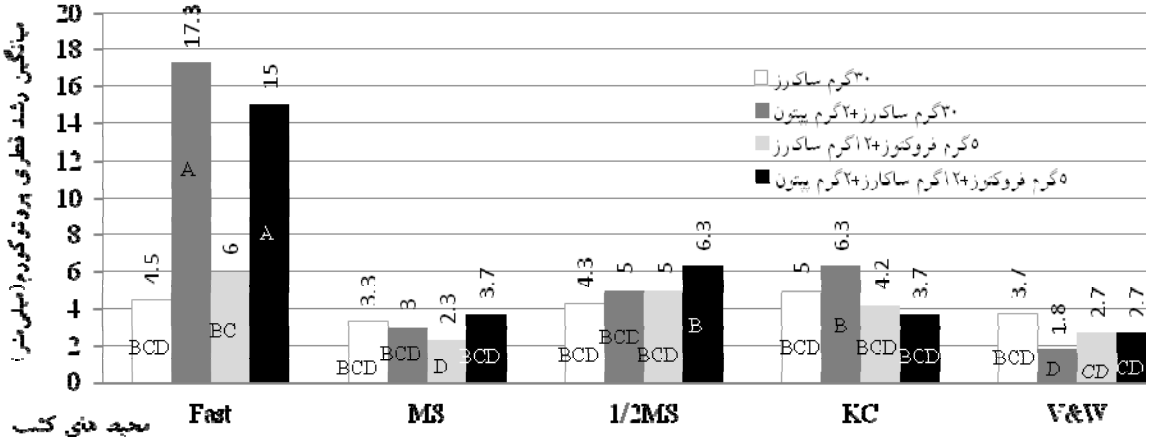
شکل ٦. اثرمتقابل قند و پپتون روی رشد پروتوکورم

تغذیهٔ نیتروژنی برای رشد و نمو گیاهان ضروری است، ولی معلوم شده است که منابع نیتروژن از نظر اثر روی جوانه‌زنی گونه‌های مختلف ارکیده متفاوت هستند [۵۰، ۵۵]. بعضی پژوهشگران اعتقاد دارند به‌دلیل آنکه قارچ‌ها به‌طور طبیعی نیتروژن آلی را برای بذر ارکیده‌ها تأمین می‌کنند؛ بنابراین، یک منبع نیتروژنی آلی می‌تواند برای جوانه‌زنی و نمو آن‌ها مفید باشد [٤]. نیتروژن آلی توانست پیشرفت رشد و نمو *Habenaria macroceratitis* و *Platanthera ciliaris* را تحت تأثیر قرار دهد [٤، ۵۰]. سبزشدن غیرهم‌زیست درون‌شیشه‌ای اغلب با نیتروژن آلی بیرونی تحریک می‌شود و اثر نیتروژن آلی مثبت یا خنثی گزارش شده است [٤٣]. شاید بخشی از آن به این دلیل باشد که نیتروژن به این شکل با سهولت کمتری جذب می‌شود. وقتی نیتروژن آلی به یک دستورالعمل اضافه می‌شود اغلب جایگزین اندکی از نیتروژن غیرآلی مصرفی می‌شود. به نظر می‌رسد غلظت‌های بالای نیتروژن آلی در محیط کشت قابل تحمل است. عصارهٔ مخمر که مقدار بالایی از اسیدهای‌آمینه را دارد، در غلظتی بالای پنج درصد، بدون ایجاد هیچ اثر مضری برای سبزشدن *Galeola septentrionalis* استفاده شد [٦٠]. گزارش شده است که محیط کشت حاوی پپتون در مقایسه با محیط دارای آسپارژین از نمو پروتوکورم‌های *Spathoglottis* بهتر حمایت می‌کند [۱۳]. استفاده از پپتون موجب جوانه‌زنی سریع و پیشرفت نمو پروتوکورم‌ها در ارکیدهٔ خاکروی *Calopogon tuberoses*شد [۳۳]. اضافه‌کردن پنج صدم درصد پپتون به محیط کشت، جوانه‌زنی بذر جنس‌های *Paphiopedilum* و *Vanda* را به‌طور معنی‌دار افزایش داد [۱۳]. پپتون موجب افزایش یکنواختی نمو گیاهچه‌ها نیز شده است [۳۲]. در یک ارزیابی آزمایشی برای به حداقل رساندن محیط کشت مصرفی در سبزکردن هم‌زیست *Liparis lilifolia* معلوم شد که سبزشدن بذرها در محیط بدون عصارهٔ مخمر در مقایسه با محیط دارای مخمر به‌طور معنی‌داری پایین‌تر و تقریبا به ضعیفی سبزشدن روی آگار است [٤٣]. این مسئله گویای آن است که برخی ترکیبات عصارهٔ مخمر، احتمالا برخی از اسیدهای‌آمینه برای سبزشدن اساسی هستند و نه تنها گیاهچه‌ها، بلکه قارچ‌ها نیز نمی‌توانند آن‌ها را سنتز کنند. احتمال دارد اجتماع قارچ‌ها و گیاهچه‌ها موجب شود تا بتوانند ترکیبات آلی به غیر از کربوهیدرات‌ها را از مواد آلی که روی آن تغذیه می‌کنند، به‌دست آورند [٤٢]. نتایج برخی آزمایش‌ها نشان داد که نرخ جوانه‌زنی چند ارکیدهٔ خاکروی مقاوم به سرما روی محیط کشت حاوی نیتروژن آلی بالاتر است [۳۸، ۵۵]. البته باید اشاره کرد که مقدار واقعی نیتروژن موجود در پپتون معلوم نیست [۳۲]. در مجموع نتایج این آزمایش نیز مؤید اثر مثبت پپتون به‌عنوان منبعی از نیتروژن آلی روی جوانه‌زنی و رشد بعدی پروتوکورم‌های ارکیدهٔ خربقی است و نتایج اثر مثبت استفاده از نیتروژن آلی به‌ویژه نتایج مربوط به استفاده از پپتون در پژوهش‌های قبلی را تأیید می‌کند.

بررسی مجموع اثرات متقابل انواع محیط کشت، انواع ترکیبات قندی و استفاده از پپتون (نمودارهای۷ و ۸) نشان داد که محیط فاست تغییریافتهٔ دارای فروکتوز، ساکارز و پپتون (MFH2P2) با اختلاف کاملا معنی‌دار نسبت به سایر ترکیبات بهترین ترکیب برای جوانه‌زنی (٤٩/٦٪) است (نمودار ۷). بهترین ترکیبات برای رشد پروتوکورم‌ها به ترتیب محیط فاست تغییریافتهٔ دارای ساکارز و پپتون (MFH1 P2) (۱۷/۳ میلی‌متر) و محیط فاست تغییریافتهٔ دارای فروکتوز، ساکارز و پپتون (MFH2 P2) (پانزده میلی‌متر) بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر و با اختلاف کاملا معنی‌دار نسبت به سایر ترکیبات بودند (نمودار ۸).



شکل ۷. اثرمتقابل محیط‌های کشت دارا یا فاقد پپتون و ترکیبات قندی روی درصد جوانه‌زنی بذر



شکل ۸. اثر محیط‌های کشت دارا یا فاقد پپتون و ترکیبات قندی متفاوت روی رشد پروتوکورم

۵.۳. نتیجه‌گیری نهایی

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که از میان پنج محیط کشت مورد آزمایش، محیط فاست بهترین محیط برای جوانه‌زنی بذر و رشد پروتوکورم‌های ارکیدهٔ خربقی معمولی است و اضافه‌کردن مواد آلی، پپتون، در این محیط می‌تواند تأثیر چشمگیری روی درصد جوانه‌زنی و نیز رشد پروتوکوم‌های حاصل داشته باشد. جوانه‌زنی نیازمند وجود منو ساکاریدهایی همچون فروکتوز به تنهایی یا در کنار دی‌ساکاریدها است. به نظر می‌رسد نوع و ترکیب قندی، تفاوت معنی‌داری روی رشد پروتوکورم‌ها ندارد و ساکارز به تنهایی می‌تواند اثر بهتری روی ادامهٔ رشد پروتوکورم‌ها داشته باشد.

منابع

۱. شاهسواری، ع؛ (۱۳۷٦). ثعلب‌های ایران (مطالبی دربارهٔ شناخت ثعلب‌ها، کلید شناسایی، معرفی گونه‌ها و نیز پراکندگی آن‌ها در ایران). تهران، انتشارات مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، ص. ٦٥.

۲. رنتس، ج؛ (۱۳۷٦). گل های ارکیده ایران. مترجم محمدیان، ح؛ انتشارات راهنما، ص. ۱۲٦.

۳. مظفریان، و؛ (۱۳۷۵). فرهنگ نام‌های گیاهان ایران(لاتینی ـ انگلیسی ـ فارسی). تهران، مؤسسه فرهنگ معاصر تهران، ص. ۱۰٦٤.

4. Anderson AB (1996) The rei ntroduction of *Platanthera ciliaris* in Canada. North American Native Terrestrial Orchid Conference. Germantown. Maryland. 73–76

5. Arditti J (1973) Factors affecting the germination of orchi d seed. The Botanical Review. 3: 1-97

6. Arditti J (1979) Aspects of orchid physiology. Advances in botanical research. London: Academic Press. 7:421-655.

7. Arditti J *et al.*(1982) Seed germ ination of North American orchids. 1. Native California and related species of *Calypso, Epipactis, Goodyera, Piperia* and *Platanthera.* Bot. Gaz. 142: 442-453

8. Arditti J *et al.* (1990) The cont ribution of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. Lindleyana. 5:429-255

9. Arditti J and Ghani AKA (2000) Tansley review No. 110- Num erical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytol.145:367-421

10. Butcher D and M arlow SA (2010) 3. Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids, Modern Methods In Orchid Conservation: The Role of Phy siology, Ecology and M anagement. Jodrell Laboratory Royal botanic Gardens, Kew

11. Cheruvathur M K *et al.*(2010) Adventitious shoot induction from cultured internodal explants of Malaxis acuminata D. Don, a valuable terrestrial medicinal orchid. Plant Cell Tiss Organ Cult.101:163– 170

12. Curtis JT (1936) The germ ination of nat ive orchid seeds. Am erican Orchid Society Bulletin.5: 42-47.

13. Curtis JT (1947) Studies on the nitrogen nutrition of orchidembryos. AOS Bull.16:654–660

14. De Pauw MA and R emphrey WR(1993) In vitro germination of three Cypripedium species in relation to time of collection, media and cold treatment. Canadian Jornal of Botany.71: 879-885

15. Dijk E (1988) Mykorrhizen der Orchi deen. II Die Pilze. Die Orchidee. 39: 116-20

16. Do Rego MM *et al.* (2009) M icropropagation of an Amazonian Terrestrial Orchid (*Brassia biddens*) from Roraima State, Brazil . Acta Hort. 813. ISHS . 459-463

17. Eiberg H (1970) Asym biotisk frospiting og kulturforsog hos nogle europaisle jordorkideer. MSc thedid. Univerdity of Copenhagen.Plant Phydiological Laboratory.

18. Fast G (1976) Moglichkeiten zur Massenvermehrung von *Cypripedium calceolus* undanderen europaischen Wildorchideen. Proc. 8th World Orchid Conf.359-363

19. Fast G(1982) European t errestrial orchids (Symbiotic and asym biotic methods). Arditti J (ed.) In: Orchid Biology. 11. R eviews and perspectives. Orchid seed germination and seedling culture - a m anual. 309-326. Ithaca, New York, Cornell University Press

20. Fast G (1983) st and und aussi chten bei der anzucht europaischer orchideen. DeOrchidee. Sonderheft Marz.97-100

21. Fast G (1985) Zur okol ogie einiger mitteleuropaischer waldorchideen unter besonderer berucksichtigung der bodenver haltnisse in Bayern. Die Orchidee. 36:148-52

22. Finkelstein RR and TJ Ly nch (2000) Absci sic acid inhibition of radical emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. Plant Physiol. 122:1179–1186

23. Gamborg OL (1970) The effects of amino acids and ammonium on t he growth of pl ant cells in suspension cultures.Plant Physiol. 45:372-375

24. Gorecki R *et al.* (1996) Soluble carbohydrates in white lupin seeds m atured at 13 and 28C. Crop Sci. 36:1277–128

25. Harvais G (1973) Growt h requirements and development of *Cymbidium reginae* in axenic culture. Can J. Bot. 51:327-332

26. Harvais G and Hadl ey G (1967) The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. New Phytologist.66:217-230

27. Helgeson JP *et al.* (1970) Medium and t issue sugar concentrations during cutokinin-controlled growth of tobacco callus tissues. 484-492. in Carr D.J. (ed) Plant Growth substances, Springer verlag, Berlin, Hridelberg, New York.

28. Ichihashi S and amashita MY(1977) Studies on the media for orchid seed germ ination. 1. The effects of balances inside each cation and anion group for t he germination and seedl ing development of *Bletilla striata* seeds. J. Jpn. See. Hortic. Sci. 45: 407-414.

29. IUCNISSC Orchid Specialist Group (1996) Orchids - St atus survey and conservation action plan. Hagsater, E., Dumont, V. (Eds.).Gland Switzerland and Cambridge, UK, IUCN (Compiled by: Pridgeon, A.M.).

30. Jamir C *et al.* (2002) In vi tro propagation of *Cymbidium iridioides* and *C. lowianum*, J. Orchid Soc. India.16:83-89

31. Johansen B and Rasmussen H (1992) *Ex situ* conservation of orchids. Opera Bot.113: 43-48

32. Kauth PH (2005) *In vitro* Seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacoila lanceolata* var. *lanceolata*: Two Florida n ative terrestrial Orchids, A Th esis presented to the graduate school of t he Univesity of Fl orida in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science Univerdity of florida

33. Kauth PJ, Vendrame WA and Kane ME (2006) In vitro seed culture and seedling development of Calopogon tuberosus. Plant Cell Tissue Organ Cult.85:91–102

34. Kinderen GVan der (1995) Observat ion on in situ germination of *Epipactis helleborine*(L.) Crantz. Lindleyana.10:68-73

35. Kitsaki C *et al.* (2004) In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versrs im mature seeds from several *Ophrys* species (*Orchidaceae*). Plant Cell Rep. 23: 284-290

36. Leroux G, Barabe D and Vi eth J(1995) Comparative morphogenesis of *Cypripedium acaule* (Orchidaeceae) protocorms cultivated in vitro with or wi thout sugar. Can. J. Bot. 73:1391–1406

37. McAlister BG and Staden J Van(1998) In vitro culture of Eul ophia species. S. Afr. J. Bot. 64:264–266

38. Malmgren Malmgren S(1996) Orchi d propagation: Theory and pract ice. 63-71. In Allen, C. ed. North Am erican Native Terrestrial Orchids Propagation and Production. North American Native Terrestrial Orchid Conference, Germantown, Maryland.

39. Mead J W and Bulard C (1979) Vitamins and nitrogen requirements of Orchi s laxiflora Lamk. New Phytol. 83: 129–136

40. Oliva AP and Arditti J(1984) Seed germination of North Am erican orchids. II. native California and rel ated species of *Aplectrum*, *Cypripedium*, and *Spiranthes*. Botanical Gazette. 145: 495-501

41. Pridgon AM (1996) Orchi ds—status survey and conservation action plan. IUCN. Cambridge. UK.

42. Rasmussen HN (1995) Terrestial orchids: from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Cambridege. UK.

43. Rasmussen HN(2002) Recent developments in the study of orchi d mycorrhiza. Plant and Soil. 244: 149–163

44. Rittershausen B and Rittershausen W (2001) ORCHIDS a pract ical hand book, a beautiful guide to growing orchids. published by Hermes House

45. Roy J and Banerjee N (2002) Opt imization of *in vitro* seed germination, protocorm growth and seedling proliferation of *Vanda tessellate* (Roxb.) Hook Ex G Don. Phytomorphology. 52: 167-178.

46. Sangba T and Ranjan Deb Ch (2005)Effect od different factors on non-sy mbiotic seed germination, formation of prot ocorm-like bodies and plantlet morphology of *Cleisostoma racemiferum*(Lindl.) Garay, Indian Journal of Biotechnoligy. 5: 223-228

47. Sinha S L *et al.*(1998) In vitro multiplication of *Aerides rosea* Loddiges ex. Paxt. Through Through asymbiotic seed germ ination, Arunachal For News.(16):38-44

48. Smith SE and Read DJ(1997) Mycorrhizal symbiosis. Academic press, London

49. Stenberg M L and Kane M E(1998) *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid. Lindleyana.13: 101-112.

50. Stewart SL and Kane M E (2006) Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell Tiss Organ Cult.86:159–167

51. Stoutamire WP (1964) Seeds and seedl ings of native orchids. *Michigan Botanist.* 3: 107-119

52. Szendrak E and R ead PE (2000) Invi tro propagation and anat omical studies of temperate orchid species (Orchidaceae), Acta Hort. 520. ISHS. 8.

53. United States Department of Agri culture (USDA)(2005) Fl oriculture Crops Summary. last accessed 15 June

54. VanWaes J (1984) *In vitro* studie van de kierningsfysiologie van W esteuropese orchideegn . Ph. D . Dissertation . Fac . Landbouwwet . Ghent,:223 p.

55. Van Waes JM and Debergh PC (1986) *In vitro* germination of som e Western European orchids. *Physiologia Plantarum.*67: 253-261.

56. Vejsadova H (2006) Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro, Acta Bio logica Cracoviendia Series Botanica.48/1: 109–113

57. Wotavova-Novotna K *et al*.(2007) Effects of sugars and growt h regulators on i n vitro growth of *Dactylorhiza* species, Biologia Plantarum. 51(1): 198-200

58. Yuan K and W ysocka-Diller J (2006) Phytohormone signalling pathways interact with sugars during seed germ ination and seedling development. J. Exp. B iol.57:3359–3367

59. Zelmer CD and C urrah RS(1997) Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte. Lindleyana.12:142-148

60. Zettler LW and McInnis TM (1994) Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered t errestrial orchid (Platanthera integrilabia). Plant Science.102: 133-138.