

بهینه‌سازی جوانه‌زنی ناهمزیست ارکید خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia* Boiss. & Hohen)

شیرین دیان‌تی دیلمی^{۱*}، محسن کافی^۲ و سید علیرضا سلامی^۳

۱. استادیار، گروه باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

۲ و ۳. استاد و استادیار، گروه مهندسی و علوم باغبانی و فضای سبز پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۲۰)

چکیده

برای بهینه‌سازی جوانه‌زنی بذر ارکید خربقی معمولی، از دوازده سطح تیمار مختلف قندی (ساکارز، فروکتوز، گلوکز و دو ترکیب از قندهای فروکتوز و ساکارز) به همراه دو سطح تیمار نیتروژن آلی (۲ گرم در لیتر پپتون) در محیط کشت فاست استفاده شد. نتایج نشان داد تیمارهای قندی ترکیب ۲ فروکتوز-ساکارز (H12)، ۱۰ گرم در لیتر ساکارز (H8)، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز (H2) و ترکیب ۱ فروکتوز-ساکارز (H11) بدون اختلاف معنی‌دار به ترتیب بهترین تأثیر را بر درصد جوانه‌زنی و تیمارهای ترکیب ۱ و ۲ فروکتوز-ساکارز (H11 و H12) بهترین تأثیر را در رشد پدازه‌نماها داشتند. تیمارهای ترکیب ۲ فروکتوز-ساکارز، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و ۱۰ گرم در لیتر ساکارز (H12P2، H2P2، H8P2) که همگی ۲ گرم در لیتر پپتون داشتند، بهترین ترکیب برای جوانه‌زنی ناهمزیست بذر (به ترتیب با میانگین جوانه‌زنی ۷۹/۶ درصد، ۷۴/۶ درصد و ۷۱/۲ درصد) بودند. تیمار ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (H10P2) بهترین ترکیب برای رشد پدازه‌نماها (۱۷/۳ میلی‌متر) بود. در مجموع می‌توان گفت نوع قند و مواد آلی بر درصد جوانه‌زنی بذر به صورت ناهمزیست و نیز بر رشد بعدی گیاهچه‌های پدازه‌نمای این گونه تأثیر معنی‌دار دارند. بنابراین می‌توان با استفاده از ترکیبی مناسب از آن‌ها درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های این گونه را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: ارکید بومی ایران، پپتون، ثعلب خاکروی، رشد پدازه‌نما، کشت درون شیشه‌ای، کربوهیدرات (قند).

Improvement of asymbiotic germination of *Epipactis veratrifolia*

Shirin Dianati Daylami^{1*}, Mohsen Kafi² and Seyed Alireza Salami³

1. Associate Professor, Aburayhan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran

2, 3. Professor and Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran

(Received: Sep. 5, 2015 - Accepted: Aug. 10, 2016)

ABSTRACT

For improvement asymbiotic seed germination media of temperate terrestrial orchid *Epipactis veratrifolia*, 12 different concentrations of the carbohydrates (fructose, glucose, sucrose and two combination of fructose with sucrose) were assessed on the seed germination and protocorm development, in the presence (2g L^{-1}) and absence of peptone in Fast medium. Results revealed significant differences between treatments on seed germination percentage and protocorm growth. Carbohydrate treatments; H12 (3.5g/l fructose+14 g/l sucrose), H8(10 g/l sucrose), H2 (20 g/l glucose), and H11 (5 g/l fructose+12 g/l sucrose) had significant effect on seed germination percentage. H11 and H12 was the best medium for protocorm growth. H8P2(10 g/l sucrose+2 g/l peptone), H2P2(20 g/l glucose+2 g/l peptone) and H12P2(3.5g/l fructose+14 g/l sucrose+2 g/l peptone) were the best for seed germination respectively with 79/6%, 74/6% and 71/9% seed germination percentage. H10P2 (30 sucrose g/l+2 g/l peptone) with 17/3mm growth, significantly was the best for protocorm growth. Therefore kind and concentration of carbohydrate and presence of organic nitrogen (peptone) influence asymbiotic seed germination percentage and protocorm growth and could improved both of them. This finding revealing that it is possible to improvement asymbiotic seed germination of this species orchid with combination of mono and disaccharides and organic nitrogen.

Keywords: Carbohydrate, *In vitro* culture, native orchid of iran, orchid, peptone, protocorm growth.

مقدمه

خانوادهٔ ثعلب (Orchidaceae) با داشتن حدود ۲۵۰۰۰ گونه و ۸۰۰ جنس یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی است (Johnson *et al.*, 2011). از نظر بسیاری از مردم ارکیده‌ها عجیب‌ترین گل‌ها را دارند که موجب کمیابی و گران بودنشان شده است. ولی تنها شمار اندکی از آن‌ها به صورت گیاهان تجاری در سطح گسترده تولید می‌شوند. ارکیده‌های خاکرست مناطق معتدله^۱ که با عنوان ارکیده‌های مقاوم و نیمه مقاوم^۲ شناخته می‌شوند، هرچند که محبوبیت بی‌نظیری به‌عنوان گل وحشی دارند ولی برخلاف انواع دارزی گرمسیری^۳، هنوز در مقیاس گسترده به صورت گیاه باغچه‌ای یا گل‌گلدانی و شاخه بریده در نیامده‌اند. امروزه کارهایی در مورد ارکیده‌های مقاوم به‌عنوان گیاهان باغچه‌ای انجام شده و فهرستی منتشر شده که در آن بیش از ۱۵۰ گونه ارکیدهٔ مقاوم یا نیمه مقاوم دارای قابلیت (پتانسیل) برای تبدیل شدن به گیاه باغچه‌ای معرفی شده است که بیانگر توانمندی گستردهٔ موجود در این گروه گیاهی است (Jorgensen & Andersen, 1998). امروزه برای ارکیده‌های مقاوم بازار خوبی وجود دارد که متأسفانه به دلیل تولید بسیار کم این نوع گیاهان، خیلی رضایت‌بخش نیست. بالا بودن قیمت ارکیده‌های مقاوم، نتیجهٔ تولید پایین آن‌هاست که متأسفانه مشوق گردآوری این گیاهان از طبیعت می‌شود. البته این مسئله از سوی دیگر موجب سودمندی تولید مصنوعی این نوع ارکیده‌ها نیز می‌شود. مشکل اصلی در تولید و سازگار کردن ارکیده‌های مقاوم به‌عنوان گیاهان گلدانی تجاری جدید آن است که افزایش بیشتر گونه‌ها مشکل یا بسیار کند است (Johnson *et al.*, 2011). در مجموع، ارکیده‌ها را بر پایهٔ پاسخ بذرهايشان نسبت به محیط کشت سترون (استریل) درون شیشه‌ای می‌توان به سه دسته تقسیم کرد. گروه اول ارکیده‌های گرمسیری هستند که ساده‌ترین نیازها برای جوانه‌زنی را دارند و بنابراین به‌طور معمول به‌آسانی روی یک محیط کشت ساده جوانه می‌زنند. گروه بعدی ارکیده‌های خاکرست گرمسیری هستند که به‌طور کلی از نظر جوانه‌زنی

دشواری از گروه اول هستند، زیرا نیازهایشان پیچیده‌تر با ویژه‌تر است. ارکیده‌های خاکرست نواحی معتدله جز گروه سوم و سخت‌ترین و طاقت‌فرساترین گروه از نظر جوانه‌زنی هستند. تاکنون از روش کشت همزیست^۴ درون شیشه‌ای به‌عنوان کارآمدترین روش برای افزایش شماری از ارکیده‌های خاکرست معتدله استفاده شده است. به‌هرحال استفاده از این روش همچنان محدودیت‌ها و مشکلاتی را دارد. مشکل اصلی با آگاهی از چگونگی ارتباط ارکیده با قارچ‌ها و یافتن نوع مناسب آن‌ها برای همزیستی آغاز می‌شود و ناشناخته بودن نوع قارچ همزیست موجب شده که برای بیشتر گونه‌ها، سازگار شدن با سامانهٔ افزایش همزیست همچنان نیازمند بررسی بیشتر باشد (Testtelova *et al.*, 2012; Jørgensen & Andersen, 1998).

نخستین بار آزمایش‌های Knudson (1946) نشان داد، با استفاده از قندهای یک محیط دارای قند به‌عنوان منبعی از کربن احیا و نیز مواد کانی مناسب می‌توان جوانه‌زنی درون شیشه‌ای بذر ارکیده‌های دارزی را بدون استفاده از قارچ‌های قارچ‌ریشه‌ای (مایکوریزایی) یعنی به صورت کشت ناهمزیست^۵ افزایش داد (Zeng *et al.*, 2012). جایگزین کردن قندهای مناسب به‌جای قارچ‌های قارچ‌ریشه‌ای در کشت‌وکار درون شیشه‌ای موجب آسان‌تر شدن و نیز افزایش جوانه‌زنی بذر ارکیده‌ها شد (Wotavova- Novotna *et al.*, 2007). در شرایط کشت درون شیشه‌ای بذر به شیوهٔ ناهمزیست، بذرهاي ارکیده قادر به استفاده از طیف گسترده‌ای از الیگو ساکاریدها، دی ساکاریدها، منوساکاریدها و عصاره‌های پیچیدهٔ گیاهی حاوی کربن هستند. ولی یافتن نوع و میزان مناسب ترکیب‌های قندی برای جوانه‌زنی گونه‌های مختلف ارکیده همچنان نیازمند بررسی است. نیاز به کربوهیدرات‌های بیرونی برای کشت درون‌شیشه‌ای بذر ارکیده‌ها، تا حدودی به‌طور فراگیر توسط پژوهشگران این رشته پذیرفته شده است. حتی اگر گونه‌ای از ارکیده‌ها بدون وجود کربوهیدرات قادر به جوانه‌زنی

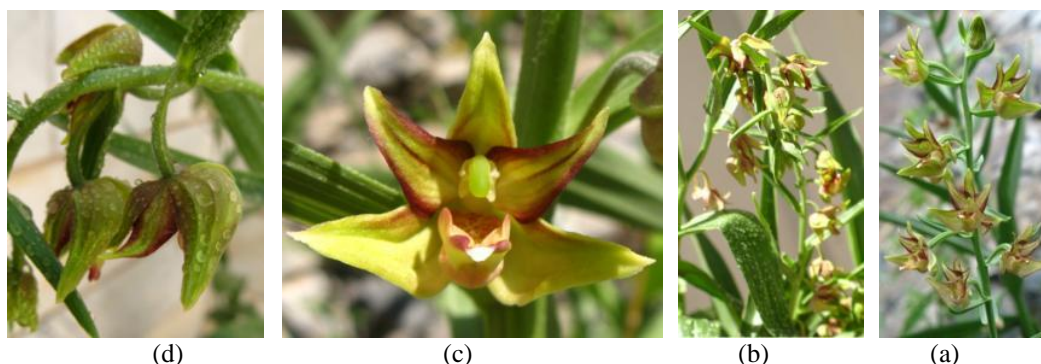
1. Terrestrial orchids of temperate origin
2. Hardy or half hardy orchids
3. Tropical or subtropical epiphytes

4. Symbiotic germination
5. Asymbiotic germination

ارکیدة خربقی معمولی^۲ از گروه ارکیده‌های خاکرست نواحی معتدله است (Mozaffarian, 2006; Rens, 1998; Shamsavari, 2001) (شکل ۱). این گیاه در برخی نواحی ایران به‌صورت خودرو رویش می‌یابد. گونه‌ی یادشده ساقه‌ی زیرزمینی کوتاه و برگ‌های پهن تا نیزه‌ای شکل و گل‌های خوشه‌ای بزرگ ۲-۴ سانتی‌متر و تا حدی خمیده، بسیار رنگین و گلبرگ‌هایی کمی کوتاه‌تر از کاسبرگ‌ها دارد و در نوک لابل^۳ آن یک لکه سفید وجود دارد (شکل ۱). زمان گلدهی آن نیمه اردیبهشت تا اوایل تیرماه و میوه آن به شکل کپسول حاوی هزاران بذر بسیار ریز است (Rens, 1998; Shamsavari, 2001). به‌نظر می‌رسد این گیاه قابلیت استفاده به‌عنوان گل شاخه بریده و یا باغچه‌ای را داشته باشد. برای استفاده مناسب از این‌گونه برای ذخیره‌ی ذخائر توارثی (ژرم پلاسما) گیاهی و کارهای اصلاحی رسیدن به شیوه‌ای مناسب برای افزایش انبوه آن ضروری است.

دستیابی به روش مناسب برای افزایش انبوه گروه سوم ارکیده‌ها به‌صورت کشت درون شیشه‌ای به شیوه ناهمزیست می‌تواند تحولی بزرگ به شمار آید. بنابراین در این پژوهش به‌منظور افزایش درصد جوانه‌زنی بذر و بهینه‌سازی افزایش انبوه این گیاه به شیوه کشت ناهمزیست، تأثیر تیمارهای مختلف قندی و پیتون روی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های پدازه‌نمای^۴ آن در محیط فاست^۵ (Fast, 1976) آزمایش شد.

باشد، بدون وجود آن‌ها پس از جوانه‌زنی نمو محدودی خواهد داشت و از بین می‌رود (Johnson et al., 2011; Schneider et al., 2014). به‌طورمعمول از کربوهیدرات‌های ساکارز، فروکتوز یا گلوکز در محیط کشت استفاده می‌شود. البته ترکیب‌های دیگری شامل مانوز، رافینوز، مانیتول و ترهالوز^۱ نیز استفاده می‌شوند. چنانچه دو مورد آخر منشأ قارچی داشته باشند کارایی ویژه‌ای خواهند داشت (Butcher & Marlow, 2010). درافزایش ناهمزیست برای آغاز جوانه‌زنی در حضور قارچ‌ریشه، پلی‌ساکاریدهایی همچون نشاسته یا سلولز لازم هستند. ولی در افزایش ناهمزیست درون شیشه‌ای، منو یا دی‌ساکاریدهایی مانند ساکارز، گلوکز یا فروکتوز ترجیح داده می‌شوند (Wotavova-Novotna et al., 2007) که به‌طورمعمول در غلظت‌های بین ۵ تا ۳۰ گرم در لیتر در محیط کشت به‌کار می‌روند. تغییر غلظت کربوهیدرات‌ها در فرآیند اتوکلاو کردن امکان‌پذیر است (Butcher & Marlow, 2010). معلوم شده آبکافت (هیدرولیز) ساکارز در فرآیند اتوکلاو کردن محیط‌های کشت رخ می‌دهد و به‌طور کامل یا تا حدی به‌صورت منوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز آبکافت می‌شود. گزارش شده است که ۱۵-۱۰ درصد ساکارز می‌تواند به گلوکز و فروکتوز تبدیل شود (George et al., 2008). بنابراین مقایسه کارایی ترکیب‌های این دو نوع قند با ساکارز منطقی است.



شکل ۱. a و b) بخشی از گل‌آذین ارکیدة خربقی معمولی؛ c) گلچه؛ d) غنچه‌ها
Figure 1. a, b) Part of the inflorescence *Epipactis veratrifolia* orchid; c) Floret; d) Flower buds

1. Raffinose, Mannitol and Trehalose
2. *Epipactis veratrifolia*; Syn. *Helleborine veratrifolia*; *Epipactilis consimilis*
3. Labellum
4. Protocorm
5. FAST

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش از بذرهای ارکیدۀ خربقی معمولی استفاده شد. کپسول‌های رسیده در اوایل تیرماه پیش از شکافتن، از روی گیاه در رویشگاه طبیعی از ارتفاعات مسیر جاده چالوس (ارتفاع ۱۷۱۰ متر، عرض و طول جغرافیایی $۵۱^{\circ} ۱۶'$ و $۳۶^{\circ} ۲۲'$) گردآوری شدند. بذرهای درون کپسول‌ها خارج و تا زمان استفاده درون پاکت‌های کاغذی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. مدت‌زمان سترون کردن بذرهای پانزده دقیقه با غوطه‌ورسازی آن‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم (با استفاده از سفیدکنندۀ خانگی "وایتکس" دارای ۵/۲ درصد غلظت ماده مؤثرۀ کلر فعال) به غلظت ۱۳ درصد بود. پس از آن بذرهای استفاده از آب مقطر سترون سه بار و هر بار به مدت دو دقیقه شستشو شدند.

برای کشت بذرهای از ظرف‌های پتری‌دیش شیشه‌ای سترون به ابعاد ۲۰×۱۰۰ میلی‌متر استفاده شد. در هر پتری‌دیش شمار ۱۰ ± ۱۵۰ بذر کشت شد. برای مقایسۀ تأثیر ترکیب‌های قندی مختلف بر جوانه‌زنی ناهمزبست، از محیط کشت فاست (محیط کشت فاست یک محیط کم غلظت است که برای افزایش ارکیدها استفاده شده است. مواد غذایی اصلی (ماکرو) شامل: $MgSO_4$ ، NH_4NO_3 ، NH_2PO_4 ، $Ca(NO_3)_2$ و $Fe\ EDTA$ (میکرو) شامل: $MnSO_4$ ، KI ، $ZnSO_4$ ، H_3BO_3 و $CUSO_4$ و ویتامین‌ها) استفاده شد (Fast, 1976). دوازده سطح تیمار قندی مختلف شامل ۱۰، ۲۰، ۳۰ گرم در لیتر گلوکز (به ترتیب H1، H2 و H3)، ۷/۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر فروکتوز (به ترتیب H4، H5، H6 و H7) و ۱۰، ۲۰، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (به ترتیب H8، H9 و H10)، ترکیب ۵ گرم فروکتوز و ۱۲ گرم ساکارز در لیتر (H11) و ترکیب ۳/۵ گرم فروکتوز و ۱۴ گرم در لیتر ساکارز (H12) بودند. تیمارهای نیتروژن آلی در دو سطح شامل استفاده از ۲ گرم در لیتر پیتون (P2) یا استفاده نکردن از آن (P1) بودند. pH محیط‌های کشت پیش از اتوکلاو روی ۵،۵ تنظیم و از ۷ گرم در لیتر آگار برای جامدسازی استفاده شد. محیط‌های کشت حاوی تیمارهای مختلف در دمای ۱۲۱ درجه

سلسیوس به مدت بیست دقیقه اتوکلاو و پس از سترون شدن به میزان ۳۰ سی‌سی در هر پتری توزیع شدند. پتری‌دیش‌های حاوی بذر تا هنگام تشکیل پدازه‌نماهای نوک‌دار (شکل ۲) در اتاق رشد با دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس 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 ارکیدۀ خربقی و میزان رشد پدازه‌نماها چهار ماه پس از کشت اندازه‌گیری شد. برای محاسبۀ جوانه‌زنی کل بذرهای کشت‌شده در هر پتری در آغاز کشت شمارش و بذرهای جوانه‌زده به‌طور هفتگی شمرده شد. درنهایت از شمار بذرهای جوانه‌زده در هفته هشتم نسبت به شمار کل بذرهای کشت‌شده در سه پتری برای محاسبۀ درصد جوانه‌زنی استفاده شدند. رشد پدازه‌نماها با اندازه‌گیری طول نهایی پدازه‌نماهای در هر پتری دیش در پایان هفته هشتم محاسبه شدند (شکل ۳).

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. در مجموع بذرهای در ۷۲ پتری‌دیش حاوی محیط کشت فاست به‌صورت ۲۴ تیمار مختلف شامل دوازده سطح تیمار قندی و دو سطح پیتون در سه تکرار و در هر تکرار 10 ± 500 بذر کشت شدند و ویژگی‌های درصد جوانه‌زنی بذر و میزان رشد پدازه‌نما در آن‌ها بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسۀ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح $P=0/05$ انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیۀ واریانس تیمارها نشان داد نوع، غلظت و ترکیب قندها بر درصد جوانه‌زنی و نیز رشد پدازه‌نماها تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد ایجاد کرده‌اند (جدول ۱، شکل‌های ۴، ۵ و ۱۰). نتایج بیانگر اهمیت نوع کربوهیدرات‌های برونزا در بهبود جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه‌های این نوع ارکیده است. بهترین ترکیب قندی برای جوانه‌زنی بذرهای، به ترتیب شامل تیمارهای؛ ترکیب ۳/۵ گرم فروکتوز و ۱۴ گرم ساکارز در لیتر (H12)، ۱۰ گرم در لیتر ساکارز (H8)، ۲۰ گرم

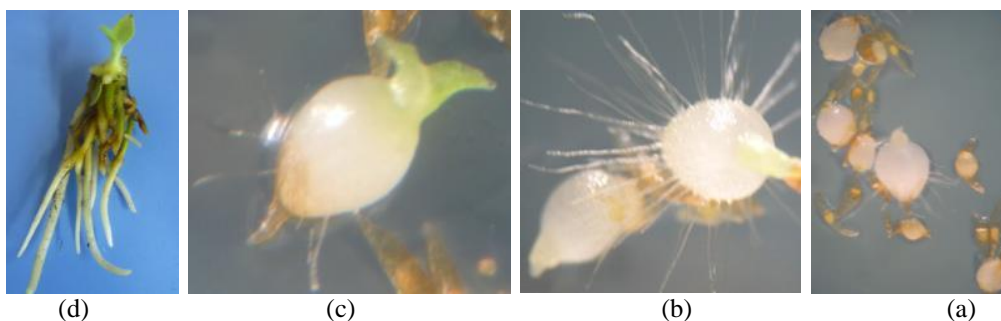
لیتر درصد جوانه‌زنی بالاتری ایجاد کرده و از این لحاظ نتایج مربوط به آن برعکس نتایج مربوط به منوساکاریدها بود. هردو تیمار ترکیبی دارای قندهای فروکتوز و ساکارز درصد مناسبی از جوانه‌زنی را ایجاد کردند، ولی نتایج به‌دست‌آمده از ترکیب دارای ساکارز بیشتر و فروکتوز کمتر (H12) نسبت به دیگری (H11) بهتر بود (شکل ۴).

در لیتر گلوکز (H2) و ترکیب ۵ گرم فروکتوز و ۱۲ گرم ساکارز در لیتر (H11) با اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد نسبت به دیگر تیمارها بودند. منوساکاریدها (گلوکز و فروکتوز) در غلظت ۲۰ گرم در لیتر در مقایسه با ۷/۵، ۱۰ و ۳۰ گرم در لیتر، میزان بهتری از جوانه‌زنی را ایجاد کردند. درحالی‌که غلظت ۱۰ گرم در لیتر ساکارز در مقایسه با ۲۰ و ۳۰ گرم در

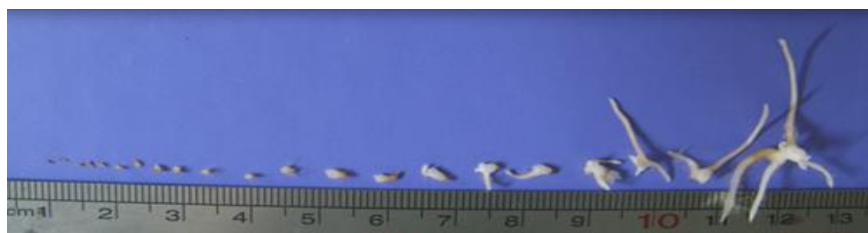
جدول ۱. تجزیه واریانس اثر نوع، ترکیب و نسبت قندهای مختلف و استفاده از پپتون روی درصد جوانه‌زنی بذر و میزان رشد پدازه‌نماها
Table 1. Variance analysis of the combination, different ratio and Kind of sugars and Peptone usage on the seed germination percentage and Protocorm growth.

| SOV | Degrees of freedom (df) | Germination Mean Square | Protocorm growth mean square (Mm) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Carbohydrates | 11 | 1313.1** | 53.4** |
| Peptone | 1 | 20710.2** | 541.8** |
| Carbohydrates × Peptone | 11 | 724.9** | 18.7** |
| Errore | 46 | 41.1 | 3 |

** p<0.01(According to the Duncan's multiple range test).



شکل ۲. (a) بذرها در کنار پدازه‌نماها در مراحل رشدی متفاوت؛ (b) پدازه‌نمای نوک‌دار که بیشترین طول آن در حد ۲ میلی‌متر است؛ (c) پدازه‌نمای دارای دو برگ اولیه که بیشترین طول آن در حد ۳/۵ میلی‌متر است؛ (d) گیاهچه کامل ارکیده خربقی معمولی
Figure 2. a) seeds and Protocorm in different developmental stages; b) protocorm with shoot meristem (maximum length of up to 2 mm); c) protocorm with two leaf primordia (maximum length of up to 3.5 mm); d) Complete plantlet of *Epipactis veratrifolia*.



شکل ۳. روند جوانه‌زنی و رشد پدازه‌نماها (از بذر تا پدازه‌نمای دارای برگ‌های اولیه و ریشه)
Figure 3. Seed germination and Protocorm growth stages (seed to protocorm with leaf primordia and roots)

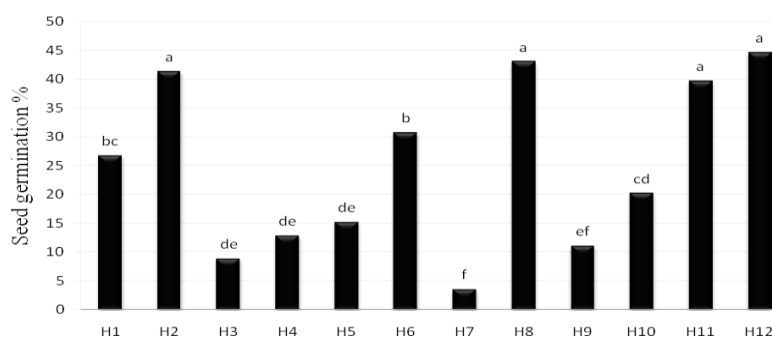
جوانه‌زنی با گیاهان جهش‌یافته (موتانت) علف‌تال (آرابیدوپسیس) به دست آمده است. این پژوهش‌ها آشکار ساخته است که جوانه‌زنی، اوج قلّه زنجیره فعالیت‌های مربوط به چندی از فرآیندهای بسیار

گزارش شده است که غلظت‌های کربن آلی تأثیر شایان‌توجهی در جوانه‌زنی ناهمزیست بذر ارکیده‌ها و تمایز بعدی آن دارند (Sangba & Deb, 2006). بیشتر دانش محققان درباره تأثیر کربوهیدرات‌ها بر تنظیم

آزمایش تا حدی همانند نتایج بررسی بر ارکیده *Bletia purpurea* بود که نشان داد افزایش مولاریته ساکارز از ۱۰ تا ۵۰ میلی‌مول موجب کاهش جوانه‌زنی بذر آن می‌شود. شاید دلیل این موضوع آن باشد که بذرهای در مولاریته بالا دچار تنش فشار اسمزی می‌شوند و یا در اثر تولید محصولات فرعی به‌دست‌آمده از آبکافت ساکارز رشد و نمویشان محدود می‌شود (Dowling & Jusaitis, 2012). گزارش شده است در شرایط درون شیشه‌ای بیشتر ارکیدها می‌توانند برخلاف کربوهیدرات‌های پیچیده‌تر مانند ساکارز، از کربوهیدرات‌های ساده‌تر برونزا به‌عنوان منبع پایه کربنی برای آغاز جوانه‌زنی بذر و حمایت اولیه از نمو پدازه‌نما در شرایط درون شیشه‌ای استفاده کنند. در بررسی اثر کربوهیدرات‌های فروکتوز، ساکارز و دکستروز در جوانه‌زنی بذر و نمو پدازه‌نماهای ارکیده *Habenaria macroceratitis* نتایج معنی‌داری به دست نیامد (Stewart & Kane, 2010). گلوکز منبع عمومی انرژی و کربوهیدرات‌ها در یاخته‌های زنده است، معلوم شده است که گلوکز برونزا با کاهش تجزیه ABA موجب کاهش یا توقف جوانه‌زنی علف تال‌های وحشی و بذرهای برخی گونه‌های دیگر می‌شود (Johnson et al., 2011). در بررسی تأثیر منابع مختلف کربن آلی در جوانه‌زنی درون شیشه‌ای بذر معلوم شد که ۳-۲ درصد ساکارز، فروکتوز و گلوکز برای جوانه‌زنی بذر *Cymbidium elegans* و *Cioelogyne punctulata* مناسب هستند (Sangba & Deb, 2006).

سخت و پیچیده فیزیولوژی است (Johnson et al., 2011). کربوهیدرات‌ها که طی جوانه‌زنی بذر استفاده می‌شوند وظایفی را به عهده دارند، در درجه اول کربوهیدرات‌های ذخیره‌شده به‌عنوان منبع انرژی برای حمایت از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها عمل می‌کنند (George et al., 2008). افزون بر این کربوهیدرات‌ها می‌توانند به‌عنوان مولکول‌های علامت‌دهنده در تنظیم و یکپارچگی چند مسیر بیوشیمیایی مهم دخالت کنند که جوانه‌زنی، رکود بذر و حرکت مواد ذخیره بذر را تحت تأثیر قرار می‌دهند (George et al., 2008; Johnson et al., 2011). به نظر می‌رسد که به‌احتمال کربوهیدرات‌های محلول به‌عنوان نشانه‌هایی گویای تلقیح بذرهای آبگیری کرده ارکیدها توسط قارچ‌ها نیز باشند. البته شواهد بیشتری برای تأیید این مطلب مورد نیاز است. ممکن است کربوهیدرات‌ها با تأثیر بر تولید ریزوئید نقش مهمی در تنظیم همزیستی قارچ-ارکیده بازی کنند و به‌صورت مولکول‌های علامت‌دهنده کلیدی در فرونشاندن رکود بذر یا محدود (بلوکه) کردن مواد غذایی برای جوانه‌زنی بذر به‌کار آیند (Johnson et al., 2011). کربوهیدرات‌ها در کشت‌های درون شیشه‌ای افزون بر تأمین منابع انرژی و کربن، نقش مهمی نیز به‌عنوان عامل اسمزی ایفا می‌کنند (George et al., 2008).

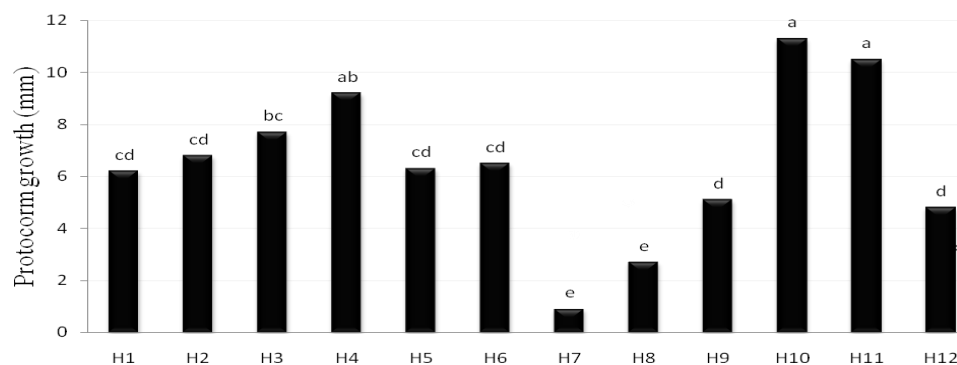
در کشت‌های ناهمزیست، قندهای محلول باید به شکلی در محیط کشت وجود داشته باشند که بتوانند به‌طور مستقیم به‌وسیله بذرهای جذب شوند. نتایج مربوط به تأثیر غلظت‌های ساکارز بر جوانه‌زنی در این



شکل ۴. تأثیر انواع تیمارهای قندی بر درصد جوانه‌زنی بذر
Figure 4. Effect of sugar treatments on seed germination

(نمودار ۲). البته لازم به بیان است که تأثیر قندها روی رشد پدازه‌نماها در غلظت‌های مختلف از روند خاصی پیروی نمی‌کند. به‌هرحال استفاده از ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (H10) توانست بهترین میزان رشد را ایجاد کند.

نتایج آزمایش در مورد رشد پدازه‌نماهای ارکیده خربقی معمولی نشان داد که تیمارهای قندی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (H10) و ترکیب ۵ گرم فروکتوز و ۱۲ گرم ساکارز در لیتر (H11) بهترین میزان رشد را ایجاد کردند



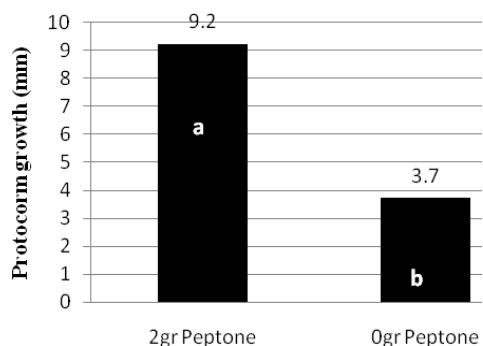
شکل ۵. تأثیر انواع تیمارهای قندی بر میزان رشد پدازه‌نماها
Figure 5. Effect of sugar treatments on protocorm growth

غلظت‌های بالای گلوکز بیشترین تأثیر مثبت را روی میزان رشد شاخه و ریشه ارکیده *D. incarnate* ssp. *incarnata* داشت، ولی با تحریک بافت‌مرده (نکروزه) شدن سریع گیاهچه‌ها همراه بود، بنابراین غلظت متوسط ساکارز (۲۰ گرم در لیتر) برای این گیاه انتخاب شد، زیرا با استفاده از آن عملکرد به نسبت بالا برای میزان رشد شاخه و ریشه و درصد پایین بافت‌مرده مشاهده شد (Wotavova-Novotna *et al.*, 2007). در آزمایش ما نیز بیشترین میزان ساکارز (۳۰ گرم در لیتر) بهترین تأثیر را در رشد گیاهچه‌های پدازه‌نمایی داشت. البته علائمی از بافت‌مرده شدن در دیگر تیمارها نیز مشاهده نشد. در برخی آزمایش‌ها استفاده از فروکتوز همراه با ساکارز و گلوکز تأثیر هم‌افزایی داشته است و موجب رشد بهتر شده است (George *et al.*, 2008). تأثیر تیمار ترکیبی فروکتوز و ساکارز (H11) در این آزمایش نیز این مسئله را تأیید می‌کند.

گزارش شده است به‌غیر از ترکیب‌های قندی، نوع نیتروژن و غلظت آن می‌تواند نقش مهمی در فرآیند جوانه‌زنی ناهمزیست درون شیشه‌ای بذر ارکیده ایفا کند (Schneider *et al.*, 2014, Butcher & Marlow, 2010). مقایسه تیمارهای دارای پپتون با تیمارهای

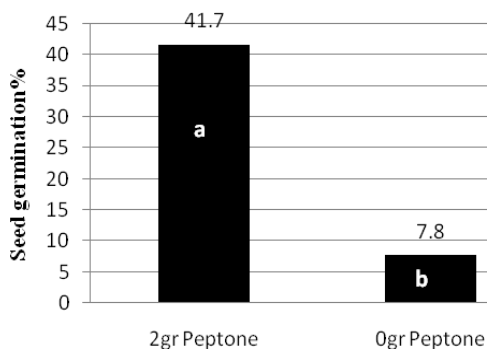
در بسیاری از محیط‌های غذایی کشت‌بافت از ساکارز به‌عنوان منبع کربن استفاده شده و به‌تقریب ثابت شده است که ساکارز بهترین کربوهیدرات در انواع کشت‌بافت‌های گیاهی است (Johnson *et al.*, 2011) که نتایج آزمایش ما نیز آن را تأیید می‌کند. گزارش شده است برتری کلی ساکارز نسبت به گلوکز در کشت‌بافت‌های سازمان‌یافته گیاهی مانند ریشه‌ها می‌تواند به دلیل انتقال مؤثرتر آن به ژاتاک (مریستم) انتهایی باشد (Johnson *et al.*, 2011). افزون بر این می‌تواند تأثیر اسمزی نیز داشته باشد. بیشترین نمو گیاهچه‌های ارکیده *Bletia purpurea* در بالاترین غلظت مورد آزمایش یعنی ۵۰ میلی‌مول ساکارز گزارش شده است (Johnson *et al.*, 2011). درعین حال نتایج استفاده از انواع قندها روی رشد نمو گونه‌های ارکیده، بسیار گوناگون و متفاوت است. تأثیر قندهای دیگر مانند گلوکز و فروکتوز نیز در محیط کشت بررسی شده است. گزارش شده است برخی گونه‌های ارکیده روی فروکتوز نسبت به گلوکز بهتر رشد می‌کنند. به‌عنوان مثال در مورد *Dactylorhiza incarnata* ssp. *incarnata* بیشترین میزان رشد شاخه‌ها و ریشه‌ها در حضور گلوکز در غلظت ۴۰ گرم در دسی‌مترمکعب (dm^{-3}) به‌دست آمد. باینکه

رشد از کمیته ۱/۸ میلی‌متر در تیمار H7 تا بیشینه ۱۲/۱ میلی‌متر در تیمار H10 شده است.



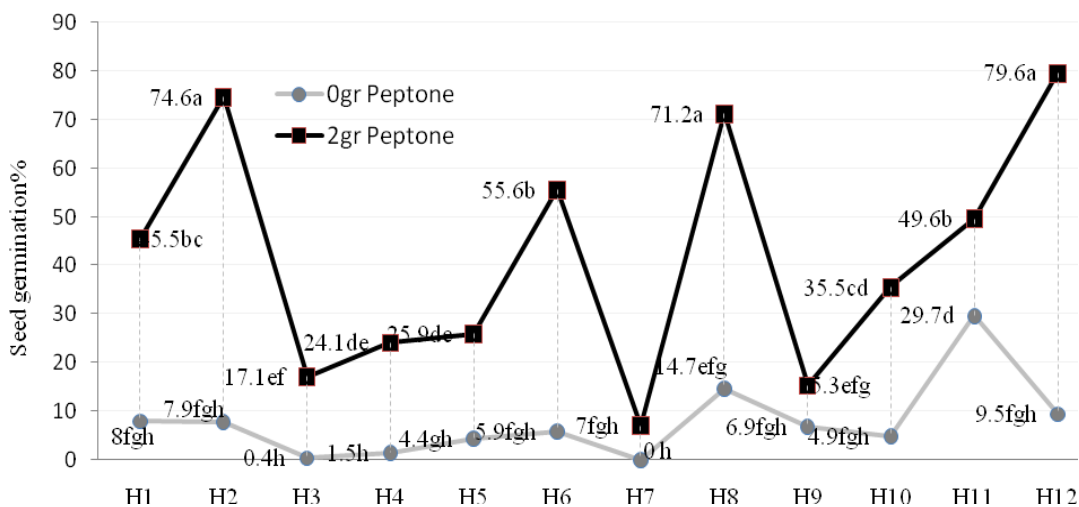
شکل ۶. تأثیر استفاده از پپتون بر درصد جوانه‌زنی بذر

Figure 6. Effect of peptone treatments on seed germination



شکل ۷. تأثیر استفاده از پپتون بر رشد پدازه‌نما

Figure 7. Effect of peptone treatments on protocorm growth

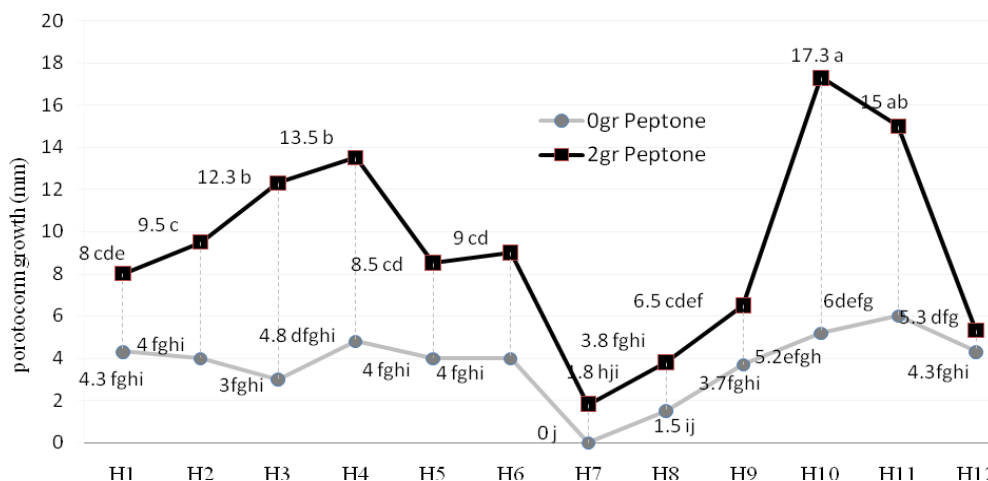


شکل ۸. اثر متقابل تیمارهای قندی و پپتون بر درصد جوانه‌زنی بذر

Figure 8. The interaction effect of sugar and peptone treatments on seed germination.

بدون آن در این آزمایش، بیانگر اثر بسیار معنی‌دار استفاده از پپتون بر درصد جوانه‌زنی و نیز رشد پدازه‌نماهاست (جدول ۱ و شکل‌های ۶، ۷ و ۱۰). در مجموع استفاده از پپتون موجب افزایش حدود ۳۴ درصدی میزان جوانه‌زنی و ۵/۵ میلی‌متری رشد پدازه‌نماها شده است (شکل ۶). در مورد بهترین تیمار جوانه‌زنی یعنی ترکیب ۳/۵ گرم فروکتوز و ۱۴ گرم ساکارز در لیتر دارای ۲ گرم در لیتر پپتون (H12P2)، این افزایش در حد ۷۰/۱ درصد و در مورد بهترین تیمار رشدی یعنی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز دارای ۲ گرم در لیتر پپتون (H10P2)، برابر ۱۲/۱ میلی‌متر است که هر دو بسیار شایان توجه هستند (شکل‌های ۸ و ۹).

نتایج اثر متقابل تیمارهای قندی و پپتون بیانگر اختلاف به‌طور کلی معنی‌دار بین تیمارهای دارا و بدون پپتون روی درصد جوانه‌زنی و نیز رشد پدازه‌نماها است (شکل‌های ۸ و ۹). در مورد درصد جوانه‌زنی نمودار ترکیب‌های دارای پپتون و بدون پپتون به‌غیر از تیمارهای قندی H10 و H12، روند افزایشی و کاهشی همسان دارند. در همه تیمارهای قندی افزودن پپتون موجب افزایش درصد جوانه‌زنی، از میزان کمیته ۷ درصد در تیمار H7 تا بیشینه ۷۰/۱ درصد در تیمار H12 شده است (شکل ۸). این روند همسان در مورد رشد پدازه‌نماها نیز (به‌غیر از تیمارهای قندی H3 و H11) مشاهده می‌شود (شکل ۹). در مورد رشد پدازه‌نماها نیز افزودن پپتون موجب افزایش میزان



شکل ۹. اثر متقابل تیمارهای قندی و پپتون بر رشد پدازه‌نما

Figure 9. The interaction effect of sugar and peptone treatments on protocorm growth.

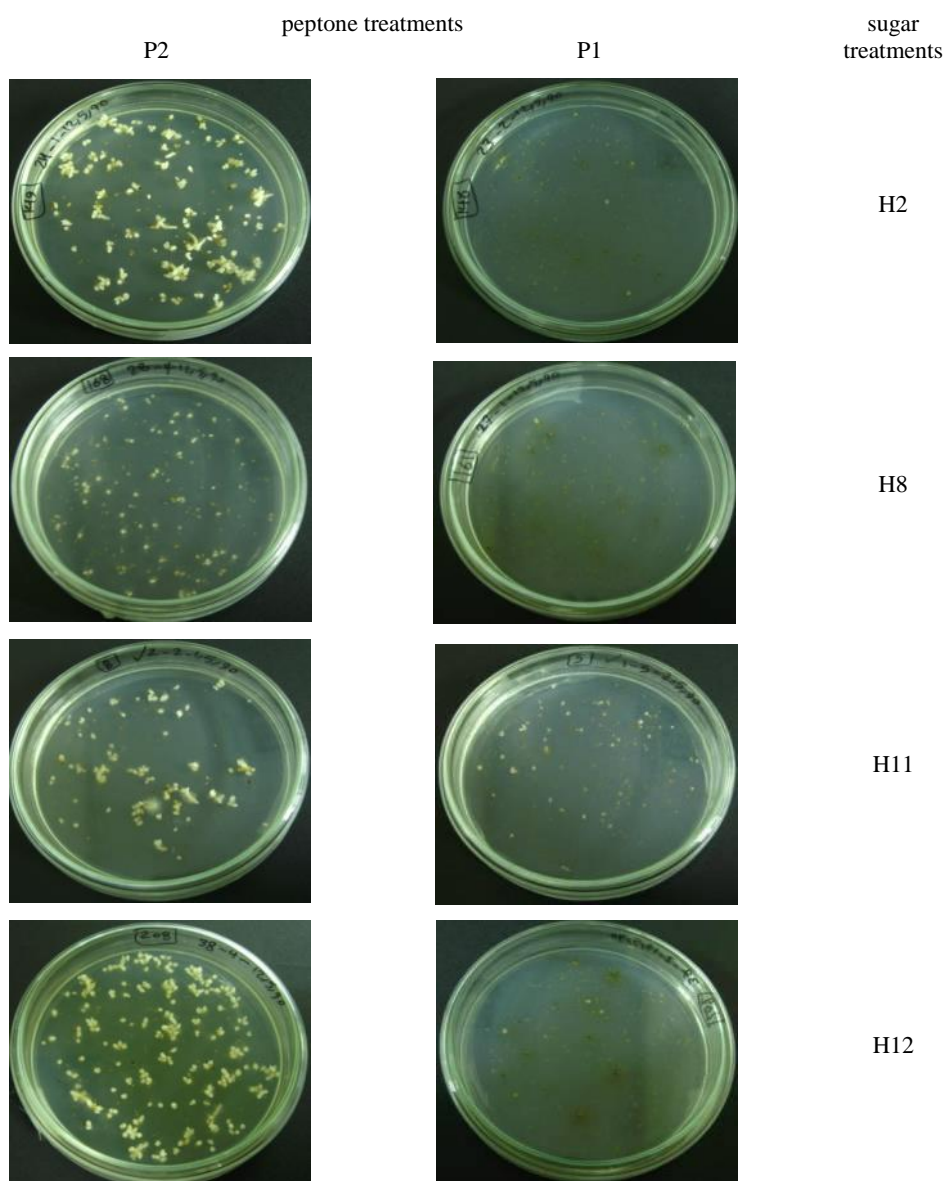
است. به نظر می‌رسد غلظت‌های بالای نیتروژن آلی در محیط کشت قابل تحمل است (Kauth, 2005). گزارش شده است که محیط کشت حاوی پپتون در مقایسه با محیط دارای آسپارژین موجب جوانه‌زنی سریع و بهبود نمو پدازه‌نماها می‌شود (Shahsavari, 2001). همچنین پپتون موجب افزایش یکنواختی نمو گیاهچه‌ها نیز شده است (Kauth, 2005). نتایج برخی آزمایش‌ها نشان داده است که میزان جوانه‌زنی چند ارکیدۀ خاکرست مقاوم به سرما روی محیط کشت حاوی نیتروژن آلی بالاتر است (Wotavova-Novotna *et al.*, 2007). میزان واقعی نیتروژن موجود در پپتون معلوم نیست (Kauth, 2005). استفاده از ۲ گرم در لیتر پپتون موجب بالا رفتن جوانه‌زنی بذر ارکیدۀ *Dendrobium aphyllum* تا میزان ۱۰۰ درصد و رشد قوی‌تر، بقای بالاتر و پیشرفت، رشد و نمو پدازه‌نماهای آن شد (Hossain *et al.*, 2012). اضافه کردن ۲ گرم در لیتر پپتون همراه با ۱۵ درصد شیر نارگیل به محیط کشت موجب بالا رفتن درصد جوانه‌زنی بذر *Dendrobium tetrachromum* تا ۱۰۰ درصد شد (Ali *et al.*, 2011). نتایج استفاده از ترکیب‌های آلی مانند شیر نارگیل، موز همگن‌شده (هموژنیزه)، سیب‌زمینی، پپتون و تریپتون در جوانه‌زنی بذر ارکیدۀ *Paphiopedilum wardii* Sumerh. متناقض بود (Zeng *et al.*, 2012). گزارش شده است که جوانه‌زنی بذر ارکیدۀ‌های خاکرست با استفاده از نیتروژن آلی به‌جای اسیدهای آمینه بهبود می‌یابد. نتایج این آزمایش

تغذیه نیتروژنی برای رشد و نمو گیاهان ضروری است ولی معلوم شده است که تأثیر منابع متفاوت نیتروژنی بر جوانه‌زنی گونه‌های مختلف ارکیدۀ متفاوت است (Zeng *et al.*, 2012). نیتروژن به‌صورت مواد آلی یا غیر آلی یا مخلوطی از هر دو به محیط کشت اضافه می‌شود. جوانه‌زنی بذر و رشد پدازه‌نماهای ارکیدۀ‌ها با ترکیب‌های آلی تسریع می‌شود. برخی پژوهشگران باور دارند، به دلیل آنکه قارچ‌ها به‌طور طبیعی نیتروژن آلی را برای بذر تأمین می‌کنند، بنابراین یک منبع نیتروژنی آلی می‌تواند برای جوانه‌زنی و نمو سودمند باشد (Butcher & Marlow, 2010). جوانه‌زنی ناهمزبست درون‌شیشه‌ای اغلب با نیتروژن آلی بیرونی تحریک می‌شود و تأثیر نیتروژن آلی مثبت یا خنثی گزارش شده است (Rasmussen, 1995). شاید بخشی از آن به این دلیل باشد که نیتروژن به این شکل خیلی آسان جذب می‌شود. نمو پدازه‌نماهای ارکیدۀ‌های خاکرست استرالیایی بر محیط‌هایی که تنها حاوی نیتروژن غیرآلی بودند کاهش یافت و نتیجه گرفته شده است که این نوع نیتروژن سریع‌تر از انواع غیرآلی برای نمو گیاهچه‌ها در دسترس قرار می‌گیرند (Dowling & Jusaitis, 2012). بذرهای بالغ *Epipactis atrorubens* در محیط بدون نیتروژن آلی کمتر از ۱ درصد جوانه‌زنی داشت (Rasmussen, 1995). هنگامی نیتروژن آلی به یک شیوه کار اضافه می‌شود اغلب جایگزین میزانی از نیتروژن غیرآلی

نیتروژن آلی دیگر مانند کازبین، عصاره مخمر، شیر نارگیل و غیره نیز بررسی شود. اثرگذاری نوع، میزان و ترکیب قندها نیز بر درصد جوانه‌زنی و همچنین رشد پدازه‌نماها بسیار معنی‌دار و نیازمند مدیریت دقیق برای رسیدن به بیشترین نتیجه است. استفاده از ترکیب منو و دی ساکاریدهای گلوکز و ساکارز در کنار هم و یا استفاده از ۲۰ گرم در لیتر منوساکارید گلوکز تنها و یا ۱۰ گرم در لیتر دی ساکارید ساکارز تنها برای دستیابی به نتایج جوانه‌زنی بهتر توصیه می‌شود.

نیز مؤید تأثیر مثبت پپتون به‌عنوان منبعی از نیتروژن آلی در جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های پدازه‌نمای ارکیده خربقی است و نتایج این پژوهش تأثیر مثبت استفاده از نیتروژن آلی (پپتون) در پژوهش‌های پیشین را به‌خوبی تأیید می‌کند.

در مجموع می‌توان گفت که استفاده از پپتون تأثیر چشمگیری بر درصد جوانه‌زنی و نیز رشد پدازه‌نمای این‌گونه از ارکیده دارد. در نتیجه پیشنهاد می‌شود ضمن بررسی غلظت‌های دیگر آن، تأثیر مواد



شکل ۱۰. مقایسه نتایج تیمارهای برتر برای درصد جوانه‌زنی بذر
Figure 10. Comparison the results of better treatments on seed germination

بخشی از هزینه اجرای این پروژه را طی قرارداد شماره
۹۳۰۲۰۹۸۵ فراهم آوردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که

REFERENCES

1. Ali, M. J., Murdad, R. & Latip, M. A. (2011). In Vitro germination of Bornean Endemic Orchids *Dendrobium tetrachromum* and *Dendrobium hamaticalcar*. *Empowering Science, Technology and Innovation Towards a Better tomorrow*, 770-777.
2. Arditti, J. (2008). *Micro propagation of Orchids*. Blackwell Publishing.
3. Butcher, D. & Marlow, S.A. (2010). Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids, *Modern Methods In Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management*. Pritchard H. N., Jodrell Laboratory Royal botanic Gardens, Kew, 1989, Cambridge university press.
4. Dowling, N. & Jusaitis, M. (2012). Asymbiotic in vitro germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany*, Available online at: <http://dx.doi.org/10.1071.BT12133>.
5. Fast, G. (1976). Möglichkeiten zur Massenvermehrung von *Cypripedium calceolus* und anderen europäischen Wildorchideen. pp. 359-363. In *Proceedings of the Eighth World Orchid Conference*. German Orchid Society, Frankfurt, Germany.
6. George, E. F., Hall, M. A. & Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.
7. Hossain, M.M., Sharma, M. & Pathak, P. (2012). In vitro propagation of *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae) –seed germination to flowering. *Journal of Plant Biochemistry Biotechnology*.
8. Johnson, T. R., Kane, M. E. & Pe´rez, H. E. (2011). Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). *Plant Growth Regulator*, 63, 89-99.
9. Jorgensen, B. I. & Andersen, T. F. (1998). Hardy and half hardy terrestrial orchids as potential new potplants. In: *Proceedings of third international symposium on new floriculture crops*, Acta Horticulturae, 454, International Society for Horticultural Science (ISHS). pp.195-205.
10. Kauth, Ph. (2005). *In vitro Seed germination and seedling development of Calopogon tuberosus and Sacoila lanceolata var. lanceolata: Two Florida native terrestrial Orchids*. M.Sc. thesis, University of Florida.
11. Mozaffarian, VA. (2006). A Dictionary of Iranian Plant Names. *Farhang Moaser*, Tehran. 1064. (in Farsi)
12. Rasmussen, H.N. (1995). *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.
13. Rens J. – Translation by: H. Mohammadian. (1998). *Iranian orchid flowers*. Rahnama Publications. 125. (in Farsi)
14. Sangba, T. & Deb, C.R. (2006). Effect of different factors on non-symbiotic seed germination, formation of protocorm-like bodies and plantlet morphology of *Cleisotoma racemiferum* (Lindl.) Garay. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 223-228.
15. Luana Schneider, D.Sc. J. S. de P. Araújo, D.Sc. Gilmar, & Zaffari, R. (2014). Seed Germination of *Cattleyaintermedia* and *Cattleyawarneri* in Alternative culture Media. *American International Journal of Contemporary Research*, 4, 7, 60-66.
16. Shahsavari, A. (2001). *Persian orchids the introduction of species identification kers and their distribution*. Research institute of forests and rangelands. 66. (in Farsi)
17. Stewart, S. L. & Kane, M. E. (2010). Effects of carbohydrate source on the in vitro asymbiotic seed germination of the terrestrial orchid *Habenaria macroceratitis*. *Journal of Plant Nutrition*, 33(8), 1155-1165.
18. Testtelova T., Tesitel J., Jersakova J., Rihova G. & Selosse, M. (2012) Symbiotic germination capability of four *Epopactis* species (Orchidacea) is broader than expected from adult ecology. *American Journal of Botany*, 99(6), 1020-1032.
19. Wotavova-Novotna, K., Vejsadova, H. & Kindlamnn, P. (2007). Effects of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia Plantarum*, 51(1), 198-200.
20. Zeng, S., Wu, K. J., Silva, A. T., Zhang, J., Xia, Z., Chen, N. & Duan, J. (2012). Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh, and endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*, 138L, 198-209.