Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 4, Winter 2020 (959-965)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.224061.1156

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۵۰، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۸ (ص ۹۶۵-۹۵۹)

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر جوانه‌زنی بذور نارس ارکیده در دو محیط کشت آزمایشگاهی

حسین پیری[1*]، منصور فاضلی رستم‌پور[2] و علی بازند[3]
۱. استادیار، گروه کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه ولایت، ایرانشهر، سیستان و بلوچستان، ایران
۲. استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی سیستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زابل، ایران
۳. مدرس مدعو دانشگاه پیام نور چابهار، سیستان و بلوچستان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۰)

چکیده

با هدف بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف گیاهی بر جوانه‌زنی بذور نارس ارکیده رقم *Dendrobium nobile* Lindl در دو محیط کشت MS وM آزمایشی به‌صورت تجزیه مرکب در قالب طرح کامل تصادفی با ٤ تکرار در مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان طی سال‌های ۱۳۹٤-۱۳۹۵ انجام شد. بیست و دو تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی شامل شاهد (عدم استفاده از تنظیم‌کننده رشد)، ٤ غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲) میلی‌گرم بر لیتر NAA یا α-Naphthaleneacetic acid، ٤ غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲) میلی‌گرم بر لیتر Kin یا Kinetin، ٤ غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲) میلی‌گرم بر لیتر IAA یاIndole-3-acetic acid، ۳ غلظت از ترکیب Kin+IAA شامل (۰/۵+۱)، (۱+۰/۵) و (۱ +۱) میلی‌گرم بر لیتر، ۳ غلظت از ترکیب NAA+IAA شامل (۰/۵+۱)، (۱+ ۰/۵) و (۱+۱) میلی‌گرم بر لیتر و ۳ غلظت از ترکیب NAA+Kin شامل (۰/۵+۱)، (۱+۰/۵) و (۱+۱) میلی‌گرم بر لیتر در دو محیط کشت M و MS بود. اثر ساده محیط کشت بر همه صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار نبود، اما اثر ساده تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و محیط کشت بر تمام صفات اندازه‌گیری شده در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که کم‌ترین و بیشترین درصد جوانه‌زنی به‌ترتیب در تیمارهای شاهد و NAA+Kin (۱+۰/۵mgl^{-1}) در محیط کشت M مشاهده شد. کم‌ترین مدت زمان شروع جوانه‌زنی در شرایط کاربرد NAA; 1.5mgl^{-1} و در محیط کشت M و بیش‌ترین مدت زمان آغاز جوانه‌زنی در شرایط عدم استفاده از هورمون در هر دو محیط کشت بود. همچنین کم‌ترین مدت زمان ایجاد اسفرول در شرایط کاربرد NAA; 1.5mgl^{-1} و در محیط کشت M و بیش‌ترین مدت زمان جهت ایجاد اسفرول در شرایط عدم استفاده از هورمون در هر دو محیط کشت، و تیمار Kin+IAA (1+1mgl^{-1}) در محیط کشت MS بود. کم‌ترین و بیش‌ترین مدت زمان تشکیل پروتوکورم بترتیب در شرایط کاربرد NAA; 1.5mgl^{-1} و در محیط کشت M و در شرایط عدم استفاده از هورمون و در هر دو محیط کشت بود. به‌طور کلی تیمار NAA;1.5mgl^{-1} در محیط کشت M بهترین و اقتصادی‌ترین تیمار در مقایسه با سایر تیمارها در دو محیط کشت بود، که نتیجه ترکیب و غلظت عناصر موجود در این محیط کشت مختص ارکیده‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکسین، اسفرول، پروتوکورم، سایتوکنین.

Effect of plant growth regulators on germination of immature orchid seeds in two culture media laboratory

Hossein Piri[1*], Mansour Fazeli Rostampour[2] and Ali Bazand[3]
1. Assistant Professor, Agriculture and Environmental Department, Velayat University, Iranshahr, Iran
2. Assistant Professor, Sistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zabol, Iran
3. Lecturer, Peyam Noor University, Chabahar, Iran
(Received: Jan. 1, 2017 - Accepted: Oct. 2, 2018)

ABSTRACT

With the aim of investigate the effect of different plant growth regulators on orchid immature seed germination, *Dendrobium nobile* Lindl spicies, was performed in two experimental MS and M culture media, as a composite analysis in a randomized complete design with 4 replications in Balouchestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center during 2015-2016 years. Twenty-two plant growth regulator treatments included control (no use of growth regulator), 4 concentrations of NAA or α-Naphthaleneacetic acid (0.5, 1, 1.5 and 2 mgl^{-1}), 4 concentrations of Kin or Kinetin (0.5, 1, 1.5 and 2 mgl^{-1}), 4 concentrations of IAA or Indole-3-acetic acid (0.5, 1, 1.5 and 2 mgl^{-1}), 3 combinations of Kin+IAA{(0.5+1), (1+0.5) and (1+1)} mgl^{-1}, 3 combinations of NAA+IAA{(0.5+1), (1+0.5) and (1+1)} mgl^{-1}, and 3 combinations of NAA+Kin{(0.5+1), (1+0.5) and (1+1)} mgl^{-1} on two culture media. The simple effect of the culture medium on all measured traits was not significant, while the simple effect of growth regulators as well as the interaction effect of growth regulators and culture medium on all traits measured at the level of 1% was significant. The results showed that the lowest and highest percentage of germination were observed in control treatments and NAA+Kin (1+0.5mgl^{-1}), in M culture medium, respectively. The shortest time to start germination observed under application of NAA; 1.5mgl^{-1} in M culture medium, and the longest time to start germination was happened in the absence of hormone use in the both culture media. Also, the shortest time to spherule formation, was observed under application of NAA; 1.5mgl^{-1} in M culture medium, and the longest time to spherule formation was occurred under conditions of non-hormone use in the both culture media and Kin+IAA(1+1mgl^{-1}) treatment in MS culture medium. The shortest and longest duration to protocorm formation, was observed under application of NAA; 1.5mgl^{-1} in M culture medium, and in conditions of non-use of hormones in the both culture media, respectively. In general, NAA; 1.5mgl^{-1} treatment in M culture medium was the best and most economical treatment in compared to other treatments in the two culture media, which are the result of combinations and concentrations the elements in this culture medium for orchids.

Keywords: Auxin, Cytokinin, Protocorm, Spherule.

* Corresponding author E-mail: h.piri@velayat.ac.ir

مقدمه

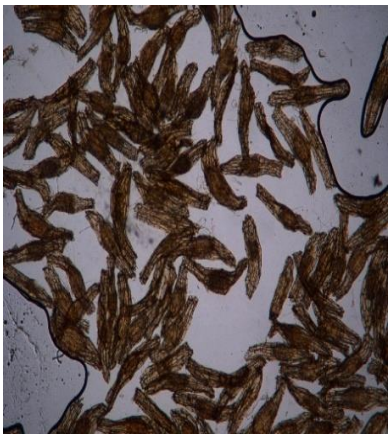
ارکیده از تیره ارکیداسه (Orchidaceae) یا ثعلبیان است. این تیره با داشتن ۸۵۹ جنس و حدود ۲۵-۳۵ هزار گونه، بین ۷-۱۱ درصد گیاهان گل‌دار را شامل و بزرگ‌ترین تیره در این گیاهان محسوب می‌گردد. تعداد رقم‌های این گروه که از تلاقی میان‌گونه‌ای یا بین‌گونه‌ای به‌دست آمده‌اند، از مرز ۱۳۰ رقم هزار گذشته است. بیشتر رقم‌های ارکیده در مناطق نیمه‌گرمسیری و معتدله دیده می‌شوند (Cribb & Govaerts, 2005). ارکیده‌ها دارای یک غلاف بذری می‌باشند که تعداد زیادی بذر (۱۳۰۰ عدد تا ۴ میلیون) در آن وجود دارد، به‌طوری‌که این بذرها غالباً هیچ آندوسپرمی ندارند و به اندازه‌ای ریز هستند که با چشم غیرمسلح دیده نمی‌شوند. جوانه‌زنی بذر ارکیده در شرایط طبیعی فقط در صورت همزیستی با قارچ‌های میکوریزا و به میزان کم‌تر از یک درصد گزارش شده است (Arditti, 1967; Harvais, 1972). از زمانی‌که نادسون اظهار داشت که می‌توان گل‌های ارکیده را بدون همزیستی با قارچ‌ها و با تهیه محیط کشت مناسب و فراهم نمودن سایر نیازهای آن به‌صورت درون‌شیشه‌ای ازدیاد نمود (Knudson, 1922)، تکثیر گونه‌ها و رقم‌های مختلف این گل پرطرفدار به روش کشت بافت آغاز و تا به امروز چندین محیط کشت اختصاصی نیز به این منظور تهیه شده و مورداستفاده می‌باشد. براساس گزارش دانشکده اقتصاد کشاورزی دانشگاه تگزاس آمریکا در سال ۲۰۰۷، بالغ بر ۱۲۶ میلیون دلار ارز، حاصل از فروش انواع گل‌های ارکیده بریدنی و گلدانی در این کشور حاصل شده است (Lee, 2011). ریزازدیادی بافت شبه‌پروتوکورم (Protocorm like bodies) حاصل از جوانه‌زنی اولیه بذر و بافت‌های سوماتیکی حاصل از کشت بذر، روشی مهم برای به‌دست‌آوردن گیاهانی با ثبات ژنتیکی است و در برخی برنامه‌ها جهت بهبود خصوصیات و تکثیر گل ارکیده استفاده می‌شود (Knudson, 1925). با افزودن نسبت مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکینین می‌توان تولید ساقه یا ریشه را تحریک کرد. عموماً چنانچه نسبت اکسین به سایتوکینین بیشتر باشد تولید ریشه و اگر این نسبت عکس شود تولید نوساقه و میزان حدواسط این دو گروه تولید کالوس می‌نمایند (Arditti, 1967). با توجه به ارزش اقتصادی و تجاری بسیار زیاد رقم *Dendrobium nobile* در جهان از نظر زینتی و همچنین وجود برخی از خواص دارویی در این گیاه، بررسی مشکلات جوانه‌زنی بذر *Dendrobium nobile* به‌منظور معرفی دستورالعمل جدید سازگار با شرایط محیطی منطقه و تسهیل جوانه‌زنی دارای اهمیت است. در این مقاله با توجه به تأثیرات مهم محیط‌های کشت پایه و همچنین نقش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد جوانه‌زنی بذر نارس ارکیده، مدت زمان شروع جوانه‌زنی، ایجاد اسفرول و تشکیل پروتوکورم، این تحقیق در دو محیط کشت Murashige & Skoog (MS: 1962) و Mitra *et al.* (M: 1976) مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف گیاهی در دو محیط کشت بر جوانه‌زنی بذر نارس ارکیده رقم *Dendrobium nobile* آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی در ۲ محیط کشت و ۴ تکرار، در آزمایشگاه مرکز تحقیقات آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۴ انجام شد. بیست و دو تیمار تنظیم‌کننده رشد شامل شاهد (عدم استفاده از تنظیم‌کننده رشد)، ۴ غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲) میلی‌گرم بر لیتر NAA یا α-Naphthaleneacetic acid، ۴ غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲) میلی‌گرم بر لیتر Kin (Kinetin)، ۴ غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲) میلی‌گرم بر لیتر IAA یا Indole-3-acetic acid، ۳ غلظت از ترکیب Kin+IAA شامل (۰/۵+۱)، (۱+۰/۵) و (۱+۱) میلی‌گرم بر لیتر، ۳ غلظت از ترکیب NAA+IAA شامل (۰/۵+۱)، (۱+۰/۵) و (۱+۱) میلی‌گرم بر لیتر و ۳ غلظت از ترکیب NAA+Kin شامل (۰/۵+۱)، (۱+۰/۵) و (۱+۱) میلی‌گرم بر لیتر در دو محیط کشت M و MS بود.

کپسول‌ها جهت ضدعفونی و به‌منظور رفع آلودگی‌های سطحی، با آب شیر به‌مدت ۱۵ دقیقه

شست‌وشو داده شدند و سپس جهت حذف کشش سطحی، در ماده شوینده تی‌پل ۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور گردیدند. پس از شست‌وشوی مجدد با آب شهری، در شرایط کاملاً استریل به زیر هود لامینار ایرفلو منتقل و در الکل اتیلیک ۷۰ درصد به‌مدت ۳۵-۳۰ ثانیه جهت ضدعفونی غوطه‌ور گردیدند. در ادامه برای از بین بردن اثرات الکل، بلافاصله کپسول‌ها از روی شعله عبور داده شدند. علاوه بر این کپسول‌ها با محلول ۰/۰۳ درصد بوستین (Bavistin) به‌مدت ۵ دقیقه برای از بین بردن قارچ‌ها و با محلول ۰/۰۳ درصد استرپتومایسین (Streptomycin) به‌مدت ۵ دقیقه جهت از بین‌بردن باکتری‌ها تیمار گردیدند. در مرحله بعد، کپسول‌ها به‌مدت شش دقیقه در محلول ۰/۳ درصد کلرید جیوه دارای ۱ تا ۲ قطره توین ۲۰ غوطه‌ور گردیدند و پس از هر بار ضدعفونی ۳-۴ بار با آب مقطر دو بار استریل شست‌وشو داده شدند تا اثرات سوء عوامل بکار رفته در فرآیند ضدعفونی از بین برود. پس از اتمام مراحل ضدعفونی، کپسول‌ها با کمک تیغ اسکالپل به‌صورت طولی برش داده شدند و توده بذور نابالغ (شکل ۱) در شرایط کاملاً استریل بر روی محیط‌های کشت قرار گرفتند (Pathak *et al.*, 2011).



شکل ۱. بذور نارس ارکیده در زمان اینوکلوشن (۲۰X)
Figure 1.Orchid immature seeds at the time of inoculation (20X)

پس از کشت، درصد جوانه‌زنی، مدت زمان (روز) تا شروع جوانه‌زنی، ایجاد اسفرول و تشکیل و توسعه پروتوکورم مورد بررسی قرار گرفت. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش از کمپانی Duchefa هلند خریداری و مورد استفاده قرار گرفت. کلیه کشت‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، در معرض ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی، شدت نور ۳۶۰۰ لوکس و با فواصل منظم از یکدیگر در اتاق رشد قرار داده شدند. اندازه‌گیری‌ها به‌صورت روزانه انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. همچنین مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

فراوانی جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد و اثر متقابل مکان در تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد بر درصد فراوانی جوانه‌زنی معنی‌دار بود (جدول ۱). کم‌ترین درصد جوانه‌زنی در شرایط عدم استفاده از هورمون در محیط کشت MS مشاهده شد (۴۷/۵۰)، این درحالی بود که در شرایط عدم استفاده از هورمون، محیط کشت M دارای درصد جوانه‌زنی معنی‌دار بالاتری (۵۰/۰۰) بود. همچنین بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی در شرایط کاربرد (NAA+Kin (1+1mgl^{-1} و در محیط کشت M به‌دست آمد. به‌عبارت دیگر، کم‌ترین و بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی به‌ترتیب در تیمارهای شاهد و (NAA+Kin (۱+۰/۵mgl^{-1} در محیط کشت M مشاهده شد (جدول ۲).

تاکنون تکثیر ارکیده‌ها به‌وسیله جوانه‌زنی غیرهمزیست بذر در رقم‌های *Epidendrum ibaguense* Kunth (Hussain, 2008)، *Geodorum densiflorum* (Bhadra & Hossain, 2003)، *Oncidium* sp. (Kalimuthu *et al*., 2007)، *Aplectrum hyemale* (*muhl. EX willd.*) (Lauzer *et al*., 2007)، *Acampe papillosa* (Piri *et al*., 2013)، *Phalaenopsis amabilis blume* (Bazand *et al*., 2014) و *Rhynchostylis retusa* (Piri *et al*., 2010) گزارش شده است، و نتایج نشان داد.

روند رشد مورفولوژیکی از مرحله جوانه‌زنی تا مرحله تبدیل‌شدن به یک گیاه کامل بستگی به جنس، گونه یا رقم، سن بذر، محیط کشت و افزودنی‌های آلی و غیرآلی متفاوت می‌باشد.

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر غلظت‌ها و ترکیب‌های مختلف هورمون‌ها بر جوانه‌زنی بذور نارس ارکیده در دو محیط کشت M و MS

Table 1. Variance analysis of effect of different concentrations and combinations of hormones on orchid seeds germination in two M and MS culture media

SOV	df	Means			
		Germination frequency (%)	Onset of germination	Spherule formation	Protocorm development
Culture	1	33.57^{ns}	164.20^{ns}	3.84^{ns}	542.50^{ns}
Error 1	6	136.28	157.76	125.08	145.70
Treat	21	527.74**	35.75**	47.14**	75.29**
Treat × Culture	21	20.76**	13.64**	6.67**	37.40**
Error 2	126	2.55	2.46	0.96	1.37
CV (%)		2.6*	8.25	4.38	2.27

** Significant at 1% probability level.

**: تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل تأثیر غلظت‌ها و ترکیب‌های مختلف هورمون‌ها بر جوانه‌زنی بذور نارس ارکیده در دو محیط کشت MS و M

Table 2. Comparison of the mean interaction effect of different concentrations and combinations of hormones on orchid immature seeds germination in MS and M culture media

Culture medium	Hormones	Characteristics			
		Germination frequency (%)	Onset of germination (day)	Spherule formation (day)	Protocorm development (day)
MS	Control	47.50^{q}	24.70^{a}	27.50^{a}	71.50^{a}
	NAA(0.5mgl^{-1})	55.00^{o}	20.20^{cdef}	23.50^{efg}	65.50^{f}
	NAA(1mgl^{-1})	66.25^{k}	17.20^{ghij}	21.50^{ijkl}	60.70^{ijkl}
	NAA(1.5mgl^{-1})	76.25^{def}	16.20^{hij}	19.00^{nop}	59.20^{lmnop}
	NAA(2mgl^{-1})	72.50^{igh}	17.50^{ghij}	19.50^{mnop}	62.70^{gh}
	Kin(0.5mgl^{-1})	62.50^{l}	18.00^{efghij}	19.50^{mnop}	69.20^{bc}
	Kin(1mgl^{-1})	72.50^{ghi}	17.20^{ghij}	20.50^{klmn}	67.50^{ced}
	Kin(1.5mgl^{-1})	75.00^{efg}	17.70^{fghij}	20.70^{jklm}	65.70^{ef}
	Kin(2mgl^{-1})	67.50^{jk}	18.20^{efghi}	21.50^{ijkl}	62.70^{gh}
	IAA(0.5mgl^{-1})	66.25^{k}	17.20^{ghij}	22.50^{ghi}	57.70^{op}
	IAA(1mgl^{-1})	71.25^{hi}	19.20^{defg}	21.50^{ijkl}	58.20^{nop}
	IAA(1.5mgl^{-1})	76.25^{def}	20.25^{cdef}	22.75^{fghi}	58.00^{nop}
	IAA(2mgl^{-1})	72.50^{ghi}	21.50^{bcd}	23.20^{efgh}	62.70^{gh}
	NAA+Kin(0.5+1mgl^{-1})	75.00^{efg}	23.50^{ab}	25.50^{bcd}	59.50^{klmno}
	NAA+Kin(1+0.5mgl^{-1})	80.00^{c}	23.70^{ab}	25.70^{bcd}	61.20^{hijk}
	NAA+Kin(1+1mgl^{-1})	76.50^{de}	24.20^{a}	26.00^{bc}	62.50^{ghi}
	Kin+IAA(0.5+1mgl^{-1})	73.75^{fgh}	23.50^{ab}	25.50^{bcd}	61.70^{hij}
	Kin+IAA(1+0.5mgl^{-1})	78.75^{cd}	22.50^{abc}	25.50^{bcd}	63.70^{g}
	Kin+IAA(1+1mgl^{-1})	73.50^{gh}	24.20^{a}	26.20^{ab}	68.20^{cd}
	NAA+IAA(0.5+1mgl^{-1})	57.50^{n}	17.00^{ghij}	19.20^{mnpq}	68.20^{cd}
	NAA+IAA(1+0.5mgl^{-1})	66.25^{k}	17.20^{ghij}	18.70^{op}	68.70^{bcd}
	NAA+IAA(1+1mgl^{-1})	66.25^{k}	18.00^{efghi}	20.00^{lmno}	67.20^{de}
M	Control	50.00^{p}	24.20^{a}	26.20^{ab}	70.20^{ab}
	NAA(0.5mgl^{-1})	60.00^{m}	20.20^{cdef}	22.20^{ghij}	67.50^{ced}
	NAA(1mgl^{-1})	67.50^{jk}	18.70^{efgh}	20.70^{jklm}	60.20^{jklm}
	NAA(1.5mgl^{-1})	83.75^{b}	15.20^{j}	17.20^{q}	54.70^{qs}
	NAA(2 mgl^{-1})	67.50^{jk}	17.50^{ghij}	19.50^{mnop}	57.50^{p}
	Kin(0.5mgl^{-1})	71.25^{hi}	17.70^{fghij}	21.50^{ijkl}	55.70^{q}
	Kin(1mgl^{-1})	73.75^{fgh}	17.20^{ghij}	20.70^{jklm}	59.20^{lmnop}
	Kin(1.5mgl^{-1})	26.25^{def}	17.20^{ghij}	22.20^{ghij}	58.20^{nop}
	Kin(2 mgl^{-1})	71.25^{hi}	18.50^{efghi}	22.50^{ghi}	59.70^{klmn}
	IAA(0.5mgl^{-1})	71.25^{hi}	17.50^{ghij}	23.50^{efg}	58.50^{mnop}
	IAA(1mgl^{-1})	67.5^{efg}	18.20^{efghi}	22.50^{ghij}	59.20^{lmnop}
	IAA(1.5 mgl^{-1})	75.00^{efg}	19.50^{defg}	24.20^{def}	61.20^{hijk}
	IAA(2 mgl^{-1})	77.50^{de}	20.50^{cde}	25.50^{bcd}	61.70^{hij}
	NAA+Kin(0.5+1mgl^{-1})	70.00^{ij}	17.20^{ghij}	25.20^{bcd}	59.20^{lmnop}
	NAA+Kin(1+0.5mgl^{-1})	77.50^{de}	17.70^{fghij}	24.20^{def}	61.20^{hijk}
	NAA+Kin(1+1mgl^{-1})	86.25^{a}	18.50^{efghi}	23.20^{efgh}	62.70^{gh}
	Kin+IAA(0.5+1mgl^{-1})	82.50^{b}	17.50^{ghij}	24.50^{cde}	58.70^{mnop}
	Kin+IAA(1+0.5mgl^{-1})	73.75^{fgh}	18.50^{efghi}	23.50^{efg}	58.20^{nop}
	Kin+IAA(1+1mgl^{-1})	72.50^{ghi}	17.00^{ghij}	21.70^{hijk}	59.50^{klmno}
	NAA+IAA(0.5+1mgl^{-1})	61.25^{ml}	15.70^{ij}	18.20^{pq}	61.70^{hij}
	NAA+IAA(1+0.5mgl^{-1})	67.50^{jk}	16.00^{hij}	19.70^{mnop}	60.70^{ijkl}
	NAA+IAA(1+1mgl^{-1})	71.25^{hi}	16.20^{hij}	19.70^{mnop}	59.50^{klmno}

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

In each column means with same letters are not significant at probability level of 5%.

طی پژوهشی که در سال ۲۰۰۸ بر روی *Epidendrum ibaguense* Kunth در چهار محیط کشت MS، M، KC و PM صورت گرفت، حداکثر جوانه‌زنی با ۹۰ درصد در محیط کشت‌های PM و M همراه با دو گرم بر لیتر پپتون و با حضور ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. این یافته‌ها با نتایج این پژوهش مطابقت دارد، زیرا محیط کشت M بهترین پاسخ را در حضور تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و IAA داده است که نشان می‌دهد هم افزودنی‌های آلی و هم غیرآلی در میزان جوانه‌زنی بذور تأثیر گذارند (Hussain, 2008). در سال ۲۰۰۸ در آزمایشی دیگر روی جوانه‌زنی بذر ارکیده رقم‌های *Phragmipedium longifolium*، *P. pearcei* و *P. humboldtii* در دو محیط کشت Knudson C و ½MS صورت گرفت، متوسط درصد جوانه‌زنی بذور به‌ترتیب ۴۱/۳۰، ۳۸/۷۰ و ۲/۹۰ درصد ثبت گردید، که تفاوت زیادی در درصد جوانه‌زنی، نشان از تأثیر گونه دارد (Melania & Víctor, 2008).

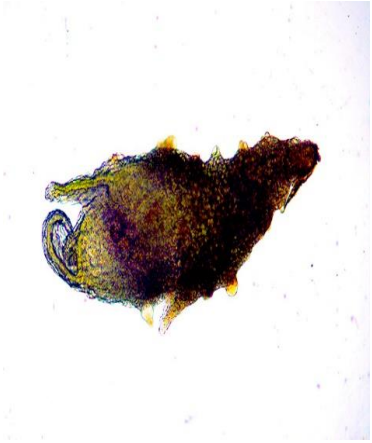
مدت زمان شروع جوانه‌زنی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد و اثر متقابل مکان در تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد بر مدت زمان شروع جوانه‌زنی معنی‌دار بود (جدول ۱). کم‌ترین مدت زمان جهت شروع جوانه‌زنی از نظر آماری در دو محیط کشت و سطوح مختلف هورمون‌ها دیده شد (جدول۲). این در حالی بود که کم‌ترین مدت زمان شروع جوانه‌زنی از نظر عددی (۱۷/۲۰ روز) در شرایط کاربرد NAA; 1.5mgl^{-1} و در محیط کشت M دیده شد. هم‌چنین بیش‌ترین مدت زمان شروع جوانه‌زنی در شرایط عدم استفاده از هورمون، در هر دو محیط کشت مشاهده شد (جدول ۲). در سال ۲۰۱۱ طی پژوهشی مشابه، قابلیت جوانه‌زنی غیر همزیست درون‌شیشه‌ای بذر نابالغ *Gastrochilus calceolaris* در سه نوع محیط کشت MS، PDA و M به‌همراه افزودنی‌های رشد بررسی شد. بذرها در فاصله ۱۶ تا ۳۸ روز شروع به جوانه‌زنی کردند. بهترین محیط کشت برای جوانه‌زدن بذر و رشد پروتوکورم، محیط MS همراه با ۱۰ درصد شیر نارگیل بود. این مسأله از دو جنبه قابل بحث است، جنبه اول تطابق مدت زمان شروع جوانه‌زنی از حیث روز با نتایج این پژوهش و دیگری عدم تطابق محیط کشت مناسب با این مطالعه که علت این تفاوت احتمالاً نوع گونه و افزودنی مورد استفاده می‌باشد که در نتایج تحقیق Pathak *et al.* (2011) نیز آمده است. در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۰۷، بذور *Oncidium* spp. در محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP به‌راحتی جوانه زدند (Kalimuthu *et al.*, 2007). در سال ۲۰۰۸ آزمایشی بر روی جوانه‌زنی بذور گونه‌های *Phragmipedium longifolium*، *P. pearcei* و *P. humboldtii* انجام شد، جوانه‌زنی بذور بین ۲ تا ۴ هفته به‌طول انجامید، که این نتایج مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد (Melania & Víctor, 2008). در یک مطالعه که در سال ۲۰۱۰ بر روی جوانه‌زنی بذور *Rhynchostylis retusa* صورت گرفت، محیط کشت میترا و همکاران (M) غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر حداکثر جوانه‌زنی را نشان داد، درحالی‌که محیط کشت پایه از حداقل جوانه‌زنی برخوردار بود (Piri *et al.*, 2010). نتیجه این مطالعه مبین این نکته است که بذر غالب گونه‌ها و ارقام برای جوانه‌زنی نیاز به افزودنی‌های آلی و غیرآلی متفاوت دارند، تا جوانه‌زنی قابل قبول و اقتصادی را داشته باشند.

مدت زمان ایجاد اسفرول

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد و اثر متقابل مکان در تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد بر مدت زمان ایجاد اسفرول (شکل ۲) معنی‌دار بود (جدول ۱). کم‌ترین مدت زمان ایجاد اسفرول از نظر آماری در دو محیط کشت و سطوح مختلف هورمون‌ها دیده شد (جدول۲). این در حالی بود که کم‌ترین مدت زمان ایجاد اسفرول از نظر عددی (۱۵/۲۰ روز) در شرایط کاربرد NAA; 1.5mgl^{-1} و در محیط کشت M دیده شد (جدول ۲). هم‌چنین بیش‌ترین مدت زمان جهت ایجاد اسفرول در شرایط عدم استفاده از هورمون در هر دو محیط کشت، و تیمار Kin+IAA (1+1mgl^{-1}) در محیط

کشت MS مشاهده شد (جدول ۲). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۵ بر روی جوانه‌زنی بذر نارس *Rhynchostylis retusa* در ۴ محیط کشت B5، MS، ½MS و PM انجام گرفت، بهترین محیط‌های کشت جهت تشکیل اسفرول MS و ½MS ثبت گردیدند. در هر دو محیط کشت، تشکیل اسفرول بین ۵۶-۴۹ روز مشاهده گردید (Bhattacharjee & Shahinul Islam, 2015)، درحالی‌که در تحقیق حاضر در محیط‌های کشت MS و M به‌ترتیب ۲۷/۵۰ و ۲۶/۲۰ روز پس از کشت بذر، تشکیل اسفرول صورت گرفت که نشان از ایجاد شرایط بهینه در محیط‌های کشت در این تحقیق را دارد.



شکل ۲. ایجاد اسفرول در ارکیده بعد از ۱۷ روز در تیمار M+NAA; 1.5mgl^{-1}

Figure 2. Spherule formation in orchid after 17 days of culture in M+NAA; 1.5mgl^{-1}

مدت زمان تشکیل و تمایزیابی پروتوکورم

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر تنظیم-کننده‌های مختلف رشد و اثر متقابل مکان در تنظیم-کننده‌های مختلف رشد بر مدت زمان تشکیل پروتوکورم (شکل ۳) معنی‌دار بود (جدول ۱). کم‌ترین مدت زمان تشکیل پروتوکورم از نظر آماری در دو محیط کشت و سطوح مختلف هورمون‌ها مشاهده شد (جدول ۲). این در حالی بود که کم‌ترین مدت زمان تشکیل پروتوکورم از نظر عددی (۵۴/۷) در شرایط کاربرد NAA; 1.5mgl^{-1} و در محیط کشت M دیده شد (جدول ۲). همچنین بیش‌ترین مدت زمان تشکیل پروتوکورم در شرایط عدم استفاده از هورمون و در هر دو محیط کشت مشاهده شد (جدول ۲). در بررسی دیگر که در سال ۲۰۱۴ بر روی ارکیده رقم *Phalaenopsis blume orchids* صورت گرفت، تشکیل اولین پروتوکورم ۳۳ روز پس از کشت صورت گرفت (Birhalawati *et al*., 2014)، که نشان می‌دهد تفاوت زیادی از نظر تعداد روز با نتایج تحقیق حاضر که تشکیل اولین پروتوکورم در آن بعد از ۵۴/۷ روز در تیمار NAA; 1.5mgl^{-1} و در محیط کشت M رخ داد، دارد. از طرف دیگر در تحقیقی که بر روی گونه *Vanda roxburghii* در محیط کشت MS صورت گرفت ۳۶ روز زمان فقط جهت جوانه‌زنی بذر در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌ی رشد (Rafiqul Islam *et al*., 2014)، و در سه نوع محیط کشت KnC، VW و MS اولین ظهور جوانه‌زنی به‌ترتیب ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز پس از کشت ثبت گردیده است (Sebastinraj & Muhirkuzhali, 2014). در آزمایشی که بر روی بذور *Rhynchostylis retusa* در ۴ محیط کشت B5، MS، ½MS و PM صورت گرفت، تشکیل پروتوکورم در فاصله زمانی بین ۶۳-۷۷ روز ثبت گردید که کم ترین زمان متعلق به دو محیط کشت MS و ½MS با ۶۳ روز بود (Bhattacharjee & Shahinul Islam, 2015). این امر بیان‌کننده این نکته است که به احتمال قریب به یقین نوع رقم یا گونه، زمان برداشت کپسول، فاصله زمانی بین برداشت کپسول تا کشت بذر، سن بذور، زمان استفاده بذور و ترکیب محیط کشت از عوامل این تغییرات و تفاوت‌ها می‌باشند.

شکل ۳. تشکیل و آغاز تمایزیابی پروتوکورم در ارکیده بعد از ۵۵ روز در تیمار M+NAA; 1.5mgl^{-1}

Figure 3. Formation and differentiation of protocorms in orchid after 55 days of culture in M+NAA; 1.5mgl^{-1}

نتیجه‌گیری

در این مطالعه با توجه به آنالیز داده‌ها، تیمار NAA; $1.5mgl^{-1}$ در محیط کشت M بهترین و اقتصادی‌ترین تیمار در مقایسه با سایر تیمارها در دو محیط کشت ثبت گردید، که نتیجه ترکیب و غلظت عناصر موجود در این محیط کشت اختصاصی ارکیده‌ها می‌باشد.

REFERENCES

1. Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review Journal*, 33, 1-97.
2. Bazand, A., Otroshy, M., Fazilati, M., Piri, H. & Mokhtari, A. (2014). Effect of plant growth regulators on seed germination and development of protocorm and seedling of *Phalaenopsis amabilis* blume (Orchidaceae). *Annual Research & Review in Biology*, 4(24), 3962-3969.
3. Bhadra, S. K. Hossain, M. M. (2003). *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. *Plant Tissue Culture*, 13(2), 165-171.
4. Bhattacharjee, B. & Shahinul Islam, S. M. (2015). The effect of PGRs on *in vitro* development of protocorms, regeneration and mass multiplication derived from immature seeds of *Rhynchostylis retusa* (l.) blume. *Global Journal of Bio-science and Biotechnology*, 4(1), 121-127.
5. Birhalawati, B., Abdul Latip, M. & Gansau, J. A. (2014). Asymbiotic germination and seedling development of *Dimorphics lowii* (Orchidaceae). *Asian Journal of Plant Biology*, 1, 28-33.
6. Cribb, P. & Govaerts, R. (2005). Just how many orchids are there? *18th World Orchid Conference*, 11-20 march, University of Burgundy, Dijon, France, pp. 161-172.
7. Harvais, G. (1972). The development and growth requirements of *Dactylorhiza purpurella* in asymbiotic cultures. *Canadian Journal of. Botany*, 50, 451-460.
8. Hussain, M. M. (2008). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. *African Journal of Biotechnology*, 7 (20), 3614-3619.
9. Kalimuthu, K., Senthilkumar, R. & Vijayakumar, S. (2007). *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). *African Journal of Biotechnol*, 6(10), 1171-1174.
10. Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical gazette*, *73*(1), 1-25.
11. Knudson, L. (1925). Physiological study of the asymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 79, 345-379.
12. Lauzer, D., Renaut, S., Arnaud, M.S. & Barab, D. (2007). *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. Orchidaceae). *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 134, 344-348.
13. Lee, Y. I. (2011). *In vitro* culture and germination of terrestrial Asian orchid seeds. *Methods in Molecular Biology*, 710, 53-62.
14. Melania, M. & Víctor, M. J. (2008). Capsule development, *in vitro* germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. Universidad de Costa Rica, Lankesteriana, 8(2), 23-31.
15. Mitra, G. C., Prasad, R. N. & Roychowdhary, A. (1976). Inorganic salts and differentiation of protocorms in seed-callus of an orchid and correlated changes in its free amino acid content. *Indian Journal of Experimental Biology*, 14, 350-351.
16. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
17. Pathak, P., Piri, H., Vij, S. P., Mahant, K. C. & Chauhan, S. (2011). *In vitro* propagation and mass scale multiplication of a critically endangered epiphytic orchid, *Gastrochilus calceolaris* (Buch.-Ham ex J.E.Sm.) D. Don. using immature seeds. *Indian Journal of Experimental Biology*, 49, 711-716.
18. Piri, H., Pathak, P. & Bhanwra, R. K. (2013). Asymbiotic germination of immature embryos of a medicinally important epiphytic orchid, *Acampe papillosa* (Lindl.) Lindl, *African Journal of Biotechnology*, 12(2), 162-167.
19. Piri, H., Promila, P., Bhanwra, R. K. & Vij, S. P. (2010). A cost effective medium for embryo culture of a floriculturally important orchid, Rhynchostylis retusa BL. *National conference on orchid: systematic and diversity analysis for conservation and sustainable utilization*,.19-21 March, Kosi-Katarmal, 263-643, G. B. Plant Institute of Himalayan Environment and Development, Almora, India, P, 86.
20. Rafiqul, I., Khandakar, M. D., Kabir, R., Hossain, S., Hossain, F. & Khalil, I. (2014). Efficient *in vitro* cultural techniques for seeds germination of Vanda roxburghii. *World Journal of Agricultural Sciences*, 10 (4), 163-168.
21. Sebastinraj, J. & Muhirkuzhali, S. (2014). Asymbiotic seed germination and micropropagation of *Pathoglottis plicata* blume. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry* (IJAPBC), 3(2), 495-501.