



مجله علمی کاربردی علوم باغبانی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و دوم، شماره چهارم، ۱۳۹۴

<http://jopp.gau.ac.ir>

## اثر محیط کشت، نوع ریز نمونه و بنزیل آدنین بر القای رویان بدنی دوگونه ثعلب ایرانی

\*شیرین مرادی<sup>۱</sup>، شیرین دیاننتی دیلمی<sup>۲</sup>، کورش وحدتی<sup>۳</sup> و مصطفی عرب<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد باغبانی، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، <sup>۲</sup> استادیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان،

دانشگاه تهران، <sup>۳</sup> استاد گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۲

### چکیده

**سابقه و هدف:** ارکیدهای خاکروی مناطق معتدله دسته مهمی از ارکیدها هستند که توانسته‌اند در سال‌های اخیر توجه دنیای باغبانی را به خود جلب کنند. ارکیده خربقی معمولی با نام علمی *Epipactis veratrifolia* و ارکیده ثعلب سایه پسند با نام علمی *Dactylorhiza umbrosa* از دسته ارکیدهای خاکروی معتدله و نیز از جمله ثعلب‌های بومی ایران هستند. متأسفانه تکثیر اندک، قیمت بالا و وجود تقاضای علاقمندان در بازار، سبب جمع‌آوری آن‌ها از طبیعت شده است. در نتیجه تعداد آن‌ها کاهش یافته و حتی برخی از گونه‌ها در معرض انقراض و نابودی می‌باشند. از سوی دیگر با وجود این‌که پیشرفت‌هایی برای ریزازدیادی و کشت درون شیشه‌ای برخی ارکیدها، نتایج اندکی در مورد ارکیدهای خاکروی مناطق معتدله به دست آمده است. رویان‌زایی بدنی پتانسیل بالایی برای ریزازدیادی در مقیاس وسیع به‌ویژه برای گیاهان دارای چرخه تولید مثل خاص (همانند ارکیدها) دارد. هدف این پژوهش بررسی مقدماتی برای انگیزش و جستجوی شرایط بهتر برای القای رویان‌زایی در این گونه‌های بومی ریزازدیادی و تکثیر انبوه کلون‌های آن‌ها در سطح وسیع است.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش غلظت‌های صفر و سه میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین در چهار محیط کشت شامل محیط فاست و غلظت‌های یک دوم، یک چهارم و یک هشتم محیط کشت موراشیگ و اسگوک برای القای رویان بدنی مستقیم دو گونه ارکیده بومی ایران مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، چهار ریزنمونه مختلف (برگ، ساقه، طوقه و پروتوکورم) از گونه خربقی معمولی و دو ریز نمونه (برگ و طوقه) از گونه ثعلب سایه پسند استفاده شد.

\*مسئول مکاتبه: [shirinmoradi@ut.ac.ir](mailto:shirinmoradi@ut.ac.ir)

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در گونه خربقی معمولی تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های کشت وجود نداشت، اثر متقابل بین ریزنمونه و هورمون بنزیل آدنین در سطح یک درصد معنی‌دار بود و ریزنمونه پروتوکورم تیمار شده با هورمون بنزیل آدنین با میانگین تولید ۱۳ رویان در محیط کشت یک چهارم موراشیگ و اسگوک، بیشترین نتیجه را به همراه داشت. در گونه ثعلب سایه پسند تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت‌ها وجود داشت و محیط کشت فاست و ریزنمونه طوقه بهترین نتیجه (۲/۶۶ رویان در هر ریزنمونه) را به همراه داشتند. همچنین نتایج، تأثیر مثبت سه میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین بر رویان‌زایی این گونه را نشان دادند.

**نتیجه‌گیری کلی:** تأثیر مثبت سه میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین در هر دو گونه مشاهده شد. بنابراین استفاده از آن برای رویان‌زایی و آزمایش اثر غلظت‌های مختلف آن بر تعداد رویان توصیه می‌شود. در ارکیده خربقی معمولی محیط‌های کشت از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند. در حالی که در گونه ثعلب سایه پسند محیط کشت فاست با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. ریزنمونه پروتوکورمی در ارکیده خربقی معمولی و ریزنمونه طوقه (پاهنگ ساقه) در ارکیده ثعلب سایه پسند پربازده‌ترین ریزنمونه‌ها شناخته شدند. در هر دو گونه ریزنمونه برگی نتیجه بخش نبود.

**واژه‌های کلیدی:** محیط کشت درون شیشه‌ای، پروتوکورم، ارکیده، خربقی معمولی، ثعلب سایه پسند

## مقدمه

ارکیده‌های خاکروی مناطق معتدله دسته مهمی از ارکیده‌ها هستند که توانسته‌اند در سال‌های اخیر به عنوان گل‌های چند ساله باغچه‌ای و با پتانسیل بالا برای تولید گل‌گلدانی و شاخه بریده، توجه دنیای باغبانی را به خود جلب کنند (۱۶).

ارکیده خربقی معمولی با نام علمی *Epipactis veratrifolia* و ارکیده ثعلب سایه پسند با نام علمی *Dactylorhiza umbrosa* از دسته ارکیده‌های خاکروی معتدله و نیز از جمله ثعلب‌های بومی ایران هستند. این گیاه پایا، دارای قامتی افراشته، غالباً بسیار قوی و محکم با ارتفاع ۱۲۰-۱۵۰ سانتی‌متر با برگ‌های سبز مات و ریزوم ریشه‌زا با گل‌هایی مجتمع در گل‌آذین ایستاده و گلپوشی با تقسیمات استکانی، با انتهای همگرا و تقریباً گسترده، کاسبرگ‌های رنگین و گلبرگ‌های تخم‌مرغی زرد که گلی زیبا و جذاب و دارای پتانسیل مناسب برای عرضه به‌عنوان گل‌گلدانی و حتی شاخه بریده ایجاد می‌کند. گونه ثعلب سایه پسند گیاهی است به ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی‌متر، با غده‌ای استوانه‌ای یا پنجه‌ای دو تا پنج قسمت انگشتی، غالباً ضخیم است. گل‌های این گیاه به رنگ ارغوانی متمایل به بنفش کم‌رنگ، یا صورتی-بنفش، یا ارغوانی متمایل به سفید بوده و در گل‌آذین‌های غالباً پرگل، تقریباً استوانه‌ای که دارای براکته‌ها سبز و بسیار بلندتر از گل‌ها هستند، به‌صورت مجتمع دیده می‌شوند. زمان گلدهی این گیاه اردیبهشت تا خرداد می‌باشد (۱۰). این گیاه دارای مواد مؤثره بسیاری است و عصاره غده این گیاه در طب سنتی و پزشکی مدرن برای درمان بیماری‌های زیادی استفاده می‌شود (۹).

مشکل بزرگ در مسیر تکثیر گیاهان خانواده ارکیده، وجود بذرهای بسیار ریز و رویان‌های نابالغ است که برای جوانه‌زنی به همزیستی قارچ‌های مایکوریزا نیاز دارند. تحقیقات بسیاری در مورد جوانه‌زنی غیرهمزیست بذر گونه‌های مختلف ارکیده در محیط درون شیشه‌ای صورت گرفته که موجب تجاری شدن تولید برخی از آن‌ها شده است. ارکیده‌ها بر اساس سهولت تکثیر به سه گروه عمده تقسیم می‌شوند. دسته اول ارکیده‌های دارزی گرمسیری هستند که نسبت به سایر ارکیده‌ها آسان‌تر تکثیر می‌شوند. گروه بعدی ارکیده‌های خاکروی گرمسیری هستند که تکثیر آن‌ها نسبت به گروه اول کمی دشوارتر است و در نهایت ارکیده‌های خاکروی مناطق معتدله هستند که از نظر تکثیر به‌عنوان سر سخت‌ترین ارکیده‌ها شناخته می‌شوند. در حالی که یافتن و استفاده از قارچ‌های مناسب کار بسیار دشوار و نیز درصد جوانه‌زنی همزیست بذر در شرایط آزمایشگاهی پایین است، با این حال

برای تکثیر ارکیدهای خاکروی معتدله روش کشت همزیست تاکنون کارآمدترین راه ممکن در نظر گرفته می‌شود. با وجود این‌که پیشرفت‌هایی برای ریزازدیادی و کشت درون شیشه‌ای برخی ارکیدهای دارزی گرمسیری به‌صورت انبوه در سطح تجاری به‌دست آمده، نتایج اندکی در مورد ارکیدهای خاکروی مناطق معتدله به‌دست آمده است. با توجه به وجود بازار و تقاضا و با در نظر گرفتن مشکلات عمده و سختی کار، جستجوی یک روش مناسب برای تکثیر ارکیدها می‌تواند ارزش بالایی داشته باشد و اهمیت کار را دوچندان نماید (۱۶ و ۱۹). متأسفانه تکثیر اندک، قیمت بالا و وجود تقاضای علاقمندان در بازار، سبب جمع‌آوری آن‌ها از طبیعت شده است. در نتیجه تعداد آن‌ها کاهش یافته و حتی برخی از گونه‌ها در معرض انقراض و نابودی می‌باشند. با این تفصیل در چشم انداز آینده تمام تلاش‌ها برای جستجوی راه کارهای آسان به‌منظور تکثیر ارکیدها، متمرکز شده است تا موجب کاهش قیمت و نجات آن‌ها از انقراض گردد (۲۲).

رویان‌زایی بدنی پتانسیل بالایی برای ریز ازدیادی در مقیاس وسیع به‌ویژه برای گیاهان چوبی و گیاهان دارای چرخه تولید مثل خاص (همانند ارکیدها) دارد و همچنین سیستمی بسیار کارآمد برای باززایی گیاهان در مهندسی ژنتیک و ایجاد گیاهان تراریخت، محسوب می‌شود (۱۹ و ۲۱). عوامل بسیاری بر رویان‌زایی بدنی تأثیرگذار است، اما محیط کشت انگیزشی مناسب و استفاده از تنظیم کننده‌های رشد متداول‌ترین راه برای رویان‌زایی بدنی محسوب می‌شود. لذا هدف این پژوهش بررسی مقدماتی محیط‌های کشت درون شیشه‌ای و ریز نمونه‌های مختلف و استفاده از تنظیم کننده رشد، برای انگیزش و جستجوی شرایط بهتر برای القای رویان‌زایی در گونه‌های بومی ارکیده خربقی معمولی و ارکیده ثعلب سایه و ریزازدیادی و تکثیر انبوه کلون‌های آن‌ها در سطح وسیع است.

### مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** در این پژوهش از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای حاصل از بذر ارکیده خربقی معمولی و ثعلب سایه پسند به‌عنوان گیاه پایه استفاده شد (۸). از برگ کامل، تک گره ساقه و طوقه ارکیده خربقی معمولی و همچنین پروتوکورم‌های حاصل از بذر به‌عنوان ریز نمونه استفاده شد. در مورد ارکیده ثعلب سایه پسند از ریز نمونه طوقه و برگ حاصل از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای نیز به‌عنوان ریز نمونه استفاده گردید.

**محیط و شرایط کشت:** برای انجام آزمایش از چهار محیط کشت مختلف شامل: فاست<sup>۱</sup>، نسبت‌های یک دوم، یک چهارم و یک هشتم موراشیگی و اسگوک<sup>۲</sup> و دو سطح صفر و سه میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین<sup>۳</sup> استفاده شد. نمونه‌های برگ‌ی به دو صورت رو به بالا و رو به پایین روی محیط کشت قرار گرفتند.

**طرح آماری:** این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در این طرح از سه فاکتور محیط کشت (چهار سطح)، هورمون بنزیل آدنین (دو سطح) و نوع ریزنمونه (چهار سطح در گونه خربقی معمولی و دو سطح در گونه ثعلب سایه پسند) در سه تکرار و در مجموع ۱۶۸ پتری استفاده شد. تعداد رویان‌های تولید شده در هر واحد آزمایشی (۴ قطعه در هر تکرار) مربوط به هر تکرار به عنوان داده ثبت گردید. تجزیه داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS 9.0 و مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ انجام شد. شروع رویان‌زایی دو هفته پس از کشت، بر روی ریزنمونه‌ها مشاهده شد. داده‌ها با شمارش تعداد رویان‌ها در هر ریز نمونه به صورت هفتگی یادداشت‌برداری شد و پس از ۶ هفته داده‌های نهایی ثبت گردید تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها برای دو گونه به صورت مجزا انجام گرفت.

## نتایج و بحث

در اרכیده خربقی معمولی محیط‌های کشت از نظر رویان‌زایی تفاوت معنی‌دار نداشتند. اما نوع ریزنمونه، هورمون و اثر متقابل بین هورمون و ریز نمونه‌ها در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار شدند (جدول ۱).

ریز نمونه‌های پروتوکورمی با میانگین تولید ۱۳ پروتوکورم در هر ریز نمونه بیشترین میزان رویان را تولید نمودند و ریز نمونه‌های ساقه و طوقه به ترتیب با میانگین تولید ۵/۸ و ۲/۴ پروتوکورم در هر ریزنمونه در مراتب بعدی قرار گرفتند. بالاترین میانگین مربوط به اثر متقابل هورمون بنزیل آدنین و ریز نمونه پروتوکورمی (میانگین ۱۳) بود (شکل ۱).

1. FAST
2. Murashige T, Skoog F (MS)
3. Benzyladenine (BA)

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر محیط کشت، هورمون و نوع ریز نمونه و اثر متقابل آن‌ها بر رویان‌زایی ارکیده خربقی معمولی.

Table 1. Analysis of variance in effect of medium, hormone and explants type and the interaction of them on somatic embryogenesis of *Epipactis veratrifolia*.

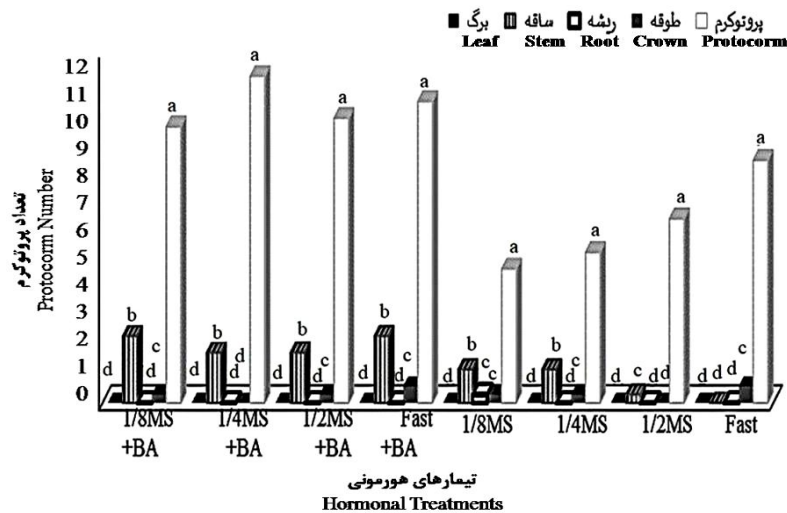
میانگین مربعات Mean Square	درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
10.021	95	کل total
20.21 <sup>n.s</sup>	3	محیط کشت Medium
44.46 <sup>**</sup>	1	هورمون Hormone
55.9 <sup>**</sup>	3	نوع ریزنمونه (Explants type)
0.45 <sup>n.s</sup>	3	اثر متقابل (محیط کشت × هورمون) Interaction (Medium × Hormone)
13.49 <sup>**</sup>	9	اثر متقابل (محیط کشت × ریزنمونه) Interaction (Medium × Explants type)
3.28 <sup>n.s</sup>	3	اثر متقابل (ریزنمونه × هورمون) Interaction (Explants type × Hormone)
12.10 <sup>**</sup>	9	اثر متقابل (محیط کشت × ریزنمونه × هورمون) Interaction (Medium × Explants type × Hormone)
3.42	64	خطا (Error)
20.06	-	ضریب تغییرات (C.V)

\* و \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، n.s. غیر معنی‌دار.

\* and \*\* Significant at 1% and 5% probability level, n.s non significant difference.

استفاده از هورمون بنزیل آدنین (۳ میلی‌گرم در لیتر) تأثیری مثبتی بر رویان‌زایی بدنی مستقیم این گونه داشت. اثر مثبت هورمون بنزیل آدنین بر رویان‌زایی بدنی حاصل از ریزنمونه‌های برگ‌ی ارکیده فالانوپسیس *Phalaenopsis* و نیز رویان‌زایی غیر مستقیم ارکیده لیکاسته *Lycaste* از ریزنمونه جوانه ساقه گزارش شده است (۶ و ۱۵). همچنین در گزارشات اخیر پژوهشگران به اثر مثبت استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین بر رویان‌زایی مستقیم ریزنمونه‌های پرتوکورمی ارکیده

سیمبیدیوم *Cymbidium bicolor* Lindl اشاره نمودند (۱۷). نتایج فوق مبنی بر تأثیر مثبت هورمون بنزیل آدنین بر رویان زایی در ارکیده خربقی معمولی نیز مطابقت دارد.



شکل ۱- مقایسه میانگین برهمکنش اثر محیط‌های کشت، ریزنمونه و تیمار هورمونی بر رویان‌زایی ارکیده خربقی معمولی.  
Figure 1. Means comparison of interaction in effect of media, explants and hormonal treatment on somatic embryogenesis of *Epipactis veratrifolia*.

پژوهشگران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از ریز نمونه پروتوکومی بهترین رویان‌زایی را در محیط یک دوم غلظت موراشیگی و اسگوک حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و ۰/۴ میلی‌گرم بنزیل آدنین به دست آوردند (۷). در این پژوهش نیز مطابق گزارشات فوق ریز نمونه پروتوکومی به همراه هورمون بنزیل آدنین بهترین نتیجه را در پی داشت.

پروتوکوم به‌عنوان ریزنمونه بسیار پرتوان برای تولید رویان در ارکیده دندروبیوم *Dendrobium* و سیمبیدیوم *Cymbidium* گزارش شده است و محققان با استفاده از ریزنمونه‌های لایه‌های نازک پروتوکومی و به شیوه‌ی برش لایه نازک<sup>۱</sup> موفق به تولید رویان‌های بدنی شدند (۲۰، ۲۵ و ۲۶). بهترین رویان‌زایی در ارکیده اونسیدیوم *Oncidium* 'Gower Ramsey' و دندروبیوم *Dendrobium* با استفاده از ریزنمونه پروتوکومی در محیط پایه گزارش شد (۵، ۶ و ۷). در پژوهش حاضر نیز ریزنمونه پروتوکومی بهترین نتیجه را به همراه داشت که مؤید نتایج پژوهش‌های مذکور است.

#### 1. Thin cell layer

در ارکیده اونسیدیوم *Oncidium* ریزنمونه گره ساقه با ۶۰ درصد رویان‌زایی بیشترین نتیجه را به خود اختصاص داد (۴). همچنین در رویان‌زایی ارکیده وانیلا *Vanilla planifolia* ریزنمونه‌های جوانه انتهایی و گره‌های ساقه، در رویان‌زایی غیر مستقیم ارکیده لیکاسته (*Lycaste hybrid*) و نیز در رویان‌زایی بدنی مستقیم ارکیده دندروبیوم (*Dendrobium CV Sonia*) و سیمیدیوم (*Cymbidium*) جوانه ساقه به‌عنوان ریزنمونه برتر گزارش شدند (۱۱، ۱۵، ۲۴ و ۲۵). نتایج این پژوهش نیز مؤید گزارش‌های فوق بود و ریزنمونه گره ساقه با اختلاف معنی‌دار نسبت به پروتوکورم و با میانگین کل تولید ۵/۸ رویان در هر ریزنمونه به عنوان دومین ریزنمونه گزارش شد. در نهایت ۶۰ روز پس از کشت، گیاهچه‌های حاصل از رویان‌ها بدنی به محیط کشت فاست فاقد هورمون منتقل شدند. تجزیه آماری داده‌های مربوط به ارکیده ثعلب سایه پسند بیانگر تفاوت معنی‌دار برای تمام عوامل اعم از محیط کشت، نوع ریزنمونه، اثر هورمون و اثرات متقابل فاکتورها بود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر محیط کشت، هورمون و نوع ریزنمونه و اثر متقابل آن‌ها بر رویان‌زایی ارکیده ثعلب سایه پسند.

Table 2. Analysis of variance in effect of medium, hormone and explants type and the interaction of them on somatic embryogenesis of *Dactylorhiza umbrosa*.

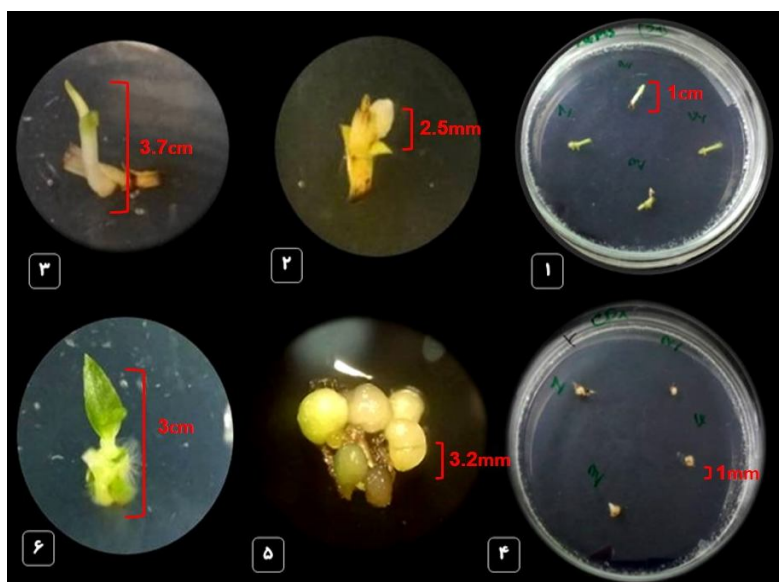
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square
کل total	47	0.67
محیط کشت Medium	3	1.2**
هورمون Hormone	1	2**
نوع ریزنمونه (Explants type)	1	4**
اثر متقابل (محیط کشت × هورمون) Interaction (Medium × Hormone)	3	1.19**
اثر متقابل (محیط کشت × ریزنمونه) Interaction (Medium × Explants type)	3	1.7**
اثر متقابل (ریزنمونه × هورمون) Interaction (Explants type × Hormone)	1	3.8**
اثر متقابل (محیط کشت × ریزنمونه × هورمون) Interaction (Medium × Explants type × Hormone)	3	1.6**
خطا (Error)	32	0.17
ضریب تغییرات (C.V)	-	11.33

\* و \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، n.s. غیر معنی‌دار.

\* and \*\* Significant at 1% and 5% probability level, n.s non significant difference.

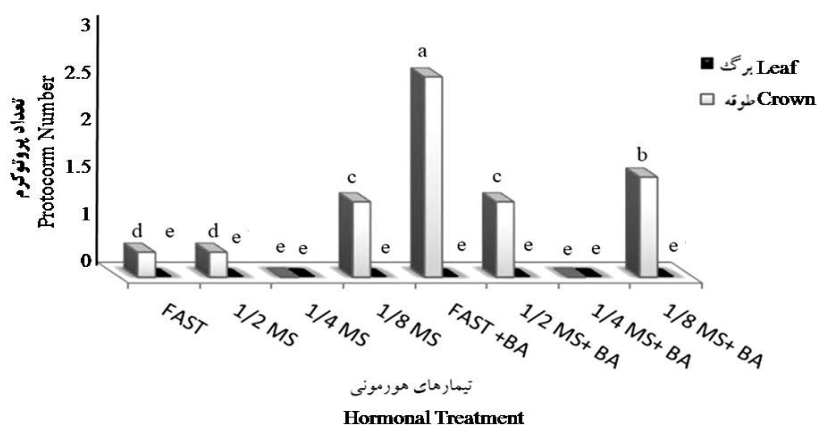


مقایسه میانگین داده‌های مربوط به محیط‌های کشت مختلف نشان داد که محیط کشت فاست با میانگین تولید ۰/۷۵ رویان در هر ریزنمونه بر سایر محیط‌های کشت برتری دارد. همچنین در بین ریزنمونه‌ها، ریزنمونه طوقه برترین ریز نمونه بود. سه میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین بر روی رویان‌زایی ارکیده ثعلب سایه پسند تأثیری مثبت داشت و با تیمارهای فاقد این هورمون تفاوت معنی‌دار نشان داد. همچنین اثر متقابل ریز نمونه، هورمون و محیط کشت نیز معنی‌دار شد. در بین تیمارها، ریزنمونه طوقه در محیط کشت فاست حاوی سه میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین با میانگین تولید ۲/۶۶ رویان در هر ریزنمونه پربازده‌ترین تیمار نسبت به سایرین بود (شکل ۳).



شکل ۲- مراحل مختلف رویان‌زایی در ارکیده خربقی معمولی، ۱- ریزنمونه‌های ساقه روز اول کشت، ۲- رویان بدنی اولیه از ساقه (بعد از دو هفته)، ۳- گیاهچه برگ‌دار حاصل از رویان بدنی (چهار هفته بعد)، ۴- ریزنمونه‌های پروتوکورمی، ۵- تعداد زیادی رویان بدنی روی ریز نمونه (دو هفته بعد)، ۶- گیاهچه دو برگی حاصل از رویان بدنی (چهار هفته بعد).

Figure 2. Different stages of somatic embryogenesis in *Epipactis veratrifolia*, 1- stem explants first day of culture, 2- primary somatic embryo from stem explants (after 2 weeks), 3- first leaf formation from somatic embryo (after 4 weeks), 4- protocorm explants, 5- a lot of embryo on explants (after 2 week), plantlet with 2 leaf outgrowth of somatic embryo (after 4 weeks).



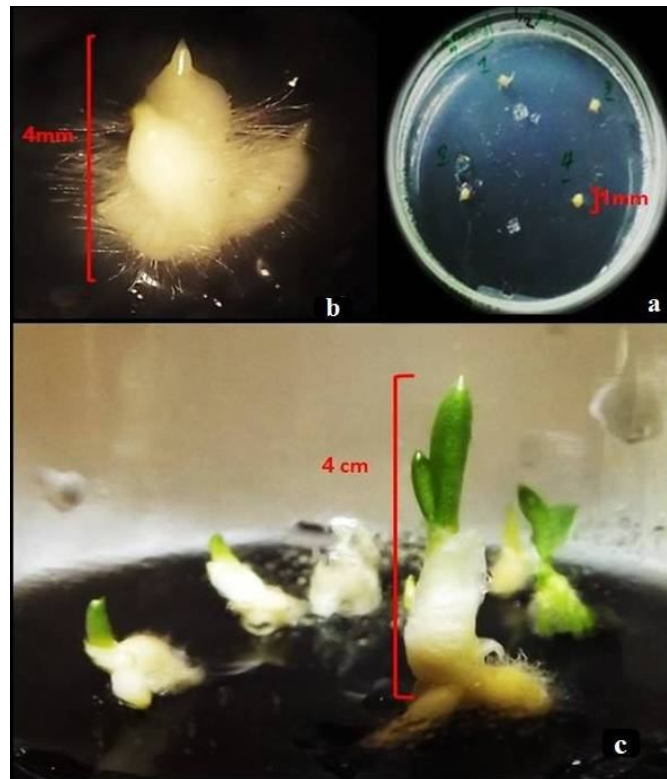
شکل ۳- مقایسه برهمکنش اثر محیط‌های کشت، ریزنمونه و تیمار هورمونی در میانگین رویان‌زایی ارکیده ثعلب سایه پسند.  
 Figure 3. Means comparison of interaction in effect of media, explants and hormonal treatment on somatic embryogenesis of *Dactylorhiza umbrosa*.

در ارکیده ثعلب سایه پسند ریزنمونه طوقه (پاهنگ) بهترین ریزنمونه بود (شکل ۴). استفاده از ریز نمونه طوقه در ارکیده‌های رانکواستلیس *Rhynchostylis retusa* 'blume'، اونسیدیوم *Oncidium*، سیمبیدیوم *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* به‌منظور رویان‌زایی نتایج مثبتی را به دنبال داشت که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد (۲،۳ و ۲۷).

برخلاف گزارش‌ها بسیار مبنی بر تأثیر مثبت محیط کشت MS برای رویان‌زایی گونه‌های مختلف ارکیده از جمله سیمبیدیوم (*Cymbidium*)، فالانوپسیس (*Phalaenopsis*)، لیکاسته (*Lycaste*)، اونسیدیوم (*Oncidium*) (۱، ۲، ۴، ۹، ۲۳ و ۲۴). در این پژوهش استفاده از محیط کشت فاست با تولید بالاترین میزان رویان (۲/۵) رویان در هر ریز نمونه تفاوت معنی داری با سایر تیمارهای محیط کشت (حاوی نسبت‌های مختلف محیط MS) داشت و تأثیر مثبتی بر رویان‌زایی بدنی ارکیده ثعلب سایه پسند گذاشت.

آزمایشات بسیاری مبنی بر رویان‌زایی از ریز نمونه برگ در مورد بسیاری از ارکیده‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری وجود دارد، اما تاکنون در ارکیده‌های معتدله خاکروی نتیجه‌ی مثبتی گزارش نشده است در پژوهشی جهت تکثیر و حفاظت از ارکیده خاکروی داکتیلوریزا (*Dactylorhiza hatagirea*) از ریز نمونه‌های مختلف ساقه، کپسول بذر، غده زیرزمینی و برگ به منظور رویان‌زایی استفاده کردند. در مورد

ریز نمونه برگ تیمار هورمونی سطوح مختلف استفاده شد. اما ریز نمونه برگی در هیچ یک از تیمارها نتیجه نداد (۱۲). بر این اساس نتایج این آزمایش با آن‌ها مطابقت دارد.



شکل ۴- مراحل مختلف رویان‌زایی ارکیده ثعلب سایه پسند، الف- ریزنمونه‌های طوقه روز اول کشت، ب- رویان بدنی اولیه از طوقه (بعد از دو هفته)، ج- گیاهچه‌های برگدار حاصل از رویان بدنی (چهار هفته بعد).

Figure 4. Different stages of *Dactylorhiza umbrosa* somatic embryogenesis, a) crown explants first day of culture, b) primary somatic embryo from crown explants (after 2 weeks), c) plantlet with leaf outgrowth of somatic embryo (after 4 weeks).

### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش رویان‌زایی بدنی دوگونه ارکیده بومی ایران مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر مثبت سه میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین در هر دو گونه مشاهده شد. بنابراین استفاده از آن برای رویان‌زایی و آزمایش اثر غلظت‌های مختلف آن بر تعداد رویان توصیه می‌شود. در ارکیده خربقی

معمولی محیط‌های کشت از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند. در حالی‌که در گونه ثعلب سایه پسند محیط کشت فاست با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. بنابراین به‌نظر می‌رسد ارکیده ثعلب سایه پسند به محیط اختصاصی‌تری برای رویان‌زایی بدنی احتیاج دارد و برای دستیابی به نتایج بهتر باید به آن توجه نمود. ریزنمونه پروتوکورمی در ارکیده خربقی معمولی و ریزنمونه طوقه (پاهنگ ساقه) در ارکیده ثعلب سایه پسند پربازده‌ترین ریزنمونه‌ها شناخته شدند. در هر دو گونه ریزنمونه برگ‌ی نتیجه بخش نبود. در ارکیده‌های معتدله بر خلاف انواع گرمسیری و نیمه گرمسیری ریزنمونه برگ‌ی گزینه مناسب و آسانی برای رویان‌زایی نمی‌باشد.

#### منابع

1. Agarwal, L.S., and Knawark, Sh. 2004. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba*. L. Sci. Hort. 102: 359-368.
2. Begum, A.A., Tamaki, M., Tahara, M., and Kato, S. 1994. Somatic embryogenesis in *Cymbidium* through in vitro culture of inner tissue of protocorm-like bodies. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63: 419-427.
3. Chang, Y.C., and Chang, W.C. 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. Plant Cell Rep. 17: 251-255.
4. Chen, Y.C., Chang, C., and Chang, W.C. 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. In Vitro Plant. 36: 420-423.
5. Chung, H.G., Chen, J.T., and Chang, W.C. 2005. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* 'chiengmai pink' and subsequent plant regeneration. In Vitro Plant. 41:765-769.
6. Chung, H.G., Chen, J.T., and Chang, W.C. 2007. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. Biol. Plant. 51(2): 346-350.
7. Chung, J.P., Huang, C.Y., and Dai, T.E. 2010. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* 'Gower Ramsey', Sci. Hort. 124: 511-516.
8. Dianati Daylami, Sh. 2014. Study of seed germination, floral transition and expression of some related gene in some Iranian Orchids. Ph.D. Thesis. University of Tehran. Aburairhan Campus. (In Persian)
9. Eisenman, S.W., Zaurov, D.E., and Struwe, L. 2013. Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan, Translated by Zaurov, D.E. Eisenman, S.W., Yunusov, D.A., and Isaeva, V., Springer. Pp: 85.
10. Ghahraman, A., and Attar, F. 1998. Iranian plant biodiversity. V 1. Institute of Tehran University Publications. (In Persian)

11. Geetha, S., and Shetty, A.S. 2000. In vitro propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Curr. Sci.* 79(6): 886- 889.
12. Giri, D., and Tamata, S. 2012. Propagation and conservation of *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo, an endangered alpine orchid. *Afr. J. Biotech.* 11(62): 12586-12594.
13. Gow, P.W., Chen, J.T., and Chang, W.C. 2008. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiol Plant.* 30: 507-512.
14. Gow, W.P., Chen, J.T., and Chang, W.C. 2009. Effects of genotype, light regime, explants position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiol Plant.* 31: 363-369.
15. Huang, C.Y., and Chung, J.P. 2011. Efficient indirect induction of protocorm-like bodies and shoot proliferation using field-grown axillary buds of a *Lycaste* hybrid, *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 106: 31–38.
16. Jorgensen, B.O., Andersen, I., and Torben, F. 1998. Hardy and half hardy terrestrial orchids as potential new pot plant, proc Third Symposium. on New Horticulture Crops. *Acta Hort.* 454 ISHS.
17. Mahendran, G., and Narmatha Bai, V. 2012. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Sci. Hort.* 135: 40–44.
18. Moradi, Sh., Dianati daylami, Sh., Arab, M., and Vahdati, K. 2013. Best medium for somatic embryogenesis induction in *Epipactis veratrifolia*. 8th Iranian Horticulture Science Congress. Bu- Ali Sina Universit. 26-29 August. Hamedan. Iran.
19. Moradi, Sh. 2014. Direct somatic embryogenesis of two Iranian native orchids. MSc. Thesis. University of Tehran. Aburaihan Campus. (In Persian)
20. Nayak, N.R. 1997. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids. Trough thidiazuron induce high frequency shoot proliferation. *Sci. Hort.* 71: 243-250.
21. Piri Zirkouhi, M., Mashayekhi, K., Kamkar, B., Hemmati, Kh., and Vahdatpour, F. 2009. Embryogenesis of a commercial and a native tomato cultivar using different culture media, *J. Plant Prod. Res.* 16(1): 101-114. (In Persian)
22. Rännbäck, L.M. 2007. Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium* spp., bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture Programme.
23. Subramaniam, G., and Taha, R.M. 2003. Morphogenesis of *cymbidium atropupureum*, in vitro. *Malayays, Sci.* 22: 1-5.
24. Sheela, V.L., Rajmohan, K., Anita, S., and Sarada, S. 2004. Effect of growth regulators on development and multiplication of protocorm like bodies in *Dendrobium* CV Sonia. *J. Orchid Soc. India.* 18: 21–23.
25. Teixeira da Silva, J.A., Singh, N., and Tanaka, M. 2006. Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium*

- (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plants. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 84: 135–144.
26. Teixeira da Silva, J.A. 2012. Jasmonic Acid, but not Salicylic Acid, Improves PLB Formation of Hybrid *Cymbidium*. *Plant Tissue Cult Biotech*, 22(2): 187-192.
27. Thomas, T.D., and Michael, A. 2007. High-frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchostylis retusa* Blume, an exquisite orchid. *Plant Biotech. Rep.* 1: 243–249.