Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

The effect of orchid immature embryos age on asymbiotic germination frequency by optimizingplant growth regulators

Hossein Piri

Assistant Professor, Agricultural Department, Velayat University, Sistan and Balouchestan, Iran. Email: h.piri@velayat.ac.ir

Abstract

Objective

Orchids seeds are so small, lacking nutrients and barely germinate in natural condition. For germinating in natural conditions, should associatie with fungi, especially mycorrhizal fungi. Drawing on the tissue culture technique and meeting all necessary growth and development conditions, the limitations can be overcome.

Materials and Methods

After being surfaced cleaned, the capsules containing seeds were placed in 1% Teepol solution as a disinfectant and wetting agent for 20 minutes to completely remove pathogens; then were washed and placed under laminar air flow, disinfected with $HgCl_2$ 0.2 for 10 minutes, Bavistin and Streptomycin each one 0.03% for 5 minutes in a entirely sterile environment. All the culture media were simultaneously ready and the seeds were uniformly inoculated in a totally sterilized environment and incubated.

Results

The percentage and germination rate were affected by seed age and plant growth regulators. The formation of spherule and chlorophyll synthesis were highest in the third stage of seed culture. Based on the type of treatment, the formation, development and differentiation of protocorm were observed between 43-76 days after culture, which was statistically significant at 1% compared to control.

Conclusions

Considering the data analysis results, the success rate from the germination stage to the differentiation of protocorm in orchid seeds is mostly different based on seed age in each

spices and cultivars, the type of plant growth regulators used, The ratio and composition of the two types of auxin and the ratio of auxin to cytokinin and vice versa are different. Therefore, it is necessary that new complementary experiments be done for each spices and cultivars based on the difference in the time taken from pollination to embryo ripening.

Keywords: *Growth hormones, M medium, Protocorms, Spherule*

Citations: Piri H (2020) The Effect of Orchid Immature Embryos Age on Asymbiotic Germination Frequency by Optimizing Plant Growth Regulators. Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 143-160.

Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 143-160.
DOI: 10.22103/jab.2020.14272.1142
Received: December 16, 2019; Accepted: January 9, 2020
© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

تاثیر سن جنین‌های نارس ارکیده بر میزان جوانه‌زنی به روش غیرهمزیست با کمک بهینه‌سازی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

حسین پیری

استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه ولایت، ایرانشهر، سیستان و بلوچستان، ایران، ایمیل: h.piri@velayat.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۰

چکیده

هدف: دانه‌های ارکیده بسیار ریز، فاقد مواد غذایی و بندرت در شرایط طبیعی جوانه می‌زنند. برای جوانه‌زنی در شرایط طبیعی ابتدا بایستی همزیستی با قارچ‌ها، بویژه قارچ‌های میکوریزا انجام شود. با استفاده از تکنیک کشت بافت و فراهم نمودن تمام شرایط لازم برای رشد و توسعه، می‌توان این محدودیت‌ها را برطرف نمود.

مواد و روش‌ها: کپسول‌های حاوی دانه بعد از تمیز نمودن سطحی به منظور حذف کامل عوامل بیماری‌زا، داخل محلول ۱ درصد تی‌پل (Teepol) بعنوان ماده ضدعفونی‌کننده و خیس‌کننده برای ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس شستشو و به زیر دستگاه لامینار ایرفلو منتقل و در شرایط کاملا" استریل با کلرید جیوه ($Hgcl_2$) به میزان ۰/۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، بوستین (Bavistin) و استرپتومایسین (Streptomycin) هر کدام به میزان ۰/۰۳ درصد بمدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند. تمام محیط‌های کشت همزمان آماده و دانه‌ها در شرایط کاملا" سترون بطور یکنواخت کشت و جهت جوانه‌زنی در اتاق رشد قرار داده شدند.

نتایج: درصد و سرعت جوانه‌زنی تحت تاثیر سن دانه و تنظیم‌کننده‌های رشد قرار داشت. تشکیل اسفرول و سنتز کلروفیل در مرحله سوم کشت دانه، حداکثر بود. تشکیل، توسعه و تمایزیابی پروتوکورم بسته به نوع تیمار و مرحله رشدی دانه‌ها در فاصله زمانی بین ۴۳ الی ۷۶ روز بعد از کشت مشاهده شد، که نسبت به شاهد در سطح آماری ۱ درصد معنی‌داری بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها می‌توان بیان داشت، در بیشتر موارد درصد موفقیت از مرحله جوانه‌زنی تا تمایزیابی پروتوکورم در گل‌های ارکیده با توجه به سن دانه گیاهی در هر گونه و رقم، نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده، نسبت و ترکیب دو نوع اکسین و نسبت اکسین به سایتوکنین و بالعکس متفاوت می باشد، در نتیجه لازم است برای هر گونه و رقم با توجه به تفاوت در طول دوره گرده‌افشانی تا رسیدن دانه آزمایشات تکمیلی جدیدی انجام شود.

کلمات کلیدی: اسفرول، پروتوکورم، محیط کشت M، هورمون‌های رشد

مقدمه

ارکیده‌ها یکی از مهم‌ترین و توسعه یافته‌ترین گیاهان خانواده تک‌لپه‌ای‌ها هستند. در منابع مختلف تعداد گونه‌های آن‌ها متفاوت و تا ۳۵۰۰۰ گونه در قالب ۸۵۹ جنس ذکر شده‌اند. این تعداد حدود ۱۱ درصد کل گیاهان گل‌دار را شامل می‌شوند (Cribb and Govaerts 2005). علاوه بر این، شمار ارقامی که از تلاقی سایر گونه‌های این خانواده بدست آمده‌اند، از مرز ۱۳۰۰۰۰ رقم گذشته است. هر رقم دارای خصوصیاتی منحصر به‌فرد می‌باشد. ارکیده‌ها از گیاهان گل‌دار و خلقت عجیب طبیعت هستند که در سراسر دنیا پراکنده و به غیر از نواحی قطبی و بیابان‌های گرم و سوزان می‌توانند به رشد و حیات خود ادامه دهند (Bijaya 2013). گونه *multiflora* یکی از گونه‌های مورد توجه و معروف جنس *Aerides* است که به دلیل شکل گل‌آذین، به دم روباهی (Fox-tail) شهرت دارد. این جنس دارای ۶۰ گونه است که همگی اپی‌فیتیک هستند. توزیع جغرافیایی آن گسترده است، به‌طوری‌که از هند تا تایلند از طریق بنگلادش، بوتان، برمه و نپال ادامه یافته، اما در اثر برداشت‌های بی‌رویه توسط افراد سودجو و محلی برای مصارف گوناگون بویژه دارویی، معدوم شدن در اثر ساخت و سازهای بی‌وقفه و درصد بسیار پایین جوانه‌زنی در طبیعت، در لیست گیاهان در حال انقراض[1] قرار گرفته است (Agoo et al. 2009). از این گل به عنوان گل بریده و گیاه گلدانی استفاده می‌شود. یکی از ویژگی‌های تجاری آن ماندگاری طولانی مدت گل‌آذین آن می‌باشد که در شرایط مساعد ۲ تا ۳ هفته شادابی خود را پس از برداشت بعنوان گل بریده حفظ می‌نماید. بصورت گسترده نیز توسط اصلاح‌گرها جهت تولید هیبریدهای جدید استفاده می‌شود. ارکیده‌ها از جمله گل‌هایی هستند که در ایران روی آنها تحقیقات بسیار کمی صورت گرفته است، در نتیجه با توجه به اهمیت این گل‌ها از نظر اقتصادی و ارزآوری، تحقیقات و بررسی‌های لازم جهت مشخص نمودن گونه‌ها و ارقام سازگار و یا سازگار نمودن با شرایط منطقه با هدف تولید انبوه و صادرات بویژه به کشورهای حاشیه خلیج همیشه فارس که واردکننده انواع گل‌های ارکیده از آمریکا، هلند، مالزی، سنگاپور و تایلند هستند، ضرورت دارد.

دانه‌های ارکیده بسیار ریز و از نظر اندازه نیز متنوع، بطول ۰/۵۰ الی ۶ و عرض ۰/۰۱ الی ۰/۹۳ میلی‌متر و وزن بین ۰/۳ تا ۱۴ میکروگرم که فاقد مواد غذایی هستند. بندرت در کشت طبیعی جواب می‌دهند (Arditti and Ghani 2000). دانه از یک پوسته ضخیم و یک جنین ۱۰۰ سلولی تشکیل شده است. دانه‌ها تمایز نیافته‌اند، بطوری‌که فاقد کوتیلدون، ریشه‌چه و یا حتی آندوسپرم می‌باشند و این وجه مشترک تمام گونه‌ها است. محیط کشت مناسب این ویترو، جوانه‌زنی جنین‌های نابالغ را میسر می‌سازد (Arditti 1967; Prutsch et al. 2000). مواد غذایی درون دانه‌های غالب گونه‌های خانواده ارکیده در مرحله بلوغ و رسیدگی کامل بصورت کمپلکس و غیرقابل استفاده در آمده و درصد جوانه‌زنی علاوه بر کاهش شدید با تاخیر معنی‌دار صورت می‌گیرد (Arditti and Ghani 2000). برای جوانه‌زنی در شرایط طبیعی ابتدا بایستی مواد درون جنین به وسیله همزیستی با

2. IUCN

قارچها بویژه قارچهای میکوریزا به شکل ساده و قابل استفاده تبدیل شوند. قارچهای میکوریزا جنین را با آب، کربوهیدرات‌ها، مواد معدنی و ویتامین‌ها برای جوانه‌زنی آماده می‌کنند که عموما نرخ جوانه‌زنی در این شراط کمتر از ۱ درصد گزارش شده است. علاوه بر این خیلی از دانهال‌ها پس از جوانه‌زدن و قبل از تبدیل به نهال کامل از بین می‌روند (Philip et al. 2008)، زیرا این بذور فاقد آنزیم‌های لازم برای تبدیل لیپید به کربوهیدرات و قند قابل مصرف می‌باشند (Manning and Van Staden 1987). علاوه بر این در شرایط طبیعی از مرحله جوانه‌زنی تا گلدهی ۸ تا ۱۰ سال طول می‌کشد. با استفاده از تکنیک کشت بافت و فراهم نمودن تمام شرایط لازم برای رشد و توسعه، می‌توان این محدودیت‌ها را برطرف نمود (Kumar and Rahman 2017). جوانه زنی دانه‌های ارکیده در شرایط غیرهمزیست بستگی به چند فاکتور مهم نظیر سن جنین، سن کپسول، مواد غذایی و عناصر مورد استفاده، شرایط فیزیکی محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد دارد (Arditti 1979)، به همین دلیل ضرورت دارد برای تشخیص بهترین سن جوانه‌زنی، دانه‌های گونه‌های مختلف را بصورت نارس و در چندین مرحله از رشد، در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد آزمایش قرار داد تا سن اقتصادی جنین برای کشت مشخص شود. از زمانی‌که Knudson (1921-1922)، برای اولین بار احتمال جوانه‌زدن دانه‌های انواع ارکیده را بدون همزیستی با قارچها[2]، در شرایط درون‌شیشه‌ای با تهیه محیط کشت اختصاصی در شرایط محیطی مناسب مطرح نمود، با این تکنیک می‌توان از یک سو امکان ازدیاد این گل را بصورت انبوه و اقتصادی فراهم و از سوی دیگر ژرم‌پلاسم ارقام و گونه‌های در حال انقراض را حفظ نمود و مسیر جدید را در کشت بافت و ریزازدیادی گل ارکیده تسهیل نمود. تحقیقات و مطالعات اخیر در دنیا برای دستیابی به پروتوکورم، که یک ساختار منحصربفرد شبه‌غده‌ای دارای ریشه‌چه و نوساقه در ارکیده‌ها است و جهت تکثیر از آن استفاده می‌شود را به منظور تولید انبوه ارکیده‌ها، در برنامه‌های خود قرار داده است (Philip et al. 2008). پروتوکورم از اسفرول که حالتی از جنین متورم شده می‌باشد و از پوسته سخت دانه خارج شده است و در برخی گونه‌ها و ارقام دارای برجستگی‌های مومانند می‌باشد، بوجود می‌آید. این پژوهش به منظور بررسی قابلیت میزان جوانه‌زنی دانه‌های گل ارکیده *Aerides multiflora* در سه مرحله رشدی متفاوت بعد از گرده‌افشانی برای مطالعه، با هدف تعیین بالاترین درصد جوانه‌زنی در حداقل زمان تا مرحله تولید پروتوکورم سالم قابل تمایزیابی جهت تولید انبوه این گل انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، کپسول‌های حاوی دانه از گلخانه ارکیده دانشگاه پنجاب هندوستان واقع در شهر چندیگر در سه مرحله رشدی مختلف برداشت و به محل اجرای آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت و ژنومیکس مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان مستقر در شهرستان ایرانشهر منتقل شدند. این پژوهش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با

2. Asymbiotic

چهار تکرار انجام گرفت و تیمارهای مورد استفاده عبارت بودند از: الف. سطوح رشدی دانه‌ها شامل: ۱) ۱۶ هفته بعد از گرده‌افشانی، ۲) ۱۸ هفته بعد از گرده‌افشانی و ۳) ۲۰ هفته بعد از گرده‌افشانی. ب. سطوح هورمونی شامل: ۱- شاهد (Control)، ۲- IAA($0.25mgl^{-1}$)، ۳- IAA($0.5mgl^{-1}$)، ۴- IAA($0.75mgl^{-1}$)، ۵- IAA($1mgl^{-1}$)، ۶- IBA($0.25mgl^{-1}$)، ۷- IBA($0.5mgl^{-1}$)، ۸- IBA($0.75mgl^{-1}$)، ۹- IBA($1mgl^{-1}$)، ۱۰- Kin($0.25mgl^{-1}$)، ۱۱- Kin($0.5mgl^{-1}$)، ۱۲- Kin($0.75mgl^{-1}$)، ۱۳- Kin($1mgl^{-1}$)، ۱۴- IAA+IBA($0.25+0.25mgl^{-1}$)، ۱۵- IAA+IBA($0.5+0.25mgl^{-1}$)، ۱۶- IAA+IBA($0.25+0.5mgl^{-1}$)، ۱۷- IAA+IBA($0.5+0.5mgl^{-1}$)، ۱۸- IAA+Kin($0.25+0.25mgl^{-1}$)، ۱۹- IAA+Kin($0.5+0.25mgl^{-1}$)، ۲۰- IAA+Kin($0.25+0.5mgl^{-1}$)، ۲۱- IAA+Kin($0.5+0.5mgl^{-1}$)، ۲۲- IBA+Kin($0.25+0.25mgl^{-1}$)، ۲۳- IBA+Kin($0.5+0.25mgl^{-1}$)، ۲۴- IBA+Kin($25+0.5mgl^{-1}$) و ۲۵- IBA+Kin($0.5+0.5mgl^{-1}$). بعد از تمیز نمودن سطحی، داخل فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری، در زیر شیر آب جاری به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. به منظور از بین بردن کامل عوامل خارجی و حذف کشش سطحی، داخل محلول ۱ درصد تی‌پل (Teepol) بعنوان ماده ضدعفونی‌کننده و خیس‌کننده برای ۲۰ دقیقه دیگر قرار گرفتند. سپس شستشو و به زیر دستگاه لامینار ایرفلو منتقل و در شرایط کاملا" استریل با کلرید جیوه ($Hgcl_2$) به میزان ۰/۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، بوستین (Bavistin) و استرپتومایسین (Streptomycin) هرکدام به میزان ۰/۰۳ درصد و به مدت ۵ دقیقه، بترتیب جهت از بین بردن قارچ‌ها و باکتری‌ها تیمار گردیدند. کپسول‌ها پس از هر تیمار، ۳ بار با آب دوبار تقطیر شده، برای از بین بردن اثرات احتمالی بجای مانده از مواد بکار گرفته شده، آبکشی شدند. به مدت ۳۰ ثانیه داخل الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور و بی‌درنگ به منظور از بین بردن اثرات الکل از روی شعله عبور داده شدند. تمام محیط‌های کشت همزمان آماده شدند و قبل از اضافه کردن آگار (شرکت سیگما) به میزان ۹ گرم در لیتر، pH آنها با استفاده از محلول ۰/۱ نرمال سدیم هیدروکسید (0.1 N NaOH) و هیدروکلریک اسید (0.1 N HCL) روی ۵/۸ تنظیم و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ^{oc}۱۲۱ و فشار $1b/cm^2$ ۱۵ اتوکلاو شدند. محیط کشت به میزان مساوی داخل لوله‌ها و فلاسک‌های آزمایش توزیع گردیدند. کپسول‌ها با چاقو اسکالپل بصورت طولی برش داده شدند (شکل ۱-۱).

دانه‌ها در شرایط کاملا" سترون و بطور یکنواخت روی محیط کشت قرار گرفتند و در دمای ۱ ± ^{oc}۲۴ و شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنائی و ۱۰ ساعت تاریکی قرار داده شدند (Kumar and Rahman 2017; Mihaljevic et al. 2013; Parthibhan et al. 2012). صفات مورد نظر از قبیل درصد جوانه‌زنی، مدت زمان (روز) تا شروع جوانه‌زنی، ایجاد اسفرول و تشکیل و توسعه پروتوکورم بصورت روزانه مورد بازدید، بررسی و یادداشت برداری قرار گرفتند. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش به جز آگار (شرکت سیگما) از نمایندگی کمپانی Duchefa هلند خریداری و مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج و بحث

در تمامی تیمارها، رویان حاوی مقدار مواد غذایی بسیار ناچیزی بود (شکل ۲-۱)، به‌طوری‌که پس از یک هفته دانه‌ها متورم (شکل ۳-۱)، و پس از دو هفته در خیلی از دانه‌هایی که در مرحله سوم کشت شده بودند، اسفرول با چشم مسلح قابل مشاهده بود (شکل ۴-۱). درصد و سرعت جوانه‌زنی تحت تاثیر سن دانه و تنظیم‌کننده‌های رشد قرار داشت. تشکیل اسفرول و سنتز کلروفیل در مرحله سوم کشت دانه، حداکثر بود (شکل ۵-۱). تشکیل، توسعه و تمایزیابی پروتوکورم (شکل ۶-۱)، بسته به نوع تیمار و مرحله رشدی دانه‌ها در فاصله زمانی بین ۴۳ الی ۷۶ روز بعد از کشت[3] صورت گرفت که نسبت به شاهد افزایش چشم‌گیر و معنی‌داری در سطح آماری ۱ درصد نشان داد (جدول ۱). طبق نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) تاثیر مراحل رشدی متفاوت بعد از گرده‌افشانی و انواع هورمون‌ها و اثر متقابل مراحل رشد و هورمون‌ها بر درصد جوانه‌زنی ارکیده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. جدول اثر متقابل نشان داد که در مرحله رشدی ۱۶ هفته پس از گرده‌افشانی، بیشترین درصد جوانه‌زنی (۶۸/۷۵) تحت تیمار ($IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})$ حاصل شد، در مرحله رشدی ۱۸ هفته پس از گرده‌افشانی بیشترین درصد جوانه‌زنی (۷۰/۰۰) تحت تیمار ($IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})$ و کمترین آن (۳۰/۰۰) در تیمار شاهد حاصل شد. در مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از برداشت دانه‌ها، بیشترین درصد جوانه‌زنی (۱۰۰/۰۰) به نسبت مساوی تحت تیمار ($IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})$ و ($IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})$ و کمترین آن (۳۳/۰۰) در تیمار شاهد مشاهده شد. از مقایسه تیمارهای فوق مشخص شد که بهترین تیمار برای جوانه‌زنی دانه ارکیده، برداشت کپسول در مرحله رشدی ۲۰ هفته بعد از گرده-افشانی و تحت تاثیر سطوح و غلظت هورمونی ($IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})$ و ($IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})$ میباشد (جدول ۲)، که یکی ترکیبی از دو نوع اکسین و دیگری ترکیبی از گروه اکسین و گروه سایتوکنین است، اما با نسبت و غلظت مساوی، در بذوری که در ۳ مرحله ۱۶، ۱۸ و ۲۰ هفته بعد از گرده افشانی برداشت و کشت شده بودند، ثبت گردید. درصد جوانه‌زنی و سایر تغییرات مورفولوژیکی با افزایش سن دانه، بهبود و توسعه یافت. نکته قابل بررسی این است که با وجود بکارگیری تیمارهای متفاوت از نظر غلظت و نسبت، دانه‌ها در هر سه مرحله‌ی رشدی در دو تیمار فوق‌الذکر که دارای غلظت‌های مساوی بودند، حداکثر عملکرد را نشان دادند.

3. Inoculation

جدول ۱. تجزیه واریانس برخی صفات ارکیده تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و مراحل رشدی مختلف دانه پس از گرده‌افشانی

Table 1. Analyses of variance of some orchid traits under the influence of plant growth regulators and different seed growth stages after pollination

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی Germination frequency	تعداد روز تا مرحله: Number of days to stage:				
			آغاز جوانه‌زنی Onset of germination	ایجاد اسفرول Spherule induction	سنتز کلروفیل Chlorophyll synthesis	تشکیل پروتوکورم Protocorm formation	تمایز یابی پروتوکورم Protocorm differentiation
مراحل رشد Growth stages	2	9233.44**	1243.10**	1602.60**	1016.67**	9464.16**	4179.86**
ترکیبات هورمونی Hormonal Compositions	24	2836.98**	114.32**	159.76**	155.57**	185.29**	201.04**
مراحل رشد× ترکیبات هورمونی Growth stages *Hormonal Compositions	48	84.41**	8.49**	7.50**	6.29**	14.34**	21.38**
خطا آزمایشی Trial error	225	1.63	2.51	1.45	1.32	1.22	2.19
ضریب تغییرات Coefficient of variation		2.150852	6.17	3.776224	2.648271	2.629511	1.50889

****Significant at the level of 1% معنی‌دار در سطح ۱ درصد**

از نتایج مقایسه میانگین (جدول ۲) می‌توان استنباط کرد که ترکیب بهینه جهت رشد قوی و سالم، نسبتی مساوی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسین و یا دو گروه اکسین و سایتوکنین است. دو تیمار ترکیبی ($IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})$ و $IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})$ از نظر درصد جوانه‌زنی و عملکرد مطلوب و نهایتاً از لحاظ اقتصادی که یکی از اهداف مهم این تحقیق است، مناسب‌ترین تیمارها می‌باشند. سایر تغییرات در هر دو تیمار نیز یکسان بود. دانه‌های غالب ارقام و گونه‌های خانواده

ارکیده در مرحله بلوغ و رسیدگی کامل در هر شرایط و هر نوع تیماری نه تنها نسبت به افزایش جوانه‌زنی واکنش مثبت نشان نمی دهند بلکه در بسیاری از موارد، درصد جوانه‌زنی بشدت کاهش و با تاخیر معنی‌داری صورت می‌گیرد، زیرا در مرحله نهائی شکل گیری دانه، علاوه بر مسئله مهم رکود، اندک مواد غذایی درون آنها نیز بصورت کمپلکس درآمده به‌طوری‌که جوانه‌زنی آنها به سختی امکان‌پذیر است. برای جوانه‌زنی در شرایط طبیعی ابتدا بایستی بوسیله همزیستی با قارچها بویژه قارچهای میکوریزا به بشکل ساده و قابل مصرف تبدیل شوند و یا در محیط درون‌شیشه‌ای با فراهم نمودن تمام شرایط رشد، این امکان را ایجاد نمود (Harvais 1972; Arditti 1967).

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۲. مقایسه میانگین برخی صفات ارکیده تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و مراحل رشدی دانه پس از گرده‌اقشانی

Table 2. Mean comparison of some orchid traits under the influnce of plant growth regulators and seed growth stages after pollination

Number of days to stage: تعداد روز تا مرحله						Treatments تیمارها	مراحل رشدی	ردیف Rows
تمایزیابی پروتوکورم Protocorm differentiation	تشکیل پروتوکورم Protocorm formatior	سنتز کلروفیل Chlorophyll synthesis	ایجاد اسفرول Spherule induction	آغاز جوانه‌زنی Onset of germination	درصد جوانه‌زنی Germination frequency	هورمون‌ها Hormones		
76.00^{a}	64.75^{a}	55.75^{b}	49.25^{a}	37.50^{a}	23.00^{b}	شاهد Control	16 weeks after pollination ۱۶ هفته بعد از گرده افشانی	1
62.25^{efg}	53.00^{ef}	42.75^{jklmn}	38.00^{de}	29.25^{cdef}	35.50^{y}	IAA(0.25mgl^{-1})		2
62.25^{efg}	53.50^{def}	42.75^{jklmn}	38.00^{de}	28.00^{efghi}	41.75^{wv}	IAA(0.5mgl^{-1})		3
62.25^{efg}	54.50^{cde}	42.75^{jklmn}	37.00^{ef}	28.00^{efghi}	50.50^{rq}	IAA(0.75mgl^{-1})		4
56.75^{klm}	47.75^{h}	38.00^{qr}	30.00^{lmno}	22.25^{mno}	70.50^{g}	IAA(1mgl^{-1})		5
60.25^{ghi}	53.50^{def}	42.75^{jklmn}	35.25^{fgh}	28.75^{defgh}	30.75^{a}	IBA(0.25mgl^{-1})		6
62.25^{efg}	53.25^{def}	42.75^{jklmn}	35.00^{fghi}	28.75^{defgh}	35.50^{y}	IBA(0.5mgl^{-1})		7
60.25^{ghi}	53.25^{def}	42.00^{jklmn}	35.00^{fghi}	28.75^{defgh}	45.50^{u}	IBA(0.75mgl^{-1})		8
54.50^{no}	54.25^{cde}	34.50^{s}	29.50^{lmnop}	23.50^{klmn}	61.75^{l}	IBA(1mgl^{-1})		9
69.25^{bc}	56.75^{b}	41.00^{no}	39.25^{cd}	32.25^{b}	30.75^{a}	Kin(0.25mgl^{-1})		10
64.50^{d}	52.00f^{g}	42.00^{jklmn}	35.50^{fgh}	27.25^{efghi}	42.25^{v}	Kin(0.5mgl^{-1})		11
63.75^{de}	51.00^{g}	40.00^{op}	35.00^{fghi}	27.25^{efghi}	60.00^{mln}	Kin(0.75mgl^{-1})		12
60.25^{ghi}	51.00^{g}	40.00^{op}	34.00^{ghij}	27.25^{efghi}	65.25^{jk}	Kin(1mgl^{-1})		13
60.75^{fgh}	53.00^{ef}	42.00^{jklmn}	35.50^{fgh}	28.00^{efghi}	45.00^{u}	IAA+IBA(0.25+0.25mgl^{-1})		14
60.75^{fgh}	53.00^{ef}	42.00^{jklmn}	36.50^{ef}	26.25^{ghij}	58.75^{mon}	IAA+IBA(0.5+0.25mgl^{-1})		15
60.75^{fgh}	52.00^{fg}	42.00^{jklmn}	34.25^{ghij}	26.00^{hijk}	58.00^{o}	IAA+IBA(0.25+0.5mgl^{-1})		16
53.25^{op}	47.50^{h}	38.00^{qr}	33.00^{ijk}	26.00^{hijk}	70.00^{g}	IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})		17
69.25^{bc}	55.00^{cd}	44.00^{hijk}	38.00^{de}	29.00^{defg}	45.50^{u}	IAA+Kin(0.25+0.25mgl^{-1})		18
60.50^{gh}	52.00^{fg}	42.00^{jklmn}	36.00^{efg}	29.25^{cdef}	45.50^{u}	IAA+Kin(0.5+0.25mgl^{-1})		19
60.50^{gh}	52.00^{fg}	41.00^{no}	35.25^{fgh}	28.75^{defgh}	51.00^{q}	IAA+Kin(0.25+0.5mgl^{-1})		20
52.25^{pqr}	47.00^{h}	38.50^{pqr}	31.50^{kl}	26.25^{ghij}	70.00^{g}	IAA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})		21
63.50^{de}	54.00^{cde}	43.50^{ijklm}	37.75^{de}	28.75^{defgh}	40.75^{wvx}	IBA+Kin(0.25+0.25mgl^{-1})		22
63.50^{de}	54.00^{cde}	43.75^{hijkl}	38.00^{de}	29.00^{defg}	40.00^{wx}	IBA+Kin(0.5+0.25mgl^{-1})		23
63.50^{de}	54.00^{cde}	43.50^{ijklm}	37.7^{de}	29.25^{cdef}	48.25^{ts}	IBA+Kin(25+0.5mgl^{-1})		24
52.25^{pqr}	47.00^{h}	38.75^{pq}	31.25^{kl}	26.00^{hijk}	68.75^{hg}	IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})		25

1	Control شاهد	30.00^{a}	35.50^{a}	45.00^{b}	61.50^{a}	55.75^{bc}	70.00^{b}	
2	IAA($0.25mgl^{-1}$)	39.50^{x}	28.7^{defgh}	36.00^{efg}	50.00^{c}	47.00^{h}	52.34^{pqr}	
3	IAA($0.5mgl^{-1}$)	45.75^{u}	26.50^{fghi}	34.00^{ghij}	50.00^{c}	47.25^{h}	62.75^{def}	
4	IAA($0.75mgl^{-1}$)	58.50^{on}	26.50^{fghi}	34.00^{ghij}	50.00^{c}	44.75^{i}	60.75^{fgh}	
5	IAA($1mgl^{-1}$)	81.75^{d}	23.25^{lmn}	28.00^{opqr}	43.75^{hijkl}	39.50^{jkl}	52.00^{pqr}	
6	IBA($0.25mgl^{-1}$)	39.50^{x}	28.75^{defgh}	32.75^{jk}	47.75de	40.00^{jk}	58.25^{ijkl}	
7	IBA($0.5mgl^{-1}$)	39.50^{x}	26.50^{fghi}	33.75^{hij}	47.50^{de}	39.25^{jkl}	58.25^{ijkl}	
8	IBA($0.75mgl^{-1}$)	49.00^{rtqs}	31.75^{bc}	33.75^{hij}	47.50^{de}	38.75^{klm}	58.75^{hijk}	
9	IBA($1mgl^{-1}$)	70.75^{g}	25.75^{ijkl}	28.25^{nopqr}	42.00^{jklmn}	34.50^{pq}	52.75^{opq}	
10	Kin($0.25mgl^{-1}$)	48.75^{rts}	32.75^{b}	33.75^{hij}	48.50^{cd}	40.50^{jk}	59.75^{hij}	
11	Kin($0.5mgl^{-1}$)	50.50^{rq}	28.50^{defghi}	30.25^{lmn}	46.50^{efg}	38.00^{lmn}	58.75^{hijk}	
12	Kin($0.75mgl^{-1}$)	70.00^{g}	27.00^{efghi}	30.25^{lmn}	46.50^{efg}	38.00^{lmn}	58.75^{hijk}	
13	Kin($1mgl^{-1}$)	74.25^{f}	22.00^{mno}	28.25^{nopqr}	47.50^{de}	36.00^{op}	59.75^{hij}	
14	IAA+IBA($0.25+0.25mgl^{-1}$)	50.00^{rqs}	28.75^{defgh}	33.00^{ijk}	47.00^{def}	39.00^{jkl}	58.75^{hijk}	
15	IAA+IBA($0.5+0.25mgl^{-1}$)	70.00^{g}	25.75^{ijkl}	29.75^{lmnop}	44.25^{hij}	36.50^{no}	55.75^{mn}	
16	IAA+IBA($0.25+0.5mgl^{-1}$)	64.00^{k}	26.50^{fghi}	32.75jk	46.50^{efg}	38.75^{klm}	58.00^{jkl}	
17	IAA+IBA($0.5+0.5mgl^{-1}$)	86.00^{c}	21.00^{no}	26.50^{rst}	40.25^{op}	34.50^{pq}	50.25rst	
18	IAA+Kin($0.25+0.25mgl^{-1}$)	55.50^{p}	31.00^{bcd}	37.00^{ef}	49.75^{c}	44.50^{i}	60.50^{gh}	
19	IAA+Kin($0.5+0.25mgl^{-1}$)	67.50^{hi}	26.75^{efghi}	31.50^{kl}	46.50^{fgh}	39.75^{jkl}	55.75^{mn}	
20	IAA+Kin($0.25+0.5mgl^{-1}$)	60.50^{ml}	28.75^{defgh}	33.00^{ijk}	46.75^{defg}	39.75^{jkl}	56.50^{lm}	
21	IAA+Kin($0.5+0.5mgl^{-1}$)	77.50^{e}	26.50^{fghi}	31.50^{kl}	45.00^{ghi}	37.25^{mno}	52.75^{opq}	
22	IBA+Kin($0.25+0.25mgl^{-1}$)	54.75^{p}	29.50^{cde}	34.25^{ghij}	48.50^{cd}	40.75^{j}	58.75^{hijk}	
23	IBA+Kin($0.5+0.25mgl^{-1}$)	66.00^{ji}	29.50^{cde}	$34.25g^{hij}$	48.50^{cd}	40.75^{j}	58.25^{ijkl}	
24	IBA+Kin($25+0.5mgl^{-1}$)	77.250^{e}	27.00^{efghi}	30.50^{lm}	44.25^{hij}	37.00^{no}	54.50^{no}	
25	IBA+Kin($0.5+0.5mgl^{-1}$)	88.75^{b}	20.25^{op}	30.36^{lm}	41.75^{lmno}	30.25^{tuv}	49.75^{stu}	
1	Control شاهد	33.00^{z}	32.00^{b}	40.25^{c}	48.75^{h}	37.26^{op}	60.00^{hij}	۲۰ هفته بعد از گرده افشانی 20 weeks after pollination
2	IAA($0.25mgl^{-1}$)	48.00^{t}	25.75^{ijkl}	30.00^{lmno}	43.50^{ijklm}	36.00^{op}	51.25^{pqrs}	
3	IAA($0.5mgl^{-1}$)	50.75^{rq}	23.00^{mn}	30.00^{lmno}	43.50^{ijklm}	36.25^{op}	51.25^{pqrs}	
4	IAA($0.75mgl^{-1}$)	67.500^{hi}	23.00^{mn}	30.00^{lmno}	43.50^{ijklm}	36.00^{op}	51.25^{pqrs}	
5	IAA($1mgl^{-1}$)	90.00^{b}	18.25^{pq}	30.00^{lmno}	38.75^{pq}	31.25^{stu}	47.00^{uv}	
6	IBA($0.25mgl^{-1}$)	40.25^{wx}	25.75^{ijkl}	30.00^{lmno}	43.50^{ijklm}	36.00^{op}	51.25^{pqrs}	

7	IBA(0.5mgl^{-1})	47.75^{t}	23.75^{jklm}	30.00^{lmno}	43.50^{ijklm}	36.00^{op}	51.00^{qrs}
8	IBA(0.75mgl^{-1})	57.50^{o}	23.75^{jklm}	30.00^{lmno}	43.5^{0ijklm}	36.00^{op}	51.75^{pqrs}
9	IBA(1mgl^{-1})	75.75^{fe}	18.25^{pq}	25.75^{stu}	38.00^{qr}	31.25^{stu}	47.75^{uv}
10	Kin(0.25mgl^{-1})	55.00^{p}	26.25^{ghij}	30.00^{lmno}	43.50^{ijklm}	36.00^{op}	51.50^{pqrs}
11	Kin(0.5mgl^{-1})	57.500^{o}	22.00^{mno}	27.75^{pqr}	40.00^{op}	32.75^{qrs}	47.75^{uv}
12	Kin(0.75mgl^{-1})	80.00^{d}	21.00^{no}	27.25^{qrs}	40.00^{op}	32.75^{qrs}	47.75^{uv}
13	Kin(1mgl^{-1})	80.00^{d}	17.25^{q}	27.25^{qrs}	40.00^{op}	31.00^{stu}	47.75^{uv}
14	IAA+IBA(0.25+0.25mgl^{-1})	55.00^{p}	22.00^{mno}	27.75^{pqr}	40.00^{op}	32.00^{rst}	47.75^{uv}
15	IAA+IBA(0.5+0.25mgl^{-1})	76.25^{e}	20.00^{op}	25.75^{pqr}	38.00^{qr}	30.00^{uv}	45.50^{w}
16	IAA+IBA(0.25+0.5mgl^{-1})	70.00^{g}	21.00^{no}	27.75^{pqr}	41.00^{no}	32.00^{rst}	48.25^{uv}
17	IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})	100.00^{a}	16.00^{q}	21.25^{v}	36.75^{r}	28.75^{vw}	43.25^{x}
18	IAA+Kin(0.25+0.25mgl^{-1})	65.75^{jik}	23.75^{jklm}	28.75$^{mnop}_{q}$	41.50^{mno}	33.75^{qr}	48.50^{tuv}
19	IAA+Kin(0.5+0.25mgl^{-1})	76.00^{fe}	21.00^{no}	28.00^{opqr}	41.50^{mno}	33.75^{qr}	48.50^{tuv}
20	IAA+Kin(0.25+0.5mgl^{-1})	70.00^{g}	21.00^{no}	28.25^{nopq}r	41.50^{mno}	33.75^{qr}	48.50^{tuv}
21	IAA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})	90.00^{b}	18.25^{pq}	28.25^{nopqr}	40.00^{op}	31.25^{stu}	47.75^{uv}
22	IBA+Kin(0.25+0.25mgl^{-1})	65.75^{jik}	21.00^{no}	28.00^{opqr}	41.50^{mno}	33.75^{qr}	48.50^{tuv}
23	IBA+Kin(0.5+0.25mgl^{-1})	75.75^{fe}	21.00^{no}	28.00^{opqr}	40.00^{op}	33.75^{qr}	48.00^{uv}
24	IBA+Kin(25+0.5mgl^{-1})	85.00^{c}	20.00^{op}	25.75^{stu}	38.75^{pq}	31.00^{stu}	47.00^{vw}
25	IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})	100.00^{a}	16.00^{q}	21.25^{v}	36.75^{r}	28.25^{w}	43.25^{x}

آنالیز جدول تجزیه واریانس در مورد اثرات ساده انواع تیمارهای رشدی و انواع هورمون‌ها و همچنین اثر متقابل مراحل رشد و هورمون‌ها بر صفت آغاز جوانه‌زنی در دانه‌های ارکیده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار نشان داد (جدول ۱). بررسی اثر متقابل تاثیر مراحل رشدی و غلظت‌های مختلف هورمونی بر صفت آغاز جوانه‌زنی نشان داد که بهترین غلظت هورمونی برای جوانه‌زنی در مرحله رشدی ۱۶ هفته، تیمار IAA(1mgl^{-1}) می باشد که جوانه‌زنی دانه‌ها در کمترین مدت زمان و ۲۲/۲۵ روز پس از کاشت انجام شد. در تیمار هورمونی شاهد بیشترین تعداد روز (۳۷/۵۰) جهت جوانه‌زنی مشاهده شد. در مرحله رشدی ۱۸ هفته پس از برداشت بهترین غلظت هورمونی IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) بود. در تیمار شاهد آغاز جوانه‌زنی با تاخیر بیشتری انجام شد. همچنین بررسی اثر متقابل مراحل رشدی و غلظت‌های مختلف هورمونی نشان داد که در مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از برداشت، تیمارهای هورمونی IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) و IAA+IBA (0.5+0.5mgl^{-1}) با مقدار عددی ۱۶/۰۰ روز، بهترین تیمار جهت آغاز جوانه‌زنی دانه‌های ارکیده بودند. جوانه‌زنی در تیمار شاهد با تاخیر بیشتری نسبت به بقیه تیمارها انجام شد (جدول ۲). در پژوهشی که Kumar and Rahman (2017) روی ارکیده *Cymbidium aloifolium* انجام دادند، گزارش نمودند، محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA پاسخ معنی‌داری در سطح ۱ درصد نسبت به سایر تیمارها در میزان جوانه‌زنی و سایر مراحل رشد داشت. این نتایج با نتایج پژوهش حاضر که نشان داد، اضافه نمودن IBA و Kn به میزان ۵/. میلی‌گرم در لیتر از هر کدام به محیط کشت M درصد جوانه‌زنی تا مرحله تمایزیابی پروتوکورم را بهبود

بخشید و از نظر آماری در مقایسه با سایر تیمارها در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود، مطابقت دارد، زیرا در هر دو آزمایش از یک تنظیم‌کننده رشد اکسین جهت ریشه‌زایی و یک تنظیم‌کننده رشد سایتوکینین برای ساقه‌زایی استفاده شده است. در دیگر مطالعات نیز به بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت درون‌شیشه‌ای ارقام و گونه‌های مختلف ارکیده‌ها پرداخته شده است و کاربرد تنظیم‌کننده‌های گروه سایتوکنین و اکسین جهت تحریک جوانه‌زنی و توسعه پروتوکورم در دانه‌های بسیاری از گونه‌های ارکیده اثبات شده است (Stewart and Kane 2006a; De Pauw et al. 1995).

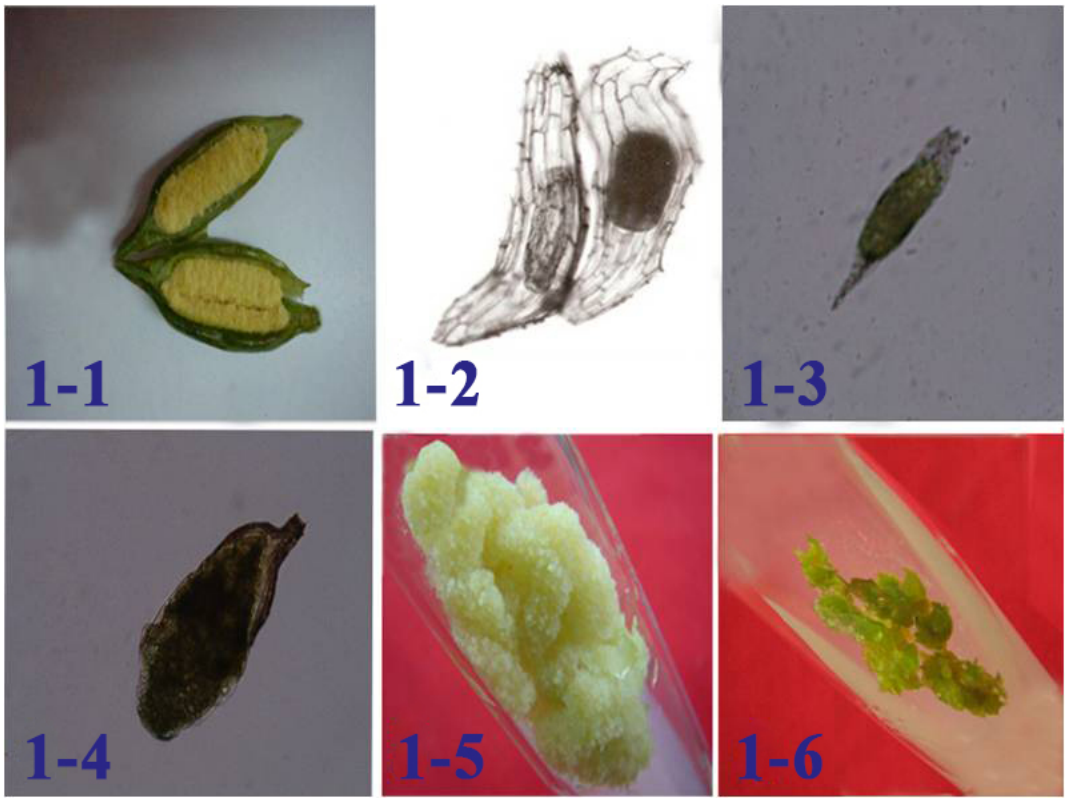
مطابق آنالیز جدول تجزیه واریانس، ایجاد اسفرول در دانه‌های ارکیده به شدت تحت تاثیر مراحل رشدی دانه‌ها و غلظت های مختلف هورمونی قرار می‌گیرد، به گونه‌ای که اثرات ساده هورمون و مراحل مختلف رشدی دانه‌ها و همچنین اثر متقابل این دو نوع تیمارها بر ایجاد اسفرول در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). جدول اثرات متقابل نشان داد که در مرحله رشدی ۱۶ هفته پس از گرده‌افشانی کمترین مدت زمان (۲۹/۵۰) جهت ایجاد اسفرول تحت تاثیر تیمار ($IBA(1mgl^{-1})$ حاصل شد و در تیمار شاهد ایجاد اسفرول با بیشترین تاخیر (۴۹/۲۵ روز) انجام گرفت. هم‌چنین تیمارهای ($IAA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})$ و ($IAA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})$ از نظر آماری در یک سطح قرار گرفتند. در مرحله رشدی ۱۸ هفته پس از گرده‌افشانی بهترین غلظت هورمونی برای ایجاد اسفرول، تیمار ($IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})$ با مقدار عددی ۲۶/۵۰ بود. ایجاد اسفرول در تیمار شاهد با بیشترین تاخیر انجام شد. در مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از گرده‌افشانی، سریعترین زمان تشکیل ایجاد اسفرول تحت تاثیر تیمارهای هورمونی ($IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})$ و ($IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})$ بود که در زمان‌های یکسان و مشابهی (۲۵/۲۱) بدست آمد (جدول ۲). مطابق آنالیز جدول تجزیه واریانس، سنتز کلروفیل در گیاهچه‌های گیاه ارکیده تحت تاثیر مراحل مختلف رشدی و انواع هورمون‌ها و نیز اثرات متقابل هورمون و مراحل رشد قرار گرفت، به‌طوری‌که اثرات این تیمارها بر میزان سنتز کلروفیل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). جدول مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که در مرحله رشدی ۱۶ هفته پس از برداشت کپسول‌ها، سریع‌ترین زمان سنتز کلروفیل (۳۴/۵۰) تحت تیمار ($IBA(1mgl^{-1})$ حاصل شد. در تیمار شاهد سنتز کلروفیل با بیشترین تاخیر ظاهر شد. همچنین در مرحله رشدی ۱۸ هفته پس از گرده‌افشانی، بهترین تیمار جهت سنتز کلروفیل در کمترین زمان ممکن تیمار ($IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})$ بود و تیمار ($IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})$ در رتبه دوم قرار گرفت. در مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از گرده‌افشانی، بهترین غلظت هورمونی جهت حصول سریع سنتز کلروفیل تیمارهای ($IAA+IBA(0.5+0.5mgl^{-1})$ و ($IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1})$ با مقدار عددی مساوی ۳۶/۷۵ بودند. بیشترین تاخیر در سنتز کلروفیل تحت تاثیر تیمار شاهد (۴۸/۷۵) مشاهده گردید.

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که انواع هورمون‌ها و مراحل رشدی بر میزان تشکیل پروتوکورم و تمایزیابی پروتوکورم در دانه‌های ارکیده در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). همچنین اثرات متقابل هورمون‌ها و مراحل رشدی بر این دو صفت در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. این نشان دهنده تاثیرپذیری شدید دانه‌های این گیاه بر غلظت‌های مختلف هورمونی بوده

و نیز زمان برداشت کپسول‌ها بر این دو صفت تاثیر بسیار زیادی می‌گذارد. جدول مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که در مرحله رشدی ۱۶ هفته پس از گرده‌افشانی، سریع‌ترین زمان تشکیل پروتوکورم (۴۷/۰۰ روز) تحت تیمار IAA+Kin(0.25+0.5mgl^{-1}) و IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) حاصل شد. در تیمار شاهد تشکیل پروتوکورم با بیشترین تاخیر مشاهده شد. در مرحله رشدی ۱۸ و ۲۰ هفته پس از گرده‌افشانی، نیز بهترین تیمار جهت تشکیل پروتوکورم در کمترین زمان ممکن، تیمار IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) بود که به ترتیب در روزهای ۳۰/۲۵ و ۲۸/۲۵ مشاهده شد. بررسی اثر متقابل تاثیر مراحل رشدی و غلظت‌های مختلف هورمونی بر صفت تمایزیابی پروتوکورم نشان داد که بهترین تیمار هورمونی برای این صفت در مرحله رشدی ۱۶ هفته، تیمار IAA+Kin(0.25+0.5mgl^{-1}) و IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) می‌باشد که تمایزیابی پروتوکورم در کمترین مدت زمان با ۵۲/۲۵ روز پس از کاشت ظاهر شد. در تیمار هورمونی شاهد بیشترین تعداد روز (۷۶/۰۰) جهت تمایزیابی پروتوکورم مشاهده شد. در مرحله رشدی ۱۸ و ۲۰ هفته پس از گرده‌افشانی، بهترین تیمار هورمونی IBA+Kin(0.5+0.5mgl^{-1}) بود. تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر جوانه‌زنی ارکیده‌ها به ویژه توسعه پروتوکورم مهم می‌باشد (Stewart and Kane 2006a; De Pauw and Remphrey 1993). نقش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف و سایر افزودنی‌های آلی که بیشتر نقش هورمون‌ها را بازی می‌کنند جهت تسهیل در جوانه‌زنی و افزایش رشد و توسعه فرایند تغییرات مورفولوژیکی، بر روی خیلی از گل‌های ارکیده بررسی و مطالعه شده است، و نقش تنظیم‌کننده‌های رشد در تسریع و تسهیل جوانه‌زنی تا باززایی پروتوکورم، در تمام ارقام و گونه‌ها مشهود می‌باشد. در تحقیقی که Edy و Hariyanto (۲۰۱۹) روی ارکیده گونه *Phalaenopsis amboinensis* انجام دادند، اظهار داشتند، استفاده از ترکیب آب نارگیل به‌میزان ۱۵ درصد به‌عنوان منبع سیتوکینین (حاوی Kn) و ۱۰ گرم در لیتر افشرده موز بعنوان منبع اکسین (حاوی IAA) در محیط کشت MS بیشترین تاثیر را در جوانه‌زنی، رشد و نمو دانه‌های ارکیده در شرایط درون‌شیشه‌ای داشت که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

نقش تنظیم‌کننده‌های BAP، NAA و IBA روی سایر گونه‌های گیاهی از جمله انگور رقم بیدانه قرمز در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای انجام و نتایج از لحاظ آماری در مقایسه با تیمار شاهد در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بود (Norouzi et al. 2018). نتایج مشابه زیادی که مبین نقش موثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر جوانه‌زنی دانه‌های ارکیده‌ها باشد، وجود دارد، اما در مورد تاثیر سن جنین گونه‌های مختلف بر میزان جوانه‌زنی، مطالعات اندکی صورت گرفته است، که یکی از دلایل اصلی آن عدم دسترسی و یا به عبارت دیگر محدودیت گیاه مادری جهت گرده‌افشانی دستی گل‌ها و مراقبت‌های بعدی تا رسیدن و برداشت کپسول‌های حاوی دانه می‌باشد. نتایج سه مرحله کشت دانه‌ها نشان داد که درصد جوانه‌زنی و سایر تغییرات مورفولوژیکی با افزایش سن دانه، بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش داشت. نتایج پژوهش مشابهی که Parab and Krishnan (2012) روی جوانه‌زنی دانه‌های دو گونه *Aerides maculosa* (۵ الی ۱۰ هفته بعد از گرده‌افشانی) و *Rhynchostylis retusa* (۱۰ الی ۲۰

هفته بعد از گرده‌افشانی) جهت القاء کالوس و تولید پروتوکورم انجام دادند، نشان داد که استفاده از ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف نظیر BA+NAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر از هر کدام، تاثیر قابل ملاحظه‌ای در بالا بردن نرخ جوانه‌زنی تا مرحله تشکیل پروتوکورم دارند. در تحقیق حاضر نیز کمترین میزان جوانه‌زنی با ۲۸/۶۶ درصد، میانگین بیشترین مدت زمان جهت جوانه‌زنی با ۳۵/۰۰ روز و سایر تغییرات مورفولوژیکی (تشکیل اسفرول، سنتز کلروفیل، تشکیل و تمایزیابی پروتوکورم) در هر ۳ مرحله کشت، در تیمارهای شاهد ثبت گردید، که مبین تاثیر تمام غلظت‌ها و نسبت‌های هورمونی در افزایش درصد جوانه‌زنی، تسریع در جوانه‌زنی و تسهیل روند رشد تا تشکیل و تمایزیابی پروتوکورم می‌باشد. از مقایسه داده‌های جداول، میتوان نتیجه گرفت که با افزایش سن دانه‌ها در این گونه، درصد و سرعت جوانه‌زنی نیز افزایش و با موفقیت همراه بود. این امر بدلیل تکامل و رشد بذور و در نتیجه افزایش آندوسپرم، آب و مواد غذایی درونی آنها در این گونه می‌باشد. (Arditti et al. 1981; (Arditti 1982; yoon et al. 2016; Linden 1992; De Pauw and Remphrey 1993، قابل ذکر است که در مرحله پایانی و نهایی رشد که تا ۳۰ هفته پس از گرده‌افشانی ادامه دارد، میزان بازدارنده‌های رشد مانند ABA افزایش و میزان هورمون‌های محرک جوانه‌زنی کاهش می‌یابند (Yamazaki and Miyoshi, 2006). در این تحقیق مشخص شد علاوه بر سن دانه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نیز جوانه‌زنی دانه را تسهیل می‌کنند، که این نتایج با نتایج پژوهشی که توسط Kumar and Rahman (۲۰۱۷) روی دانه‌های *Cymbidium aloifolium* با هدف تاثیر ۴ نوع محیط کشت MS, KC, PM, VW و ترکیب ۲ نوع تنظیم‌کننده رشد NAA+BAP هر کدام به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بر میزان جوانه‌زنی و تشکیل پروتوکورم انجام شد، مطابقت دارد. در آزمایشی که Bhattacharjee and Islam (2015) روی ارکیده *Rhynchostylis retusa* انجام دادند، اظهار داشتند، افزودن IAA، IBA، NAA، Kn و BAP با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش درصد جوانه‌زنی و سایر تغییرات مورفولوژیکی تا مرحله تولید دانهال شد، اما بیشترین میزان پروتوکورم در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP+IAA و BAP+IBA ثبت شد که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. نتایج نشان داد که با افزایش سن دانه‌ها تا ۲۰ هفته بعد از گرده‌افشانی، نرخ جوانه‌زنی و سایر صفات بهبود یافت، بنابراین توصیه می‌شود این روند تا پایان ۳۰ هفته بعد از گرده‌افشانی که مرحله نهایی رشد دانه‌ها می‌باشد، ادامه یابد تا بهترین زمان کشت اقتصادی دانه‌ها مشخص گردد. در تمام تیمارها در هر ۳ مرحله کشت، سنتز کلروفیل قبل از تمایزیابی پروتوکورم صورت گرفت.



شکل ۱. ۱-۱- کپسول حاوی جنین‌های نارس در مرحله ۲۰ هفته بعد از گرده‌افشانی، ۱-۲- رویان دارای ذخیره مواد غذایی (20x)، ۱-۳- متورم شدن رویان پس از یک هفته (20x)، ۱-٤- اسفرول پس از دو هفته (10x)، ۱-٥- تشکیل کالوس و سنتز کلروفیل، ۱-٦- توسعه و تمایزیابی پروتوکورم.

Figure 1. 1-1- Immature Capsule containing immature embryos (20 weeks after pollination), 1-2- Immature Embryo containing endosperm (20x), 1-3- Swelling of embryo after a week (20x), 1-4- Spherule (10x), 1-5- Callus formation and chlorophyll synthesis, 1-6- Development and differentiation of protocorm.

References

Agoo EMG, Cootes J, Colamco A et al. (2009) *Aerides multiflora,* in IUCN red list of threatened species. Version 1.

Arditti J (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot Rev 33, 1-97.

Arditti J (1982) Orchid seed germination and seedling culture: A manual. In: Arditti J (Ed) Orchid Biology: Reviews and Perspectives (Vol II), Cornell University Press, Ithaca, NY, pp 245-370.

Arditti J (1979) Aspects of the physiology of orchids. Adv Bot Int J Res 7, 422-638.

Arditti J, Michaud JD, Oliva AP (1981) Seed germination of North American orchids. I. native California and related species of Calypso, Epipactis, Goodyera, Piperia, and Platanthera. Botanical Int. Commun. Gaz 142, 442-453.

Arditti J, Ghani AKA (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytol 145, 367-421.

Bhattacharjee B, Shahinul Islam, SM (2015) The effect of PGRs on in vitro development of protocorms, regeneration and mass multiplication derived from immature seeds of *Rhynchostylis retusa* (l.) blume. G J B B 4, 121-127.

Bijaya P (2013) Medicinal orchids and their uses: Tissue culture potential alternative for conservation. Afr J Plant Sci 7, 448-467.

Cribb P, Govaerts R (2005) Just how many orchids are there? *In: Proc. 18th World Orchid Conference* (eds. A. Raynal-Roques, A. Roguenant, and D. Prat), Dijon, France. pp. 161-172.

De Pauw MA, Remphrey WR, Palmer CE (1995) The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. Ann Bot 75, 267-275.

De Pauw MA, Remphrey WR (1993) *In vitro* germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media, and cold treatment. Can J Bot 71, 879-885.

Edy SWU, and Sucipto H (2019) *In Vitro* Seed Germination and Seedling Development of a Rare Indonesian Native Orchid *Phalaenopsis* amboinensis. Hindawi Scientifica, 1-6.

Harvais G (1972) The development and growth requirements of *Dactylorhiza purpurella* in asymbiotic cultures. Can J Bot 50, 451-460.

Knudson L (1921) La germination no simuotica de las semillas de orquideas. Real Soc Esp Hist Nat 21, 250-260.

Knudson L (1922) Non–symbiotic germination of orchid seeds. Bot. gaz J 73: 1-25.

Kumar TB, Mahabubur Rahman MD (2017) Effect of different basal media and PGRs on *in vitro* seed germination and seedling development of medicinally important orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. IRJPP 6, 167-172.

Linden B (1992) Two new methods for pretreatment of seeds of Northern orchids to improve germination in axenic culture. Ann Bot Fenn 29, 305-313.

Manning JC, Van SJ (1987) The development and mobilization of seed reserves in some African orchids. Aust J Bot 35, 343-353.

Mihaljevic I, Dugalic K, Tomas V et al. (2013) *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of 'Oblacinska' sour cherry. J Agric Sci 58, 117-126.

Mitra GC, Prasad RN, 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 J Exp Biol 14, 350–351.

Norouzi E, Naseri L, Najafzadeh R (2018) Effects of various concentrations of hormonal treatments on *In vitro* culture of red seedless grape. Agric Biotechnol J 10, 119-138 (In Persian).

Parab GV, Krishnan S (2012) Rapid *in vitro* mass multiplication of orchids *Aerides maculosa* Lindl. And *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. from immature seeds. Indian J Biotechnol 11, 288-294.

Parthibhan S, Benjamin JHF, Muthukumar M et al. (2012) Influence of nutritional media and photoperiods on *in vitro* asymbiotic seed germination and seedling development of *Dendrobium aqueum* Lindley. Afr J Plant Sci 6, 383-393.

Philip JK, Daniela D, Timothy RJ et al. (2008) Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Volume V Global Science Books, UK.

Prutsch J, Schardt A, Schill R (2000) Adaptations of an orchid seed to water uptake and storage. Plant Syst Evol 220, 69-75.

Stewart SL, Kane ME (2006a) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. PCTOC 86, 147-158.

Yamazaki J, Miyoshi K (2006) *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorms by *Cephalanthera falcata* (Orchidacaea). Ann Bot 98, 1197-1206.

Yoon SH, Joung KL, Sang YN et al. (2016) Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives. J Plant Biotechnol 43, 138-145.