Plant Prod., 2023, 46(1), 129-140
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2023.42629.2068
Received: 29 December 2022
Accepted: 18 March 2023

Plant Productions
Research Article

Comparison of germination and primary growth of *Ophrys schulzei* Bornm. & Fleischm seedling in different culture media under in vitro condition

Frouzan Valadi[1], Jalal Khorshidi[2]*, Ali Akbar Mozafari[3], Yavar Vafaee[4]

1. M.Sc. Student, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, and Member of Research Center of Medicinal Plants Breeding and Development, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
3. Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, and Member of Research Center of Medicinal Plants Breeding and Development, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
4. Associate Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, and Member of Research Center of Medicinal Plants Breeding and Development, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Citation: Valadi, F., Khorshidi, J., Mozafari, A.A., & Vafaee, Y. (2023). Comparison of germination and primary growth of *Ophrys schulzei* Bornm. & Fleischm seedling in different culture media under in vitro condition. *Plant Productions,* 46(1), 129-139.

Abstract

Introduction

Ophrys schulzei Bornm. & Fleischm is an orchid species which its underground organ is harvested and has numerous applications in the food and pharmaceutical industries. The population of this orchid species in the natural habitat has been greatly reduced and is at risk of extinction due to the low germination percentage, required specific ecological conditions and also overharvesting. Therefore, it is necessary to evaluate different propagation methods in order to approach *ex situ* conservation, domestication and cultivation of this plant species. Vegetative propagation of orchids is difficult, time-consuming and expensive, and also a small number of propagules can be obtained from each mother plant. Sexual propagation in *ex vitro* condition is also difficult due to low endosperm of orchid seeds, undifferentiated embryo and need to symbiosis with mycorrhizal fungi. Therefore, it seems that *in vitro* seed germination is the most suitable method for producing orchid seedlings. The most important and crucial step in seedlings mass production is selecting appropriate growth media for *in vitro* cultivation. Therefore, in this research, the effect of different culture media on the germination and seedling growth of *Ophrys schulzei* was studied.

Materials and Methods

* **Corresponding Author:** Jalal Khorshidi
E-mail: j.khorshidi@uok.ac.ir

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In this research, germination, protocorm formation and growth indices of *Ophrys schulzei* seedlings were evaluated in 5 different culture media including Malmgren, Orchimax, P723, $\frac{1}{4}$MS and $\frac{1}{4}$B5. At first, the seeds were sown in the mentioned culture media and transferred to the growth chamber with 25°C and dark conditions. After germination, they were placed in a refrigerator at 4°C for two weeks. At the end of two weeks, the culture containers were placed in the growth chamber with 25°C and light conditions 16/8 h (light/dark). After 12 months from seed sowing, the mentioned factors were evaluated. This research was conducted as a completely randomized design with 5 replications at Research Center of Medicinal Plants Breeding and Development of University of Kurdistan, in 2019-2022.

Results and Discussion

The highest (25.26%) and lowest (0%) germination percentage were observed in Malmgren and Orchimax culture media, respectively. Protocorms were appeared earlier in the Malmgren medium than other media (19.33 days after seed sowing). Protocorms on $\frac{1}{4}$MS medium were stayed in initial form, and no significant development was observed. Protomeristems were appeared earlier in Malmgren medium compared to P723 and $\frac{1}{4}$B5 (105.66 days after seed sowing). There was no significant difference between P723 and $\frac{1}{4}$B5 in terms of protomeristem appearance time (1/4 B5 148.33 and P723 159 days after seed sowing). Seedlings were formed only in P723, Malmgren and $\frac{1}{4}$B5 culture media. The highest protocorm weight (0.12 g) was belonged to the Malmgren culture medium, and the highest root length (21.44 mm), root weight (0.19 g), aerial weight (0.05 g), seedling length (45.98 mm) and seedling weight (0.37 g) were belonged to the seedlings grown in P723 medium. In terms of the number of roots and shoot length, no significant differences were observed between the three culture media.

Conclusion

In general, among the studied culture media, Malmgren and P723 were determined the most suitable culture media for production of *Ophrys schulzei* seedlings.

Keywords: Domestication, Malmgren, Orchid, Orchimax, Protocorm

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۲، ۴۶(۱)، ۱۲۹-۱۴۰
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2023.42629.2068
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۷

تولیدات گیاهی

مقاله پژوهشی

مقایسه جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه *Ophrys schulzei* Bornm. & Fleischm در محیط کشت‌های مختلف درون شیشه‌ای

فروزان ولدی[۱]، جلال خورشیدی[۲]*، علی اکبر مظفری[۳]، یاور وفایی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، و عضو مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۳. استاد، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، و عضو مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۴. دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، و عضو مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

چکیده

***Ophrys schulzei*، گونه‌ای ارکید است که بخش زیرزمینی آن کاربردهای زیادی در صنایع غذایی و دارویی دارد. درصد جوانه‌زنی پایین، شرایط اکولوژیکی خاص مورد نیاز و برداشت‌های بی‌رویه و غیر اصولی از این گیاه موجب شده که جمعیت آن در عرصه طبیعی به شدت کاهش یافته و در معرض خطر انقراض قرار گیرد. بنابراین ارزیابی روش‌های مختلف تکثیر این گیاه به‌منظور حفاظت برون‌جای و نیز تکثیر و اهلی‌سازی آن، از ضروریات است. در این پژوهش، جوانه‌زنی، تشکیل پروتوکورم و شاخص‌های رشدی گیاهچه *Ophrys schulzei* در ۵ نوع محیط کشت درون شیشه ای شامل Malmgren، Orchimax، P723، MS$\frac{1}{4}$ و B5$\frac{1}{4}$ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار طی سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰ در مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی دانشگاه کردستان مورد ارزیابی قرار گرفت. بیش‌ترین (۲۵/۲۶ درصد) و کم‌ترین (۰ درصد) درصد جوانه‌زنی به‌ترتیب در محیط کشت‌های Malmgren و Orchimax مشاهده شد. پروتوکورم‌ها در محیط کشت Malmgren زودتر از سایر محیط کشت‌ها (۱۹/۳۳ روز پس از کشت بذر) بوجود آمدند. در محیط کشت MS$\frac{1}{4}$، پروتوکورم‌ها پس از بوجود آمدن در همان حالت باقی ماندند و هیچ گونه تغییر قابل توجهی در آن‌ها مشاهده نشد. مریستم‌های اولیه در محیط کشت Malmgren، زودتر از دو محیط کشت B5$\frac{1}{4}$ و P723 (۱۰۵/۶۶ روز پس از کشت بذر) ظاهر شدند. فقط در سه محیط کشت P723، Malmgren و B5$\frac{1}{4}$، گیاهچه تشکیل شد. بیش‌ترین وزن پروتوکورم (۰/۱۲ گرم) متعلق به محیط کشت Malmgren، و بیش‌ترین طول ریشه (۲۱/۴۴ میلی‌متر)، وزن ریشه (۰/۱۹ گرم)، وزن اندام هوایی (۰/۰۵ گرم)، طول گیاهچه (۴۵/۹۸ میلی‌متر) و وزن گیاهچه (۰/۳۷ گرم)، متعلق به گیاهچه‌های محیط کشت P723 بود. از نظر تعداد ریشه و طول اندام هوایی گیاهچه، بین سه محیط کشت مذکور تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. به‌طور کلی، از بین محیط کشت‌های مورد مطالعه، Malmgren و P723 محیط کشت‌های مناسب‌تری جهت تولید گیاهچه *Ophrys schulzei* شناخته شدند.

کلیدواژه‌ها: ارکید، اهلی‌سازی، پروتوکورم، Malmgren، Orchimax

* **نویسنده مسئول:** جلال خورشیدی
رایانامه: j.khorshidi@uok.ac.ir

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقدمه

تیره ارکید با دارا بودن حدود ۲۸۰۰۰ گونه گیاهی، یکی از بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهی است (Christenhusz and Byng, 2016). اغلب گونه‌های ارکید به دلایل مختلف از جمله تغییر کاربری یا تخریب زیستگاه طبیعی‌شان، برداشت بیش از حد و تجارت غیر مجاز، جزو گونه‌های در معرض خطر تهدید یا انقراض قرار گرفته‌اند (Diantina et al., 2020). اندام‌های زیرزمینی ارکیدها (غده‌ها و ریشه‌های غده‌ای) دارای کاربردهای مختلفی در صنایع غذایی و دارویی بوده و تأمین بخش اعظم نیاز بازار به آن‌ها، به‌صورت برداشت از عرصه‌های طبیعی صورت می‌گیرد. قیمت هر کیلو پودر غده ارکید در سال ۲۰۱۹، حدود ۸۰۰ دلار گزارش شده است (Youssef et al., 2019) و به همین دلیل، افراد سودجو با برداشت‌های بی‌رویه و غیر اصولی، مقدمات نابودی و انقراض این گیاهان را فراهم آورده‌اند (Gholami et al., 2021). حفاظت درون‌جای ارکیدهای رویش‌یافته در عرصه طبیعی، اولاً امری هزینه‌بر بوده و عملاً امکانپذیر نمی‌باشد، ثانیاً جمعیت کم ارکیدهای رویشگاه طبیعی پاسخگوی نیاز شدید بازار به این گیاهان نیست (Seaton et al., 2010). بنابراین بایستی به دنبال حفاظت برون‌جای، تکثیر انبوه و نیز اهلی‌سازی ارکیدها باشیم تا از طرفی از فشار بر عرصه طبیعی کاسته شده و از انقراض این گونه‌های گیاهی ممانعت گردد و از طرفی دیگر نیاز بازار نیز تأمین شود. یکی از اساسی‌ترین موانع رسیدن به اهداف مذکور، مشکل تکثیر ارکید است. تکثیر رویشی ارکیدها فرایندی مشکل، زمانبر و هزینه‌بر بوده و تعداد کمی افزونه می‌توان از هر گیاه مادری به دست آورد (Puchooa, 2004). تکثیر جنسی ارکیدها در شرایط برون شیشه‌ای به دلیل اندوخته غذایی کم بذور، جنین تمایز نیافته و نیاز به همزیستی با قارچ‌های میکوریزا جهت جوانه‌زنی، مشکل می‌باشد (Dulić et al., 2018). حدود ۲ تا ۵ درصد بذور تولید شده توسط گیاه مادری قادر به جوانه‌زنی در عرصه طبیعی خواهند بود و از بذور جوانه‌زده نیز تعداد کمی قادر به تولید گیاهچه و نهایتاً گیاه بالغ خواهند شد (Rao, 1977; Vij, 2002). از این رو، به نظر می‌رسد که راهکار مطلوب جهت تکثیر انبوه ارکیدها، جوانه‌زنی غیر همزیست بذور آن‌ها در شرایط درون شیشه‌ای است. جوانه‌زنی بذور ارکید در بستر کشتی که حاوی مواد معدنی و کربوهیدرات‌ها باشد، حتی در غیاب قارچ‌های مایکوریزا، امکان‌پذیر است (Knudson, 1922). جوانه‌زنی درون شیشه‌ای به عوامل مختلفی از جمله دما، نور، مواد معدنی، کربوهیدرات، ویتامین‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد وابسته است (Dulić et al., 2018). از آنجائیکه محیط کشت‌های مختلف درون شیشه‌ای به لحاظ نوع و میزان ترکیبات بکار رفته در آن‌ها، با هم متفاوت هستند، لذا تأثیر متفاوتی روی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه خواهند داشت و میزان این تأثیرپذیری بسته به گونه گیاهی متفاوت خواهد بود (Tantasawat et al., 2015).

شناسایی و بهینه‌سازی مناسب‌ترین محیط کشت درون شیشه‌ای جهت تکثیر انبوه یک گونه گیاهی خاص، یکی از پیش‌نیازهای مهم در میزان موفقیت تکثیر است (Eshaghi Sanayi et al., 2020; Mohamadzadeh Moghadam and Hamidi, 2017). در این پژوهش جوانه‌زنی غیر همزیست گونه‌ای از ارکید با نام علمی *Ophrys schulzei* مورد مطالعه قرار گرفت. این گونه ارکید، در جنگل‌های بلوط غرب ایران پراکنش دارد (Shahsavari, 1997). افراد بومی، غده‌های زیرزمینی گیاه مذکور را برداشت و در بازارهای محلی به فروش می‌رسانند، که در نهایت بخش عمده آن به بازارهای جهانی بویژه ترکیه صادر می‌گردد. مشاهدات طبیعی بیانگر کاهش شدید جمعیت گونه مذکور در رویشگاه طبیعی آن است و چنانچه اقدامی اصولی و عملی برای حفاظت و یا تکثیر آن صورت نگیرد، در آینده‌ای نه چندان دور شاهد از بین رفتن کامل آن از رویشگاه‌های طبیعی خواهیم بود.

در ارتباط با تکثیر درون شیشه‌ای گونه‌های مختلف *Ophrys*، مطالعاتی صورت گرفته است که نتایج آن‌ها بیانگر تأثیر چشمگیر نوع و میزان ترکیبات محیط کشت بر جوانه‌زنی و رشد بعدی گیاهچه‌های بوجود آمده است (Barroso et al., 1990; Kitsaki et al., 2004; Dulić et al., 2018; Arcidiacono et al., 2021). در پژوهش حاضر، میزان جوانه‌زنی و شاخص‌های رشدی گیاهچه *Ophrys schulzei* در محیط کشت‌های مختلف درون شیشه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت تا مناسب‌ترین محیط کشت از بین محیط کشت‌های استفاده شده جهت تولید گیاهچه گونه مذکور شناسایی و معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه بذور

برای انجام این پژوهش، در ابتدا به کمک اطلاعات افراد بومی رویشگاه *Ophrys schulzei* واقع در شهرستان پاوه (استان کرمانشاه) شناسایی گردید (شکل ۱).

Figure 1. *Ophrys schulzei* in natural habitat

سپس حدود ۱۰ بوته از گیاه مذکور در بهار ۱۳۹۸ به کلکسیون ارکید مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی دانشگاه کردستان منتقل گردید تا سیکل زندگی آن‌ها در کلکسیون تکمیل گردد. در زمان رسیدن میوه‌های کپسول آن-ها، میوه‌ها برداشت و در دمای اتاق خشک شدند. در ادامه، بذور از میوه‌ها جدا و داخل فالکون ریخته شد و تا زمان کشت درون شیشه‌ای، در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید.

کشت بذور در محیط کشت‌های درون شیشه‌ای

ابتدا بذور توسط هیپوکلریت سدیم (با غلظت ۰/۵ درصد) به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند. محیط کشت‌های مورد مطالعه شامل Malmgren، Orchimax، P723، $\frac{1}{4}$MS و $\frac{1}{4}$B5 بودند که پس از آماده‌سازی و اتوکلاو (۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس)، در ظروف کشت توزیع و سپس بذور توسط اسپریدر روی محیط کشت‌های مذکور کشت شدند. پس از کشت، درب ظروف کشت را بسته و دور تا دور آن سلفون پیچیده شد. لازم به ذکر است که به ازای هر محیط کشت، ۵ عدد ظرف در نظر گرفته شد و در هر ظرف، ۵۰ عدد بذر کشت گردید.

انتقال کشت‌ها به اتاقک رشد و یخچال

پس از کشت، ظروف حاوی بذور کشت شده، به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی منتقل شدند تا جوانه‌زنی در آن شرایط انجام گیرد. پس از جوانه‌زنی، ظروف حاوی بذور جوانه‌زده به مدت دو هفته در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند (شرایط یخچال مشابه شرایط زمستان در طبیعت می‌باشد که به ادامه رشد بذور جوانه‌زده کمک می‌کند). در پایان دو هفته سرمادهی در یخچال، ظروف در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. حدود ۱۲ ماه پس از کشت، فاکتورهایی مانند درصد جوانه‌زنی، زمان تشکیل پروتوکورم، زمان ظهور مریستم ابتدایی، طول، عرض و وزن پروتوکورم، تعداد، طول و وزن ریشه، طول و وزن اندام هوایی و همچنین طول و وزن گیاهچه‌ها ارزیابی گردید. اندازه-گیری طول و عرض توسط کولیس دیجیتال و وزن توسط ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۱ گرم انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

طرح آزمایشی بصورت کاملاً تصادفی در ۵ تیمار و ۵ تکرار اجرا گردید. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۵) آنالیز شدند و مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

میزان جوانه‌زنی بذور در محیط کشت‌های مورد مطالعه تفاوت چشمگیری با هم داشت. طوریکه در محیط کشت Orchimax هیچ‌گونه جوانه‌زنی مشاهده نشد و این محیط از ادامه ارزیابی‌ها حذف گردید. بیش‌ترین میانگین درصد جوانه-زنی (۲۵/۲۶ درصد) در محیط کشت Malmgren مشاهده شد و به دنبال آن به‌ترتیب محیط کشت‌های P723 (۹/۱۴ درصد)، $\frac{1}{4}$B5 (۵/۳۴ درصد) و $\frac{1}{4}$MS (۲/۲۱ درصد) قرار داشتند (شکل B-۲ و شکل ۳). در مطالعه انجام شده توسط Kitsaki et al., (2004) روی ۱۳ گونه *Ophrys* کشت شده در محیط کشت Malmgren، درصد جوانه‌زنی بین ۰/۵ تا ۵۲ درصد (به‌ترتیب مربوط به گونه‌های *O. lutea* و *O. spruneri*) گزارش گردیده است.

Arcidiacono et al., (2021) میزان جوانه‌زنی بذور *Ophrys panormitana* را در دو محیط کشت Orchimax و MS مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که بذور گونه مذکور تنها روی محیط Orchimax قادر به جوانه‌زنی بود، که البته درصد جوانه‌زنی آن پایین (۱۱/۸ درصد) بود. ارزیابی جوانه‌زنی بذور *Ophrys sphegodes* روی دو محیط کشت Knudson C و Malmgren نشان داد که جوانه‌زنی تنها روی محیط کشت Malmgren اتفاق افتاد (Dulić et al., 2018). به‌طور کلی بذور ارکید به دلیل آندوسپرم کمی که دارند، از درصد جوانه‌زنی پایینی برخوردار هستند. علاوه بر این، گونه ارکید، شرایط رویشی گیاه مادری، میزان رسیدگی بذور و نیز شرایط محیط کشت بر روی درصد جوانه‌زنی بذور ارکید تأثیرگذار هستند (Lee et al., 2005; Dutra et al., 2008; Arcidiacono et al., 2021).

انتخاب نوع محیط کشت تأثیر بسیار چشمگیری روی جوانه‌زنی بذور ارکید دارد. تفاوت در ترکیب مواد آلی و غیرآلی محیط کشت، به‌طور معنی‌داری جوانه‌زنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Vogel et al., 2011). درصد جوانه‌زنی بیش‌تر *O. schulzei* در محیط کشت Malmgren در مقایسه با سایر محیط کشت‌ها را می‌توان به فرم نیتروژن ربط داد، چراکه در محیط کشت نامبرده، نیتروژن به فرم آلی (گلیسین و کازئین هیدرولیزات) و در سایر محیط کشت‌ها به فرم معدنی (نیترات پتاسیم و نیترات آمونیوم) وجود دارد (Dulić et al., 2018). در گزارشات متعددی آمده است که نیتروژن به فرم معدنی بعنوان یک عامل بازدارنده جوانه‌زنی بذر ارکید عمل می‌کند و از این رو درصد جوانه‌زنی در محیط کشت‌هایی که نسبت نیتروژن آلی به معدنی بالاتر است، بیش‌تر خواهد بود (Ponert et al., 2013; Sgarbi et al., 2009; Magrini et al., 2019). همچنین غلظت پایین نمک درشت مغذی‌ها در محیط کشت Malmgren می‌تواند یکی دیگر از دلایل درصد جوانه‌زنی بالا در این محیط کشت نسبت به سایر محیط کشت‌های مورد مطالعه باشد. ثابت شده است که ارکیدهای خاکزی از جمله گونه مورد مطالعه، برای جوانه‌زنی نیاز به محیط کشتی با غلظت پایین نمک دارند (Rasmussen, 1995).

پروتوکورم‌ها در محیط کشت Malmgren زودتر از سایر محیط کشت‌ها به وجود آمدند (۱۹/۳۳ روز پس از کشت)، که البته از این نظر با محیط کشت P723 (۲۸/۳۳ روز پس از کشت) تفاوت معنی‌داری نداشت. در محیط کشت $\frac{1}{4}$MS، پروتوکورم‌ها دیرتر از سایر محیط کشت‌ها ظاهر شدند (۸۱/۶۶ روز پس از کشت) (شکل ۲-C و شکل ۳). زمان تشکیل پروتوکورم بسته به گونه ارکید و ترکیبات محیط متفاوت است. در مطالعه Barroso et al., (1990)، پروتوکورم‌های دو گونه *Ophrys lutea* و *Ophrys fusca* در محیط کشت Curtis تغییریافته، حدود ۶۰ روز پس از کشت بذر تشکیل شدند. در گونه *Ophrys panormitana* کشت شده در محیط Orchimax، ۸۰ روز پس از کشت بذور، پروتوکورم‌ها ظاهر شدند (Arcidiacono et al., 2021).

در محیط کشت $\frac{1}{4}$MS، پروتوکورم‌ها پس از بوجود آمدن در همان حالت باقی ماندند و هیچ گونه رشد چشمگیری در آن‌ها مشاهده نشد و از این رو، این محیط کشت نیز از ادامه ارزیابی‌ها حذف گردید. اما در محیط کشت‌های Malmgren، P723 و $\frac{1}{4}$B5، پس از مدتی مریستم‌های اولیه از پروتوکورم‌ها بوجود آمدند (شکل ۲-D و شکل ۳).

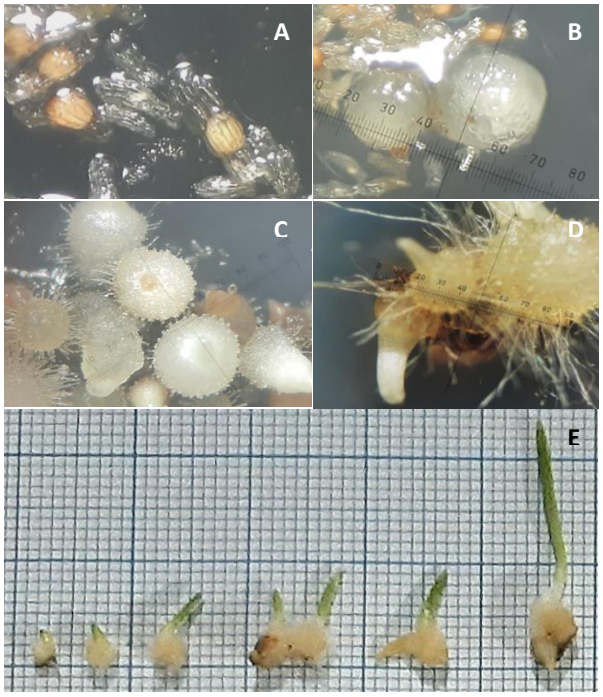

Figure 2. In vitro seed germination of *Ophrys schulzei*: (A) swelling of embryo; (B) germination; (C) protocorm formation; (D) emergence of protomeristem; (E) emergence of first leaf until 12 months after seed sowing.

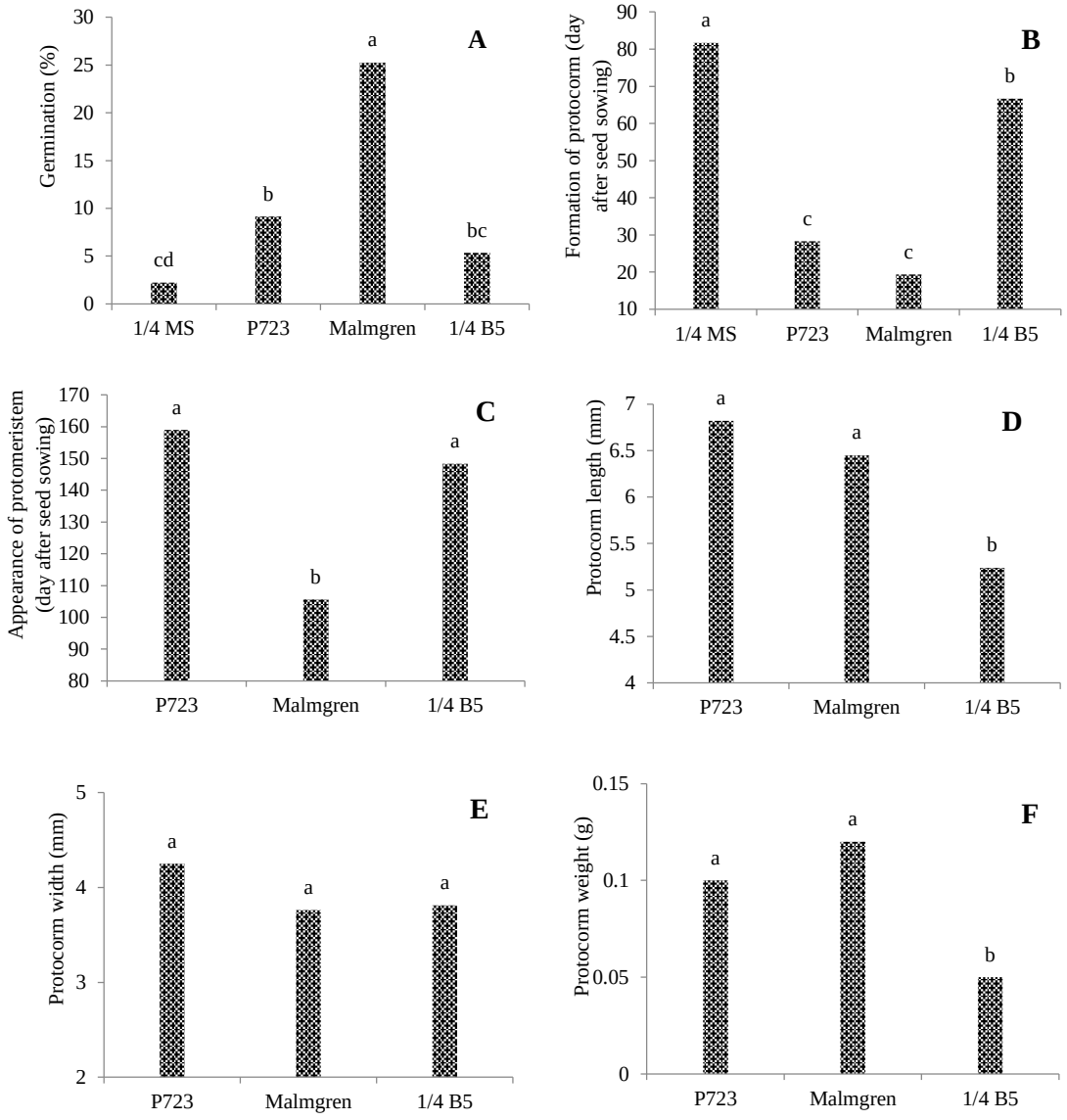

Figure 3. Mean comparison of germination percentage (A), time needed for formation of protocorm (B), time needed for appearance of protomeristem (C), protocorm length (D), protocorm width (E), and protocorm weight (F) of *Ophrys schulzei* in different culture media. Means with at least one same letter are not significantly different at P ≤ 0.05 (Duncan's test).

در محیط کشت Malmgren، زودتر از دو محیط دیگر مریستم‌های اولیه تشکیل شدند (۱۰۵/۶۶ روز پس از کشت) و در دو محیط دیگر زمان ظاهر شدن مریستم‌های اولیه، تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ($\frac{1}{4}$B5 ۱۴۸/۳۳ و P723 ۱۵۹ روز پس از کشت). به‌نظر می‌رسد که توقف رشد پروتوکورم‌ها در محیط کشت $\frac{1}{4}$MS ناشی از غلظت بالای نیتروژن به فرم نیترات در این محیط باشد، چراکه گزارش شده که پروتوکورم‌ها توانایی استفاده از نیتروژن به فرم نیترات را ندارند (Raghavan et al., 1964). زنده‌مانی پروتوکورم‌ها و تمایز پیدا کردن مریستم‌های اولیه از آن‌ها، ارتباط تنگاتنگی با ترکیبات موجود در محیط کشت دارد.

در گونه‌های *lutea*، *fusca* و *speculum* متعلق به جنس *Ophrys*، پروتوکورم‌های بوجود آمده در محیط کشت Orchimax1، ۱۲ ماه بدون تغییر باقی ماندند؛ در محیط کشت‌های Orchimax3 و Orchimax5، پس از ۱۴ روز قهوه‌ای شده و از بین رفتند که دلیل آن را غلظت بالای 2,4-D عنوان

کردند و تنها در محیط کشت‌های Orchimax2 و Orchimax4، پروتوکورم‌ها زنده مانده و به رشد خود ادامه دادند (Barroso et al., 1990). حضور پودر آناناس در محیط کشت Malmgren شاید یکی از دلایل تشکیل زود هنگام پروتوکورم‌ها و نیز ظهور زود هنگام مریستم‌های اولیه در این محیط کشت در مقایسه با سایر محیط کشت‌ها باشد. پودر آناناس یک منبع پر انرژی و سرشار از ترکیبات قندی و ویتامین‌های مختلف است که می‌تواند تأثیر بسزایی در جوانه‌زنی و رشد بعدی بذور گونه‌های مختلف ارکید داشته باشد (Salazar Mercado et al., 2013; Salazar Mercado and Vega-Contreras, 2017).

پروتوکورم‌های بوجود آمده در محیط کشت‌های P723 و Malmgren میانگین طول (به‌ترتیب ۶/۸۲ و ۶/۴۵ میلی‌متر) بیش‌تری نسبت به پروتوکورم‌های محیط کشت $\frac{1}{4}$B5 (۵/۲۴ میلی‌متر) داشتند، اما به لحاظ عرض پروتوکورم، تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت‌ها مشاهده نشد. پروتوکورم‌های بوجود آمده در محیط کشت Malmgren، بیش‌ترین وزن را داشتند (۰/۱۲ گرم)، هر چند که از این نظر تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت مذکور با محیط کشت P723 مشاهده نشد (شکل ۳). از لحاظ تعداد ریشه بوجود آمده روی پروتوکورم، بین محیط کشت‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید، ولی از نظر طول و وزن ریشه بوجود آمده، بین محیط‌ها تفاوت معنی‌دار بود، طوریکه ریشه‌های بوجود آمده در محیط کشت‌های P723 و Malmgren میانگین طول (به‌ترتیب ۲۱/۴۴ و ۱۴/۱۳ میلی‌متر) بیش‌تری نسبت به ریشه‌های بوجود آمده در محیط کشت $\frac{1}{4}$B5 (۹/۰۷ میلی‌متر) داشتند و میانگین وزن ریشه‌های بوجود آمده در محیط کشت P723 (۰/۱۹ گرم)، به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از دو محیط دیگر بود (شکل ۴). گیاهچه‌های تشکیل شده در محیط کشت P723، بیش‌ترین میانگین وزن اندام هوایی را داشتند (۰/۰۵گرم)، هر چند که از این نظر تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت مذکور با محیط کشت Malmgren وجود نداشت. طول اندام هوایی گیاهچه‌های بوجود آمده در سه محیط کشت، تفاوت چشمگیری با هم نداشتند. بیش‌ترین میانگین طول گیاهچه (۴۵/۹۸ میلی‌متر) و وزن گیاهچه (۰/۳۷ گرم) متعلق به گیاهچه‌های محیط کشت P723 بود، اگرچه از این نظر تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت مذکور با محیط کشت Malmgren وجود نداشت (شکل ۴).

وضعیت رشدی بهتر پروتوکورم‌ها، اندام هوایی، ریشه و در مجموع گیاهچه‌ها در محیط کشت Malmgren را به وجود پودر آناناس و کازئین هیدرولیزات، و در محیط P723 را به وجود پپتون می‌توان ربط داد. پودر آناناس سرشار از قندهای ساکارز، فروکتوز و گلوکز بوده و لذا انرژی لازم برای تقسیم سلولی و رشد پروتوکورم‌ها و گیاهچه را فراهم می‌کند (Malmgren, 1996). نقش مثبت پودر آناناس در رشد گیاهچه‌های *Phalaenopsis* نیز گزارش شده است (Salazar Mercado et al., 2013). کازئین هیدرولیزات مخلوطی از اسید آمینه‌های مختلف، ویتامین‌ها، کلسیم، فسفات و چندین ریز مغذی است که موجب افزایش تقسیم سلولی و نهایتاً رشد بیش‌تر می‌گردد (Rezaii Gangeh et al., 2019). پپتون مخلوطی از پپتیدها، اسیدهای آمینه، نمک‌های غیرآلی، لیپیدها، ویتامین‌ها و قندهاست که موجب افزایش رشد سلول می‌گردد (Davami et al., 2015). در مطالعات پیشین نیز نقش مثبت پپتون بر رشد و توسعه پروتوکورم و گیاهچه‌های گونه‌های مختلف ارکید گزارش شده است (Kauth et al., 2006; Dutra et al., 2009; Dianati et al., 2014).

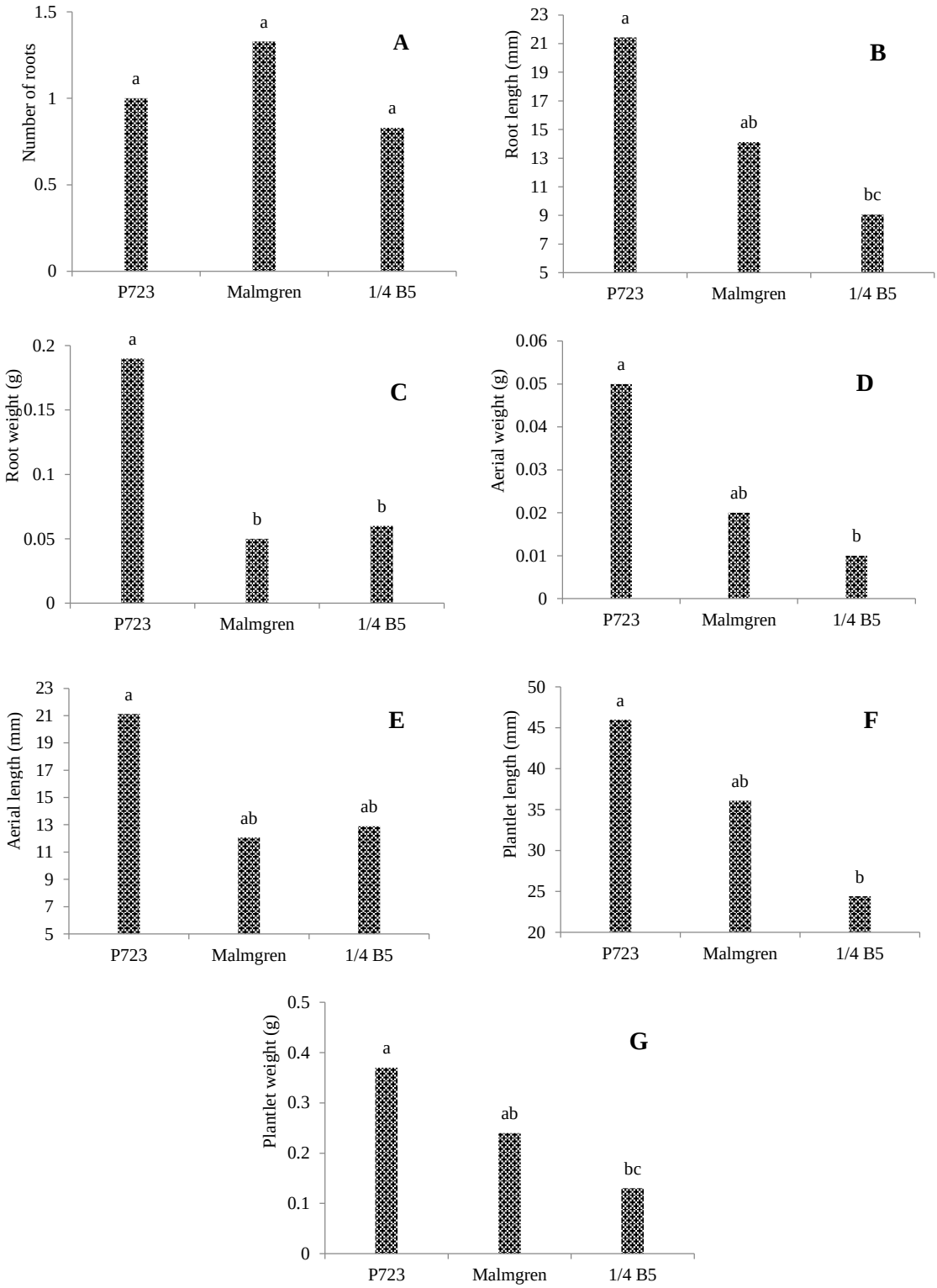

Figure 4. Mean comparison of number of roots (A), root length (B), root weight (C), aerial weight (D), aerial length (E), plantlet length (F), and plantlet weight (G) of *Ophrys schulzei* in different culture media. Means with at least one same letter are not significantly different at P ≤ 0.05 (Duncan's test).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که محیط کشت‌هایی با منابع نیتروژنی آلی بیش‌تر نسبت به منابع نیتروژن معدنی، محیط کشت‌های مناسب‌تری جهت تولید انبوه گیاهچه *Ophrys schulzei* هستند. بر همین اساس محیط کشت‌های Malmgren و P723 نسبت به محیط کشت‌های Orchimax، $\frac{1}{4}$MS و $\frac{1}{4}$B5 برتر شناخته شدند.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی دانشگاه کردستان و نیز سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی استان کردستان که با حمایت‌های مادی و معنوی‌شان ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، سپاس و قدردانی می‌گردد.

References

Arcidiacono, M., Catalano, C., Motisi, A., Sajeva, M., Carimi, F., & Carra, A. 2021. Influence of culture conditions on in vitro asymbiotic germination of *Anacamptis longicornu* and *Ophrys panormitana* (Orchidaceae). *Plants*, 10, 2543.

Barroso, J., Fevereiro, P., Oliveira, M.M., & Pais, M.S.S. 1990. In vitro seed germination, differentiation and production of minitubers from *Ophrys lutea* Cav., *Ophrys fusca* Link and *Ophrys speculum* Link. *Scientia Horticulturae*, 42, 329-337.

Christenhusz, M.J.M., & Byng, J.W. 2016. The number of known plant species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261, 201-217.

Davami, F., Eghbalpour, F., Nematollahi, L., Barkhordari, F., & Mahboudi, F. 2015. Effects of peptone supplementation in different culture media on growth, metabolic pathway and productivity of CHO DG44 cells; a new insight into amino acid profiles. *Iranian Biomedical Journal*, 19(4), 194-205.

Dianati, Sh., Kafi, M., Mirmasoumi, M., Mozaffarian, V., & Salami, A.R. 2014. Introduce the suitable medium for asymbiotic germination of *Epipactis veratrifolia*. *Journal of Crops Improvement*, 15(2), 161-177.

Diantina, S., Kartikaningrum, S., McCormick, A.C., Millner, J., McGill, C., Pritchard, H.W., & Nadarajan, J. 2020. Comparative in vitro seed germination and seedling development in tropical and temperate epiphytic and temperate terrestrial orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143, 619-633.

Dulić, J., Ljubojević, M., Prlainović, I., Barać, G., Narandžić, T., & Ognjanov, V. 2018. Germination and protocorm formation of *Ophrys sphegodes* Mill.-In vitro protocol for a rare orchid species. *Contemporary Agriculture*, 67(3-4), 196-201.

Dutra, D., Johnson, T.R., Kauth, P.J., Stewart, S.L., Kane, M.E., & Richardson, L. 2008. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94, 11-21.

Dutra, D., Kane, M.E., & Richardson, L. 2009. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96, 235-243.

Eshaghi Sanayi, T., Zare Mehrjerdi, M., & Sharifi, A. 2020. Effect of medium, iron-chelating agent and plant growth regulator on micropropagation of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Plant Productions*, 43(2), 309-322. [In Persian]

Garbi, E., Grimaudo, M., & Del Prete, C. 2009. In vitro asymbiotic germination and seedling development of *Limodorum abortivum* (Orchidaceae). *Plant Biosystems*, 143, 114-119.

Gholami, S., Vafaee, Y., Nazari, F., & Ghorbani, A. 2021. Molecular characterization of endangered Iranian terrestrial orchids using ISSR markers and association with floral and tuber-related phenotypic traits. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(1), 53-68.

Kauth, P.J., Vendrame, W.A., & Kane, M.E. 2006. In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, 91-102.

Kitsaki, C.K., Zygouraki, S., Ziobora, M., & Kintzios, S. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*, 23, 284-290.

Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 73(1), 1-25.

Lee, Y.I., Lee, N., Yeung, E.C., & Chung, M.C. 2005. Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination in vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130, 747-753.

Magrini, S., De Vitis, M., Torelli, D., Santi, L., & Zucconi, L. 2019. Seed banking of terrestrial orchids: Evaluation of seed quality in *Anacamptis* following 4-year dry storage. *Plant Biology*, 21, 544-550.

Malmgren, S. 1996. *Orchid propagation: theory and practice. In:Allen C (Ed) North American native terrestrial orchids: propagation and production.* North American Native Terrestrial Orchid Conference, Maryland, pp: 63-71.

Mohamadzadeh Moghadam, N., & Hamidi, H. 2017. Study on the effects of medium, sterilization and hormonal treatment on micropropagation of some apple (*Mallus domestica* Borkh.) rootstocks. *Plant Productions*, 40(1), 41-54. [In Persian]

Ponert, J., Figura, T., Vosolsobe, S., Lipavska, H., Vohnik, M., & Jersakova, J. 2013. Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhabited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany*, 91, 662-670.

Puchooa, D. 2004. Comparison of different culture media for the in vitro culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). *International Journal of Agriculture & Biology*, 6(5), 884-888.

Raghavan, V., & Torrey, J.G. 1964. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, Cattleya. *American Journal of Botany*, 51, 264-274.

Rao, A. 1977. *Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture.* Springer. 803 p.

Rasmussen, H.N. 1995. *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant.* Cambridge University Press, 460 p.

Rezaii Gangeh, S., Dehestani-Ardakani, M., & Kamali Aliabad, K. 2019. The effect of different factors on somatic embryogenesis of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 27(1), 108-119. [In Persian]

Salazar Mercado, S.A., & Vega-Contreras, N.A. 2017. Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb. f. (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, 66, 544-548

Salazar Mercado, S.A., Amaya Nieto, A.Z., & Barrientos Rey, F. 2013. Evaluation of different in vitro culture media in the development of *Phalaenopsis* hybrid (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15, 97-105.

Seaton, Ph.T., Hu, H., Perner, H., & Pritchard, H.H. 2010. Ex situ conservation of orchids in a warming world. *The Botanical Review*, 76, 193-203.

Shahsavari, A. 1997. *Persian orchids: the introduction of species, identification keys and their distributio*n. Research Institute of Forests and Rangelands, 74 p. [In Persian]

Tantasawat, P.A., Khairum, A., Arsakit, K., Poolsawat, O., Pornbungkerd, P., & Kativat, Ch. 2015. Effects of different culture media on growth and proliferation of *Dendrobium* 'Earsakul' protocorm-like bodies. *Preliminary and Regional Reports*, 25(5), 681-686.

Vij, S. 2002. *Orchids and tissue culture: current status, in role of plant tissue culture in biodiversity conservation and economic development.* Gyanodaya Prakashan, 491 p.

Vogel, I.N., & Macedo, A.F. 2011. Influence of IAA, TDZ, and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104, 147-155.

Youssef, S., Galalaey, A., Mahmood, A., Mahdi, H., & Vela, E. 2019. *Wild orchids of the Kurdistan region areas: a scientific window on the unexpected nature of the north western Zagros*. Société Méditerranéenne d'Orchidologie. 164 p.