علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۷، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۵ (ص ۲۳۲-۲۲۱) DOI: 10.22059/ijhs.2016.58522

مقایسهٔ قابلیت ریزازدیادی جنسی و غیرجنسی برای کاهش دورهٔ نونهالی ارکیدهٔ فالانوپسیس

خسرو بالی لاشکی[۱]، روح‌انگیز نادری[۲]* و سیامک کلانتری[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲٤)

چکیده

ارکیده‌ها یکی از مهم‌ترین و معروف‌ترین گیاهان عمومی و موردپسند مردم جهان هستند که در میان آن‌ها جنس فالانوپسیس بیشترین میزان تولید و فروش را دارد. از مهم‌ترین چالش‌های ارکیده‌ها دشواری افزونش آن‌هاست. به همین منظور آزمایشی برای افزایش و آسانگری افزونش این گیاه طراحی شد. در آغاز برای تولید کپسول بذر، گل‌های فالانوپسیس در طی ماه‌های مختلف سال به‌صورت دستی گرده‌افشانی شد و در مرحلهٔ بعد برای مقایسهٔ میانگین درصد جوانه‌زنی بذرها از سه محیط کشت 1/2 MS، Vacin-Went و Chen استفاده شد و بهترین عملکرد (۸۳/۳۷درصد جوانه‌زنی) با استفاده از محیط Chen به دست آمد. در مرحلهٔ بعد شاخه‌زایی با استفاده از ریز نمونهٔ گره‌های روی ساقهٔ گل بررسی شد. بهترین نتیجه با تولید ۱۵/۳ گیاهچه به ازای هر گره در محیط MS محتوای ٤/٤۰ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. برگ‌های گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کشت گره برای تولید گیاهچه در محیط Chen و غلظت‌های مختلف TDZ، BA و NAA کشت شدند و بهترین نتیجه (۵۸/۲٦ پداژه‌نما (پروتوکورم) به ازای هر ریز نمونه) در تیمار محتوای ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ به دست آمد. در مرحلهٔ سازگاری، گیاهان به گلخانه منتقل و در دو بستر متفاوت کشت شدند و هریک از گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از بذر، گره و برگ بیشترین زنده‌مانی را در محیط حاوی کوکوپیت + زغال+ پوکه‌های صنعتی+ خرده‌های یونولیت (به نسبت۱:۱:۲:٤) نشان دادند. همچنین کوتاه‌ترین دورهٔ زمانی از آغاز سازگاری تا گلدهی گیاهچه‌ها به مدت شانزده ماه و متعلق به گیاهان ناشی از کشت گره‌های ساقهٔ گل بود.

واژه‌های کلیدی: برگ، بذر، پداژه‌نما، ریزنمونه،گره‌های روی ساقهٔ گل.

مقدمه

ارکیده‌ها با داشتن ۸۰۰ جنس و ۲۵۰۰۰ گونه جزو قدیمی‌ترین و تکامل‌یافته‌ترین خانواده‌های گیاهی هستند. این گل‌ها به علت محبوبیتی که دارند توانسته‌اند ۸درصد از تجارت جهانی گل و گیاهان زینتی را به خود اختصاص دهند (Chugh *et al.*, 2009). زیبایی ارکیده‌ها به دلیل رنگ، شکل، تنوع گل‌ها و وجود آن‌ها از سردترین تا گرم‌ترین نقاط جهان است (Hempfling & Peril, 2005). ارکیده‌ها در ۳۰۰۰ سال پیش توسط ژاپنی‌ها و چینی‌ها پرورش داده می‌شدند، آن‌ها ارکیده‌هایی مانند دندروبیوم و سیمبیدیوم را برای عطر دل‌انگیزشان کشت می‌کردند (Tanaka *et al.*, 1998). پرورش ارکیده در ایران به‌طور رسمی از ۶۶ سال پیش با تأسیس مجتمع کشاورزی گرمسیری و نیمه گرمسیری نوشهر آغاز شد، هرچند در طی سالیان گذشته مراکزی دیگر نیز

* تلفن: ۰۹۱۲۱۶۱۴۱۵۹
E-mail: rnaderi@ut.ac.ir

آغاز به پرورش این گل‌های با ارزش کرده‌اند اما این مجتمع با داشتن ۳ هکتار گلخانهٔ مجهز، یکی از بزرگ‌ترین مراکز تولید ارکیده در ایران است (Sheykhi, 2004). فالانوپسیس یکی از معروف‌ترین ارکیده‌های موجود در جهان است. این ارکیده جزو ارکیده‌های مونوپودیال است، فالانوپسیس بومی جنوب شرقی آسیا و کشورهایی مانند سنگاپور، مالزی، فیلیپین، تایلند، اندونزی و همچنین شمال استرالیا است (Chen & Chang, 2006). ارکیده فالانوپسیس ۷۵درصد از فروش بازار ارکیده‌های گلدانی گلدار را به خود اختصاص داده است (Griesbach, 2002). از چالش‌های عمده در پرورش فالانوپسیس و دیگر ارکیده‌ها تولید انبوه گیاهچه‌های آن‌هاست که یکی از دلایل آن را می‌توان دشواری زیاد شدن ارکیده‌ها با روش‌های افزونش رویشی دانست. از سوی دیگر سبز نشدن بذرهای ارکیده و نیز ترشح مواد فنولیک، سازگار کردن و تفاوت‌های همسانهٔ بدنی (سوماکلونالی) بازدارندهٔ تولید گیاهچه‌های آن می‌شود (Chugh *et al*., 2009). ارکیده‌ها را می‌توان جزو نخستین گیاهانی دانست که کار برای تولید انبوه آن‌ها در محیط آزمایشگاهی آغاز شد. این گل‌ها به علت نبود امکان جوانه‌زنی بذرهاشان در بیرون از محیط طبیعی که در آن زندگی می‌کنند همیشه موردتوجه پژوهشگران علم زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) بوده‌اند و بدین دلیل از گذشتهٔ دور تا حال به دنبال پیدا کردن روش‌هایی برای تولید انبوه آن‌ها در محیط‌های مصنوعی هستند (Arditti & Alec, 1993; Chugh *et al*., 2009). روش‌های کشت بافت می‌توانند جایگزین مناسبی برای تولید ارکیده‌ها باشند. نخستین کارهایی که در مورد کشت بافت ارکیده‌ها انجام شده مربوط به کشت بذر در محیط سترون (استریل) توسط نادسون در سال ۱۹۲۰ بود، اما کار تحقیقات اساسی از سال ۱۹۴۹ با کشت گره‌های موجود بر ساقهٔ گل فالانوپسیس و تولید گیاه سیمبیدیوم بدون ویروس توسط مورل در سال ۱۹۶۰ آغاز شد و از آن هنگام تاکنون کار روی ریز ازدیادی ارکیده‌ها با روش‌های مختلف ادامه دارد (Arditti, 1993; Chugh *et al*., 2009). در طبیعت، فالانوپسیس به دو روش جنسی با بذر و غیرجنسی با تولید کیکیزها که گیاهچه‌های ناشی از رشد جوانه‌های نهفته روی ساقهٔ گل‌دهنده هستند، افزایش می‌یابد. در روش کشت بافت نیز برای تولید فالانوپسیس می‌توان از چند نوع ریزنمونه شامل کشت درون شیشه‌ای بذر، کشت گره‌های روی ساقهٔ گل و کشت برگ‌های به‌دست‌آمده از گیاهچه‌های ناشی از گره‌های ساقهٔ گل استفاده کرد (Chugh *et al*., 2009). محبوبیت فالانوپسیس باعث ارتقای دانش تولید آن در جهان شده و در کشوری مانند تایوان، محصول اول صادراتی بخش کشاورزی است (Chen & Chang, 2006). در پژوهشی تأثیر هورمون NAA و TDZ روی جنین‌زایی پداژه‌نما (پروتوکورم)های ناشی از کشت بذر ارکیده *P. amabilis* var. *Formosa* *بررسی* شد و محیط 1/2MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ بهترین تیمار برای جنین‌زایی پداژه‌نماها اعلام شد (Chen & Chang, 2004). برخی پژوهشگران عامل مؤثر بر جنین‌زایی بدنی (سوماتیکی) برگ دو ارکیدهٔ *P. Nebula* و *P. amabilis* شامل اندازهٔ ریزنمونه، زمان مناسب برای واکشت در تاریکی و روشنایی را آزمایش کردند و دریافتند که بهترین اندازه برای ریز نمونهٔ برگی، ۱ سانتی‌متر و مناسب‌ترین زمان برای واکشت در تاریکی شصت روز و برای روشنایی چهل‌وپنج روز است (Penggow *et al*., 2010). گزارش شده TDZ می‌تواند باعث ارتقای جنین‌زایی مستقیم از یاخته‌های روپوستی (اپیدرمی) و همچنین ریزنمونه‌های برگی *P. amabilis* شود (Chen & Chang, 2006). در آزمایشی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد روی تشکیل جنین‌زایی مستقیم ریزنمونه‌های برگی دو ارکیدهٔ *P. Nebula* و *P. amabilis* بررسی و بیان شد که 2ip و BA بیشترین تأثیر را دارند درحالی‌که اکسین‌ها، GA3 و پلی‌آمین‌ها در هر دو گونه بازدارندهٔ جنین‌زایی شدند و قسمت انتهایی برگ‌ها توانایی بیشتری در تولید جنین‌های بدنی نسبت به نوک برگ‌ها دارند (Penggow *et al*., 2008).

با توجه به دشوار بودن افزونش ارکیدهٔ فالانوپسیس و متفاوت بودن دورهٔ نونهالی بین گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از راه جنسی و غیرجنسی و نیز دستیابی

به بهترین روش برای تولید انبوه و تجاری ارکیدهٔ فالانوپسیس، بر آن شدیم در این تحقیق بتوانیم بهترین ریزنمونه و روش افزونش را از نظر سادگی در تولید انبوه و فاصلهٔ زمانی موردنیاز از کشت ریزنمونه‌ها تا گلدهی گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از آن‌ها را بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ مواد گیاهی

برای انجام این تحقیق از بوته‌های دوسالهٔ ارکیده *Phalaenopsis amabilis cv*. Cool Breeze استفاده شد، این بوته‌ها در گلخانهٔ شیشه‌ای مخصوص پرورش فالانوپسیس با دمای روز و شب ۲۵ و ۲۰ درجهٔ سلسیوس و با میانگین رطوبت ۸۰-۷۰ درصد با کود کامل ۲۰-۲۰ به غلظت دو در هزار نگهداری می‌شدند.

محیط و شرایط کشت

برای انجام این پژوهش از چهار محیط کشت شامل (MS-1962)، (1/2MS-1962)، (Chen-1999) و (VandW-1949) استفاده شد. لازم به یادآوری است در محیط Chen از ۲/۲ گرم در لیتر ژلرایت و نیز ۱ گرم در لیتر پپتون استفاده شد. همهٔ ابزارهای کار، محیط‌های کشت و آب مقطر با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱۲۰ کیلو پاسکال (Kpa) به مدت پانزده دقیقه ضدعفونی شدند. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به اتاقک رشد دارای دمای ۱±۲۵ درجهٔ سلسیوس و طول روز شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت خاموشی با استفاده از لامپ‌های فلورسنت سرد منتقل و نگهداری شدند.

آزمایش اول

تولید گیاهچه از بذر

در این آزمایش آغاز گل‌های فالانوپسیس در طول هشت ماه از سال یعنی از دی‌ماه تا مردادماه که گل دارد به‌صورت دستی گرده‌افشانی شدند و پنج کپسول بذر به‌دست‌آمده از تیمارهای ماهانه به‌صورت تصادفی انتخاب و صدوپنجاه روز پس از گرده‌افشانی درحالی‌که هنوز سبز و نارس بودند برداشت و در ظرفی محتوی ۰/۵ درصد هیپو کلرید سدیم، یک قطره توئین ۲۰، یک قطره مایع ظرف‌شویی به ازای ۱ لیتر آب به مدت ده دقیقه پیش سترون شدند و سترون‌شدهٔ آن‌ها نیز پس از قرارگیری سی ثانیه‌ای در اتانول ۷۰ درصد در محلول هیپوکلریت سدیم ۴ درصد به مدت پانزده دقیقه انجام شد و در نهایت در سه زمان پنج دقیقه‌ای با آب مقطر شسته و پس از شکافته شدن توسط اسکالپل در سه بستر کشت Chen، ½MS و Vacin and Went که در منابع از آن‌ها استفادهٔ زیادی برای افزونش ارکیده‌ها شده، کاشته شدند و از نظر درصد جوانه‌زنی برای تعیین بهترین محیط کشت و مناسب‌ترین زمان گرده‌افشانی بررسی شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها، از هر تیمار بیست ظرف کشت به‌صورت تصادفی انتخاب و از هر ظرف نیز صد بذر در زیر بینی کولار شمرده و پس از مشخص شدن بذرهای زنده نسبت به بذرهای مرده، میانگین شمار بذرهای جوانه‌زده بین بیست ظرف کشت به‌عنوان درصد جوانه‌زنی برای هر بستر کشت محاسبه شد.

آزمایش دوم

تولید گیاهچه از گره‌های موجود روی ساقهٔ گل

برای انجام این آزمایش، ساقه‌های گلی که دست‌کم سه غنچهٔ بازشده و دم گلی با بیش از سه گره داشتند از بوته جدا و در ظرف مخصوص حاوی آب خالص به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از ورود نمونه‌ها به آزمایشگاه قسمت انتهایی گل‌آذین و همهٔ گلچه‌های روی آن حذف شد و سپس ساقهٔ گل به کمک پنبهٔ آغشته به اتانول ۷۰درصد سترون سطحی شد. گل‌آذین به‌صورت قطعه‌های ۵ الی ۶ سانتی‌متری دارای یک گره، بریده و به مدت ده دقیقه برای پیش سترون‌سازی در ظرفی محتوای قارچ‌کش بنومیل ۱درصد، یک قطره توئین ۲۰ و یک قطره مایع ظرف‌شویی به ازای ۱ لیتر آب قرار داده شدند. سپس در زیر کابینت سترون‌شده به مدت بیست ثانیه‌ای در اتانول ۷۰درصد و نیز به مدت ده دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۷درصد سترون و در نهایت سه بار با آب مقطر شسته شدند. پس از سترون ریزنمونه‌ها، دو طرف گره‌ها را که در اثر سترون‌سازی آسیب دیده بودند به اندازهٔ ۱/۵ سانتی‌متر بریده و ریز نمونه‌های ۱

سانتی‌متری را پس از حذف براکته روی جوانه‌ها، به‌صورت افقی روی محیط کشت MS دارای ۵ تیمار (۱- شاهد بدون هورمون، ۲-۲میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳-۳ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۴-۴/۴۰ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۵-۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA) و چهل تکرار کشت شدند. گیاهچه‌های تولیدشده از این ریزنمونه‌ها به علت تولید نکردن ریشه در محیط شاخه‌زایی، برای ریشه‌زایی به مدت چهارده هفته در محیط کشت ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA قرار گرفتند. (علت دیر ریشه‌دار شدن، بزرگ بودن گیاهچه‌ها بود. چون گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از این ریزنمونه‌ها گرایش به رشد رویشی بالایی دارند اما رشد ریشه‌ها به‌ویژه در آغاز پیدایش بسیار ضعیف است). ریزنمونه‌ها هر چهارده روز یک‌بار واکشت می‌شدند و شمار گیاهچه‌های تولیدی به ازای هر گرهٔ کشت‌شده ثبت می‌شد.

آزمایش سوم

بررسی ریزازدیادی فالانوپسیس از روش برگ‌های سترون‌شده گیاهچه‌های ناشی از گره‌های ساقهٔ گل

برای تهیهٔ برگ سترون‌شده به‌طورمعمول دو راه وجود دارد که یکی کاشت بذر و دیگری کشت گره‌های روی ساقهٔ گل است. در این آزمایش به دلیل آنکه تولید گیاهچه‌های همسان و کاهش دورهٔ نونهالی یکی از هدف‌های اصلی به‌شمار می‌رفت، از برگ‌های سترون‌شده گیاهچه‌های ناشی از گره‌هایی که صدوشصت روز از کشت آن‌ها گذشته بود استفاده شد که پس از جداسازی و برش به قطعه‌هایی با طول ۱ و عرض ۰/۵ سانتی‌متر، در محیط Chen با نه تیمار و غلظت‌های مختلفی از NAA، BA و TDZ کاشته شدند (جدول۱). برای هر تیمار، چهل ریزنمونه به‌صورت تکی در هر ظرف کشت، کاشته و از نظر شمار گیاهچهٔ تولیدی به ازای هر قطعه برگ کشت‌شده ارزیابی شدند. در طی دورهٔ این آزمایش که دوازده هفته بود، ریزنمونه‌ها هر چهارده روز یک‌بار واکشت شدند. یادداشت‌برداری‌ها به‌صورت هفتگی و یادداشت‌برداری نهایی در پایان هفتهٔ دوازدهم انجام گرفت.

جدول ۱. تیمارهای بررسی‌شده در تولید گیاهچه از برگ‌های سترون حاصل از گره های ساقهٔ گل

Table 1. Treatments applied for plantlet production via sterile leaves from flowering stem nodes

Plant growth regulators (mg/l)			Treatment
TDZ	NAA	BA	
0	0	0	1
0.5	0	0	2
1	0	0	3
2	0	0	4
3	0	0	5
0	0.3	1	6
0	0.5	2	7
0	0.75	3	8
0	1	4	9

آزمایش چهارم

بررسی سازگاری گیاهچه‌های تولیدی

در این آزمایش گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کشت بذر، گره و برگ که آمادهٔ خارج شدن و سازگاری با محیط گلخانه بودند انتخاب و در نخستین گام در سه روز متوالی در پوشش شیشه‌ها در سه بازهٔ زمانی یک، سه و پنج ساعته در اتاقک کشت باز شد و سپس در روز چهارم پس از خارج کردن و شستشوی نمونه‌ها با آب مقطر، برای سازگاری به گلخانه‌ای با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس منتقل و در آنجا به مدت یک دقیقه در قارچ‌کش کاربوکسی تیرام ۱درصد غوطه‌ور شدند و در انتها گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از بذر، گره و برگ به‌صورت جداگانه در دو بستر کشت متفاوت بر پایهٔ جدول ۲ و به‌صورت توده‌های صدتایی در سبدهای پلاستیکی در ابعاد ۳۰×۴۵ و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر کشت و یک ماه پس‌ازآن از نظر درصد زنده‌مانی آزمایش شدند.

جدول ۲. مواد تشکیل‌دهندهٔ بسترهای کشت برای سازگاری

Table 2. Media applied for adaptation

Cocopeat + Coal 1:5	Treatment 1
Cocopeat + Coal + Industrial cartridge + Yonolit 1:1:2:4	Treatment 2

آزمایش پنجم

مقایسهٔ گیاهچه‌های تولیدی از نظر زمان لازم از سازگاری تا گلدهی

در این آزمایش مدت‌زمان لازم از سازگاری گیاهچه‌های تولیدشده از ریزنمونه‌های مختلف تا گلدهی موردنظر بود، بدین منظور از هر ریزنمونه سیصد گیاهچه پس از

سازگاری در گلخانه‌ای با دمای روز ۲۵ و شب ۲۰ درجهٔ سلسیوس تا هنگام ظهور نخستین شاخهٔ گل قرار داده شدند. لازم به یادآوری است گیاهچه‌ها هر سه روز یک‌بار با کود کریستالون ۲۰:۲۰:۲۰ تغذیه شدند.

تجزیه‌وتحلیل آماری

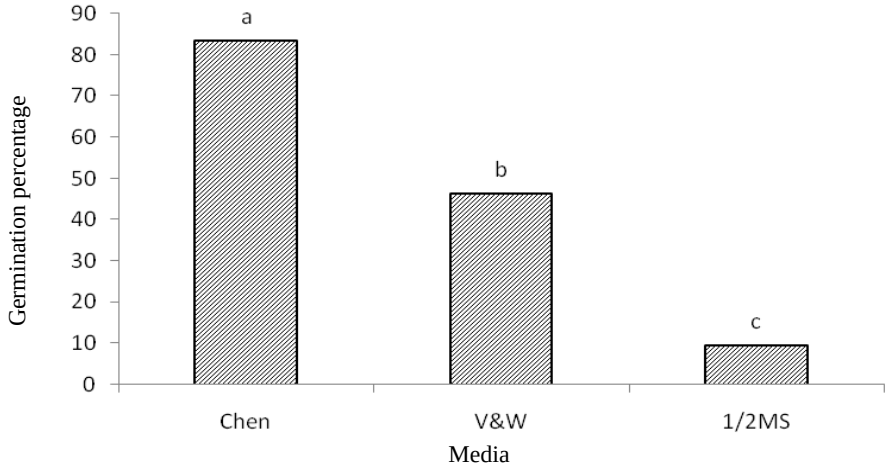
تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های آزمایش‌های این پژوهش در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تولید گیاهچه از بذر

همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد در بین سه بستر کشت مورداستفاده تفاوت‌های معنی‌دار از لحاظ عملکرد وجود داشت و میانگین جوانه‌زنی بین هشت ماه گرده‌افشانی بین سه بستر، هفت هفته پس از کاشت را نیز نشان داد بسترهای Chen، Vacin and Went و ½MSبا ۸۳/۳۷، ۴۶/۲۵ و ۹/۳۷ درصد در ردیف اول تا سوم از لحاظ میانگین جوانه‌زنی بودند. در بین بسترهای کشت مورداستفاده، محیط Vacin and Went از لحاظ عناصر غذایی سبک‌ترین بود. به نظر می‌رسد استفاده از ۱ گرم در لیتر پپتون در محیط کشت Chen روی درصد جوانه‌زنی مؤثر بوده و موجب افزایش معنی‌دار جوانه‌زنی در مقایسه با دو محیط دیگر شده است. اما در محیط Chen بر خلاف دو محیط کشت دیگر از ژل رایت به‌جای آگار و ۱ گرم در لیتر پپتون به‌عنوان افزودنی طبیعی استفاده شد. نتایج تحقیقات پیشین نشان داده که افزودنی‌های طبیعی مانند پپتون می‌تواند باعث افزایش جوانه‌زنی بذرهای ارکیده‌ها شود (Japer & Latip, 2011). همچنین گزارش‌ها نشان می‌دهد که بذرهای ارکیده‌های گرمسیری مانند فالانوپسیس به بسترهای کشت غنی‌تری نسبت به گونه‌های سردسیری نیاز دارند (Pierik, 1986). در این تحقیق محیط Chen بهترین بستر برای کشت بذر ارکیدهٔ فالانوپسیس تشخیص داده شد.

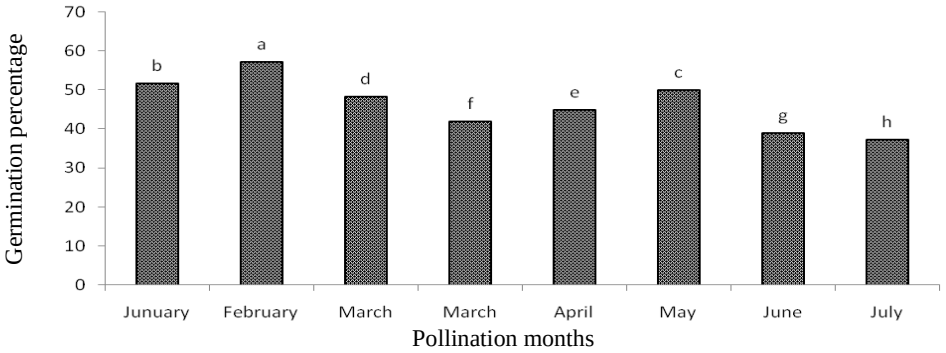
نتایج نشان داد استفاده از کپسول‌های نارس برای استخراج بذر روشی مناسب است. گزارش‌های پیشین نیز نشان داده که کشت بذرهای نارس ارکیده درصد جوانه‌زنی بالاتری نسبت به بذرهای رسیده ایجاد می‌کند و موجب دست‌یابی سریع‌تر به گیاهچه، کاهش مدت به گل رفتن گیاه، کاهش دورهٔ اصلاحی و شکافته نشدن کپسول‌ها در اثر خشکی طبیعی می‌شود (Shamra *et al*., 2005; Kumar *et al*., 2006). برخی پژوهشگران بهترین زمان برای افزایش جوانه‌زنی بذرهای ارکیدهٔ فالانوپسیس را استفاده از کپسول‌هایی می‌دانند که ۲۱۶-۹۰ روز از گرده‌افشانی آن‌ها گذشته باشد (Rachel & Vanita, 2011).



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین درصد جوانه‌زنی بذرها در سه محیط کشت

Figure 1. Mean comparison of seeds germination in three media

میانگین جوانه‌زنی بذرها در سه بستر کشت در ماه‌های مختلف متفاوت بود و بذرهای به‌دست‌آمده از تیمار گرده‌افشانی بهمن‌ماه با ۵۷/۴درصد بیشترین و بذرهای تیمار مرداد با ۴۲درصد کمترین میانگین درصد جوانه‌زنی را داشتند، پس می‌توان نتیجه گرفت بدون توجه به بستر کشتی که بذرها در آن کاشته شدند ماه بهمن و در کل فصل زمستان بهترین زمان برای گرده‌افشانی و تولید بذر است. شکل ۲ میانگین جوانه‌زنی بذرهای به‌دست‌آمده از گرده‌افشانی دی تا مردادماه را در سه محیط کشت متفاوت را نشان می‌دهد.



شکل ۲. میانگین جوانه‌زنی بذرهای به‌دست‌آمده از گرده‌افشانی ماه‌های مختلف

Figure 2. Mean germination of seeds produced from pollination in different monthes

در ادامهٔ کار پس از ظهور برگ‌ها و ریشه‌های حقیقی، گیاهچه‌ها در طی زمان لازم برای رسیدن به‌اندازهٔ شایان‌پذیرش برای سازگاری به‌صورت ماهانه در بستر Chen محتوای ۲ گرم در لیتر زغال فعال واکشت شدند. زمان کشت تا سازگاری گیاهچه‌ها ۲۴۰ روز طول کشید. Pierik (1986) نیز مدت‌زمان لازم از کشت بذر تا تولید گیاهچهٔ ریشه‌دارشده را شش ماه اعلام کرده، اما اشاره‌ای به‌اندازهٔ گیاهچه‌ها نکرده است.

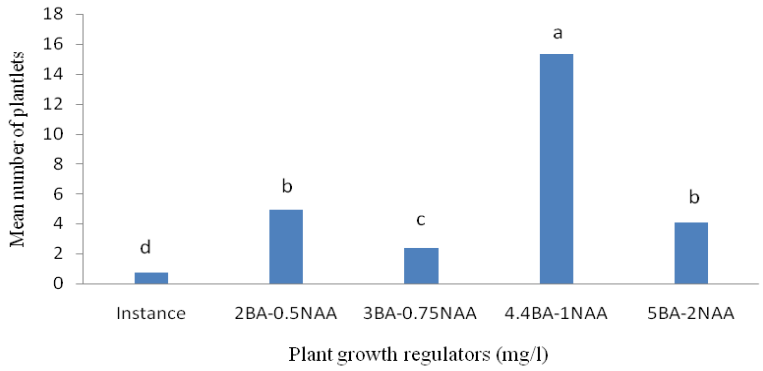
نتایج آزمایش تولید گیاهچه از گره‌های موجود روی ساقهٔ گل با مقایسهٔ غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد

پس از کشت گره‌های روی ساقهٔ گل، ریز نمونه‌های کشت‌شده دو حالت مختلف را از خود نشان دادند. در حدود هفتهٔ دوم کشت در شماری از تیمارها، جوانه‌های روی گره‌ها متورم شده و آغاز به رشد کردند، اما شماری از آن‌ها به حالت رکود باقی ماندند و تا آخر آزمایش نیز هیچ رشدی از خود نشان ندادند. در بررسی دیگری گزارش کردند که جوانه‌های روی گرهٔ دمگل در صورت استفاده به عنوان ریز نمونه برای ریزازدیادی سه حالت مختلف را از خود نشان می‌دهد که یا خفته می‌مانند، یا تبدیل به گیاهچه می‌شوند و یا وارد حالت (فاز) زایشی شده و تبدیل به شاخهٔ گل می‌شوند (Arditti, 2008). این آزمایش نیز این گفته را تأیید می‌کند اما هیچ‌کدام از جوانه‌ها تبدیل به شاخهٔ گل نشدند و دو حالت اول را از خود نشان دادند. یکی از چالش‌هایی که کشت بافت ارکیده‌ها را محدود می‌سازد تولید مواد فنولیک از ریزنمونه‌ها است که محیط کشت را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Chugh *et al.*, 2009). از آنجایی‌که ریز نمونه‌ها به طور گسترده‌ای مواد فنولیک تولید کردند، مجبور شدیم هر چهارده روز یک‌بار آن‌ها را واکشت کنیم. همان‌طور که بیان شد از هفتهٔ دوم، جوانه‌های فعال آغاز به رشد کردند، در بعضی از تیمارها مانند تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴/۴۰ میلی‌گرم در لیتر BA، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA ریزنمونه‌ها در قسمت انتهایی متورم شدند و در هفتهٔ چهارم این تورم به نهایت خود رسید و در هفتهٔ پنجم پداژه‌نماهای تشکیل‌شده در اطراف آن دیده شدند. اما در تیمار شاهد، جوانه‌ها به‌صورت معمولی رشد کردند و تبدیل به گیاه شدند و از هر جوانه فقط یک گیاه به‌وجود آمد. در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA آغاز جوانه‌ها به‌صورت عمودی با ظاهری همسان ساقهٔ گل‌دهنده رشد کردند. اما در

هفتهٔ هشتم جوانه‌های جانبی روی آن‌ها آغاز به رشد کردند. شمار گیاهچه‌های تولیدی به ازای هر گره در بین تیمارها بسیار متفاوت بود. بیشترین شمار گیاهچه (۱۵/۳ گیاه چه به ازای هر گره) از محیط کشت حاوی ۴/۴۰ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به وجود آمد. در آزمایشی که برای کشت گره‌های ساقهٔ گل فالانوپسیس انجام شد، بهترین عملکرد با ۸/۳۵ گیاهچه به ازای هر گره در محیط کشت تجاری سیگما P6793 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش شد (Kosir *et al.*, 2004). ما در آزمایش خود نزدیک به دو برابر این شمار رسیدیم، وجه مشترک آزمایش ما و این گزارش شمار روز پس از کشت یعنی صدوشصت روز است. کمترین شمار گیاهچهٔ به‌دست‌آمده در تیمار شاهد بود. ۷۰درصد از گره‌های کاشته شده در محیط شاهد فعال شدند که کمترین مقدار جوانهٔ فعال نسبت به تیمارهای حاوی تنظیم‌کنندهٔ رشد بود، در تیمار شاهد از هر گره تنها یک گیاهچه به دست آمد. شمار جوانه‌های فعال‌شده در تیمارهای حاوی NAA و BA نسبت به شاهد نشان داد که این تنظیم‌کننده‌های رشد قابلیت تحریک جوانه را برای شاخه‌زایی دارند (شکل ۳). این نتیجه با نظر دیگر محققان همخوانی دارد که BAP می‌تواند باعث فعال شدن جوانه‌های خفته روی گره‌ها شود (Arditti, 2008).

نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد خراش‌دهی اطراف جوانه‌های روی گره پیش از کشت، باعث افزایش شاخه‌زایی گره‌ها می‌شود و موقعیت گره‌ها روی ساقهٔ گل، BAP و دما می‌توانند روی رشد جوانه‌های گره *Phalaenopsis amabilis* تأثیر بگذارد (Tanaka *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1978). TDZ و BAP بهترین عملکرد را در تولید شاخساره از گره‌های ساقهٔ گل فالانوپسیس دارند (Tanaka *et al.*, 1978). سن ریزنمونه عامل دیگری است که روی باززایی گره‌های ساقهٔ گل مؤثر است و ریز نمونه‌های گرفته‌شده از منابع جوان‌تر پاسخ عملکردی بهتری در ارکیده‌های *Phalaenopsis*، *Dendrobium* و *Oncidium* نشان دادند (Intuwong & sagawa, 1973). در این بررسی نیز که از گیاهان جوان استفاده شد به نتایج خوبی از نظر عملکرد و روبه‌رو نشدن با بیماری‌های ویروسی و باکتریایی دست یافتیم.

تحقیقات نشان می‌دهد اگر گره‌ها از گل‌آذین‌هایی تهیه شوند که همهٔ گل‌های آن‌ها باز شده باشد، تنها تا ۳۰درصد از ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط کشت، شاخسارهٔ جانبی تولید می‌کنند. ما از گره‌های گل‌آذین‌هایی استفاده کردیم که تنها یک تا سه گلچهٔ آن‌ها باز شده بودند، بااین‌حال شماری از ریزنمونه‌های کشت‌شده خفته ماندند و هیچ شاخساره‌ای تولید نکردند. البته پژوهشگران این عامل را در مورد ارکیدهٔ *Aranda deborah* مؤثر ندانستند و اشاره کرده‌اند که گره‌های این نوع ارکیده حتی در شرایط باز بودن کامل گل‌ها قابلیت باززایی خوبی را از خود نشان می‌دهند (Goh & Wong, 1990). همهٔ نمونه‌های ریشه‌دارشدهٔ ناشی از این آزمایش ۲۶۰ روز پس از کشت ریزنمونه، برای سازگاری به محیط گلخانه منتقل شدند. این دورهٔ ۲۶۰ روزه شامل ۱۶۰ روز مرحلهٔ شاخه‌زایی و صد روز مرحلهٔ ریشه‌زایی بود.



شکل ۳. نمودار تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر شاخه‌زایی گره‌ها در محیط کشت MS

Figure 3. Effects of different concentrations of plant growth regulators on shoot regeneration from nodes in MS medium.

نتایج بررسی ریزازدیادی فالانوپسیس از روش کشت برگ‌های سترون‌شده

برای انجام این آزمایش از برگ‌های مربوط به گیاهچه‌های تولیدشده از گرهٔ ساقهٔ گل استفاده شد. شش هفته پس از کشت، پداژه‌نماها به تدریج از کنارهٔ ریزنمونه‌های برگی ظاهر شدند. نخستین تشکیل پداژه‌نما در تیمار حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده شد. پس از گذشت هفت هفته تنها در تیمارهایی که TDZ در آن‌ها استفاده شده بود، پداژه‌نماها ظاهر شدند و در تیمارهای حاوی BAP و NAA هیچ‌گونه اثری مبنی بر ظهور پداژه‌نما دیده نشد و تا آخر آزمایش یعنی هفتهٔ دوازدهم به تدریج این ریزنمونه‌ها زرد شده و از بین رفتند. پژوهشگرانی در آزمایشی که روی برگ‌های کشت‌شدهٔ ارکیدهٔ *P. amabilis* انجام شد، استفاده از TDZ را برای تولید جنین‌های بدنی و پداژه‌نما مؤثر اعلام کردند (Chen & Chang, 2006). در آزمایش ما حتی با استفاده از تیمار TDZ نیز بعضی از ریزنمونه‌ها بدون تولید حتی یک پداژه‌نما از بین رفتند، بیشترین نمونه‌های از بین رفته مربوط به برگ‌هایی بود که اندازهٔ بزرگ‌تری داشتند و برگ‌های کوچک‌تر گرایش بیشتری برای تولید پداژه‌نما از خود نشان دادند. بیشترین تولید پداژه‌نما در قسمت پایینی برگ‌ها، یعنی جایی که به ساقه متصل می‌شوند، مشاهده شد. گزارش‌شده ریزازدیادی موفق به‌وسیلهٔ برگ‌های ارکیده‌ها بستگی به عامل‌های زیادی مانند ترکیب غذایی بستر کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد، منبع برگ (درون شیشه‌ای یا برون شیشه‌ای)، قسمت مورد کشت برگ‌ها، موقعیت برگ روی گیاه و سن برگ دارد (Chugh *et al*., 2009). در آزمایش‌هایی که برای جنین‌زایی بدنی برگ فالانوپسیس انجام شده، اندازهٔ ریزنمونه بررسی و گزارش شده که بهترین ریزنمونه‌ها برگ‌هایی به ابعاد ۱سانتی‌متر مربع دارند و نیز بهترین قسمت برای تولید پداژه‌نما قسمت پایینی برگ‌ها است (Penggow *et al*., 2010). نتایج این محققان با نتیجهٔ به‌دست‌آمده در این آزمایش همخوانی دارد. اما بیشترین نمونهٔ فعال برای تولید پداژه‌نما (۹۰درصد) مربوط به تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و کمترین میزان آن (۷۶درصد) مربوط به تیمار دارای ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود. با افزایش غلظت TDZ درصد نمونهٔ فعال کاهش یافت (جدول ۳). تولید پداژه‌نما در هر ریزنمونه با افزایش TDZ رشد صعودی از خود نشان داد، به‌طوری‌که کمترین شمار پداژه‌نما با میانگین ۶/۳ به ازای هر ریزنمونه در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و بیشترین میزان تولید با میانگین ۵۸/۲۶ به ازای هر ریز نمونه در تیمار محتوای ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده شد (جدول ۳). نتایج نشان داد که هر چند با افزایش غلظت TDZ تولید پداژه‌نما افزایش می‌یابد، اما موجب کاهش درصد نمونهٔ فعال می‌شود. کمترین تلفات پداژه‌نما با ۰/۶۶ درصد به ازای هر برگ به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و بیشترین میزان نیز به تیمار محتوای ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ تعلق داشت (جدول ۳). بهترین غلظت برای جنین‌زایی برگ *P.amabilis* ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ گزارش شده است (Chen & Chang, 2006).

نمونه‌ها پس از دوازده هفته از محیط حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد خارج و در محیط ½MS بدون هورمون و دارای ۲ گرم در لیتر زغال فعال به مدت هشت هفته کشت شدند. پس از بزرگ شدن و تولید برگ و ریشه، گیاهچه‌های به هم چسبیده از هم جدا شده و دوباره به مدت هفت هفته در محیط ½MS محتوای ۲ گرم در لیتر زغال فعال کشت شدند و درنهایت پس از ۱۹۰ روز برای سازگاری به محیط گلخانه منتقل شدند.

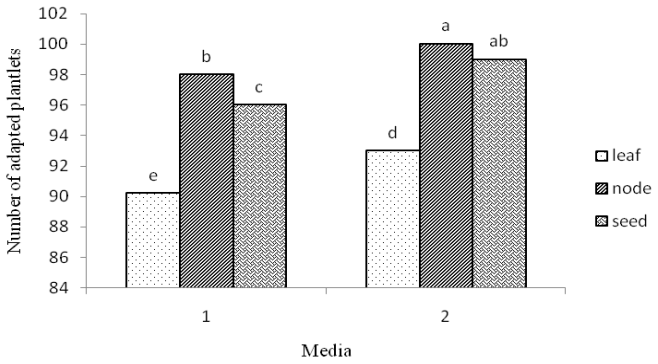
نتایج بررسی سازگاری گیاهچه‌های تولیدی در دو محیط کشت مختلف

نتایج زنده‌مانی گیاهچه‌های ناشی از ریزنمونه‌های مختلف به‌غیراز گیاهچه‌های برگی بسیار به هم نزدیک بودند. سی روز پس از انتقال به گلخانه برای سازگاری، بهترین عملکرد با ۱۰۰درصد زنده‌مانی مربوط به گیاهان ناشی از کشت گره در محیط ۲ حاوی کوکوپیت+زغال+پوکه‌های صنعتی+ خرده‌های یونولیت به نسبت حجمی ۱:۱:۲:۴ بود و ۹۸درصد گیاهان نیز در محیط ۱حاوی کوکوپیت + زغال به نسبت حجمی ۱:۵با محیط گلخانه سازگار شدند. احتمال دارد یکی از دلایل سازگاری خوب گیاهچه‌های ناشی از گره، بزرگ‌تر بودن اندازه و ریشه‌های آن‌ها نسبت به گیاهچه‌های به‌دست‌امده از ریزنمونه‌های دیگر بود.

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین‌های تولید شاخساره از برگ‌های سترون‌شده
Table 3. Mean comparison of shoots regenerated from sterile leaves

TDZ (mg/l)	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Explant activity (%)	Number of produced protocorm per explant	Number of yellowed protocorm per explant
0	0	0	^{d} 0	0^{d}	0^{c}
0.5	0	0	90^{a}	6.3^{d}	0.66^{c}
1	0	0	83^{ab}	25.16^{c}	2.2^{b}
2	0	0	70^{b}	38.5^{b}	5.96^{a}
3	0	0	76^{ab}	58.26^{a}	6.73^{a}
0	1	0.3	0	0^{d}	0^{c}
0	2	10.5	0	0^{d}	0^{c}
0	3	0.76	0	0^{d}	0^{c}
0	4	1	0	0^{d}	0^{c}

۹۹درصد از گیاهان تولیدشده از بذر در محیط ۲ و ۹۶درصد آن‌ها در محیط ۱ زنده ماندند. این گیاهچه‌ها به علت داشتن ریشهٔ زیاد و طویل‌تر سازگاری خوبی داشتند. Chen & Chang (2004) با کشت گیاهچه‌های ناشی از کشت بذر ارکیدهٔ *P. amabilis* var. *Formosa* برای سازگاری روی خزهٔ اسفاگنوم به درصد زندمانی ۱۰۰درصد رسیدند. ضعیف‌ترین گروه گیاهچه‌ها برای سازگاری، گیاهان ناشی از کشت برگ‌ها بودند. ۹۳درصد این گیاهچه‌ها در محیط ۲ و ۹۰/۲درصد در محیط ۱زنده ماندند. اما نکتهٔ مهم در مورد این دو نوع بستر کشت آن است که محیط ۱ توان نگهداری میزان رطوبت بیشتری داشت و به همین دلیل گیاهچه‌های کشت‌شده در آن اغلب از ناحیهٔ ریشه آغاز به پوسیده شدن می‌کردند. محیط ۲ بستر متخلخل‌تری را داشت، این به علت وجود پوکهٔ صنعتی و خرده‌های یونولیت بود، گیاهچه‌های کشت‌شده در این محیط، سازگاری و رشد بهتری داشتند. ارکیدهٔ فالانوپسیس جز گیاهان دارزی است بنابراین می‌تواند در محیط‌های دارای تخلخل و هوادهی بیشتر مانند محیط ۲ رشد بهتری از خود نشان دهد (شکل ۴).

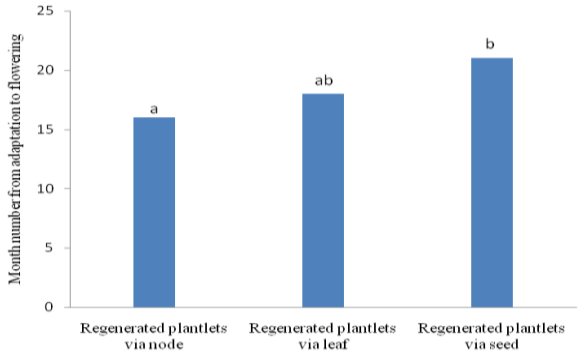


شکل ۴. تأثیرمحیط کشت روی سازگاری گیاهچه
Figure 4. Effects of media on plantlet adaptation

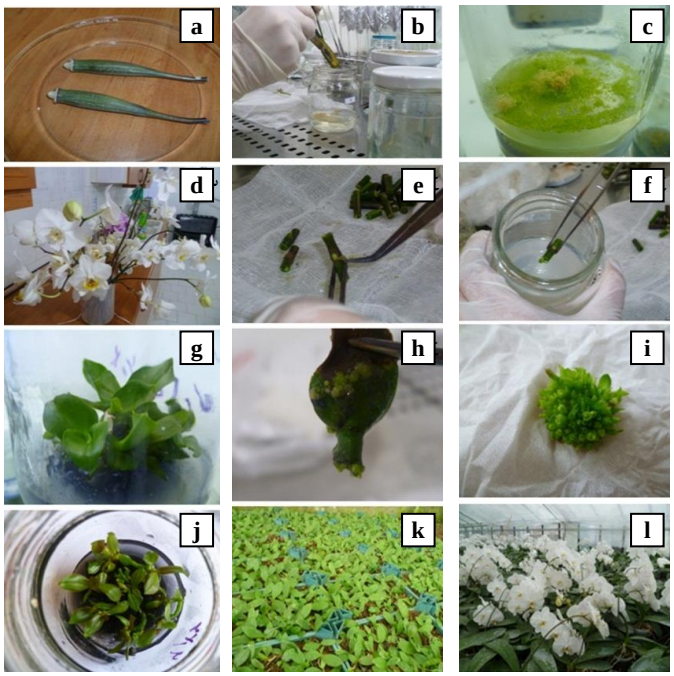
نتایج بررسی وضعیت گیاهان از نظر مدت‌زمان لازم پس از آغاز سازگاری تا گلدهی

فاصلهٔ بین زمان سازگاری تا گلدهی بین گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌های مختلف متفاوت بود، به‌طوری‌که گیاهان ناشی از کشت گره‌های ساقهٔ گل، شانزده ماه پس از آغاز دورهٔ سازگاری و زودتر از گیاهان دیگر به گل رفتند، گیاهان ناشی از بذر، دورهٔ نونهالی طولانی‌تری داشتند و فاصلهٔ بین آغاز دورهٔ سازگاری تا گلدهی آن‌ها بیست‌ویک ماه به درازا کشید. گلدهی گیاهان به‌دست‌آمده از برگ‌های سترون‌شده نیز هجده ماه به طول انجامید؛ اما این آزمایش نشان داد از کشت ریزنمونه تا گلدهی برای گیاهان ناشی از کشت بذر، گره‌های ساقهٔ گل و برگ‌های سترون‌شده به ترتیب ۲۹، ۲۴/۲ و ۲۴/۱ ماه زمان موردنیاز است (شکل ۵). پژوهشگران طول مدت بین جوانه‌زنی بذرها تا سازگاری گیاهچه‌های تولیدشده مربوط به سه جنس ارکیدهٔ *Dendrobium*، *Cattyeya* و *Cattleyopsis* را به ترتیب ۳۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ روز اعلام کردند. آن‌ها همچنین

گزارش کردند که کشت بذرها نارس می‌تواند ۲ الی ۲/۵ ماه، دورهٔ تولید را کاهش دهد. به‌طور معمول کپسول بذر فالانوپسیس نیاز به هشت ماه زمان برای رسیدن دارد (Lyumila & Alla, 2004). در آزمایش ما نیز از کپسول سبزی استفاده شده بود که تنها پنج ماه از گرده‌افشانی آن گذشته بود و نتیجهٔ مطلوبی به دست آمد. عکس های مربوط به مراحل انجام آزمایشات به ترتیب در شکل ۶ قابل رویت می‌باشد.



شکل ۵. مدت زمان موردنیاز برای گلدهی پس از شروع سازگاری گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از ریز نمونه‌های مختلف
Figure 5. The proper time for flowering after adaptation of plantlets regenerated via different explants



شکل ۶. ریز ازدیادی ارکیدهٔ فالانوپسیس با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف. a) کپسول‌های بذر پنج ماه پس از گرده‌افشانی، b) نحوهٔ کشت بذرها روی بستر کشت، c) جوانه‌زنی بذرها و تولید پداژه‌نما، ت: برداشت و انتقال شاخه‌های گل به آزمایشگاه، d) حذف قسمت‌های آسیب‌دیده در نتیجهٔ سترون‌سازی، e) کاشت ریزنمونه‌ها به‌صورت افقی روی بستر کشت، f) گیاهان ناشی از کشت گره در محیط محتوای ۴/۴۰ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، g) تولید پداژه‌نما روی برگ‌های کشت‌شده، h) شاخه‌زایی پداژه‌نماهای تولیدشده از برگ‌ها، i) کشت گیاهچه‌های کوچک روی بستر کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد حاوی زغال فعال، j) ۲ ماه پس از سازگاری گیاهچه‌های تولیدی با محیط گلخانه، k) گلدهی گیاهان ناشی از کشت برگ هجده ماه پس از سازگاری.
Figure 6. Phalaenopsis orchid micropropagation via different explants. a) seed capsules 5 months after pollination; b) seeds culturing on medium; c) seed germination and protocorm production; d) flowering shoots harvesting; e) removing the damaged parts of shoots; f) explants culturing on medium in horizontal shape; g) the plantlets produced via nodes on medium supplemented with 4.4 $mg.L^{-1}$BA and 1 $mg.L^{-1}$NAA; h) protocorm production on sterile leave; i) shoot regeneration of protocorms which produced via leaves; j) plantlet culturing on medium supplemented with active charcoal and without any plant growth regulators; k) two months after adaptation to greenhouse condition; l) flowering in plantlets regenerated via leaves 18 months after adaptation.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد با توجه به طولانی بودن دورهٔ نونهالی گیاهان تولیدشده از بذر و نبود اطمینان از یکنواختی گیاهچه‌های تولیدی به دلیل دگرگشن بودن ارکیده‌ها و همچنین سختی افزونش از راه گره‌های روی ساقهٔ گل به دلیل روبه‌رویی با بیماری‌های درونی، محدودیت ریزنمونه برای کاشت و سختی کشت آن‌ها به سبب قطرها و سفت بودن ساقهٔ گل، زیاد توجیه اقتصادی ندارد، اما افزونش از راه برگ‌های سترون‌شده به دلیل بازدهی بهتر، هزینهٔ کمتر، سرعت بالای افزونش، کوتاه بودن دورهٔ نونهالی، تولید گیاهان همسان به گیاه مادری به دلیل استفاده از روش جنین‌زایی مستقیم، فراوانی نسبی و در دسترس بودن ریزنمونه به میزان کافی می‌تواند روش مطلوبی برای تولید انبوه و تجاری فالانوپسیس باشد.

REFERENCES

1. ArdittI, J. & Alec, M. (1993). *Fundamental of Orchid Biology*. Wiley Interscience. In: New York. pp. 432-654.
2. Arditti, J. (1993).*Orchid biology*. Kluwer Academic Press.Boston.
3. Arditti, J. (2008). Micropropagation of Orchid. In: USA. pp. 564-843.
4. Chen, J. T., Chang, C. & Chang, W.C. (1999). Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 19(2), 143-149.
5. Chen, J. & Chang, W.C. (2006). Direct Somatic embryogenensis and plant regeneration from leaf explants *Phalaenopsis*. *Bioplant*, 50, 169-173.
6. Chen, J. T. & Chang, W. C. (2004). Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of Phalaenopsis amabilis var. formosa Shimadzu. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(3), 290-293.
7. Chugh, H.S., Guha, S. & Rao, U. (2009). Micropropagation of Orchid: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122, 507-520.
8. Goh, J. & Wong, P.F. (1990). Micropropagation of the monopodial Orchid hybrid Aranda Deborah using in Florescence explant. *Scientia Horticulturae*, 44, 315-321.
9. Griesbach, R.J. (2002). *Development of Phalaenopsis Orchids for the mass-market*. ASHS Press, Alexandria, VA, 458-465.
10. Hempfling, T. & Preil, W. (2005). Application of a temporary immersion system in mass propagation of Phalaenopsis. In *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*. Springer Netherlands. (pp. 231-242)
11. Intuwong, O. & Sagawa, Y. (1973). Clonal Propagation of sarcanthine Orchid by aseptic Culture of inflorescence. *American Orchid Society Bulletin*, 42, 209- 215.
12. Japer, M. & Latip, M. (2011). Invitro seed Germination of Bornean Endemic Orchids *Dendrobium tetrachromum* and *D.hamaticalcar*. *Empowering Science*, 122, 770-778.
13. Kosir, P., Skof, S. & Luthar, Z. (2004). Direct shoot regeneration from node of Phalaenopsis Orchid. *Acta agriculture Slovenia*, 83, 233-242.
14. Kumar, K., Majumdar, S., Sharma, R. & Sharma, B. (2006). Green pod Culture and rapid Micropropagation of *Dendrobium Chrysanthum*. *Folia Horticulturae*, 18, 81-90.
15. Lyumila, B. & Alla, L. (2004). In vitro germination of seed of some rare tropical Orchids.Aca universita tislatviensis. *Biology*, 676, 159-162
16. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
17. Penggow, W., Chang, J.T. & Chang, W.C. (2010). Enham cement of direct somatic embryogenesis and plant grow from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture Periodand explants length. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 621-627.
18. Penggow, W., Chen, J.T. & Chang, W.C. (2008). Influence of Growth regulators on direct embro formation from leaf explants of Phalaenopsis Orchid. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 507-512
19. Pierik, R.L.M. (1986). *In vitro culture of higher plants*. Nirokawa prees, Netherland 406 p.
20. Rachel, S. & Vanita, B. (2011). The influence of seed maturation on desiccation tolerance in *Phalaenopsis amabilis* hybrids. *Scientia Horticulturae*, 128, 136-140.
21. Shamra, R.D.K.K., Shamra, B. & Majumdar, S. (2005). Micropropagation of *Dendrobium Filmbriatum* Hook by Green pod Culture. *Journal of Plant Biology*, 48, 253-257.
22. Sheikh, A. (2004). *Agriculture of tropics and subtropics plants*. Thamenol hojaj. 530 p. (In Farsi)

23. Tanaka, M. & Sakanishi, Y. (1978). Factor affecting the growth of in vitro cultured buds from *Phalaenopsis* flower stalk. *Scientia Horticulturae*, 8, 169-178.
24. Tanaka, M., Kumara, M. & Goi, M. (1998). Optimal conditions for shoot production from Phalaenopsis Flower stalk cuttings cultured. *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 35, 117-126.
25. Vacin, E. F. & Went, F. W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, 605-613.

Iranian Journal of Horticultural Science, Vol. 47, No. 2, Summer 2016

Comparing sexual and asexual micropropagation potential for reduction of juvenile phase in Phalaenopsis orchid

Khosro Balilashaki[1], Ruhangiz Naderi[2*] and Siamak Kalantari[3]
1, 2, 3. Former M.Sc. Student, Associate Professors, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Oct. 25, 2014 - Accepted: Mar. 15, 2015)

ABSTRACT

Orchids are one of the most popular plants in the world and among them Phalaenopsis genus have the most sales in a Global Market. Because of its hard propagation, micropropagation technique has been employed recently. In this study, we tried to find out useful protocol for commercial production through in vitro culture. At first, for seed capsules production, flowers were pollinated with hand in different months. Afterwards, their seeds were compared for percentage and speed of germination in ½ MS, Vacin & Went and Chen media. The highest percent of seed germination (% 83.37) achieved from Chen medium. After that nodes on the Flower stalk were studied for their shoot formation potential. The best result (15.3 produced planets from one node) obtained from MS medium contained 4.40 mgL^{-1} BA and 1 mgL^{-1} NAA. Then, sterile leaves from produced plants were inoculated on Chen medium supplemented with TDZ, BA and NAA hormones in different concentrations for protocorm production. Best result was obtained (58.26 protocorm per explant) from 3 mgL^{-1} TDZ treatment. Finally, plants transferred to greenhouse for acclimatization and cultured on two different media. Plants produced from seed, node and leaf showed 99%, 100% and 93% survival on medium two, respectively. The shortest time span from acclimatization to flowering (16 month) of plants was achieved from plants obtained from nodes.

Keywords: Explant, flower stalk, leaf, protocorm, seed.

* Corresponding author E-mail: rnaderi@ut.ac.ir Tel: +98 9121614159