مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۱ شماره ۳ صفحه های ۲۹۹ تا ۳۰۸ (۱۳۹۹)
مقاله پژوهشی

تأثیر دما و مدت‌زمان ذخیره‌سازی بر فرایند جوانه‌زنی پروتوکورم کپسوله شده ثعلب سایه پسند[1]

Effect of Temperature and Storage Duration on Germination Process of Encapsulated Protocorms of *Dactylorhiza umbrosa*

زهرا مهدوی، شیرین دیانتی دیلمی*، ساسان علی نیایی فرد و علی فدوی[2]

چکیده

خطر نابودی، ارکیده‌های بومی دارای ارزش اقتصادی را تهدید می‌کند. فناوری بذر مصنوعی می‌تواند از انقراض این گیاهان جلوگیری نماید و برای تولید و صادرات محصول مناسب باشد. در این پژوهش پروتوکورم‌های ثعلب سایه‌پسند کپسوله شدند. اثر سه تیمار دمایی ۴، ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس طی سه دوره۳۰، ۶۰ و ۹۰ روزه ذخیره‌سازی بذرهای مصنوعی بررسی شد. درصد جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی در شرایط ذخیره‌سازی، پس از خروج از شرایط ذخیره‌سازی، درصد جوانه‌زنی کل و تعداد روز برای شروع جوانه‌زنی بررسی شد. بیشترین درصد جوانه‌زنی در شرایط ذخیره مربوط به تیمارهای ۹۰ روزه در دمای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس و کمترین مربوط به تیمار ۳۰ روزه در ۴ درجه سلسیوس بود. بیشترین درصد جوانه‌زنی پس از خروج از ذخیره‌سازی و کشت، در بذرهای ذخیره‌شده در ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس مشاهده شد. بیشترین درصد جوانه‌زنی کل مربوط به تیمارهای ذخیره‌شده در ۶۰ و ۹۰ روز به ترتیب در دمای ۲۰ و ۴ درجه سلسیوس حاصل شد. بیشترین تعداد روز برای شروع جوانه‌زنی در کشت‌های بعد از ۶۰ روز مشاهده شد. بهترین تیمار جهت ذخیره‌سازی در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ و ۶۰ روز بود که در شرایط ذخیره‌سازی کمترین و پس از کشت، بیشترین درصد جوانه‌زنی را داشت.

واژه‌های کلیدی: بذر مصنوعی، آلژینات سدیم، کشت درون شیشه‌ای، ارکیده.

مقدمه

تیره ارکیده یکی از بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین تیره‌های گیاهان گل‌دار است که شامل حدود ۸۰۰ جنس و بیش از ۲۵۰۰۰ گونه می‌باشد (۹). این گیاهان در سطح وسیعی از مناطق جهان رویش دارند به‌طوری‌که از قطب شمال تا قطب جنوب در بوته‌زارها، بیابان‌ها، دره‌ها، دشت‌ها، تپه‌ها، کوه‌ها و حتی زیر زمین رویش می‌یابند (۱۳).

تولید ارکیده فالانوپسیس[3] بیش از ۷۵٪ از تجارت ارکیده‌ها را به خود اختصاص داده است (۱۰). هرچند ارکیده‌ها اغلب به‌عنوان گیاهان زینتی مورد توجه قرار می‌گیرند، اما بعضی از انواع آن‌ها به‌عنوان داروهای گیاهی و غذا در بسیاری از کشورها و توسط قبیله‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). ارکیده‌های بومی ایران نیز

۱- تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۳/۱۹

۲- به‌ترتیب دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد، استادیاران، گروه علوم باغبانی، دانشیار گروه فناوری صنایع غذایی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (dianati@ut.ac.ir).

۳- *Phalaenopsis* orchid

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

به دلیل خواص دارویی، مصارف غذایی و ادویه‌ای مورد توجه هستند. ثعلب سایه‌پسند با نام علمی *Dactylorhiza umbrosa* از جمله ارکیده‌های بومی ایران است که هم گیاه و هم پودر غده‌های[1] آن با عنوان "ثعلب" شناخته می‌شوند و از نظر دارویی و مصارف غذایی ارزش زیادی دارند. شوربختانه عدم کشت و کار، وابستگی به رویشگاه‌های طبیعی، رشد کم و کند گیاه، ، قیمت بالا و تقاضای بالا در بازار سبب جمع‌آوری بی‌رویه این گیاه از طبیعت شده است. از این‌رو، راهبردی کارآمد برای افزایش و ذخیره ژرم پلاسم این‌گونه ارزشمند گیاهی و هم‌چنین برای استفاده از پتانسیل اقتصادی آن مورد نیاز است. با توجه به تغییرهای احتمالی محیط زیست در رویشگاه‌های ارکیده‌های بومی و یا برداشت بی‌رویه توسط مردم محلی، این احتمال وجود دارد که برخی از گونه‌های ارکیده دارای ارزش زینتی یا داروئی موجود، در معرض خطر انقراض قرار گیرند. افزایش بذری این گیاه در طبیعت همچون دیگر ارکیده‌ها از راه همزیستی بذر با قارچ مایکوریزا امکان‌پذیر می‌گردد و تولید گیاهچه یکی از دشواری‌های عمده در پرورش آن‌ها است که علت آن بذرهای بسیار ریز و بدون اندوخته غذایی و رویان‌های ابتدایی است. همین مسئله موجب شده تکثیر این ارکیده‌ها بیشتر از راه کشت درون شیشه‌ای بذر و ریزنمونه بافت‌های گیاهی انجام گیرد. خوشبختانه رویه فراگیر تکثیر بذری درون شیشه‌ای این نوع ثعلب به‌صورت کامل به‌دست‌آمده و قابل استفاده است (۱).

امروزه تولید بذر مصنوعی با استفاده از کپسوله کردن ریزنمونه گیاهی به ابزاری نوین و کارآمد در ریزافزایی و ذخیره‌سازی کوتاه مدت با هدف تولید در سطح وسیع و صادرات و هم‌چنین ذخیره‌سازی بلند مدت با هدف حفاظت از ژرم پلاسم گونه گیاهی در بانک ژن تبدیل‌شده است به‌گونه‌ای که این روش برای برخی از گیاهان زینتی و گونه‌های در حال انقراض به‌عنوان تنها راه افزایش مطرح شده است (۲۵). این فناوری می‌تواند جایگزینی مناسب جهت ذخیره ژرم پلاسم به جای یک خزانه یا مزرعه باشد. بذر مصنوعی هم‌چنین امکان ذخیره گیاهان هتروزیگوت یا گیاهانی دارای ژن‌های خاص حاصل از نوترکیبی ژنتیکی در هر نسل از افزایش با بذر را فراهم می‌نماید (۲۳). تولید بذر مصنوعی برای اولین بار توسط کیتو و جنیک در سال ۱۹۸۲ با استفاده از کپسوله کردن رویان‌های بدنی هویج انجام گرفت (۱۴). از جمله مزایای تولید بذرهای مصنوعی می‌توان به سهولت تولید هم‌گروه‌های گیاهی نسبت به بذر، حفظ و گسترش تنوع زیستی، ثبات ژنتیکی گونه‌های گیاهی نادر، تکثیر در مقیاس وسیع و هماهنگی و نظم بیشتر در برداشت محصول‌های مهم کشاورزی، سهولت در حمل‌ونقل، پتانسیل ذخیره‌سازی طولانی مدت بدون از دست دادن زنده‌مانی (زیوایی) و تولید و ازدیاد با هزینه‌های کم اشاره کرد (۱۹). در کل می‌توان گفت که هدف از توسعه فناوری بذر مصنوعی، ایجاد کلون‌هایی از ریزافزونه‌های رویشی است که بتوان آن‌ها را به مدت طولانی انبار و در زمان مورد نظر تعداد زیادی گیاه مشابه تکثیر نمود.

تولید بذر مصنوعی روشی عالی جهت ذخیره پروتوکورم ارکیده است که می‌توان آن را در دمای آزمایشگاه و یا حتی با استفاده از دمای پایین برای چندین هفته ذخیره نمود (۲۰). دستیابی به روشی کارآمد برای ذخیره‌سازی این محصول می‌تواند برای عرضه محصول متناسب با تقاضای بازار بسیار ارزشمند باشد و در درازمدت به صادرات این محصول به ویژه انواع دارویی- صنعتی ارکیده‌ها که از ارزآوری بالایی برخوردارند، کمک شایانی نماید.

تولید بذر مصنوعی با استفاده از پروتوکورم‌های بدنی در بسیاری از گونه‌های ارکیده مانند *Cymbidium giganteum*، *Dendrobium densiflorum*، *Dendrobium wardianum*، *Cattleya*، *Oncidium*، *Phaius tonkervillae* و *Spathoglottis plicata* ثبت شده است. پروتوکورم بدنی و پروتوکورم حاصل از بذر نیز به طور مؤثری برای تولید بذر مصنوعی گونه‌های مختلف گیاه ارکیده استفاده می‌شود (۳، ۲۱، ۲۶).

همان‌گونه که اشاره شد ذخیره‌سازی بذر مصنوعی یکی از اهداف فناوری تولید بذر مصنوعی بوده و در حال حاضر این فناوری به‌عنوان روشی کارآمد برای افزایش و ذخیره‌سازی کوتاه مدت و میان مدت برای چندین ارکیده مهم تجاری نیز در نظر گرفته شده است. بذر مصنوعی قادر است ریزنمونه گیاهی را در شرایط مناسب دمایی و

۱- Tuber

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

دوره‌های متفاوت ذخیره‌سازی، حفظ کرده و پس از دوره ذخیره‌سازی همانند یک بذر طبیعی عمل کند. افزون بر این، ذخیره‌سازی کوتاه مدت بذر مصنوعی در دمای پایین به علت عدم نیاز به نیروی کار ماهر و واکشت‌های متوالی کاربرد فراوانی داشته و باعث کاهش هزینه‌های مربوط به حفظ و نگهداری ژرم پلاسم گونه‌های ارزشمند می‌شود (۱۲). دما و مدت‌زمان نگهداری بذر مصنوعی به گیاه مورد نظر و ریزنمونه گیاهی از نظر میزان تحمل آن‌ها نسبت به دماها و زمان‌های نگهداری بستگی دارد (۱۷). هم‌چنین ارکیده‌ها بذرهایی تولید می‌کنند که نسبت به خشک شدن حساس هستند، بنابراین امکان ذخیره‌سازی طولانی مدت آن‌ها در بانک بذر وجود ندارد. نگهداری و ذخیره طولانی مدت رویان‌های بدنی به‌صورت بذر مصنوعی با حفظ تمام ویژگی‌های ژنتیکی می‌تواند جایگزین مناسبی برای ذخیره‌سازی طولانی مدت این گونه‌ها باشد که فنّاوری بذر مصنوعی تا حدودی توانسته این امکان را فراهم آورد.

هدف از این پژوهش بررسی شرایط ذخیره‌سازی از جمله دما و مدت‌زمان نگهداری بذرهای مصنوعی ارکیده "ثعلب سایه‌پسند" به منظور افزایش انبوه، ایجاد هم‌گروه، ذخیره و به دنبال آن استفاده از پتانسیل اقتصادی این محصول ارزشمند است.

مواد و روش‌ها

کشت بذر *Dactylorhiza umbrosa*

برای انجام آزمایش کپسول‌های رسیده بذر ثعلب سایه‌پسند در تیرماه از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و به روش دیانتی گندزدایی و بذرها در ظروف پتری کشت شدند (۱). بذرهای کشت‌شده برای جوانه‌زنی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی قرار گرفتند.

ساخت بذر مصنوعی

مناسب‌ترین روش برای ساخت بذر مصنوعی روش کپسول هیدروژل است که توسط ردنبوگ و همکاران (۱۹۸۷) معرفی شد (۲۰). به‌عنوان ریزنمونه از پروتوکورم‌های ۲ تا ۳ میلی‌متری حاصل از کشت بذر استفاده شد. برای تهیه ماده‌های کپسوله کننده، آلژینات سدیم در غلظت ۵٪ با محیط کشت مایع فاست[۱](۵) تغییریافته مخلوط شد. هم‌چنین کلرید کلسیم محلول در آب مقطر با غلظت ۱۵۰میلی مولار تهیه شد. کل فرایند ساخت بذر در شرایط سترون انجام شد. برای این منظور pH محلول‌ها قبل از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد و به‌وسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سترون شد. برای پوشش‌دار نمودن پروتوکورم‌ها و ساخت بذر مصنوعی، پروتوکورم‌ها همراه با محلول آلژینات سدیم به‌صورت قطره قطره داخل محلول کلرید کلسیم ۱۵۰ میلی مولار رها شد.

ذخیره‌سازی بذر مصنوعی

بذرهای مصنوعی ساخته شده پس از شستشو با آب مقطر، درون فالکون‌های پلی اتیلنی ۱۵ سی سی سترون قرار داده شدند. برای جلوگیری از خشک شدن بذرهای مصنوعی در هر فالکون ۱ سی سی آب مقطر سترون اضافه و درب فالکون‌ها پس از بستن با استفاده از پارافیلم به طور کامل مسدود شد و با دماهای مختلف در تاریکی تیمار شدند.

واکاوی داده‌ها

تیمارها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با ۳ تکرار اعمال شدند. هر تکرار شامل ۵ بذر مصنوعی (واحد آزمایشی) بود. فاکتورهای آزمایش شامل ۳ سطح دمایی (۴، ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس) و ۳ سطح زمانی (۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز) بود. داده‌برداری مربوط به درصد جوانه‌زنی در شرایط ذخیره‌سازی، درصد جوانه‌زنی پس از خاتمه دوره‌های ذخیره‌سازی و کشت روی محیط فاست تغییریافته (درصد جوانه‌زنی ۵ بذر کشت شده در هر یک از ۳ پتری) و درصد جوانه‌زنی کل (مجموع درصد جوانه‌زنی هر دو شرایط ذخیره‌سازی و شرایط پس از ذخیره‌سازی) ۵۰ روز پس از کشت بذرهای مصنوعی (۲۴) و نیز داده برداری تعداد روز برای شروع جوانه‌زنی (مشاهده اولین جوانه‌زنی در بذرهای پس از کشت) انجام گرفت. واکاوی داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

۱- FAST medium (1976)

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

نتایج

نتیجه‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها اختلاف معنی‌دار بین اثر تیمارهای دما و مدت‌زمان ذخیره‌سازی نشان داد. هم‌چنین برهمکنش دما و مدت‌زمان بر درصد جوانه‌زنی در شرایط ذخیره‌سازی، درصد جوانه‌زنی کل و درصد جوانه‌زنی در شرایط کشت پس از خاتمه ذخیره‌سازی اختلاف معنی‌داری را نیز در سطح احتمال ۱٪ نشان داد. هم‌چنین تیمارهای زمانی در طول دوره ذخیره‌سازی بر تعداد روز برای شروع جوانه‌زنی بذر مصنوعی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ داشتند. درحالی‌که تیمارهای دمایی و برهمکنش دما و زمان در طول دوره ذخیره‌سازی اختلاف معنی‌داری بر تعداد روز برای شروع جوانه‌زنی نداشت.

مقایسه میانگین اثر دما بر درصد جوانه‌زنی کل نشان داد مناسب‌ترین دما برای ذخیره‌سازی بذر مصنوعی ثعلب سایه‌پسند دمای ۲۰ درجه سلسیوس با ۹۱/۱۱٪ جوانه‌زنی پس از ذخیره‌سازی و پس از آن دمای ۲۵ درجه سلسیوس با ۸۴/۴۴٪ جوانه‌زنی بود. کمترین درصد جوانه‌زنی کل پس از ذخیره‌سازی (۷۵٪) در تیمار دمایی ۴ درجه سلسیوس مشاهده شد (جدول ۱).

جدول۱ – اثر سه دمای ذخیره‌سازی بر میانگین درصد جوانه‌زنی کل بذر مصنوعی ارکیده *Dactylorhiza umbrosa* .

Table 1. Effect of three storage temperatures on average total germination percentage of artificial seed of orchid *Dactylorhiza umbrosa*.

دمای ذخیره‌سازی (°C) Storage temperatures (°C)	درصد جوانه‌زنی (٪) Germination (%)
4	75[c]
20	91.11[a]
25	84.44[b]

† Means within a column followed by the same letters are not significantly different at P≤0.01 according to Duncan's multiple range test.

† در هر ستون، میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک، بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

هم‌چنین مقایسه میانگین اثر زمان بر درصد جوانه‌زنی کل نشان داد با افزایش زمان ذخیره‌سازی بذرهای مصنوعی ثعلب سایه‌پسند، درصد جوانه‌زنی کل نیز افزایش یافت به‌طوری‌که در هر سه تیمار دمایی، بذرهایی که به مدت ۶۰ روز ذخیره‌شده بودند پس از کشت، درصد جوانه‌زنی بیشتری نسبت به ۳۰ روز ذخیره‌سازی داشتند (جدول ۲). بیشترین درصد جوانه‌زنی کل ثعلب سایه‌پسند (۹۵/۵۶) پس از ذخیره‌سازی مربوط به تیمار ۹۰ روز ذخیره در دمای ۴ درجه سلسیوس بود (جدول ۲). بررسی برهمکنش‌ها نشان داد که در دمای ۴ درجه سلسیوس، تفاوت معنی‌داری بین هر سه زمان ذخیره‌سازی وجود داشت. درحالی‌که در دو تیمار ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس بین دوره‌های ذخیره‌سازی ۶۰ و ۹۰ روز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱).

جدول۲- اثر سه زمان ذخیره‌سازی بر میانگین درصد جوانه‌زنی کل بذرهای مصنوعی ثعلب سایه پسند .

Table 2. Effect of three storage times on average of total artificial seeds germination percentage of *Dactylorhiza umbrosa*.

مدت زمان ذخیره‌سازی (روز) Storage time (day)	درصد جوانه‌زنی Germination%
30	61.67[b]
60	93.33[a]
90	95.56[a]

† Means within a column followed by the same letters are not significantly different at P≤0.01 according to Duncan's multiple range test.

† در هر ستون، میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

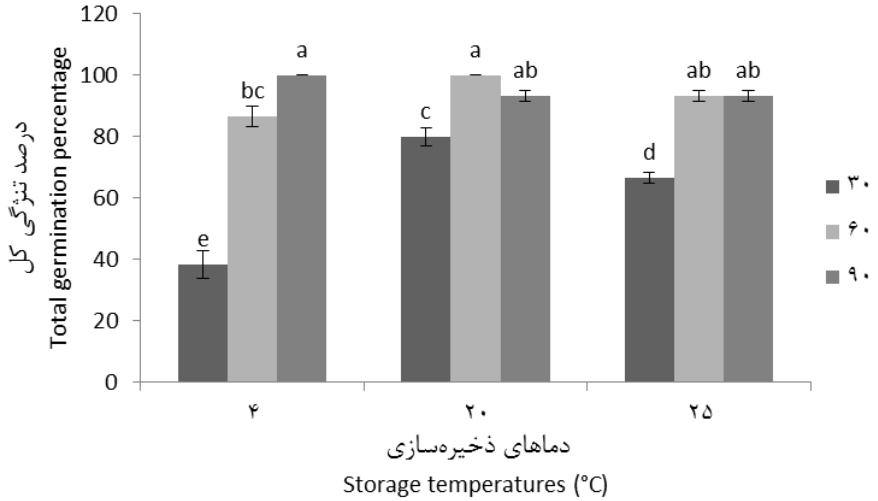

Fig. 1. The interaction of temperature and storage time on total germination percentage of *Dactylorhiza umbrosa* artificial seeds. E The error bars show the standard error of three replications.

شکل ۱ـ برهمکنش دما و زمان ذخیره‌سازی بر درصد جوانه‌زنی کل بذرهای مصنوعی ثعلب سایه پسند. نوار خطا بیانگر خطای استاندارد سه تکرار است.

مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی در طول ذخیره‌سازی نشان داد مناسب‌ترین دمای ذخیره‌سازی جهت جلوگیری از جوانه‌زنی بذر مصنوعی دمای ۴ درجه سلسیوس با کمترین درصد جوانه‌زنی (۳۳/۳۳٪) بود و بین درصد جوانه‌زنی دو تیمار دمایی ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳).

جدول ۳- درصد جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی ثعلب سایه پسند در طول ذخیره‌سازی (قبل از کشت) در سه دمای ۴، ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس.

Table 3. The percentage of artificial seeds germination of *Dactylorhiza umbrosa* during storage (before culturing) in three temperatures (4, 20, and 25 ° C).

درصد جوانه‌زنی در دوره ذخیره‌سازی Germination (%) during storage	دمای ذخیره‌سازی Storage temperature (° C)
33.33[c]	4
64.44[a]	20
53.33[b]	25

† Means within a column followed by the same letters are not significantly different at P≤0.01 according to Duncan's multiple range test.

† در هر ستون، میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

بیشترین درصد جوانه‌زنی در شرایط ذخیره‌سازی در مدت ۹۰ روز ذخیره‌سازی در دماهای ۴ و ۲۰ درجه سلسیوس و کمترین آن در مدت ۳۰ روز ذخیره‌سازی در دمای ۴ درجه سلسیوس مشاهده شد (شکل ۲).

بیشترین تعداد روز برای شروع جوانه‌زنی (۲/۸۹ روز) در بذرهای مصنوعی ذخیره‌شده در ۶۰ روز ذخیره‌سازی مشاهده شد (شکل ۳ و جدول ۴) و بین تیمارهای زمانی ۳۰ و ۹۰ روز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۴).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

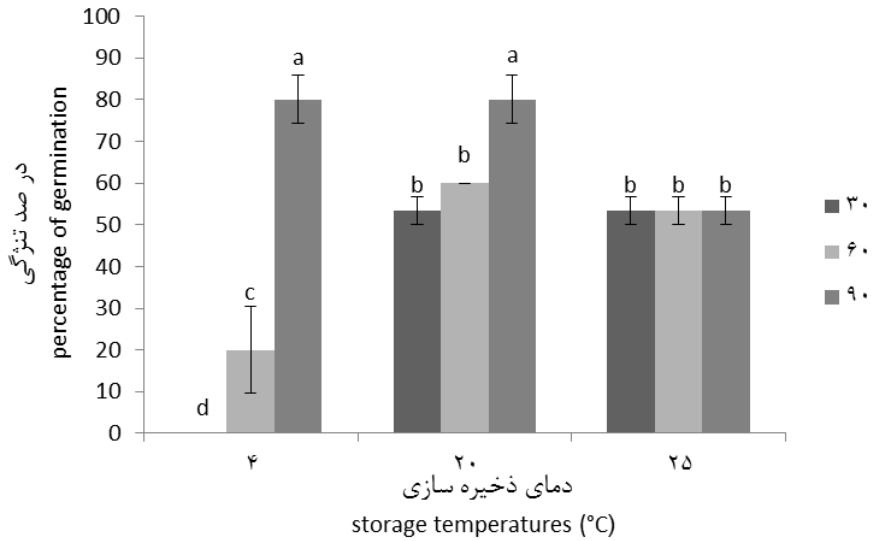

Fig. 2. The interaction of temperature and time on the percentage of artificial seed germination in storage conditions (before culturing). Error bar shows the standard error of three repeats.

شکل ۲- برهمکنش دما و زمان بر در صد جوانه‌زنی بذر مصنوعی در شرایط ذخیره‌سازی (قبل از کشت). نوار خطا بیانگر خطای استاندارد سه تکرار است.

جدول ۴- تعداد روز لازم برای شروع جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی ثعلب سایه پسند، پس از خاتمه زمان ذخیره‌سازی.

Table 4. The number of days required to start *Dactylorhiza umbrosa* artificial seeds germination, after the end of the storage time.

تعداد روز لازم برای شروع جوانه‌زنی بذرها The number of days required for artificial seeds germination	مدت زمان ذخیره‌سازی (روز) Storage time (day)
1.55[b]	30
2.89[a]	60
1.22[b]	90

† Means within a column followed by the same letters are not significantly different at P≤0.01 according to Duncan's multiple range test.

† در هر ستون، میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

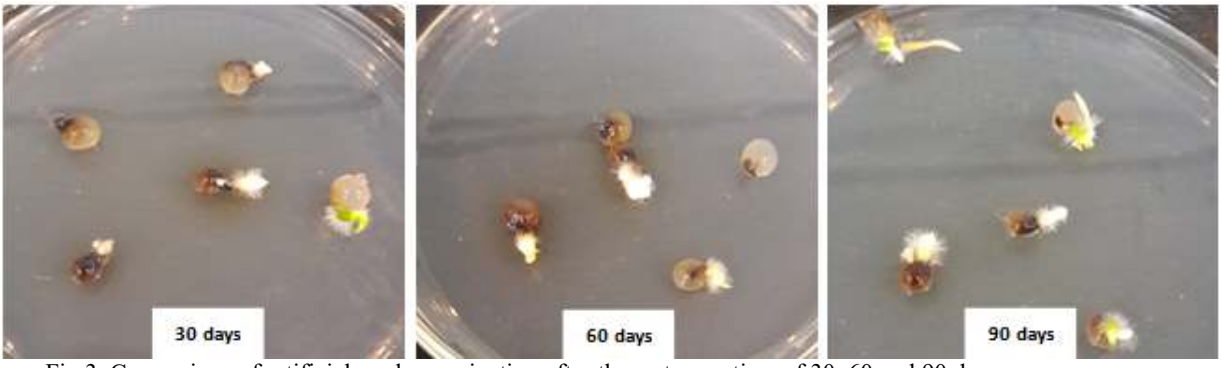

Fig 3. Comparison of artificial seeds germination after three storage time of 30, 60 and 90 days.

شکل ۳ـ مقایسه جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی پس از سه زمان ذخیره‌سازی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روزه.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

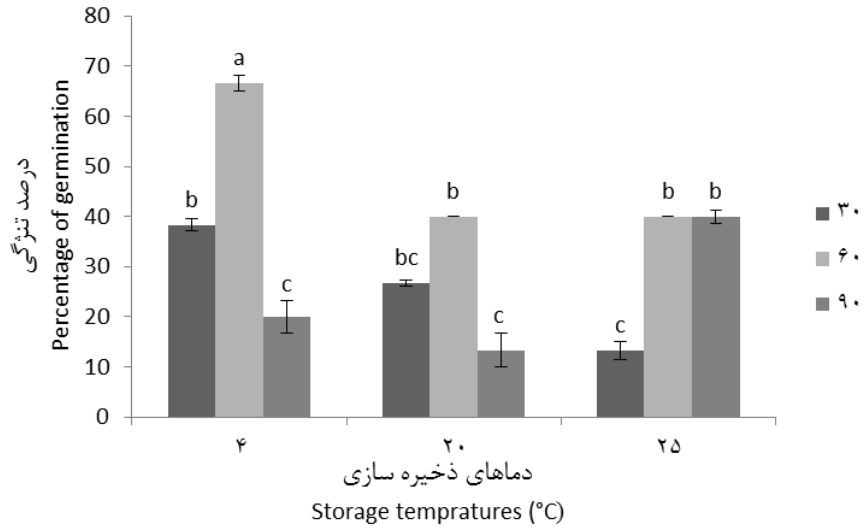

Fig. 4. The interaction of temperature and storage time on artificial seed germination percentage, after storage and 50 days after culture. Error bar shows the standard error of three repeats.

شکل ۴- برهمکنش دما و زمان بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی پس از خروج از شرایط ذخیره‌سازی و ۵۰ روز پس از کشت. نوار خطا بیانگر خطای استاندارد سه تکرار است.

بررسی برهمکنش دما و مدت زمان ذخیره‌سازی بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی پس از خروج از شرایط ذخیره‌سازی و ۵۰ روز پس از کشت نشان داد ذخیره‌سازی در تیمار دمای ۴ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌داری بین درصد جوانه‌زنی در هر سه زمان ذخیره‌سازی ایجاد نموده است، به‌طوری‌که بیشترین درصد جوانه‌زنی در بذرهای ذخیره شده در ۶۰ روز و کمترین درصد جوانه‌زنی در ۹۰ روز مشاهده شد (شکل ۴). این روند در تیمار ۲۰ درجه سلسیوس نیز مشاهده شد به‌طوری‌که تیمار ۶۰ روز بیشترین و تیمار ۹۰ روز کمترین جوانه‌زنی را نشان داد که البته تیمار ۳۰ روز تفاوت معنی‌داری با ۶۰ و ۹۰ روز نشان نداد. هم‌چنین درصد جوانه‌زنی در تیمار ۳۰ و ۶۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نیز همانند تیمارهای دو دمای دیگر بود و تنها تفاوت بین دو زمان ۶۰ و ۹۰ روز بود که تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴). بیشترین درصد جوانه‌زنی در بذرهای ذخیره‌شده در مدت ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس و کمترین آن مربوط به ۹۰ روز ذخیره‌سازی در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و۳۰ روز ذخیره‌سازی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود (شکل ۴).

بحث

در این پژوهش بالاترین درصد جوانه‌زنی کل در تیمار ۴ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ روز و تیمار دمای ۲۰ درجه سلسیوس در مدت ۶۰ روز مشاهده شد. کمترین درصد جوانه‌زنی کل مربوط به تیمار ۳۰ روز در هر سه تیمار دمایی بود (شکل ۱). در پژوهش‌های قبلی انجام شده روی ارکیده‌ها، ذخیره‌سازی بذرهای مصنوعی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نسبت به دمای ۴ درجه سلسیوس مناسب‌ترین دما جهت جوانه‌زنی بذر مصنوعی ارکیده‌هایی همچون *Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue'×*Vanda coerulea* Grifft. ex. Lindl. و *Cymbidium bicolor* Lindl گزارش شده است (۷، ۱۵). این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت نوع ارکیده مورد مطالعه و شرایط آب و هوایی منطقه زیستی آن‌ها باشد. ارکیده‌های خاکرست مناطق معتدله نیاز به دماهای پایین دارند به‌طوری‌که دوره خواب جوانه گل ارکیده خاکرست مناطق معتدله با استفاده از تیمار سرمایی از بین می‌رود (۱۸)، درصورتی‌که ارکیده‌های بیان‌شده در پژوهش‌های بالا گرمسیری بوده و به طور طبیعی نیاز دمایی بالاتری داشته و نسبت به دماهای پایین حساس‌تر هستند. گزارش شده است که ذخیره‌سازی پروتوکورم‌های کپسوله‌شده به شدت زیر تأثیر دما است. با این حال، پاسخ بذرهای مصنوعی به دمای ذخیره‌سازی به گونه گیاهی بستگی دارد (۶).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

بیشترین درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی ثعلب سایه‌پسند پس از خاتمه ذخیره‌سازی و کشت، مربوط به تیمار ۶۰ روز در ۴ درجه سلسیوس بود. گزارش شده بذرهای مصنوعی ارکیده *Coelogyne breviscapa* Lindl ذخیره‌شده در دمای ۴ درجه سلسیوس نسبت به آن‌هایی که در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ذخیره شدند، درصد جوانه‌زنی بالاتری را نشان دادند (۱۶).

مناسب‌ترین دمای ذخیره‌سازی برای جلوگیری از جوانه‌زنی بذر مصنوعی ثعلب سایه پسند در طی شرایط ذخیره‌سازی، دمای ۴ درجه سلسیوس بود. ذخیره‌سازی در دمای پایین باعث کاهش فعالیت‌های متابولیکی بذرهای مصنوعی شده که این باعث می‌شود ماده‌های مغذی داخل ماتریس بذر مصنوعی حفظ شده و ریزنمونه در یک حالت غیرفعال باقی بماند (۸، ۱۱). بیشترین درصد جوانه‌زنی پیش از کشت در طی مدت ۹۰ روز ذخیره‌سازی در دماهای ۴ و ۲۰ درجه سلسیوس بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر و کمترین آن در مدت ۳۰ روز ذخیره‌سازی در دمای ۴ درجه سلسیوس مشاهده شد. داده برداری‌ها نشان می‌دهد با افزایش مدت ذخیره‌سازی در دو دمای ۴ و ۲۰ درجه سلسیوس درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی در شرایط ذخیره‌سازی نیز افزایش یافت که این افزایش در تیمار دمایی ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده نشد. به نظر می‌رسد این روند افزایشی در دو دمای ۴ و ۲۰ درجه سلسیوس در درجه اول به خاطر قابلیت دسترسی بیشتر به ماده‌های مغذی موجود در ماتریس بذر مصنوعی به مرور زمان است که با وجود قرار دادن بذرها در شرایط جوانه‌زنی نامناسب از لحاظ نوری (تاریکی)، تعدادی از بذرهای مصنوعی با استفاده از عنصرهای غذایی موجود در کپسول بذر توانستند به مرور در طی مدت ذخیره‌سازی جوانه‌زنی داشته باشند. البته، این روند در دمای ۲۵ درجه سلسیوس که دمای مناسب برای رشد گیاهان در شرایط مصنوعی است، به‌صورت یکنواخت رخ داده و با افزایش مدت زمان انبار داری تغییر معنی‌داری نداشته است. در بررسی‌های پیشین اشاره شده که با افزایش مدت ذخیره‌سازی درصد جوانه‌زنی در شرایط ذخیره‌سازی افزایش می‌یابد. دلیل این امر استفاده از منبع غذایی موجود در کپسول بذر به‌وسیله پروتوکورم و به دنبال آن رشد و جوانه‌زنی بیان شده است (۲۲).

بیشترین درصد جوانه‌زنی پس از کشت در بذرهای ذخیره‌شده در مدت ۶۰ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس و کمترین آن مربوط به ۹۰ روز ذخیره‌سازی در دمای ۴ و ۲۰ درجه سلسیوس و ۳۰ روز ذخیره‌سازی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود (شکل ۴). اگرچه براساس شکل ۴ مناسب‌ترین دوره ذخیره‌سازی جهت بیشترین جوانه‌زنی بذر مصنوعی پس از خروج از شرایط ذخیره‌سازی، مدت ۶۰ روز است که در هر سه دما نسبت به دیگر تیمارها بیشترین درصد جوانه‌زنی را نشان داد، اما در صورت مقایسه با نمودار شکل ۲ بهترین تیمار جهت جوانه‌زنی پس از خروج از شرایط ذخیره‌سازی، تیمار ۴ درجه سلسیوس و مدت ۳۰ و ۶۰ روز می‌باشد. در واقع بهترین تیمار جهت ذخیره‌سازی بذر مصنوعی تیماری است که در شرایط ذخیره‌سازی کمترین و پس از خروج از شرایط ذخیره‌سازی و کشت، بیشترین درصد جوانه‌زنی را نشان دهد. بنابراین، تیمار ۴ درجه سلسیوس و ۳۰ روز بدون هیچ‌گونه جوانه‌زنی و تیمار ۴ درجه سلسیوس و ۶۰ روز با ۲۰ درصد جوانه‌زنی کمترین جوانه‌زنی را در شرایط ذخیره‌سازی نسبت به دیگر تیمارها نشان دادند که پس از کشت به ترتیب ۳۸/۳۳ و ۶۶/۶۶٪ جوانه‌زنی را داشته و بهترین تیمار می‌باشد. البته، انتخاب بهترین تیمار بر اساس هدف مورد نظر متغیر باشد. در واقع چنانچه هدف جوانه‌زنی بیشتر و ورود سریع محصول به بازار باشد و جوانه‌زنی داخل انبار اهمیت نداشته باشد می‌توان بهترین تیمار را براساس نمودار مربوط به جوانه‌زنی کل، تیمارهای ۹۰ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس و ۹۰ و ۶۰ روز در دماهای ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس معرفی کرد.

بیشترین تعداد روز برای شروع جوانه‌زنی در بذرهای مصنوعی ذخیره‌شده در ۶۰ روز ذخیره‌سازی مشاهده شد و بین تیمارهای زمانی ۳۰ و ۹۰ روز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۴). به‌طورکلی، گزارش‌شده است که زمان لازم برای جوانه‌زنی و تشکیل گیاهان با افزایش دوره ذخیره‌سازی بذرهای مصنوعی افزایش می‌یابد. در حقیقت، سرعت جوانه‌زنی کاهش می‌یابد (۲۱). این گزارش با نتیجه‌های مربوط به مدت‌زمان ۳۰ و ۶۰ روز همخوانی داشته، اما بذرهای ذخیره‌شده در مدت ۹۰ روز در تعداد روز کمتری نسبت به ۶۰ روز دیگر جوانه‌زنی داشت و این موضوع با افزایش درصد جوانه‌زنی در طول دوره ذخیره‌سازی همپوشانی دارد. در حقیقت، بذرهایی که در مدت بیشتر از ۶۰ روز ذخیره شده‌اند (۹۰ روز) فرصت بیشتری برای شروع مرحله جوانه‌زنی داشته‌اند و به‌محض قرارگیری روی محیط کشت سرعت بیشتری را در جوانه‌زنی نسبت به تیمارهای ۳۰ و ۶۰ روزه نشان دادند.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

نتیجه‌گیری

در میان ۳ تیمار ذخیره‌سازی، دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ روز و دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ روز مناسب‌ترین تیمارها جهت بیشترین درصد جوانه‌زنی کل بذرهای مصنوعی بود. اگرچه بهترین تیمار جهت ذخیره‌سازی بذر مصنوعی تیماری است که در شرایط ذخیره‌سازی کمترین درصد جوانه‌زنی و پس از خروج از شرایط ذخیره‌سازی و کشت، بیشترین درصد جوانه‌زنی را نشان دهد. لذا مناسب‌ترین تیمار جهت ذخیره‌سازی بذر مصنوعی ارکیده *Dactylorhiza umbrosa* تیمار ۴ درجه سلسیوس و مدت ۳۰ و ۶۰ روز می‌باشد. از طرفی چنانچه هدف ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت و ورود سریع محصول به بازار باشد و جوانه‌زنی داخل انبار اهمیت نداشته باشد می‌توان بهترین تیمار دمایی را براساس جدول ۱ دماهای ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس با بیشترین درصد جوانه‌زنی معرفی کرد.

افزایش دوره ذخیره‌سازی باعث افزایش درصد جوانه‌زنی در طی شرایط ذخیره‌سازی شد و این به علت وجود محیط مغذی در ماتریس بذر مصنوعی بود. در حقیقت، با افزایش مدت ذخیره‌سازی، پروتوکورم پوشیده در کپسول توانست از محلول مغذی استفاده و تا حدودی جوانه‌زنی را آغاز نماید که البته پس از ۶۰ روز ذخیره‌سازی قدرت و سرعت جوانه‌زنی روند صعودی پیدا کرد و در تعداد روز کمتری جوانه‌زنی داشت. به نظر می‌رسد می‌توان با تغییر در میزان و درصد محلول مغذی ماتریس و با کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، جوانه‌زنی بذر مصنوعی این نوع ارکیده را در شرایط ذخیره‌سازی کنترل و مانع از آن شد. بنابراین، این مسئله نیازمند پژوهش و مطالعه بیشتری می‌باشد.

منابع References

1. Dianati Daylami, Sh., 1392. Study of seed germination, floral transition and expression of some related gene in some Iranian Orchids, Thesis for the Doctor of Philosophy in Horticulture Sciences, University of Tehran, Department of Horticulture Sciences and Landescape, 296
2. Moradi, Sh., Sh. Dianati Daylami, K. Vahdati, M., Arab, 2016. Effect of medium, explants and BA on somatic embryogenesis induction in tow Iranian native orchids, J. Plant Prod. Res. 22, (4): 119-132
3. Ara, H., U. Jaiswal, and V. Jaiswal. 2000. Synthetic seed: prospects and limitations. Current Sci. 78 (12): 1438-1444.
4. Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. lohn Wiley and Sons. New York, New York.
5. FAST, G. 1976. Moglichkeiten zur Massenvermehrung von Cypripedium calceolus und anderen europaischen Wildorchideen. Proceedings of the Eighth World Orchid Conference. Frankfurt, Germany: German Orchid Society (in German).
6. Gantait, S., S. Bustam, and U. R. Sinniah. 2012. Alginate-encapsulation, short-term storage and plant regeneration from protocorm-like bodies of Aranda Wan Chark Kuan 'Blue'× Vanda coerulea Grifft. ex. Lindl.(Orchidaceae). Plant Growth Regul. 68: 303-311.
7. Gantait, S., U. R. Sinniah. 2013. Storability, post-storage conversion and genetic stability assessment of alginate-encapsulated shoot tips of monopodial orchid hybrid *Aranda* Wan Chark Kuan 'Blue'× *Vanda coerulea* Grifft. ex. Lindl. Plant Biot. Rep. 7: 257-266.
8. Gantait, S., J. Vijayan, and A. Majee. 2017. Artificial seed production of *Tylophora indica* for interim storing and swapping of germplasm. Hort. Plant J. 3: 41-46.
9. Garay, L. A. 1960. On the origin of the Orchidaceae. Botanical Museum Leaflets, Harvard University, 19: 57-96.
10. Griesbach, R. 2002. Development of Phalaenopsis orchids for the mass-market. Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 458-465.
11. Gupta, A. 2016. Regeneration of *Renanthera imschootiana* Rolfe Using Synthetic Seeds. Inter. Adv. Res. J. Sci. Eng. Technol. 3: 286-289.
12. Haque, S.M. and B. Ghosh. 2016. High-frequency somatic embryogenesis and artificial seeds for mass production of true-to-type plants in *Ledebouria revoluta*: an important cardioprotective plant. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. (PCTOC). 127: 71-83.
13. Hatch, E. 1953. Orquideas subterraneas. Orquidea, 15 (1): 2-11.
14. Kitto, S. K. and J. Janick. 1982. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. Hort. Sci. 17: 488-490.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

15. Mahendran, G., D.N. Parimala, and B.V. Narmatha. 2014. Encapsulation of Protocorm of *Cymbidium bicolor* Lindl. for Short-Term Storage and Germplasm Exchange.
16. Mohanraj, R., R. Ananthan, and V. Bai. 2009. Production and storage of synthetic seeds in *Coelogyne breviscapa* Lindl. Asian J. Biot. 1: 124-128.
17. Nyende, A. B., S. Schittenhelm., G. Mix-Wagner, and J. M. Greef. 2003. Production, storability, and regeneration of shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant , 39: 540-544.
18. Rasmussen, H. N. 1995. Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant, Cambridge University Press.
19. Ravi, D. and P. Anand. 2012. Production and applications of artificial seeds: a review. Int. Res. J. Biol. Sci. 1: 74-78
20. Redenbaugh, K. 1993. Synseeds : applications of synthetic seeds to crop improvement, Boca Raton; Ann Arbor; London, , Tokyo.131-161
21. Saiprasad, G. and R. Polisetty. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant, 39: 42-48.
22. Sarmah, D. K, M. Borthakur, and P. Borua. 2010. Artificial seed production from encapsulated PLBs regenerated from leaf base of Vanda coerulea Grifft. ex. Lindl.–an endangered orchid. Curr. Sci. VOL. 98, NO. 5, 686-690.
23. Sharma, H. P. 2012. Plant Tissue Culture: Totipotency to Transgenic, Publisher: AGROBIOS (January 1, 2012), ISBN-10 : 9788177544671
24. Siew, W.L., M.Y. Kwok,. Y.M. Ong,. Liew, H.P. and B.K. Yew. 2014. Effective Use of Synthetic Seed Technology in the Regeneration of Dendrobium White Fairy Orchid. J. Ornam. Hort. Plants, 4(1-7).
25. Standardi, A. and E. Piccioni. 1997. Rooting induction in encapsulated buds of M. 26 apple rootstock for synthetic seed. In Biology of root formation and development. Springer, Boston, MA. 309-313.
26. Vij, S., P. Kaur, and A. Gupta. 2001. Synseeds and their utility in orchids: *Dendrobium densiflorum* Lindl. Phytomorphol. 51: 159-165.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 21 (3): 299 - 308 (2020)
Research article

Effect of Temperature and Storage Duration on Germination Process of Encapsulated Protocorms of *Dactylorhiza umbrosa*

Z. Mahdavi, Sh. Dianati Daylami*,S. Aliniaefard and A. Fadavi[1]

The extinction threatens some native orchids which has economic value. Artificial seed technology can prevent the extinction of these plants and can be suitable for producing and exporting of product. In this study, protocorms of Dactylorhiza umbrosa were encapsulated. The effects of three temperature treatments 4, 20, and 25°C were investigated during three periods 30, 60, and 90-days of artificial seed storage. Percentage of artificial seed germination during storage conditions, after storage, total percentage of germination and number of days required for germination incidence, were investigated. The highest germination percent during storage conditions was related to 90-days storage at 4 and 25 ° C, and the lowest obtained after 30 days at 4 ° C, which did not show any germination. The highest germination percentage of artificial seeds after storage and cultivation was observed in 60 days stored seeds at 4 °C. The highest total percentage of germination was obtained after 60 and 90 days storage at 20 and 4 °C, respectively. The highest number of days befor germination incidence was observed after 60 days of storage. The best treatment for storage of artificial seeds was 4 °C for 30 and 60 days, which showed the lowest percentage of germination during storage conditions and the highest percentage of germination after culturing.

Keywords: Artificial seed, Sodium alginate, In vitro culture, Orchid.

1. Former M.Sc. Student, Assistant Professors, Department of Horticultural Science and Associate Professor of Department of Food Technology, Aburaihan College, University of Tehran, Tehran, Iran, respectively.
* Corresponding author, Email: (dianati@ut.ac.ir).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-06]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.1.9]