

## تأثیر استفاده از سوبستراهای مصنوعی بر خصوصیات رشدی ارکیدهای خاک‌رست *Epipactis veratrifolia* در شرایط درون شیشه‌ای

زهره سلطانی<sup>۱</sup>، شیرین دیانتي دیلمی<sup>۲\*</sup>، ساسان علی نیایی فرد<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

<sup>۲\*</sup> استادیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

\* نویسنده مسئول: [dianati@ut.ac.ir](mailto:dianati@ut.ac.ir)

### چکیده

ارکیدهای خاک‌رست *Epipactis veratrifolia* معمولی از گونه‌های ریزوم‌دار و بومی مناطق سردسیر و معتدل ایران است. این گونه از نظر داروئی و زیبایی حائز اهمیت است و به دلیل خواص متعدد درمانی به صورت بی‌رویه از رویشگاه‌های طبیعی برداشت می‌شود. در این مطالعه گیاهچه‌های سه برگچه‌ای این گونه در تیمارهای درون شیشه‌ای محیط کشت جامد فاست به‌عنوان شاهد و تیمارهای محیط مایع فاست با سوبستراهای مصنوعی مختلف نظیر پرلیت، کوکوپیت و پوکه معدنی، از نظر خصوصیات رشدی مورد بررسی قرار گرفتند. تیمار حاوی پرلیت به علت عدم تغییر اسیدیته‌ی محیط کشت، افزایش میزان تهویه و تبادلات گازی دارای بیشترین میزان شاخص‌های رشدی نظیر تعداد برگ، ساقه و ریشه، سطح برگ، طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی بود. تیمارهای حاوی پوکه معدنی به علت تغییر اسیدیته‌ی محیط و تیمار حاوی کوکوپیت به علت تهویه‌ی ناکافی، گیاهچه‌ها را در وضع نامطلوبی از نظر شاخص‌های رشدی قرار داده بودند. در نتیجه محیط مایع فاست با سوبسترای پرلیت به‌عنوان محیطی مناسب جهت تکثیر و رشد ارکید خاک‌رست *Epipactis veratrifolia* معمولی در شرایط درون شیشه‌ای توصیه می‌شود. کلمات کلیدی: محیط کشت فاست، پرلیت، کوکوپیت، پوکه معدنی، شاخص‌های رشدی

### مقدمه

ارکیدهای خربقی معمولی *Epipactis veratrifolia* از جمله ارکیدهای خاک‌رست ریزوم‌دار و بومی مناطق معتدل ایران است که از منظر داروئی و زینتی حائز اهمیت و مورد توجه است. از برگ‌های این گیاه در طب سنتی هند جهت درمان تب مزمن و از ریزوم‌های آن به‌عنوان داروی تقویت جنسی استفاده می‌گردد (Dogan et al., 2004; Dangwal et al., 2010). با توجه به پتانسیل بالقوه‌ی این گونه در فرآیند اصلاح گیاهان زینتی و ارزش داروئی آن و همچنین حفظ و احیای ذخایر ژنتیکی ایران، مطالعات بیشتر در زمینه‌ی کشت این گونه در شرایط کنترل شده‌ی درون شیشه‌ای ضروری به نظر می‌رسد.

ریزازدیادی گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای روشی سریع و مطمئن در راستای هدایت رشدی گیاهان می‌باشد. مواد تشکیل دهنده‌ی یک محیط کشت، تعیین کننده‌ی عوامل مؤثر بر رشد گونه‌ی مورد نظر است. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که مایع یا جامد بودن محیط کشت بر جذب عناصر غذایی و در نتیجه میزان رشد گیاه تأثیرگذار است. استفاده از سوبسترای مصنوعی جهت استقرار گیاهچه در فاز مایع الزامی‌ست. بروچارد و همکاران بیشترین ریشه‌زایی را در محیط مایع حاوی سوبسترای مصنوعی مشاهده کردند و علت این امر را افزایش تهویه در این محیط بیان داشتند (Brochard, 1991). همچنین استفاده از این مواد سبب کاهش تنش ناشی از انتقال به محیط طبیعی در گیاهان حاصل از کشت درون شیشه‌ای می‌گردد (Lucchesini and Vitagliano, 2000).

<sup>1</sup> Micropropagation

<sup>2</sup> Artificial substrates

علی‌رغم دستیابی به پروتکل مناسب برای تکثیر درون‌شیشه‌ای ارکیده‌ی خاک‌رست خربقی معمولی (Dianati et al., 2013)، اثر شکل استفاده از محیط کشت (مایع یا جامد با آگار) و بسترهای کشت به‌عنوان سوبسترای مصنوعی بر خصوصیات رشدی این گونه بررسی نشده است. هدف این مطالعه بررسی اثرات حاصل از تغییر فاز محیط فاست و همچنین استفاده از سوبسترای مصنوعی در فاز مایع این محیط بر خصوصیات رشدی گونه‌ی خربقی معمولی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

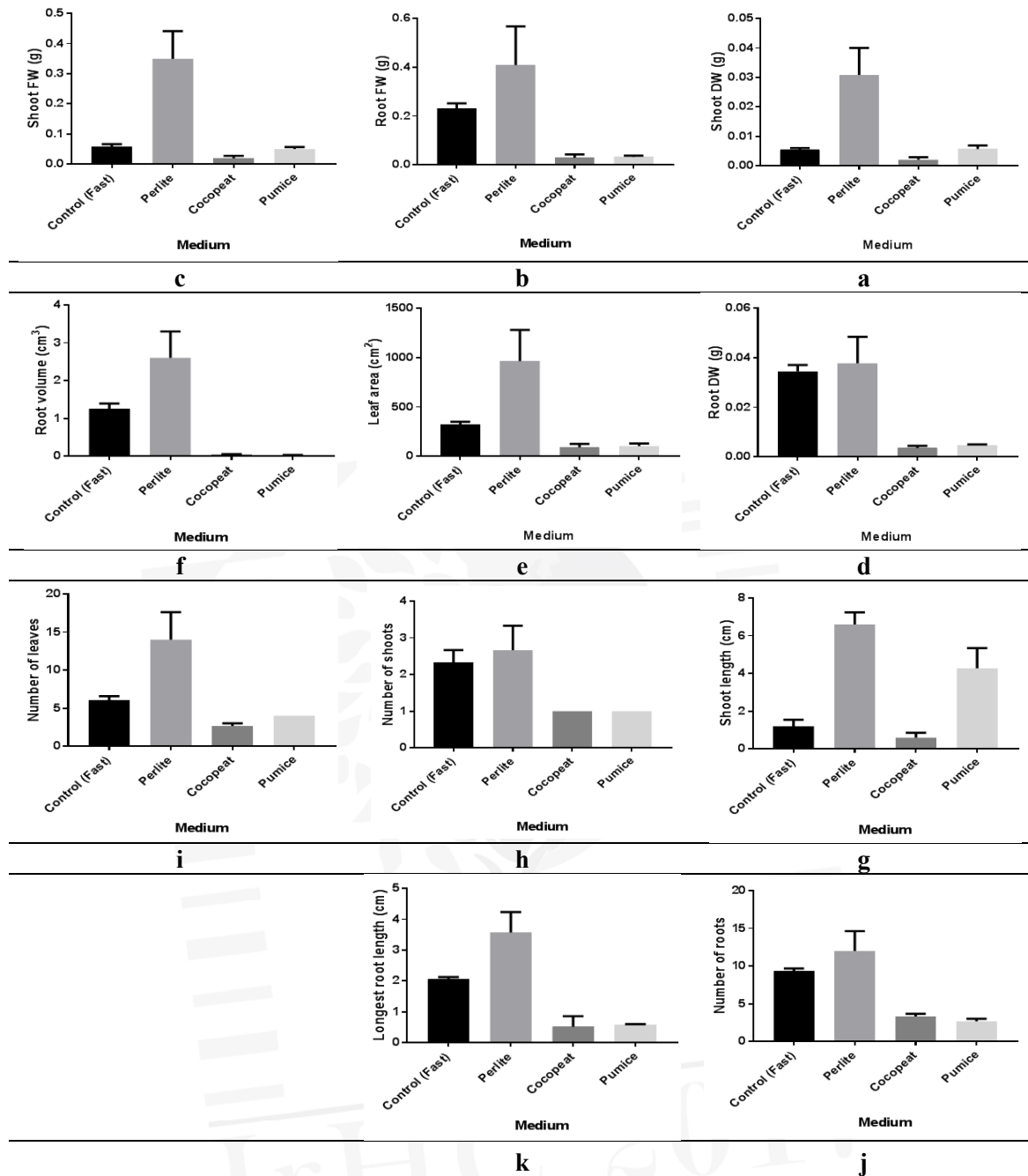
بذرهای ارکیده‌ی خربقی معمولی اوایل مرداد ماه از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و تا زمان کشت در پاکت های کاغذی در یخچال قرار داده شد. بذرها در اواسط مهرماه جهت استریل و کشت از یخچال خارج و در دمای معمولی قرار گرفتند. بذرهای پس از ضدعفونی شدن در محلول هیپوکلریت سدیم در محیط جامد فاست<sup>۱</sup> (Fast, 1976) حاوی پپتون، ساکارز، فروکتوز، ۴/۹ g/l آگار (Duchefa, Haarlem, the Netherlands) و pH=۶/۵ جهت تشکیل پروتوکورم کشت و در تاریکی قرار داده شدند. بعد از گذشت ۷۵ روز پروتوکورم‌های تشکیل شده در محیط قبلی واکنش<sup>۲</sup> شدند. سپس پروتوکورم‌های نوک دار به محیط نیم‌سایه جهت تشکیل کلروفیل منتقل و بعد از یک هفته سازگاری، به نور با دوره‌ی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. بعد از سه هفته گیاهچه‌های سه برگچه‌ای حاصل، در ظروف شیشه‌ای حاوی بسترهای کشت مختلف قرار گرفتند. از آگار برای جامدسازی محیط کشت شاهد فاست استفاده شد. در بسترهای کشت پرلیت استریل، کوکوپیت و پوکه‌های که آبشویی و استریل شده بودند از محیط کشت مایع فاست استفاده شد. pH محیط فاست استفاده شده برای تیمارها قبل از اتوکلاو روی ۵/۶ تنظیم شد و سپس در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. آزمایش بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار و هر تکرار شامل سه نمونه انجام شد. بعد از یک ماه شاخص‌های رشدی مانند وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه (بوسیله‌ی ترازوی آزمایشگاه)، طول ریشه و ساقه (بوسیله‌ی کولیس)، حجم ریشه (بوسیله‌ی مزور مدرج)، سطح برگ (با استفاده از کپی برداری از عکس و توسط نرم‌افزار image J) و تعداد ساقه و برگ و ریشه اندازه گیری شدند.

## نتایج و بحث

بیشترین میزان وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه، تعداد برگ و ریشه، حجم ریشه، طول ساقه و ریشه و سطح برگ در گیاهچه‌های حاصل از محیط کشت فاست مایع حاوی بستر کشت پرلیت و کمترین میزان شاخص‌های مذکور در گیاهچه‌های حاصل از تیمار محیط مایع حاوی کوکوپیت و پوکه معدنی مشاهده گردید (شکل شماره‌ی یک). با اندازه‌گیری اسیدیته‌ی تیمارهای مختلف علت اصلی تفاوت‌ها در محیط‌های مایع حاوی سوبسترای مصنوعی مشخص گردید. اسیدیته‌ی محیط مایع حاوی پرلیت ۵/۷۳ بود و تفاوت چندانی با محیط اولیه نداشت، این در حالی است که اسیدیته‌ی محیط حاوی پوکه ۷/۳ و محیط حاوی کوکوپیت ۵/۲ بود.

<sup>1</sup> Fast medium

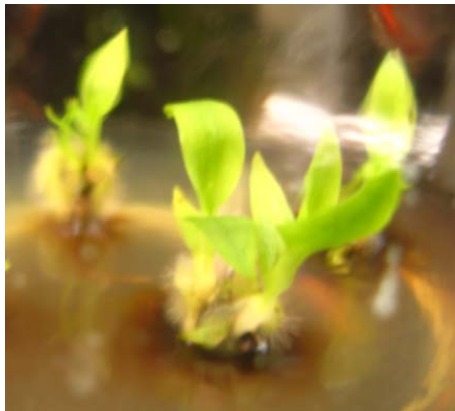
<sup>2</sup> Subculture



شکل «۱» اثر سوبستراهای مصنوعی متفاوت بر شاخص‌های رشدی ارکیده‌ی خربقی معمولی، وزن خشک بخش هوایی (a)، وزن تر ریشه (b)، وزن تر بخش هوایی (c)، وزن خشک ریشه (d)، سطح برگ (e)، حجم ریشه (f)، طول ساقه (g)، تعداد ساقه (h)، تعداد برگ (i)، تعداد ریشه (j)، طول بلندترین ریشه (k).

جذب عناصر غذایی در محیط مایع بیشتر از محیط جامد است و همین امر موجب افزایش شاخص‌های رشدی در گونه‌ی *Typhonium flagelliforme* شده است (Rezali *et al.*, 2017). علاوه بر این استفاده از پرلیت در محیط مایع منجر به افزایش تهویه و تبادلات گازی در محیط کشت می‌شود (Nguyen and Kozai, 2005). همچنین افزایش اثرات مطلوبی بر گیاه پایا داشته است (Schmidt *et al.*, 2015). عامل اساسی و تأثیرگذار دیگر در این آزمایش اسیدیته‌ی محیط کشت است. میزان اسیدیته‌ی محیط کشت عامل بسیار مهم و تعیین‌کننده‌ی در رشد گیاهان کشت

شده در شرایط درون شیشه می‌باشد. اسیدیته‌ی محیط بر میزان جذب عناصر غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد از طریق تعیین میزان انحلال آن‌ها تأثیر می‌گذارد. جذب آنیون‌ها در اسیدیته‌ی پائین افزایش و جذب کاتیون‌ها در اسیدیته‌ی بالا بهتر صورت می‌گیرد.



b



a



d



c

شکل «۲»: اثر فاز محیط کشت و استفاده از سوبسترهای متفاوت بر میزان رشد ارکیده‌ی خربقی معمولی، گیاهچه‌های حاصل از تیمار محیط مایع حاوی پرلیت (a)، گیاهچه‌های حاصل از تیمار شاهد (محیط فاست جامد) (b)، گیاهچه‌های حاصل از محیط مایع حاوی کوکوپیت (c)، گیاهچه‌های حاصل از محیط مایع حاوی پوک‌معدنی (d)

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که نه تنها محیط مایع اثر مثبتی بر میزان رشد ارکیده‌ی خربقی معمولی نسبت به تیمار شاهد (فاز جامد) داشته است، بلکه استفاده از سوبسترهای مصنوعی تا حدود زیادی بر این موضوع اثرگذار است. پرلیت بهترین سوبسترهای مصنوعی در این آزمایش بود که علاوه بر عدم اثرگذاری بر میزان اسیدیته‌ی محیط، با افزایش تبادلات گازی و تهویه محیط کشت، گیاهچه‌ها را با اختلاف معناداری در سطح مطلوب قرار داده است. میزان اسیدیته‌ی بالا در محیط حاوی پوک‌معدنی و همچنین عدم تهویه‌ی مطلوب در محیط حاوی کوکوپیت سبب کاهش شاخص‌های رشدی گردید (شکل شماره‌ی ۲).

### منابع

- Brochard, P., 1991.** Use of artificial substrates for in vitro propagation. High-Tech and Micropropagation I. Springer, pp. 270-284.
- Dangwal, L., Sharma, A., Kumar, N., Rana, C., Sharma, U., 2010.** Ethno-medico botany of some aquatic Angiospermae from North-West Himalaya. Researcher 2, 49-54.
- Dianati Daylami, S., Kafi, M., Mirmasoumi, M., Mozaffarian, V., Salami, A., 2013.** Introduce the suitable medium for asymbiotic germination of *Epipactis veratrifolia*.
- Dogan, Y., Baslar, S., Ay, G., Mert, H.H., 2004.** The use of wild edible plants in western and central Anatolia (Turkey). Economic Botany 58, 684-690.
- 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).
- Lucchesini, M., Vitagliano, C., 2000.** In vitro micro-environments to improve growth of olive plantlets during the rooting phase. IV International Symposium on Olive Growing 586, pp. 895-898.
- Nguyen, Q.T., Kozai, T., 2005.** Photoautotrophic Micro-Propagation of Woody Species. In: Kozai, T., Afreen, F., Zobayed, S.M.A. (Eds.), Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 123-146.
- Rezali, N.I., Jaafar Sidik, N., Saleh, A., Osman, N.I., Mohd Adam, N.A., 2017.** The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on in vitro growth of Typhonium flagelliforme. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 7, 151-156.
- Schmidt, O., Netto, A.T., Schmidt, E.R., Carvalho, V.S., Otoni, W.C., Campostrini, E., 2015.** Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated in vitro with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. Theoretical and Experimental Plant Physiology 27, 7-18.





## Effect of Artificial Substrates on *in vitro* Growth of *Epipactis Veratrifolia* terrestrial orchid

Zohreh Soltani<sup>1</sup>, Shirin Dianati Deylami<sup>1\*</sup>, Sasan Aliniaefard<sup>1</sup>

Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran

\*Corresponding Author: [Dianati@ut.ac.ir](mailto:Dianati@ut.ac.ir)

### Abstract

*Epipactis veratrifolia* is an Iranian rhizomic orchid. It is a terrestrial type orchid belongs to temperate zones. Ornamental and medicinal values of this orchid have been resulted in its massive harvesting from natural habitats. In current study, *in vitro* plantlets propagation and growth of this orchid were studied using Fast solid medium as control and liquid Fast medium with different artificial substrates (perlite, Coco peat and LECA) as the other treatments. Perlite substrate resulted in improvements of all measured growth parameters (leaf area, root and shoot dry weight, root and shoot fresh weight, root volume, shoot and root length, leaf, shoot and root number), while the lowest values for the growth parameters were recorded for Coco peat and expanded clay (LECA). The improving effects of perlite on growth parameters were due to stabilizing medium pH and increasing media ventilation. However, Coco peat resulted lower media ventilation and LECA caused an increase in medium pH. In conclusion, perlite substrates supplemented by liquid Fast medium can be recommended for *in vitro* production and growth of *Epipactis veratrifolia*.

**Keywords:** Fast nutrient medium, Perlite, Coco peat, LECA, Growth parameter

