# استفاده از بسترهای جایگزین آگار جهت کشت درون شیشه‌ای ثعلب سایه پسند *Dactylorhiza umbrosa*

**سعیده رستمی بالان[۱]، شیرین دیانتی دیلمی*[۲]، سهیل کریمی[۲]**
[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران
[۲] استادیار گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران
*نویسنده مسئول: dianati@ut.ac.ir

## چکیده

ثعلب سایه‌پسند از گروه ارکیده‌های خاکروی مناطق معتدله است. غده‌های زیرزمینی این گونه در صنایع داوریی و غذایی کاربرد دارد به همین دلیل به صورت بی‌رویه از منابع طبیی برداشت می‌شود که آن را در معرض انقراض قرار داده است. در پژوهش حاضر گیاهچه‌های کشت بافتی این گیاه در چهار نوع بستر کشت شامل آگار، آگار + ذغال فعال، ماسه، و آگار + ماسه به عنوان تیمار کشت شدند که هر سه هفته یکبار همگی با استفاده از ۴ میلی لیتر محیط کشت مایع فاست تغییر یافته برای تغذیه گیاهان غنی می‌شدند. بررسی نتایج پس از گذشت ۵۸ روز از اعمال تیمارها نشان داد که بطورکلی طول غده در محیط‌های تیره دارای ماسه و یا ذغال فعال بهتر بود و محیط دارای بستر ترکیبی آگار + ماسه تفاوت معنی دار با تیمار آگار داشت که علت آن می‌تواند تداوم تغذیه در بستر ماسه توسط محیط حاوی آگار باشد.

تیمار آگار دارای بیشترین تعداد ریشه سیاه بود که می‌تواند بدلیل عبور راحت طیف‌های نور از بستر کشت نیمه جامد آگار و تاثیر منفی آن روی بقای ریشه باشد. قطر ریشه در محیط دارای آگار + ذغال فعال نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. به نظر می‌رسد ذغال علاوه بر جذب مواد مضر با تاریک ساختن بستر کشت و محدود ساختن ورود طیف‌های مختلف نور در این مورد تاثیر داشته است. با توجه به نتایج می‌توان گفت تغییر بستر کشت با توجه به اثرگذاری مثبت بر رشد اندام زیرزمینی ارزشمند ثعلب می‌تواند بطورخاص مورد توجه قرار گیرد.

***کلمات کلیدی:*** ذغال فعال، غده، ماسه، ژرم پلاسم

## مقدمه

ثعلب سایه‌پسند *Dactylorhiza umbrosa* از ارکیده‌های خاکروی مناطق معتدله است (Arditti, 1980). این گیاه دارای غده‌های زیرزمینی به شکل پنجه‌ای می‌باشد (Farhoosh and Riazi, 2006) و به دلیل داشتن این غده‌های ارزشمند در فصل گلدهی و پیش از بلوغ و پراکنش بذر از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. پودر حاصل از غده‌های خشک این گیاهان با عنوان ثعلب شناخته می‌شود (Kaya and Tekin, 2001). ثعلب علاوه بر داشتن خواص درمانی و غذایی(Ktistis and Georgakopoulos, 1991; Vuksan *et al*., 1999; Farhoosh and Riazi, 2007) برای ایجاد عطر و طعم‌دهی (Kayacier and Dogan, 2006) در صنایع دارویی، نوشیدنی، شیرینی‌سازی و بستنی‌سازی (Sezik, 2002; Tamer *et al*., 2006) و نیز به عنوان عامل قوام‌دهنده و تثبیت‌کننده در صنایع غذایی ( Kayacier and Dogan, 2006) کاربرد دارد. این گیاه قابلیت تکثیر و کشت و کار به شکل معمول را ندارند و برای این منظور باید بصورت تخصصی از تکنیک کشت درون شیشه‌ای استفاده نمود. کشت درون شیشه‌ای روشی بهینه و مطمئن جهت هدایت رشدی گیاهان محسوب می‌گردد و بستر ریشه‌زایی یا مواد حمایت‌کننده آن نقش مهمی در فرایند ریزافزایی دارند. البته استفاده ازاین روش معایبی نظیر هزینه بالای تجهیزات و مواد شیمیایی را نیز به‌همراه دارد. از مهم‌ترین این هزینه‌ها می‌توان به هزینه بالای استفاده از آگار به عنوان عامل سفت کننده محیط کشت اشاره نمود که حدود ۷۰درصد از هزینه

IrHC2019

تهیه محیط کشت را شامل می‌شود (Johansson,1988). از این رو یافتن مواد حمایتی ارزانتر برای جایگزینی با آگار مورد توجه است.

طی دو دهه اخیر پژوهش‌های زیادی در راستای یافتن مواد جایگزین آگار انجام شده است. به‌عنوان مثال طی پژوهشی صمغ کتیرا به عنوان عامل ژل‌کننده برای شاخه‌زایی درون شیشه‌ای رز مینیاتور بررسی شد. اگرچه، گرانروی کم محیط کتیرا باعث فرو رفتن نمونه‌ها در آن شد ولی نمونه‌ها از نظر شاخه زایی واکنش مثبتی نشان دادند. برای افزایش سفتی محیط، نسبت‌های مختلفی از آمیخته آگار و کتیرا استفاده شد. در مجموع فعالیت ریزنمونه‌ها و میزان رشد آن‌ها در محیط کتیرا و محیطی که دارای ترکیب کتیرا و آگار بود، در مقایسه با محیط کشت آگار، افزایش یافت (Karimi *et al*., 2016). مهدوی و همکاران (۱۳۹۶) نیز امکان جایگزین کردن آگار با مواد ارزان قیمتی همچون کتیرا، پرلیت و ترکیب کتیرا و آگار و ترکیب کتیرا و پرلیت بر ریزنمونه‌های پایه GF677 بادام را مورد بررسی قرار دادند. شاخص‌های رشد، بقاء و درصد آلودگی پس از ۴۵ روز ارزیابی شدند. رشد و پرآوری شاخساره در محیط کشت حاوی کتیرا و پرلیت به‌خوبی محیط آگار بود. افزون بر این درصد بقاء ریز نمونه در این محیط‌ها بیشتر از محیط حاوی آگار بود. کمترین رشد درترکیب پرلیت و کتیرا مشاهده شد. در پژوهشی دیگر برای کشت درون شیشه ای گیاهان چوبی از سیلیکا سند (ماسه) بجای آگار به صورت موفقیت آمیزی استفاده شد (Prknová, 2007). از جمله مزایای این محیط می‌توان به سهولت ترکیب ماسه و محیط سرد در داخل شیشه کشت در مقایسه با محلول داغ و چسبنده حاوی آگار؛ ایجاد محیطی مایع که با تکان دادن ظرف به‌راحتی در اختیار گیاه قرار می‌گیرد؛ تماس مطلوب گیاهچه‌ها در ماسه و محیط کشت؛ ثابت ماندن واکنش محلول غذایی پس از اتوکلاو و عدم سمیت توسط یون‌های سولفات در ظرف کشت؛ عدم جذب مواد آلی توسط شن و ماسه و شست و شوی مواد سمی یا مهارکننده‌ها از اطراف گیاهچه‌ها با تکان دادن ظرف کشت؛ خروج راحت شن و ماسه از ظرف کشت پس از پایان کشت؛ و قیمت ارزان ماسه اشاره کرد (Prknová, 2007). در پژوهشی دیگر اثر سوبستراهای مصنوعی نظیر پرلیت، کوکوپیت، پوکه معدنی و همچنین محیط حاوی آگار به عنوان شاهد بر ویژگی‌های رشدی ارکیده خاکرست خربقی معمولی *Epipactis veratrifolia* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار حاوی پرلیت به علت عدم تغییر اسیدیته 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 اسیدیته محیط و تیمار حاوی کوکوپیت به علت تهویه ناکافی گیاهچه‌ها را در وضع نامطلوبی از نظر شاخص‌های رشدی قرار دادند (سلطانی و همکاران، ۱۳۹۶).

با توجه به مشاهدات پیشین در خصوص ریزافزایی ارکیده ثعلب سایه‌پسند، ریشه‌های این گیاه نسبت به‌سختی محیط کشت و جابجایی طی واکشت حساس می‌باشند و طی پروسه واکشت که خود زمان بر می‌باشد، ریشه‌ها آسیب دیده و مواد فنولی آزاد می‌کنند. گران بودن آگار و حساسیت ریشه‌ها به جابجایی طی واکشت از یک‌سو و همچنین ارزشمند بودن این گیاه از سوی دیگر موجب شد پژوهش حاضر به منظور دستیابی به محیطی بهینه با جایگزینی موادی مانند ماسه بجای آگار به‌منظور حذف فرایند واکشت گیاهچه‌ها و کاهش هزینه تولید انجام گردد.

## مواد و روش‌ها

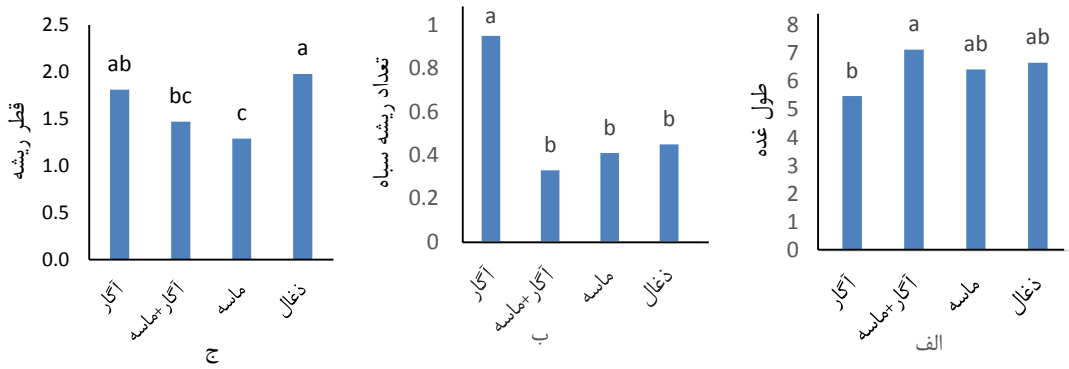
گیاهچه‌های کشت بافتی ۱۰ ماهه ثعلب سایه پسند در چهار نوع بستر کشت استریل (شامل آگار، آگار + ذغال فعال، ماسه شسته رودخانه ای و آگار + ماسه شسته رودخانه ای (اتوکلاو شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) کشت شدند. این محیط‌ها هر سه هفته یکبار همگی با استفاده از ۴ میلی لیتر محیط کشت مایع فاست تغییر یافته (دیانتی و همکاران، ۱۳۹۲) برای تغذیه گیاهان غنی می‌شدند. آزمایش بصورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و هر تکرار شامل پنج ریزنمونه انجام شد. بعد از ۵۸ روز شاخص‌های رشد مانند وزن تر، طول ساقه و قطر ریشه (به وسیله کولیس)، طول و قطر غده (به وسیله کولیس)، تعداد ریشه‌های سیاه (نکروزه) و سفید (فعال)، اندازه گیری شدند. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل شد.



IrHC2019

## نتایج و بحث

اثر تیمارها بر سه صفت مورد ارزیابی شامل طول غده، تعداد ریشه سیاه (نکروزه) و قطر ریشه معنی‌دار بود و در مورد سایر صفات تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۲). بیشترین میزان طول غده در محیط ترکیبی آگار و ماسه مشاهده شد و کم‌ترین میزان طول غده در محیط آگار (شاهد) مشاهده شد (شکل ۱- الف). که این نتیجه نشان می‌دهد استفاده از بستر کشت تلفیقی آگار و ماسه نسبت به بستر کشت ماسه به تنهایی و یا آگار بستر بهتری برای رشد طولی غده‌ها فراهم ساخته است. در پژوهش Debeljak و همکاران (۲۰۰۲) نیز از بستر تلفیقی ماسه و آگار برای غده‌زایی ارکیده استرالیایی استفاده و دلیل بهبود اندازه طول غده در آن نسبت به سایر محیط‌ها، تداوم تغذیه گیاه در این نوع بستر عنوان شد.

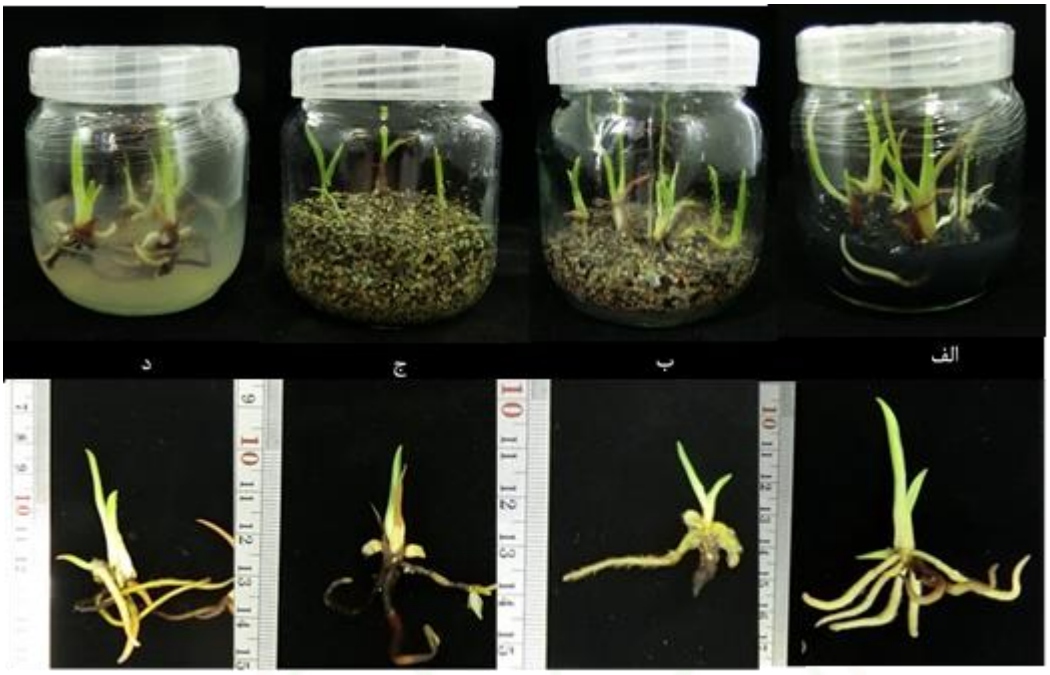



شکل ۱: اثر نوع بستر کشت بر رشد اندام‌های زیر زمینی ثعلب سایه پسند.
الف) طول غده، ب) تعداد ریشه سیاه، ج) قطر ریشه

تاثیر نوع بستر کشت بر تعداد ریشه سیاه در سطح ۱ درصد کاملا معنی‌دار بود و در محیط حاوی آگار بیشترین تعداد ریشه سیاه (نکروزه) تولید شده بود (شکل ۱-ب). پژوهش‌ها نشان می‌دهد استفاده از ذغال فعال در کشت درون شیشه ای باعث تاریک شدن محیط کشت می‌گردد و از آنجا که نور یکی از عوامل موثر در نمو سازمان یافته درون شیشه‌ای می باشد کاهش نور در قاعده شاخه می‌تواند محیط مناسبی را برای تجمع اکسین که حساس به نور است و همچنین کوفاکتورها فراهم کند (Nissen and Sutter, 1990). کاربرد ذغال فعال در محیط کشت ریشه‌زایی *Pinus pinaster*، پتانسیل تولید ریشه‌های نابجا را افزایش داد، این افزایش نه تنها از لحاظ سرعت، بلکه از نظر تعداد و طول ریشه نیز بود (Dumas, 1995). در پژوهش حاضر با بررسی اثر نوع بستر کشت بر قطر ریشه مشاهده شد که محیط حاوی ذغال اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشته و ریشه‌هایی با قطر بیشتر در آن تولید شده است. گزارش شده است که ذغال فعال با افزایش ریشه‌دهی و جذب بهتر مواد (Pan and Van staden, 1998)، جذب اتیلین آزاد شده از محیط کشت و ریزنمونه (Johansson *et al*., 1990) و همچنین با آزاد ساختن مواد غذایی (Pan and Van staden, 1998)، باعث افزایش اندازه اندام زیرزمینی می شود.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت تغییر بستر کشت با تشدید رشد اندام زیرزمینی ثعلب، می‌تواند بهره وری تولید این گیاه را در شرایط کشت درون شیشه ای افزایش دهد. استفاده از مواد ارزان قیمتی همچون ماسه در شرایط کشت درون شیشه ای می تواند به صورت موثری هزینه های تولید را کاهش داده و درآمد خالص از تولید را افزایش دهد.

IrHC2019




شکل ۲: اثر نوع محیط کشت بر میزان رشد ثعلب سایه پسند حاوی بستر کشت: الف) آگار داری ذغال فعال، ب) ترکیب آگار و ماسه، ج) ماسه، د) آگار(شاهد)

**منابع**

دیانتی، ش.، کافی، م.، سلامی، ع. و مظفریان، و. ۱۳۹۲. مطالعه جوانه زنی، انتقال به مرحله گلدهی و بیان برخی ژن‌های مربوط به آن در چند گونه ارکیده ایرانی. رساله دکتری. دانشگاه تهران، پردیس کرج.

سلطانی، ز.، دیانتی، ش. و علی نیایی فرد، س. ۱۳۹۶. تأثیر استفاده ازسوبستراهای مصنوعی بر خصوصیات رشدی ارکیده خاک رست خربقی معمولی *Epipactis veratrifolia* در شرایط درون شیشه‌ای. نخستین کنفرانس بین المللی و دهمین کنگره علوم باغبانی ایران، تهران.

مهدوی، ز.، دیانتی، ش. و کریمی، س. ۱۳۹۶. استفاده از کتیرا و پرلیت بعنوان جایگزین آگار در محیط ریزافزایی پایه بادام GF677. نخستین کنفرانس بین المللی و دهمین کنگره علوم باغبانی ایران، تهران.

Arditti, Joseph. "Aspects of the physiology of orchids." Advances in botanical research. Vol. 7. Academic Press, 1980. 421-655.

Debeljak, N., Regvar, M., Dixon, K. W. and Sivasithamparam, K. 2002. Induction of tuberisation *in vitro* with jasmonic acid and sucrose in an Australian terrestrial orchid, *Pterostylis sanguinea*. Plant Growth Regulation, 36(3), 253-260.

Dumas, E., 1995. *In vitro* rooting of micro propagated shoots from Juvenile and mature *Pinus pinaster* explants_ influence of activated charcoal. Plant. Cell. Tissue. Org. Cult. 40: 231 235.

Farhoosh, R. and Riazi, A., 2007. A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. Food Hydrocolloids 21, 660-666.

Johansson, L. B., Calleberg, E., and Gedin, A. 1990. Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of Anemone canadensis. Physiologia Plantarum, 80(2), 243-249.

Karimi, S., Salehi, H., and Ashiri, F. 2016. Tragacanth, a Novel and Cheap Gelling Agent in Carnation and Miniature Rose Tissue Culture Media. Journal of Ornamental Plants, 6(4), 253-260.

IrHC2019

Kaya, S. and Tekin, A.R., 2001. The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice cream mix. Journal of Food Engineering 47, 59-62.
Kayacier, A. and Dogan, M., 2006. Rheological properties of some gums-salep mixed solutions. Journal of Food Engineering 72, 261-265.
Kayacier, A. and Dogan, M., 2006. Rheological properties of some gums-salep mixed solutions. Journal of Food Engineering 72, 261-265.
Ktistis, G. and Georgakopoulos, P., 1991. Rheology of salep mucilages. Pharmazie 46, 55-56.
Nissen, S.J. and Sutter, E.G. 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. HortScience. 25: 800 802.
Pan, M. J. and Van staden, J. 1998. The use of charcoal in *in vitro*, a review. Plant. Growth. Regulation. 26: 155-163.
Prknová, H. 2007. The use of silica sand in micropropagation of woods. Journal of Forest Science 53.02: 88-92.
Sezik E. 2002. Turkish orchids and salep. Acta Pharm Turc 44:151–157

## Using alternative substrates instead of agar for *in vitro* culture of *Dactylorhiza umbrosa*

Saeideh Rostami Balan[1], Shirin Dianati Daylami[2]*, Sohail Karimi[2]
[1] MSc Student of the Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran.
[2] Assistant Professor of the Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran.
[*] *Corresponding Author: dianati@ut.ac.ir*

**Abstract**

*Dactylorhiza umbrosa* is of terrestrial temperate orchids. The underground tubers of this species are used in traditional medicine and food industry. Therefore, overharvesting from the natural resources has encouraged extinction of this species. In this study, seedlings of *D. umbrosa* were cultivated on four types of media including agar, agar + active charcoal, sand, and Agar + sand *in vitro*. The media were enriched every 4 weeks using 4 ml of modified FAST medium. After 58 days, the results showed that the tuber length was generally larger in dark media containing sand or active charcoal. The agar + sand compound had a significant difference with agar treatment due to continuity of nutrition in the sand by agar-containing medium. Agar containing media had the highest number of necrotic roots which could be due to its transprancy and the negative effect of light on root growth. The highest root diameter was observed in the agar + active charcoal treatment. In addition to absorbing harmful substances, active charcoal by darkening of the culture medium may enhance root growth. According to the results, it was concluded that changing the culture medium can positively affect the growth of the valuable underground parts of the *D. umbrosa*.

***Keywords*:** Activated charcoal, tubers, sand, natural resources

IrHC2019