ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گونه‌ای از ارکید در حال انقراض (*Orchis catasetum*) توسط پروتوکورم‌ها: اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نانوکلات آهن

بهزاد کاویانی[1*]، ناصر نگهدار[2]، احمد باکر[3] و نینا مسافر[1]

[1] رشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی

[2] آمل، موسسه تحقیقاتی علوم کشاورزی و بیوتکنولوژی هیرکان

[3] تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۷

چکیده

خطر انقراض برخی از گونه‌های ارکید را تهدید می‌کند. در اینجا یک روش کارامد برای تکثیر درون‌شیشه‌ای نوعی ارکید در حال انقراض (*Orchis catasetum*) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نانوکلات آهن ارائه می‌شود. پروتوکورم‌ها، به‌عنوان ریزنمونه، بر روی محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA)، نفتالین استیک اسید (NAA)، ایندول بوتیریک اسید (IBA) و نانوکلات آهن کشت شدند. بیشترین باززایی اجسام شبه-پروتوکورم (PLBs) (۱۸/۸۴ عدد در گیاهچه) از ریزنمونه‌های پروتوکورم در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. بیشترین تعداد ریشه (۶/۹۴ عدد در گیاهچه)، طول ریشه (۱۷۸/۹۰ میلی‌متر در گیاهچه)، تعداد برگ (۹/۵۰ عدد در گیاهچه) و ارتفاع گیاهچه (۱۲۴/۱۰ میلی‌متر در گیاهچه) در ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط MS غنی‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. در ارتباط با اثر نانوکلات آهن، بیشترین ارتفاع گیاهچه (۸۲/۷۹ میلی‌متر در گیاهچه)، بیشترین تعداد ریشه (۴/۷۶ عدد در گیاهچه) و طول ریشه (۸۷/۵۳ میلی‌متر در گیاهچه) در ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط MS غنی‌شده با ۰/۱۳ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. تعداد اجسام شبه-پروتوکورم و تعداد برگ در تیمارهای نانوکلات آهن نسبت به شاهد افزایشی را نشان ندادند. برای سازگاری، گیاهچه‌ها به گلدان‌های پرشده با پرلیت، خاک‌اره، یونولیت و پوکه معدنی به نسبت مساوی منتقل شدند. گیاهچه‌های سازگارشده، در گلدان‌های حاوی پرلیت قرار گرفته و به گلخانه منتقل گردیدند. در شرایط درون‌خاکی، ۱۰۰ درصد گیاهان زنده ماندند و تغییر مورفولوژیکی نسبت به گیاهان مادری در آنها مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: بنه اولیه، تکثیر درون‌شیشه‌ای، نانوکودها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۱۱۷۷۷۴۸۲، پست الکترونیکی: kaviani@iaurasht.ac.ir

مقدمه

ارکید با نام علمی *Orchids catasetum* از خانواده Orchidaceae و راسته Gynandrales است. گیاهان این خانواده تک‌لپه، علفی و پایا هستند که به‌صورت انگل، ساپروفیت و خاکزی مشاهده می‌شوند (۶). ارکیدها با بیش از ۸۰۰ جنس و ۲۵۰۰۰ گونه در سطح جهان، یکی از متنوع‌ترین و تکامل‌یافته‌ترین خانواده‌های گیاهان عالی هستند (۶). پراکنش اکولوژیکی این گیاه در مناطق جنوب شرق آسیا و کشورهایی مانند چین، تایوان، هنگ‌کنگ، تایلند، فیلیپین، مالزی و سنگاپور است. ارکیدها به‌عنوان گیاهان زینتی رشد داده می‌شوند و به‌دلیل زیبایی و طول

عمر بالای پس از برداشت‌شان، به‌صورت گل‌های شاخه-بریده مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶). تکثیر در مقیاس بالای ارکیدها، به‌ویژه گونه‌های هیبرید و در حال انقراض با استفاده از فنون کشت بافت، باعث شده است تا این گیاهان به‌عنوان یکی از ۱۰ گل شاخه‌بریده برتر جهان مطرح باشند (۶). تکثیر ارکید با بذر باعث تولید گیاهان هتروزیگوس می‌شود. بنابراین، تکثیر درون‌شیشه‌ای یک روش متناوب مناسب برای ازدیاد ارکیدها می‌باشد. دستورالعمل‌های مختلفی برای ریزازدیادی گونه‌های مختلف ارکید از طریق کشت درون‌شیشه‌ای بخش‌های مختلف گیاه شامل سرشاخه، انتهای ریشه، ساقه، برگ، گره، جوانه، گل‌آذین، ریزوم، جنین‌های زیگوتی، کالوس و لایه نازک سلولی ارائه شده است (۵، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۲۴، ۲۵، ۳۱، ۳۲، ۳۵، ۳۷، ۴۰، ۴۱). ریزازدیادی از طریق اجسام شبه-پروتوکورم (PLBs)، به‌دلیل اینکه این اجسام می‌توانند بر روی محیط کشت جامد یا مایع به‌سرعت تکثیر شوند و تعداد زیادی اجسام شبه-پروتوکورم دیگر در یک دوره زمانی کوتاه تولید شوند، در مقایسه با نمو گیاهچه از بذر یا شاخه‌های نابجا، مؤثرتر است (۱۸). پروتوکورم‌ها یا بنه‌های اولیه غده‌هایی هستند که توسط بذرها و از رویش آنها تولید می‌شوند. چنانچه از این پروتورکورم‌ها یا سایر اندام‌های رویشی برای تکثیر درون-شیشه‌ای استفاده شود، ابتدا اجسام شبه-پروتوکورم به‌وجود می‌آید که برای استفاده به‌عنوان ریزنمونه بسیار مناسب هستند. مطالعات فراوان آشکار کرده است که بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت، یک رویکرد مهم برای اصلاح مراحل ریزازدیادی ارکیدها با کشت‌کردن اجسام شبه-پروتوکورم است که همچنین به گونه و رقم بستگی دارد (۱۷، ۳۴). تلاش‌های زیادی برای دستیابی به روش مناسب برای ریزازدیادی مؤثر اجسام شبه-پروتوکورم به‌ویژه با تغییر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند BA، تیدیازورون (TDZ)، بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، NAA، ۳-ایندول استیک اسید (IAA) و اسید ژیبرلیک (GA_3) انجام شده است (۱۹، ۲۲، ۲۳، ۲۶، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۶). سیتوکینین‌ها مهمترین عوامل اصلاح باززایی گیاهان از اجسام شبه--پروتوکورم هستند (۱۷، ۲۱، ۲۲).

کاربرد موفقیت‌آمیز انواع ذرات نانو در پزشکی، توجه را به‌سمت استفاده از فناوری نانو (نانوتکنولوژی) در کشاورزی برای افزایش کمی و کیفی محصولات زراعی و باغی معطوف کرد. این فناوری موجب آزادشدن ترکیبات شیمیایی موجود در این ذرات به‌صورت هدفمند شده و بعد جذب گیاه می‌شوند و در بدنه گیاه نیز به بافت‌های مورد نظر می‌رسند و باعث کاربرد مؤثر مواد معدنی و افزایش رشد گیاه می‌شوند. کاربرد مؤثر مواد غذایی، افزایش رشد کمی و کیفی گیاه را به‌دنبال دارد. تغییر شکل مواد در مقیاس نانو، ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، بیولوژیکی و فعالیت‌های کاتالیتیک آنها را تغییر می‌دهد. ناحیه سطحی ویژه اغلب مواد در مقیاس نانو، فعالیت شیمیایی و زیستی‌شان را افزایش می‌دهد. بنابراین، خواص جدید در ذرات نانو مانند حلالیت بیشتر، فعالیت شیمیایی بیشتر و توانایی نفوذ به‌درون غشای سلول ظاهر می‌شود. نانوکلات آهن می‌تواند به‌عنوان یک منبع غنی و قابل اطمینان آهن بی‌والنت برای گیاه، به‌دلیل پایداری بالا و رهاسازی تدریجی آهن در طیف وسیعی از اسیدیته (۱۱-۳) مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. مزیت دیگر نانوکلات آهن، میزان بیشتر آهن فروس نسبت به آهن فریک در سطح کلات است که سنتز بیشتر کلروفیل را در گیاه باعث می‌شود. البته کاربرد کودهای نانو در شرایط کشت درون-شیشه‌ای بسیار محدود است. پیشرفت در این زمینه، نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد. خطر انقراض نسل، بسیاری از گونه‌های ارکید از جمله *Orchis catasetum* را تهدید می-کند (۱۷، ۲۱، ۲۲). در این پژوهش، تکثیر و رشد ارکید *Orchis catasetum* تحت شرایط کنترل‌شده کشت بافت در حضور و غیاب BA، IBA و NAA مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین به اثر غلظت‌های مختلف نانوکلات آهن در شرایط درون‌شیشه‌ای روی برخی صفات

مورفولوژیکی و باززایی اجسام شبه-پروتوکورم پرداخته شده است.

مواد و روشها

پروتوکورم‌های سالم و گندزدایی‌شده ارکید، از یک آزمایشگاه تجاری و تحقیقاتی کشت بافت گیاهی واقع در شهر محلات تهیه شدند و به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. پروتوکورم‌ها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) همراه با ۳ درصد (وزن به حجم) سوکروز و ۰/۸ درصد آگار-آگار کشت شدند. اسیدیته (pH) محیط-های کشت، قبل از اتوکلاو، با اسید کلریدریک یا هیدروکسید سدیم بر روی ۰/۲ ± ۵/۷ تنظیم شد. محیط-های کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۰۵ کیلوگرم در سانتی‌متر مربع به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. تمام کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد تحت نور سفید فلورسنت (۵۶ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) با دوره نوری ۱۶ ساعت قرار داده شدند.

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نانوکلات آهن افزوده‌شده به محیط MS بر روی تکثیر پروتوکورم و رشد و نمو بعدی گیاهچه‌ها ارزیابی شد. پروتوکورم‌ها در محیط MS حاوی BA (۰، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر)، IBA (۰ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر)، NAA (۰ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و نانوکلات آهن (۰، ۰/۱۳، ۰/۳۴ و ۰/۷۰ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. برای هر تیمار، ۳ ظرف پتری در نظر گرفته شد و در هر ظرف پتری، ۴ پروتوکورم کاشته شد. ریزنمونه‌ها ترکیبات فنولیک را به‌درون محیط‌های کشت ترشح می‌کنند، بنابراین، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ذغال فعال-شده به محیط‌ها افزوده شد. ذغال فعال‌شده، ترکیبات فنولیک را جذب می‌کند. ۶۰ روز بعد از آغاز کشت، تعداد اجسام شبه-پروتوکورم باززایی‌شده، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، تعداد ریشه و طول ریشه اندازه‌گیری شدند.

واحدهای آزمایشی در یک طرح بلوک کاملا تصادفی (RCBD) آرایش یافتند. هر آزمایش در ۳ تکرار انجام شد و هر تکرار شامل ۴ نمونه بود (در مجموع ۱۲ نمونه برای هر تیمار). داده‌ها توسط تجزیه واریانس (ANOVA)، با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C آنالیز شدند و میانگین آنها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۹۹ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

اثر BA و IBA یا NAA بر روی باززایی پروتوکورم و تولید اجسام شبه-پروتوکورم: تعداد اجسام شبه-پروتوکورم تحت تأثیر حضور BA، IBA و NAA در محیط MS قرار دارد. اثر BA، IBA و NAA، به‌تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر روی باززایی و رشد پروتوکورم در جدولهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. یک ترکیب از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین باززایی اجسام شبه-پروتوکورم (۱۸/۸۴ عدد در گیاهچه) را القا کرد (شکل ۱). در میان تمام تیمارهای BA، بالاترین باززایی اجسام شبه-پروتوکورم (۱۲/۲۰ عدد در گیاهچه) از پروتوکورم در محیط حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر آن به‌دست آمد. غلظت‌های بالاتر BA، باززایی بیشتر اجسام شبه-پروتوکورم را باعث نشدند. کمترین تعداد اجسام شبه-پروتوکورم (۵/۱۰ و ۵/۱۵ عدد در گیاهچه) به‌ترتیب در محیط‌های غنی‌شده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. ارتباط مثبتی بین افزایش غلظت BA و افزایش تعداد اجسام شبه-پروتوکورم وجود ندارد (جدول ۱). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p\leq0.01$) در میان غلظت‌های مختلف BA همچنین اثر متقابل BA و IBA یا NAA برای تعداد اجسام شبه-پروتوکورم وجود دارد. اثر IBA و NAA بر روی تعداد اجسام شبه-پروتوکورم معنی‌دار نبود (جدول ۲).

اثر BA و IBA یا NAA بر روی ارتفاع گیاهچه: اثر BA، IBA و NAA بر روی ارتفاع گیاهچه معنی‌دار نبود (جدول ۲). در میان غلظت‌های مختلف BA، ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر، بیشترین تأثیر را بر روی افزایش ارتفاع گیاهچه‌ها (۱۰۲ میلی‌متر در گیاهچه) داشت (جدول ۱). بالاترین ارتفاع گیاهچه‌ها (۱۲۴/۱۰ میلی‌متر در گیاهچه) در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA آن به‌دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- اثر ساده و متقابل BA و IBA یا NAA بر روی تکثیر و رشد ارکید *Orchis catasetum*

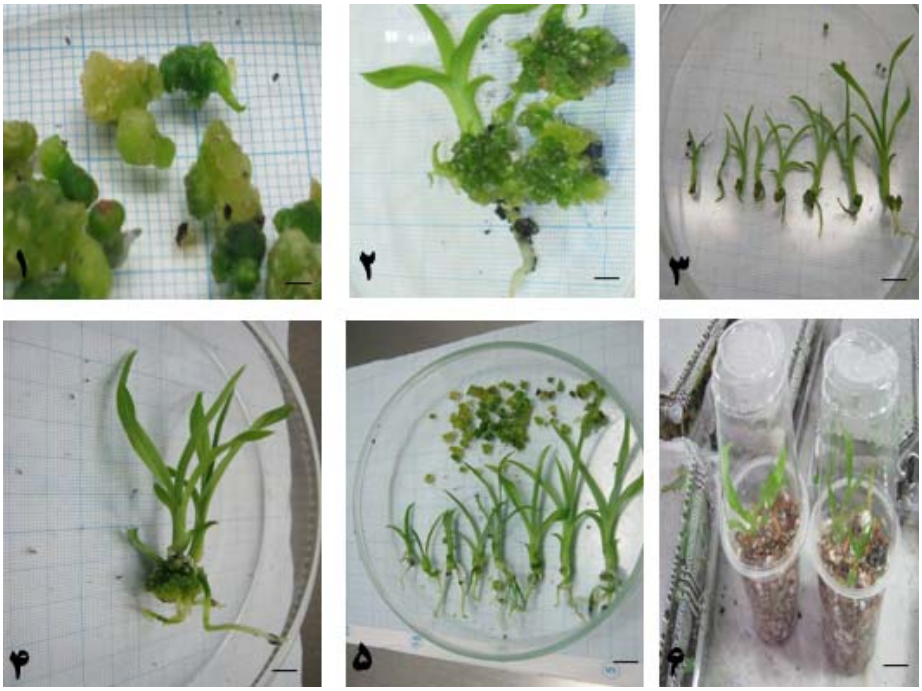
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (میلی‌گرم در لیتر)			تعداد اجسام شبه-پروتوکورم	ارتفاع گیاهچه (میلی‌متر)	تعداد برگ	تعداد ریشه	طول ریشه (میلی‌متر)
BA	IBA	NAA					
۰	۰	۰	۱۰/۸۰$^{b-d}$	۷۵/۵۰$^{b-d}$	۷/۳۰$^{b-d}$	۴/۳۰$^{c-f}$	۸۱/۸۸$^{d-g}$
۰/۲	۰	۰	۱۲/۲۰$^{c-e}$	۱۰۲/۰۰^{a}	۸/۸۶^{ab}	۵/۳۰$^{b-d}$	۱۰۲/۱۰$^{b-d}$
۰/۵	۰	۰	۱۰/۸۰$^{c-e}$	۴۰/۰۰^{f}	۴/۰۰^{i}	۲/۰۸^{i}	۵۰/۱۳^{fg}
۱	۰	۰	۸/۱۰$^{e-g}$	۶۴/۵۰$^{c-f}$	۵/۶۰$^{d-i}$	۴/۲۰$^{d-g}$	۹۰/۵۰$^{d-g}$
۱/۵	۰	۰	۹/۲۰$^{d-g}$	۴۶/۳۰^{ef}	۷/۰۰$^{b-f}$	۵/۱۰$^{c-e}$	۶۰/۵۰$^{e-g}$
۳	۰	۰	۱۰/۱۰^{de}	۴۷/۳۷^{ef}	۵/۷۰$^{c-i}$	۴/۷۰$^{c-f}$	۱۰۱/۴۰$^{b-e}$
۰	۰/۵	۰	۱۱/۰۰$^{c-e}$	۴۲/۰۲^{f}	۶/۸۰^{ab}	۴/۳۰$^{d-g}$	۸۸/۲۰$^{d-g}$
۰/۲	۰/۵	۰	۱۲/۲۰$^{b-d}$	۳۸/۷۷^{f}	۴/۴۰$^{g-i}$	۳/۸۰$^{e-h}$	۷۴/۳۵$^{d-g}$
۰/۵	۰/۵	۰	۱۴/۵۰^{bc}	۶۶/۹۵$^{c-f}$	۸/۰۸$^{a-c}$	۵/۶۰^{bc}	۹۳/۱۲$^{c-f}$
۱	۰/۵	۰	۹/۰۰$^{d-g}$	۴۹/۲۵$^{d-f}$	۴/۷۰$^{f-i}$	۲/۹۰$^{g-i}$	۴۸/۹۲^{fg}
۱/۵	۰/۵	۰	۹/۶۰$^{d-g}$	۴۱/۰۰^{f}	۴/۱۲^{i}	۲/۶۰^{hi}	۴۶/۲۵^{g}
۳	۰/۵	۰	۱۰/۱۰$^{c-e}$	۵۷/۷۵$^{c-f}$	۵/۲۰$^{e-i}$	۴/۰۰$^{e-h}$	۷۳/۶۷$^{d-g}$
۰	۰	۰/۵	۱۲/۵۰$^{b-d}$	۴۹/۰۰$^{d-f}$	۶/۸۸^{ab}	۴/۵۰$^{d-g}$	۹۰/۲۰$^{d-g}$
۰/۲	۰	۰/۵	۶/۰۰^{gh}	۵۱/۵۸$^{d-f}$	۴/۴۰^{hi}	۳/۰۸$^{g-i}$	۵۶/۵۸^{fg}
۰/۵	۰	۰/۵	۱۸/۸۴^{a}	۱۲۴/۱۰^{a}	۹/۵۰^{a}	۶/۹۴^{a}	۱۷۸/۹۰^{a}
۱	۰	۰/۵	۱۵/۶۰^{b}	۸۴/۱۳^{bc}	۸/۰۰$^{a-d}$	۵/۹۵^{ab}	۱۲۴/۲۰^{bc}
۱/۵	۰	۰/۵	۵/۱۰^{h}	۶۴/۷۳$^{c-f}$	۷/۲۰$^{b-e}$	۳/۹۰$^{e-h}$	۵۷/۷۷^{bc}
۳	۰	۰/۵	۵/۱۵^{h}	۵۳/۹۲$^{d-f}$	۵/۶۰$^{d-i}$	۳/۴۰$^{f-i}$	۶۴/۶۷$^{d-g}$

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف همسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی روی تکثیر و رشد ارکید *Orchis catasetum*

منبع تغییرات	درجه آزادی	تعداد اجسام شبه-پروتوکورم	ارتفاع گیاهچه	تعداد برگ	تعداد ریشه	طول ریشه
اکسین (A)	۳	۷/۷۰^{ns}	۱۱۰۱/۶۹*	۶/۸۴*	۳/۴۰**	۲۵۸۳/۳۶*
سیتوکینین (B)	۵	۶۶/۳۰**	۱۱۹۲/۹۶**	۶/۳۲**	۱/۶۹^{ns}	۳۶۷۳/۱۲**
A × B	۱۵	۴۷۵/۲۳**	۹۶۳/۶۰**	۸/۴۶**	۵/۶۴**	۳۵۱۹/۷۷**
خطا	۴۸	۱۸۲/۵۱	۲۸۳/۱۸	۲/۱۱	۰/۷۳	۷۲۵/۲۷
ضریب تغییرات (%)	-	۱۹/۷۰	۲۶/۲۱	۲۲/۱۷	۱۹/۰۳	۳۱/۷۸

**: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ns: عدم معنی‌داری



شکل ۱- ریزازدیادی ارکید *Orchis catasetum* با استفاده از پروتوکورم. ۱: پروتوکورم استفاده‌شده به‌عنوان ریزنمونه (مقیاس = ۱ سانتی‌متر)؛ ۲: یک پروتوکورم در حال توسعه (مقیاس = ۱ سانتی‌متر)؛ ۳: گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از محیط‌های کشت غنی‌شده با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (مقیاس = ۲ سانتی‌متر). در این گیاهچه‌ها تفاوت ارتفاع مشخص است؛ ۴: سرشاخه‌های ریزازدیادی‌شده از پروتوکورم کشت‌شده بر روی محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، (مقیاس = ۱ سانتی‌متر). در این شکل، برگ‌های توسعه‌یافته کاملا مشخص است؛ ۵: گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از محیط‌های کشت غنی‌شده با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (مقیاس = ۲ سانتی‌متر). در این گیاهچه‌ها تفاوت ارتفاع و ریشه‌ها مشخص است؛ ۶: مراحل سازگاری گیاهچه‌های تولیدشده در شرایط درون‌شیشه‌ای به شرایط درون‌خاکی (مقیاس = ۲ سانتی‌متر).

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، به‌تنهایی برای القای ارتفاع بهینه گیاهچه مناسب نبودند، زیرا آنها تنها ۴۰ و ۴۹ میلی‌متر طول را در هر گیاهچه تحریک کردند (جدول ۱). کمترین ارتفاع گیاهچه‌ها (۳۸/۷۷ میلی‌متر در گیاهچه) در محیط حاوی ۰/۲ میلی-گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ثبت شد (جدول ۱).

اثر BA و IBA یا NAA بر روی تعداد برگ: ریزنمونه-های کشت‌شده در حضور ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین تعداد برگ (۹/۵۰ برگ در هر گیاهچه) را تولید کردند، که این تعداد بیش از ۲ برابر تعداد برگ‌های تولیدشده در ریزنمونه‌های کشت-شده در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، به‌تنهایی است (جدول ۱). در میان تمام تیمارهای BA، بیشترین تعداد برگ (۸/۸۶ عدد در گیاهچه) در محیط حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر آن به‌دست آمد. تجزیه واریانس داده‌ها، اختلاف معنی‌داری را در میان غلظت‌های مختلف BA ($p\leq0.01$)، IBA و NAA ($p\leq0.05$)، همچنین اثر متقابل BA و IBA یا NAA ($p\leq0.01$) بر روی تعداد برگ نشان داد (جدول ۲).

اثر BA و IBA یا NAA بر روی تعداد و طول ریشه: تعداد و طول ریشه، تحت تأثیر حضور BA، IBA و NAA در محیط MS قرار دارند. اثر BA، IBA و NAA، به‌تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر بر روی تعداد و طول ریشه در جدول ۱ نشان داده شده است. یک ترکیب از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین

تعداد ریشه (۶/۹۴ عدد در گیاهچه) و بالاترین طول ریشه (۱۷۸/۹۰ میلی‌متر در گیاهچه) را القا کرد. ترکیبی از ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، تیمار مناسبی برای القای تعداد ریشه (۵/۹۵ عدد در گیاهچه) و طول ریشه (۱۲۴/۲۰ میلی‌متر در گیاهچه) بود. در میان تمام تیمارهای BA، بیشترین تعداد ریشه (۵/۳۰ عدد در گیاهچه) و طول ریشه (۱۰۲/۱۰ میلی‌متر در گیاهچه) در محیط MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر آن محاسبه شد (جدول ۱؛ شکل ۱). غلظت‌های بالاتر BA، تعداد و طول بیشتر ریشه را القا نکرد. کمترین تعداد ریشه (۲/۰۸ عدد در گیاهچه) در محیط غنی‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. همچنین، کمترین طول ریشه (۴۶/۲۵ میلی‌متر در گیاهچه) در محیط‌های غنی‌شده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA محاسبه شد (جدول ۱). ارتباط مثبتی بین افزایش غلظت BA و افزایش تعداد و طول ریشه وجود ندارد (جدول ۱).

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p\leq0.01$) در میان غلظت‌های مختلف BA همراه با IBA یا NAA برای تولید ریشه وجود دارد (جدول ۲).

اثر نانوکلات آهن بر روی باززایی پروتوکورم: باززایی پروتوکورم‌ها تحت تأثیر نانوکلات آهن در محیط MS قرار گرفت. بیشترین تعداد اجسام شبه-پروتوکورم (۱۰/۲۰ عدد در گیاهچه) در تیمار شاهد به‌دست آمد (جدول ۳، شکل ۲). در میان تمام تیمارهای نانوکلات آهن، بالاترین باززایی اجسام شبه-پروتوکورم (۱۰/۱۸ عدد در گیاهچه) در محیط حاوی ۰/۱۳ میلی‌گرم در لیتر آن به‌دست آمد. کمترین تعداد اجسام شبه-پروتوکورم (۶/۶۱ عدد در گیاهچه) در تیمار ۰/۷۰ میلی‌گرم به‌دست آمد (جدول ۳). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p\leq0.01$) در میان غلظت‌های مختلف نانوکلات آهن روی تعداد اجسام شبه-پروتوکورم وجود دارد (جدول ۴).

شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف نانوکلات آهن بر ریزازدیادی ارکید *Orchis catasetum* با استفاده از پروتوکورم. ۱: اثر نانوکلات آهن بر ارتفاع گیاهچه (مقیاس = ۱ سانتی‌متر)؛ ۲: ریشه توسعه‌یافته در محیط حاوی نانوکلات آهن (مقیاس = ۱ سانتی‌متر)؛ ۳: اثر نانوکلات آهن بر تعداد اجسام شبه-پروتوکورم (مقیاس = ۲ سانتی‌متر)؛ ۴: اثر نانوکلات آهن بر تعداد برگ (مقیاس = ۲ سانتی‌متر). در این شکل، برگ‌های توسعه‌یافته کاملا مشخص است؛ ۵: اثر نانوکلات آهن بر تعداد ریشه؛ ۶: مراحل سازگاری گیاهچه‌های تولیدشده در شرایط درون‌شیشه‌ای به شرایط درون‌خاکی (مقیاس = ۲ سانتی‌متر).

اثر نانوکلات آهن بر روی ارتفاع گیاهچه: اثر نانوکلات آهن بر روی ارتفاع گیاهچه معنی‌دار بود ($p\leq0.01$) (جدول ۴). بالاترین ارتفاع گیاهچه‌ها (۸۲/۷۹ میلی‌متر در گیاهچه) در محیط حاوی ۰/۱۳ میلی‌گرم در لیتر نانوکلات آهن به-

دست آمد (جدول ۳). کمترین ارتفاع گیاهچه‌ها (۶۵/۷۸ میلی‌متر در گیاهچه) در محیط حاوی ۰/۳۴ میلی‌گرم در لیتر نانوکلات آهن ثبت شد (جدول ۳).

اثر نانوکلات آهن بر روی تعداد برگ: ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط کشت بدون نانوکلات آهن (شاهد)، بیشترین تعداد برگ (۶/۷۶ برگ در هر گیاهچه) را تولید کردند (جدول ۳). در میان تمام تیمارهای نانوکلات آهن، بیشترین تعداد برگ (۶/۶۴ عدد در گیاهچه) در محیط حاوی ۰/۱۳ میلی‌گرم در لیتر آن به‌دست آمد. کمترین تعداد برگ (۴/۰۵ عدد در گیاهچه) در محیط حاوی ۰/۳۴ میلی‌گرم در لیتر نانوکلات آهن به‌دست آمد. تجزیه واریانس داده‌ها، اختلاف معنی‌داری را در میان غلظت‌های مختلف نانوکلات آهن ($p\leq0.01$) بر روی تعداد برگ نشان داد (جدول ۴).

اثر نانوکلات آهن بر روی تعداد و طول ریشه: غلظت ۰/۱۳ میلی‌گرم در لیتر نانوکلات آهن، بیشترین تعداد ریشه (۴/۷۶ عدد در گیاهچه) و بالاترین طول ریشه (۸۷/۵۳ میلی‌متر در گیاهچه) را القا کرد (جدول ۳). کمترین تعداد ریشه (۳/۱۷ عدد در گیاهچه) در محیط غنی‌شده با ۰/۷۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکلات آهن مشاهده شد. همچنین، کمترین طول ریشه (۷۲/۵۳ میلی‌متر در گیاهچه) در محیط‌های غنی‌شده با ۰/۳۴ میلی‌گرم در لیتر نانوکلات آهن محاسبه شد (جدول ۳). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میان غلظت‌های مختلف نانوکلات آهن برای تولید ریشه وجود ندارد (جدول ۴). این اختلاف در ارتباط با طول ریشه معنی‌دار بود ($p\leq0.01$).

جدول ۳- اثر ساده غلظت‌های مختلف نانوکلات آهن روی تکثیر و رشد ارکید *Orchis catasetum*

نانوکلات آهن (میلی‌گرم در لیتر)	تعداد اجسام شبه-پروتوکورم	ارتفاع گیاهچه (میلی‌متر)	تعداد برگ	تعداد ریشه	طول ریشه (میلی‌متر)
۰	۱۰/۲۰^{a}	۷۶/۷۷^{a}	۶/۷۶^{a}	۴/۲۲^{a}	۷۹/۵۶^{b}
۰/۱۳	۱۰/۱۸^{a}	۸۲/۷۹^{a}	۶/۶۴^{a}	۴/۷۶^{a}	۸۷/۵۳^{a}
۰/۳۴	۸/۳۳^{b}	۶۵/۷۸^{b}	۵/۸۷^{a}	۴/۰۷^{a}	۷۲/۴۲^{c}
۰/۷۰	۶/۶۱^{c}	۶۶/۶۱^{b}	۴/۰۵^{b}	۳/۱۷^{a}	۷۳/۶۷^{bc}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف همسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانوکلات آهن روی تکثیر و رشد ارکید *Orchis catasetum*

منبع تغییرات	درجه آزادی	تعداد اجسام شبه-پروتوکورم	ارتفاع گیاهچه	تعداد برگ	تعداد ریشه	طول ریشه
تکرار	۴	۷/۲۸	۲/۱۳	۱/۲۹	۲/۰۲	۰/۵۵
تیمار	۳	۱۵/۴۴**	۸/۰۲**	۱۳/۵۰**	۱/۱۵^{ns}	۱۰/۳۶**
خطا	۱۲	-	-	-	-	-
ضریب تغییرات (%)	-	۱۱/۰۹	۱۰/۳۱	۱۵/۷۵	۳۳/۹۲	۸/۲۲

**: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، *: معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ns: عدم معنی‌داری

بحث

اجسام شبه-پروتوکورم (PLBs) می‌توانند برای ازدیاد سریع ارکیدها مورد استفاده قرار گیرند. افزودن غلظت‌های کم BA و NAA، تکثیر و رشد گیاهچه‌های ارکید *Orchis catasetum* را تحریک کرد. استفاده ترکیبی از BA و NAA، برای ریزازدیادی این ارکید در حال انقراض،

پیشنهاد می‌شود. اگرچه، این مقاله می‌تواند غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA را به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی منفرد برای تحریک تشکیل سرشاخه و تولید ریشه معرفی کند. اما نتایج مشابهی توسط کالیموتو و همکاران (۱۲) بر روی ارکید *Oncidium* sp. به‌دست آمد. این محققان نشان دادند که بیشترین تشکیل اجسام شبه-پروتوکورم و بیشترین تعداد سرشاخه و ریشه در محیط غنی‌شده با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. BAP به‌تنهایی نسبت به ترکیب آن با NAA بهتر بود. البته، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌تنهایی یا در ترکیب با ۱/۵ میلی-گرم در لیتر NAA تعداد ریشه مشابهی (۱۰۰ درصد) را بر روی سرشاخه القا کرد. از آنجایی‌که بذر ارکید بدون آندوسپرم است، بنابراین به شرایط محیطی و مغذی ویژه‌ای برای جوانه‌زنی نیاز دارد (۴). اجسام شبه-پروتوکورم، یک اندام ناقص و ابتدایی است که به شاخه جدید تمایز می-یابد. سلول‌های اجسام شبه-پروتوکورم بسیار مریستمی هستند، بنابراین می‌تواند برای ازدیاد افزایش‌یافته و تولید هم‌زمان گیاهچه‌های ارکید به‌کار رود (۳۸). اجسام شبه-پروتوکورم توسط بسیاری از محققان به‌عنوان ریزنمونه برای ریزازدیادی بسیاری از گونه‌های کمیاب و در خطر انقراض ارکید به‌کار برده می‌شوند (۷، ۹، ۲۰، ۲۸، ۳۱، ۳۳، ۳۹). ارکیدها برای نمو گیاهچه به اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها نیاز دارند (۲۸). نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در طی ریزازدیادی بسیاری از ارکیدها ایفا می-کنند (۳). این مطالعه اثر مثبت BA را برای تولید بیشینه اجسام شبه-پروتوکورم نشان داد. BA در ترکیب با NAA مؤثرتر عمل کرد. این یافته‌ها با برخی یافته‌های دیگر در طی ریزازدیادی ارکیدها مطابقت دارد (۲۸، ۳۱). مطالعه لو و همکاران (۱۷) بر روی ریزازدیادی ارکید *Dendrobium huoshanense* نشان داد که بیشترین تشکیل سرشاخه در محیط کشت حاوی ۱۵-۵ میکرومولار iP-۲ تشکیل شد. چندین مطالعه، اثر مثبت BAP، NAA، TDZ و کینتین (KIN) را برای باززایی گیاهچه از اجسام شبه-پروتوکورم نشان داد (۶، ۱۶، ۲۱). BAP و NAA بیشترین کاربرد را در ریزازدیادی اغلب ارکیدها دارند (۶). این تنظیم‌کننده-های رشد گیاهی نقش مؤثری در ریزازدیادی سایر گیاهان زینتی ایفا می‌کنند (۱، ۲). لو و همکاران (۱۶) نشان دادند که ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای القای اجسام شبه-پروتوکورم (۱۵ عدد در ریزنمونه ساقه) طی ۶ هفته، بهترین بود. ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN نیز برای تشکیل اجسام شبه-پروتوکورم مناسب بود. BAP در ترکیب با NAA برای دستیابی به بیشترین تعداد اجسام شبه-پروتوکورم طی برخی مطالعات پیشنهاد شده است (۱۴، ۲۷). البته یافته‌های ما در تناقض با این نتایج است. اگرچه لو و همکاران (۱۶) نشان دادند که NAA افزوده‌شده به محیط حاوی غلظت بهینه BAP به‌طور معنی‌داری پاسخ ریزنمونه‌های *Dendrobium densiflorum* را اصلاح نکرد و حتی تولید اجسام شبه-پروتوکورم در غلظت‌های بیش از ۱ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. در برخی ارکیدها، IBA ریشه‌زایی را القا کرد. در این مطالعه، NAA برای ریزازدیادی *Orchis catasetum*، بسیار مؤثرتر از IBA بود. مطالعه روی و همکاران (۲۸) بر روی نوعی وانیل (*Vanda coerulea*)، یک ارکید در خطر انقراض، نشان داد که یک ترکیب سازگار بین ۵/۳۶ میکرومولار از NAA و ۳/۸۰ میکرومولار BAP موجب تولید حداکثری اجسام شبه-پروتوکورم شد.

ریزازدیادی ارکیدهای کمیاب و در خطر انقراض در مقیاس وسیع، به‌دلیل ارزش تجاری و حفاظت آنها باید توسعه یابد. یک نسبت مناسب از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها برای تکثیر بهینه اجسام شبه-پروتوکورم مورد نیاز است. کارایی نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای گونه‌ها و ارقام مختلف ارکید، متفاوت است. BA و NAA در غلظت ویژه برای تولید و رشد اجسام شبه-پروتوکورم *Orchis catasetum* مناسب هستند.

با توجه به جدیدبودن فناوری نانو و روند رو به رشد مطالعات در این فناوری، گزارش‌های زیادی درباره اثر این کود بر روی شاخص‌های رشد و نمو گیاهان وجود ندارد. گزارش‌های موجود در ارتباط با کشت خاکی برخی گیاهان و اثر نانوکودها بر روی مورفولوژی و فیزیولوژی آنها می‌باشد. مطالعه روی اثر نانوذرات به‌ویژه نانوکلات آهن در شرایط کشت بافت بسیار محدود است. مقایسه نتایج حاصل از اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نانوکلات آهن در این مطالعه نشان داد که تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از پتانسیل بسیار بالاتری برای تغییر مثبت صفات اندازه‌گیری‌شده در ارکید برخوردار هستند. این بررسی نشان داد که تعداد اجسام شبه-پروتوکورم، ارتفاع گیاهچه، تعداد برگ، تعداد ریشه و طول ریشه در گیاهچه‌های رشدکرده در محیط‌های کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بسیار بیشتر از گیاهچه‌های رشدکرده در محیط‌های کشت حاوی نانوکلات آهن بودند. بنابراین استفاده از نانوکلات آهن در ریزازدیادی ارکید *Orchis catasetum* توصیه نمی‌شود.

منابع

۱- قلی‌زاده، ف.، غلامی، ل. و کیارستمی، خ.، ۱۳۹۳. بررسی اثر محیط‌های کشت پایه و تیمارهای مختلف هورمونی بر ریزازدیادی گل محمدی (*Rosa damascene* Mill.). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۷ (۱): ۱۲۱-۱۲۹.

۲- کاویانی، ب. و غفاری ایسی‌زاد، س.، ۱۳۹۴. اثر غلظت‌های مختلف نفتالن‌استیک‌اسید و کینتین بر روی ریزازدیادی گیاه زینتی لیسیانتوس (Eustoma grandiflorum). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۸ (۴): مقاله آماده انتشار.

3- Arditti, J. and Ernst, R., 1993. Micropropagation of orchids. John Wiley and Sons. New York.

4- Arditti, J., Ernest, R., Yam, T.W. and Glabe, C., 1990. The contribution to orchid mycorhizal fungi to seed germination: a speculative review, Lindleyana. 5: 249-255.

5- Bhadra, S.K. and Hossain, M.M., 2003. *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. Plant Tissue Cult., 13: 165-171.

6- Chugh, S., Guha, S. and Rao, U., 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. Sci. Hortic., 122: 507-520.

7- Dev, C.R. and Temjensangba, 2006. *In vitro* propagation of threatened terrestrial orchid *Malaxis khasiana* Soland ex. Swartz through immature seed culture. Ind. J. Exp. Biol., 44: 762-766.

8- Geetha, S. and Shetty, S.A., 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. Curr. Sci., 71: 886-889.

9- Hossain, M.M., Sharma, M., Teixeira da Silva, J.A. and Phthak, P., 2010. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. Ex. Lindl. Sci. Hortic., 123: 479-487.

10- Janarthanam, B., Seshadri, S., 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 44: 84-89.

11- Kalimuthu, K., Senthikumar, R. and Murugalatha, N., 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr.-a tropical orchid. Curr. Sci., 91: 1401-1403.

12- Kalimuthu, K., Senthikumar, R. and Vijayakumar S., 2007. *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). Afr. J. Biotech., 6 (10): 1171-1174.

13- Ket, N.V., Hahn, E.J., Park, S.Y. and Paek, K.Y., 2004. Micropropagation of an endangered orchid *Anectochilus formosanus*. Biol. Plant, 48: 339-344.

14- Kim, M.S. and Kim, J.Y., 2003. Micropropagation of *Dendrobium* hybrids through shoot tip culture. Acta Hortic., 624: 527-533.

15- Kuo, H.I., Chen, J.T. and Chang, W.C., 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 41: 453-456.

16- Luo, J.P., Wang, Y., Zha, X.Q. and Huang, L., 2008. Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindle. ex Wall. through protocorm-like bodies: effect of plant growth regulators and lanthanoids. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 93: 333-340.

17- Luo, J.P., Wawrosch, C. and Kopp, B., 2009. Enhanced micropropagation of *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng through protocorm-like bodies: The effect of cytokinins, carbohydrate sources and cold pretreatment. Sci. Hortic., 123: 258-262.

18- Luo, J.P., Zha, X.Q. and Jiang, S.T., 2003a. Suspension culture of protocorm-like bodies from the endangered medicinal plant *Dendrobium huoshanenese*. China J. Chinese Mater. Med., 28: 611-614.
19- Malabadi, R.B., Mulgund, G.S. and Kallappa, N., 2005. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. J. Plant Physiol., 162: 473-478.
20- Nagaraju, V. and Mani, S.K., 2005. Rapid *in vitro* propagation of orchid *Zygopetalum intermedium*. J. Plant Biochem. Biotech., 14: 27-32.
21- Nasiruddin, K.M., Begum, R. and Yasmin, S., 2003. Protocorm-like bodies and plantlet regeneration from *Dendrobium formosum* leaf callus. Asian J. Plant Sci., 2: 955-957.
22- Nayak, N.R., Sahoo, S., Patnaik, S. and Rath, S.P., 2002. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium alofolium* (L.) SW. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Sci. Hortic., 94: 107-116.
23- Nge, K.L., New, N., Chandrkrachang, S. and Stevens, W.F., 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. Plant Sci., 170: 1185-1190.
24- Park, S.Y., Murthy, H.N. and Paek, K.Y., 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. Plant Sci., 164: 919-923.
25- Park, S.Y., Yeung, E.C., Chakrabarty, D. and Paek, K.Y., 2002b. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf sub-epidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. Plant Cell Rep., 21: 46-51.
26- Prakash, L., Lee, C.I., Loh, C.S. and Goh, C.J., 1996. *In vitro* propagation of commercial orchids: an assessment of current methodologies and development of a novel approach-thin cross section culture. In: Islam, A.S. (Ed.), Plant Tissue Cult., Oxford Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi.
27- Puchooa, D., 2004. Comparison of different culture media for the *in vitro* culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). Ind. J. Agric. Biol., 6: 884-888.
28- Roy, A.R., Patel, R.S., Sajeev, S. and Deka, C., 2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindle. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. Sci. Hortic., 128: 325-331.
29- Roy, J. and Banerjee, N., 2003. Induction of callus and plant regeneration from shoot tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. Oculatum H.K.f. Sci. Hortic., 97: 333-340.
30- Saiprasad, G.V.S., Raghuveer, P., Khetarpal, S. and Chandra, R. 2004. Effect of various polyamines on production of protocorm-like bodies in orchid- *Dendrobium* 'Sonia'. Sci. Hortic., 100: 161-168.
31- Seeni, S. and Latha, P.G., 2000. *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda. Plant Cell Tissue Org. Cult., 61: 1-8.
32- Sheela, V.L., Rajmohan, K., Anita, S. and Sarada, S., 2004. Effect of growth regulators on development and multiplication of protocorm like bodies in *Dendrobium* cv. Sonia. J. Orchid Soc., India. 18: 21-23.
33- Sheelavantmath, S.S., Murthy, H.N., Pyati, A.N., Ashok Kumar, H.G. and Ravishanker, B.V., 2000. *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. Plant Cell Tissue Org. Cult., 60: 151-154.
34- Shimura, H. and Koda, Y., 2004. Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. Rebunerse through protocorm-like bodies derived from mature seed. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 78: 273-276.
35- Sinha, P., Hakim, M.K. and Alam, M.F., 2007. Efficient micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* (L.) B.L. cv. 'Cool Breeze' using inflorescence axis thin section as explants. Prop. Ornamental Plants. 7: 9-15.
36- Subramanium, G. and Taha, R.M., 2003. Morphogenesis of *Cymbidium atropurpureum in vitro*. Malays. J. Sci., 22: 1-5.
37- Teixeira, da Silva, J.A., 2003. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. Afr. J. Biotech., 2: 683-691.
38- Teixeira, da Silva, J.A., Yam, T., Fukai, S., Nayak, N. and Tanaka, M., 2005. Establishment of optimum nutrient media for *in vitro* propagation of *Cymbidium* Sw (Orchidaceae) using protocorm-like body segments. Prop. Ornamental Plants, 5: 129-136.
39- Teixeira, da Silva, J.A., Singh, N. and Tanaka, M., 2006. Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plants. Plant Cell Tissue Org. Cult., 84: 135-144.
40- Wang, Y.F., Lu, R.J., Sun, Y.F., Zhou, R.M. and Huang, J.H., 2004. The induction and cultivation of cell-derived regenerates of *Dendrobium huoshanenese*. Acta Agric. Shanghai, 20: 8-10.

In vitro micropropagation of an endangered orchid species (*Orchis catasetum*) through protocorms: the effect of plant growth regulators and iron Nano-chelate

Kaviani B.[1], Negahdar N.[2], Baker A.[3] and Mosafer N.[1]

[1] **Horticultural Science Dept., Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. of Iran**

[2]**Hyrcan Agricultural Sciences and Biotechnology Research Institute, Amol, I.R. of Iran**

[3] **Horticultural Science Dept., Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. of Iran**

Abstract

Many orchid species are threatened with the danger of extinction. Here, a protocol was developed for high frequency *in vitro* multiplication of an endangered orchid, *Orchis catasetum* using plant growth regulators and iron Nano-chelate. Protocorms, as explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium fortified with different concentrations of N^6-benzyladenine (BA), α-naphthaleneacetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA) either individually or in combination and iron Nano-chelate. A combination of 0.5 mg l^{-1} BA and 0.5 mg l^{-1} NAA was found to be suitable for maximum protocorm-like bodies (PLBs) regeneration (18.84/plantlet) from protocorm explants. The maximum number of root (6.94/plantlet) and leaf (9.50/plantlet), also the highest plant height (124.10 mm/plantlet) and root length (178.90 mm/plantlet) were obtained on MS medium supplemented with 0.5 mg l^{-1} BA a long with 0.5 mg l^{-1} NAA. Related to the effect of iron Nano-chelate, maximum plant height (82.79 mm/plantlets), maximum root number (4.76/plantlets) and root length (87.53 mm/plantlets) were observed in explants cultured in MS medium enriched with 0.13 mg l^{-1}. Plantlets were transplanted to pots filled with perlite, wood pieces, ionolite and mineral cartridge shell (1:1:1:1), also perlite individually and transferred to the greenhouse. Upon *ex vitro* transfer, 100% of plants survived.

Key words: Protocorm, *In vitro* propagation, Nano-fertilizers, Plant growth regulators