گل و گیاهان زینتی (۱۳۹۸)، ٤(۲): ۱۱٤-۱۰۱

نوع مقاله: پژوهشی

بررسی همبستگی و واکاوی خوشه‌ای صفات تنژگی بذر ۵ رقم ارکید فالانوپسیس در محیط کشت Chen

فاطمه بیدرنامنی[۱]، سید نجم الدین مرتضوی[۱*]، مریم رحیمی[۲]

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲. گروه فضای سبز، دانشکده کشاورزی زابل، زابل، ایران

*mortazavi@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۱

چکیده

امروزه فنون کشت درون‌شیشه‌ای برای افزایش اقتصادی و سریع گونه‌های ارکید به‌ویژه فالانوپسیس پیشنهاد می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی کیفیت تنژگی بذر پنج رقم ارکید فالانوپسیس و همبستگی شاخص‌های آن در محیط کشت Chen بود. بررسی حاضر روی بذور نارس و رسیده پنج رقم ارکید فالانوپسیس شامل"Dubrovnik، Memphis، Andorra، Bucharest و Nottingham انجام شد. کپسول‌ها در هر یک از ارقام با خودگرده‌افشانی گل تشکیل گردید. بذور در محیط کشت chen کشت شدند. در فاصله ۱۸ تا ۳۳ روز پس از کاشت، تعداد بذور نتنژیده و تنژیده شمارش گردیدند. بیشترین ضریب همبستگی بین سرعت تنژگی و شاخص تنژگی با مقدار ۰/۹۸ بود. نتایج واکاوی خوشه ای بر اساس تمامی صفات اندازه‌گیری شده تنژگی به روش بیشترین میانگین فاصله بین خوشه‌ها انجام شد که در نهایت در فاصله اقلیدوسی ۱/۲۵ ارقام به دو گروه تقسیم‌بندی شدند که ارقام Dubrovnik و Memphis در گروه اول و ارقام Andorra، Bucharest و Notingham در گروه دوم دسته بندی شدند. صفات مهم و کلیدی در جداسازی خوشه‌ای بین گروه‌ها درصد تنژگی، سرعت تنژگی، شاخص تنژگی و میانگین زمان تنژگی بودند. آزمون واکاوی تابع تشخیص، گروه‌بندی بین ارقام را ۱۰۰٪ تایید کرد. دو آزمون Hotelling-Lawley Trace و Roy's Greatest Root دارای بیشترین مقدار (۵/۲۳) برای تایید گروه‌بندی بود. با توجه به نتایج واکاوی خوشه‌ای و همبستگی می توان نتیجه گرفت که رقم Notingham دارای بیشترین مقدار در عامل‌های تنژگی بوده و بر این اساس می‌توان از صفات درصد تنژگی، سرعت تنژگی و شاخص تنژگی به عنوان صفات کلیدی برای برنامه‌های بهنژادی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: ارکید، بذر، افزایش، تنژگی.

مقدمه

ارکیدها با داشتن ۸۰۰ جنس و ۲۵۰۰۰ گونه از قدیمی‌ترین و تکامل یافته‌ترین تیره های گیاهی هستند. این گل ها به علت محبوبیتی که دارند توانسته‌اند ۸٪ از تجارت جهانی گل و گیاهان زینتی را به خود اختصاص دهند (Chugh *et al.*, 2009). بیشتر رقم‌های ارکید در مناطق نیمه‌گرمسیری و معتدله دیده می‌شوند (Cribb & Govaerts, 2005). ارکیدها دارای یک غلاف بذری

می‌باشند که تعداد زیادی بذر (۱۳۰۰ تا ٤ میلیون عدد) در آن وجود دارد، به طوری که این بذرها اغلب هیچ اندوسپرمی ندارند و به اندازه‌ای ریز هستند که با چشم غیرمسلح دیده نمی‌شوند. تنزگی بذر ارکید در شرایط طبیعی تنها در صورت همزیستی با قارچ ریشه‌ها و به میزان کمتر از ۱٪ گزارش شده است (Arditti, 1967; Harvais, 1972). از زمانی که نادسون[1] (۱۹۲۲) اظهار داشت که می‌توان گل‌های ارکید را بدون همزیستی با قارچ‌ها و با تهیه محیط کشت مناسب و فراهم نمودن سایر نیازهای آن به صورت درون شیشه‌ای افزود افزایش گونه‌ها و رقم‌های مختلف این گل پرطرفدار به روش کشت بافت آغاز شده و تا به امروز چندین محیط کشت اختصاصی نیز به این منظور تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفته است. بر اساس گزارش دانشگاه تگزاس آمریکا در سال ۲۰۰۷، بیش از ۱۲٦ میلیون دلار ارز، حاصل از فروش انواع گل‌های ارکید بریدنی و گلدانی در این کشور حاصل شده است (Lee, 2011).

ارکید فالانوپسیس[2] از تیره Orchidaceae است که از جمله بزرگ ترین تیره های گیاهان گلدار می‌باشد (Dressler, 1993) این جنس ارکید حدود ٦٦ گونه را شامل می‌شود (Liu *et al.*, 2016; Chien *et al.*, 2015). ارکیده فالانوپسیس از ارکیده‌های مونوپودیال بوده و بومی جنوب شرقی آسیا و کشورهایی مثل سنگاپور، مالزی، فیلیپین، تایلند، اندونزی و همچنین شمال استرالیا می باشد (Chen *et al*., 2006) و به دلیل زیبایی منحصر به فرد، قرینه بودن گل ها و داشتن گل های بزرگ، رنگارنگ و با دوام و همچنین سازگاری بالا به عنوان گل بریدنی و یا گیاه گلدانی از محبوب ترین جنس‌های ارکیده در صنعت باغبانی می‌باشد. امروزه ارکیده‌ها به صنعت میلیون دلاری در کشورهایی مثل تایلند، استرالیا، سنگاپور، مالزی و چند کشور دیگر تبدیل شده‌اند (Chugh *et al.*, 2009). ارکیده فالانوپسیس با ۷۵٪ فروش ارکیده های گلدانی مهم ترین جنس ارکیده به شمار می‌رود (Ardit, 2009). در برنامه‌های بهنژادی،گزینش یک رقم مناسب بر اساس تعداد صفات زیادی صورت می‌گیرد که بین صفات ممکن است همبستگی مثبت یا منفی وجود داشته باشد (Johnson and Wichern, 1988). همبستگی صفات در گیاهان می‌تواند ژنتیکی یا محیطی باشد (Falconer, 1989). همبستگی فنوتیپی شامل اثرهای ژنتیکی و محیطی می‌باشد که به طور مستقیم از اندازه‌گیری دو صفت در تعدادی از افراد جمعیت می‌تواند مشاهده شود. همبستگی ژنوتیپی وابسته به مقادیر اصلاحی (مثل واریانس افزایشی) دو صفت است و مقادیر ژن‌های مشابه یا ژن‌های نزدیک به هم را که به دلیل کوواریانس در دو صفت مختلف ایجاد می‌شود اندازه‌گیری می‌کند. واکاوی و تحلیل همبستگی، پارتیشن ضرایب همبستگی را بر مولفه‌های آن میسر می‌کند. یکی از مولفه‌ها ایجاد ضرایبی است که ضرایب متغیر پیش‌بینی کننده بر متغیر پاسخ را اندازه‌گیری می‌کند. دومین مولفه هم اثرهای متغیر پیش‌بینی‌کننده بر متغیر پاسخ از طریق متغیر پیش‌بینی کننده دیگر را میسر می‌سازد (Jhon *et al.*, 2002). محبوبیت فالانوپسیس باعث بهبود دانش تولید آن در جهان شده و در کشوری مانند تایوان، محصول اول صادراتی بخش کشاورزی است (Chen & Chang, 2006).

1. Knudson
2. *Phalaenopsis*

روش‌های آماری که بدون از بین بردن اطلاعات مفید، تعداد صفات موثر در عملکرد را کاهش می‌دهد، برای بهنژادگران دارای اهمیت زیادی است. بنابراین استفاده از همبستگی میان صفات مرسوم است، با این حال همبستگی صفات رابطه علت و معلول بین صفات را نشان نمی‌دهد، چون این رابطه را تعدادی عامل ناشناخته ایجاد می‌کند (Lee & Kaltsicks, 1973). در پژوهشی که روی همبستگی صفات گلایول انجام شد، نشان داد که بین طول سنبله با ارتفاع بوته، تعداد گل‌ها در سنبله واندازه گل‌ها همبستگی مثبت و معناداری وجود داشت. وزن و اندازه پداژه، همبستگی منفی قوی با روزهای جوانه زدن، روزهای مربوط به باز شدن گلچه و وزن میانگین پداژه در هر دو سطح فنوتیپی و ژنوتیپی را نشان داد (Misra *et al.*, 2003). براساس نتایج به دست آمده در هند که روی همبستگی صفات مختلف ۲۰ ژنوتیپ میخک انجام شد، ساقه گل دهنده هر گیاه همبستگی مثبت با تعداد جوانه هر گیاه، طول سنبله و روزهای باز شدن جوانه گل نشان داد (Radhakrishna *et al.*, 2004).

در بررسی دیگری که روی همبستگی صفات ۲۵ ژنوتیپ ارکید ۸ ساله در بنگلادش انجام شد، نتایج نشان داد که اندازه بزرگ گل‌های هر گیاه همبستگی مثبت با تعداد سنبله هر گیاه دارد (۰/۳۷)، که نشان دهنده این است که‌هرچه تعداد سنبله گیاه بیشتر باشد، اندازه گیاه بزرگتر است. گسترش عمودی گل‌ها به طورمعنی‌داری همبستگی مثبت زیادی با وزن گل (۰/۷٦) و بخش افقی گل (۰/۸۹) داشته است. همچنین نتایج نشان داده که ارتفاع گیاه همبستگی مثبت با تعداد گل‌ها در هر گیاه (۰/۹۵)، تعداد سنبله در هر گیاه (۰/٤۸) و وزن گل (۰/۳۱) دارد. با توجه به پژوهش‌های انجام شده، پیشنهاد شده که‌گزینش ارکیدها بر اساس صفاتی از جمله وزن گیاه، تعداد سنبله در هر گیاه و وزن گل‌ها صورت گیرد (Miano *et al.*, 2015). متخصصان بهنژادی گیاهی باگزینش و به کارگیری مقدار متناسبی از گوناگونی ژنتیکی می‌توانند به اهداف از قبل پیش‌بینی شده برسند که برای تعیین فواصل زیاد و کم ژنوتیپ‌ها، نزدیکی و یا عدم نزدیکی آن ها و همچنین تعیین وجود و یا عدم وجود تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها از واکاوی خوشه‌ای استفاده می‌کنند. در بین روش‌های واکاوی چند متغیره، واکاوی به مولفه‌های اصلی، واکاوی خوشه‌ای و واکاوی به عامل‌ها مهمترین روش‌ها می‌باشند (Mohammadi and Prasanna, 2003). یکی از مشکلات عمده در پرورش فالانوپسیس و دیگر ارکیده‌ها افزایش آن ها می‌باشد که به علت افزایش سخت ارکیده‌ها از طریق رویشی و نیز عدم تنژیدن بذور ارکیده در شرایطی مانند دیگر گیاهان است (Chugh *et al*., 2009). تاکنون پژوهشی در رابطه با واکاوی خوشه‌ای و همبستگی بین صفات تنژگی روی ارکید فالانوپسیس انجام نشده است. این پژوهش برای بررسی رابطه همبستگی بین صفات مختلف تنژگی برای رسیدن به صفات موثر در تنژگی و طبقه‌بندی مطلوب بذور رسیده و نارس پنج رقم ارکید و تعیین بهترین رقم از نظر عامل‌های تنژگی برای برنامه‌های بهنژادی انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای بررسی همبستگی و واکاوی خوشه‌ای ویژگی‌های تنژگی در پنج رقم ارکید فالانوپسیس در محیط کشت

Chen، پژوهش جاری در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان اجرا شد. پنج رقم ارکید فالانوپسیس شامل Dubrovnik، Memphis، Andorra، Bucharest، و Nottingham از گلخانه‌ای در پاکدشت تهیه شد. در آذرماه گرده‌افشانی با استفاده از سرنگ مایه زنی ارکید که در اداره ثبت اختراعات سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران ثبت شده است (شماره ثبت اختراع ۰۰۳٦۹۵) انجام شد (شکل ۱).

شکل ۱- سرنگ مایه زنی ارکید ثبت شده در اداره ثبت اختراعات.

Figure 1- Orchid inoculation syringe registered with the Patent Office.

عملیات مایه زنی از آذرماه تا خردادماه ادامه داشت. در تاریخ ۱۰ خرداد از کپسول‌هایی که در آذرماه مایه زنی شده بودند برای آزمایش بذرهای رسیده و کپسول‌هایی که در بهمن ماه مایه زنی شده بودند برای آزمایش بذرهای نارس استفاده شد. بذرهای نارس در مرحله سبز بودن کپسول و بذرهای رسیده در مرحله قهوه‌ای شدن کپسول پیش از رسیدگی کامل و چروکیده شدن برداشت شدند. با توجه به اینکه آزمایش در خرداد ماه انجام شد بذرهای نارس و رسیده به صورت همزمان در محیط کشت کاشته شدند. پس از مایه زنی با توجه به اینکه گندزدایی بذرهای بسیار ریز ارکید دشوار بود، کپسول‌ها در مرحله پیش از خشکیدگی و باز شدن کامل از ساقه گل‌دهنده جدا شده و برای گندزدایی به آزمایشگاه انتقال یافتند. برای گندزدایی ابتدا کپسول‌ها زیر آب سرد به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه شسته شد تا آلودگی سطحی پاک گردد. سپس با مایع ظرفشویی دو تا سه بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو و آبکشی شدند. برای گندزدایی تکمیلی، کپسول‌ها به مدت ۵ دقیقه در بطری‌های گندزدایی شده دارای محلول هیپوکلریت سدیم (۵٪) به همراه ۱ قطره توئین-۲۰ غوطه‌ور و بطری‌ها تکان داده شد تا تمام سطوح کپسول گندزدایی شود. پس از شستن با آب مقطر گندزدایی شده به مدت سه بار، در مرحله بعدی کپسول‌ها در بطری گندزدایی شده به همراه اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شده و در مرحله آخر ۳ بار با آب مقطر گندزدایی شده به طور کامل شسته شدند. پس از تهیه محلول مایه و افزودن آگار روی لرزا، محیط کشت ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۰۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع به مدت ۲۰ دقیقه گندزدایی شد. تمام شیشه‌های کشت در اتاقک رشد با دمای ۲±۲٤ درجه

سلسیوس زیر نور سفید فلورسنت (٥٦ میکرو مول بر مترمربع بر ثانیه) با دوره نوری ١٦ ساعت قرار داده شدند. روش کاشت بذرها پس از گندردایی کپسول بدین صورت بود که در زیر هود کشت بافت با انبرک بخشی از بذرها در سطح محیط کشت Chen به صورت کامل پخش شد (شکل ۲) و اندازه گیری شاخص‌های تنژگی پس از ۱۸ روز آغاز و تا پایان تنژگی بذرهای تنژیده و نتنژیده جداسازی و شمارش شدند. چون بذر ارکید بسیار ریز بوده و به دلیل شرایط سترون زیر هود امکان شمارش بذرها وجود نداشت، شمارش نهایی ۱۸ روز پس از کاشت انجام شد (شکل ۲).

شکل ۲- تشکیل کپسول (الف و ب) و کشت بذرها پس از گندزدایی در محیط کشت (ج).

Figure 2- Capsule formation (a, b) and seeds cultured after sterilization on culture medium.

آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح به طور کامل تصادفی با ۱۰ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. برای انجام واکاوی خوشه‌ای از شیوه پیوند میانگین پس از استاندارد کردن داده‌ها استفاده شد. ویژگی‌ها براساس اندازه‌گیری مقادیر نبود تشابه از صفر تا ۱۰ گروه‌بندی شد. تقسیم‌بندی درختی بر اساس دورترین میانگین (با برش نمودار درختی در فاصله بین ۰/۵۵ تا ۱/۲۵) به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی شدند. با توجه به برداشت بخشی از بذرها در هر کپسول به طور میانگین حدود ۵۰۰ بذر در هر شیشه آزمایشگاهی کشت شد. ارقام مورد استفاده در آزمایش از گونه فالانوپسیس رقم Nottingham با گل‌های سفید، Bucharest با گلهای بنفش‌راه راه، Memphis با گل های بنفش، Dubrovnik با گل های زرد و Andorra با گل‌های بنفش خالدار بودند (شکل ۳).

هجده روز پس از کشت بذرها، درصد تنژگی، سرعت تنژگی، شاخص تنژگی، میانگین تنژگی نهایی، میانگین زمان تنژگی و ضریب سرعت تنژگی برای تمام نمونه‌ها در یک زمان مشخص اندازه‌گیری شد و فاصله زمانی شمارش برای هر شیشه ۳ روز بود. تنژگی از روز ۱۸ پس از کشت آغاز و تا روز ۳۳ ادامه داشت. همچنین با توجه به ریز بودن بذرهای ارکید از مجموع بذرهای سبز تنژیده به اضافه بذرهای سفید نتنژیده، شمار کل بذرها در هر شیشه کشت بافت مشخص شد. بذرهای سبز در هر تیمار به عنوان بذرهای تنژیده و بذرهای سفید به‌عنوان بذرهای نتنژیده و

سقط شده تعیین شدند (شکل ۲). درصد تنژگی از نسبت شمار بذرهای تنژیده به شمار کل بذرها به دست آمد. نتایج بررسی آزمون‌های معنی‌داری گروه‌بندی ویژگی‌های تنژگی نشان داد که بیشترین مقدارهای ویژه برای آزمون همبستگی با روش Hotelling-Lawley Trace و Roy's Greatest Root می‌باشد (جدول ٤).

شکل ۳- ارقام فالانوپسیس مورد استفاده در آزمایش.

Figure 3- *Phalaenopsis* cultivars used in the experiment.

سرعت تنژگی و میانگین سرعت تنژگی نیز به کمک رابطه‌های زیر به دست آمد (Sahelzadeh *et al.*, 2009):

رابطه (۱)

$$RS = \sum_{I=1}^{n} \frac{Si}{Di}$$

در رابطه بالا: RS سرعت تنژگی، Si شمار بذرهای تنژیده در هر شمارش، Di شمار روز تا شمارش n ام و n مرتبه‌های شمارش می‌باشد.

رابطه (۲)

$$MGT = \frac{\sum Dn}{\sum n}$$

در رابطه بالا، MGT میانگین زمان تنژگی، n شمار بذرهایی که در روز D تنژیده اند و D شمار روزهای پس از آغاز تنژگی می‌باشد. همچنین ضریب سرعت تنژگی (CVG) که مشخصه سرعت و شتاب تنژگی بذرهاست از رابطه زیر محاسبه شد:

رابطه (۳)

$$CVG = \frac{G1 + G2 + \cdots + Gn}{(1 \times G1) + (1 \times G2) + \cdots + (n \times Gn)}$$

که در این رابطه G1 تا Gn شمار بذرهای تنژیده از روز اول تا آخر آزمون (روز ۳۳ در این پژوهش) است (Scott *et al*., 1984).

شاخص تنژگی از مجموع نسبت شمار کل بذرهای تنژیده به شمار روزهای پس از کاشت به دست آمد که در آن Ni برابر است با شمار کل بذرهای تنژیده تا روز N ام و Ti شماره روز که برای این پژوهش، نخستین روز شمارش ۱۸ و آخرین روز شمارش ۳۳ بود (Tekrony & Egli, 1991; Draper, 1985).

رابطه (٤)

$$\sum G.I = \frac{Ni}{Ti}$$

میانگین تنژگی روزانه (MDG) که شاخصی از سرعت تنژگی روزانه است به صورت زیر محاسبه شد:

رابطه (٥)

$$MDG = \frac{FGP}{D}$$

FGP درصد تنژگی نهایی (Hamidi *et al*., 2009) و D شمار روز تا رسیدن به بیشینه تنژگی نهایی (طول دوره اجرای آزمون) است (Hunter *et al*., 1984).

واکاوی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9 و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد. برای واکاوی و تحلیل آماری ابتدا نرمال بودن داده‌های ویژگی‌های مختلف با استفاده از نرم افزار Minitab 16 مورد بررسی قرار گرفت. سپس ضریب های همبستگی پیرسون بین ویژگی های مورد بررسی با استفاده از نرم افزار SAS برآورد شد. برای گروه‌بندی بذرهای نارس و رسیده پنج رقم ارکید فالانوپسیس از واکاوی خوشه‌ای به روش میانگین فاصله بین خوشه‌ها با استفاده از مربع اقلیدسی استفاده شد. در آزمون نامبرده از نرم افزار آماری SAS 9 استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که ویژگی درصد تنژگی بذرهای با میانگین زمان تنژگی همبستگی منفی با ویژگی‌های سرعت تنژگی، شاخص تنژگی، میانگین تنژگی روزانه و ضریب سرعت تنژگی همبستگی مثبت در سطح یک درصد دارد (جدول۱). سرعت تنژگی با میانگین زمان تنژگی همبستگی منفی و با درصد تنژگی، شاخص تنژگی، میانگین تنژگی روزانه و ضریب سرعت تنژگی در سطح یک درصد همبستگی مثبت نشان داد (جدول ۱). همچنین میانگین زمان تنژگی همبستگی منفی با تمام ویژگی‌های تنژگی شامل: درصد تنژگی، سرعت تنژگی، شاخص تنژگی، ضریب سرعت تنژگی و میانگین تنژگی روزانه در سطح یک درصد نشان داد. شاخص تنژگی، میانگین تنژگی روزانه و ضریب سرعت تنژگی فقط با میانگین وزن تنژگی همبستگی منفی در سطح یک درصد داشتند، بیشترین ضریب همبستگی مثبت بین شاخص تنژگی و سرعت تنژگی ۰/۹۸ است.

ضریب های با اعداد منفی بیانگر همبستگی منفی و معکوس بین دو ویژگی، ضریب های با دوستاره بیانگر همبستگی معنی‌دار در سطح ۱٪ بین دو ویژگی، ضریب های با یک ستاره بیانگر همبستگی در سطح ۵٪ و ضریب های بدون ستاره نشان‌دهنده نبود همبستگی معنی‌دار بین دو ویژگی است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از همبستگی بین ویژگی‌های اندازه‌گیری شده می‌توان نتیجه گرفت که ارقام با سرعت تنژگی و شاخص تنژگی بالا مانند Nottingham را

می‌توان برای هدف‌های بهنژادی به عنوان پایه مادری یا والد پدری برای ارقامی مثل Memphis و Dubrovnik با عملکرد پایین در عامل های تنژگی به کار برد. نتایج این پژوهش با نتایج سایر پژوهشگران که نشان دادند میانگین زمان تنژگی با سایر عامل‌های تنژگی مثل درصد تنژگی، سرعت تنژگی، شاخص تنژگی، و میانگین تنژگی بذرها همسو بود (Bagheri *et al*., 2012; Haji-babaii *et al*., 2015).

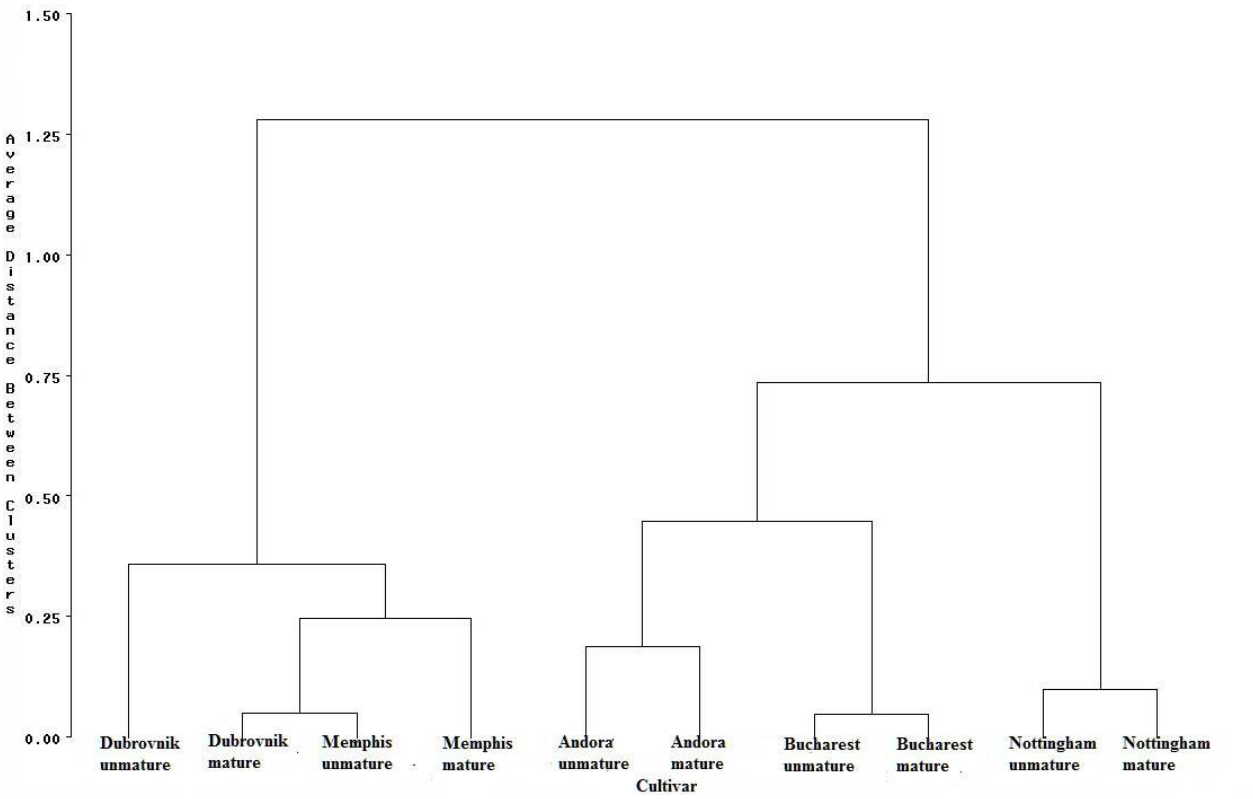
جدول ۱- همبستگی بین ویژگی های مختلف اندازه‌گیری شده.

Table 1- Correlation between different measured characteristics.

	درصد تنژگی Germination percentage	سرعت تنژگی Germination rate	شاخص تنژگی Germination index	میانگین تنژگی روزانه Mean daily germination	میانگین زمان تنژگی Mean germination time	ضریب سرعت تنژگی Coefficient of germination rate
درصد تنژگی Germination percentage	1	0.91**	0.90**	0.91**	-0.91**	0.67**
سرعت تنژگی Germination rate	0.91**	1	0.67**	0.91**	-0.94**	0.80**
شاخص تنژگی Germination index	0.90**	0.98**	1	0.90**	-0.91**	0.86**
میانگین تنژگی روزانه Mean daily germination	0.88**	0.91**	0.90**	1	-0.91**	0.67**
میانگین زمان تنژگی Mean germination time	-0.91**	-0.94**	-0.91**	-0.91**	1	-0.67**
ضریب سرعت تنژگی Coefficient of germination rate	0.67**	0.80**	0.86**	0.67**	-0.67**	1

واکاوی خوشه ای

برای انجام واکاوی خوشه ای شیوه پیوند میانگین پس از استاندارد کردن داده‌ها به کار برده شد. ویژگی‌ها بر اساس اندازه‌گیری مقادیر نبود تشابه از صفر تا ۱۰ گروه‌بندی شد. دسته‌بندی نمودار درختی بر اساس دورترین میانگین (با برش نمودار درختی در فاصله بین ۰/۵۵ تا ۱/۲۵) به دو گروه اصلی انجام شد (شکل ٤).



شکل ٤- نمودار درختی نزدیکی بین ارقام و تیمارها بر اساس عامل‌های تنژگی.

Figure 4- Dendrogram of similarity between cultivars and treatments based on germination factors.

گروه دوم دارای بیشترین مقادیر ویژگی‌های تنژگی شامل بذرهای ارقام Nottingham، Andorra و Bucharest است که با برش نمودار درختی (۰/۷۵) از گروه اول جدا شده است. همچنین با توجه به شکل ٤ مقادیر ویژگی‌های تنژگی برای ارقام Nottingham (۰/۷۵)، Bucharest (۰/۵) و Andorra (۰/۲۵) به ترتیب از بیشترین به کمترین مقدار در این ویژگی‌ها است. با توجه به جدول ۲ مقایسه میانگین گروه نخست و دوم بر اساس ویژگی‌های درصد تنژگی، سرعت تنژگی، شاخص تنژگی و میانگین زمان تنژگی همپوشانی ندارند و بر اساس دو ویژگی میانگین تنژگی روزانه و ضریب سرعت تنژگی مقادیر کمی همپوشانی دارند. گروه نخست شامل کمترین مقادیر ویژگی‌های تنژگی شامل بذرهای ارقام Dubrovnik و Memphis بود که با برش نمودار درختی (۰/۳۵) از گروه دوم جدا شد. همچنین با توجه به شکل ٤ مقادیر ویژگی‌های تنژگی برای ارقام نارس Dubrovnik (۰/۳۵)، ارقام رسیده Memphis (۰/۲۵) و نارس Memphis (۰/۱) و رسیده Dubrovnik (۰/۱) به ترتیب از بیشترین به کمترین مقادیر این ویژگی‌ها می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین ویژگی‌های مختلف تنژگی براساس گروه‌بندی و خوشه‌بندی تیمارها.

Table 2- Mean comparison of different germination characteristics based on grouping and clustering between treatments.

	First group گروه اول		Second group گروه دوم		
ویژگی‌ها	خوشه اول	خوشه دوم	خوشه اول	خوشه دوم	خوشه سوم
Characteristics	First cluster	Second cluster	First cluster	Second cluster	Third cluster
درصد تنژگی	62^{g}-70.3^{ef}	67.33^{g}	72.66^{cde}-75.66^{bc}	67.33^{g}	81^{a}-82^{a}
Germination percentage					
سرعت تنژگی	93.9^{g}-146.5^{e}	117.83^{f}	189.7^{d}-208.9^{c}	117.83^{f}	289.6^{a}-292^{a}
Germination speed					
شاخص تنژگی	26.6^{g}-40.7^{g}	35.53^{f}	57.5^{e}-64.4^{d}	35.53^{f}	96.7^{b}-107.24^{a}
Germination index					
میانگین تنژگی روزانه	1.93^{g}-2.18^{def}	3.10^{f}	2.27^{cde}-2.36^{bc}	3.10^{f}	2.53^{a}-2.56^{a}
Daily germination mean					
میانگین زمان تنژگی	0.38^{g}-0.61^{a}	0.48^{b}	0.27^{f}-0.3^{f}	0.48^{b}	0.18^{h}-0.19^{h}
Average of germination time					
ضریب سرعت تنژگی	0.035^{bc}-0.036^{a}	0.036^{ab}	0.035^{bc}-0.036^{a}	0.036^{ab}	0.035^{c}-0.036^{ab}
Coefficient of germination speed					

با توجه به جدول ۲ مقایسه میانگین‌های گروه نخست به دو خوشه تقسیم بندی شد که دو خوشه بر اساس ویژگی‌های‌درصد تنژگی، سرعت تنژگی، میانگین زمان تنژگی و ضریب تنژگی دارای همپوشانی بودند ولی از نظر عامل شاخص تنژگی بدون هر گونه همپوشانی می‌باشند که بر این اساس خوشه بندی این گروه جدا می‌شود.

همچنین با توجه به جدول ۲ گروه دوم بر اساس ویژگی‌های سرعت تنژگی، شاخص تنژگی و میانگین زمان تنژگی بدون همپوشانی بود که اساس خوشه بندی در این گروه بر پایه این ویژگی‌ها است اما بر حسب عامل های درصد تنژگی، میانگین تنژگی روزانه و ضریب سرعت تنژگی دارای همپوشانی می‌باشند. نتایج این بررسی با نتایج سایرین (Kheybari *et al*., 2018) که شاخص‌های تنژگی را به دو گروه با استفاده از واکاوی خوشه‌ای تقسیم بندی کردند همسویی داشت. واکاوی تابع تشخیص که درستی طبقه‌بندی داده‌ها را مورد بررسی قرار می‌دهد، به طور معمول یک تقسیم دو بخشی است. اگر واکاوی تابع تشخیص برای طبقه‌بندی داده‌ها قابل استناد باشد، جدول گروه‌بندی، پیش‌بینی درستی از گروه‌بندی را با درجه اطمینان بالا به دست می‌دهد. با توجه به اینکه واکاوی تابع تشخیص ۱۰۰٪ گروه‌بندی تنژگی بذرها را برازش کرد می‌توان نتیجه گرفت که واکاوی خوشه‌ای به درستی برای ویژگی‌های تنژگی برای پنج رقم ارکید فالانوپسیس انجام شده است (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تابع تشخیص برای تایید گروه‌بندی عامل های تنژگی.

Table 3- Results of discriminant analysis for confirmation of germination factors.

گروه Group	1	2	جمع Total
1	12	0	12
	100%	0	100%
2	0	18	18
	0	100	100
جمع کل total sum	12	18	30
خطای تخمین برای گروه‌ها Estimation error for groups	0	0	0
نسبت Ratio	100	100	100

نتایج این پژوهش با نتایج پژوهشی که روی گل داوودی انجام شد و واکاوی تابع تشخیص ۸۹/٦٪ بود که درستی گروه‌بندی را تایید کرد همسو بود (Roin *et al*., 2015) اما در این پژوهش گروه‌بندی با استفاده از نتیجه تابع تشخیص تا ۱۰۰٪ تایید شد.

نتایج جدول ٤ برای بررسی آزمون‌های معنی‌داری گروه‌بندی ویژگی‌های تنژگی نشان داد که بیشترین ارزش‌های ویژه برای آزمون همبستگی با روش Trace Hotelling-Lawley و Roy's Greatest Root می‌باشد. ارزش های ویژه برای آزمون‌های دیگر همبستگی Wilks' Lambda برابر ۰/۱٦ و Pillai's Trace برابر با ۰/۸٤ و آزمون آماری برابر با ۲۵/۱۵ می‌باشد. در تمام آزمون‌های آماری اشاره شده گروه‌بندی تنژگی بذرها معنی‌دار شد.

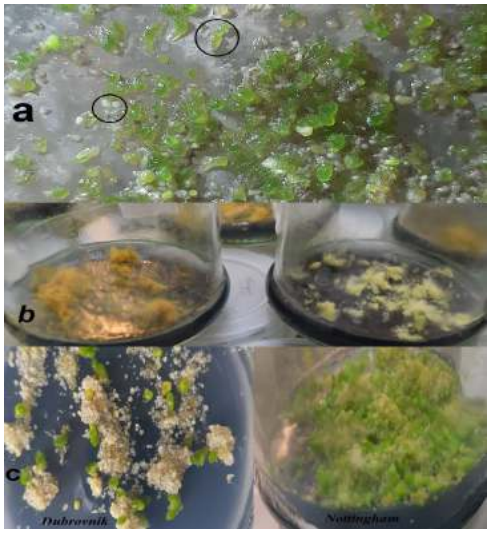
جدول ٤- آزمون‌های معنی‌داری گروه‌بندی تنژگی بذرهای ۵ رقم ارکید فالانوپسیس.

Table 4- Significant tests of grouping for germination of 5 cultivars of *Phalaenopsis* orchid.

	ارزش های ویژه Special values	F	درجه‌آزادی Degrees of Freedom	P
Wilks' Lambda	0.160	25.15	5	0.0001
Pillai's Trace	0.839	25.15	5	0.0001
Hotelling-Lawley Trace	5.239	25.15	5	0.0001
Roy's Greatest Root	5.239	25.15	5	0.0001

از دلایل تنژگی بالای بذرها می‌توان به اندازه بذرها اشاره کرد. در ارقامی که بذرها اندازه بزرگتری دارند درصد تنژگی می تواند بیشتر باشد. شاید یکی از دلایل درصد تنژگی بالای رقم Notingham اندازه بذرهای آن نسبت به بذرهای سایر ارقام باشد (شکل ۵). پژوهشگران دیگری نیز بیان کرده‌اند که بذرهای با اندازه بزرگتر درصد تنژگی بالاتری دارند (Bagheri *et al*., 2012; Sawan *et al*., 2005). در پژوهش‌های مختلف درصد تنژگی بذرهای

نارس ارکید ٦۰ تا ۹۰٪ و میزان تنژگی بذرهای رسیده ارکید بین ۱۰ تا ۳۰٪ گزارش شده است و در پژوهش‌های دیگر به استفاده از بذرهای نارس در کشت بافت پیشنهاد شده است به این دلیل که بذرهای نابالغی که اندازه رویان آن ها ٦٦٪ بذرهای بالغ بوده است و دارای ۱۲ تا ۹ یاخته و پوسته زنده بوده‌اند، تنژگی بهتری نسبت به بذرهای بالغ داشته‌اند. دلیل تنژگی بهتر بذرهای نارس تحرک پروتئینی خوب، داشتن پوسته بذر نفوذپذیر و داشتن پوشش رویانی رشد نیافته بیان شده است (Rasmussen, 1995). با توجه به این که بذرهای درشت دارای اندوخته بیشتری هستند با شتاب بیشتری می تنژند. در واقع بذرهای درشت‌تر آب را که لازمه تنژگی است بهتر جذب کرده و با اندوخته غذایی خود با شتاب می تنژند (Shekari *et al*., 2007).



شکل ۵- افزایش ارکید فالانوپسیس با بذر: a): تفاوت بذر تنژیده (سبز) و بذر نتنژیده (سفید) برای شمارش و تعیین درصد تنژگی در تیمارهای مختلف b): بذر نارس (سمت راست) و بذر رسیده (سمت چپ) c): تفاوت تنژگی در رقم برتر (Nottingham) و غیربرتر (Dubrovnik).

Figure 5- Propagation of *Phalaenopsis* orchid by seed: a) Difference of germinated seed (green) and non-germinated seed (white) for counting and determining germination percentage in different treatments b) Immature seed (right side) and mature seed (left side) c) Difference of germination in Superior cultivar (Nottingham) and non-superior cultivar (Dubrovnik).

نتیجه‌گیری

دستیابی به آگاهی‌های دقیق ارقام ارکید برای تولید، صادرات و برنامه های بهنژادی اهیمت زیادی دارد. این پژوهش برای اولین بار در کشور انجام شد و دامنه گستردهای از ویژگی‌های این ارقام به‌دست آمد. براساس یافته های این پژوهش موارد زیر پیشنهاد می شود:

۱- بهتر است از بین رقم های ارکید رقم Nottingham استفاده شود چون این رقم از سایر ارقام و بذرهای نارس تنژگی بهتری نسبت به بذرهای رسیده دارد.

۲- در همه رقم ها بهتر است بذرهای نارس در مرحله تشکیل کامل کپسول و بذر رسیده در مرحله قهوه‌ای شدن اولیه پوسته کپسول و پیش از چروکیده‌شدن و بازشدن برداشت شوند.

۳- از بین عامل‌های مختلف تنژگی می توان درصد، سرعت و شاخص تنژگی را به دلیل این که دارای همگرایی مثبت هستند به‌عنوان ویژگی‌های مهم در کارهای بهنژادی مورد استفاده قرار داد.

منابع

Bagheri, H., Ghazi-khanlou Sani, Y., Andalibi, B., Azimi-moghadam, M.R., Zangani, A., Jamshidi, S. (2012). Study of seed germination indices and early growth of safflower seedlings with different seed weight under drought stress. *Quarterly Journal of Modern Knowledge of Sustainable Agriculture*, *8(3)*: 1-12. (In Persian).

Balilashaki, KH., Naderi, R. Kalantari, S. (2016). Comparing sexual and asexual micropropagation potential for reduction of juvenile phase in Phalaenopsis orchid. *Iranian Journal of Horticultural Science*, *47(2)*, 221-232 (In Persian with English abstract).

Chen, J.T., Chang, C., Chang, W.C. (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explant of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum, 50*, 169-173.

Chien, K.W., Agrawal, D.C., Tsay, H.S., Chang, C.A. (2015). Elimination of mixed *Odontoglossum* ringspot and *Cymbidium mosaic* viruses from *Phalaenopsis* hybrid "V3" through shoot-tip culture and protocormlike body selection. *Crop Protection*, *67*, 1-6.

Chugh, H.S., Guha, S., Rao, U. (2009). Micropropagation of Orchid: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, *122*, 507-520.

Cribb, P., Govaerts, R. (2005). Just how many orchids are there. 18th World Orchid Conference, University of Burgundy, Dijon, France, 161-172.

De, L.C. (2015). Commercial orchids. Berlin: De Gruyter Open. Available at: http://www.degruyter.com/view/product/456245.

Draper, S.R. (1985). Seed Science and Technology. *International Seed Testing Association* (ISTA).

Dressler, R.L. (1993). Phylogeny and Classification of the Orchid Family, Illustrated ed. Cambridge University Press, Melbourne, Australia.

Haji-Babaii, M., Goldani, M., Shirani-Rad, A.H., Nezami, A. (2015). Evaluation of characteristics and indices germination affecting drought tolerance in new lines of *Brassicanapus*. *Journal of Crop Physiology*, *7*(26), 71-84.

Hamidi, A., Rudi D., Asghari, V., Hajilui, S. (2009). Study on applicability of controlled deterioration vigor test for evaluation of seed vigor and field performance of three oil-seed rape (*Brassica napus* L.) cultivars. *Journal of Plant and Seed*, *24*, 677-706 (In Persian with English Abstract).

Hinsley, A., De Boer, H.J, Fay, M.F., Gale, S.W., Gardiner, L.M., Gunasekara, R.S., Kumar, P., Masters, S., Metusala, D., Roberts, D.L., Veldman, S., Wong, SH., Phelps, J. (2018). Areview of the trade in orchids and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society, 186*, 435- 455.

Hunter, E.A., Glasbey, C.A., Naylor, R.E.L. (1984). The analysis of data from germination tests. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, *102*, 207-213.

Jhon, A.Q., Bichoo, G.A., Wani, S.A. (2002). Correlation studies in *gladiolus*. *Journal of Ornamental Hortculture, 5*, 25-29.

Kheybari, M., Shirani Rad, A.H., Seyfzadeh, S., Hadidi Masouleh, E., Zakerian, H.R. (2018). Investigation of sowing date of mother plant effect on germination indices of autumn rapeseed cultivars and lines. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, *7(2),* 237-246.

Lee, Y(2011). In vitro culture and germination of terrestrial Asian orchid seeds. *Methods in Molecular Biology*, *710*, 53-62.

Liu, Y.C., Lin, B.Y., Lin, J.Y., Wub, W.L., Chang, C.C. (2016). Evaluation of chloroplast DNA markers for intraspecific identification of *Phalaenopsis eustress cultivars*. *Scientia Horticulturae*, *203*, 86–94.

Lorenceti, C., Felix de Carvalho, F.I., de Oliviera, A.C., Valerio, I.P., Hartwig, I., Benin, G., Schmidt, D.A.M., (2006). Applicability of phenotypic and path coefficient in the selection of oat genotypes. *Scientia Agricola*, *63(1)*, 11-19.

Miano, T.F. Rabbani, M.G., Balochi, A.W. (2015). Character association and path analysis in orchids, *Science International Lahore, 27(4),* 3297-3300.

Misra, S., Gupta, Y.C., Rao, A.R. (2003). Correlation and path-coefficient studies in Carnation. *Journal of Ornamnetal Horticulture, 6*, 24-28.

Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, *43(3),* 1235-1248.

Moniruzzaman, M., Zaman, M.A., Earshad Hossain, M., Bhuniyan, M.H., Rahman, M.Z. (2012). Genetic variability and character association in some native orchid species (*Dendrobium spp*.), *The Agriculturists, 10(1*), 1-9.

Radhakrishna, K.N., Janakiram, T., Srinivas, M. (2004). Correlation studies in tuberose (*Polianthes tuberose* L.). *Journal of Ornamnetal Horticulture, 7*, 110-116.

Rasmussen, H.N. (1995). Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plants. Cambridge University Press, Cambridge.

Roin, Z., Hasanpour Asl, M., Sabouri, A (2015). Evaluation of morphological characteristics, genetically valuation and genotypic grouping in *Chrysanthemum*. *Journal of Crop Production and Processing*, *5(16),* 345- 359.

Salehzade, H., Izadkhah Shishvan, M., Ghiyasi, M. (2009). Effect of seed priming on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Biological Sciences*, *4(5),* 629-631.

Sawan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Ternand, C.L., Sullivan, S., Teague, J.L. (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthate exposure. *Environment Health Perspectives,113 (8*), 1056-61.

Scott, S.J., Jones, R.A, Wiliams, W.A. (1984). Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Science, 24*, 1192-1199.

Shekari, F., Masiha, S., Esmaeilpour, B. (2007). Physiology of vegetable crops (Translated). University of Zanjan Publications, Zanjan (In Persian with English Abstract).

Tekrony, D.M., Egli, D.B. (1991). Relationship of seed vigor to crop yield: a review. *Crop Science*, *31*, 816-822.

UNEP-WCMC {Comps}. (2015). The checklist of CITES species website. Geneva. CITES Secretariat. Available at: http://checklist.cites.org.

Flower and Ornamentak Plants (2020): 4(2): 101- 114
Article type: Research article

Study of correlation and cluster analysis of seed germination characteristics in 5 cultivars of *Phalaenopsis* orchid in Chen medium

Fatemeh Bidarnamani[1], Seyyed Najmoddin Mortazavi[1*] Maryam Rahimi[2]

1. Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran
2. Department of Green Space, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol. Iran

*Mortazavi@znu.ac.ir

Abstract

Nowadays, *in vitro* techniques are proposed for commercial and rapid propagation of *Phalaenopsis* species. The present study aims were investigating the quality of seed germination of 5 cultivars of *Phalaenopsis* orchid, and correlation of their traits in the culture medium. The study was conducted using the green and ripe seeds in terms of 5 cultivars of orchid as Dubrovnik, Memphis, Andorra, Bucharest and Nottingham in a factorial experiment based on a completely randomized design. The capsules were formed using self-pollination of flowers in each cultivar. The green seeds were harvested at the stage of completely formed capsules and the ripe ones were harvested at the stage of initial browning of the capsule shell. The seeds were cultured on Chen's culture medium. The number of germinated and non-germinated seeds were counted 18-33 days after their culture. The following factors were measured for each treatment: germination percentage, germination rate, germination index, mean daily germination, mean germination time and coefficient of germination rate. Correlation coefficient of %98 between the measured characteristics indicated a significant correlation between germination rate and germination index. The results of cluster analysis that was conducted based on all the measured germination characteristics showed the maximum mean distance between clusters; ultimately, that separated into two groups at Euclidean distance of 1.25 which Dubrovnik and Memphis cultivars were classified in the first group and Andorra, Bucharest and Notingham cultivars were classified in the second group. The key characteristics in separating cluster among the groups were considered to be germination percentage, germination rate, germination index and mean germination time. Discrimination function analysis test confirmed the grouping among the cultivars in a 100% manner. Both Hoteling-Lawley Trace as well as Roy's Greatest Root tests showed the highest value of 5.23 to confirm the grouping. It is concluded that using cluster analysis and correlation coefficient Notingham had the highest value in germination factors based on the germination percentage, germination rate and germination index which were regarded as key traits for the breeding programs.

Keywords: Germination, Orchid, Propagation, Seed.