گل و گیاهان زینتی (۱۴۰۰)، ۶(۲): ۱۱۹-۱۳۲
مقاله پژوهشی
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.119

# تاثیر ژنتیک، نوع ریزنمونه، تنظیم کننده رشد گیاهی و بستر کشت بر باززایی درون شیشه‌ای رقم‌های تجاری ارکیده فالانوپسیس

فاطمه بیدرنامنی[۲،۱]، عبدالرحمن رحیمیان بوگر[۳*]، سید نجم الدین مرتضوی[۱]

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل (آدرس کنونی)
۳- گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
a.rahimian@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۶، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۹/۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۳

## چکیده

ارکیده فالانوپسیس (*Phalaenopsis*)، محبوب‌ترین جنس تیره ثعلب‌ها می‌باشد که به دلیل داشتن گل‌های پروانه‌ای شکل و جذاب، بازار پسندی بالایی دارد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر ژنتیک، ریزنمونه، تنظیم کننده‌های رشد و بستر کشت بر افزایش درون شیشه‌ای ارکیده فالانوپسیس انجام شد. تیمارها شامل چهار تیمار تنظیم کننده رشد بنزیل آدنین (۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA) و ایندول بوتیریک اسید (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA)، دو محیط کشت MS و Chen، دو ریزنمونه برگ و ساقه، و پنج رقم تجاری فالانوپسیس بود. عوامل مورد بررسی تاثیر معنی‌داری بر زمان تشکیل سرآغازه‌های برگ و ریشه، ایجاد پداژه‌نما، شمار برگ و ریشه داشتند. کمترین زمان لازم برای تشکیل نخستین سرآغازه‌های برگ و ریشه، مربوط به رقم‌های Nottingham و Dubrovnik، تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA ترکیب با IBA با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر، و محیط کشت Chen بود. زمان تشکیل سرآغازه‌های برگ در ریزنمونه‌های برگی در مقایسه با ریزنمونه‌های ساقه، به‌طور معنی‌داری کمتر بود. ریزنمونه‌های برگی، پداژه‌نمای بیشتری نسبت به ریزنمونه‌های ساقه تولید کردند. در رقم Nottingham، تیمار BA+IBA با نسبت ۲ به ۱ میلی‌گرم بر لیتر و محیط کشت Chen بیشترین تاثیر را بر افزایش شمار پداژه‌نماها داشتند. افزون بر این، شمار برگ و ریشه در گیاهچه‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای، به‌طور معنی داری زیر تاثیر عوامل مختلف قرار گرفت به‌طوری که گیاهچه‌های رقم Dubrovnik شمار برگ بیشتری و گیاهچه‌های رقم Nottingham شمار ریشه بیشتری در مقایسه با سایر رقم‌ها داشتند. بیشترین شمار برگ در تیمار BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه IBA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. در حالی که بیشترین شمار ریشه در تیمار BA+IBA با نسبت ۲ به ۱ میلی‌گرم در لیتر وجود داشت. در مقایسه محیط کشت‌ها نیز محیط کشت Chen تاثیر بیشتری بر تولید برگ و ریشه داشت. این نتایج نشان داد که موفقیت باززایی رقم‌های مختلف ارکیده فالانوپسیس در شرایط درون شیشه‌ای، وابسته به ویژگی‌های ژنتیکی، نوع محیط کشت و تیمارهای تنظیم کننده رشد است. رقم Nottingham و ریزنمونه‌های برگی باززایی بهتری در شرایط درون شیشه‌ای داشت. افزایش غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنینی BA از ۲ به ۴ میلی‌گرم بر لیتر، منجر به افزایش زمان مورد نیاز برای تشکیل سرآغازه‌های برگ و ریشه، و طولانی تر شدن دوره کشت درون شیشه‌ای شد.

**واژه‌های کلیدی:** باززایی، ریزافزایی، فالانوپسیس.

**مقدمه**

تیره ارکیدسانان[۱] از تیره‌های گیاهی بسیار بزرگ و گوناگون در میان تک لپه‌ای‌ها می‌باشد که دارای ۶۰۰ تا ۸۰۰ جنس با ۲۵۰۰۰-۳۵۰۰۰ گونه است (Chowdhery, 2001; Singh *et al*., 2007). فالانوپسیس[۲] مهمترین جنس از تیره ارکیده است که به‌صورت گسترده‌ای در مناطق مختلف جهان تولید می‌شود، همچنین فالانوپسیس به دلیل کشت آسان، گوناگونی در رنگ گل، گوناگونی در اندازه و شکل، در دسترس بودن در طول سال، ظرافت و عمر گلجایی طولانی، یکی از گل‌های با ارزش و محبوب است که به‌صورت گلدانی و گل بریدنی در سراسر جهان استفاده می‌شود (De *et al*., 2015). این گیاه دارای بذرهای بسیار ریزی است که تنزگی آن در طبیعت نیاز به وجود قارچ همزیست دارد (Dijk, 1988). افزون بر این، افزایش بذری ارکیده باعث تفرقه ویژگی‌ها می‌شود و گیاهان حاصل شبیه به اصل نخواهند بود. بنابراین افزایش درون‌شیشه‌ای یک روش مناسب برای افزایش ارکیده‌ها می‌باشد (Zheng *et al*., 2010).

روش‌های مختلفی برای افزایش درون شیشه‌ای ارکیده‌ها وجود دارد، که در میان آنها رویان‌زایی بدنی، ممکن است یکی از بهترین گزینه‌ها برای دست یابی به اندام‌های شبیه پداژه‌نما[۳] باشد (Chen *et al*., 2000; Lee *et al*., 2013). از سویی رویان‌های بدنی، ماده مناسبی برای افزایش توده‌ای و باززایی گیاهان تراریخته محسوب می شوند (Moradi *et al*., 2017). ولی دست یابی به رویان‌های بدنی از راه تولید بافت پینه، به دلیل عدم موفقیت تشکیل پینه که ناشی از رشد کُند بافت پینه و تمایل آن به قهوه‌ای شدن[۴] است، در ارکیده‌ها بسیار کم است (Naing *et al*., 2011). به ویژه، تشکیل پینه از ریزنمونه های برگ ارکیده بسیار دشوار می‌باشد. همچنین، حتی زمانی که انگیزش پینه رخ دهد، ممکن است سرانجام مقدار پینه به‌دست آمده کم و حفظ آن دشوار باشد (Roy and Banerjee, 2003; Huana *et al*., 2004). افزون بر این، بررسی‌ها نشان داده است که بین توانمندی رویان‌زایی توسط ریزنمونه‌های تهیه شده از قسمت‌های مختلف برگ تفاوت وجود دارد و ریزنمونه‌های تهیه شده از انتهای برگ‌ها توانایی بیشتری در تولید رویان‌های بدنی نسبت به نوک برگ‌ها دارند (Penggow *et al*., 2008). همچنین، گزارش شده است که بهترین نتیجه شاخه‌زایی با استفاده از ریزنمونه‌های گره روی ساقه گل‌دهند در ارکیده فالانوپسیس به دست آمده است (Chen and Chang, 2006). تنظیم‌کننده‌های رشد به ویژه اکسین‌ها، سایتوکینین‌ها، آبسیزیک اسید و اتیلن، پاسخ‌های مورفولوژیکی درون‌شیشه‌ای را در شمار زیادی از گیاهان کنترل می‌کنند (Sidhu, 2010).

در بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد بر تشکیل رویان‌زایی مستقیم ریزنمونه‌های برگی در دو رقم ارکیده *P. nebula* و *P. amabilis* نشان داده شد که 2iP و BA بیشترین تأثیر را بر رویان‌زایی داشتند، در حالی‌که تیمارهای اکسین، جیبرلین و پلی آمین‌ها در هر دو گونه بازدارنده رویان‌زایی بودند (Penggow *et al*., 2008). همچنین بررسی اثر تنظیم کننده‌های NAA و TDZ بر رویان‌زایی پداژه‌نماهای ایجاد شده بوسیله کشت بذر ارکیده *P. amabilis* نشان داد که پداژه‌نماها در محیط کشت 1/2MS با ۹ میلیگرم در لیتر TDZ بیشترین رویان‌زایی را داشتند (Chen and Chang, 2004). تأثیر افزودن NAA و BAP بر ازدیاد پداژه‌نماها در ارکیده Vanda نشان داد که افزودن ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP+ ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA منجر به تولید درصد

۱- Orchidaceae ۲- *Phalaenopsis* ۳- Protocorm-like body (PLB) ۴- Necrosis

بالاتر پداژه‌نماها می‌شود (David *et al.*, 2008). بررسی اثر محیط‌های مختلف کشت در بهینه سازی تندش بذر و رشد گیاهچه ارکیده فلانوپسیس در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که محیط کشت‌های MS و 1/2MS تاثیر بیشتری در بهینه‌سازی تندش و ویژگی‌های دانهال‌های ایجاد شده در مقایسه با محیط کشت‌های VW و KC داشتند (Abbaszadeh *et al.*, 2017). بررسی دیگری نشان داد که شمار بیشتری پداژه‌نما طی ۲ هفته در محیط کشت VW مایع نسبت به MS مایع انگیخته شد، درحالی‌که محیط MS آبگونه منجر به افزایش سریع پداژه‌نما از نوک شاخه رقم سونیا در *Dendrobium* شد (Shylaraj *et al.*, 2007). همچنین بنا بر یافته‌های این پژوهش محیط MS در مقایسه با VW در تشکیل شاخه‌های فراوان برتری داشت.

پژوهش حاضر به بررسی تاثیر انواع ریزنمونه، محیط کشت و تیمارهای تنظیم کننده رشد بر تشکیل پداژه‌نما و ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاهچه‌های ارکیده فلانوپسیس در شرایط درون شیشه ای پرداخته است.

**مواد و روش ها**

در این پژوهش، پنج رقم از گونه زینتی ارکیده فلانوپسیس که در ایران تولید تجاری دارند، گزینش شدند (شکل ۱). آمیزش مصنوعی برای این رقم‌های انجام شد و کپسول‌های حاوی بذرهای رسیده نخست با افزودن چند قطره مایع شوینده و قرار دادن آن‌ها زیر آب جاری به مدت نیم ساعت و سه نوبت با آب مقطر شستشو شدند. سپس مرحله دوم گندزدایی زیر هود و با هیپوکلریت سدیم پنج درصد و الکل ۷۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ ثانیه انجام شد. پس از این مرحله، کپسول‌های بذر بی‌درنگ با آب مقطر اتوکلاو شده، سه مرتبه شستشو داده شدند و در محیط کشت برای ادامه این پژوهش استفاده گردیدند.

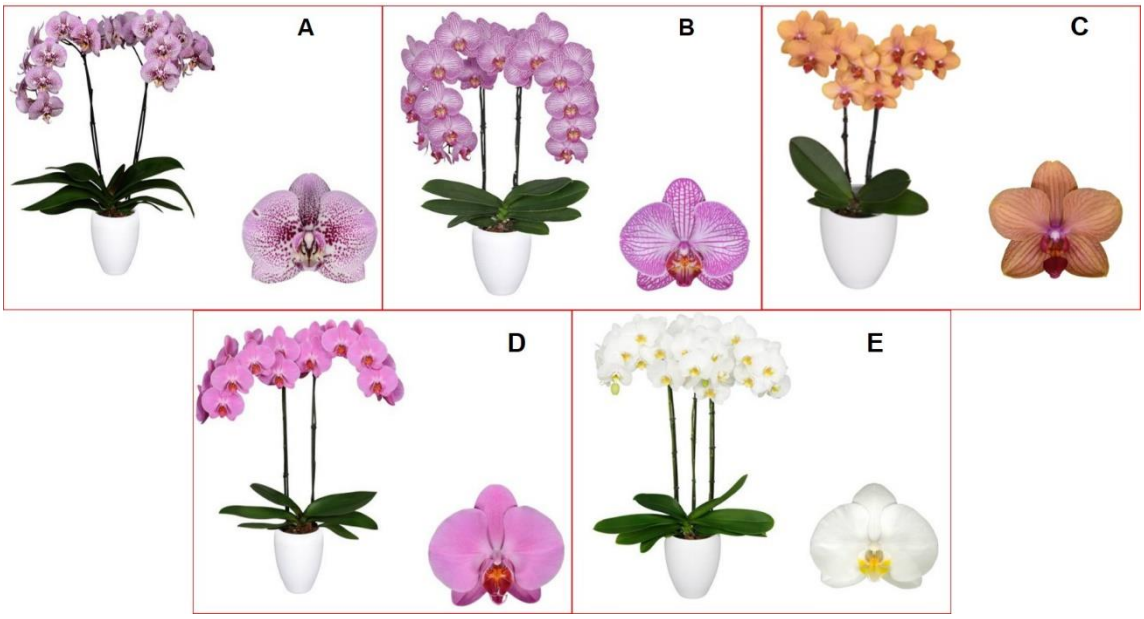
در پژوهش حاضر، برای بررسی تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد، نوع بستر کشت و ریزنمونه بر افزایش درون شیشه‌ای رقم‌های مختلف فلانوپسیس چهار تیمار تنظیم کننده رشد شامل؛ بنزیل آدنین[۱] (BA) با غلظت‌های دو و چهار میلی‌گرم بر لیتر و ایندول بوتیریک اسید[۲] (IBA) در غلظت‌های نیم و یک میلی‌گرم بر لیتر، دو تیمار بستر کشت شامل محیط‌های Chen و MS، و دو نوع ریزنمونه شامل ریزنمونه‌های برگی به اندازه یک در یک سانتی متر و ریزنمونه ساقه به طول یک سانتی متر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ریزنمونه‌ها پس از کشت در اتاق رشد با ۲±۲۵ درجه سلسیوس، طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت با شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. شاخص‌های مورد ارزیابی شامل: شمار پداژه‌نما، شمار روز تا تشکیل نخستین سرآغازه برگ و ریشه، شمار برگ و ریشه و برهمکنش تیمارهای مختلف تنظیم کننده، محیط کشت و نوع ریزنمونه بر شمار پداژه‌نما و زمان تشکیل نخستین سرآغازه برگ و ریشه که با چشم قابل مشاهد بود، و شمار برگ و ریشه در رقم‌های مورد بررسی فلانوپسیس بود.

این پژوهش به‌صورت طرح به‌طورکامل تصادفی و در قالب آزمایش فاکتوریل با ۳ تکرار انجام شد (هر شیشه کشت به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد و حاوی ۴ ریز نمونه بود). واکاوی داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS صورت پذیرفت. آنالیز واریانس داده‌ها با روش ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪، انجام گردید.

۱- Benzyl Adenine (BA)

۲- Indole-3-butyric acid




**شکل ۱- رقم‌های ارکیده فالانوپسیس که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند؛ (A) Andorra، (B) Bucharest، Dubrovnik (C)، Memphis (D)، Nottingham (E).**

**Figure 1- The *Phalaenopsis* cultivars investigated in this research include; Andorra (A), Bucharest (B), Dubrovnik (C), Memphis (D), Nottingham (E).**

## نتایج و بحث

نتایج به‌دست آمده از تحلیل واریانس داده‌های این پژوهش نشان داد که هر چهار عامل تنظیم کننده رشد، بستر کشت، نوع ریزنمونه و رقم و برهمکنش این آن‌ها دارای تاثیر متفاوتی بر ویژگی‌های شمار پداژه‌نما، زمان تشکیل سرآغازه برگ و ریشه و شمار ریشه و برگ گیاهچه‌های فالانوپسیس به‌دست آمده در شرایط درون شیشه‌ای هستند (جدول ۱). یافته‌ها همچنین نشان داد که کاربرد تیمارهای تنظیم کننده رشد به‌طور معنی داری باعث افزایش شمار پداژه‌نما، زمان تشکیل سرآغازه برگ و ریشه، و شمار ریشه ($P\leq0.01$) و شمار برگ ($P \leq0.05$) شد. محیط کشت تاثیر معنی داری بر شمار پداژه‌نما، زمان تشکیل سرآغازه برگ، شمار ریشه ($P \leq0.01$) و زمان تشکیل سرآغازه ریشه ($P \leq0.05$) بود، در حالی که تاثیر معنی‌داری بر شمار برگ نداشت. همچنین نوع ریزنمونه و رقم به‌طور معنی‌داری ($P\leq0.01$) بر همه ویژگی‌های مورد ارزیابی تاثیر داشت (جدول ۱). این نتایج با یافته‌های پژوهش‌های دیگری در زمینه تاثیر کاربرد تنظیم کننده‌ها بر پینه‌زایی و رویان‌زایی بدنی مستقیم جنس‌های مختلف ارکیده همسویی دارند (Chen and Chang, 2006; Naing *et al*., 2011; Moradi *et al*., 2017). همچنین، بررسی دیگری نشان داد که واکنش گونه‌های ارکیده فالانوپسیس و سیمبیدیوم در کشت درون شیشه‌ای زیر تاثیر نوع ژنوتیپ آن‌ها قرار می‌گیرد (Teixeira da Silva and Winarto, 2016).

یافته‌های این پژوهش نشان داد که برهمکنش بین تنظیم کننده رشد و رقم تاثیر معنی‌داری بر شمار پداژه‌نما، زمان تشکیل سرآغازه برگ و ریشه، شمار برگ و ریشه ($P\leq0.01$) دارد، در حالی که برهم‌کنش بین تیمارهای تنظیم کننده رشد و محیط کشت فقط بر ویژگی‌های زمان تشکیل سرآغازه برگ و ریشه، و شمار ریشه ($P \leq0.01$) اثر معنی‌دار داشت و برهمکنش تیمارهای تنظیم کننده رشد و ریزنمونه فقط بر شمار پداژه‌نما و شمار ریشه ($P \leq0.05$) دارای تاثیر معنی‌دار بود.

**جدول ۱- جدول آنالیز واریانس ANOVA.**

**Table 1. Table of ANOVA analysis.**

| منبع تغییرات Source of variation | شمار پداژه‌نما Number of protocorms | زمان تشکیل نخستین سرآغازه برگ Time of leaf primordia initiation | زمان تشکیل نخستین سرآغازه ریشه Time of root primordia initiation | شمار برگ Number of leaves | شمار ریشه Number of roots |
|---|---|---|---|---|---|
| تنظیم کننده رشد Growth regulator | ۱۵۷۱۳/۰۵$^{**}$ | ۲۱۱۵/۵۴$^{**}$ | ۱۴۱۴/۳۲$^{**}$ | ۱/۲۱$^{*}$ | ۲۸/۱۷$^{**}$ |
| محیط کشت Culture medium | ۲۳۸۴۰/۲۷$^{**}$ | ۴۰۵۰/۸۲$^{**}$ | ۴۵/۹۴$^{*}$ | ۱/۰۷$^{ns}$ | ۷/۷۰$^{**}$ |
| ریزنمونه Explant | ۱۷۶۰/۴۲$^{**}$ | ۲۰۲۷۶/۸۲$^{**}$ | ۲۱۶۶/۰۰$^{**}$ | ۱۲۶/۱۵$^{**}$ | ۱۵۲/۰۰$^{**}$ |
| رقم Cultivar | ۵۲۵/۲۹$^{**}$ | ۱۱۶۹/۳۲$^{**}$ | ۴۰۵/۱۳$^{**}$ | ۱۶/۶۷$^{**}$ | ۱۴/۹۲$^{**}$ |
| تکرار Replication | ۱۷۳۹/۲۶ | ۹۱/۸۹ | ۱۵/۳۳$^{ns}$ | ۰/۲ | ۲/۸۸ |
| تنظیم کننده رشد × محیط کشت Medium × Growth regulator | ۱۳۷۶/۱۴$^{ns}$ | ۱۶۵/۰۷$^{**}$ | ۲۵۳/۵۷$^{**}$ | ۰/۲۸$^{ns}$ | ۲/۳۲$^{**}$ |
| تنظیم کننده رشد × ریزنمونه Explant × Growth regulator | ۸۳/۱۴$^{*}$ | ۱۳/۱۱$^{ns}$ | ۱۵/۸۲$^{ns}$ | ۰/۱۲$^{ns}$ | ۱/۲۸$^{*}$ |
| تنظیم کننده رشد × رقم Cultivar× Growth regulator | ۹۴/۲۸$^{**}$ | ۱۳۹/۲۸$^{**}$ | ۴۰/۱۳$^{**}$ | ۱/۱۸$^{**}$ | ۲/۹۸$^{**}$ |
| محیط کشت × ریزنمونه Explant × Medium | ۱۲۳/۲۷$^{*}$ | ۱۳/۰۷$^{ns}$ | ۳۹/۲۰$^{*}$ | ۲/۴$^{**}$ | ۰/۰۲$^{ns}$ |
| محیط کشت × رقم Cultivar × Medium | ۲۴/۹۶$^{ns}$ | ۴۲/۴۸$^{ns}$ | ۶۱/۷۰$^{**}$ | ۰/۸۰$^{*}$ | ۱/۱۲$^{*}$ |
| ریزنمونه × رقم Cultivar × Explant | ۶۲/۸۶$^{ns}$ | ۶۳/۳۶$^{ns}$ | ۱۲۸/۱۰$^{**}$ | ۵/۹۲$^{**}$ | ۱/۳۸$^{*}$ |
| تنظیم کننده رشد × محیط کشت × رقم C × M × GR | ۲۸/۰۵$^{ns}$ | ۳۱/۲۵$^{ns}$ | ۲۳/۷۵$^{*}$ | ۰/۲۱$^{ns}$ | ۰/۵۱$^{ns}$ |
| تنظیم کننده رشد × ریزنمونه × رقم C × E × GR | ۱۳/۱۳$^{ns}$ | ۱۹/۰۳$^{ns}$ | ۲۱/۲۷$^{**}$ | ۰/۲۸$^{ns}$ | ۰/۲۴$^{ns}$ |
| تنظیم کننده رشد × محیط کشت×ریزنمونه E × M × GR | ۳۲/۴۸$^{ns}$ | ۱۱/۳۴$^{ns}$ | ۵/۸۵$^{ns}$ | ۰/۲۶$^{ns}$ | ۰/۵۱$^{ns}$ |
| تنظیم کننده رشد × محیط کشت× رقم × ریزنمونه E × C × M × GR | ۲۶/۹۷$^{ns}$ | ۱۰/۰۷$^{ns}$ | ۱۰/۲۱$^{ns}$ | ۰/۳۱$^{ns}$ | ۰/۰۸$^{ns}$ |
| ضریب تغییرات (٪) CV | ۹/۸۸ | ۴/۲۵ | ۱۱/۶۸ | ۲۳/۹۲ | ۱۷/۷۱ |
| R2 | ۹۵/۲۲ | ۸۸/۱۸ | ۸۸/۱۷ | ۸۰/۳۱ | ۸۱/۴۱ |

** معنی‌داری در سطح ۱٪، * معنی‌داری در سطح ۵٪، ns نبود معنی‌داری.

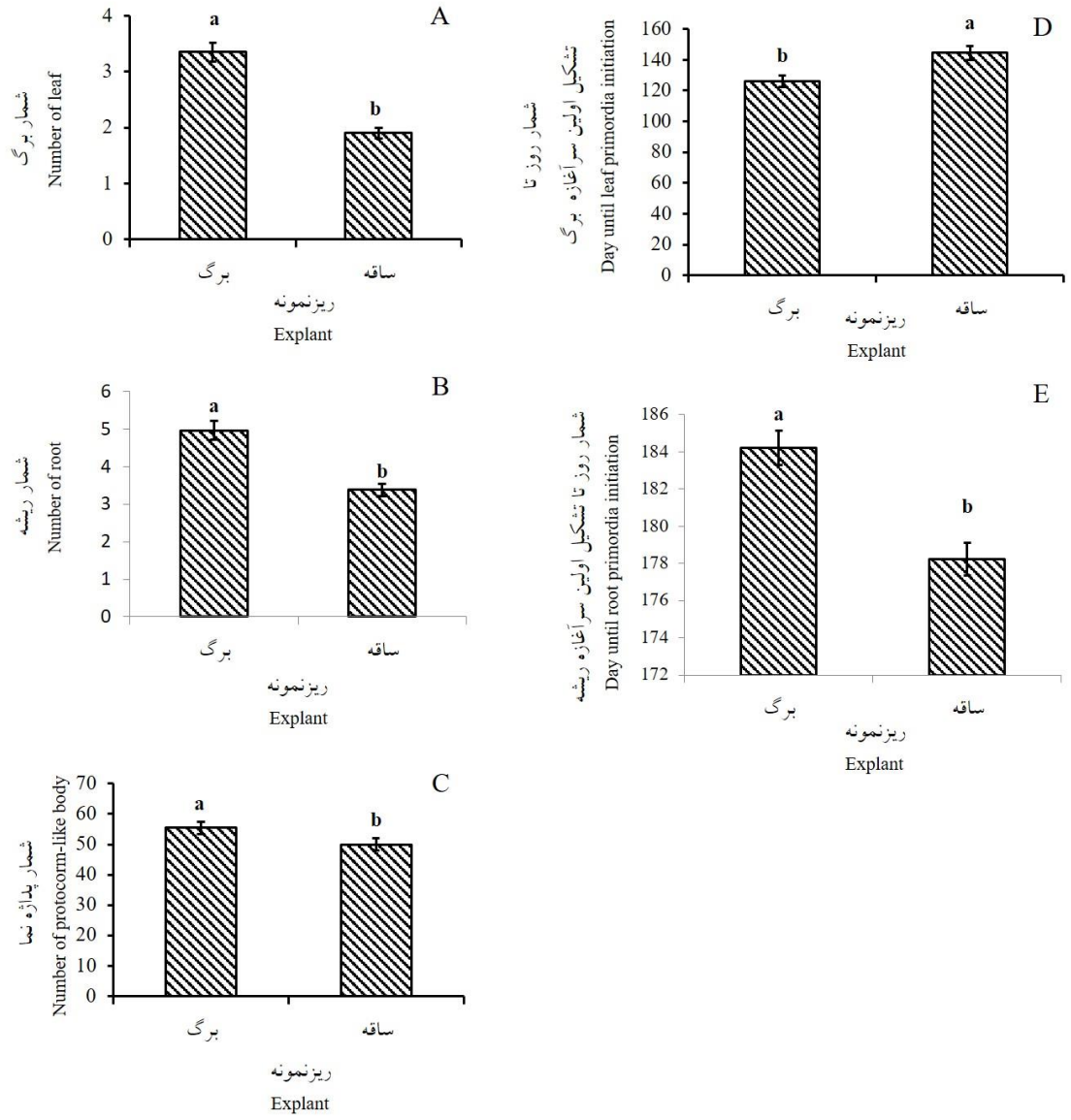
** Significant at 1%, and * Significant at 5% levels, $^{ns}$ non-significant.

در بررسی پینه‌زایی شاهدانه[۱] برهمکنش رقم و محیط کشت بر پینه‌زایی از ریزنمونه‌های مختلف برگ، دمبرگ، میانگره و جوانه جانبی معنی‌دار بود، در حالی که اثر محیط کشت و ریزنمونه بر پینه‌زایی و باززایی معنی‌دار نبود (Ślusarkiewicz-Jarzina *et al*., 2005). بررسی اثر برهمکنش محیط کشت و ریزنمونه بر باززایی درون شیشه‌ای گوجه فرنگی، نشان داد که نوع محیط کشت تاثیر معنی‌داری بر باززایی ریزنمونه‌های مختلف دارد (Mamidala and Nanna, 2011). در پژوهش حاضر، برهمکنش محیط کشت با ریزنمونه بر ایجاد شمار پداژه‌نما، سرآغازه ریشه و شمار برگ معنی‌دار بود، که می‌تواند ناشی از میزان دسترسی به عناصر غذایی و کربوهیدرات محیط کشت و میزان تنظیم کننده‌ها و ذخیر کربوهیدراتی درونی و پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها باشد.

نتایج نشان داد که تأثیر نوع ریزنمونه، رقم، غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد و نوع محیط کشت بر زمان تشکیل نخستین سرآغازه برگ معنی‌دار است ($P\leq0.01$). در این راستا، پژوهش‌های متعددی نشان داده‌اند که عوامل مختلفی مانند نوع ریزنمونه، تنظیم کننده‌های رشد و ترکیبات محیط کشت، افزایش درون شیشه‌ای گونه‌های گیاهی را زیر تاثیر قرار می‌دهند (Pipino *et al*., 2010; Ozarowski *et al*., 2013; Vieira *et al*., 2014; Shekhawat *et al*., 2015; Meng *et al*., 2021). در این پژوهش برهمکنش نوع ریزنمونه و تنظیم کننده رشد بر شمار پداژه‌نما و ریشه معنی‌دار بود. بیشترین شمار پداژه‌نما و ریشه برای ریزنمونه برگ در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد. در باززایی درون شیشه‌ای گل ساعت[۲] غلظت‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد BA و NAA برای پینه‌زایی و پرآوری از ریزنمونه‌های میانگره، دمبرگ و پیچک مورد استفاده قرار گرفت، که بین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد بر پینه‌زایی و پرآوری گل ساعت اختلاف معنی‌دار وجود دارد، در حالی که بین اثر ریزنمونه‌های مختلف تفاوتی وجود ندارد (Meng *et al*., 2021). نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد، و به‌طور ویژه میزان سایتوکینین درون‌زای ریزنمونه از مهم‌ترین عواملی هستند که اندام‌زایی درون شیشه‌ای گیاهان را زیر تاثیر قرار می‌دهند (Gentile *et al*., 2014). از سویی در پژوهش‌های زیادی برای ریشه‌زایی گونه‌های گیاهی مختلف تیمارهای تنظیم کننده رشد اکسینی مورد کاربرد بوده است (Chen and Chang, 2006; Dias *et al*., 2009; Rocha *et al*., 2012; Meng *et al*., 2021). در حالی که در این پژوهش برای ریشه‌زایی رقم‌های مختلف ارکیده از بسترهای کشت حاوی ترکیب تنظیم کننده رشد سایتوکنینی و اکسینی استفاده شد، در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بیشترین شمار ریشه ایجاد شد. این نتایج همسو با ریشه‌زایی گل ساعت در غلظت‌های پایین نفتالین استیک اسید است (Ragavendran *et al*., 2012). برای دو نوع ریزنمونه مورد استفاده در این پژوهش، زمان لازم برای تشکیل سرآغازه‌های برگ در ریزنمونه برگی به‌طور معنی داری در مقایسه با ریزنمونه‌های ساقه کمتر بود (شکل ۲). در حالی‌که زمان لازم برای تشکیل سرآغازه ریشه در ریزنمونه‌های ساقه کمتر از ریزنمونه‌های برگی بود (شکل ۲). افزون بر این، تاثیر نوع ریزنمونه‌ها بر شمار برگ، ریشه و پداژه‌نما نشان داد که استفاده از ریزنمونه‌های برگی به طور معنی داری باعث افزایش این شاخص‌ها شد (شکل ۲).

۱- *Cannabis sativa*

۲- *Passiflora xishuangbannaensis*




**شکل ۲- مقایسه تاثیر ریزنمونه بر شمار برگ (A)، ریشه (B)، پداژه نما (C) و شمار روز تا تشکیل نخستین سرآغازه برگ (D) و ریشه (E).**

**در هر نمودار، ستون‌های میانگین که دارای حروف کوچک و خطای استاندارد مشابه هستند دارای اختلاف معنی داری نیستند.**

**Figure 2- Comparison of the effect of explant on number of leaf (A), root (B), and protocorm-like body (C), and number of days until initiation of leaf (D) and root (E) primordia. In each graph, columns of means with the same lowercase letters and standard error have no significant difference.**

در این راستا، نشان داده شده که نوع ریزنمونه بر القای پینه و کشت درون شیشه‌ای گل بنفشه[۱] تاثیر معنی‌داری دارد (Andarz *et al*., 2014). افزون بر این، نوع ریزنمونه بر پتانسیل باززایی و افزایش درون شیشه‌ای گیاهان مختلف کاسنی[۲] (Kohsari *et al*., 2020)، سویا[۳] (Raza *et al*., 2017) و سدروس[۴] (Nazemi Rafi and Salehi, 2018) دارای تاثیر معنی‌دار بوده است. از آنجا که باززایی گیاهان کشت بافتی ارکیده به‌طور مستقیم از یاخته‌های روپوست ریزنمونه با ایجاد پداژه‌نما، یا به‌صورت غیر

۱- *Viola odorata* L.
۲- *Cichorium intybus* L.
۳- *Glycine max* (L.) Merr
۴- *Cedrus deodara* (Roxb. ex Lamb) G. Don.

مستقیم با تولید بافت پینه و کاربرد تیمارهای مداخله‌ای انجام می‌شود، در پژوهش‌های پیشین برای باززایی گونه‌های مختلف ارکیده بیشتر از ریزنمونه برگی (Wu *et al*., 2004; Chung *et al*., 2007; Naing *et al*., 2011; Sembi *et al*., 2020) و کمتر از ریزنمونه‌های ساقه (Balilashaki *et al*., 2014) استفاده شده است. از این رو، می‌توان تفاوت بین تاثیر نوع ریزنمونه‌های مختلف بر باززایی درون شیشه‌ای ارکیده در بررسی حاضر را به تفاوت در سطح تنظیم کننده‌های رشد درون‌زا و ذخیر کربوهیدراتی ریزنمونه‌های برگ و ساقه نسبت داد.

مقایسه میانگین داده‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان ویژگی‌های ارزیابی شده برای رقم‌های مختلف ارکیده در پژوهش حاضر است (شکل ۳). بر اساس این نتایج کمترین شمار روز تا تشکیل نخستین سرآغازه برگ، ۱۲۹ روز برای رقم Nottingham بود، و بیشترین شمار روز تا تشکیل نخستین سرآغازه برگ ۱۳۹ روز برای رقم‌های Dubrovnik و Memphis می باشد. همچنین بین زمان لازم تا تشکیل نخستین سرآغازه ریشه در رقم‌های مورد مطالعه، اختلاف معنی وجود دارد. در این راستا رقم Dubrovnik با ۱۷۶ روز دارای کمترین زمان تا تشکیل سرآغازه ریشه بود و رقم Memphis با ۱۸۴ روز دارای بیشترین شمار روز تا تشکیل سرآغازه ریشه است (شکل ۳).

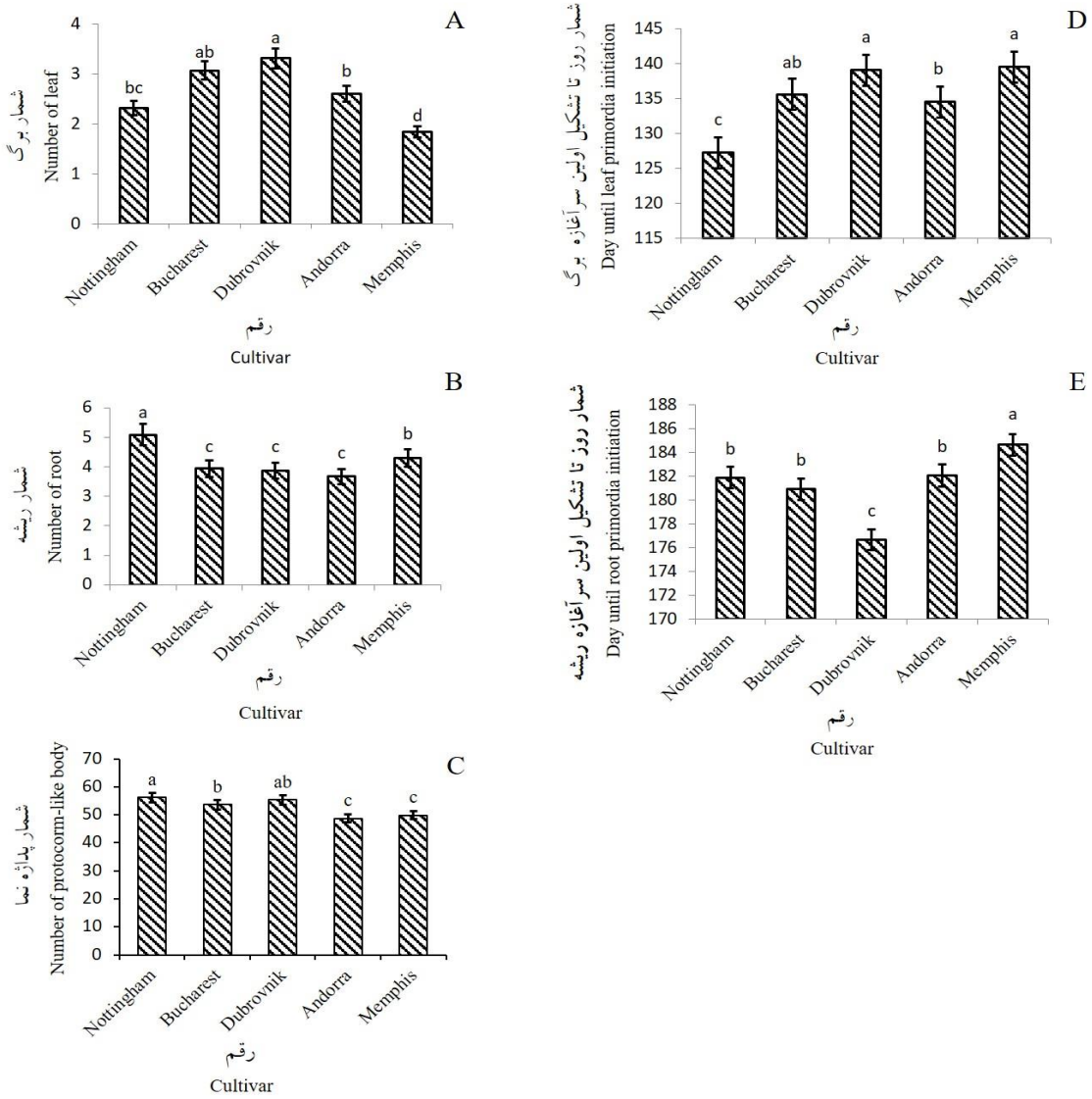
افزون بر این، رقم‌های مورد بررسی دارای اختلاف معنی‌داری در شمار برگ، ریشه و پداژه‌نما هستند. نتایج نشان داد که رقم Dubrovnik دارای بیشترین شمار برگ و رقم Memphis دارای کمترین شمار برگ بودند. رقم Nottingham دارای بیشترین شمار ریشه و رقم‌های Bucharest، Dubrovnik و Andorra دارای کمترین شمار ریشه بودند. همچنین بیشترین شمار پداژه‌نما برای رقم Nottingham به‌دست آمد و کمترین آن برای رقم‌های Memphis و Andorra به‌دست آمد (شکل ۳). این نتایج با یافته‌های پژوهش دیگری در رابطه با تاثیر نوع رقم در افزایش درون شیشه‌ای رقم‌های مختلف دراسنا[1] همسویی دارد (Kakouei and Salehi, 2015). مقایسه فراوانی باززایی ژنوتیپ‌های مختلف سویا نشان داده است که نوع ژنوتیپ بر باززایی درون شیشه‌ای موثر است (Raza *et al*., 2017).

نتایج ارزیابی تاثیر تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشدی بر زمان تشکیل نخستین سرآغازه‌های برگ و ریشه نشان داد که ریزنمونه های کشت شده در شرایط کاربرد تیمار ۲ گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در بازه زمانی کمتری نسبت به ریزنمونه‌های کشت شده در زیر تیمار تنظیم کننده رشد ۴ گرم بر لیتر BA در ترکیب با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA سرآغازه‌های برگ و ریشه را ایجاد نموده‌اند. در این راستا بین نتایج به‌دست آمده از تیمارهای BA و IBA با نسبت ۲ به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۲ با ۱ میلی‌گرم در لیتر این دو تنظیم کننده رشد اختلاف معنی داری وجود نداشت، در حالی که بین این دو تیمار با تیمارهای ۴ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (شکل ۴). این نتایج با یافته‌های دیگر پژوهش‌ها در خصوص نقش تیمارهای تنظیم کننده رشدی در آغازش فعالیت‌های مریستمی ریزنمونه‌های کشت شده برای باززایی گونه‌های ارکیده *Rhynchostylis gigantean* (Pathak *et al*., 2017) و *Cymbidium eburneum* (Sembi *et al*., 2020) همسویی دارد. بین تاثیر تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشد و شمار پداژه‌نما، برگ و ریشه تولید شده در هر ریزنمونه اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت. بیشترین شمار پداژه‌نما و ریشه

---

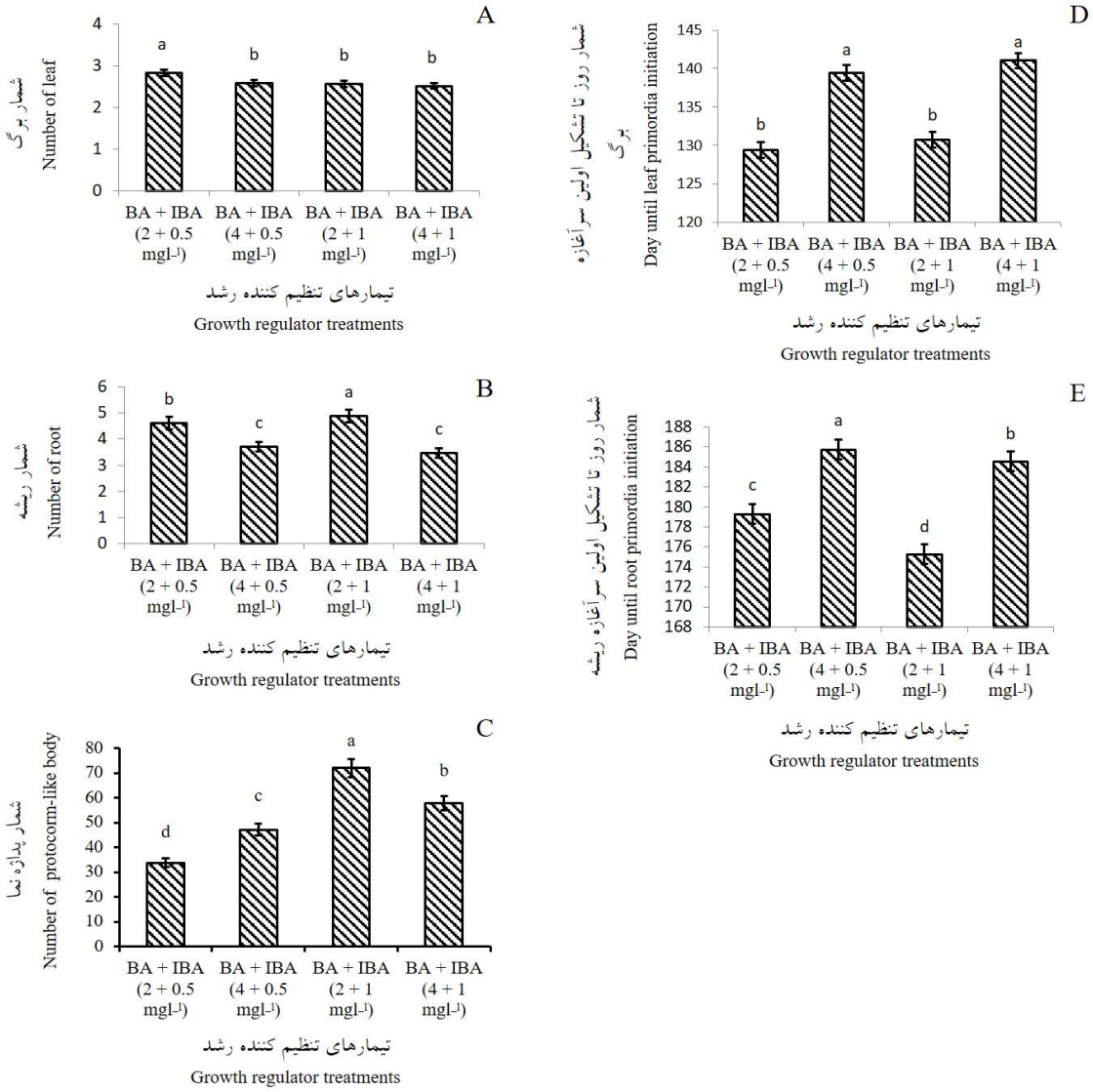
۱- *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast.

ر ریزنمونه‌های زیر تیمار ۲ میلیگرم بر لیتر BA ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر IBA به‌دست آمد و بیشترین شمار برگ در ریزنمونه‌های زیر تیمار ۲ میلی گرم بر لیتر BA در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر IBA وجود داشت (شکل ۴). این نتایج با یافته‌های بررسی دیگری و تاثیر تیمار ترکیب تنظیم کننده رشد BA و NAA در باززایی مستقیم پداژه‌نماها از ریزنمونه‌ها در گونه ارکیده *Cymbidium eburneum* همسویی دارد (Sembi *et al*., 2020). همچنین، در این راستا در پژوهش دیگری نشان داد که کاربرد تنظیم کننده‌های کینتین (Kin) و نفتالن استیک اسید (NAA) باعث تشکیل پداژه‌نماها در جنس‌های ارکیده *Cymbidium* و *Dendrobium* شد (Teixeira da Silva and Winarto, 2016).




**شکل ۳- مقایسه تاثیر رقم بر شمار برگ (A)، ریشه (B)، پداژه نما (C) و شمار روز تا تشکیل نخستین سرآغازه برگ (D) و ریشه (E). در هر نمودار، ستون‌های میانگین که دارای حروف کوچک و خطای استاندارد مشابه هستند دارای اختلاف معنی داری نیستند.**

**Figure 3- Comparison of the effect of cultivar on number of leaf (A), root (B), and protocorm-like body (C), and number of days until initiation of leaf (D) and root (E) primordia. In each graph, columns of means with the same lowercase letters and standard error have no significant difference.**



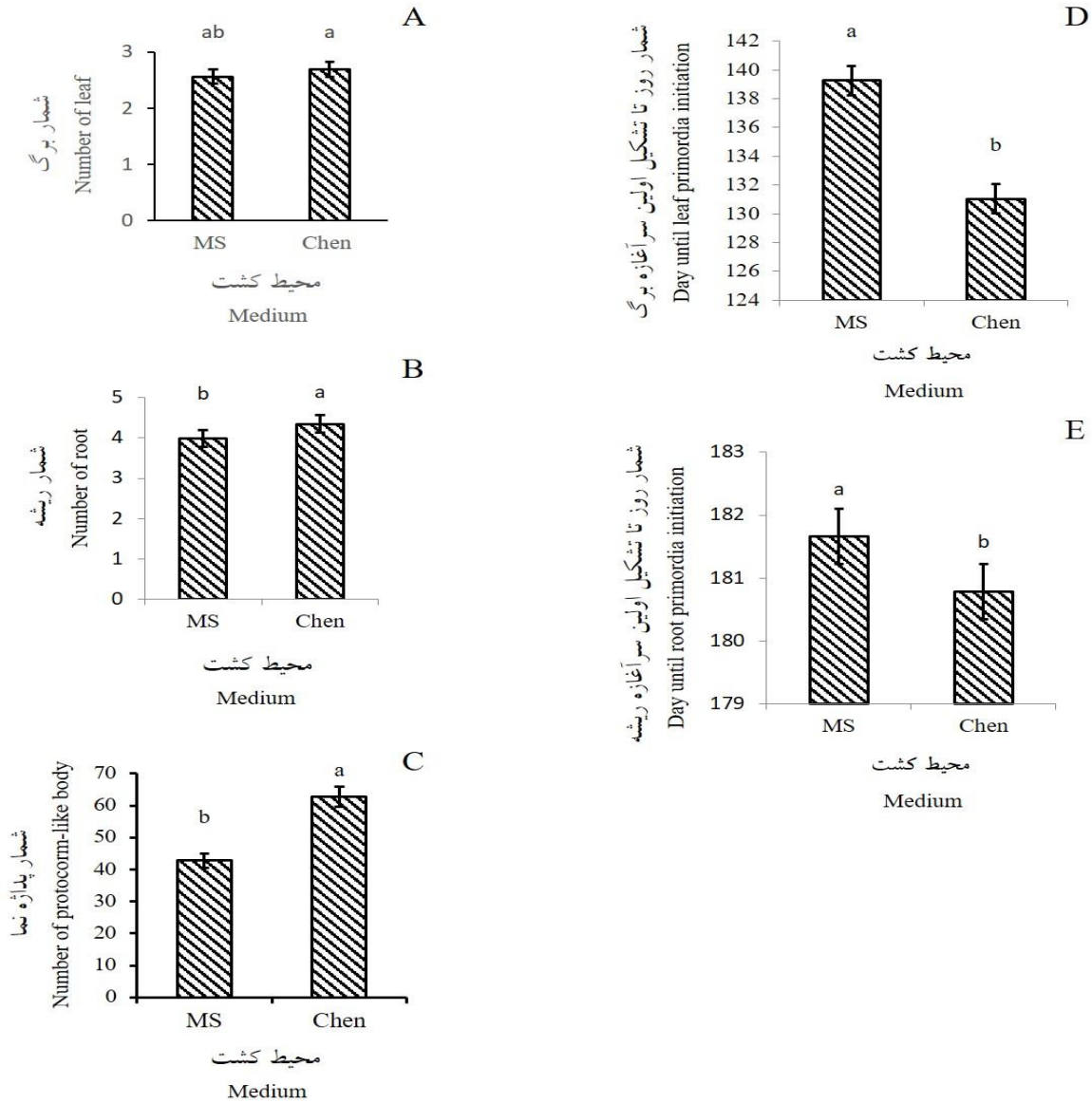

**شکل ۴- مقایسه تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد بر شمار برگ (A)، ریشه (B)، پداژه نما (C) و شمار روز تا تشکیل نخستین سرآغازه برگ (D) و ریشه (E). در هر نمودار، ستون‌های میانگین که دارای حروف کوچک و خطای استاندارد مشابه هستند دارای اختلاف معنی داری نیستند.**

**Figure 4- Comparison of the effect of growth regulator treatments on number of leaf (A), root (B), and protocorm-like body (C), and number of days until initiation of leaf (D) and root (E) primordia. In each graph, columns of means with the same lowercase letters and standard error have no significant difference.**

در پژوهش حاضر استفاده از تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد BA به عنوان یک تنظیم کننده رشد سایتوکینینی و IBA به عنوان یک تنظیم کننده رشد اکسینی نشان داد که با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد BA از ۲ میلی گرم بر لیتر به ۴ میلی‌گرم بر لیتر بازه زمانی لازم برای تشکیل سرآغازه برگ افزایش و شمار پداژه‌نما، برگ و ریشه کاهش داشته است که احتمالا به دلیل غلظت بالاتر در کار دو تنظیم کننده رشد اختلال ایجاد شده و گیاه به غلظت‌های بالاتر واکنش منفی نشان داده است. بنابراین استفاده از غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA در رقم‌های مورد نظر این آزمون نتایج بهتری نشان داده است. در پژوهشی روی گره ساقه ارکیده فالانوپسیس در محیط کشت MS، غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشترین باززایی شاخه را داشت، در حالی‌که برگ‌ها در محیط کشت MS حاوی تیدیازورون در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور مستقیم

رویان‌های بدنی را ایجاد کردند (Balilashaki *et al.*, 2014). همچنین یافته‌های این بررسی نشان داد که افزایش غلظت تنظیم کننده رشد تیدیازورون منجر به افزایش تولید شمار پداژه نما از ۶ به ۵۸ شد. در بررسی دیگری بهترین غلظت تیدیازورون برای رویان‌زایی برگ *P. amabilis*، ۳ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است (Chen and Chang, 2006).

در این بررسی برای باززایی درون شیشه‌ای رقم‌های مختلف ارکیده فالانوپسیس از دو محیط کشت MS و Chen استفاده شد. نتایج به‌دست آمده نشان دادند که تشکیل سرآغازه‌های برگ و ریشه در محیط MS نسبت به محیط Chen به زمان بیشتری نیاز دارد و همچنین شمار پداژه‌نماها، برگ و ریشه ریزنمونه‌های قرار گرفته در MS به‌طور معنی‌داری کمتر از ریزنمونه‌های قرار گرفته در محیط Chen بود (شکل ۵).




**شکل ۵- مقایسه تاثیر محیط کشت بر شمار برگ (A)، ریشه (B)، پداژه نما (C) و شمار روز تا تشکیل نخستین سرآغازه برگ (D) و ریشه (E). در هر نمودار، ستون‌های که دارای حروف کوچک و خطای استاندارد مشابه هستند دارای اختلاف میانگین معنی داری نیستند.**

**Figure 5. Comparison of the effect of medium on number of leaf (A), root (B), and protocorm-like body (C), and number of days until initiation of leaf (D) and root (E) primordia. In each graph, columns of mean with the same lowercase letters and standard error have no significant difference.**

در این راستا، بررسی پینه‌زایی *Anthurium* در بسترهای مختلف کشت نشان داد که ایجاد پینه‌های مریستمی گره‌دار[۱] و شبه رویانی[۲] زیر تاثیر نوع بستر کشت قرار می‌گیرد. به‌طوری که در بسترهای کشت MMS[۳] و NN[۴] پینه‌های مریستمی گره‌دار ایجاد شد، در حالی که در بسترهای کشت MS و WPM[۵] پینه‌های شبه رویانی ایجاد شد (Te-chato *et al*., 2006). غلظت عناصر غذایی در بسترهای کشت مهمترین عاملی است که باززایی گیاهان را زیر تاثیر قرار می‌دهد (Te-chato *et al*., 2002). همچنین بررسی‌های دیگری نشان داده‌اند که محیط کشت به عنوان عامل غیرزیستی بر باززایی درون شیشه‌ای گیاهان موثر است، که تاثیر آن به نوع ترکیبات، غلظت عناصر غذایی و پتانسیل اسمزی آن بستگی دارد (Fitch, 1993; Vale *et al*., 2018; Solórzano-Cascante *et al*., 2018).

## نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، زمان ایجاد سرآغازه‌های برگ و ریشه در رقم‌های مختلف جنس ارکیده فالانوپسیس زیر تاثیر عوامل مختلف متفاوت بوده است. بین نوع ریزنمونه برگ و ساقه، کمترین زمان تشکیل سرآغازه برگ از ریزنمونه برگی حاصل شد، درحالی‌که در تولید سرآغازه ریشه از ریزنمونه برگ نیاز به زمان بیشتری داشت. گیاهچه‌ها در محیط کشت Chen برای تشکیل هر دو سرآغازه برگ و ریشه نیاز به زمان کمتری نسبت به محیط کشت MS داشتند. در بین رقم‌های مورد بررسی، رقم‌های Nottingham و Dubrovnik نیاز به زمان کمتری برای تشکیل سرآغازه‌های برگ و ریشه داشتند، درحالی‌که رقم Memphis در تشکیل هر دو سرآغازه نیاز به بیشترین زمان داشت. تیمار تنظیم کننده رشد ترکیبی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA در کمترین زمان و تیمار حاوی ترکیب ۴ به ۱ میلی‌گرم بر لیتر از این تنظیم کننده‌ها در بیشترین زمان، تشکیل سرآغازه برگ داد. اما در تشکیل سرآغازه ریشه تیمار ۲ به ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA با IBA نیاز به زمان کمتر و تیمار ۴ به ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از این تنظیم کننده‌ها نیاز به زمان طولانی‌تر داشت. بنابراین و بر اساس یافته‌های به‌دست آمده از این پژوهش در خصوص دشواری تکثیر رقم‌های تجاری ارکیده فالانوپسیس بوسیله کشت درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌های ساقه به‌دلیل باززایی کُندتر و ایجاد گیاهچه‌هایی با ریشه و برگ کمتر ، کاربردشان در تولید تجاری رقم‌های فالانوپسیس توجیه اقتصادی ندارد. در حالی که استفاد از ریزنمونه‌های برگی به دلیل بازدهی بهتر، هزینه کمتر، سرعت بالای باززایی و تولید گیاهان با شمار برگ و ریشه بیشتر، روش مطلوبی برای تولید تجاری ارکیده‌های فالانوپسیس است. همچنین محیط کشت Chen، تاثیر معنی‌داری بر کاهش زمان ایجاد سرآغازه‌های برگ و ریشه در مقایسه با محیط MS داشت و با توجه به نقش موثر آن در تولید گیاهچه‌هایی با شمار برگ و ریشه بیشتر، به عنوان بهترین نوع محیط کشت برای افزایش درون شیشه‌ای رقم‌های ارکیده فالانوپسیس، قابل توصیه است.

## منابع

Abbaszadeh, S.M., Miri, S.M., Naderi, R. (2017). An effective nutrient media for asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Phalaenopsis* ‘Bahia Blanca’. *Journal of Ornamental Plants*, 11-20. (In Persian).

۱- Meristematic Nodular Callus (MNC)
۲- Embryogenic-like callus (ELC)
۳- Modified Murashige and Skoog
۴- Nitsch and Nitsch
۵- Woody Plant Medium

Andarz, Z., Daneshvar, M.H., Yari, F. (2014). Induction of callus from three explants of leaf, petiole and stem of *viola odorata* using growth regulators. 1st National Congress of Ornamental Flowers and Plants. Karaj, Iran. https://civilica.com/doc/331730 (In Persian).

Balilashaki, K., Naderi, R., Kalantari, S., Vahedi, M. (2014). PTC & B Efficient *in vitro* Culture Protocols for Propagating *Phalaenopsis* 'Cool Breeze', *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, *24*(2), 191-203.

Chen, J.T., Chang, W.C. (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum*, *50*(2), 169-173.

Chen, J.T., Chang, W.C. (2004). Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* Shimadzu. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *40*(3), 290-293.

Chen, Y.C., Chang, C., Chang, W.C. (2000). A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, *36*, 290–293.

Chowdhery, H. J. (2001) Orchid diversity in north-east India. *Journal of Orchid Society of India*, *15*, 1-17.

Chung, H. H., Cheng, J. T., Chang, W. C. (2007). Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biologia Plantarum*, *51*(2), 346-350.

David, D., Jualang, A.G. Janna, O.A. (2008). Effect of NAA and BAP on protocorm proliferation of Borneo Scented Orchid, *Vanda helvola*. *Asian Pacific Journal Molecular Biology Biotechnology*, *16*(3), 221-224.

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

Dias, L.L.C., Santa-Catarina, C., Ribeiro, D.M., Barros, R.S., Floh, E.I.S., Otoni, W.C. (2009). Ethylene and polyamine production patterns during in vitro shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *99*, 199–208.

Dijk, E. (1988) Mykorrhizen der Orchideen. *II Die Pilze. Die Orchidee*. *39*, 116-20

Fitch, M.M. (1993). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32*, 205–212.

Gentile, A., Gutierrez, M.J., Martinez, J., Frattarelli, A., Nota, P., Caboni, E. (2014). Effect of metatopolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *118*, 373–381.

Huana, L.V.T., Takamura, T., Tanaka, M. (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* Orchid. *Plant Science*, *166*(6), 1443-1449.

Kakouei, F., Salehi, H. (2015). Factors affecting in vitro propagation of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast. cultivars. II. MS salt strengths, subculturing times, rooting and acclimatization. *Advances in Horticultural Science*, *29*(4), 165-170.

Kohsari, A., Chalavi, V., Akbarpour, V. (2020) Effect of explant types and growth regulators on callus induction and secondary metabolites of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Production Research*, DOI: 10.22069/jopp.2020.15491.2390 (In Persian).

Lee, Y.I., Hsu, S.T., Yeung, E.C. (2013). Orchid protocorm- like bodies are somatic embryos. *American Journal of Botany*, *100*, 2121–2131.

Mamidala, P., Nanna, R.S. (2011). Effect of genotype, explant source and medium on *in vitro* regeneration of tomato. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, *3*(3), 45-50.

Meng, Y.Y., Song, S.J., Landrein, S. 2021. *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Passiflora xishuangbannaensis*, a species with extremely small populations. *Global Ecology and Conservation*, *31*, e01836.

Moradi, S., Daylami, S.D., Arab, M., Vahdati, K. (2017). Direct somatic embryogenesis in *Epipactis veratrifolia*, a temperate terrestrial orchid. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *92*(1), 88–97.

Naing, A.H., Chung, J.D., Lim, K.B. (2011). Plant regeneration through indirect somatic embryogenesis in *Coelogyne cristata* Orchid. *American Journal of Plant Sciences*, *2*, 262-267.

Nazemi Rafi, Z., Salehi, H. (2018). Factors affecting *in vitro* propagation of some genotypes of Himalayan cedar [*Cedrus deodara* (Roxb. ex Lamb) G. Don.]. *Advances in Horticultural Science*, *32*(4),479-486.

Ozarowski, M., Thiem, B., Gryszczyńska, A., Budzianowski, J. (2013). Studies on *in vitro* seed germination and plant regeneration from mature leaf, internodal and petiole explants of *Passiflora caerulea* L. *56th Convention of the Polish Botanical Society, Interdisciplinary and Practical Significance of Botanical Sciences*. Olsztyn, Poland.

Pathak, P., Verma, S., Prakash, A., Mahant, K.C. (2017). Regeneration competence of an ornamentally important epiphytic orchid, *Rhynchostylis gigantean* (Lindl.) Ridl. through leaf segments: a study *in vitro*. *Journal of the Orchid Society of India*, *31*, 97-101

Penggow, W., Chen, J. T., Chang, W.C. (2008). Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* Orchid. *Acta Physiologiae Plantarum*, *30*, 507-512.

Pipino, L., Braglia, L., Giovannini, A., Fascella, G. (2010). *In vitro* regeneration and multiplication of *Passiflora hybrid* "Guglielmo Betto". In: Jain, S.M., Ochatt, S.J. (Eds.), Protocols for *in Vitro* propagation of ornamental plants. Methods in molecular biology. Humana Press, New Jersey, 153–162.

Ragavendran, C. (2012). *In vitro* propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. an exotic medicinal plant. *Asian Journal of Plant Science & Research*, *2*, 707–711.

Raza, G., Singh, M.B., Bhalla, P.L. (2017). In vitro plant regeneration from commercial cultivars of soybean. *BioMed Research International*, ID 7379693, https://doi.org/10.1155/2017/7379693.

Rocha, D.I., Vieira, L.M., Tanaka, F.A.O., Silva, L.C., Otoni, W.C. (2012). Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *111*, 69–78.

Roy, J., Banerjee, N. (2003). Induction of callus and plant regeneration from shoot tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk.f. *Scientia Horticulturae, 97*(3), 333-340.

Sembi, J.K., Pathak, P., Verma, J. (2020). Regeneration competence of leaf explants in *Cymbidium eburneum* Lindl. *Journal of the Orchid Society of India*, *34*, 17-21.

Shekhawat, M.S., Kannan, N., Manokari, M., Ravindran, C. P. (2015). *In vitro* regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *13*, 209–214.

Shylaraj, H.S., Deepthy, R., Korah, P.L. (2007). High Frequency Mericloning from Shake Cultures of Tropical Orchids *Dendrobium* cv. Sonia. In: Keshavachandran, R., Nazeem, P.A., Girija, D., John, P.S., Peter, K.V. (Eds.). Recent Trends in Horticultural Biotechnology. New Delhi: New India Publishing. 327-332.

Sidhu, S. (2010) *In vitro* micropropagation of medicinal plants by tissue culture. *The Plymouth Student*, *4*(1), 432-446.

Singh, M.K., Sherpa, A.R., Hallan, V., Zaidi, A.A. (2007). A potyvirus in *Cymbidium* spp. in Northern India. *Australasian Plant Disease Notes*, *2*(1), 11-13.

Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Ponitka, A., Kaczmarek, Z. (2005). Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* (L.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, *47*(2), 145–151.

Solórzano-Cascante, P., Sánchez-Chiang, N., Jiménez, V.M. (2018). Explant type, culture system, 6-Benzyladenine, Meta-Topolin and Encapsulation affect indirect somatic embryogenesis and regeneration in *Carica papaya* (L.). *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1769.

Te-chato, S., Susanon, T., Sontikun, Y. (2006). Cultivar, explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenegenesis in *Anthurium* spp. *Songklanakarin*. *Journal of Science and Technology*, *28*(4), 717-722.

Te-chato, S., Naksombut, S., Boonsiri, J. (2002). Effect of variety and explant on callus formation and micropropagation of *Anthurium*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *24*, 569-578.

Teixeira da Silva, J.A., Winarto, B. (2016). *Somatic Embryogenesis in Two Orchid Genera (Cymbidium, Dendrobium)*. Maria Antonietta Germanà, M.A., Lambardi, M. (Eds.), *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, Methods in Molecular Biology, Vol. 1359, Springer Science+Business Media, New York. DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6_18

Vale, E.M., Reis, R.S., Passamani, L.Z., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2018). Morphological analyses and variation in carbohydrate content during the maturation of somatic embryos of *Carica papaya*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *24*, 295–305.

Vieira, L.M., Rocha, D.I., Taquetti, M.F., da Silva, L. C., de Campos, J.M.S., Viccini, L.F., Otoni, W.C. (2014). *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae): The influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, *50*, 738–745.

Wu, J.F., Chen, J.T., Chang, W.C. (2004). Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *77*(1), 107- 109.

Zheng, Y.X., Shen, B.N., Chen, C.C., Jan, F.J. (2010). Odontoglossum ring spot virus causing flower crinkle in Phalaenopsis hybrids. *European Journal of Plant Pathology*, *128*, 1–5.

Flower and Ornamental Plants (2021), 6(2): 119-132
Research article
DOI: 10.52547/flowerjournal.6.2.119

# Effects of genetic, explant type, plant growth regulator and culture medium on *in vitro* regeneration of commercial *Phalaenopsis* orchid cultivars

**Fatemeh Bidarnamani[1,2], Abdolrahman Rahimian Boogar[3]*, Seyed Najmmaddin Mortazavi[1]**

1. Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Institute of Agricultural Research, University of Zabol, Zabol (Present address)
3. Department of Horticultural Science and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol

✉ a.rahimian@uoz.ac.ir

Received: 2021/10/28, Revised: 2021/11/24, Accepted: 2021/11/24

**Abstract**

The *Phalaenopsis* orchid is the most popular genus of Orchidaceae family with high marketability due to its butterfly shape and attractive flowers. The aim of this study was to investigate the effects of cultivar, explant type, plant growth regulators and culture medium on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* orchid. Experiment was conducted using 4 combined treatments of benzyladenine (BA) and indolebutyric acid (IBA) (BA 2 and 4 mg $L^{-1}$ with IBA 0.5 and 1 mg $L^{-1}$), 2 culture media (MS and Chen), 2 types of explants (leaf and stem), and 5 commercial cultivars of *Phalaenopsis* orchids. The findings revealed that the studied factors had significant effects on leaf and root primordia initiation, number of protocorms, and number of leaves and roots. Among the investigated cultivars, 2 cultivars: Nottingham and Dubrovnik showed earlier leaf and root primordia initiation. Two treatments including BA+IBA (2+0.5 mg $L^{-1}$ and 2+1 mg $L^{-1}$), and Chen culture medium showed faster primordia initiation significantly different from the other treatments. Leaf explants produced more protocorm than stem explants. The highest number of protocorms was belonged to Nottingham cultivar, and the treatment of BA+IBA (2 to 1 mg $L^{-1}$) on Chen culture medium. The number of leaves and roots of *in vitro* plantlets were significantly affected by various factors so that, Dubrovnik had more leaves and the Nottingham had more roots than the other cultivars. The highest number of leaves was observed in BA+IBA (2+0.5 mg $L^{-1}$) treatment, while the highest number of roots was belonged to BA+IBA (2+1 mg $L^{-1}$) treatment. Comparing the media, Chen medium showed more positive effects on leaf and root number than MS medium. The results of this study indicated that the success of regeneration of *Phalaenopsis* cultivars *in vitro* is influenced by the characteristics of the cultivar, medium, and plant growth regulator treatments. Nottingham cultivar and leaf explant showed better regeneration rates *in vitro*. Increasing the concentration of BA from 2 to 4 mg $L^{-1}$, increased the time required for leaf and root primordia initiation and prolonged the *in vitro* cultivation period.

**Keywords**: Regeneration, Tissue culture, *Phalaenopsis.*