Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
Islamic Azad University Gorgan Branch
Phycological Society of Iran

The effect of some growth regulators on the micro propagation of orchid (*Phalaenopsis philippinensis*) by flowering stem buds (pedicel)

Mehdi Khorshidi*
[1]Department of Plant Sciences, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran, Email: m_khorshidi@du.ac.ir

Article type:
Research Article

Article history
Received: 11.02.2021
Revised: 22.06.2021
Accepted: 17.06.2021
Published:22.02.2023

Keywords
Benzyl amino purine
Indole butyric acid
Micro propagation
Phalaenopsis orchid
Plant tissue culture

Abstract

Orchids are one of the most famous and important ornamental plants that have a high commercial value. plant tissue culture is one of the most important methods for the plant proliferation. The aim of this study was to determine the best concentration of growth regulators of benzyl amino purine (BAP) and indole butyric acid (IBA) on orchid micro propagation. The flower stem buds of orchid (*Phalaenopsis philippinensis*) were used as explant. This study was performed as a factorial in a completely randomized design with two factors BAP, IBA and in three replications. In the stem formation section of the first factor BAP at 4 levels (0, 0.5, 1 and 2 mg/l) and IBA at 2 levels (0 and 0.25 mg/l), also in the root formation section the first factor IBA in 4 levels (0, 0.5, 1 and 2 mg/l) and BAP were considered at 2 levels (0 and 0.1 mg/l). The results of this study showed that the highest number of shoot formation was obtained at the concentration of 1 mg/L BAP with 0.25 mg/L IBA which has led to the production of 12.27 shoot per explant. The lowest number of shoot formation was observed in the group control. In the root formation, the highest number of roots (4.33) and also the maximum root length (8.67 cm) were obtained at the concentration of 1 mg/L IBA with 0.1 mg/L BAP. The results also show that the combination of growth regulators together improves the result in comparison with their uses alone. Therefor results generally shows that the plant tissue culture is a suitable and optimal way to propagate orchid species.

Cite this article as: Khorshidi, M. (2022). The effect of some growth regulators on the micro propagation of orchid (*Phalaenopsis philippinensis*) by flowering stem buds (pedicel). *Journal of Plant Environmental Physiology*, 68(4): 24-36.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Doi: 10.30495/iper.2022.688801
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.3.2

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran

تاثیر برخی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی ارکیده (*Phalaenopsis philippinensis*) با استفاده از جوانه‌های ساقه گلزا (pedicel)

مهدی خورشیدی[۱]

[۱]گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران. رایانامه: m_khorshidi@du.ac.ir

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۳/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۷
تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۲/۰۳

واژه‌های کلیدی:
ارکیده فلانوپسیس
ایندول بوتریک اسید
بنزیل آمینوپورین
ریزازدیادی
کشت بافت گیاهی

چکیده

ارکیده از معروف ترین و مهمترین گیاهان زینتی بوده و ارزش تجاری بالایی دارد. کشت بافت از مهمترین روش‌های تکثیر آن محسوب می‌شود. هدف این تحقیق تعیین بهترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آمینو پورین (BAP) و ایندول بوتریک اسید (IBA) بر ریز ازدیادی ارکیده می‌باشد. از جوانه ساقه گلزا در ارکیده فلانوپسیس (*Phalaenopsis philippinensis*) به عنوان ریز نمونه استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور BAP و IBA و در سه تکرار اجرا گردید. در بخش ساقه زایی فاکتور اول BAP در ٤ سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و IBA در ۲ سطح (۰ و ۰/۲۵میلی‌گرم در لیتر)، همچنین در بخش ریشه‌زایی فاکتور اول IBA در ٤ سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP در ۲ سطح (۰ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) در نظرگرفته شد. نتایج نشان داد که بهترین عملکرد در ساقه زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به تعداد ۱۲/۲۷ ساقه به ازای هر ریز نمونه حاصل شد. کمترین تعداد ساقه نیز در شاهد مشاهده گردید. در ریشه زایی، بیشترین تعداد ریشه (٤/۳۳ عدد) و همچنین بیشترین طول ریشه‌ها (۸/٦۷ سانتی‌متر) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. همچنین نتایج نشان می دهد که ترکیب تنظیم کننده‌های رشد با هم در مقایسه با کاربرد آنها به تنهایی، نتیجه را بهبود می بخشد. بنابراین نتایج در کل نشان داد که کشت بافت گیاهی روشی مناسب و بهینه در تکثیر انواع ارکیده می باشد.

استناد: خورشیدی، مهدی. (۱٤۰۱). تاثیر برخی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی ارکیده (*Phalaenopsis philippinensis*) با استفاده از جوانه‌های ساقه گلزا (pedicel). *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ٦۸ (٤)، ۳٦-۲٤.

Doi: 10.30495/iper.2022.688801
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.3.2

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

ارکیده (Orchidaceae) از تکامل یافته ترین خانواده‌های گیاهی است که بعلت تنوع و جذابیت گلهایش محبوبیت عام دارد. این گیاه زینتی جزء ۱۰ گل شاخه بریده برتر جهان بوده و در نقاط مختلف از سردترین تا گرمترین نقطه قابل مشاهده هستند (Hempfling and Peril, 2005). خانواده ارکیده بالغ بر ۸۰۰ جنس و ۲۵ هزار گونه دارد (Chugh et al., 2009). فالانوپسیس یکی از معروفترین ارکیده‌های مونوپودیال در جهان است و بومی جنوب شرقی آسیا و شمال استرالیا است (Chen & Chang, 2006). ارزش تجاری ارکیده فالانوپسیس قابل توجه بوده و به دو صورت شاخه بریده و گلدانی به بازار عرضه می شود. ٪۷۵ فروش گلدانی ارکیده به فالانوپسیس اختصاص دارد (Gerisbach, 2002). اندازه، رنگ و دوام گل آن قابل توجه می باشد. برخی از گونه‌های فالانوپسیس نیز در حال انقراض هستند.

مشکل اصلی در پرورش و تکثیر ارکیده، تهیه گیاهچه‌های آن است. تنوع سوماکلونال، ترشح مواد فنلی و آلودگی از متداولترین مشکلات است. تکثیر از طریق بذر در شرایط خاص امکان پذیر بوده و از طرف دیگر سبب تولید گیاهچه‌های هتروزیگوت می شود(Lal and singh, 2020). تکثیر درون شیشه ای و کشت بافت یکی از روش‌های تکثیر این گیاه می‌باشد که پروتوکلهای تکثیر آن در حال گسترش و تکمیل شدن می باشد (Asa and Kaviani, 2020; Bali Lashki et al., 2016). تحقیقات اولیه درباره کشت بذر ارکیده توسط Knudson (1922) در یک محیط استریل می‌باشد ولی مطالعات اساسی در مورد کشت گره‌های روی ساقه گلزا فلانوپسیس از سال 1949 و تولید گیاه بدون ویروس سیمبیدیوم بوسیله Morel (1960) شروع (Arditti 1993; Chugh et al., 2009) و تاکنون کارهای زیادی انجام شده و همچنان ادامه دارد (Bali Lashki et al., 2016). یکی از مهمترین عوامل در تکثیر، بهینه کردن ترکیبات محیط کشت، جهت تقویت و افزایش موفقیت می‌باشد. عمده‌ترین عوامل موثر در ترکیبات محیط کشت نیز تنظیم‌کننده‌های رشد هستند، که محققین زیادی برای این منظور آزمایش‌های بسیاری را انجام داده و هم اکنون نیز ادامه دارد. Bali Lashki و همکاران (2016) به مطالعه و آزمایش، مقایسه قابلیت ریز ازدیادی جنسی و غیر جنسی فالانوپسیس واریته Cool Breeze پرداخته و دریافتند که بیشترین جوانه‌زنی بذر ٪۸۳/۳۷ در محیط کشت MS، بیشترین شاخه‌زایی گره‌های ساقه گل در غلظت ٤/٤ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به تعداد ۱۵/۳ گیاهچه و همچنین بیشترین تعداد پروتوکورم (۵۸/۲٦) در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر TDZ بدست می‌آید (Bali Lashki et al., 2016). Kriswanto و همکاران (2020) با مطالعه تکثیر گونه‌ای ارکیده از طریق ایجاد پروتوکورم در محیط مایع نشان دادند که محیط کشت MS با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد پروتوکورم بدست می‌آید (Kriswanto et al., 2020). Winarto و همکاران (2016) به بررسی جنین زایی دو کلون حاصل از نوک ساقه ارکیده فالانوپسیس پرداخته و دریافتند محیط کشت MS با غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین تاثیر را در جنین‌زایی داشتند (Winarto et al., 2016). همچنین Novotna و همکاران (2007) بالاترین نرخ رشد ساقه در محیط کشت حاوی 2-ip در *Dactyloriza incarnate* و Bektas و همکاران (2013) تنظیم کننده‌های 2-ip و BA را برای *Orkis coriophora* مناسب اعلام نموده‌اند (Novotna et al., 2007; Bektas et al., 2013). مطالعات Hossain و همکاران (2010) روی *Cymbidium gianteum* و Bali Lashki و Ghasemi Ghehsareh, (2016) بر روی

Phalaenopsis ambilis واریته مانیلا نشان داد که ساقه زایی در محیط‌کشت‌های دارای BAP به‌علاوه NAA، بیشترین تاثیر را داشته‌اند (Bali Lashki and Ghasemi Ghehsareh, 2016; Hossain et al., 2010).

از بخش‌های مختلف گیاه ارکیده مانند بذر (Bali Lashki et al., 2016)، برگ (Thwe et al., 2018; Bali Lashki and Ghasemi Ghehsareh, 2016; Zahara, 2017)، جوانه‌های ساقه گلزا (Bali Lashki et al., 2016) در کشت بافت استفاده می‌شود در برخی موارد هم، کالوس تهیه و از جنین زایی سوماتیکی نیز استفاده می‌گردد (Wu et al., 2004). در اغلب این روش‌ها، مانند کشت بذر و بخش‌هایی از گیاه که به کالوس منجر می‌شود. به‌دلیل تقسیم‌های بسیار زیاد سلول‌ها یا عوامل ناشناخته دیگر، تنوع ژنتیکی مشاهده می‌شود (Asa and Kaviani, 2020).

یک مزیت استفاده از جوانه‌های ساقه گلزا می‌تواند این باشد که دقیقاً همان جوانه رشد کرده، تقسیمات کنترل شده، و دقیقا همان پایه مادری تکثیر گشته و ژنوتیپ آن کاملا حفظ می‌گردد. همچنین از بوجود آمدن کالوس و تقسیمات ناخواسته جلوگیری می‌شود. به همین دلیل در این تحقیق، جهت حفاظت از ژنوتیپ اصلی گیاه مادری که دارای اصالت ویژه ای است (از نظر اندازه گیاه، گل و گل آذین)، از جوانه‌های ساقه گلزا استفاده و تاثیر غلظت‌های مختلف BAP و IBA در ساقه‌زایی و ریشه‌زایی به‌منظور تکثیر آن مورد بررسی قرار گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: برای انجام این تحقیق از بوته‌های دوساله ارکیده فلانوپسیس (*Phalaenopsis philippinensis*) استفاده شد. این بوته‌ها وارداتی از کشور هلند و در گلخانه مخصوص با دمای میانگین روز و شب ۲۵ و ۲۰ درجه با میانگین رطوبت ۸۰-۷۰ درصد و با کود کامل ۲۰-۲۰-۲۰ با غلظت دو در هزار نگهداری شدند. این تحقیق در به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (در هر تکرار ۵ نمونه جمعاً ۲۴۰ نمونه) اجرا و برای انجام این آزمایش از ساقه گلزایی استفاده شد که دست کم سه غنچه باز شده و ۵ تا ۷ گره روی ساقه گل داشتند. در آزمایشگاه ساقه گل از بوته جدا شده و با حذف گلها و غنچه‌ها از آن، به کمک اتانول ۷۰٪ استریل سطحی شدند. سپس به قطعات ۴-۳ سانتیمتری تقسیم کرده که هر کدام دارای یک گره بودند. برای استریل کردن به‌ترتیب در قارچ کش بنومیل ۱٪ (۱۵ دقیقه)به همراه سه قطره توئین۲۰ به ازای هر لیتر آب، اتانول ۷۰٪ (یک دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۵٪ به همراه سه قطره توئین۲۰ به ازای هر لیتر (۱۵ دقیقه) قرار داده شدند در آخر با آب مقطر استریل پنج بار در مدت نیم ساعت در داخل دستگاه لامینار فلو شستشو گردیدند. پس از خشک شدن سطح قطعات در داخل دستگاه بخشهای آسیب دیده از دو انتها جدا و سپس به داخل ظروف، منتقل و کشت شدند.

محیط کشت استقرار ریز نمونه: جهت استقرار ریز نمونه‌ها محیط کشت Murahsige و Skoog (1962) اصلاح شده که در آن بجای $FeSO_4$ از ترکیب Fe-EDDHA با غلظت ۰/۱ گرم در لیتر استفاده شد. در تهیه محیط مقدار ساکارز ۳٪ و آگار ۰/۸٪ استفاده و pH در ۵/۷ تنظیم گردید (Murashige and Skoog, 1962). پس از جوشاندن و انتقال به ظروف، با اتوکلاو در مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. پس از انتقال ریز نمونه‌های استریل شده، در اتاقک‌های رشد با دمای متوسط ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گرادو نور فلورسنت سفید رنگ (دو عدد در ارتفاع ۴۰ سانتی‌متری) با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

محیط کشت ساقه‌زایی: پس از مدت چهار هفته از استقرار ریز نمونه‌ها، نمونه‌های آلوده و یا رشد نکرده جدا و حذف گردیدند. نمونه‌های سالم به محیط کشت MS اصلاح شده، حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد ساقه زایی جابجا شدند (۸گروه). برای تهیه محیط کشت ساقه زایی از دو تنظیم کننده رشد بنزیل آمینوپورین (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و ایندول بوتریک اسید (۰ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد (جدول ۱). ریز نمونه‌های حاصل از مرحله قبل به مدت حداقل دو ماه در این محیط قرار گرفتند. نمونه‌ها هر ماه واکشت می‌شدند. در نهایت نمونه‌ها مورد بررسی قرارگرفت و اندازه گیری انجام شد.

محیط کشت ریشه زایی: ساقه‌های حاصل از مرحله قبل به محیط کشت MS اصلاح شده، حاوی تنظیم کننده‌های رشد ریشه زایی منتقل شدند. برای تهیه محیط کشت ریشه زایی از دو تنظیم کننده ایندول بوتریک اسید (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آمینوپورین (۰ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گشت (جدول ۱). ریز نمونه‌های حاصل از مرحله قبل بصورت منفرد به مدت دو ماه در این محیط قرار داده و هر ماه واکشت ودر پایان مورد بررسی و سنجش قرار گرفتند.

جدول ۱: غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و ایندول‌بوتریک اسید (IBA) در ساقه زایی (گروه‌های ۸-۱) و ریشه زایی (گروه‌های ۱۶-۹).

تیمارهای ساقه‌زایی	ایندول‌بوتریک اسید (میلی‌گرم بر لیتر)	بنزیل‌آمینو پورین (میلی‌گرم بر لیتر)	تیمارهای ریشه‌زایی	بنزیل آمینوپورین (میلی‌گرم بر لیتر)	ایندول‌بوتریک‌اسید (میلی‌گرم بر لیتر)
گروه ۱	۰	۰	گروه ۹	۰	۰
گروه ۲	۰	۰/۵	گروه ۱۰	۰	۰/۵
گروه ۳	۰	۱	گروه ۱۱	۰	۱
گروه ٤	۰	۲	گروه ۱۲	۰	۲
گروه ۵	۰/۲۵	۰	گروه ۱۳	۰/۱	۰
گروه ٦	۰/۲۵	۰/۵	گروه ١٤	۰/۱	۰/۵
گروه ۷	۰/۲۵	۱	گروه ۱۵	۰/۱	۱
گروه ۸	۰/۲۵	۲	گروه ١٦	۰/۱	۲

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های آزمایش، از نرم‌افزار SAS استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

پس از جداسازی، استریل و انتقال به محیط کشت استقرار، جوانه موجود در روی گره شروع به رشد نموده و ساقه نازکی به همراه برگهای کوچکی بر روی آن ظاهر گردید (شکل ۱). پس از اطمینان از رشد جوانه‌ها و سالم بودنشان، آنها را از ساقه مادری جدا نموده و به محیط کشت ساقه‌زایی منتقل گردیدند. پس از طی دوبار واکشت و گذشت ۲ تا ۳ ماه در برخی غلظت‌های تاثیر مثبت ساقه زایی مشاهده گردید. با تاثیر غلظت‌های مختلف از تنظیم کننده‌های رشد ساقه زایی، ریز نمونه‌ها پاسخهای متفاوتی از خود نشان دادند مثلا بیشترین تاثیر با

۱۲/۲۷ تعداد گیاهچه (شکل ۲) در تیمار با غلظت‌های ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (گروه ۷) و کمترین تاثیر به تعداد یک گیاهچه در گروه‌های ۱ (شاهد) و ۵ مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۲ مقایسه میانگین اثر اصلی تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA و اثر متقابل آنها در جدول ۳ آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که تاثیر تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA در تعداد گیاهچه‌ها و همچنین تعداد برگها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شده است. همچنین اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA نیز در سطح احتمال ۱٪ بر روی تعداد گیاهچه‌ها معنی‌دار شده است. از جدول ۳ چنین استنباط می‌شود که BAP در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر سبب تحریک ساقه زایی می شود که ترتیب نزولی تعداد ساقه به‌ترتیب در غلظت ۱، ۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP می‌باشد. مقایسه وجود و عدم وجود IBA در ساقه‌زایی حاکی از آن است که حضور IBA در مجموع تاثیر گذار بوده و سبب بهبود ساقه زایی BAP می‌شود. به‌طوریکه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP افزایشی بیش از سه برابر مشاهده می گردد (مقایسه گروه‌های ۳ و ۷). ترتیب تاثیر در ساقه‌زایی غلظتهای مختلف BAP + IBA مشابه غلظت‌های BAP می باشد. تعداد برگ‌ها در تیمارهای مختلف نشان می دهد که ساقه زایی سبب کاهش جزیی تعداد برگها می شود. البته همانطور که در شکل‌ها هم مشخص است بیشترین تاثیر غلظت تنظیم کننده‌های رشد در ساقه زایی، در اندازه و سطح برگها در مقایسه با تعداد برگها، نمود بیشتری داشته است و ظاهرا تاثیر قابل توجهی در تعداد نگذاشته اما چون توان گیاهچه در راه ایجاد ساقه‌های جدید مصرف شده سطح برگ و اندازه آنها بطور گسترده‌ای کاهش یافته است.

جدول ۲: تجزیه واریانس تأثیر تنظیم کننده‌های رشد بنزیل‌آمینوپورین(BAP) و ایندول‌بوتریک اسید (IBA) در ساقه زایی ارکیده.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	
		تعداد گیاهچه	تعداد برگ
بنزیل‌آمینوپورین	۳	۱۹۱/۳۲۵**	۱۱/۰۰۰**
ایندول‌بوتریک اسید	۱	۳۹/۰۱۵**	۰/٤۲٦٦**
بنزیل‌آمینوپورین* ایندول‌بوتریک اسید	۳	۷۰/۳۷۸**	۰/۰۹۳۳**
خطای آزمایش	۱٦	٦/۱۰٦٦	۱/۱۷۳۳**
کل	۲۳	۳۰٦/۸۲۵	۱۲/٦۹۳۳
ضریب تغییرات (CV)		۱۷/۲۸۰۹	٦/۸۸٤۷۸

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

شکل ۱: مراحل رشد جوانه روی گره ساقه گلزا ارکیده فلانوپسیس.

جدول ۳: مقایسه میانگین اثر اصلی تنظیم کننده‌های رشد بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و ایندول‌بوتریک اسید (IBA) و اثر متقابل آنها در ساقه زایی ارکیده.

تیمار	تعداد گیاهچه	تعداد برگ
	خطای استاندارد± میانگین	خطای استاندارد± میانگین
ایندول‌بوتریک اسید		
۰	۲/۳±۰/۳۹۲^{b}	۳/۸±۰/۲۰۵^{b}
۰/۲۵	٤/۸۵±۱/۳٦۹^{a}	٤/۰۷±۰/۲۲٦^{a}
بنزیل‌آمینوپورین		
۰	۱±۰/۰۰۰^{c}	٤/۷۳±۰/۱۳۳^{a}
۰/۵	۱/٤±۰/۱۱۵^{c}	٤/٤۷±۰/۱٤۳^{a}
۱	۸/۱±۱/۸۹۷^{a}	۳/۱۷±۰/۰٦۱^{b}
۲	۳/۸±۰/٤۸۷^{b}	۳/۳۷±۰/۱۲۰^{b}
بنزیل‌آمینوپورین* ایندول‌بوتریک اسید		
۰ –۰ (گروه ۱)	۱±۰/۰۰۰^{d}	٤/٦±۰/۲۰۰^{ab}
۰ – ۰/۵ (گروه ۲)	۱/٤±۰/۲۳۱^{d}	٤/٦۷±۰/۱۷٦^{ab}
۰ – ۱ (گروه ۳)	۳/۹۳±۰/۵۸۱^{bc}	۳/۱۳±۰/۰٦۷^{c}
۰ –۲ (گروه ٤)	۲/۸۷±۰/۵٤۵^{c}	۳/۲±۰/۱۱۵^{c}
۰/۲۵–۰ (گروه ۵)	۱±۰/۰۰۰^{d}	٤/۸۷±۰/۱۷٦^{a}
۰/۲۵–۰/۵ (گروه ٦)	۱/٤±۰/۱۱۵^{d}	٤/۲۷±۰/۱۷٦^{ab}
۱–۰/۲۵ (گروه ۷)	۱۲/۲۷±۰/۵٤٦^{a}	۳/۲±۰/۱۱۵^{c}
۰/۲۵ –۲ (گروه ۸)	٤/۷۳±۰/۱۳۳^{b}	۳/۵۳±۰/۱۷٦^{c}

بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اعداد با حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری ندارند.

شکل ۲: ساقه‌زایی در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتریک اسید (IBA) را به‌ترتیب از چپ به راست.

نتایج حاصل از ریشه‌زایی شامل تجزیه واریانس در جدول ٤ مقایسه میانگین اثر اصلی تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA و اثر متقابل آنها در جدول ۵ آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که تاثیر تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA در تعداد ریشه‌ها و همچنین طول ریشه‌ها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است. همچنین اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA نیز در سطح احتمال ۱٪ بر روی

تعداد ریشه‌ها معنی‌دار است. براساس نتایج جدول ٤ و ٥ می‌توان گفت که، از آنجایی که IBA به‌عنوان تنظیم کننده ریشه‌زایی موثر، مطرح است مشاهده ریشه دور از انتظار نیست. وقتی که ساقه‌های منفرد حاصله از مرحله قبل به محیط ریشه زایی منتقل می‌شوند از نظر ظاهری برگها رشد بیشتری داشته و پهن گسترده می‌شوند که از این نظر برگ‌های محیط ریشه‌زایی با محیط ساقه‌زایی متفاوت هستند. ریشه زایی فقط در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده می شود (گروه‌های ۱۱، ۱۲، ۱۵ و ۱٦) و همانطور که نتایج نشان می‌دهند حضور BAP تاثیر مثبتی در ریشه‌زایی داشته و به همراه IBA ریشه زایی با تعداد بیشتر ریشه و همچنین افزایش طول ریشه نشان می‌دهد (شکل ۳). بیشترین طول ریشه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP اندازه‌گیری شده است (گروه ۱۵).

جدول٤: تجزیه واریانس تأثیر تنظیم کننده‌های رشد بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و ایندول‌بوتریک اسید (IBA) در ریشه‌زایی ارکیده.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	
		تعداد ریشه	طول ریشه (سانتیمتر)
بنزیل‌آمینوپورین	۳	۵/٦۰۷**	۱۳/۸۰۲**
ایندول‌بوتریک اسید	۱	٤۹/۷۸۰**	۱۸٤/۱۱۰**
بنزیل‌آمینوپورین* ایندول‌بوتریک اسید	۳	۵/۹٤۰**	۱٦/۸۰۲**
خطای آزمایش	۱٦	۰/۸۲۷	۱/۵۸۰
کل	۲۳	٦۲/۱۵۳	۲۱٦/۲۹۳
ضریب تغییرات (CV)		۱٦/۰٤۵	۱۲/٤۰٤

**: معنی‌دار در سطح احتمال٪ ۱

شکل ۳: ریشه زایی در غلظت‌های ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتریک اسید (IBA) (سمت چپ، گروه ۱۵) و غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) (سمت راست گروه ۱۱).

جدول ۵: مقایسه میانگین اثر اصلی تنظیم کننده‌ای رشد بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و ایندول‌بوتریک اسید (IBA) و اثر متقابل آنها در ریشه‌زایی ارکیده.

تیمار	تعداد ریشه	طول ریشه (سانتیمتر)
	میانگین±خطای استاندارد	میانگین±خطای استاندارد
	ایندول‌بوتریک اسید	
۰	۰/۹۳۳±۰/۲۹۲^{b}	۱/۷۷۵±۰/۵۸۹^{b}
۰/۱	۱/۹±۰/۵۸۶^{a}	۳/۲۹۲±۱/۰۸۹^{a}
	بنزیل‌آمینوپورین	
۰	۰±۰/۰۰۰^{c}	۰±۰/۰۰۰^{c}
۰/۵	۰±۰/۰۰۰^{c}	۰±۰/۰۰۰^{c}
۱	۳/۲±۰/۵۱۶^{a}	۶/۶۵±۰/۹۲۲^{a}
۲	۲/۴۶۷±۰/۳۸۲^{b}	۳/۴۸۳±۰/۱۴۷۱^{b}
	بنزیل‌آمینوپورین* ایندول‌بوتریک اسید	
۰ – ۰ (گروه ۹)	۰±۰/۰۰۰^{e}	۰±۰/۰۰۰^{d}
۰ – ۰/۵(گروه ۱۰)	۰±۰/۰۰۰^{e}	۰±۰/۰۰۰^{d}
۰ – ۱(گروه ۱۱)	۲/۰۶۷±۰/۱۷۶^{c}	۴/۶۳۳±۰/۳۱۸^{b}
۰ – ۲(گروه ۱۲)	۱/۶۶۷±۰/۲۴۰^{d}	۲/۴۶۷±۰/۲۳۳^{c}
۰/۱ – ۰(گروه ۱۳)	۰±۰/۰۰۰^{e}	۰±۰/۰۰۰^{d}
۰/۱ – ۰/۵(گروه ۱۴)	۰±۰/۰۰۰^{e}	۰±۰/۰۰۰^{d}
۰/۱ – ۱(گروه ۱۵)	۴/۳۳۳±۱/۳۳۳^{a}	۸/۶۶۷±۰/۲۹۰^{a}
۰/۱ – ۲(گروه ۱۶)	۳/۲۶۷±۰/۱۷۶^{b}	۴/۵۰±۰/۱۵۳^{b}

بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اعداد با حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری ندارند

بحث

ارکیده از گیاهان گلدار علاوه بر ظاهر زیبا، دارای ارزش فراوان در صنایع غذایی، دارویی و طعم دهنده هستند. تکثیر رویشی و جوانه‌زنی بذر از روش‌های معمولی ازدیاد ارکیده است که با توجه به تقاضای بالا در بازار استفاده از این روش‌ها بسیار کند است. بدین سبب از کشت بافت به‌طور گشترده در تکثیر ارکیده استفاده می‌شود (Lal and singh, 2020). در طبیعت ارکیده فلانوپسیس با دو روش جنسی بوسیله بذر یا روش غیر جنسی و با تولید کیکزها که گیاهچه‌های ناشی از رشد جوانه‌های نهفته روی ساقه گل دهنده هستند، افزایش می یابند (Bali Lashki et al., 2016). در کشت بافت نیز از چند ریز نمونه بذر، برگ و جوانه‌های ساقه گلزا استفاده می‌شود (Asa and Kaviani, 2020). هر کدام از این روش‌ها مزیت و معایب خود را بهمراه دارد استفاده از بذر به دلیل تعداد زیاد آن در هر کپسول باعث تولید تعداد زیادی گیاهچه می شود. اما به دلیل کامل نبودن جنین در بذرها رشد آنها با تمهیدات خاصی از جمله تغذیه مناسب و شرایط خاص می‌تواند موفقیت لازم را بدست آورد از طرف دیگر پژوهش‌ها نشان داده اند که با توجه به طولانی بودن دوره نو نهالی گیاهان تولید شده از بذر و عدم اطمینان از یکنواختی گیاهچه‌های تولید شده به دلیل دگرگشن بودن ارکیده‌ها از معایب این روش می باشند (Bali Lashki et al., 2016). استفاده از برگ در اغلب موارد و دیگر

بخشهای گیاه در برخی دیگر از موارد، القای جنین زایی مستقیم نیز روش مناسبی برای تکثیر ارکیده فلانوپسیس توسط برخی محققین گزارش شده است. در این روش با ایجاد تقسیم سلولی و تولید پروتوکورم و در آخر تحریک آن بسوی ساقه‌زایی موفقیت‌های خوبی را گزارش می نمایند (Kriswanto et al., 2020; Asa and Kaviani, 2020; Thwe et al., 2018). پروتوکورم‌ها یک اندام نابالغ ارکیده بوده که پتانسیل مریستمی بالایی دارند همچنین حد واسط جنین و گیاه می باشند و از ریز نمونه‌های متنوعی مانند برگ، نوک ساقه، دانه و TCL (لایه نازک سلولی) بدست می آیند (Teixeira da Silva et al.,2006; Hossain et al., 2010; Roy et al., 2011; Baker et al., 2014;) به دلیل تولید زیاد پروتوکروم در زمان کوتاه به نظر روش مناسبی برای تکثیر بوده و پژوهشگران بسیاری در این مسیر تحقیقات گسترده ای انجام داده اند. بیشترین تعداد پروتوکورم در ریز نمونه ۵۰/۶۵ عدد در *Phalaenopsis amabilis* واریته مانیلا در محیط کشت حاوی ۱۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه NAA گزارش شده است (Bali Lashki and Ghasemi Ghehsareh, 2016). در تحقیق دیگری تعداد ۳۰/۴۰ به ازای هر ریز نمونه در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin و IBA گزارش گردیده است (Asa and Kaviani, 2020). نکته حایز اهمیت در این روش تنها تولید پروتوکروم نیست بلکه تعداد گیاهچه حاصل از آن است به عنوان مثال در گزارش Asa و Kaviani تعداد ۱۰/۳۳ گیاچه از ۳۰/۴۰ پروتوکورم بطور متوسط بدست آمده است (Asa and Kaviani, 2020). در نتیجه اگر معیار تعداد گیاهچه‌های بدست آمده باشد شاید روش‌های موفق دیگری هم وجود داشته باشد.

محققانی که در گذشته از ساقه گلزا برای تکثیر و تولید گیاهچه استفاده کرده اند سه حالت از پاسخ‌های جوانه‌ها مشاهده نموده اند برخی به همان حالت خفته باقی می‌مانند و هیچ‌گونه تغییری نمی‌کنند. برخی رشد کرده و ساقه و برگ داده و سپس به گیاهچه سالم و فعال تبدیل می‌شوند و برخی وارد فاز زایشی شده و به گل یا شاخه گل تبدیل می‌شوند (Arditti 2008; Bali Lashki et al., 2016). در تحقیق حاضر ۵٪ جوانه‌ها رشد نکرده ۹۵٪ آنها به جوانه رویشی فعال و ۰٪ به گل یا گل آذین تبدیل شدند. در این پژوهش، بهترین عملکرد در ساقه زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم IBA بدست آمده که به تعداد ۱۲/۲۷ گیاهچه می باشد. گزارش‌های متفاوتی از محیط ساقه زایی وجود دارد که سبب تحریک و ایجاد ساقه‌های جدید می شود. بهترین عملکرد در تولید گیاهچه‌ها از جوانه‌های ساقه گل فلانوپسیس در محیط کشت تجاری سیگما P6793 که حاوی ۲ میلی‌گرم BAP و ۰/۵ میلی‌گرم NAA در هر لیتر به تعداد ۸/۳۵ گیاهچه به ازای هر گره (یا جوانه) گزارش گردیده است (Kosir et al., 2004). در تحقیق دیگری تعداد گیاهچه‌ها در محیط کشت MS با غلظت ٤/٤ میلی‌گرم BAP به همراه ۱ میلی‌گرم NAA در لیتر، به تعداد ۱۵/۳ گیاهچه به ازای هر گره گزارش شده است (Bali Lashki et al., 2016). نتایج یافته‌های حاضر با این نتایج مقایسه شود می توان نتیجه گرفت که بیشترین تعداد گیاهچه در هر آزمایش در غلظتهایی از تنظیم کننده‌ها بدست آمده است که، نسبت سیتوکنین به اکسین، نسبت چهار به یک است و این نسبت به نظر یک نکته کلیدی در افزایش تعداد گیاهچه‌ها از هر گره می باشد. این امر در پژوهش حاضر نیز مشاهده شده است. نکته دوم می تواند این باشد که نوع اکسین و سیتوکنین استفاده شده نیز می تواند در ماکزیمم تعداد گیاهچه‌های بدست آمده تاثیر گذار باشد.

غلظت تنظیم کننده‌های رشد و چگونگی استفاده از آنها (جداگانه یا با هم) در تولید ساقه مهم بوده که

البته به نوع گونه و واریته هم بستگی دارد. این مطلب با گزارشهای متعدد محققین بر روی واریتههای مختلف، به اثبات رسیده و تاکید شده است. علاوه براین، مقدار تنظیم کنندههای رشد درونزاد، نوع ریز نمونه و جهت استقرار آن در محیط کشت میتواند در نتیجه تاثیر گذار باشد. برخی محققین استفاده از یک تنظیمکننده رشد بجای چند تنظیم کننده رشد را در ساقه زایی ارکیده موثرتر میدانند (Panwar et al., 2012; Parthibhan et al., 2015)، البته برخی دیگر نیز ترکیب تنظیم کنندههای رشد را در تحقیقاتشان موثرتر گزارش کردهاند (Asa and Kaviani, 2020). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان میدهد که ترکیب تنظیم کنندههای رشد موثرتر واقع شدهاند.

یافتههای محققین نشان میدهد که ریشه زایی در گیاهچههایی که ساقه بلندتری داشته باشند بهتر بوده و دارای بیشترین تعداد ریشه و بالاترین طول ریشهها هستند (Asa and Kaviani, 2020). برخی نشان داده اند که تنظیم کننده IBA در ریشه زایی بسیار موثر بوده و NAA تاثیری در ریشه زایی ارکیده ندارد. (Mahendran and Bai, 2009; Asa and Kaviani, 2020). آنها نقش IBA در القای ریشه زایی و رشد ریشه را در انواع ارکیده مانند *Vanilla planifolia* (Giridhar et al., 2006)، *Cymbidium pendulum* (Nongdam et al., 2006)، *Satyrium nepalense* (Mahendran and Bai, 2009) نشان داده اند. بهترین غلظت در القای ریشه زایی فالانوپسیس واریته Cool Breeze، در غلظت نیم میلیگرم در لیتر IAA گزارش شده است (Bali Lashki et al., 2014;). Baker (2014) بالاترین تعداد ریشه را در غلظت ۰/۵ میلیگرم BA و NAA نشان داد (Baker et al., 2014). Asa و Kaviani (2020) بالاترین تعداد ریشه را در غلظت ۱ میلیگرم در لیتر از هر دو تنظیم کننده Kin و IBA به تعداد ۸/۳۶ نشان داده است (Asa and Kaviani, 2020). نتایج بدست آمده از این تحقیق نیز نشان می دهد که غلظت ۱ میلیگرم در لیتر IBA به همراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر BAP (گروه ۱۵) باعث تشکیل بیشترین تعداد ریشه و همچنین بیشترین طول ریشه گردیده است. البته Luo و همکاران (2009) نیز نشان دادند که ساقه *Dendrobium huoshanense* رشد یافته در محیط کشت MS عاری از تنظیم کننده ریشه دار شده است (Luo et al., 2009). در برخی تحقیقات جدید تولید متابولیتهای ثانویه از ارکیده مورد توجه قرار گرفته و با ایجاد شرایط مختلف به تغییرات این متابولیتها می پردازند. متابولیتهای ثانویه حاصل از ارکیده در صنایع غذایی و دارویی کاربرد اساسی دارد (Yeowa et al., 2020).

نتیجهگیری نهایی

با توجه به انواع روشهای تکثیر ارکیده که هر کدام به نوبه خود دارای اهمیت است. اما روش تکثیر از طریق جوانه یا گره ساقه گلزا نیز، به جهت حفظ کامل ژنوتیپ و خصوصیات پایه اصلی، دارای اهمیت ویژه ای است. در این تحقیق با مطالعه غلظتهای مختلف BAP و IBA بر روی ساقهزایی و ریشه زایی ارکیده فالانوپسیس (*Phalaenopsis philippinensis*)، مشخص گردید که غلظت ۱ میلیگرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلیگرم در لیتر IBA بیشترین تاثیر را با تعداد ۱۲/۲۷ ساقه به ازای هر ریز نمونه و در غلظت ۱ میلیگرم در لیتر IBA به همراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر BAP بیشترین تاثیر را در ایجاد تعداد (٤/۳۳) و طول (۸/٦۷ سانتیمتر) ریشه دارد. استفاده از این غلظتها BAP و IBA در ریزازدیادی ارکیده توصیه میشود.

References

Arditti, J. (2008). Micropropagation of Orchid. In: USA. 564-843.

Arditti, J. and Alec, M. (1993). Fundamental of Orchid Biology. Wiley Interscience. In: New York. 432-654.

Asa, M. and Kaviani, B. (2020). In vitro propagation of orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume var. Jawa. Iranian Journal of Plant Physiology. 10(2): 3113-3123.

Balilashaki, Kh. and Ghasemi Ghehsareh, M. (2016). Micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* var. 'Manila' by leaves obtained from *in vitro* culturing the nodes of flower stalks. Notulae Scientia Biologicae. 8 (2): 164-169.

Balilashaki, K., Naderi, R. and 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.

Balilashaki, Kh., Naderi, R., Kalantari, S. and Soorni, A. (2014). Micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* cv. Cool 'Breeze' with using of flower stalk nodes and leaves of sterile obtained from node cultures. International Journal of Farming and Allied Sciences. 3(7): 823-829.

Baker, B., Kaviani, B., Nematzadeh, Gh. and Negahdar, N. (2014). Micropropagation of *Orchis catasetum* – A rare and endangered orchid. Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus. 13 (2): 197-205.

Bektas, E., Cuce, M. and Sokmen, A. (2013). *In vitro* regeneration from protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley – An imperiled orchid. Turkish Journal of Botany. 37: 336-342.

Chen, J. and Chang, W.C. (2006). Direct Somatic embryogenensis and plant regeneration from leaf explants Phalaenopsis. Bioplant. 50: 169-173.

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

Giridhar, P., Obul Reddy, B. and Ravishankar, G.A. (2001). Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Androl. Current Science. 81: 1166–1170.

Griesbach, R.J. (2002). Development of Phalaenopsis Orchids for the mass-market. ASHS Press, Alexandria, 458-465.

Hempfling, T. and Preil, W. (2005). Application of a temporary immersion system in mass propagation of Phalaenopsis. In Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation. Springer Netherlands. 231-242.

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. Scientia Horticulturae. 123: 479-487.

Kosir, P., Skof, S. and Luthar, Z. (2004). Direct shoot regeneration from node of Phalaenopsis Orchid. Acta Agriculture Slovenia. 83: 233-242.

Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 73: 1–7.

Kriswanto, B., Soeparjono, S. and Restanto, D.P. (2020). Primacy of liquid medium technique on protocorm like bodipropagationof phalaenopsis sp. Orkids in tissue culture. Biovalentia: Biological Reaserch Journal. 6(1): 1-7.

Lal, N. and Singh, M. (2020). Prospects of Plant Tissue Culture in Orchid Propagation: A Review. Indian Journal of Biology 7(2): 103-110.

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. Scientia Horticulturae. 123: 258-262.

Mahendran, G. and Narmatha Bai, V. (2009). Mass propagation of *Satyrium nepalense* D. Don A medicinal orchid via seed culture. Scientia Horticulturae. 119: 203–207.

Morel, G., (1960). Producing virus-free cymbidiums. Am. Orchid Soc. Bull. 29: 495–497.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473–479.

Nongdam, P., Nirmala, C. and Tewari, R. (2006). *In vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* orchids via embryo culture. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology. 7: 145–150.

Novotna, K.W., Vejsadova, H. and Kindlemann, P. (2007). Effect of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species. Biologia Plantarum 51: 198-200.

Panwar, D., Ram, K. and Shekhawat, H. N. S. (2012). In vitro propagation of *Eulophia nuda* Lindl., an endangered orchid. Scientia Horticulturae. 139: 46–52.

Parthibhan, S., Rao, M.V. and Kumar, T. S. (2015). In vitro regeneration from protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley – An imperiled orchid. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 13: 227-233.

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. Scientia Horticulturae. 128: 325-331.

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 and Organ Culture. 84: 135-144.

Thwe, M.K.H., Myint, K.T., Khaing, T.T. and Shwe1, S.S. (2018). In vitro clonal propagation of phalaenopsis through young leaf. Journal of Agricultural Research. 5(2): 99-103.

Winarto, B., Atmini, K. D., Badriah, D.S. and Wegadara, M. (2016). In vitro embryogenesis derived from shoot tips in mass propagation of two selected-clones of phalaenopsis. Notulae Scientia Biologicae. 8(3): 317-325.

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

Yeowa LC, Chewa BL, Sreeramanan S. (2020). Elevation of secondary metabolites production through light-emitting diodes (LEDs) illumination in protocorm-like bodies (PLBs) of Dendrobium hybrid orchid rich in phytochemicals with therapeutic effects. Biotech Rep. 27: e00497.

Zahara, M. (2017). A review: Micropropagation of Phalaenopsis sp. from leaf and flower stalk explants. Jurnal Natural. 17 (2): 91-95.