Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
PSI
Phycological Society of Iran

Effect of Explant Type, Plant Growth Regulators and LED lights on the Establishment and Propagation of ZZ Plant (*Zamioculcas zamiifolia*)

Fatemeh Mousali[1], Mansour Matloobi[2*], Alireza Motallebi Azar[3], Sadaleh Alizadeh[4], Mohammad Medi Habibi[5], Asghar Mohammadi[6]

[1] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran, Email: fatemehmousali@gmail.com
[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran, Email: matloobi@gmail.com
[3] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran, Email: motallebiazar@tabrizu.ac.ir
[4] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran, Email: azajirlo@tabrizu.ac.ir
[5] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran, Email: mohammadhabibi23vh@gmail.com
[6] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran, Email: asghar69.mohammadi@gmail.com

Article type:
Research article

Article history
Received:19.06.2023
Revised: 22.11.2023
Accepted: 25.11.2023
Published:20.03.2024

Keywords
BAP
Blue light
Light quality
NAA
Tissue culture

Abstract

Zamioculcas zamiifolia plant is one the most valuable foliage plants which is commonly propagated using vegetative methods. This technique requires a great number of mother plants to provide adequate cuttings for commercial propagation which hardly seem to meet the most economical expectations. However, due to the slow growth habit of this plant, even under ideal growing conditions, its commercial and mass production are limited by some species-related characteristics. Therefore, developing an improved method of micropropagation which lead to a fast and reliable mass propagation technique may overcome most of these limitations especially at commercial scale. In this regard, this research was conducted and aimed to introduce an efficient micropropagation method in in-vitro condition for rapid propagation of this plant. Two different concentrations of BAP (1 and 2 mg L^{-1}) and NAA (0 and 0.1 2 mg L^{-1}) were applied on the explants taken from one of the three different positions of the leaflets (i.e., lower, middle and upper parts) cultured in MS medium and treated with blue (400-500 nm) or red (600-700 nm) light supplied by LED luminaries The results showed that the best treatment for callus and protocorm formation with the maximum stimulation (93.75%) and (66.66%) was the application of 2 mg/L BAP along with 0.1 mg/L NAA in The light was red. Callus production occurred in cut surfaces by 90% under blue and 85% under red light, while these lights induced protocorm indirectly by 80% and 90% respectively, leaving the rest to be regenerated by directly. Blue and red light induced protocorm emergence by 95% and 97% respectively from the cut surface and the parts around the cut location were responsible for the emergence of the remained protocorms. The highest rate of regeneration of protocorms (95%) in the treatment of 0.1 mg/liter NAA was indirect, and in the absence of NAA, callus generation was 92% and vprotocorms were formed 100% at the cut surface. Protocorm regeneration in lower and middle parts of leaflets occurred 75% as indirectly, and no regeneration was observed in the middle and upper parts of the leaflets. In general, the best combination of the applied treatments for the both callus and protocorm regeneration was found as follows: BA 2 mg L -1 with NAA 0.1 mg L -1 applied for explants of lower parts of the leaflets under red light spectrum.

Cite this article as: Mousali, F., Matloobi, M., Motallebi Azar, A.R., Alizadeh, S., Habibi, M.M., Mohammadi, A. (2023). Effect of Explant Type, Plant Growth Regulators and LED lights on the Establishment and Propagation of ZZ Plant (*Zamioculcas zamiifolia*). *Journal of Plant Environmental Physiology*, 19(1): 1-16.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

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

اثر نوع ریز نمونه، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و انواع نورهای LED روی مرحله استقرار و پرآوری زاموفیلیا (*Zamioculcas zamiifolia*)

فاطمه موسعلی[۱]، منصور مطلوبی[۲*]، علیرضا مطلبی آذر[۳]، سعداله علیزاده[۴]، محمد ولی حبیبی[۵]، اصغر محمدی[۶]

[۱] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: fatemehmousali@gmail.com
[۲] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: matloobi@tabrizu.ac.ir
[۳] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: motallebiazar@tabrizu.ac.ir
[۴] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: azajirlo@tabrizu.ac.ir
[۵] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: mohammadhabibi23vh@gmail.com
[۶] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، رایانامه: asghar69.mohammadi@gmail.com

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۴
تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۰۱/۰۱

واژه‌های کلیدی:
بنزیل آمینو پورین
کشت بافت
کیفیت نور
نور آبی
نفتالین استیک اسید

چکیده

زاموفیلیا یکی از گیاهان زینتی با ارزش است که تکثیر معمول آن از طریق رویشی صورت می‌گیرد. به همین دلیل به تعداد زیادی گیاه مادری جهت تولید تجاری آن نیاز است که مقرون به صرفه نیست. بنابراین هدف از انجام این پژوهش معرفی یک روش کشت درون شیشه‌ای برای افزایش سریع گیاه زاموفیلیا می باشد. در پژوهش حاضر اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آمینو پورین (BAP) (۱و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و نفتالن استیک‌اسید (NAA) (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) و همچنین نورهای LED آبی (۴۰۰-۵۰۰ نانومتر) و قرمز (۶۰۰-۷۰۰ نانومتر) بر تشکیل پینه‌زایی و پروتوکروم (برگچه، قسمت میانی برگچه و جفت برگچه‌ای) بررسی شد. نتایج نشان داد بهترین تیمار برای پینه‌زایی با بیشینه انگیزش ۹۳/۷۵٪ و تشکیل پروتوکورم ۶۶/۶۶٪ ، تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و در نور قرمز بود. تشکیل پینه، تحت نور آبی و قرمز، به ترتیب در ۹۰ و ۸۵ درصد موارد از محل برش و باززایی پروتوکورم درهمین شرایط، به ترتیب، ۸۰ و ۹۰ درصد به صورت غیر مستقیم بود. همچنین تحت نور آبی و قرمز به ترتیب، ۹۵ و ۹۷ درصد ظهور پروتوکورم از محل برش مشاهده شد. بیشترین میزان باززایی پروتوکورم‌ها (۹۵ درصد) در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA، به صورت غیر مستقیم بود که در نبود NAA، پینه‌زایی ۹۲ درصد و پروتوکورم ۱۰۰ درصد در محل برش تشکیل شدند. باززایی پروتوکورم در ریزنمونه قاعده و قسمت میانی برگچه با رگبرگ، ۷۵ درصد به صورت غیر مستقیم بود و در ریزنمونه جفت برگچه‌ای هیچگونه باززایی مشاهده نشد. به طور کلی بهترین ترکیب هورمونی، کیفیت نور و نوع ریزنمونه برای تشکیل پینه و پروتوکورم، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و نور قرمز در ریزنمونه قاعده برگچه بود.

استناد: موسعلی، فاطمه؛ مطلوبی، منصور؛ مطلبی آذر، علیرضا؛ علیزاده، سعداله؛ ولی حبیبی، محمد؛ محمدی، اصغر. (۱۴۰۳). اثر نوع ریز نمونه، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و انواع نورهای LED روی مرحله استقرار و پرآوری زاموفیلیا (*Zamioculcas zamiifolia*). *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۱۹(۱)، ۱۶-۱.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

زامونیلیا (*Zamioculcas zamiifolia*)، گل‌زاد یا گیاه zz یا نخل آروئید از گیاهان خانواده آراسه[1] می‌باشد که از نظر اقتصادی یکی از با ارزش‌ترین جنس‌های این خانواده است. زادگاه این گیاه دائمی و همیشه سبز شرق آفریقا است (Lopez et al., 2009). زامونیلیا گیاهی علفی است که ارتفاع آن به ٤٥ تا ۹۰ سانتی‌متر می‌رسد. به دلیل کم توقع بودن و رشد خوب این گیاه در شرایط نور کم می‌توان براحتی آن را در آپارتمان پرورش داد (Feng et al., 2006). روش تکثیر معمول زامونیلیا به صورت رویشی و با استفاده از قلمه‌های برگ و دمبرگ و همچنین تقسیم ریزوم است. اما به دلیل کند رشد بودن این گیاه، حتی در شرایط رشدی ایده‌ال، تولید تجاری و انبوه آن به روش‌های معمول محدود بوده و عملکرد مورد قبولی نخواهد داشت، به همین دلیل در چنین شرایطی تولید تجاری آن خیلی مقرون به صرفه نخواهد بود. یکی از راهکارهای غلبه بر این مشکل می‌تواند استفاده از روش‌های ریزازدیادی باشد که در صورت موفقیت قادر خواهد بود در مقیاس تجاری بصورت انبوه این گیاه را تکثیر کند.

استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت بافت بسیار مهم است. با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مصنوعی، می‌توان نتایج مشابه با اثرات هورمون‌های درون‌زا که در گیاه سنتز شده‌اند، به دست آورد (Mehbub et al., 2022). انتخاب نوع ریزنمونه هم مانند ترکیبات محیط کشت و عناصر فیزیولوژیکی می‌تواند بر رشد گیاه موثر باشد. از عواملی که در انتخاب ریزنمونه می‌تواند تعیین کننده باشد، هدف نهایی کشت و پاسخ مورد انتظار از کشت می‌باشد برای مثال Sayad-Najad and Sadeghi (۲۰۱۹) جهت تولید پینه و باززایی در گیاه زامونیلیا، از ریزنمونه‌های دمبرگ، ریزوم، برگ و شاخه، در محیط کشت‌های با سطوح متفاوت تنظیم کننده‌های رشد استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند که محیط کشت پایه MS به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بالاترین پینه‌زایی را داشت. در مرحله ریشه‌زایی بهترین تیمار برای ریزنمونه دمبرگ با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بدست آمد با این حال در مرحله شاخه‌زایی بهترین نتایج از ریزنمونه ریزوم حاصل شد. در تحقیقی دیگر از ریزنمونه برگ و دمبرگ زامونیلیا برای ریزازدیادی استفاده شد. ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ٤ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D در شرایط تاریکی مناسب برای پینه‌زایی بود (Vanize-canton and Leonhardt., 2007). پژوهشگر دیگر، در کشت درون شیشه‌ای زامونیلیا از ریزنمونه‌های برگ و شاخه‌های ظریف گیاه استفاده کرد. محیط کشت پایه به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA برای پینه‌زایی و همچنین ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA برای جوانه‌زنی مناسب تشخیص داده شد که بعد از ۳۰ روز، تعداد زیادی جوانه‌های تمایز یافته رشد کردند، برای ریشه‌زایی از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA استفاده کرد (Ni, 2015).

نور یکی دیگر از موارد تاثیر گذار در کشت بافت گیاهان است. نور از طریق واکنش‌های فتوسنتزی و فتومورفوژنز می‌تواند در ازدیاد گیاهان موثر باشد. معمولاً در کشت بافت از نورهای فلورسنت استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر تلاش می‌شود از لامپ‌هایی LED برای تامین نور در کشت درون شیشه‌ای استفاده شود. مصرف برق لامپ‌های فلورسنت بیشتر است و طیف گسترده‌ای از طول موج‌های (۳۵۰-۷۵۰ نانومتر) را تولید می‌کنند که بخشی از این نور برای رشد و نمو گیاه ضروری نیست. LEDهای تک رنگ نور را در طول موج‌های خاصی ساطع می‌کنند. نور تولیدی از لامپ‌های LED در کشت درون شیشه‌ای کارآمدتر از نور فلورسنت سفید تشخیص داده شده‌اند. LEDها دارای طول موج‌های خاصی هستند که می‌توان آن‌ها را متناسب با نیاز هر گیاه انتخاب کرد (Gupta and Jatothu, 2013). طول موج این لامپ‌ها با تاثیر بر گیرنده‌های نوری گیاه، مورفولوژی و ترکیب

[1] *Aracea*

متابولیت‌های گیاهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Bourget, 2008; Morrow, 2008). رنگدانه‌های گیاهی طول موج‌های قرمز (٦٠٠ تا ٧٠٠ نانومتر) را به خوبی جذب می‌کنند، که طیف ٦٦٠ نانومتر به پیک جذب کلروفیل نزدیک است، در حالی که ناحیه آبی شامل طیف مرئی (٤٠٠-٥٠٠ نانومتر) است (Matioc-Precup et al., 2012). نور قرمز و آبی بهترین طیف نوری برای هدایت متابولیسم فتوسنتزی هستند. در صورتیکه بخش سبز طیف نوری نقش چندانی در فتوسنتز ندارد (Johkan et al., 2012). علاوه بر این، کیفیت نور بر اثر بخشی بیولوژیکی تنظیم‌کننده‌های رشد اضافه‌شده به محیط کشت و همچنین تعادل هورمونی درون‌زا در بافت‌ها تأثیر می‌گذارد (Ding et al., 2011). بنابراین باززایی گیاهان علاوه بر ترکیبات محیط کشت به کیفیت نور نیز بستگی دارد. در این راستا پژوهش‌های مختلفی توسط پژوهشگران انجام شده است. در یکی از این آزمایش‌ها کاربرد لامپ‌های LED با طیف گسترده در ریزازدیادی چند گونه محبوب گیاه زینتی مورد بررسی قرار گرفت؛ نتایج نشان داد، در اکثر گونه‌های تیمار شده با نور قرمز یا قرمز دور، درصد تکثیر بالاتر یا هم‌سطح با لامپ‌های فلورسنت بود.(Miler et al., 2019). نتایج مطالعه ای بر کشت درون شیشه‌ای گیاه *Calanthe* نشان داد که مخلوط نور آبی و قرمز می تواند رشد گیاه را به طور موثری افزایش دهد؛ در حالی که نور قرمز همراه با نور قرمز دور، اثر بازدارندگی بر رشد گیاهچه نشان داد (Baque et al., 2011). در پژوهشی دیگر برای ریزازدیادی زامولیلیا از انواع قلمه‌های رویشی در محیط مایع (آب مقطر) و محیط کشت جامد با مواد مغذی استفاده شد، نتایج نشان داد که محل اتصال برگ به دمبرگ به عنوان بهترین محل برش و محیط کشت جامد با مواد مغذی موثرترین عوامل برای ریشه‌زایی بودند (Thongkham and Phavaphutanon, 2018). با توجه به موارد بیان شده هدف از این مطالعه مقایسه اثر نوع ریز نمونه، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نورهای LED روی مرحله استقرار، پرآوری و تکثیر گیاه زامولیلیا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی ریزنمونه‌ها: در این مطالعه برگ‌ها از گیاهان مادری نگهداری شده در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان زینتی، دانکشده کشاورزی، دانشگاه تبریز برش داده شد. ریزنمونه‌ها جهت ضدعفونی، پنج دقیقه در جریان آب جاری قرار داده شدند. پس از آن توسط محلول حاوی مایع ظرفشویی شسته شدند. بعد از این مرحله ریزنمونه‌ها پنج دقیقه توسط الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند. در پایان ریزنمونه‌ها به زیر هود لامینار انتقال و توسط آب مقطر استریل در سه مرحله و هر بار بمدت یک دقیقه شستشو داده شدند.

تهیه محیط کشت: برای کشت ریزنمونه‌ها از محیط کشت MS و MS ½ استفاده شد. هر شیشه دارای ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS یا MS ½ به همراه تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد BAP (۱و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بود. برای تهیه محیط کشت MS ½ یک لیتر محیط کشت MS را به دو قسمت مساوی ۵۰۰ میلی‌لیتری تقسیم کرده به هر یک ۰/۱ گرم در لیتر میواینوزیتول وزن شده و به محلول اضافه شد. برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر PVP (پلی‌وینیل پیرولیدون)[1] به محیط کشت اضافه گردید و بعد از اضافه کردن ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد، pH آن روی ۵/۸ تنظیم و در فشار ۱/۲ بار و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو شد. تمامی مواد تنظیم کننده رشد گیاهی و آگار از شرکت مرک[2] آلمان تهیه شدند.

[1] Polyvinylpyrrolidone

[2] Merck

شکل ۱: نوع ریز نمونه و کشت آن‌ها در محیط کشت پینه‌زایی (از چپ به راست، جفت برگچه‌ای، قسمت میانی برگچه با رگبرگ و قاعده برگچه)

کشت ریزنمونه: پس از ضد عفونی برگچه‌های میانی و انتهایی که به همراه دمبرگچه از گیاه زاموفیلیا جدا شدند، برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه هنگام برش از محلول استریل PVP (۰/۱ درصد) استفاده شد. سپس سه نوع ریزنمونه که شامل قاعده برگچه، قسمت میانی برگچه با رگبرگ و جفت برگچه‌ای برش داده شده و در محیط کشت MS حاوی ترکیبات BAP (۱و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. کشت‌ها جهت پینه‌زایی تحت شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. هر چهار هفته یک‌بار، تمامی ریزنمونه‌ها به محیط کشت مشابه باز کشت شدند. نوع ریز نمونه و کشت آن‌ها در محیط کشت پینه‌زایی در شکل ۱ نشان داده شده است.

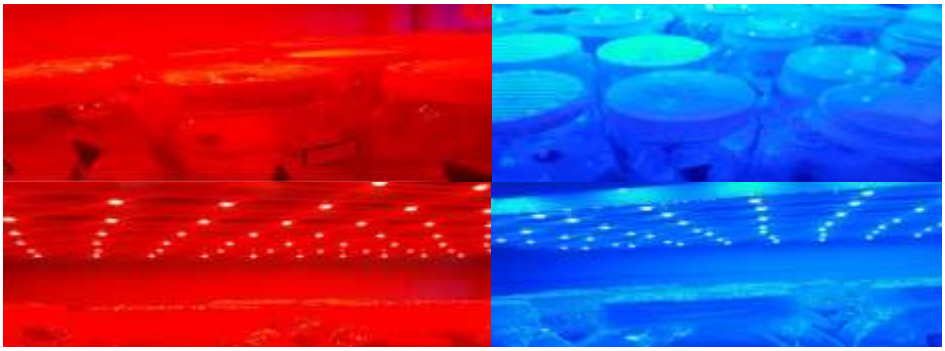
اعمال تیمار نوری و اندازه‌گیری صفات مورد نظر: پس از یک ماه، ریزنمونه‌ها به محیط کشت جدید منتقل شداند و تحت تیمار نورهای آبی (با طول موج ۴۰۰-۵۰۰ نانومتر) و قرمز (با طول موج ۶۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر) با شدت نوری ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود (شکل ۲). ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار در محیط مشابه و تازه زیر کشت و در هر نوبت قسمت‌های قهوه‌ای و سیاه رنگ از آن جدا شد. ارزیابی باززایی بعد از گذشت سه ماه انجام گرفت. در این مرحله ویژگی‌هایی مانند درصد تشکیل پروتوکورم و درصد پینه‌زایی اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری درصد تشکیل پروتوکورم و درصد پینه‌زایی به ترتیب از رابطه ۱ و ۲ استفاده شد و همچنین نوع باززایی (مستقیم یا غیر مستقیم)، محل ظهور پینه‌ها و پروتوکورم اندازه‌گیری شد.

رابطه ۱)

$$\text{درصد پینه‌زایی} = \frac{\text{تعداد ریز نمونه‌های پینه داده}}{\text{کل ریز نمونه‌های کشت شده در شیشه}} \times ۱۰۰$$

رابطه ۲)

$$\text{درصد تشکیل پروتوکورم} = \frac{\text{تعداد ریز نمونه تشکیل پروتوکورم داده}}{\text{کل ریز نمونه‌های کشت شده در شیشه}} \times ۱۰۰$$



شکل ۲: تصاویر اعمال تیمار نوری آبی و قرمز بر ریزنمونه‌ها

تجزیه آماری

این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با شش تکرار اجرا شد که فاکتور اول نور با دو سطح (آبی و قرمز)، فاکتور دوم غلظت NAA (با دو سطح) و فاکتور سوم غلظت BAP (با دو سطح) انتخاب شد. هر تکرار شامل شش شیشه و در هر شیشه پنج ریزنمونه قرار گرفت. پس از بررسی فرضیات تجزیه واریانس، تجزیه واریانس داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۹/۱ انجام و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. همچنین برای رسم شکل‌ها از نرم افزار اکسل نسخه ۱۶ استفاده شد.

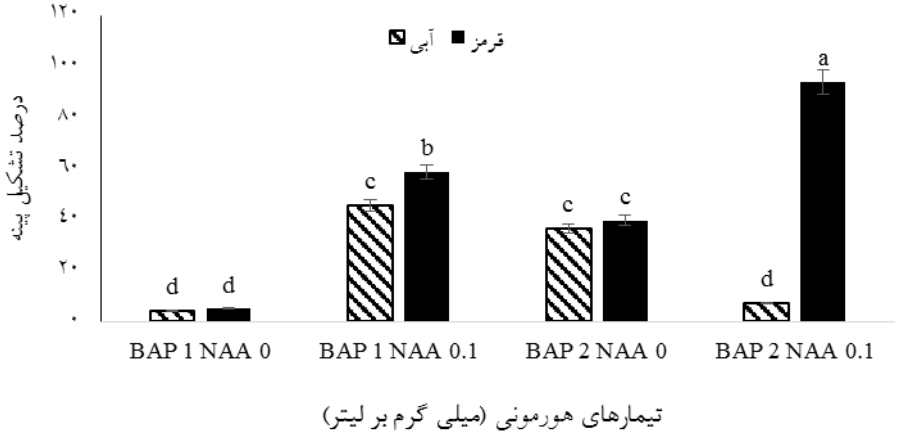
نتایج

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر نوع نور، NAA و اثر برهمکنش نور× BAP×NAA روی درصد پینه‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. درحالی که اثر BAP، اثر برهمکنش نور × BAP، اثر برهمکنش نور × NAA و همچنین اثر برهمکنش BAP×NAA بر درصد پینه‌زایی تاثیر معنی‌داری نشان نداد. اثر فاکتور نور در سطح احتمال پنج درصد و اثر BAP، NAA و اثر متقابل نور×BAP، نور×NAA، BAP×NAA، نور×BAP×NAA در سطح احتمال یک درصد بر تشکیل پروتوکورم معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس درصد تشکیل پروتوکورم و پینه‌زایی در فاکتورهای مورد مطالعه در ریزازدیادی گیاه زاموفیلیا از طریق ریز نمونه‌های برگی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تشکیل پروتوکورم	پینه‌زایی
نور	۱	۸۹/٤*	۱٤٦۲/٥**
BAP	۱	۱۲٤۲/۷**	۰/۲ns
NAA	۱	۱۰۷٥/۳**	٥۷۸**
نور×BAP	۱	۹۸٤/٥**	۱/٥ns
نور×NAA	۱	۱۱۸/۱**	۷۲**
NAA× BAP	۱	٤٦۲۰**	٦۹ns
نور×BAP × NAA	۱	۱٥۰٥/٦**	۹٦۹٥/۲**
اشتباه آزمایشی	۱٦	۱۳/۱	۲۱/٥

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

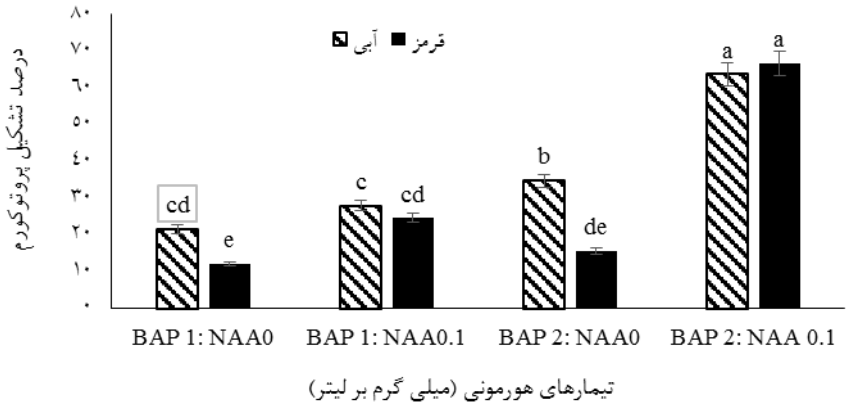


شکل ۳: متوسط درصد تشکیل پینه تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP در حضور نور آبی و قرمز در گیاه زاموفیلیا.

درصد پینه‌زایی: مقایسه میانگین (شکل ۳) نشان داد که بیشترین درصد پینه‌زایی حاصل از تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP تحت نور قرمز، ۹۳/۷۵ درصد بود؛ رتبه بعدی مربوط به تیمار ۰/۱ ملی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP در نور قرمز بود. پینه‌های تشکیل شده در شکل ٤ نشان داده شده است.

شکل ٤: تاثیر نور آبی و قرمز بر تشکیل پینه در گیاه زاموفیلیا، الف) پینه‌های تشکیل شده در تیمار۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA تحت نور قرمز ، ب) پینه‌های تشکیل شده در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر و BAP و ۰/۱میلی‌گرم بر لیتر NAA تحت نور آبی.

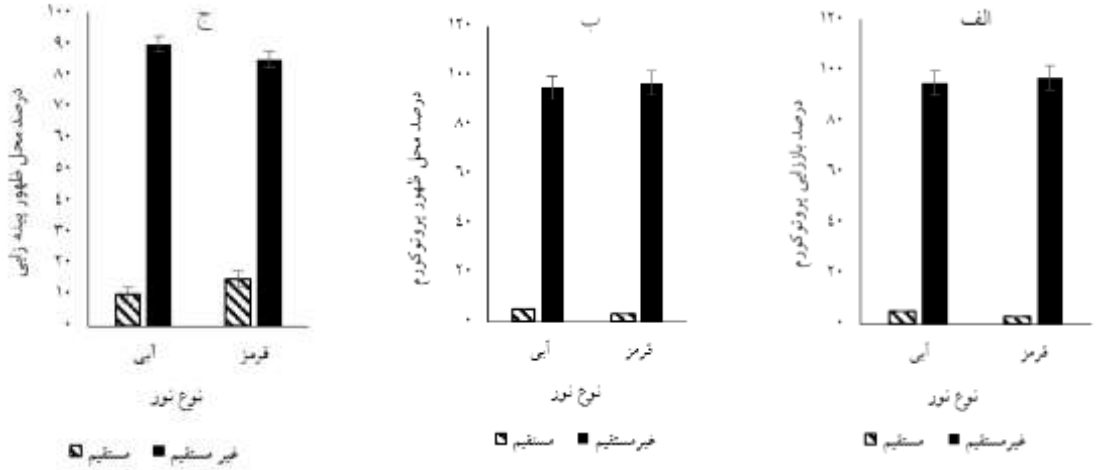
درصد تشکیل پروتوکورم: با توجه به شکل ۵، بین درصد تشکیل پروتوکورم در غلظت‌های متفاوت NAA در ترکیب با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و تحت کیفیت نور آبی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما با تغییر غلظت BAP به ۲ میلی‌گرم بر لیتر، تفاوت معنی‌داری در درصد تشکیل پروتوکورم مشاهده گردید. بیشترین تشکیل پروتوکورم (٦٦/٦٦٪) مربوط به تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA در نور قرمز بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار نور آبی (۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA٦٥٪/٦٣) نداشت. تشکیل پروتوکورم‌ها در گیاه زاموفیلیا تحت تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد و نور در شکل ٦ نشان داده شده است.



شکل ٥: متوسط درصد تشکیل پروتوکورم تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP در حضور نور آبی و قرمز در گیاه زاموفیلیا.

شکل ٦: تاثیر نور آبی و قرمز بر تشکیل پروتوکورم در گیاه زاموفیلیا، الف) پروتوکورم‌های تشکیل شده در تیمار۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA تحت نور آبی، ب) پروتوکورم‌های تشکیل شده در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱میلی‌گرم بر لیتر NAA تحت نور قرمز.

اثر کیفیت نور: در بررسی اثر نور بر پارامترهای باززایی (جدول ۲) در ریزنمونه‌های پاسخ داده در این آزمایش، تحت نور آبی، ۸۰ درصد و در نور قرمز ۹۰ درصد باززایی پروتوکورم به صورت غیر مستقیم بود و در مابقی موارد باززایی مستقیم مشاهده شد (شکل ۷ الف). همچنین تحت نور آبی، در ۹۵ درصد از موارد، و تحت نور قرمز ۹۷ درصد ظهور پروتوکورم از محل برش، و در دیگر موارد در اطراف محل برش مشاهده شد (شکل ۷ ب). تشکیل پینه، تحت نور آبی و قرمز، به ترتیب در ۹۰ درصد و ۸۵ درصد موارد از محل برش تشکیل شد (شکل ۷ ج). نحوه تشکیل پروتوکورم‌ها در شکل ۸ مشاهده می‌شود.

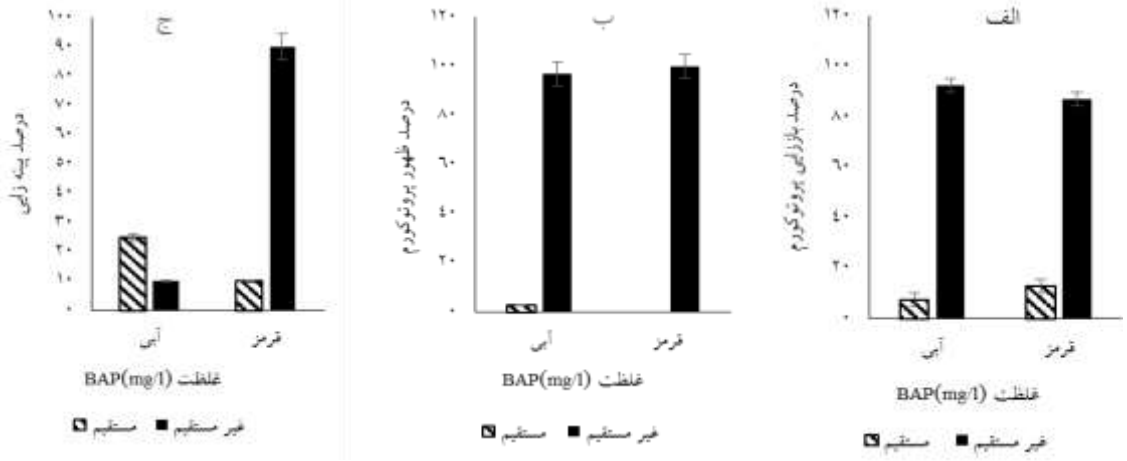


شکل ۷: الف) تاثیر نور بر نوع باززایی پروتوکورم: ب) تاثیر نوع نور بر محل ظهور پروتوکورم و ج) تاثیر نوع نور بر محل ظهور پینه در گیاه زاموفیلیا.

اثر غلظت BAP و NAA: نتایج (جدول ۳) نشان داد، با افزایش غلظت BAP از ۱ میلی‌گرم بر لیتر به ۲ میلی‌گرم بر لیتر، میزان باززایی غیر مستقیم پروتوکورم، کاهش یافته و باززایی مستقیم افزایش یافت. هر چند در هر دو غلظت BAP، میزان باززایی غیر مستقیم پروتوکورم بیشتر از باززایی مستقیم بود

(شکل ۹ الف). همچنین در سطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر از BAP، ۹۷ درصد پروتوکورم‌ها از محل برش ظاهر شدند و تنها ۳ درصد آن‌ها در اطراف محل برش تشکیل شدند؛ ولی با افزایش سطح BAP ۱۰۰ درصد پروتوکورم‌ها در محل برش تشکیل شدند (شکل ۹ ب). در سطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر از BAP، مقدار ۷۵ درصد پینه‌ها در محل برش، و ۲۵ درصد در اطراف تشکیل شد. با افزایش سطح BAP پینه‌های تشکیل شده در محل برش به ۹۰ درصد رسید و در اطراف تنها ۱۰ درصد پینه تشکیل شد (شکل ۹ ج).

شکل ۸: نحوه تشکیل پروتوکورم‌ها، الف) تشکیل غیر مستقیم پروتوکورم‌ها تحت نور آبی و نور قرمز. ب) تشکیل مستقیم پروتوکورم‌ها تحت نور آبی و نور قرمز.



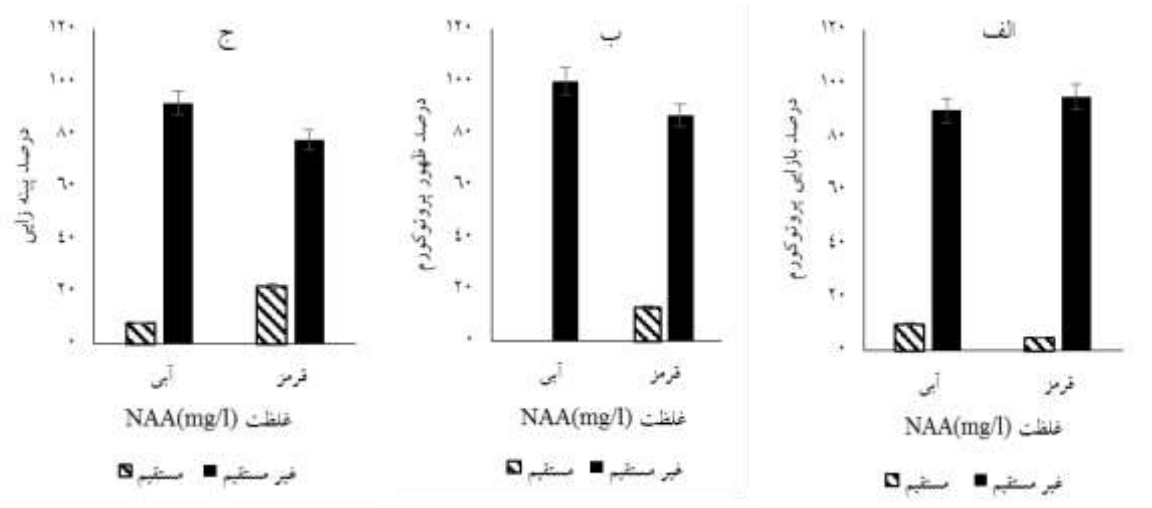
شکل ۹: الف) تاثیر غلظت BAP بر نوع باززایی پروتوکورم: ب) تاثیر نوع نور بر محل ظهور پروتوکورم و ج) تاثیر نوع نور بر محل ظهور پینه در گیاه زاموفیلیا

این وجود در هر دو حالت، میزان باززایی غیر مستقیم پروتوکورم بسیار بیشتر از باززایی مستقیم بود. (شکل ۱۰- الف). در نبود NAA، ۱۰۰ درصد پروتوکورم در محل برش ایجاد شد؛ و هنگامی که غلظت NAA محیط کشت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بود، این میزان به ۸۷ درصد کاهش یافت و در ۱۳ درصد

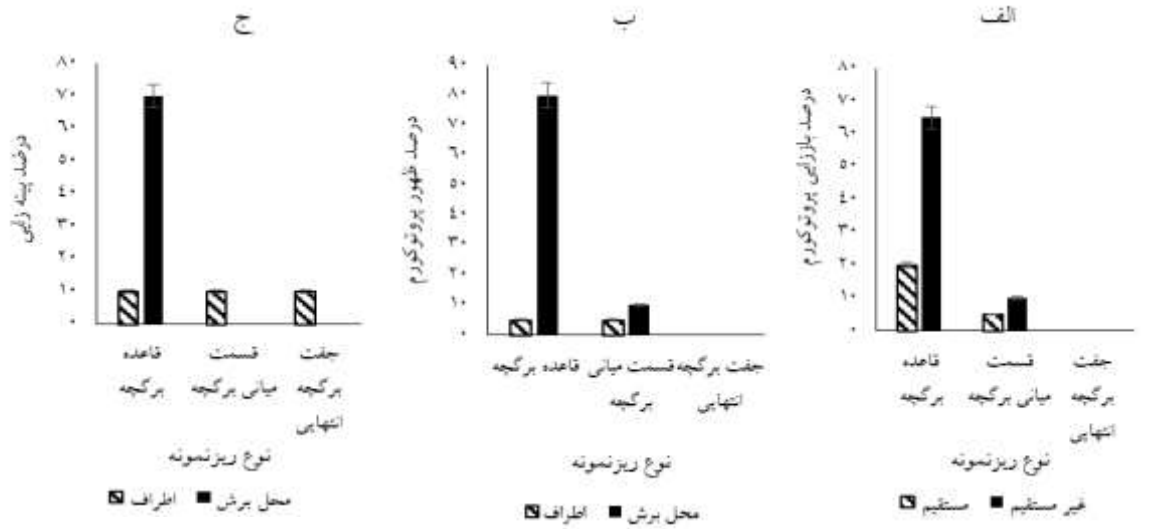
با توجه به نتایج شکل ۱۰، هنگامی که غلظت NAA در محیط کشت صفر بود، باززایی پروتوکورم در ۹۰ درصد موارد بصورت غیر مستقیم، و در ۱۰ موارد مستقیم بود؛ با افزودن ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA، میزان باززایی مستقیم ۵ درصد کاهش یافته، و باززایی غیر مستقیم به همان میزان افزایش یافت با

افزایش NAA به ترکیب محیط کشت، میزان پینه‌های تشکیل شده در محل برش ۷۸ درصد و در اطراف به ۲۲ درصد رسید (شکل ۱۰ ج).

موارد پروتوکورم در اطراف مشاهد شد (شکل ۱۰-ب). وقتی NAA درمحیط نبود، ۹۲ درصد پینه‌ها در محل برش و ۸ درصد در اطراف تشکیل شد؛ با



شکل ۱۰: الف) تاثیر غلظت NAA بر نوع باززایی پروتوکورم: ب) تاثیر نوع نور بر محل ظهور پروتوکورم و ج) تاثیر نوع نور بر محل ظهور پینه در گیاه زاموفیلیا.

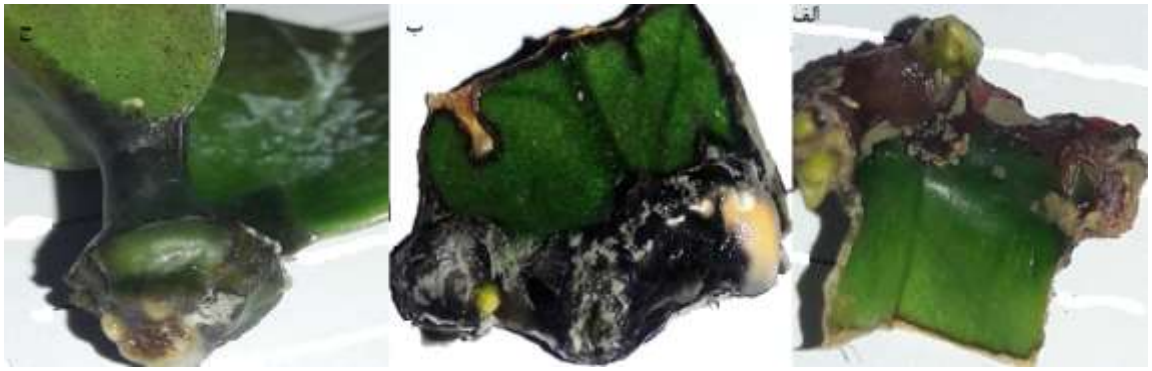


شکل ۱۱: الف) تاثیر نوع ریزنمونه بر نوع باززایی پروتوکورم: ب) تاثیر نوع نور بر محل ظهور پروتوکورم و ج) تاثیر نوع نور بر محل ظهور پینه در گیاه زاموفیلیا.

اثر نوع ریز نمونه برگی: در بررسی اثر نوع ریزنمونه بر ویژگی‌های باززایی، مشاهده شد که در ۲۵ درصد از کل ریزنمونه‌ها باززایی پروتوکورم در تیمار تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و نور قرمز، بصورت مستقیم بود که از این میزان

۲۰ درصد مربوط به ریزنمونه قاعده برگچه و ۵ درصد مربوط به ریزنمونه قسمت میانی برگچه با رگبرگ بود. در مجموع ۷۵ درصد باززایی غیرمستقیم مشاهده شد که ، ٦٥ درصد مربوط به ریزنمونه قاعده برگچه و ۱۰ درصد مربوط به ریزنمونه قسمت میانی برگچه با

رگبرگ بود و در ریزنمونه جفت برگچه‌ای هیچگونه باززایی مشاهده نشد (شکل ۱۱ الف) ۹۰ درصد پروتوکورم‌ها در محل برش تشکیل شدند که ۸۰ درصد پروتوکروم‌های تشکیل شده در محل برش، مربوط به ریزنمونه قاعده برگچه و ۱۰ درصد در ریزنمونه قسمت میانی برگچه با رگبرگ مشاهده شد. ۱۰ درصد از پروتوکورم‌ها در اطراف تشکیل شدند که سهم هر دو ریزنمونه قاعده برگچه و قسمت میانی برگچه از این میزان، ۵ درصد بود (شکل ۱۱ ب). ۹۰ درصد از پینه‌های به‌دست آمده از ریزنمونه‌ها، در محل برش تشکیل شدند که ۷۰ درصد آن‌ها از ریزنمونه قاعده برگچه حاصل شدند و ۲۰ درصد باقیمانده در ریزنمونه‌های قسمت میانی برگچه با رگبرگ و جفت برگچه‌ای به میزان مساوی مشاهده شدند (شکل ۱۱ج).



شکل ۱۲: تصاویر نوع ریزنمونه‌ها، الف) قاعده برگچه‌ها، ب) میانی برگچه با رگبرگ، ج) جفت برگچه‌ای

بحث

در پژوهش زمانیکه غلظت BAP ثابت و غلظت NAA صفر بود، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در درصد پینه‌زایی با تغییر تیمارهای نوری مشاهده نشد و با افزایش غلظت BAP از ۱ میلی‌گرم بر لیتر به ۲ میلی‌گرم بر لیتر، در هر دو نوع نور (آبی یا قرمز)، درصد پینه‌زایی نیز افزایش معنی‌داری نشان داد. با افزایش ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به محیط کشت، با غلظت ثابت BAP، درصد پینه‌زایی در ریزنمونه‌های تحت نور قرمز افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان تحت نور آبی نشان دادند. تحت نور آبی، کاهش درصد پینه‌زایی مشهود بود ولی تحت نور قرمز درصد پینه‌زایی با افزایش مواجه شد. به طور معمول القای پینه به حضور اکسین‌ها یا سیتوکین‌ها یا هر دو نیاز دارد. Skoog و Miler (۲۰۰٤) نشان دادند که نسبت اکسین به سیتوکینین در حد متعادل، موجب پینه‌زایی می‌شود. نتایج پژوهش‌ها نشان داد افزایش اکسین درونی باعث ایجاد فیتوهورمون اتیلن شده که آن نیز باعث تولید آبسزیک اسید (ABA) می‌شود (Gruenwald and Aenicke, 2000). آبسزیک اسید به عنوان مهارکننده رشد در گیاهان عمل می‌کند و به طور معمول به عنوان مهار رشد در کشت بافت گیاهان در نظر گرفته می‌شود (Taghizadeh et al., 2004) به نظر می‌رسد با توجه به تاثیر نور آبی بر افزایش اکسین درونی، کاهش درصد پینه‌زایی تحت تاثیر این تیمار قابل توجیه باشد. همچنین نور قرمز، سیتوکنین‌ها را افزایش داده و از طرفی باعث کاهش اکسین‌ها می‌شود که با توجه به نیاز به ایجاد تعادل بین اکسین وسیتوکینین برای پینه‌زایی، احتمالا به همین دلیل درصد پینه‌زایی در تیمار نور قرمز افزایش یافته است. نتایج پژوهش Le و Tanaka (۲۰۰٤) نشان داد که با کاهش درصد LEDهای قرمز همراه با افزایش درصد LEDهای آبی، تشکیل پینه در گیاه ارکیده کاهش می‌یابد و بالاترین القای پینه از بخش‌های پروتوکورم تحت ۱۰۰٪ LEDهای قرمز مشاهده شد که با نتایج ما همخوانی دارد. در پژوهشی

دیگر LEDهای قرمز برای تشکیل پینه از بخش‌های پروتوکورم ارکیده مناسب بودند (Tanaka, 2001). در پژوهشی دیگر Kadkade و Jopson (۱۹۷۸) گزارش کردند که نور قرمز فلورسنت با پهنای باند (۶۶۰ نانومتر) تولید پینه را از بافت جنین در صنوبر داگلاس (*Pseudotsuga menziesii*) افزایش می‌دهد. کیفیت نور مستقیماً بر موفقیت سیستم کشت بافت گیاهی تأثیر می‌گذارد. کنترل کیفیت نور و دانستن اینکه کدام قسمت (یا ترکیبات) از نواحی طیف در فرآیندهای مختلف دخیل هستند، امکان تولید گیاهان با ویژگی های مطلوب را فراهم می‌کند (Bantis et al. 2016). لامپ‌های فلورسانت که استفاده می‌شوند، معمولاً فاقد نور قرمز بسیار دور هستند که برای رشد گیاه از نظر افزایش طول ساقه و فعالیت فیتوکروم مهم است، در حالی که دارای نور سبز و زرد هستند که برای گیاهان کارایی کمتری دارند (تابش فعال فتوسنتزی ۳۰-۲۰٪ PAR = Shin et al. 2008). بنابراین، در مطالعه حاضر، از LEDهای دارای نور آبی و قرمز استفاده شد. بر اساس نتایج بدست آمده، BAP در تشکیل پروتوکورم موثر بوده است و طبق گزارشات، برخی قارچ‌های مایکوریز، سایتوکنین تولید می‌کنند و به نظر می‌رسد همین موضوع در طبیعت به تشکیل پروتوکورم کمک می‌کند (Bektas et al., 2013). نتایج اغلب پژوهش‌ها نشان داده است که نور آبی باعث افزایش اکسین درون‌زاد در گیاهان می‌شود (Liu, 2014) و نور قرمز باعث افزایش سیتوکنین‌ها و کاهش اکسین‌ها می‌شود (Economou, and Read.,1984; Finlayson et al., 2010; Morelli and Ruberti, 2000). در این آزمایش در تیمار نور آبی تعادل هورمونی بین اکسین و سیتوکینین برای القای پروتوکروم ضروری به نظر می‌رسد به طوری که با اضافه شدن NAA به غلظت‌های مختلف BAP درصد تشکیل پروتوکورم افزایش یافت در حالی که در تیمار نور قرمز با افزایش غلظت BAP، درصد تشکیل پروتوکورم افزایش یافت و در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشترین مقدار را نشان داد. در ارکیده شاپرکی (*Phalaenopsis*)، LEDهای آبی برای تشکیل پروتوکورم موثر بودند (Tanaka, 2001). در ارکیده در مقایسه با LEDهای آبی، LEDهای آبی با مقدار کمی نور LED قرمز در ۲۵٪ LED قرمز + ۷۵٪ LEDهای آبی مناسب ترین کیفیت برای بازسازی پروتوکورم از پینه بودند (Le, and Tanaka., 2004). برخی از محققین پیشنهاد کرده‌اند که گیرنده‌های نور در پاسخ به اثرات شرایط نوری مختلف بر رشد و نمو بافت گیاهی تکامل یافته‌اند (Bonnett, I 972؛ Seibert et al., 1975; Kaldenhoff et al., 1994; Burritt and Leung, 2003). دامزداه و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی که برای القا و تکثیر پروتوکورم‌ها از تکه‌های برگ ارکیده *Phalaenopsis bellina* در شرایط درون شیشه‌ای انجام دادند، بهترین پاسخ (۷۸٪ باززایی مستقیم) را از نمونه‌های برگ پس از ۱۶ هفته کشت در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون به دست آوردند؛ همچنین در آزمایش آن‌ها، بهترین درصد (۷۲٪) القا برای ترکیب اکسین: سایتوکنین، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون بود (Khoddamzadeh et al., 2011). با توجه به نتایج پژوهش ما به نظر می‌رسد نور LED، آبی و قرمز در تشکیل پروتوکورم زاموفیلیا موثراند. در مطالعه حاضر اثر کیفیت نور بر نوع باززایی پروتوکورم مشاهده شد که باززایی مستقیم در نور قرمز نسبت به نور آبی کاهش یافته ولی باززایی غیر مستقیم افزایش داشت؛ با این حال در هر دو کیفیت نور، درصد باززایی غیر مستقیم به مراتب بیشتر از باززایی مستقیم مشاهده شد. ظهور پروتوکورم در هر دو کیفیت نور، در محل برش بسیار بیشتر از اطراف اتفاق افتاد، درحالی که در نور قرمز نسبت به نور آبی، ظهور پروتوکورم در محل برش بیشتر بوده، ولی در اطراف کمتر از نور آبی بود، هر چند نور قرمز تشکیل پینه در اطراف را مقداری تقویت کرد، اما در هر دو

کیفیت نور قرمز و آبی، تشکیل پینه در محل برش بیشتر از اطراف مشاهده شد. در ارکیده شاپرکی (*Phalaenopsis*)، LEDهای آبی در باززایی مستقیم پروتوکورم موثر هستند (Tanaka., 2001). Weis و Jaffe (۱۹۶۹) دریافتند که نور آبی فلورسنت پیوسته و همچنین نور سفید باعث افزایش اندام‌زایی پینه تنباکو می‌شود، در حالی که نور قرمز و نور قرمز دور تقریباً هیچ تأثیری نداشتند. به طور مشابه، گزارش شده است که تشکیل شاخه از پینه توتون در ناحیه نور آبی فلورسنت افزایش یافت، در حالی که مناطق نور قرمز و قرمز دور شروع شاخه را تحریک نمی کنند (Fridborg, G., Eriksson,1975; Seibert et al., 1975). نتایج این پژوهش‌ها با نتایج به دست آمده از پژوهش ما همخوانی ندارد. به گفته Kaldenhoff و همکاران. (۱۹۹٤)، بازسازی گیاهچه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) با تابش نور آبی (٤۰۰-۵۰۰ نانومتر) افزایش یافت در حالی که نور قرمز (٦۰۰-۷۰۰ نانومتر) بی اثر بود. در ارکیده Cymbidium، نشان داده شد که در مقایسه با LEDهای آبی، LEDهای آبی با مقدار کمی نور LED قرمز در ۲۵ درصد LED قرمز + ۷۵ درصد LEDهای آبی مناسب ترین برای بازسازی پروتوکورم از پینه بودند. نتایج دیگر نشان می‌دهد که تحت شرایط نوری مختلف، دو گیرنده نوری، فیتوکروم و گیرنده نوری جذب کننده آبی، ممکن است بر القا و تکثیر پینه و همچنین تشکیل پروتوکورم‌ها از پینه ارکیده (Cymbidium) تأثیر بگذارند (Le and Tanaka., 2004). آنتونی و همکاران (۲۰۱٤) از مشاهدات بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)[1] استفاده کرد تا گزارش دهد که پروتوکورم‌ها می‌توانند از سطح زخمی یک ریزنمونه ایجاد شوند و به گیاهچه تبدیل شوند، زیرا پروتوکورم‌ها از چندین مرکز مریستمی تشکیل شده بنابراین می‌تواند به تدریج به شاخه، برگ و ریشه تمایز یابند. نتایج این پژوهش با گزارش‌های مختلف دیگری همسو است که نشان می‌دهد پروتوکورم‌ها می‌توانند از لایه‌های سلولی اپیدرمی تشکیل شوند (Kuo et al., 2005; Khoddamzadeh et al., 2011; Chen and Chang, 2004). Julkiflee و Uddain (۲۰۱٤) نشان دادند که محیط بدون تنظیم کننده‌های رشد می‌تواند تکثیر پروتوکورم را افزایش دهد. علاوه بر این، Ng و Saleh (۲۰۱۱) پیشنهاد کردند که محیط بدون تنظیم کننده‌های رشد می‌تواند باعث ایجاد پروتوکورم‌های ژنتیکی پایدار شود، که با نتایج ما مغایرت دارد چون با افزایش سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد افزایش در میزان پروتوکورم مشاهده کردیم. با این حال در کشت بافت، سیتوکینین‌ها گروهی از هورمون‌ها هستند که تقسیم سلولی را افزایش می‌دهند، به ویژه. BA به دلیل قیمت پایین و اثربخشی آن به طور گسترده برای تحقیقات کشت بافت استفاده می‌شود (George et al., 2008). Luo همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که ۵ میلی گرم در لیتر BAP بهترین تیمار برای القای پروتوکورم‌ها (۱۵ در هر ریزنمونه) بود. همچنین ۰/۵ میلی¬گرم در لیتر Kin برای تشکیل پروتوکورم نتیجه بخش بود. چندین مطالعه نشان داد که BAP برای تولید بیشترین تعداد پروتوکورم موثرتر است (Nayak et al 2002; Nagaraju et al., 2000.). BAP به علاوه NAA توسط برخی از محققان برای به دست آوردن حداکثر تعداد پروتوکورم‌ها پیشنهاد شده است بالاترین پروتوکورم‌ها در هر ریزنمونه (۵۰,٦۵) در ارکیده ماه (*Phalaenopsis amabilis var*). در محیط حاوی ۱۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به اضافه ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Bali Lashaki and Ghasemi Ghehsareh, ۲۰۱٦). نتایج Kalimuthu و همکاران (۲۰۰۷) بر روی ارکیده Oncidium sp. نشان داد که بیشترین باززایی پروتوکورم مربوط به تیمار BA در غلظت ۰/۲ میلی-گرم در لیتر بود که با افزایش غلظت BA باززایی

[1] Scanning Electron Microscope

پروتوکورم کاهش یافت. در آزمایش Papafotiou و Martini (۲۰۰۹) نیز در ریزازدیادی زامونیلیا، نمونه‌های تهیه شده از قاعده برگ، در همه انواع ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد، بیشترین پاسخ‌های مورفولوژیکی را نشان دادند.

نتیجه‌گیری نهایی

بررسی منابع موجود نشان داده است که تاکنون تحقیقاتی در زمینه اثر کیفیت نور LED بر ریزازدیادی گیاه زامونیلیا انجام نگرفته است. در این پژوهش ریزنمونه تهیه شده از قاعده برگچه در مقایسه با دو ریزنمونه دیگر پاسخ‌دهی بهتری نشان داد. پینه‌زایی و ایجاد پروتوکورم در این ریزنمونه بیشتر مشاهده شد. نور LED قرمز در مقایسه با نور آبی، همواره پینه‌زایی بیشتری ایجاد کرد و نور آبی تاثیر مثبتی بر تشکیل پروتوکورم داشت. بیشترین نوع باززایی پروتوکورم بصورت غیر مستقیم بود، هرچند نور آبی موجب افزایش نسبی باززایی مستقیم شد. افزایش غلظت BAP نیز تاثیر مشابه داشت، ولی با اضافه شدن NAA، بر میزان باززایی غیر مستقیم افزوده شد. بیشترین پروتوکورم، در محل برش مشاهده شد که نور و BAP تاثیر چندانی بر ان نداشتند، وجود NAA در محیط کشت باعث ایجاد پروتوکورم در اطراف شد. پینه بیشتر در محل برش تشکیل شد که افزایش غلظت BAP تشکیل پینه در محل برش و وجود NAA تشکیل پینه در اطراف را تقویت کرد. بهترین ترکیب هورمونی و کیفیت نور برای تشکیل پینه و پروتوکورم ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و نور قرمز بود. در نهایت، نتایج ما نشان می‌دهد که LED ها می‌توانند برای بهبود کشت پینه و تشکیل پروتوکورم از پینه در زامونیلیا استفاده شوند. با پیشرفت‌های بیشتر، منطقی است که انتظار داشته باشیم که سیستم‌های تابش LED می‌توانند برای تکثیر ریز زامونیلیا در آینده مورد استفاده قرار گیرند بنابراین پیشنهاد می‌شود درپژوهش‌های آینده اثر متقابل دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد و LED های دیگر بر استقرار و پرآوری زامونیلیا مورد بررسی قرار گیرد همچنین استفاده از ریزوم بعنوان ریزنمونه در ریزازدیادی گیاه زامونیلیا می‌تواند موثر باشد

References

Antony, J. J., Sundarasekar, J., Rathinam, X., Subramaniam, S. and Marimuthu, K. (2014). Microscopical Analysis Of In Vitro Mokara Broga Giant Orchid. Emirates Journal of Food and Agriculture. 26: 73-81.

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.

Bantis, F., Ouzounis, T. and Radoglou, K. (2016). Artificial LED lighting enhances growth characteristics and total phenolic content of *Ocimum basilicum*, but variably affects transplant success. Scientia Horticulturae, 198: 277-283.

Baque, M. A., Shin, Y. K., Elshmari, T., Lee, E. J. and Paek, K. Y. (2011). Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of Calanthe hybrids ('Bukduseong'×'Hyesung'and'Chunkwang'×'Hyesung'). Australian Journal of Crop Science, 5(10): 1247-1254.

Bektas, E., Cuce, M. and Sokmen, A. (2013). In vitro germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. Turkish Journal of Botany, 37(2):336-342.

Bonnett, H. T. (1972). Phytochrome regulation of endogenous bud development in root cultures of *Convolvulus arvensis*. Planta, 106(4): 325-330.

Bourget, C.M. (2008). An introduction to light-emitting diodes. HortScience. 43: 1944–1946.

Burritt, D. J. and Leung, D. W. (2003). Adventitious shoot regeneration from *Begonia*× *erythrophylla* petiole sections is developmentally sensitive to light quality. Physiologia Plantarum, 118(2): 289-296.

Chen, J. T. and Chang, W. C. (2004). TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of Oncidium. Plant cell, tissue and organ culture. 79: 315-320.

Chen, Y. C., Chang, C. and Lin, H. L. (2020). Topolins and red light improve the micropropagation efficiency of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)'Tainung . Hortscience. 55(8): 1337-1344.

Ding, Z., Galván-Ampudia, C. S., Demarsy, E., Łangowski, Ł., Kleine-Vehn, J., Fan, Y. and Friml, J. (2011). Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis. Nature Cell Biology. 13(4): 447-452.

Economou, A. S. and Read, P. E. (1986). Effect of red and far-red light on azalea microcutting production in vitro and rooting in vivo. In Proceedings of 6th International Congress Plant Tissue and Cell Culture, 431.

Feng, C. T., Ho, W. C. and Chao, Y. C. (2006). Basal petiole rot and plant kill of *Zamioculcas zamiifolia* caused by Phytophthora nicotianae. Plant Disease. 90(8): 1107-1107.

Finlayson, S. A., Krishnareddy, S. R., Kebrom, T. H. and Casal, J. J. (2010). Phytochrome regulation of branching in Arabidopsis. Plant Physiology, 152(4):1914-1927.

Folta, K. M., and Maruhnich, S. A. (2007). Green light: a signal to slow down or stop. Journal of Experimental Botany. 58(12): 3099-3111.

Fridborg, G, and Eriksson, T. (1975). Partial Reversal by Cytokinin and (2- Chloroethyl)- Trimethylammonium Chloride of Near- Ultraviolet Inhibited Growth and Morphogenesis in Callus Cultures. Physiologia Plantarum. 34(2): 162-166.

George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (2008). Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. Springer, Wageningen, The Netherlands.growth and development of Sabah's endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. AsPac. Journal of Molecular Biology. 7: 211–220.

Gruenwald, B. and Aenicke, C. (2000). Aenicke. PDR for herbal medicine. 2th edition. Medical economics Co. montvale New Jersey. 729-31.

Gupta, S. D. and Jatothu, B. (2013). Biotechnol. growth and morphogenesis. Plant Biotechnology Reports. 7(3): 211-220.

Johkan, M., Shoji, K., Goto, F., Hahida, S. N. and Yoshihara, T. (2012). Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. Environmental and Experimental Botany. 75: 128-133.

Julkiflee, A. L. and Uddain, J. (2014). Efficient micropropagation of *Dendrobium sonia*-28 for rapid PLBs proliferation. Emirates Journal of Food and Agriculture.26(6): 545-551.

Kadkade, P. G. and Jopson, H. (1978). Influence of light quality on organogenesis from the embryo-derived callus of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). Plant Science Letters. 13(1): 67-73.

Kaldenhoff, R., Henningsen, U. and Richter, G. (1994). Gene activation in suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana* during blue-light-dependent plantlet regeneration. Planta. 195(2): 182-187.

Kalimuthu, K., Senthilkumar, R. and Vijayakumar, S. (2007). In vitro micropropagation of orchid, *Oncidium* sp.(Dancing Dolls). African Journal of Biotechnology, 6(10):106-112.

Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. R., Kadir, M. A., Kadzimin, S. B., Mahmood, M., and Sreeramanan, S. (2011). In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson. Plant Growth Regulation. 65: 381-387.

Kuo, H. L., Chen, J. T. and Chang, W. C. (2005). Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 41: 453-456.

Le, V. T. and Tanaka, M. (2004). Effects of red and blue light-emitting diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in *Cymbidium orchid*. Environment Control in Biology. 42(1): 57-64.

Liu, M., Xu, Z., Guo, S., Tang, C., Liu, X. and Jao, X. (2014). Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets in vitro under different light spectra. Scientia Horticulturae. 174: 112-118.

Lopez, R. G., Blanchard, M. G. and Runkle, E. S. (2007). Propagation and production of *Zamioculcas zamiifolia*. In VI International Symposium on New Floricultural Crops. 813:559-564.

Luo, J. P., Wang, Y., Zha, X. Q. and Huang, L. (2008). Micropropagation of Dendrobium densiflorum Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 93: 333-340.

Matioc-Precup, M. M. and Cachita-Cosma, D. (2012). The germination and growth of *Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra plantlets under the influence of colored light of different provenance. Studia Universitatis" Vasile Goldis" Arad. Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series). 22(2): 193.

Mehbub, H., Akter, A., Akter, M., Mandal, M. S. H., Hoque, M., Tuleja, M. and Mehraj, H. (2022). Tissue Culture in Ornamentals: Cultivation Factors, Propagation Techniques, and Its Application. Plants. 11(23): 3208.

Miler, N., Kulus, D., Woźny, A., Rymarz, D., Hajzer, M., Wierzbowski, K. and Szeffs, L. (2019). Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: A study on plant quality and cost reduction. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 55: 99-108.

Morelli, G. and Ruberti, I. (2000). Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. Plant physiology.122(3): 621-626.

Morrow, R. C. (2008). LED lighting in horticulture. HortScience. 43(7): 1947-1950.

Murdad, R., Latip, M. A., Aziz, Z. A. and Ripin, R. (2007). Effects of carbon source and potato homogenate on in vitro growth and development of Sabah's Endangered orchid: *Phalaenopsis gigantea*. In Proceedings Asia Pacific Conference on Plant Tissue and Agribiotechnology (APaCPA). 18(1):197-200.

Nagaraju, V., Das, S. P., Bhutia, P. C. and Upadhyaya, R. C. (2003). Response of *Cymbidium lunavian* Atlas protocorms to media and benzyl amino purine. Indian Journal of Horticulture. 60(1): 98-103.

Nayak, N. R., Sahoo, S., Patnaik, S. and Rath, S. P. (2002). Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl.(Orchidaceae). Scientia Horticulturae. 94(1-2): 107-116.

Ng, C. Y., and Saleh, N. M. (2011). In vitro propagation of *Paphiopedilum orchid* through formation of protocorm-like bodies. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 105: 193-202.

Ni, K. (2015). *Zamioculcas zamiifolia* plant tissue culture method. Anhui Agricultural Science Bulletin 10(6): 56-63.

Papafotiou, M., and Martini, A. N. (2009). Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl.(ZZ). Scientia Horticulturae. 120(1): 115-120.

Saebo, A., Krekling, T., and Appelgren, M. (1995). Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 41: 177-185.

Sayadi Nejad, M., and Sadeghi, S. M. (2019). Optimization of callus production and regeneration of zamiifolia (*Zamioculcas zamiifolia*). Journal of Horticultural Science. 33(3): 405-415.

Seibert, M., Wetherbee, P. J. and Job, D. D. (1975). The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. Plant Physiology. 56(1): 130-139.

Shin, K. S., Murthy, H. N., Heo, J. W., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2008). The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured Doritaenopsis plants. Acta Physiologiae Plantarum. 30: 339-343.

Skoog, F. and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. Society for Experimental Biology. 11: 118-131.

Taghizadeh, M., Ahvazi, M. and Naghinezhad, A. (2004). Determination of growth and distribution of *Centella asiatica* in the Anzali lagoon.

Tanaka, M. (2001). Morphogenesis in the PLB segments of Phalaenopsis cultured under LED irradiation system. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 70(1): 306.

Thongkham, L. and Phavaphutanon, L. (2018). Effect of position and size of leaflets on rooting and rhizome formation of ZZ plant (*Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl.) leaflet cuttings. Agriculture and Natural Resources. 52(3): 246-249.

Vanzie-Canton, S. D. and Leonhardt, K. W. (2007). In vitro callus induction and plantlet regeneration protocol developed for the oryzalin treatment of *Zamioculcas zamiifolia* (lodd.) Engl.(araceae). In VI International Symposium on New Floricultural Crops. 813: 201-208.

Weis, J. S. and Jaffe, M. J. (1969). Photoenhancement by blue light of organogenesis in tobacco pith cultures. Physiologia Plantarum. 22(1): 171-176.