Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Evaluation of the Effect of *Moringa Oleifera* L. Medicinal Plant Extract and Zeatin on In vitro Culture of Phalaenopsis Orchid Plant

Zahra Mirsaberi

M.S. Student, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran. E-mail address: mirsaberi80@gmail.com

Mojgan Soleimanizadeh

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran. E-mail address: m.soleimanizadeh@hormozgan.ac.ir

Abbas Yadollahi

Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail address: yadollahiabbas@gmail.com

Abstract

Objective

Phalaenopsis orchid is known as the most popular orchid species in the horticulture industry due to its large, colorful and durable flowers, as well as its high adaptability, and it has a high economic value in international flower markets. Plant tissue culture technology has been widely used for rapid and high-scale propagation of this species. Moringa leaf is rich in natural cytokine hormones (zeatin), ascorbic acid and minerals such as calcium, potassium and iron, which can support Phalaenopsis orchid in vitro culture. Therefore, the purpose of this research is to evaluate the effect of *Moringa oleifera* L. and zeatin extract on the in vitro growth of Phalaenopsis orchid.

Materials and methods

In order to carry out this research, after preparing Moringa medicinal plant extracts, different concentrations of plant extract and zeatin hormone were prepared and will be applied on Phalaenopsis orchid cultivation medium. After measuring the measured traits (including number of leaves, number of roots, leaf length, root length, seedling height, percentage of live, infected and browned seedlings), data analysis was done.

Results

The results showed that leaves were formed on some flowering stems after about two months. The contamination percentage of explants reached zero by the fourth disinfection treatment (S4). In this sterilization method, the combination of benomyl fungicide and mercury chloride was used, and contamination was removed by using these substances. Also, the highest rate of regeneration was observed in the fourth disinfection method and the vertical orientation of the explant (S4D2). The addition of 150 mg/liter of moringa leaf extract and 1.5 mg/liter of zeatin increased the number of leaves. Moringa leaf extract significantly increased root number, leaf length, root length and fresh and dry weight of seedlings and antioxidant activity. Moringa treatment with different concentrations reduced the percentage of orchid seedlings contamination to zero. Also, the application of moringa prevented the browning of the seedling.

Conclusions

In general, the treatment of moringa leaf extract with a concentration of 150 mg/L is suggested as an alternative to zeatin hormone in tissue culture of orchids and other ornamental plants.
Keywords: Tissue culture technology, *Moringa Oleifera* L., Phalaenopsis Orchid, Plant Extract, Zeatin

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mirsaberi Z, B, Soleimanizadeh M, Yadollahi A (2024) Evaluation of the effect of *Moringa Oleifera* L. medicinal plant extract and zeatin on in vitro culture of phalaenopsis orchid plant. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (4), 1-32.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (4), 1-32. DOI: 10.22103/jab.2024.23849.1585

Received: July 22, 2024. Received in revised form: August 31, 2024.

Accepted: September 01, 2024. Published online: December 30, 2024.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.
© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران

ارزیابی تاثیر عصاره گیاه دارویی مورینگا اولیفرا (*Moringa oleifera* L.) و زآتین بر کشت درون شیشه‌ای گیاه ارکیده فالانوپسیس

زهرا میرصابری

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

رایانامه: mirsaberi80@gmail.com

مژگان سلیمانی زاده

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

رایانامه: m.soleimanizadeh@hormozgan.ac.ir

عباس یداللهی

دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ، ایران. رایانامه: yadollahiabbas@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۱

چکیده

هدف: ارکیده فالانوپسیس به‌دلیل گل‌های بزرگ، رنگارنگ و بادوام و همچنین سازگاری بالا به‌عنوان محبوب‌ترین جنس ارکیده در صنعت باغبانی شناخته شده و در بازارهای بین‌المللی گل از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار می‌باشد. تکنولوژی کشت بافت گیاهی به‌طور گسترده‌ای برای تکثیر سریع و در مقیاس بالا این گونه به‌کار گرفته شده است. برگ مورینگا سرشار از هورمون‌های سیتوکین طبیعی (زآتین)، اسید اسکوربیک و مواد معدنی مانند کلسیم، پتاسیم و آهن است که می‌تواند از رشد درون شیشه‌ای گیاه ارکیده فالانوپسیس حمایت کند. لذا هدف از این تحقیق ارزیابی تاثیر عصاره گیاه دارویی مورینگا اولیفرا و زآتین بر رشد درون شیشه‌ای گیاه ارکیده فالانوپسیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور اجرای این پژوهش، ابتدا ساقه گلدهنده تهیه و برای تشکیل گیاهچه نهایی استفاده شد. پس از تهیه عصاره گیاه مورینگا، غلظت‌های مختلف از عصاره گیاهی و هورمون زآتین تهیه و در محیط کشت گیاه ارکیده فالانوپسیس اعمال شد. پس از اندازه‌گیری صفات تعداد برگ، تعداد ریشه، طول برگ، طول ریشه، ارتفاع گیاهچه، درصد گیاهچه های زنده، آلوده و قهوه‌ای شده تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که پس از حدود دو ماه روی برخی ساقه‌های گل‌دهنده برگ تشکیل شد. درصد آلودگی ریزنمونه‌ها توسط تیمار چهارم ضدعفونی (S_4) به صفر رسید. در این روش استریل‌سازی از ترکیب قارچ کش بنومیل و کلرید جیوه استفاده شد که با کاربرد این مواد آلودگی حذف گردید. همچنین بالاترین میزان باززایی در روش چهارم ضدعفونی و جهت عمودی ریزنمونه (S_4D_2) مشاهده شد. افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا و زاتین ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش تعداد برگ شد. عصاره برگ مورینگا به‌طور معنی‌داری سبب افزایش تعداد ریشه، طول برگ، طول ریشه و وزن تر و خشک گیاهچه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد. تیمار مورینگا با غلظت‌های مختلف درصد آلودگی گیاهچه‌های ارکیده را به صفر رساند. همچنین کاربرد مورینگا از قهوه‌ای شدن گیاهچه جلوگیری کرد.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی، تیمار عصاره برگ مورینگا با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر در کشت بافت ارکیده به‌عنوان جایگزینی برای هورمون زآتین پیشنهاد می‌شود..

کلیدواژه‌ها: کشت درون شیشه‌ای، عصاره گیاهی، مورینگا اولیفرا، زآتین، ارکیده فالانونوپسیس.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: میرصابری زهرا، سلیمانی زاده مژگان، یداللهی عباس (۱۴۰۳) ارزیابی تاثیر عصاره گیاه دارویی مورینگا اولیفرا (*Moringa oleifera* L.) و زآتین بر کشت درون شیشه‌ای گیاه ارکیده فالانوپسیس. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۴)، ۱-۳۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

خانواده ثعلب یا ارکیده (Orchidaceae) بزرگترین و متنوع‌ترین خانواده گیاهان گلدار است که از بیش از ۲۵۰۰۰ گونه در بیش از ۸۵۰ جنس تشکیل شده است. ریخت شناسی، ساختار و فیزیولوژی تخصصی گل آن‌ها از زمان‌های قدیم مردم را مجذوب خود کرده است و آن‌ها را به یکی از محبوب‌ترین گیاهان گلدار در سراسر جهان تبدیل کرده است (Yonzone et al. 2012). آن‌ها در انواع زیستگاه‌ها به‌جز سیستم‌های آبی رشد می‌کنند و در رویشگاه رشد آن‌ها ممکن است به‌شکل زمینی، اپی‌فیت یا ساپروفیت باشد. بیشتر ارکیده‌ها ماهیتی اپی‌فیتی دارند، در حالی که بقیه زمینی هستند. اگرچه ارکیده‌ها عمدتاً برای کاربردهای زینتی پرورش می‌یابند، اما برخی از آن‌ها به‌عنوان داروهای گیاهی و غذا استفاده می‌شود. جمعیت وحشی ارکیده‌ها می‌توانند از طریق تولید مثل جنسی (بذر) یا تولید مثل غیر جنسی (تکثیر رویشی) تکثیر شوند. بهرحال، تکثیر رویشی بسیار کند است و با وجود میلیون‌ها بذر تولید شده در هر کپسول، تنها تعداد کمی از آن‌ها جوانه می‌زنند. بذرها فاقد لپه و آندوسپرم هستند و ذخایر غذایی کافی و مورد نیاز برای

جوانه‌زنی در دسترس ندارند. همزیستی بذر ارکیده با قارچ مناسب برای جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه آن ضروری است (Bhatti & Thakur 2022). جمع‌آوری جمعیت وحشی به‌عنوان منبع ذخیره‌سازی برای تجارت‌های مختلف اجتماعی–اقتصادی به‌جای تکثیر تجاری آن‌ها، تهدیدی جدی برای بسیاری از کشورها است. تکثیر کم جمعیت وحشی و استفاده گسترده در صنایع گل و سایر صنایع منجر به کاهش جمعیت بسیاری از گونه‌ها شده و برخی از آن‌ها در آستانه انقراض هستند. در سال‌های اخیر روش‌های تکثیر درون شیشه‌ای برای کاهش فشار جمع‌آوری بر جمعیت وحشی استفاده شده است. علاوه بر جوانه‌زنی بذرهای غیر همزیست، ارکیده‌ها از طریق ریزنمونه‌هایی مانند برگ‌ها، ریزوم ریشه، مریستم شاخساره، جوانه‌های جانبی، اجسام پروتوکورم مانند (PLBs[1]) و غیره باززایی می‌شوند (Park et al. 2018). ارکیده‌های فالانوپسیس به‌دلیل گل‌های بزرگ، رنگارنگ و بادوام و همچنین سازگاری بالا به‌عنوان محبوب‌ترین جنس ارکیده در صنعت باغبانی شناخته می‌شوند. این ارکیده هم به‌عنوان گل شاخه بریده و هم به‌عنوان گیاه گلدانی در بازارهای بین‌المللی گل از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار است (Zahara et al. 2017). داده‌های آماری کشور هلند نشان می‌دهد بازار فروش فالانوپسیس از ۵ به ۶۶ درصد در سال ۱۹۸۳ تا ۱۹۹۴ افزایش یافت. بسیاری از کشورها مانند آلمان، هلند، ایالات متحده، چین، ژاپن و تایوان به‌صورت تجاری و در مقیاس بال فالانوپسیس را کشت می‌دهند و تایوان در تولید جهانی رتبه اول را دارد (Hsu et al., 2022). تکثیر ارکیده به‌عنوان یک گیاه مونوپودیال[2] با استفاده از روش‌های رویشی سنتی (قلمه یا تقسیم شاخه) به‌دلیل سرعت تکثیر پایین، یکنواخت نبودن خصوصیات گیاهچه و غیره مشکل می‌باشد؛ لذا برای تولید در مقیاس بالا مناسب نمی‌باشند. برای گلدهی در شرایط گلخانه‌ای حداقل به سه سال زمان نیاز دارد که یکی از مشکلات اساسی در تولید تجاری می‌باشد (Darras 2020). تکنیک کشت بافت به‌طور گسترده برای تکثیر سریع و در مقیاس بالا این گونه به‌کار گرفته شده است. ریزازدیادی شامل تکثیر درون شیشه‌ای مواد گیاهی در شرایط استریل در یک محیط کشت است که حاوی مواد معدنی، ویتامین‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه و همچنین مکمل‌های لازم برای تکثیر، رشد و نمو مناسب گیاهان است. محیط کشت با توجه به گونه یا ژنوتیپ مورد استفاده و همچنین برای مراحل مختلف ریزازدیادی (مانند تکثیر ساقه یا ریشه‌دهی) ممکن است متفاوت باشد. برای تکثیر درون شیشه‌ای ارکیده‌ها، چندین محیط کشت با موفقیت به‌کار گرفته شده است. از جمله محیط کشت MS[3] که یکی از پرکاربردترین محیط‌های کشت برای مراحل مختلف ریزازدیادی می باشد. محیط کشت VW[4] همچنین به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است و مزایایی را برای تولید PLBها نشان می‌دهد که وسیله‌ای برای تکثیر کلونال ارکیده‌ها فراهم می‌کند (Cardoso et al. 2020). موفقیت کشت بافت گیاهی در تکثیر ارکیده تا حد زیادی تحت تأثیر وجود تنظیم‌کننده رشد و اجزای تغذیه‌ای استفاده شده در محیط است. محیط مورد استفاده برای کشت بافت ارکیده به‌طور کلی دارای نمک‌های معدنی، ویتامین‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد و آب است. علاوه بر این، منبع کربن به‌شکل کربوهیدرات (قند) یکی دیگر از اجزای ضروری در محیط کشت است که می‌تواند

[1] Protocorm-like bodies
[2] Monopodial
[3] Murashige and Skoog
[4] Vacin and Went

بر رشد گیاهان نیز تأثیر بگذارد (Zahara et al. 2017). تنظیم‌کننده‌های رشد که معمولاً در کشت بافت استفاده می‌شوند اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها هستند (Schäfer et al. 2015). سیتوکنین‌ها هورمون‌های گیاهی هستند که برای تنظیم تقسیم سلولی، تشکیل اندام‌ها، بزرگ شدن سلول‌ها و اندام‌ها، جلوگیری از آسیب کلروفیل، تشکیل کلروپلاست، باز و بسته شدن روزنه‌ها و رشد شاخساره‌ها موثر می‌باشند و پرمصرف‌ترین آن‌ها در کشت بافت زآتین و ۶ بنزیل آمینو پورین (BAP) هستند (Ružić & Vujović 2008). برگ مورینگا دارای غلظت بالایی از زآتین بین ۲۰۰–۵ میکروگرم بر گرم برگ است (Mardiana & Sumarji 2021). گیاه *Moringa oleifera* L. گسترده‌ترین گونه کشت شده از جنس Moringa در خانواده Moringaceae می‌باشد. گیاهان مورینگا درختچه‌هایی هستند که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌توانند به ارتفاع ۷–۱۱ متر رشد کنند. بومی کوه‌های هیمالیا در شمال هند است. امروزه برای اهداف مختلف در کل مناطق گرمسیری و مناطق نیمه گرمسیری جهان کشت می‌شود. کشت و استفاده آن در جنوب شرق آسیا، غرب آسیا، شبه جزیره عربستان، شرق و غرب آفریقا، هند غربی و فلوریدا جنوبی، آمریکای مرکزی و جنوبی و غیره شتاب یافته است (Mamo et al. 2024). از نظر ریخت‌شناسی، گیاهان دارای ساقه‌های چوبی، صاف، سفید کثیف، پوست نازک، سطح ناصاف، انشعاب سیمپودیال، شاخه‌های عمودی یا مورب هستند، تمایل به رشد مستقیم و کشیده دارند. این گیاه بسیار مغذی است و کاربردهای بالقوه مختلفی دارد. دارای ترکیبات فعال زیستی مانند اسیدهای آمینه، پرولین، فلاونوئید، اسید اسکوربیک، فنولیک‌ها، کاروتنوئیدها، ویتامین A همراه با مواد مغذی ضروری دیگر می‌باشد. برگ‌های گیاهان مورینگا سرشار از هورمون‌های سیتوکین طبیعی، به‌ویژه زآتین هستند که مقدار آن چندین هزار برابر بیشتر از محتوای زآتین سایر گیاهان است. علاوه بر این، عصاره برگ مورینگا همچنین حاوی اسید اسکوربیک و مواد معدنی مانند کلسیم، پتاسیم و آهن است که می‌تواند از رشد درون شیشه‌ای گیاه ارکیده فالانوپسیس حمایت کند (Arif et al. 2024). هدف از این تحقیق ارزیابی مقایسه‌ای عصاره گیاه دارویی *Moringa oleifera* L. و زآتین بر کشت درون شیشه‌ای گیاه ارکیده فالانوپسیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مکان آزمایش: این تحقیق در شرکت نهال گستر رویان و دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان اجرا شد.

تهیه مواد محیط کشت و مواد گیاهی: مواد شیمیایی، هورمون‌های گیاهی و مواد مورد نیاز برای کشت بافت از شرکت Merck و Sigma تهیه شدند. ساقه گلدهنده ارکیده فالانوپسیس از پایه‌های مادری سالم از گلخانه‌ای واقع در شهر تهران تهیه شد. این ساقه‌ها توسط قیچی استریل باغبانی از انتها جدا شده و به آزمایشگاه کشت و بافت منتقل شد.

تهیه محیط کشت‌های MS و MS (1/2): برای تهیه محیط کشت MS، پس از تهیه محلول‌های ذخیره و اضافه کردن آن‌ها به ظرف محیط کشت، مقدار ۳۰ گرم ساکارز به ازای هر لیتر به و مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از میواینوزیتول به ازای هر لیتر به آن اضافه شده و سپس pH محیط کشت با استفاده از دستگاه pH متر روی ۵/۸–۵/۷ تنظیم شد.

استریلیزاسیون مواد گیاهی و نگه‌داری کشت‌ها: استریلیزاسیون مواد گیاهی بسته به نوع ریزنمونه مورد آزمایش و نوع گیاه متفاوت می‌باشد. از آنجا که انواع آلودگی‌های باکتریایی و قارچی در محیط کشت مشاهده می‌گردد، در این پژوهش، برای انتخاب روش مناسب برای استریلیزاسیون از تیمارهای مختلف (جدول ۱) استفاده شد تا در نهایت بهترین روش انتخاب شد. ریزنمونه‌های کشت شده در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت ۶۰ درصد نگهداری شدند.

جدول ۱. تیمارهای مختلف ضدعفونی مواد گیاهی موردنظر

Table 1. Various disinfection treatments of the target plant material

Treatment code کد تیمار	Treatment تیمارها
شاهد (S_0) Control	عدم ضدعفونی No sterilization
روش اول استریل‌سازی (S_1) The first method of sterilization	۱۵ دقیقه شستشو با مایع دستشویی، اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار ۱۰ دقیقه 15 min washing with washing liquid, 70% ethanol for 30 seconds, 2.5% sodium hypochlorite for 10 min, 3 times washing with sterile distilled water for 10 min each time
روش دوم استریل‌سازی (S_2) The second method of sterilization	۱۵ دقیقه شستشو با مایع دستشویی، اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار ۱۰ دقیقه 15 min washing with washing liquid, 70% ethanol for 30 seconds, 1.5% sodium hypochlorite for 10 min, 3 times washing with sterile distilled water for 10 min each time
روش سوم استریل‌سازی (S_3) The third method of sterilization	۱۵ دقیقه شستشو با مایع دستشویی، اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، کلرید جیوه ۰/۱٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار ۱۰ دقیقه 15 min washing with washing liquid, 70% ethanol for 30 seconds, 0.1% $HgCl_2$ for 15 min, 3 times washing with sterile distilled water for 10 min each time
روش چهارم استریل‌سازی (S_4) The fourth method of sterilization	۱۵ دقیقه شستشو با مایع دستشویی، ۵ دقیقه با قارچ کش ۱۰٪، اتانول ۷۰٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۵ دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر استریل هر بار ۱۰ دقیقه 15 min washing with toilet liquid, 5 min with 10% fungicide, 70% ethanol for 30 seconds, 1.5% sodium hypochlorite for 15 min, 0.1% $HgCl_2$ for 5 min, 3 times washing with sterile distilled for water 10 min each time

کشت ریزنمونه گره ساقه گل‌دهنده به‌منظور تهیه برگ برای تولید پروتوکورم: بدین منظور، پس از آبشویی ساقه‌های گلدهنده، قطعات ۳ تا ۶ سانتی‌متری از آن جدا شده و در داخل بشرهای استریل قرار گرفت. سپس به‌منظور استریلیزاسیون به زیر هود لامینار ایرفلو منتقل گردید و تیمارهای ضدعفونی ذکر شده در جدول ۱ روی آن‌ها اعمال شد. در تمامی تیمارها هنگامی

که از هیپوکلریت سدیم استفاده شد، مقداری توئین ۲۰ به آن اضافه گردید. سپس برای حذف اثر مواد ضدعفونی کننده سه‌بار (هر بار ۱۰ دقیقه) با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و روی‌کاغذ واتمن استریل قرار داده شدند. پس از آن، حدود یک سانتی‌متر از بخش ابتدا و انتهای نمونه‌ها با استفاده از اسکالپل برش داده شده و قطعات باقی مانده که هر کدام دارای یک گره بودند روی محیط کشت‌های مدنظر (MS و MS یک دوم) بدون تنظیم کننده رشد و به دو شکل مختلف (افقی و عمودی) برای تولید برگ قرار داده شدند. در ضمن باید جوانه‌ها به‌گونه‌ای روی محیط کشت قرار گیرد که از خفگی نمونه‌ها جلوگیری شود.

تهیه پروتوکورم از ریزنمونه برگ ایجاد شده از گره ساقه گلدهنده: پس از حدود دو ماه و نیم از ایجاد برگ (با اندازه حدودی دو تا سه سانتی‌متر) روی گره ساقه گلدهنده، برگ‌ها جدا شده و به قطعات یک تا یک سانتی‌متری تقسیم شده و روی محیط کشت MS حاوی یک گرم در لیتر تی‌دیازورون (TDZ)، ۰/۵ گرم در لیتر BA و سه گرم در لیتر کازئین دهیدرات کشت شدند. روی هر محیط کشت ۳ برگ قرار داده شد.

تهیه گیاهچه استریل از پروتوکورم: پس از حدود یک ماه و نیم تا دو ماه از ایجاد پروتوکورم، جدا شده و به قطعات نیم تا یک سانتی‌متری تقسیم شده و روی محیط کشت MS استاندارد کشت شدند تا گیاهچه‌های ارکیده استریل به‌دست آیند.

تهیه عصاره‌های گیاه مورینگا و اعمال تیمارها: در این پژوهش برای تهیه عصاره‌های گیاهی از روش ماسراسیون استفاده شد. در این روش، مواد گیاهی پودر شده برای مدت طولانی‌تری در حلال (آب، روغن یا الکل) خیسانده می‌شوند. سپس حلال را می‌توان از طریق یک صافی با فشار دادن بقایای گیاهی و بازیابی ترکیبات زیست فعال خارج کرد. راندمان استخراج مواد فعال زیستی از گیاهان بر اساس نوع حلال، قطبیت حلال، ماده گیاهی، فاصله هم زدن و زمان عصاره‌گیری تعیین می‌شود (Subramanian & Anandharamakrishnan 2023). برای استفاده از این روش، پس از تهیه برگ‌های گیاه مورینگا و حذف مواد زاید، عمل آسیاب کردن برگ‌ها توسط آسیاب برقی انجام گردید. سپس پودر تهیه شده در مقادیر مورد نظر (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ گرم) با استفاده از ترازو وزن شد. در مرحله بعد پودر وزن شده به حلال مناسب (متانول) به نسبت یک به ۱۰ اضافه شد و در داخل دستگاه تکان دهنده به‌مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر شد و عصاره‌های تهیه شده در نهایت به محیط های کشت مربوطه اضافه شد.

تنظیم کننده رشد گیاهی زآتین: زآتین با غلظت‌های صفر، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت.

صفات مورد بررسی: صفات مورد بررسی در این پژوهش شامل: ارتفاع گیاهچه، طول ساقه، طول برگ، تعداد برگ، طول ریشه، تعداد ریشه، قطر ریشه، وزن تر گیاهچه، درصد گیاهچه‌های آلوده، زنده و قهوه‌ای بود. برای اندازه‌گیری صفات از ترازو، کولیس و شمارش دستی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری: این تحقیق در دو آزمایش جداگانه انجام شد. آزمایش اول: در این آزمایش تاثیر ۵ روش ضدعفونی، دو محیط کشت (MS و MS 1/2) و دو روش قرار دادن نمونه (افقی و عمودی) به شکل یک آزمایش فاکتوریل در

قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار و ۲ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. آزمایش دوم: در این آزمایش ۱۱ تیمار مختلف در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار روی رشد درون شیشه‌ای گیاه فالانوپسیس بررسی شد (جدول ۲). در نهایت پس از داده‌برداری، برای آنالیز داده ها از نرم افزار SAS و برای رسم نمودار از Excel استفاده شد. برای مقایسه میانگین از آزمون دانکن استفاده شد.

جدول ۲. تیمارهای مورد استفاده در تحقیق حاضر (عصاره برگی مورینگا و زآتین) به‌همراه کد آن‌ها

Table 2. The treatments used in the present study (moringa leaf extract and zeatin) along with their codes

ردیف (Row)	تیمار (Treatment)	کدتیمار (Treatment code)
1	شاهد (بدون اعمال عصاره و زآتین) Control (without extract and zeatin)	C
2	مورینگا ۵۰ میلی‌گرم در لیتر Moringa 50 mg/L	M_1
3	مورینگا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر Moringa 100 mg/L	M_2
4	مورینگا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر Moringa 150 mg/L	M_3
5	مورینگا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر Moringa 200 mg/L	M_4
6	مورینگا ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر Moringa 250 mg/L	M_5
7	زآتین ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Zeatin 0.5 mg/L	Z_1
8	زآتین ۱ میلی‌گرم در لیتر Zeatin 1 mg/L	Z_2
9	زآتین ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر Zeatin 1.5 mg/L	Z_3
10	زآتین ۲ میلی‌گرم در لیتر Zeatin 2 mg/L	Z_4
11	زآتین ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر Zeatin 2.5 mg/L	Z_5

نتایج و بحث

تولید برگ از گره‌های ساقه گل‌دهنده: در این پژوهش، پس از تقریبا دو ماه روی برخی گره‌های ساقه گلدهنده تعدادی برگ تشکیل شد (شکل ۱). در محیط کشت بافت، گره‌ها در شرایط مناسب قابلیت تمایز به برگ دارند و این فرایند تمایز می‌تواند تحت تأثیر نوع محیط کشت و ترکیب آن قرار گیرند. در این آزمایش تشکیل برگ روی هر دو محیط کشت مختلف صورت

گرفت. از طرف دیگر حفظ شرایط محیطی بهینه در آزمایشگاه کشت بافت برای تولید موفق برگ از گره‌ها بسیار مهم است. عواملی مانند دما، شدت نور، دوره نوری و سطوح رطوبت باید به دقت کنترل شوند تا شرایط طبیعی که باعث رشد برگ در ارکیده می‌شود، القاء شود (van Tongerlo et al. 2021).

شکل ۱. برگ‌های تشکیل شده گیاه ارکیده فالانوپسیس روی ساقه گلدهنده

Figure 1. Formed leaves of Phalaenopsis orchid plant on flowering stem

تولید PLB از برگ‌های ایجاد شده گره‌های ساقه گل‌دهنده: توسعه ریزنمونه گره ساقه گل‌دهنده نقش بسیار مهمی در القا PLB در شرایط درون شیشه‌ای دارد. مهمترین مرحله برای کشت ریزنمونه گره به منظور دستیابی به PLB، زمانی پس از تشکیل شدن آن‌ها روی ساقه گل‌دهنده و قبل از باز شدن اولین گل است. گره‌های نزدیک به بخش‌های انتهایی ساقه گل‌دهنده بهترین نتایج را حاصل می‌کند (Mehbub et al. 2022). در این تحقیق سعی شد تا حد امکان از بخش‌های انتهایی ساقه گل‌دهنده به عنوان ریزنمونه اولیه استفاده شود. برای تولید PLBs از برگ گره‌های ساقه گل دهنده در ابتدا برگ‌های استریل روی محیط رشد استریل حاوی مواد مغذی، PGR و ویتامین‌ها قرار می‌گیرند. این PGRها با دقت انتخاب می‌شوند تا شروع و رشد PLBها را القاء کنند. سیتوکینین‌ها اغلب برای تحریک تشکیل ساقه از بافت‌های برگ استفاده می‌شوند (Adugna et al. 2020). در این تحقیق ریزنمونه برگی استریل به‌دست آمده از گره ساقه گلدهنده روی محیط کشت MS حاوی یک گرم در لیتر سیتوکینین TDZ، ۰/۵ گرم در لیتر سیتوکینین BA و سه گرم در لیتر کازئین دهیدرات کشت شدند. پس از حدود دو ماه ساختارهای PLB روی برگ تشکیل شد (شکل ۲). هنگامی که PLBها به مرحله رشد مناسبی رسیدند، با شرایط In-vivo سازگار می‌شوند که شامل قرار دادن تدریجی گیاهچه‌ها در شرایط محیطی خارج از محیط کشت بافت، آماده‌سازی آن‌ها برای انتقال به شرایط گلخانه یا مزرعه برای رشد و نمو بیشتر است. در طول این مراحل، حفظ شرایط استریل و تکنیک‌های ضدعفونی مناسب برای جلوگیری از آلودگی و اطمینان از موفقیت تولید PLB در کشت بافت بسیار مهم است. علاوه بر این، بهینه‌سازی ترکیب محیط رشد و شرایط

کشت برای القاء رشد و توسعه کارآمد PLB ضروری می‌باشد. در تحقیقاتی شروع و تکثیر PLB و کالوس جدید در NAA و کینتین با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، در عرض ۴۵ تا ۶۰ روز مشاهده شد (da Silva et al. 2006).

شکل ۲. تولید PLB روی برگ ارکیده فالانوپسیس

Figure 2. PLB production on Phalaenopsis orchid leaves

تولید گیاهچه‌های ارکیده فالانوپسیس از PLB: پس از حدود شش ماه گیاهچه‌های ارکیده فالانوپسیس از PLBها تشکیل شد (شکل ۳). در طول مراحل تشکیل گیاهچه، حفظ شرایط استریل برای جلوگیری از آلودگی و اطمینان از تکثیر موفق گیاهچه ارکیده سالم بسیار مهم است (Yam & Arditti 2018). در پژوهشی نتایج نشان داد افزودن ملاتونین ۵-۱ میکرومولار، متیل جاسمونات ۵۰-۱۰۰ میکرومولار و سالسیلیک اسید ۱۰۰ میکرومولار سبب القای PLB شد (Chashmi et al. 2023). در مطالعه‌ای نتایج نشان داد اثر متقابل NAA و BAP بر زمان تشکیل PLB به‌طور معنی‌داری وجود دارد. بیشترین تعداد PLB در BAP ۱ پی‌پی‌ام و MS+NAA ۱/۵ پی‌پی‌ام بود (Siregar et al. 2023).

شکل ۳. تولید گیاهچه ارکیده فالانوپسیس بعد از حدود شش ماه

Figure 3. Production of Phalaenopsis orchid seedlings after about six months

آزمایش اول: بررسی تاثیر اثر نوع محیط کشت، جهت ریزنمونه و روش استریلیزاسیون مواد گیاهی روی درصد باززایی، آلودگی و سوختگی ریزنمونه‌های ارکیده فالانوپسیس

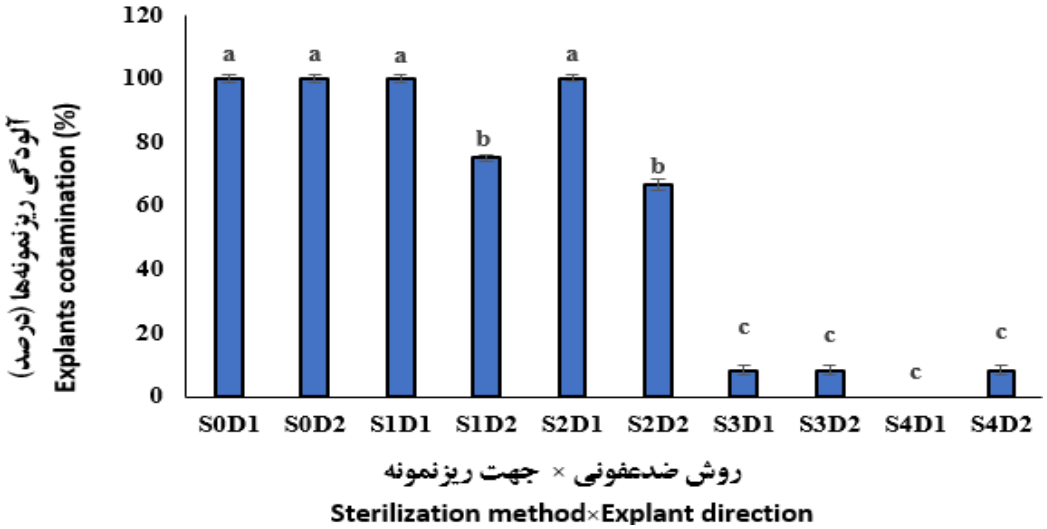
درصد آلودگی ریز نمونه‌ها: نتایج تجزیه واریانس برای این آزمایش نشان داد که اثر متقابل روش ضدعفونی و جهت ریزنمونه بر درصد آلودگی ریزنمونه‌ها گیاه ارکیده فالانوپسیس در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در تیمار S_4D_1 درصد آلودگی ریزنمونه صفر می‌باشد (شکل ۴). بین محیط کشت‌های مختلف از لحاظ تاثیر بر میزان آلودگی اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس تاثیر اثر نوع محیط کشت، جهت ریزنمونه و روش استریلیزاسیون مواد گیاهی روی درصد باززایی، آلودگی و سوختگی ریزنمونه‌های ارکیده فالانوپسیس

Table 3. The results of ANOVA of the effect of the type of culture medium, the direction of the explant and the sterilization method of plant material on the percentage of regeneration, contamination and burn of Phalaenopsis orchid explants

منابع تغییرات S.O. V	درجه آزادی Df	Mean of square میانگین مربعات		
		درصد آلودگی Contamination (%)	درصد سوختگی Burn (%)	درصد باززایی Regeneration (%)
روش ضدعفونی Sterilization (S) method	4	25895.00**	23541.66**	18375.00**
محیط کشت Medium culture (M)	1	166.66ns	41.66 ns	41.66 ns
جهت ریزنمونه Explant (D)direction	1	1500*	41.66 ns	375.00*
SM	4	62.50ns	41.66ns	41.66ns
SD	4	979.166*	41.66ns	375.00*
MD	1	0.00ns	41.66ns	41.66ns
SMD	4	312/50ns	41.66ns	41.66ns
خطای آزمایش Error	40	299.66	41.66	83.33
ضریب تغییرات C.V. (%)	-	12.38	2.96	4.22

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



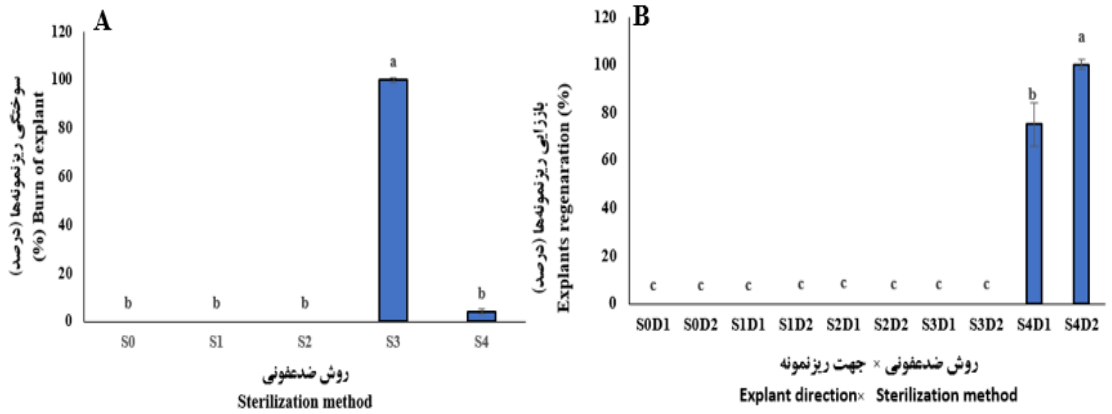
شکل ٤. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل روش ضدعفونی و جهت ریزنمونه بر درصد آلودگی ریزنمونه ارکیده فالانوپسیس. S_0: عدم استریل‌سازی، S_1، S_2، S_3، S_4 و S_5 (روش اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم ضدعفونی) ، D_1 و D_2 (جهت افقی و عمودی). میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

Figure 4. The mean comparison results of the interaction effect of sterilization method and the direction of explant on the percentage of Phalaenopsis orchid explant contamination. S_0: no sterilization, S_1, S_2, S_3, S_4 (first, second, third, and fourth method of sterilization), D_1 and D_2 (horizontal and vertical direction). The mean of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability level. Error bar indicates standard error

در این تحقیق در روش چهارم ضدعفونی از ترکیب قارچ کش بنومیل و کلرید جیوه استفاده شده که با کاربرد این مواد آلودگی‌های قارچی و کاملا حذف شد. حتی اگر ریزازدیادی امکان تولید گیاهان متعدد با کیفیت بالا را در مدت زمان نسبتا کوتاه فراهم کند، بزرگترین مشکل در این روش آلودگی است (Cardoso et al. 2018). در محیط کشت بافت گیاهی، ممکن است با انواع مختلفی از آلودگی رو به رو شویم. برخی از انواع رایج آلودگی‌ها عبارتند از آلودگی باکتریایی؛ باکتری‌ها می‌توانند از طریق هوا، آب، ظروف کشت، و مواد غذایی به محیط کشت وارد شوند و بافت‌های گیاهی را آلوده کنند (Leifert et al. 1994; Cassells 2012). آلودگی قارچی؛ قارچ‌ها نیز می‌توانند از طریق هوا یا اشیاء آلوده به محیط کشت وارد شوند و بافت‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار دهند (Li & Yang 2004). ویروس‌ها معمولا از طریق نهال‌ها یا ابزارهای آلوده به محیط کشت وارد شده و گیاهچه‌ها را آلوده نمایند (Mehle & Ravnikar 2012). استفاده از قارچ‌کش و کلرید جیوه در کشت بافت گیاهی به‌عنوان روش‌هایی برای

کنترل آلودگی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mng'omba et al. 2012). این ترکیبات به‌طور موثر می‌توانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را کنترل کنند و از آلودگی محیط کشت جلوگیری نمایند و قارچ‌کش‌ها می‌توانند در برخورد با آلودگی‌های قارچی در محیط کشت بافت گیاهی موثر باشند. آن‌ها ممکن است قارچ‌هایی که بافت گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند را مهار و کنترل کنند (Leelavathy & Sankar 2016). کلرید جیوه به‌عنوان یک ماده استریل کننده می‌تواند باکتری‌های مختلف را کنترل کند و از آلودگی باکتریایی در محیط کشت جلوگیری کند (Tyagi et al. 2011). استفاده از قارچ‌کش و کلرید جیوه ممکن است باعث کاهش شدیدی در تعداد ویروس‌های آلوده شده به گیاهان شود و در نتیجه از آلودگی ویروسی جلوگیری کند (Singh et al. 2012). در تحقیقات خرازی و همکاران (١٣٩٧) مشاهده شد که کمترین درصد آلودگی در کاربرد تیمار گرمایی و کاربرد دو گرم در لیتر بنومیل در سوخ نرگس بود. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که کاربرد قارچ‌کش‌ها می‌توانند به کنترل آلودگی در شرایط کشت بافت کمک نمایند (Niedz & Bausher 2002; Eed et al. 2010)، و براساس تحقیقات انجام شده، موثرترین تیمار در آلودگی قارچی، قارچ‌کش بنومیل می‌باشد. از آنجائی که این قارچ‌کش، جزو قارچکش‌های سیستمیک محسوب می‌گردد، لذا جهت حذف قارچ‌های داخلی مفید می‌باشد (Ahmadi et al. 2012). در پژوهشی (Smith 2013) گزارش نمود استفاده از تیمارهای قارچکش (بنومیل) می‌تواند به کاهش آلودگی قارچی کمک نماید. در تحقیقاتی (Altan et al. 2010) از تیمارهای شیمیایی مختلفی برای کنترل آلودگی میکروبی در کشت درون شیشه‌ای لیلیوم استفاده کردند و بهترین پاسخ را پس از اعمال ترکیب ١٠٠ میلی‌گرم در لیتر بنومیل به همراه ١٠٠ میلی‌گرم در لیتر نیستاتین به‌مدت ٣٠ دقیقه مشاهده نمودند. در تائید نتایج تحقیق حاضر، پژوهش دیگری هم نشان داد که کاربرد محیط کشت MS حاوی یک گرم در لیتر بنومیل باعث حذف کامل آلودگی از ریزنمونه‌های گیاه کاملیا گردید (Haldeman et al. 1987). مکانیزم عمل بنومیل از طریق جلوگیری شدید از سنتز DNA و یا فرایندهای مرتبط با تقسیم سلولی قارچ‌ها می‌باشد (Bošnjak Mihovilović et al. 2024).

درصد سوختگی: براساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها اثر ساده روش استریل‌سازی بر درصد سوختگی ریزنمونه گیاه ارکیده فالانوپسیس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ٣). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که روش سوم استریل‌سازی بالاترین میزان درصد سوختگی را دارا می باشد (شکل ٥–A). تأثیر روش‌های استریل‌سازی بر میزان سوختگی ارکیده‌ها در کشت بافت بسته به عوامل متعددی از جمله نوع استریل‌سازی کننده مورد استفاده، غلظت، مدت زمان قرار گرفتن در معرض و گونه یا نوع خاص ارکیده می‌تواند متفاوت باشد (da Silva et al. 2016). قرار گرفتن بیش از حد در معرض مواد استریل‌سازی یا استفاده از غلظت‌های بسیار بالا می‌تواند منجر به آسیب بافتی یا نکروز شود که می‌تواند بر موفقیت تکثیر کشت بافت تأثیر منفی بگذارد. بهینه‌سازی پروتکل‌های ضدعفونی برای به حداقل رساندن میزان سوختگی و در عین حال از بین بردن موثر آلاینده‌ها ضروری است. این اغلب شامل آزمایش با غلظت‌ها و زمان‌های قرار گرفتن در معرض مختلف برای یافتن تعادل بین ضدعفونی مؤثر و حداقل آسیب بافتی است. (Soudagar et al. 2024).



شکل ۵. نتایج مقایسه میانگین اثر ساده استریل‌سازی بر درصد سوختگی (A) و اثر متقابل استریل سازی و جهت ریزنمونه بر باززایی (B) گیاه ارکیده فالانوپسیس. S_0: عدم استریل‌سازی ، S_1، S_2، S_3، S_4 و S_5 (روش اول، دوم، سوم، و چهارم استریل‌سازی). میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

Figure 5. Comparison results of the average effect of sterilization on the percentage of burn (A) and regeneration (B) of Phalaenopsis orchid. S_0: no sterilization, S_1, S_2, S_3, S_4 and S_5 (first, second, third and fourth method of sterilization). The mean of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability level. Error bar indicates standard error

در این تحقیق هم در روش سوم چون زمان در معرض قرار گرفتن ریزنمونه با کلرید جیوه بالاتر از سایر روش‌ها بود، درصد بالایی (۱۰۰ درصد) از ریزنمونه‌ها دچار سوختگی شد. در پژوهشی ضدعفونی سطحی با کلرید جیوه ۰/۲ درصد به‌مدت یک ساعت منجر به درصد بقا و زنده ماندن ریز نمونه شد. به‌طور کلی، اثر زمان ضدعفونی در کشت بافت بر میزان تکثیر اندام هوایی در کشت‌های آزمایشگاهی از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است. این ماده معمولا به‌عنوان یک ماده ضدقارچ و ضدباکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از کلرید جیوه در زمان ضدعفونی زیاد می‌تواند به دو عامل باز گردد که ممکن است سبب سوختگی گیاهان در کشت بافت گردد و کلرید جیوه یک ترکیب شیمیایی که می‌تواند در زمان زیاد و در مقادیر بیش از حد به گیاهان آسیب بزند. این ماده می‌تواند باعث ایجاد سمیت در گیاه شود که به‌عنوان پاسخ به آن، سوختگی و آسیب‌هایی مانند تغییر رنگ برگ‌ها، رویش ناهنجار و ضعیفی ساقه‌ها و برگ‌ها و حتی مرگ گیاه شود. همچنین استفاده از کلرید جیوه به مقدار زیاد منجر به تخلیه آب از سلول‌های گیاهی، خشک شدن برگ‌ها و ساقه‌ها می‌شود و در نهایت سوختگی و آسیب‌هایی در گیاه می‌گردد (Hashim et al. 2021). استفاده از روش‌های استریل‌سازی به‌صورت مداوم می‌تواند کمک کند تا شرایط بهداشتی مناسب در محیط کشت فراهم شود و از ایجاد محیطی که برای رشد میکروارگانیسم‌های مضر مناسب است، جلوگیری شود. برخی از مواد استریل‌سازی می‌توانند

به‌عنوان تقویت کننده سیستم ایمنی گیاه عمل کنند و به گیاه کمک کنند تا بهتر در مقابل حملات میکروارگانیسم‌ها مضر مقاومت نشان دهد و استفاده از روش‌های استریل‌سازی مناسب می‌تواند به کاهش تنش‌های هوازی و شیمیایی که ممکن است منجر به سوختگی ریزنمونه‌های گیاهان شوند، کمک کند (Orlikowska et al. 2017).

درصد باززایی: در این تحقیق نتایج جدول تجزیه واریانس ۳ نشان داد که اثر روش استریل‌سازی و جهت بر درصد باززایی گیاه ارکیده فالانوپسیس در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین در این پژوهش نشان داد که تیمار S_4D_2 (روش چهارم استریل‌سازی و جهت عمودی ریزنمونه) بالاترین درصد باززایی را نسبت به سایر تیمارها و شاهد نشان داد (شکل ۵-B). باززایی گیاه در شرایط درون شیشه‌ای اغلب مرحله‌ای مهم برای بکار بردن موفق تکنولوژی کشت بافت در برنامه‌های اصلاحی گیاهان می‌باشد. در این پژوهش احتمال بر این است که چون روش چهارم ضدعفونی کمترین میزان آلودگی و سوختگی ریزنمونه را داشتند، لذا ریزنمونه برگ فرصت باززایی کافی را در هر دو محیط کشت مختلف داشته است و از طرف دیگر ریزنمونه‌ای که به شکل عمودی قرار گرفته است به احتمال زیاد مواد مغذی بیشتری را جذب نموده است. جهت مناسب کاشت ریزنمونه در کشت بافت می‌تواند تاثیر بسزایی بر درصد باززایی داشته باشد. جهت مناسب شامل جهتی است که بتواند رشد گیاهچه‌ها را به حداکثر برساند و شرایطی را برای جذب نور، هوا، آب و مواد مغذی فراهم کند. جهت مناسب کاشت ریزنمونه می‌تواند باعث جذب بهتر نور و بهبود تولید انرژی توسط گیاهچه‌ها شود، که از این موضوع می‌تواند به رشد سریع‌تر و سلامتی بهتر گیاهچه‌ها کمک کند و در نتیجه، بهبود باززایی را تسهیل کند (Olson et al. 2011). جهت مناسب کاشت ریزنمونه می‌تواند به توزیع مناسب مواد مغذی گیاهچه کمک کند، که سبب افزایش توانایی گیاهچه‌ها در جذب مواد مغذی شده و در نتیجه، درصد باززایی را افزایش دهد. همچنین، جهت مناسب کشت ریزنمونه می‌تواند باعث حفظ تعادل حرارتی و رطوبتی در محیط کشت شود که این امر از تنش‌های محیطی جلوگیری کرده ورشد گیاهچه‌ها را بهبود می‌بخشد و در نتیجه درصد باززایی را افزایش می‌دهد (Hassan et al. 2021).

نتایج آزمایش دوم: بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر تعداد برگ: در این مطالعه برطبق جدول تجزیه واریانس ۴ نتایج نشان داد که اثر عصاره مورینگا و زآتین بر تعداد برگ گیاه ارکیده فالانوپسیس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. تعداد برگ مهمترین عامل تکثیر گیاه در کشت بافت است. موفقیت ریزنمونه‌ها در تکثیر تحت تأثیر ترکیب مواد محرک رشد است که می‌تواند کارایی باززایی ریزنمونه را بسته به غلظت اضافه شده بهبود بخشد. عصاره برگ مورینگا حاوی زآتین و چندین ترکیب اضافی دیگر مانند اسید اسکوربیک و مواد معدنی مانند کلسیم، پتاسیم و آهن است. زآتین یک ترکیب سیتوکین است که می‌تواند اثرات مهارکننده‌های ABA را که معمولاً در برگ‌ها یافت می‌شود، سرکوب کند (Suminar et al. 2015). براساس شکل ۶-A مشاهده می‌شود که افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا و زآتین ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت بهترین نتایج را نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد. این می‌تواند به این دلیل باشد که برگ‌های مورینگا حاوی زآتین است که گروهی از هورمون‌های

سیتوکینین است. افزودن سیتوکینین‌ها با غلظت مناسب می‌تواند تکثیر برگ را در کشت بافت افزایش دهد. در پژوهشی دیگر مشاهده شد که افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا سبب افزایش برگ شد (Mardiana & Sumarji 2021).

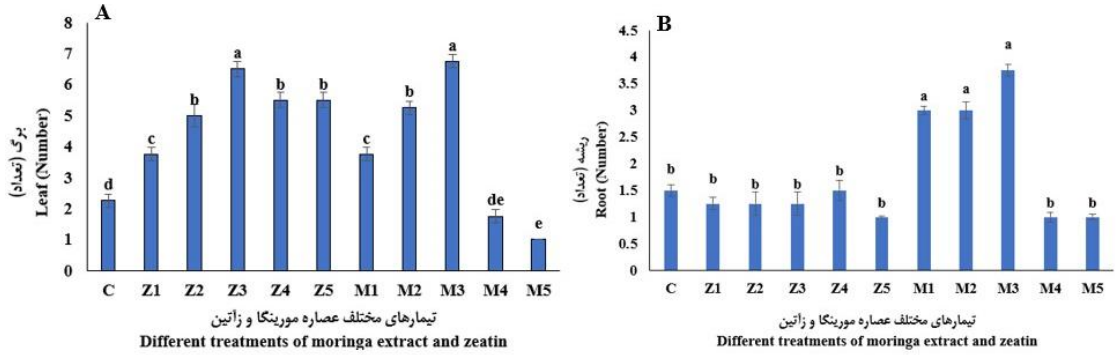
جدول ٤. نتایج تجزیه واریانس بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر صفات گیاه ارکیده فالانوپسیس

Table 4. The results of analysis of variance to investigate the effect of moringa and zeatin extracts on Phalaenopsis orchid traits

منابع تغییرات S. O. V	درجه آزادی Df	Mean of square میانگین مربعات					
		تعداد برگ Number leaf	تعداد ریشه Number root	ارتفاع Height	طول برگ Number leaf	طول ریشه Number root	وزن تر Fresh weight
تیمار Treatment	10	**14.92	**3.87	**17.01	**150.57	**254.93	**1.52
خطا Error	33	0.287	0.272	0.104	2.08	1.17	0.011
ضریب تغییرات CV (%)	-	12.55	29.45	7.43	6.95	5.21	14.73

نتایج نشان داد که در غلظت ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا کمتری نسبت به غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا تولید می‌شود، اما تعداد برگ‌های بیشتری نسبت به محیط کنترل تولید می‌شود. از طرف دیگر هر چه غلظت عصاره برگ مورینگا بیشتر باشد، محتوای هورمون سیتوکین بیشتر می‌باشد، غلظت بالای عصاره برای ریزنمونه ها سمی خواهد بود که منجر به کاهش تعداد برگ‌ها و می‌شود. به گفته Mardiana و Sumarji (۲۰۲۱) اعمال سیتوکینین‌های اگزوژن بالا دیگر اثر خوبی ندارد یا حتی رشد را مهار نمی‌کند، زیرا غلظت سیتوکینین‌ها بیش از حد می‌شود. غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا نسبت به غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر یا صفر گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا تعداد برگ بهتری را نشان داد. در تحقیقاتی Mawadah و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند ترکیب ۱۰۰ گرم در لیتر عصاره جوانه به اضافه ۱۰۰ گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا پتانسیل رشد بهتری را در مقایسه با محیط‌های شاهد از افزودن تعداد برگ و تعداد ریشه دارد. براساس نتایج آزمایش واریته مشخص شد که افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا می‌تواند تعداد برگ‌ها را مشابه استفاده از هورمون زآتین ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش دهد. این افزایش می‌تواند اتفاق بیفتد، زیرا یک برگ مورینگا حاوی ۵–۲۰۰ میکروگرم زآتین است (Yasmeen et al. 2014). این می‌تواند ناشی از سایر مواد شیمیایی موجود در عصاره برگ مورینگا، مانند ویتامین C، آهن و کلسیم باشد. رشد برگ‌های ریزنمونه ارکیده تحت تأثیر هورمون‌های سیتوکین است، بنابراین در این تحقیق از هورمون زآتین و عصاره برگ مورینگا استفاده شد. نتایج تحقیقات (Kasutjianingati et al. 2010) نشان داد که افزودن زآتین به محیط کشت بافت می‌تواند تعداد برگ‌های ریزنمونه را افزایش دهد. این مطابق با تحقیقات (Suminar et al. 2015) است که استفاده از ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر زآتین بیشترین تعداد برگ را تولید کرد. در تحقیقاتی نتایج نشان داد که خیساندن بذر در محلول اسید آسکوربیک و

تیمار با عصاره برگ مورینگا سبب افزایش تعداد برگ در مقایسه با شاهد شد (Rady & Mohamed 2015). شکل B-۴ نشان می‌دهد که تیمار با استفاده از عصاره برگ مورینگا نتایج مشابهی با استفاده از هورمون زآتین در تعداد برگ و ارتفاع گیاه مشاهده شده دارد. این به دلیل تأثیر زآتین بر تقسیم سلولی بود. در تحقیقاتی موثرترین غلظت هورمون زآتین طبق (Suminar et al. 2015) ۱/۵ پی‌پی‌ام است. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا تعدادی برگ تولید کرد که تفاوت معنی‌داری با استفاده از هورمون زآتین در ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر نداشت. گزارش شده است که هورمون زآتین-سیتوکنین نقش عمده‌ای در تشکیل و رشد برگ در ریزنمونه‌های گونه‌های مختلف گیاهی دارد. عصاره برگ مورینگا حاوی متابولیت‌های مربوط به جوانه‌زنی و مواد مغذی مانند زآتین، اسید اسکوربیک، کلسیم و پتاسیم می‌باشد. زآتین یکی از اصلی‌ترین سیتوکنین‌ها است که در عصاره برگ مورینگا یافت می‌شود. این هورمون جوانه‌زنی را تحریک می‌کند و می‌تواند به رشد برگ‌ها کمک کند (Raha & Ahmaruzzaman 2022). اسید اسکوربیک یا ویتامین C یک آنتی‌اکسیدان قوی است که در عصاره برگ مورینگا سبب بهبود سلامت گیاه و تقویت رشد برگ‌ها می‌شود. مواد معدنی مانند کلسیم و پتاسیم نقش مهمی در تقویت ساختار گیاه و فعالیت‌های سلولی دارند و افزایش میزان این مواد معدنی در عصاره برگ مورینگا می‌تواند به تقویت ساختار برگ‌ها و بهبود رشد آن‌ها کمک کند (Yuniati et al. 2022).



شکل ٦. نتایج مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای مختلف عصاره مورینگا و زآتین بر تعداد برگ (A) و ریشه گیاه ارکیده فالانوپسیس (B). C (شاهد: عدم ضدعفونی) Z_1، Z_2، Z_3، Z_4 و Z_5 (زآتین ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) و M_1، M_2، M_3، M_4 و M_5 (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر). میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

Figure 6. Comparison results of the means effect of different treatments of Moringa extracts and Zeatin on the number of leaves (A) and roots (B) of Phalaenopsis orchid. C (control: no sterilization) Z_1, Z_2, Z_3, Z_4 and Z_5 (Zeatin 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mg/L) and M_1, M_2, M_3, M_4 and M_5 (50, 100, 150, 200 and 250 mg/liter). The mean of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability level. Error bar indicates standard error

بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر تعداد ریشه: نتایج جدول ۴ نشان داد اثر عصاره مورینگا و زآتین بر تعداد ریشه ارکیده فالانوپسیس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تیمار M_3 (غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مورینگا) بالاترین تعداد ریشه را دارا می باشد (شکل ۶-B). ریشه بخشی از گیاه است که وظیفه جذب آب و مواد معدنی (مواد مغذی) و حمایت و تقویت استقرار گیاهان را بر عهده دارد. تعداد ریشه عامل مهمی در تعیین توانایی ریزنمونه‌ها در جذب عناصر غذایی در محیط کشت است. تعداد بیشتر ریشه‌ها می‌تواند جذب مواد مغذی در محیط را بهینه کند. تعداد ریشه‌ها مشاهده شد تا ببینیم آیا بین تیمارهای داده شده تأثیری بر افزایش تعداد ریشه‌ها وجود دارد یا خیر. نتایج نشان داد که افزودن برگ مورینگا به محیط کشت تأثیر معنی‌داری بر تعداد ریشه داشت. عصاره برگ مورینگا ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تعداد ریشه را نسبت به سایر تیمارها تولید کرد. این افزایش تعداد ریشه به این دلیل بود که ترکیب محیط عصاره برگ مورینگا حاوی عنصر فسفر بالایی می‌باشد که برای رشد رویشی مورد نیاز گیاهان است. عملکرد فسفر تسریع رشد ریشه، تقویت ساقه گیاهان، تسریع فرآیند گلدهی، افزایش تولید و رسیدن میوه‌ها و دانه‌ها است. به گفته (Shen et al. 2011) فسفر یک محرک رشد برای ریشه گیاهان است. عصاره برگ مورینگا که به محیط اضافه می‌شود علاوه بر اینکه حاوی هورمون سیتوکینین است، حاوی کلسیم بالایی نیز می‌باشد. کلسیم برای گیاهان به‌عنوان یک اتصال دهنده برای مولکول‌های غشایی عمل می‌کند تا بتواند در رشد و نمو سلول به خوبی عمل کند. این نتیجه مطابق با نتایج تحقیقات (Ren et al. 2021) است که کلسیم جزء تشکیل دهنده دیواره‌های سلولی است، این عنصر همچنین در تقسیم و طویل شدن سلول عمل می کند. در تحقیقاتی همچنین بیان کردند که تیمار عصاره برگ مورینگا در نهالستان‌های نیشکر باعث افزایش قطر ریشه‌های نیشکر شده است. افزایش تعداد ریشه‌ها می تواند ناشی از فعالیت متابولیکی بالاتر سلول‌های تقسیم شونده باشد (Saptaria & Setyawan 2021). کمترین تعداد ریشه در شاهد (عدم ضدعفونی) با میانگین تعداد ریشه ۱/۵ بود که تفاوت معنی‌داری با تیمارهای زآتین با غلظت‌های مختلف و مورینگا با غلظت‌های ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نداشت. افزودن غلظت‌های بالا می‌تواند باعث کاهش تعداد ریشه‌ها شد. که احتمالا به دلیل این بوده است که اثر سمی داشته است.

بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر ارتفاع گیاهچه: برطبق جدول ۴ تجزیه واریانس داده‌ها اثر عصاره مورینگا و زآتین بر ارتفاع گیاهچه ارکیده فالانوپسیس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. میانگین ارتفاع گیاهچه ارکیده در شکل ۷-A نشان داده شده است. نتایج مشاهدات نشان داد که عصاره مورینگا و زآتین با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر ارتفاع گیاهچه را در مقایسه با شاهد افزایش دادند (شکل۷-A). تیمار زآتین در مقایسه با تیمار عصاره برگ مورینگا در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری نداشت. افزودن عصاره برگ مورینگا در محیط کشت بهترین ارتفاع گیاهچه را به دست آورد. محیط‌های پایه با افزودن عصاره برگ مورینگا با غلظت‌های ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر روی ارتفاع گیاهچه تأثیری کمتری داشت. ارتفاع ریزنمونه توسط دو فرآیند تقسیم سلولی و طویل شدن ایجاد می‌شود. هر دوی این فرآیندها در بافت مریستم، یعنی در نقطه رشد ساقه رخ

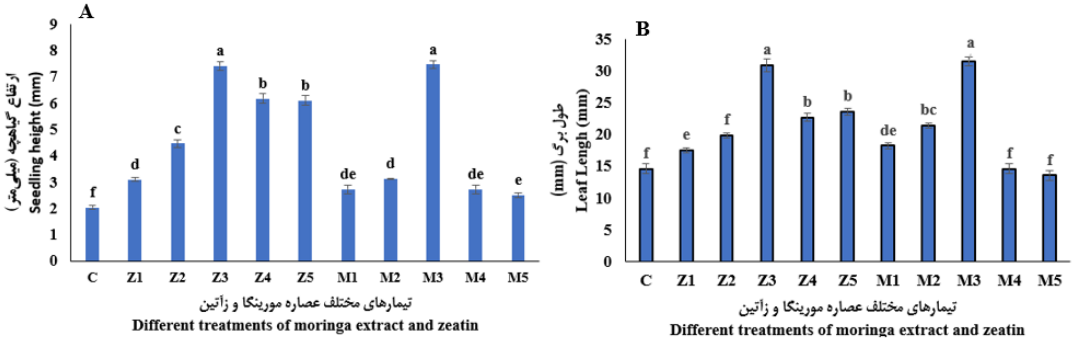
می‌دهد تا گیاه بزرگتر شود و در تعیین عملکرد محصول همبستگی مثبتی داشته باشد (Untari & Puspitaningtyas 2006). تسریع ارتفاع گیاهچه در کل گیاه بوسیله سه فرآیند ایجاد می‌شود، از جمله (۱) تقسیم سلولی تسریع شده در اندام هوایی، (۲) جیبرلین که رشد سلول را تحریک می‌کند و (۳) جیبرلین افزایش انعطاف‌پذیری دیواره سلولی. سیتوکنین‌ها هورمون‌هایی هستند که تقسیم سلولی را تحریک می‌کنند و باعث رشد بهتر و سریع‌تر جوانه‌ها می‌شوند. این هورمون‌ها در عصاره برگ مورینگا وجود دارند و به بهبود و رشد ساقه و در نتیجه افزایش ارتفاع گیاهچه کمک می‌کنند (Basra & Lovatt 2016). در این مطالعه، اعمال هورمون زآتین در مقایسه با عصاره برگ مورینگا در افزایش ارتفاع گیاهچه مشابه بود. نتایج ارائه شده در شکل۷-A نشان می‌دهد که هر چه غلظت عصاره برگ مورینگا بیشتر باشد، میانگین ارتفاع ریزنمونه‌ها کمتر می‌شود. این از نتایج مطالعات روی هورمون‌های گیاهی مشتق شده از مواد طبیعی مانند عصاره برگ مورینگا و زآتین پشتیبانی می‌کند. افزودن این مواد طبیعی باعث عدم تعادل فیتوهورمون‌ها شده و در نتیجه رشد ارتفاع گیاهچه را مهار می‌کند. در پژوهشی (Brar et al. 1995) نیز طی آزمایشی روی دو رقم میخک نشان دادند که افزایش غلظت هورمون سیتوکنین منجر به کاهش ارتفاع گیاهچه می‌شود که با نتایج آزمایش اخیر مطابقت دارد. در تحقیقاتی مشخص شد که سیتوکنین و جیبرلین سبب افزایش ارتفاع در گوجه‌فرنگی می‌شوند (Liu et al. 2023).

بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر طول برگ: در این مطالعه نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر عصاره مورینگا و زآتین بر طول برگ گیاه ارکیده فالانوپسیس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین طول برگ در دو تیمار M_3 و Z_3 حاصل شد (شکل ۷-B). عصاره برگ مورینگا با استفاده از ترکیبات مختلفی که در خود دارند، می‌توانند به افزایش طول برگ ارکیده در محیط کشت بافت کمک کنند. وجود سیتوکنین‌ها در عصاره برگ مورینگا باعث افزایش تقسیم سلولی در نواحی برگ می‌شود و در نتیجه برگ‌ها به رشد و توسعه بیشتری دست می‌یابند. در تائید نتایج تحقیق ما، در مطالعه‌ای عصاره برگ مورینگا سبب افزایش طول برگ در ارکیده شد (Rathnayaka et al. 2023). همچنین در تحقیقی افزودن ۱۵۰ گرم در لیتر عصاره برگ مورینگا به محیط کشت سبب بهبود طول برگ ارکیده گردید (Mardiana & Sumarji 2021).

بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر طول ریشه: در این تحقیق براساس جدول ۴ تجزیه واریانس داده‌ها اثر عصاره مورینگا و زآتین بر طول ریشه گیاهچه ارکیده فالانوپسیس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین طول ریشه مربوط به تیمار شاهد و M_3 به ترتیب به‌میزان ۳۰/۳۲ و ۲۸/۲۵ میلی‌متر و کمترین در تیمارهای Z_5، M_4 و M_5 به‌ترتیب به‌میزان ۱۱/۲۰، ۱۱/۲۰ و۱۱/۰۹ مشاهده شد (شکل ۸-A). عصاره برگ مورینگا می‌تواند سبب افزایش طول ریشه در کشت بافت گیاهان شود و این تاثیر به‌دلیل حضور ترکیبات مختلفی است که به‌طور همزمان بر رشد و توسعه ریشه‌ها

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

تاثیر می‌گذارند (Iqbal 2014). ترکیبات کلیدی موجود در عصاره برگ مورینگا که به افزایش طول ریشه کمک میکنند عبارتند از اکسین‌ها از جمله هورمون‌های گیاهی هستند که نقش مهمی در توسعه و رشد ریشه‌ها دارند (Mazzoni-Putman et al. 2021).

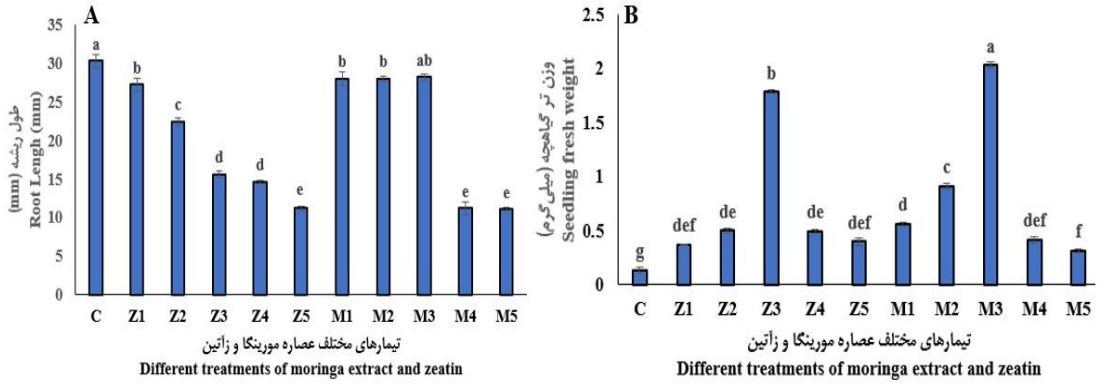


شکل ۷. نتایج مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای مختلف عصاره مورینگا و زآتین بر ارتفاع گیاهچه (A) و طول برگ گیاه ارکیده فالانوپسیس (B). C (شاهد: عدم ضدعفونی) Z_1، Z_2، Z_3، Z_4 و Z_5 (زآتین ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) و M_1، M_2، M_3، M_4 و M_5 (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر). میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

Figure 7. Comparison results of the means effect of different treatments of Moringa extracts and Zeatin on the height (A) and leaf length (B) of Phalaenopsis orchid. C (control: no sterilization) Z_1, Z_2, Z_3, Z_4 and Z_5 (Zeatin 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mg/L) and M_1, M_2, M_3, M_4 and M_5 (50, 100, 150, 200 and 250 mg/liter). The mean of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability

عصاره برگ مورینگا حاوی اکسین‌هایی مانند ایندول-۳- استیک اسید است که باعث تحریک تقسیم سلولی و افزایش طولی ریشه می‌شوند. ویتامین‌ها (مانند ویتامین C و E) و مواد معدنی (مانند کلسیم، آهن و منیزیم) موجود در عصاره برگ مورینگا باعث تقویت سلامت کلی گیاه و بهبود فرآیندهای متابولیکی می‌شوند. این مواد مغذی می‌توانند به رشد بهتر و سریع‌تر ریشه‌ها کمک کنند (Islam et al. 2021). آمینواسیدهای موجود در عصاره برگ مورینگا، به‌عنوان واحدهای سازنده پروتئین‌ها، نقش مهمی در توسعه و رشد ریشه‌ها دارند. این آمینواسیدها می‌توانند به سنتز پروتئین‌های ضروری برای رشد سلولی کمک کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها مانند فلاونوئیدها و فنولیک‌ها می‌توانند به کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌ها کمک کنند و این کاهش تنش باعث بهبود و توسعه ریشه‌ها می‌شود (Michalak 2006). ترکیبات فنلی موجود در عصاره برگ مورینگا می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی عمل کنند، که این موضوع باعث بهبود و افزایش رشد ریشه‌ها می‌شود (Abdalla 2013). به‌طور کلی،

ترکیب این هورمون‌ها و مواد مغذی در عصاره برگ مورینگا به‌صورت همزمان و سینرژیک عمل می‌کنند تا رشد و توسعه ریشه‌ها را بهبود بخشند. این ترکیبات منجر به تحریک تقسیم سلولی، افزایش طول سلول‌ها، تقویت سلامت کلی گیاه و کاهش تنش‌های محیطی می‌شوند که همه اینها به افزایش طول ریشه در کشت بافت گیاهان کمک می‌کنند(Arif et al. 2024). در تحقیقاتی نتایج نشان داد عصاره برگ مورینگا سبب افزایش طول ریشه گیاه نسبت به جیبرلین گردید (Elzaawely et al. 2017). در پژوهشی عصاره برگ مورینگا و چریش سبب افزایش طول ریشه شد (Rathnayaka et al. 2023).



شکل ۸. نتایج مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای مختلف عصاره مورینگا و زآتین بر طول ریشه (A) و وزن تر گیاهچه ارکیده فالانوپسیس (B). C (شاهد: عدم ضدعفونی) Z_1، Z_2، Z_3، Z_4 و Z_5 (زآتین ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) و M_1، M_2، M_3، M_4 و M_5 (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر). میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

Figure 8. Comparison results of the means effect of different treatments of Moringa extracts and Zeatin on the root length (A) and fresh weight (B) of Phalaenopsis orchid. C (control: no sterilization) Z1, Z2, Z3, Z4 and Z5 (Zeatin 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mg/L) and M1, M2, M3, M4 and M5 (50, 100, 150, 200 and 250 mg/liter). The mean of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability

بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر وزن ترگیاهچه: براساس جدول ۴ تجزیه واریانس داده‌ها اثر عصاره مورینگا و زآتین بر وزن تر گیاهچه ارکیده فالانوپسیس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بالاترین زیست توده برای گیاهچه‌ها در حضور عصاره مورینگا با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد (شکل ۸-B). تیمار M_3 در محیط کشت به‌میزان ۲/۰۳ میلی‌گرم در مقایسه با شاهد مشاهده شد که با نتایج مطالعه (Grzegorczyk-Karolak et al. 2015) همسو بود. در مطالعه‌ای وزن گیاه توسط عصاره مورینگا افزایش یافت. بهبود صفات رشد گیاهچه مانند طول ساقه، تعداد و سطح برگ در بوته، وزن گیاه با

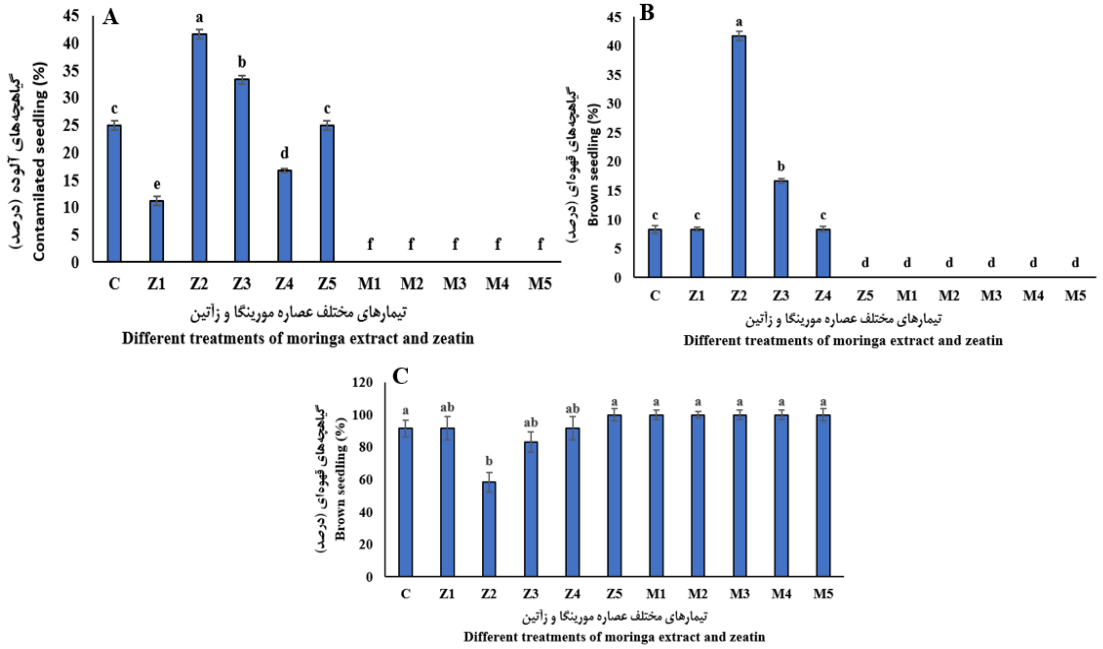
کاربرد عصاره برگ مورینگا ممکن است به‌دلیل افزایش تحرک متابولیت‌های مربوط به جوانه‌زنی، یا املاح معدنی مانند زآتین، اسید آسکوربیک، کلسیم و پتاسیم در عصاره برگ مورینگا باشد (Rady & Mohamed 2015). عصاره برگ مورینگا نسبت به زآتین می‌تواند سبب افزایش وزن ترگیاهچه شود. این افزایش به‌دلایل متعددی مرتبط با ترکیبات غنی و ویژگی‌های منحصر به فرد عصاره برگ مورینگا است (Hala et al. 2017). عصاره برگ مورینگا حاوی ویتامین‌ها (ویتامین C و A)، مواد معدنی (کلسیم، پتاسیم و آهن)، آمینواسیدها و پروتئین‌ها است. این مواد مغذی ضروری به‌طور مستقیم به رشد و توسعه سلول‌ها و بافت‌های گیاه کمک می‌کنند و منجر به افزایش وزن تر گیاهچه می‌شوند (Yaseen & Hájos 2020). علاوه بر سیتوکنین‌ها، عصاره برگ مورینگا حاوی اکسین‌ها و سایر هورمون‌های گیاهی است که به تعادل هورمونی گیاه کمک می‌کنند. این تعادل هورمونی باعث تحریک رشد سلولی، افزایش تقسیم سلولی و توسعه بهتر بافت‌های گیاه می‌شود که در نتیجه وزن گیاهچه افزایش می‌یابد همچنین ترکیبات موجود در عصاره برگ مورینگا می‌توانند به بهبود کارایی فتوسنتز کمک کنند. این بهبود فتوسنتز باعث تولید بیشتر مواد غذایی و انرژی در گیاه می‌شود که به رشد بهتر و افزایش وزن منجر می‌شود. عصاره برگ مورینگا ممکن است باعث بهبود جذب مواد مغذی از محیط کشت شود. مواد مغذی بیشتر به معنای رشد بهتر و سریعتر گیاهچه‌ها است که در نهایت به افزایش وزن تر منجر می‌شود(Zulfiqar et al. 2020).

بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر درصد گیاهچه‌های آلوده: برطبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر عصاره مورینگا و زآتین بر درصد گیاهچه‌های آلوده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین در این تحقیق نشان داد که با اعمال عصاره مورینگا با غلظت‌های مختلف درصد آلودگی گیاهچه‌های ارکیده به صفر رسید (شکل ۹-A).

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس عصاره مورینگا و زاتین بر درصد گیاهچه‌های زنده، آلوده و قهوه‌ای گیاه ارکیده فالانوپسیس

Table 5. The results of ANOVA of Moringa and zeatin extract on the percentage of live, brown, and contaminated seedlings of Phalaenopsis orchid plant

منابع تغییرات S.O. V	درجه آزادی Df	Mean of square میانگین مربعات		
		درصد گیاهچه‌های زنده Live seedling (%)	درصد گیاهچه‌های قهوه‌ای Brown seedling (%)	درصد گیاهچه‌های آلوده Contaminated seedling (%)
تیمار (Treatment)	10	636.34**	636.48**	654.43**
خطای آزمایش Error	33	202.04	202.07	176.73
ضریب تغییرات C.V. (%)	-	18.61	15.38	19.99



شکل ۹. نتایج مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای مختلف عصاره مورینگا و زآتین بر درصد گیاهچه‌های آلوده (A)، قهوه‌ای (B) و زنده (C) گیاه ارکیده فالانوپسیس. C (شاهد: عدم ضدعفونی) Z_1، Z_2، Z_3، Z_4 و Z_5 (زآتین ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) و M_1، M_2، M_3، M_4 و M_5 (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر). میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است

Figure 9: Comparison results of the average effect of different treatments of moringa extracts and zeatin on the percentage of contaminated (A), brown (B) and live (C) seedlings of Phalaenopsis orchid. C (control: no sterilization) Z_1, Z_2, Z_3, Z_4 and Z_5 (Zeatin 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mg/L) and M_1, M_2, M_3, M_4 and M_5 (50, 100, 150, 200 and 250 mg/liter). The mean of similar letters does not have a significant difference at the five percent probability level. Error bar indicates standard error

درصد ریزنمونه‌های آلوده میزان آلودگی را در همه ریزنمونه‌های کاشته شده نشان داد. وقوع آلودگی می‌تواند باعث مهار رشد یا مرگ ریزنمونه شود. میزان آلودگی با کاربرد غلظت‌های مختلف عصاره مورینگا در این تحقیق صفر درصد بود (شکل ۹-A). همسو با نتایج تحقیق (Segwatibe et al. 2023)، این مطالعه تیمار عصاره مورینگا آلودگی را به صفر درصد رساند (Mardiana & Sumarji 2021). عصاره برگ مورینگا دارای ترکیبات ضدمیکروبی قوی مانند ایزوتیوسیانات‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و اسیدهای فنلی هستند. این ترکیبات قادرند رشد و تکثیر باکتری‌ها و قارچ‌ها را مهار کنند. این خاصیت ضدمیکروبی کمک می‌کند تا میزان

آلودگی‌های میکروبی در محیط کشت کاهش یابد و گیاهچه‌ها از عفونت‌های میکروبی در امان بمانند عصاره برگ مورینگا حاوی مواد مغذی و آنتی اکسیدان‌هایی است که می‌توانند مقاومت طبیعی گیاه را در برابر عوامل بیماری‌زا افزایش دهند. افزودن عصاره برگ مورینگا به محیط کشت می‌تواند شرایط مطلوب تری را برای رشد گیاهچه‌ها فراهم کند (Sulistiani and Saraghi, 2024). ترکیبات موجود در عصاره ممکن است pH و سایر شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت را تنظیم کند که این امر می‌توان باعث کاهش رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های مضر شود (Jikah & Edo 2023). ترکیبات مختلف موجود در عصاره برگ مورینگا ممکن است به‌صورت سینرژیک عمل کنند و اثرات ضد باکتریایی و ضدقارچی را تقویت کنند و این ترکیبات می‌توانند به‌طور همزمان روی چندین مسیر متابولیکی میکروارگانیسم‌ها تاثیر بگذارند و مانع از رشد آن‌ها شوند (Adelakun et al. 2024).

بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر درصد گیاهچه‌های قهوه‌ای: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر عصاره مورینگا و زآتین بر درصد گیاهچه‌های قهوه‌ای در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین نشان داد با اعمال افزایش غلظت تیمار، میزان قهوه‌ای کاهش یافت (شکل ۹–B). قهوه‌ای شدن در کشت بافت گیاهی به پدیده‌ای اطلاق می‌شود که در آن ریزنمونه‌ها در جریان تمایز زدایی و/یا تمایز مجدد، مواد یا فنولیک‌های قهوه‌ای رنگ را از بافت‌های خود به محیط آزاد می‌کنند. فنل‌ها ترکیبات شیمیایی هستند که طیف وسیعی از مواد گیاهی را در بر می‌گیرند که دارای یک حلقه معطر است که دارای یک یا چند ترکیب هیدروکسیل است (Sun & Shahrajabian 2023). قهوه‌ای شدن اکسیداتیو یک مشکل رایج در کشت بافت گیاهی است. منجر به کاهش رشد، نرخ‌های کمتر باززایی و در نهایت می‌تواند منجر به مرگ سلول/بافت/گیاه شود(Permadi et al. 2024). شیوع قهوه‌ای شدن بین گونه‌ها، ارقام و وضعیت فیزیولوژیکی گیاه/بافت متفاوت است، اما در بسیاری از موارد توانایی ما را برای دستکاری رشد و نمو گیاه به‌شدت محدود می‌کند. یکی از دلایل اصلی قهوه‌ای شدن در کشت آزمایشگاهی، زخم ناشی از برش بافت است. آسیب به بافت گیاهی باعث ایجاد تنش می‌شود و باعث افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیاک لیاز (FAL) می‌شود که به دنبال آن فعالیت آنزیم اکسیداز (PPO) و باعث قهوه‌ای شدن می‌شود (Amente and Chimdessa, 2021). در تحقیقات (Hutami 2008) تأیید شده است قهوه‌ای شدن در کشت آزمایشگاهی به‌دلیل تجمع ترکیبات فنلی آزاد شده یا سنتز شده توسط بافت رخ می‌دهد و هنگامی که سلول‌ها آسیب می‌بینند تحت اکسیداسیون قرار می‌گیرند. در تحقیقاتی کشت کالوس افرا و نارون کشت شده روی محیط‌های پایه هر دو قهوه‌ای شدن بافت را به درجات مختلف نشان دادند که *U. americana* بیشتر مستعد این مشکل بود (Jones and Saxena, 2013). در این پژوهش نتایج نشان داد که هیچ یک از ریزنمونه‌ها با اعمال عصاره مورینگا قهوه‌ای شدن را تجربه نکردند. عصاره برگ مورینگا حاوی اسید آسکوربیک می‌باشد که می‌تواند میزان قهوه‌ای شدن را کاهش دهد (Permadi et al. 2024). اسید آسکوربیک یک آنتی اکسیدان قوی است که می‌تواند از اکسیداسیون ترکیبات فنلی جلوگیری کند (Permadi et al. 2024). در فرآیند قهوه‌ای شدن، اکسیداسیون ترکیبات فنلی توسط آنزیم‌های مانند پلی فنل‌اکسیداز باعث تولید ملانین و سایر رنگدانه‌های قهوه‌ای می‌شود. با کاهش فعالیت این آنزیم‌ها از طریق اسید آسکوربیک، فرآیند قهوه‌ای شدن به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. عصاره موجود در عصاره برگ مورینگا می‌توانند به کاهش

فعالیت آنزیم‌های اکسیداز کمک کنند (Hassan et al. 2020). این کاهش فعالیت منجر به کاهش تولید رنگدانه‌های قهوه‌ای می‌شود. بنابراین عصاره برگ مورینگا به‌دلیل دارا بودن آنتی‌اکسیدان‌های قوی مانند اسید آسکوربیک، فلانوئیدها و سایر ترکیبات ضداکسیداسیون، می‌تواند به‌طور موثری از قهوه‌ای شدن کشت بافت گیاهان جلوگیری کنند (Farhat et al. 2023).

بررسی تاثیر عصاره مورینگا و زاتین بر درصد گیاهچه‌های زنده: براساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۵ اثر عصاره مورینگا و زآتین بر درصد گیاهچه‌های زنده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد. مشاهدات روی درصد گیاهچه‌های زنده از ابتدای کاشت تا پایان کاشت مورد بررسی قرار گرفت. مورینگا در تمامی غلظت‌های مورد نظر دارای گیاهچه‌های زنده بود. در تیمار مورینگا با غلظت‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۶-C). زنده ماندن گیاهچه‌ها در کشت بافت به شدت به وضعیت ریزنمونه‌ها، نوع و ترکیب محیط، و محتوای تنظیم کننده‌های رشد داده شده بستگی دارد. گفته می‌شود که گیاهان در صورتی زنده هستند که آلوده نباشند یا بتوانند ریشه‌ها یا شاخه‌های جدید تشکیل دهند و قهوه‌ای شدن دائمی را تجربه نکنند (Kilic & Uysal 2023). نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار مورینگا درصد بالایی از گیاهچه‌های زنده یعنی ۱۰۰ درصد تولید می‌کند. گیاهچه‌های زنده با گیاهچه‌هایی که آلودگی به شکل باکتری یا قارچ را تجربه نکردند و گیاهچه‌هایی که قهوه‌ای شدن یا قهوه‌ای شدن را تجربه نکردند، مقایسه شدند. در این مطالعه درصد آلودگی و قهوه‌ای شدن در تیمار عصاره مورینگا صفر بوده و از طرفی عصاره برگ مورینگا حاوی سیتوکنین و سایر مواد مغذی است، بنابراین این تیمار نسبت به سایر تیمارها دارای درصد گیاهچه‌های زنده بالاتری بودند. طبق گفته Rifai و همکاران (۲۰۲۰) رشد و توسعه ریزنمونه‌ها تحت تأثیر محیط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. افزودن تنظیم کننده‌های رشد و انتخاب ریزنمونه‌های با کیفیت بر توانایی بالای گیاهچه‌ها برای بقا تأثیر می‌گذارد (Nurjaman and Isnawan, 2020). در پژوهشی ریزنمونه‌های *Dendrobium nobile* روی محیط‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد آلی مانند عصاره برگ مورینگا رشد کردند (Mardiana & Sumarji 2021).

نتیجه‌گیری: کشت بافت امروزه، یک بازوی قوی برای تولید انبوه گیاهان زینتی است و به‌عنوان یک مکمل و در کنار کشت سنتی نقش ایفا می‌کند و در سال‌های اخیر رو به گسترش بوده است. نتایج نشان داد که انتخاب استریل‌سازی مناسب و استفاده از ترکیب قارچ‌کش بنومیل و کلرید جیوه در روش چهارم، به‌طور قابل توجهی آلودگی‌های قارچی را حذف کرده و شرایط بهینه برای رشد گیاهچه‌ها را فراهم می‌کند و این روش استریل‌سازی (S_4) به همراه جهت عمودی ریزنمونه (D_2)، بالاترین درصد باززایی و کمترین میزان آلودگی را داشت. افزایش ارتفاع، تعداد ریشه، تعداد و طول برگ و زیست توده گیاهچه‌ها در تیمارهای حاوی عصاره مورینگا با غلظت‌های مختلف، به‌ویژه ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر، به‌طور معنی‌داری مشاهده شد. این عصاره علاوه بر بهبود رشد، به‌طور کامل آلودگی‌های گیاهچه‌ها را نیز کاهش داد و درصد آلودگی‌ها به صفر رسید. بنابراین، ترکیب روش‌های بهینه استریل‌سازی و استفاده از عصاره مورینگا در محیط کشت می‌تواند به‌طور موثری عملکرد کشت درون شیشه‌ای را بهبود بخشد و منجر به گیاهچه‌های سالم و با رشد مطلوب شود.

سپاسگزاری: از داوران محترم به‌خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

References

Abdalla MM (2013) The potential of Moringa oleifera extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. sativa) plants. Int J Plant Physiol Biochem 5**,** 42-49.

Adelakun AO, Awosika A, Adabanya U, et al. (2024) Antimicrobial and Synergistic Effects of *Syzygium cumini*, *Moringa oleifera*, and *Tinospora cordifolia* Against Different Candida Infections. Cureus 16, e52857.

Adugna AY, Feyissa T, Tasew FS (2020) Optimization of growth regulators on in vitro propagation of *Moringa stenopetala* from shoot explants. BMC Biotechnol 20**,** 1-10.

Ahmadi E, Nasr SMH, Jalilvand H, et al. (2012) Contamination control of microbe *Ziziphus spina* [christti] seed in vitro culture. Trees 26**,** 1299-1304.

Altan F, Bürün B, Sahin N (2010) Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. Afr J Biotechnol 9**,** 991-995.

Amente G, Chimdessa E (2021) Control of browning in plant tissue culture: A review. J Sci Agric 5**,** 67-71.

Arif A, Jamil A, Munir A, et al. (2024) Regulatory, ethical, and social aspects of CRISPR crops. In: CRISPRized Horticulture Crops. Elsevier. pp. 439-470.

Basra SM, Lovatt CJ (2016) Exogenous applications of moringa leaf extract and cytokinins improve plant growth, yield, and fruit quality of cherry tomato. Hort Technology 26**,** 327-337.

Bhatti SK, Thakur M (2022) An overview on orchids and their interaction with endophytes. Bot Rev 88**,** 485-504.

Bošnjak Mihovilović A, Kereša S, Lazarević B, et al. (2024) The Use of Sodium Hypochlorite and Plant Preservative Mixture Significantly Reduces Seed-Borne Pathogen Contamination When Establishing In Vitro Cultures of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds. Agriculture 14**,** e556.

Brar MS, Al-Khayri JM, Klingaman GL (1995) Effect of thidiazuron and benzylaminopurine on in vitro shoot proliferation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). J Arkansas Acad Sci 49**,** 30-33.

Cardoso JC, Sheng Gerald LT, Teixeira da Silva JA (2018) Plant cell culture protocols (4st edn). Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo M (eds). Humana, US. pp 17-46.

Cardoso JC, Zanello CA, Chen J-T (2020) An overview of orchid protocorm-like bodies: Mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. Int J Mol Sci 21**,** e985.

Cassells AC (2012) Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. Mol Biol 887, 57-80.

Chashmi KA, Omran VOG, Ebrahimi R, et al. (2023) In-Vitro Elicitation of Phalaenopsis pulcherrima Leaf Explants Using Melatonin, Salicylic Acid and Methyl Jasmonate for PLBs Induction and Anthocyanin Production. Biol Bull 50**,** 379-389.

da Silva JAT, Chan M-T, Chai M-L, et al. (2006) Priming abiotic factors for optimal hybrid Cymbidium (Orchidaceae) PLB and callus induction, plantlet formation, and their subsequent cytogenetic stability analysis. Sci Hortic 109**,** 368-378.

da Silva JAT, Winarto B, Dobránszki J, et al. (2016) Tissue disinfection for preparation of culture. Folia Hortic 28**,** 57-75.

Darras AI (2020) Implementation of sustainable practices to ornamental plant cultivation worldwide: A critical review. Agron 10**,** e1570.

De L, Khan AM, Kumar R, et al. (2014) Orchid farming-a remunerative approach for farmers livelihood. Int J Sci Res 3**,** 468-471.

Eed AM, Reddy SA, Reddy KM, et al. (2010) Effect of antibiotics and fungicides on the in vitro production of Citrus limonia Osbeck nodal segment and shoot tip explants. Asian J Plant Sci 4**,** 66-70.

Elzaawely AA, Ahmed ME, Maswada HF, et al. (2017) Enhancing growth, yield, biochemical, and hormonal contents of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprayed with moringa leaf extract. Arch Agron Soil Sci 63**,** 687-699.

Farhat F, Ashaq N, Noman A, et al. (2023) Exogenous application of Moringa leaf extract confers salinity tolerance in sunflower by concerted regulation of antioxidants and secondary metabolites. J Soil Sci Plant Nutr 23**,** 3806-3822.

Grzegorczyk-Karolak I, Kuźma Ł, Wysokińska H (2015) The effect of cytokinins on shoot proliferation, secondary metabolite production and antioxidant potential in shoot cultures of Scutellaria alpina. Plant Cell Tissue Organ Cult 122**,** 699-708.

Hala H, El-Noor A, Ewais N (2017) Effect of *Moringa oleifera* leaf extract (MLE) on pepper seed germination, seedlings improvement, growth, fruit yield and its quality. Middle East J Agric Res 6**,** 448-463.

Haldeman J, Thomas R, McKamy D (1987) Use of benomyl and rifampicin for in vitro shoot tip culture of Camellia sinensis and C. japonica. Hort Sci 22**,** 306-307.

Hashim SN, Ghazali SZ, Sidik NJ, et al. (2021) Surface sterilization method for reducing contamination of *Clinacanthus nutans* nodal explants intended for in-vitro culture. 1st International Conference on Assessment and Development of Agricultural Innovation. Volume 306, July. 5-6, 2021. Bogor, Indonesia. 01004 (Abstract).

Hassan F, Mazrou R, Gaber A, et al. (2020) Moringa extract preserved the vase life of cut roses through maintaining water relations and enhancing antioxidant machinery. Postharvest Biol Technol 164**,** e111156.

Hassan MU, Chattha MU, Khan I, et al. (2021) Heat stress in cultivated plants: Nature, impact, mechanisms, and mitigation strategies-A review. Plant Biosyst 155**,** 211-234.

Hutami S (2008) Ulasan masalah pencoklatan pada kultur jaringan. J Agro Biogen 4**,** 83-88.

Hsu CC, Chen SY, Chiu SY, et al. (2022). High-density genetic map and genome-wide association studies of aesthetic traits in Phalaenopsis orchids. Sci Rep 12, e3346.

Iqbal MA (2014) Role of moringa, brassica and sorghum water extracts in increasing crops growth and yield: A Review. Am Eurasian J Agric Environ Sci 14**,** 1150-1158.

Islam Z, Islam SR, Hossen F, et al. (2021) *Moringa oleifera* is a prominent source of nutrients with potential health benefits. Int J Food Sci 2, e11.

Jikah AN, Edo GI (2023) *Moringa oleifera*: a valuable insight into recent advances in medicinal uses and pharmacological activities. J Sci Food Agric 103, 7343-7361.

Kasutjianingati RP, Khumaida N, Efendi D (2010) Kemampuan pecah tunas dan kemampuan berbiak mother plant pisang Rajabulu (AAB) dan pisang Tanduk (AAB) dalam medium inisiasi in vitro. Agriplus 20**,** 09-17.

Khoddamzadeh AA, Sinniah U, Kadir M, et al. (2011) In vitro induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson. Plant Growth Regul 65**,** 381-387.

Kilic MU, Uysal H (2023) Establishment of In Vitro Cultures and Investigation of Micropropagation Possibilities in Shoot Tip Explants of Different Mastic Tree (*Pistacia lentiscus* L.) Genotypes. Biol Bull 50**,** 931-945.

Leelavathy S, Sankar PD (2016) Curbing the menace of contamination in plant tissue culture. J Pure Appl Microbiol 10, 2145-2152.

Leifert C, Morris CE, Waites WM (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems in vitro. Crit Rev Plant Sci 13**,** 139-183.

Li D-W, Yang CS (2004) Fungal contamination as a major contributor to sick building syndrome. Adv Appl Microbiol 55**,** 31-112.

Liu Y, Liu Y, He Y, et al. (2023) Cytokinin-inducible response regulator SlRR6 controls plant height through gibberellin and auxin pathways in tomato. J Exp Bot 74**,** 4471-4488.

Mamo B, Feyissa AM, Mengesha T, et al. (2024) Association between cognitive impairment and antiseizure medication adherence among people with epilepsy in Addis Ababa, Ethiopia. Epilepsy Behav 152**,** e109651.

Mardiana Y, Sumarji S (2021) Utilization of Moringa Leaves to Improve the Quality of Orchid Explants Through Tissue Culture Techniques. In: Prosiding Seminar. pp. 1-12.

Mazzoni-Putman SM, Brumos J, Zhao C, et al. (2021) Auxin interactions with other hormones in plant development. Cold Spring Harb Perspect Biol 13**,** a039990.

Mehbub H, Akter A, Akter MA, et al. (2022) Tissue culture in ornamentals: Cultivation factors, propagation techniques, and its application. Plants 11**,** e3208.

Mehle N, Ravnikar M (2012) Plant viruses in aqueous environment–survival, water mediated transmission and detection. Water Res 46**,** 4902-4917.

Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Pol J Environ Stud 4, 523-530.

Mng'omba SA, du Toit ES, Akinnifesi FK, et al. (2012) Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. InTech Open Access Publisher.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473 - 497

Ng C-Y, Saleh NM (2011) In vitro propagation of Paphiopedilum orchid through formation of protocorm-like bodies. Plant Cell Tissue Organ Cult 105**,** 193-202.

Niedz RP, Bausher MG (2002) Control of in vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. In Vitro Cell Dev Biol Plant 38**,** 468-471.

Olson JL, Atala A, Yoo JJ (2011) Tissue engineering: current strategies and future directions. Chonnam Med J 47**,** 1-13.

Orlikowska T, Nowak K, Reed B (2017) Bacteria in the plant tissue culture environment. In Vitro Cell Dev Biol Plant 128**,** 487-508.

Park S-Y, Huh Y-S, Paek K-Y. Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols**,** Lee Y, Tak Yeung E (eds)**,** Humana, US. pp. 179-193.

Permadi N, Akbari SI, Prismantoro D, et al. (2024) Traditional and next-generation methods for browning control in plant tissue culture: Current insights and future directions. Curr Plant Biol 38, 1-15.

Rady MM, Mohamed GF (2015) Modulation of salt stress effects on the growth, physio-chemical attributes and yields of *Phaseolus vulgaris* L. plants by the combined application of salicylic acid and *Moringa oleifera* leaf extract. Scientia Horti 193**,** 105-113.

Raha S, Ahmaruzzaman M (2022) ZnO nanostructured materials and their potential applications: progress, challenges and perspectives. Nanoscale Adv 4**,** 1868-1925.

Rathnayaka R, Herath H, Mubarak A, et al. (2023) Exploring the potential use of *Moringa olifera* Lam and *Azadirachta indica* additives in Orchid tissue culture. Sri Lanka J Technol 1, 1-5.

Ren H, Zhao X, Li W, et al. (2021) Calcium signaling in plant programmed cell death. Cells 10**,** e1089.

Romano A, Noronha C, Martins-Loução M (1992) Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. Ann Bot 70**,** 531-536.

Ružić Đ, Vujović T (2008) The effects of cytokinin types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). Hortic Sci 35**,** 12-21.

Saptaria L, Setyawan WH (2021) Desain pembelajaran technopreneurship untuk meningkatkan motivasi berwirausaha mahasiswa uniska kediri. Prima Magistra: J Ilmiah Kependidikan 2**,** 77-89.

Schäfer M, Brütting C, Meza-Canales ID, et al. (2015) The role of cis-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. J Exp Bot 66**,** 4873-4884.

Segwatibe MK, Cosa S, Bassey K (2023) Antioxidant and antimicrobial evaluations of *Moringa oleifera* Lam leaves extract and isolated compounds. Molecules 28**,** 899.

Shen J, Yuan L, Zhang J, et al. (2011) Phosphorus dynamics: from soil to plant. Plant Physiol 156**,** 997-1005.

Singh VK, Singh Y, Singh A (2012) Eco-friendly innovative approaches in plant disease management (1st edn)**,** International Book Distributors, India, pp. 543-572.

Siregar A, Harahap F, Idramsa I, et al. (2023) The Effect of NAA and BAP in Induction of Protocorm Like Bodies (PLB) Cattleya sp. Orchid In Vitro. In: Proceedings of the 8th Annual International Seminar on Transformative Education and Educational Leadership, AISTEEL 2023, 19 Sept 2023, Medan, North Sumatera Province, Indonesia.

Smith RH (2013) Plant tissue culture: techniques and experiments (3rd edn). Academic press, Cambridge, US, pp.167-171.

Soudagar MEM, Shelare S, Marghade D, et al. (2024) Optimizing IC engine efficiency: A comprehensive review on biodiesel, nanofluid, and the role of artificial intelligence and machine learning. Energy Conv Manag 307**,** e118337.

Subramanian P, Anandharamakrishnan C (2023) Extraction of bioactive compounds. In: Industrial Application of Functional Foods, Ingredients and Nutraceuticals. Elsevier. pp. 45-87.

Suminar E, Anjarsari IRD, Nuraini A, et al. (2015) Pertumbuhan dan perkembangan tunas nilam var. Lhoukseumawe dari jenis eksplan dengan sitokinin yang berbeda secara in vitro. Kultivasi 14, 10-15.

Sun W, Shahrajabian MH (2023) Therapeutic potential of phenolic compounds in medicinal plants-Natural health products for human health. Molecules 28**,** e1845.

Tyagi VSA, Chauhan P, Kumari P, et al. (2011) Identification and prevention of bacterial contimination on explant used in plant tissue culture labs. Alcohol 3**,** 0-722.

Untari R, Puspitaningtyas D (2006) Pengaruh bahan organik dan NAA terhadap pertumbuhan anggrek hitam (*Coelogyne pandurata* L.) dalam kultur in vitro. Biodivers 7**,** 344-348.

van Tongerlo E, van Ieperen W, Dieleman JA, et al. (2021) Vegetative traits can predict flowering quality in Phalaenopsis orchids despite large genotypic variation in response to light and temperature. Plos One 16**,** e0251405.

Yam TW, Arditti J (2018) Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols. Lee Y, Tak Yeung E (eds)**,** Humana, US. pp.151-178.

Yaseen A, Hájos MT (2020) Study on moringa tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaf extract in organic vegetable production: A review. Res Crop 21**,** 402-414.

Yasmeen A, Nouman W, Basra SMA, et al. (2014) Morphological and physiological response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to natural and synthetic cytokinin sources: a comparative study. Acta Physiol Plant 36**,** 3147-3155.

Yonzone R, Lama D, Bhujel R, et al. (2012) Orchid species diversity of Darjeeling Himalaya of India. Int J Pharm Sci 3, 1533-1550.

Yuniati N, Kusumiyati K, Mubarok S, et al. (2022) The role of moringa leaf extract as a plant biostimulant in improving the quality of agricultural products. Plants 11**,** e2186.

Zahara M, Datta A, Boonkorkaew P, et al. (2017) The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of Phalaenopsis hybrid'Pink'. Braz Arch Biol Technol 60, 1-15.

Zulfiqar F, Casadesús A, Brockman H, et al. (2020) An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. Plant Sci 295**,** e110194.