فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱۳، شماره ۶۰، خرداد و تیرماه ۱۴۰۳ صفحه: ۲۲۳-۲۳۴
https://doi.org/10.22034/13.60.223

مقاله پژوهشی

# ارزیابی اثر محیط‌کشت و ترکیبات هورمونی مختلف بر پارامترهای درون شیشه‌ای در طی ریزازدیادی ارکیده وانیلی (*Vanilla planifolia*)

یوسف فرخ‌زاد[۱]، مهناز سلاطین[۲] و شهرام جعفرنیا*[۲]

[۱] مرکز تحقیقات پیشرفته و توسعه امور نخبگان، سازمان اتکا، تهران، ایران

[۲] گروه گیاهان دارویی، هلدینگ مزارع مدرن ایرانیان، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۹/۱۳)

## چکیده

**در این مطالعه یک روش کارآمد و ساده برای ریزازدیادی ارکیده وانیلی (*Vanilla planifolia*) که یک گیاهی ادویه‌ای- زینتی ارزشمند است توسعه داده شد. ریزنمونه‌های میانگره شاخه پس از فرآیند ضدعفونی روی هشت محیط‌کشت شامل MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ؛ MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin؛ MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ ۱/۲MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ؛ ۱/۲MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ ۱/۲MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin؛ ۱/۲MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مستقر شدند. تیمارها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار آرایش یافتند و هر ماه یکبار واکشت انجام شد. پس از سه ماه و اتمام مرحله ریزافزایی صفات مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که روی محیط 1/2MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA و 1/2MS+2 mg/l Kin+0.5 mg/l NAA بیشترین میزان زنده‌مانی ریزنمونه (۹۱ درصد) و شاخه‌زایی رخ می‌دهد. با این حال، محیط 1/2MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA منجر به بیشترین تعداد برگ، وزن تر و درصد وزن خشک نیز شد و همچنین بالاترین تعداد ریشه و وزن تر ریشه نیز روی این محیط مشاهده شد. طول گیاهچه‌های ریزافزایی شده مستقر روی محیط‌کشت MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA بیشتر از سایر محیط‌های کشت بود. به‌طورکلی، براساس نتایج بدست آمده محیط 1/2MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA برای ریزازدیادی ارکیده وانیلی پیشنهاد می‌شود.**

**واژه‌های کلیدی: ارکیده‌ی وانیلی، ریزازدیادی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، کشت‌بافت گیاهی**

## مقدمه

ارکیده وانیلی (*Vanilla planifolia* L.) یک گونه گیاهی چند ساله از تیره ثعلب‌سانان (Orchidaceae) است (Ramachandra Rao and Ravishankar, 2000). اگر چه ارکیده‌ها به دلیل زیبایی گل‌هایشان ارزش تجاری بالایی دارند، اما اهمیت اقتصادی گونه وانیل به دلیل داشتن وانیلین (۴-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزآلدئید) که پس از عمل‌آوری و خشک‌شدن غلاف‌ها (وانیل) با هدف افزایش طعم و مزه به دست می‌آید، بسیار بیشتر است. عصاره وانیل حاوی حدود ۱/۵ درصد وانیلین است و به عنوان یک عامل ضدمیکروبی افزون بر استفاده در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی و عطرسازی کاربرد وسیعی دارد (de Oliveira *et al.*, 2013).

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: sh.jafarnya@gmail.com

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]

در هند مساحت کل برای کشت وانیل حدود ۲۵۴۵ هکتار است (Anilkumar, 2004). در برزیل، تولید وانیل هنوز در مراحل اولیه است، اگر چه شرایط آب و هوایی و خاک مناسب برای رشد وانیل را دارد. به‌طورکلی، در برزیل، بازار نهال به دلیل عملکرد کم تکنیک‌های تکثیر کلونال معمولی تقریباً ناپدید می‌شود (de Oliveira *et al*., 2013). پژوهشگران دانشگاه واخنینگن هلند در حال همکاری با جامعه تجاری در ارتباط با کشت ارکیده وانیلی در گلخانه هستند. آنها امیدوار هستند که کشت کنترل‌شده در گلخانه‌ها امکان تولید وانیل با کیفیت را فراهم کرده به‌طوری‌که محتوای وانیلین کاهش پیدا نکند (van Noort, 2017). در امارات متحده عربی طرح‌هایی تحقیقاتی با هدف تولید وانیل در گلخانه در حال اجراست. اخیراً در یک ارزیابی در امارات متحده عربی که توسط Rahman و همکاران (۲۰۱۹) منتشر شده است نشان داده شد که از ۲۰ کیلوگرم غلاف تازه بعد از عمل‌آوری و خشک‌کردن ۴ کیلوگرم غلاف فرآوری‌شده در طی کشت گلخانه‌ای به دست می‌آید که عملکردی اقتصادی محسوب می‌شود. این گزارش می‌افزاید که از محیط کنترل‌شده می‌توان برای کشت وانیل در سایر نقاط امارات متحده عربی و سایر کشورهای شورای همکاری خلیج‌فارس استفاده کرد. با توجه به اینکه کشورهای مختلف در پی توسعه کشت گلخانه‌ای وانیل به عنوان یک محصول با ارزش افزوده بالا هستند گسترش پژوهش‌ها در راستای تولید انبوه ریزافزونه‌های گیاهی سالم، کسب دانش تولید گلخانه‌ای و سازگار کردن این محصول در کشورمان ضرورت دارد.

تقاضای زیاد برای وانیلین طبیعی منجر به گسترش سطح زیرکشت *V. planifolia* شده است که به نوبه خود منجر به تقاضای بالا برای انبار کاشت *V. planifolia* شده است. وانیل طبیعی استخراج‌شده از غلاف‌های وانیل عمدتاً به صورت طعم‌دهنده در کیک‌ها، بستنی‌ها و نوشابه‌ها و در صنایع آرایشی و بهداشتی و عطرسازی استفاده می‌شود (Retheesh and Bhat, 2011). به‌طور رایج از عصاره آن برای ایجاد عطر متمایز در دسرها و کاهش مقادیر مورد نیاز شیرین‌کننده استفاده می‌شود (Berenstein, 2016). ماداگاسکار، اندونزی، چین و مکزیک تولیدکنندگان اصلی دانه‌های وانیل طبیعی هستند (Baqueiro and Guerrero, 2017) که در واقع دارای متوسط دمای گرم، نور خورشید غیرمستقیم و رطوبت بالا هستند (Rahman *et al*., 2019). در حال حاضر وانیل پس از زعفران و هل سومین ادویه گران قیمت جهان است (Azeez, 2008) با این حال این محصول نسبت به زعفران عملکرد بیشتری در واحد سطح دارد.

از آنجا که بذور این گیاه به ندرت جوانه‌زنی دارند (Palama *et al*., 2010) لذا ازدیاد این گیاه عمدتاً به طریق قلمه ساقه است (Retheesh and Bhat, 2011). با این حال قلمه‌زنی یک فرآیند زمان‌بر بوده که نیروی کار زیادی می‌طلبد (Mengesha *et al*., 2012) یک روش اقتصادی نبوده و جمع‌آوری قلمه از گیاه مادری سبب کاهش رشد و عملکرد گیاهان مادری می‌شود (Palama *et al*., 2010). بنابراین ازدیاد از طریق کشت‌بافت گیاهی یا روش ساده برای تولید گیاهچه‌ها و افزونه‌های ازدیادی در مقیاس گسترده محسوب می‌شود. همچنین در کشورهایی نظیر ایران که این گیاه سابقه کشت ندارد و دسترسی به گیاهان مادری وجود ندارد تولید گیاهان از طریق کشت‌بافت برای اهداف تحقیقاتی- تجاری می‌تواند امیدوارکننده باشد.

گزارش‌های مختلفی در مورد توسعه پروتکل ریز ازدیادی ارکیده وانیلی وجود دارد. Ramirez-Mosqueda و Lglesias-AAndreu (۲۰۱۷) بهترین انباشت زیست‌توده را طی کشت سوسپانسیون سلولی روی محیط Murashige و Skoog (۱۹۶۲) مایع که با ۸/۸۸ میکرومولار BA تکمیل شده بود مشاهده کردند. در یک گزارش نشان داده شد که استفاده از ۵/۴ میکرومولار نفتالین استیک اسید و ۴/۵ میکرومولار تیدیازرون باعث القا موفق اجسام پروتوکورم مانند از ریزنمونه‌های گلچه‌های ساقه گل‌دهنده از ارکیده فالائنوپسیس می‌شود (Vendrame, and Maguire, 2007). در یک مطالعه Tan و همکاران (۲۰۱۱) باززایی گیاهچه از کالوس مشتق‌شده از برگ و میانگره ساقه در وانیل را مورد ارزیابی

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]

قرار دادند. یافته‌های آنها نشان داد که محیط MS کامل محتوای ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین شاخه (۴/۲ شاخه به ازای هر ریزنمونه) باززایی می‌شود. محیط‌کشت پایه MS غنی‌شده با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۹/۵۵ میکرومولار بنزیل‌آدین به همراه بکارگیری سیستم تعلیق موقت به عنوان گزینه مناسبی برای تولید بیشترین شاخه، وزن تر و خشک و زنده‌مانی بعد از سازگاری برای ازدیاد درون شیشه‌ای ارکیده وانیلی معرفی شده است (Ramirez-Mosqueda and Bello-Bello, 2021). Niknejad و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده کردند که بهترین ترکیب هورمونی برای برای تولید بهینه کالوس و اجسام پروتوکورم مانند ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازرون و ۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید است. در پژوهش دیگری محیط‌کشت MS غنی‌شده با ۹/۵۵ میکرو مولار بنزیل آدنین به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر آب نارگیل در سیستم تعلیق موقت ( با فروبری ۲ دقیقه‌ای به ازای هر چهار ساعت) به عنوان مؤثرترین تیمار برای ریزازدیادی وانیل معرفی شد ( Ramos-Castella *et al.*, 2014). اخیراً در یک مطالعه با هدف توسعه ریزازدیادی ارکیده وانیلی نشان داده شد که بیشترین پرآوری شاخه و تولید گیاهانی با کیفیت از نظر فیزیولوژیک روی محیط‌کشت MS مایع حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر متاتوپولین و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Manokari *et al.*, 2021).

هدف ما از این مطالعه توسعه یک پروتکل ساده و کارآمد در زمینه ریزافزایی و تولید ریزافزونه‌های وانیل در مقیاس وسیع از شیشه‌کشت تا مرحله سازگاری برون شیشه‌ای است. برای این منظور ریزنمونه‌های میانگره روی هشت محیط‌کشت با تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف کشت و در نهایت شاخه‌زایی و کیفیت گیاهچه‌های باززایی‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** گیاهان ارکیده وانیلی رقم "Bourbon-Madagascar" (۱۵ نشاء) از شرکت کشت‌بافت مزرعه نوین ایرانیان واقع در ورامین تهیه شدند. سپس گیاهان به مدت دو ماه در یک گلخانه کوچک با شدت نور متوسط ۸۰ تا ۱۰۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه روی یک سکوی فلزی با ارتفاع ۵۰ سانتی‌متری قرار گرفتند. دمای داخل گلخانه ۳±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵±۸۰ درصد نگه‌داری و با محلول غذایی ۲ در هزار NPK آبیاری شدند. گیاهان به فاصله هر سه هفته یکبار به منظور کاهش آلودگی‌های قارچی در طی نمونه‌گیری برای کاشت در ظروف کاشت، گیاهان با قارچکش مانکوزب (۲ در هزار) محلول‌پاشی شدند.

**ضدعفونی و آماده‌سازی ریزنمونه:** بعد از دو ماه پیش‌تیمار گیاهان با قارچکش مانکوزب، جهت کاهش آلودگی‌های قارچی، نمونه‌گیری از بافت میانگره‌های ساقه انجام شد. بعد از نمونه‌گیری، ریزنمونه‌ها (ریزنمونه‌های میانگره) در مایع ظرفشویی پنج دقیقه شیک و سه بار با آب مقطر آبکشی شدند. در ادامه ریزنمونه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (حاوی کلر فعال ۲/۵ درصد) و چند قطره توئین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر گذاشته شدند و سپس با آب‌مقطر اتوکلاو شده در زیر هود سه بار آبکشی شدند. در ادامه ریزنمونه‌ها به مدت یک دقیقه با الکل اتانول ۷۰ درصد تیمار و با آب‌مقطر دیونیزه سه بار شسته شدند.

**مرحله استقرار:** در این مرحله همه ریزنمونه‌های ضدعفونی‌شده و استریل روی محیط MS جامد بدون هورمون قرار گرفتند. هدف از این مرحله ترمیم زخم بافت‌ها، تشخیص اولیه آلودگی‌ها، سازگاری به محیط درون شیشه‌ای و کاهش مصرف تنظیم‌کننده‌های رشد بود. بعد از یک ماه کاشت، ریزنمونه‌های سالم و بدون آلودگی (کمتر از ۵ درصد آلودگی مشاهده شد) روی محیط‌های با ترکیبات هورمونی مختلف (تیمارها) جهت پرآوری و القاء شاخساره منتقل شدند.

**مرحله شاخه‌زایی و ریشه‌زایی:** محیط پرآوری شاخه محیط MS (۱۹۶۲) با قدرت کامل و قدرت نصف بود که با ترکیبات هورمونی مختلف تکمیل شده بودند که شامل هشت محیط‌کشت می‌شد که در جدول ۱ به آن اشاره شده است. هر ظرف کشت حاوی حدود ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت بود. این محیط‌های کاشت با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز، ۱ میلی‌گرم

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]

**جدول ۱- انواع محیط‌کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده جهت ریزافزایی ارکیده وانیلی**

| نام محیط‌کشت | نوع محیط‌کشت | ترکیب هورمونی |
|---|---|---|
| $T_1$ | MS | 2 mg/l TDZ |
| $T_2$ | MS | 2 mg/l TDZ+0/5 mg/l NAA |
| T3 | MS | 2 mg/l Kin |
| $T_4$ | MS | 2 mg/l Kin+ 0/5 mg/l NAA |
| $T_5$ | 1/2MS | 2 mg/l TDZ |
| $T_6$ | 1/2MS | 2 mg/l TDZ+0/5 mg/l NAA |
| $T_7$ | 1/2MS | 2 mg/l Kin |
| $T_8$ | 1/2MS | 2 mg/l Kin+ 0/5 mg/l NAA |

**TDZ**: تیدیازرون، **NAA**: نفتالین استیک اسید و **Kin**: کینتین

در لیتر تیامین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول و ۷/۵ گرم در لیتر آگار تکمیل شد و اسیدیته محیط‌های کاشت قبل از افزودن آگار روی ۵/۸ تنظیم شد. پس از بسته‌شدن آگار و هم دما شدن ظروف کاشت با محیط آزمایشگاه، درون هر ظرف پنج ریزنمونه کشت شد. کشت‌ها تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تا اتمام مرحله پرآوری شاخه (سه ماه بعد از کاشت) قرار گرفته و هر ماه یکبار نیز واکشت انجام شد. با توجه به اینکه ریشه‌زایی در این مرحله نیز ملاحظه شد این صفت نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از مرحله پرآوری صفاتی نظیر تعداد شاخه، طول شاخه، طول برگ، تعداد برگ، وزن تر شاخه، وزن خشک شاخه، میزان زنده‌مانی ریزنمونه، تعداد ریشه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه، مورد ارزیابی قرار گرفت. در جدول ۱ انواع محیط‌کشت مورد مطالعه و تنظیم کننده‌های رشد اضافه‌شده به هر محیط‌کشت ارائه شده است.

این مطالعه بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد که هر تکرار نماینده میانگین سه ریزنمونه بود. داده‌های این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. نمودارها نیز توسط اکسل ۲۰۱۳ رسم شد.

## نتایج

این مطالعه با هدف توسعه یک پروتکل ساده و ارزان برای ریزازدیادی ارکیده وانیلی انجام شد. هدف ما عدم استفاده از ترکیبات پیچیده نظیر آب نارگیل بود زیرا که ویژگی‌های بیوشیمیایی این ترکیبات بعد از مدتی تغییر می‌کند، نسبتاً گران بوده و دسترسی همیشگی نسبت به آنها وجود ندارد.

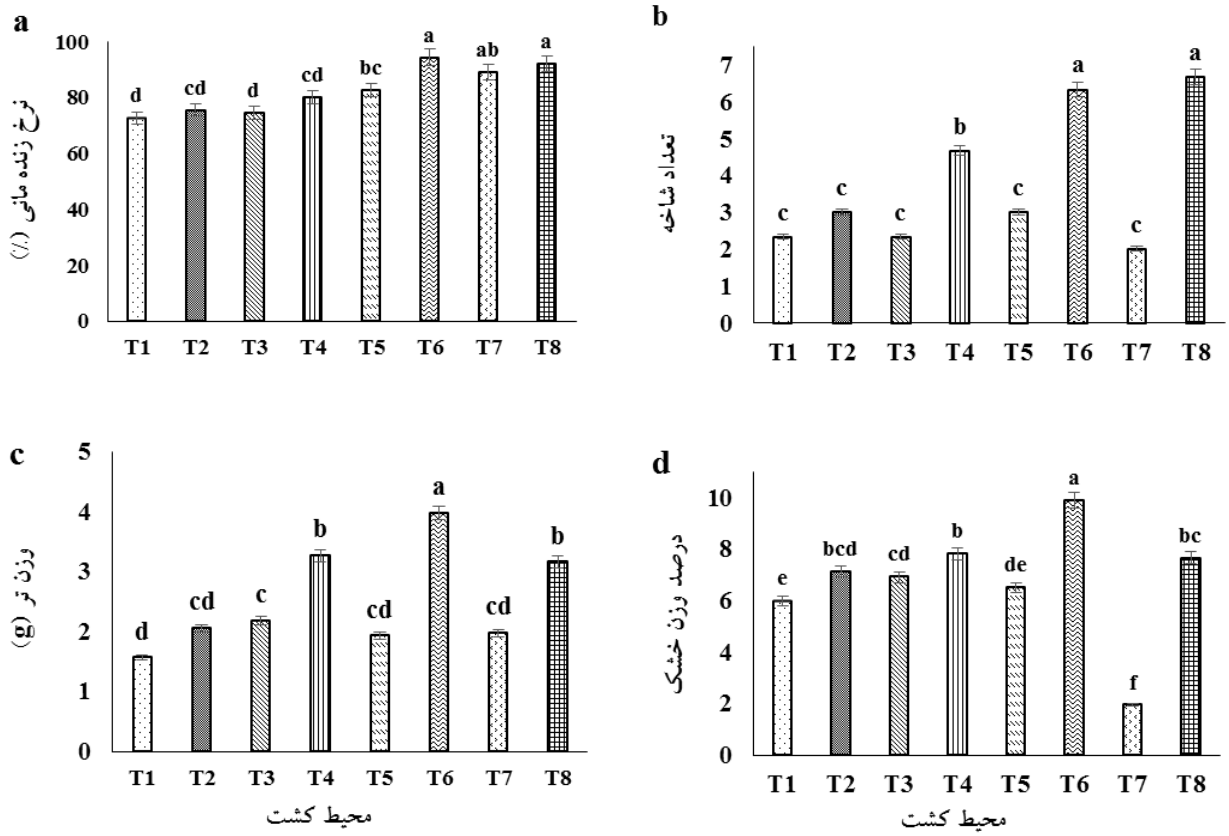
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر نوع محیط‌کشت بر میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۱$) بود. روی محیط T6 و T8 بیشترین نرخ زنده‌مانی ریزنمونه ثبت شد که البته با محیط T7 تفاوت معنی‌دار نبود (شکل 1a). کمترین نرخ زنده‌مانی ریزنمونه در طی ریز ازدیادی مربوط به محیط‌های کشت T1 و T3 بود. همان‌گونه که آنالیز تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد اثر محیط‌کشت بر تعداد شاخه (شاخه‌زایی) معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۱$) بود. همان‌گونه که در شکل b ۱ ارائه شده است بیشترین تعداد شاخه به ترتیب روی محیط T8 و T6 ملاحظه شد. پاسخ شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها روی محیط‌های T7، T3، T1، T2 و T5 کمتر بود. پاسخ وزن تر و وزن خشک شاخساره‌های باززایی‌شده به نوع محیط‌کشت نیز بررسی شد. همان‌گونه که در جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) ارائه شده است پاسخ وزن تر و درصد وزن خشک به نوع محیط‌کشت در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. به‌طوری‌که بیشترین وزن تر روی محیط‌کشت T6 ثبت شد و کمترین وزن تر روی محیط‌کشت T1 مشاهده شد (شکل 1c). درصد وزن خشک نیز روی محیط‌کشت T6 نسبت به سایر محیط‌های کشت بیشتر بود. با این حال کمترین وزن خشک روی محیط T7 مشاهده شد (شکل 1d).

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]

**جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر صفات درون شیشه‌ای ارکیده وانیلی**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | وزن خشک ریشه | وزن تر ریشه | تعداد ریشه | نرخ زنده‌مانی | درصد وزن خشک | طول برگ | وزن تر گیاهچه | طول شاخه | تعداد برگ | تعداد شاخه |
| تیمار | ۷ | ۰/۰۳** | ۲/۷۴** | ۳/۷۰** | ۲۰۸/۴۶** | ۱۵/۳۲** | ۰/۰۵* | ۲/۱۳** | ۱/۲۶** | ۱/۶۶** | ۱۲/۹۳** |
| خطا | ۱۶ | ۰/۰۰۳ | ۰/۲۰ | ۰/۴۲ | ۱۶/۴۸ | ۰/۲۲ | ۰/۰۲ | ۰/۰۷ | ۰/۱۳ | ۰/۳۳ | ۰/۵۵ |
| ضریب تغییرات | - | ۳۵/۵۹ | ۲۹/۰۰ | ۳۴/۴۲ | ۴/۹۱ | ۶/۹۹ | ۷/۶۸ | ۱۰/۵۲ | ۱۹/۶۳ | ۱۷/۰۰ | ۱۸/۹۷ |

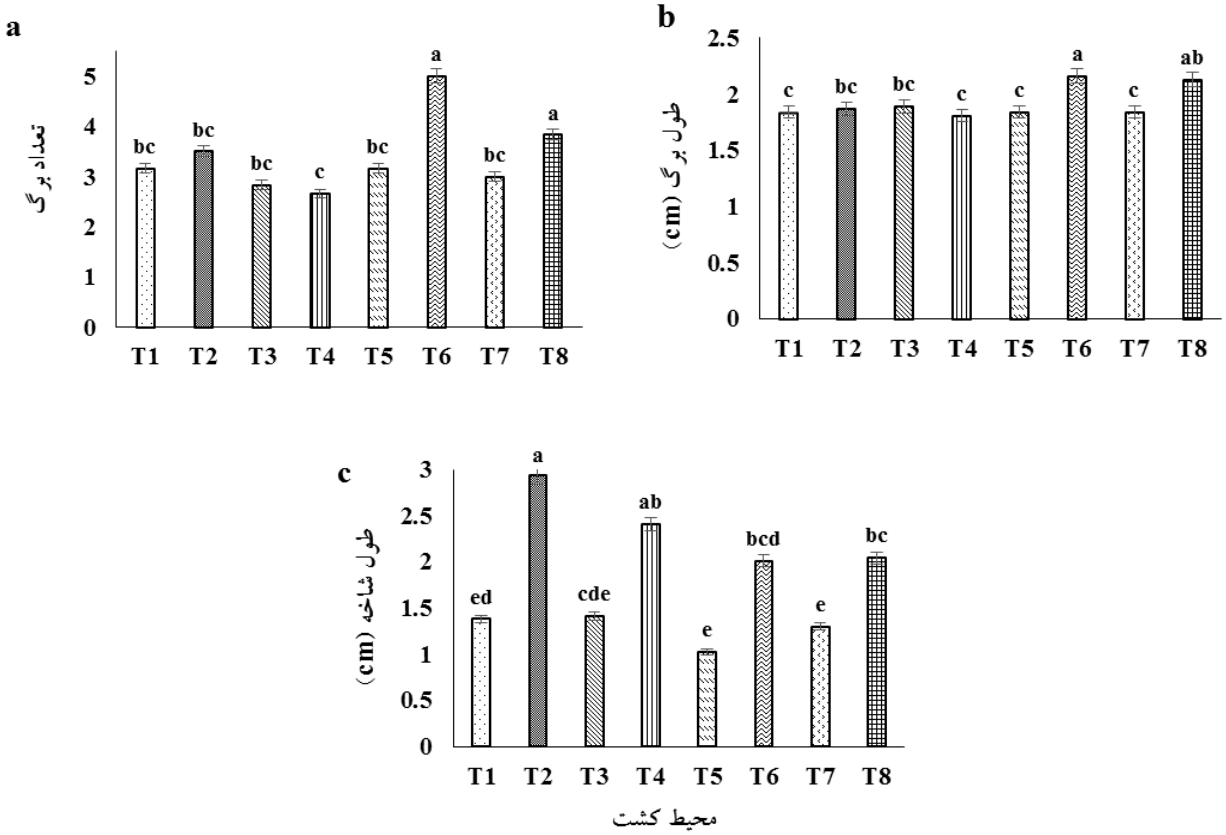
*، ** و ns به ترتیب به مفهوم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و بدون اختلاف معنی‌دار است.




**شکل ۱- اثر هشت نوع محیط‌کشت تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر زنده‌مانی ریزنمونه (a)، تعداد شاخه (b)، وزن تر (c) و درصد وزن خشک (d) ریزنمونه‌های ارکیده وانیلی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.**

بازشدن طبیعی برگ و نمو طبیعی شاخساره در گیاهان حاصل از کشت‌بافت اهمیت وافری دارد به همین منظور تعداد برگ، طول برگ و طول گیاهچه‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. پاسخ تعداد برگ به نوع محیط‌کشت چشمگیر بود ($P \leq ۰/۰۱$). همان‌گونه که در شکل a ۲ ارائه شده است تعداد برگ در ریزنمونه‌های کاشته‌شده روی محیط‌کشت T6 پیرو محیط‌کشت T8 نسبت به سایر محیط‌های کشت بیشتر بود. نتایج بیانگر کمترین تعداد برگ روی محیط‌کشت T4 است. افزون بر این، پاسخ طول برگ به نوع محیط‌کشت در سطح احتمال ۵ درصد قابل‌ملاحظه بود. محیط‌کشت T6 و به دنبال

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]



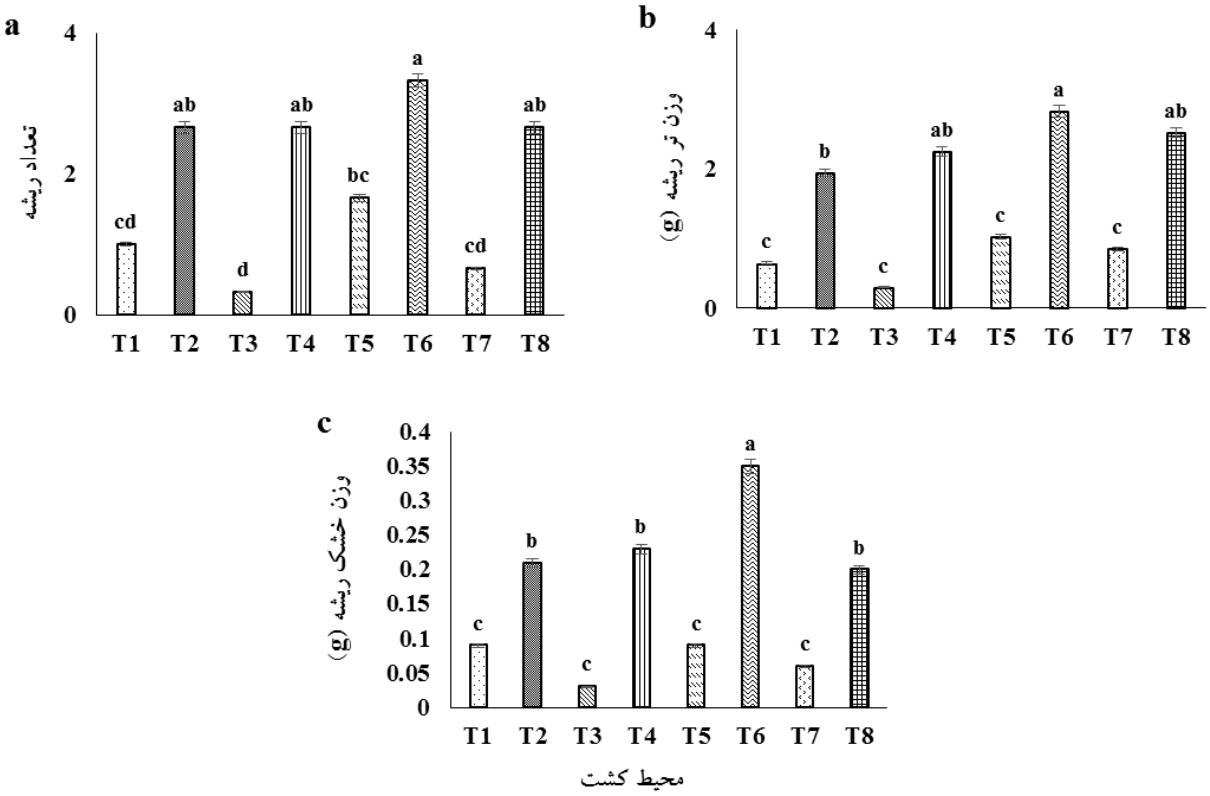

**شکل ۲- اثر هشت نوع محیط‌کشت با تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر تعداد برگ (a)، طول برگ (b) و طول گیاهان (c) حاصل از ریزنمونه‌های ارکیده وانیلی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.**

آن محیط‌کشت T8 منجر به افزایش طول برگ نسبت به سایر تیمارها شدند (شکل ۲b). در مقابل برگ‌های ایجادشده روی محیط‌های کشت T1، T4، T5 و T7 کمترین طول را داشتند. افزایش طول شاخه نیز تحت تأثیر معنی‌دار تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد قرار گرفت (جدول ۲). شاخه‌های ایجادشده روی محیط‌کشت T2 افزایش طول بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشتند درحالی‌که گیاهچه‌های روی محیط‌های کاشت T5 و T7 به ترتیب کمترین افزایش طول را نشان دادند (شکل ۲c).

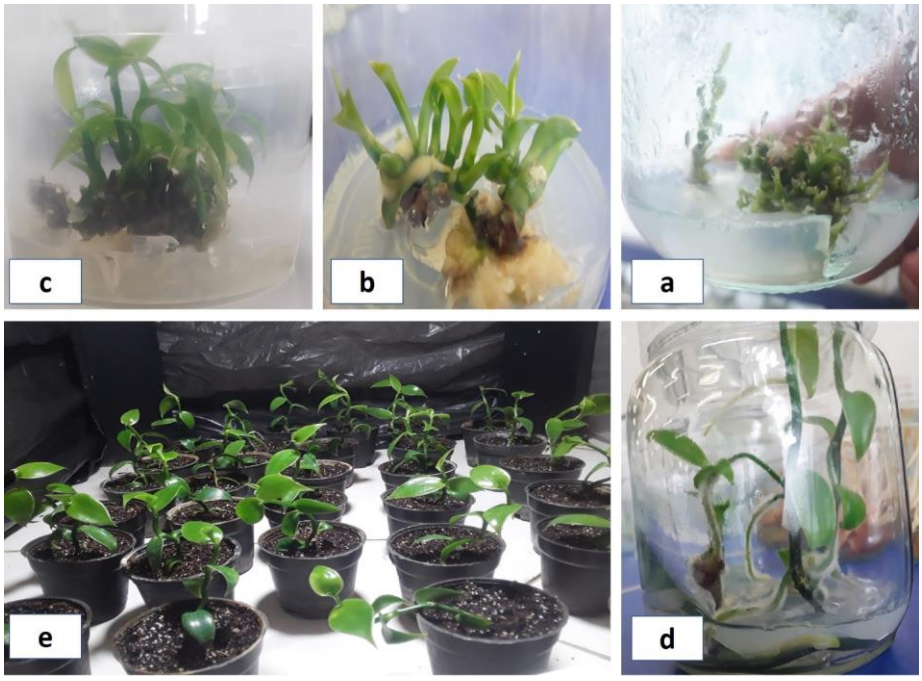
با توجه به اینکه ریشه‌زایی روی محیط پرآوری شاخه روی همه محیط‌های کشت ملاحظه شد لذا صفات مربوط به رشه شامل تعداد ریشه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پاسخ تعداد ریشه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه‌ها به نوع محیط‌کشت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین تعداد ریشه روی محیط T6 ملاحظه شد که بعد از آن محیط‌های کشت T2، T4 و T8 قرار داشتند. کمترین میزان ریشه‌زایی نیز روی محیط‌های کشت بدون اکسین (T1، T3 و T7) مشاهده شد (شکل ۳a). محیط‌کشت T6 افزون بر آنکه وزن تر ریشه را افزایش داد منجر به افزایش انباشت ماده خشک در گیاهچه‌های کشت بافتی نیز شد (شکل ۳c و b).

روی‌هم‌رفته با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان محیط‌کشت T6 را که جهت بهبود پرآوری شاخه و همزمان تولید گیاهچه‌هایی با کیفیت (بازشدن طبیعی بهتر برگ و طول شاخه بیشتر) و کمیت (وزن تر و خشک بالا) مناسب جهت ریزافزایی ارکیده وانیلی توصیه کرد. همچنین با توجه به اینکه ریشه‌زایی روی این محیط‌کشت مناسب است به نظر می‌رسد که روی این محیط‌کشت زمان مورد نیاز برای ریزافزایی کمتر

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]




**شکل ۳- اثر هشت نوع محیط‌کشت بر تعداد ریشه (a)، وزن تر ریشه (b) و وزن خشک ریشه (c) حاصل از ریزنمونه‌های ارکیده وانیلی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.**




**شکل ۴- شمایی از مراحل ریزازدیادی گیاه ارکیده وانیلی. شروع پرآوری شاخه (واکشت اول) (a)، ادامه رشد شاخه‌های باززایی‌شده (واکشت دوم) (b)، تکمیل مرحله پرآوری شاخه (واکشت سوم) (c)، ریشه‌زایی شاخه‌ها (d) و سازگاری گیاهان به شرایط برون شیشه‌ای (۶۰ روز بعد از انتقال از شیشه به بیرون) (e)**

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]

شده که منجر به صرفه‌جویی در هزینه‌های تولید می‌شود. در ادامه گیاهانی که روی محیط‌کشت T6 باززایی شده بودند با موفقیت در محیط برون شیشه‌ای روی کوکوپیت دانه درشت و پرلیت (با نسبت ۵۰:۵۰) سازگار شدند (شکل ۴).

**بحث**

گیاه وانیل یک گیاه ادویه‌ای با ارزش اقتصادی بالا است. ازدیاد این گیاه که عمدتاً از طریق قلمه ساقه است منجر به آسیب عمده به گیاهان مادری می‌شود بنابراین روش ازدیاد درون شیشه‌ای یک جایگزین مفید برای جلوگیری از آسیب‌ها به گیاه مادری است (Halim *et al.*, 2017). در این مطالعه، اثر محیط‌های کشت با ترکیبات هورمونی مختلف بر ریزادیادی و القا شاخساره و ریشه در گیاه ارکیده وانیلی مورد ارزیابی قرار گرفت. زنده‌مانی ریزنمونه‌ها روی محیط‌کشت T6 و T8 بیشتر بود. روی این محیط‌کشت همچنین باززایی شاخه که هدف اصلی این مطالعه بود روی محیط‌های کشت T6 و T8 بیشتر بود. بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش تعداد شاخساره ممکن است با زنده‌مانی ریزنمونه‌ها مرتبط باشد. Preetha و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که در ارکیده فالائنوپسیس بهترین پرآوری شاخساره را روی محیط‌کشت MS تکمیل‌شده با غلظت‌های مختلف تیدیازرون دارد. Arafa و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که تکمیل محیط‌کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون و کینتین پراوری شاخساره، وزن تر و رشد گیاهچه‌های ارکیده دندروبیوم را افزایش می‌دهد. Tan و همکاران (۲۰۱۱) در طی ریز ازدیادی بیشترین تعداد ریزنمونه‌هایی میانگره که کالوس تولید کردند روی محیط Murashige و Skoog (۱۹۶۲) تکمیل‌شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA یافتند. Gopi و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که بیشترین تعداد شاخساره (۱۲/۸ شاخه در هر ریزنمونه) با میانگین طول ۲/۶ سانتی‌متر در یک دوره چهار هفته‌ای به دست آمد که ریزنمونه‌های گره‌ای روی محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم کشت شدند. از سوی دیگر، Abebe و همکاران (۲۰۰۹) دریافتند که محیط‌کشت MS تکمیل‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین منجر به باززایی میانگین تعداد ۴/۲ شاخه در هر ریزنمونه پس از ۴۵ روز کشت می‌شود. در مطالعه ما در محیط‌کشت T8 نیز که حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین است شاخه‌زایی مناسب بود. اگر چه در مطالعات Lee-Espinosa و همکاران (۲۰۰۸) و Ayele و همکاران (۲۰۱۷) بهترین پرآوری شاخه روی محیط‌کشت MS ملاحظه شد با این حال در این مطالعه محیط‌کشت MS ۱/۲ منجر به القاء شاخساره بیشتری در وانیل شد. در مورد شاخه‌زایی، BAP به تنهایی نتایج مناسبی به همراه نداشت. با این حال، شاخه‌زایی بیشتر بر روی محیط‌های کشت حاوی NAA ملاحظه شد. Ali و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که وقتی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP افزوده می‌شود، شاخه‌زایی مناسبی در کالادیوم اتفاق افتاد. بنابراین به نظر می‌رسد در شروع کشت وجود نسبت متوازنی از ترکیبات اکسینی و سیتوکنینی جهت ارتقاء زنده‌مانی ریزنمونه‌ها و شاخه‌زایی مناسب مورد نیاز است.

ریزنمونه‌های کاشته‌شده روی محیط‌کشت T6 ( 1/2MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA) بیشترین وزن تر و درصد وزن خشک شاخه را نیز داشتند. این مسئله ممکن است مربوط به بهبود زنده‌مانی ریزنمونه‌ها و پرآوری شاخه روی این محیط کاشت باشد. در مطالعات دیگر نیز همراستا با بهبود باززایی شاخه، افزایش وزن تر و خشک نیز در گیاه وانیل ملاحظه شده است (Ramirez-Mosqueda and Iglesias-Andreu, 2017; Mengesha *et al.*, 2012). طبق نتایج Mosqueda و Iglesias-Andreu (۲۰۱۷) افزایش وزن خشک ممکن است مرتبط با انباشت بهتر رنگیزه‌های گیاهی (کلروفیل آ و ب) در بافت گیاهی تولیدشده در طی پرآوری شاخه باشد. افزون بر این، در مطالعه ما روی محیط‌کشت T6 تعداد برگ و طول برگ نیز افزایش نشان داد که با افزایش وزن تر و خشک روی محیط‌کشت T6 مرتبط است.

یافته‌های ما نشان داد که وجود NAA القا و رشد ریشه را

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]

در شرایط درون شیشه‌ای در وانیل افزایش می‌دهد (T6، T8، T4 و T2) اگر چه ریشه‌زایی روی محیط‌های کشت بدون NAA نیز مشاهده شد. یافته‌های مشابهی نیز توسط برخی دیگر از پژوهشگران مشاهده شده است. در مطالعه‌ای بر روی ریزازدیادی کالادیوم، Ali و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که بهترین ریشه‌زایی در محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد. در این غلظت، همه گیاهان در مدت هشت روز پس از استقرار روی این محیط‌کشت، ریشه‌زایی نشان دادند. برخی محققان از اکسین‌های دیگر استفاده کرده‌اند. Mujib و همکاران (۲۰۰۰) بهترین ریشه‌زایی را روی محیط‌کشت MS حاوی ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر IBA گزارش کردند. برای هر پروتکل ریزازدیادی، ریشه‌زایی موفق ریزشاخه‌ها یک پیش‌نیاز مهم برای تسهیل استقرار آنها در خاک است. اکسین‌ها جوانه‌زنی بذر، القای ریشه و رشد گیاهچه بسیاری از گونه‌ها را افزایش می‌دهند (Jain and Ochatt, 2010). Pierik (۱۹۹۷) نشان داد که NAA یک اکسین قوی است و غلظت‌های نسبتاً کمی از آن برای تشکیل ریشه مورد نیاز است. با غلظت بالای NAA، تشکیل ریشه انجام نمی‌شود و تشکیل کالوس اتفاق می‌افتد. ریشه‌زایی یک فرآیند مهم برای موفقیت ریزازدیادی است. بدون سیستم ریشه مؤثر، سازگاری گیاه دشوار خواهد بود و سرعت تکثیر گیاه ممکن است به شدت تحت تأثیر قرار گیرد (Gonçalves *et al*., 1998). نوع و غلظت اکسین به طور معنی‌داری بر درصد ریشه‌زایی و طول ریشه تأثیر می‌گذارد. استفاده از NAA در ترکیب با TDZ در بین سایر ترکیبات اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها جهت ریزازدیادی در سراسر جهان رایج است (Kaviani, 2015). در یک مطالعه، از محیط‌کشت MS ۱/۲ تکمیل‌شده با ۳۰ گرم ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون و ۷ میلی‌گرم در لیتر آگار برای شاخه‌زایی در ارکید فالائنوپسیس استفاده شد (Farrokhzad *et al*., 2022). در این مطالعه، ممکن است بهبود ریشه‌زایی و متعاقباً برگرفتن عناصر غذایی و کربوهیدرات‌ها از محیط‌کشت، روی محیط‌کشت T6 با بهبود رشد روی این محیط همبستگی داشته باشد.

پروتکل‌های مقرون به صرفه برای ازدیاد انبوه *V. planifolia* باید بیشتر توسعه یابند تا مواد گیاهی کافی و با کیفیت بالا برای برآوردن تقاضای فزاینده برای تولید وانیل طبیعی فراهم شود. در این راستا، مرحله سازگاری گیاهان تولیدشده یک مسئله اساسی است که باید به آن پرداخته شود تا از زنده‌مانی آنها در هنگام انتقال به شرایط برون شیشه‌ای در محیط گلخانه‌ای اطمینان حاصل شود. به‌طورکلی، ۹۵ درصد گیاهان تولیدشده روی محیط T6 در گلدان‌های کوچک محتوای کوکوپیت (۴+۱۲ میلی‌متری) و پرلیت دانه درشت با موفقیت در یک سازه گلخانه‌ای تحت شدت نور ۵±۸۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و رطوبت نسبی ۸۰ درصد سازگار شدند (شکل ۴).

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر هشت نوع محیط‌کشت در طی ریزافزایی ارکیده وانیلی مورد اررزیابی قرار گرفت. ریزنمونه‌های کاشته‌شده روی محیط‌کشت T6 ( 1/2MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA) و T8 (1/2MS+2 mg/l Kin+ 0/5 mg/l NAA) بهترین پرآوری شاخساره را داشتند. با این حال، شاخص‌هایی نظیر وزن تر و خشک، بسط بهتر برگ و ریشه‌زایی روی محیط T6 نسبت به سایر محیط‌های کشت بیشتر بود. لذا به دلیل همین کیفیت بالای گیاهان تولیدشده روی محیط‌کشت T6، ۹۵ درصد گیاهان در گلدان‌های کوچک حاوی بستر کوکوپیت و پرلیت به محیط بیرون شیشه سازگار شدند. بنابراین استفاده از محیط‌کشت T6 برای ریزافزایی انبوه ارکیده وانیلی توصیه می‌شود. تا آنجا که می‌دانیم این نخستین گزارش از ریزافزایی ارکیده وانیلی در کشور است.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این پژوهش از سازمان اتکا (مزارع نوین ایرانیان) جهت پشتیبانی معنوی از این پروژه نهایت سپاس و قدردانی را دارند.

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]

## منابع


Abebe, Z., Mengesha, A., Teressa, A., & Tefera, W. (2009). Efficient in vitro multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, *8*(24).

Arafa, A. M., El-Attar, A. B., Hassan, M. M., & El-Sayed, S. A. (2021). Effect of MS medium strength and growth regulators (TDZ & KIN) on *Dendrobium nobile* orchid in vitro regeneration. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, *22*(65), 99-118.

Ali, A. A. M. I. R., Munawar, A. S. I. F. A., & Naz, S. H. A. G. U. F. T. A. (2007). An in vitro study on micropropagation of *Caladium bicolor*. *International Journal of Agriculture and Biology*, *9*(5), 731-735.

Anilkumar, A. S. (2004). Vanilla cultivation: A profitable agri-based enterprise. *Kerala Calling*, *1*, 26-30.

Ayele, Y., Tefera, W., & Bantte, K. (2017). Enhanced protocol development for in vitro multiplication and rooting of vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) clone (Van. 2/05). *Biotechnology Journal International*, *18*(3), 1-11.

Azeez, S. (2008). Vanilla. In: Chemistry of Spices (eds. Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., and Zachariah, T. J.) Pp. 287-311. CAB International, UK.

Baqueiro-Pena, I. & Guerrero-Beltran, J. A. (2017). Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.), its residues and other industrial by-products for recovering high value flavor molecules: A review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *6*, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.10.003

Berenstein, N. (2016). Making a global sensation: Vanilla flavor, synthetic chemistry, and the meanings of purity. *History of Science*, *54*(4), 399-424. https://doi.org/10.1177/0073275316681802

de Oliveira, S. O. D., Sayd, R. M., Balzon, T. A., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2013). A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. *Scientia Horticulturae*, *161*, 204-209. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.039

Farrokhzad, Y., Babaei, A., Yadollahi, A., Kashkooli, A. B., Mokhtassi-Bidgoli, A., & Hessami, S. (2022). Informative title: Development of lighting intensity approach for shoot proliferation in *Phalaenopsis amabilis* through combination with silver nanoparticles. *Scientia Horticulturae*, *292*, 110582. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110582

Goncalves, J. C., Diogo, G., & Amancio, S. (1998). In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa× C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*, *72*(3-4), 265-275. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00136-2

Gopi, C., Vatsala, T. M., & Ponmurugan, P. (2006). In vitro multiple shoot proliferation and plant regeneration of *Vanilla planifolia* Andr.-A commercial spicy orchid. *Journal of Plant Biotechnology-Daejion*, *8*(1), 37.

Halim., R., Akyol, B., & Guner, A. (2017). In vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* L.). *Journal of Applied Biological Sciences*, *11*(1), 5-10. https://dergipark.org.tr/en/pub/jabs/issue/34958/397140

Jain, S. M. & Ochatt, S. J. (2010). Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. *Humana press*. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1.

Kaviani, B. (2015). Some useful information about micropropagation. *Journal of Ornamental Plants*, *5*(1), 29-40.

Lee-Espinosa, H. E., Murguia-Gonzalez, J., Garcia-Rosas, B., Cordova-Contreras, A. L., Laguna-Cerda, A., Mijangos-Cortes, J. O., & Santana-Buzzy, N. (2008). In vitro clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *HortScience*, *43*(2), 454-458. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.2.454

Manokari, M., Priyadharshini, S., Jogam, P., Dey, A., & Shekhawat, M. S. (2021). Meta-topolin and liquid medium mediated enhanced micropropagation via ex vitro rooting in *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *146*, 69-82. https://doi.org/10.1007/s11240-021-02044-z

Mengesha, A., Ayenew, B., Gebremariam, E., & Tadesse, T. (2012). Micropropagation of *Vanilla planifolia* using Enset (*Ensete ventricosum* (Welw, cheesman)) starch as a gelling agent. *Current Research Journal of Biological Sciences*, *4*, 519-25.

Mujib, A., Bandyopadhyay, S., & Ghosh, P. D. (2000). Tissue culture derived plantlet variation in *Caladium bicolor* L.–an important ornamental. *Plant Tissue Culture*, *10*(2), 149-155.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Niknejad, A., Kadir, M. A., & Kadzimin, S. B. (2011). In vitro plant regeneration from protocorms-like bodies (PLBs) and callus of *Phalaenopsis gigantean* (Epidendroideae: Orchidaceae). *African Journal of Biotechnolog*, *10*(56), 11808-11816.

Palama, T. L., Menard, P., Fock, I., Choi, Y. H., Bourdon, E., Govinden-Soulange, J., & Kodja, H. (2010). Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): Proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 1-18. https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-82

Preetha, L. K., Shylaraj, K. S., & Rohini, P. C. (2017). An improved method for rapid propagation of *Phalaenopsis* hybrids via culture of longitudinally bisected shoot tips. *Journal of Tropical Agriculture*, *55*(1), 45-51.


[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]

Pierik, R. L. M. (1997). In vitro culture of higher plants. *Springer Science & Business Media*. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5750-6

Rahman, K. U., Bin Thaleth, M. K., Kutty, G. M., & Subramanian, R. (2019). Pilot scale cultivation and production of *Vanilla planifolia* in the United Arab Emirates. *Bulgarian Journal of Agricultural Science, 25*(6).

Ramachandra Rao, S. & Ravishankar, G. A. (2000). Vanilla flavour: Production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(3), 289-304. https://doi.org/10.1002/1097-0010(200002)80:3%3C289::AID-JSFA543%3E3.0.CO;2-2

Ramirez-Mosqueda, M. A. & Bello-Bello, J. J. (2021). SETIS™ bioreactor increases in vitro multiplication and shoot length in vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews). *Acta Physiologiae Plantarum*, *43*(4), 52. https://doi.org/10.1007/s11738-021-03227-z

Ramirez-Mosqueda, M. A. & Iglesias-Andreu, L. G. (2017). Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) cell suspension cultures: Establishment, characterization, and applications. *3 Biotech*, *7*, 1-6. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0871-x

Ramos-Castella, A., Iglesias-Andreu, L. G., Bello-Bello, J., & Lee-Espinosa, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *50*, 576-581. https://doi.org/10.1007/s11627-014-9602-8

Retheesh, S. T. & Bhat, A. I. (2011). Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from protocorm-like bodies of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *20*, 262-269. https://doi.org/10.1007/s13562-011-0057-2

Tan, B. C., Chin, C. F., & Alderson, P. (2011). Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *105*, 457-463. https://doi.org/10.1007/s11240-010-9866-6

van Noort, F. R. (2017). Researcher filip van noort explains how growing vanilla in the Netherlands works (https://www.wur.nl/en/Publication-details.htm?publicationId=publication-way-35323237383).

Vendrame, W. A. & Maguire, I. (2007). In vitro propagation and plantlet regeneration from doritaenopsis purple gem ‘Ching Hua’ flower explant.

*Hortscience*, *42*(5), 1256-1258. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.5.1256

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]

# Evaluation of the effect of culture medium and different hormonal compounds on in vitro parameters during the micropropagation of vanilla orchid (*Vanilla planifolia*)

**Yusuf Farrokhzad[1], Mahnaz Salatin[2], Shahram Jafarnia[2]***

**[1] Center for Advanced Research and Development of Elite Affairs, ETKA Organization, Tehran, Iran**
**[2] Medicinal Plants Section, Iranian Modern Farms Holding, Tehran, Iran**
**(Received: 2023/10/21, Accepted: 2023/12/04)**

**Abstract**

In this study, an efficient and simple method was developed for the micropropagation of vanilla orchid (*Vanilla planifolia*), which is a valuable spice-ornamental plant. The internodal explants after the disinfection process were established on eight culture mediums, including MS + 2 mg/L TDZ; MS + 2 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA; MS + 2 mg/L Kin; MS + 2 mg/L Kin + 0.5 mg/L NAA; 1.2MS + 2 mg/L TDZ; 1.2MS + 2 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA; 1.2MS + 2 mg per liter Kin; 1.2 MS + 2 mg/l Kin + 0.5 mg/L NAA. The treatments were arranged in the form of a completely randomized design (CRD) in three replications, followed by subculturing once every month. After three months and the completion of the shoot proliferation stage, different *in vitro* traits were evaluated. The results showed that the highest survival rates of explants and shoot multiplication occur on 1/2MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA and 1/2MS+2 mg/l Kin+0.5 mg/l NAA mediums. However, 1/2MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA medium resulted in the highest leaf number, fresh weight and percentage of dry weight. The length of tissue-cultured plants on MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA was greater than other mediums. The highest number of roots and root fresh weight were also observed at 1/2MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA, although compared to other mediums with NAA there was not a significant difference. In general, based on the obtained results, medium 1/2MS+2 mg/l TDZ+0.5 mg/l NAA is recommended for vanilla micropropagation.

**Keywords**: Vanilla orchid, Micropropagation, Plant growth regulators, Plant tissue culture

Corresponding author, Email: sh.jafarnya@gmail.com

[ Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-02 ]