

مقاله پژوهشی

تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی گیاه زیتنی *Haworthia attenuatae* (هاورتیای گورخری)

نفیسه نجاریان کرمانی^۱، مهدیه پارسایان^۱ و زیبا قسیمی حق^{۲*}

^۱ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود

^۲ گروه علوم باغبانی و گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۲/۰۷)

چکیده

به دلیل مشکلات تکثیر جنسی و غیرجنسی *Haworthia attenuatae* به عنوان یکی از محبوب‌ترین گیاهان گوشتی زیتنی، امکان ریزازدیادی این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. اثر جداگانه سیتوکینین‌های BAP (Benzylamino purine) و Kin (kinetin) و ترکیب با IBA (Indole-3-acetic acid) (صفر، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر) با استفاده از ریزنمونه‌های برگ بر شاخه‌زایی این گیاه نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۵/۲۲ عدد) در محیط کشت MS تغییر یافته با ریزنمونه برگ کامل در ترکیب ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA بدست آمد. حداکثر تعداد برگ (۴/۶۶ عدد) در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP بدون حضور IBA و طول‌ترین و عریض‌ترین برگ‌ها (۱/۰۵ و ۰/۶۸ سانتی متر) با ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA با ریزنمونه برگ کامل تولید شدند. در حالی که با مصرف Kin، بیشترین تعداد (۳/۵ عدد)، طول‌ترین (۱/۴۵ سانتی متر) و عریض‌ترین (۰/۸۷ سانتی متر) شاخساره‌های باززایی شده در ترکیب ۱ میلی گرم در لیتر Kin با ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA با ریزنمونه بخش تحتانی برگ بدست آمد. نتایج ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی شده در محیط‌های MS و ½MS تغییر یافته با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA نشان داد که بیشترین تعداد ریشه (۶/۶۶ عدد) و طول‌ترین ریشه (۳/۴۷ سانتی متر) در محیط ½MS به ترتیب با ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد. ۹۰ درصد شاخساره‌های ریشه‌دار شده با محیط گلخانه سازگار شدند. در کل، با بهینه‌سازی بیشتر این پروتکل می‌توان ریزنمونه برگ را برای ریزازدیادی تجاری *H. attenuatae* استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ریزازدیادی، BAP، *Haworthia attenuatae*، IBA، Kin، ریزنمونه برگ

مقدمه

به طوری که این تنوع باعث جلب توجه گیاه‌شناسان و گردآورندگان گیاهان گوشتی شده است (Liu et al., 2017). این گیاهان به عنوان گیاهان زیتنی گلدانی و نیز در فضای سبز در محوطه‌سازی با سنگریزه‌ها کاربرد دارند (Barker, 1929). *H. attenuatae*، گونه‌ای از هاورتیا است که

H. attenuatae از گیاهان گوشتی بیابانی، تک لپه‌ای، گلدار و چندساله در خانواده Asphodelaceae است که بومی آفریقای جنوبی، سوازیلند، موزامبیک و نامیبیا هستند و تنوع مورفولوژیکی زیادی در این مناطق دارند (Bayer, 1999;)

* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: zghasimi@shahrood.ac.ir, zghasimi@yahoo.com

ریزنمونه برگ‌گی و ترکیب هورمون‌های BA و Kin در گونه‌های *H. mutica* و *H. retusa*, *H. emelyae*, *H. mirabilis* Richwine (۱۹۹۵) با ریزنمونه گل‌آذین و هورمون‌های BA و Zeatin در گونه‌های *H. attenuate*, *H. coorctata* و *H. limifolia* Lizumi و Amaki (۲۰۱۱) با ریزنمونه برگ‌گی و ساقه و ترکیب هورمون‌های BA و IAA در گونه *H. cymbiformis* گزارش کرده‌اند که در این مطالعات محیط پایه MS استفاده شده است.

در کل با توجه به تقاضای رو به افزون این گیاهان در بازار گل، بررسی ریزازدیادی آنها می‌تواند در تولید انبوه مورد توجه قرار گیرد. هر چند در هاورتیاها استفاده از ریزنمونه برگ‌گی و هورمون‌های BAP و Kin در ریزازدیادی گزارش شده است ولی از اثر این دو هورمون در ترکیب با اکسین IBA در محیط پایه MS تغییر یافته که در آن به جای آهن Fe-EDTA از Fe-EDHA استفاده شود هیچ گزارشی در *H. attenuatae* نشده است. در این پژوهش، ریزازدیادی این گیاه در محیط پایه MS تغییر یافته با استفاده از دو نوع ریزنمونه برگ‌گی و ترکیب هورمون‌های BAP و Kin با اکسین IBA جهت دستیابی به روشی کاربردی برای تکثیر انبوه غیرجنسی این گونه با بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای و معرفی مناسب‌ترین ترکیب هورمونی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گیاهان سالم *H. attenuatae* از گلخانه‌ای تجاری در شهرستان شاهرود به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی شاهرود انتقال یافتند. برای استریل کردن، ریزنمونه‌های برگ‌گی به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفتند و در ادامه در زیر هود ایرفلوآمینار یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند و دوبار با آب مقطر استریل آب‌شویی شدند و در مرحله بعد، ریزنمونه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند. ریزنمونه‌های استریل برای انجام کشت در زیر هود در روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا سطح آن‌ها خشک

دارای برگ‌های ضخیم، نوک تیز، سبز رنگ و سفت با خطوط سفید و راه راه است، که علت نامگذاری آن به هاورتیای گورخری همین خطوط است و امروزه به‌عنوان گیاهان گوشتی زینتی ارزش اقتصادی خوبی در بازارهای گل جهانی پیدا کرده است (Bayer, 1999). هاورتیاها خودناسازگاری دارند و برای تکثیر جنسی، بذر کمی تولید می‌کنند و از طرفی گیاهان بذری هاورتیا کند رشد بوده و تنوع ژنتیکی در آنها مشاهده می‌شود. تکثیر غیرجنسی این گیاهان با جدا کردن پاجوش‌ها و قلمه‌های برگ‌گی انجام می‌شود ولی تعداد پاجوش‌ها در این گیاه کم بوده و تکثیر با قلمه‌های برگ‌گی به دلیل درصد ریشه‌زایی کم عملکرد پایینی دارد (Rogers, 1993a; Mycock et al., 1997; Bayer, 1999). بنابراین ریزازدیادی به‌عنوان یک راهکار مناسب برای تکثیر گیاهان هاورتیا می‌تواند در نظر گرفته شود چرا که پتانسیل کشت بافت گیاهی در تکثیر وسیع و سریع برخی گیاهان گوشتی از جمله *Cotyledon orbiculata* (Kumari et al., 2016) و *Pelecyphora aselliformis* (Badalamenti et al., 2016) با حذف محدودیت‌های فصلی و محیطی مشخص شده است (Kitamura et al., 2002; Kumari et al., 2016). البته در ریزازدیادی عوامل مختلفی از قبیل نوع ریزنمونه، مواد مغذی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه و سایر مواد افزودنی، دما، شدت نور و مدت زمان بر راندمان یا میزان موفقیت آن اثر می‌گذارد. مطالعات صورت گرفته در کشت بافت هاورتیاها غالباً مربوط به کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم (Chen et al., 2019; kim et al., 2018; Liu et al., 2017; Rogers, 1993a; Ogihara, 1979; Ogihara and Tsunewaki, 1978; Kaul and Sabharwal, 1972; Majumdar, 1970a; Majumdar, 1970b) است که جهت کالوس‌زایی از هورمون‌های اکسین NAA, 2,4-D و IAA و هورمون‌های سیتوکینین BA, TDZ و Kin در محیط پایه White (Majumdar, 1970a; Majumdar, 1970b) و MS (Kaul and Sabharwal, 1972) با افزودنی‌هایی از قبیل شیر نارگیل (Majumdar, 1972) با افزودنی‌هایی از قبیل شیر نارگیل (Majumdar, 1972) و کازین هیدرولیز شده (Kaul and Sabharwal, 1972) استفاده شده است. باززایی مستقیم را Rogers (۱۹۹۳b) با استفاده از

شود.

در ابتدای این پژوهش و پیش از اعمال تیمارهای اصلی، نظر به کسب نتایج مثبت مبنی بر رشدونمو بهتر گیاهان هاورتیا در نتیجه کاربرد Fe-EDDHA به جای Fe-EDTA در محیط پایه موراشینگ و اسکوک (MS) (Murashige and Skoog, 1962)، این جایگزینی در تمامی واحدهای آزمایشی اعمال گردید به‌طوری‌که در فرمول این محیط پایه به جای $37/6$ میلی‌گرم در لیتر آهن Ethylenediamine (FeNaEDTA) tetraacetate ferric sodium iron از 110 میلی‌گرم در لیتر آهن Ethylenediamine di-2-hydroxyphenyl (Fe-EDDHA) acetate ferric استفاده شد. برای بررسی باززایی شاخساره هاورتیا، دو آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید که در هر دو آزمایش، فاکتور اول نوع ریزنمونه شامل برگ کامل و قسمت تحتانی برگ به اندازه 2 سانتی‌متر بود. فاکتور دوم، نوع هورمون سیتوکینینی BAP (در آزمایش اول) و یا Kin (در آزمایش دوم) با غلظت‌های $0/5$ ، 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر و فاکتور سوم هورمون اکسین IBA با غلظت‌های صفر، $0/1$ ، $0/5$ ، 1 میلی‌گرم در لیتر بود. هر یک ماه یک‌بار عمل واکشت ریزنمونه‌ها انجام گردید. شاخساره‌های باززایی‌شده، پس از واکشت دوم به محیط‌کشت ریشه‌زایی انتقال داده شدند. برای بررسی ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی‌شده، یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. فاکتور اول نوع محیط پایه و فاکتور دوم غلظت‌های مختلف هورمون اکسین IBA بود. در این آزمایش شاخساره‌های باززایی‌شده به اندازه تقریبی 2 سانتی‌متری به محیط‌های MS و $1/2$ MS تغییر یافته حاوی هورمون اکسین IBA با غلظت‌های صفر، $0/5$ ، 1 و $1/5$ میلی‌گرم در لیتر جهت رشد و ریشه‌زایی انتقال یافتند. در این پژوهش، تیمارها در سه تکرار و سه ریزنمونه در هر تکرار اعمال شدند. مقدار 50 میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک فیلتر شده جهت کاهش ترکیبات فنلی به‌همراه 7 گرم در لیتر آگار و 30 گرم در لیتر ساکاروز به محیط‌کشت‌ها اضافه گردید و pH محیط‌های کشت $5/8$ تنظیم شد. کشت‌ها در شرایط دمایی

$25^{\circ}\text{C} \pm 2$ و با فوتوپریود 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی با لامپ فلورسنت شدت نور 45 میکرومول بر متر مربع در ثانیه در دستگاه فیتوترون قرار گرفتند. صفات مورفولوژیکی شاخساره‌های باززایی‌شده شامل تعداد شاخساره باززایی‌شده، طول و عرض شاخساره و برگ با استفاده از کولیس و تعداد برگ در شاخساره باززایی‌شده یادداشت برداری شد. در شاخساره‌های باززایی‌شده، در مرحله ریشه‌زایی تعداد و طول ریشه‌ها ثبت شدند. درنهایت مرحله سازگاری با انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده درون شیشه‌ای به گلدان‌های کوچک حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت وزنی $1:2$ انجام شد. گیاهچه‌های ریشه‌دارشده با احتیاط و به کمک پنس از محیط‌های کشت خارج شدند و پس از شست‌وشوی آرام ریشه‌ها با جریان آب و حذف آگار، در گلدان‌ها کاشته شدند. گیاهان برای مدت 10 روز در گلخانه سازگاری با پوشش‌های پلاستیکی انفرادی پوشیده شدند. سپس پوشش‌ها حذف شدند و گلدان‌ها در گلخانه سازگاری نگهداری شدند که متوسط دمای گلخانه $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ، رطوبت نسبی 80 درصد و شدت نوری 10000 لوکس بود. آبیاری براساس نیاز گیاه در گلخانه انجام شد. پس از 2 ماه، درصد بقای گیاهچه‌های سازگار شده، ثبت شد.

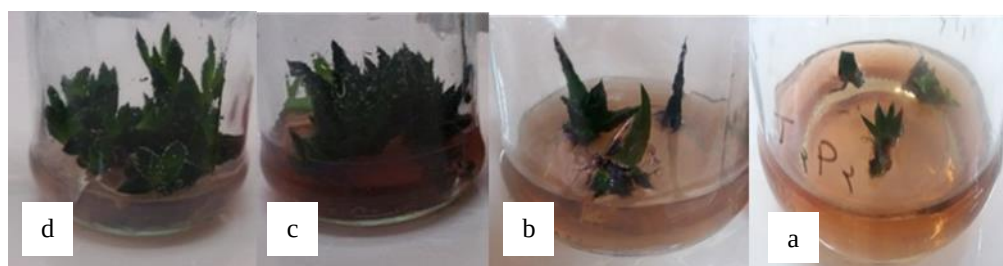
تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم گردیدند. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD توسط نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد و آزمون t زوجی برای مقایسه بین هورمون‌های سیتوکینینی به تفکیک هر ریز نمونه و برای هر صفت به‌طور جداگانه صورت گرفت.

نتایج و بحث

با وجود پژوهش‌های انجام‌شده قبلی در زمینه ریزازدیادی گونه‌های دیگر هاورتیا، پژوهش حاضر روشی کارآمد جهت ریزازدیادی گونه *H. attenuatae* با استفاده از ریزنمونه‌های برگ‌ی در محیط MS تغییر یافته با استفاده از دو نوع سیتوکینین‌های BAP و Kin در ترکیب با اکسین IBA را ارائه می‌کند.



شکل ۱- باززایی شاخساره *H. attenuatae* از ریزنمونه بخش تحتانی برگ و برگ کامل با تیمار هورمونی BAP و IBA. a تا c: شاخساره اولیه باززایی شده (a)، یک ماه پس از باززایی (b) و دو ماه پس از باززایی (c) از ریزنمونه برگ کامل d تا f: شاخساره اولیه باززایی شده (d)، یک ماه پس از باززایی (e) و دو ماه پس از باززایی (f) از ریزنمونه تحتانی برگ

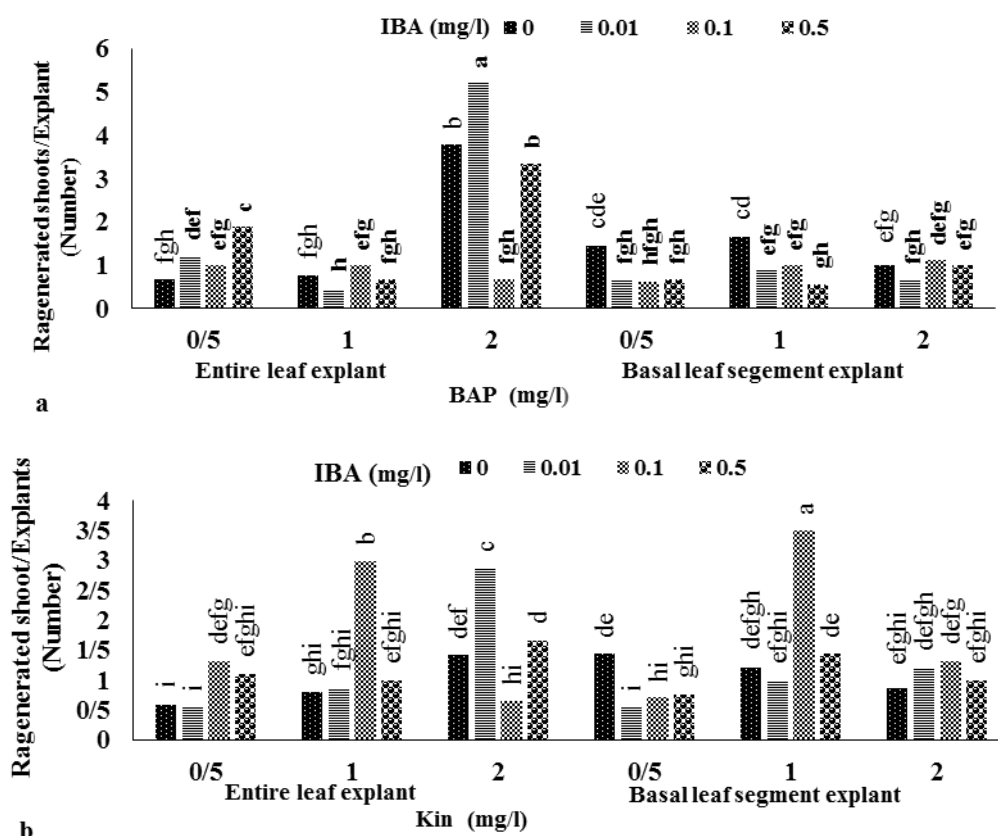


شکل ۲- باززایی شاخساره *H. attenuatae* از ریزنمونه بخش تحتانی برگ و برگ کامل با تیمار هورمونی Kin و IBA. باززایی از ریزنمونه تحتانی برگ (a) و باززایی از ریزنمونه برگ کامل (b) یک ماه پس از کشت اولیه. شاخساره‌های باززایی شده پس از دو ماه با ریزنمونه تحتانی برگ (c) و با ریزنمونه برگ کامل (d)

بیشترین تعداد شاخساره باززایی شده (۵/۲۲ عدد) در نتیجه مصرف ۲ میلی گرم در لیتر از این هورمون به همراه ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA بود (شکل ۳a) در حالی که در شرایط استفاده از Kin، ریزنمونه تحتانی برگ با کاربرد ۱ میلی گرم در لیتر Kin به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA بیشترین تعداد شاخساره (۳/۵ عدد) را تولید نمود (شکل ۳b).

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها اصلی ترین تنظیم کننده‌های درگیر در برگشت از تمایز و تمایز یابی سلول‌های گیاهی هستند. نظر به اهمیت سیتوکینین‌ها در روند تقسیم سلولی، اندام‌زایی و در نتیجه تعداد شاخساره تولید شده، باززایی و تکثیر شاخساره‌ها طی ریزازدیادی تحت

اثر هورمون‌های BAP و Kin در ترکیب با IBA بر باززایی گیاه هاورتیا، تعداد شاخساره: در هر دو آزمایش، باززایی شاخساره‌ها از ریزنمونه‌های برگ *H. attenuatae* پس از ۸ هفته آغاز شد و نتایج کاربرد هورمون‌های BAP و Kin در ترکیب با IBA بر باززایی ریزنمونه‌های برگ گیاه هاورتیا نشان داد که در مجموع، هر دو ریزنمونه برگ کامل و بخش تحتانی برگ، از قابلیت باززایی شاخساره در غلظت‌های مختلف هر دو نوع تیمار سیتوکینینی BAP و Kin در ترکیب با IBA برخوردار بودند (شکل ۱ و ۲). با این حال، نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه تیمارها بر این صفت در شرایط کاربرد BAP، مبین برتری ریزنمونه برگ کامل در تولید



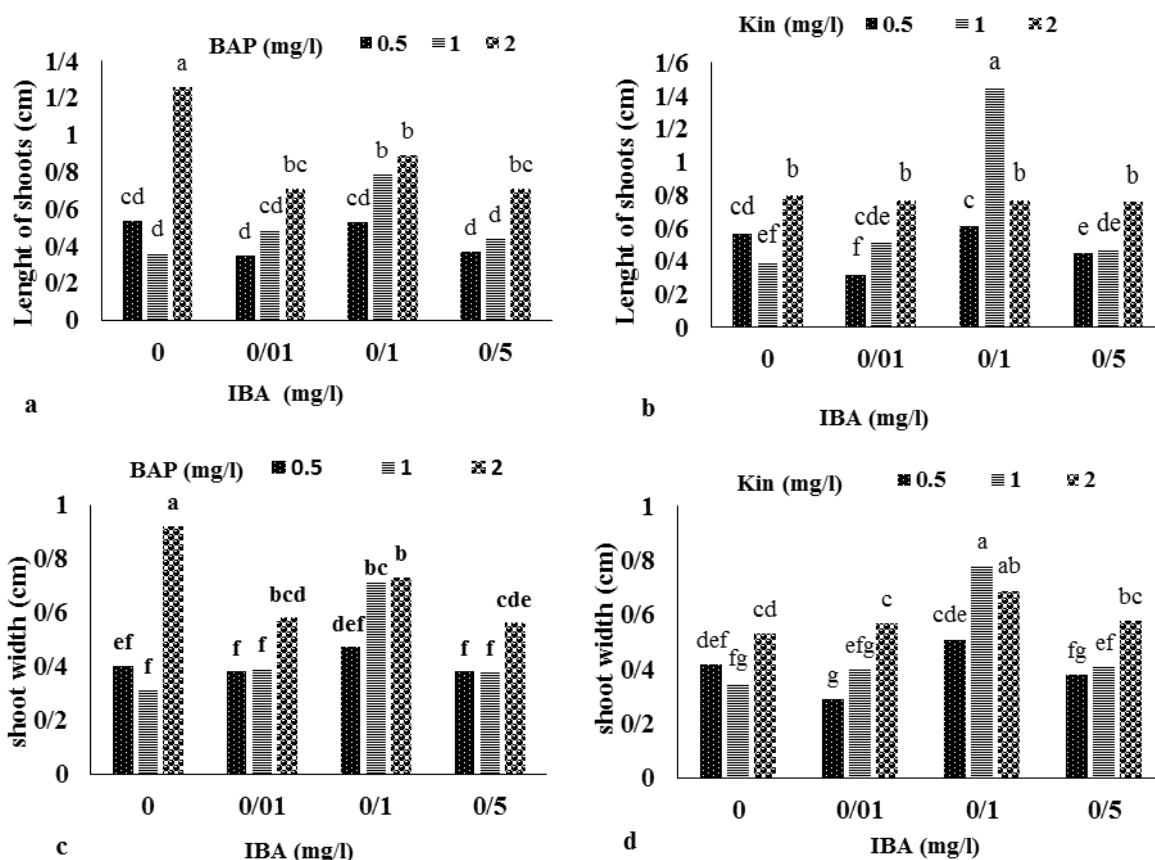
شکل ۳- اثر متقابل انواع ریزنمونه (ریزنمونه برگ کامل و ریزنمونه تحتانی برگ) و هورمون IBA در ترکیب با BAP (a) و Kin (b) بر تعداد شاخساره‌های باززایی‌شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه *H. attenuatae*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است ($P \leq 0.01$).

بیشتری (شاخساره باززایی‌شده از ریزنمونه بخش تحتانی برگ) را در این گونه هاورتیا تولید نماید ($t(70) = -2.09$; $p = 0.0416$). همراستا با نتایج این پژوهش، Roger (1993b) در بررسی تأثیر کاربرد هورمون‌های BAP و Kin در باززایی ۵ گونه هاورتیا با استفاده از ریزنمونه برگ، به تأثیر بیشتر هورمون Kin در برخی صفات اشاره کرده است. با این وجود، اثر مثبت کاربرد BAP بر شاخه‌زایی هاورتیا (Rogers, 1993a,b) و آلئوئورا (Debiasi et al., 2007) نیز در برخی تحقیقات گزارش شده است.

طول و عرض شاخساره: نتایج بررسی طول شاخساره‌های باززایی‌شده هاورتیا تحت تیمارهای هورمونی مختلف نشان داد که نوع ریزنمونه بر خلاف کاربرد تیمارهای هورمونی بر این صفت تأثیرگذار نبود. براساس مقایسه میانگین طول

تأثیر نوع و غلظت سیتوکینین‌های مورد استفاده قرار می‌گیرد (Abd Aziz et al., 2018). انتخاب نوع سیتوکینین مورد استفاده در ریزازدیادی گیاهان با توجه به کارایی آنها در تشکیل و تکثیر شاخه‌های سالم و تحریک سازگاری آنها تعیین می‌شود (Bairu et al., 2007).

مطالعات قبلی در هاورتیاها نیز نشان داده است که حضور سیتوکینین‌ها به مقدار لازم جهت باززایی شاخساره‌ها ضروری است (Rogers, 1993a,b; Richwine, 1995; Lizumi and Amaki, 2011) و پاسخ باززایی هاورتیاها به سیتوکینین‌های مختلف متفاوت است (Rogers, 1993b; Richwine, 1995). در پژوهش حاضر نیز اگر چه هر دو سیتوکینین مورد استفاده از مشتقات آدنینی هستند، با این حال، کاربرد Kin در ترکیب با IBA نسبت به ترکیب BAP و IBA توانست تعداد شاخساره



شکل ۴- اثر هورمون IBA در ترکیب با BAP و Kin بر طول (a و b) و عرض (c و d) شاخساره‌های باززایی شده از هر دو نوع ریزنمونه (ریزنمونه برگ کامل و تحتانی برگ) در کشت درون شیشه‌ای گیاه *H. attenuata*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است ($P \leq 0.01$).

بالاتر سبب کاهش ارتفاع شاخساره می‌شود. اختلالاتی از قبیل کندی رشد، کاهش وزن تر شاخساره‌ها و عدم رشد ریشه در غلظت‌های بالای سیتوکینین‌ها مربوط به تجمع بیش از حد متابولیت‌های سمی حاصل از BAP یا سایر سیتوکینین‌ها در طی کشت بافت گیاهی است (Werbrouck *et al.*, 1996; Baroja-Fernandez *et al.*, 2002; Bairu *et al.*, 2010). تناسب طول و عرض شاخساره در شکل ظاهری گیاه هاورتیا بسیار اهمیت دارد (Rogers, 1993b).

نتایج صفت عرض شاخساره‌های باززایی شده با نتایج به‌دست آمده برای صفت طول شاخساره مشابه بود (شکل ۴c و d). به‌طوری‌که نوع ریزنمونه در تغییر عرض شاخساره‌های باززایی شده تأثیر معنی‌داری نداشت. درحالی‌که در سطوح

شاخساره‌های رشدیافته تحت تیمارهای هورمونی BAP و IBA، بیشترین میانگین طول شاخساره (۱/۲۶ سانتی‌متر) تنها در بالاترین سطح BAP یعنی ۲ میلی‌گرم در لیتر و عدم حضور هورمون IBA به‌دست آمد (شکل ۴a) درحالی‌که با کاربرد Kin به جای BAP طول‌ترین شاخساره‌ها (۱/۴۵ سانتی‌متر) در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin تولید شدند و در همین ترکیب تیماری، کمترین طول شاخساره در عدم مصرف و کاربرد ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌ترتیب همراه با سطوح ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد (شکل ۴b). نتایج Rogers (1993b) در باززایی هاورتیا نشان داد که غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و Kin شاخساره‌هایی با ارتفاع مناسب تولید می‌کند و غلظت‌های

مختلف هورمون IBA با افزایش غلظت هر دو سیتوکینین BAP و Kin شاخساره‌های هاورتیا عریض‌تر شدند چرا که نسبت اکسین به سیتوکینین در طی کشت‌بافت می‌تواند نقش مهمی در القا پاسخ مورفوژنیک در گیاهان عالی داشته باشد (Garcia et al., 2008).

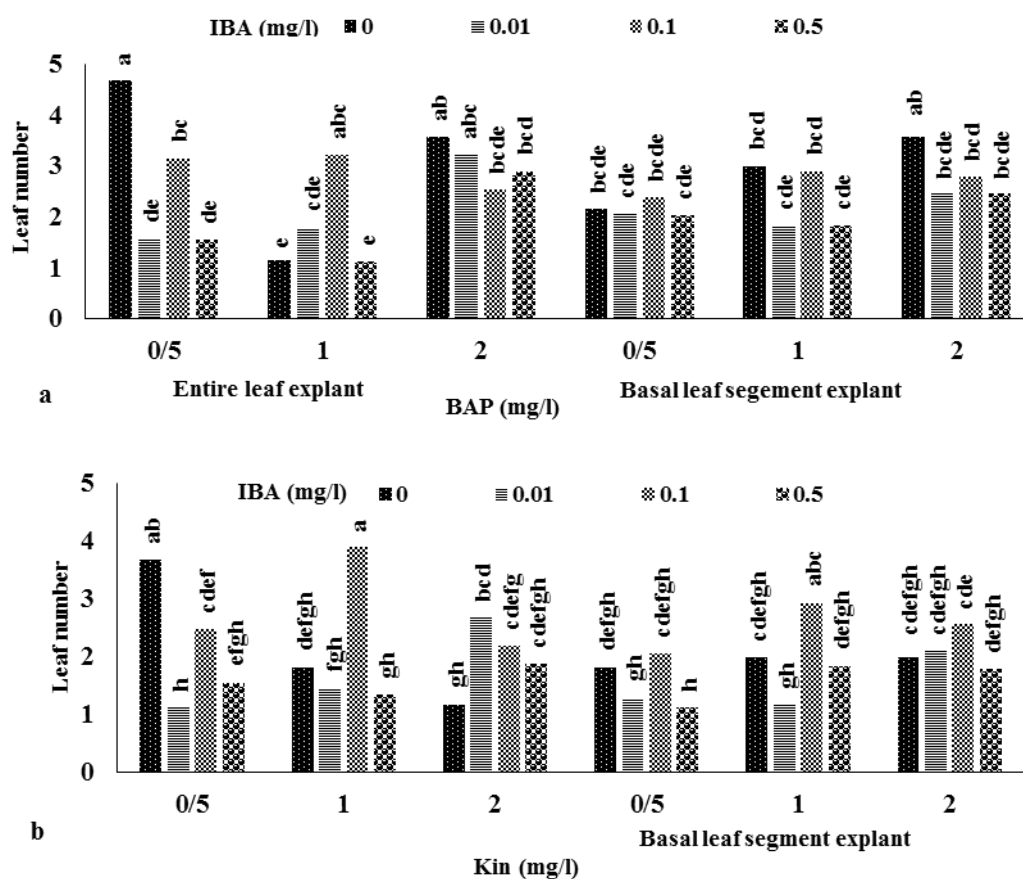
با کاربرد سیتوکینین BAP، عریض‌ترین شاخساره (۰/۹۲ سانتی‌متر) در بالاترین سطح هورمون BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و بدون حضور هورمون IBA تولید گردید (شکل ۴c). درحالی‌که با تغییر سیتوکینین از BAP به Kin، عریض‌ترین شاخساره‌ها (۰/۸۷ و ۰/۶۹ سانتی‌متر) در غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌همراه ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin تولید شدند (شکل ۴d). این نتایج نشان داد که طول و عرض شاخساره‌های باززایی‌شده رقم هاورتیا مورد بررسی با استفاده از این ترکیب‌های هورمونی نسبت به سایر سطوح به بالاترین میزان خود رسید و به‌نظر می‌رسد در این غلظت‌ها، بین سیتوکینین‌های BAP و Kin و اکسین IBA برای باززایی و تولید شاخساره‌های مناسب در هاورتیا با استفاده از ریزنمونه برگی تعادل ایجاد شده است.

تعداد و طول برگ: نتایج مقایسه میانگین تعداد برگ در شاخساره‌های باززایی‌شده هاورتیا در محیط‌های کشت حاوی ترکیبات هورمونی BAP و IBA، مبین برتری ریزنمونه برگ کامل از نظر تولید تعداد برگ (۴/۶۶ عدد)، تحت تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و عدم مصرف هورمون IBA بود (شکل ۵a). همچنین این ریزنمونه در سطوح بالاتر کاربرد BAP (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌همراه سطوح پایین ۰/۱، ۰ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA توانست با تولید تعداد برگ بیشتر نسبت به سایر تیمارها، در گروه برتر آماری قرار گیرد. این در حالی است که ریز نمونه تحتانی برگ تنها در بالاترین سطح کاربرد هورمون BAP و عدم مصرف IBA نتایج مشابهی را در تولید تعداد برگ کسب نموده و از نظر این صفت به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها پیش‌تاز باشد. Jayakrishna و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش نمودند که ریزنمونه‌های گره ساقه آلوئه‌ورا در محیط

MS حاوی سطح بالای هورمون BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین تعداد برگ را تولید نمودند. با این حال نتایج مقایسه میانگین ترکیبات سه جانبه تیمارهای مورد بررسی در این صفت در شرایط مصرف هورمون Kin نشان داد که شاخساره‌های باززایی‌شده با ریزنمونه برگ کامل در سطوح پایین هورمون Kin (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به‌ترتیب در شرایط عدم‌مصرف و مصرف ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA، بیشترین تعداد برگ (۳/۸۸ عدد) را تولید نمودند (شکل ۵b). در این شرایط، شاخساره‌های حاصل از ریز نمونه‌های تحتانی برگ نیز در محیط‌کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA توانستند با تولید تعداد برگ بیشتر در جایگاه برتر قرار گیرند. در مجموع با توجه به نتایج آزمون t زوجی ($t(70)=3.25$ $p=0.0018$)، ریزنمونه بخش تحتانی برگ در شرایط کاربرد سیتوکینین BAP نسبت به کاربرد Kin تعداد برگ بیشتری تولید نمود.

بررسی نتایج طول برگ شاخساره‌های باززایی‌شده هاورتیا نشان داد که در شاخساره‌های باززایی‌شده از هر دو ریزنمونه، طویل‌ترین برگ‌ها در بالاترین سطح هورمون BAP و سطوح مختلف هورمون IBA تولید گردیدند (شکل ۶a). در شرایط کاربرد هورمون Kin، اگرچه ریزنمونه برگ کامل در بالاترین سطح این هورمون (۲ میلی‌گرم در لیتر)، الگوی مشابهی را با هورمون BAP، در تولید شاخساره‌های دارای برگ‌های طویل‌تر نشان داد، ولیکن ریزنمونه تحتانی برگ با قدری تفاوت نسبت به شرایط کاربرد هورمون BAP، این برتری را صرفاً در ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حفظ نمود (شکل ۶b). برتری نسبی ریزنمونه برگ کامل از نظر این صفت ممکن است به‌دلیل تأمین بهتر مواد غذایی در قسمت مریستم این ریزنمونه باشد. Kharrazi و همکاران (۲۰۱۲) نیز تأثیر مثبت کاربرد هورمون Kin در طویل‌شدن برگ‌های گیاه میخک را گزارش نمودند.

عرض برگ: بررسی نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ترکیب دو هورمون BAP و IBA بر صفت عرض برگ‌های تولیدشده در شاخساره‌های باززایی‌شده هاورتیا نشان داد که

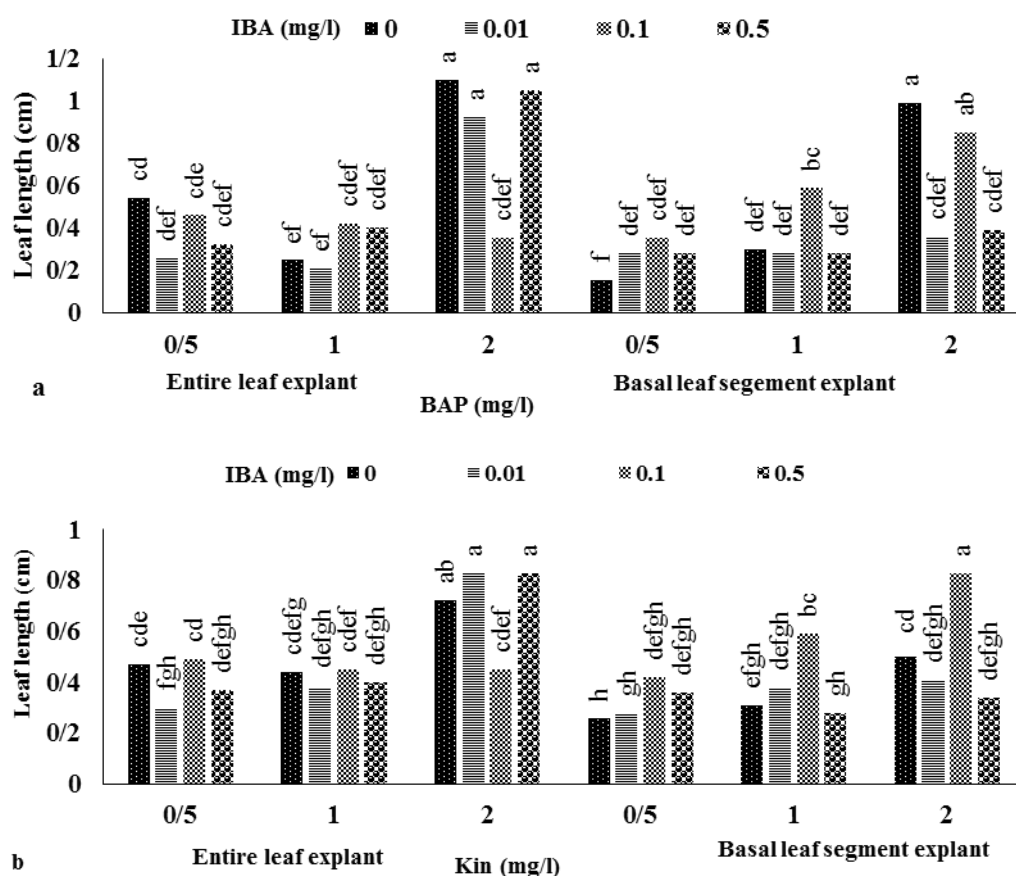


شکل ۵- اثر متقابل ریزنمونه برگ (برگ کامل و ریزنمونه تحتانی برگ) و هورمون IBA در ترکیب با BAP (a) و Kin (b) بر تعداد برگ شاخساره‌های باززایی شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه *H. attenuatae*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است ($P \leq 0.05$).

در لیتر IBA، به‌طور مشترک موفق به تولید شاخساره‌هایی با عریض‌ترین برگ‌ها (۰/۶۸ و ۰/۶۶ سانتی‌متر به‌ترتیب) نسبت به سایر ترکیبات تیماری شدند (شکل b ۷). شکل ۲ نمونه‌ای از گیاهان باززایی شده هاورتیا را پس از دو ماه نشان می‌دهد. به‌طور کلی، در واکنش‌های هورمونی ممکن است یک هورمون اثر هورمون دیگر را تشدید یا خنثی کند. محققین دریافته‌اند که هورمون‌ها روی هم اثر متقابل داشته و اثرات یکدیگر را بهبود می‌بخشند (Del poza et al., 2005). در برخی گونه‌ها و ارقام، سطوح داخلی هورمون‌های اکسین و سیتوکینین به گونه‌ای است که استفاده خارجی تنظیم‌کننده‌های رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اگر اکسین داخلی بالا باشد، افزودن اکسین به محیط درون شیشه‌ای موجب کاهش میزان باززایی می‌شود.

عریض‌ترین برگ‌ها (۰/۶۴ سانتی‌متر) بدون تأثیرپذیری از نوع ریزنمونه در بالاترین سطح هورمون BAP و عدم حضور هورمون IBA تولید گردیدند (شکل Va).

بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه نشان داد که در شرایط کاربرد هورمون Kin، عریض‌ترین برگ‌ها در شاخساره‌های باززایی شده از هر دو ریزنمونه، همانند طویل‌ترین آنها در بالاترین سطح این هورمون تولید گردیدند (شکل a و b). بر این اساس ریزنمونه برگ کامل در محیط کشت حاوی بالاترین سطوح هورمونی (۲ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA) و ریزنمونه تحتانی برگ نیز در بالاترین سطح هورمون Kin (۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم



شکل ۶- اثر متقابل ریزنمونه برگ کامل و ریزنمونه تحتانی برگ و هورمون IBA در ترکیب با BAP (a) و Kin (b) بر طول برگ شاخساره‌های باززایی شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه *H. attenuatae*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است ($P \leq 0.01$).

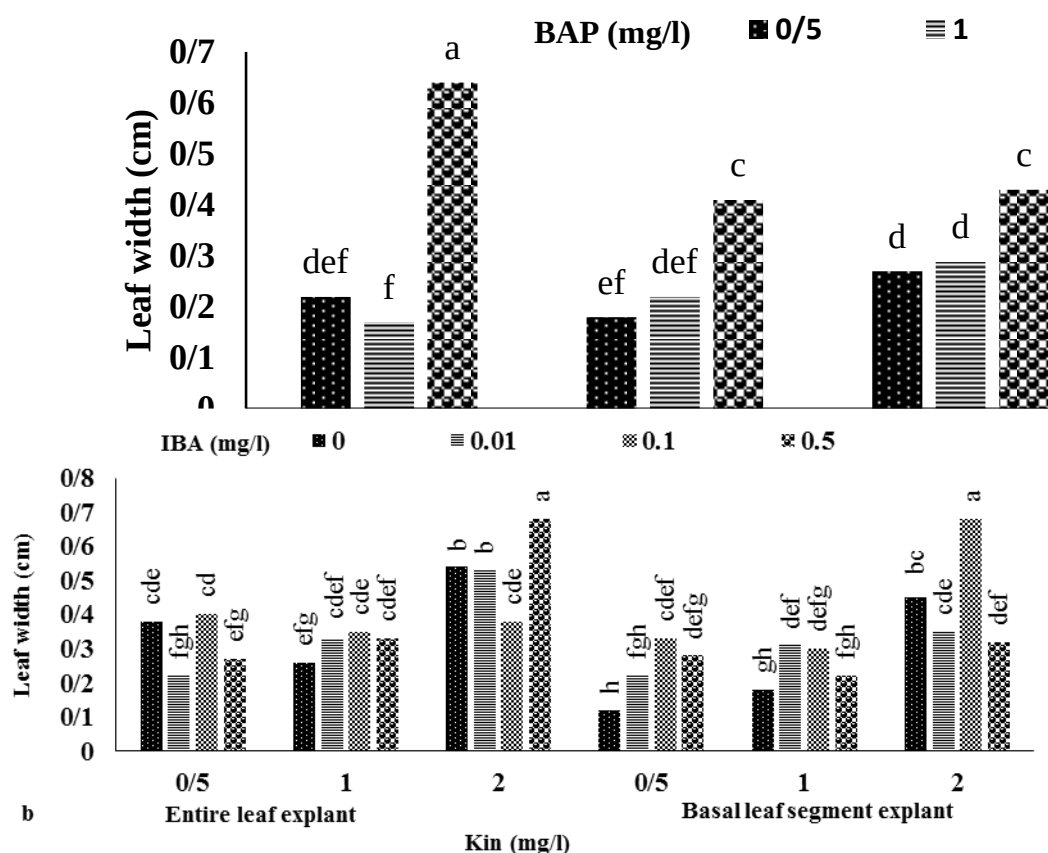
شده عامل تعیین‌کننده‌ای در موفقیت ریشه‌زایی است (Bandari et al., 2010) ولی تعداد و طول ریشه‌های تولیدشده به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر غلظت هورمون اکسین IBA و نوع محیط قرار گرفت، به‌طوری‌که مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد شاخساره‌های کشت‌شده در محیط $\frac{1}{2}$ MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تعداد ریشه (۶/۶۶ عدد) را تولید نمودند (شکل ۸a و ۹) و شاخساره‌هایی که در محیط $\frac{1}{2}$ MS حاوی تیمار هورمونی ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA کشت شدند، به‌طور مشترک بیشترین طول ریشه (به‌ترتیب ۳/۱۵ و ۳/۴۷ سانتی‌متر) را تولید کردند (شکل ۸b).

سایر محققین نیز، ریشه‌زایی بهتر شاخساره‌های باززایی شده برخی گیاهان از جمله گونه‌های دیگر هاورتیا را (Huang

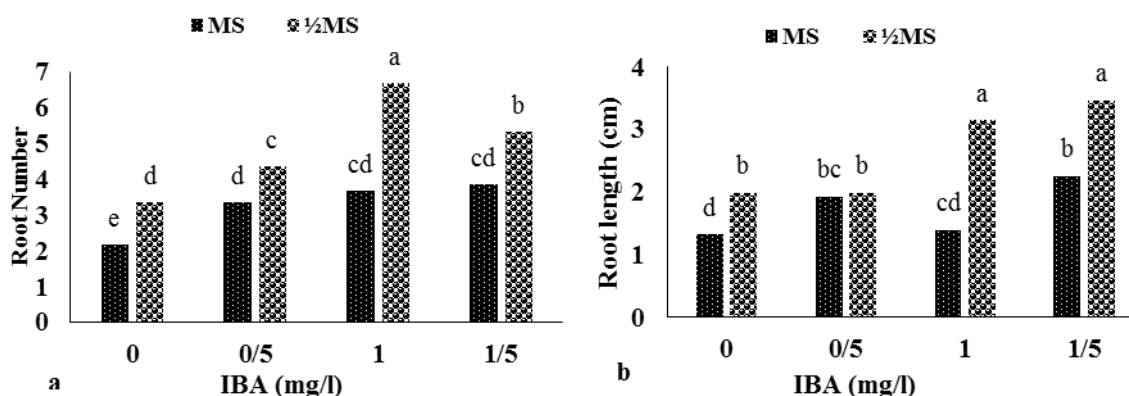
Gasper و همکاران (۲۰۰۳) و Zhang و همکاران (۲۰۰۱) نیز گزارش نمودند که تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نه تنها غیر اختصاصی شدن و تکثیر سلول‌ها را تنظیم می‌کنند بلکه موجب کنترل اندام‌زایی بافت‌ها نیز می‌گردند.

اثر نوع محیط کشت و هورمون IBA بر ریشه‌زایی گیاه

هاورتیا: به‌طورکلی، اکسین‌های IBA، NAA و IAA که به محیط کشت‌بافت گیاهی اضافه می‌شوند باعث ریشه‌زایی می‌شوند (Sivanesan et al., 2011). در این مطالعه، انتقال شاخساره‌های باززایی‌شده هاورتیا با کیفیت مطلوب و به اندازه تقریبی ۲ سانتی‌متر به محیط‌های کشت ریشه‌زایی حاوی اکسین IBA نشان داد که تقریباً تمامی شاخساره‌ها یک ماه پس از انتقال به محیط‌ها، ریشه‌دار شدند. کیفیت شاخساره باززایی



شکل ۷ (a) - اثر متقابل هورمون BA در ترکیب IBA و (b) اثر متقابل ریزنمونه برگ کامل و ریزنمونه تحتانی برگ و هورمون IBA در ترکیب با Kin بر عرض برگ شاخساره‌های باززایی‌شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه *H. attenuata*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است ($P \leq 0.01$).



شکل ۸ - اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد IBA با نوع محیط کشت بر تعداد (a) و طول (b) ریشه تولیدشده از شاخساره‌های باززایی‌شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه *H. attenuata*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است (تعداد ریشه، $P \leq 0.05$ و طول ریشه، $P \leq 0.01$).

غلظت نصف محیط پایه، تأثیر غلظت محیط پایه ممکن است به ترکیبات خاصی از محیط کشت مرتبط باشد، چرا که تغییرات

در *Mentha spicata* (Fadel et al., 2010) گزارش نموده‌اند. در ریشه‌زایی مطلوب در محیط 1/2MS



شکل ۹- ریشه زایی گیاه *H. attenuata* با کاربرد تیمار ۱ (a) و ۱/۵ میلی گرم در لیتر (b) هورمون IBA.

جزئی در غلظت عناصر کمیاب می‌تواند به‌طور چشمگیری بر اندام‌زایی گیاه در شرایط آزمایشگاهی تأثیر بگذارد (Fadel et al., 2010). ریشه‌زایی در گیاهان باززایی‌شده با مصرف اکسین‌ها انجام می‌شود و مصرف هورمون IBA در محیط‌های کشت اکثر گونه‌های گیاهی برای ریشه‌زایی مناسب گزارش شده است که می‌تواند به‌دلیل پایداری این اکسین مصنوعی در محیط باشد (Debnath and Bisen, 2006). همراهی با نتایج این پژوهش، محققین دیگر نیز مصرف هورمون IBA را در ریشه‌زایی گونه‌های دیگر گیاه هاورتیا (Chen et al., 2019; Huang et al., 2014) و آلوئه‌ورا (Dwivedi et al., 2014) موفقیت‌آمیز گزارش نمودند.

مرحله سازگاری: یکی از مراحل مهم و پیچیده کشت بافت گیاهان، استقرار شاخساره‌های باززایی‌شده ریشه‌دار در بسترهای کشت بعد از کشت درون‌شیشه‌ای است. در مرحله سازگاری شاخساره‌های هاورتیا به میزان ۹۰ درصد با محیط بیرون سازگار شدند و پس از انتقال به خاک رشد مطلوبی را از خود نشان دادند. گیاهان حاوی ذخیره بالاتر کربوهیدرات و صلاحیت فتوسنتزی شانس بیشتری برای زنده ماندن و رشد و نمو بهتر طی سازگاری دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که ریزازدیادی هاورتیا می‌تواند منجر به تولید گیاهان یک دست با تعداد گیاه باززایی‌شده مطلوب در زمان کوتاهی شود. هر دو ریزنمونه برگ کامل و قسمت تحتانی برگ در صورت انتخاب ترکیب هورمونی اکسینی و سیتوکینینی مناسب می‌تواند نتایج مطلوبی در باززایی

این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای به‌همراه داشته باشند. نتایج استفاده از هر دو سیتوکینین BAP و Kin در ترکیب با IBA برای ریزازدیادی هاورتیا نشان داد که استفاده از سیتوکینین Kin در ترکیب با IBA توانست از نظر تعداد شاخساره‌های باززایی‌شده (از ریزنمونه‌های قسمت تحتانی برگ) بهتر باشد. درحالی‌که کاربرد سیتوکینین BAP به‌همراه اکسین IBA توانست از نظر تولید تعداد بیشتر برگ در شاخساره‌های باززایی‌شده موفق‌تر عمل نماید. همچنین در مرحله ریشه‌زایی، استفاده از هورمون IBA در محیط $\frac{1}{2}$ MS توانست ریشه‌های مطلوبی را با تعداد مناسب تولید کند، به‌طوری‌که انتقال گیاهچه‌های باززایی‌شده، با درصد بالایی از سازگاری همراه بود. در کل استفاده از هورمون‌های BAP، Kin و IBA به‌عنوان سیتوکینین‌ها و اکسین تجاری پر مصرف می‌تواند در ریزازدیادی و ریشه‌زایی *H. attenuata* مورد توجه قرار گیرد. علاوه بر این، این نتایج می‌تواند در گسترش تحقیقات مربوط به فیزیولوژی، مهندسی ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی جنس *Haworthia* مؤثر باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه صنعتی شاهرود، شرکت زیست‌فناور سپنتا ناروان و آقای دکتر حمیدرضا اصغری به خاطر حمایت‌هایشان در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

- Abd Aziz, A. N., Tan, B. C., Othman, R. Y. and Khalid, N. (2018) Efficient micropropagation protocol and genome size estimation of an important cover crop, *Mucuna bracteata* DC. ex Kurz. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 132: 267-278.
- Badalamenti, O., Carra, A., Oddo, E., Carimi, F. and Sajeve, M. (2016) Is *in vitro* micrografting a possible valid alternative to traditional micropropagation in Cactaceae? *Pelecypora aselliformis* as a case study. *Springer Plus* 5: 201.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O. and Van Staden, J. (2010) Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63: 147-173.
- Bairu, M. W., Stirk, W. A., Dolezal, K. and Van-Staden, J. (2007) Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: Can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 15-23.
- Bandari, A. K., Negi, J. S., Bisht, V. K. and Bharti, M. K. (2010) *In vitro* propagation of *Aloe vera*. A plant with Medicinal properties. *Natural Science* 8: 8.
- Barker, W. F. (1929) *Haworthia*. *Journal of South African Botany* 11: 22-24.
- Baroja-Fernandez, E., Aguirreolea, J., Martinkova, H., Hanus, J. and Strnad, M. (2002) Aromatic cytokinins in micropropagated potato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 217-224.
- Bayer, B. (1999) *Haworthia Revisited*. A revision of the Genus. National Botanic Gardens of South Africa. Umdaus Press.
- Chen, Y. M., Huang, J. Z., Hou, T. W. and Pan, I. C. (2019) Effects of light intensity and plant growth regulators on callus proliferation and shoot regeneration in the ornamental succulent *Haworthia*. *Botanical Studies* 60: 1-10.
- Debiasi, C., Silva, C. G. and Pescador, R. (2007) Micropropagation of *Aloe vera* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 9: 36-43.
- Debnath, C. P. M. and Bisen, P. S. (2006) Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7: 33-49.
- Del poza, J. C., Lopez-matas, M. A., Ramirez- parra, E. and Gutierrez, Z. C. (2005) A hormone control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* 123: 173-183.
- Dwivedi, N. K., Indiradevi, A., Asha, K. I., Asokan, N. R. and Suma, A. (2014) A protocol for micro propagation of *Aloe vera* L. (Indian Aloe) a miracle plant. *Research in Biotechnology* 5: 1-5.
- Fadel, D., Kintzios, S., Economou, A. S., Moschopoulou, G. and Constantinidou, H. A. (2010) Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (*Mentha spicata* L.). *The Open Horticulture Journal* 3: 31-35.
- Garcia, R., Somonte, D., Zaldua, Z., Mena, J., Lopez, A., Moran, R., Arencibia, A. D., Quiroz Bravo, K. and Caligari, P. (2008) Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 16: 25-33.
- Gasper, T., Kevers, C., Faivre- Rampant, O., Crevecoeur, M., Penel, C., Greppin, H. and Dommes, J. (2003) Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39: 85-106.
- Huang, S. H., Xiao, H. Y. and Hong, Y. P. (2014) Tissue culture and rapid propagation of *Haworthia cymbiformis*. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)* 33: 682.
- Jayakrishna, C., Katthik, C., Barathi, S., Kamalanathan, D. and Arulselvi, I. P. (2011) *In vitro* propagation of *Aloe vera* *barbadensis* Miller, a miracle herb. *Research in Plant Biology* 5: 22-26.
- Kaul, K. and Sabharwal, P. S. (1972) Morphogenetic studies on *Haworthia*: Establishment of tissue culture and control of differentiation. *American Journal of Botany* 59: 377-385.
- Kharrazi, S. M., Nemati, Q. H., Tehranifer, A. S., Sharifi, A. and Bagheri, A. (2012) Effects of type and concentration of cytokinin on *in vitro* proliferation and vitrification rate of explants of four cloves (*Dianthus caryophyllus* L.) genotypes. *Journal of Horticultural Science* 25: 376-383 (In Persian).
- Kim, Y. H., Kim, H. H., Lee, G. Y., Lee, J. H., Jung, J. H. and Lee, S. D. (2018) Effect of growth regulators on *in vitro* mass propagation of *Haworthia maughanii*. *Journal of Plant Biotechnology* 45: 369-374.
- Kitamura, Y., Kubo, K., Rahman, L. and Ikenaga, T. (2002) Reproduction of *Sedum drymarioides*, an endangered rare species, by micropropagation. *Plant Biotechnology* 19: 303-309.
- Kumari, A., Baskaran, P. and Van Staden, J. (2016) *In vitro* propagation and antibacterial activity in *Cotyledon orbiculata*: A valuable medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 124: 97-104.
- Liu, B. L., Fang, H. Z., Meng, C. R., Chen, M., Chai, Q. D., Zhang, K. and Liu, S. J. (2017) Establishment of a rapid and efficient micropropagation system for succulent plant *Haworthia turgida*. *Hort Science* 52: 1278-1282.
- Lizumi, M. and Amaki, W. (2011) Micropropagation of *Haworthia cymbiformis* through thin-cell-layer tissue culture. *International Plant Propagators' Society* 61: 288-291.
- Majumdar, S. K. (1970a) Culture of *Haworthia* inflorescences *in vitro*. *Journal of South African Botany* 36: 63-67.

- Majumdar, S. K. (1970b) Production of plantlets from the ovary wall of *Haworthia turgida* var. *pallidifolia*. *Planta* 90: 212-214.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Mycock, D. J., Watt, M. P., Hannweg, K. F., Naicker, K., Makwareka, M. and Berjak, P. (1997) Somatic embryogenesis of two indigenous South African *Haworthia* spp. (*H. limifolia* and *H. koelmaniorum*). *Journal of South African Botany* 63: 345-350.
- Ogihara, Y. (1979) Tissue culture in *Haworthia*. II. Effects of three auxins and kinetin on greening and redifferentiation of calluses. *Botanical Magazine, Tokyo* 92: 163-171.
- Ogihara, Y. and Tsunewaki, K. (1978) Tissue culture in *Haworthia*. I. Effects of auxins and kinetin on callus growth. *Botanical Magazine, Tokyo* 91: 83-91.
- Richwine, A. M., Tipton, J. L. and Thompson, G. A. (1995) Establishment of Aloe, Gasteria, and *Haworthia* shoot cultures from inflorescence explants. *Hortscience* 30: 1443-1444.
- Rogers, S. M. D. (1993a) Culture phenotype effects on regeneration capacity in the monocot *Haworthia comptoniana*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 29: 9-12.
- Rogers, S. M. D. (1993b) Optimization of plant regeneration and rooting from leaf explants of five rare *Haworthia*. *Scientia Horticulturae* 56: 157-161.
- Sivanesan, I., Song, J. Y., Hwang, S. J. and Jeong, B. R. (2011) Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai - A rare endemic ornamental plant. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 105: 55-63.
- Werbrouck, S. P. O., Strnad, M., Van Onckelen, H. A. and Debergh, P. C. (1996) Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum* 98: 291-297.
- Zhang, C. L., Chen, D. F., Elliott, M. C. and Slater, A. (2001) Thidiazuron induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *In vitro cellular and Development Biology - Plant* 37: 305-310.

The effect of different concentrations of growth regulators on the micropropagation of *Haworthia attenuata* (zebra haworthi)

Nafiseh Najarian Kermani¹, Mahdeieh Parsaiyan¹, Ziba Ghasimi Hagh^{2*}

¹ Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

² Department of Horticulture Science and Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
(Received: 10/10/2020, Accepted: 27/04/2021)

Abstract

Due to the problems of sexual and asexual reproduction of *Haworthia attenuata* as one of the most popular ornamental succulents, the possibility of micropropagation of this plant in *in vitro* conditions was studied. The effect of BAP (Benzylamino purine) and Kin (Kinetin) (0.5, 1 and 2 mg/l) in combination with IBA (Indole-3-acetic acid) (0, 0.01, 0.1 and 0.5 mg/l) using leaf explants on the shoot regeneration of this plant showed that the highest number of shoots (5.22) was obtained with entire leaf explants on modified MS medium supplemented with 2 mg/l BAP and 0.01 mg/l IBA. Maximum number of leaves (4.66) and the longest and widest leaves (1.05 and 0.68 cm) were produced using entire leaf explants with 0.5 BAP mg/l and 2 mg/l plus 0.5 mg/l IBA, respectively. Whereas, the highest number of regenerated shoots (3.5), the longest (1.45 cm) and the widest shoots (0.87 cm) were observed in combination 1 mg/l Kin with 0.1 mg/l IBA with basal leaf segment explant. The results of root regeneration in modified MS and ½MS media supplemented with 0, 0.5, 1, 1.5 mg/l IBA showed that the highest number of roots (6.66), as well as the longest root (3.47 cm) were observed in ½MS medium supplemented with 1 and 1.5 mg / l IBA, respectively. From the rooted plantlets, 90% were adapted to the greenhouse environment. Generally, further optimization of this protocol may help to use leaf explant for commercial micropropagation of *Haworthia attenuata*.

Key word: Micropropagation, BAP, *Haworthia attenuate*, IBA, Kin, Leaf explant

Corresponding author, Email: z_ghasimi@yahoo.com, zghasimi@shahroodut.ac.ir