مقاله پژوهشی

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

نفیسه نجاریان کرمانی[۱]، مهدیه پارساییان[۱] و زیبا قسیمی‌حق*[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

به‌دلیل مشکلات تکثیر جنسی و غیرجنسی *Haworthia attenuatae* به‌عنوان یکی از محبوب‌ترین گیاهان گوشتی زینتی، امکان ریزازدیادی این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. اثر جداگانه سیتوکینین‌های BAP (Benzylamino purine) و Kin (kinetin) (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با IBA (Indole-3-acetic acid) (صفر، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) با استفاده از ریزنمونه‌های برگی بر شاخه‌زایی این گیاه نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۵/۲۲ عدد) در محیط‌کشت MS تغییریافته با ریزنمونه برگ کامل در ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. حداکثر تعداد برگ (۴/۶۶ عدد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور IBA و طویل‌ترین و عریض‌ترین برگ‌ها (۱/۰۵ و ۰/۶۸ سانتی‌متر) با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA با ریزنمونه برگ کامل تولید شدند. درحالی‌که با مصرف Kin، بیشترین تعداد (۳/۵ عدد)، طویل‌ترین (۱/۴۵ سانتی‌متر) و عریض‌ترین (۰/۸۷ سانتی‌متر) شاخساره‌های باززایی‌شده در ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با ریزنمونه بخش تحتانی برگ بدست آمد. نتایج ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی‌شده در محیط‌های MS و ½MS تغییریافته با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA نشان داد که بیشترین تعداد ریشه (۶/۶۶ عدد) و طویل‌ترین ریشه (۳/۴۷ سانتی‌متر) در محیط ½MS به‌ترتیب با ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم 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 برگی

مقدمه

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; Chen *et al*., 2019) به‌طوری‌که این تنوع باعث جلب توجه گیاه‌شناسان و گردآورندگان گیاهان گوشتی شده است (Liu *et al*., 2017). این گیاهان به‌عنوان گیاهان زینتی گلدانی و نیز در فضای سبز در محوطه‌سازی با سنگریزه‌ها کاربرد دارند (Barker, 1929). *H. attenuatae*، گونه‌ای از هاورتیا است که

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]

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 برگی انجام می‌شود ولی تعداد پاجوش‌ها در این گیاه کم بوده و تکثیر با قلمه‌های برگی به‌دلیل 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 کشت‌بافت گیاهی در تکثیر وسیع و سریع برخی گیاهان گوشتی از جمله *Cotyledon orbiculata* (Kumari *et al*., 2016)، *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 صورت‌گرفته در کشت‌بافت 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; Kaul and Sabharwal, 1972) و MS (Kaul and Sabharwal, 1972) با افزودنی‌هایی از قبیل شیر نارگیل (Majumdar, 1970a; Majumdar, 1970b; Kaul and Sabharwal, 1972) و کازیین هیدرولیزشده (Kaul and Sabharwal, 1972) استفاده شده است. باززایی مستقیم را Rogers (۱۹۹۳b) با استفاده از ریزنمونه برگی و ترکیب هورمون‌های BA و Kin در گونه‌های *H. retusa*, *H. emelyae*, *H. mirabilis* و *H. mutica*، Richwine (۱۹۹۵) با ریزنمونه گل‌آذین و هورمون‌های BA و Zeatin در گونه‌های *H. attenuate*, *H. coorctata* و *H. limifolia* و Lizumi و Amaki (۲۰۱۱) با ریزنمونه برگی 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 برگی 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 تغییریافته که در آن به جای آهن Fe-EDTA از Fe-EDDHA استفاده شود هیچ گزارشی در *H. attenuatae* نشده است. در این پژوهش، ریزازدیادی این گیاه در محیط پایه MS تغییریافته با استفاده از دو نوع ریزنمونه برگی 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 استریل‌کردن، ریزنمونه‌های برگی به‌مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفتند و در ادامه در زیر هود ایرفلولامینار یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند و دوبار با آب‌مقطر استریل آب‌شویی شدند و در مرحله بعد، ریزنمونه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و درنهایت سه بار با آب‌مقطر استریل آبکشی شدند. ریزنمونه‌های استریل برای انجام کشت در زیر هود در روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا سطح آن‌ها خشک

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]

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 ۳۷/۶ میلی‌گرم در لیتر آهن (FeNaEDTA) Ethylenediamine tetraacetate ferric sodium iron از ۱۱۰ میلی‌گرم در لیتر آهن (Fe-EDDHA) Ethylenediamine di-2-hydroxyphenyl 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 ۲ سانتی‌متر بود. فاکتور دوم، نوع هورمون سیتوکینینی BAP (در آزمایش اول) و یا Kin (در آزمایش دوم) با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و فاکتور سوم هورمون اکسین IBA با غلظت‌های صفر، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵ 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 ۲ سانتی‌متری به محیط‌های MS و ½MS تغییریافته حاوی هورمون اکسین IBA با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ 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 ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک فیلتر شده جهت کاهش ترکیبات فنلی به‌همراه ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز به محیط‌کشت‌ها اضافه گردید و pH محیط‌های کشت ۵/۸ تنظیم شد. کشت‌ها در شرایط دمایی ۲۵°C ±۲ و با فوتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با لامپ فلورسنت شدت نور ۴۵ 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 ۱:۲ انجام شد. گیاهچه‌های ریشه‌دارشده با احتیاط و به کمک پنس از محیط‌های کشت خارج شدند وپس از شست‌وشوی آرام ریشه‌ها با جریان آب و حذف آگار، در گلدان‌ها کاشته شدند. گیاهان برای مدت ۱۰ 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 ۲۵°C ±۲، رطوبت نسبی ۸۰ درصد و شدت نوری ۱۰۰۰۰ لوکس بود. آبیاری براساس نیاز گیاه در گلخانه انجام شد. پس از ۲ ماه، درصد بقای گیاهچه‌های سازگارشده، ثبت شد.

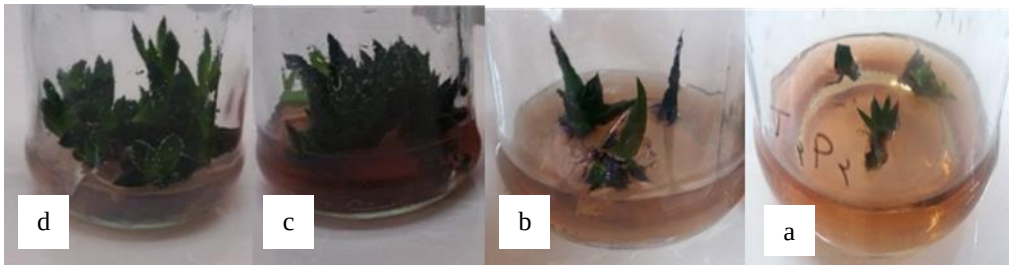
تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم گردیدند. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD توسط نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد و آزمون t زوجی برای مقایسه بین هورمون‌های سیتوکینینی به تفکیک هر ریز نمونه و برای هر صفت به‌طور جداگانه صورت گرفت.

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 تغییریافته با استفاده از دو نوع سیتوکینین‌های BAP و Kin در ترکیب با اکسین IBA را ارائه می‌کند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]

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 باززایی‌شده (a)، یک ماه پس از باززایی (b) و دو ماه پس از باززایی (c) از ریزنمونه برگ کامل d تا f: شاخساره اولیه باززایی‌شده (d)، یک ماه پس از باززایی (e) و دو ماه پس از باززایی (f) از ریزنمونه تحتانی برگ

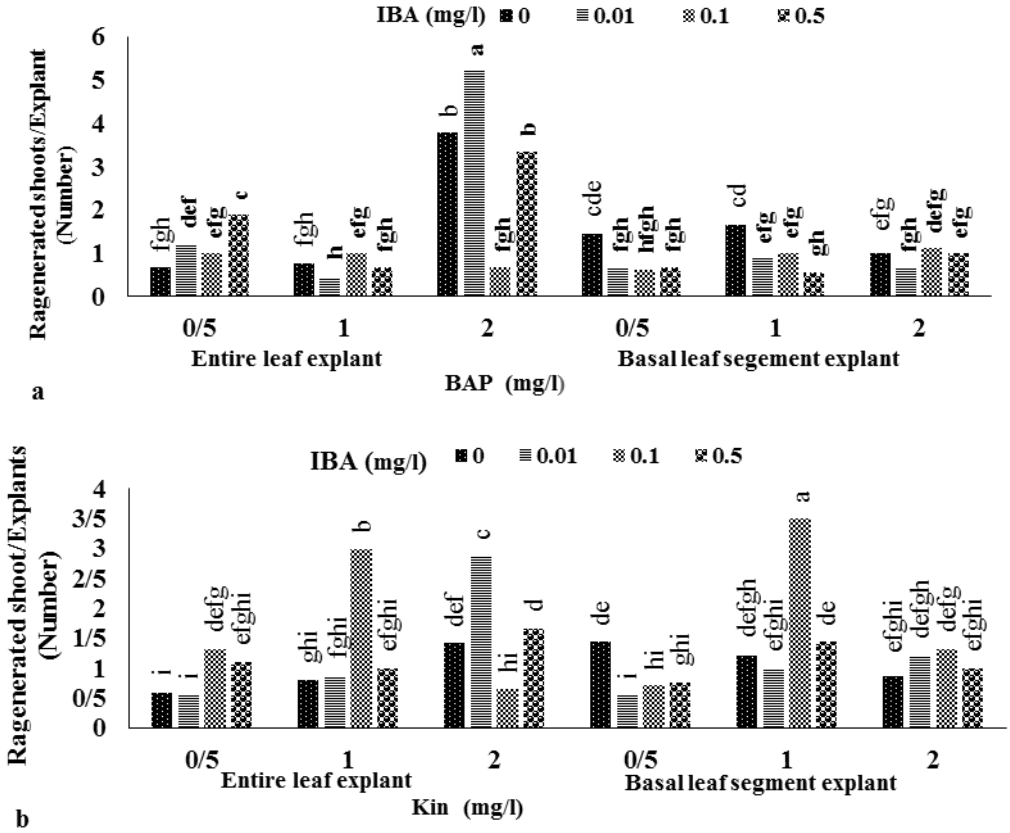


شکل ۲- باززایی شاخساره *H. attenuatae* از ریزنمونه بخش تحتانی برگ و برگ کامل با تیمار هورمونی Kin و IBA. باززایی از ریزنمونه تحتانی برگ (a) و باززایی از ریزنمونه برگ کامل (b) یک ماه پس از کشت اولیه. شاخساره‌های باززایی‌شده پس از دو ماه با ریزنمونه تحتانی برگ (c) و با ریزنمونه برگ کامل (d)

اثر هورمون‌های BAP و Kin در ترکیب باIBA بر باززایی گیاه هاورتیا، تعداد شاخساره: در هر دو آزمایش، باززایی شاخساره‌ها از ریزنمونه‌های برگی *H.attenuatae* پس از ۸ هفته آغاز شد و نتایج کاربرد هورمون‌های BAP و Kin در ترکیب با IBA بر باززایی ریزنمونه‌های برگی 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 وKin 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 بیشترین تعداد شاخساره باززایی‌شده (۵/۲۲ عدد) درنتیجه مصرف ۲ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون به‌همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (شکل ۳a) درحالی‌که در شرایط استفاده از Kin، ریزنمونه تحتانی برگ با کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تعداد شاخساره (۳/۵ عدد) را تولید نمود (شکل ۳b).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها اصلی‌ترین تنظیم‌کننده‌های درگیر در برگشت از تمایز و تمایزیابی سلول‌های گیاهی هستند. نظر به اهمیت سیتوکینین‌ها در روند تقسیم سلولی، اندام‌زایی و درنتیجه تعداد شاخساره تولیدشده، باززایی و تکثیر شاخساره‌ها طی ریزازدیادی تحت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]



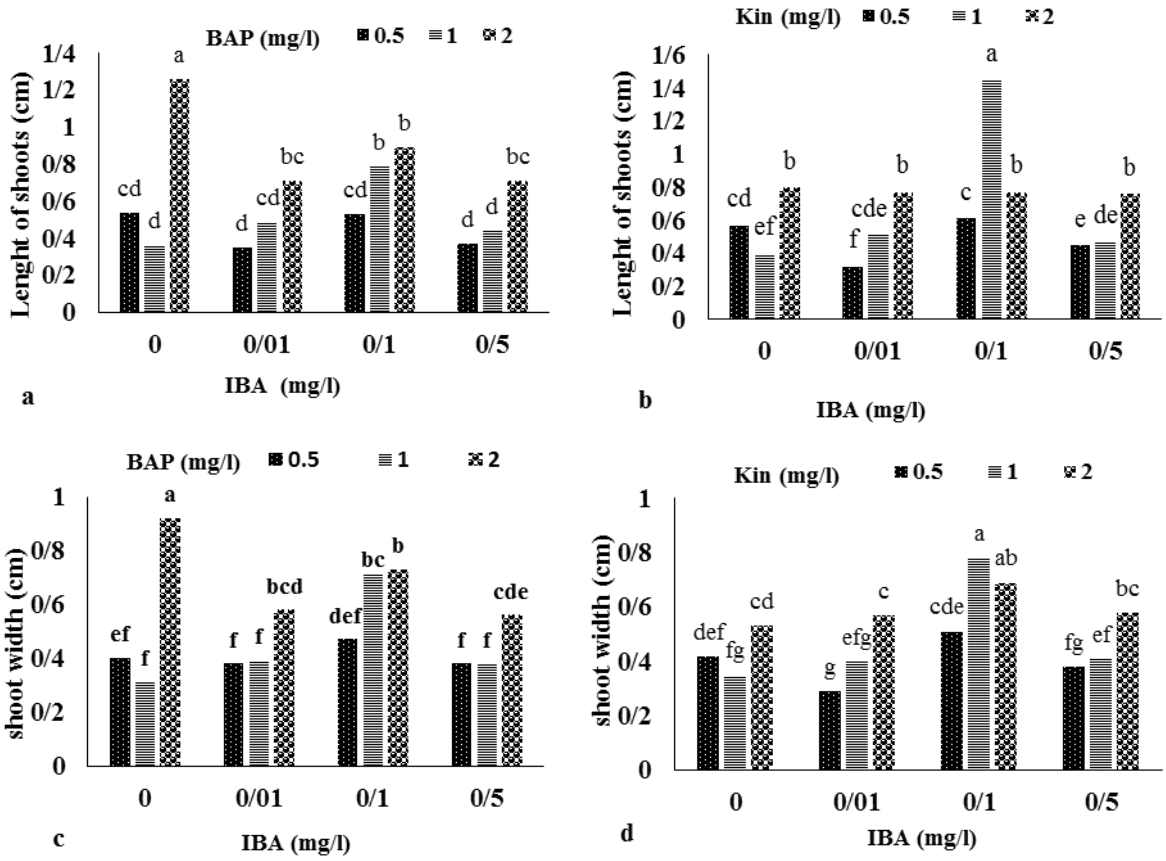
شکل ۳- اثر متقابل انواع ریزنمونه (ریزنمونه برگ کامل و ریزنمونه تحتانی برگ) و هورمون IBA در ترکیب با BAP (a) و Kin (b) بر تعداد شاخساره‌های باززایی‌شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه *H. attenuatae*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون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

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 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 برگی، 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 آلوئه‌ورا (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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]



شکل ۴- اثر هورمون IBA در ترکیب با BAP و Kin بر طول (a و b) و عرض (c و d) شاخساره‌های باززایی‌شده از هر دو نوع ریزنمونه (ریزنمونه برگ کامل و تحتانی برگ) 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 ($P \leq 0.01$).

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 طویل‌ترین 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 میلی گرم در لیتر BA و Kin شاخساره‌هایی با ارتفاع مناسب تولید می‌کند و غلظت‌های 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 کشت‌بافت 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 باززایی‌شده با نتایج به‌دست آمده برای صفت طول شاخساره مشابه بود (شکل ۴c و d). به‌طوری‌که نوع ریزنمونه در تغییر عرض شاخساره‌های باززایی‌شده تأثیر معنی‌داری نداشت. درحالی‌که در سطوح

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]

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 هاورتیای 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.

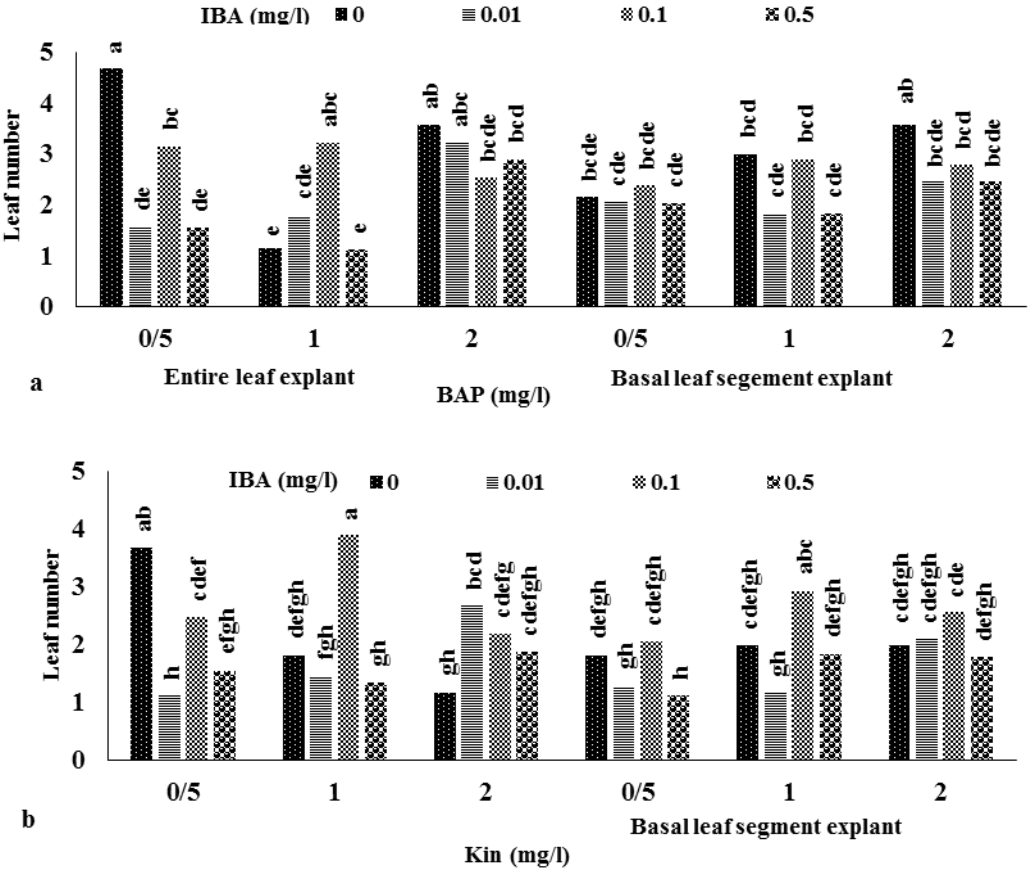
تعداد و طول برگ: نتایج مقایسه میانگین تعداد برگ در شاخساره‌های باززایی‌شده هاورتیا در محیط‌های کشت حاوی ترکیبات هورمونی BAP و IBA، مبین برتری ریزنمونه برگ کامل از نظر تولید تعداد برگ (۴/۶۶ عدد)، تحت تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و عدم مصرف هورمون IBA بود (شکل ۵a). همچنین این ریزنمونه در سطوح بالاتر کاربرد BAP (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌همراه سطوح پایین ۰/۱، ۰ و ۰/۰۱ میلی گرم 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]

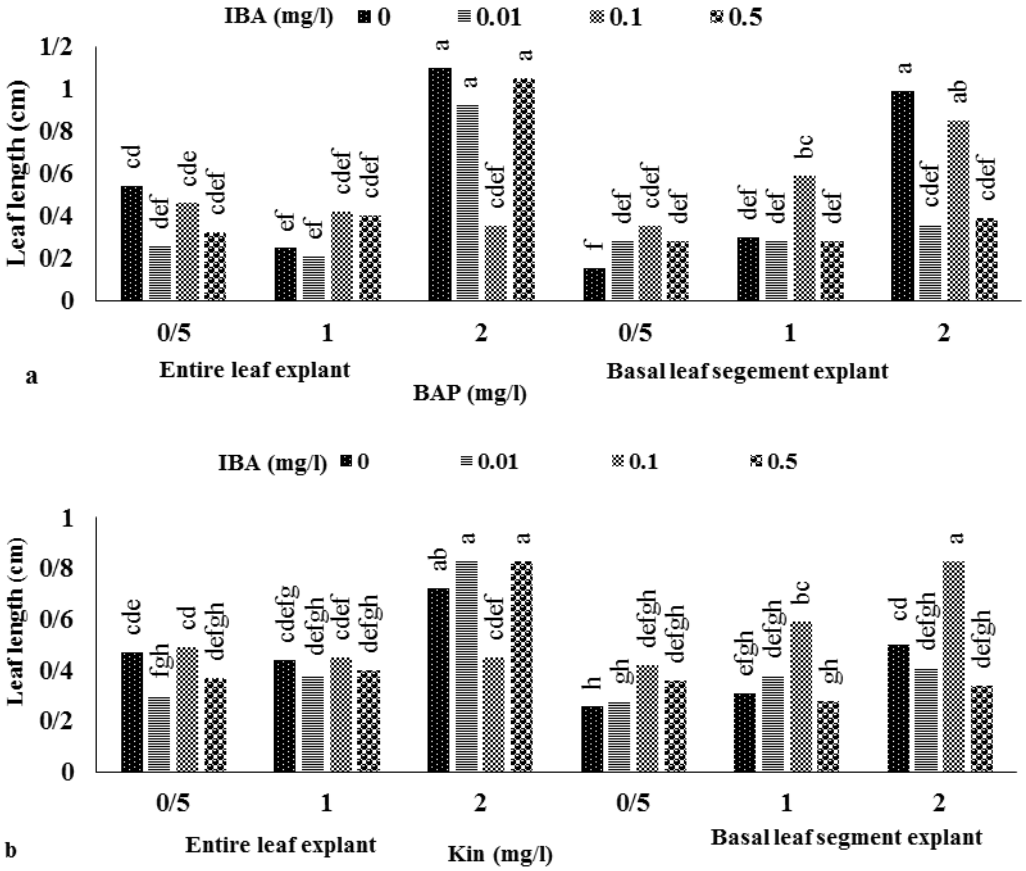


شکل ۵- اثر متقابل ریزنمونه برگ (برگ کامل و ریزنمونه تحتانی برگ) و هورمون IBA در ترکیب با BAP (a) و Kin (b) بر تعداد برگ شاخساره‌های باززایی‌شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه *H. attenuatae*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است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

عریض‌ترین برگ‌ها (۰/۶۴ سانتی‌متر) بدون تأثیرپذیری از نوع ریزنمونه در بالاترین سطح هورمون BAP و عدم‌حضور هورمون IBA تولید گردیدند (شکل ۷a).

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 ۷ a و b). بر این اساس ریزنمونه برگ کامل در محیط‌کشت 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 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 ۷ b). شکل ۲ نمونه‌ای از گیاهان باززایی‌شده هاورتیا را پس از دو ماه نشان می‌دهد. به‌طورکلی، 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]



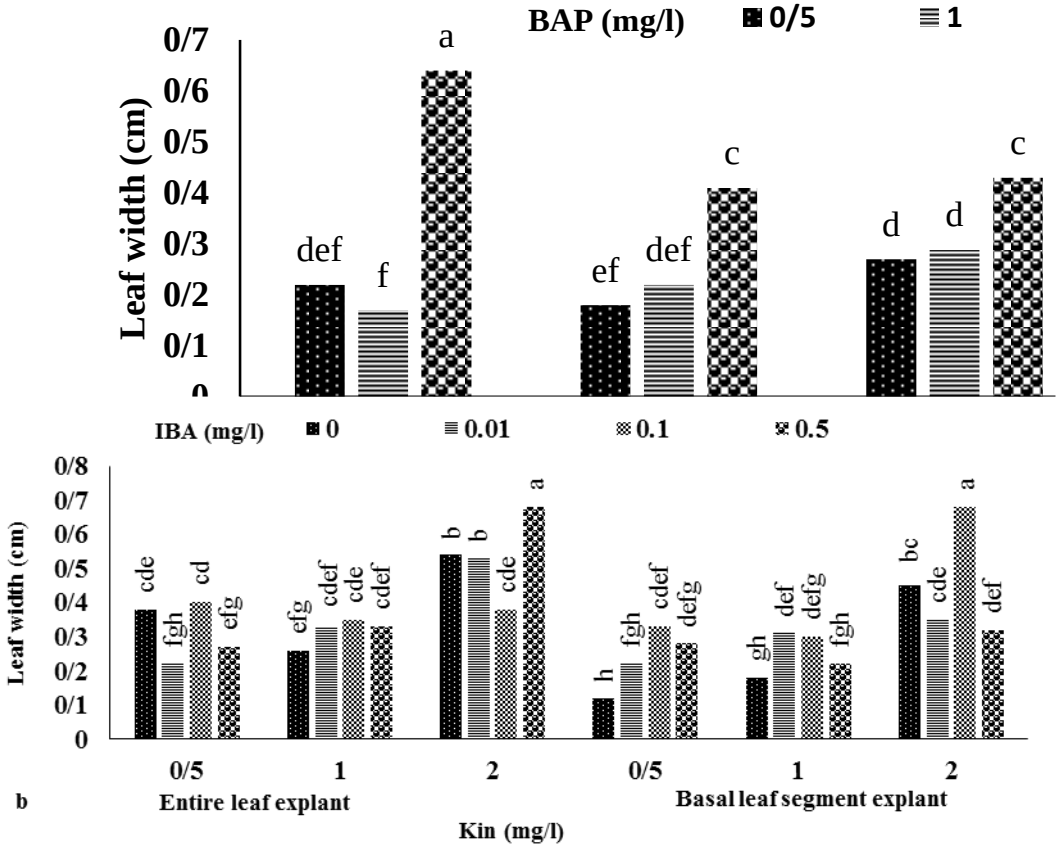
شکل ۶- اثر متقابل ریزنمونه برگ کامل و ریزنمونه تحتانی برگ و هورمون IBA در ترکیب با BAP (a) و Kin (b) بر طول برگ شاخساره‌های باززایی‌شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه *H. attenuatae*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است ($P \leq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

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

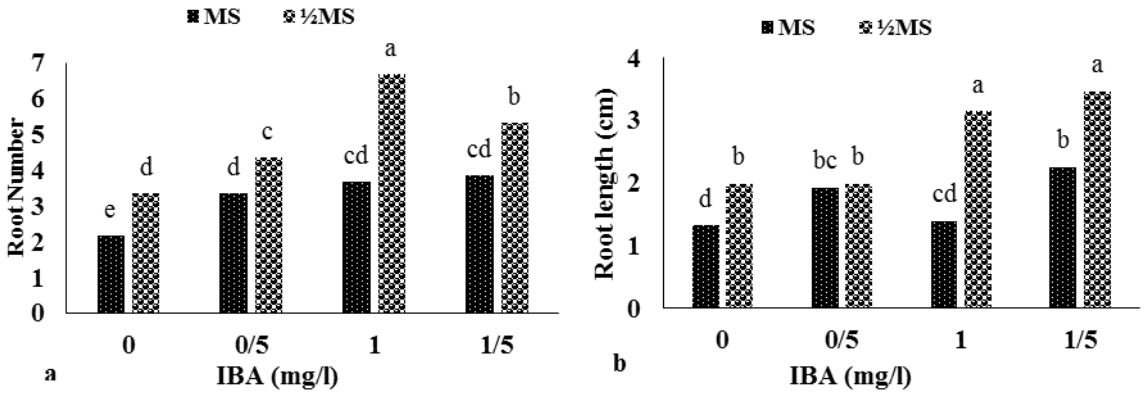
اثر نوع محیط‌کشت و هورمون IBA بر ریشه‌زایی گیاه هاورتیا: به‌طورکلی، اکسین‌های IBA، NAA و IAA که به محیط کشت‌بافت گیاهی اضافه می‌شوند باعث ریشه‌زایی می‌شوند (Sivanesan *et al*., 2011). در این مطالعه، انتقال شاخساره‌های باززایی‌شده هاورتیا با کیفیت مطلوب و به اندازه تقریبی ۲ سانتی‌متر به محیط‌های کشت ریشه‌زایی حاوی اکسین IBA نشان داد که تقریباً تمامی شاخساره‌ها یک ماه پس از انتقال به محیط‌ها، ریشه‌دار شدند. کیفیت شاخساره باززایی 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 ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تعداد ریشه (۶/۶۶ عدد) را تولید نمودند (شکل ۸a و ۹) و شاخساره‌هایی که در محیط ½MS 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]



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. attenuatae*. مقادیر، میانگین سه تکرار (هر تکرار سه جدا کشت) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است ($P \leq 0.01$).



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. attenuatae*. 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 محیط‌کشت مرتبط باشد، چرا که تغییرات

(Fadel *et al*., 2010) *Mentha spicata* ،(*et al*., 2014 در محیط ½MS گزارش نموده‌اند. در ریشه‌زایی مطلوب در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]

شکل ۹- ریشه زایی گیاه *H. attenuatae* با کاربرد تیمار ۱ (a) و ۱/۵ میلی‌گرم 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). همراستا 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 زنده‌ماندن 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 بازازایی 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 ½MS 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. attenuatae* 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]

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 Sajeva, M. (2016) Is *in vitro* micrografting a possible valid alternative to traditional micropropagation in Cactaceae? Pelecyphora 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. Arevision of the Genous. 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. Botacial Studies 60: 1-10.

Debiasi, C., Silva, C. G. and Pescador, R. (2007) Micropropagation of *Aloe vera* L. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 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 Gutierre, 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 *Hworthia cymbioformis.* Journal of Fujian Normal University (Naturral 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]

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 Cultular 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) Thidiazeron induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *In vitro* cellular and Development Biology – Plant 37: 305-310.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]

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

Nafiseh Najarian Kermani[1], Mahdeieh Parsaiyan[1], 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 attenuatae* 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.45.6.4]