https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en
IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 14, Issue, No. 2, Summer 2022
Document Type: Research Paper
Received: 2021-03-21 Accepted: 2022-11-29

Micropropagation of *Haworthia limifolia* using plant growth regulators

Abbas Saidi[1*], Saba Azimi[1]

[1.] Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

Haworthiopsis limifolia, a cactus native to South Africa, is one of the herbaceous ornamental plants belonging to the Asphodelaceae family. This succulent perennial plant is known for its medicinal properties, including antibacterial and antifungal properties. The production and cultivation of this plant are traditionally associated with low yield and time consumption, which do not meet any needs of the market, and the producer faces problems with mass production. To solve these problems, new propagation methods, such as tissue culture, are used. The objectives of this study were to introduce a novel protocol for disinfecting Hawthorn for *in vitro* tissue culture and investigate the effects of different levels of growth regulators, including BAP (benzyl amino purine) and IBA (indole butyric acid), on the micropropagation of this plant. The results showed that 1.5% sodium hypochlorite solution for 10 minutes was the best treatment for the disinfection of the isolated cultures. In addition, our results indicated that the highest number of succulents (10) belonged to the treatment of 1.5 mg /L BAP. According to the mean comparison, the best treatment for rooting was 1.5 mg/L of IBA. The 1.5 mg/l concentration of BAP led to the maximum number of succulents. Moreover, BAP had a more significant effect than IBA on cacti's rooting, shooting, and suckering.

Introduction

The *Haworthia limifolia*, with the scientific name *Haworthia limifolia*, is an ornamental, herbaceous, and perennial plant from the Asphodelaceae family and tends to fall under the category of succulent cactus plants. This particular plant originates from South Africa and is commonly grown for decorative purposes. It is also known for its medicinal properties, which include antibacterial and antifungal benefits. *Haworthia limifolia* is a highly prized plant, sought after for its unique and stunning appearance, featuring two distinct colors, and it is often considered an ornamental plant. This plant's compact size allows for easy cultivation in a small pot or a lovely terrarium alongside other decorative succulents. In addition, in the past years, *Haworthia limifolia*, like aloe vera plants, has been widely considered in traditional medicine among the natives of the region. Traditionally, the

* Corresponding Author: abbas.saidi@gmail.com

2322- 2204/ © 2023 University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses BY-NC-ND 4.0)

DOI. 10.22108/IJPB.2022.127562.1242

yield and breeding of this plant are low and time-consuming, which fails to meet market demands. As a result, the producer encounters difficulties in mass production. Modern methods, like tissue culture, are used to solve this problem. The success rate of micropropagation depends on multiple factors, including explant type, nutrients, plant growth regulators, additives, temperature, light intensity, and duration.

Materials and Methods

The offshoots surrounding the plants were removed, and the roots were gently separated without causing any harm to the plant. Next, the leaves and meristem were placed in a net and washed under running water for one hour. To disinfect the samples before growing them in the plant culture media, 2.5 ml of 20% Tween 20 were added to 100 ml of water after washing with running water for one hour. Then, the samples were soaked in the solution of Mancozeb fungicide (2 grams per 100 ml) and remained in this solution for 20 minutes. Following the disinfection process, small pieces of leaves containing meristems were placed on an MS culture medium (pH=5.8) with 30 grams of sucrose and 7 grams per liter of agar for 14 days. The samples were then regularly subcultured. Different concentrations (0, 1, 1.5, 2, and 4 mg/L) of IBA (indole butyric acid) and BAP (benzyl amino purine) hormones were applied to produce shoots, roots, and offshoots. After four weeks, the desired traits were measured.

Results and Discussion

Based on our results, the most effective way to disinfect isolated cultures is to treat them with a 1.5% sodium hypochlorite solution for 10 minutes. Variance analysis showed that the effect of BAP concentration on the number of *Haworthia* leaves was significant at the five percent level. The variance analysis indicates that the concentration of BAP had a significant impact on the number of leaves, the length of the longest leaf, and overall plant height. However, the number of roots in *Haworthia limifolia* was only significantly affected by the concentration of IBA hormone and the type of culture medium used, with no noticeable impact from the interaction of these factors. Our results revealed that the treatment of 1.5 mg/L BAP resulted in the highest number of stems (10) in *Haworthia* tissue cultures, and the most effective treatment for rooting was IBA at a concentration of 1.5 mg/L according to mean comparison results. In the stem formation stage, the tallest seedlings were observed in the treatment with 1 mg/L BAP hormone, indicating a 45.5% increase compared to the control treatment in contrast, the treatment with the highest concentration (4 mg/L) of BAP resulted in the shortest seedlings, with a decrease of 42.2% in plant height compared to the control treatment. Overall, as the concentration of BAP hormone increased, the height of *Haworthia* seedlings decreased. In addition, using IBA hormone at a 0.5 mg/L concentration resulted in a 17.8% reduction in seedling height. The best results for offshoot growth were achieved by using 1.5 mg/liter BAP in the plant culture medium.

Conclusion

The purpose of this study was to discover a way to disinfect *Haworthia* for *in vitro* tissue culture and explore the impact of various levels of growth regulators, such as BAP and IBA, on the plant's micropropagation. The findings revealed that BAP had a greater influence than IBA on the production of shoots, roots, and offshoots in *Haworthia* explants.

Keywords: Ornamental plant, *Hawthorn limifolia*, Stem formation, Rooting, Sucker

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال چهاردهم، شمارهٔ پنجاه و دوم، تابستان ۱۴۰۱، صفحهٔ ۷۸-۶۵
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۱/۰۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۴۰۱/۰۸/۲۸
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸
مقاله پژوهشی

ریزازدیادی گیاه *Haworthia limifolia* با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

عباس سعیدی[1*]، صبا عظیمی[1]
[1] گروه علوم و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکدهٔ علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده
کاکتوس (*Haworthiopsis limifolia*)، بومی آفریقای جنوبی، یک گیاه زینتی علفی از خانواده Asphodelaceae است. این گیاه چند ساله گوشتی به دلیل خواص دارویی از جمله خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی شناخته شده است. تولید و کشت این گیاه به طور سنتی با عملکرد کم و زمان بر بوده و پاسخگوی نیاز بازار نیست و تولید کننده برای تولید انبوه با مشکل مواجه است. برای حل این مشکل از روش های جدید تکثیر مانند کشت بافت استفاده می شود. هدف از مطالعه ما بررسی و شناسایی روشی برای ضد عفونی کردن کشت بافت در شرایط آزمایشگاهی هارورتیا و سپس بررسی اثرات سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد شامل BAP (بنزیل آمینوپورین) و IBA (ایندول بوتیریک اسید) بر ریزازدیادی این گیاه بود. گیاه. نتایج ما نشان داد که محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه بهترین تیمار برای ضدعفونی کشت های جدا شده بود. نتایج ما نشان داد که بیشترین تعداد ساکولنت (۱۰) مربوط به ۱/۵میلی‌گرم در لیتر BAP بود. مقایسه میانگین نشان داد که بهترین تیمار برای ریشه زایی (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA) بود. حداکثر تعداد ساکولنت ها از ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP به دست آمد. بر اساس نتایج، BAP نسبت به IBA تأثیر معنی‌داری بر ریشه‌زایی، ساچمه‌زنی و مکیدن کاکتوس‌ها داشت.

واژه‌های کلیدی: گیاه زینتی، *هاورتیا لیمیفولیا*، ساقه‌زایی، ریشه‌زایی، پاجوش

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: abbas.saidi@gmail.com، شمارهٔ تماس: ۰۲۱۲۲۴۳۱۶۶۴

2322- 2204/ © 2023 University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses BY-NC-ND 4.0)

DOI. 10.22108/IJPB.2022.127562.1242

مقدمه

هاورتیا لیمیفولیا با نام علمی *Haworthiopsis limifolia* گیاهی زینتی، گوشتی، علفی، بوته‌ای و چند ساله از خانواده Asphodelaceae که بومی آفریقای جنوبی است. *هاورتیا* گیاهانی با برگ‌های گوشتی که به شکل گلبرگ‌های روبروی هم و به صورت چرخشی به سمت بالا قرار دارند. قطر برگ‌ها از ۳ تا ۳۰ سانتی‌متر در گونه‌های مختلف دیده می شود. این گیاهان معمولاً بدون ساقه، ارتفاع تقریبی آنها ۱۰ سانتی‌متر و دارای برگ‌های ضخیم و نوک تیز متشکل از دو رنگ سبز و زرد هستند که برگ‌های اولیه ضخیم‌تر و برگ‌های جوان‌تر کشیده و باریک است (Chen *et al*., 2019).

هاورتیا لیمیفولیا به دلیل کمیابی و ظاهر زیبا و خاص خود و همچنین، دو رنگ بودن، به عنوان یک گیاه زینتی و کلکسیونی استفاده می‌شود. کوچک بودن این گیاه باعث می شود که آن را به صورت چندتایی و یا در کنار دیگر پاجوش‌های زینتی در یک گلدان کوچک کشت کرد. علاوه براین، از سال های گذشته *هاورتیا لیمیفولیا* مانند گیاه آلوئه‌ورا، به‌صورت گسترده مورد توجه طب سنتی در میان بومیان منطقه بوده است. همچنین، در پژوهش های اخیر دانشمندان متوجه خواص دارویی دیگر این گیاه از جمله خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و تأثیر بر باروری و پرآوری در محصولات دامی شده‌اند (Naidoo and Coopoosamy, 2011).

تکثیر طبیعی این گیاه، از طریق پاجوش به دلیل کند بودن این روش جوابگوی تقاضای بازار نیست و همچنین، تکثیر به روش کشت بذر به دلیل مشکلاتی نظیر نرعقیمی و دگرگشنی، باعث افزایش تفرق ژنتیکی در نتایج می شود. بنابراین، می توان با استفاده از کشت بافت درون شیشه‌ای تقاضای بازار را برطرف کرد.

به‌منظور ارزیابی باززایی درون شیشه ای کاکتوس، آزمایشی در محیط‌های کشت حاوی هورمون‌های رشد گیاهی نفتالین استیک اسید (NAA) و بنزیل آمینوپورین (BAP) و محیط کشت‌های فاقد این هورمون‌ها انجام شد (Chen *et al*., 2019). در این تحقیق، بیشترین تعداد شاخساره در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد و بیشترین طول شاخساره نیز به تیماری با ۲ میلی گرم در لیتر BAP مربوط بود. همچنین، بیشترین طول ریشه تحت تأثیر محیط کشت با تیمار دارای ۴ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA دیده شد.

در کشت بافت گلابی خاردار، بهترین محیط کشت برای اندام‌زایی را مقادیر ۲، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر IBA به‌همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP با محیط کشت پایه MS معرفی نموده‌اند (El Finti *et al*., 2012). در پژوهشی نشان داده شد که تیمارهایی با محیط MS که حاوی BAP به‌همراه NAA بود، بیشترین میزان شاخه زایی در محیط کشت با ۱ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد. در مرحله بعدی که ریشه‌زایی بود، بعضی نمونه‌ها ریشه‌دار شد ولی با اضافه شدن مقدار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA، ریشه زایی بهبود پیدا کرد (Abrie and Staden, 2001).

در تحقیقی روی ۵ رقم از *هاورتیا* در محیط کشت MS تیمارهای ۰، ۱، ۲ و یا ۴ میلی گرم در لیتر Kinitin یا BAP (کینتین نوعی سیتوکینین

است، دسته ای از هورمون‌های گیاهی که تقسیم سلولی را تقویت می‌کند) اضافه و پس از جوانه‌زنی و شاخه‌زایی، در مرحله واکشت برای ریشه‌زایی تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA اعمال شد (Rogers *et al*.,1993). در نتیجه این تحقیق میزان جوانه‌زنی در هر ۵ رقم متفاوت بود و بیشترین جوانه‌زنی بین ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر Kinitin مشاهده شد. بلندترین شاخه‌ها نیز در محیط‌های بدون هورمون و یا کمترین میزان Kinitin قرار داشتند. در تحقیقی دیگر بر روی *Haworthia comptoniana*، از مقادیر صفر تا ۱۰ میلی گرم بر لیتر BAP برای کالوس‌زایی و ساقه‌زایی استفاده شد. بیشترین تعداد جوانه در تیمار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP مشاهده شد (Seol *et al*., 2008; Efferth, 2019). در سال‌های اخیر، کشت بافت پتانسیل وسیعی برای تکثیر سریع گونه‌ها در بیشتر جنس‌های پاجوش شامل این کاکتوس با نام نوتو کاکتوس (*Notocactus scopa*) و پلسیفورا (*Pelecyphora aselliformis*) و کالانچو (*Kalanchoe pinnata*) را ممکن ساخته است (Seol *et al*., 2008; Kumari *et al*., 2016; Badalamenti *et al*., 2016; Jaiswal and Sawhney 2006).

همچنین، ریزازدیادی برای کمک به تولیدمثل برخی از گونه‌های *Haworthia* خودناسازگار، ازطریق القای باززایی از برگها، گل‌آذین و دیواره‌های تخمدان استفاده شده است (Majumdar 1970). کارایی یا میزان موفقیت ریزازدیادی تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند نوع ریزنمونه، مواد مغذی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه و سایر مواد افزودنی، دما و شدت و مدت زمان نور قرار دارد. کالوس *Haworthia* از بخش‌های برگ، بخش‌های گل‌آذین یا جوانه‌های گل ایجاد شده است (Ogihara, 1978).

در مطالعه‌ای، ویژگی‌های رشدی در شرایط *in vitro* برخی گونه‌های هارورتیا در پاسخ به اجزای محیط کشت مانند اکسین (IAA, NAA, 2,4-D) و سیتوکینین (BA, Kinetin, Zeatin) و دفولینات (Thidiazuron) و کازئین هیدرولات، شیره نارگیل و اینوزیتول بررسی شد (Liu *et al*., 2017; Kaul and Sabharwal 1972; Beiramizadeh *et al*., 2017). در پژوهشی برای ایجاد یک سیستم باززایی بسیار سریع برای گیاه *Haworthia* spp در شرایط آزمایشگاهی، گل آذین رقم *Sansenjyu* به عنوان ریزنمونه برای ریزازدیادی جدا شد (Chen *et al*., 2019). علاوه بر تنظیم کننده های رشد ، شدت نور (Chen *et al*., 2019; Afolayan and Adebola, 2004) عامل مهم دیگری برای بهبود کارایی باززایی است.

رویکرد سال‌های اخیر بشر به استفاده از گیاهان زینتی سبب شده صنایع بسیار گسترده‌ای درارتباط با تولید این نوع از گیاهان در کشورهای توسعه یافته و کشورهای در حال توسعه برای تأمین نیازهای داخلی و همچنین، برای صادرات و استفاده از جنبه های اقتصادی این صنعت، ایجاد شود. ایران با دارا بودن شرایط آب و هوایی و اقلیم های مختلف و فلور غنی، یکی از کشورهایی است که منابع گسترده ای از انواع گیاهان زینتی را دارد. هدف از این مطالعه، ضدعفونی، تعیین غلظت‌های مناسب هورمون‌ها برای ریشه‌زایی و ساقه‌زایی، ریزازدیادی *هاورتیا* با استفاده از مراحل ساقه‌زایی، ریشه‌زایی و تولید پاجوش‌ها از گیاه است.

مواد و روش‌ها

تیمار ضدعفونی

در مرحله اول، پاجوش را از گیاه خارج نموده و بدون آسیب رساندن به گیاه، ریشه‌های باقیمانده از گیاهچه جدا شدند. با کمک تیغ جراحی برگ ها تک تک از گیاه جدا شد به‌صورتی که تنها مریستم گیاه در قسمت مرکزی، باقی ماند. برگ ها به همراه مریستم در یک توری قرار داده شدند و یک ساعت زیر آب جاری شستشو داده شدند. سپس، ۲/۵ میلی‌لیتر توئین ۲۰ (۲۰ درصد) با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به‌منظور ضدعفونی نمونه‌ها برای کشت در محیط، به نمونه‌ها اضافه شد. پس از آن، نمونه‌ها در محلول قارچ کش مانکوزب (Mancozeb) که به مقدار ۲ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شده بود، با یک آهن ربا روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در این محلول باقی ماند. پس از آن، ۳۰ ثانیه با آب استریل شستشو و سپس در جریان هود لامینار به مدت ۶۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند و به‌ترتیب در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه با هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد تیمار شدند. پس از مرحله ضدعفونی، ریزنمونه ها (برگ های حاوی مریستم) به قطعات کوچکتر تقسیم و به محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) بدون هورمون با اسیدیته ۵/۸ و حاوی ۳۰ گرم ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار اضافه و به مدت ۱۴ روز در محیط کشت رشد و سپس واکشت شدند.

تیمار ساقه‌زایی

برای مرحله ساقه‌زایی از هورمون BAP به مقادیر ۰، ۱، ۱/۵، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر هر یک به‌تنهایی و همچنین، در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA استفاده شد (جدول ۱). نمونه های موردنیاز برای کشت شامل جوانه های جدید جدا شده از برگ بود.

تیمار ریشه‌زایی

گیاهچه‌های هم اندازه از شاخه‌زایی پس از گذشت ۴ هفته تحت تیمارهای هورمونی IBA و BAP و با تیمار محیط کشت پایه (MS) و محیط کشت MS ۱/۲ به‌دست آمدند. در محیط کشت ۱/۲ در مقایسه با محیط کشت کامل غلظت تمام نمک‌ها به جز ویتامین‌ها نصف شد. در فاز ریشه‌دهی از مقادیر ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر IBA با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP همراه با تیمارمحیط کشت کامل و محیط کشت MS ۱/۲ استفاده شد و نمونه ها به‌مدت ۱۴ روز در محیط کشت قرار داده شدند و سپس در محیط حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP با تیمار ۱ ، ۱/۵ ، ۲ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر IBA واکشت شدند (جدول ۱). به‌منظور ریشه زایی، نمونه ها از محیط کشت جدا و به محیط جدید منتقل شدند.

تیمار پاجوش‌دهی

در مرحله پاجوش دهی نیز، تیمارهای شامل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA با ترکیب ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر BAP استفاده شدند. پس از هر مرحله کشت بافت، زیر هود لامینار، درب ظروف با پارافیلم بسته شد تا از آلودگی نمونه ها جلوگیری شود و ظروف کشت شده در اتاق رشد در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی قرار داده شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

صفات مورد نظر در مرحله ساقه‌زایی، ریشه‌زایی و پاجوش‌دهی پس از ۴ هفته اندازه‌گیری و قالب اجرای آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شد. داده‌های به‌دست آمده در نرم‌افزار SAS 9.1 در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار SPSS و Excel استفاده و در رابطه با داده‌های با ماهیت متنوع، قبل از تجزیه واریانس، نرمال سازی انجام شد.

جدول ۱- نوع و غلظت هورمون‌های استفاده‌شده در این مطالعه

Table 1- Type and concentration of hormones used in this study

تیمار	مرحله رشد گیاه		
	ساقه زایی	ریشه زایی	پاجوش دهی
۱	۰ mg/l BAP	۱ mg/l IBA	۰ mg/l BAP
۲	۱ mg/l BAP	۱/۵ mg/l IBA	۰/۵ mg/l BAP
۳	۱/۵ mg/l BAP	۲ mg/l IBA	۱ mg/l BAP
۴	۲ mg/l BAP	۲/۵ mg/l IBA	۱/۵ mg/l BAP
۵	۴ mg/l BAP	۱ mg/l IBA +۱/۲ MS	۲ mg/l BAP
۶	۰ mg/l IBA	۱/۵ mg/l IBA +۱/۲ MS	۲/۵ mg/l BAP
۷	۱ mg/l IBA	۲ mg/l IBA +۱/۲ MS	
۸	۰ mg/l BAP+ ۰ mg/l IBA	۲/۵ mg/l IBA +۱/۲ MS	
۹	۱ mg/l BAP+ ۰ mg/l IBA	۱ mg/l IBA + MS	
۱۰	۱/۵ mg/l BAP+ ۰ mg/l IBA	۱/۵ mg/l IBA + MS	
۱۱	۲ mg/l BAP+ ۰ mg/l IBA	۲ mg/l IBA + MS	
۱۲	۴ mg/l BAP+ ۰ mg/l IBA	۲/۵ mg/l IBA + MS	
۱۳	۰ mg/l BAP+ ۱ mg/l IBA		
۱۴	۱ mg/l BAP+ ۱ mg/l IBA		
۱۵	۱/۵ mg/l BAP+ ۱ mg/l IBA		
۱۶	۲ mg/l BAP+ ۱ mg/l IBA		
۱۷	۴ mg/l BAP+ ۱ mg/l IBA		

نتایج

تیمار ضدعفونی

نتایج تیمار ضدعفونی در جدول ۲ آورده شده است. در تیمار اول نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در محلول ۱/۵ درصد هیپوکلرید سدیم قرار داده شدند و در ۸۷ درصد شیشه‌ها آلودگی قارچی مشاهده شد و ۶۶ درصد درصد از نمونه ها نیز زنده ماندند. در تیمار دوم تمام نمونه ها زنده ماندند و آلودگی نیز مشاهده نشد. در تیمار سوم آلودگی مشاهده نشد ولی تنها ۷۸ درصد از نمونه‌ها زنده ماندند و نمونه‌های دیگر به رنگ سفید تغییر کردند و پس از دو هفته کاملاً به یک توده سفید

تبدیل و رشدی در آن‌ها مشاهده نشد، که باتوجه‌به تیمار قبلی که تمام ریزنمونه‌ها زنده ماندند و رشد کردند، میزان کمتری است. در تیمار چهارم که نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد قرار داده شدند، فقط ۲۰ درصد از نمونه ها زنده ماندند و بقیه از بین رفتند. در این نمونه نیز آلودگی مشاهده نشد. در تیمار پنجم و ششم نمونه‌ها آلوده نشدند ولی نمونه‌ها در مدت زمان کوتاه تری نسبت به تیمارهای سوم و چهارم، از بین رفتند. به دلیل اینکه روش مشخصی برای ضدعفونی نمونه های گیاه *هاورتیا لیمیفولیای* ابلق وجود ندارد، از روش ضدعفونی گونه‌های نزدیک استفاده و تیمارهایی برای ضدعفونی تعریف شد. نتایج این تیمارها که از هر کدام ۳ تکرار انجام شد در جدول ۲ آمده است.

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر مرحله ساقه زایی

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، غلظت BAP تأثیر معنی داری بر روی تعداد برگ، طول بلندترین برگ و ارتفاع بوته داشت، و در مرحله ساقه زایی، افزایش غلظت هورمون IBA تأثیر منفی بر تعداد برگ *هاورتیا* داشت. همچنین، کاربرد هورمون IBA موجب کاهش تعداد برگ *هاورتیا* شد. بیشترین اندازه برگ و تعداد برگ در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (شکل ۱ الف، ب). هر چند که غلظت های بالای هورمون IBA نیز تعداد برگ را کاهش دادند (شکل ۱). نتایج غلظت هورمون های استفاده شده بر طول بلندترین برگ *هاورتیا* نیز، تقریباً مشابه با تأثیر آنها بر تعداد برگ بود. بر این اساس بیشترین ارتفاع گیاه در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر هورمون BAP و صفر میلی گرم در لیتر هورمون IBA (۲۱ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد بدون هورمون) مشاهده شد (شکل ۲). کمترین تعداد برگ نیز در تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP به دست آمد (شکل ۲). افزایش غلظت هورمون BAP اثر کاهشی بر طول بلندترین برگ *هاورتیا* داشت. کاربرد هورمون IBA نیز طول بلندترین برگ *هاورتیا* را کاهش داد ولی ترکیب آن با هورمون BAP موجب کاهش اثر منفی آن شد و طول بلندترین برگ افزایش یافت، هر چند که غلظت‌های بالای هورمون BAP نیز طول بلندترین برگ را کاهش دادند.

جدول ۲- تیمارهای ضدعفونی برای نمونه‌های استفاده شده در مطالعه

Table 2- Disinfection treatments for the samples used in the study

تیمار	مواد استفاده شده	درصد آلودگی	درصد زنده ماندن
۱	هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد (۵ دقیقه)	۸۸/۶ درصد	۶۶/۳ درصد
۲	هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد (۱۰ دقیقه)	۰	۱۰۰ درصد
۳	هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد (۱۵ دقیقه)	۰	۷۷/۷ درصد
۴	هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد (۲۰ دقیقه)	۰	۲۲/۲ درصد
۵	هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد (۲۵ دقیقه)	۰	۰
۶	هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد (۳۰ دقیقه)	۰	۰

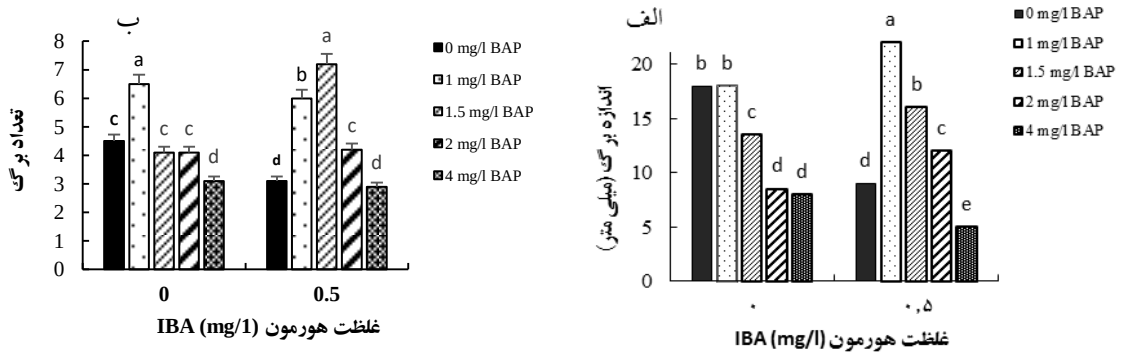
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف هورمون‌های BAP و IBA در مرحله ساقه زایی بر روی برخی صفات

Table 3- Variance analysis of the effect of different treatments of BAP and IBA hormones in the shooting stage on some traits

تابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		تعداد برگ	طول بلندترین برگ	ارتفاع بوته
غلظت BAP	۴	۱۰/۰۸۳۳**	۱۵۵/۵۸**	۱۵۰/۹۲**
غلظت IBA	۱	۰/۰۰۰۰ns	۰/۱۳ns	۵۸/۸*
BAP×IBA	۴	۳/۵۸۳۳**	۴۵/۳۸**	۲۷/۰۵ns
خطا	۲۰	۰/۶۰۰۰	۵/۷۳	۹/۵۰
ضریب تغییرات (٪)		۱۶/۶	۱۶/۷۱	۲۱/۵

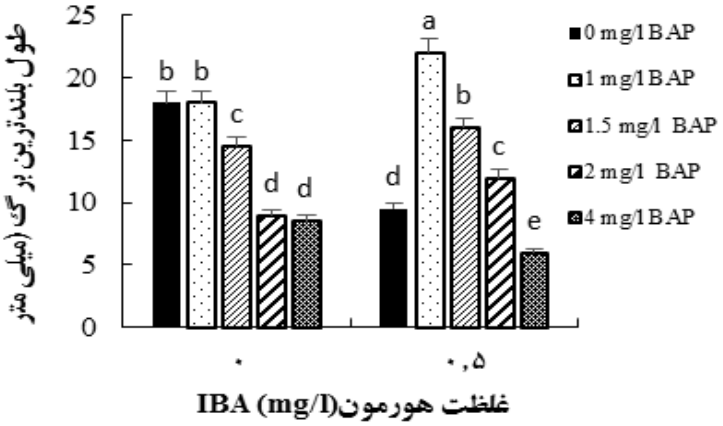
*و**اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ns اختلاف معنی‌دار نیست.

*and** significant difference at 5 and 1% level and ns is not significant difference.



شکل ۱- تیمارهای مختلف هورمون‌های BAP بر الف) اندازه برگ و ب) تعداد برگ *هاورتیا لیمیفولیا*. ستون‌های با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بر اساس آزمون LSD نیستند.

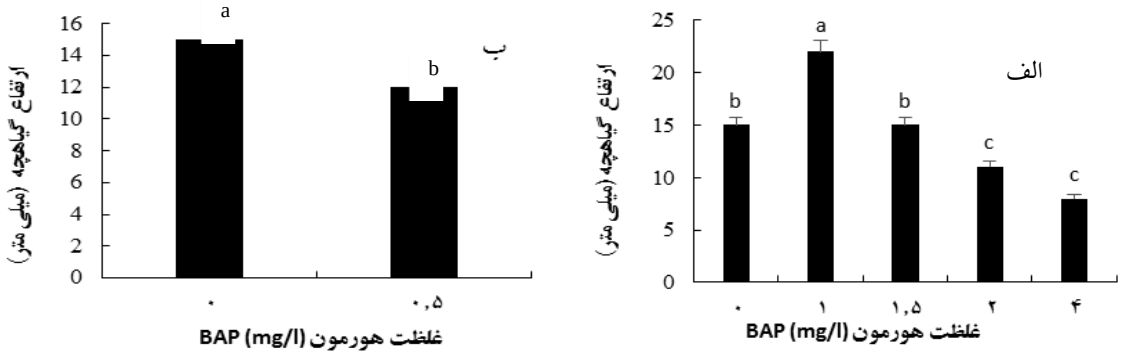
Figure 1- Different treatments of IBA hormones on a) leaf size and b) number of *Haworthia limifolia.* Columns with the same letters are not significantly different at the 1% level based on the LSD test.



شکل ۲- تیمارهای مختلف هورمون‌های IBA بر طول بلندترین برگ *هاورتیا لیمیفولیا* با غلظت‌های مختلف هورمون. ستون‌های با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بر اساس آزمون LSD نیستند.

Figure 2- Different treatments of IBA hormones on the longest leaf length of *Haworthia limifolia* with different hormone concentrations. Columns with the same letters are not significantly different at the 1% level based on the LSD test.

به طورکلی، افزایش غلظت هورمون BAP موجب کاهش ارتفاع گیاهچه *هاورتیا* شد. کاربرد هورمون IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش ۱۷/۸ درصدی ارتفاع گیاهچه شد (شکل ۳ الف). بیشترین ارتفاع گیاهچه در مرحله ساقه زایی در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP (۴۵/۵ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد) به‌دست آمد و کمترین ارتفاع گیاهچه به بیشترین غلظت هورمون (۴ میلی گرم در لیتر) مربوط بود که موجب کاهش ۴۲/۲ درصدی ارتفاع بوته نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۳ ب).



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف هورمون الف) BAPو ب) IBA بر ارتفاع گیاهچه *هاورتیا لیمیفولیا*. ستون‌های با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بر اساس آزمون LSD نیستند.

Figure 3- Different treatments of a) IBA and b) BAP hormones on length of the longest leaf of *Haworthia limifolia*. Columns with the same letters are not significantly different at the 1% level based on the LSD test.

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر مرحله ریشه‌زایی

باتوجه به جدول تجزیه واریانس مشاهده می‌شود که تنها تیمار غلظت هورمون IBA و محیط کشت بر تعداد ریشه معنی‌دار بود و برهم کنش آنها تأثیر معنی‌داری بر تعداد ریشه *هاورتیا لیمیفولیا* نداشت (جدول ۳). بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت کامل (۲/۴۲) به‌دست آمد (شکل ۴ الف). نتایج مقایسه میانگین غلظت های مختلف هورمون IBA نشان داد که بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر (۲/۳۳) به‌دست آمد و افزایش غلظت این هورمون موجب کاهش تعداد ریشه *هاورتیا* شد (شکل ۴ ب). در گیاهان، اکسین‌ها معمولاً موجب تحریک و افزایش ریشه‌زایی می شوند. بیشترین طول ریشه در تیمار غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA در محیط کشت کامل (۳۷/۳۳ میلی‌متر) به‌دست آمد. به‌طورکلی، تمامی غلظت های هورمون IBA در محیط کشت کامل کارآیی بهتری بر افزایش طول بلندترین ریشه داشتند، هر چند که در غلظت‌های بالا این افزایش بسیار کمتر بود که به دلیل اثر سمی هورمون IBA در غلظت‌های بالا است (شکل ۴ ب). براساس مطالعه‌های انجام شده، تیمار ریشه‌زایی MS با ۲۴/۶ میکرومول IBA بدست آمد (Aslam and Khan, 2009). نتایج ما نشان داد که بیشترین طول ریشه در تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA و محیط کشت MS(۲۸/۳۳ میلی متر) به دست آمد (شکل ۴

ج). کمترین طول ریشه نیز در غلظت های ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA در محیط کشت MS ۱/۲ به دست آمد(شکل ۴ د). به‌طور کلی، در محیط کشت، هورمون IBA موجب افزایش طول ریشه شد هر چند در غلظت‌های بالاتر هورمون این روند کاهشی بود.

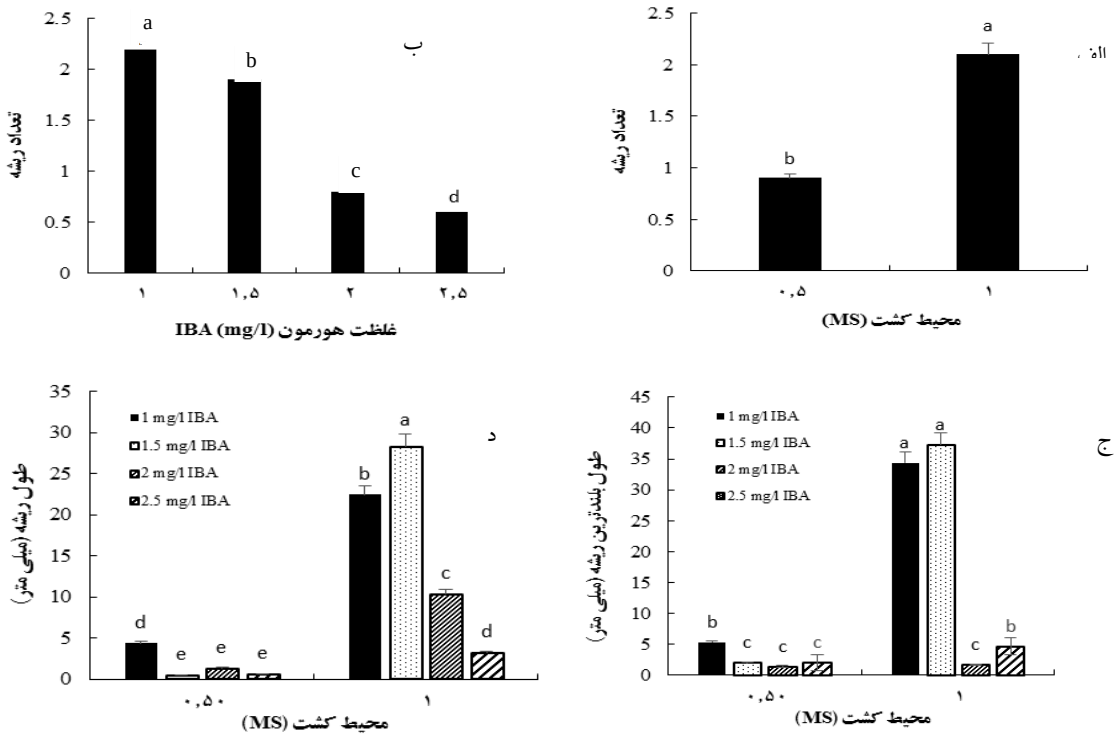
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف هورمون IBA و محیط کشت بر روی برخی صفات در مرحله ریشه زایی

Table 3- Analysis of variance of the effect of different treatments of IBA hormone and media on some traits in the rooting stage

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		تعداد ریشه	طول بلندترین ریشه	طول ریشه
غلظت IBA	۳	۲/۷۸**	۴۵۳/۹۴**	۲۱۷/۹۴**
محیط کشت	۱	۱۳/۵**	۲۳۶۰/۱۷**	۱۲۴۱/۷۱**
محیط کشت × IBA	۳	۰/۲۸ns	۳۵۳/۹۴**	۱۸۱/۹۹**
خطا	۱۶	۰/۰۸	۱/۸۸	۱/۷۳
ضریب تغییرات (٪)		۱۷/۳۳	۱۱/۳۳	۱۴/۸

*و**اختلاف معنادار در سطح ۵ و ۱ درصد و ns اعداد معنی‌دار نیست.

*and** the significant difference is not significant at 5 and 1 percent level and ns is not significant difference.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف هورمون IBA بر اثر محیط کشت و تعداد ریشه و برهم‌کنش محیط کشت و هورمون IBA بر طول بلندترین ریشه و طول ریشه *هاورتیا لیمیفولیا*. ستون‌های با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بر اساس آزمون LSD نیستند.

Figure 4- The effect of different concentrations of IBA hormone a) on the culture medium b) and the number of roots and the interaction between culture medium and IBA hormone c) on the longest root length and d) root length of *Havertia limifolia*. Columns with the same letters are not significantly different at the 1% level based on the LSD test.

بیشترین میزان ریشه زایی *هاورتیا* (*H.attenuatae*) (۱۰۰ درصد) و بیشترین تعداد ریشه (۱۲/۹) در محیط MS با ۲.۵ میکرومولار IBA به‌دست آمد (Kim *et al*., 2019). عموماً اکسین ها ازجمله NAA، IBA و IAA که به محیط کشت اضافه می‌شوند ریشه‌زایی را القا می کنند (Sivanesan *et al*., 2011). در مطالعه‌های پیشین برای القای تشکیل ریشه‌های نابجا در گونه‌های *هاورتیا* مانند *H. turgida* (Liu *et al*., 2017) *H. retusa* (Kim *et al*., 2018) و *H. attenuata* (Richwine *et al*., 1995) از اکسین استفاده شد.

اثر غلظت هورمون‌ها بر مرحله پاجوش‌دهی گیاه *هاورتیا*

آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر غلظت BAP بر تعداد پاجوش *هاورتیا* در سطح پنج درصد معنی‌دار بود(جدول ۴). بیشترین تعداد پاجوش در تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP (عدد ۴) به‌دست آمد. بین سایر تیمارها اختلاف معنی داری وجود نداشت. همانند تعداد پاجوش، بیشترین طول پاجوش در تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر (۸/۶۷ میلی متر) و سپس غلظت ۱ میلی گرم در لیتر (۷ میلی‌متر) مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری بین سایر تیمارها وجود نداشت (شکل ۵ الف). طول پاجوش ها در غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP افزایش یافت و سپس با افزایش غلظت به ۲/۵ میلی گرم در لیتر کاهش یافت. بیشترین ارتفاع گیاهچه در غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر (۵۱/۹ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد) مشاهده شد که اختلاف معنی داری با تیمار ۱ میلی گرم در لیتر (۳۲/۷ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد) نداشت (شکل ۵ ب).کمترین ارتفاع گیاهچه نیز در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر به دست آمد. BAP یک منبع مهم سیتوکینین در اکثر مطالعه‌های کشت بافت است. تأثیر سیتوکینین ها باتوجه‌به نوع کشت، سن ریز نمونه و نوع رقم تغییر می کند و شروع فعالیت جوانه‌های جانبی، تحریک وتقسیم سلول، تشکیل جوانه‌های جانبی و تکثیر آنها را کنترل می کند (Dobranszki and Teixeira, 2010; Liu *et al*.,2018). گیاهچه‌های حاصل از ریشه‌زایی و ساقه‌زایی و پاجوش‌دهی در گیاه *هاورتیا لیمیفولیا* در شکل ۶ آورده شده است.

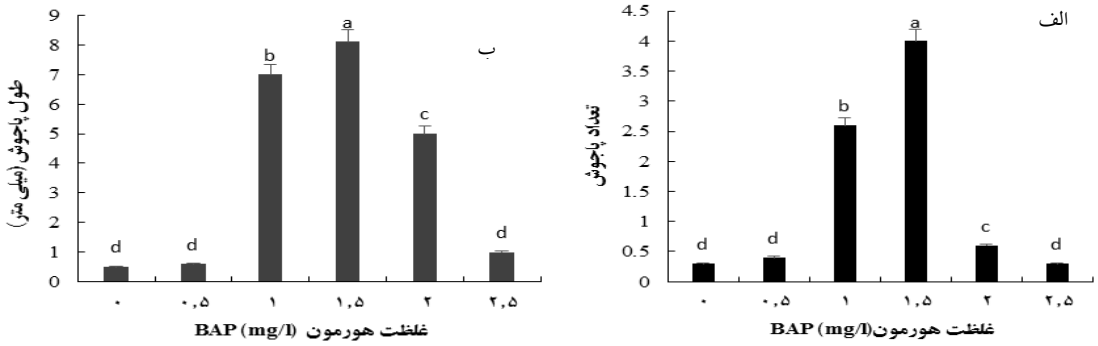
جدول ۴- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر روی برخی صفات در مرحله پاجوش‌دهی

Table 4- Variance analysis of the effect of different concentrations of BAP hormone on some traits in the succulent stage

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		تعداد پاجوش	طول پاجوش	ارتفاع گیاهچه
غلظت BAP	۵	۷/۳۹**	۳۷/۷**	۷۵/۸۲**
خطا	۱۲	۰/۱۱	۰/۳۳	۴/۷۲
ضریب تغییرات (٪)		۲۱/۰۱	۱۵/۰۶	۱۱/۳۷

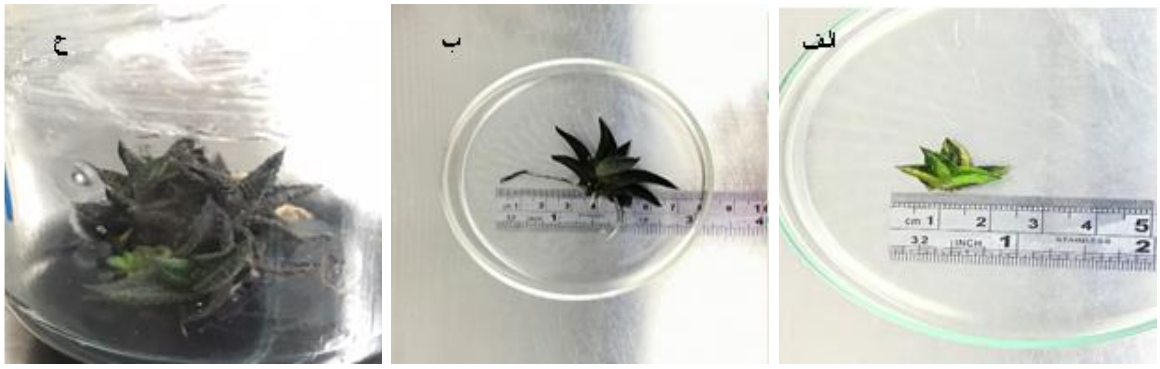
**اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد

**Significant difference at the 1% level.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر تعداد الف) پاجوش و ب) طول پاجوش *هاورتیا لیمیفولیا*. ستون‌های با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بر اساس آزمون LSD نیستند.

Figure 5- Effect of different concentrations of BAP hormone on the a) number of succulent and b) length of succulents of *Harwortia limifolia*. Columns with the same letters are not significantly different at the 1% level based on the LSD test.



شکل ۶- گیاهچه های حاصل در مرحله الف) ساقه زایی، ب) ریشه زایی و ج) پاجوش های حاصل شده از تیمارهای استفاده شده در گیاه هاورتیا لیمیفولیا

Figure 5- Seedlings obtained at a) the stage of shooting, b) rooting and c) suckers obtained from treatments used in *Harwortia*

بحث

باتوجه‌به آزمایش‌های انجام شده در زمینه ضدعفونی گیاه *هاورتیا لیمیفولیا* مشخص شد که بهترین نوع ضدعفونی برای این گیاه و کمترین درصد آلودگی ریزنمونه‌ها (صفر) با تیمار الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم در ۱۰ دقیقه به دست آمد. نتایج کشت بافت *هاورتیا* نشان داد که بیشترین تعداد ساقه (۱۰ عدد) در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. در بلندشدن طول ساقه‌ها نیز غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP به‌تنهایی باعث بیشترین رشد در طول ساقه‌ها شد. بیشترین میزان ریشه‌زایی و بلندترین ریشه‌ها در تیمارهایی با محیط کشت کامل مشاهده شدند که بیانگر این است که برهمکنش تیمار محیط کشت با هورمون تأثیر مثبتی بر القای ریشه زایی نداشته است. نتایج پژوهشی نشان داد که حداکثر تعداد برگ در تیمار ۰/۵ میلی-گرم در لیتر BAP بدون حضور IBA تولید شد. نتایج ریشه زایی شاخساره‌های باززایی شده نشان داد که بیشترین تعداد ریشه و طویل‌ترین ریشه در محیط MS ۱/۲ به‌ترتیب با ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA

به دست آمد (Najarian Kermani *et al*., 2021). براساس نتایج مطالعه‌ای نشان داده شد که ریزنمونه‌های گره ساقه آلوئه‌ورا در محیط MS حاوی سطح بالای هورمون ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین تعداد برگ را تولید کردند (Jayakrishna *et al*., 2011).

براساس نتایج مطالعه‌های قبلی گزارش شد که در گیاه *هاورتیا*ها حضور سیتوکینین‌ها به مقدار لازم برای باززایی شاخساره‌ها لازم و باززایی *هاورتیا*ها به سیتوکینین‌های مختلف پاسخ متفاوتی نشان می‌دهند (Lizumi and Amaki, 2011; Bairu *et al*., 2007; Najarian Kermani *et al*., 2021).

در مطالعه‌ای نشان داده شد که به‌طورکلی، اکسین‌هایی مانند IBA و NAA و ایندول استیک اسید (IAA) زمانی‌که به محیط کشت اضافه شوند، باعث القای ریشه‌زایی می‌شوند. همچنین، نشان داده شد که در گیاه آلوئه‌ورا بیشترین تعداد ریشه‌ها در محیط کشت با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست می‌آید (Hashemabadi and Kaviani, 2010). در گیاه کالانکوئه (*Kalanchoe blossfeldiana*) نیز مقدار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA در القای ریشه‌زایی و طویل شدن ریشه تاثیر مثبت دارد (Kaviani *et al*., 2014). در تحقیق بر روی *Haworthia turgida* به‌این نتیجه رسیدند که با استفاده از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بیشترین درصد ریشه زایی و بلندترین ریشه ها ایجاد می‌شود. در حالیکه افزایش مقدار هورمون به ۰/۱۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر باعث تغییر شکل و ایجاد مورفولوژی غیرطبیعی در گیاه می‌شود (Boling *et al*.,2017). مطالعه قبلی نشان داده است که در مرحله باززایی گیاهچه از کالوس *هاورتیا* حداکثر تعداد شاخه *هاورتیا* (۲۵/۷) هنگام تهیه کالوس در محیط MS به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر۴،۲ دی کلروفنوکسی استیک اسید،(2,4-D) حاصل شد. بیشترین تعداد ریشه در هر شاخه (۶/۲) بدست آمد و ریشه‌های نابجا بر روی محیط MS با ۰۵/ میلی‌گرم درلیتر NAA به‌دست آمد (Liu *et al*.,2017; Nguyen *et al*., 2020).

بهترین تیمار برای ریشه‌زایی تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA شناخته شد. تعداد پاجوش‌های به‌دست آمده در تیمار با مقادیر ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (به‌ترتیب ۵ و ۷) و میزان رشد گیاهچه و پاجوش‌های به‌دست آمده بسیار قابل توجه بود که باتوجه‌به زمان اعمال تیمارها تا اندازه‌گیری نتایج، به صرفه بودن روش ریزازدیادی با کشت بافت برای این گیاه را نشان می‌دهد. استفاده از ریزازدیادی برای تکثیر گونه *هاورتیا* به میزان کمتری مورد توجه پژوهشگران است. در گیاهان، تنظیم‌کننده‌های رشد در کنترل رشد و نمو نقش اساسی دارند و محیط کشت کامل همراه با برخی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه ضروری است. اکسین‌ها هورمونهای اصلی مسؤول طویل شدن ساقه، فوتوتروپیسم، تمایز بافت آوندی و گسترش سلول در فرآیند رشد گیاه و به‌شدت نور بالا حساس هستند (Vanneste and Friml 2009). سیتوکینین برای تقسیم سلولی در طیف گسترده‌ای از بافت‌های گیاهی نیاز است (Dewitte *et al*., 1999) و می‌توانند باعث افزایش طول ساقه در گیاهان شوند (Smets *et al*., 2005). در فرایند کشت بافت، فاکتورهایی ازجمله اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، نور و دما بر القای تشکیل کالوس تأثیر دارند و در غلظت‌ها و ترکیبات کمتر از حد مطلوب می‌توانند باعث قهوه‌ای شدن پینه و نکروز شوند (Afshari *et al*., 2011; Dou *et al*., 2017; Ikeuchi *et al*., 2013).

به‌طورکلی، القای ریشه زایی را می‌توان با افزودن اکسین‌هایی مانند NAA، IBA و IAA شروع کرد (Sauer *et al*., 2013). مطالعه‌های قبلی نیازهای اکسین را برای گونه های *هاورتیا* مانند *H. turgida*، *H. retusa*، *H. attenuata* و *H. turgida* گزارش کرده‌اند (Kim *et al*., 2018; Liu *et al*., 2017)؛ بااین‌حال، در آزمایش‌های ما، گیاهچه‌ها حتی اگر فقط دارای چند ریشه باشند، می‌توانند پس از انتقال به گلخانه رشد خوبی داشته باشند. شرایط رشدی برای گیاه *Haworthia planifolia* پس از ۱۶ هفته کالوس‌زایی از قسمت‌های برگی ممکن و گیاهان باززایی شدند. از کالوس تولیدشده حاوی بافت برگی ، ساقه زایی انجام و ریشه ها تشکیل شدند (Wessels *et al*., 1976).

References

Abrie, A. and va Staden, J. (2001) Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. Plant Growth Regulation 33: 19-23.

Afolayan, A. J, and Adebola, P. O. (2004) *In vitro* propagation: A biotechnological tool capable of solving the problem of medicinal plant decimation in South Africa. African Journal of Biotechnology 3: 683-687.

Afshari, R., Angoshtari, R, and Kalantari, S. (2011) Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. Plant Omics 4: 60-67.

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(1): 1-4.

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.

Beiramizadeh, E., Zarei, R., Hajibarat, Z., Hajibarat, Z. and Saeidi, A. (2017) Micropropagation of *Rosa canina* through axillary bud. Crop Biotechnology 7(18): 93-102.

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): 1-8.

Dobranszki, J. and Teixeira J. A. (2010) Micropropagation of apple- A review. Biotechnology Advances. 28: 462-488.

El Finti, A., El Boullani, R., El Ayadi, F., Ait Aabd, N. and El Mousadik, A. (2012) Micropropagation *in vitro* of *Opuntia ficus-indica* in south of Morocco. International Journal of Chemical and Biochemical Science 1:6-10.

Efferth T. (2019) Biotechnology applications of plant callus cultures. Engineering 5: 50-59

Hashemabadi, D. and B. Kaviani. (2010) *In vitro* proliferation of an important medicinal plant Aloe- A method for rapid production. Australian Journal of Crop Science 4(4): 216-22.

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

Jaiswal, S, and Sawhney, S. (2006) Modulation of TDZ-induced morphogenetic responses by anti-auxin TIBA in bud-bearing foliar explants of Kalanchoe pinnata. Plant Cell Tissue Organ Culture 86: 69-76.

Kaviani, B., Hashemabadi, D. and Kordi, M. (2014) The effect of different concentrations of plant growt regulators on micropropagation of *Kalanchoe blossfeldiana* cv. White. Journal of Ornamental Plants 4(2): 101-106.

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.

Kim, D. H., Kang, K. W. and Sivanesan, I. (2018) Influence of auxins on somatic embryogenesis in *Haworthia retusa* Duval. Biologia 74: 25-33.

Kim, D. H., Kang, K. W. and Sivanesan, I. (2019) Micropropagation and somaclonal variation in *haworthia truncata* schonland. Propagation of Ornamental Plants 19(2): 52-8.

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 Organ Culture 124: 97-104.

Liu, B., Fang, H., Meng, C., Chen, M., Chai, Q., Zhang, K. and Liu, S. (2017) Establishment of a rapid and efficient micropropagation system for succulent plant *Haworthia turgida* Haw. HortScience 52(9): 1278-1282.

Liu, J., Feng, H., Ma, Y., Zhang, L., Han, H. and Huang, H. (2018) Effects of different plant hormones on callus induction and plant regeneration of miniature roses (*Rosa hybrida* L.). Horticulture International Journal 2(4): 201-206.

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. (1970) 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. Physiology Plant 15: 473-497.

Najarian Kermani, N., Parsaiyan, M. and Ghasimi Hagh, Z. (2021) The effect of different concentrations of growth regulators on the micropropagation of *Haworthia attenuatae* (*zebra haworthi*). Journal of Plant Process and Function 10(45): 1-14 (in Persian)

Nguyen, T. H. N., Winkelmann, T. and Debener, T. (2020) Genetic analysis of callus formation in a diversity panel of 96 rose genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 142(3): 505-517.

Ogihara, Y. and Tsunewaki, K. (1978) Tissue culture in *Haworthia*. The Botanical Magazine 91(1): 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. (1993) Optimization of plant regeneration and rooting from leaf explants of five rare *Haworthia*. Scientia Horticulturae 56(2): 157-161.

Sauer, M., Robert, S. and Kleine-Vehn, J. (2013) Auxin: simply complicated. Journal of Experimental Botany 64:2565-2577.

Seol, E., Jung, Y., Lee, J., Cho, C., Kim, T., Rhee, Y. and Lee, S. (2008) In planta transformation of *Notocactus scopa* cv. Soonjung by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 27(7): 1197-1206.

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 and Organ Culture (PCTOC) 105(1): 55-63.

Smets, R., Le, J., Prinsen, E., Verbelen, J. P. and Van Onckelen, H. A. (2005) Cytokinin-induced hypocotyl elongation in light-grown *Arabidopsis* plants with inhibited ethylene action or indole-3-acetic acid transport. Planta 221(1): 39-47.

Wessels, D. C. J., Groenewald, E. G. and Koeleman, A. (1976) Callus formation and subsequent shoot and root development from leaf tissue of *Haworthia planifolia* var. cf. var. *setulifera v.* Poellia. Zeistscrift fur Pflanzenphysiologie 78: 141-145.