Plant Prod., 2022, 45(1), 53-66
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/PPD.2021.36744.1971
Received: 3 May 2021
Accepted: 23 June 2021

Plant Productions
Research Article

Optimization of *in vitro* Cultural Conditions of Haworthia (*Haworthia Cooperi* Baker)

Mahdiyeh Kharrazi [1], Maryam Moradian [2], Nasim Safari [3], Azadeh Khadem [4], Ahmad Sharifi [5]*

1- Assistant Professor, Department of Horticultural Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad, Iran
2- Instructor, Department of Horticultural Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad, Iran
3- Ph.D. Student of Horticultural Science, Department of Horticultural science and landscape, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
4- Instructor, Department of Horticultural Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad, Iran
5- Assistant Professor, Department of Horticultural Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Khorasan Razavi, Iran

Citation: Kharrazi, M., Moradian, M., Safari, N., Khadem, A., & Sharifi, A.(2022). Optimization of *in vitro* cultural conditions of haworthia (*Haworthia Cooperi* Baker). *Plant Productions*, 45(1), 53-66.

Abstract

Introduction

Haworthia cooperi is a type of ornamental succulent that is propagated by separating the offsets and leaf cuttings. Due to the small number of produced offsets by the mother plant, the rate of propagation in this way is low, so micropropagation can be considered as an effective and efficient way to propagate this ornamental plant.

Materials and Methods

For this purpose, in the present study, the growth response of *Haworthia cooperi* plants to *in vitro* culture conditions in 1398 in the research laboratory of the Department of Ornamental Plants Biotechnology was investigated. This research was conducted in the form of three separate experiments based on a completely randomized design with three replications. In the first experiment, the effects of cytokinin type (BA and KIN) and concentration of cytokinin (0, 1, 2 and 3 mg/l) on leaf explant regeneration were evaluated. In the second experiment, the effects of culture medium type (MS and B_5) and concentration of culture medium (0.5 and 1) on plantlet

* **Corresponding Author:** Ahmad Sharifi
E-mail: a-sharifi@jdm.ac.ir

© 2022 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

propagation were investigated. In the third experiment, plantlet rooting rate was evaluated under the influence of auxin type (NAA, IBA and IAA) and concentration (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l) of auxin.

Results and Discussion

The results showed that application of BA and KIN hormones increased the number of regenerated plantlets. The highest number of plantlets (5.50) was recorded in the MS medium containing 3 mg/l BA with 0.5 mg/l NAA. Plantlets cultured in the hormone-free culture medium had no regenerated symptoms. The number of plantlets increased with increasing the concentration of both hormones, but BA hormone in the culture medium had a greater effect on this factor. Lack of cytokinin hormone application in culture medium led to root production; however, the use of BA and KIN hormones in the culture medium reduced the number of produced roots by plantlets. The highest number of roots was recorded in hormone-free culture medium and the lowest number was recorded in the high concentration of BA hormone. The reduction in the number of roots in the culture medium containing BA was greater than the culture medium containing KIN. The of the second experiment revealed that use of MS culture medium showed better performance compared to B_5 culture medium. Thus, the highest dry weight of plantlet and roots was obtained at full concentration of MS culture medium. The results of rooting stage showed that the presence of NAA hormone in the culture medium increased rooting in the plant. However, the produced roots in this culture medium were so thick that these roots are not suitable for plant growth in the acclimation stage. Therefore, considering the number and length of produced roots, the optimal culture medium for plantlet rooting is ½ MS culture medium containing 1 mg/l IAA hormone. Determining the best type of culture medium and optimizing it for regeneration, proliferation and rooting is one of the important factors in success in vitro culture conditions. Based on the results of the current study, application of MS medium containing 3 mg/l BA with 0.5 mg/l NAA was so effective for regeneration phase of this ornamental plant. Also, the efficiency of MS culture medium in the process of propagation of this plant is most likely related to the suitability of the components of this culture medium. In general, due to the presence of plant growth regulators such as NAA, IBA and IAA in the culture medium, rooting is induced in plantlets. In the present study, the use of IAA hormone at a concentration of 1 mg/l was a suitable hormonal combination for rooting in this ornamental plant.

Conclusion

Based on the results of the present study, the application of MS culture medium containing 3 mg/l BA with 0.5 mg/l NAA is recommended for regeneration and proliferation of tissue culture plantlets of *Haworthia cooperi*. It is also recommended to use ½ MS culture medium containing 1 mg/l of IAA hormone for rooting of tissue culture plantlets.

Keywords: Callus formation, Propagation, Regeneration, Rooting

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۱، ۴۵(۱)، ۶۶-۵۳
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/PPD.2021.36744.1971
تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۲

تولیدات گیاهی
مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا شیشه‌ای (*Haworthia cooperi*)

سیده مهدیه خرازی[۱]، مریم مرادیان[۲]، نسیم صفری[۳]، آزاده خادم[۴]، احمد شریفی[۵]*

۱- استادیار، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
۲- مربی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
۳- دانشجوی دکتری علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۴- مربی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
۵- استادیار، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی پاسخ رشدی گیاه هاورتیا شیشه‌ای (*Haworthia cooperi*) به شرایط کشت درون شیشه‌ای در قالب ۳ آزمایش جداگانه، بصورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی انجام شد. در آزمایش اول اثرات نوع سیتوکنین (BA و KIN) و غلظت سیتوکنین (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بر باززایی ریزنمونه برگ مورد ارزیابی قرار گرفت. طی آزمایش دوم به بررسی اثرات نوع نمک محیط کشت (MS و B_5) و غلظت نمک محیط کشت (۰/۵ و ۱) بر میزان پرآوری گیاهچه‌ها پرداخته شد. در آزمایش سوم، میزان ریشه‌زایی گیاهچه‌ها تحت تأثیر نوع اکسین (NAA، IBA و IAA) و غلظت اکسین (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کاربرد انواع مختلف سیتوکینین بر میزان باززایی مؤثر بود. بیشترین تعداد گیاهچه باززاشده در محیط کشت پایه MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده شد. استفاده از محیط‌کشت MS در مقایسه با محیط کشت B_5 کارایی بهتری را نشان داد. نتایج مرحله ریشه زایی نشان داد که وجود هورمون NAA در محیط کشت افزایش ریشه‌زایی در گیاه را سبب شد، در مقابل به افزایش ضخامت ریشه‌های تولیدی در گیاهچه نیز منجر شد که این ریشه‌ها برای رشد گیاه در مرحله سازگاری مناسب نیستند. لذا با در نظر گرفتن تعداد و طول ریشه های تولید شده، محیط کشت بهینه جهت ریشه‌زایی، محیط کشت نصف غلظت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA معرفی گردید.

کلیدواژه‌ها: باززایی، پرآوری، ریشه‌زایی، کالوس‌زایی

* **نویسنده مسئول:** احمد شریفی
رایانامه: a-sharifi@jdm.ac.ir

© 2022 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقدمه

ساکولنت‌ها گیاهانی بسیار متنوع و دارای برگ‌ها و ساقه‌های گوشتی می‌باشند. برخی از آن‌ها دارای گل‌های زیبا و برخی دیگر دارای برگ‌های چشم‌نواز و جذاب می‌باشند. این گیاهان به دلیل توقع بسیار پایین و مقاومت بسیار بالا امروزه در باغبانی و صنعت گلکاری مورد توجه قرارگرفته‌اند. از این گیاهان همانند سایر گیاهان برگ‌زینتی و گل‌دهنده می‌توان در زیباسازی فضای داخلی آپارتمان‌ها استفاده نمود (Ghasemi Ghehsare & Kafi, 2010). جنس *Haworthia* Spp. بیشتر از ۱۵۰ گونه دارد که همه آن‌ها ارتفاع کمی داشته و اغلب بدون ساقه هستند که به عادت رشدی طوقه‌ای در این گیاهان منجر می‌شود (Ghasemi Ghehsare & Kafi, 2010). از گیاه هاورتیا به‌عنوان گیاه گلدانی و در باغ‌های مینیاتوری استفاده می‌شود. هم‌چنین این گیاه قابلیت کشت در محوطه‌سازی صخره‌ای و فضای باز را دارد. هاورتیا گیاهی خودناسازگار بوده و توسط قلمه برگ تکثیر می‌شود. با این حال، روند تکثیر گیاه از این طریق به دلیل تعداد کم پاگیاه (Offshoot) تولید شده توسط گیاه مادری بسیار پایین است (Liu et al., 2017; Mycock et al., 1997; Van Jaarsveld, 1999)؛ در نتیجه ریزازدیادی روشی مؤثر و کارآمد به منظور تکثیر گونه‌های مختلف هاورتیا می‌باشد. پژوهش‌هایی در ارتباط با تکثیر برخی گونه‌های این گیاه از طریق کشت درون شیشه‌ای انجام شده است. محققین اثرات مثبت هورمون BA را در افزایش تعداد شاخساره در شرایط کشت درون شیشه‌ای تأیید نموده‌اند (Estrada-Luna et al., 2008; Khalafalla et al., 2007). در پژوهش انجام شده بر روی گونه ای از هاورتیا مشخص گردید که استفاده از هورمون BA در محیط کشت پایه MS به افزایش تعداد اندام هوایی در گیاه هاورتیا مینیما (*Haworthia minima*) منجر شد. این در حالی است که کاربرد KIN در محیط کشت، پدیده شیشه‌ای شدن در این گیاه را سبب شد (Nezamdoost et al., 2019). در پژوهشی دیگر کاربرد محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون KIN بر کشت درون‌شیشه‌ای گیاه هاورتیا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش غلظت هورمون کینتین به ۲ میلی‌گرم در لیتر تولید شاخساره با کیفیت، کاهش و در غلظت‌های بالاتر تنها به تولید کالوس منجر شد (Kaul & Sabharwal, 1992). در کاکتوس انجیر تیغی هندی (*Opuntia ficus-indica*)، محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به تولید بیشترین تعداد شاخساره منجر شد (Darang et al., 2011). در پژوهشی دیگر بهترین تیمار شاخه‌زایی مستقیم در گونه پلسی فورا آسلیفورمیس (*Pelecyphora aselliformis*) محیط کشت حاوی ۳ درصد ساکارز و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA بیان شد. هم‌چنین گونه پلسی فورا استرابلی فورمیس (*Pelecyphora strobiliformis*) در محیط کشت حاوی ۵ درصد ساکارز و ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA بیشترین شاخه‌زایی را نشان داد (Balch & Figuaroa, 2002). استفاده از ۰/۸۸ میلی گرم در لیتر هورمون TDZ به همراه ۰/۳۷ میلی گرم در لیتر هورمون NAA در محیط کشت پایه MS به القای شاخه‌زایی و تولید بیشترین شاخه در گیاه هاورتیا رتوسا (*Haworthia retusa*) منجر گردید (Kim et al., 2017). بهترین تیمار هورمونی به منظور شاخه‌زایی مستقیم در دو گونه مامیلاریا پکتینی فورا (*Mamillaria pectinifera*) و اسکوباریا مینیما (*Escobaria minima*) کاربرد محیط کشت پایه MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA و در گونه پلسی فورا آسلیفورمیس (*Pelecyphora aselliformis*) کاربرد ۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون KIN و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA تعیین شد (Giusti et al., 2002). در پژوهش انجام‌شده در کاکتوس توربینی کارپوس (*Turbinicarpus*) مشخص گردید که محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA بهترین محیط کشت به منظور فعال‌سازی جوانه است (Ruvalcaba-Ruiz et al., 2010). هم‌چنین بهترین محیط کشت برای شاخه‌زایی کاکتوس انجیر تیغی هندی (*Opuntia ficus-indica*)، محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA، تعیین شد (Cecilia et al., 2002). در کاکتوس زینتی اوپونتیا لانیجرا (*Opuntia lanigera*) بیشترین تعداد شاخساره در حضور ۵ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد (Estrada-Luna et al., 2008). تفاوت در محیط کشت پایه نیز می‌تواند بر میزان شاخه‌زایی مؤثر باشد. در پژوهشی که در گیاه کراسولا آربورسینز (*Crassula arborescens*) صورت گرفت، شاخه‌زایی در محیط کشت MS و BW به‌ترتیب ۱۰۰ و ۸۷ درصد ثبت شد (Luliana vidican et al., 2010). کاربرد دو هورمون IAA و IBA، ریشه‌زایی در هر دو گونه پلسی فورا

آسلیفورمیس (*Pelecyphora aselliformis*) و پلسی فورا استرابلی فورمیس (*Pelecyphora strobiliformis*) را سبب شد (Balch & Figuaroa, 2002). این در حالی است که محیط کشت بهینه جهت ریشه‌زایی در کاکتوس توربینی کارپوس (*Turbinicarpus*) محیط کشت MS فاقد هورمون معرفی گردید (Ruvalcaba-Ruiz et al., 2010). در گیاه هاورتیا سیمبی فورمیس (*Haworthia cymbiformis*) مشخص شد که محیط کشت MS دارای ۳ میلی‌گرم در لیتر BA، ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار، محیط کشت بهینه برای القای کالوس می‌باشد (Huang et al., 2014). کاربرد هورمون NAA در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و هورمون TDZ با غلظت ۰/۰۷ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت پایه MS، بهترین ترکیب هورمونی در تولید کالوس در گیاه *Cereus peruvianus* Mill. معرفی شد (Karimi et al., 2010). استفاده از کشت درون‌شیشه‌ای به تسهیل تکثیر در گیاه از طریق حذف محدودیت‌های فصلی و محیطی منجر می‌شود. با توجه به مشکلات تکثیر در این گیاه به روش قلمه برگ و کمبود پاگیاه تولید شده به عنوان منبع قلمه، این پژوهش با هدف بررسی اثر و نوع غلظت نمک محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سیتوکینین و اکسین به منظور بهینه‌سازی دستورالعمل تکثیر این گیاه مینیاتوری در شرایط کشت درون شیشه‌ای طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به منظور بررسی پاسخ گیاه هاورتیا شیشه‌ای (*Haworthia cooperi*) به شرایط کشت درون شیشه‌ای در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی طراحی و اجرا شد. به منظور تهیه ریزنمونه، تعداد محدودی گیاه هاورتیا شیشه‌ای از گلخانه‌ای در شهرستان گلبهار تهیه گردید و پس از انتقال به گلخانه تحقیقاتی در شرایط محیطی و تغذیه مناسب نگهداری شدند. پس از انتقال گیاهان به آزمایشگاه، به منظور ضدعفونی مواد گیاهی، ابتدا ریشه گیاهان حذف گردید و برگ‌های گیاه به آرامی از یکدیگر جدا شدند و به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و چند قطره مایع‌شوینده رایج شستشو داده شدند تا گردوغبار و هم‌چنین مواد زائد دیگر از سطح آن برطرف گردد. پس از این مرحله، از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه برای از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی استفاده شد و پس از انتقال بشر حاوی نمونه‌های برگی به زیر هود لامینار و آبکشی با آب مقطر استریل، برای از بین بردن آلودگی‌های قارچی از محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. به منظور کاهش کِشش سطحی و افزایش سطح تماس نمونه و ماده گندزدا، بسته به حجم محلول گندزدا ۲ تا ۳ قطره تِوین ۲۰ به محلول ضدعفونی اضافه شد. طی مدت ضدعفونی و به منظور بهبود تماس گیاه با ماده گندزدا، محلول با دست تکان داده شد. در پایان مدت ضدعفونی، ریزنمونه‌ها تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار ۳ مرتبه در بازه‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با آب‌مقطر استریل آبکشی شدند.

آزمایش اول: به منظور بررسی اثر نوع و غلظت هورمون سیتوکنین بر باززایی ریزنمونه برگ گیاه هاورتیا شیشه‌ای، ریزنمونه‌های برگ این گیاه به طول ۰/۵ سانتیمتر برش خورده و در محیط‌کشت نیمه‌جامد MS (موراشیگ و اسکوگ) حاوی غلظت‌های مختلف BA و KIN، (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA، ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، pH= ۵/۷ کشت گردیدند. محیط کشت‌ها در شیشه‌های کشت به میزان ۱۵ میلی‌لیتر توزیع و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر اُتوکلاو گردیدند. پس از کشت، ریزنمونه‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ۴۰ روز، عکس‌العمل ریزنمونه‌ها از نظر تعداد گیاهچه باززا شده، تعداد ریشه و طول آن مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار طراحی و اجرا شد. عامل اول نوع سیتوکنین (BA و KIN) و عامل دوم غلظت سیتوکنین (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بود.

آزمایش دوم: به منظور بررسی اثر نوع نمک محیط کشت و غلظت آن بر میزان پرآوری گیاهچه‌های باززا شده، آزمایشی فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با دو عامل نوع نمک محیط کشت (MS و B_5) و غلظت نمک محیط (۰/۵ و ۱) در چهار تکرار طراحی و اجرا شد. محیط کشت‌های مورد نظر حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار بودند و pH= ۵/۷ تنظیم گردید. ریزنمونه‌ها مشابه آزمایش قبل تهیه و در شرایط مشابه نگهداری شدند و در فاصله زمانی هر ۴ هفته

واکشت انجام شد. پس از گذشت ۴۰ روز صفاتی همچون تعداد گیاهچه باززا شده، تعداد ریشه، طول ریشه، وزن تر گیاهچه اصلی، وزن تر گیاهچه‌های باززاشده، وزن تر ریشه، وزن خشک گیاهچه اصلی، وزن خشک گیاهچه‌های باززاشده شده و وزن خشک ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمایش سوم: به منظور بررسی اثر نوع و غلظت اکسین بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا شده هاورتیا شیشه‌ای، گیاهچه‌های رشد یافته در مرحله پُرآوری در محیط‌کشت نیمه‌جامد با نصف غلظت MS حاوی انواع و غلظت‌های مختلف اکسین قرار داده شدند. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. عامل اول نوع هورمون اکسین (NAA، IBA و IAA) و عامل دوم غلظت های مختلف آن (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بود. مقدار ساکارز و آگار موجود در محیط به ترتیب ۳ درصد و ۸ گرم در لیتر و pH= ۵/۷ تنظیم گردید. پس از گذشت ۴۰ روز، صفات مختلفی از جمله تعداد و طول ریشه تولیدشده، درصد ریشه‌زایی، تعداد برگ، تعداد گیاهچه، ارتفاع گیاهچه و وزن خشک گیاهچه مورد ارزیابی قرار گرفت. آماده سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP-8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت و نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم گردیدند.

نتایج و بحث

آزمایش اول: بررسی اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی سیتوکنین بر باززایی ریزنمونه برگ گیاه هاورتیا شیشه‌ای

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش اول در ارتباط با تأثیر نوع و غلظت هورمون بر باززایی گیاه هاورتیا شیشه‌ای در محیط کشت MS مشخص گردید که برهمکنش نوع و غلظت هورمون بر صفات ثبت شده از جمله تعداد ریشه و طول ریشه در سطح احتمال یک درصد و در صفت تعداد گیاهچه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار گردید (جدول ۱). کاربرد دو هورمون BA و KIN منجر به افزایش تعداد گیاهچه گردید. بیشترین تعداد گیاهچه (۵/۵۰ عدد در هر ریزنمونه) در شرایط کاربرد هورمون BA با غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر ثبت شد. عدم کاربرد هورمون در محیط کشت کمترین تعداد گیاهچه را به خود اختصاص داد و در حقیقت در ریزنمونه مورد بررسی هیچگونه باززایی صورت نگرفت. با افزایش غلظت هر دو هورمون مورد بررسی تعداد گیاهچه افزایش یافت، اما کاربرد هورمون BA در محیط کشت، تأثیر بیشتری در این امر داشت (جدول ۲). کاربرد هورمون KIN افزایش ارتفاع گیاهچه را سبب شد. در مقابل گیاهچه‌های رشد کرده در محیط کشت حاوی هورمون BA ارتفاع کمتری داشتند (شکل ۱).

Table 1. Analysis of variance (mean squares) of measured traits under the influence of cytokinin type and concentration

S.O.V.	df	Plantlet height	Root length	Number of root	Number of shoot
Hormone	1	2.83^{*}	22.52^{**}	49.59^{**}	2.04^{**}
concentration	3	0.007^{**}	7.02^{**}	30.59^{**}	17.16^{**}
Hormone × concentration	3	0.33^{ns}	2.52^{**}	6.09^{**}	0.70^{*}
Error	16	0.41	0.13	0.90	0.16

*,** significant at 5% and 1% level of probability, respectively. ns: Non-significant.

Table 2. Interaction of type and concentration of cytokinin on number of shoot, number of roots and root length

Cytokinin	Concentration (mg/l)	Root length (cm)	Number of root	Number of shoot
BA	0	4.50^{a}	8.00^{a}	1.00^{e}
	1	1.50^{d}	4.00^{d}	2.50^{d}
	2	1.25^{de}	2.00^{e}	4.50^{b}
	3	0.75^{e}	0.50^{e}	5.50^{a}
KIN	0	4.50^{a}	8.00^{a}	1.00^{e}
	1	4.25^{ab}	7.00^{ab}	2.50^{d}
	2	3.75^{bc}	6.00^{bc}	3.50^{c}
	3	3.25^{c}	5.00^{cd}	4.16^{bc}

Same letter in each column are not significantly different at probability levels of 5% based on LSD test.

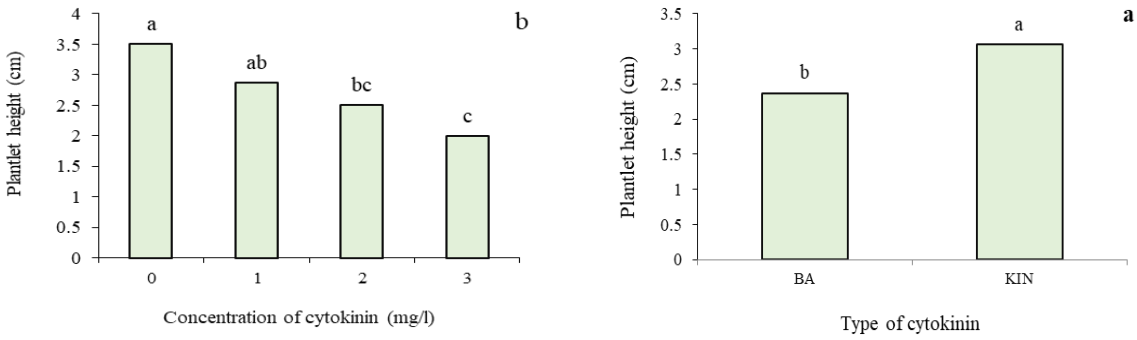


Figure 1. Effect of different types of cytokinin (a) and different concentrations (b of cytokinin on plantlet height. Same letter in each column are not significantly different at probability levels of 5% based on LSD test

هم‌چنین کاربرد غلظت‌های مختلف هورمون بر ارتفاع گیاه مؤثر بود. با توجه به نتایج مشخص شد که با افزایش غلظت هورمون از ۰ به ۳ میلی‌گرم در لیتر از ارتفاع گیاهچه‌ها کاسته شد؛ به‌طوری‌که کمترین ارتفاع در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA در محیط کشت مشاهده و ثبت شد (شکل ۱). عدم کاربرد هورمون در محیط کشت به تولید ریشه در گیاهچه‌های باززاشده منجر گردید؛ اما استفاده از دو هورمون BA و KIN در محیط کشت تعداد ریشه تولید شده توسط گیاهچه را کاهش داد. به طوریکه بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت فاقد هورمون و کمترین تعداد آن در غلظت بالای هورمون BA ثبت شد. کاهش تعداد ریشه در محیط کشت حاوی BA نسبت به محیط کشت حاوی KIN بیشتر بود (جدول ۲ و شکل ۲). برهمکنش نوع و غلظت هورمون بر طول ریشه تولید شده نیز مؤثر بود. بدین صورت که با افزایش غلظت دو هورمون BA و KIN در محیط کشت از طول ریشه تولید شده کاسته شد (جدول ۲ و شکل ۲).

نوع، ژنوتیپ و شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه، نوع محیط کشت، توانایی متابولیکی سلول و شرایط سلول از نظر مرحله تقسیم سلولی و هم‌چنین عوامل تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر درصد باززایی در شرایط کشت درون شیشه‌ای تأثیر می‌گذارند. علاوه بر این، شرایط فیزیولوژیکی گیاه بر تولید گیاهچه و درصد باززایی آن مؤثر است (Kuykendall et al., 2003; Meftahizade et al., 2010; Tripathi & Tripathi, 2003; Nagarathan et al., 1991). سایتوکینین‌ها در گیاهان سبب اندام‌زایی و تسریع در تقسیم سلولی می‌شوند (Emara, 2008). در این آزمایش نیز کاربرد BA در محیط کشت توانست باززایی گیاهچه را افزایش دهد. با توجه به پژوهش‌های انجام شده مشخص گردیده است که سیتوکینین‌ها در رشد ساقه و جوانه مؤثر بوده و آن را تسریع می‌کنند (Fathi et al., 2012; Mashayekhi & Akbarpour, 2008)؛ به نحوی که در کشت درون شیشه‌ای در گیاه پیلوسرئوس ماکسونی (*Pilocereus maxonii*) استفاده از محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مؤثر بوده است. علاوه بر این، کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر 2ip (2-ip-riboside, N6-(2-isopentenyl)adenosine, n6-(y,y- methylallyl) adenosine) در محیط کشت در شاخه‌زایی این گیاه مؤثر بود (Sagastume Tecnoregion, 2006). هم‌چنین کاربرد هورمون IBA در محیط کشت به القا ریشه‌زایی منجر گردید (Drew & Azimi, 2000). در پژوهشی دیگر، در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) بهترین باززایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP به همراه ۱ گرم در لیتر زغال فعال حاصل شد (Talebi et al., 2012). در شرایط آزمایشگاهی استفاده از BA در مقایسه با KIN و TDZ تأثیر بیشتری دارد (Emara, 2008). این مورد در نتایج پژوهش ما نیز تایید شد. در آزمایش انجام شده توسط محققین مشخص گردید که استفاده از BA در غلظت بالا در محیط کشت تعداد شاخساره را افزایش اما ارتفاع گیاه را کاهش داد و با کاهش غلظت آن تعداد شاخساره کاهش و ارتفاع گیاه افزایش یافت (Chien-Ying et al., 2009; Kharrazi et al., 2018). این نتایج همسو با نتایج حاصل از این پژوهش می‌باشد. در پژوهش حاضر نیز با وجود افزایش تعداد گیاهچه باززا شده، ارتفاع گیاهچه در محیط کشت حاوی BA در مقایسه با محیط کشت حاوی KIN کمتر بود.

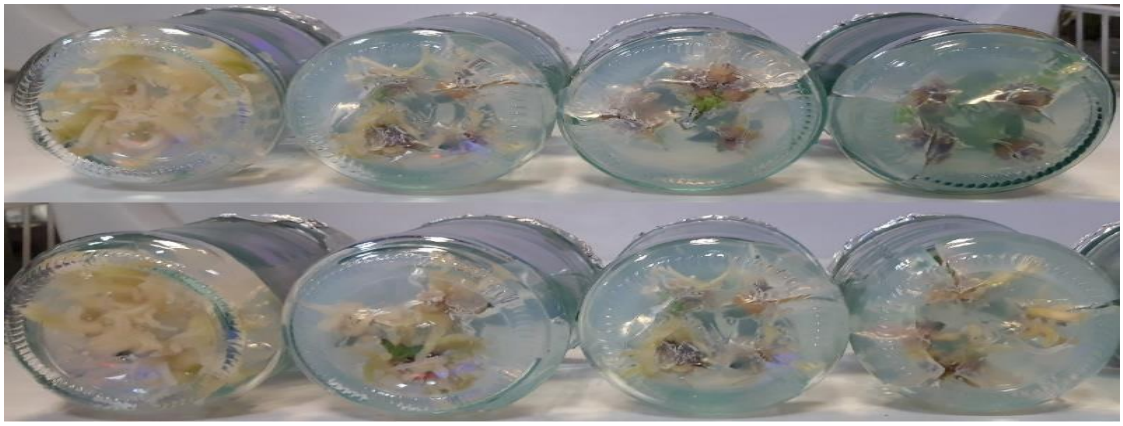


Figure 2. The effect of type and concentration of cytokinin on plantlet rooting (top row from left to right: 0, 1, 2 and 3 mg/l BA, respectively, and bottom row from left to right: 0, 1, 2 and 3 mg/l Kin)

آزمایش دوم: بررسی اثر نوع و غلظت نمک محیط کشت بر میزان پرآوری گیاهچه‌های باززا شده هاورتیا شیشه‌ای

با توجه به نتایج تجزیه واریانس مشخص گردید که نوع محیط کشت و غلظت آن بر صفات مورد بررسی مؤثر بود و اثر متقابل نوع و غلظت محیط کشت بر صفات وزن تر گیاهچه اصلی، وزن تر گیاهچه‌های باززا شده، وزن تر ریشه، وزن خشک گیاهچه اصلی، گیاهچه‌های باززاشده و وزن خشک ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). تفاوت در محیط کشت مورد استفاده بر صفات تعداد گیاهچه باززاشده، تعداد ریشه و طول ریشه تأثیر گذار بود به طوری که این صفات در محیط کشت MS در مقایسه با محیط کشت B_5 وضعیت بهتری داشتند. این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار بود (شکل‌های ۳ و ۴). این نکته قابل ذکر است که صفت طول ریشه تحت تأثیر غلظت محیط کشت قرار گرفت و با کاهش غلظت عناصر محیط کشت به نصف، طول ریشه به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۳).

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش مشخص گردید که محیط کشت MS در تمامی صفات نسبت به محیط کشت B_5 عملکرد بهتری را نشان داده است. استفاده از این محیط کشت به ثبت بیشترین وزن تر گیاهچه اصلی، وزن تر گیاهچه‌های باززا شده، وزن تر ریشه، وزن خشک گیاهچه اصلی، وزن خشک گیاهچه‌های باززاشده و وزن خشک ریشه منجر شد. این نکته قابل ذکر است که سایر تیمارهای آزمایش از لحاظ آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (جدول ۴). به‌طورکلی رشد گیاهچه‌ها در محیط کشت MS بهتر بود. این نکته قابل ذکر است که رنگ گیاهچه‌های رشده یافته در محیط کشت B_5 نسبت به محیط کشت MS متفاوت بود و به رنگ سبز متمایل به قهوه‌ای تغییر رنگ داده بودند. اما مقدار تغییر رنگ در محیط کشت نصف غلظت B_5 کمتر بود (داده‌ها مشاهده‌ای است). این در حالی است که گیاهچه‌های رشد کرده در محیط کشت MS دارای رنگ سبز و با کیفیت مناسب بودند و گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت ½ MS دارای کیفیت نسبتاً مناسبی بودند. رنگ ریشه‌های تولید در دو محیط کشت مختلف متفاوت بود. ریشه‌های تولید در محیط کشت MS سفید رنگ و در محیط کشت B_5 زرد متمایل به قهوه‌ای بود (داده‌ها مشاهده‌ای است) (شکل ۴).

تعیین بهترین نوع محیط کشت و بهینه‌سازی آن به منظور باززایی، پرآوری، ریشه‌زایی و کالوس‌زایی یکی از موارد مهم در موفقیت و نتیجه‌گیری صحیح در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای است (Nourafcan et al., 2014; Balapor et al., 2020). در پژوهش حاضر محیط کشت MS در مقایسه با محیط کشت B_5 کارایی بهتری نشان داد و موجب بهبود صفات مورد بررسی در آزمایش شد. با توجه به نتایج این پژوهش کارآمد بودن محیط کشت MS در فرآیند پرآوری این گیاه، به احتمال فراوان با مناسب بودن اجزا تشکیل دهنده این محیط کشت در ارتباط

می‌باشد. هم‌چنین برتری محیط کشت MS می‌تواند با بالاتر بودن توان یونی این محیط کشت در مقایسه با محیط‌کشت B_5 مرتبط باشد. علاوه بر این میزان یون و غلظت مواد معدنی در محیط کشت MS از محیط کشت B_5 بیشتر است (Koohi et al., 2014; Pierik, 1997; Taji et al., 1997). تمامی این موارد می‌تواند با برتری محیط کشت MS در ارتباط باشد. علاوه بر این کاهش غلظت مواد ریزمغذی و عناصر غذایی اصلی در محیط کشت با غلظت نصف، کاهش صفات مورد بررسی را توجیه می‌کند (Pierik, 1997; Taji et al., 1997).

Table 3. Analysis of variance (mean squares) of measured traits under the influence of type and concentration of culture medium

S.O.V.	df	Number of regenerated shoot	Number of root	Root length	Regenerated Shoot fresh weight
Medium	1	13.43*	53.76*	2.78*	0.68**
Concentration	1	1.00 ns	1.77 ns	5.44**	0.66**
Medium × Concentration	1	9.00 ns	7.11 ns	0.000ns	0.47**
Error	12	2.27	2.22	0.208	0.02
S.O.V.	**df**	**Root fresh weight**	**Dry weight of main shoot**	**Regenerated shoot dry weight**	**Root dry weight**
Medium	1	0.29**	0.007**	0.002**	0.0003**
Concentration	1	0.21**	0.005**	0.001**	0.0002**
Medium × Concentration	1	0.32**	0.008**	0.001**	0.0004**
Error	12	0.17	0.0001	0.00006	0.00001

*,** significant at 5% and 1% level of probability, respectively. n.s: Non-significant.

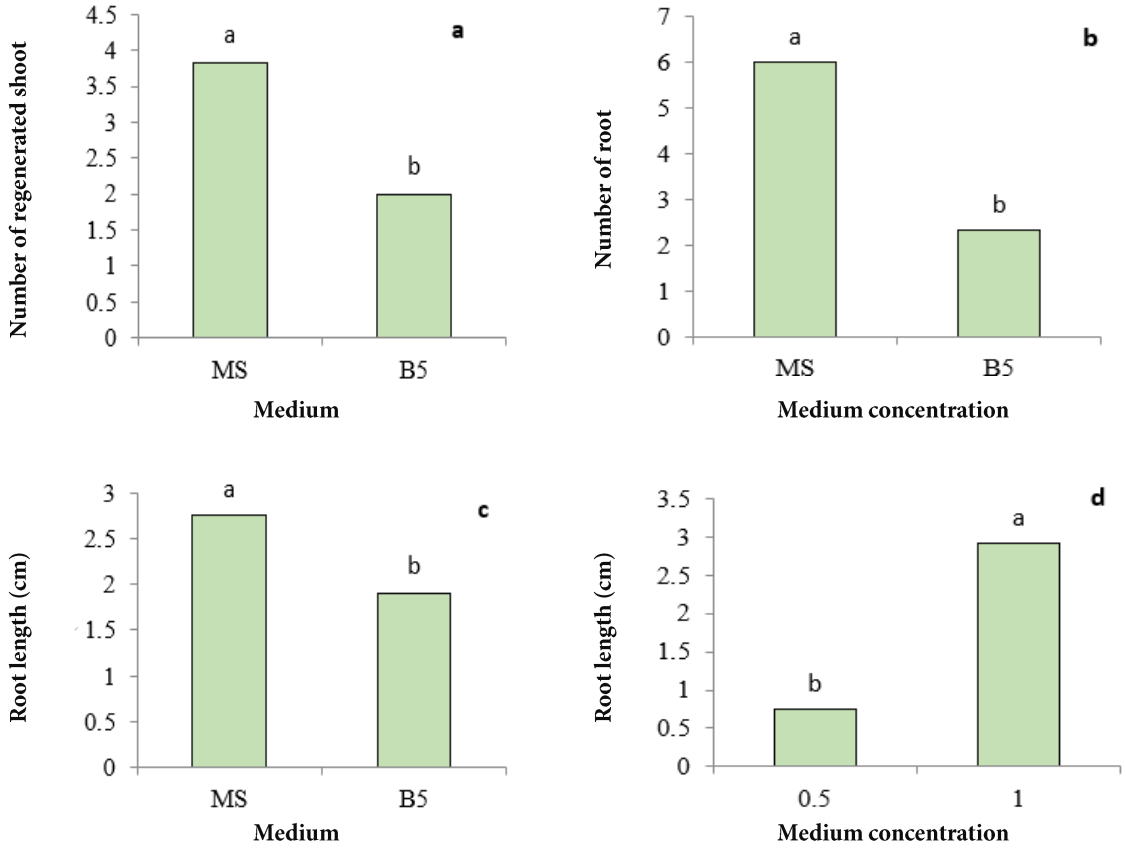


Figure 3. Effect of medium on the number of regenerated shoot (a), number of roots (b) and root length (c) and effect of different concentrations of culture medium on root length (d). Same letter in each column are not significantly different at probability levels of 5% based on LSD test



Figure 4. The effect of salt type of culture medium on plantlet and root quality of Hawthorn

Table 4. Interaction of type and concentration of medium on measured trait

Medium	Concentration (mg/l)	Root dry weight (g)	Regenerated shoot dry weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Regenerated Shoot fresh weight (g)
MS	0.5	0.004[b]	0.01[b]	0.02[b]	0.07[b]	0.14[b]
	1	0.02[a]	0.04[a]	0.11[a]	0.59[a]	0.89[a]
B_5	0.5	0.004[b]	0.004[b]	0.02[b]	0.08[b]	0.07[b]
	1	0.001[b]	0.008[b]	0.02[b]	0.03[b]	0.13[b]

Same letter in each column are not significantly different at probability levels of 5% based on LSD test.

در پژوهشی که در گیاه به لیمو به منظور بهینه‌سازی محیط کشت صورت گرفت، مشخص گردید که استفاده از محیط کشت MS در مقایسه با محیط کشت B_5 در غلظت کامل، تمامی شاخص‌های رشدی مورد مطالعه را بهبود بخشید و در نهایت استفاده از محیط کشت MS در غلظت کامل و حاوی ۱ گرم بر لیتر زغال فعال، محیط کشت بهینه جهت ریزازدیادی گیاه به‌لیمو معرفی گردید (Nourafkan & Ansari, 2017). این نتایج همسو با نتایج حاصل از این پژوهش می‌باشد.

آزمایش سوم: بررسی اثر نوع و غلظت اکسین بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا شده هاورتیا شیشه‌ای

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی نشان داد که کاربرد انواع مختلف هورمون و هم‌چنین غلظت‌های مختلف آن بر صفات مرتبط با ریشه‌زایی گیاه هاورتیا شیشه‌ای مؤثر بود. برهمکنش نوع هورمون و غلظت آن بر صفات تعداد ریشه، طول ریشه و ضخامت ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۵). عدم کاربرد هورمون اکسین در محیط کشت کمترین تعداد ریشه در هر گیاهچه را به خود اختصاص داد. هورمون NAA نسبت به دو هورمون IAA و IBA به تولید تعداد ریشه بیشتری منجر شد. با افزایش غلظت این هورمون از ۱ به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، تعداد ریشه کاهش یافت اما از لحاظ آماری تفاوت ایجاد شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار نبود (جدول ۶). تأثیر هورمون‌های مختلف بر طول ریشه متفاوت بود. کاربرد دو هورمون NAA و IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، طول ریشه تولید شده را افزایش داد؛ اما با افزایش غلظت این دو هورمون به ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر از طول ریشه تولید شده کاسته شد. در مقابل کاربرد هومورن IAA در هر سه غلظت مورد بررسی در آزمایش به افزایش طول ریشه نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد هورمون در محیط کشت) منجر گردید (جدول ۶).

ضخامت ریشه تولید شده نیز تحت تأثیر نوع هورمون قرار گرفت. بطوریکه با کاربرد هورمون ضخامت ریشه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد (عدم کاربرد هورمون اکسین در محیط کشت) مشاهده شد. بیشترین ضخامت ریشه در محیط کشت حاوی هورمون NAA در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد. با افزایش غلظت هورمون NAA از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم در لیتر ضخامت ریشه تولیدی به‌طور چشم‌گیری افزایش یافت. این نکته قابل ذکر است که ریشه‌های ضخیم تولید شده در محیط کشت حاوی

هورمون NAA قابلیت سازگاری ضعیفی داشته و ایجاد چنین ریشه‌هایی در شرایط کشت بافت نامطلوب است و به کاهش درصد سازگاری گیاهچه‌ها منجر می‌گردد. در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر هورمون IAA، تعداد ریشه تولیدی با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA تفاوت آماری معنی‌داری نداشت ولی طول ریشه‌های تولیدی در بالاترین میزان خود بود و ریشه‌های تولیدی ضخامت نسبتا مطلوبی داشت (جدول ۶ و شکل ۵). بنابراین محیط کشت بهینه جهت ریشه‌زایی گیاه هاورتیا شیشه‌ای، محیط کشت نصف غلظت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون IAA می‌باشد. درصد کالوس‌زایی نیز تحت تأثیر انواع مختلف هورمون اکسین قرار گرفت. با توجه به نتایج مشخص گردید که کاربرد هورمون NAA منجر به تولید کالوس در ریزنمونه گردید و در محیط کشت‌های حاوی دو هورمون IBA و IAA هیچگونه کالوس‌زایی مشاهده نگردید (جدول ۶).

در پایان آزمایش گیاهچه‌های کشت‌بافتی ریشه‌دار جهت سازگاری به شرایط گلخانه منتقل شدند و سازگاری (به میزان ۹۰٪) در بستر کشت ورمی‌کولیت: پرلیت به نسبت ۲ به ۱ صورت گرفت (شکل ۶).

Table 5. Analysis of variance (mean squares) of measured traits under the influence of auxin type and concentration

S.O.V.	df	Callus	Secondary root	Root thickness	Root length	Number of root
Hormone	2	22500.0**	0.33^{ns}	6.97**	4.11**	34.11**
Concentration	3	2500.0**	0.18^{ns}	2.70**	1.30**	65.65**
Hormone × Concentration	6	2500.0**	0.07^{ns}	0.97**	1.46**	13.74**
Error	24	0.000	0.13	0.09	0.25	0.88

*,** significant at 5% and 1% level of probability, respectively. ns: Non-significant.

Table 6. Effect of type and concentration of auxin on traits related to rooting of Hawthorn plantlets

Auxin	Concentration (mg/l)	Callus (%)	Root thickness (mm)	Root length (cm)	Number of root
NAA	0	0.0^{b}	0.94^{d}	1.66^{b}	2.33^{f}
	0.5	100.0^{a}	2.77^{b}	2.66^{a}	4.00^{de}
	1	100.0^{a}	3.78^{a}	1.66^{b}	11.33^{a}
	1.5	100.0^{a}	2.81^{b}	1.66^{b}	12.00^{a}
IAA	0	0.0^{b}	0.94^{d}	1.66^{b}	2.33^{f}
	0.5	0.0^{b}	1.12^{cd}	2.66^{a}	4.66^{cde}
	1	0.0^{b}	1.43^{cd}	3.50^{a}	6.00^{bc}
	1.5	0.0^{b}	1.60^{c}	3.00^{a}	4.66^{cde}
IBA	0	0.0^{b}	0.94^{d}	1.66^{b}	2.33^{f}
	0.5	0.0^{b}	1.11^{cd}	3.33^{a}	3.66^{ef}
	1	0.0^{b}	1.45^{cd}	1.50^{b}	5.33^{cd}
	1.5	0.0^{b}	1.43^{cd}	1.66^{b}	7.00^{b}

Same letter in each column are not significantly different at probability levels of 5% based on LSD test.

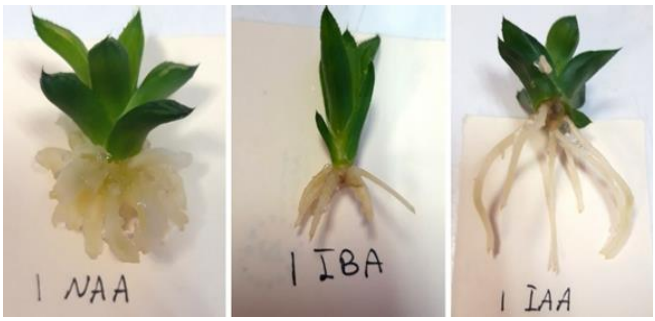


Figure 5. Effect of auxin type on rooting of Hawthorn plantlets



Figure 6. Adaptation of tissue culture plantlets in greenhouse condition

اکسین یکی از هورمون‌های گیاهی است که برای فعال‌سازی تقسیم سلولی در سلول‌های گیاهی تمایزیافته در شرایط کشت بافت موردنیاز می‌باشد (Asgharzadeh et al., 2016). به‌طورکلی در پی حضور تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از قبیل NAA، IBA و IAA در محیط کشت، ریشه‌زایی در نمونه‌های گیاهی القا می‌شود (Sivanesan et al., 2011). در پژوهش حاضر استفاده از هورمون IAA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر ترکیب هورمونی مناسب برای ریشه‌زایی در گیاه هاورتیا شیشه‌ای بود. در گیاه هاورتیا رتوسا (*Haworthia retusa*) استفاده از محیط کشت MS حاوی دو میکرومول ایندول بوتریک اسید بیشترین ریشه‌زایی را نشان داد (Kim et al., 2017). هم‌چنین در گیاه هاورتیا سیمبی فورمیس (*Haworthia cymbiformis*) محیط کشت بهینه برای ریشه‌زایی، محیط کشت نصف غلظت MS دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA، ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار بود (Huang et al., 2014). کاربرد هورمون IBA به میزان ۲ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت نصف غلظت MS به بیشترین درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های ژنوتیپ گالیکا (Gallica var. Tuscany superb) گل محمدی منجر گردید (Omidi et al., 2017). در پژوهشی دیگر مشخص گردید که کاربرد ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در محیط کشت گیاه هاورتیا تورجیدا (*Haworthia turgida* Haw) به بیشترین درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه منجر شد (Liu et al., 2017). در این پژوهش کاربرد هورمون NAA در محیط ریشه‌زایی را افزایش داد اما در مقابل به تولید ریشه بسیار ضخیم و بی‌کیفیت منجر گردید. در تولید کالوس و کالوس‌زایی در ریزنمونه، ترکیب هورمونی محیط کشت و غلظت‌های مورد استفاده نقش مهم و تاثیرگذاری دارند (De Oliveira et al., 1995).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش مشخص گردید که محیط کشت بهینه جهت ریزازدیادی گیاه هاورتیا شیشه‌ای محیط کشت MS می‌باشد. تمامی پارامترهای مورد ارزیابی در این محیط کشت بهترین نتیجه را نشان دادند. هم‌چنین کاربرد BA در مقایسه با کاربرد کاینتین در محیط کشت بر پارامترهای باززایی در این گیاه مؤثر بود. کاربرد هورمون BA در غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت MS به تولید بیشترین تعداد گیاهچه باززاشده منجر گردید. با این حال گیاهچه های باززا شده در این ترکیب هورمونی، کمترین ارتفاع گیاهچه تولیدی را به خود اختصاص دادند. علاوه بر این، با توجه به نتایج آزمایش مشخص گردید که محیط کشت نصف غلظت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA محیط کشت بهینه جهت ریشه‌زایی گیاه هاورتیا شیشه‌ای می‌باشد. وجود هورمون NAA در محیط کشت افزایش ریشه‌زایی در گیاه را سبب شد، در مقابل به افزایش ضخامت ریشه‌های تولیدی در گیاهچه نیز منجر شد که این ریشه‌ها برای رشد گیاه در مراحل بعدی مناسب نیستند.

سپاس‌گزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی سازمان جهاددانشگاهی خراسان رضوی بابت تأمین زیرساخت ها و هزینه های انجام این پروژه به‌عنوان بخشی از طرح مصوب این سازمان کمال تشکر را دارند.

References

Asgharzadeh, R., Moradi, H., Nematzadeh, Gh., & Ghanbari, A. (2016). Evaluation of growth adapter effect on callus induction of *Momordica Charantia* L. *Eco-Phytochemical Journal of Medical Plants*, 3(15), 46-56. [In Farsi]

Balapor, Z., Hosseini Moghaddam, H., Zarei, M., & Mollashahi, M. (2020). Micro Propagation of Penta Rootstock (*Prunus domestica*) in the Two Culture Media (MS and B5). *Plant Productions*, 42(4), 441-454. [In Farsi]

Balch, P. M., & Figuaroa, C. A. (2002). *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* and *P. strobiliformis* (cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 38, 73-78.

Cecilia Juarez, M., & Bernardo Passere C. (2002). *In vitro* propagation of *opuntia ellisiana Griff.* And a acclimatization *ellisiana Griff.* and acclimatization to field conditions. *Biocell*, 26(3), 1-18.

Chien-Ying, K., Al-Abdulkarim, A.M., Al-Jowid, S.M., & Al-Baiz, A. (2009). An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry. *African Journal of Biotechnology*, 8(11), 2611-2615.

Darang, M., Hamidoghli, Y., & Ramezani Sayad, A. (2011). *Influence of growth regulators on in vitro propagation of cactus (Opuntia ficus-indica).* MSc thesis of Horticultural Science, University of Guilan, Rasht. [In Farsi]

De Oliveira, S.A., Pires, F., Da Silva Machado, M., Jose Prioli, A., & Mangolin C. A. (1995). *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae), *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 31(1), 47-50.

Drew, R.A., & Azimi, M. (2000). Micropropagation of Red Pitaya (*Hylocereus undatus*). *Acta HortiCulture*, 575(26), 93-98.

Emara, H. (2008). Factors affecting propagation of strawberry (*Fragaria spp.*) through tissue cultures. *International Journal of Product Development*, 13(1), 191-212.

Estrada-Luna, A.A., Martinez-Hernandez, J.J., Estela Torres, M., & Chable-Moreno, F. (2008). *In vitro* micropropagation of the prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm- Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to ex vitro conditions. *Scientia Horticulturae*, 117(4), 378-385.

Fathi, Gh., Esmailpour, B., & Jalilvand, P. (2012). *Plant growth regulators*, Mashhad, JDM press. [In Farsi]

Ghasemi Ghohsare, M., & Kafi, M. (2010). *Floriculture* Vol 2. Tehran: Tehran University Press. [In Farsi]

Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F., & Tucci, M. (2002). *In Vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*, 95(4), 319-332.

Huang, S. H., Xiao, H. Y., & Hong, Y. P. (2014). Tissue culture and rapid propagation of *Haworthia cymbiformis*. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 30(5), 96-100.

Karimi, N., Naderi, R., Ebrahimi, M., & Mofid, M.R. (2010). Investigation of a Medicinal and ornamental plant propagation: The *Cereus Peruvianus* Mill. and using tissue culture technique. *Journal of Medicinal Plants*, 9(2-34), 38-44. [In Farsi]

Kaul, K., & Sabharwal, P. S. (1992). Morphogenetic studies on Haworthia: Establishment of tissue culture and control of differentiation. *American Journal of Botany*, 59(4), 377-385.

khalafalla, M. M., Abdellatef, E., Mohamed Ahmed, M. M., & Osman, M. G. (2007). Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi-arid regions. *International Journal of Sustainable Crop Production*, 2(4), 1-8.

Kharrazi, M., Sharifi, A., Keykhah Akhar, F., Bagheri, A., & Moradian, M. (2018). Effect of Hormonal Compositions on Micropropagation of Fifteen Cultivars of Gerbera (*Gerbera Jamesonii* Bolus ex Hooker f.). *Plant Productions*, 40(4), 91-102. [In Farsi]

Kim, D. H., Kang, K. W., & Sivanesan, I. (2017). Micropropagation of *Haworthia retusa* duval. *Propagation of Ornamental Plants*, 17(3), 77-82.

Koohi, L., Zare, N., Asghari Zakaria, R., & Sheykhzade Mosadegh, P. (2014). The Effect of plant growth regulators and different explants on the response of tissue culture and cell suspension cultures of german chamomile (*Matricaria Chamomilla* L.). *Journal of Crop Ecophysiology (Agriculture Science)*, 2(30), 203-214. [In Farsi]

Kuykendall, L. D., Stockett, T. M., & Saunders, J. W. (2003). Rhizobium radiobacter conjugation and callus-independent shoot regeneration used to introduce the cercosporin export gene cfp from Cercospora into sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biotechnology Letter*, 25(9), 739-744.

Liu, B., Fang, H., Meng, C., Chen, M., Chai, Q., Zhang, K., & Liu, S. (2017). Establishment of a Rapid and Efficient Micropropagation System for Succulent Plant *Haworthia turgida* Haw. *Hort Science*, 52(9), 1278-1282.

Luliana vidican, T., & Cachita-Cosma, D. (2010). Initiation of *Opuntia fragilis* var. fragilis in vitro cultures. *Studia Universitatis Vasile Goldis, Seria stiintele Vietii*, 20(3), 35-40.

Mashayekhi, K., & Akbarpour, V. (2008). *Mineral and organic minerals used in plant tissue culture* (Vol 1). Golestan: Makhtoomgholi Feraghi press (Sarli). [In Farsi]

Meftahizade, H., Moradkhani, H., Naseri, B., Lotfi, M., & Naseri, A. (2010). Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(3), 240-246.

Mycock, D.J., Watt, M.P., Hannweg, K.F., Naicker, K., Makwareka, M., & Berjak, P. (1997). Somatic embryogenesis of two indigenous South African *Haworthia* spp. (*H. limifolia* and *H. koelmaniorum*), *South African Journal of Botany*, 63(6), 345-350.

Nagarathan, K. C., Prakash, H. S., & Shetty, H. S. (1991). Genotypic effects on the callus formation from different explants of pearl millet B lines. *Advances in Plant Sciences*, 4(1), 82-86.

Nezamdoost, M., Kalateh Jari, S., & Ebrahimi, A. (2019). *Investigation of Haworthia minima organogenesis and rooting under in vitro condition.* Presented at the Conference 2nd international & 6th national confrence on organic and conventional agriculture, 25-26 Aug, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil. [In Farsi]

Nourafcan, H., Sefidkon, F., Mousavi, A., Sharifi, M., & Khalighi, A. (2014). Effects of different medium on some morpho-physiological index of lemon verbena under *in vitro* conditions. *Journal of Herbal Drugs*, 5(3), 143-150.

Nourafkan, H., & Ansari, F. (2017). The effect of MS and B5 media on growth indices of lemon verbena in in vitro condition. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48(1), 249-254. [In Farsi]

Omidi, M., Ydollahi, A., Ahmadi, N., & Beyranvand, F. (2017). Improvement of in vitro micro propagation of *Rosa damascene*. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 47(4), 773-784.

Pierik, R. L. M. (1997). *In Vitro culture of higher plants.* Netherlands, Springer science & business media.

Ruvalcaba-Ruiz, D., Rojas-Bravo D., & Valencia-Botin, A. J. (2010). *In Vitro* propagation of *Coryphantha retusa* (Britton and Rose) an endemic and endangered cactus. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(1), 139-143.

Sagastume Tecnoregion, H. (2006). Propagation in vitro cactus cabeza (*pilocereus maxonii*). Biotecnologia, 23-24.

Sivanesan, I., Song, J. Y., Hwang, S. J., & Jeong, B. R. (2011). Micropropagation of Cotoneaster wilsonii Nakai-a rare endemic ornamental plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(1), 55-63.

Taji, A. M., Dodd, W. A., & Williams, R. R. (1997). *Plant tissue culture practice.* Armidale, Australia: University of New England press.

Talebi, M., Etesam, F., Sayed-Tabatabaei, B., & Khaksar, G. (2012). Direct regeneration of Periwinkle (*Catharanthus roseus*) via node explants culture and different combinations of plant growth regulators. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture Soilless Culture Research Center*, 3(2), 55-65. [In Farsi]

Tripathi, L., & Tripathi, J. N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2), 243-253.

Van Jaarsveld, E. (1999). Indigenous succulent plants for indoors. *Veld Flora*, 85(2), 82-84.