



<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<sup>1\*</sup> , Saba Azimi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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



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

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

عباس سعیدی<sup>۱\*</sup>، صبا عظیمی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده 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 تنظیم کننده های 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 ضد عفونی کشت های جدا شده بود. نتایج ما نشان داد که بیشترین تعداد ساکولنت (۱۰) مربوط به ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP بود. مقایسه میانگین نشان داد که بهترین تیمار برای ریشه زایی (۱/۵ میلی گرم 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 معنی داری بر ریشه زایی، ساقه زنی و مکیدن کاکتوس ها داشت.

**واژه های کلیدی:** گیاه زینتی، هاورتیا لیمیفولیا، ساقه زایی، ریشه زایی، پاجوش



## مقدمه

هاورثیا لیمیفولیا با نام علمی *Haworthiopsis limifolia* گیاهی زینتی، گوشتی، علفی، بوته‌ای و چند ساله از خانواده *Asphodelaceae* که بومی آفریقای جنوبی است. هاورثیا گیاهانی با برگ‌های گوشتی که به شکل گلبزرگ‌های روبروی هم و به صورت چرخشی به سمت بالا قرار دارند. قطر برگ‌ها از ۳ تا ۳۰ سانتی‌متر در گونه‌های مختلف دیده می‌شود. 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).

هاورثیا لیمیفولیا به دلیل کمیابی و ظاهر زیبا و خاص خود و همچنین، دو رنگ بودن، به عنوان یک گیاه زینتی و کلکسیونری استفاده می‌شود. کوچک بودن این گیاه باعث می‌شود که آن را به صورت چندتایی و یا در کنار دیگر پاجوش‌های زینتی در یک گلدان کوچک کشت کرد. علاوه بر این، از سال‌های گذشته هاورثیا لیمیفولیا مانند گیاه آلوئه‌ورا، به صورت گسترده مورد توجه طب سنتی در میان بومیان منطقه بوده است. همچنین، در پژوهش‌های 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 Cooposamy, 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 نرغیمی و دگرگشتی، باعث افزایش تفرق ژنتیکی در نتایج می‌شود. بنابراین، می‌توان با استفاده از کشت بافت درون شیشه‌ای تقاضای بازار را برطرف کرد.

به‌منظور ارزیابی باززایی درون شیشه‌ای 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 میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد و بیشترین طول شاخساره نیز به تیماری با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP مربوط بود. همچنین، بیشترین طول ریشه تحت تأثیر محیط کشت با تیمار دارای ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA دیده شد.

در کشت بافت گلابی خاردار، بهترین محیط کشت برای اندام‌زایی را مقادیر ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌همراه ۲ میلی‌گرم 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 شاخه‌زایی در محیط کشت با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. در مرحله بعدی که ریشه‌زایی بود، بعضی نمونه‌ها ریشه‌دار شد ولی با اضافه شدن مقدار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA، ریشه‌زایی بهبود پیدا کرد (Abrie and Staden, 2001).

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

گل آذین 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 سیٹوکینین (BA, Kinetin, Zeatin) و دفولینات (Thidiazuron) و کازین هیدرولات، شیر 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 ریزادیدای جدا شد (Chen *et al.*, 2019). علاوه بر تنظیم کننده‌های 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 در ارتباط 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 جنبه‌های اقتصادی این صنعت، ایجاد شود. ایران با دارا بودن شرایط آب و هوایی و اقلیم‌های مختلف و فلور غنی، یکی از کشورهای است که منابع گسترده‌ای از انواع گیاهان زینتی را دارد. هدف از این مطالعه، ضد عفونی، تعیین غلظت‌های مناسب هورمون‌ها برای ریشه‌زایی و ساقه‌زایی، ریزادیدای هارورتیا با استفاده از مراحل ساقه‌زایی، ریشه‌زایی و تولید پاجوش‌ها از گیاه است.

است، دسته‌ای از هورمون‌های گیاهی که تقسیم سلولی را تقویت می‌کند) اضافه و پس از جوانه زنی 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 میلی‌گرم بر لیتر BAP برای کالوس‌زایی و ساقه‌زایی استفاده شد. بیشترین تعداد جوانه در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شد (Seol *et al.*, 2008; Efferth *et al.*, 2019). در سال‌های اخیر، کشت بافت پتانسیل وسیعی برای تکثیر سریع گونه‌ها در بیشتر جنس‌های پاجوش شامل این کاکتوس با نام نوتو کاکتوس (*Notocactus scopi*) و پلسیفورا (*Pelecypora*) را ممکن ساخته است (Seol *et al.*, 2008; Kumari *et al.*, 2016; Badalamenti *et al.*, 2016; Jaiswal and Sawhney 2006).

همچنین، ریزادیدای برای کمک به تولید مثل برخی از گونه‌های *Haworthia* خودناسازگار، از طریق القای باززایی از برگ‌ها، گل آذین و دیواره‌های تخمدان استفاده شده است (Majumdar *et al.*, 1970). کارایی یا میزان موفقیت ریزادیدای تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند نوع ریزنمونه، مواد مغذی، تنظیم کننده‌های رشد گیاه و سایر مواد افزودنی، دما و شدت و مدت زمان نور قرار دارد. کالوس *Haworthia* از بخش‌های برگ، بخش‌های

## 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 برگ‌ها تک تک از گیاه جدا شد به صورتی که تنها مریستم گیاه در قسمت مرکزی، باقی ماند. برگ‌ها به همراه مریستم در یک توری قرار داده شدند و یک ساعت زیر آب جاری شستشو داده شدند. سپس، ۲/۵ میلی لیتر توئین ۲۰ (۲۰ درصد) با ۱۰۰ میلی لیتر آب به منظور 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 به ترتیب در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه با هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد تیمار شدند. پس از مرحله ضدعفونی، ریزنمونه‌ها (برگ‌های 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 به تنهایی و همچنین، در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در

لیتر هورمون IBA استفاده شد (جدول ۱). نمونه‌های موردنیاز برای کشت شامل جوانه‌های 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 به دست 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 تیمار محیط کشت کامل و محیط کشت MS ۱/۲ استفاده شد و نمونه‌ها به مدت 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). به منظور ریشه‌زایی، نمونه‌ها از محیط کشت جدا و به محیط جدید منتقل شدند.

### تیمار پاجوش‌دهی

در مرحله پاجوش‌دهی نیز، تیمارهای شامل ۰/۵ میلی گرم 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 پارافیلیم بسته شد تا از آلودگی نمونه‌ها 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 ساقه زایی، ریشه زایی و پاجوش دهی پس از ۴ هفته اندازه گیری و قالب اجرای آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شد. داده‌های به دست آمده در نرم افزار 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 استفاده شده در این مطالعه

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

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

**نتایج****تیمار ضد عفونی**

نتایج تیمار ضد عفونی در جدول ۲ آورده شده است. در تیمار اول نمونه‌ها به مدت 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 نمونه‌ها نیز زنده ماندند. در تیمار دوم تمام نمونه‌ها 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 باتوجه به تیمار قبلی که تمام ریزنمونه‌ها زنده ماندند و رشد کردند، میزان کمتری است. در تیمار چهارم که نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد قرار داده شدند، فقط ۲۰ درصد از نمونه‌ها 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 نمونه‌های 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

باتوجه 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 به دست آمد (شکل ۱ الف، ب). هر چند که غلظت‌های بالای هورمون IBA نیز تعداد برگ را کاهش دادند (شکل ۱). نتایج غلظت هورمون‌های 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 میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و صفر میلی‌گرم 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



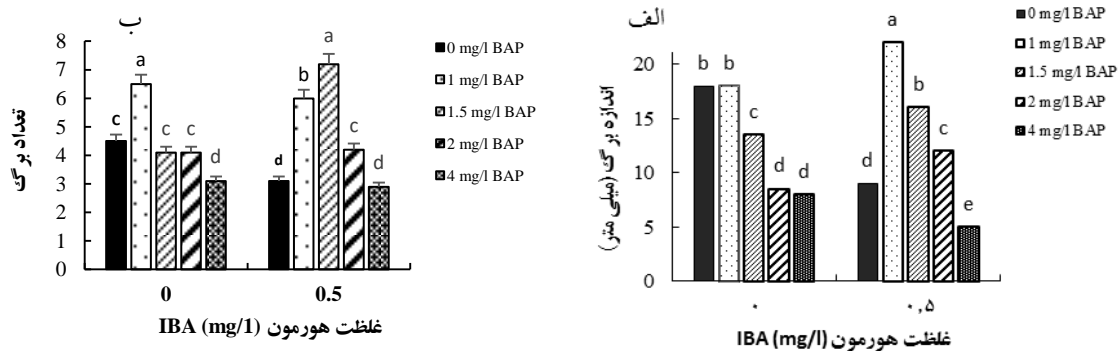
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف هورمون‌های BAP و IBA در مرحله ساقه زایی بر روی برخی صفات

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

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

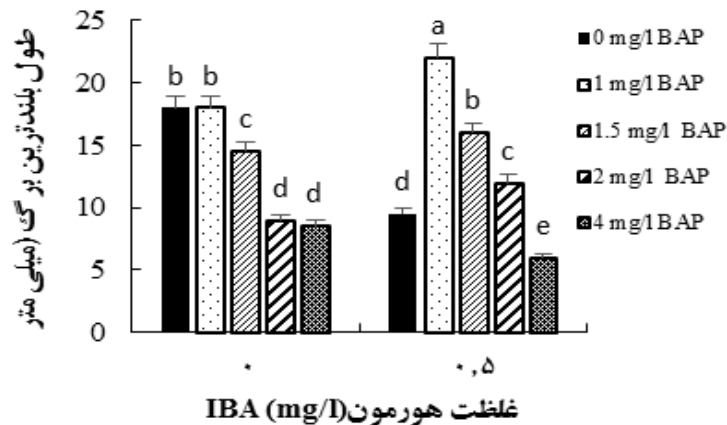
\*و\*\* اختلاف معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ns اختلاف معنی دار نیست.

\*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 معنی داری در سطح یک درصد بر اساس آزمون LSD نیستند.

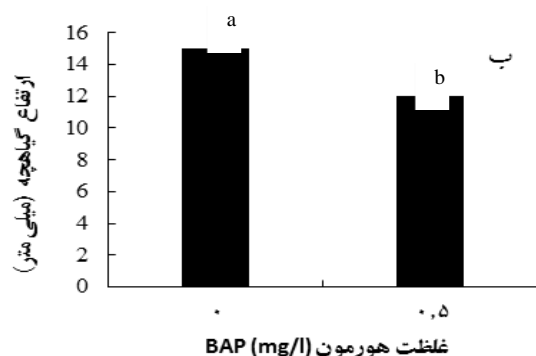
Figure 1- Different treatments of IBA hormones on a) leaf size and b) number of *Haworthia limifolia*. Columns with the same letters are not significantly different at the 1% level based on the LSD test.



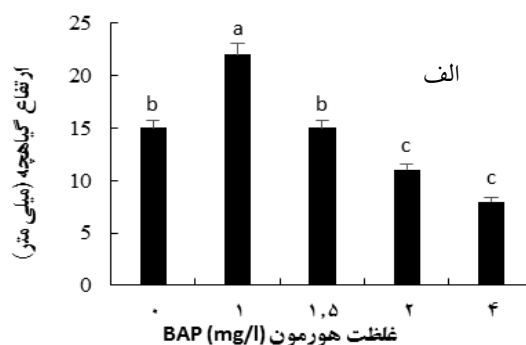
شکل ۲- تیمارهای مختلف هورمون‌های IBA بر طول بلندترین برگ *هاورتیا لیمیفولیا* با غلظت‌های مختلف هورمون. ستون‌های با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری در سطح یک درصد بر اساس آزمون LSD نیستند.

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.

BAP (۴۵/۵ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد) به دست 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).



به طور کلی، افزایش غلظت هورمون BAP موجب کاهش ارتفاع گیاهچه هاورتیا شد. کاربرد هورمون IBA در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر موجب کاهش ۱۷/۸ درصدی ارتفاع گیاهچه شد (شکل ۳ الف). بیشترین ارتفاع گیاهچه در مرحله ساقه زایی در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر هورمون



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف هورمون الف (BAP) و 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.

می شوند. بیشترین طول ریشه در تیمار غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA در محیط کشت کامل (۳۷/۳۳ میلی متر) به دست آمد. به طور کلی، تمامی غلظت‌های 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). بر اساس 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

#### اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر مرحله ریشه‌زایی

باتوجه به جدول تجزیه واریانس مشاهده می شود که تنها تیمار غلظت هورمون IBA و محیط کشت بر تعداد ریشه معنی دار بود و برهم کنش آنها تأثیر معنی‌داری بر تعداد ریشه هاورتیا لیمیفولیا نداشت (جدول ۳). بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت کامل (۲/۴۲) به دست آمد (شکل ۴ الف). نتایج مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف هورمون IBA نشان داد که بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر (۲/۳۳) به دست آمد و افزایش غلظت این هورمون موجب کاهش تعداد ریشه هاورتیا شد (شکل ۴ ب). در گیاهان، اکسین‌ها معمولاً موجب تحریک و افزایش ریشه‌زایی

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). به طور کلی، در محیط کشت، هورمون IBA موجب افزایش طول ریشه شد هر چند در غلظت های بالاتر هورمون این روند کاهشی بود.

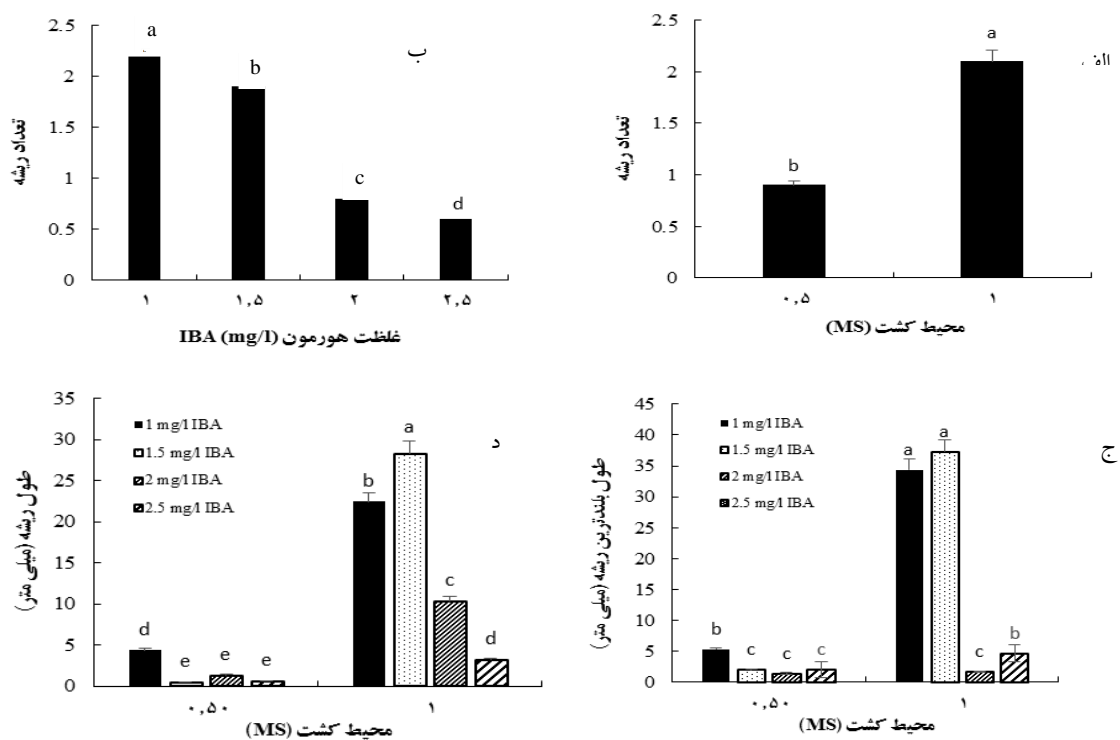
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف هورمون IBA و محیط کشت بر روی برخی صفات در مرحله ریشه زایی

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

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

\*\*و\* اختلاف معنادار در سطح ۵ و ۱ درصد و ns اعداد معنی دار نیست.

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



شکل ۴- اثر غلظت های مختلف هورمون IBA بر اثر محیط کشت و تعداد ریشه و برهم کنش محیط کشت و هورمون IBA بر طول بلندترین ریشه و طول ریشه ها و برتیا لیمیفولیا. ستون های با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری 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 *Haworthia limifolia*. Columns with the same letters are not significantly different at the 1% level based on the LSD test.

لیتر (۸/۶۷ میلی متر) و سپس غلظت ۱ میلی گرم در لیتر (۷ میلی متر) مشاهده شد. اختلاف معنی داری بین سایر تیمارها وجود نداشت (شکل ۵ الف). طول پاجوش‌ها 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 (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 سیتوکینین‌ها با توجه به نوع کشت، سن ریز نمونه و نوع رقم تغییر می‌کند و شروع فعالیت جوانه‌های جانبی، تحریک و تقسیم سلول، تشکیل جوانه‌های جانبی و تکثیر آنها را کنترل می‌کند (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.

بیشترین میزان ریشه‌زایی *هاورتیا (H. attenuata)* (۱۰۰ درصد) و بیشترین تعداد ریشه (۱۲/۹) در محیط MS با ۲.۵ میکرومولار IBA به دست آمد (Kim et al., 2019). عموماً اکسین‌ها از جمله NAA، IBA و IAA که به محیط کشت اضافه می‌شوند ریشه‌زایی را القا می‌کنند (Sivanesan et al., 2011). در مطالعه‌های پیشین برای القای تشکیل ریشه‌های نابجا در گونه‌های *هاورتیا* مانند *H. turgida* (Liu et al., 2017) و *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 معنی دار بود (جدول ۴). بیشترین تعداد پاجوش در تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP (عدد ۴) به دست آمد. بین سایر تیمارها اختلاف معنی داری وجود نداشت. همانند تعداد پاجوش، بیشترین طول پاجوش در تیمار ۱/۵ میلی گرم در

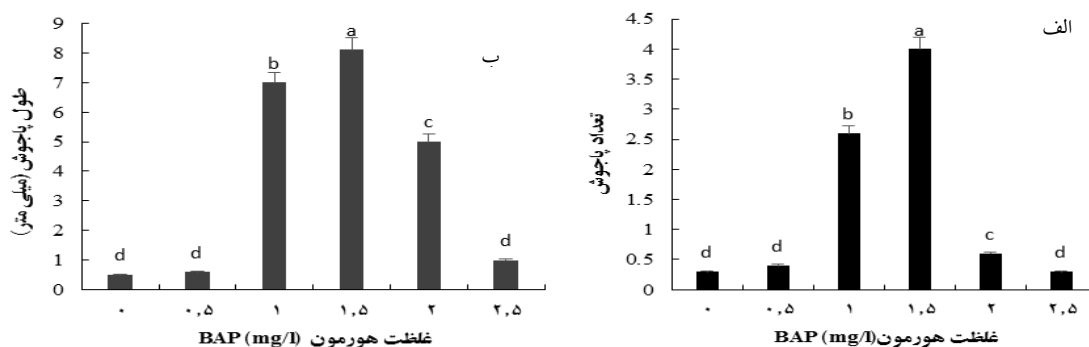
جدول ۴- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر روی برخی صفات در مرحله پاجوش‌دهی

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

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

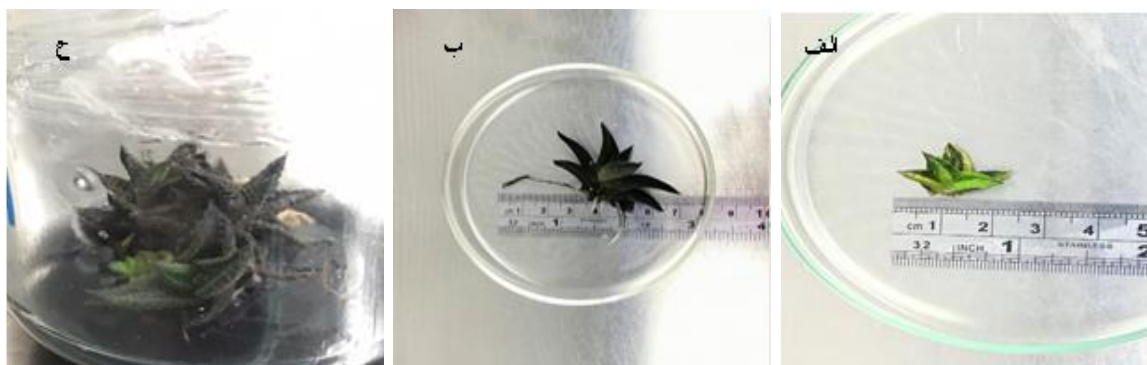
\*\*اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد

\*\*Significant difference at the 1% level.



شکل ۵- اثر غلظت های مختلف هورمون BAP بر تعداد الف) پاجوش و ب) طول پاجوش هاورتیا لیمیفولیا. ستون های با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری 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

باعث بیشترین رشد در طول ساقه ها شد. بیشترین میزان ریشه زایی و بلندترین ریشه ها 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 شاخساره های باززایی شده نشان داد که بیشترین تعداد ریشه و طولی ترین ریشه در محیط MS ۱/۲ به ترتیب با ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA

باتوجه به آزمایش های انجام شده در زمینه ضدعفونی گیاه هاورتیا لیمیفولیا مشخص شد که بهترین نوع ضدعفونی برای این گیاه و کمترین درصد آلودگی ریزنمونه ها (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 میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد. در بلند شدن طول ساقه ها نیز غلظت ۱ میلی گرم در لیتر هورمون BAP به تنهایی

لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر ۴،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 ۱/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست 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 به دست آمده در تیمار با مقادیر ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (به ترتیب ۵ و ۷) و میزان رشد گیاهچه و پاجوش‌های به دست آمده بسیار قابل توجه بود که با توجه به 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 به شدت 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 از جمله 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).

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 حضور سیتوکینین‌ها به مقدار لازم برای باززایی شاخساره‌ها لازم و باززایی هاورتیا‌ها 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 به‌طور کلی، اکسین‌هایی مانند IBA و NAA و ایندول استیک اسید (IAA) زمانی که 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 کالانکوهه (*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* به این نتیجه رسیدند که با استفاده از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بیشترین درصد ریشه زایی و بلندترین ریشه‌ها 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

- 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 growth 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.
- 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 گونه‌های *هاورتیا* مانند *H. turgida* و *H. attenuata* *H. retusa* *turgida* گزارش کرده‌اند (Kim *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2017)؛ باین‌حال، 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 ریشه‌ها 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 Sajeve, 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.

- 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 scopae* 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. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 78: 141-145.