



اثرهای سطح های مختلف بنزیل آدنین بر باززایی و رشد درون شیشه ای ونوس حشره خوار (*Dionaea muscipula* Ellis.

منیژه اسلامی، مهناز کریمی^{*}، حسین مرادی

گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

✉ karimi@sanru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۳۰، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۷/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۲۷

چکیده

ونوس حشره خوار یک گیاه زینتی در حال نابودی است که مطالعه کمی بر ریزافزایی آن انجام شده است. سیتوکینین ها گروهی از هورمون های رشد گیاهی هستند که تقسیم یاخته ای، تمایز یاخته ای، آغاز ساقه دهی و رشد را در بسیاری از گیاهان تحریک می کنند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر غلظت های مختلف بنزیل آدنین بر باززایی و رشد ونوس حشره خوار بود. بدین منظور، آزمایشی به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. گیاهچه های کشت بافتی که به روش کشت اندام گیاهی افزایش یافت انتخاب شده و در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ با غلظت های مختلف بنزیل آدنین (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر) کشت شدند. پس از گذشت ۱۵۵ روز برخی از صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی از جمله تعداد پینه های رویان زا، تعداد برگ، تعداد ریشه، درصد ریشه زایی، درصد باززایی و رنگیزه های فتوسنتزی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده اثر غلظت های مختلف بنزیل آدنین بر درصد ریشه زایی، تعداد ریشه، درصد باززایی و تعداد برگ معنی دار بود. بیشترین درصد ریشه زایی با ۹۹/۹۷٪ در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین و کمترین آن مربوط به غلظت ۰/۳ میلی گرم بر لیتر بود. بیشترین درصد باززایی، تعداد ریشه و تعداد برگ در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین ثبت شد. اثر غلظت های مختلف بنزیل آدنین بر نسبت کلروفیل کل و کارتنوئید در سطح احتمال ۵٪ معنی دار بود. با توجه به نتایج پژوهش حاضر غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین تاثیر معنی داری در مقایسه با دو غلظت ۰/۳ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر بر درصد باززایی، درصد ریشه زایی، تعداد برگ، محتوای کلروفیل و کارتنوئید داشت. اگر هدف از کشت بافت گیاه ونوس حشره خوار تعداد پینه های رویان زا بالا در مدت زمان کم باشد استفاده از غلظت ۰/۳ میلی گرم بر لیتر بهترین نتیجه را خواهد داشت.

واژه های کلیدی: سیتوکینین، کشت بافت، کلروفیل، گیاه زینتی.

مقدمه

گیاهان گوشت خوار در راسته گیاهان نهان دانه قرار دارند. این گیاهان حدود ۸۱۰ گونه از ۲۵۰۰۰۰ گونه گیاه گل دار در دنیا را تشکیل می دهند. بیشتر آنها متعلق به دو راسته *Nepenthes* و *Lamiales* می باشند (Mithöfer, 2022). گیاهان گوشت خوار



مستقیماً پروتئین حیوانی را با استفاده از آنزیم‌هایی که عملکرد آنها مشابه پپسین و سایر پروتئازها است حل می‌کند (Darwin & Darwin, 1888; Ellison & Gotelli, 2009).

ونوس حشره‌خوار^۱ تنها گونه این جنس، یک گیاه نیمه گرمسیری و در حال نابودی است (Horner et al., 2014). این گیاه قادر است مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی مانند فنیل پروپانوئیدها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک را سنتز کند. این ترکیبات فنلی دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی قوی می‌باشند (Devi et al., 2016). ظاهر متمایز و عادت رشد ونوس حشره‌خوار سبب شده که به یک گیاه آپارتمانی محبوب تبدیل شود (Bergman, 2017).

ریزافزایی، یکی از کاربردی‌ترین روش‌های افزایش گیاهان زینتی است. ریزنمونه‌ها معمولاً در محیطی حاوی مواد مغذی تحت شرایط استریل کشت می‌شوند (Wijerathna-Yapa et al., 2023; Mehubub et al., 2022). تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نقش بسیار بارزی در ریزافزایی دارند. در این میان سیتوکینین‌ها به طور گسترده‌ای به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی رشد و نمو شاخه‌ها استفاده می‌شوند و در غلظت‌های بالا موجب تشکیل جوانه، تقسیم یاخته‌ای، رشد و تشکیل کالوس می‌شوند. این ترکیبات نقش مهمی بر عملکرد دستگاه فتوسنتزی نیز دارند (Dobránszki & Mendler-Drienyovszki, 2014). تحقیقات گسترده‌ای بر عملکرد این نوع تنظیم کننده در گیاهان مختلف انجام شده است و نتایج نشان داده است که یکی از مهم‌ترین عوامل برای تکثیر گیاه در شرایط کشت بافتی، نوع و غلظت سیتوکینین است (AL-Bakkar, 2022; García-Ramírez, 2024).

در پژوهشی اثرات نوع محیط کشت، غلظت محیط موراشیگ اسکوگ و انواع سیتوکینین، اکسین و اسیدپته محیط بر تکثیر اندام هوایی و تشکیل ریشه در گیاه ونوس حشره‌خوار مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج به‌دست آمده، بیشترین پراوری نمونه‌ها با استفاده از شاخساره‌های سه ماهه در محیط کشت MS با $\frac{1}{3}$ تا $\frac{2}{3}$ میکرومولار کینتین در اسیدپته ۵/۵ بدست آمد. بهترین شرایط برای ریشه زایی محیط MS با $\frac{1}{3}$ همراه با ۰/۵ میکرومولار ایندول بوتیریک اسید بود. همه شاخه‌های زیر کشت، پس از ۵-۶ هفته کشت، سیستم ریشه‌ای گسترده‌ای تولید کردند (Jang et al., 2003).

محققان آزمایشی بر روی سه گونه گیاه گوشت‌خوار دروزرا^۲ در چند محیط کشت مختلف با ریز نمونه برگ با هورمون بنزیل آدنین^۳ و نفتالین استیک اسید^۴ انجام دادند. در این پژوهش دو محیط MS با $\frac{1}{2}$ و ۵VW با دو هورمون BA و NAA به میزان ۰/۰۵ و ۰/۲ میکرومولار بهترین نتیجه را در باززایی از برگ این گیاه داشتند (Kawiak et al., 2003).

با توجه به اهمیت اکولوژیکی، اقتصادی، زینتی و دارویی گیاه ونوس حشره‌خوار و همچنین در معرض نابودی بودن این گیاه، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر سطوح مختلف بنزیل آدنین بر تسریع در باززایی گیاه ونوس حشره‌خوار با استفاده از ریزنمونه گیاهچه در محیط کشت بافت در مدت زمان کمتر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا شد. ابتدا گیاهان کشت بافتی خریداری شد و برای افزایش اولیه، در محیط



کشت بدون هورمون به مدت چهار هفته افزایش یافتند تا گیاهچه‌های یکسانی به دست آید. سپس گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه، با برگ غیر توسعه یافته و بدون ریشه (اندازه ۰/۳-۰/۲ میلی‌متر) به صورت تصادفی برای آزمایش انتخاب شدند. بدین منظور نمونه‌های افزایش یافته در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی سه سطح بنزیل آدنین (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با ۳٪ ساکارز حجمی/ وزنی و ۰/۸ درصد آگار کشت داده شدند. تمام محیط‌ها قبل از استریل در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، با HCl و NaOH یک نرمال در pH ۵/۸±۰/۲ تنظیم شدند. بعد از استریل و انتقال گیاهچه‌ها در زیر هود لامینار ایرفلو، همه کشت‌ها در دمای ۲۴±۲ درجه سلسیوس زیر نور فلورسنت سفید خنک (۵۶ میکرومول در متر مربع بر ثانیه) با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. سپس به مدت ۲۲ هفته به نمونه‌ها اجازه رشد داده شد (شکل ۱). هر دو هفته نمونه‌ها جابجا شد تا شرایط برای تمام نمونه‌ها یکسان باشد. پس از گذشت ۱۵۵ روز صفاتی چون تعداد پینه‌های رویان‌زا، تعداد برگ، تعداد ریشه، درصد ریشه‌زایی، درصد باززایی (Pirooz et al., 2017)، کلروفیل و کارتنوئید مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱- مراحل مختلف افزایش گیاهچه ونوس حشره خوار در محیط کشت MS (الف) استقرار اولیه گیاهان؛ (ب) شرایط نگهداری گیاه؛ (ج) پاسخ گیاه به رشد و آلودگی و از بین رفتن گیاه (سیاه شدن بافت گیاه و عدم رشد در محیط)؛ (د) بررسی خصوصیات مورفولوژیک.

Fig. 1. Different stages of Venus plant micropropagation on MS medium: (a) Initial plant establishment; (b) Plant maintenance conditions; (c) Plant responses to growth and contamination; (d) Examination of morphological characteristics.

صفات مورد بررسی با شمارش و از طریق رابطه ۱ و ۲ محاسبه شدند.

$$\text{درصد ریشه زایی} = \frac{\text{تعداد ریشه تولید شده در هر نمونه}}{\text{تعداد کل نمونه انتخاب شده}} \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

$$\text{درصد باززایی} = \frac{\text{تعداد نمونه های رشد یافته}}{\text{تعداد کل نمونه های کشت شده}} \times 100 \quad (\text{رابطه ۲})$$

0

برای استخراج رنگدانه، نمونه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶٪ قرار گرفتند. سپس در تاریکی و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. مواد رویی حاوی رنگدانه‌های استخراج شده جمع‌آوری شد و میزان جذب با اسپکتروفتومتر در ۴۷۰، ۶۶۵ و ۶۵۲ نانومتر قرائت شد. مقادیر جذب با استفاده از معادلات ۳ تا ۷ به محتوای کلروفیل a و b ، نسبت کلروفیل a به b ، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها تبدیل شدند (Lichtenthaler, 1987).

$$Chl_a = 16.72 * A_{665} - 9.16 * A_{652} \quad (\text{رابطه ۳})$$

$$Chl_b = 34.09 * A_{652} - 15.28 * A_{665} \quad (\text{رابطه ۴})$$

$$Chl(Total)_{(a+b)} = C_a + C_b \quad (\text{رابطه ۵})$$

$$Chl\ a/b\ Ratio = C_a/C_b \quad (\text{رابطه ۶})$$

$$C_{X+c} = (1000 * A_{470} - 1.63 * C_a - 104.96 * C_b)/221 \quad (\text{رابطه ۷})$$

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین بر درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در سطح احتمال ۱٪ بر درصد باززایی، تعداد برگ و تعداد پینه رویان‌ها در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. بیشترین درصد ریشه‌زایی با ۹۹/۹۷٪ در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین و کمترین آن مربوط به غلظت ۰/۳ میلی گرم بر لیتر بود (جدول ۲). بیشترین درصد باززایی، تعداد ریشه و تعداد برگ به ترتیب با میانگین ۹۴/۷۴٪، ۳ عدد و ۳۳/۳ عدد در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین ثبت شد. بیشترین تعداد پینه رویان‌ها در تیمار ۰/۳ میلی گرم بر لیتر و کمترین آن در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین ثبت شد (شکل ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین بر صفات مورفولوژیکی گیاه ونوس حشره‌خوار .

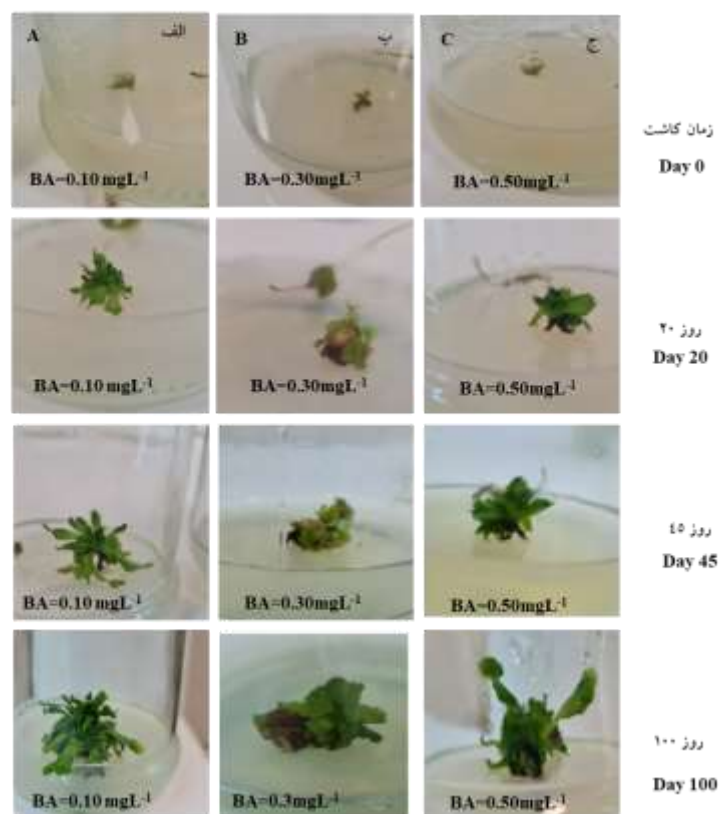
Table 1. Variance analysis of morphological characteristics in Venus flytrap plant under different levels of benzyl adenine.

منبع تغییر	درجه	درصد ریشه زایی	درصد باززایی	تعداد ریشه	تعداد برگ	تعداد پینه رویان
S.O.V	آزادی	%Rooting	Regeneration %	Number of roots	Number of leaves	Number of callosum embryos
df						
بنزیل آدنین	2	55.262	83.23	5.44	87.11	38.11
(BA)						
خطا	6	5.62**	0.46*	0.55**	0.66*	1.33*
(Error)						
ضریب تغییرات		43/68	21/68	47/91	10/80	33/52
(%CV)						

ns و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و ۱٪.

ns, * and ** are non-significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively.





شکل ۲- رشد گیاه ونوس حشره خوار بر روی محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف بنزیل آدنین (الف- BA ۰/۱ میلی گرم بر لیتر، ب- BA ۰/۳ میلی گرم بر لیتر، ج- BA ۰/۵ میلی گرم بر لیتر).

Fig. 2. Growth of Venus plant on MS medium containing different levels of benzyladenine (A- BA 0.1 mgL⁻¹, B- BA 0.3 mgL⁻¹, C- BA 0.5 mgL⁻¹).

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی گیاه ونوس حشره خوار تحت سطوح مختلف بنزیل آدنین.

Table 2. Mean comparisons of morphological traits Venus flytrap plant under different levels of benzyl adenine.

تعداد پینه رویان زا	تعداد برگ	تعداد ریشه	درصد باززایی	درصد ریشه زایی	بنزیل آدنین (میلی گرم در لیتر)
Number of callosum embryos	Number of leaves	Number of roots	Regeneration %	%Rooting	BA (mgL ⁻¹)
0.30c	13.33a	3.00a	94.74a	99.97a	0.1
7.33a	2.66c	0.33b	68.12c	14.80c	0.3
2.66b	6.66b	1.33b	80.54b	48.10b	0.5

در هر ستون اعداد با حروف مشابه تفاوت معنی داری با همدیگر در آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵٪ ندارند

In each column, the numbers with the same letter are not significantly different from each other at the 5% level in Duncan's multiple range test

در پژوهش حاضر اثر غلظت های مختلف بنزیل آدنین بر درصد ریشه زایی، تعداد ریشه، درصد باززایی، تعداد برگ و تعداد پینه رویان زا معنی دار بود. گزارش شده است سایتوکینین ها با کاهش غالبیت انتهایی، در تحریک رشد و بزرگ شدن یاخته مؤثر می باشند. در بیشتر تحقیقات بنزیل آدنین به عنوان مؤثرترین تنظیم کننده رشد سایتوکینینی در پرآوری و افزایش شاخه زایی معرفی شده است (Azizi et al., 2020).



طبق نتایج آزمایش حاضر، با افزایش غلظت بنزیل آدنین از ۰/۱ تا ۰/۵ گرم در لیتر درصد باززایی و ریشه‌زایی، تعداد ریشه و تعداد برگ کاهش یافت. در پژوهشی دیگر روی ریزنمونه ریزوم گیاه ونوس، با افزایش غلظت BA اثرات مضر بر رشد و کاهش کیفیت گیاهچه‌ها گزارش شده است (Parlman *et al.*, 1982). در گیاه گوشت خوار دروزرا دو هورمون BA و NAA به میزان ۰/۰۵ و ۰/۲ میکرومولار بهترین نتیجه را در باززایی از برگ این گیاه داشتند (Kawiak *et al.*, 2003). در پژوهشی ۱۲ گونه گیاهی در شرایط کشت بافت در غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین کشت شدند. در این پژوهش بهترین تیمار برای شاخه‌دهی و رشد، غلظت بین ۰/۱ تا ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA معرفی شد (Norton & Boe, 1982). هم‌راستا با یافته‌های پژوهش حاضر، پژوهشگران بیان داشتند که تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین تأثیر معنی‌داری بر درصد باززایی، درصد ریشه‌زایی، طول گیاهچه، تعداد ریشه و وزن خشک گیاهچه‌های لیلیوم داشت (Sharifi *et al.*, 2017). بنزیل آدنین در غلظت مناسب، در تحریک رشد گیاهچه با تحریک تقسیم‌های یاخته‌ای و همچنین توسعه و رشد یاخته‌ها و نیز کمک در انتقال ترکیب‌های ذخیره‌ای اثر دارد. آنزیم‌های متابولیک سیتوکینین در بازسازی شاخساره شرکت می‌کنند (Viswanath *et al.*, 2023).

جدول ۳- تجزیه واریانس محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاه حشره‌خوار ونوس.

Table 3. Variance analysis of photosynthetic pigments content of Venus flytrap plant.

منبع تغییر	درجه	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	نسبت کلروفیل a/b	کاروتنوئید
S.O.V	آزادی	Chl a	Chl b	Chl Total (a+b)	Chl a/b Ratio	Carotenoids
df						
بنزیل آدنین	2	0.090	0.134	0.446	1.233	0.034
(BA)						
خطا	6	0.015 ^{ns}	0.001*	0.018*	0.124**	0.0013*
(Error)						
ضریب تغییرات	-	19.007	10.35	13.24	18.06	10.01
%CV						

^{ns} و *؛ به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و ۱٪.

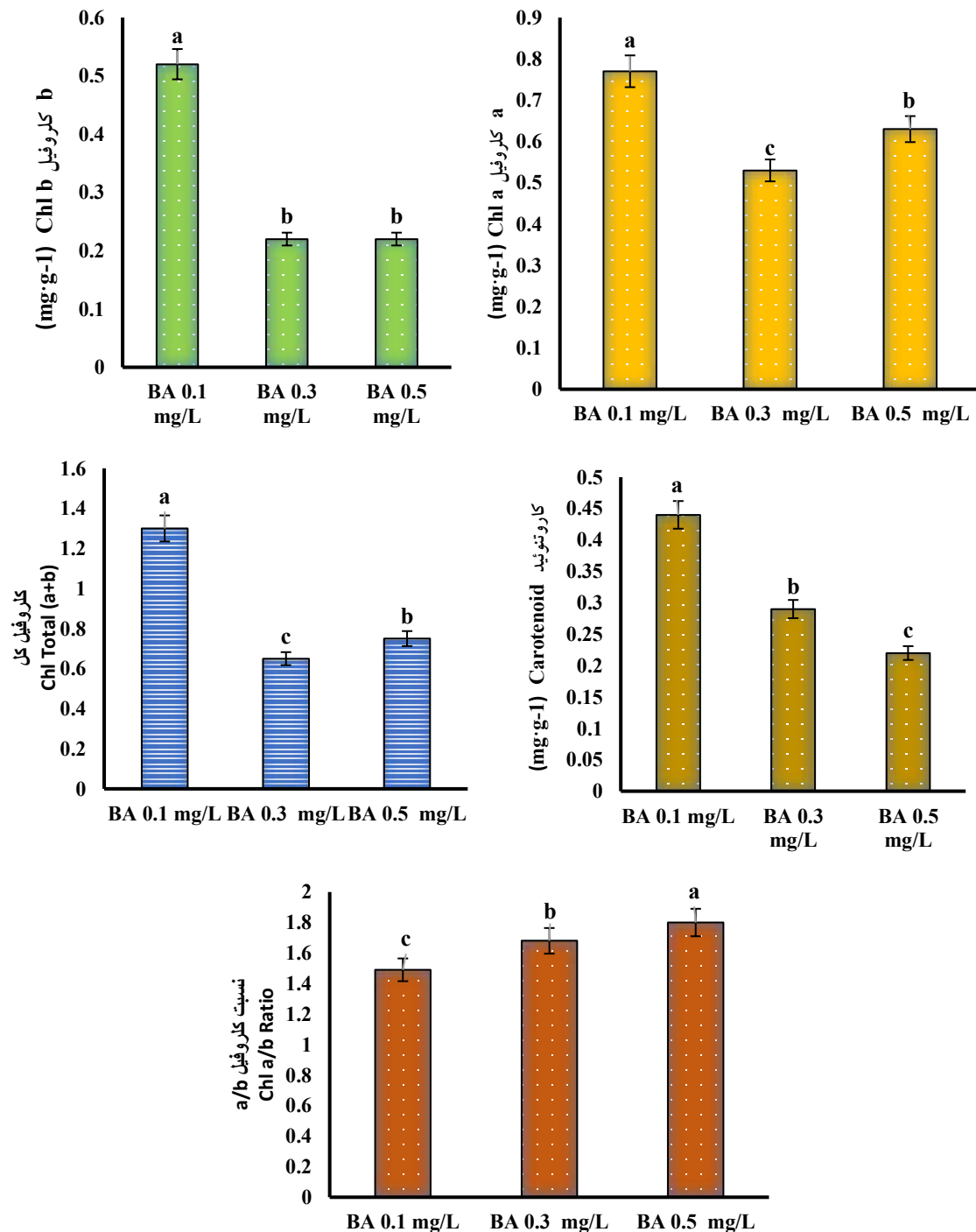
^{ns}, * and ** are non-significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین بر نسبت کلروفیل a/b در سطح احتمال ۱٪ و بر میزان کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. بیشترین میزان کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین ثبت شد. بیشترین نسبت کلروفیل a/b در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بدست آمد (شکل ۳).

در گیاهان مختلف نشان داده شده است که در شرایط آزمایشگاهی نوع و غلظت هورمون گیاهی بر عملکرد و فعالیت فتوسنتزی تأثیر می‌گذارد (Dobránszki & Mendler-Drienyovszki, 2014). سیتوکینین‌ها در حمل و نقل و تجمع ترکیبات فتوسنتزی موثر می‌باشند. هنگامی که سیتوکینین‌ها سنتز می‌شوند، به بافت‌های گیاه منتقل شده و از طریق انتشار و انتقال فعال وارد یاخته می‌شوند و عملکرد کلروپلاست را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Kudo *et al.*, 2010). در راستای این پژوهش، اثرات



مخرب مشابه سیتوکنین‌ها بر فتوسنتز توسط دیگر پژوهش‌ها نیز نشان داده شد که با افزایش غلظت بنزیل آدنین کاهش معنی‌داری در غلظت کلروفیل ایجاد می‌شود (Aremu *et al.*, 2012; Carimi *et al.*, 2003).



شکل ۳- اثر سطوح مختلف بنزیل آدنین بر محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاه حشره‌خوار ونوس در شرایط درون شیشه‌ای. میانگین‌های دارای حروف یکسان از نظر آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 3. Effect of different levels of benzyl adenine on the content of photosynthetic pigments in Venus flytrap plant under *in vitro* culture conditions. Means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at 5% level



در پژوهش حاضر بیشترین محتوای کارتنوئید در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین ثبت شد با افزایش غلظت بنزیل آدنین کاهش در میزان کارتنوئید مشاهده گردید. گزارش شده است که کاهش کارتنوئید ممکن است به تخریب کلروفیل کمک کند، که منجر به کاهش کارایی دستگاه فتوسنتزی می شود. در پژوهشی بر روی گیاهان مختلف خانواده بروملیاسه، در غلظت بالای سیتوکینین کاهش تراکم روزنه اتفاق افتاد و اثرات باقیمانده بنزیل آدنین در محیط کشت، سبب کاهش محتوای رنگدانه ها شد. این پژوهشگران بیان کردند که استفاده از بنزیل آدنین در طول رشد گیاه در شرایط آزمایشگاهی می تواند باعث ایجاد اختلال در عملکرد فتوسنتزی گیاهان شوند (Dewir et al., 2016; Gentile et al., 2017; Martins et al., 2018; Rosa et al., 2018). در پژوهشی روی گیاه ونوس حشره خوار با افزایش غلظت بنزیل آدنین طول برگ و ساقه کاهش یافت (Jang et al., 2003). به طور کلی کاهش محتوای رنگدانه ها نشان دهنده اختلالات در دستگاه فتوسنتزی گیاهان کشت بافتی است که این اختلال بیانگر افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی به علت سیتوکینین خارجی است که در محیط باقی می ماند (Dakah et al., 2014).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج پژوهش حاضر غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین تاثیر معنی داری در مقایسه با دو غلظت ۰/۳ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر بر درصد باززایی، درصد ریشه زایی، تعداد ریشه، تعداد برگ، محتوای کلروفیل و کارتنوئید داشت. اگر هدف از کشت بافت گیاه ونوس حشره خوار تعداد پینه رویان را بالا در مدت زمان کم باشد استفاده از غلظت ۰/۳ میلی گرم بر لیتر توصیه می شود.

منابع

- AL-Bakkar, A. H. A.Q. (2022). Effect of benzyl adenine on the vegetative and root growth of seedlings of *Myrtus communis* L.: A Review. *British Journal of Global Ecology and Sustainable Development*, 7, 19-27.
- Aremu, A. O., Bairu, M. W., Szücs, L., Finnie, J. F., Van Staden, J. (2012). The role of meta-topolins on the photosynthetic pigment profiles and foliar structures of micropropagated 'Williams' bananas. *Journal of Plant Physiology*, 169(15), 1530–1541. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.006>
- Azizi, F., Samiei, L., Moghaddam, M. (2020). Assessment of the effect of plant growth regulators on micropropagation of Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) medicinal plant. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 28(1), 79-90. doi: 10.22092/ijrfpbgr.2020.342212.1362. (In Persian).
- Bergman, C. M. (2017). The Vascular Flora of Lee County, Texas. *Lundellia*, 20(1), 60-114. <https://doi.org/10.25224/1097-993X-20.1.60>
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., Lo Schiavo, F. (2003). Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 216(3), 413–421. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0862-x>
- Darwin, C., Darwin, F. (1888). Insectivorous plants. J. Murray. 378p. <https://doi.org/10.2307/4447054>
- Dakah, A., Zaid, S., Suleiman, M., Abbas, S., Wink, M. (2014). *In vitro* propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(4), 317-323.
- Devi, S.P., Kumaria, S., Rao, S.R. Tandon, P. (2016). Carnivorous plants as a source of potent bioactive compound: Naphthoquinones. *Tropical Plant Biology*, 9, 267–279.



- Dewir, Y. H., Murthy, H. N., Ammar, M. H., Alghamdi, S. S., Al-Suhaibani, N. A., Alsadon, A. A., Paek, K. Y. (2016). *In vitro* rooting of leguminous plants: Difficulties, alternatives, and strategies for improvement. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 57, 311-322.
- Dobránszki, J., Mendler-Drienyovszki, N. (2014). Cytokinin induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of *in vitro* apple leaves. *Journal of Plant Physiology*, 171(16), 1472-1478. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.015>
- Ellison, A. M., Gotelli, N. J. (2009). Energetics and the evolution of carnivorous plants—Darwin's 'most wonderful plants in the world'. *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 19-42. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern179>
- García-Ramírez, Y. (2024). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of bamboo to cytokinin. *Vegetos*, 37(1), 6-15.
- Gentile, A., Frattarelli, A., Nota, P., Condello, E., Caboni, E. (2017). The aromatic cytokinin meta-topolin promotes *in vitro* propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128, 693-703.
- Horner, J. D., Hodcroft, E. B., Hale, A. M., Williams, D. A. (2014). Clonality, genetic variation, and the origin of isolated western populations of the carnivorous plant, *Sarracenia alata* L. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 141(4), 326-337.
- Jang, G. W., Kim, K. S., Park, R. D. (2003). Micropropagation of Venus fly trap by shoot culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(1), 95-98. <https://doi.org/10.1023/A:1021203811457>
- Kawiak, A., Królicka, A., Lojewska, E. (2003). Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75, 175-178.
- Kudo, T., Kiba, T., Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 53-60.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Elsevier.
- Martins, J., Santos, E., Rodrigues, L., Gontijo, A., Falqueto, A. (2018). Effects of 6-benzylaminopurine on photosystemII functionality and leaf anatomy of *in vitro* cultivated *Aechmea blanchetiana*. *Biologia Plantarum*, 62, 793-800.
- Mehbub, H., Akter, A., Akter, M. A., Mandal, M. S. H., Hoque, M. A., Tuleja, M., Mehraj, H. (2022). Tissue culture in ornamentals: cultivation factors, propagation techniques, and its application. *Plants*, 11(23), 3208. <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/23/3208>
- Mithöfer, A. (2022). Carnivorous plants and their biotic interactions. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 333–343. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2038710>
- Norton, M. E., Boe, A. A. (1982). *In vitro* propagation of ornamental rosaceous plants. *HortScience*, 17(2), 190-191. <https://doi.org/10.21273/hortsci.17.2.190>
- Parlman, B. J., Evans, P. T., Rupert, E. A. (1982). Tissue culture of single rhizome explants of *Dionaea muscipula* Ellis, the venus flytrap, for rapid asexual propagation1. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107(2), 305-310. <https://doi.org/10.21273/JASHS.107.2.305>
- Pirooz, M., Amiri, H., Dostii, B. (2017). 'Callus induction and plant regeneration of *Thymus daenensis* Celak, *Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 32(6), 958-967. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109312>. (In Persian).
- Rosa, W. S., Martins, J. P. R., Rodrigues, E. S., de Almeida Rodrigues, L. C., Gontijo, A. B. P. L., Falqueto, A. R. (2018). Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the *in vitro*



- multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133, 339-350.
- Sharifi, A., Keykha, F., Yazdi, M., Bagheri, A. (2017). Effect of cultivar and plant growth regulators on *in vitro* regeneration of *Lilium* Spp. utilizing thin cell layer Explants. *Journal Of Horticultural Science*, 31(3), 555-564. <https://doi.org/10.22067/jhorts4.v31i3.55475>. (In Persian).
- Viswanath, M., Ravindra Kumar, K., Chetanchidambar, N., Mahesh, S. (2023). Regeneration mechanisms in plant tissue culture. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 12, 2948-2952.
- Wijerathna-Yapa, Akila, and Jayeni Hiti-Bandaralage. (2023). Tissue Culture—A Sustainable Approach to Explore Plant Stresses. *Life*, 13(3), 780. <https://doi.org/10.3390/life13030780>





Effects of different levels of benzyl adenine on *in vitro* regeneration and growth of Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis.)

Manijhe Eslami, Mahnaz Karimi*, Hossein Moradi

Department of Horticultural Sciences, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari

✉ karimi@sanru.ac.ir

Received: 2024/05/19, Revised: 2024/10/05, Accepted: 2024/10/18

Abstract

The Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis.) is an endangered ornamental plant that has received limited research on its micropropagation. Cytokinins are a group of plant growth hormones that stimulate cell division, cell differentiation, stem initiation, and reproductive growth in many plants. This study aimed to investigate the effect of different concentrations of benzyl adenine on the regeneration and growth of Venus flytrap. An experiment was conducted as a completely randomized design with 3 replications. Tissue-cultured plantlets that were propagated using the organ culture method were selected and cultured in Murashige and Skoog medium with different concentrations of benzyl adenine (0.1, 0.3, and 0.5 mgL⁻¹). After 155 days, some morphological and biochemistry traits such as the number of callus-derived embryos, number of leaves, number of roots, rooting percentage, regeneration percentage, and photosynthetic pigments were investigated. Based on the results obtained, the effect of different concentrations of benzyladenine on percentage of rooting, number of roots, percentage of regeneration and number of leaves was significant. The highest percentage of rooting with 97.99% was obtained at a concentration of 0.1 mgL⁻¹ benzyladenine. The highest percentage of regeneration, number of roots and number of leaves were recorded at a concentration of 0.1 mgL⁻¹ benzyladenine. The effect of different concentrations of benzyladenine on total chlorophyll and carotenoids was significant at the 5% level of probability. According to the results of the present study, the concentration of 0.1 mgL⁻¹benzyladenine had a significant effect compared to two concentrations of 0.3 and 0.5 mgL⁻¹on the percentage of regeneration, percentage of rooting, number of roots, number of leaves, chlorophyll and carotenoid content. If the aim of tissue culture of Venus flytrap is to produce a high number of embryogenic callus in a short period of time, a concentration of 0.3 mgL⁻¹will give the best results.

Keywords: Cytokinin, Tissue Culture, Chlorophyll, Ornamental plant.