



امکان سنجی باززایی درون شیشه‌ای *Sansevieria trifasciata* 'Laurentii' از راه کشت لایه نازک

یاخته ای

متین کاظم‌زاده بهنمیری^۱، مصطفی خوشحال سرمست^{۲*}، مهدی علیزاده^۱، محمد نقی پاداشت^۲

۱. گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، گرگان

۲. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، ایستگاه تحقیقات گل و گیاهان زینتی لاهیجان، گیلان

✉ mkhsarmast@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۲، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۲

چکیده

سانسوریا به دلیل برگ‌های افراشته، گوشتی و جذاب و به دلیل سازگاری بالا با شرایط درون‌خانه‌ای به میزان گسترده‌ای استفاده می‌شود. به دلیل وجود بافت ناهمسان از نوع فراپوش در این گونه سانسوریا و عدم موفقیت در افزایش آن با قلمه برگ و همچنین پایین بودن بازده استفاده از روش تقسیم بوته، وجود راهکاری که بتواند بازده تولید ارقام مختلف سانسوریا ابلق را افزایش دهد دارای اهمیت می‌باشد. در این مطالعه، روش کشت لایه نازک یاخته ای طولی برای تولید ارقام جهش یافته سانسوریا ارزیابی شد. نتایج نشان داد که گیاهچه‌هایی که از لایه‌های اپیدرمی بخش جهش یافته سانسوریا به صورت مستقیم یا غیر مستقیم باززایی نمودند، به حالت جهش یافته زرد رنگ بوده و هیچ یک مشابه گیاه مادری نشدند. در باززایی غیرمستقیم پس از القاء پینه، شاخساره‌ها به طور غیرمستقیم از روی پینه تشکیل شدند. نمونه‌هایی که در محیط MS دارای هورمون 2,4-D کشت شده بودند دوباره در همان محیط واکشت شدند و بدون نیاز به تنظیم کننده سیتوکینین بعد از ۸۰ روز باززایی شدند. پس از گذشت ۸۰ روز از شروع کشت برخی نمونه‌ها بدون نیاز به IBA ریشه‌دار شدند. بیشترین میانگین تعداد برگ (۵/۵) و گیاهچه (۲/۵) در باززایی غیرمستقیم، در محیط MS حاوی تنظیم کننده رشد 2,4-D به غلظت ۰/۶ میلی گرم در لیتر بود. در این تیمار حدود ۲/۵ گیاهچه بعد از گذشت ۸۰ روز از پینه تولید شد. به طور میانگین ۱/۵ گیاهچه در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D تولید شد. محیط کشت MS حاوی ۱/۲ میلی گرم در لیتر BA منجر به بیشترین باززایی مستقیم شاخساره (۳/۳ عدد) با استفاده از روش کشت لایه نازک یاخته ای شد. چهار ماه پس از کشت فقط ۶۵٪ نمونه‌های باززایی شده، پس از ریشه‌زایی قادر به سازگاری بودند. این پژوهش نشان داد که امکان تولید گیاه بافت ناهمسان مشابه گیاه مادری با استفاده از روش لایه نازک یاخته ای طولی از لایه‌های اپیدرمی خارجی وجود ندارد. به تقریب تمام گیاهان تولید شده به حالت جهش یافته زرد رنگ درآمدند که بسیار متفاوت از گیاهان سبز رنگ معمولی می‌باشند. این موضوع از آن جهت دارای اهمیت است که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تولید رقم‌های جهش یافته زرد رنگ در سانسوریا به شیوه روش کشت لایه نازک یاخته ای انجام نشده است. یافته‌های این پژوهش در آینده می‌تواند اطلاعات ارزشمندی درباره تولید ارقام بافت ناهمسان به روش‌های درون شیشه‌ای را فراهم نماید.

واژه‌های کلیدی: افزایش همگرومی، پایداری ژنتیکی، سانسوریا، شبیه به اصل.



مقدمه

گونه‌های جنس *Sansevieria* spp. به طور طبیعی در آفریقا، شبه‌جزیره عربستان (یمن)، هند، سریلانکا، میانمار و کومور یافت می‌شود. این گیاهان چند ساله، علفی، گلدار و متحمل به خشکی هستند که گاهی در قاعده منشعب می‌شوند و با نیساگ^۱ یا دستک‌های^۲ تشکیل شده روی زمین، گسترش می‌یابند. برگ‌های آن‌ها به‌طور عمده مسطح یا استوانه‌ای شکل، چرمی، آبدار و دارای حالت رشدی بیساگ (طوقه‌ای) هستند (Newton, 2020).

سانسوریا ۵۰ تا ۷۰ گونه یا حتی بیش از ۸۰ گونه را شامل می‌شود که در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان پراکنده هستند. بسیاری از گونه‌های *Sansevieria* برای اهداف زینتی یا در طب سنتی برای درمان آسم، سرفه، فشارخون بالا و غیره استفاده می‌شود (Said et al., 2015; Giovannini & Howes, Thu et al., 2021; Dandan, 2016; Mohana et al., 2008; Takawira-Nyenyanya & Stedje, 2011; Takawira-Nyenyanya et al., 2014) و همچنین اهداف اقتصادی استفاده می‌شود.

از بین گونه‌های مختلف این گیاه، *S. trifasciata* در سراسر جهان به‌عنوان گیاهان زینتی پرورش می‌یابد. ارقام این گیاه در مناطق نیمه‌گرمسیری و گرمسیری در فضای باز به‌عنوان زمین پوشش یا عناصر محوطه‌سازی استفاده می‌شوند. در مناطق خنک‌تر در داخل خانه به‌دلیل ماندگاری بالا، حساسیت کم به آفات و نیاز کم به کود و آب و نیز به‌عنوان گیاه آپارتمانی یا درون‌خانه‌ای برگساره‌ای زینتی استفاده می‌شوند (Nakamura et al., 2006). رقم *Sansevieria trifasciata* 'Laurentii' یا سانسوریا نوار طلایی مانند گونه اصلی خود دارای رشد عمودی است و در حاشیه برگ دارای نوار زرد است. اما این نوار زرد از نظر عرض و موقعیت تا حدودی متغیر است. رقم *Laurentii* توسط Belgian Congo در آفریقا معرفی شده است و با وجود معرفی ارقام دیگر سانسوریا، این رقم هنوز هم به‌عنوان سانسوریای زینتی بازارپسند است (Short et al., 1991).

ریزافزایی، از جمله روش‌های پرورشی در تولید همگروه‌های گیاهان زینتی است. در نخستین گزارش‌های منتشر شده در زمینه ریزافزایی سانسوریا، از 2,4-D برای القاء پینه و سپس از Kinetin برای تولید گیاهچه استفاده شد (Blazich & Nivitzky, 1984). در ارزیابی توانایی قسمت‌های مختلف برگ سانسوریای سبز در شرایط درون شیشه‌ای آشکار شد که کشت ریزنمونه‌های برگ به مدت سه هفته در محیط حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و سپس کشت در محیط دارای ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر Kinetin به بالاترین باززایی شاخساره نابجا به‌ویژه در قسمت نزد پاهنگ گیاه منجر می‌شود. این ریزشاخساره‌های تولید شده با فروبری سریع در تنظیم‌کننده رشد IBA ریشه‌دار و سپس سازگار شدند (Sarmast et al., 2009). در یک گزارش دیگر درباره رشد فزاینده گونه سانسوریای سیلندری، از 2,4-D و IBA استفاده شد که منجر به تشکیل ساختارهای گره مانند روی قلمه‌های برگ و پینه‌ها شد. استفاده از ۵ میکرومولار BA و ۲ میکرومولار NAA منجر به تولید ۱۷ شاخساره در هر نمونه گردید. به‌طور متوسط، محیط کشت نیمه‌جامد دارای ۵ میکرومولار IBA ۳/۵ ریشه در هر نمونه با طول متوسط ۶ سانتی‌متر تولید نمود (Shahzad et al., 2009). در گزارشی دیگر، القاء شاخساره از ریزنمونه برگ رقم *Laurentii* در محیط حاوی یک تا ده میلی‌گرم در لیتر IBA و دمای ۳۷ درجه سلسیوس منجر به تولید گیاهان غیر ابلق گردید (Kaur & Mudgal, 2021). اخیراً نیز بررسی‌های درون‌شیشه‌ای انجام شده روی بساک و تخمدان گل گونه‌های مختلف سانسوریا انجام شد که با وجود گزارش باززایی کامل، شواهد مربوط به تولید گیاهان بافت ناهمسان یا ابلق ارائه نشده است (Sarmast et al., 2023; Catalano et al., 2023).



لایه نازک یاخته ای^۱ (TCL)، به عنوان یک روش برای دستیابی به نوع خاصی از یاخته یا بافت تحت شرایط کنترل شده از نظر نور، دما، تنظیم کننده های رشد، pH، افزودنی های محیط کشت و غیره مورد استفاده قرار می گیرند (Teixeira da Silva & Doranzski, 2014). نظر به استفاده از برش های طولی و عرضی نازک در این روش، امکان کاربرد آن برای ریزافزایی و یا تکثیر لایه های مختلف یاخته ای امکان پذیر خواهد بود. کشت لایه نازک یاخته ای، جزء روش هایی است که امکان تحقیق در زمینه های یاخته شناسی، بافت شناسی، فیزیولوژی، بیوشیمی و تغییرات مولکولی یاخته های گیاه را ممکن می سازد. همچنین، استفاده از سیستم کشت لایه نازک یاخته ای، تولید گل در شرایط درون شیشه ها را قابل انجام می سازد (Teixeira Da Silva & Dobranski, 2019). سیستم لایه نازک یاخته ای شامل ریزنمونه هایی با اندازه کوچک است که از اندام های مختلف گیاه به طور طولی^۲ و یا عرضی^۳ گرفته می شود. ITCL شامل یک نوع بافت (به طور مثال یک لایه نازک از یاخته اپیدرمی) یا گاهی دو نوع بافت (به طور مثال دو لایه اپیدرمی و لایه کلرانشیمی زیر آن) و یا حتی ۴-۶ لایه باشد. اما tTCL، باتوجه به اینکه ریزنمونه به طور عرضی برش داده می شود، شامل یاخته هایی از بافت های مختلف (مانند اپیدرم، کورتکس، کامبیوم و غیره) می باشد (Van, 1980).

ریخت زایی در کشت لایه نازک یاخته ای می تواند توسط نور، غلظت قند یا گلوکز، ترکیب یونی محیط کشت، pH و عوامل دیگر تنظیم شود (Cousson & Tran, 1992). یکی از مزایای کشت لایه نازک یاخته ای، قابلیت تعیین دقیق غلظت مؤثر تنظیم کننده های رشد خارجی برای بررسی فرآیندهای ریخت زایی است (Tran, 1980). از طرف دیگر این روش به تولید، تکثیر و پیشبرد ارقام زینتی خاص و دستکاری های ژنتیکی آنها کمک نموده است و حتی امکان تولید بیشتر متابولیت های ثانویه و مواد دارویی از یک بافت خاص با این روش میسر شده است (Teixeira & Fukai, 2002).

استفاده از لایه نازک یاخته ای طولی از اپیدرم و پارانشیم کورتکس بافت دمگل گل میمون میسر شده است (Teixeira & Fukai, 2002). استفاده از لایه نازک یاخته ای عرضی از ناحیه ساقه در گل داوودی^۴ (Shinoyama et al. 2006) و سوسن (Nhut et al. 2001) به عنوان گیاهان مدل زینتی برای بررسی تمایز یاخته ای و به ویژه برای تولید رویان رویشی از نمونه های سوخیزه^۵ سوسن (Nhut et al. 2001) با موفقیت همراه بوده است. استفاده از روش لایه نازک یاخته ای در برخی دیگر از گیاهان زینتی از بافت های مختلف با موفقیت گزارش شده است (Teixeira da Silva et al. 2014). با توجه به اینکه بافت ناهمسانی موجود در سانسوریا از نوع فراپوش می باشد، افزایش با قلمه برگ در شرایط گلخانه و کشت بافت منجر به تولید گیاهچه هایی با برگ کاملاً سبز می شود (Sarmast et al. 2023). از این رو این گیاه از طریق تقسیم بوته و جداسازی ریزوم تکثیر می شود که فرایندی زمان بر است. در این مقاله تولید گیاهان با برگ زرد از لایه های فراپوش در سانسوریا توسط لایه نازک یاخته ای طولی گزارش می شود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و استقرار اولیه ریزنمونه

در این پژوهش از سانسوریا ابلق رقم 'Sansevieria trifasciata' 'Laurentii' استفاده شد. در فروردین ۱۴۰۱ گیاهان مادری از گلخانه تجاری در مازندران خریداری شدند و به گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. پیش از جابه جایی گیاه از عدم وجود هر گونه بیماری و آفات بر روی گیاه اطمینان حاصل شد. تمامی گیاهان استفاده شده یک اندازه و کاملاً یکنواخت بودند. گیاهان به مدت یک ماه در شرایط گلخانه استاندارد با دمای 26 ± 2 سلسیوس با شدت نوری ۵۰۰ میکرومول در متر مربع در ثانیه (ایجاد شده توسط لامپ فلورسانس سفید) و رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد قرار گرفتند تا از

۳- Transverse thin cell layer

۲- Longitudinal thin cell layer

۱- Thin cell layer (TCL)

۵- Bulbil

۴- *Dendranthema grandiflorum*



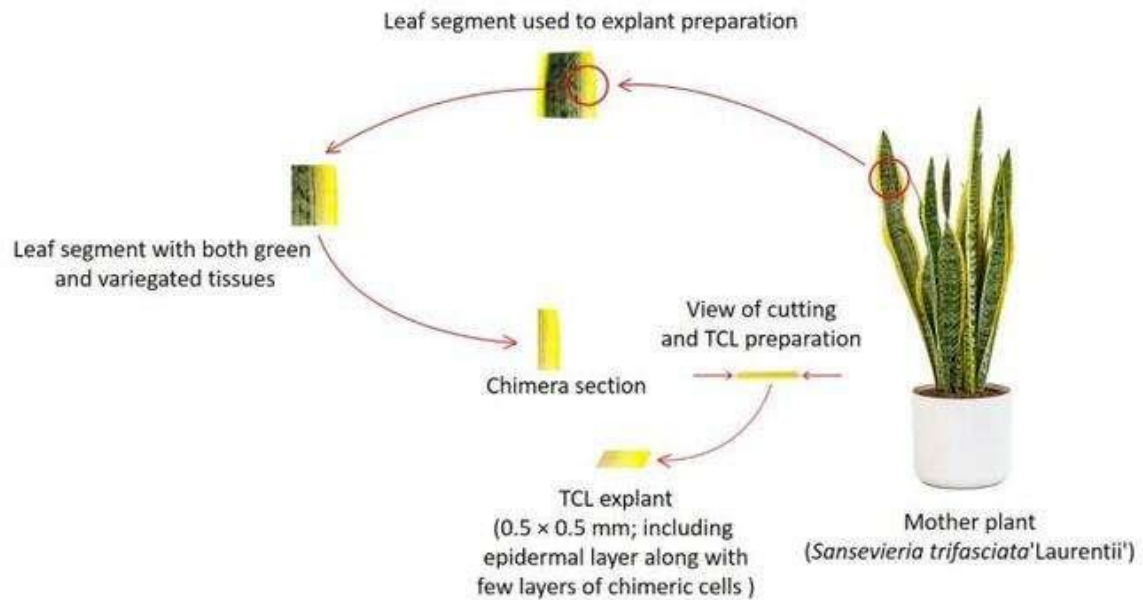
لحاظ فیزیولوژیکی با شرایط گلخانه سازگار شوند. سپس برگ‌های بالغ گیاهان مادری از فاصله ۵ سانتی‌متری سطح خاک جدا شده و به آزمایشگاه منتقل شد. برای گندزدایی، برگ‌ها به طول ۱۰ سانتی‌متر برش داده شدند و سپس در زیر آب جاری شسته و تمیز شدند. این برگ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب (حاوی دو قطره ریکا در نیم لیتر آب) غوطه‌ور و روی شیکر با سرعت ۱۰۰ rpm قرار گرفتند. نمونه‌ها سپس به زیر هود لامینار منتقل شدند. برای گندزدایی سطحی، قطعات برگ به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و سپس با کلراکس ۱۰ درصد (که از هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد تهیه شده بود) به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند (Sarmast et al., 2009). شش بار نمونه‌های برگ با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس نوار زرد رنگ حاشیه برگ به صورت طولی برش داده شد به صورتی که فاقد نواحی دارای کلروفیل سبز باشد. این قطعات با طول یک سانتی‌متر یک هفته در محیط کشت MS فاقد هورمون مستقر شدند. پس از اطمینان از عدم وجود آلودگی در آنها، مجدداً ریز نمونه‌ها از شیشه خارج و با استفاده از اسکالپل، قطعاتی به صورت طولی (۵ میلی‌متر) و قطر تقریبی ۲ میلی‌متر برش داده شدند (شکل ۱). در دو آزمایش مستقل ریز نمونه‌ها در دو محیط کشت حاوی BA (۰/۱، ۰/۶، ۱/۲، ۱/۸ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر) برای باززایی مستقیم و محیط باززایی غیرمستقیم حاوی 2,4-D (۰/۱، ۰/۶، ۱/۲، ۱/۸ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. از آنجایی که ریزنمونه‌ها کوچکترین پاسخی در محیط فاقد هورمون نداشتند تمام تیمارهای مربوط به شاهد در نتایج حذف شدند. نمونه‌های کشت شده در محیط حاوی BA، دو بار در همان محیط کشت با فاصله ۲۷ روز واگشت شدند. ریزنمونه‌های کشت شده در محیط دارای 2,4-D تنها به مدت یک ماه در تماس با این تنظیم کننده رشد بودند. اما در مراحل بعدی (دو واگشت با فاصله ۲۷ روز)، در محیط MS فاقد تنظیم کننده رشد واگشت شدند. pH تمام محیط‌های کشت روی ۵/۸ به کمک HCl و NaOH تنظیم شد. هشت گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر شکر به محیط کشت افزوده شد. کشت‌ها در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس و شدت نور مناسب (۵۰ میکرومول در متر مربع در ثانیه) در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. برای هر تیمار شش تکرار و در هر تکرار چهار ریزنمونه درون هر ظرف کشت قرار داده شد. از میان تمام گیاهان باززایی شده سبز رنگ، تنها نمونه‌های جهش یافته دارای برگ زرد از بافت ریز نمونه اصلی به کمک اسکالپل جدا شدند و ته این ریز شاخساره‌ها به مدت دو ثانیه در محلول ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA قرار گرفتند. نمونه‌های تیمار شده در محیط نیم غلظت MS در کمتر از ۳۰ روز ریشه‌دار شدند. این نمونه‌ها در مرحله سازگاری از داخل ظروف کشت خارج و پس شستشوی آگار اطراف ریشه در آمیخته خاکی کوکوپیت و پرلیت (نسبت برابر) کشت شدند. نمونه‌ها در زیر سیستم میست طی مدت دو ماه سازگار شدند.

داده برداری ۸۰ روز پس از کشت ریز نمونه انجام شد. صفاتی مانند میانگین تعداد و طول شاخساره‌های (برگ) پرآوری شده، وزن‌تر بافت (میانگین هر ریزنمونه)، عرض برگ (پهن‌ترین قسمت برگ مد نظر قرار گرفت) و میانگین تعداد برگ تولید شده در هر ریز نمونه اولیه مورد داده‌برداری قرار گرفت. نظر به اینکه در طی مراحل باززایی، ریشه نیز در برخی از ریز نمونه‌ها القاء شد، صفاتی مانند میانگین طول و تعداد ریشه تشکیل شده در هر ریز نمونه اولیه هم مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. درصد مشابهت گیاهچه‌های باززایی شده با گیاه مادری از طریق مقایسه ظاهری بعد از ۸۰ روز انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش با شش تکرار و چهار ریزنمونه در هر تکرار به‌عنوان واحد آزمایش و در قالب طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. جمع‌آوری داده‌ها ۸۰ روز پس کشت اولیه انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰۲ آنالیز و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.





شکل ۱ - مراحل تهیه ریز نمونه لایه نازک باخته ای طولی از برگ سانسوریا رقم 'Laurenti'.
Figure 1- The preparation of TCL from the leaves of *S. trifasciata* 'Laurentii'.

نتایج و بحث

تولید پینه و باززایی غیرمستقیم از بخش‌های ابلق برگ سانسوریا رقم Laurenti

نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده کشت ریزنمونه‌های لایه نازک اپیدرمی بخش‌های ابلق برگ سانسوریا رقم Laurenti در محیط دارای تنظیم کننده رشد 2,4-D وجود اختلاف معنی‌دار در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده غیر از شباهت گیاهان باززایی شده به نمونه مادری را بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ و ۱٪ نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس برخی از خصوصیات *S. trifasciata* 'Laurentii' باززایی شده در محیط حاوی 2,4-D پس از ۸۰ روز.
Table 1. The analysis of variance on some characteristics of regenerated *S. trifasciata* 'Laurentii' on 2,4-D media after 80 days.

وزن تر Fresh weight (g)	تعداد ریشه Number of roots	تعداد شاخساره در هر ریز نمونه The number of shoots per explant	ارتفاع برگ leaf height (cm)	عرض برگ Shoot width (cm)	طول ریشه Root length	تعداد برگ های باززایی شده The number of proliferated leaves	شباهت بین گیاهان باززایی شده و گیاه مادری Smilarity among the regenerated shoots with corresponding mother plant	درجه آزادی df	منبع تغییرات Sources of variation
0.14**	2.6**	0.038**	2.4**	0.038**	0.8**	15.7**	0 ^{ns}	4	تیمار Treatment
0.005	0.2	0.003	0/02	0.003	0.08	0.4	0	10	خطا Error
۰	17.8	14	12	14.8	13	14	0	-	ضریب تغییرات CV (%)

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

ns و * و **، به ترتیب به معنی عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ است.

در باززایی غیرمستقیم ابتدا بافت پینه القاء می شود و سپس شاخساره ها به طور غیرمستقیم از روی پینه تشکیل می شوند (Collado et al, 2013). پس از گذشت ۸۰ روز از شروع کشت برخی نمونه ها بدون نیاز به IBA ریشه دار شدند. میانگین بیشترین تعداد (۲/۳) و طول ریشه (۱/۲ سانتی متر) تشکیل شده به ترتیب مربوط به محیط کشت حاوی ۲/۴ و ۱/۸ میلی گرم در لیتر 2,4-D بود. بیشترین طول برگ در محیط حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. همچنین بیشترین عرض برگ مشاهده شده نیز در همین تیمار بود (جدول ۲). بیشترین میانگین تعداد گیاهچه (شاخساره) باززایی شده (۲/۵ شاخساره) و برگ (۵/۵) در باززایی غیرمستقیم از روی پینه در محیط MS حاوی ۰/۶ میلی گرم 2,4-D مشاهده شد. در صورتی که محیط حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D نصف همین تعداد گیاهچه را تولید نمود. (شکل ۲ و ۳).

جدول ۲- باززایی غیر مستقیم از لایه نازک یاخته ای برگ سانسوریا در محیط کشت MS دارای 2,4-D

Table 2- Indirect regeneration of *Sansevieria* from thin cell layer culture in MS media supplemented with 2,4-D.

وزن تر بافت (گرم) Fresh weight on day 80(g)	تعداد ریشه Number of roots	طول ریشه (سانتی متر) Root length (cm)	طول برگ Leaf length (cm)	عرض برگ Shoot width (cm)	تیمار 2,4-D (mg/L)
0.53 ^c	0 ^c	0 ^c	1.2 ^a	0.28 ^a	0.1
1.03 ^a	0.33 ^{bc}	0.33 ^b	1.1 ^b	0.106 ^{bc}	0.6
0.6 ^c	0.33 ^{bc}	0 ^c	0.4 ^c	0.16 ^b	1.2
0.53 ^c	1 ^b	1.2 ^a	0.06 ^d	0.033 ^{cd}	1.8
0.83 ^b	2.3 ^a	0.33 ^b	0 ^d	0 ^d	2.4

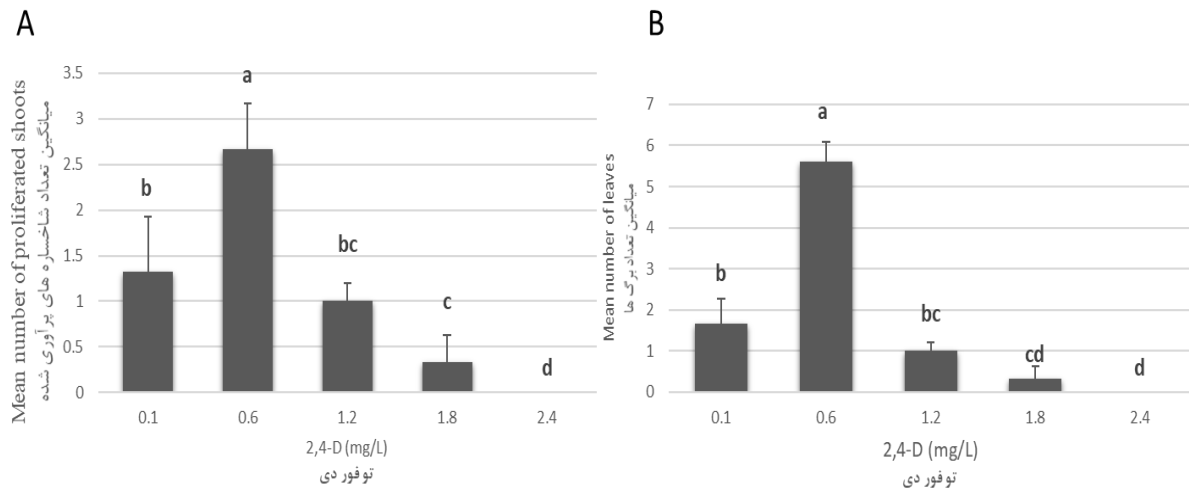
حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن ندارند.

Mean values with the same letter are not significantly different according to the Duncan test ($P \leq 0.05$).

در گزارش های پیشین، اثر القایی تنظیم کننده های رشد اکسینی مانند 2,4-D و IBA در تولید شاخساره گزارش شده است. برای نمونه، نگهداری اولیه ریزنمونه های برگ سانسوریا در محیط حاوی ۰/۳۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و سپس واکشت آنها در محیط حاوی کایتین منجر به تولید حداکثر ۴ شاخساره در هر ریز نمونه گردید (Sarmast et al., 2009). در حالی که اخیرا گزارش شده است که محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی گرم در لیتر IBA می تواند تا ۱۰ شاخساره هم در هر ریزنمونه برگ تولید نماید (Kaur & Mudgal, 2021). پایین تر بودن بازده باززایی گیاه در این گزارش حاضر تا حدی می تواند مربوط به باززایی گیاه از قسمت بافت ناهمسان باشد. زیرا که این بافت از نظر ظاهری دارای مقادیر بسیار اندکی از کلروفیل است که تا حد زیادی بر بازده باززایی تاثیر دارد.

نتایج اولیه بررسی های ما نشان می دهد که امکان تولید گیاه بافت ناهمسان مشابه گیاه مادری با استفاده از روش لایه نازک یاخته ای از لایه های اپیدرمی خارجی وجود ندارد و به تقریب تمام گیاهان تولید شده به حالت جهش یافته زرد رنگ درآمدند که بسیار متفاوت از گیاهان سبز رنگ معمولی می باشد (شکل ۳). این موضوع از آن جهت اهمیت دارد که تا کنون مطالعه ای در زمینه تولید ارقام زینتی با برگ زرد در سانسوریا از طریق روش کشت لایه نازک یاخته ای انجام نشده است.





شکل ۲- نتایج مقایسه میانگین تعداد شاخساره (A) و برگ (B) تشکیل شده از ریز نمونه لایه نازک برگ سانسوریا رقم *Laurentii* در محی ط کشت MS حاوی 2,4-D ۸۰ روز پس از شروع کشت. مقادیر میانگین $\pm$ انحراف معیار (n=3)

Figure 2 - The comparison of the mean number of regenerated shoots and leaves of *S. trifasciata* 'Laurentii' supplemented with 2,4-D, 80 days from the start of the experiment in MS media. Data are mean values $\pm$ SE; n = 3.



شکل ۳- باززایی غیر مستقیم شاخساره از لایه نازک یاخته ای از سانسوریا رقم *Laurentii*. ۸۰ روز پس از شروع کشت ریز نمونه در محیط MS حاوی ۱: ۰/۶ میلی گرم در لیتر، ۲ و ۳: ۰/۱ میلی گرم در لیتر، ۴: ۱/۲ میلی گرم در لیتر و ۵: ۱/۸ میلی گرم در لیتر از 2,4-D قرار داشتند.

Figure 3. Representative of indirect regenerated shoots of *S. trifasciata* cv. *Laurentii* from TCL culture, 80 days after the start of the experiment. Explants exposed to 1: 0.6 mg/l, 2, 3: 0.1 mg/l, 4: 1.2 mg/l, 5: 1.8 mg/l of 2,4-D.

باززایی مستقیم ریزنمونه‌های لایه نازک اپیدرمی سانسوریا رقم Laurentii

نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده کشت ریزنمونه‌های لایه نازک یاخته ای از بخش‌های ابلق برگ سانسوریا رقم Laurentii اختلاف معنی‌دار را در اکثر صفات اندازه‌گیری شده غیر از طول ریشه و شباهت گیاهان باززایی شده نسبت به گیاه مادری بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ و ۱٪ نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمار BA بر باززایی و برخی از خصوصیات *S. trifasciata* 'Laurentii' ۸۰ روز پس از شروع کشت.

Table 3- The analysis of variance on the some characteristics of directly regenerated *S. trifasciata* 'Laurentii' after 80 days in media supplemented with BA.

منبع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	وزن تر (گرم) Fresh weight (g)	تعداد ریشه Number of roots	تعداد شاخساره The number of shoots	طول برگ (cm) Leaf length (cm)	قطر شاخساره (cm) Shoot diameter (cm)	طول ریشه (سانتی متر) Root length (cm)	تعداد برگ باززایی شده The number of proliferated leaves	شباهت میان شاخساره های باززایی شده و گیاه مادری Similarity among the regenerated shoots with corresponding mother plant
تیمار treatment	4	0.7**	2.7**	2.4**	1.05**	0.028*	1.1 ^{ns}	18.2**	0 ^{ns}
خطا Error	10	0.01	0.2	0.2	0.03	0.006	0.6	0.4	0
ضریب تغییرات (CV)	-	0	8	14	16	12	13	16	0

ns, * and ** Non-significant and significant at the 5% and 1% probability levels, respectively.

ns و **، به ترتیب به معنی عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۵٪ و ۱٪ است.

گیاهان باززایی شده از لایه نازک یاخته ای از نظر ظاهری زرد رنگ و فاقد کلروفیل بودند و با برگ‌های سبز گیاهان مادری به‌طور کامل تفاوت نشان دادند. نمونه‌های لایه نازک یاخته ای طولی گرفته شده از قسمت نوار زرد رنگ برگ سانسوریا در محیط کشت حاوی BA بعد از ۸۰ روز قادر به باززایی مستقیم بودند. اهمیت این موضوع مربوط به عدم وجود بافت پینه است که تا حد زیادی از تنوع سوماکلونال طی فرایند باززایی جلوگیری می‌نماید. بیشترین تعداد گیاهچه در باززایی مستقیم، در غلظت ۱/۲ میلی گرم در لیتر از BA مشاهده شد (جدول ۴) که به‌طور میانگین تعداد ۳ گیاهچه جدید از هر ریزنمونه باززایی کرد. همچنین بیشترین تعداد برگ و وزن تر کل بافت در حال باززایی نیز در غلظت ۱/۲ میلی گرم در لیتر از BA مشاهده شد. بیشترین تعداد ریشه در BA ۰/۱ میلی گرم در لیتر بود. بیشتر طول ریشه در غلظت تنظیم‌کننده ۰/۶ میلی گرم در لیتر بود و بیشترین طول و عرض برگ اندازه‌گیری شده نیز در محیط حاوی ۲/۴ میلی گرم در لیتر از BA به دست آمد (جدول ۴).

مطالعات پیشین درصد بالاتری از پرآوری شاخساره را از ریزنمونه‌های برگ گونه‌های دیگر سانسوریا (*Sansevieria cylindrica*) در محیط حاوی BA و NAA گزارش نمودند (Shahzad et al., 2009). حتی اخیراً تولید ارقام ابلق از رقم Laurentii به کمک باززایی از ریزنمونه ریزوم میسر شده است (Kazemzadeh Bahnamirei et al. 2024). بافت ناهمسان به



طور عمده نتیجه جهش ایجاد شده در ژنوم کلروپلاست، میتوکندری و هسته در یاخته های رویشی یا جنسی است. در گیاهان بافت ناهمسان که حاشیه برگ به طور پیوسته فاقد بافت سبز رنگ می باشد به نظر می رسد یاخته های پلاستییدی نوع A در لایه L2 فاقد گرانا و لاملای استرما باشند و کلروپلاست در این لایه به خوبی نمو نیافته است (Zhou *et al.* 2024) در نتیجه درصد پایین تر پرآوری حاصل شده می تواند تا قسمتی مربوط به ضعف ریزنمونه لایه نازک یاخته ای در مقایسه با یک ریز نمونه ضخیم تر سبز باشد. به صورتی که ارتباط میان افزایش پرآوری با ضخامت ریزنمونه برگ سانسوریا گزارش شده است (Sarmast *et al.* 2009). برخی از پژوهشگران، کاهش بیان ژن *FSD2* را عامل کاهش کلروفیل در قسمت های بافت ناهمسان گیاه *Heliopsis helianthoides* معرفی نموده اند (Qin *et al.*, 2024). در این پژوهش استفاده از لایه نازک یاخته ای برای تولید ارقام دارای برگ زرد جهش یافته در سانسوریا با موفقیت همراه بود. این موضوع اهمیت استفاده از یک لایه نازک یاخته ای در باززایی یک بافت خاص را در شرایط درون شیشه ای آشکار می نماید.

جدول ۴- اثر غلظت های مختلف BA بر باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه TCL برگ سانسوریا ۸۰ روز پس از شروع کشت.

Table 4. Effects of different BA concentrations on direct shoot regeneration from Sansevieria leaf TCL after 80 days of culture initiation

تیمار BA (mg/l)	مشابهت با گیاه مادری Smilarity among the regenerated shoots with corresponding mother plant	تعداد شاخساره The number of shoots	تعداد برگ پرآوری شده The number of proliferated leaves	وزن تر (گرم) Fresh weight (g)	تعداد ریشه Number of roots	طول Root length (cm)	طول برگ Leaf length (cm)	عرض برگ Leaf width (cm)
0.1	0 ^a	1 ^c	1 ^c	0.8 ^c	2.33 ^a	0.6 ^{ab}	1.7 ^{bc}	0.17 ^b
۰.۶	0 ^a	1.3 ^{bc}	1.3 ^c	1.06 ^a	1.67 ^{ab}	1.6 ^a	1.4 ^c	0.26 ^a
۱.۲	0 ^a	3.3 ^a	7 ^a	2.1 ^c	1 ^b	1.2 ^{ab}	0.7 ^d	0.08 ^c
۱.۸	0 ^a	1.6 ^{bc}	1.6 ^{bc}	1.53 ^c	0.33 ^c	1 ^{ab}	2 ^{ab}	0.13 ^{bc}
۲.۴	0 ^a	2 ^b	2.6 ^b	1.2 ^b	0 ^d	0 ^b	2.3 ^a	0.32 ^a

حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن ندارند.

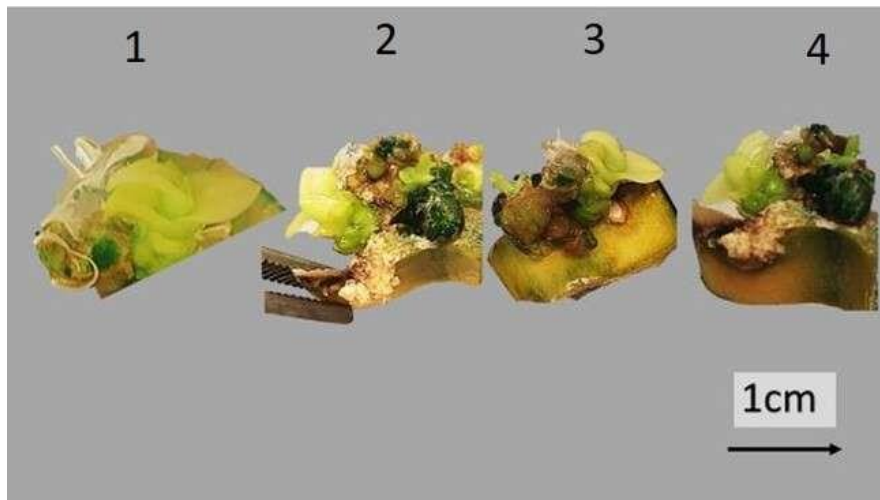
Mean values with the same letter are not significantly different according to the Duncan test ($P \leq 0.05$).

نتایج ریشه زایی بیانگر این است که تمامی ریز شاخساره هایی که با IBA تیمار شده بودند ریشه دار شدند. اما درصد سازگاری نمونه های ریشه دار شده پس از انتقال به آمیخته خاکی حدود ۶۵ درصد ارزیابی شد. در مجموع، سانسوریا پس از انتقال به شرایط گلخانه قابلیت سازگاری بالایی دارد (Kaur & Mudgal, 2021; Sarmast *et al.* 2014).

استفاده از روش لایه نازک یاخته ای در بهبود بازده پرآوری شاخساره موثر است. استفاده از لایه نازک یاخته ای عرضی دمبرگ در *Begonia rex* رقم DS-EYWA در حضور بنزیل آدنین و نیترات نقره به شکل معنی داری باززایی مستقیم را بهبود بخشید (Davoudipahnekolayi *et al.* 2024). در گزارشی دیگر استفاده از لایه نازک یاخته ای عرضی حاصل از *Ferocactus peninsulae* در حضور ۰/۷۵ میلی گرم BA و ۰/۱۵ میلی گرم NAA به شدت میزان پرآوری را افزایش داد (Manokari *et al.* 2024). بنابراین استفاده از روش لایه نازک یاخته ای نه تنها با هدف باززایی یک بافت با ویژگی مورفولوژیکی خاص می تواند مورد استفاده قرار گیرد بلکه در بهبود پرآوری نیز تاثیر گذار است. در این پژوهش استفاده از روش لایه نازک یاخته ای تهیه شده از نوار زرد رنگ حاشیه برگ سانسوریای ابلق به تولید و باززایی گیاهانی با برگ های به نسبت زرد و منحصر به



فرد منجر شد. باززایی غیر مستقیم شاخساره از روی پینه در محیط دارای 2,4-D و یا باززایی مستقیم از روی قلمه برگ در محیط حاوی BA تاثیری در ظاهر گیاهان تولید شده از نظر مورفولوژیک نداشت. نظر به اینکه این گیاهان باززایی شده از مقادیر کلروفیل پایینی برخوردار بودند تا حدی سازگاری آنها با مشکل مواجه شد.



شکل ۴- باززایی مستقیم شاخساره از لایه نازک یاخته ای از سانسوریا رقم Laurentii. ۸۰ روز پس از شروع کشت. ریز نمونه‌ها در معرض ۱: ۱/۸ میلی گرم در لیتر، ۲ و ۳: ۱/۲ میلی گرم در لیتر، ۴: ۲/۴ میلی گرم در لیتر از هورمون BA قرار داشتند.

Figure 4. Representative of direct regenerated shoots of *S. trifasciata* cv. *Laurentii* from TCL culture, 80 days after the start of the experiment. Explants exposed to 1: 1.8 mg/l, 2, 3: 1.2 mg/l, 4: 2.4 mg/l of BA.



شکل ۵- گیاه باززایی شده با برگ های زرد که از لایه نازک یاخته ای طولی برگ سانسوریا رقم 'Laurentii' منشاء گرفته است. ۵ ماه پس از انتقال به گلخانه.

Figure 5- Representative of acclimatized TCL-originated *S. trifasciata* 'Laurentii' plants. 5 months after transferring to the greenhouse.

نتیجه‌گیری

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی تولید گیاه زرد جهش‌یافته سانسوریا از رقم *Laurentii* و به کمک روش لایه نازک یاخته‌ای، نوآوری قابل توجهی در عرصه ژنتیک گیاهی به شمار می‌آید. این گونه با ویژگی‌های ظاهری خاص، قابلیت جذب بازارهای هدف را دارد و می‌تواند به عنوان مدلی ارزشمند در پژوهش‌های آینده در زمینه رنگ‌دانه‌سازی و سازوکارهای فیزیولوژیکی مرتبط با رنگدانه‌ها مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر این، این تحقیق می‌تواند به افزایش تنوع زیبایی‌شناسی در طراحی منظرهای زینتی و طبیعی کمک کند، حتی اگر عمر این گیاهان نسبت به گونه‌های معمولی کوتاه‌تر باشد. در نتیجه، دستاورد حاضر نه تنها به پیشبرد دانش علمی در زمینه گیاهان زینتی کمک می‌کند، بلکه پتانسیل‌های جدیدی برای کاربردهای تجاری در این حوزه را فراهم می‌کند.

منابع

- Blazich, F.A., Novitzky, R.T. (1984). In vitro propagation of *Sansevieria trifasciata*. *HortScience*, 19(1), 122-123. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.1.122>
- Catalano, C., Carra, A., Carimi, F., Motisi, A., Sajeve, M., Butler, A., Lucretti, S., Giorgi, D., Farina, A., Abbate, L. (2023) Somatic embryogenesis and flow cytometric assessment of nuclear genetic stability for *Sansevieria spp.* An approach for in vitro regeneration of ornamental plants. *Horticulturae*, 9: 138. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020138>
- Collado, R., Veitia, N., Bermudez-Caraballosa, I., Garcia, L., Torres, D., Romero, C., Lorenzo, J.R., & Angenon, G. (2013). Efficient in vitro plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. *Scientia Horticulturae*, 153, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.007>.
- Cousson, A., & Tran, T.V.K. (1992). Influence of ionic composition of the culture medium on de novo flower formation in tobacco thin cell layers. *Canadian Journal of Botany*, 71, 506- 511.
- Davoudipahnekolayi, M., Nezamdoost Darestani, D., Mirshahi, H. (2024). Multipurpose Impacts of Silver Nitrate on Direct Organogenesis of *Begonia rex* cv. DS-EYWA via Transverse Thin Cell Layering (tTCL) Technique. *Horticulturae*, 10(9), 986. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10090986>
- Fiscal, R.R., Dandan, K.B.V. (2016). Development and evaluation of paper from Corn husks (*Zea mays* L.) and snake plant fibers (*Sansevieria zeylanica*). *IJSR*, 5, 867–870. <https://doi.org/10.21275/v5i8.3081601>.
- Giovannini, P., Howes, M.J.R. (2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 240-256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.011>.
- Kazemzadeh Bahnamirei, M., Sarmast, MK., Padasht Dahkaei, MN., Alizadeh M. (2024). Evaluation of mother-plant growing beds, explant type, and different disinfection treatments in control of *Sansevieria* rhizome contamination under *in vitro* conditions. *J. Plant Physiol Breed.* 14(2), 23-38.
- Henley, R.W. (1982). *Sansevieria* in Florida—past and present. *Proc Fla State Hortic Soc*, 95, 295–298.
- Kaur, J., Mudgal, G. (2021). An efficient and quick protocol for in vitro multiplication of snake plant, *Sansevieria trifasciata* var. *Laurentii* [Prain]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 147, 405–411 <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02132-0>
- Manokari, M., Faisal, M., Alatar, A.A., Shekhawat, M.P. (2024). Optimization of in vitro regeneration of *Ferocactus peninsulae* (Barrel Cactus) through transverse thin cell layer (tTCL) culture: a strategy for large-scale propagation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 159, 48. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02910-6>
- Mohana, V.R., Rajeshb, A., Athiperumalsamia, T., Sutha, S. (2008). Ethnomedicinal plants of the Tirunelveli District, Tamil Nadu, India. *Ethnobot Leaflet*, 12, 79–95.
- Nakamura, M., Ohzono, M., Iwai, H., Arai, K. (2006). Anthracnose of *Sansevieria trifasciata* caused by *Colletotrichum sansevieriae* sp. nov. *The Journal of General Plant Pathology*, 72, 253–256. DOI 10.1007/s10327-006-0280-1.
- Newton, L.E. (2020). *Sansevieria ruscaceae*. In: Eggli U, Nyfeller R (eds) *Bromeliaceae to xanthorrhoeaceae*, 2nd edn. Illustrated handbook of succulent plants—Monocotyledons, vol 2. Springer, Berlin, pp 271–284.



- Nhut, D.T., Bui, V.L., Teixeira da Silva, J.A., Aswath, C.R. (2001) Thin cell layer culture system in *Lilium*: regeneration and transformation perspectives. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37, 516-523
- Qin, H., Guo, J., Jin, Y. et al. (2024). Integrative analysis of transcriptome and metabolome provides insights into the mechanisms of leaf variegation in *Heliopsis helianthoides*. *BMC Plant Biology*, 24, 731. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05450-5>
- Said, A., Aboutabl, E.A., Melek, F.R., Abdel Jaleel, G.A., R., Raslan, M. (2015). Steroidal saponins and homoisoflavanone from the aerial parts of *Sansevieria cylindrica* Bojer ex Hook. *Phytochemistry Letters*, 12, 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.03.006>.
- Sarmast, M.K., Dolati, M., Abbasabad, M., Seyfi, E., Alizadeh, M. (2023). Appraisal of leaf cutting, soil mixture and leaf explants on production of *Sansevieria trifasciata* under ex/in vitro condition. *Flower and Ornamental Plants*, 7(2), 261-276.
- Sarmast, M.K., Salehi, H., Khosh-Khui, M. (2014). Seismomorphogenesis: a novel approach to acclimatization of tissue culture regenerated plants. *3 Biotech* 4, 599–604. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0191-8>
- Sarmast, M.K., Salehi, M., Salehi, H. (2009). The potential of different parts of *Sansevieria trifasciata* L. leaf for meristemoids production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3), 2506-2509.
- Shahzad, A., Ahmad, N., Rather, M.A., Husain, M.K., Anis M. (2009). Improved shoot regeneration system through leaf derived callus and nodule culture of *Sansevieria cylindrica*. *Biologia Plantarum*, 53, 745-749.
- Shinoyama, H., Anderson, N., Furuta, H., Mochizuki, A., Nomura, Y., Singh, R.P., Datta, S.K., Wang, B.-C., Teixeira da Silva, J.A. (2006) *Chrysanthemum* biotechnology. In: Teixeira da Silva JA (ed.) *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues* (1st edn, Vol II), Global Science Books, London, UK, pp 140-163
- Short, D.E., Osborne L.S., Henley R.W.. (1991-92) Insect and related arthropod management guide for commercial foliage plants in Florida. *Extension Entomology Report*, 53. 13 pp.
- Takawira-Nyanya, R., Stedje, B. (2011). Ethnobotanical studies in the genus *Sansevieria* Thunb. (*Asparagaceae*) in Zimbabwe. *Ethnobotany Research and Applications*, 9, 421–444.
- Takawira-Nyanya, R., Newton, L.E., Wabuyele, E., Stedje, B. (2014). Ethnobotanical uses of *Sansevieria* Thunb (*Asparagaceae*) in coast province of Kenya. *Ethnobotany Research and Applications*, 12, 51–69.
- Teixeira da Silva, J.A., Dobra'nszki, J. (2014). Dissecting the concept of the Thin Cell Layer: theoretical basis. *Journal of Plant Growth Regulators*. 33, 881-895. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9437-x>.
- Teixeira da Silva, J.A., & Dobra'nszki, J. 2019. Recent advances and novelties in the thin cell layer-based plant biotechnology – a mini-review. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 100, 89-96
- Teixeira, D.S.J.A. Fukai, S. (2002). Increasing transient and subsequent stable transgene expression in chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitamura) following optimization of particle bombardment and Agroinfection parameters. *Plant Biotechnology*, 19, 229-240.
- Thu, Z.M., Oo, S.M., Nwe, T.M., Aung, H.T., Armijos, C., Hussain, F.H.S., Vidari, G. (2021). Structures and bioactivities of steroidal saponins isolated from the genera *Dracaena* and *Sansevieria*. *Molecules*, 26(7), 1916. <https://doi.org/10.3390/molecules26071916>.
- Van, K.T.T. (1980). Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers [Plants, de novo buds, roots]. *International Review of Cytology*, 32, 291-311.
- Zhou, S., Ma, K., Mower, J.P., Liu, Y., Zhou, R. (2024). Leaf variegation caused by plastome structural variation: an example from *Dianella tasmanica*. *Horticulture Research*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae009>





Feasibility of *in vitro* generation of *Sansevieria trifasciata* 'Laurentii' plantlets through a thin cell layer

Matin Kazemzadeh Bahnamirei¹, Mostafa Khoshhal Sarmast¹, Mahdi Alizadeh¹, Mohammad Naghi Padasht Dahkaci²

¹Department of Horticultural Sciences and Landscape Engineering, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

²Horticulture Crops Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Lahijan

Corresponding author: mkhsarmast@gau.ac.ir

Abstract

The *Sansevieria* plant is widely valued for its upright, fleshy, and attractive leaves, as well as its high adaptability to home conditions. Due to the presence of preclinal chimera tissue in this species and the challenges associated with its propagation *via* leaf cuttings, finding an effective method to enhance the production of various variegated *Sansevieria* cultivars is essential. In this study, we examined the longitudinal thin cell layer technique for producing mutated *Sansevieria*. Our results indicated that plantlets regenerated directly or indirectly from the epidermal layers of the chimeric *Sansevieria* were, contrary to expectations that they would resemble the mother plant, yellowish mutants, with none resembling the mother plant. In indirect regeneration, shoots were formed from the callus after callus induction. Samples grown in 2,4-D medium were subsequently subcultured in the same medium and showed regeneration without the need for a cytokinin after 80 days. After 80 days of culturing, some samples rooted without requiring IBA. The highest average number of leaves and plantlets in indirect regeneration occurred in the MS medium containing 0.6 mg L⁻¹ of 2,4-D, where approximately 2.5 plantlets were produced after 80 days from the callus. In contrast, the 2,4-D concentration of 0.1 mg L⁻¹ produced about 1.5 plantlets. The MS medium containing 1.2 mg L⁻¹ of BA led to the highest direct shoot regeneration (3.3) using the thin cell layer culture technique. Only 65% of the regenerated samples were able to acclimatize after rooting four months later. Our investigation indicates that producing a preclinal chimera plant resembling the mother plant using the longitudinal thin cell layer culture technique from the outer epidermal layers is not feasible; nearly all produced plants turned out to be yellowish mutants, significantly different from the typical green plants. This finding is noteworthy as no previous studies have investigated the production of variegated ornamental cultivars through thin cell layer culture methods. The results of this research could provide valuable insights for the future production of variegated plant varieties *via in vitro* culture.

Keywords: Clonal propagation, TCL, *Sansevieria*, Genetic stability