Vol. 7, No. 1, Spring & Summer, 2026, p.1-16

*Plant Production and Genetics*

https://doi.org/10.22034/PLANT.2026.145471.1194

# Optimization of callusogenesis and rooting of two valerian (*Valeriana officinalis* L.) ecotypes using different concentrations of BAP and IBA

**Somayeh Najafi[1], Alireza Motallebiazar[1], Samaneh Kazemiani Najafabadi[3], Mina Amani[1*], Mostafa Valizadeh[1]**

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Department of Horticultural Sciences and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Scientific and Research Industrial Town of Isfahan University of Technology, Mobtakeran Shimi Espadan Company.Isfahan, Iran

*Corresponding Author Email: minaamani@tabrizu.ac.ir

## Abstract

**Introduction:** Valerian (*Valeriana officinalis* L.) holds significant importance due to its medicinal properties, especially in traditional medicine. The increasing demand for it necessitates efficient propagation methods. Plant tissue culture, using growth regulators like BAP and IBA, can be an effective solution. This research, by examining the effects of different concentrations of these hormones on two ecotypes of valerian, aims to find optimal conditions for mass production of callus and roots, and ultimately, for the medicinal compounds of this plant.

**Materials and Methods:** In this study, the effect of different concentrations of BAP (1 and 2 mg/L) in combination with IBA (0, 0.5, and 1 mg/L) on callus formation and root production using leaf and petiole explants of in vitro seedlings from two ecotypes (Shiraz and Mashhad) was investigated in a factorial experiment under a completely randomized design with three replications. Seeds of the two valerian ecotypes, Shiraz and Mashhad, were used to produce in vitro seedlings and to evaluate callus and root production under tissue culture conditions. Various traits, including callus formation percentage, rooting percentage, callus diameter, number of roots, percentage of roots larger than 2 cm, callus and root fresh weight, and total fresh weight (including root and callus weight) were measured to assess root and callus production in leaf and petiole explants from the two valerian ecotypes of Shiraz and Mashhad. Finally, statistical analysis was performed, and after the treatments became significant, mean comparison of the data was done using Duncan's test at a 5% probability level. MSTAT-C and SPSS Ver. 18 software were used for statistical analysis, and Excel software was used for drawing graphs.

**Results:** The results showed that for callus and root induction, the presence of exogenous auxin is essential, as callus and root formation were only observed in culture media containing IBA. With an increase in BAP concentration to 2 mg/L, the callus formation percentage increased by 54.16% in the Mashhad ecotype. In leaf explants, adding IBA to the culture medium led to an increase in callus formation percentage to 87.60%. The effect of different IBA concentrations on rooting percentage was significant, with the maximum rooting percentage achieved at concentrations of 0.5 mg/L (77.77%) and 1 mg/L (80.35%) of IBA. In the Shiraz ecotype compared to Mashhad, and in leaf explants compared to petioles, a greater number of roots were produced. The maximum number of roots (8.21), irrespective of IBA concentration, was obtained in culture media containing 2 mg/L BAP. Callus formation percentage was maximal in the Shiraz ecotype across all treatment combinations and in the Mashhad ecotype, except for leaf explants cultured in a medium containing 1 mg/L BAP combined with 0.5 mg/L IBA.

**Conclusion:** The results showed that the percentage of callus formation and rooting in the two ecotypes of Shiraz and Mashhad were different and depended on the type of hormonal combination applied. In general, the Shiraz ecotype performed better than Mashhad. In addition, petiole explants performed better in increasing the percentage of callus formation and callus diameter. Given that the leaf explant produced a higher percentage of roots with the desired length, this type of explant is recommended. The results showed that the amounts of endogenous hormones were different between ecotypes and explants, and the hormonal requirements at different stages of callus and root maintenance differed from the stages of callus and root induction from explants.

**Keywords:** Callus formation, Micropropagation, Plant Growth Regulators, Rooting

**Received**: 17-02-2026 **Accepted**: 18-05-2026

Citation: Najafi, S., Motallebiazar, A., Kazemiani Najafabadi, S., Amani, M., & Valizadeh, M. (2026). Optimization of callusogenesis and rooting of two valerian (*Valeriana officinalis* L.) ecotypes using different concentrations of BAP and IBA. *Plant Production and Genetics*, *7*(1), 1-16. https://doi.org/10.22034/PLANT.2026.145471.1194

Copyrights:
Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

جلد ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۵، صفحات ۱۶-۱

# تولید و ژنتیک گیاهی

https://doi.org/10.22034/PLANT.2026.145471.1194

# بهینه‌سازی کالوس‌زایی و ریشه‌زایی دو اکوتیپ سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) با استفاده از غلظت‌های مختلف BAP و IBA

**سمیه نجفی[۱]، علیرضا مطلبی آذر[۲]، سمانه کاظمیانی نجف‌آبادی[۳]، مینا امانی[۲*]، مصطفی ولی‌زاده[۱]**

۱. گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲. گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳. شهرک صنعتی علمی تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان، شرکت مبتکران شیمی اسپادان.اصفهان، ایران

*ایمیل نویسنده مسئول: minaamani@tabrizu.ac.ir

## چکیده

**مقدمه**: سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) به‌دلیل خواص دارویی، به‌ویژه در طب سنتی، اهمیت زیادی دارد و افزایش تقاضا برای آن، نیاز به روش‌های تکثیر کارآمد را ضروری ساخته است. کشت بافت گیاهی با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مانند BAP و IBA می‌تواند راهکاری مؤثر باشد. این تحقیق با بررسی اثر غلظت‌های مختلف این هورمون‌ها بر روی دو اکوتیپ سنبل‌الطیب، به دنبال یافتن شرایط بهینه برای تولید انبوه کالوس و ریشه، و در نهایت ترکیبات دارویی این گیاه است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، تأثیر غلظت‌های مختلف BAP (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با IBA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بر روی کالوس‌زایی و تولید ریشه با استفاده از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاهچه‌های درون شیشه‌ای دو اکوتیپ (شیراز و مشهد) به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی شد. بذرهای دو اکوتیپ سنبل‌الطیب، شامل اکوتیپ‌های شیراز و مشهد، برای تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای و ارزیابی تولید کالوس و ریشه در شرایط کشت بافت به کار گرفته شد. در این پژوهش، صفات مختلفی شامل درصد کالوس‌زایی، درصد ریشه‌زایی، قطر کالوس، تعداد ریشه، درصد ریشه‌های بزرگتر از دو سانتی‌متر، وزن کالوس و ریشه و وزن تر کل (شامل وزن ریشه و کالوس) برای ارزیابی تولید ریشه و کالوس در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ از دو اکوتیپ سنبل‌الطیب شیراز و مشهد اندازه‌گیری شدند. درنهایت تجزیه و تحلیل آماری انجام و بعد از معنی‌دار شدن تیمارها، مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های آماری از نرم افزارهای MSTAT-C و SPSS Ver. 18 و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد که برای کالوس‌زایی و ریشه‌زایی، وجود اکسین خارجی ضروری است، زیرا تنها در محیط‌های کشت حاویIBA، تشکیل کالوس و ریشه مشاهده شد. با افزایش غلظت BAP به میزان دو میلی‌گرم در لیتر، درصد کالوس‌زایی به میزان ۵۴/۱۶ درصد در اکوتیپ مشهد افزایش یافت. در ریزنمونه‌های برگ، افزودن IBA به محیط کشت منجر به افزایش درصد کالوس‌زایی به ۸۷/۶۰ درصد گردید. تأثیر غلظت‌های مختلف IBA بر درصد ریشه‌زایی معنی‌دار بود و حداکثر درصد ریشه‌زایی در غلظت‌های ۰/۵ (۷۷/۷۷ درصد) و یک (۸۰/۳۵ درصد) میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. در اکوتیپ شیراز نسبت به مشهد و در ریزنمونه‌های برگ نسبت به دمبرگ، تعداد ریشه بیشتری تولید شد. حداکثر تعداد ریشه (۸/۲۱) بدون درنظر گرفتن غلظت IBA در محیط‌های کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. درصد کالوس‌زایی در اکوتیپ شیراز در تمامی ترکیبات تیماری و در اکوتیپ مشهد بجز ریزنمونه برگ کشت شده در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، حداکثر بود.

**نتیجه‌گیری**: نتایج نشان داد که درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در دو اکوتیپ شیراز و مشهد با هم متفاوت و وابسته به‌نوع ترکیب هورمونی اعمال شده بود. به‌طورکلی، اکوتیپ شیراز عملکرد بهتری نسبت به مشهد داشت. علاوه بر این، ریزنمونه دمبرگ برای افزایش درصد کالوس‌زایی و قطر کالوس، عملکرد بیشتری داشت. نتایج نشان داد که مقادیر هورمون‌های درونی بین اکوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها متفاوت بوده و نیازهای هورمونی در مراحل مختلف نگهداری کالوس و ریشه با مراحل القای کالوس و ریشه از ریزنمونه‌ها تفاوت دارد. با توجه به اینکه ریزنمونه برگ درصد بیشتری ریشه با طول مورد نظر تولید نمود، این نوع ریزنمونه توصیه می‌شود.

**کلید واژگان**: تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزازدیادی، ریشه‌زایی، کالوس‌زایی

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۴/۱۱/۲۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۵/۰۲/۰۶

**منبع:** نجفی، س.، مطلبی آذر، ع.، کاظمیانی نجف‌آبادی، س.، امانی، م.، و ولی‌زاده، م. (۱۴۰۵). بهینه‌سازی کالوس‌زایی و ریشه‌زایی دو اکوتیپ سنبل‌الطیب (Valeriana officinalis L.) با استفاده از غلظت‌های مختلف BAP و IBA. *مجله تولید و ژنتیک گیاهی*، ۷ (۱)، ۱۶-۱. https://doi.org/10.22034/PLANT.2026.145471.1194

CC BY

**مقدمه**

سنبل‌الطیب یکی از گیاهان دارویی شناخته‌شده و با اهمیت در طب سنتی و مدرن است که به‌دلیل خواص درمانی، به‌ویژه در کاهش اضطراب، بهبود خواب و تسکین علائم اختلالات عصبی، به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیبات فعال زیستی موجود در سنبل‌الطیب، شامل اسید والرنیک، والرات و سایر ترکیبات فنولی، نه‌تنها به‌عنوان آرام‌بخش‌های طبیعی شناخته می‌شوند، بلکه در بهبود کیفیت خواب و کاهش استرس نیز مؤثر هستند. باتوجه به افزایش تقاضا برای محصولات دارویی طبیعی و گیاهی، شناخت و توسعه روش‌های مؤثر برای کشت و تکثیر این گیاه به‌ویژه در شرایط کنترل شده، امری ضروری است. تحقیقات بر روی تکثیر گیاه دارویی سنبل‌الطیب به‌دلیل محدودیت‌های روش‌های سنتی و افزایش تقاضا برای ترکیبات مؤثره آن، حائز اهمیت است. این مطالعه بر بهینه‌سازی پروتکل‌های کشت بافت سنبل‌الطیب با تمرکز بر القای کالوس از طریق تنظیم‌کننده‌های سیتوکینین مانند (بنزیل آمینوپورین) و توسعه سیستم ریشه‌زایی با استفاده از اکسین‌ها (مانند اسید ایندول-۳-بوتیریک) متمرکز است (Zamini *et al.*, 2016).

کشت بافت گیاهی به‌عنوان یک تکنیک نوین و پیشرفته، امکان تولید انبوه گیاهان با ویژگی‌های ژنتیکی یکسان و کیفیت بالا را فراهم آورده است. این روش به‌ویژه در مورد گیاهانی مانند سنبل‌الطیب که تولیدمثل جنسی و غیرجنسی آن‌ها ممکن است به زمان و شرایط خاصی نیاز داشته باشد، می‌تواند به‌عنوان یک روش سریع و کارآمد به کار رود. در این راستا، استفاده از ریزنمونه‌های گیاهی تحت شرایط کنترل‌شده، برای تولید کالوس و ریشه، از اهمیت بالایی برخوردار است (Mathur *et al.*, 1988; Vennapusa *et al.*, 2015; Nazir *et al.*, 2022; Prakash *et al.*, 2023).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، به‌ویژه سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها، نقش کلیدی در فرآیندهای کشت بافت ایفا می‌کنند. دو مورد از مهم‌ترین این تنظیم‌کننده‌ها، BAP (بنزیل آمینوپورین) و IBA (اسید ایندول-۳-بوتیریک) تأثیرات قابل توجهی بر روی فرآیندهای کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در گیاهان دارند (Galavi *et al.*, 2013; Márquez *et al.*, 2016).

BAP به‌عنوان یک سیتوکینین مصنوعی، به‌طور عمده در تحریک تقسیم سلولی و تولید جوانه‌های جانبی مؤثر است. این هورمون با تسهیل تقسیم سلولی، به‌ویژه در ریزنمونه‌های کشت‌شده، به افزایش درصد کالوس‌زایی کمک می‌کند. BAP همچنین می‌تواند به تحریک رشد اندام‌های هوایی و جوانه‌زنی در گیاهان کمک کند. تحقیقات نشان داده‌اند که غلظت‌های مختلف BAP می‌توانند تأثیرات متفاوتی بر روی جوانه‌زنی و کالوس‌زایی داشته باشند. BAP همچنین می‌تواند در تحریک تشکیل کالوس به‌کار رود. در این زمینه، BAP می‌تواند در ترکیب با اکسین‌ها، مانند IBA، به افزایش درصد کالوس‌زایی کمک کند و به تولید کالوس‌های با کیفیت بالا منجر شود (Galavi *et al.*, 2013; Márquez *et al.*, 2016).

IBA یک اکسین طبیعی است و گاهی اوقات استفاده از ترکیبات طبیعی در کشت بافت نتایج مطلوب‌تری از نظر فیزیولوژیکی و کاهش اثرات سمی احتمالی برای گیاه ایجاد می‌کند. در برخی پروتکل‌های کشت بافت، هدف نهایی تولید اندام‌های رویشی (مانند ریشه‌ها) پس از مرحله کالوس‌زایی است. در این حالت، استفاده از IBA به‌عنوان پیش‌ماده یا در مراحل بعدی کشت، برای تحریک ریشه‌زایی بسیار کارآمدتر است. اکسین‌ها به‌ویژه IBA، مسئول رشد و توسعه ریشه‌ها هستند و می‌توانند به‌طور قابل توجهی به بهبود درصد ریشه‌زایی در گیاهان کمک کنند. IBA به تحریک تقسیم سلولی و تمایز سلولی در نواحی ریشه کمک کرده و می‌تواند به افزایش تعداد ریشه‌های تولید شده در گیاهان کمک کند. در واقع، IBA به ایجاد ساختارهای ریشه‌ای قوی و سالم کمک می‌کند و می‌تواند در ترکیب با BAP به‌عنوان یک راهکار مؤثر برای افزایش درصد ریشه‌زایی در کشت بافت گیاهان دارویی عمل کند. IBA همچنین با افزایش سطح هورمون‌های داخلی مانند اکسین‌های دیگر، می‌تواند به بهبود ریشه‌زایی در شرایط مختلف کشت بافت کمک کند (Ludwig-Müller *et al.*, 2005; Farhadi *et al.*, 2017; Frick and Strader, 2018).

نوع ریزنمونه نیز یکی‌دیگر از عوامل مؤثر در کشت بافت است. به‌طورکلی، ریزنمونه‌های مختلف ممکن است پاسخ‌های متفاوتی به تنظیم‌کننده‌های رشد نشان دهند. به‌عنوان مثال، ریزنمونه‌های برگ ممکن است نسبت به ریزنمونه‌های دمبرگ، درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی بیشتری را نشان دهند. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از ساختار بافتی، غلظت‌های مختلف هورمونی و همچنین فعالیت‌های متابولیکی مختلف در این بافت‌ها باشد

(Zamini *et al.*, 2016; Kawochar *et al.*, 2017). باتوجه به این‌که محل تولید و تجمع مواد مؤثره این گیاه در ریشه آن می‌باشد، در این مطالعه سعی بر آن شد تا محیط کشت مناسب به منظور تولید ریشه و کالوس و درنهایت تولید این مواد بسیار با اهمیت دارویی در حجم بالا شناسایی شود.

## مواد و روش‌ها

### آماده‌سازی بذر سنبل‌الطیب برای کشت بافت

بذرهای دو اکوتیپ سنبل‌الطیب، شامل اکوتیپ‌های شیراز و مشهد، از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. این بذرها جهت تولید گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای و ارزیابی ریشه و کالوس در شرایط کشت بافت مورد استفاده قرار گرفتند. بذرها به مدت هشت ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند تا آلودگی‌های سطحی آن‌ها رفع شود. پس از این مرحله، برای ضدعفونی بهتر، بذرها ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد غوطه‌ور شدند. سپس بذرها به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. درنهایت، بذرها تحت شرایط استریل، سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا از هرگونه آلودگی و مواد شیمیایی پاک شوند. بذرهای ضدعفونی‌شده پس از شستشو، بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا رطوبت اضافی آن‌ها گرفته شود. سپس ۱۰ عدد بذر در پتری‌دیش به محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) منتقل شدند که حاوی ترکیبات ضروری برای رشد و جوانه‌زنی گیاهان بود. کشت‌ها به مدت نه روز در یخچال در دمای پنج درجه سلسیوس نگهداری شدند تا به خواب بذرها پایان داده و جوانه‌زنی تحریک شود. پس از این مرحله، بذرها به شرایط نوری و دمایی مناسب منتقل شدند و در دمای ۲۴±۲ درجه سلسیوس تحت روشنایی ۱۶/۸ ساعت (چرخه نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی) قرار گرفتند تا ریزنمونه‌های موردنیاز برای مراحل بعدی کشت بافت فراهم گردد.

### ارزیابی تولید ریشه و کالوس

برای تهیه ریزنمونه‌های مورد استفاده در کشت‌های ریشه‌زایی و کالوس‌زایی، گیاهچه‌های حاصل از بذرهای ضدعفونی‌شده پس از رشد اولیه در شرایط درون‌شیشه‌ای انتخاب شدند. ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ از هر دو اکوتیپ شیراز و مشهد برداشت گردید. برگ‌ها از ناحیه میانی گیاهچه انتخاب شدند و قطعاتی با اندازه تقریباً ۵×۵ میلی‌متر تهیه شدند تا یکنواختی نمونه‌ها در تمام تیمارها حفظ شود. ریزنمونه‌های دمبرگ نیز از بخش میانی دمبرگ جدا شده و قطعاتی به طول تقریبی پنج تا هفت میلی‌متر آماده گردیدند. پس از تهیه، ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با BAP (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. در هر پتری‌دیش، پنج ریزنمونه قرار داده شد تا از تماس و تداخل رشد کالوس‌ها جلوگیری گردد. برای هر تیمار، سه تکرار درنظر گرفته شد. در مجموع، ۲۴ تیمار مختلف برای این پژوهش طراحی شد. کشت‌ها در دمای ۲۴±۲ درجه سلسیوس و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی شده و پس از گذشت یک ماه، در همان محیط کشت، واکشت و در انتهای هر کشت، داده‌ها یادداشت‌برداری شدند. در این پژوهش، صفات مختلفی برای ارزیابی کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ از دو اکوتیپ سنبل‌الطیب شیراز و مشهد اندازه‌گیری شدند. این صفات شامل درصد کالوس‌زایی و درصد ریشه‌زایی بودند. همچنین، قطر کالوس و تعداد ریشه به‌عنوان معیارهای کیفی و کمی تولید ریشه و کالوس مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این، درصد ریشه‌هایی که بزرگتر از دو سانتی‌متر بودند، به‌منظور ارزیابی کیفیت ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، وزن کالوس و ریشه به‌عنوان معیاری برای ارزیابی حجم و تولید انبوه مواد مؤثره گیاهی درنظر گرفته شدند. درنهایت، وزن تر کل که شامل وزن ریشه و کالوس می‌شود، به‌منظور ارزیابی کلی عملکرد کشت بافت مورد بررسی قرار گرفت.

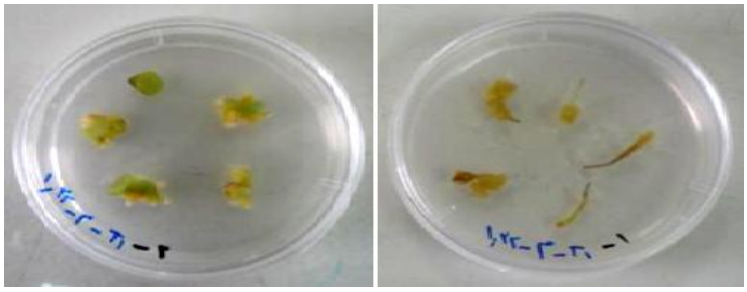
### تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای نرمال‌سازی داده‌های صفت تعداد ریشه، از روش جذری برای داده‌های صفات درصد کالوس‌زایی و درصد ریشه‌زایی، از روش آرک-سینوس و در مرحله واکشت برای داده‌های صفت تعداد ریشه، روش جذری و برای داده‌های صفت درصد ریشه با طول بزرگتر از دو سانتی‌متر، روش آرک-سینوس و برای داده‌های وزن ریشه، روش لگاریتمی استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. در این پژوهش از دو نرم‌افزار MSTAT-C و SPSS به‌طور مکمل استفاده شد؛ زیرا MSTAT-C برای اجرای تحلیل‌های آزمایشی و آزمون

دانکن مناسب‌تر بوده و SPSS امکانات دقیق‌تری برای نرمال‌سازی و کنترل مفروضات آماری فراهم می‌کند. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

## نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کالوس‌زایی در بازه زمانی پنج تا ۱۰ روز پس از کشت به‌طور معناداری افزایش یافت (شکل ۱). این افزایش در درصد کالوس‌زایی می‌تواند به‌دلیل تأثیر مثبت هورمون‌های گیاهی به‌کاررفته در محیط کشت باشد که به تحریک تقسیم سلولی و تشکیل بافت کالوس کمک می‌کند. در مورد ریشه‌زایی، درصد موفقیت در بازه ۱۵ تا ۲۰ روز پس از کشت مشاهده شد (شکل ۲). این امر نشان‌دهنده قابلیت بالای ریزنمونه‌ها در تولید ریشه‌های جدید و اثربخشی شرایط کشت در تحریک فرآیند ریشه‌زایی است. ریشه‌های تولیدشده به‌طور مستقیم از ریزنمونه‌ها خارج شدند، که نشان‌دهنده موفقیت در فرآیند ریشه‌زایی و توانایی ریزنمونه در ایجاد ساختارهای ریشه‌ای سالم و کارآمد است. کالوس‌های تولیدشده دارای بافتی ترد و کرم رنگ بودند، درحالیکه در برخی نمونه‌ها رنگ‌های کرم-سبز و کرم-قهوه‌ای نیز مشاهده گردید. این تنوع رنگ می‌تواند نشان‌دهنده تغییرات در ترکیبات فیتوشیمیایی و متابولیکی کالوس‌ها باشد که ممکن است تحت تأثیر نوع ریزنمونه، غلظت هورمون‌ها و شرایط محیطی قرار گیرد. تغییرات در ترکیب فیتوشیمیایی می‌تواند بر ویژگی‌های بیولوژیکی و دارویی گیاه تأثیر بگذارد و به‌عنوان معیاری برای ارزیابی کیفیت کالوس‌ها و ریشه‌ها مورد استفاده قرار گیرد (Vahdati *et al.*, 2004; Ngomuo *et al.*, 2013; Sidik *et al.*, 2024).

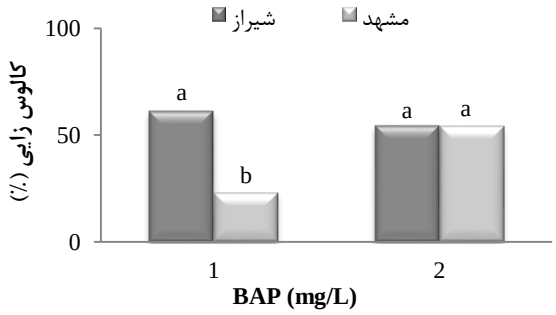


**شکل ۱- تشکیل کالوس ۱۰-۵ روز پس از کشت (ریزنمونه‌ها از راست به چپ: دمبرگ و برگ)**

**شکل ۲- تشکیل ریشه ۲۰-۱۵ روز پس از کشت (ریزنمونه‌ها از راست به چپ: دمبرگ و برگ)**

**شکل ۲- تشکیل ریشه ۲۰-۱۵ روز پس از کشت (ریزنمونه‌ها از راست به چپ: دمبرگ و برگ)**

نتایج این مطالعه نشان داد که برای بهینه‌سازی فرآیندهای کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های سنبل‌الطیب، استفاده از اکسین‌های خارجی، به‌ویژه IBA، ضروری است. تشکیل کالوس و ریشه تنها در محیط‌های کشت حاوی IBA مشاهده شد و در محیط‌های فاقد IBA، کالوس‌زایی و ریشه‌زایی مشاهده نشد. این یافته‌ها تأکید بر اهمیت نقش IBA در تحریک فرآیندهای فیزیولوژیکی مرتبط با کالوس‌زایی و ریشه‌زایی دارند. درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی به ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده بستگی داشت و در محدوده‌ای از صفر تا صد درصد نوسان داشت. با افزایش غلظت BAP، درصد کالوس‌زایی در اکوتیپ مشهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، درحالیکه در اکوتیپ شیراز تغییر معنی‌داری در درصد کالوس‌زایی مشاهده نشد. این نتیجه نشان می‌دهد که در اکوتیپ شیراز نیازی به افزایش غلظت BAP برای بهبود درصد کالوس‌زایی وجود ندارد و بنابراین، استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر BAP به‌عنوان یک گزینه مناسب‌تر پیشنهاد می‌شود. افزودن IBA به محیط کشت برای ریزنمونه‌های برگ به‌طور معنی‌داری درصد کالوس‌زایی را افزایش داد، درحالیکه در ریزنمونه‌های دمبرگ تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳ و جدول ۱). این نتایج نشان‌دهنده تفاوت‌های موجود در مقادیر هورمون‌های درونی بین ریزنمونه‌ها است. در ریزنمونه‌های برگ، افزایش IBA منجر به ایجاد تعادل هورمونی مناسب‌تری شد که درنهایت به افزایش درصد کالوس‌زایی منجر گردید.




**شکل ۳- میانگین درصد کالوس‌زایی دو اکوتیپ شیراز و مشهد در غلظت‌های مختلف BAP**

تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری با یکدیگر براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

**جدول ۱- میانگین درصد کالوس‌زایی در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ در غلظت‌های مختلف IBA**

| IBA (mg/L) | ریزنمونه | درصد کالوس‌زایی |
|---|---|---|
| ۰ | برگ | ۰$^{c}$ |
| | دمبرگ | ۰$^{c}$ |
| ۰/۵ | برگ | ۴۷/۹۹$^{b}$ |
| | دمبرگ | ۸۴/۷۲$^{a}$ |
| ۱ | برگ | ۸۷/۶۰$^{a}$ |
| | دمبرگ | ۶۸/۹۲$^{b}$ |

تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

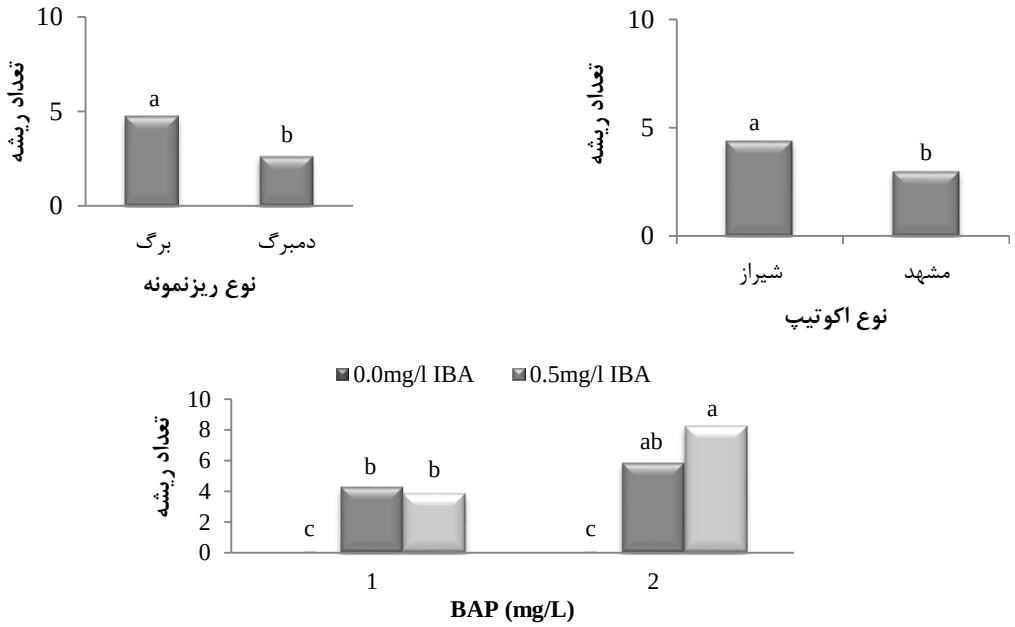
نتایج این مطالعه نشان داد که حداکثر درصد ریشه‌زایی که در غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد، نشان‌دهنده حساسیت بالای ریزنمونه‌ها به این اکسین در تحریک تشکیل ریشه‌های جدید است. عدم مشاهده ریشه‌زایی در محیط‌های کشت فاقد IBA به‌ویژه در شرایط کشت درون شیشه‌ای، بر اهمیت وجود این اکسین برای تحریک فرآیند ریشه‌زایی تأکید دارد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که ریشه‌زایی به‌طور طبیعی بدون حضور IBA به‌سختی امکان‌پذیر است. به‌عنوان مثال، IBA با تحریک بیان ژن‌های مرتبط با ریشه‌زایی و فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی خاص، نظیر مسیرهای مرتبط با Aux/IAA و ARF (Auxin Response Factor)، به تشکیل ریشه‌های جدید کمک می‌کند. این مکانیسم‌ها به‌وضوح نشان‌دهنده نقش حیاتی IBA در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با ریشه‌زایی هستند. افزون بر این، تأثیر IBA بر ریشه‌زایی می‌تواند به واسطه تعدیل نسبت اکسین به سیتوکینین در محیط کشت باشد. این نسبت به‌طور مستقیم بر فرآیندهای تقسیم و تمایز سلولی تأثیر می‌گذارد و می‌تواند زمینه‌ساز ایجاد ریشه‌های جدید و بهبود رشد آن‌ها باشد. به‌علاوه، IBA ممکن است با تحریک سنتز پروتئین‌های خاص و آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم اکسین، نظیر اکسیدازهای اکسین، به تسهیل ریشه‌زایی کمک کند (Dhar and Joshi, 2005; Akaneme and Eneobong, 2008; Kawochar *et al.*, 2017; Mirani *et al.*, 2017).

**جدول ۲- میانگین درصد ریشه‌زایی در غلظت‌های مختلف IBA**

| IBA (mg/L) | درصد ریشه‌زایی |
|---|---|
| ۰ | ۰[b] |
| ۰/۵ | ۷۷/۷۷[a] |
| ۱ | ۸۰/۳۵[a] |

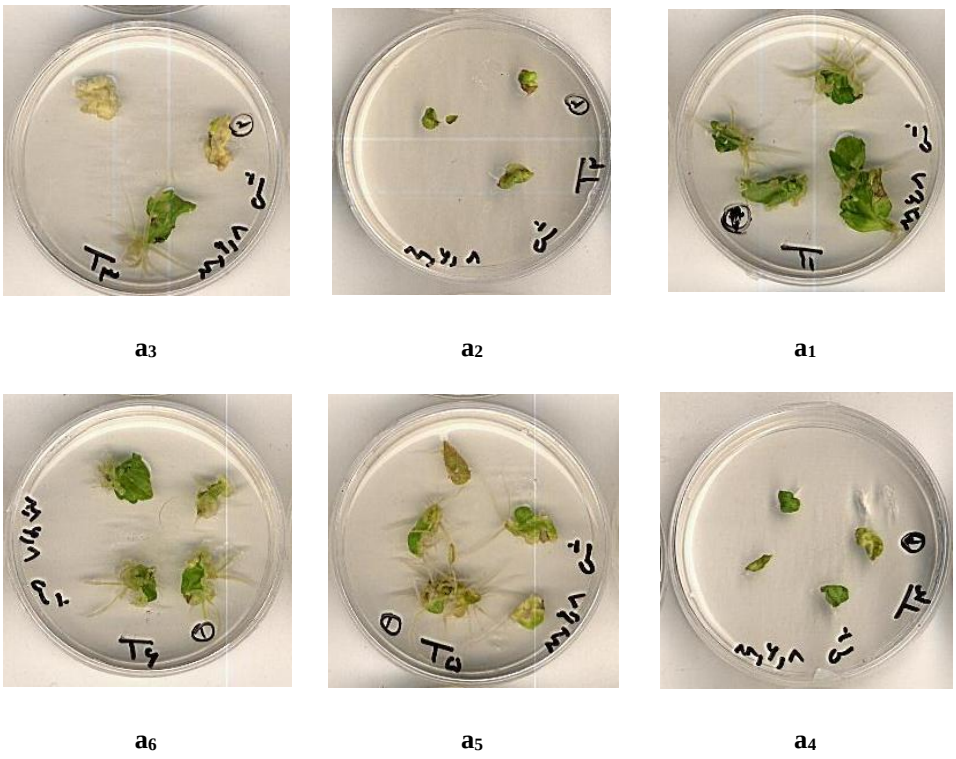
تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

در مقایسه بین اکوتیپ‌ها، تعداد ریشه‌ها در اکوتیپ شیراز به‌طور معناداری بیشتر از اکوتیپ مشهد بود. این تفاوت می‌تواند به ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی خاص هر اکوتیپ نسبت داده شود که بر روی پاسخ به هورمون‌ها تأثیر می‌گذارد. به‌ویژه، تفاوت در تولید هورمون‌های درونی و حساسیت به هورمون‌های خارجی می‌تواند منجر به تغییرات قابل توجهی در فرآیند ریشه‌زایی گردد. همچنین، ریزنمونه‌های برگ نسبت به دمبرگ تعداد ریشه بیشتری تولید کردند، که نشان می‌دهد نوع ریزنمونه به‌عنوان یک عامل مؤثر در بهینه‌سازی پروتکل‌های ریشه‌زایی باید مدنظر قرار گیرد. این تفاوت‌ها ممکن است ناشی از ساختار بافتی و فعالیت‌های متابولیکی مختلف در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ باشد، به‌طوری‌که ریزنمونه‌های برگ دارای فعالیت‌های متابولیکی بالاتری هستند که به تولید بیشتر ریشه‌ها کمک می‌کند. افزودن BAP به محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA منجر به افزایش معنی‌دار تعداد ریشه‌ها شد. این نتایج نشان‌دهنده این است که ترکیب مناسب اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها می‌تواند به بهبود فرآیند ریشه‌زایی کمک کند. BAP، به‌عنوان یک سیتوکینین، با تحریک تقسیم سلولی و تمایز در بافت‌های ریشه‌ای، به افزایش تعداد ریشه‌ها کمک می‌کند. سیتوکینین‌ها با تأثیر بر نسبت اکسین به سیتوکینین در بافت، می‌توانند به بهینه‌سازی فرآیند ریشه‌زایی کمک نمایند. حداکثر تعداد ریشه‌ها نیز در محیط‌های کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP، بدون درنظر گرفتن غلظت IBA، به‌دست آمد. این امر نشان‌دهنده تأثیر مثبت BAP بر تعداد ریشه‌ها است و با مطالعات پیشین که اثرات مثبت سیتوکینین‌ها بر ریشه‌زایی در گیاهان مختلف را تأیید کرده‌اند، همخوانی دارد. از نظر فیزیولوژیکی، IBA به‌عنوان یک اکسین، از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی خاص، نظیر Aux/IAA و ARF، به تحریک تمایز و شکل‌گیری ریشه‌های جدید کمک می‌کند (Galavi *et al.*, 2013; Zamini *et al.*, 2016; Jamil *et al.*, 2017; Kawochar *et al.*, 2017).



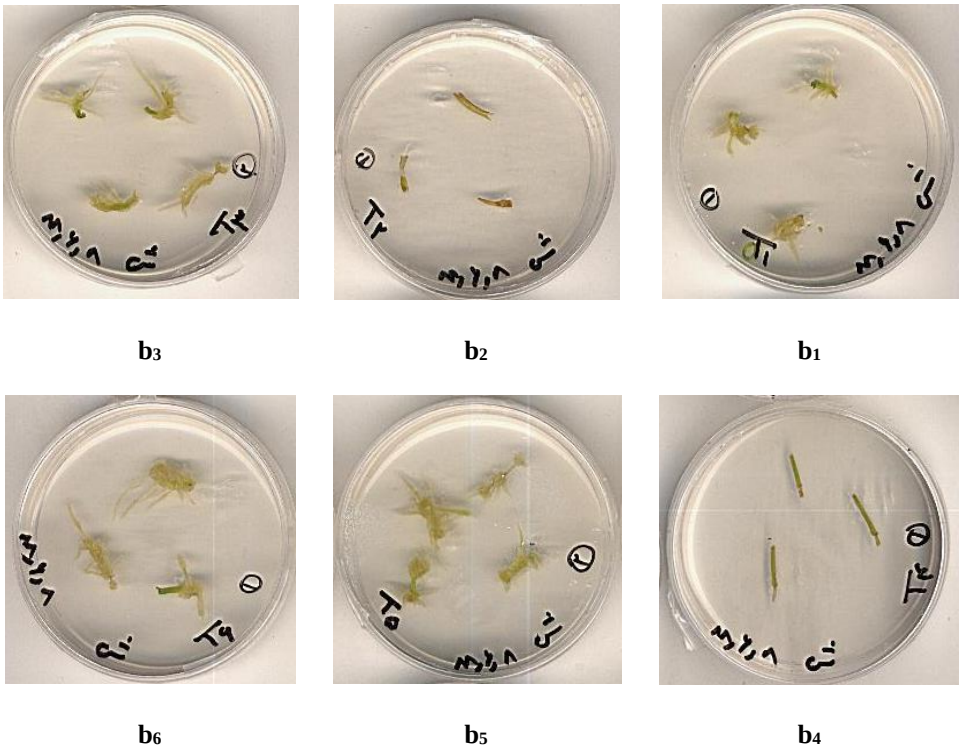

**شکل ۴- میانگین تعداد ریشه**

تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.



**a3** **a2** **a1**

**a6** **a5** **a4**



**b3** **b2** **b1**

**b6** **b5** **b4**

**شکل ۵- ریزنمونه‌های برگ ($a_1$-$a_6$) و دمبرگ ($b_1$-$b_6$) کشت شده در محیط کشت MS حاوی ترکیبات BAP و IBA در اکوتیپ شیراز پس از یک ماه** ($a_1$ و $b_1$: ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، $a_2$ و $b_2$: ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، $a_3$ و $b_3$: ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، $a_4$ و $b_4$: ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، $a_5$ و $b_5$: ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، $a_6$ و $b_6$: ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP).

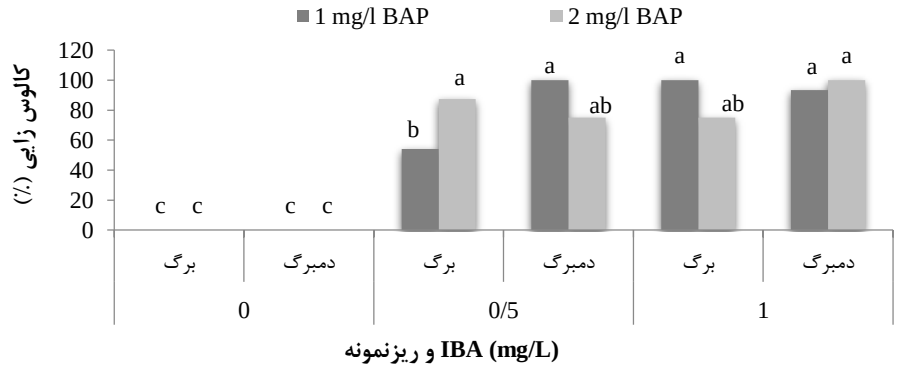
نتایج بررسی واکشت در این مطالعه به‌وضوح نشان‌دهنده اهمیت IBA در فرآیندهای کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های سنبل‌الطیب هستند. عدم مشاهده هرگونه کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در محیط کشت فاقد IBA، به‌خوبی بیانگر این است که این هورمون به‌عنوان یک اکسین کلیدی، نقش اساسی در تحریک فرآیندهای فیزیولوژیکی مرتبط با تمایز و توسعه ریشه‌ها و بافت‌های کالوس ایفا می‌کند. IBA به‌عنوان یک اکسین، با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ریشه‌زایی و کالوس‌زایی، نظیر ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ساختاری و آنزیم‌های متابولیکی، فرآیندهای فیزیولوژیکی را تسهیل می‌کند. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عدم وجود IBA در محیط کشت، منجر به عدم فعال‌سازی این مسیرهای سیگنال‌دهی و درنتیجه، عدم تولید کالوس و ریشه می‌شود. در اکوتیپ شیراز، بجز دو ترکیب شامل دو میلی‌گرم در لیتر BAP با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP با یک میلی‌گرم در لیتر IBA، در سایر ترکیبات کالوس‌زایی به‌طور کامل صورت گرفت. این یافته‌ها نشان‌دهنده توانایی بالای اکوتیپ شیراز در تولید کالوس در شرایط هورمونی مختلف است. توانایی بالای این اکوتیپ ممکن است به‌دلیل وجود ویژگی‌های ژنتیکی خاص و سازگاری با شرایط محیطی باشد که موجب افزایش حساسیت به هورمون‌های رشد می‌شود. علاوه بر این، عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ترکیب‌های هورمونی مختلف از نظر درصد کالوس‌زایی در اکوتیپ شیراز (جدول ۳) می‌تواند به این معنا باشد که این اکوتیپ به‌طور یکنواخت به سطوح مختلف هورمونی پاسخ می‌دهد. این پدیده ممکن است به‌دلیل وجود مکانیسم‌های تنظیمی داخلی در این اکوتیپ باشد که به‌طور مؤثری توانایی آن را در پاسخ به تغییرات در غلظت هورمون‌ها افزایش می‌دهد (Jamil *et al.*, 2017; Mirani *et al.*, 2017; Nazir *et al.*, 2022).

**جدول ۳- میانگین درصد کالوس‌زایی در غلظت‌های مختلف BAP و IBA و ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در اکوتیپ شیراز**

| IBA (mg/L) | ریزنمونه | BAP (mg/L) | درصد کالوس‌زایی |
|---|---|---|---|
| ۰ | برگ | ۱ | ۰$^{c}$ |
| | | ۲ | ۰$^{c}$ |
| | دمبرگ | ۱ | ۰$^{c}$ |
| | | ۲ | ۰$^{c}$ |
| ۰/۵ | برگ | ۱ | ۱۰۰$^{a}$ |
| | | ۲ | ۸۰$^{ab}$ |
| | دمبرگ | ۱ | ۱۰۰$^{a}$ |
| | | ۲ | ۱۰۰$^{a}$ |
| ۱ | برگ | ۱ | ۸۰$^{ab}$ |
| | | ۲ | ۱۰۰$^{a}$ |
| | دمبرگ | ۱ | ۱۰۰$^{a}$ |
| | | ۲ | ۱۰۰$^{a}$ |

تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

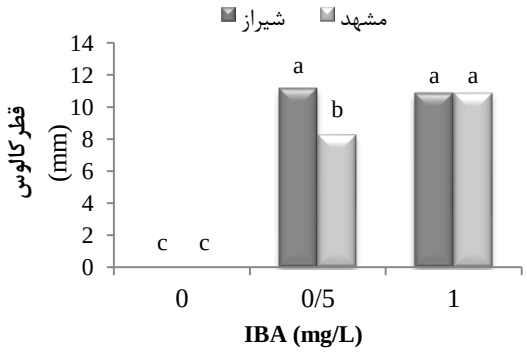
در این اکوتیپ، اغلب تیمارهای هورمونی موجب القای کالوس‌زایی با کارایی بالا در دامنه ۸۰ تا ۱۰۰ درصد شدند. با این حال، ریزنمونه‌های برگ کشت‌شده در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA از این الگو پیروی نکرده و کاهش قابل توجهی در درصد کالوس‌زایی نشان دادند. این یافته‌ها به وضوح بیانگر این است که اکوتیپ مشهد بخوبی به ترکیبات هورمونی پاسخ می‌دهد و توانایی بالایی در تولید کالوس در شرایط مختلف دارد. در مقابل، اکوتیپ شیراز نشان داد که افزودن BAP به محیط کشت با غلظت ثابتی از IBA در هر دو نوع ریزنمونه (برگ و دمبرگ) تغییر معنی‌داری در درصد کالوس‌زایی ایجاد نکرد. این عدم تغییر می‌تواند به تفاوت‌های ژنتیکی یا فیزیولوژیکی بین اکوتیپ‌ها مرتبط باشد که بر نحوه پاسخ‌دهی آن‌ها به تنظیم‌کننده‌های رشد تأثیر می‌گذارد. این یافته‌ها نشان‌دهنده این است که اکوتیپ شیراز ممکن است به‌دلیل ویژگی‌های ژنتیکی خاص، به ترکیبات هورمونی پاسخ کمتری دهد و یا ممکن است نیاز به شرایط خاص‌تری برای تحریک فرآیند کالوس‌زایی داشته باشد. علاوه بر این، در اکوتیپ مشهد، اضافه کردن تنظیم‌کننده رشد BAP به محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در ریزنمونه برگ منجر به افزایش معنی‌دار درصد کالوس‌زایی شد (شکل ۶). این نتیجه نشان می‌دهد که ترکیب مناسب از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها می‌تواند به‌طور قابل توجهی بهبود فرآیند کالوس‌زایی را تسهیل کند. BAP به‌عنوان یک سیتوکینین، با تحریک تقسیم سلولی و تمایز در بافت‌های کالوس، می‌تواند به افزایش تولید کالوس کمک کند. تفاوت‌های مشاهده‌شده در درصد کالوس‌زایی بین اکوتیپ‌ها می‌تواند ناشی از عوامل متعددی باشد، از جمله تفاوت در تولید هورمون‌های درونی، حساسیت به تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی و ویژگی‌های متابولیکی خاص هر اکوتیپ. به‌عنوان مثال، اکوتیپ مشهد ممکن است به‌دلیل وجود ژن‌های خاصی که بر روی پاسخ به هورمون‌ها تأثیر می‌گذارند، توانایی بهتری در تولید کالوس داشته باشد. در مقابل، اکوتیپ شیراز ممکن است نیاز به شرایط خاص‌تری برای تحریک تولید کالوس داشته باشد، که این امر می‌تواند به تحقیقات بیشتری در زمینه بررسی ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی این اکوتیپ‌ها نیاز داشته باشد (Vennapusa *et al.*, 2015; Nazir *et al.*, 2022; Prakash *et al.*, 2023; Sidik *et al.*, 2024).



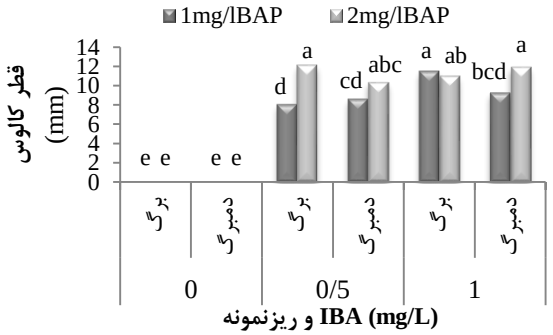

**شکل ۶- میانگین درصد کالوس‌زایی در غلظت‌های مختلف BAP و IBA و ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در اکوتیپ مشهد**

تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

نتایج نشان داد که افزایش غلظت IBA به محیط کشت در اکوتیپ مشهد به‌طور معنی‌داری قطر کالوس را افزایش داد، درحالی‌که در اکوتیپ شیراز این تغییرات مشاهده نشد (شکل ۷). این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی متفاوت بین اکوتیپ‌ها باشد که بر نحوه پاسخ‌دهی به اکسین‌ها تأثیر می‌گذارد. علاوه بر این، قطر کالوس در ریزنمونه برگ کشت‌شده در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و در ریزنمونه دمبرگ در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر IBA با افزایش BAP به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این نشان می‌دهد که ترکیب مناسب BAP و IBA می‌تواند به بهبود قطر کالوس کمک کند. در سایر ترکیبات، تغییر غلظت BAP تأثیری بر قطر کالوس نداشت (شکل ۸). آسیم و همکاران (۲۰۰۸) بر روی گیاه *Vigna unguiculata* L.، نشان دادند که بیشترین قطر کالوس در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمده است. در اکوتیپ شیراز، باتوجه به عدم وجود تفاوت معنی‌دار از نظر قطر کالوس بین غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر IBA، استفاده از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌عنوان گزینه‌ای مقرون به صرفه پیشنهاد می‌شود، اما در اکوتیپ مشهد، باتوجه به افزایش قطر کالوس با افزایش IBA، استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر IBA پیشنهاد می‌گردد.




**شکل ۷- میانگین قطر کالوس در غلظت‌های مختلف IBA و دو اکوتیپ شیراز و مشهد**




**شکل ۸- میانگین قطر کالوس در غلظت‌های مختلف BAP و IBA و ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ**

تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

نتایج این مطالعه به‌روشنی نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار غلظت‌های مختلف IBA بر درصد ریشه‌زایی در واکشت ریزنمونه‌های سنبل‌الطیب است ($p \leq 0.05$). این یافته‌ها تأییدکننده نقش کلیدی IBA به‌عنوان یک اکسین در تحریک فرآیند ریشه‌زایی هستند. به‌طور خاص، با افزایش غلظت IBA، درصد ریشه‌زایی نیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بالاترین درصد ریشه‌زایی در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (جدول ۴). مقایسه میانگین‌ها

نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف IBA تأثیر مستقیمی بر درصد ریشه‌زایی دارند. همچنین، غلظت یک میلی‌گرم در لیتر IBA، بالاترین درصد ریشه‌زایی را به همراه داشت، درحالی‌که در غلظت‌های پایین‌تر، مانند ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، درصد ریشه‌زایی کاهش یافت. این یافته‌ها به‌روشنی بیانگر این است که IBA می‌تواند به‌عنوان یک محرک قوی در فرآیند ریشه‌زایی از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با تمایز ریشه و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ریشه‌زایی عمل کند. درمقابل، تأثیر غلظت‌های مختلف BAP، اکوتیپ، نوع ریزنمونه و سایر اثرات متقابل بر درصد ریشه‌زایی از نظر آماری معنی‌دار نبودند. این عدم تأثیر می‌تواند ناشی از این باشد که BAP به‌عنوان یک سیتوکینین، به‌طور عمده بر روی فرآیندهای تقسیم سلولی و تمایز سلولی تأثیر می‌گذارد، اما در این مطالعه، نقش آن در ریشه‌زایی به‌طور قابل توجهی کمتر از نقش IBA بود. مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با تأثیر IBA بر ریشه‌زایی شامل فعال‌سازی ژن‌های خاصی است که در فرآیندهای ریشه‌زایی و تمایز سلولی نقش دارند. IBA می‌تواند به تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با ریشه‌زایی، نظیر ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ساختاری و آنزیم‌های متابولیکی کمک کند. به‌علاوه، IBA با تأثیر بر غلظت‌های درونی اکسین‌ها و تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی، می‌تواند به بهبود فرآیند ریشه‌زایی کمک کند (Ludwig-Müller *et al.*, 2005; Zamini *et al.*, 2016; Vennapusa *et al.*, 2015; Nazir *et al.*, 2022).

**جدول ۴- مقایسه میانگین اثر IBA روی صفات**

| IBA (mg/L) | درصد ریشه‌زایی | تعداد ریشه | وزن تر (mg) |
|---|---|---|---|
| ۰ | ۰±۰$^{c}$ | ۰±۰$^{c}$ | ۰±۰$^{b}$ |
| ۰/۵ | ۷۵/۲۷±۱/۴$^{b}$ | ۷/۵±۳۱/۰۱$^{b}$ | ۱۴۶۲/۵۴۹±۶/۷$^{a}$ |
| ۱ | ۹۵/۱۱±۷/۱$^{a}$ | ۱۱/۴±۷/۲$^{a}$ | ۱۵۸۶/۵۴۱±۶/۳$^{a}$ |

تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

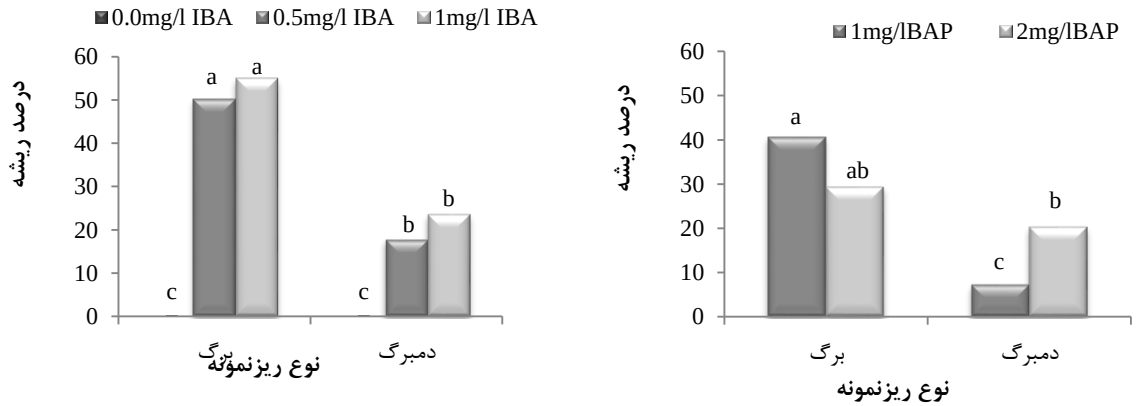
نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تأثیر معنادار غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر تعداد ریشه در واکشت ریزنمونه‌های سنبل‌الطیب است ($p \leq 0.05$). این یافته‌ها تأییدکننده نقش مهم این تنظیم‌کننده‌های رشد در فرآیند ریشه‌زایی و تمایز سلولی در گیاهان هستند. به‌ویژه، با افزایش غلظت هر یک از این دو هورمون، تعداد ریشه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول‌های ۴ و ۵). مقایسه میانگین‌ها در جدول ۵ نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف BAP تأثیر مستقیمی بر تعداد ریشه‌ها دارند. به‌طور خاص، با افزایش غلظت BAP از یک به دو میلی‌گرم در لیتر، تعداد ریشه‌ها به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. این نتایج نشان‌دهنده این است که BAP به‌عنوان یک سیتوکینین، می‌تواند با تحریک تقسیم سلولی و تمایز ریشه‌ها، بهبود قابل توجهی در تعداد ریشه‌ها ایجاد کند. در این راستا، BAP با افزایش فعالیت‌های متابولیکی و تحریک بیان ژن‌های مرتبط با رشد ریشه، می‌تواند به‌عنوان یک محرک قوی در فرآیند ریشه‌زایی عمل کند. به‌علاوه، نتایج نشان دادند که تعداد ریشه تحت تأثیر سایر اثرات اصلی و متقابل قرار نگرفت. این امر می‌تواند به این معنا باشد که در این شرایط خاص، تأثیر BAP و IBA بر تعداد ریشه‌ها به‌طور مستقل از سایر عوامل محیطی و ژنتیکی عمل می‌کند. این مشاهده نشان‌دهنده وجود یک مکانیسم خاص در پاسخ به این دو هورمون است که می‌تواند به‌طور مستقل از سایر فاکتورها بر روی تعداد ریشه‌ها تأثیر بگذارد. مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با تأثیر BAP و IBA بر تعداد ریشه شامل تنظیم بیان ژن‌های خاصی است که در فرآیندهای ریشه‌زایی و تقسیم سلولی نقش دارند (Ludwig-Müller *et al.*, 2005; Galavi *et al.*, 2013; Jamil *et al.*, 2017; Kawochar *et al.*, 2017).

**جدول ۵- مقایسه میانگین اثر BAP روی تعداد ریشه**

| BAP (mg/L) | تعداد ریشه |
|---|---|
| ۱ | ۵/۵±۴/۲[b] |
| ۲ | ۷/۶±۴/۳[a] |

تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

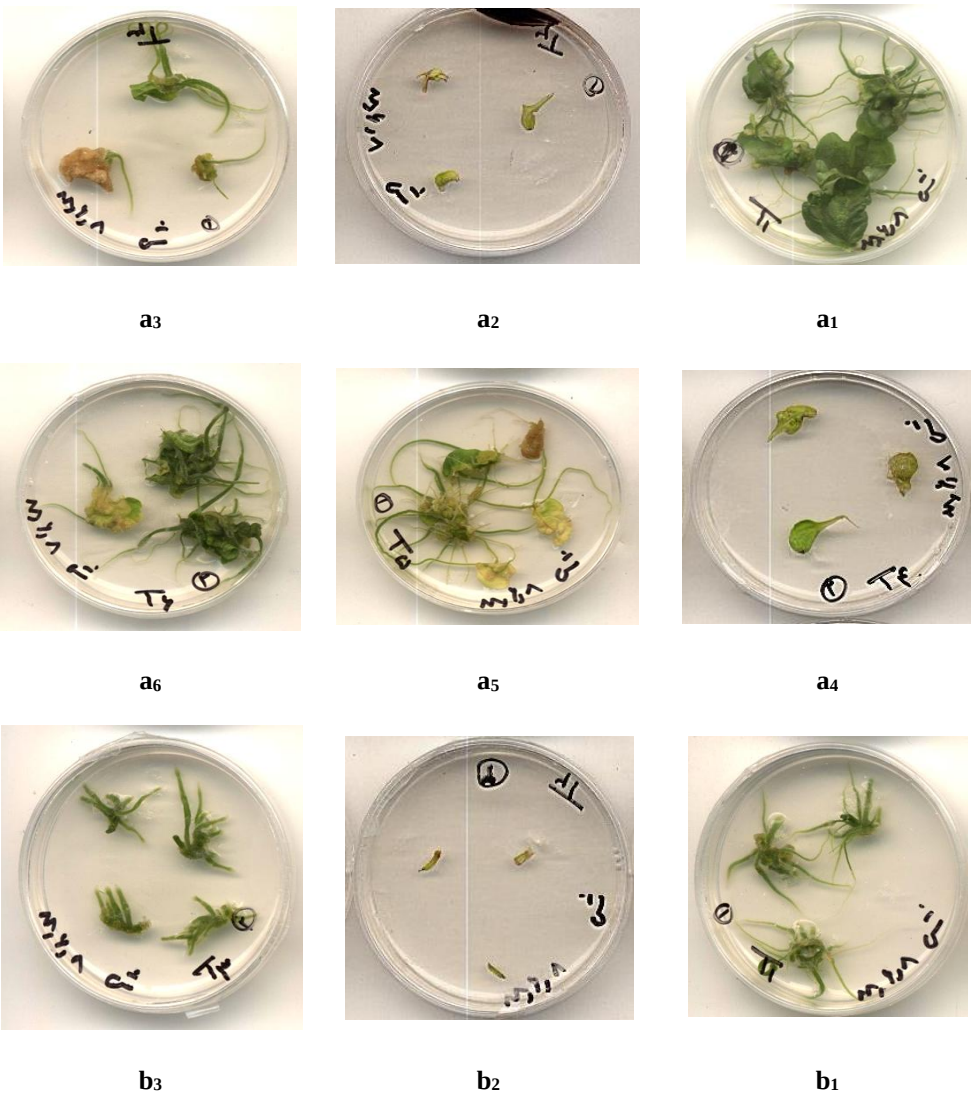
افزایش غلظت BAP از یک به دو میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه دمبرگ باعث افزایش درصد ریشه با طول بزرگتر از دو سانتی‌متر شد، درحالی‌که در ریزنمونه برگ، این افزایش منجر به کاهش درصد ریشه‌های موردنظر گردید، هرچند این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. این موضوع نشان می‌دهد که پاسخ ریزنمونه‌های کشت شده به افزایش غلظت سیتوکینین یکسان نیست. به‌طورکلی، بیشترین درصد ریشه با طول بزرگتر از دو سانتی‌متر در ریزنمونه برگ حاصل شد. نتایج مقایسه میانگین اثر IBA بر نوع ریزنمونه نشان داد که درصد ریشه با طول بزرگتر از دو سانتی‌متر در ریزنمونه برگ کشت شده در محیط‌های کشت دارای ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر IBA حداکثر بود. همچنین، افزایش غلظت IBA از ۰/۵ به یک میلی‌گرم در لیتر تأثیر معنی‌داری بر صفت موردنظر ایجاد نکرد؛ بنابراین به منظور مصرف کمتر، بهتر است از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده شود. بدون درنظر گرفتن غلظت این تنظیم‌کننده رشد، ریزنمونه برگ درصد بیشتری ریشه با طول موردنظر تولید کرد و برای تولید ریشه‌های طویل‌تر، کشت این ریزنمونه ترجیح داده می‌شود (شکل ۹). نتایج این مطالعه نشان‌دهنده تأثیر معنادار غلظت‌های مختلف IBA و BAP بر درصد ریشه‌هایی با طول بزرگتر از دو سانتی‌متر در ریزنمونه‌های سنبل‌الطیب است. این تأثیرات به چندین دلیل علمی قابل تبیین است. IBA به‌عنوان یک اکسین، با تحریک فرآیندهای ریشه‌زایی و افزایش غلظت‌های درونی اکسین، نقش کلیدی در تمایز و توسعه ریشه‌ها ایفا می‌کند. از سوی دیگر، BAP به‌عنوان یک سیتوکینین، با تحریک تقسیم سلولی و بهبود فرآیندهای متابولیکی، می‌تواند بر تعداد ریشه‌ها تأثیر بگذارد، اما پاسخ به BAP به‌طور چشمگیری بسته به نوع ریزنمونه متفاوت است که ممکن است ناشی از تفاوت‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی بین بافت‌های مختلف باشد (Ngomuo *et al.*, 2013; Márquez *et al.*, 2016; Kawochar *et al.*, 2017; Sidik *et al.*, 2024). همچنین، عدم وجود تفاوت معنی‌دار در درصد ریشه‌های طویل‌تر با افزایش غلظت IBA از ۰/۵ به یک میلی‌گرم در لیتر نشان‌دهنده این است که گیاهان ممکن است به حالت اشباع رسیده و نتوانند به‌طور مؤثر از هورمون‌های اضافی استفاده کنند. درنتیجه، برای بهینه‌سازی تولید ریشه‌های طویل‌تر در سنبل‌الطیب، انتخاب دقیق غلظت‌های IBA و BAP و نوع ریزنمونه از اهمیت بالایی برخوردار است.




**شکل ۹- میانگین درصد ریشه با طول بزرگتر از ۲ سانتی‌متر در غلظت‌های مختلف BAP و IBA**

تیمارهای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

وزن کالوس در اکوتیپ شیراز از ۵۰۰ تا ۲۳۴۱ میلی‌گرم و در اکوتیپ مشهد از ۱۵۰ تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم متغیر بود. این نتایج نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل توجه در تولید کالوس بین دو اکوتیپ است. همچنین، وزن ریشه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف IBA قرار گرفت ($p < 0.05$)، درحالی‌که سایر اثرات برای این صفت تأثیر معنی‌داری نداشتند. وزن ریشه به ترتیب در اکوتیپ شیراز و مشهد به ۱۰۵۰ میلی‌گرم (حداقل ۶۶/۵ میلی‌گرم) و ۸۳۷ میلی‌گرم (حداقل ۶۲ میلی‌گرم) رسید. نتایج نشان داد که وزن تر کل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف BAP و IBA قرار گرفت ($p < 0.05$). با این حال، اثرات اصلی و متقابل برای این صفت معنی‌دار نبودند. میانگین وزن تر کل در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BAP برابر با ۷۳۱/۵ ± ۸۸۱/۶ و در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BAP برابر با ۹۱۷/۰ ± ۱۱۵۱/۲ به‌دست آمد. این نتایج نشان می‌دهند که حداکثر وزن تر کل در غلظت بالاتر BAP به‌دست آمده است. نتایج نشان داد که بین غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر IBA تفاوت معنی‌داری در مقدار وزن تر کل مشاهده نشد و در هر دو غلظت، این تنظیم‌کننده رشد بالاترین مقدار وزن تر کل را به‌دست آورد. علاوه بر این، تعداد و درصد ریشه‌های با طول بزرگتر از دو سانتی‌متر نیز بر وزن ریشه و قطر کالوس تأثیر گذاشت و به همین ترتیب بر وزن کالوس مؤثر بود. وزن تر کل به‌عنوان مجموع وزن ریشه و کالوس محاسبه شده است. بنابراین نتایج حاصل برای صفات اخیر با نتیجه به‌دست آمده برای وزن تر کل مطابقت داشتند. در شکل ۱۰، ریزنمونه‌های کشت شده از اکوتیپ شیراز در محیط‌های کشت حاوی ترکیبات مختلف BAP و IBA به تصویر کشیده شده است.



**a1** **a2** **a3**

**a4** **a5** **a6**

**b1** **b2** **b3**

$b_6$ $b_5$ $b_4$

**شکل ۱۰- ریزنمونه‌های برگ ($a_1$-$a_6$) و دمبرگ ($b_1$-$b_6$) کشت شده در محیط کشت MS حاوی ترکیبات BAP و IBA در اکوتیپ شیراز پس از دو ماه** ($a_1$ و $b_1$: ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، $a_2$ و $b_2$: ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، $a_3$ و $b_3$: ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، $a_4$ و $b_4$: ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، $a_5$ و $b_5$: ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۲ میلی‌گرم در لیترBAP، $a_6$ و $b_6$: ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP)

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی در دو اکوتیپ شیراز و مشهد با هم متفاوت و وابسته به نوع ترکیب هورمونی اعمال شده (یک و دو میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۰، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر IBA) بود. به‌طورکلی، اکوتیپ شیراز عملکرد بهتری نسبت به مشهد داشت. همچنین در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر IBA، درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی بیشتر از سایر غلظت‌ها بود. برای تولید ریشه‌های بیشتر و طویل‌تر، استفاده از ریزنمونه برگ مناسبتر ارزیابی شد. علاوه بر این، برای افزایش درصد کالوس‌زایی و قطر کالوس، ریزنمونه دمبرگ بهترین عملکرد را داشت. این نتایج نشان‌دهنده اهمیت نوع ریزنمونه در فرآیندهای کالوس‌زایی و ریشه‌زایی هستند. همچنین، نیازهای هورمونی مرحله نگهداری کالوس و ریشه با مرحله القای کالوس و ریشه از ریزنمونه‌ها تفاوت داشت.

## سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، به انجام رسیده است. از تلاش‌های بی‌شائبه مسئولین و کارکنان دانشکده در فراهم آوردن امکانات لازم و همکاری در اجرای مراحل مختلف پژوهش، کمال امتنان را داریم.

**منابع**


Akaneme, F. I., & Eneobong, E. E. (2008). Tissue culture in *Pinus caribaea* Mor. var. Hondurensis barr. and golf. II: Effects of two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogenesis. *African Journal of Biotechnology,7*(6). 757-765. https://doi.org/10.5897/AJB07.681

Dhar, U., & Joshi, M. (2005). Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Reports, 24*(4), 195-200. https://doi.org/10.1007/s00299-005-0932-1

Farhadi, N., Panahandeh, J., Azar, A. M., & Salte, S. A. (2017). Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (*Allium hirtifolium*). *Scientia Horticulturae, 218*, 80-86. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.040

Frick, E. M. & Strader, L. C. (2018). Roles for IBA-derived auxin in plant development. *Journal of Experimental Botany, 69*(2), 169-177. https://doi.org/0.1093/jxb/erx298

Galavi, M., Karimian, M. A., & Mousavi, S. R. (2013). Effects of different auxin (IBA) concentrations and planting-beds on rooting grape cuttings (*Vitis vinifera*). *Annual Research & Review in Biology, 3*(4), 517-523. https://doi.org/10.2478/v10014-007-0005-y

Jamil, S., Shahzad, R., Talha, G. M., Sakhawat, G., Sultana, R., & Iqbal, M. Z. (2017). Optimization of protocols for in vitro regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *International Journal of Agronomy, 217*(1), 2089381. https://doi.org/10.1155/2017/2089381

Kawochar, M. A., Ahmed, N. U., Hossain, M. I., & Ferdois, J. (2017). Role of explants and NAA on callus induction of potato (*Solanum tuberosum*). *American Journal of Life Sciences, 5*(5), 140-144. https://doi.org/10.11648/j.ajls.20170505.14

Ludwig-Müller, J., Vertocnik, A., & Town, C. D. (2005). Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *Journal of Experimental Botany, 56*(418), 2095-2105. https://doi.org/10.1093/jxb/eri208

Márquez, G., Alarcón, M. V., & Salguero, J. (2016). Differential responses of primary and lateral roots to indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, and 1-naphthaleneacetic acid in maize seedlings. *Biologia Plantarum, 60*(2), 367-375. https://doi.org/10.1017/S174275841200035X

Mathur, J., Ahuja, P. S., Mathur, A., Kukreja, A. K., & Shah, N. C. (1988). In vitro propagation of Valeriana wallichii. *Planta Medica, 54*(01), 82-83. https://doi.org/10.1055/s-2006-962346

Mirani, A. A., Abul-Soad, A. A., & Markhand, G. S. (2017). *In vitro* rooting of *Dendrobium nobile* orchid: multiple responses to auxin combinations. *Notulae Scientia Biologicae, 9*(1), 84-88. https://doi.org/10.15835/nsb919894

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15*, 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Nazir, U., Gul, Z., Shah, G. M., & Khan, N. I. (2022). Interaction effect of auxin and cytokinin on in vitro shoot regeneration and rooting of endangered medicinal plant *Valeriana jatamansi* Jones through tissue culture. *American Journal of Plant Sciences, 13*(2), 223-240. https://doi.org/10.4236/ajps.2022.132014

Ngomuo, M., Mneney, E., & Ndakidemi, P. (2013). The effects of auxins and cytokinin on growth and development of (*Musa* sp.) var. "Yangambi" explants in tissue culture. *American Journal of Plant Sciences, 4*(11), 2174-2180. https://doi.org/10.4236/ajps.2013.411269

Prakash, S., Shah, D., Jangpangi, D., & Patni, B. (2023). Exploring regenerative mechanisms: comparative analysis of callus induction and shoot regeneration in *Valeriana jatamansi* Jones through In-vitro and In-vivo Cultivation. *International Journal of Plant & Soil Science, 35*(19), 1495-1502. https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i193693

Sidik, N. J., Agha, H. M., Alkamil, A. A., Alsayadi, M. M. S., & Mohammed, A. A. (2024). A mini review of plant tissue culture: the role of media optimization, growth regulators in modern agriculture, callus induction and the applications. *AUIQ Complementary Biological System, 1*(2), 96-109. https://doi.org/10.70176/3007-973X.1019

Vahdati, K., Leslie, C., Zamani, Z., & McGranahan, G. (2004). Rooting and acclimatization of *in vitro*-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars. *HortScience, 39*(2), 324-327. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.2.324

Vennapusa, A. R., Vemanna, R.S., Reddy, B. R., Babitha, K. C., Kiranmai, K., Nareshkumar, A., & Sudhakar, C. (2015). An efficient callus induction and regeneration protocol for a drought tolerant rice indica genotype AC39020. *Journal of Plant Sciences, 3*(5), 248-254. https://doi.org/10.11648/j.jps.20150305.11

Zamini, A., Mokhtari, A., Tansaz, M., & Zarei, M. (2016). Callus induction and plant regeneration of *Valeriana officinalis* are affected by different leaf explants and various concentrations of plant growth regulators. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology, 97*(4). 261-269. https://doi.org/10.5114/bta.2016.64543