

Investigation of the Effect of NaCl Elicitor on *In Vitro* Callogenesis of *Chrysanthemum indicum* var. *indicum*

ABSTRACT

Introduction

In vitro culture and callus production are considered important tools in the improvement of traits and production of secondary metabolites in medicinal and ornamental plants. The *Chrysanthemum indicum* var. *indicum* plant, due to its high medicinal and ornamental value, has attracted much attention from researchers in the field of tissue culture. *Chrysanthemum indicum* L. is known as one of the most important ornamental and medicinal plants in the world, which, in addition to ornamental use, is also utilized in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries. Its secondary metabolites such as phenols, flavonoids, and terpenoids play an important role in antioxidant and anti-inflammatory properties. These compounds increase in response to biotic and abiotic stresses. The callus induction process is considered a key stage in breeding and propagation programs, the success of which depends on factors such as the type of explant, culture medium, and plant growth regulators. The use of elicitors such as NaCl under *in vitro* conditions can stimulate the production of secondary metabolites and improve callus growth. Accordingly, the present study was designed with the aim of investigating the callus formation process and evaluating the effects of different concentrations of sodium chloride (NaCl) as a non-biological elicitor under *in vitro* conditions of *Chrysanthemum indicum* var. *indicum*. This study evaluated callus formation, growth, and metabolite production to advance the understanding of salt stress responses on tissue culture of *Chrysanthemum indicum* var. *indicum*.

Method

In this research, two separate experiments were carried out in the plant tissue culture laboratory of Hormozgan University. In the first experiment, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design (CRD) to evaluate the effects of plant growth regulators (PGRs), explant type, and light conditions on callus induction. The MS culture medium was prepared according to the Murashige and Skoog (1962) formula, and the following PGRs treatments were added: control (without PGRs), 1 mg/L NAA + 2 mg/L BAP, 2 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D, and 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D. Leaf and stem explants were cultured under light and dark conditions. After four weeks, the measured traits included percentage of callus induction, time to callus initiation, callus fresh and dry weight, and callus volume. In the second experiment, the effect of different sodium chloride concentrations (0, 50, 100, and 150 mM) was evaluated in a completely randomized design. Physiological and biochemical characteristics of the callus were assessed, including photosynthetic pigments, phenol, flavonoid, anthocyanin, proline, antioxidant activity (DPPH), malondialdehyde (MDA), and the activities of catalase and peroxidase enzymes. Measurements were performed using standard extraction protocols and a spectrophotometer. Data were analyzed using SAS software, and mean comparisons were carried out using Duncan's multiple range test.

Results

The results of this study indicate that the combination of BAP and 2,4-D under light conditions (E_1H_5L) significantly improved callus induction in *Chrysanthemum indicum* var. *indicum*, achieving the highest callus formation percentage and the shortest time to callus formation. This highlights the importance of optimizing growth regulators and environmental conditions for efficient callus induction. The control treatment showed superior performance in terms of biomass accumulation and chlorophyll content, which suggests that under non-stress conditions, the plant can better allocate resources to growth. In contrast, the sodium chloride treatment at 150 mM induced notable stress responses, evidenced by increased antioxidant activity, anthocyanin content, and other biochemical markers, suggesting its potential for enhancing the production of secondary metabolites. This study emphasizes the dual role of hormonal treatments and osmotic stress in enhancing both growth and the accumulation of valuable compounds in plant tissue cultures.

Conclusions

The most effective treatment for callus induction and formation was the combination of leaf explant, 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D, under light conditions, which resulted in the highest callus induction percentage, the shortest time to callus initiation, and the greatest fresh weight, dry weight, and callus volume. The results indicate that sodium chloride elicitor can significantly improve certain biochemical, antioxidant, and metabolic traits. This study shows that under stress conditions,

the level of medicinal metabolites in this plant increases. Therefore, this elicitor can be used as a tool to simulate environmental stresses and stimulate the production of secondary metabolites.

Author Contributions

Y M, Methodology: S M, Software: S M, Validation: S M, Formal analysis: S M, Investigation: S M; Resources: YM, Data curation: Y M and Y A, Writing-original draft preparation: S M, Writing-review and editing: S M, Visualization: S M, Supervision: S M, Project administration: Y M, Funding acquisition: Y M and Y A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Not applicable

Acknowledgements

The authors would like to thank all participants of the present study.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

بررسی تاثیر الیستور NaCl بر فرایند کالوس‌زایی درون شیشه‌ای گیاه داوودی (*Chrysanthemum indicum* var. *indicum*)

چکیده

کشت درون شیشه‌ای و تولید کالوس از ابزارهای مهم در بهبود صفات و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی و تکثیر زینتی به‌شمار می‌رود. گیاه داوودی به دلیل ارزش دارویی و زینتی بالای خود، توجه بسیاری از پژوهشگران را در زمینه کشت بافت به خود جلب کرده است. استفاده از الیستورها نظیر NaCl می‌تواند با القای تنش اسمزی، فرایند کالوس‌زایی و تولید ترکیبات دفاعی را تحت تاثیر قرار دهد. هدف از این پژوهش، بررسی فرایند القای کالوس و تاثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر ویژگی‌های مختلف مورفوفیزیولوژیکی، متابولیکی، بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی کالوس در کشت درون شیشه‌ای گیاه داوودی بود. بذور گیاه داوودی هندی به صورت درون شیشه‌ای کشت شد و از برگ و ساقه گیاهان ریزنمونه تهیه شد. در پژوهش حاضر آزمایش اول به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور نوع ریزنمونه، ترکیب تنظیم کننده رشد و شرایط روشنایی انجام گردید. بالاترین درصد کالوس‌زایی، کمترین زمان تا آغاز کالوس‌زایی و بیشترین وزن تر و خشک کالوس مربوط به ریزنمونه برگ در تیمار ۲ میلی گرم BAP + ۲ میلی گرم 2, 4-D در شرایط روشنایی بود. آزمایش دوم به صورت طرح کاملاً تصادفی برای بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف NaCl (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار) بر ویژگی‌های کالوس انجام شد. بر اساس نتایج تیمار NaCl تاثیر قابل توجهی بر افزایش ویژگی‌های متابولیکی، بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی کالوس داشت. اثر غلظت ۱۵۰ میلی مولار NaCl روی برخی صفات بیوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس معنی دار بود و مقدار متابولیت‌های ثانویه گیاه از جمله فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین را در هنگام تنش افزایش داد. لذا می‌توان از این الیستور به عنوان ابزاری برای شبیه‌سازی تنش‌های محیطی و تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: برانگیزش، کشت بافت گیاهی، ریزنمونه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، متابولیت ثانویه

Abstract

In vitro cultivation and callus production are important tools for trait improvement, secondary metabolite production in medicinal plants, and ornamental propagation *Chrysanthemum indicum* var. *indicum*, due to its high medicinal and ornamental value, has attracted considerable attention from researchers in the field of tissue culture. The use of elicitors such as NaCl can influence callogenesis and the production of defensive compounds by inducing osmotic stress. The aim of this study was to investigate the process of callus induction and the effect of different NaCl concentrations on various morphophysiological, metabolic, biochemical, and antioxidant traits of callus in *in vitro* culture of *Chrysanthemum indicum* var. *indicum*. Seeds of *Chrysanthemum indicum* var. *indicum* were cultured *in vitro*, and explants were prepared from the leaves and stems of the plant. In the present study, the first experiment was conducted factorially in a completely randomized design with three factors: explant type, growth regulator combination, and light conditions. The highest callus induction percentage, the shortest time to callus initiation, and the greatest fresh and dry weight of callus were related to leaf explants treated with 2 mg BAP + 2 mg 2,4-D under light conditions. The second experiment was conducted as a completely randomized design to investigate the effect of different NaCl concentrations (0, 50, 100, and 150 mM) on callus traits. According to the results, NaCl treatment had a significant effect on increasing the metabolic, biochemical, and antioxidant traits of callus. The effect of 150 mM NaCl on some biochemical traits and antioxidant activity of callus was significant, and it increased the amount of secondary metabolites of the plant, including phenols, flavonoids, and anthocyanins, under stress.

Therefore, this elicitor can be used as a tool to simulate environmental stress and stimulate the production of secondary metabolites.

Keywords: antioxidant activity, elicitation, explant, plant tissue culture, secondary metabolite

ویراستای نشده

مقدمه

گل داوودی (*Chrysanthemum Sp.*) به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی و دارویی در سطح جهان شناخته می‌شود. این گیاه به دلیل زیبایی ظاهری، تنوع گسترده رنگ و شکل گل‌ها، طولانی بودن دوره گلدهی، و خواص دارویی از جمله فعالیت‌های ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Liu et al., 2024). افزون بر مصارف زینتی، از عصاره‌های گل داوودی در صنایع داروسازی، آرایشی و غذایی نیز بهره‌برداری می‌شود. به همین دلیل، گسترش کشت و بهبود صفات کیفی این گیاه همواره مورد توجه محققان و تولیدکنندگان بوده است. از مهم‌ترین ویژگی‌های دارویی گل داوودی می‌توان به غنای آن از نظر متابولیت‌های ثانویه همچون فلاونوئیدها، فنل‌ها، ترپنوئیدها و اسانس‌های معطر اشاره کرد (Jiang et al., 2021). این ترکیبات نقش مؤثری در محافظت گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی داشته و در طب سنتی و نوین به عنوان عوامل ضدالتهاب، آنتی‌اکسیدان، ضدسرطان و ضدباکتری به کار می‌روند. علاوه بر آن، برخی از متابولیت‌های ثانویه گل داوودی در بهبود سلامت قلبی-عروقی، کنترل دیابت و افزایش ایمنی بدن مؤثر شناخته شده‌اند (Liang et al., 2020).

از این رو، افزایش تولید این ترکیبات ارزشمند از طریق بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای و تحریک مسیرهای بیوسنتزی توسط محرک‌ها¹ اهمیت ویژه‌ای دارد (Fazili et al., 2022). تولید و کشت گل داوودی با چالش‌های متعددی روبه‌روست که از جمله آن‌ها می‌توان به حساسیت بالا به تنش‌های محیطی مانند شوری و کم‌آبی، وابستگی به شرایط خاص نوری و دمایی برای گلدهی مطلوب، شیوع بیماری‌های قارچی و ویروسی، و محدودیت‌های موجود در روش‌های سنتی تکثیر از طریق قلمه اشاره کرد (Gupta et al., 2021; Spaargaren & van Geest, 2018; Su et al., 2019). این چالش‌ها ضرورت بهره‌گیری از فناوری‌های نوین زیستی، به ویژه کشت بافت گیاهی، را برای تولید انبوه، حفظ تنوع ژنتیکی و ارتقاء صفات مطلوب در گل داوودی پررنگ‌تر کرده‌اند. فرآیند کالوس‌زایی یکی از مراحل بنیادی در برنامه‌های اصلاحی و تکثیری به‌شمار می‌رود (Babich et al., 2020). کالوس می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای باززایی گیاهان، جنین‌زایی سوماتیکی و همچنین مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد. موفقیت در القای کالوس به عوامل متعددی مانند نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGRs)، منبع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و شرایط فیزیکی محیط کشت بستگی دارد (Guo & Jeong, 2021). کاربرد الیستورهای غیرزیستی، مانند کلرید سدیم (NaCl)، در کشت‌های درون شیشه‌ای به عنوان ابزاری برای شبیه‌سازی تنش‌های محیطی و تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه اهمیت فزاینده‌ای یافته است (Hawrylak-Nowak et al., 2021). الیستورها می‌توانند با القای پاسخ‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی در ریزنمونه‌ها، موجب بهبود ویژگی‌های کمی و کیفی کالوس شوند. کلرید سدیم (NaCl) به عنوان یکی از الیستورهای غیرزیستی مؤثر، نقش مهمی در تحریک پاسخ‌های دفاعی گیاهان ایفا می‌کند. این ترکیب با ایجاد تنش شوری، موجب اختلال در تعادل اسمزی، تغییرات یونی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که خود به فعال‌سازی مسیرهای دفاعی و تولید متابولیت‌های ثانویه منجر می‌گردد (Hasanuzzaman et al., 2021; Hawrylak-Nowak et al., 2021). بررسی بهینه‌سازی کالوس‌زایی و اثر NaCl به عنوان الیستور بر فرآیند کالوس‌زایی و تولید متابولیت‌های ثانویه در گل داوودی، می‌تواند به ارتقای درک از مکانیسم‌های پاسخ به تنش و بهینه‌سازی روش‌های کشت بافت کمک کند (Yan Yu et al., 2019). با وجود اهمیت شناخته شده شوری در تعدیل پاسخ‌های گیاهی، تحقیقات مستقیمی که به بررسی اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر القا و رشد کالوس در گل داوودی پرداخته باشند، وجود ندارد. شناخت دقیق اثرات این الیستور بر تغییرات مقدار رشد و ویژگی‌های فیزیولوژیکی کالوس، مقدار زیست‌توده و سطح تولید متابولیت‌های ارزشمند، می‌تواند به تدوین پروتکل‌های بهینه کشت بافت و ارتقای بهره‌وری در تولید تجاری این گیاه منجر شود. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف بررسی فرآیند تشکیل کالوس و ارزیابی اثرات غلظت‌های مختلف کلرید سدیم به عنوان الیستور غیرزیستی در شرایط درون شیشه‌ای گل داوودی طراحی شده است. در این تحقیق، با سنجش شاخص‌هایی نظیر درصد القای کالوس، وزن تر و خشک کالوس، ویژگی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و میزان تولید برخی متابولیت‌های ثانویه، تلاش شده است گامی در راستای توسعه دانش فیزیولوژی و بیوتکنولوژی تنش در کشت بافت گل داوودی و بهینه‌سازی کاربردهای آن برداشته شود.

¹ Elicitors

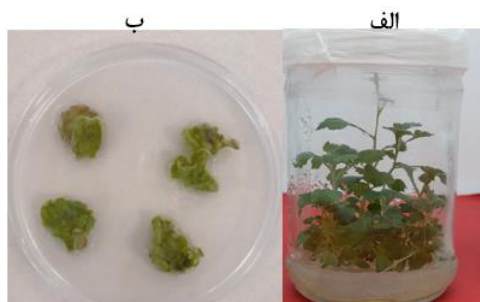
پیشینه پژوهش

کشت بافت گیاهی به دوره هابرلند (۱۹۴۵-۱۸۵۴) بازمی‌گردد (Bonner, 1936) و در دهه‌های ۱۹۴۰ تا ۱۹۶۰ با پیشرفت‌های فنی، زمینه‌ساز مطالعات سلولی و کاربردهایی چون تولید گیاهان عاری از بیماری و ذخیره ژرم پلاسما شد. از دهه ۱۹۶۰ به بعد، با گسترش فناوری‌های مبتنی بر ژن، روش‌های نوینی مانند کشت کالوس برای تولید متابولیت‌های ثانویه توسعه یافت (Thorpe, 2007). در خصوص تاثیر الیستورهای غیر زیستی در کشت درون شیشه‌ای گزارشات متعددی وجود دارد. به‌طور مثال پژوهشی با هدف بررسی اثر دو الیستور غیرزیستی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه و فعالیت زیستی در کشت درون شیشه‌ای *Artemisia arborescens* در سال ۲۰۲۲ انجام شد (Rejeb et al., 2022). در این مطالعه، از الیستور غیرزیستی NaCl و KCl برای تحریک مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات مفید گیاه استفاده شد. نتایج نشان داد که الیستور موجب افزایش قابل توجهی در تولید ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی شد. همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل به طور چشمگیری افزایش یافت. این یافته‌ها نشان داد که استفاده از الیستورها می‌تواند روشی مؤثر برای بهبود تولید ترکیبات دارویی در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی باشد. تحقیقی در سال ۲۰۲۱ با هدف بررسی اثر القای تنش شوری با استفاده از کلرید سدیم (NaCl) بر گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) انجام شد. گیاهان در معرض سطوح مختلف شوری قرار گرفتند تا پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن‌ها ارزیابی شود. نتایج نشان داد که اگرچه تنش شوری باعث کاهش رشد گیاه شد، اما به‌طور قابل توجهی مقدار ترکیبات فنولی مانند فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک افزایش یافت. همچنین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان تیمار شده بیشتر شد که نشان‌دهنده سازوکار دفاعی گیاه در برابر تنش بود. در نهایت، پژوهش نتیجه گرفت که اعمال تنش شوری کنترل شده می‌تواند راهکار مؤثری برای افزایش ترکیبات زیست‌فعال در گیاهان دارویی باشد (Hawrylak-Nowak et al., 2021). در سال ۲۰۱۹ پژوهشی به‌منظور بررسی تأثیر تنش خشکی القاشده با پلی‌اتیلن گلیکول^۱ (PEG) بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه آویشن در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام شد. در این مطالعه، گیاهان در محیط کشت حاوی سطوح مختلف PEG قرار گرفتند تا واکنش آن‌ها نسبت به شرایط تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت PEG موجب کاهش رشد ریشه، شاخه و وزن تر گیاهچه‌ها شد، در حالی که شاخص‌های تنش مانند محتوای پرولین افزایش یافت (Razavizadeh et al., 2019). در سال ۲۰۲۳ Maqbool و همکاران افزایش تولید متابولیت‌های فعال بیولوژیکی در کشت کالوس *Aerva sanguinolenta* را از طریق الیستورهای نانوذرات نقره و سالیسیلیک اسید مورد بررسی قرار دادند. تمامی تیمارهایی اعمال شده به‌طور معنی‌داری تولید متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی، محتویات فنلی و فلاونوئیدی کل را نسبت به شاهد افزایش دادند (Maqbool et al., 2023). در سال ۲۰۲۰ Sharifi-Rad و همکاران اثر الیستورهای غیر زیستی (جاسمونات و نانوذرات اکسید روی) را روی برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی *Momordica charantia* L. بررسی نمودند. متابولیت‌های ثانویه شامل فنل، فلاونوئید و کاروتنوئید و همینطور کربوهیدرات و محتوی پرولین به‌طور معنی‌داری با استفاده از الیستورها افزایش یافت. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گویاکول پراکسیداز نیز افزایش یافت (Sharifi-Rad et al., 2020).

روش‌شناسی پژوهش

این تحقیق در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه هرمزگان انجام شد. بذور داوودی (*Chrysanthemum indicum* var. *indicum*) مورد استفاده در این پژوهش از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. جهت ضدعفونی مواد گیاهی و کشت بذر، تیمار با قارچ کش بنومیل ۱۰٪ (۵ دقیقه)، اتانول ۷۰٪ (۱ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۱٪ (۱۵ دقیقه) انجام شد. سپس نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شست و شو شدند و روی محیط کشت موراشیگ و اسکوک (MS) قرار گرفتند. پس از گذشت یک ماه، ریزنمونه‌های برگ و ساقه جوان با اندازه یک سانتی‌متر در یک سانتی‌متر برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب و استفاده شدند (شکل ۱- الف).

¹ Poly Ethylene Glycol



شکل ۱. الف) بذور جوانه زده روی محیط کشت MS ب) کالوس به دست آمده از ریزنمونه برگ در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر BAP + میلی گرم در لیتر 2,4-D در شرایط روشنایی (E₁H₅L)

به منظور دستیابی به اهداف پژوهش، دو آزمایش مجزا طراحی و اجرا گردید. در آزمایش اول، به منظور بررسی تأثیر نوع ریزنمونه، شرایط روشنایی و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر القای کالوس، محیط کشت MS مطابق با دستورالعمل موراشیک و اسکوگ تهیه (Murashige & Skoog, 1962) و تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشد شامل 2,4-D، NAA و BAP به محیط کشت اضافه گردید. برای تهیه محلول مادری 2,4-D و NAA، مقدار ۱۰ میلی گرم از هر یک با چند قطره اتانول ۹۶ درصد در مقداری آب دوبار تقطیر حل شده و حجم آن به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. همچنین، برای تهیه محلول مادری BAP، با حل کردن ۱۰ میلی گرم BAP در چند قطره سود و مقداری آب دوبار تقطیر تهیه شده، حجم آن به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و دو ریز نمونه در هر تکرار انجام شد. فاکتورها شامل نوع تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی در ۵ سطح (H₁ تا H₅)، نوع ریزنمونه (E₁ تا E₂) با ۲ سطح و شرایط نوری در ۲ سطح (روشنایی و تاریکی) بود. در این آزمایش ریزنمونه های برگ و ساقه به ترتیب با کدهای E₁ و E₂، تیمارهای تنظیم کننده رشد گیاهی شاهد، ۱ میلی گرم در لیتر NAA + ۲ میلی گرم در لیتر BAP، ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D با کدهای H₁ تا H₅ و شرایط نوری با کدهای L (روشنایی) و D (تاریکی) مشخص گردید. در جدول ۱ کدهای مربوط به نوع تیمار هورمونی، ریزنمونه و شرایط نوری ذکر شده است (جدول ۱). پس از چهار هفته، درصد القای کالوس، زمان آغاز کالوس زایی، وزن تر، خشک و حجم کالوس اندازه گیری شد. برای بررسی کالوس زایی، نسبت تعداد نمونه های کالوس زایی شده به کل نمونه های کشت شده به عنوان درصد کالوس زایی محاسبه شد. زمان تا آغاز کالوس زایی نیز به عنوان مدت زمان سپری شده از زمان کشت نمونه ها تا شروع تشکیل کالوس اندازه گیری گردید. وزن تر و وزن خشک کالوس با استفاده از ترازوی آنالیتیکال بر حسب گرم ثبت شد. علاوه بر این، حجم کالوس براساس روش ارشمیدس، با غوطه ور کردن نمونه ها در مایع و اندازه گیری حجم مایع جابه جا شده، تعیین گردید.

جدول ۱. نوع تیمار هورمونی، ریزنمونه و شرایط نوری

شرایط نوری				تنظیم کننده رشد گیاهی (میلی گرم در لیتر)		
روشنایی		تاریکی		BAP	2,4-D	NAA
ساقه	برگ	ساقه	برگ			
E ₂ H ₁ L	E ₁ H ₁ L	E ₂ H ₁ D	E ₁ H ₁ D	۰	۰	۰
E ₂ H ₂ L	E ₁ H ₂ L	E ₂ H ₂ D	E ₁ H ₂ D	۲	۰	۱
E ₂ H ₃ L	E ₁ H ₃ L	E ₂ H ₃ D	E ₁ H ₃ D	۰	۲	۰
E ₂ H ₄ L	E ₁ H ₄ L	E ₂ H ₄ D	E ₁ H ₄ D	۰/۲	۰.۵	۰
E ₂ H ₅ L	E ₁ H ₅ L	E ₂ H ₅ D	E ₁ H ₅ D	۲	۲	۰

در آزمایش دوم، تاثیر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) شامل ۰ (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار بر کالوس های حاصل از تیمار بهینه تنظیم کننده رشد (۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 4-D) در آزمایش اول مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. برای تهیه الیسیاتور کلرید سدیم، ابتدا محلول پایه کلرید سدیم ۰/۱ مولار تهیه شد. برای این کار، مقدار مورد نیاز کلرید سدیم محاسبه و در آب مقطر حل شد. سپس کلرید سدیم با غلظت های مورد نظر به محیط کشت پایه حاوی ریزنمونه برگ اضافه گردید. در نهایت تاثیر الیسیاتور کلرید سدیم بر ویژگی های مختلف کالوس پس از ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

برای تعیین مقدار رنگیزه های فتوسنتزی، ۲۰۰ میلی گرم از بافت کالوس برداشت شده برای استخراج استفاده گردید. نمونه های برداشت شده در فالتون قرار داده شد و حدود ۱۰ میلی لیتر برای هر نمونه استون ۸۰٪ اضافه شد. لوله ها در یخ قرار داده و با استفاده از همزن به مدت ۳۰ دقیقه هم زده تا کلروفیل ها و کاروتنوئید از بافت کالوس استخراج شد. پس از اتمام همزدن، محلول حاصل را جدا کرده و از یک فیلتر عبور داده شد تا هر گونه ذرات باقیمانده جدا شود. محلول فیلتر شده در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داد شد. ابتدا متانول به عنوان شاهد کالیبره شد. سپس جذب نور برای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید به ترتیب در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۸۰ نانومتر خوانش شد (Hemphill & Venketeswaran, 1978). برای اندازه گیری مقدار فنول از روش فولین-سیوکالتو استفاده گردید. بدین منظور ۰/۵ میلی لیتر محلول اتانولی عصاره با غلظت ۰/۳۲ میلی گرم در میلی لیتر، ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر فولین-سیوکالتو با هم مخلوط شدند. پس از ۵ دقیقه، ۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط اضافه شد. پس از گذشت ۱ تا ۱/۵ ساعت میزان جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فلاونوئید با برخی تغییرات با توجه به روش Chang و همکاران (۲۰۰۲)، اندازه گیری شد. برای این کار، ۱۰۰ میکرولیتر از استات پتاسیم ۱ مولار، ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) کلرید آلومینیوم و عصاره خام تا ۳ میلی لیتر با آب مقطر در یک لوله سنجش تهیه گردید. پس از ۴۵ دقیقه آنکوباسیون در شرایط تاریک در دمای اتاق، جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد (Chang et al., 2002). توانایی مهار آنتی اکسیدان ها نسبت به رادیکال DPPH پایدار با توجه به روش (Materska & Perucka, 2005) با برخی تغییرات اندازه گیری شد، مخلوط واکنش حاوی ۳/۹ میلی لیتر محلول DPPH ساخته شده در ۹۵ درصد (v/v) متانول و ۰/۱ میلی لیتر از عصاره بود. محلول به مدت ۳۰ دقیقه آنکوبه شد و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری شد. سطح پراکسیداسیون لیپیدها براساس میزان مالون دی آلدئید (MDA) اندازه گیری شد که با استفاده از روش هیت پکر تعیین گردید (Heath & Packer, 1968). برای استخراج آنتوسیانین ها، حدود ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به فالتون اضافه شد. سپس فالتون ها در یخچال به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و به طور منظم هم زده شد. پس از زمان استخراج، محلول فیلتر شد تا ذرات باقیمانده از مایع جدا شوند. برای تثبیت رنگ آنتوسیانین ها، به محلول استخراجی ۱ میلی لیتر 1M HCl اضافه شد. محلول فیلتر شده و اسیدی شده را در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد. دستگاه را با همان حلال ۸۰ درصد کالیبره شد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانش شد (Bürkle et al., 2018). محتوای پرولین طبق روش بیتس تعیین شد (Bates et al., 1973). فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) طبق روش Abai (۱۹۸۴) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7) حاوی ۰/۲ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۱٪ و ۰/۳ میلی لیتر عصاره بود. فعالیت کاتالاز به عنوان کاهش جذب در ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد (Aebi, 1984). برای سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش (Serrano-Martínez et al., 2008) استفاده شد. برای سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز شامل سه میلی لیتر بافر فسفات pH=7 ۵۰ میلی مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد، ۳ میکرولیتر محلول گایاکول ۲۰۰ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فواصل ۲۰ ثانیه ای به مدت سه دقیقه برای مقدار جذب و قرائت تعیین شد. فعالیت ویژه این آنزیم توسط H₂O₂ تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین محاسبه شد و در فواصل ۱۰ ثانیه به مدت یک دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil CE2501 انگلستان) خوانده شد.

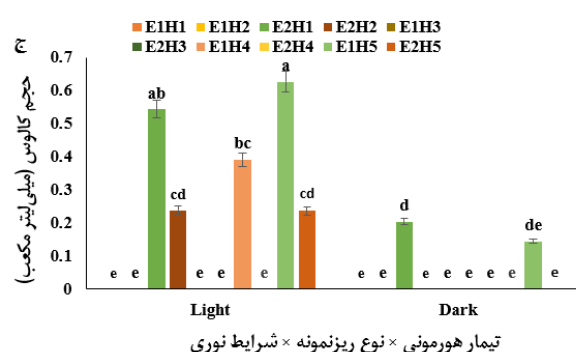
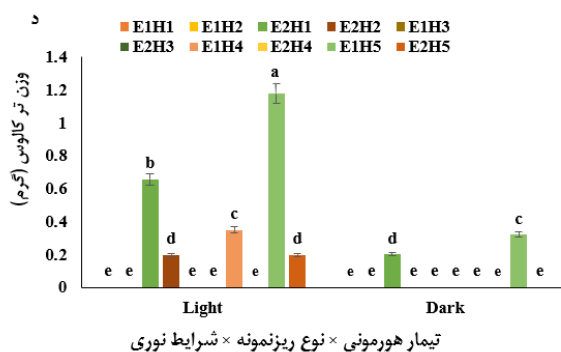
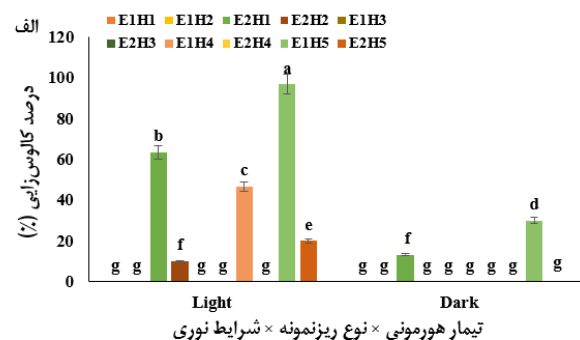
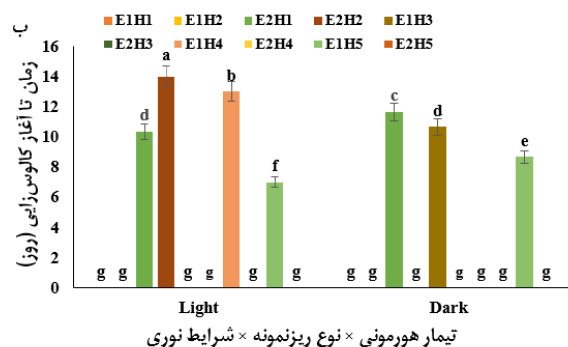
آنالیز آماری

در نهایت پس از داده برداری، برای آنالیز داده ها از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ و برای رسم نمودار از Excel استفاده شد. برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

یافته‌های پژوهش

بررسی تاثیر تنظیم کنند رشد گیاهی، نوع ریزنمونه و شرایط نوری بر صفات مختلف کالوس

پس از کشت بذر و جوانه‌زنی بذور روی محیط کشت (MS) (شکل ۱-الف) از برگ و ساقه گیاهان درون شیشه‌ای به‌منظور کالوس‌زایی استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس حاکی از معنی‌دار بودن اثر متقابل تنظیم کنند رشد گیاهی، نوع ریزنمونه و شرایط نوری در سطح احتمال یک درصد می‌باشد به همین علت نمودار اثر سه گانه رسم شد. بالاترین درصد کالوس‌زایی به‌میزان ۹۶/۶۶ درصد در تیمار E_1H_5L (برگ، ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D در شرایط روشنایی) مشاهده شد (شکل ۱-ب و شکل ۲-الف). بر برخی تیمارها هیچ گونه کالوسی تشکیل نشد (شکل ۲-الف). کمترین زمان تا آغاز کالوس‌زایی نیز در تیمار E_1H_5L (برگ، ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D، روشنایی) مشاهده شد (شکل ۲-ب). برطبق نتایج بیشترین افزایش معنی‌دار حجم کالوس توسط تیمار E_1H_5L (برگ، ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D، روشنایی) گزارش گردید (شکل ۲-ج). وزن کالوس در تیمار E_1H_5L (برگ، ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D، روشنایی) نیز افزایش معنادار داشت (شکل ۲-د).



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کنند رشد گیاهی، ریزنمونه و شرایط نوری بر درصد کالوس‌زایی (الف)، زمان تا آغاز کالوس‌زایی (ب)، حجم کالوس (ج) و وزن تر کالوس (د) گیاه داوودی (*Chrysanthemum indicum* var. *indicum*)، E_1H_1 (ریزنمونه برگ، شاهد)، E_1H_2 (ریزنمونه برگ، ۱ میلی گرم در لیتر NAA + ۲ میلی گرم در لیتر BAP)، E_2H_1 (ریزنمونه ساقه، شاهد)، E_2H_2 (ریزنمونه ساقه، ۱ میلی گرم در لیتر NAA + ۲ میلی گرم در لیتر BAP)، E_1H_3 (ریزنمونه برگ، ۰/۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D)، E_2H_3 (ریزنمونه ساقه، ۰/۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D)، E_1H_4 (ریزنمونه برگ، ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D)، E_2H_4 (ریزنمونه ساقه، ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D)، E_1H_5 (ریزنمونه برگ، ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D)، E_2H_5 (ریزنمونه ساقه، ۲ میلی گرم در لیتر BAP + ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D). میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خط نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

بررسی تاثیر الیستور NaCl روی ویژگی‌های مختلف کالوس

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر الیستور NaCl بر صفات کالوس گیاه داوودی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر الیستور کلرید سدیم بر صفات مورفیزبولوژیکی، متابولیکی و آنتی اکسیدانی کالوس گیاه داوودی (*، **، NS به ترتیب در سطح احتمال ۵، ۱ درصد و غیرمعنی دار)

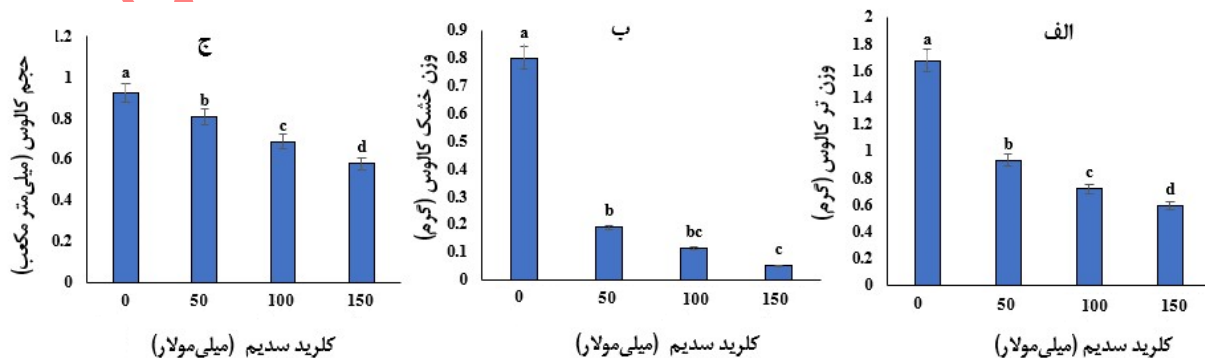
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	حجم کالوس	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	فنل	فلاونوئید	آنتی اکسیدان
کلرید سدیم	۳	۰/۷۰۵**	۰/۳۵۷**	۰/۰۶۶**	۲۰/۹۹**	۱۱/۴۰**	۰/۰۸۶۴**	۳/۲۰**	۸۲/۹۳**	۱۸۰/۲۶**
خطای آزمایش	۸	۰/۰۰۱۸۳	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۰۶۲۷	۰/۰۷۹۱	۰/۰۹۵۵	۰/۰۰۴۷	۰/۶۰۳	۰/۱۲۲	۰/۲۰۴
ضرب تغییرات (%)	-	۴/۳۵	۱۸/۴۵	۳/۳۴	۲/۶۹	۴/۷۶	۹/۵۹	۱/۵۸	۱/۲۱	۰/۹۱۵

وزن تر کالوس

نتایج نشان داد میانگین وزن تر کالوس پس از ۱۰ روز، در تیمار شاهد برابر با ۱/۶۷۹ گرم بود. با افزایش غلظت NaCl، کاهش قابل توجهی در وزن تر کالوس مشاهده شد. در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی مولار (NaCl₁)، وزن تر کالوس به ۰/۹۳۴ گرم کاهش یافت که معادل ۴۴/۳۹٪ کاهش نسبت به شاهد بود. در تیمار NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی مولار (NaCl₂)، این مقدار به ۰/۷۲۲ گرم رسید که نشان دهنده ۵۶/۹۸٪ کاهش است. بیشترین کاهش وزن تر کالوس در تیمار NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی مولار (NaCl₃) با مقدار ۰/۵۹۵ گرم ثبت شد، که برابر با ۶۴/۵۴٪ کاهش نسبت به تیمار شاهد بود (شکل ۳-الف).

وزن خشک کالوس و حجم کالوس

در تیمار شاهد، میانگین وزن خشک کالوس برابر با ۰/۸۰۰ گرم اندازه گیری شد. با افزایش غلظت NaCl، کاهش قابل توجهی در وزن خشک کالوس مشاهده گردید. تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی مولار (NaCl₁) وزن خشک کالوس برابر با ۰/۱۸۹ گرم بود که در مقایسه با شاهد ۷۶/۳۷ درصد کاهش را داشت. در تیمار NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی مولار (NaCl₂)، این کاهش برابر ۸۵/۶۲٪ بود و وزن خشک کالوس به ۰/۱۱۵ گرم کاهش یافت. بیشترین کاهش وزن خشک کالوس در تیمار NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی مولار (NaCl₃) مشاهده شد، به طوری که وزن خشک کالوس به ۰/۰۵۲۳ گرم رسید که معادل ۹۳/۴۶٪ کاهش نسبت به شاهد بود (شکل ۳-ب). میانگین حجم کالوس در تیمار شاهد برابر ۰/۹۲۳ میلی متر مکعب بود. با افزایش غلظت NaCl، کاهش تدریجی در حجم کالوس مشاهده شد. در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی مولار (NaCl₁) (۰/۸۰۷ میلی متر مکعب)، کاهش حجم کالوس نسبت به شاهد ۱۲/۵۷٪ بود. این کاهش در تیمار NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی مولار (NaCl₂) (۰/۶۸۷ میلی متر مکعب) به ۲۵/۵۶٪ و در تیمار NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی مولار (NaCl₃) (۰/۵۸۰ میلی متر مکعب) به ۳۷/۱۷٪ رسید (شکل ۳-ج).



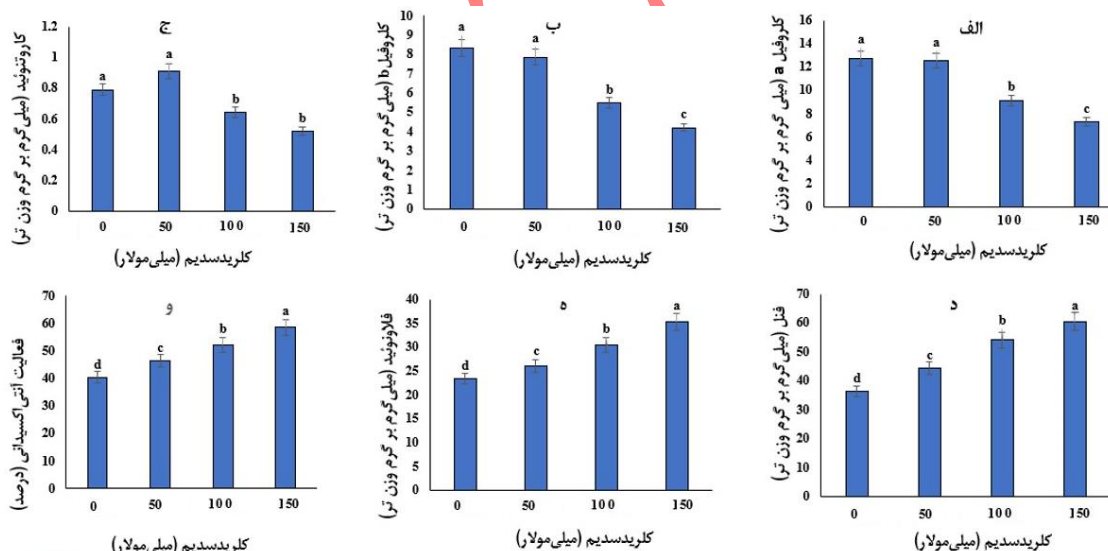
شکل ۳. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف الیستور کلریدسديم بر وزن تر (الف)، خشک (ب) و حجم کالوس برگ (ج) داوودی (*Chrysanthemum indicum* var. *indicum*). H، تنظیم کننده رشد، E، ریزنمونه. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

اثر الیستور کلرید سديم بر صفات فیزیولوژیکی، متابولیتی و آنتی‌اکسیدانی

براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر الیستور کلرید سديم بر صفات فیزیولوژیکی، متابولیتی و آنتی‌اکسیدانی کالوس گیاه داوودی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

کلروفیل a و b

نتایج نشان داد که کلروفیل a در تیمارهای مختلف NaCl کاهش معنادار نسبت به شاهد داشت. مقدار کلروفیل a در تیمار شاهد ۱۲/۷۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود. تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl_1)، مقدار کلروفیل a را به ۱۲/۵۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر کاهش داد که تنها ۱/۵۷٪ کاهش را نسبت به شاهد نشان داد. با این حال، تیمار NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (NaCl_2) مقدار کلروفیل a را به ۹/۱۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر کاهش داد که معادل ۲۸/۰۱٪ کاهش نسبت به شاهد بود. تیمار NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl_3) کمترین میزان کلروفیل a را با مقدار ۷/۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر داشت که ۴۲/۵۵٪ کاهش نسبت به شاهد را نشان داد (شکل ۴-الف). براساس نتایج داده‌ها میزان کلروفیل b در تیمارهای مختلف NaCl نسبت به شاهد کاهش یافت. میانگین کلروفیل b در تیمار شاهد ۸/۳۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود. تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl_1) با مقدار ۷/۸۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر کاهش ۵/۵۱٪ نسبت به شاهد نشان داد. در تیمار NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (NaCl_2)، میزان کلروفیل b به ۵/۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر کاهش یافت که بیانگر ۳۳/۹۸٪ کاهش نسبت به شاهد بود. همچنین، تیمار NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl_3) کمترین میزان کلروفیل b را با مقدار ۴/۲۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر نشان داد که ۴۹/۳۴٪ کاهش نسبت به شاهد داشت (شکل ۴-ب).



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف الیستور کلریدسديم بر کلروفیل a (الف)، b (ب)، کاروتنوئید (ج)، فنل (د)، فلاونوئید (ه) و آنتی‌اکسیدان (و) کالوس برگ داوودی (*Chrysanthemum indicum* var. *indicum*). H، تنظیم کننده رشد، E، ریزنمونه. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

کاروتنوئید

نتایج نشان داد که مقدار کاروتنوئید در تیمارهای مختلف NaCl تغییرات معنادار نسبت به شاهد داشت. میانگین کاروتنوئید در تیمار شاهد ۰/۷۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود. تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl_1) با مقدار ۰/۹۱۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر افزایش برابر ۱۵/۳۲٪ نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۴-ج). این افزایش احتمالاً به دلیل تاثیر مثبت غلظت پایین در

تحریک تولید کاروتنوئیدها به عنوان بخشی از پاسخ دفاعی گیاه بوده است. در مقابل، تیمارهای NaCl با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl₂ و NaCl₃) با مقادیر ۰/۵۴۴ و ۰/۵۲۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر کاهش‌هایی برابر با ۱۸/۴۸٪ و ۳۴/۰۵٪ نسبت به شاهد داشتند (شکل ۴-ج).

فصل و فلاونوئید

بررسی نتایج نشان داد که میزان فصل در نمونه‌های تیمار شده با NaCl نسبت به شاهد به طور معناداری افزایش یافت. در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl₁)، میزان فصل ۴۴/۳۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر نسبت به شاهد ۳۶/۳۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر افزایش یافت. این میزان افزایش در تیمارهای NaCl با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl₂ و NaCl₃) به ترتیب به ۵۴/۱۵ و ۶۰/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید (شکل ۴-د). نتایج نشان داد که میزان فلاونوئیدها در گیاهان تیمار شده با NaCl به طور معناداری افزایش یافت. در تیمار کلرید سدیم با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl₁)، فلاونوئیدها ۲۶/۰۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر نسبت به شاهد (۲۳/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) افزایش یافتند. در تیمارهای NaCl با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl₂ و NaCl₃) این افزایش به ترتیب به ۳۰/۴۱ و ۳۵/۳۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید (شکل ۴-ه).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

در این مطالعه نتایج نشان داد که تیمار NaCl موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان شد. به طوری که در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl₁) میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۴۶/۳۹ درصد نسبت به شاهد (۴۰/۴۳ درصد) افزایش یافت. در تیمارهای NaCl با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl₂ و NaCl₃) این افزایش به ترتیب ۵۲/۲۸ و ۵۸/۴۸ درصد رسید (شکل ۴-و).

اثر الیستور NaCl بر صفات بیوشیمیایی گیاه داوودی

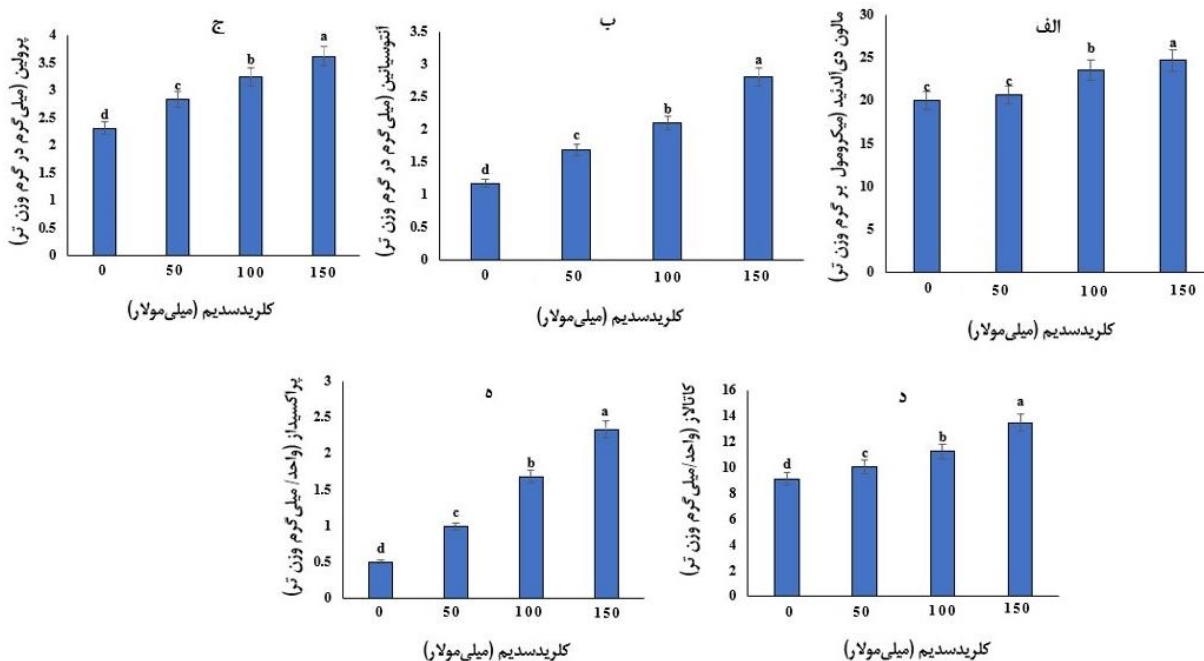
بر طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر الیستور NaCl بر صفات بیوشیمیایی گیاه داوودی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۳).

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر الیستور کلرید سدیم بر صفات بیوشیمیایی کالوس گیاه داوودی (*، **، ns به ترتیب در سطح احتمال ۵، ۱ درصد و غیرمعنی‌دار)

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
پراکسیداز	کاتالاز	پرولین	آنتوسیانین	مالون دی		
۱/۹۳**	۱۰/۶۴**	۰/۹۴۰**	۱/۴۳**	۱۵/۰۲**	۳	کلرید سدیم
۰/۰۶۷۵	۰/۰۱۲۳	۰/۰۳۳۴	۰/۰۰۸۷	۰/۱۳۱	۸	خطای آزمایش
۱۸/۸۶	۱/۰۱	۶/۰۷	۴/۷۹	۱/۶۲	-	ضریب تغییرات (%)

مالون دی‌آلدئید

همانطور که در نتایج مشاهده می‌شود، تیمار NaCl موجب افزایش MDA در گیاهان شد که این افزایش در تیمارهای با غلظت بالاتر NaCl بیشتر بوده است. در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl₁)، میزان ۲۰/۷۲ میکرومول بر گرم وزن تر MDA بیشتر از شاهد (۲۰/۰۵ میکرومول بر گرم وزن تر) بود، در حالی که در تیمارهای کلرید سدیم با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl₂ و NaCl₃) این افزایش به ترتیب ۲۳/۶۲ و ۲۴/۶۹ میکرومول بر گرم وزن تر رسید (شکل ۵-الف). MDA به عنوان یک نشانگر آسیب‌های اکسیداتیو در گیاهان شناخته می‌شود (Jadoon & Malik, 2017).



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف الیستور کلرید سدیم بر مالون دی‌آلدئید (الف)، آنتوسیانین (ب)، پرولین (ج)، کاتالاز (د)، پراکسیداز (و) کالوس برگ داوودی (*Chrysanthemum indicum* var. *indicum*). H، تنظیم کننده رشد، E، ریزنمونه. میانگین حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

آنتوسیانین و پرولین

براساس نتایج این مطالعه تغییرات معنادار مقدار آنتوسیانین تحت تیمارهای مختلف NaCl در مقایسه با شاهد مشاهده شد. همانطور که در شکل ۵- ب مشاهده می‌شود، تیمارهای NaCl موجب افزایش قابل توجه میزان آنتوسیانین در گیاهان شدند. در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl_1)، میزان آنتوسیانین نسبت به شاهد افزایش یافت و این تغییر در تیمارهای NaCl با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl_2 و NaCl_3) به‌طور قابل توجهی بیشتر بود (شکل ۵- ب). این افزایش به‌ویژه در تیمار NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl_3) چشمگیر است که میزان آنتوسیانین در این تیمار بیش از ۲/۸۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر نسبت به شاهد (۱/۱۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر) افزایش یافته است. افزایش معنادار میزان پرولین در پاسخ به تیمارهای مختلف NaCl نسبت به شاهد مشاهده شد. در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl_1)، میزان پرولین ۲/۸۴ میلی‌گرم در گرم وزن تر بیشتر از شاهد (۲/۳۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر) بود. در تیمار NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (NaCl_2)، این افزایش به ۳/۲۴ میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید و در تیمار کلرید سدیم با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl_3)، بیشترین افزایش ۳/۶۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۵- ج).

کاتالاز و پراکسیداز

نتایج نشان‌دهنده‌ی افزایش معنادار فعالیت آنزیم کاتالاز در پاسخ به تیمارهای NaCl نسبت به شاهد است. در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl_1)، فعالیت کاتالاز ۱۰/۰۵ واحد بر میلی‌گرم وزن تر نسبت به شاهد (۹/۱۵ واحد بر میلی‌گرم وزن تر) افزایش یافت. در تیمار NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (NaCl_2)، این افزایش به ۱۱/۲۶ واحد بر میلی‌گرم وزن تر رسید در تیمار NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl_3)، بیشترین افزایش معادل ۱۳/۵۰ واحد بر میلی‌گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۵- د). با محاسبه درصد تغییرات فعالیت پراکسیداز نسبت به شاهد، نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت NaCl، فعالیت این آنزیم به‌طور معناداری افزایش یافته است. در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl_1)، فعالیت پراکسیداز ۰/۹۹۱ واحد بر میلی‌گرم وزن تر بیشتر از گروه شاهد (۰/۴۹۸ واحد بر میلی‌گرم وزن تر) بود. در تیمار NaCl با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (NaCl_2) این مقدار به ۱/۶۸ واحد بر میلی‌گرم وزن تر افزایش یافت و در تیمار NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl_3)، افزایش چشمگیر ۲/۳۳ واحد بر میلی‌گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۵- ه).

بحث

افزایش درصد کالوس‌زایی ممکن است ناشی از تعادل مؤثر بین اکسین مصنوعی 2,4-D و سیتوکینین BAP باشد (Guo et al., 2011). استفاده از برگ به‌عنوان ریزنمونه به‌دلیل داشتن سلول‌های مریستمی بیشتر و حساسیت بالاتر به تنظیم‌کننده‌های رشد، موجب افزایش درصد کالوس‌زایی در این تیمار شد (André et al., 2015). همچنین، وجود شرایط نوری مناسب (روشنایی) احتمالاً با افزایش فتوسنتز و تولید متابولیت‌های ثانویه، محیطی مطلوب برای رشد کالوس فراهم کرد (Kapoor et al., 2018). در پژوهشی غلظت ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D به‌عنوان ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی بهینه برای تولید بیشترین کالوس در گیاه زنیان شناسایی گردید (Fazeli-Nasab, 2018). در مطالعه‌ای دیگر، استفاده از ترکیب این دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی روی گیاه *Hymenocallis littoralis*، بالاترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد نمود (Sundarasekar et al., 2012).

افزایش زمان تا آغاز کالوس‌زایی در تیمار E_2H_2L می‌تواند ناشی از تأثیر متقابل نوع بافت، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و شرایط نوری باشد (Zhou et al., 2018). در پژوهشی، سریع‌ترین زمان برای القای کالوس در برگ *Piper betle L.* با افزودن ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. همچنین در پژوهشی، استفاده از محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP برای گیاه *Allium hirtifolium* منجر به کاهش زمان آغاز کالوس‌زایی شد (Farhadi et al., 2017).

افزایش وزن تر کالوس ناشی از اثر هم‌افزایی سیتوکینین (BAP) و اکسین (2, 4-D) در تحریک تقسیم سلولی و رشد کالوس است (Bano et al., 2022). افزایش وزن تر کالوس در تیمار E_1H_5L که در شرایط روشنایی قرار داشت، احتمالاً به‌دلیل تأثیر نور بر تنظیم متابولیسم، تعادل هورمونی و افزایش تقسیم سلولی بود (Ya Yu et al., 2019). نور با بهبود فتوسنتز و تأمین انرژی، رشد سلول‌های کالوس را تقویت کرده و می‌تواند از طریق تنظیم هورمون‌هایی مانند سیتوکینین و اکسین، مسیرهای تقسیم سلولی را فعال‌تر کند (Cavallaro et al., 2022). برگ‌ها دارای مقدار بیشتری از هورمون‌های گیاهی، متابولیت‌های اولیه و ثانویه، و ذخایر کربوهیدراتی هستند که می‌توانند رشد و تقسیم سلولی را در کالوس‌زایی تقویت کنند. علاوه بر این، برگ‌ها معمولاً سلول‌های مریستمی فعال‌تری نسبت به ساقه دارند، که منجر به تکثیر سریع‌تر سلولی و افزایش زیست توده کالوس می‌شود (Khan et al., 2018). در مطالعه‌ای گزارش شده که بیشترین وزن کالوس در شرایط روشنایی و با استفاده از ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D و BAP به‌دست آمد (Puad et al., 2024). نتایج مطالعه‌ای دیگری (Arofah et al., 2021) نیز حاکی از آن بود که افزودن ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP و 2,4-D به محیط کشت، رشد کالوس برگ‌های گیاه *Piper retrofractum* را بهبود بخشید.

افزایش حجم کالوس در این تیمار به‌دلیل ترکیب اثرات هم‌زمان تنظیم‌کننده رشد گیاهی و شرایط محیطی است (André et al., 2015). این ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی باعث تسریع رشد کالوس و افزایش حجم آن می‌شود (Mayerni et al., 2020). علاوه بر این، روشنایی به‌عنوان یک عامل محیطی مؤثر می‌تواند فرآیندهای متابولیکی و بیوشیمیایی لازم برای رشد بهینه کالوس را تحریک کرده و در نهایت به افزایش حجم آن کمک کند. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ توسط تشوم و همکاران انجام شد، نشان داد که بیشترین مقدار القای کالوس در گیاه *Glinus lotoides* در محیط کشت حاوی 2, 4-D همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP به‌دست آمد که این ترکیبات باعث افزایش قابل توجه حجم کالوس شدند (Teshome & Feyissa, 2015).

کاهش وزن تر کالوس در شرایط تنش شوری ناشی از اثرات مخرب تنش اسمزی و افزایش تجمع یون‌ها در محیط کشت است. یون‌های سدیم و کلر با ایجاد تنش اسمزی، جذب آب توسط سلول‌ها را محدود کرده و باعث کاهش تورژسانس سلولی می‌شوند (Flowers et al., 2015). کاهش وزن تر همچنین می‌تواند به‌دلیل کاهش سنتز مواد ضروری مانند پروتئین‌ها و قندها باشد که برای رشد و تقسیم سلولی مورد نیاز هستند. در کشت استویا حضور NaCl سبب کاهش وزن تر کالوس در مقایسه با شاهد شد (Gupta et al., 2014). در مطالعه‌ای نتایج نشان داد که تیمار NaCl سبب کاهش وزن تر کالوس سیب‌زمینی شد (Yousef et al., 2024). نتایج تحقیقی دیگر نیز نشان داد که تیمار NaCl بر گیاه *Rumex thyrsiflorus* Fingerh سبب کاهش وزن تر کالوس

گردید (Gozdur et al., 2024). در تحقیقی القای کالوس با تیمار NaCl سبب کاهش وزن تر کالوس در گیاه *Melia azedarach* L. شد (Ahmadpoor et al., 2022). در پژوهشی تیمار با NaCl سبب کاهش وزن خشک کالوس ماش شد (Rafiq et al., 2008). کاهش حجم سلول تحت تاثیر افزایش غلظت NaCl می‌تواند به دلیل تاثیرات منفی تنش شوری بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیسمی سلول باشد (Shahid et al., 2020). شوری با ایجاد تنش اسمزی، جذب آب را در سلول‌های کالوس محدود کرده و به کاهش حجم سلولی منجر می‌شود. علاوه بر این، تنش شوری باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که به ساختارهای سلولی آسیب رسانده و فرآیندهای تقسیم و رشد سلولی را مختل می‌کند (Miller et al., 2010). از سوی دیگر، گیاهان برای مقابله با شرایط تنش، بخشی از انرژی خود را به سمت تولید ترکیبات دفاعی مانند پرولین و ترکیبات فنلی هدایت می‌کنند که این تغییر در اولویت‌های متابولیسمی ممکن است رشد کالوس را کاهش دهد (Ragaey et al., 2022). بنابراین، کاهش حجم کالوس در تیمارهای شوری نشان‌دهنده تاثیر منفی NaCl بر رشد و تکثیر سلول‌های کالوس است. در تحقیقی در غلظت‌های بالای NaCl، حجم کالوس‌ها به‌طور معناداری کاهش یافته و کالوس‌ها نرم و متلاشی شدند (Liza et al., 2013). در پژوهشی دیگر روی گیاه آویشن افزایش NaCl سبب کاهش حجم کالوس گردید (Razavizadeh et al., 2019).

کاهش کلروفیل a تحت تاثیر تنش شوری، به‌ویژه در غلظت‌های بالای NaCl (۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) نشان‌دهنده تاثیر منفی شوری بر فرآیندهای فتوسنتزی گیاه است (شکل ۶ الف). تنش شوری منجر به تجمع یون‌های سدیم و کلر در سلول‌های گیاهی می‌شود که باعث ایجاد سمیت یونی و کاهش جذب عناصر غذایی ضروری مانند نیتروژن و منیزیم می‌شود. این عناصر برای سنتز کلروفیل ضروری هستند. کاهش دسترسی به این عناصر، سنتز کلروفیل a را محدود می‌کند (Cakmak & Yazici, 2010; Rashad & Hussien, 2014). تنش شوری باعث تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن می‌شود. این مولکول‌ها به غشاهای پروتئین‌ها و کلروفیل آسیب می‌رسانند (Sachdev et al., 2021). تخریب کلروفیل a به دلیل افزایش ROS یکی از دلایل اصلی کاهش فتوسنتز در شرایط تنش شوری است (Cuddy et al., 2013). در مطالعه‌ای، کاهش محتوای کلروفیل تحت تنش شوری در بادرنجبویه گزارش شد (Safari et al., 2020). محتوای کلروفیل a با افزایش غلظت NaCl در گیاه *Stevia rebaudiana* کاهش پیدا کرد (Sharuti & Narender, 2014). کاهش کلروفیل b در تیمارهای شوری به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر NaCl نشان‌دهنده تاثیر منفی تنش شوری بر ساختار فتوسنتزی گیاه است (Ma et al., 2017). شوری بالا موجب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که به تخریب کلروفیل و آسیب به غشای تیلاکوئیدی منجر می‌گردد (Tammam et al., 2011). با این حال، در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl_1) کاهش کمتری مشاهده شد که ممکن است به دلیل توانایی گیاه در مقابله با تنش خفیف از طریق مکانیسم‌های دفاعی نظیر افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌ها باشد. در پژوهشی غلظت‌های بالاتر از ۹۰ میلی‌مولار NaCl ساختار کلروپلاست *Stevia rebaudiana* را تخریب کرد. استفاده از تیمار با NaCl روی گیاه *Portulaca oleracea* L. نیز سبب کاهش کلروفیل b شد (Savari et al., 2024).

کارتونوئیدها نقش مهمی در کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و محافظت از سلول‌های گیاهی در برابر تنش اکسیداتیو دارند (Shen et al., 2018). افزایش مشاهده شده در تیمار NaCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (NaCl_1) ممکن است ناشی از فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر تنش شوری خفیف باشد که تولید این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را تقویت می‌کند. با این حال، در غلظت‌های بالاتر، تنش شدید شوری منجر به تخریب کارتونوئیدها و کاهش توانایی گیاه در مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو شده است. نتایج پژوهشی نشان داد در برگ‌های *Pennisetum alopecuroides* در سطوح پایین‌تر شوری افزایش یافت (Mane et al., 2010). در تحقیقی شوری بالا اثرات مخربی بر فرآیند فتوسنتز دارد و باعث کاهش غلظت رنگدانه‌ها در گیاه استویا شد (Azzam et al., 2021).

افزایش مقدار فنل در گیاهان تیمار شده با NaCl احتمالاً به دلیل تحریک مسیرهای بیوسنتزی مرتبط با تولید فنل‌ها است. این پاسخ می‌تواند بخشی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر تنش شوری باشد که با کاهش آسیب‌های اکسیداتیو و تثبیت ساختار سلولی، به بقای گیاه کمک می‌کند (Hao et al., 2021). در تیمار NaCl با غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار (NaCl_3)، افزایش در مقدار فنل نشان‌دهنده تاثیر بالاتر شوری در فعال‌سازی سیستم‌های دفاعی گیاه است. این امر احتمالاً به دلیل افزایش تولید آنزیم‌های مرتبط

با سنتز فنل است که به خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن کمک می‌کند (Hajam et al., 2023). در تحقیقی روی بادرنبویه نشان داده شده که القای ناشی از NaCl به‌طور کلی موجب افزایش سطح فنل شد (Hawrylak-Nowak et al., 2021). در تحقیقی روی *Artemisia arborescens* در کشت کالوس در شرایط درون شیشه‌ای، استفاده از NaCl باعث افزایش قابل توجهی در مقدار فنل در مقایسه با شاهد شد (Rejeb et al., 2022). فلاونوئیدها از مهمترین متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند شوری نقش کلیدی دارند (Yang et al., 2018). افزایش مقدار فلاونوئیدها در گیاهان تیمار شده با NaCl می‌تواند به‌عنوان یک پاسخ دفاعی در برابر تنش شوری تفسیر شود. فلاونوئیدها با خواص آنتی‌اکسیدانی خود به خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از شوری کمک می‌کنند (Ahanger et al., 2018). در تیمارهای دارای غلظت بالاتر NaCl افزایش قابل توجهی در مقدار فلاونوئیدها مشاهده شد که نشان‌دهنده تأثیر بیشتر شوری در تحریک مسیرهای بیوسنتزی مرتبط با تولید فلاونوئیدها است. این پاسخ می‌تواند بخشی از سازوکارهای تنظیمی گیاه برای حفاظت از سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو و حفظ تعادل سلولی باشد (Sharma et al., 2019). القای NaCl به‌طور قابل توجهی میزان فلاونوئیدها را در کشت بادرنبویه افزایش داد (Hawrylak-Nowak et al., 2021). در مطالعه‌ای دیگر افزایش محتوای فلاونوئید تحت تنش شوری در کالوس‌های تاج خروس گزارش شد (Golkar et al., 2019).

افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه در تیمارهای با غلظت بالاتر NaCl (۱۵۰ میلی‌مولار) قابل توجه است که نشان‌دهنده پاسخ گیاه به تنش‌های اکسیداتیو ناشی از شوری است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که شوری به‌عنوان یک تنش محیطی می‌تواند موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان شود. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه در تیمارهای با غلظت بالاتر NaCl (۱۵۰ میلی‌مولار) می‌تواند نشان‌دهنده فعال شدن سیستم‌های دفاعی در مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از شوری باشد. در شرایط شوری، گیاهان به‌طور خودکار به افزایش تولید آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خود اقدام می‌کنند تا از آسیب‌های اکسیداتیو و تخریب سلولی جلوگیری کنند (Jamshidi Goharizi et al., 2020). فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان به کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند و نقش مهمی در حفاظت از سلول‌ها در برابر تنش‌های محیطی دارد (Das & Roychoudhury, 2014). به‌طور خاص، در تیمارهای با غلظت‌های بالاتر NaCl این پاسخ دفاعی به شدت افزایش می‌یابد، که به‌طور غیرمستقیم نشان‌دهنده مواجهه بیشتر گیاه با تنش‌های اکسیداتیو است. بنابراین، افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان یک مکانیزم محافظتی برای گیاه در برابر آسیب‌های ناشی از شوری عمل می‌کند (Kibria et al., 2017). در مطالعه‌ای روی گیاه *Salvia macrosiphon* افزایش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها مشاهده شد (Valifard et al., 2017). در تحقیقی روی *Artemisia arborescens* در کشت کالوس در شرایط درون شیشه‌ای، استفاده از باعث افزایش قابل توجهی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با شاهد شد (Rejeb et al., 2022).

افزایش میزان MDA به‌طور معمول نشان‌دهنده افزایش سطح تنش اکسیداتیو و تخریب غشاهای سلولی است (Singh et al., 2014). در این مطالعه مشاهده شد که با افزایش شدت شوری (تیمارهای NaCl)، میزان MDA نیز افزایش یافت، که این نشان‌دهنده افزایش آسیب‌های اکسیداتیو در گیاهان است. افزایش میزان MDA در تیمارهای NaCl (NaCl_2 و NaCl_3) مشهود است که نشان‌دهنده شدت بیشتر آسیب‌ها و واکنش‌های دفاعی گیاه به‌دنبال تنش شوری است. شوری موجب تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود، که این به نوبه خود منجر به افزایش تولید محصولات جانبی اکسیداتیو مانند MDA می‌شود (Hasanuzzaman et al., 2012; Khan et al., 2024). در تحقیقی افزایش قابل توجهی در پراکسیداسیون لیپدها، به‌عنوان محتوای MDA، با افزایش سطح شوری مشاهده شد (Golkar et al., 2020). در پژوهشی افزایش MDA توسط تیمار NaCl روی گیاه *Stevia rebaudiana* نسبت به شاهد مشاهده شد (Gerami et al., 2020). تیمار با NaCl سبب افزایش MDA در گیاه سویا گردید (Su et al., 2024).

در این تحقیق، مشاهده شده که با افزایش غلظت NaCl میزان آنتوسیانین در گیاهان افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده واکنش دفاعی گیاه به تنش شوری است (Jeon et al., 2020). این افزایش می‌تواند به‌عنوان یک مکانیزم دفاعی برای مقابله با آسیب‌های ناشی از شوری و بهبود مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی تغییر شود. نتایجی روی گل زوفا نشان داد که تحت تنش شوری

افزایش قابل توجهی در آنتوسیانین ایجاد می‌شود (Jahantigh et al., 2016). افزایش آنتوسیانین با کاربرد NaCl در کشت‌های بادرنبویه مشاهده شد (Hawrylak-Nowak et al., 2021). در پژوهشی افزایش قابل توجهی در محتوای آنتوسیانین در نمونه‌های هیپوکوتیل و برگ *Nigella sativa* L. تیمار شده با NaCl مشاهده شد (Golkar et al., 2020).

پرولین به‌عنوان یک ترکیب محافظتی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و فشار اسمزی ناشی از شوری کمک کند (Abdelhamid et al., 2013). افزایش مقدار پرولین در تیمارهای با NaCl بالاتر، نشان‌دهنده واکنش گیاه به تنش شوری و تقویت مکانیزم‌های دفاعی در برابر این تنش است. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که با افزایش غلظت NaCl در محیط MS، مقدار پرولین به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (Azzam et al., 2021). بسیاری از محققان گزارش کرده‌اند که تجمع پرولین تحت تنش NaCl در گیاهان مختلف مانند کنبج (Koca et al., 2007) و ذرت (CHAUM & Kirdmanee, 2010) افزایش یافته است.

شوری به‌عنوان یک تنش محیطی موجب تولید رادیکال‌های آزاد مانند سوپراکسید و پراکسیدهایروژن در سلول‌های گیاهی می‌شود. این رادیکال‌های آزاد می‌توانند آسیب‌های اکسیداتیو به غشاهای پروتئین‌ها و DNA وارد کنند (Sofa et al., 2015). در پاسخ به این آسیب‌ها، گیاهان فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را آغاز می‌کنند تا رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند. آنزیم کاتالاز یکی از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که در کاهش سطح پراکسیدهایروژن در سلول‌های گیاهی نقش دارد. در نتیجه، افزایش غلظت NaCl به‌عنوان الیستور، موجب فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه از طریق افزایش فعالیت کاتالاز می‌شود (Anjum et al., 2016). این فعالیت بالاتر کاتالاز به گیاه کمک می‌کند تا پراکسیدهایروژن به آب و اکسیژن تجزیه کند و از آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری نماید (Nandi et al., 2019). در پژوهشی روی *Stevia rebaudiana* تیمار با NaCl باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد (Zeng et al., 2013). در مطالعه‌ای فعالیت کاتالاز با افزایش غلظت NaCl در شرایط تنش، نسبت به شاهد افزایش یافت (Muchate et al., 2019). در پژوهشی تنش NaCl سبب فعال شدن نشانگرهای تنش مانند کاتالاز در جوانه‌های لوبیا شد (Ampofo & Ngadi, 2021). به نظر می‌رسد که افزایش غلظت NaCl باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان می‌شود. این نشان‌دهنده واکنش فیزیولوژیکی گیاه به تنش شوری است (Alharbi et al., 2022; Lu et al., 2021). در پاسخ به تنش شوری، گیاهان با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به مقابله با رادیکال‌های آزاد تولید شده می‌پردازند. در تحقیقی تیمار NaCl باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در *Stevia rebaudiana* شد (Zeng et al., 2013). در مطالعه‌ای فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری به‌طور معناداری افزایش یافت (Koca et al., 2007). مشابه با تحقیق حاضر در پاسخ گیاه *Salicornia* به NaCl افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با شاهد مشاهده شد (Homayouni et al., 2024).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب تیماری E_1H_5L (برگ، ۲ میلی‌گرم + 2 BAP میلی‌گرم 2,4-D، روش‌نایی) بالاترین درصد کالوس‌زایی (۹۶/۶۶٪) و کمترین زمان تا آغاز کالوس‌زایی را داشت. همچنین، این تیمار باعث افزایش معنادار مقدار در وزن تر، خشک و حجم کالوس‌ها شد. تیمار شوری تأثیر منفی بر وزن تر، وزن خشک، حجم کالوس، کلروفیل a و کلروفیل b نشان داد. با اینحال، تیمار کلرید سدیم با غلظت غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را بر محتوای آنتوسیانین، پرولین (۳/۶۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۵۸/۴۸٪)، میزان فنل (۶۰/۵۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و MDA داشت. همچنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به‌ترتیب به ۱۳/۵۰ و ۲/۳۳ واحد افزایش یافت. این یافته‌ها نشان‌دهنده تأثیر مثبت تیمارهای مختلف شوری بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، متابولیتی و مقاومت به تنش است. این پژوهش می‌تواند به عنوان مبنای تحقیقات آینده در زمینه بهینه‌سازی فرآیندهای کالوس‌زایی و تولید ترکیبات مفید در گیاهان دارویی با استفاده از تیمارهای مختلف، به‌ویژه الیستورها، در راستای افزایش بهره‌وری گیاهان در شرایط تنش‌های محیطی عمل کند.

منابع

- Abdelhamid, M. T., Rady, M. M., Osman, A. S., & Abdalla, M. A. (2013). Exogenous application of proline alleviates salt-induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* L. plants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(4), 439-446 .
- Aebi ,H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Elsevier .
- Ahanger, M. A., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Alamri, S. A., Alam, P., Ashraf, M., & Ahmad, P. (2018). Potential of exogenously sourced kinetin in protecting *Solanum lycopersicum* from NaCl-induced oxidative stress through up-regulation of the antioxidant system, ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system. *PloS one*, 13(9), e0202175 .
- Ahmadpoor, F., Zare, N., Asghari, R., & Sheikhzadeh, P. (2022). Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in in vitro cultures *Melia azedarach* L. *AMB Express*, 12, 1-12 .
- Alharbi, K., Al-Osaimi, A. A., & Alghamdi, B. A. (2022). Sodium chloride (NaCl)-induced physiological alteration and oxidative stress generation in *Pisum sativum* (L.): A toxicity assessment. *ACS omega*, 7(24), 20819-20832 .
- Ampofo, J. O., & Ngadi, M. (2021). Stimulation of the phenylpropanoid pathway and antioxidant capacities by biotic and abiotic elicitation strategies in common bean (*Phaseolus vulgaris*) sprouts. *Process Biochemistry*, 100, 98-106 .
- André, S. B., Mongomaké, K., Modeste, K. K., Edmond, K. K., Tchoa, K., Hilaire, K. T., & Justin, K. Y. (2015). Effects of plant growth regulators and carbohydrates on callus induction and proliferation from leaf explant of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 8(2), 118 .
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M ,Khan, E. A., Kachhap, K.,...Vasudhevan, P. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 19002-19029 .
- Arofah, J., Manuhara, Y., & Nurhariyati, T. (2017). Effect of 2, 4-D and BAP on Callus Induction of *Piper retrofractum* Vahl. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 14(3), 1390-1394 .
- Azzam, C. R., Al-Taweel, S. K., Abdel-Aziz, R. M., Rabea, K. M., Abou-Sreya, A. I., Rady, M. M., & Ali, E. F. (2017). Salinity effects on gene expression, morphological, and physio-biochemical responses of *stevia rebaudiana bertonii* in vitro. *Plants*, 10(4), 820 .
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Ivanova, S., Asyakina, L., & Prosekov, A. (2020). Modern trends in the in vitro production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants. *Molecules*, 25(24), 5805 .
- Bano, A. S., Khattak, A. M., Basit, A., Alam, M., Shah, S. T., Ahmad, N.,...Mohamed, H. I. (2022). Callus induction, proliferation ,enhanced secondary metabolites production and antioxidants activity of *Salvia moorcroftiana* L. as influenced by combinations of auxin, cytokinin and melatonin. *Brazilian archives of biology and technology*, 65, e22210200 .
- Bates, L. S., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39, 205-207 .
- Bonner, J. (1936). Plant tissue cultures from a hormone point of view. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 22(6), 426-430 .
- Bürkle, S ,.Walter, N., & Wagner, S. (2018). Laser-based measurements of pressure broadening and pressure shift coefficients of combustion-relevant absorption lines in the near-infrared region. *Applied Physics B*, 124, 1-12 .
- Cakmak, I., & Yazici, A. M. (2010). Magnesium: a forgotten element in crop production. *Better crops*, 94(2), 23-25 .

- Cavallaro, V., Pellegrino, A., Muleo, R., & Forgione, I. (2022). Light and plant growth regulators on in vitro proliferation. *Plants*, 11(7), 844 .
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10 .(3)
- CHAUM, S., & Kirdmanee, C. (2010). Effect of glycinebetaine on proline, water use, and photosynthetic efficiencies, and growth of rice seedlings under salt stress. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34(6), 517-527 .
- Cuddy, W. S., Summerell, B. A., Gehringer, M. M., & Neilan, B. A. (2013). Nostoc, Microcoleus and Leptolyngbya inoculums are detrimental to the growth of wheat (Triticum aestivum L.) under salt stress. *Plant and soil*, 370, 317-332 .
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2, 53 .
- 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 .
- Fazeli-Nasab, B. (2018). The effect of explant, BAP and 2, 4-D on callus induction of *Trachyspermum ammi*. *Slovak Journal of Food Sciences/Potravinarstvo*, 12 .(1)
- Fazili, M. A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U., & Geelani, S. N. (2022). In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 35 .
- Flowers, T. J., Munns, R., & Colmer, T. D. (2015). Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of botany*, 115(3), 419-431 .
- Gerami, M., Majidian, P., Ghorbanpour, A., & Alipour, Z. (2020). Stevia rebaudiana Bertoni responses to salt stress and chitosan elicitor. *Physiology and molecular biology of plants*, 26(5), 965-974 .
- Golkar, P., Bakhshi, G., & Vahabi, M. R. (2020). Phytochemical, biochemical, and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Nigella sativa* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56, 247-258 .
- Golkar, P., Taghizadeh, M., & Yousefian, Z. (2019). The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137, 575-585 .
- Gozdur, K., Szopa, A., & Ślesak, H. (2024). Effect of salt stress on growth and phenolic compounds production in callus suspension culture of the dioecious species thyrse sorrel (*Rumex thyrsoflorus* Fingerh.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 158(3), 54 .
- Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L., & Wei, Y. (2011). Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 8984-9000 .
- Guo, G., & Jeong, B. R. (2021). Explant, medium, and plant growth regulator (PGR) affect induction and proliferation of callus in *Abies koreana*. *Forests*, 12(10), 1388 .
- Gupta, P., Sharma, S., & Saxena, S. (2014). Effect of salts (NaCl and Na₂CO₃) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172, 2894-2906 .
- Gupta, R., Gupta, A., Jain, S., Singh, D., & Verma, N. (2021). Chrysanthemum production, viral diseases and their management. *Virus Diseases of Ornamental Plants: Characterization, Identification, Diagnosis and Management*, 261-275 .

- Hajam, Y. A., Lone, R., & Kumar, R. (2023). Role of plant phenolics against reactive oxygen species (ROS) induced oxidative stress and biochemical alterations. In *Plant phenolics in abiotic stress management* (pp. 125-147). Springer .
- Hao, S., Wang, Y., Yan, Y., Liu, Y., Wang, J., & Chen, S. (2021). A review on plant responses to salt stress and their mechanisms of salt resistance. *Horticulturae*, 7(6), 132 .
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. *Crop stress and its management: perspectives and strategies*, 261-315 .
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Masud, A. A. C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M.,...Fujita, M. (2021). Regulation of reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under salinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9326 .
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Stasińska-Jakubas, M., Wójciak, M., Sowa, I., & Matraszek-Gawron, R. (2021). NaCl-induced elicitation alters physiology and increases accumulation of phenolic compounds in *Melissa officinalis* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6844 .
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198 .
- Hemphill, J. K., & Venketeswaran, S. (1978). Chlorophyll and carotenoid accumulation in three chlorophyllous callus phenotypes of *Glycine max*. *American Journal of Botany*, 65(10), 1055-1063 .
- Homayouni, H., Razi, H., Izadi, M., Alemzadeh, A., Kazemeini, S. A., Niazi, A., & Vicente, O. (2024). Temporal changes in biochemical responses to salt stress in three *Salicornia* species. *Plants*, 13(7), 979 .
- Jadoon, S., & Malik, A. (2017). A review article on the formation, mechanism and biochemistry of MDA and MDA as a biomarker of oxidative stress. *Int. J. Adv. Res*, 5, 81 .
- Jahantigh, O., Najafi, F., Badi, H. N., Khavari-Nejad, R. A., & Sanjarian, F. (2016). Changes in antioxidant enzymes activities and proline, total phenol and anthocyanine contents in *Hyssopus officinalis* L. plants under salt stress. *Acta Biologica Hungarica*, 67, 195-204 .
- Jamshidi Goharrizi, K., Riahi-Madvar, A., Rezaee, F., Pakzad, R., Jadid Bonyad, F., & Ghazizadeh Ahsaei, M. (2020). Effect of salinity stress on enzymes' activity, ions concentration, oxidative stress parameters, biochemical traits, content of sulforaphane, and CYP79F1 gene expression level in *Lepidium draba* plant. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 1075-1094 .
- Jeon, D., Lee, S., Choi, S., Seo, S., & Kim, C. (2020). Effect of salt stress on the anthocyanin content and associated genes in *Sorghum bicolor* L. *Korean Journal of Agricultural Science*, 47(1), 105-117 .
- Jiang, Y., Zhang, W., Chen, X., Wang, W., Köllner, T. G., Chen, S.,...Chen, F. (2021). Diversity and biosynthesis of volatile terpenoid secondary metabolites in the *Chrysanthemum* genus. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 40(5), 422-445 .
- Kapoor, S., Raghuvanshi, R., Bhardwaj, P., Sood, H., Saxena, S., & Chaurasia, O. P. (2018). Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183, 258-265 .
- Khan, K. A., Saleem, M. H., Afzal, S., Hussain, I., Ameen, F., & Fahad, S. (2024). Ferulic acid: therapeutic potential due to its antioxidant properties, role in plant growth, and stress tolerance. *Plant Growth Regulation*, 1-25 .

- Khan, T., Abbasi, B. H., Zeb, A., & Ali, G. S. (2018). Carbohydrate-induced biomass accumulation and elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*, 126, 168-176 .
- Kibria, M. G., Hossain, M., Murata, Y., & Hoque, M. A. (2017). Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. *Rice Science*, 24(3), 155-162 .
- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F., & Türkan, İ. (2007). The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 344-351 .
- Liang, W.-L., Gong, D., & Zhang, W. K. (2020). The composition of chrysanthemum extracts and their pharmacological functions. *STEMedicine*, 2(5), e69-e69 .
- Liu, Y., Lu, C., Zhou, J., Zhou, F., Gui, A., Chu, H., & Shao, Q. (2024). Chrysanthemum morifolium as a traditional herb: A review of historical development, classification, phytochemistry, pharmacology and application. *Journal of Ethnopharmacology*, 118198 .
- Liza, L. N., Nasar, A., Zinnah, K., Chowdhury, M. A. N., & Ashrafuzzaman, M. (2013). In vitro growth media effect for regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and evaluation of the salt tolerance activity of callus. *Journal of Agriculture and Sustainability*, 3(2) .
- Lu, Y., Zeng, F., Li, X., & Zhang, B. (2021). Physiological changes of three woody plants exposed to progressive salt stress. *Photosynthetica*, 59(1), 171-184 .
- Ma, X., Zheng, J., Zhang, X., Hu, Q., & Qian, R. (2017). Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress on *Dianthus superbus* (Caryophyllaceae) by activating photosynthesis, protecting morphological structure, and enhancing the antioxidant system. *Frontiers in Plant Science*, 8, 600 .
- Mane, A., Karadge, B., & Samant, J. (2010). Salt stress induced alteration in photosynthetic pigments and polyphenols of *Pennisetum alopecuroides* (L.). *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*, 177-182 .
- Maqbool, M., Ishtiaq, M., Mazhar, M. W., Casini, R., Mahmoud, E. A., & Elansary, H. O. (2023). Enhancing Bioactive Metabolite Production in *Aerva sanguinolenta* Callus Cultures through Silver Nanoparticle and Salicylic Acid Elicitation. *Sustainability*, 15(13), 10395 .
- Materska, M., & Perucka, I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1750-1756 .
- Mayerni, R., Satria, B., Wardhani, D. K., & Chan, S. R. O. S. (2020). Effect of auxin (2, 4-D) and cytokinin (BAP) in callus induction of local patchouli plants (*Pogostemon cablin* Benth.). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science ,
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 453-467 .
- Muchate, N. S., Rajurkar, N. S., Suprasanna, P., & Nikam, T. D. (2019). NaCl induced salt adaptive changes and enhanced accumulation of 20-hydroxyecdysone in the in vitro shoot cultures of *Spinacia oleracea* (L.). *Scientific Reports*, 9(1), 12522 .
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15 .
- Nandi, A., Yan, L.-J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019(1), 9613090 .

- Puad, N. I. M., Ibrahim, S. A., Azmi, A. S., & Abduh, M. Y. (2024). THE INFLUENCE OF PLANT GROWTH REGULATORS AND LIGHT SUPPLY ON BITTER CASSAVA CALLUS INITIATION FOR STARCH PRODUCTION. *IJUM Engineering Journal*, 25(1), 1-11 .
- Rafiq, M., Mali, M., Khatri, A & ,Dahot, M. U. (2008). Callus induction and regeneration in local mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] under salt stress. *Journal of Biotechnology*, 136, S152 .
- Ragaey, M. M., Sadak, M. S., Dawood, M. F., Mousa, N. H., Hanafy, R. S., & Latef, A. A. H. A .(۲۰۲۲) . Role of signaling molecules sodium nitroprusside and arginine in alleviating salt-Induced oxidative stress in wheat. *Plants*, 11(14), 1786 .
- Rashad, R. T., & Hussien, R. A. (2014). A comparison study on the effect of some growth regulators on the nutrients content of maize plant under salinity conditions. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 89-94 .
- Razavizadeh, R., Farahzadianpoor, F., Adabavazeh, F., & Komatsu, S. (2019). Physiological and morphological analyses of *Thymus vulgaris* L. in vitro cultures under polyethylene glycol (PEG)-induced osmotic stress. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 342-357 .
- Rejeb, F. B., Chograni, H., Romdhane, M. B., & Riahi, L. (2022). Effects of two abiotic elicitors on secondary metabolites accumulation and bioactivity in tree wormwood in vitro shoot cultures .
- Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2021). Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants* , ۲۷۷ ,(۲) ۱ .
- Safari, F., Akramian, M., & Salehi-Arjmand, H. (2020). Physiochemical and molecular responses of salt-stressed lemon balm (*Melissa officinalis* L.) to exogenous protectants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 1-10 .
- Savari, Z., Ganjeali, A., & Cheniany, M. (2024). Effect of abiotic elicitors and plant growth regulators on Morpho-physiological and biochemical characteristics of Purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Journal of Plant Biological Sciences*, 15(4), 73-96 .
- Serrano-Martínez, A., Fortea, M , -Del Amor, F., & Núñez-Delicado, E. (2008). Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food chemistry*, 107(1), 193-199 .
- Shahid, M. A., Sarkhosh, A., Khan, N., Balal, R. M., Ali, S., Rossi, L,...Garcia-Sanchez, F. (2020). Insights into the physiological and biochemical impacts of salt stress on plant growth and development. *Agronomy*, 10(7), 938 .
- Sharifi-Rad, R., Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Samzadeh-Kermani, A., & Gholami, M. (20۰۲) . The effect of non-biological elicitors on physiological and biochemical properties of medicinal plant *Momordica charantia* L. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 44, 1315-1326 .
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 2452 .
- Sharuti, R., & Narender, S. (2014). Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of *Stevia rebaudiana* regenerated in vitro. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10(2), 287-296 .
- Shen, Y., Li, J., Gu, R., Yue, L., Wang, H., Zhan, X., & Xing, B. (2018). Carotenoid and superoxide dismutase are the most effective antioxidants participating in ROS scavenging in phenanthrene accumulated wheat leaf. *Chemosphere*, 197, 513-525 .

- Singh, Z., Karthigesu, I. P., Singh, P., & Rupinder, K. (2014). Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. *Iranian Journal of Public Health*, 43(Supple 3), 7-16 .
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 13561-13578 .
- Spaargaren, J., & van Geest, G. (2018). Chrysanthemum. *Ornamental Crops*, 319-348 .
- Su, J., Jiang, J., Zhang, F., Liu, Y., Ding, L., Chen, S., & Chen, F. (2019). Current achievements and future prospects in the genetic breeding of chrysanthemum: a review. *Horticulture research*, 6 .
- Su, X., Huang, H., Ye, M., Guo, W., Du, B., Yang, S., & Liu, Y. (2024). Influences of Various NaCl Levels on Soybean Seedlings Growth. *Journal of Physics: Conference Series* ,
- Sundarasekar, J., Anthony, J. J. J., Murugaiyah, V., & Subramaniam, S. (2012). Preliminary responses of 2, 4-D and BAP on callus initiation of an important medicinal-ornamental *Hymenocallis littoralis* plants. *J Med Plants Res*, 6(11), 208 . ۲۰۹۳-۸
- Tammam, A. A., Fakhry, E. M., & El-Sheekh, M. (2011). Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta*. *African Journal of Biotechnology*, 10(19), 3795-38 . ۰ ۸
- Teshome, S., & Feyissa, T. (2015). In vitro callus induction and shoot regeneration from leaf explants of *Glinus lotoides* (L.)—an important medicinal plant .
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 37, 169-180 .
- Valifard, M., Mohsenzadeh, S., & Kholdebarin, B. (2017). Salinity effects on phenolic content and antioxidant activity of *Salvia macrosiphon*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 41, 295-300 .
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X , Zhao, Y.-X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762 .
- Yousef, A. N., Danial, G. H., Ibrahim, D. A., & Barakat, S. E. (2024). PROPAGATION AND CALLUS REGENERATION OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) CULTIVAR 'DESIREE' UNDER SALT STRESS CONDITIONS. *Science Journal of University of Zakho*, 12(3), 294-298 .
- Yu, Y., Qin, W., Li, Y., Zhang, C., Wang, Y., Yang, Z.,...Li, F. (2019). Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities. *Plant growth regulation*, 87, 187-199 .
- Yu, Y., Wang, T., Wu, Y., Zhou, Y., Jiang, Y., & Zhang, L. (2019). Effect of elicitors on the metabolites in the suspension cell culture of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(1), 229-242 .
- Zeng, J., Chen, A., Li, D., Yi, B., & Wu, W. (2013). Effects of salt stress on the growth, physiological responses, and glycoside contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(24), 5720-5726 .
- Zhou, L., Li, S., Huang, P., Lin, S., Addo-Danso, S. D., Ma, Z., & Ding, G. (2018). Effects of leaf age and exogenous hormones on callus initiation, rooting formation, bud germination, and plantlet formation in Chinese fir leaf cuttings. *Forests*, 9(8), 478 .