Archive of SID

مجلهٔ جنگل ایران، انجمن جنگلبانی ایران
سال یازدهم، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۸
ص ۵۴۵-۵۳۳

*مقاله پژوهشی*

# بررسی کال‌زایی و تأثیر سالیسیلیک اسید بر متابولیت‌های ثانویهٔ کالوس ارس (*Juniperus excelsa*)

**احمدرضا دری[۱]، سپیده کلاته‌جاری [۲*]، محمود دژم[۳]، احمد خلیقی[۴] و توماس گرند پیپکر [۵]**

۱. دانشجوی دکتری باغبانی، گروه علوم باغبانی و زراعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.
۲. استادیار، گروه علوم باغبانی و زراعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.
۳. استادیار، گروه کشاورزی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا.
۴. استاد، گروه علوم باغبانی و زراعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.
[۵] دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه تامسون ریورز، کانادا.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۲)

## چکیده

ارس (*Juniperus excelsa*) درختی نورپسند و دیرزیست از خانوادهٔ سرو (Cupressacea) است. این درخت کندرشد و مقاوم در برابر کم‌آبی و سرماست. تحقیق حاضر در قالب دو آزمایش جداگانه شامل بررسی غلظت هورمون‌های اکسین و سیتوکینین بر کال‌زایی ارس به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر تولید متابولیت‌های ثانویه (فنول و فلاونوئید) و مهار رادیکال آزاد DPPH انجام گرفت. نمونه‌های گیاهی اولیهٔ استفاده‌شده در این پژوهش از شاخه‌های سالم و عاری از بیماری و آفات ارس تهیه شد. از محیط کشت مخصوص گیاهان چوبی (WPM) به‌عنوان محیط پایه استفاده شد. فاکتور اول شامل اکسین در پنج سطح (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) و ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و فاکتور دوم شامل سیتوکینین در سه سطح (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین بود. نتایج تحقیق نشان داد که ریزنمونه‌ها بعد از سه هفته در محیط کالوس‌زایی به‌تدریج متورم شدند و پس از شش هفته در این ریزنمونه‌ها به‌طور کامل کالوس‌زایی انجام گرفت. بررسی اثر متقابل هورمون‌های سیتوکینین و اکسین نشان داد که بیشترین مقدار آن (۸۰ درصد) در تیمار ترکیبی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. مقایسهٔ میانگین با آزمون دانکن نشان داد که بیشترین وزن تر کالوس (۱/۱ گرم) در تیمار ترکیبی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. همچنین بیشترین وزن خشک کالوس (۰/۴ گرم) در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. Kin در ترکیب با NAA سبب ایجاد کالوس متراکم (فشرده) و زردرنگ و در ترکیب با 4,2-D سبب ایجاد کالوس ترد (پفکی) و سبزرنگ شد. در بررسی اثر سالیسیلیک اسید (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) بر متابولیت‌های ثانویهٔ بررسی‌شده مشخص شد که مقدار فنول در تیمار ۱۰۰ میکرومولار (۳۱/۸ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک) بیشتر از تیمارهای دیگر بود. اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و ۵۰ میکرومولار مشاهده نشد. بیشترین و کمترین مقدار فلاونوئید به‌ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید (۹/۳ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک) و شاهد (۲/۰۵ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک) به‌دست آمد. همچنین بیشترین مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید (۳۵/۰۶ درصد) و کمترین مقدار آن (۲۵/۳ درصد) در تیمار شاهد مشاهده شد.

**واژه‌های کلیدی**: اکسین، سیتوکینین، کالوس، فلاونوئید، فنول.

* نویسندهٔ مسئول
شمارهٔ تماس: ۰۹۱۲۵۶۶۹۲۹۹
ایمیل: kalatejari@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID


**مقدمه**

ریزازدیادی مهم‌ترین روش ازدیاد سریع غیرجنسی در شرایط درون‌شیشه‌ای است. این روش از نظر زمان و فضای لازم، برتری اقتصادی بر روش‌های ازدیاد سنتی دارد. ازدیاد سریع گیاهان، وابسته نبودن به فصل، تولید گیاهان عاری از بیماری، صرفه‌جویی در مواد گیاهی و کار در شرایط گندزدایی‌شده از ویژگی‌های این روش است. همچنین این روش انتقال بی‌خطر و قرنطینهٔ ژرم‌پلاسم را در داخل کشور و بین کشورهای دیگر تسهیل می‌کند. زمانی که روش‌های سنتی قادر به تأمین تقاضا برای ازدیاد مواد گیاهی نباشند، این روش می‌تواند گیاهان زیادی را با عملکرد مطلوب و به‌صورت یکنواخت تولید کند (Smith, 2013; Gatti & Vecchi, 2017). از نظر تعریف، هورمون‌ها ترکیبات آلی هستند که به‌صورت طبیعی در گیاهان آلی ساخته می‌شوند و بر رشد و نمو اثر می‌گذارند. افزون‌بر ترکیبات طبیعی، ترکیبات مصنوعی نیز ساخته شده‌اند که با انواع طبیعی مطابقت دارند. به مجموع هورمون‌ها و ترکیبات مصنوعی تولیدشده، تنظیم‌کننده‌های رشد می‌گویند (Idowu et al., 2009). تنظیم‌کننده‌های رشد عهده‌دار تنظیم و اعمال فیزیولوژیکی در گیاه‌اند، در رشد و نمو و فعالیت‌های سوخت‌وساز گیاه مؤثرند و با اینکه مقدارشان بسیار اندک است، اثر فعال‌کننده دارند (Watahiki & Trewavas, 2015). به‌طور کلی رشد و نمو طبیعی گیاه، بیشتر توسط اثر متقابل هورمون‌های تحریک‌کننده و بازدارنده تنظیم می‌شود (Smith, 2013).

متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه فنول‌ها و فلاونوئیدها انتشار وسیعی در گیاهان دارند و فعالیت زیستی متنوع این ترکیبات از جمله تأثیرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است. با توجه به کاربرد فراوان گیاهان و عصارهٔ آنها در صنایع مهمی همچون داروسازی، غذایی و آرایشی بهداشتی، بررسی تولید این ترکیبات تحت تأثیر محرک‌های آنها می‌تواند سودمند باشد (Balasundram et al., 2006). سالیسیلیک اسید نوعی تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهی و نوعی ترکیب فنیل پروپانوئید است (Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011). سالیسیلیک اسید از طریق باند شدن با کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز و افزایش بازدارندگی تنفس سلولی سبب مهار فعالیت کاتالیزی و افزایش اکسیژن فعال می‌شود. با افزایش سالیسیلیک اسید و ارسال سیگنال‌ها توسط آن، آنزیم‌های کدکنندهٔ ژنی از مسیر فنول پروپانوئید فعال می‌شوند (Zhang et al., 2015).

ارس (*Juniperus excelsa*) درختی از خانوادهٔ سرو[1] با ارتفاع متوسط ۳ تا ۱۵ متر است. جنس Juniperus شامل ۶۰ گونه است و گونه‌های این جنس از گروه گیاهان بسیار مقاوم با تحمل دامنهٔ وسیع شرایط اکولوژیکی هستند. این درخت از معدود سوزنی‌برگان بومی شمال ایران و درختی مقاوم و زیبا در مناطق جنگلی و کوهستانی به‌ویژه مناطق شمال کشور است. منطقهٔ رویش این درخت از شرق تا غرب در امتداد دامنه‌های جنوبی رشته‌کوه البرز و از شمال غرب تا جنوب در امتداد رشته‌کوه زاگرس است (Mozafarian, 2015). ارس به‌علت مقاومت در برابر سرما و خشکی در شرایط سخت قدرت رشد خود را حفظ می‌کند و بوی نامطبوعش سبب فرار مار، عقرب و حشره‌های گزنده می‌شود. خواص ضدمیکروبی این گیاه نیز بسیار اهمیت دارد. سرشاخه‌های آن دارای اسانسی به‌نام سابین است که به‌شدت محرک پوست و مخاط است. مطالعات روی اسانس ارس نشان داد که این متابولیت ثانویه روی گونه‌های متعددی از قارچ‌های بیماری‌زا دارای خاصیت مهارکنندگی در برابر میکروارگانسیم‌هاست. ارس در حجاز برای درمان سل ریوی و یرقان استفاده شده و همچنین ضدباکتریایی بودن اسانس این گیاه در برابر باکتری‌های گرم مثبت مانند *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis*

[1] Cupresssaceae

www.SID.ir

Archive of SID


گزارش شده است (Soltani et al., 2014). تحقیقات مختلف روی کشت بافت گونه‌های خانوادهٔ سرو نشان از متغیر بودن کیفیت کشت هر گونه نسبت به ترکیبات مختلف هورمونی و نوع محیط کشت دارد. برای مثال Salehi shanjani (2006) در بررسی کشت بافت گونهٔ ارس نشان داد که افزودن گلوتامین به محیط کشت ۱/۲ موراشیگ و اسکوگ[1] (MS) سبب تحریک کال‌زایی می‌شود، اما شکل نیتراتی نیتروژن سبب تولید هیچ کالوسی نمی‌شود. او همچنین بیان کرد که ترکیب هورمون بنزیل آمینوپورین (BAP)[2] و کینتین (Kin)[3] تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر سبب کال‌زایی می‌شود و بیشتر از آن اثر منفی بر کیفیت کالوس‌ها دارد. Baravardi et al. (2015) در پژوهشی نشان دادند که محیط کشت WPM بهتر از MS است و غلظت‌های ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین کال‌زایی را دارد. Hussain et al. (2013) بهترین محیط برای القای کالوس را محیط MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۵ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال معرفی کردند و بعد از دو هفته کالوس‌زایی از ریزنمونهٔ ساقه را به‌دست آوردند، اما موفق به باززایی کالوس‌ها نشدند. تحقیقات نشان داد که برای سوزنی‌برگان به‌ویژه سرو، محیط WPM مناسب‌تر از MS است. همچنین به‌منظور بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید بر متابولیت‌های ثانویه، Anusha et al. (2016) پس از القای کالوس گیاه *Celastrus paniculatus*، با استفاده از غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید نشان دادند که این ماده سبب تحریک تولید و تجمع فنول و ترکیبات فنولی می‌شود. Manivanna et al. (2016) اثر محرک‌های متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک و سدیم نیترپروسید را بر تجمع متابولیت‌های ثانویه و خواص آنتی‌اکسیدانی کالوس گیاه *Scrophularia kakudensis* کشت‌شده در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بررسی کردند. نتایج نشان داد که متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید موجب تجمع فنول‌های کل، فلاونوئیدها و ترکیب فلاونوئیدها با خواص دارویی شد و در غلظت‌های بیشتر به‌طور چشمگیری فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد. بنابراین درتحقیق حاضر کال‌زایی ارس در محیط WPM همراه با غلظت‌های مختلف اکسین (NAA و 2,4-D) و سیتوکینین (Kin) و همچنین تأثیر سالیسیلیک اسید بر تجمع متابولیت‌های ثانویهٔ کالوس آن بررسی می‌شود.

## مواد و روش‌ها

### منطقهٔ پژوهش

نمونه‌برداری پژوهش حاضر از منطقهٔ حفاظت‌شدهٔ خرمن‌کوه فسا انجام گرفت. خرمن‌کوه در شمال غربی شهر فسا در محدودهٔ °۵۳ تا ′۴۰ °۵۳ عرض شرقی و ′۰۹ °۲۹ تا ′۱۷ °۲۹ طول شمالی قرار دارد و مرتفع‌ترین نقطهٔ این شهرستان محسوب می‌شود. ارتفاع قلهٔ آن در حدود ۳۱۸۳ متر از سطح دریاست. پوشش گیاهی این منطقه بسیار غنی است و بالغ بر ۳۲۵ گونهٔ گیاهی در این منطقه می‌روید که بیش از همه گیاهان دائمی و اغلب بوته‌ای، درختی و درختچه‌ای جلب نظر می‌کنند. گونه‌های جنگلی ارس، بادام وحشی یا الوک، پستهٔ وحشی یا بنه و ارژن دیده می‌شود. از ارتفاع ۲۰۰۰ متر به بالا، گونهٔ ارس گونهٔ غالب منطقه است.

### روش پژوهش

### ضدعفونی جوانه‌های جانبی

نمونه‌های گیاهی از جوانه‌های جانبی شاخه‌های سالم و عاری از بیماری و آفات تهیه شد. به‌منظور سترون کردن ریزنمونه‌ها از روش Salehi shanjani (2006) استفاده شد. برای ان کار ابتدا جوانه‌های جانبی ارس حدود ۱۰ دقیقه در آب خیسانده شد. سپس به‌منظور کاهش کشش سطحی و تماس بهتر مواد

1. Murashige and Skoog
2. Benzylaminopurine
3. Kinetin

www.SID.ir

Archive of SID


ضدعفونی‌کننده، ریزنمونه‌ها ۵ دقیقه در مایع ظرفشویی قرار داده شده و سپس سه مرتبه با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. در ادامه به‌مدت ۱۵ دقیقه در قارچ‌کش بنومیل ۲ در ۱۰۰۰ قرار داده شدند و سپس سه مرتبه با آب مقطر شسته شدند. ریزنمونه‌های آزمایشی در محلول هیپوکلرید سدیم ۲۰ گرم در لیتر به‌مدت ۷ دقیقه قرار داده شده و سپس سه بار با آب مقطر استریل کاملاً شسته شدند. در مرحلهٔ آخر ریزنمونه‌ها ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند و در این مرحله نیز سه بار با آب مقطر شسته شدند. پس از خشک شدن کامل ریزنمونه‌ها، بر روی محیط کشت WPM کشت شدند.

**طرح آزمایشی القای کالوس**

به محیط WPM کامل ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار اضافه شد. سپس قطعات جداکشت جوانهٔ جانبی تحت تیمارهای تنظیم‌کنندهٔ رشد قرار گرفتند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام گرفت. فاکتور اول شامل اکسین در پنج سطح (صفر، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و فاکتور دوم شامل سیتوکینین در ۳ سطح (صفر، ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin) بود.

در پایان دورهٔ شش هفته آزمایش، درصد کال‌زایی مشخص شد. آلودگی ریزنمونه‌های اولیه ۴۰ درصد بود. کالوس‌ها از محیط کشت خارج شده و با ترازوی حساس دیجیتالی توزین شدند. برای به‌دست آوردن وزن خشک، کالوس‌ها ۲۰ ساعت در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد در آون قرار داده شده و سپس با ترازوی حساس دیجیتالی توزین شدند.

طرح آزمایشی تأثیر سالیسیلیک اسید بر فنول، فلاونوئید و مهار رادیکال آزاد ۲، ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازین (DPPH)[1]. در این آزمایش تأثیر سالیسیلیک اسید بر فنول، فلاونوئید و مهار رادیکال آزاد DPPH کالوس‌های باکیفیت به‌صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سالیسیلیک اسید در سه سطح (شاهد، ۵۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میلی‌مولار) بود.

**تعیین محتوای فنولی**

فنول کل براساس روش رنگ‌سنجی فولن سیوکالتو و برحسب اسید گالیک تعیین شد. ابتدا محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۱۲/۵ µg/ml، ۲۵، ۵۰، ۶۲/۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ از اسید گالیک در متانول ۹۹ درصد تهیه شد. سپس از هر کدام، ۱ میلی‌لیتر به لولهٔ آزمایش منتقل شد و به آنها ۵ میلی‌لیتر محلول واکنشگر فولن سیوکالتو ۱۰٪ (۱۰ سی‌سی فولن سیو کالتو (۲ مولار) را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ سی‌سی رساندیم) و بعد از ۳ تا ۸ دقیقه ۴ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵٪ اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه و در محیط تاریک نگهداری و پس از آن مقدار جذب در ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Pourmorad et al., 2006).

**تعیین محتوای فلاونوئید**

محتوای فلاونوئید براساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید تعیین شد (Chang et al., 2002). در این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪ و ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس جذب آن در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میکوگرم/ میلی‌لیتر در متانول برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و محتوای فلاونوئید به‌صورت اکی‌والان‌های کوئرستین/ گرم وزن عصارهٔ خشک بیان شد.

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

www.SID.ir

Archive of SID


**روش مهار رادیکال آزاد DPPH**

برای این آزمایش از روش Blois (1985) استفاده شد. به این صورت که به ۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌های تهیه‌شده از بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT)[1] و عصارهٔ کالوس، ۳ میلی‌لیتر محلول DPPH اضافه شد و در کنار آنها محلول‌های بلانک و شاهد نیز آماده شد (محلول ها به‌دلیل حساسیت DPPH به نور، دور از نور ساخته شد). محلول‌ها ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق انکوبه شدند و پس از گذشت این مدت جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر به‌کمک دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد (برای خواندن جذب همهٔ محلول‌ها، دستگاه با استفاده از حلال یعنی متانول کالیبره و صفر شد). برای هر محلول، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد DPPH} = \frac{\text{عصاره حاوی محلول جذب} - \text{کنترل محلول جذب}}{\text{بلانک محلول جذب}} \times ۱۰۰$$

**روش تحلیل**

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام گرفت. مقایسهٔ میانگین داده‌ها با آزمون دانکن صورت گرفت و معنی‌داری داده‌ها در سطح ۵ درصد بررسی شد.

## نتایج

**تجزیهٔ واریانس**

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اثرات اصلی و متقابل هورمون Kin (سیتوکینین) و NAA و 2،4-D (اکسین) بر صفات مختلف شامل درصد کالوس‌زایی، وزن تر و خشک کالوس معنی‌دار شد ($P\leq0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیهٔ واریانس درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس و وزن خشک کالوس

| منبع تغییرات | درجهٔ آزادی | میانگین مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| | | درصد کالوس‌زایی | وزن تر کالوس | وزن خشک کالوس |
| تکرار | ۳ | ۳۶/۶$^{ns}$ | ۰/۰۱$^{ns}$ | ۰/۰۰۱$^{ns}$ |
| سیتوکینین | ۲ | ۱۱۸۳۱$^{**}$ | ۰/۲۸$^{**}$ | ۰/۰۳$^{**}$ |
| اکسین | ۴ | ۴۵۸۵$^{**}$ | ۱/۵۳$^{**}$ | ۰/۲$^{*}$ |
| سیتوکینین × اکسین | ۸ | ۹۱۲$^{**}$ | ۰/۰۴$^{*}$ | ۰/۰۰۶$^{**}$ |
| خطا | ۴۲ | ۴۰/۸ | ۰/۰۱ | ۰/۰۰۰۴ |
| ضریب تغیرات | | ۱۹/۱ | ۹/۵ | ۹/۷ |

**درصد کالوس‌زایی**

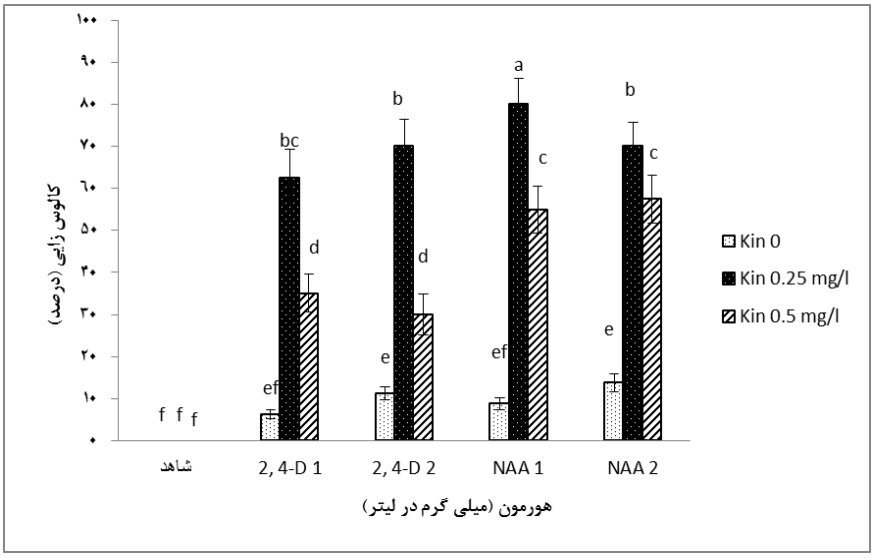
ریزنمونه‌ها سه هفته پس از قرارگیری در محیط کالوس‌زایی به‌تدریج القا شدند و بعد از شش هفته به‌طور کامل کالوس‌زایی اتفاق افتاد. نتایج مقایسهٔ میانگین اثرهای متقابل هورمون‌های سیتوکینین و اکسین نشان داد که بیشترین درصد کالوس زایی (۸۰ درصد) در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (شکل ۱).

همان‌طور که در شکل ۱ دیده می شود، در تیمار شاهد بدون تنظیم‌کنندهٔ رشد، القای کالوس رخ نداده است و در تیمارهای حاوی 2,4-D و NAA در حضور ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، نسبت به استفاده نکردن از Kin یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin درصد کالوس‌زایی بیشتری مشاهده شد که این موضوع اهمیت سطح بهینهٔ تنظیم‌کننده‌های رشد را می‌رساند.

1. Butylated hydroxytoluen

www.SID.ir

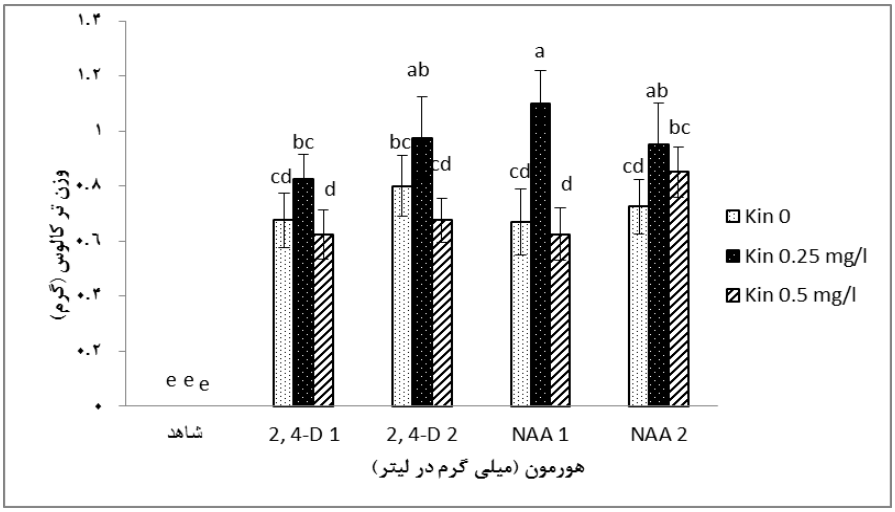
Archive of SID


شکل ۱- تأثیر همزمان اکسین و سیتوکینین بر درصد کالوس‌زایی.
میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک، اختلاف آماری معنی داری با هم ندارند و خطوط نشان‌دهندهٔ انحراف معیار داده‌هاست.

**وزن تر کالوس**

مقایسهٔ میانگین آزمون دانکن نشان داد که بیشترین وزن تر کالوس (۱/۱ گرم) در تیمار ترکیبی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (شکل ۲). براساس نتایج، وزن تر کالوس نیز همانند درصد القای کالوس در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشتر از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و بدون Kin بود. این بدان معناست که مقادیر زیاد Kin در سطوح ثابت تنظیم‌کننده‌های اکسین ممکن است اثر معکوس بر خصوصیات کالوس‌دهی بگذارد. نتایج همچنین نشان داد که Kin دارای اثر متقابل با NAA است، زیرا در سطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیمار بدون Kin نسبت به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشتر بود، اما در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA وضعیت برعکس بود.



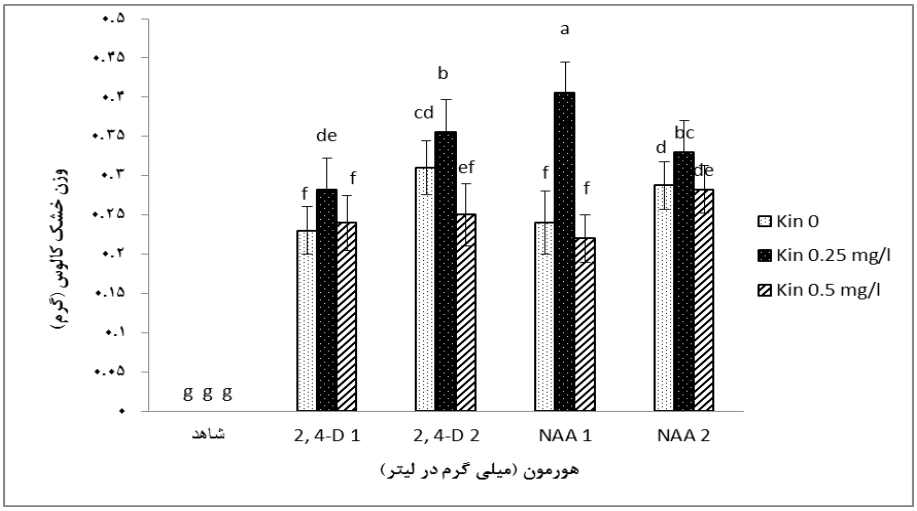

شکل ۲- اثر متقابل اکسین و سیتوکینین بر وزن تر کالوس.
حروف لاتین نشان‌دهندهٔ معنی‌داری میانگین‌ها در آزمون دانکن و خطوط نشان‌دهندهٔ انحراف معیار داده‌هاست.

www.SID.ir

Archive of SID


**وزن خشک کالوس**

نتایج مقایسهٔ میانگین برای صفت وزن خشک کالوس نشان داد که بیشترین وزن خشک کالوس (۰/۴ گرم) در تیمار ترکیبی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (شکل ۳). وزن خشک کالوس نیز مشابه با وزن تر و درصد القای کالوس در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin درصد بیشترین میزان را نسبت به دیگر تیمارهای Kin نشان داد.




شکل ۳- اثر متقابل اکسین و سیتوکینین بر وزن خشک کالوس.

حروف لاتین نشان‌دهندهٔ معنی‌داری میانگین‌ها در آزمون دانکن و خطوط نشان‌دهندهٔ انحراف معیار داده‌هاست.

**خصوصیات ظاهری کالوس**

مقایسهٔ چشمی کالوس‌های تولیدشده از نظر ظاهری نشان داد که کالوس‌های تولیدشده در محیط حاوی Kin در ترکیب با NAA متراکم (فشرده) و زردرنگ بودند، اما کالوس‌های تولیدشده در محیط Kin همراه با 2,4-D سبب ایجاد کالوس ترد (پفکی) و سبزرنگ شد (شکل ۴). بنابراین کالوس‌های تولیدشده با اکسین‌های مختلف، دارای خصوصیات ظاهری متفاوتی بودند که می‌تواند در مراحل بعدی ریخت‌زایی تأثیرگذار باشد.

شکل ۴- کالوس‌های تولیدشده تحت تأثیر Kin با NAA (سمت راست) و Kin با 2, 4-D (سمت چپ)

www.SID.ir

Archive of SID


**تجزیهٔ واریانس سالیسیلیک اسید بر فنول کل، فلاونوئید کل و مهار رادیکال آزاد DPPH کالوس**

نتایج تجزیهٔ واریانس تأثیر سالیسیلیک اسید بر فنول کل، فلاونوئید کل و مهار رادیکال آزاد DPPH کالوس نشان داد که اثر سالیسیلیک اسید بر صفات یادشده در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد ($P\leq0.01$) (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیهٔ واریانس تاثیر سالسیسلیک اسید بر فنول کل، فلاونوئید کل و مهار رادیکال آزاد DPPH درکالوس

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| | | فنول کل | فلاونوئید کل | مهار رادیکال آزاد DPPH |
| تکرار | ۲ | ۲/۵ ns | ۰/۱ ns | ۱/۱ ** |
| سالیسیلیک اسید | ۲ | ۸۷/۴ ** | ۴۳/۸ ** | ۷۷/۱ ** |
| خطا | ۴ | ۰/۷۵ | ۰/۲۵ | ۰/۰۲ |
| ضریب تغییرات (٪) | - | ۳/۴ | ۹/۹ | ۱/۴ |

** و ns به‌ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح ۱ درصد و معنی‌دار نبودن

**مقایسهٔ میانگین فنول، فلاونوئید و مهار رادیکال آزاد DPPH**

نتایج مقایسهٔ میانگین آزمون دانکن نشان داد که مقدار فنول در تیمار ۱۰۰ میکرومولار (۳۱/۸ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک) بیشتر از تیمارهای دیگر بود. اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و ۵۰ میکرومولار مشاهده نشد (جدول ۳). بیشترین و کمترین مقدار فلاونوئید به‌ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید (۹/۳ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک) و شاهد (۲/۰۵ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک) مشاهده شد (جدول ۳). همچنین بیشترین مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید (۳۵/۰۶ درصد) و کمترین مقدار آن (۲۵/۳ درصد) در تیمار شاهد به‌دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسهٔ میانگین تأثیر سالیسیلیک اسید بر فنول کل، فلاونوئید کل و مهار رادیکال آزاد DPPH درکالوس

| غلظت سالیسیلیک اسید | مقایسهٔ میانگین | | |
|---|---|---|---|
| | فنول (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک) | فلاونوئید (میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک) | مهار رادیکال آزاد DPPH (درصد) |
| شاهد | ۲۱/۸ b | ۲/۰۵ c | ۲۵/۳ c |
| ۵۰ میکرومولار | ۲۳/۹ b | ۳/۷ b | ۲۷/۷ b |
| ۱۰۰ میکرومولار | ۳۱/۸ a | ۹/۳ a | ۳۵/۰۶ a |

**بحث**

بیشترین کالوس‌زایی در تیمار ترکیبی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. Asrar zaidi et al. (2012) ریزازدیادی سه گونهٔ مختلف از جنس ارس (*J. excelsa*، *J. horizentalis* و *J. chinenssl*) در

www.SID.ir

Archive of SID


محیط‌های مختلف کشت از جمله محیط MS و محیط کشت گیاهان چوبی (WPM)[1] را با و بدون تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اکسین‌های ایندول بوتریک اسید (IBA)[2]، 2,4-D و ایندول استیک اسید (IAA)[3] و سیتوکین BAP بررسی کردند. شایان ذکر است که بیشترین افزایش تعداد شاخه‌ها در تیمار محیط WPM به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. همچنین ریشه‌زایی در محیط WPM حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. گزارش Salehi Shanjani (2006) مبنی بر اینکه افزودن هورمون‌های سیتوکینین سبب افزایش رشد و درصد کالوس‌زایی در جنس ارس می‌شود، این نتیجه را تأیید می‌کند. همچنین در گونهٔ سرخدار گزارش شده است که بهترین رشد کالوس در محیط کشت WPM همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد 2, 4-D توأم با BAP در ریزنمونهٔ رویان بالغ بوده است که با مطالعهٔ حاضر از نظر نوع محیط کشت و اکسین به‌کاررفته همسوست (Hussain et al., 2013). در تحقیق حاضر، بهترین ترکیب هورمونی برای بیشترین درصد کال‌زایی مربوط به استفاده از ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد. Baravardi et al. (2015) بهترین تیمار برای کال‌زایی ارس را ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین همراه با ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- D گزارش کردند. اختلاف ناشی از نوع اکسین ممکن است ناشی از غلظت‌های متفاوت به‌کاررفته در دو آزمایش باشد. در تحقیق Baravardi et al. (2015) بیشترین مقدار kin، ۰/۲ میلی‌گرم در نظر گرفته شد، درحالی که در تحقیق حاضر ۰/۵ میلی‌گرم اضافه شد و همچنین مقدار اکسین‌ها نیز با هم متفاوت بود. Khosroshahi et al. (2006) بیشترین کال‌زایی سرخدار را در ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin گزارش کردند که با تحقیق حاضر از نظر نوع ترکیب هورمونی مطابقت دارد.

بیشترین وزن تر و خشک کالوس در تیمار ترکیبی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. در پژوهش حاضر تیمارهایی که کال‌زایی بهتری داشتند، دارای وزن تر و خشک بهتری نیز بودند. در تحقیقی مشابه روی *J. excelsa*، بیشترین میانگین وزن کالوس در محیط WPM حاوی 2,4-D به مقدار ۴ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با Kin به میزان ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آوردند و بیشترین میانگین قطر کالوس در محیط WPM حاوی 2,4-D به‌میزان ۴ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با Kin ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد (Baravardi et al., 2015). تغییرات در وزن کالوس‌ها بسته به ترکیب سیتوکینین و اکسین متفاوت است. Rezaie et al. (2015) در تحقیقی روی کاج مطبق نشان دادند که ۴ میلی‌گرم بر لیتر پیکلورام[4] و ۴ میلی‌گرم بر لیتر IBA در محیط کشت WPM بیشترین اثر را بر رشد کالوس‌ها داشت. Baravardi et al. (2015) بیشترین وزن کالوس را در تیمار ۳ میلی‌گرم NAA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آوردند. در تحقیق حاضر NAA در مقادیر بیشتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر اثر منفی بر کال‌زایی داشت، ولی در تحقیق Baravardi et al. (2015) تا ۳ میلی‌گرم در لیتر نیز سبب افزایش کال‌زایی *J. excels* شد. اختلاف وزن کالوس در تیمار حاضر با تحقیقات مرتبط به‌دلیل اختلاف نوع گونهٔ گیاهی به‌کاررفته، نوع محیط کشت، نوع هورمون‌ها و نسبت استفاده از آنهاست.

ریخت‌شناسی کالوس ممکن است در میان ریزنمونه‌های مختلف و غلظت‌های مختلف هورمونی متفاوت باشد. در این تحقیق تغییرات رنگ از زرد به سبز و تغییرات بافت از پفکی به متراکم ناشی از تغییر

1. Woody Plant Medium
2. Indole-3-butyric acid
3. Indole-3-acetic acid
4. Picloram

www.SID.ir

Archive of SID


تنظیم‌کننده‌های رشد بود. کیفیت کالوس به نوع و مقدار عناصر موجود در محیط کشت وابسته است و بنابراین اختلافات موجود در مقدار ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد عامل اصلی این اختلافات است (Mohajer et al., 2012). ازآنجا که باززایی کالوس‌های زرد و متراکم بیشتر از کالوس‌های سبز و پفکی است، افزودن همزمان دو هورمون Kin و NAA به محیط کشت پیشنهاد می‌شود.

در تحقیق حاضر افزایش ۷/۲۵ میلی‌گرمی فلاونوئید و ۹/۷۶ درصدی مهار رادیکال آزاد در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد مشاهده شد. همچنین فنول کل در تیمار اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میکرومولار نسبت به تیمار شاهد، ۱۰ میلی‌گرم افزایش یافت. این افزایش ممکن است به‌دلیل تولید ROS توسط سالیسیلیک اسید با توجه به تأثیر آن در پیام‌رسانی در گیاه باشد. تحقیقات قبلی نیز افزایش فنول کل را در تیمار اسید سالیسیلیک گزارش کرده‌اند (Mendoza et al., 2005; Manivanna et al., 2016). گیاهان برای مقابله با تنش‌ها از سازوکارهای مختلفی مانند افزایش متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئید و آنتوسیانین استفاده می‌کنند. این ترکیبات نقش آنتی‌اکسیدانی دارند و جاروکنندهٔ گونه‌های فعال اکسیژن هستند. افزایش این ترکیبات در تیمار با اسید سالیسیلیک در بررسی‌های دیگر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Pérez-Balibrea et al., 2011; Ram et al., 2013). افزایش ترکیبات فنولی با القای فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز که آنزیم‌های کلیدی در تولید این ترکیبات هستند با تیمار اسید سالیسیلیک رخ می‌دهد (Ganapathy et al., 2016). در گزارش‌های دیگر، همبستگی مثبت بین فعالیت این آنزیم‌ها و ترکیبات فنولی اثبات شده است و ارتباط بین فعالیت این آنزیم‌ها، اسید سالیسیلیک و فنول بیان‌کنندهٔ تأثیر تنظیمی اسید سالیسیلیک در سنتز فنول‌هاست (Manivannan et al., 2016). Anusha et al. (2016) روی *Celastrus paniculatus* و Manivannan et al. (2016) روی *Scrophularia kakudensis* تجمع فنول‌های کل و فلاونوئیدها را در اثر تیمار اسید سالیسیلیک گزارش کردند که با نتایج تحقیق حاضر همسوست.

## نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تولید کالوس از ریزنمونه‌های جوانهٔ نابجای درخت ارس در محیط WPM با تنظیم‌کننده‌های Kin به همراه NAA و 2,4-D پس از شش هفته انجام‌پذیر است. ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکینین تأثیر متفاوتی بر صفات کالوس‌دهی در این گیاه داشت، تا جایی که افزایش تنظیم‌کنندهٔ رشد Kin از ۰/۲۵ به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین، در بسیاری از تیمارها اثر ممانعت‌کنندگی بر خصوصیات کالوس‌دهی این گیاه داشت. در نهایت از بین تیمارهای آزمایش‌شده، تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌عنوان بهترین تیمار به‌منظور تولید بیشتر کالوس و کالوس‌های متراکم‌تر معرفی می‌شود. همچنین در آزمایش دوم سالیسلیک اسید تأثیر معنی‌داری بر مقدار فنول، فلاونوئید و مهار رادیکال آزاد DPPH داشت، به‌طوری که غلظت ۱۰۰ میکرومولار آن دارای بهترین تأثیر بر این صفات بود؛ بنابراین برای افزایش متابولیت‌های ثانویه و خاصیت آنتی‌اکسیدانی کالوس‌های ارس، غلظت ۱۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید پیشنهاد می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID


## References


Anusha, T.S., Joseph, M.V., & Elyas, K.K. (2016). Callus Induction and Elicitation of Total Phenolics in Callus Cell Suspension Culture of Celastrus paniculatus–willd, an Endangered Medicinal Plant in India. *Pharmacognosy Journal*, *8*(5), 230-236.

Asrar Zaidi, M., Khan, S., Jahan, N.,Yousafzai A., & Mansoor. A. (2012). Micropropagation and conservation of three *Juniperus* Specices (*cuperssaceae*). *Pakistan Journal of Botany*, *44*, 301-304.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, *99*(1), 191-203.

Baravardi, H., Ranjbar, Q., & Kamali, S. (2015). Comparison of amount of callus induction in *Juniperus Excelsa* on MS and WPM culture media using different concentration of NAA, 2, 4-D and Kin. *Journal of Crop Breeding*, *16*(3), 149-157.

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), 178-182.

Ganapathy, G., Keerthi, D., Nair, R. A., & Pillai, P. (2016). Correlation of Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and Tyrosine ammonia lyase (TAL) activities to phenolics and curcuminoid content in ginger and its wild congener, Zingiber zerumbet following *Pythium myriotylum* infection. *European journal of plant pathology*, *145*(4), 777-785.

Gatti, E., & Vecchi, M. (2017). Micropropagation of Aristolochia rotunda L. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, *151*(4), 581-583.

Hussain, A., Qarshi, I.A., Nazir, H., Ullah, I., Rashid, M., & Shinwari, Z.K. (2013). In vitro callogenesis and organogenesis in Taxus wallichiana ZUCC, The Himalayan Yew. *Pakistan Journal of Botany*, *45*(5), 1755-1759.

Idowu, P.E., Ibitoye, D.O., & Ademoyegun, O.T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*, *8*(16), 3782-3788.

KHosroshahi, M.,Valizade, M., GHasempour, A., KHosroshahli M., & Naghdi. N. (2006). The effect of culture media, explant and growth regulators on callus and Taxol production in *Taxus baccata* L. *Journal of Agricultural Sciences*, *1*, 69-78

Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y., & Jeong, B. (2016). Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of Scrophularia kakudensis Franch. *International journal of molecular sciences*, *17*(3), 399.

Mendoza, D., Cuaspud, O., Arias, J.P., Ruiz, O., & Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology reports*, *19*, e00273.

Mohajer, S., Taha, R.M., Khorasani, A., & Yaacob, J.S. (2012). Induction of different types of callus and somatic embryogenesis in various explants of Sainfoin (*Onobrychis sativa*). *Australian Journal of Crop Science*, *6*(8), 1305-1313.

Mozafarian, V. (2015). Trees and shrubs of Iran. *Vaziri Publication*, 1050 p.

Pérez-Balibrea, S., Moreno, D.A., & García-Viguera, C. (2011). Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry*, *129*(1), 35-44.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, *5*(11), 43-50.


www.SID.ir

Archive of SID


Ram, M., Prasad, K. V., Singh, S. K., Hada, B. S., & Kumar, S. (2013). Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of Rosa hybrida L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *113*(3), 459-467.

Rezaie, M.R., Hadad, R., & Taghipour, M. (2015). Studying the auxin and cytochinin concentration on callus induction of Araucaria excelsa. *International biotechnology*, 1-5.

Rivas-San Vicente, M., & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of experimental botany*, *62*(10), 3321-3338.

Salehi Shanjani,P. (2006). Seasonal variation of the leaf and cone oil of Juniperus excelsa M.B. *Journal of Medicinal Plants*, *17*, 50-58.

Smith, R.H. (2013). Plant tissue culture*:* techniques and experiments. *Academic Press*. 208p.

Soltani, J., & Moghaddam, M.S.H. (2014). Antiproliferative, antifungal, and antibacterial activities of endophytic alternaria species from Cupressaceae. *Current microbiology*, *69*(3), 349-356.

Watahiki, M., & Trewavas, A. (2018). Systems, variation, individuality and plant hormones. *Progress in biophysics and molecular biology*, *12*, 223-230.

Zhang, Y., O'Neil, S.T., Guiltinan, M. J., Fister, A.S., Shi, Z., Tyler, B.M., & Maximova, S.N. (2015). Two *Theobroma cacao* genotypes with contrasting pathogen tolerance show aberrant transcriptional and ROS responses after salicylic acid treatment. *Journal of experimental botany*, *66*(20), 6245-6258.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Forest
Vol. 11, No. 4, Winter 2020
pp. 533-545

***Research Article***

# The study of callus induction and effect of salicylic acid on callus secondary metabolites of *Juniperus excels*

**A. Dorri[1], S. Kalatejari[2*], M. Dejam[3], A. Khalighi[4], and T. G. Pypker[5]**

[1] PhD student, Dept of Horticultural Science and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran
[2] Assistant Prof. Dept of Horticultural Science and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran
[3] Assistant Prof., Dept of Agriculture, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, I. R. Iran
[4] Prof, Dept of Horticultural Science and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran
[5] Dept. of Natural Resource Sciences, Faculty of Science, Thompson Rivers University, Kamloops, Canada

(Received: 14 April 2019, Accepted: 13 November 2019)

## Abstract

*Juniperus excelsa* is a light demanding and long-lived tree species of the Cupressaceae family. This species has been shown good tolerant to harsh conditions such as cold and drought situations. This research aims to assess the effect of different concentrations of auxin and cytokinin on callus induction of *J. excelsa* as factorial based on completely randomized block design and to study the effect of salicylic acid on phenol, flavonoid and inhibition of DPPH radicals of calli. The explants were selected from sound trees with no diseases and pests. Woody plant medium (WPM) was selected with same laboratory conditions (experimental place, temperature, explant age, hormone type). The experimental treatments were auxin with 5 levels (0, 1 mg/l NAA, 2 mg/l NAA, 1 mg/l 2, 4-D, and 2 mg/l 2,4-D), and cytokinin with 3 levels (0, 0.25 mg/l Kin, 0.5 mg/l kin). The results showed the explants gradually swelled after 3 weeks, and completely induced callus after 6 weeks. The interaction of auxin and cytokinin hormones showed that the highest amount of callus induction (80%) was obtained in the interaction of 0.25 mg/l Kin and 1 mg/l NAA. The highest fresh weight of callus was in the interaction of 0.25 mg/l and 1 mg/l NAA as 1.1 gr. Besides, the dry weight of callus was recorded in the interaction of 0.25 mg/l Kin and 1 mg/l NAA. Kin combined with NAA caused the formation of compressed and yellow callus, and Kin combined with 4, 2-D, created a friable and green callus. On the other hand, we found that the total phenol content in 100 µM SA (31.8 mg gallic acid/ grDW) was higher than other treatments. There was no significant difference between control and 50 µM SA. The highest (9.3 mg quercetin / grDW) and lowest (2.05 mg quercetin / grDW) flavonoid contents were found in 100 µM SA and control, respectively. In addition, the maximum inhibition of DPPH was recorded in 100 µM SA (35.06%), while the minimum was observed in control (25.3%).

**Keywords:** Auxin, Cytokinin, Callus, Flavonoid, Phenol.

∗Corresponding author Tel: +989125669299 Email: kalatejari@yahoo.com

www.SID.ir