مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۶ شماره ۱ صفحه‌های ۷۹ تا ۹۶ (۱۴۰۴)
مقاله پژوهشی

واکنش‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی، زیست شیمیایی و متابولیتی گیاه داوودی در شرایط درون شیشه‌ای به تنظیم کننده‌های رشد، نور، ریزنمونه و القا کننده اسید سالیسیلیک

Morphophysiological, Biochemical, and Metabolite Responses of Chrysanthemum Plant under *In Vitro* Conditions to Growth Regulators, Light, Explant Type, and Salicylic Acid Elicitor

یونس محمودی، مژگان سلیمانی زاده*، علیرضا یاوری
گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
نویسنده مسئول: پست الکترونیک (m.soleimanizadeh@hormozgan.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۲/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۷/۱

چکیده

القاکننده‌ها، به‌ویژه سالیسیلیک اسید، با تحریک مسیرهای دفاعی گیاه می‌توانند موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، بهبود صفات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و زیست شیمیایی شوند. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد و القاسازی اسید سالیسیلیک بر پینه‌زایی و خصوصیات مختلف آن در گیاه داوودی انجام شد. پس از ضدعفونی بذر و کشت در محیط MS ، ریزنمونه‌های برگ و ساقه از گیاهان جوان تهیه و در محیط‌های حاوی تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشد شامل H_1 (شاهد)، H_2 (یک میلی‌گرم NAA + دو میلی‌گرم BAP)، H_3 (۰/۲ میلی‌گرم 2, 4-D)، H_4 (۰/۲ میلی‌گرم BAP+ ۰/۵ میلی گرم 2, 4-D) و H_5 (دو میلی‌گرم BAP+ دو میلی‌گرم 2, 4-D) کشت شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، دو ریزنمونه و دو شرایط نوری مختلف انجام شد. پس از انتخاب بهترین تیمار، از غلظت‌های متفاوت اسید سالیسیلیک (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) روی پینه‌های به‌دست آمده استفاده شد. پس از چهار هفته، ویژگی‌هایی مانند درصد پینه‌زایی، زمان آغاز پینه‌زایی، وزن تر و خشک، و حجم پینه اندازه‌گیری شدند. بیشترین درصد پینه‌زایی (۹۹/۶۶ درصد)، کمترین زمان آغاز پینه‌زایی، و بالاترین وزن و حجم پینه، همگی در تیمار E_1H_5L (برگ، دو میلی‌گرم BAP + دو میلی‌گرم 2, 4-D، روشنایی) مشاهده شد. همچنین تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک بر ویژگی‌های از قبیل: سبزینه، کاروتنوئید، فلاونوئید، فنل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، مالون دی‌آلدئید، پرولین، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا ۱۰۰ میکرومولار وزن تر، وزن خشک و حجم پینه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین مقادیر به‌ترتیب ۲/۰۴ گرم، ۱/۱۳۴ گرم و ۱/۲۲ میلی‌متر مکعب ثبت شد. همچنین تیمارهای اسید سالیسیلیک باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله سبزینه a، b و کاروتنوئید شدند و بیشترین میزان این ترکیبات در تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد. میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک به‌ویژه در ۱۵۰ میکرومولار به‌طور چشمگیری افزایش یافت. محتوای مالون دی آلدئید، پرولین، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و پراکسیداز) در پاسخ به اسید سالیسیلیک افزایش نشان دادند که نشان‌دهنده نقش احتمالی اسید سالیسیلیک در تحریک سازوکارهای دفاعی و تحمل به تنش در پینه است. به‌طور کلی، تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیشترین تأثیر مثبت بر رشد پینه و ترکیبات زیستی داشت، در حالی که تیمار ۱۵۰ میکرومولار بیشترین اثر را بر فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پینه‌زایی، تنظیم کننده رشد، اسید سالیسیلیک، متابولیت ثانویه، ریزنمونه.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

مقدمه

گل داوودی[۱] با نام علمی *Chrysanthemum morifolium* Ramat و از خانواده Asteraceae یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین گیاهان زینتی چندساله در سطح جهان است که به‌دلیل تنوع گسترده در رنگ و شکل گل‌ها، ارزش اقتصادی و تجاری قابل توجهی دارد (Spaargaren & van Geest, 2018). این گیاه علاوه بر نقش برجسته در طراحی فضای سبز و گل‌آرایی، به‌دلیل دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها و روغن‌های فرار، در صنایع دارویی و آرایشی-بهداشتی نیز جایگاه ویژه‌ای یافته است (Mekapogu *et al.*, 2022). با وجود سازگاری بالا با شرایط محیطی و پتانسیل بالا برای تولید انبوه، روش‌های سنتی تکثیر مانند قلمه‌زنی با محدودیت‌هایی مانند راندمان پایین، کیفیت ناپایدار گیاهان حاصل، انتقال بیماری‌های گیاهی و کندی روند تکثیر مواجه هستند که پاسخ‌گوی نیازهای بازار و پژوهش‌های نوین نمی‌باشند (Eisa *et al.*, 2022). در این راستا، کشت بافت گیاهی به‌عنوان یک فناوری پیشرفته، روشی مؤثر برای تکثیر سریع و یکنواخت گیاهان سالم و عاری از آلودگی محسوب می‌شود و با فراهم آوردن محیطی کنترل‌شده، امکان بررسی دقیق اثر عوامل رشد، القاکننده‌های متابولیکی را برای بهبود کیفیت و عملکرد گیاه فراهم می‌سازد. بر این اساس، استفاده از کشت بافت ابزاری راهبردی برای رفع چالش‌های تولید گل داوودی و ارتقای سطح بهره‌وری در این گیاه ارزشمند به شمار می‌رود (Hazrati *et al.*, 2023). در بین تکنیک‌های کشت بافت، القای پینه[۲] به‌عنوان مرحله‌ای کلیدی در باززایی گیاه و همچنین تولید ترکیبات متابولیکی ثانویه با ارزش، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (Fazili *et al.*, 2022). تکثیر درون شیشه‌ای گل داوودی از طریق القای پینه (Boonprasop *et al.*, 2023; Miler *et al.*, 2023) و تولید متابولیت‌های ثانویه در پینه گل داوودی در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Purwianingsih *et al.*, 2016; Setiawati *et al.*, 2020). پینه‌زایی[۳] موفق، بستر لازم را برای تمایز یاخته‌ها به اندام‌های جدید فراهم کرده و همچنین امکان استخراج متابولیت‌های دارویی مهم از بافت‌های گیاهی را ایجاد می‌کند. فرآیند القای پینه به‌شدت تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله ترکیب محیط کشت، نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، شرایط نوری و دمایی محیط کشت قرار دارد (Karabulut *et al.*, 2024). در این میان، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند بنزیل‌آمینوپورین[۴] (BAP) از گروه سیتوکینین‌ها و نفتالین استیک اسید[۵] (NAA) از گروه اکسین‌ها، از مهم‌ترین ترکیبات مورد استفاده در القای پینه و اندام‌زایی هستند (Sidik *et al.*, 2024). 2,4 -دی کلروفنوکسی استیک اسید[۶] (2,4-D) نیز به‌عنوان یک اکسین مصنوعی بسیار مؤثر، کاربرد گسترده‌ای در القای پینه دارد و توانایی بالایی در تحریک تقسیم اولیه یاخته‌های گیاهی دارد (Butova *et al.*, 2024). علاوه بر ترکیب تنظیم کننده رشد، شرایط نوری نیز در روند پینه‌زایی و رشد بافت‌های گیاهی نقش مهمی ایفا می‌کند. بنابراین، دستیابی به بازدهی بالای پینه‌زایی و توسعه مناسب بافت‌ها در کشت درون‌شیشه‌ای، نیازمند تنظیم دقیق غلظت و نسبت تنظیم کننده رشد، نوع محرک، شرایط نوری و سایر پارامترهای محیطی است (Kirakosyan *et al.*, 2022). طراحی مناسب این شرایط می‌تواند زمینه‌ساز بهبود کارآیی در تکثیر، باززایی و تولید ترکیبات ثانویه گیاهی با ارزش در گونه‌های مهمی چون گل داوودی باشد. از سوی دیگر، بهره‌گیری از ترکیبات القاکننده پاسخ‌های دفاعی یا القاکننده‌ها در سال‌های اخیر توجه زیادی را به‌خود جلب کرده است (Saini *et al.*, 2024). اسید سالیسیلیک[۷] (SA) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین القاکننده‌ها شناخته می‌شود که در تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاه، افزایش ساخت متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مؤثری ایفا می‌کند (Upadhyay *et al.*, 2025). استفاده همزمان از اسید سالیسیلیک با تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت می‌تواند شرایط بهینه‌ای را برای افزایش رشد، افزایش تولید ترکیبات زیست‌فعال و بهبود مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های زیوا[۸] و نازیوا[۹] فراهم کند (Niazian & Sabbatini, 2021). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که افزودن اسید سالیسیلیک به محیط کشت بافت می‌تواند تأثیرات مثبتی بر رشد و افزایش تولید متابولیت در گیاهان زینتی داشته باشد. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای روی کشت‌های پینه *Givotia moluccana* مشاهده شد که تیمار با اسید سالیسیلیک موجب افزایش میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد (Woch *et al.*, 2023). همچنین، تحقیقی در سال ۲۰۲۴ نشان داد که افزودن اسید سالیسیلیک به محیط کشت بافت، تولید متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در گیاه *Hemerocallis citrina*

۱- Florist's Chrysanthemum ۲- Callus ۳- Callogenesis ۴- Benzylaminopurine
۵- Naphthaleneacetic acid ۶- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid ۷- Salicylic acid ۸- Biotic ۹- Abiotic

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

افزایش داد و می‌تواند برای سایر گیاهان زینتی نیز کاربرد داشته باشد (Miao *et al.*, 2024). با توجه به پتانسیل بالای گل داوودی در حوزه‌های زینتی و دارویی، به‌کارگیری ترکیب مناسبی از تنظیم‌کننده‌های رشد و القاکننده‌ها می‌تواند گامی مؤثر در راستای بهبود کیفی و کمی تولید این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای باشد. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشدی، نوع ریزنمونه، شرایط نوری و اسید سالیسیلیک بر پینه‌زایی و ویژگی‌های زیست شیمیایی، ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و متابولیکی آن در گل داوودی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

زمان و مکان اجرا آزمایش

این پژوهش در سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه کشت بافت، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان انجام شد.

تهیه و ضدعفونی مواد گیاهی

بذرهای داوودی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند. برای ضدعفونی، ابتدا بذرها به‌مدت ۵ دقیقه در محلول قارچ‌کش بنومیل ۱۰ درصد قرار گرفتند، سپس به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند و در نهایت به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار داده شدند. پس از این مراحل، بذرها سه بار با آب مقطر استریل شسته شده و روی محیط کشت[1] MS قرار گرفتند (Murashige & Skoog, 1962). بعد از گذشت یک ماه، ریزنمونه‌های برگ و ساقه از گیاهان جوان برداشت شده و برای انجام آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمایش اول: تاثیر تنظیم کننده‌های رشدی، ریزنمونه و شرایط نوری بر تشکیل پینه

ین آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار روی دو ریزنمونه (L (برگ) و S (ساقه) و در شرایط نوری مختلف (روشنایی و تاریکی) انجام شد. تنظیم کننده‌های رشدی در ۵ سطح مختلف شامل: H_1 (شاهد)، H_2 (یک میلی‌گرم NAA + دو میلی‌گرم BAP)، H_3 (۰/۲ میلی‌گرم 2, 4-D)، H_4 (۰/۲ میلی‌گرم BAP+ ۰/۵ میلی گرم 2, 4-D) و H_5 (دو میلی‌گرم BAP + دو میلی‌گرم 2, 4-D بودند. محلول‌های مادری تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و NAA با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم از هرکدام در چند قطره اتانول ۹۶ درصد تهیه شده و سپس با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر تا حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. همچنین، محلول مادری BAP با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم از BAP در چند قطره سود و آب مقطر آماده گردید و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

ارزیابی پینه‌زایی

نسبت تعداد ریزنمونه‌های دارای پینه به کل ریزنمونه‌ها به‌عنوان درصد پینه‌زایی ثبت شد. زمان آغاز پینه‌زایی به‌عنوان مدت زمانی که از کشت نمونه‌ها تا شروع تشکیل پینه می‌گذرد، اندازه‌گیری می‌شود. پس از گذشت چهار هفته، وزن تر و وزن خشک پینه با استفاده از ترازوی دقیق اندازه‌گیری و ثبت گردید. همچنین، حجم پینه با استفاده از روش ارشمیدس (جابه‌جایی مایع) محاسبه شد.

آزمایش دوم: تهیه القاکننده زیستی اسید سالیسیلیک و بررسی تاثیر آن بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی، زیست‌شناسی و متابولیتی پینه

پس از حل شدن کامل، با استفاده از آب مقطر محلول تا حجم نهایی مورد نظر، رقیق شد. سپس اسید سالیسیلیک با غلظت‌های مختلف (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) به محیط کشت MS حاوی بهترین تیمار تعیین‌شده از مرحله اول (دو میلی‌گرم BAP + دو میلی‌گرم) افزوده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری سبزینه و کاروتنوئید

برای استخراج رنگدانه‌ها، ۲۰۰ میلی‌گرم از پینه با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد استخراج شد. سپس محلول فیلتر شده در اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۸۰ نانومتر برای اندازه‌گیری غلظت رنگدانه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Hemphill & Venketeswaran, 1978). محاسبات بر اساس فرمول‌های زیر انجام گردید:

۱- Murashige and Skoog

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

سبزینه a (میلی‌گرم در گرم وزن تر): رابطه ۱ $= (A_{645}\times 2.69) - (A_{663}\times 12.7)$

سبزینه b (میلی‌گرم در گرم وزن تر) رابطه ۲ $= (A_{663}\times 4.68) - (A_{645}\times 22.9)$

کاروتنوئید (میلی‌گرم در گرم وزن تر) رابطه ۳ $= (A_{480}\times 1000) - (\text{Chl a}\times 1.82) - (\text{Chl b}\times 85.02)$

تعیین فنل کل

ابتدا عصاره متانولی نمونه‌های گیاهی تهیه شد؛ به این صورت که ۰/۱ گرم از پینه خشک گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ مخلوط گردید و محلول حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در با همزن هم زده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با g ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و فاز بالایی جمع‌آوری و برای سنجش فنل و فلاونوئید استفاده شد. برای تعیین میزان فنل کل، از روش فولین-سیوکالتو طبق دستورالعمل McDonald و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد (McDonald *et al.*, 2001). بدین منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با غلظت ۰/۳۲میلی‌گرم در میلی‌لیتر با ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو مخلوط گردید. پس از گذشت پنج دقیقه، ۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط افزوده شد. مخلوط حاصل به‌مدت یک تا ۱/۵ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس میزان جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تعیین محتوای فلاونوئید

مقدار فلاونوئید کل با اندکی تغییر بر اساس روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) تعیین شد. بدین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استات پتاسیم یک مولار، ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) کلرید آلومینیوم، و ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره خام در یک لوله آزمایش ریخته شد و با افزودن آب مقطر، حجم نهایی مخلوط به سه میلی‌لیتر رسانده شد. پس از انکوباسیون نمونه‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق، میزان جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Chang *et al.*, 2002).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

توانایی آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در مهار رادیکال آزاد پایدار DPPH بر اساس روش Materska و Perucka (۲۰۰۵) با اندکی تغییر ارزیابی شد. برای این منظور، ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول DPPH تهیه‌شده در متانول ۹۵ درصد با ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره مورد نظر مخلوط گردید. پس از انکوباسیون مخلوط واکنش به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Materska & Perucka, 2005).

مالون دی‌آلدئید (MDA)

سطح پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) اندازه‌گیری شد که با استفاده از روش (Heath & Packer, 1968) تعیین گردید. پینه تازه با دو میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.8) در دمای یخ‌زده هموژن شدند و سپس به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. سپس ۴ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید به یک میلی‌لیتر از سرم اضافه شد. مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس در حمام آب حرارت داده شد و سپس به سرعت در حمام یخ خنک گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آنتوسیانین

برای تعیین آنتوسیانین، ابتدا بافت پینه به قطعات کوچک تقسیم شده و در یک فالکون قرار داده شد. به‌منظور استخراج آنتوسیانین‌ها، حدود ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به فالکون اضافه گردید. سپس فالکون‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفتند و به‌طور منظم هم زده شدند. پس از پایان زمان استخراج، محلول فیلتر شد تا ذرات باقی‌مانده از مایع جدا شوند. برای تثبیت رنگ آنتوسیانین‌ها، ی میلی‌لیتر HCl 1M به محلول استخراجی افزوده شد. محلول فیلتر شده و اسیدی شده سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت. دستگاه با همان حلال ۸۰ درصد کالیبره شد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bürkle *et al.*, 2018).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

محتوای پرولین

محتوای پرولین طبق روش (Bates *et al.*, 1973) تعیین شد. برای این منظور، ۰/۰۴ گرم از پینه‌ها در ۱۵ میلی‌لیتر اسید سالیسیلیک سه درصد آبی هموژنیزه گردید. سپس عصاره فیلتر شد. محلول فیلتر شده (۲ میلی‌لیتر) با دو میلی‌لیتر معرف نائین هیدرین مخلوط شد. در نهایت، جذب محلول‌های رنگی در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) طبق روش (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش (Serrano-Martínez *et al.*, 2008)استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ استفاده شد. به‌منظور رسم نمودارها، از نرم‌افزار Excel بهره گرفته شد. برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی تاثیر تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و شرایط نوری بر صفات مختلف پینه

پس از کشت بذرها و جوانه‌زنی آن‌ها روی محیط کشت MS (شکل ۱)، برگ و ساقه گیاهان درون شیشه‌ای برای انجام فرآیند پینه‌زایی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱- بذور جوانه زده روی محیط کشت MS بعد ۱۵ (الف) و ۳۰ روز (ب).

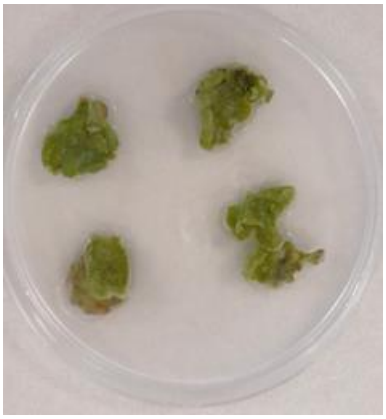
Fig. 1. Germinated seeds on MS medium after 15 (a) and 30 days (b).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان‌دهنده معنی‌دار بودن برهمکنش تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و شرایط نوری در سطح احتمال یک درصد می‌باشد. به همین دلیل، نمودار اثر سه‌گانه ترسیم گردید.

درصد پینه‌زایی

بیشترین درصد پینه‌زایی (۹۶/۶۶٪) مربوط به تیمار E_1H_5L (برگ، دو میلی‌گرم BAP + دو میلی‌گرم 2, 4-D، روشنایی) بود (جدول ۱). این نتیجه احتمالا ناشی از تعادل مناسب بین اکسین و سیتوکینین بوده است. اکسین باعث تمایززدایی و انگیزش تقسیم یاخته‌ای می‌شود و سیتوکینین رشد پینه را تقویت می‌کند (Handayani *et al.*, 2019). برگ به‌دلیل داشتن یاخته‌های مریستمی و حساسیت بیشتر به تنظیم کننده‌های رشد، پینه‌زایی بالاتری نشان می‌دهد (André *et al.*, 2015) و نور نیز باز فتوسنتز و تولید متابولیت‌های ثانویه، شرایط مناسبی برای رشد پینه فراهم می‌کند (Kapoor *et al.*, 2018). مطالعات دیگر نیز ترکیب‌های مشابهی را مؤثر دانسته‌اند. در گیاه *Trachyspermum ammi* تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین میزان پینه را تولید کرد (Fazeli-Nasab, 2018). در *Coffea arabica*، تیمارهای مختلف این دو هورمون پینه‌زایی ۴۹٪ را ایجاد کرد. علاوه بر این، ترکیب سه میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین نتیجه را برای تکثیر پینه فراهم کرد (Munawarti *et al.*, 2024).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]



شکل ۲- شکل پینه‌های به‌دست آمده از تیمار E_1H_5L یا ریزنمونه برگ در شرایط روشنایی و ترکیب تنظیم کننده رشدی دو میلی‌گرم BAP+ دو میلی‌گرم 2, 4-D.

Fig. 2. Callus tissues obtained from the E1H5L treatment or leaf explants under light conditions, using a growth regulator combination of 2 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D.

جدول ۱- مقایسه میانگین برهمکنش تنظیم کننده رشد، ریزنمونه و شرایط نوری بر درصد پینه‌زایی، زمان تا آغاز پینه‌زایی، وزن تر، وزن خشک و حجم پینه گل داوودی. میانگین حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Table 1. Comparison of the mean interaction effect of hormone, explant, and light conditions on callus percentage, time to callus initiation fresh weight, dry weight, and callus volume of the *Chrysanthemum* flower. Means with similar letters are not significantly different at the 5% probability level.

حجم پینه (میلی‌متر مکعب) Callus volume (mm^2)	وزن خشک پینه (گرم) Callus dry weight (g)	وزن تر پینه (گرم) Callus fresh weight (g)	زمان تا آغاز پینه‌زایی (روز) Time to onset of callus formation (days)	پینه‌زایی (درصد) Callus formation (%)	تیمار هورمونی Hormone type	نوع ریزنمونه Explant type	شرایط نوری Light conditions
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_1	L	Light
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_2		
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_3		
۰/۳۹۱^{bc}	۰/۰۹۳^{bc}	۰/۳۵^{d}	۱۳^{b}	۴۶/۶۶^{c}	H_4		
۰/۶۹۶^{a}	۰/۶۲۶^{a}	۱/۱۷۹^{a}	۷^{f}	۹۶/۶۶^{a}	H_5		
۰/۵۴۳^{b}	۰/۳۹۰^{b}	۰/۶۵۶^{b}	۱۰/۳۳^{d}	۶۳/۳۳^{b}	H_1	S	
۰/۱۲۱^{de}	۰/۰۸۶^{cd}	۰/۱۹۶^{c}	۱۴^{a}	۱۰^{f}	H_2		
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_3		
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_4		
۰/۲۳۶^{cd}	۰/۰۸۶^{cd}	۰/۱۹۶^{c}	۰^{g}	۲۰e	H_5		
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_1	L	Dark
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_2		
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۱۰/۶۶^{d}	۰^{g}	H_3		
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_4		
۰/۲۳۸^{cd}	۰/۰۹۰^{cd}	۰/۳۲^{d}	۸/۶۶^{e}	۳۰^{d}	H_5		
۰/۱۴۴^{d}	۰/۰۸۸^{cd}	۰/۲^{d}	۱۱/۶۶^{c}	۱۳/۳۳^{f}	H_1	S	
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_2		
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_3		
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_4		
۰^{e}	۰^{d}	۰^{e}	۰^{g}	۰^{g}	H_5		

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

زمان تا آغاز پینه‌زایی

کمترین میزان زمان آغاز پینه‌زایی در تیمار E_1H_5L (برگ، دو میلی‌گرم BAP + دو میلی‌گرم 2, 4-D، روشنایی) مشاهده شد (جدول ۱). در مقابل، تیمار E_2H_2L زمان بیشتری تا آغاز کالوس‌زایی نیاز داشت. این تاخیر ممکن است به‌دلیل برهمکنش نوع بافت، ترکیب تنظیم کننده رشدی و شرایط نوری باشد (Zhou *et al.*, 2018). مطالعات مختلف نیز تأثیر نوع و غلظت هورمون‌ها بر زمان القای کالوس را تأیید کرده‌اند. در *Piper betle* L. سریع‌ترین القای پینه با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4- و دو میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست شد (Junairiah *et al.*, 2020). در *Piper retrofractum* القای پینه به‌طور میانگین پس از ۱۵ روز رخ داد (Arofah *et al.*, 2021).

وزن تر پینه

در تیمار E_1H_5L (برگ، دو میلی‌گرم BAP + دو میلی‌گرم 2, 4-D، روشنایی) وزن تر پینه به‌طور معناداری افزایش یافت (جدول ۱). این افزایش احتمالا ناشی از اثر هم‌افزایی BAP و 2, 4-D در تحریک تقسیم یاخته‌ای و رشد پینه است. ترکیب مناسب اکسین و سیتوکینین در این تیمار، با فعال‌سازی مسیرهای تنظیم کننده رشد موجب تقویت رشد پینه رشده است (de Oliveira *et al.*, 2022). شرایط روشنایی نیز از طریق بهبود فتوسنتز، تنظیم متابولیسم و افزایش تقسیم یاخته‌ای رشد ژینه را تقویت کرده است (Yu *et al.*, 2019). علاوه بر این برگ به‌عنوان منبع ذخیره‌ای و تنظیم کننده‌های رشد، به‌دلیل ساختار بافتی مناسب‌تر و میزان کمتر ترکیبات بازدارنده، پتانسیل بیشتری در پینه‌زایی نسبت به ساقه دارد (Khan *et al.*, 2018). یافته‌های ما با نتایج تحقیقات پیشین در گونه‌های مختلف مانند *Piper retrofractum* و *Justicia gendarussa* نیز همخوانی دارد (Arofah *et al.*, 2021; Wahyuni *et al.*, 2017).

وزن خشک پینه

در تیمار E_1H_5L (برگ، دو میلی‌گرم BAP + دو میلی‌گرم 2, 4-D، روشنایی) وزن خشک پینه افزایش معناداری داشت (جدول ۱). این افزایش می‌تواند ناشی از اثر ترکیبی و تعادل مناسب بین سیتوکینین و اکسین در تحریک تقسیم یاخته‌ای و تمایز یاخته‌ای باشد (Andaryani *et al.*, 2019). همچنین این ترکیب تنظیم کننده رشدی با فعالسازی مسیرهای ساخت پروتئین و متابولیت‌های ثانویه، منجر به افزایش زیست توده می‌شود (Rybin *et al.*, 2024). شرایط نوری نیز با تقویت فرآیندهای متابولیکی و تامین انرژی، رشد پینه را بهبود می‌بخشد (Yu *et al.*, 2019). این نتایج با یافته‌های مشابه در گونه‌های مختلف مانند گیاه *Piper retrofractum* و *Stevia rebaudiana* هم خوانی دارد (Arofah *et al*. 2021; Pacaldo & Arradaza, 2021).

حجم پینه

بیشترین افزایش معنی‌دار حجم پینه در تیمار E_1H_5L (برگ، دو میلی‌گرم BAP + دو میلی‌گرم 2, 4-D، روشنایی) مشاهده شد (جدول ۱). افزایش حجم پینه در این تیمار می‌تواند به‌دلیل ترکیب اثرات همزمان تنظیم کننده رشدی و شرایط محیطی باشد (André *et al*., 2015). این ترکیب تنظیم کننده رشدی باعث تسریع رشد پینه و افزایش حجم آن می‌شود (Mayerni *et al.*, 2020). علاوه بر این، روشنایی به‌عنوان یک عامل محیطی موثر می‌تواند فرآیندهای متابولیکی و زیست شیمیایی لازم برای رشد بهینه پینه را تحریک کرده و در نهایت به افزایش حجم آن کمک کند (Tariq *et al.*, 2014). علاوه بر این، نتایج یک مطالعه نشان داد که تنظیم کننده رشدی مانند 2,4-D، NAA و TDZ به‌طور معناداری کارایی تشکیل پینه را افزایش داده و باعث افزایش وزن پینه گیاه *Zingiber officinale* شدند (Febriani *et al.*, 2025).

ارزیابی تاثیر اسید سالیسیلیک روی ویژگی‌های مختلف پینه

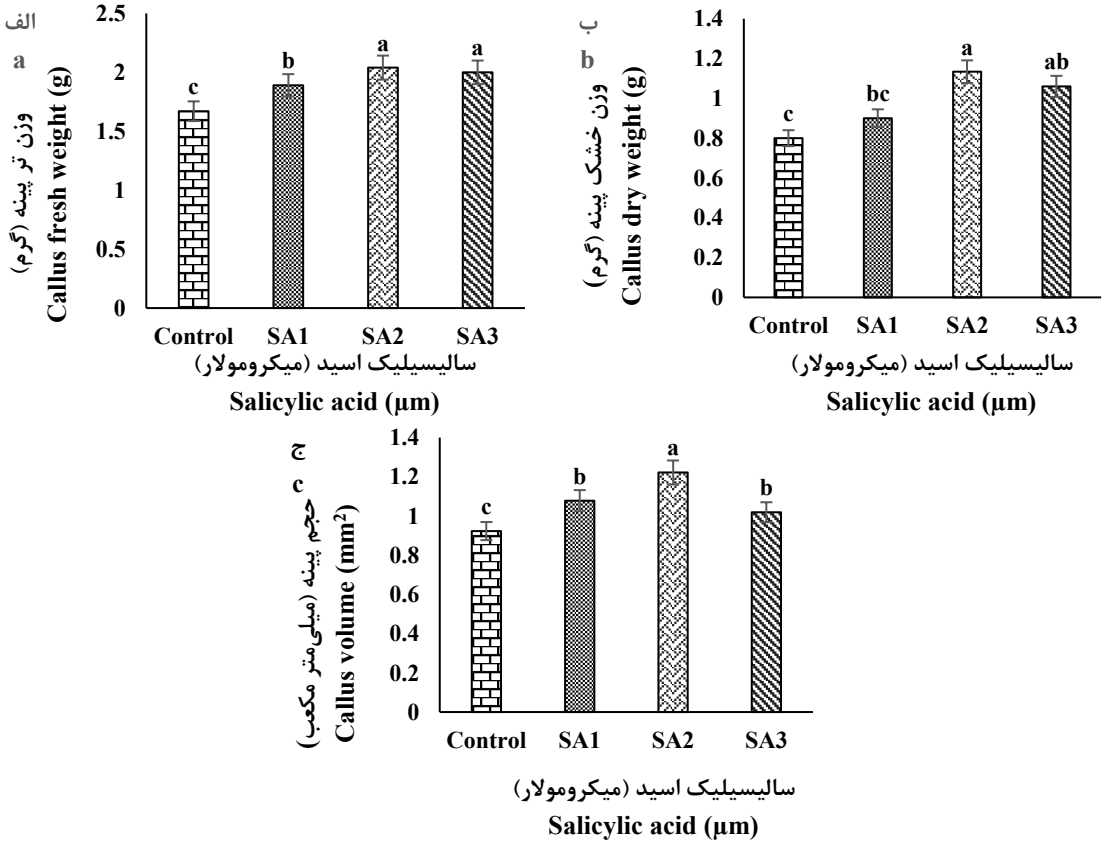
اثر اسید سالیسیلیک بر وزن تر و حجم پینه در سطح احتمال یک درصد و وزن خشک پینه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود.

وزن تر پینه

براساس نتایج، با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک وزن تر پینه به‌طور معناداری افزایش یافت و بیشترین مقدار در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار مشاهده شد (شکل ۳ الف). این افزایش ممکن است به نقش اسید سالیسیلیک در تحریک تقسیم یاخته‌ای و تعدیل مسیرهای تنظیم کننده رشدی مانند اکسین و سیتوکینین بیان ژن‌های مرتبط با پینه نسبت داده شود

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

(Aazami *et al.*, 2021). اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک تنظیم کننده رشد گیاهی، در تعدیل مسیرهای تنظیم کننده رشدی مانند اکسین و سیتوکینین و همچنین بهبود شرایط فیزیولوژیک از طریق کاهش تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مربوط باشد (Pal *et al.*, 2023). نتایج حاصل با مطالعات پیشین در گونه‌های مختلف گیاهی هم‌راستا است و نقش مؤثر این ترکیب در افزایش زیست‌توده پینه را تأیید می‌کند (Golkar *et al.*, 2019; Maqbool *et al.*, 2023).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر بر وزن تر (الف)، خشک (ب)، حجم پینه (ج) گل داوودی. میانگین حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Fig. 3. Comparison of the mean effect of different concentrations of salicylic acid on fresh weight (a), dry weight (b), and callus volume (c) of the *Chrysanthemum* flower. Means with the same letters are not significantly different at the 5% probability level.

وزن خشک پینه

با توجه به نتایج، بیشترین و کمترین میزان وزن خشک پینه در تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و شاهد به‌ترتیب به‌میزان ۱/۱۳۴ و ۰/۸۰۰ گرم بود (شکل ۳ ب). نقش تنظیمی اسید سالیسیلیک در تحریک تقسیم یاخته‌ای، به افزایش ساخت ترکیبات زیست فعال و کاهش تخریب ساختارهای یاخته‌ای نسبت داده شود. اسید سالیسیلیک با تاثیر بر تعادل تنظیم کننده رشدی، به‌ویژه از طریق تعامل با اکسین و سیتوکینین، موجب افزایش رشد و تجمع زیست توده می‌شود (Torun *et al.*, 2022). در تحقیقی افزایش وزن خشک پینه (۳/۴۰ میلی‌گرم در گرم) در *Stevia Glycosides* در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (Golkar *et al.*, 2019). در تحقیقی تیمار با اسید سالیسیلیک سبب افزایش وزن خشک پینه *Givotia moluccana* (L.) در مقایسه با شاهد شد (Woch *et al.*, 2023). در مطالعه‌ای تیمار با اسید سالیسیلیک سبب افزایش وزن خشک پینه *Aerva sanguinolenta* گردید (Maqbool *et al.*, 2023).

حجم پینه

با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا ۱۰۰ میکرومولار حجم پینه افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود (۱/۲۲ میلی‌متر مکعب) رسید درحالی‌که، کمترین حجم در شاهد (۰/۹۲۳ میلی‌متر مکعب) مشاهده شد (شکل ۳ ج). این افزایش احتمالا به نقش

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

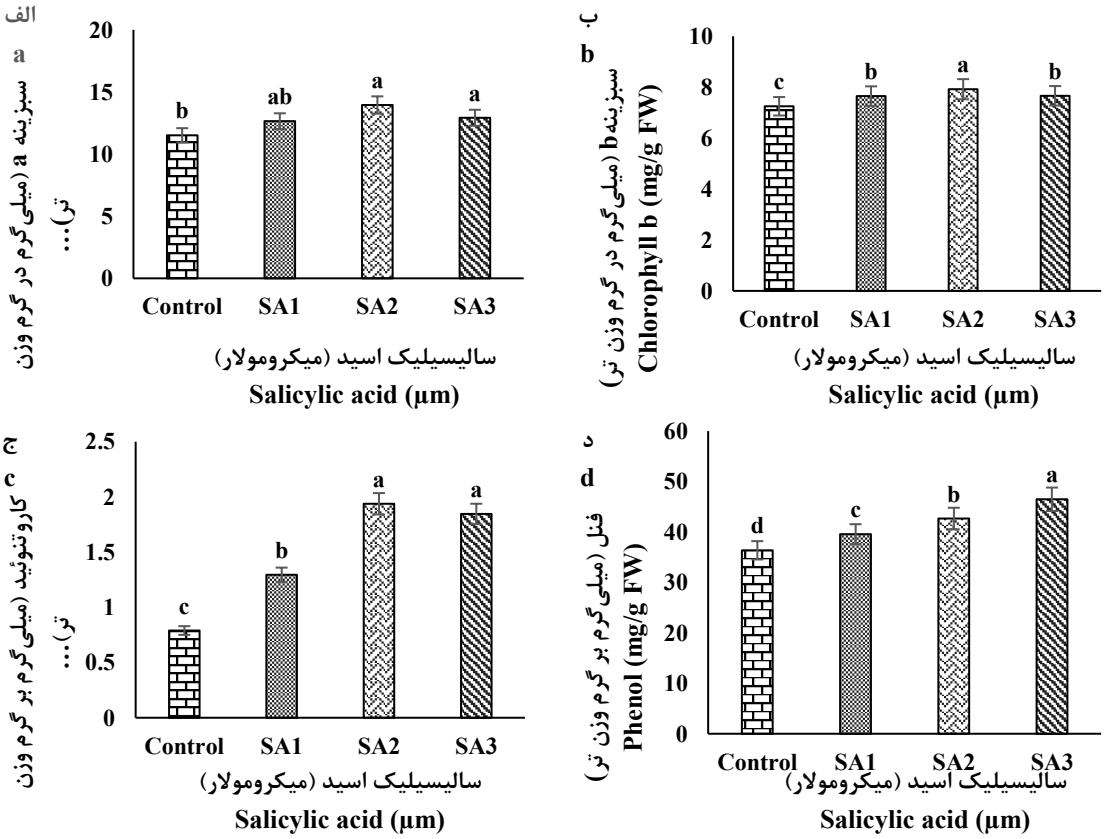
تنظیمی اسید سالیسیلیک در تحریک تقسیم و انبساط یاخته‌ای، تعدیل تعادل تنظیم کننده رشد و کاهش تنش اکسیداتیو مرتبط است (Woch *et al*., 2023). اما در غلظت ۱۵۰ میکرومولار، حجم پینه کاهش نشان داد که می‌تواند ناشی از اثرات بازدارنده غلظت‌های بالای این ترکیب و ایجاد تنش فیزیولوژیک باشد (Nazir *et al*., 2021). نتایج مشابهی در گیاهان مختلف گزارش شده است؛ به‌طور مثال اسید سالیسیلیک سبب افزایش زیست توده پینه در *Givotia moluccana* (Woch *et al*., 2023) و کاهش رشد در کشت یاخته‌ای *S. miltiorrhiza* شده است (Dong *et al*., 2010).

اثر اسید سالیسیلیک بر صفات فیزیولوژیکی، متابولیتی و آنتی‌اکسیدانی

بر طبق نتایج تجزیه واریانس اثر القاکننده اسید سالیسیلیک بر صفات فیزیولوژیکی، متابولیتی و آنتی‌اکسیدانی پینه در سطح احتمال یک درصد بود.

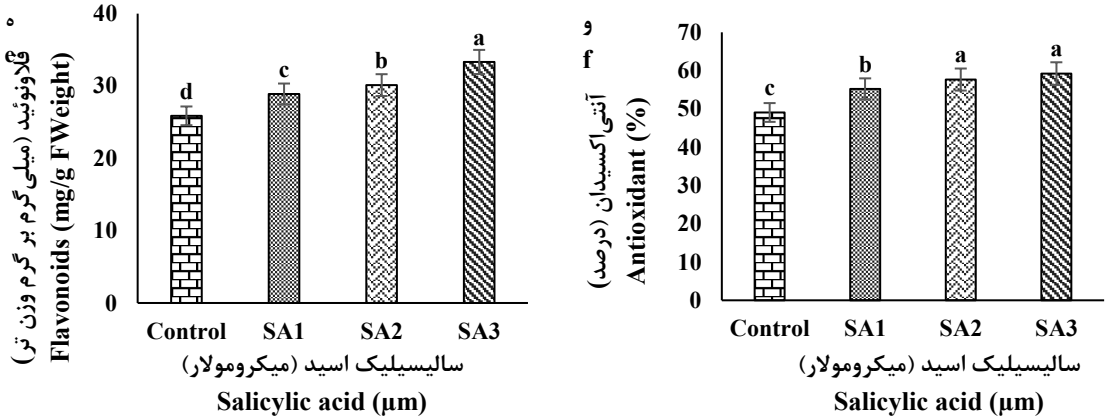
سبزینه a

نتایج مقایسه میانگین نشان داد تیمار اسید سالیسیلیک در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار سبب افزایش سبزینه a پینه شد (شکل۴ الف). بیشترین مقدار سبزینه a در غلظت‌های ۱۰۰ (۱۳/۹۵) و ۱۵۰ (۱۲/۹۲) میکرومولار مشاهده شد (شکل ۴ الف) که تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۴ الف). افزایش سبزینه احتمالا ناشی از نقش اسید سالیسیلیک در تنظیم تعادل تنظیم کننده‌های رشد، تحریک مسیرهای متابولیکی و تقویت فعالیت آنزیم‌های سبزینه‌ساز است (Yang *et al*., 2022). مطالعات پیشین نیز نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند؛ محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش سبزینه a در گیاه گل مخروط ارغوانی[1] شد (Mohit Rabary *et al*., 2020). همچنین افزایش سبزینه تحت تیمار اسید سالیسیلیک در *Calotropis procera* (Alam, 2024) و *Catharanthus roseus* L. گزارش گردیده است (Niyazazari *et al*., 2021).



۱- *Echinacea purpurea*

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر سبزینه a (الف)، b (ب)، کاروتنوئید (ج)، فنل (د)، فلاونوئید (ه) و (و) آنتی‌اکسیدان گل داوودی. میانگین حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Fig. 4. Comparison of the mean effect of different concentrations of salicylic acid on chlorophyll a (a), b (b), carotenoids (c), phenols (d), flavonoids (e), and antioxidants (f) of the *Chrysanthemum* flower. Means with the same letters are not significantly different at the 5% probability level.

سبزینه b

بر اساس نتایج، بیشترین سبزینه b در تیمار ۱۰۰ میکرومولار (۷/۹۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر) اسید سالیسیلیک و کمترین در شاهد (۷/۲۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل ۴ ب). افزایش سبزینه b در تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۰۰ میکرومولار احتمالا به نقش آن در تنظیم ساخت زیستی رنگدانه‌ها، کاهش تجزیه سبزینه و بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط است (Jahan *et al*., 2019). مطالعات نشان داده‌اند که کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک موجب افزایش سبزینه در گیاهان مختلف از جمله *Pistacia chinensis* (Song *et al*., 2020) و *Echinacea purpurea* (Mohit Rabary *et al*., 2020) شده است.

کاروتنوئید

بررسی‌ها نشان داد که تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ باعث افزایش معنی‌دار کاروتنوئید شد (شکل ۴ ج). بیشترین میزان کاروتنوئید در این غلظت‌ها مشاهده شد و بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۴ ج). این افزایش احتمالا به نقش اسید سالیسیلیک در تحریک مسیر ساخت زیستی رنگدانه‌های فتوسنتزی، حفاظت از کلروپلاست‌ها و کاهش تنش اکسیداتیو مرتبط است (Janda *et al*., 2014). مطالعات پیشین نیز نتایج مشابهی در گیاهان زینتی گزارش کرده‌اند؛ به‌طوری‌که افزایش کاروتنوئید در پینه *Echinacea purpurea* (Mohit Rabary *et al*., 2020)، *Rosa hybrida* (Ram *et al*., 2013) و *Rosa canina* L. پس از کاربرد اسید سالیسیلیک مشاهده شد (Tafreshi *et al*., 2025).

فنل

بیشترین و کمترین محتوای فنل در تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۵۰ میکرومولار و شاهد به‌ترتیب به‌میزان ۴۶/۴۸ و ۳۶/۳۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود (شکل ۴- د). افزایش در تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۵۰ میکرومولار احتمالا ناشی از نقش تنظیمی اسید سالیسیلیک در مسیرهای متابولیکی ترکیبات فنلی و پاسخ به تنش است. اسید سالیسیلیک با تحریک بیان ژن‌های کلیدی در مسیر فنیل‌پروپانوئید و افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط تولید ترکیبات فنلی را تقویت می‌کند (Sharma *et al*., 2019). مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که سالیسیلیک اسید می‌تواند محتوای فنل را در گیاهان افزایش دهد؛ به‌طور مثال در کشت سوسپانسیون یاخته‌ای *Thevetia peruviana* مشاهده شد (Mendoza *et al*., 2018). افزایش فنل در کشت سوسپانسیون یاخته‌ای *Celastrus Paniculatus* با تیمار اسید سالیسیلیک مشاهده شد (Anusha *et al*., 2016).

فلاونوئید

افزایش محتوای فلاونوئید با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۴ ه). بیشترین مقدار فلاونوئید در تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به‌مقدار ۳۳/۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود (شکل ۴ ه). افزایش فلاونوئید احتمالا ناشی از فعال‌سازی مسیر فنیل‌پروپانوئید و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با ساخت فلاونوئید است (Irani *et al*., 2019).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

فلاونوئیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن و حفاظت یاخته‌ها در برابر تنش اکسیداتیو نقش دارند (Hasanuzzaman *et al*., 2020). مطالعات پیشین نیز افزایش فلاونوئیدها را در گیاهان زینتی گزارش کرده‌اند؛ به‌طور مثال در گل همیشه بهار (Pacheco *et al*., 2013) و *Centaurea cyanus* (Tajodini *et al*., 2015) پس از کاربرد اسید سالیسیلیک افزایش قابل توجه فلاونوئید مشاهده شده است.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

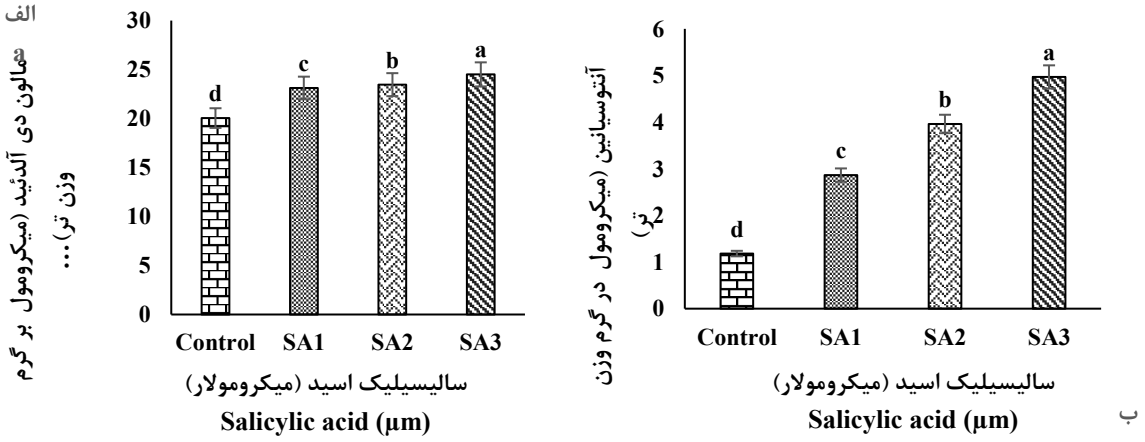
با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴ و) و بیشترین افزایش مقدار در تیمارهای اسید سالیسیلیک با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار (۵۷/۶۶ و ۵۹/۲۱ درصد) مشاهده شد. درحالی‌که کمترین میزان در شاهد (۴۹/۰۶ درصد) ثبت شد (شکل ۴ و). این افزایش به احتمال زیاد ناشی از تحریک سیستم دفاعی گیاه و فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که در کاهش آسیب ناشی از گونه‌های فعال نقش دارد (Nauman *et al*., 2018). مطالعات مشابه روی گیاهان نیز اثر تقویتی اسید سالیسیلیک بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را تأیید کرده‌اند. به‌طور مثال، در *Rosa canina* L. محلول‌پاشی با ۲ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (Tafreshi *et al*., 2025). در *Achillea gypsicola* نیز اسید سالیسیلیک سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (Açıkgöz, 2025).

اثر اسید سالیسیلیک بر ویژگی‌های زیست شیمیایی پینه

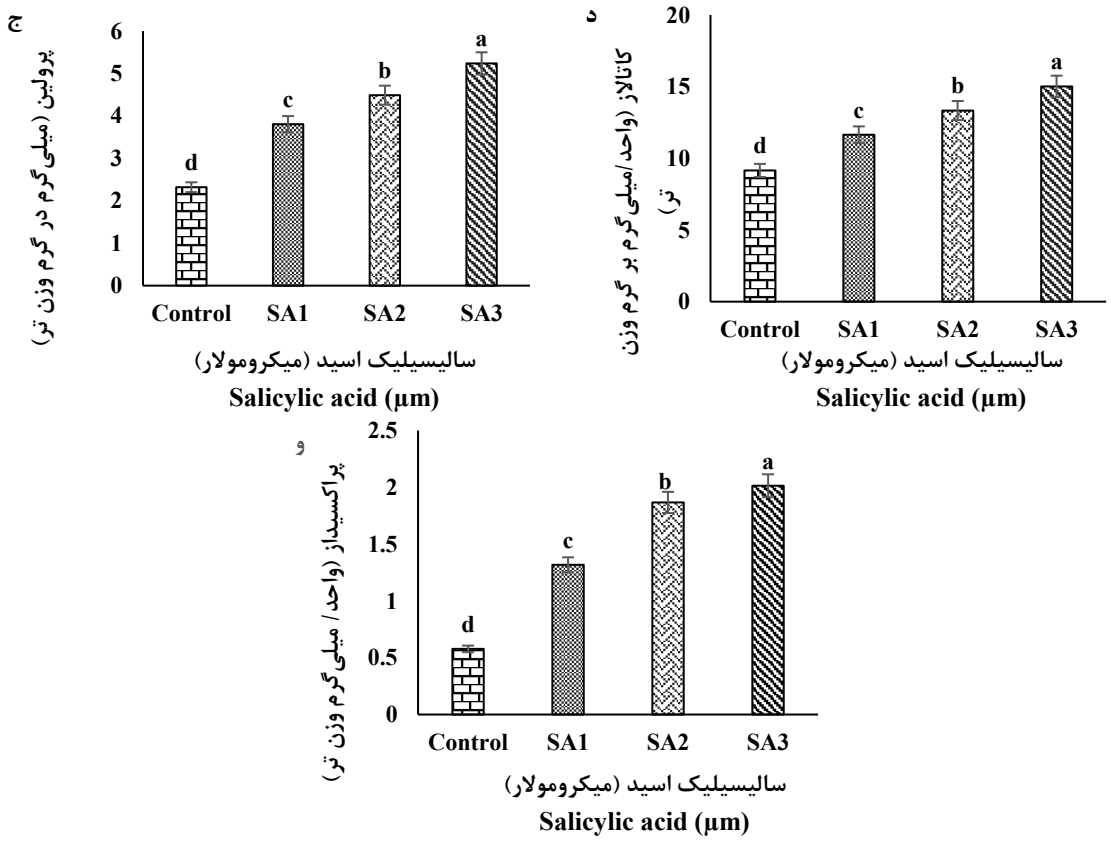
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسید سالیسیلیک بر ویژگی‌های زیست شیمیایی پینه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

مالون دی‌آلدئید

با افزایش غلظت سالسیلیک اسید، میزان MDA در پینه افزایش یافت (شکل ۵ الف). بیشترین و کمترین مقدار MDA در تیمارهای اسید به‌ترتیب در تیمار ۱۵۰ میکرومولار و شاهد برابر با ۲۴/۵۱ و ۲۰/۰۵ میکرومول بر گرم وزن تر بود (شکل۵ الف). اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک هورمون دفاعی مسیرهای دفاعی گیاه را فعال می‌کند که شامل تولید گونه‌های فعال اکسیژن برای مقابله با عوامل آسیب‌زا است. تولید گونه‌های فعال اکسیژن ممکن است به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و افزایش MDA منجر شود، به‌ویژه اگر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه نتواند گونه‌های فعال اکسیژن را خنثی کند (Ding & Ding, 2020). نتایج مشابهی در *Galanthus elwesii* گزارش شده که نشان دهنده نقش اسید سالیسیلیک در تحریک گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش MDA است (Kırgeç *et al*., 2023).



[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر مالون دی‌آلدئید (الف)، آنتوسیانین (ب)، پرولین (ج)، کاتالاز (د) و پراکسیداز (و) گل داوودی. میانگین حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Fig. 5. Comparison of the mean effect of different concentrations of salicylic acid elicitor on malondialdehyde (a), anthocyanin (b), proline (c), catalase (d), and peroxidase (f) of the *Chrysanthemum* flower. Means with the same letters are not significantly different at the 5% probability level.

آنتوسیانین

افزایش غلظت اسید سالیسیلیک موجب افزایش آنتوسیانین در پینه شد (شکل ۵ ب). به‌طوریکه بیشترین مقدار در تیمار ۱۵۰ میکرومولار (۴/۹۶ میکرومول در گرم وزن تر) و کمترین در شاهد (۱/۱۸ میکرومول در گرم وزن تر) ثبت شد (شکل ۵ ب). این افزایش ممکن است ناشی از تحریک مسیرهای بیوسنتزی فیتوشیمیایی توسط اسید سالیسیلیک باشد که با افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها را افزایش دهد (Scheit & Bauer, 2015). در پژوهشی بیشترین آنتوسیانین در پینه *Rosa hybrida* با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک در مقایسه با شاهد مشاهده شد (Ram *et al*., 2013).

پرولین

مقدار پرولین با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۷ ج). بیشترین و کمترین مقدار پرولین در تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۵۰ میکرومولار و شاهد به‌ترتیب ۱۵/۰۱ و ۹/۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۵ ج). اسید سالیسیلیک می‌تواند به‌عنوان یک تنظیم کننده در متابولیسم پرولین عمل کرده و موجب افزایش ساخت پرولین در گیاه شود. پرولین به‌عنوان یک اسمولیت سازگار با تنش عمل کرده و به حفظ تعادل اسمزی و حفاظت از یاخته‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از تنش‌های محیطی مانند تنش شوری یا خشکی کمک می‌کند (Hussain *et al*., 2024). بنابراین، افزایش میزان پرولین در تیمار اسید سالیسیلیک در غلظت ۱۵۰ میکرومولار ممکن است به‌عنوان یک پاسخ دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از شرایط محیطی باشد. محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک سبب افزایش پرولین *Echinacea purpurea* نسبت به شاهد شد (Danesh-Shahraki *et al*., 2023).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

کاتالاز

افزایش غلظت اسید سالیسیلیک سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در پینه شد (شکل ۵ د). بیشترین مقدار در تیمار اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۵۰ میکرومولار (۴/۹۶ واحد در میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین در شاهد (۱/۱۸ واحد در میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود (شکل ۵ د). اسید سالیسیلیک قادر است فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز را افزایش دهد که به‌طور خاص در کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی مانند تنش شوری نقش دارند (Hasanuzzaman *et al*., 2014). تاثیر مشابه اسید سالیسیلیک بر افزایش کاتالاز در پینه *Givotia moluccana* (Woch *et al*., 2023)، در کشت سوسپانسیون یاخته‌ای *Scrophularia kakudensis* (Manivannan *et al*., 2016) و *Zoysia japonica* (Dong *et al*., 2010) نیز گزارش شده است.

پراکسیداز

افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا ۱۵۰ میکرومولار موجب افزایش معنی‌دار فعالیت پراکسیداز شد (شکل ۵ و). بیشترین فعالیت در این تیمار به‌میزان ۲/۰۱ واحد در میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد، در حالی‌که کمترین مقدار مربوط به شاهد (۰/۵۷۸ واحد در میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود (شکل ۵ و). اسید سالیسیلیک با فعالسازی مسیرهای سیگنال‌دهی دفاعی (Saleem *et al*., 2021) و تنظیم بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز موجب کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود (Poór, 2020). پیش تیمار پینه *Taxus baccata* با اسید سالیسیلیک سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد (Sarmadi *et al*., 2018). همچنین افزایش آنزیم پراکسیداز در تیمار پینه *Givotia moluccana* با اسید سالیسیلیک نسبت به شاهد مشاهده شد (Woch *et al*., 2023).

نتیجه‌گیری

به‌کارگیری سالیسیلیک اسید نقش مؤثری در بهینه‌سازی القا و رشد پینه از طریق تحریک مکانیسم‌های دفاعی و افزایش فعالیت‌های فیزیولوژیکی ایفا می‌کند. در این مطالعه، پینه‌های تولید شده از گل داوودی در کشت درون‌شیشه‌ای بر اساس بهترین ترکیب تیماری آزمایش اول (E_1H_5L، برگ، دو میلی‌گرم BAP + دو میلی‌گرم 2, 4-D، روشنایی) تهیه شدند و سپس تحت تیمارهای مختلف اسید سالیسیلیک قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک القاکننده تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر ویژگی‌های زیست شیمیایی، ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و متابولیکی پینه‌های تولید شده از گل داوودی در کشت درون‌شیشه‌ای دارد. تیمارهای مختلف اسید سالیسیلیک، به‌ویژه غلظت ۱۰۰ میکرومولار، موجب افزایش معنی‌دار درصد پینه‌زایی، وزن تر و خشک، و حجم پینه شد. همچنین، غلظت‌های بالاتر اسید سالیسیلیک (۱۵۰ میکرومولار) توانستند سطح قابل‌توجهی از ترکیبات دفاعی مانند مالون دی‌آلدئید، پرولین، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و پراکسیداز) را افزایش دهند، که نشان‌دهنده تقویت مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر تنش‌ها بود. علاوه بر این، افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند سبزینه و کاروتنوئیدها شد، که این امر می‌تواند به‌عنوان شاخصی از بهبود فرایندهای فیزیولوژیکی و افزایش توانایی فتوسنتزی گیاه در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای باشد. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که اسید سالیسیلیک می‌تواند به‌عنوان یک عامل مؤثر در بهبود رشد و نمو پینه در گل داوودی مورد استفاده در کشت درون‌شیشه‌ای عمل کند و از آن می‌توان به‌عنوان ابزاری برای بهینه‌سازی فرآیندهای تولید متابولیت‌های ثانویه بهره برد. بنابراین، کاربرد این القاکننده در مطالعات آتی می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مهم در بهبود فرآیندهای تولید در کشت بافت و دست‌یابی به محصولات با ویژگی‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی مطلوب‌تر مدنظر قرار گیرد.

منابع

References

Aazami, M. A., Rasouli, F., & Ebrahimzadeh, A. (2021). Oxidative damage, antioxidant mechanism and gene expression in tomato responding to salinity stress under in vitro conditions and application of iron and zinc oxide nanoparticles on callus induction and plant regeneration. *BMC Plant Biology*, *21*(1), 597.

Abd El, H. A. H. M. (2012). Lipid peroxidation end-products as a key of oxidative stress: effect of antioxidant on their production and transfer of free radicals. In *Lipid peroxidation*. IntechOpen.

Açıkgöz, M. A. (2020). Establishment of cell suspension cultures of *Ocimum basilicum* L. and enhanced production of pharmaceutical active ingredients. *Industrial Crops and Products*, *148*, 112278.

Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*, *105*, 121-126.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

Alam, M., (2024). Physiological and biochemical responses in *Calotropis procera* callus under salt stress and signalling inducers.

Andaryani, S., Samanhudi, S., & Yunus, A. (2019). Effect of BAP and 2, 4-D on callus induction of *Jatropha curcas* in vitro. *Cell Biology and Development*, *3*(2).

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* (Verbenacea). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, *8*(2), 118.

Arofah, J., Manuhara, Y., & Nurhariyati, T. (2021). Effect of 2, 4-D and BAP on Callus Induction of *Piper retrofractum* Vahl. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, *14*(3), 1390-1394.

Basit, A., Shah, K., Rahman, M. U., Xing, L., Zuo, X., Han, M., & Khalid, M. A. (2018). 15. Salicylic acid an emerging growth and flower inducing hormone in marigold (*Tagetes* sp. L.). *Pure and Applied Biology (PAB)*, *7*(4), 1301-1308.

Bates, L. S., Waldren, R. P. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, *39*, 205-207.

Boonprasop, S., Saetiew, K., Teeralak, M., 2023. Induction of calluses from petal of three *chrysanthemum* cultivars in vitro, IV Asian Horticultural Congress-AHC2023 1404, pp. 347-354.

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.

Butova, V. V., Bauer, T. V., Polyakov, V. A., Rajput, V. D., & Minkina, T. M. (2024). Analyzing the benefits and limitations of advanced 2, 4-D herbicide delivery systems. *Crop Protection*, 106865.

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).

Danesh-Shahraki, H., Pirbalouti, A. G., Rajabzadeh, F., & Kachouei, M. A. (2023). Foliar application of salicylic acid and proline to mitigate water deficit impact on purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, *22*(5), 89-97.

de Oliveira, L. S., Brondani, G. E., Molinari, L. V., Dias, R. Z., Teixeira, G. L., Gonçalves, A. N., & de Almeida, M. (2022). Optimal cytokinin/auxin balance for indirect shoot organogenesis of *Eucalyptus cloeziana* and production of ex vitro rooted micro-cuttings. *Journal of Forestry Research*, *33*(5), 1573-1584.

Dong, D., Yang, Z., Ma, Y., Li, S., Wang, M., Li, Y., & Chao, Y. (2022). Expression of a chlorophyll b reductase gene from *Zoysia japonica* causes changes in leaf color and chlorophyll morphology in *Agrostis* stolonifera. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(11), 6032.

Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of salicylic acid: a plant defense hormone. *Trends in Plant Science*, *25*(6), 549-565.

Eisa, E. A., Tilly-Mándy, A., Honfi, P., Shala, A. Y., & Gururani, M. A. (2022). *Chrysanthemum*: A comprehensive review on recent developments on in vitro regeneration. *Biology*, *11*(12), 1774.

Elshahawy, I. E., & Abd El-Wahed, M. S. (2025). Efficacy of plant resistance elicitor salicylic acid against *Magnaporthiopsis maydis* and its exogenous application for controlling late wilt disease of maize. *Cereal Research Communications*, 1-14.

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.

Febriani, P. F., Susanti, R., Nazreena, O. A., & Ab, R. Z. (2025). Induction and Regeneration of Ginger Callus (*Zingiber officinale*) in Malaysia by Administration of 2, 4 D and NAA. *Journal Agronomi Tanaman Tropika*, *7*(1), 98-107.

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.

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.

Handayani, R. S., Yunus, I., Sayuti, M., & Irawan, E. (2019). *In-vitro* callus induction of durian (*Durio zibethinus* Murr.) leaves using kinetin and 2, 4-D (dichlorophenoxyacetic acid). *Journal of Tropical Horticulture*, *2*(2), 59-64.

Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Nahar, K., Ahamed, K. U., & Fujita, M. (2014). Exogenous salicylic acid alleviates salt stress-induced oxidative damage in *Brassica napus* by enhancing the antioxidant defense and glyoxalase systems. *Australian Journal of Crop Science*, *8*(4), 631-639.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, *9*(8), 681.

Hazrati, S., Mohammadi-Cheraghabadi, M., & Mollaei, S. (2023). Threats and conservation of the medicinal plants. *Phytochemicals in medicinal plants: Biodiversity, Bioactivity and Drug Discovery*, 27.

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.

Hemmati, N., Cheniany, M., & Ganjeali, A. (2020). Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge. *Botanica Serbica*, *44*(2), 163-173.

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.

Horton, P. (2012). Optimization of light harvesting and photoprotection: molecular mechanisms and physiological consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1608), 3455-3465.

Hussain, M. I., Danish, S., Naqvi, S. A., Jaskani, M. J., Asghar, M. A., Khan, I. A., & Muscolo, A. (2024). Physiological, biochemical, and comparative genome analysis of salt and drought stress impact on date palm (*Phoenix dactylifera* L.): tolerance mechanism and management. *Plant Growth Regulation*, 1-23.

Irani, S., Todd, C. D., Wei, Y., & Bonham-Smith, P. C. (2019). Changes in phenylpropanoid pathway gene expression in roots and leaves of susceptible and resistant Brassica napus lines in response to *Plasmodiophora brassicae* inoculation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *106*, 196-203.

Jahan, M. S., Wang, Y., Shu, S., Zhong, M., Chen, Z., Wu, J., & Guo, S. (2019). Exogenous salicylic acid increases the heat tolerance in Tomato (*Solanum lycopersicum* L) by enhancing photosynthesis efficiency and improving antioxidant defense system through scavenging of reactive oxygen species. *Scientia Horticulturae*, *247*, 421-429.

Janda, T., Gondor, O. K., Yordanova, R., Szalai, G., & Pál, M. (2014). Salicylic acid and photosynthesis: signaling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum*, *36*, 2537-2546.

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.

Karabulut, F., Mir, M. Y., & Kamili, A. N. (2024). Production of Secondary Metabolites from Endangered and Commercially Important Medicinal Plants Through Cell and Tissue Culture Technology. In *In Vitro Propagation and Secondary Metabolite Production from Medicinal Plants: Current Trends (Part 1)* (pp. 182-200). Bentham Science Publishers.

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.

Kirakosyan, R. N., Sumin, A. V., Polupanova, A. A., Pankova, M. G., Degtyareva, I. S., Sleptsov, N. N., & Khuat, Q. V. (2022). Influence of plant growth regulators and artificial light on the growth and accumulation of inulin of dedifferentiated chicory (*Cichorium intybus* L.) callus cells. *Life*, *12*(10), 1524.

Kırgeç, Y., Batı-Ay, E. and Açıkgöz, M.A., 2023. The effects of foliar salicylic acid and zinc treatments on proline, carotenoid, and chlorophyll content and anti-oxidant enzyme activity in *Galanthus elwesii* Hook. *Horticulturae*, *9*(9), p.1041.

Kumar, S. S., Arya, M., Mahadevappa, P., & Giridhar, P. (2020). Influence of photoperiod on growth, bioactive compounds and antioxidant activity in callus cultures of *Basella rubra* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *209*, 111937.

Kurepa, J., & Smalle, J. A. (2022). Auxin/cytokinin antagonistic control of the shoot/root growth ratio and its relevance for adaptation to drought and nutrient deficiency stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), 1933.

Li, J., Cao, X., Jia, X., Liu, L., Cao, H., Qin, W., & Li, M. (2021). Iron deficiency leads to chlorosis through impacting chlorophyll synthesis and nitrogen metabolism in *Areca catechu* L. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 1-17.

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.*). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 583, 1, p. 012003). IOP Publishing.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

Meena, M., Yadav, G., Sonigra, P., Nagda, A., Mehta, T., Swapnil, P., & Marwal, A. (2022). Role of elicitors to initiate the induction of systemic resistance in plants to biotic stress. *Plant Stress*, *5*, 100103.

Mekapogu, M., Kwon, O. K., Song, H. Y., & Jung, J. A. (2022). Towards the improvement of ornamental attributes in *chrysanthemum*: recent progress in biotechnological advances. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(20), 12284.

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.

Miao, Y., Li, H., Pan, J., Zhou, B., He, T., Wu, Y., Zhou, D., He, W., Chen, L., 2024. Salicylic acid modulates secondary metabolism and enhanced colchicine accumulation in long yellow daylily (*Hemerocallis citrina*). *AoB Plants* 16, plae029.

Miler, N., Tymoszuk, A., Rewers, M., Kulus, D., 2023. *In vitro* regeneration of *chrysanthemum* from ovaries and ovules treated with thermal and chemical stimuli: morphogenic and cytogenetic effects. *Agriculture 13*, 2069.

Mohit Rabary, P., Movahedi, Z., Ghabooli, M., & Rostami, M. (2020). Exogenous salicylic acid improves photosynthetic pigments and morphological traits of four medicinal plants in an aeroponic system. *Journal of Plant Molecular Breeding*, *8*(1), 1-9.

Morini, S., D'Onofrio, C., Bellocchi, G., & Fisichella, M. (2000). Effect of 2, 4-D and light quality on callus production and differentiation from in vitro cultured quince leaves. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, *63*, 47-55.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15.

Munawarti, A., Nurhury, R. L., Arimarsetiowati, R., Prastowo, E., & Hakim, L. (2024, June). Induction and multiplication of callus of AS2K clones *Coffea arabica* L. through 2, 4-D and BAP combination. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1356, 1, p. 012035. IOP Publishing.

Nauman, M., Kale, R. K., & Singh, R. P. (2018). Polyphenols of Salix aegyptiaca modulate the activities of drug metabolizing and antioxidant enzymes, and level of lipid peroxidation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *18*, 1-12.

Nazir, S., Jan, H., Zaman, G., Ahmed, N., Drouet, S., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2021). Synergistic effects of salicylic acid and light stress on bioactive metabolites in basil callus cultures. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *37*, 102176.

Niazian, M., & Sabbatini, P. (2021). Traditional in vitro strategies for sustainable production of bioactive compounds and manipulation of metabolomic profile in medicinal, aromatic and ornamental plants. *Planta*, *254*, 1-22.

Niyazazari, A., Chalavi, V., & Kabirnataj, S. (2021). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on production of phenol, flavonoid and pigments of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) callus. *Iranian Journal of Horticultural Science, 52,* 1-10.

Pacaldo, F. O., & Arradaza, C. C. (2021). Influence of plant growth regulators and UV light exposure on the formation and phenolic content of *Stevia rebaudiana* Bertoni callus: a preliminary study. *Annals of Tropical Research*, *43*(2), 88-101.

Pacheco, A. C., Cabral, C. S., Fermino, E. S., & Aleman, C. C. (2013). Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. *Journal of Medicinal Plants Research, 7*(42), 3158-3163.

Pal, P., Ansari, S. A., Jalil, S. U., & Ansari, M. I. (2023). Regulatory role of phytohormones in plant growth and development. In: *Plant Hormones in Crop Improvement* (pp. 1-13). Academic Press.

Poór, P. (2020). Effects of salicylic acid on the metabolism of mitochondrial reactive oxygen species in plants. *Biomolecules*, *10*(2), 341.

Puad, N. I. M., Zulkifli, W. M. W., Fathil, N. A. M., & Amid, A. (2023). Response of auxins and cytokinins on *Citrus suhuiensis* adventitious shoot culture initiation and growth. *Journal of Agrobiotechnology*, *14*(1), 21-31.

Purwianingsih, W., Febri, S., Kusdianti, 2016. Formation flavonoid secondary metabolites in callus culture of *Chrysanthemum cinerariefolium* as alternative provision medicine, AIP Conference Proceedings. AIP Publishing LLC, p. 030005.

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*, 459-467.

Rybin, D. A., Sukhova, A. A., Syomin, A. A., Zdobnova, T. A., Berezina, E. V., & Brilkina, A. A. (2024). Characteristics of Callus and Cell Suspension Cultures of Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum*

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

L.) Cultivated in the Presence of Different Concentrations of 2, 4-D and BAP in a Nutrient Medium. *Plants*, *13*(23), 3279.

Saghirzadeh Darki, B., Shabani, L., Pourvaez, R., & Ghannadian, M. (2019). Effects of CuSO4 and AgNO3 on artemisinin and phenolic compound in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Function, 8*(31), 1-8.

Saini, N., Anmol, A., Kumar, S., Wani, A. W., Bakshi, M., & Dhiman, Z. (2024). Exploring phenolic compounds as natural stress alleviators in plants-a comprehensive review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102383.

Saleem, M., Fariduddin, Q., & Castroverde, C. D. M. (2021). Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiology and Biochemistry*, *168*, 381-397.

Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A., & Mirjalili, M. H. (2019). Improved effects of polyethylene glycol on the growth, antioxidative enzymes activity and taxanes production in a *Taxus baccata* L. callus culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *137*, 319-328.

Scheit, K., & Bauer, G. (2015). Direct and indirect inactivation of tumor cell protective catalase by salicylic acid and anthocyanidins reactivates intercellular ROS signaling and allows for synergistic effects. *Carcinogenesis*, *36*(3), 400-411.

Serrano-Martínez, A., Fortea, M. I., Del Amor, F. M., & 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.

Setiawati, T., Ayalla, A., Nurzaman, M., Kusumaningtyas, V.A., Bari, I., 2020. Analysis of secondary metabolites of shoot, callus culture and field plant of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Jurnal Ilmu Dasar*, 21, 1-10.

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.

Sidik, N. J., Agha, H. M., Alkamil, A. A., Alsayadi, M. M. S., & Mohammed, A. A. (2024). A Mini Review of Plant Tissue Culture: The Role of Media Optimization, Growth Regulators in Modern Agriculture, Callus Induction and the Applications. *AUIQ Complementary Biological System*, *1*(2), 96-109.

Sjahril, R., Haring, F., Riadi, M., Rahim, M. D., Khan, R. S., Amir, A., & AR, T. (2016). Performance of NAA, 2iP, BAP and TDZ on callus multiplication, shoots initiation and growth for efficient plant regeneration system in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *International Journal of Agriculture System*, *4*(1), 52-61.

Sofian, A. A., Prihastanti, E., & Suedy, S. W. A. (2018). Effect of IBA and BAP on shoot growth of tawangmangu tangerine (*Citrus reticulate*) by in-vitro. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, *10*(2), 379-387.

Song, X., Guo, H., Liu, Y., Wan, F., Zhang, J., & Chang, X. (2020). Effects of salicylic acid and sucrose on pigment content in *Pistacia chinensis* leaves. *Scientia Horticulturae*, *259*, 108783.

Spaargaren, J., & van Geest, G. (2018). Chrysanthemum. *Ornamental Crops*, 319-348.

Srivastava, S., & Dwivedi, U. N. (2001). Plant regeneration from callus of *Cuscuta reflexa*–an angiospermic parasite–and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. *Plant Physiology and Biochemistry*, *39*(6), 529-538.

Tafreshi, Y. M., Eghlima, G., Hatami, M., & Vafadar, M. (2025). Exploring the potential impact of salicylic acid and jasmonic acid in promoting seed oil content, vitamin C and antioxidant activity in rosehip (*Rosa canina* L.). *BMC Plant Biology*, *25*(1), 249.

Tajodini, M., Samadi, F., Hasani, S., Hashemi, S. R., & Samadi, S. (2015). Influence of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf powder on growth performance, carcass traits and blood parameters in broiler chickens. *Iranian Journal of Applied Animal Science, 52.* 141-146.

Tariq, U., Ali, M., & Abbasi, B. H. (2014). Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *130*, 264-271.

Teshome, S., & Feyissa, T. (2015). *In vitro* callus induction and shoot regeneration from leaf explants of *Glinus lotoides* (L.)-an important medicinal plant. *American Journal of Plant Sciences, 6*, 1320-1340.

Torun, H., Novák, O., Mikulík, J., Pěnčík, A., Strnad, M., & Ayaz, F. A. (2020). Timing-dependent effects of salicylic acid treatment on phytohormonal changes, ROS regulation, and antioxidant defense in salinized barley (*Hordeum vulgare* L.). *Scientific Reports*, *10*(1), 13886.

Torun, H., Novák, O., Mikulík, J., Strnad, M., & Ayaz, F. A. (2022). The Effects of exogenous salicylic acid on endogenous phytohormone status in *Hordeum vulgare* L. under salt stress. *Plants*, *11*(5), 618.

Upadhyay, R., Saini, R., Shukla, P. K., & Tiwari, K. N. (2025). Role of secondary metabolites in plant defense mechanisms: A molecular and biotechnological insights. *Phytochemistry Reviews*, *24*(1), 953-983.

Wafai, A. H., Mokhdomi, T. A., Amin, A., Husaini, A. M., Bukhari, S., Wani, Z., ... & Qadri, R. A. (2017). An efficient method for development of callus and suspension culture in *Crocus sativus*. L (Saffron) using 6-

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

BAP, 2-4 D and NAA enriched media. *International Journal of Current Trends in Science and Technology*, *7*(12).

Wahyuni, D. K., Andriani, P., Ansori, A. N. M., & Utami, E. S. W. (2017). Callus induction of gendarussa (*Justicia gendarussa*) by various concentration of 2, 4-D, IBA, and BAP. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, *9*(3), 402-408.

Woch, N., Laha, S., & Gudipalli, P. (2023). Salicylic acid and jasmonic acid induced enhanced production of total phenolics, flavonoids, and antioxidant metabolism in callus cultures of *Givotia moluccana* (L.) Sreem. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *59*(2), 227-248.

Yang, W., Kang, J., Liu, Y., Guo, M., & Chen, G. (2022). Effect of salicylic acid treatment on antioxidant capacity and endogenous hormones in winter jujube during shelf life. *Food Chemistry*, *397*, 133788.

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.

Zaman, M. A. K., Azzeme, A. M., Ramle, I. K., Normanshah, N., Shaharuddin, N. A., Ahmad, S., & Abdullah, S. N. A. (2021). Prolonged incubation of callus on auxin herbicide 2, 4-D displayed significant effect on alkaloid production in callus of the woody medicinal plant *Polyalthia bullata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *57*(5), 749-759.

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.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 26 (1): 79-96 (2025)
Research article

Morphophysiological, Biochemical, and Metabolite Responses of Chrysanthemum plant under In Vitro Conditions to Growth Regulators, Light, Explant Type, and Salicylic Acid Elicitor

Younes Mahmoudi, Mojgan Soleimanizadeh*, Alireza Yavari
Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
*Corresponding Author, Email: m.soleimanizadeh@hormozgan.ac.ir

Elicitors, particularly salicylic acid, by stimulating plant defense pathways, can enhance the production of secondary metabolites and improve morphological, physiological, and biochemical traits. This study aimed to investigate the effects of growth regulators and salicylic acid elicitation on callus induction and its various characteristics in *Chrysanthemum* plant. After seed sterilization and culture on MS medium, leaf and stem explants from young plants were prepared and cultured in media containing different growth regulator treatments, including H1 (control), H2 (1 mg NAA + 2 mg BAP), H3 (0.2 mg 2,4-D), H4 (0.2 mg BAP + 0.5 mg 2,4-D), and H5 (2 mg BAP + 2 mg 2,4-D). The experiment was conducted as a factorial arrangement in a completely randomized design with three replications, two types of explants, and two light conditions. After selecting the optimal treatment, different concentrations of salicylic acid (0, 50, 100, and 150 µM) were applied to the obtained callus. After four weeks, traits such as callus induction percentage, initiation time, fresh and dry weight, and callus volume were measured. The highest callus induction percentage (99.66%), shortest initiation time, and greatest fresh weight, dry weight, and callus volume were observed in treatment E1H5L (leaf explant, 2 mg BAP + 2 mg 2,4-D, light condition). Furthermore, the effects of different salicylic acid concentrations on traits including chlorophyll content, carotenoids, flavonoids, phenolics, antioxidant capacity, malondialdehyde, proline, anthocyanin, and the activity of catalase and peroxidase enzymes were evaluated. Results indicated that increasing salicylic acid concentration up to 100 µM significantly enhanced fresh weight, dry weight, and callus volume, reaching maximum values of 2.04 g, 1.134 g, and 1.22 mm^3, respectively. Salicylic acid treatments also increased photosynthetic pigments, including chlorophyll a and b and carotenoids, with the highest levels observed at 100 µM. The amounts of phenolic and flavonoid compounds, as well as antioxidant activity, were markedly elevated, especially at 150 µM. Additionally, malondialdehyde content, proline, anthocyanin, and antioxidant enzyme activities (catalase and peroxidase) increased in response to salicylic acid, indicating its potential role in stimulating defense mechanisms and stress tolerance in callus. Overall, the 100 µM salicylic acid treatment had the most positive impact on callus growth and biochemical traits, whereas the 150 µM treatment showed the greatest effect on activating defense plant mechanisms.

Keywords: Callus formation, Growth regulators, Salicylic acid, Secondary metabolites.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-17]