Cell and Tissue Journal 14(4) (2023) 337-352

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

Optimization of Callus Formation In *Cannabis sativa* L.

Eskandari N[a] , Ebadi A[b], Salami SA[c*]

[a]Department of Horticultural Sciences, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran (Ph.D. Candidate)

[b]Department of Horticultural Sciences, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran (Professor)

[c]Department of Horticultural Sciences, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran (Professor)

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Eskandari N , Ebadi A, Salami SA. Optimization of Callus Formation In *Cannabis sativa* L. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(4): 337-352

https://10.61186/JCT.14.4.337

KEYWORDS

callogenesis
cannabinoid
Cannabis sativa L.
plant growth regulators

ABSTRACT

Aim: *Cannabis sativa* L. contains valuable cannabinoids necessary for industrial, nutraceutical and pharmaceutical applications. To ensure the availability of cannabis plant materials in vitro culture approaches guarantee rapid and mass production to meet the growing demand. On the other hand, callogenesis can also guarantee the production of secondary metabolites in vitro through suspension cell culture. The goal of the current study was to compare different basal culture media and plant growth regulator combinations to offer the best conditions for inducing callus formation in medical cannabis.

Material and Methods: Leaf explants were placed on MS and DKW basal culture media were used along with B5 vitamins, 30 g/l sucrose, and 7 g/l of Agar, together with various concentrations of plant growth regulators, including 2,4-D (2, 5, and 8 µmol/l) and BA (0.5 and 2.5 µmol/l).

* Corresponding author. Tel.: 02632248721
E-mail address: asalami@ut.ac.ir
DOI: https://10.61186/JCT.14.4.337
Received 9 Sep. 2023; Received in revised form: 30 Nov. 2023; Accepted: 29 Jan. 2024
Original Article
©Author

Results: The calli appeared between 5 to 7 days after establishment on various basal media supplemented with different types and concentrations of hormones .The presence of plant growth regulators is essential for callus formation in this plant, as the cultured explants in control treatments without hormones did not produce any calli. Callus formation was observed in all media and hormonal treatments, but produced calli were different from each other in terms of size, color and texture. Our study showed that texture of calli was compact or friable. The texture of calli in DKW was the most compact with the least amount of cytokinin at any concentration of auxin. However, in MS, it was the most friable with the highest amount of cytokinin at any concentration of auxin. Also, in this medium, the texture of calli was the most friable with the highest concentration of auxin. The color of calli in hormonal treatments present in MS culture medium was white and light cream, but in most hormonal treatments in DKW culture medium, it was white. The results of this study indicate that the best medium was MS medium supplemented with 2 (µmol/l) 2,4-D with 2.5 (µmol/l) BA (friable callus). Furthermore, the most inappropriate medium for callus formation from cannabis leaves in terms of all the characteristics examined was the DKW culture medium along with 5 (µmol/l) 2,4-D in combination with 2.5 (µmol/l) BA. The compression of calli can be caused by the reduction of proliferation in the cells that are dividing, this reaction can be influenced by the auxin inside the explant. Adding high auxin to endogenous auxin, in addition to adding cytokinin with a low concentration can affect the formation of compact texture. The formation of friable callus requires a balanced combination of auxin and cytokinin. Another important factor in plant tissue culture is the color of the calli, which is a sign of tissue health and vitality. For example, a healthy calli under light conditions is usually green in color, but a dark brown or black color is usually a sign of the death of the calli, which is due to pollution, stress or the production of substances such as phenols. Maximizing callus formation in the shortest possible time is one of the important objectives in tissue culture techniques, which not only saves time and cost but also prevents possible somaclonal variations. In general, according to the results, one of the suitable mediums for callus production in cannabis is the DKW,so the results of this study confirm the introduction of DKW as the best culture medium in past studies. However, the MS culture medium is also the best medium in the available study and the least suitable result of this study is related to one of the hormonal combinations in the DKW culture medium. This difference with the mentioned study may be due to differences in genotype, laboratory materials, hormone amount, vitamins or other conditions affecting the tissue culture of this plant.

Conclusion: Calli provides the opportunity to reproduce plants on a large scale and produce disease-free plants. Generally according to the plant, friable calli have a more suitable tissue for somatic embryogenesis and suspension culture, whereas compact calli have a higher potential for regeneration. This medium is recommended for future studies on somatic embryogenesis and cell suspension cultures due to the calli being friable in it.

سلول و بافت، دوره ۱۴، شماره ۴، سال ۱۴۰۲، صفحات ۳۳۷ تا ۳۵۲

سلول و بافت

بهینه سازی کالوس زایی در شاهدانه *Cannabis sativa* L.

نفیسه اسکندری[۱]، علی عبادی[۲]، سید علیرضا سلامی[۳*]

[۱] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۲] استاد گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۳] استاد گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

واژگان کلیدی

بیوتکنولوژی
شاهدانه
کالوس
کانابینوئید

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۹

چکیده

هدف: باتوجه به اهمیت و نیاز به افزایش کانابینوئیدهای با ارزش موجود در گیاه شاهدانه به‌دلایل کاربردهای صنعتی، غذایی و به‌خصوص اهمیت آن‌ها در صنایع داروسازی و با توجه به این‌که در روش‌های سنتی کشت گیاه، تولید متابولیت‌های ثانویه کم بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، ضروری به‌نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه این متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی با ارزش، از روش‌های کارامد بیوتکنولوژی جهت تولید مقدار مطلوب و کافی مواد موثره مورد نیاز در زمان کمتر بهره‌مند شد. بنابراین هدف از این پژوهش بهینه سازی کالوس زایی در شاهدانه دارویی است. **مواد و روش ها:** کالوس زایی ریزنمونه برگ بعد از ضدعفونی و کشت بر روی محیط کشت‌های MS و DKW حاوی ویتامین های B5 به همراه غلظت‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد D-2,4 و BA بررسی شد. **نتایج:** بهترین کالوس زایی حاصل از این پژوهش مربوط به محیط کشت MS به‌علاوه تیمار هورمونی ۲ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA بود. همچنین نامناسب ترین محیط جهت تولید کالوس از برگ شاهدانه از نظر تمام صفات مورد بررسی مربوط به محیط کشت DKW به‌همراه ۵ میکرومول در لیتر D-2,4 در ترکیب با ۲/۵ میکرومول در لیتر BA بود. **نتیجه گیری:** با توجه به ترد بودن کالوس تولیده شده در محیط به‌دست آمده از این پژوهش، استفاده از آن برای مطالعات آتی جهت جنین زایی سوماتیکی و کشت های سوسپانسیون سلولی توصیه می‌شود.

۱- مقدمه

شاهدانه با نام علمی *Cannabis sativa* L. گیاهی دو پایه و سریع الرشد از تیره Cannabaceae است که به‌طور گسترده در مناطق معتدل و گرمسیری پراکندگی دارد. معمولا شامل سه گونه *Cannabis sativa*و *Cannabis indica*و *Cannabis ruderalis* است. این گیاه به‌عنوان بومی آسیای مرکزی شناخته شده است و یکی از قدیمی ترین گیاهان اهلی شده مورد کشت در جهان برای اهداف مختلف غذایی، دارویی، صنعتی، فیبر، سوخت های زیستی و ... است (۱،۲،۳و۴).

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۶۳۲۲۴۸۷۲۱

آدرس پست الکترونیک: asalami@ut.ac.ir

شاهدانه از متابولیت‌های ثانویه متعددی از جمله حداقل ۱۰۴ کانابینوئید، ۱۲۰ ترپنوئید، ۲۶ فلاونوئید و ۱۱ استروئید در بین بیش از ۵۴۵ ترکیب شناسایی شده در این گیاه تشکیل شده است (۳و۵).

از دهه ۱۹۶۰ تحقیقات عمدتا بر روی کانابینوئیدها، Δ9- tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) (موجود در برگ‌ها و گل آذین) و cannabidiol (CBD) (موجود در تمام بافت های گیاه) متمرکز شده است برخی از فیتوکانابینوئیدها از جمله THC و CBD دارای فعالیت ضد سرطانی هستند و می‌توانند تکثیر سلولی را کاهش دهند (۵،۶،۷و۸). از بیش از ۱۰۰ کانابینوئید شناخته شده در این گیاه، THC-9Δ از نظر فعالیت روانگردانی قوی‌تر است. سایر کانابینوئیدها مانند cannabidiol (CBD) و cannabinol (CBN) دارای اثرات دارویی متفاوتی نسبت به THC-9Δ هستند (۳،۹و۱۰). نوع و سطح کانابینوئیدهای تولید شده تعیین کننده دسته بندی (فیبری و یا دارویی) این گیاه است. در نوع دارویی مقدار THC غالب است در حالی‌که در نوع فیبری مقدار CBD غالب است که خاصیت روانگردانی ندارد (۱۱).

بنابراین شاهدانه گیاهی با ارزش‌های دارویی، تغذیه ای و صنعتی بالا است. پتانسیل ها و کاربردهای شاهدانه تنها به فعالیت‌های بیولوژیکی کانابینوئیدها محدود نمی‌شود بلکه توسط ترکیبات غیرکانابینوئیدی نیز تعریف می‌شود. ترکیب سایر کانابینوئیدها همراه با اجزای غیرکانابینوئیدی می‌تواند اثرات مفید THC را افزایش دهد و عوارض جانبی نامطلوب را کاهش دهد (۱۲).

به‌طورکلی باتوجه به اهمیت و نیاز به افزایش کانابینوئیدهای با ارزش موجود در گیاه شاهدانه به‌دلایل کاربردهای صنعتی، غذایی و به‌خصوص اهمیت آن‌ها در صنایع داروسازی و با توجه به این‌که در روش‌های سنتی کشت گیاه، تولید متابولیت‌های ثانویه کم بوده و مدت زمان طولانی برای تولید لازم است، ضروری به‌نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه این متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی از روش های کارامد بیوتکنولوژی جهت تولید مقدار مطلوب و کافی مواد موثره مورد نیاز در زمان کم‌تر بهره مند شد. بنابراین به‌نژادی برای تولید متابولیت های ثانویه بیشتر، در این گیاه دارویی ارزشمند یکی از مهمترین اهداف پژوهش های مورد نیاز بر روی این گیاه است. همچنین تقاضای بالای شاهدانه به‌عنوان یک گیاه دارویی در سال‌های اخیر منجر به افزایش علاقه به درک مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در این گیاه شده است. از طرفی با توجه به اهمیت این گیاه یکی از مواردی که به‌عنوان چالش در تولید شاهدانه مطرح است رشد غیریکنواخت گیاهان از بذر ارقام تجاری است. به‌طوری‌که برای اطمینان از ثبات آن‌ها کشت تجاری شاهدانه به تکثیر رویشی از گیاهان مادری بستگی دارد از طرفی به فضای نگه‌داری قابل توجهی برای حفاظت از این گیاهان مادری نیاز است و در ضمن خطر آفات، بیماری‌ها و ویروس برای این منابع ژنتیکی ارزشمند وجود دارد و این درحالی است که آفت کش‌های محدودی برای گیاه شاهدانه ثبت شده است. بنابراین ریز ازدیادی یک روش جایگزین و ارزشمند برای از بین بردن بسیاری از این خطرات است. به‌طورکلی تکنیک‌های کشت بافت ابزاری بسیار کارامد و مفید برای تکثیر گیاهان الیت و افزایش متابولیت‌های ثانویه با ارزش آن‌ها است. روش‌های تکثیر در شرایط درون شیشه ای به‌طور گسترده در گیاهانی که در کشت مشکل دارند یا بازده استخراج ترکیبات زیستی فعال آن‌ها کم است استفاده می‌شود در میان کشت‌های درون شیشه ای، کالوس‌ها تکثیر سریع گیاه را فراهم می‌کنند و به ما اجازه می‌دهند که محیط را برای تولید ترکیبات خاص یا افزایش عملکرد آن‌ها دستکاری کنیم، در واقع کالوس یک منبع جایگزین جهت تولید متابولیت‌های ثانویه و همچنین باززایی گیاه از طریق اندام زایی غیرمستقیم است (۱۳،۱۴و۱۵)

در پژوهش‌های پیشین بر روی کشت بافت شاهدانه، از محیط کشت و غلظت‌های مختلف اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها و همچنین ریزنمونه های متفاوت استفاده شده است. لازم بذکر است با توجه به بومی بودن این گیاه در ایران بررسی‌های عمیقی طی یک دهه گذشته در کشور در این زمینه صورت گرفته است.

در مطالعه ای اسکندری و همکاران (۱۶) از ریزنمونه های برگ، ساقه و دمبرگ برای بررسی کالوس زایی و جنین زایی سوماتیکی شاهدانه در محیط کشت MS (Murashige and Skoog) حاوی ویتامین های B5 به همراه غلظت‌های متفاوتی از تنظیم کننده های رشد گیاهی(Dichlorophenoxyacetic acid-2,4(D-2,4،)Benzylaminopurine-6(BAو KIN)Kinetin(استفاده کردند. همچنین در این بررسی اثر زخم زنی و شرایط تاریکی و نور بر کالوس زایی و رشد آن بررسی شد. نتایج آنها حاکی از کالوس زایی و جنین زایی سوماتیکی موفقیت آمیز از گیاه شاهدانه بود، همچنین بهترین ریزنمونه برگ بود.

Movahedi و همکاران (۱۷) از ریزنمونه های برگ و هیپوکوتیل گیاهچه کشت بافتی شاهدانه در محیط کشت MS حاوی غلظت های متفاوتی از هورمون های BAP و TDZ (Thidiazuron) به تنهایی یا در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA (Indole-3-butyric acid) استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که بیش‌ترین حجم کالوس مربوط به ریزنمونه برگ (کالوس‌های نرم و متراکم، سبز و کرم) با تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA بود. همچنین بیش‌ترین وزن تر و خشک کالوس در ۱ میلی گرم در لیتر TDZ به همراه همین مقدار از اکسین بود. اما تیمار هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر از هر کدام از این دو هورمون هیچ کالوسی تولید نکرد.

همچنین این محققان در بررسی دیگری، از ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل از گیاهچه‌های استریل، در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف NAA)Naphthaleneacetic acid-1(و D-2,4 به تنهایی یا در ترکیب با BA استفاده کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین حجم کالوس تولید شده در کل ریزنمونه ها، در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر D-2,4 به‌همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA در ریزنمونه برگ به‌دست آمده بود. بیشترین وزن تر کالوس تولید شده مربوط به بافت برگ در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر D-2,4 به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بوده است.

بر اساس آزمایش Feeney و Punja (۱۸) کالوس زایی و کشت سوسپانسیون از گیاه شاهدانه در هر دو محیط MS و B5 پاسخ مناسبی می‌دهد. در بررسیŚlusarkewicz-Jarzina و همکاران (۱۹) کالوس زایی بر روی محیط کشت MS به‌همراه تنظیم کننده های رشد گیاهی D-2,4 و NAA و KIN و DICAMBA مورد بررسی قرار گرفت، بیشترین کالوس‌زایی از ریزنمونه دمبرگ (کالوس های زرد رنگ و دارای بافت گره ای و فشرده) و برگ‌های جوان (کالوس‌های سبز روشن و آبکی، گره دار و فشرده ی زرد رنگ) به‌دست آمد.

در مطالعه ای از ریزنمونه های مختلف ساقه، ریشه و کوتیلدون برای القای کالوس در محیط کشت DARIA استفاده کردند و بهترین ریزنمونه از نظر تولید کالوس را کوتیلدون معرفی کردند (۲۰).

Page و همکاران (۱۳)، در آزمایشی تولید کالوس از پنج رقم شاهدانه در هر دو محیط DKW (Driver and Kuniyuki Walnut) و MS با غلظت‌های متفاوت D-2,4 (۳۰-۰ میکرومول در لیتر) را بررسی کردند نتایج آن‌ها نشان داد که که بهترین محیط DKW بود.

با توجه به اینکه تولید کالوس مستلزم داشتن محیط کشت و ترکیب هورمونی بهینه است. هدف ما از انجام این آزمایش مقایسه بین محیط کشت‌ها و ترکیبات مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی جهت القای کالوس است.

۲- مواد و روش ها:

مواد گیاهی: بذرهای کموتایپ منتخب دارویی شاهدانه بومی با مقادیر THC کمتر از ۰/۳ درصد، در گلخانه باغ گیاهشناسی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در داخل گلدان‌های حاوی مخلوطی از ماسه، رس و خاکبرگ کشت و در شرایط گلخانه‌ای و تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. بعد از شش ماه و پس از مشخص شدن جنسیت، از گیاهان ماده سالم و فاقد هرگونه آفات و بیماری جهت تهیه ریز نمونه برای کشت درون شیشه‌ای نمونه برداری انجام شد. در این مطالعه جهت کالوس زایی از ریزنمونه برگ استفاده شد.

روش ضدعفونی: برگ‌ها به آزمایشگاه منتقل و مورد شستشو قرار گرفتند. ادامه ضدعفونی زیر هود لامینار فلو انجام شد که در ابتدا ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه ور شده و سپس ۳ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی شدند، در نهایت ریزنمونه ها سه بار با آب مقطر استریل مورد شستشو قرار گرفتند.

القای کالوس زایی: ریزنمونه‌ها به قطعات یک در یک سانتی‌متر برش زده شدند. در هر پتری دیش ۵ ریزنمونه و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. بعد از قرار گرفتن ریزنمونه‌ها درب پتری دیش‌ها به‌وسیله سلفون بسته و در شرایط تاریکی در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای انجام این پژوهش از محیط کشت‌های پایه MS و DKW به همراه ویتامین های B5 و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار به همراه غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی D-2,4 (۲ و ۵ و ۸ میکرومول در لیتر) و BA (۰/۵ و ۲/۵ میکرومول در لیتر) استفاده شد.

به‌منظور در نظر گرفتن شاهد از ریزنمونه‌های برگ بر روی محیط‌های پایه بدون هیچ تیمار هورمونی با سایر شرایط یکسان استفاده شد. ریزنمونه‌ها هر ۲۰ روز مورد واکشت قرار گرفتند و در نهایت بعد از ۴۰ روز صفات کمی و کیفی مانند طول، عرض، قطر، ارتفاع، رنگ و بافت کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت.

۳- آنالیز آماری

آزمایش‌های این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها بر اساس تجزیه واریانس یک‌طرفه (طرح کاملا تصادفی) صورت گرفت. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از طرح چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. جهت تجزیه آماری داده‌ها از نرم افزار SAS (نسخه ۴و۹) استفاده شد.

۴- نتایج

نتایج نشان داد که ریزنمونه‌ها در تیمارهای شاهد شامل محیط کشت های فاقد هورمون، هیچگونه کالوسی تولید نکردند. در حالی‌که ریزنمونه‌های کشت شده بر روی سایر تیمارها، در ابتدا متورم شده و سپس بین ۵ تا ۷ روز بعد از کشت تولید کالوس کردند.

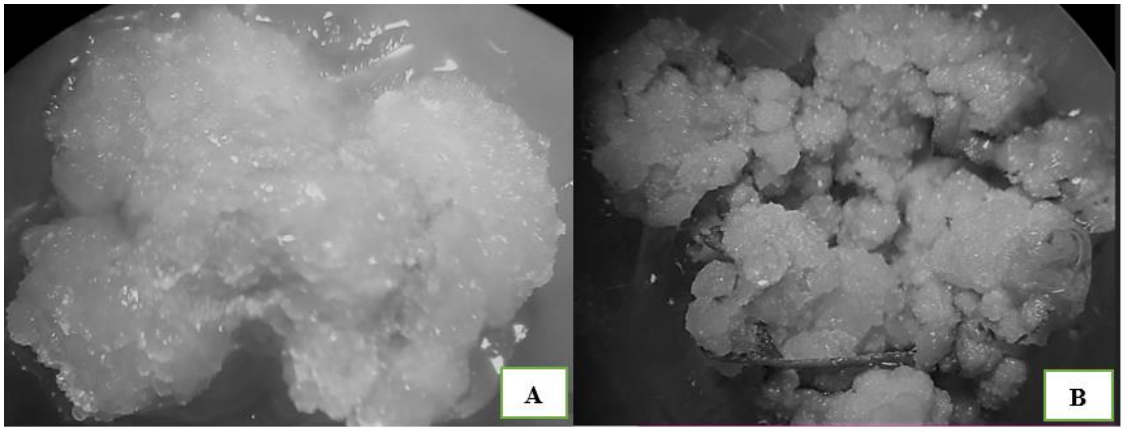
بنابراین در تمام محیط‌ها و تیمارهای هورمونی تشکیل کالوس مشاهده شد، اما کالوس‌های تولید شده از نظر اندازه و رنگ و بافت با یکدیگر متفاوت بودند (جدول ۱).

جدول ۱: درصد تشکیل کالوس و مورفولوژی کالوس، ۴۰ روز بعد از کشت

مورفولوژی کالوس	درجه کالوس دهی	درصد تشکیل کالوس (%)	ترکیب هورمونی (میکرومول در لیتر)	محیط کشت
بدون کالوس	-	0	0	MS
فشرده- گره دار- سفید- کرم روشن	++	100	(2)2,4-D+0.5BA	MS
ترد- گره دار- سفید- کرم روشن- اندکی ریشه دار	+++	100	(2)2,4-D+2.5BA	MS
ترد- گره دار- سفید- کرم روشن	++	100	(5)2,4-D+0.5BA	MS
ترد- گره دار- سفید- کرم روشن	++	100	(5)2,4-D+2.5BA	MS
ترد - سفید- کرم روشن	++	100	(8)2,4-D+0.5BA	MS
ترد- گره دار- سفید- کرم روشن	++	100	(8)2,4-D+2.5BA	MS
بدون کالوس	-	0	0	DKW
فشرده- گره دار- سفید- کرم روشن	+	100	(2)2,4-D+0.5BA	DKW
ترد- گره دار- سفید	++	100	(2)2,4-D+2.5BA	DKW
فشرده- گره دار- سفید- ریشه دار	+	100	(5)2,4-D+0.5BA	DKW
ترد - سفید- ریشه دار فشرده- سفید	+	100	(5)2,4-D+2.5BA	DKW
	+	100	(8)2,4-D+0.5BA	DKW
ترد گره دار- سفید- کرم روشن	++	100	(8)2,4-D+2.5BA	DKW

درجه کالوس زایی: (-) بدون کالوس، (+) کالوس زایی ضعیف، (++) کالوس زایی خوب، (+++) کالوس زایی عالی

نتایج بررسی ما نشان داد که بافت کالوس‌های تولید شده به‌صورت فشرده و ترد است (شکل ۱). بافت کالوس در محیط کشت DKW در کمترین مقدار سیتوکنین در هر مقدار از اکسین فشرده بود. اما در محیط کشتMS در بیشترین مقدار سیتوکنین با هر مقدار از اکسین، ترد بود. همچنین در این محیط در بیشترین مقدار اکسین بافت کالوس ترد بود.



شکل ۱: نوع بافت کالوس‌های حاصل از برگ شاهدانه ۳۰ روز بعد از کشت. A . کالوس فشرده B. کالوس ترد (با توجه به استفاده نکردن از مقیاس مشخص در زمان عکس‌برداری، مقیاس لحاظ نشده است.)

در این مطالعه کالوس‌ها در تاریکی نگه‌داری شدند، رنگ کالوس در تیمارهای هورمونی موجود در محیط کشت MS سفید و کرم روشن بود ولی در اکثر تیمارهای هورمونی در محیط کشت DKW سفید بود.

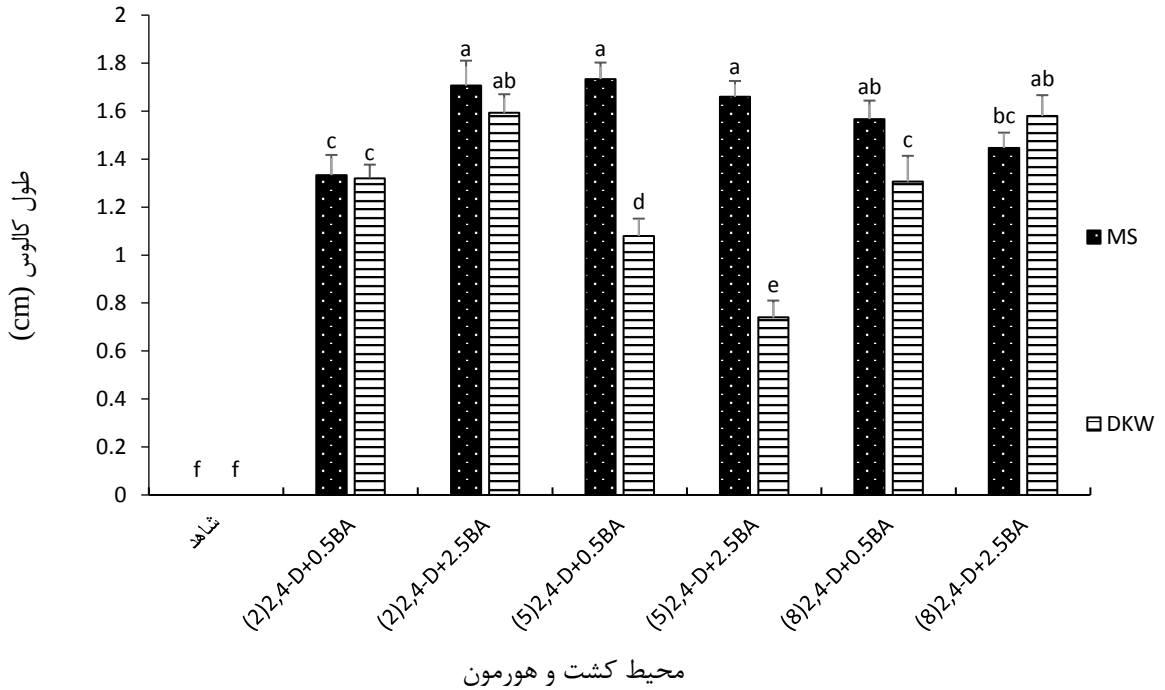
بعد از تجزیه آماری داده‌ها، نتایج تجزیه واریانس (جدول۲) نشان داد که اثر ساده و اثر متقابل نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی بر صفات اندازه‌گیری شده شامل طول، عرض، ارتفاع و قطر کالوس در سطح احتمال یک درصد معنادار بود.

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر هورمون و محیط کشت بر صفات مورد ارزیابی کالوس شاهدانه

منابع تغییر	درجه ازادی	طول	عرض	قطر
محیط کشت	1	0.75**	0.47**	0.60**
هورمون	6	6.07**	4.34**	5.20**
محیط کشت × هورمون	6	0.24**	0.36**	0.28**
خطای کل	196	0.01	0.017	0.012
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	13.02	15.5	12.08

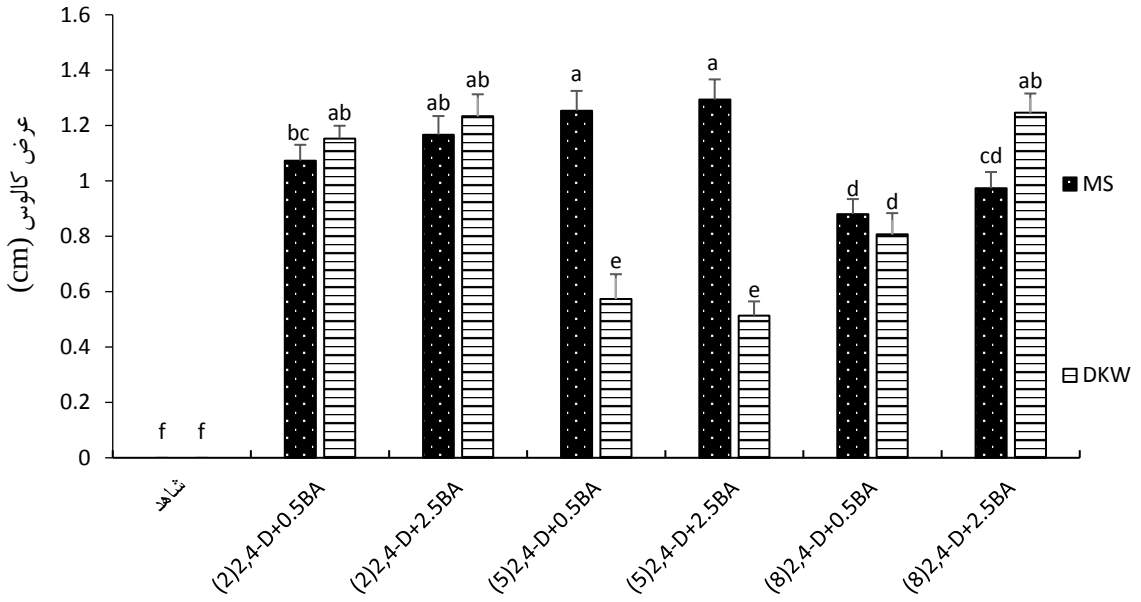
** معنی دار در سطح احتمال یک درصد

باتوجه به (شکل۲) مقایسه میانگین داده‌ها برای صفت طول کالوس نشان داد که بیشترین مقدار طول در محیط کشت MS به‌همراه ترکیبات هورمونی ۲ میکرومول در لیتر D-2,4 و ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و یا ۵ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۰/۵ میکرومول در لیتر BA و یا همین مقدار اکسین به‌همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و یا ۸ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۰/۵ میکرومول در لیتر BA و در محیط کشت DKW مربوط به تیمار هورمونی ۲ میکرومول در لیتر و ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و یا ۸ میکرومول در لیتر D-2,4 و ۲/۵ میکرومول در لیتر BA است. به‌طورکلی کمترین مقدار طول کالوس به تیمار هورمونی ۵ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA در محیط کشت DKW تعلق دارد.



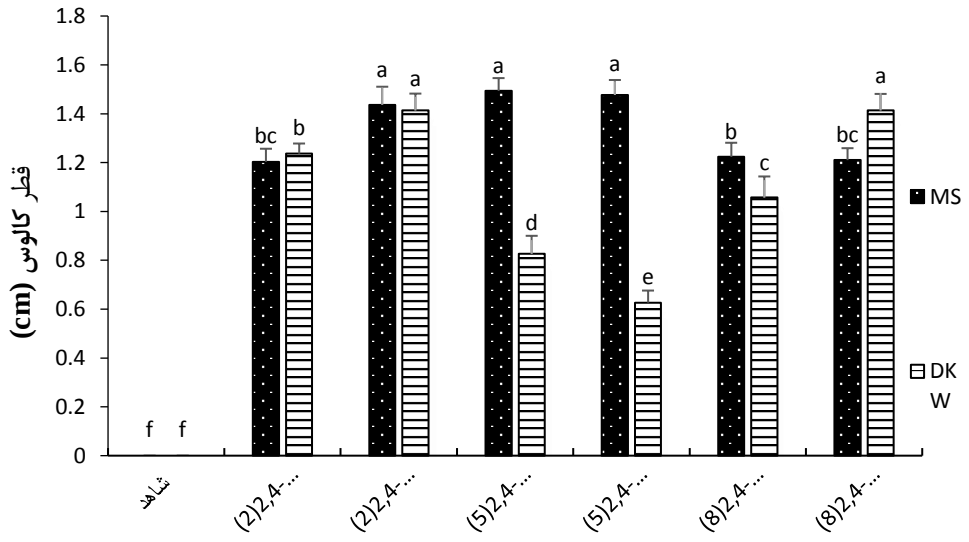
شکل ۲: تاثیر محیط کشت و هورمون های مختلف بر صفت طول کالوس

مقایسه میانگین داده‌ها برای صفت عرض کالوس (شکل ۳) نشان داد که بیشترین مقدار عرض در محیط کشت MS به‌همراه ترکیبات هورمونی ۲ میکرومول در لیتر D-2,4 و ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و یا ۵ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۰/۵ میکرومول در لیتر BA و یا همین مقدار اکسین به‌همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و در محیط کشت DKW مربوط به تیمار هورمونی ۲ میکرومول در لیتر D-2,4 و ۰/۵ میکرومول در لیتر BA و یا همین مقدار از اکسین در ترکیب با ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و یا ۸ میکرومول در لیتر D-2,4 و ۲/۵ میکرومول در لیتر BA است. کم‌ترین مقدار عرض کالوس مربوط به تیمار هورمونی ۵ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۰/۵ میکرومول در لیتر BA و یا همین مقدار از اکسین در ترکیب با ۲/۵ میکرومول در لیتر BA در محیط کشت DKW است.



شکل۳: تاثیر محیط کشت و هورمون های مختلف بر صفت عرض کالوس

مقایسه میانگین داده‌ها برای صفت قطر کالوس (شکل ۴) نشان داد که بیش‌ترین مقدار قطر در محیط کشت MS به‌همراه ترکیبات هورمونی ۲ میکرومول در لیتر D-2,4 و ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و یا ۵ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۰/۵ میکرومول در لیتر BA و یا همین مقدار اکسین به‌همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و در محیط کشت DKW مربوط به تیمار هورمونی ۲ میکرومول در لیتر D-2,4 و ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و یا ۸ میکرومول در لیتر D-2,4 و ۲/۵ میکرومول در لیتر BA است. کم‌ترین مقدار قطر کالوس مربوط به تیمار هورمونی ۵ میکرومول در لیتر D-2,4 به همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA در محیط کشت DKW است.



شکل ۴: تاثیر محیط کشت و هورمون‌های مختلف بر صفت قطر کالوس

مقایسه میانگین داده‌های کیفی برای صفت ارتفاع کالوس (جدول ۳) نشان داد که بیش‌ترین مقدار ارتفاع در محیط کشت MS در ترکیبات هورمونی ۲ و یا ۸ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه دو سطح سیتوکنین و در محیط کشت DKW مربوط به تیمار هورمونی ۲ و یا ۸ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA است. کم‌ترین مقدار ارتفاع کالوس مربوط به تیمار هورمونی ۵ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۰/۵ و یا ۲/۵ میکرومول در لیتر BA و یا ۸ میکرومول در لیتر D-2,4 به همراه ۰/۵ میکرومول در لیتر BA در محیط کشت DKW است.

جدول ۳: تاثیر محیط کشت و هورمون های مختلف بر صفت ارتفاع کالوس

رتبه	میانگین اثرات متقابل	ترکیب هورمونی (میکرومول در لیتر)	محیط کشت
بدون تغییر	1	0	MS
بسیار زیاد	5	(2)2,4-D+(0.5)BA	MS
بسیار زیاد	5	(2)2,4-D+(2.5)BA	MS
زیاد	4	(5)2,4-D+(0.5)BA	MS
متوسط	3	(5)2,4-D+(2.5)BA	MS
بسیار زیاد	5	(8)2,4-D+(0.5)BA	MS
بسیار زیاد	5	(8)2,4-D+(2.5)BA	MS
بدون تغییر	1	0	DKW
متوسط	3	(2)2,4-D+(0.5)BA	DKW
بسیار زیاد	5	(2)2,4-D+(2.5)BA	DKW
کم	2	(5)2,4-D+(0.5)BA	DKW
کم	2	(5)2,4-D+(2.5)BA	DKW
کم	2	(8)2,4-D+(0.5)BA	DKW
بسیار زیاد	5	(8)2,4-D+(2.5)BA	DKW

به‌طورکلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد بهترین محیط کشت به‌همراه ترکیبات هورمونی از نظر تمام صفات مورد بررسی برای تولید کالوس حاصل از برگ شاهدانه در محیط کشت MS مربوط به تیمار هورمونی ۲ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA است. بهترین ترکیب در محیط کشت DKW مربوط به تیمارهای هورمونی۲ و یا ۸ میکرومول در لیتر D-2,4 به‌همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA است. بهترین ترکیب هورمونی مشترک در هر دو محیط کشت MS و DKW مربوط به ترکیب هورمونی ۲ میکرومول در لیتر D-2,4 به همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA است. همچنین نامناسب‌ترین محیط جهت تولید کالوس از برگ شاهدانه از نظر تمام صفات مورد بررسی مربوط به محیط کشت DKW به‌همراه ۵ میکرومول در لیتر D-2,4 در ترکیب با ۲/۵ میکرومول در لیتر BA می باشد.

۵- بحث

در این مطالعه اثر نوع محیط کشت و غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده های رشد گیاهی، بر کالوس زایی گیاه شاهدانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه از نظر مدت زمان لازم جهت تولید کالوس، با مطالعات قبلی بر روی این گیاه مطابقت داشت (۱۶و ۲۱). تولید حداکثر کالوس در حداقل زمان یکی از اهداف مهم در تکنیک های کشت بافت است که نه تنها باعث صرفه جویی در زمان و هزینه می شود بلکه از بروز تغییرات احتمالی سوماکلونال نیز جلوگیری می‌کند (۲۲).

عدم تشکیل کالوس در ریزنمونه‌های موجود در تیمار شاهد در مطالعه حاضر نشان داد که وجود تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای تولید کالوس در این گیاه ضروری است که با نتایج پژوهش‌های کالوس زایی بر روی شقایق ایرانی، آویشن دنایی، *Artemisia absinthium* و *Barringtonia racemosa* L مطابقت دارد (۲۴،۲۳و۲۵).

داشتن انعطاف پذیری بالا برای تمایز سلولی یکی از ویژگی‌های سلول های گیاهی است، به‌طورکلی گیاهان توده‌های تمایز نیافته سلولی به‌نام کالوس را در پاسخ به محرک‌های زیستی و غیر زیستی برای مثال تقسیم سلولی در پاسخ به زخم که توسط عوامل درونی و بیرونی کنترل می‌شود ایجاد می‌کنند. القای کالوس با اعمال و تعدیل تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، با تحریک هورمون‌های درون زا یا با اعمال تنظیم کننده‌های رشد برون زا در محیط غذایی رخ می‌دهد. نسبت متوسط اکسین و سیتوکنین در شرایط آزمایشگاهی باعث القای کالوس در ریزنمونه‌های گیاهی خواهد شد، در حالی‌که نسبت بالای اکسین به سیتوکنین و یا سیتوکنین به اکسین به‌ترتیب باعث باززایی ریشه و ساقه می‌شود به‌طوری‌که از این سیستم بطور گسترده در تحقیقات پایه و باغبانی استفاده می‌شود. البته در برخی از گونه های گیاهی از آبسزیک اسید و براسینواستروئیدها نیز برای القای کالوس استفاده میگردد ولی اکسین و سیتوکنین رایج‌ترین هورمون‌های مورد استفاده جهت القای کالوس می‌باشند (۳۱،۳۰،۲۹،۲۸،۲۷،۲۶و ۳۲). در این مطالعه نیز برای تولید کالوس از مقادیر متفاوت اکسین و سیتوکنین جهت کالوس زایی استفاده شد.

تورم ریزنمونه‌های برگ شاهدانه و سپس تشکیل کالوس مورد تایید گزارش‌های موجود است، این تورم حاکی از شروع فعالیت سلولی است که بعدا به‌صورت توده خواهند شد (۳۳).

نتایج مطالعه حاضر حاکی از تولید دو نوع بافت ترد و فشرده در کالوس‌های شاهدانه با توجه به ترکیب محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی است. همان‌طور که بررسی های قبلی نشان میدهد، معمولا در کشت بافت گیاهی دو نوع بافت کالوس شامل، کالوس‌های ترد (توده نرمی که به راحتی شکسته می‌شود) و کالوس‌های فشرده (توده متراکم و فشرده از سلول‌های تمایزنیافته) وجود دارد. البته کالوس ها می‌توانند با در نظر گرفتن اندام هایی که تولید می کنند مانند کالوس‌های ساقه زا،

ریشه‌زا و جنین‌زا نیز دسته بندی شوند. با توجه به گیاه، معمولا کالوس‌های ترد بافت مناسب تری برای جنین‌زایی سوماتیکی و همچنین کشت سوسپانسیون دارند در حالی‌که کالوس‌های فشرده پتانسیل بالاتری برای باززایی و تولید شاخساره و ریشه دارند. به‌طور کلی انتخاب نوع کالوس بستگی به اهداف پژوهش دارد (۳۴،۲۶و۳۵).

فشرده شدن کالوس می‌تواند ناشی از کاهش تکثیر در سلول‌هایی باشد که در حال تقسیم شدن هستند این واکنش می‌تواند تحت تاثیر اکسین داخل ریزنمونه باشد. افزودن مقدار بالایی از اکسین به اکسین موجود در ریزنمونه به‌علاوه افزودن سیتوکنین با غلظت پایین می‌تواند بر تشکیل بافت‌های فشرده اثر بگذارد. تشکیل کالوس‌های ترد نیاز به ترکیب متعادلی از اکسین و سیتوکنین دارند (۳۶).

یکی دیگر از فاکتورهای مهم در کشت بافت گیاهی، رنگ کالوس است که نشانه‌ی سلامت و زنده بودن بافت است. برای مثال یک کالوس سالم تحت شرایط نوری معمولا به رنگ سبز است اما رنگ قهوه‌ای تیره و یا سیاه معمولا نشانه مرگ کالوس است، که به‌علت آلودگی، استرس و یا تولید موادی مانند فنل‌ها است (۳۳).

همان‌طور که در این پژوهش نشان داده شد، در کشت بافت رنگ کالوس‌ها در شرایط تاریکی معمولا به رنگ سفید و یا کرم و زرد است زیرا بافت در شرایط تاریکی فاقد کلروفیل که مسئول سبز نگه داشتن گیاه است. حتی عدم وجود نور در مواردی می‌تواند باعث شفاف شدن کالوس‌ها شود. باید به این نکته توجه داشت که نگه‌داری کالوس‌ها برای مدت زمان طولانی در تاریکی باعث اثرات منفی بر روی بافت آن برای مثال، کاهش سرعت رشد و تغییر بیان ژن‌ها می شود. بنابراین ایجاد شرایط نوری مناسب در کشت بافت جهت سلامت کالوس‌ها ضروری است.

یکی از فاکتورهای مهم در باززایی گیاهان، رنگ، سن و بافت کالوس مورد استفاده است. در پژوهشی کالوس های تشکیل دهنده ساقه که سبز روشن و دارای بافت فشرده بودند بیش‌ترین مقدار باززایی را در گیاه *rhizomatous grass* داشتند (۳۷).

اندازه کالوس یکی از عوامل مهم در کشت بافت گیاهی است زیرا می‌تواند نشان دهنده سرعت رشد و سلامت بافت گیاه باشد. علاوه بر این اندازه و کیفیت کالوس می‌تواند بر میزان موفقیت روش‌های کشت بافتی مانند باززایی و انتقال ژن موثر باشد. از نظر اندازه‌گیری صفات کالوس، فاکتورهای متعددی از جمله رنگ، بافت و چگالی آن قابل ارزیابی هستند. همچنین مورفولوژی و الگوی رشد کالوس و وجود جهش‌ها نیز قابل بررسی است. در نهایت ویژگی‌هایی که اندازه‌گیری می‌شود به هدف از تولید کالوس و گونه گیاهی بستگی دارد. میزان القای کالوس بسته به نوع و غلظت تنظیم کننده‌های مورد استفاده می‌تواند متفاوت باشد (۳۰).

همچنین یکی از موارد مهم در کالوس زایی در گیاهان می‌تواند ارتباط بین اندازه کالوس و باززایی گیاهان باشد، در تحقیقی افزایش قطر کالوس باعث افزایش باززایی گیاهان هاپلوئید در برنج شد اما باززایی دبل هاپلوئید در کالوس‌هایی با سایز کوچکتر بیشتر بوده است (۳۸).

نتایج ما نشان می‌دهد که با در نظر گرفتن اثر محیط کشت، افزودن غلظت‌های اکسین و سیتوکنین به‌صورت متعادل بزرگترین مقدار کالوس را فراهم می‌کند. هورمون‌های اکسین و سیتوکنین برای القای کالوس در کشت بافت مورد نیاز هستند، اکسین‌ها

باعث افزایش طول سلول و سیتوکنین‌ها باعث افزایش تقسیم سلولی می‌شوند استفاده از اکسین و سیتوکنین در تقسیم سلول، افزایش اندازه سلول و تمایز سلول و... مهم است (۳۹).

به‌طورکلی باتوجه به منابع، یکی از محیط‌های مناسب برای تولید کالوس در گیاه شاهدانه محیط DKW است. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش تایید کننده معرفی DKW به‌عنوان بهترین محیط کشت در بررسی Page و همکاران (۱۳) است. البته محیط کشت MS بهترین محیط کشت حاصل از مطالعه حاضر است و نامناسب‌ترین نتیجه این مطالعه نیز مربوط به یکی از ترکیب‌های هورمونی در محیط کشت DKW است که این تفاوت با مطالعه پیشین ممکن است به‌دلیل تفاوت در ژنوتیپ، مواد آزمایشگاهی، مقدار هورمون، ویتامین و یا سایر شرایط موثر در کشت بافت این گیاه باشد.

در این مطالعه وجود اثر متقابل معنی‌دار بین نوع محیط کشت و غلظت هورمون استفاده شده نشان می‌دهد که بسته به نوع محیط کشت پایه مورد استفاده غلظت هورمون مورد نیاز برای به‌دست آوردن حداکثر کالوس متفاوت است.

۶- نتیجه گیری

تولید کالوس یک مرحله مهم در کشت بافت گیاهی است، به‌طوری‌که یکی از موارد ضروری و پیش نیاز برای تولید گیاهان تراریخت، کشت سوسپانسیون سلولی و افزایش متابولیت‌های ثانویه و همچنین جداسازی اگزوزوم‌ها می‌باشد. کالوس زایی از گیاهان دارویی، فیتوکمیکال‌های فعال زیستی را تولید می‌کند که دارای کاربرد دارویی، بهداشتی، صنعتی و... هستند. با این روش می‌توان مقادیر کافی از متابولیت‌های ثانویه را در شرایط آزمایشگاهی فارغ از تغییرات فصلی، آفات و عوامل میکروبی، عوامل محیطی مختلف و محدودیت های جغرافیایی، بطور دائم و با کیفیت بالا تولید کرد.

بر اساس مطالعه حاضر بهترین محیط کشت به‌همراه ترکیبات هورمونی از نظر تمام صفات مورد بررسی کمی و کیفی برای کالوس حاصل از برگ شاهدانه، محیط کشت MS در ترکیب با ۲ میکرومول در لیتر D-2,4 به همراه ۲/۵ میکرومول در لیتر BA (بافت ترد) می‌باشد، که با توجه به هدف نهایی آزمایش‌های آتی جهت جنین زایی سوماتیکی و کشت‌های سوسپانسیون سلولی می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد.

۷- منابع

1. Salami S.A. Martinelli F. Giovino A.; Bachari, A. et al. It is our turn to get cannabis high: Put cannabinoids in food and health baskets. Molecules. 2020; 25: 4036.

2. Basas-Jaumandreu J & de Las Heras FXC. GC-MS Metabolite Profile and Identification of Unusual Homologous Cannabinoids in High Potency Cannabis sativa. Planta Med. 2020;86 (05): 338-347.

3. Gonçalves J. Rosado T. Soares S. Simão A.Y. et al. Cannabis and Its Secondary Metabolites: Their Use as Therapeutic Drugs, Toxicological Aspects, and Analytical Determination. Medicines (Basel). 2019;23;6(1):31.

4. Ren M. Tang Z. Wu X. Spengler. et al. The Origins of Cannabis Smoking: Chemical Residue Evidence from the First Millennium BCE in the Pamirs. Sci Adv. 2019; 5: 1391.

5. Jin D. Dai K. Xie Z & Chen J. Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. Sci Rep. 2020; 24;10(1):3309.

6. Soorni A. Fatahi R. Haak D.C. Salami S.A. et al. Assessment of Genetic Diversity and Population Structure in Iranian Cannabis Germplasm. Sci Rep. 2017;15,7(1):15668.

7. Tajik T. Baghaei K. Moghadam VE. Farrokhi N. et al. Extracellular vesicles of cannabis with high CBD content induce anticancer signaling in human hepatocellular carcinoma. Biomed Pharmacother. 2022;152:113209.

8. Bachari A. Piva T.J. Salami S.A. Jamshidi N. et al. Roles of Cannabinoids in Melanoma: Evidence from In Vivo Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; *21*: 6040.

9. El Sohly M.A. Marijuana and the Cannabinoids. Humana Press; Totowa, NJ. 2017.

10. Bonini S.A. Premoli M. Tambaro S. Kumar A. et al. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. J. Ethnopharmacol. 2018; 227: 300–315.

11. Jalali S. Salami S.A. Sharifi M & Sohrabi S. Signaling compounds elicit expression of key genes in cannabinoid pathway and related metabolites in cannabis. Industrial Crops and Products. 2019; 133:105-110.

12. Pollastro F. Minassi A & Fresu L.G. Cannabis Phenolics and their Bioactivities. Curr Med Chem. 2018; 25(10):1160-1185.

13. Page S.R. Monthony A.S & Jones A.M.P. DKW basal salts improve micropropagation and callogenesis compared with MS basal salts in multiple commercial cultivars of Cannabis sativa. Botany. 2020; 99: 269–279.

14. Martinez M.E. Jorquera L. Poirrier P. Díaz K. et al. Effect of the Carbon Source and Plant Growth Regulators (PGRs) in the Induction and Maintenance of an In Vitro Callus Culture of Taraxacum officinale (L) Weber Ex F.H. Wigg. *Agronomy*. 2021; 11(6):1181.

15. Retno M. Aminatun M & Elok Rifqi F. The combination effect of auxin and cytokinin on in vitro callus formation of *Physalis angulata* L. A medicinal plant. *AIP Conference Proceedings.* (2017)., 29 November., Indonesia,1908 (1).

16. Eskandari N. Salami S.A. Tabrizi L & SHOKRPOUR M. SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CANNABIS SATIVA L.: A PRELIMINARY EXPERIMENT TOWARDS TRANSGENIC CANNABIS. In: Proceedings of 4th National Congress on Medicinal Plants. 2015; 12-13 May; Tehran, 149.

17. Movahedi M. Ghasemiomran V & Torabi S. In vitro callus induction and regeneration of medicinal plant Cannabis sativa L.. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research.* 2016; 32(5):758-769. (In Farsi)

18. Feeney M & Punja Z.K. Tissue culture and Agrobacterium-mediated transformation of hemp (Cannabis sativa L.). In Vitro Cell Dev Biol -Plant 2003; 39: 578–585.

19. Ślusarkiewicz-Jarzina A. Ponitka A & Kaczmarek Z. Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of Cannabis sativa L. Acta Biologica- Cracoviensia. 2005; 47(2):145-151.

20. Wielgus K. Luwanska A. Lassocinski W & Kaczmarek Z. Estimation of Cannabis sativa L. tissue culture conditions essential for callus induction and plant regeneration. J Nat Fibers. 2008; 5:199-207.

21. Movahedi M. Ghasemiomran V & Torabi S. Effect of explants type and plant growth regulators on in vitro callus induction and shoot regeneration of Cannabis sativa L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*. 2016; 32(1):83-97. (In Farsi)

22. Ahmad A. Tahir Ul Qamar M. Shoukat A. et al. The effects of genotypes and media composition on callogenesis, regeneration and cell suspension culture of chamomile (Matricaria chamomilla L.). PeerJ. 2021; 24;9: 11464.

23. Mojtavi Sh & Omidi M. The effect of different concentrations of hormones and explant type on callus induction on persian poppy. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 2016; 29(1):191-198.

24. Saleh R. Ghorbanli M & Khalife S. Effect of various concentrations of different growth regulating hormones on callus weight and the amount of thymol of Thymus daenensis. Iranian Journal of Plant Physiology. 2016; 7(1):1919-1923.

25. Osman N. I. Jaafar Sidik N & Awal A. Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of Barringtonia racemosa L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2016; 6(2): 143–147.

26. Ikeuchi M. Sugimoto K & Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. Plant Cell. 2013; 25(9):3159-73.

27. Ikeuchi M. Iwase A. Rymen B. Lambolez. et al. Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes. Plant Physiol. 2017; 175(3):1158-1174.

28. Skoog F & Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 1957; 11: 118–130.

29. Goren R. Altman A & Giladi I. Role of ethylene in abscisic acid-induced callus formation in citrus bud cultures. Plant Physiol. 1979; 63:280–282.

30. Dekami A. Sanjarian F. Chaichi M. Hosseini B. et al. Effect of Plant Growth Regulators and Light on Callus Induction, Antioxidant Enzyme Response and Total Phenol in Nigella arvensis L. *Journal of Medicinal plants and By-product*. 2021; 12(1): 47-56.

31. Hu Y. Bao F & Li J. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. Plant J. 2000; 24:693–701.

32. George EF & Sherrington P. D. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. London: Cambridge University Press 1992.

33. Suhartanto B. Astutik M. Umami N. Suseno N. et al. The effect of explants and light conditions on callus induction of srikandi putih maize (Zea mays L.). IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2022: 1-6.

34. Sidorov V. Gilbertson L. Addae P & Duncan D. Agrobacterium-mediated transformation of seedling-derived maize callus. Plant Cell Rep. 2006; 25:320–328.

35. Akaneme F. I & Eneobong EE. Tissue culture in Pinus caribaea Mor. var. Hondurensis barr. and golf. II: Effects of two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogenesis. African Journal of Biotechnology. 2008; 7(6):757-765.

36. Moch F. H. Indriyani S & Widoretno W. The effect of explant types and plant growth regulators on callus induction of geranium (pelargonium graveolens L'Her) in vitro. IOP Conference Series.Earth and Environmental Science,., Purwokerto, Indonesia, 391. 2019; August; 5-7.

37. Kim H.S. Zhang G. Juvik J.A & Widholm J.M. Miscanthus× giganteus plant regeneration: effect of callus types, ages and culture methods on regeneration competence. Gcb Bioenergy. 2010; 2(4).

38. Yoshida T. Relationship between callus size and plant regeneration in rice (Oryza sativa L.) anther culture. Japan Agricultural Research Quarterly. 1995; 29:143-143.

39. Sujatha G & Kumari B.D. Effect of phytohormones on micro propagation of Artemisia vulgaris L. Acta Physiologiae Plantarum. 2007; 29: 89-195.