Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Effect of plant growth regulators on callus production and organogenesis of *Moringa oleifera* and the biochemical characteristics of the produced callus

Mehran Noruzpour
Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: m.noruzpuor@gmail.com

Rasool Asghari Zakaria
*Corresprending author – Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: r-asghari@uma.ac.ir

Nasser Zare
Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: zarenasser@yahoo.com

Hossein Ali Ebrahimi
Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. E-mail address: haliebrahimi@gmail.com

Hamed Parsa Khankandi
Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. E-mail address: h.parsa@arums.ac.ir

Shima Bourang
Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: sh.bourang@gmail.com

Abstract

Objective

Moringa oleifera L. belongs to the Moringaceae family and is known for its important medicinal chemicals, including flavonoids, coumarins, quinones, phenolic compounds, and alkaloids. This study focused on determining the best conditions for producing callus tissue from Moringa leaf explants and analyzing the biochemical compounds in the resulting calluses.

Materials and methods

Leaf explants of the Moringa plant were cultured on the MS medium with various plant growth regulators (Kin or BAP at 0, 0.1, and 0.5 mg/L) either alone or in combination with 2,4-D, NAA,

or IBA (each at 0, 0.5, 1, 2, and 4 mg/L). The percentage of callus production, root, and shoot formation, as well as the biochemical compounds (total flavonoid and anthocyanin contents) of the resulting calli, were recorded after 4 weeks.

Results

This research revealed a significant difference between most hormonal treatments and the control treatment regarding the percentage of callus tissue production, roots, and shoots derived from callus tissue, as well as the fresh weight of the collected callus. The most effective hormonal treatment for callus tissue production (100%) was observed with the MS medium supplemented with 2 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP. Also, the highest percentage of root production from callus tissue (100%) was associated with MS medium containing 2 or 4 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP. The MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP exhibited the highest percentage (30.53%) of shoot production from *M. oleifera* callus. Furthermore, there was a significant difference among various treatments in terms of the biochemical compound contents of the resulting callus.

Conclusions

Based on the findings, the use of plant hormones had a positive impact on callus tissue production, as well as root and shoot production, and the biochemical characteristics of the Moringa plant. The maximum fresh weight of the callus was attained by utilizing BAP and 2-4-D in the MS medium. Enhancing the amount of flavonoid and anthocyanin in plant callus is crucial to boost the antioxidant and anticancer properties. In this study, the highest levels of biochemical compounds, particularly total flavonoid and anthocyanin content in the in vitro culture of *M. oleifera* L., were associated with increased concentrations of Auxin and Cytokinin.

Keywords: Biochemical compounds, Callus tissue, Cytokinin, Moringa, Plant growth regulators.
Paper Type: Research Paper.

Citation: Noruzpour M, Asghari Zakaria R, Zare N, Ebrahimi HA, Parsa Khankandi H, Bourang Sh (2024) Effect of plant growth regulators on callus production and organogenesis of *Moringa oleifera* and the biochemical characteristics of the produced callus. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (2), 1-24.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (2), 1-24. DOI: 10.22103/jab.2024.22765.1541
Received: December 21, 2023. Received in revised form: January 19, 2024.
Accepted: January 20, 2024. Published online: May 31, 2024.
Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.
© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و اندام‌زایی گیاه مورینگا (*Moringa oleifera* L.) و خصوصیات بیوشیمیایی کالوس‌های حاصل

مهران نوروزپور
دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: m.noruzpuor@gmail.com

رسول اصغری‌زکریا
* نویسنده مسئول- استاد، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: r-asghari@uma.ac.ir

ناصر زارع
استاد، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: zarenasser@yahoo.com

حسینعلی ابراهیمی
استادیار، دانشگاه علوم پزشکی، واحد اردبیل، دانشکده داروسازی، گروه فارماسیوتیکس، اردبیل، ایران. رایانامه: haliebrahimi@gmail.com

حامد پارساخانکندی
استادیار، دانشگاه علوم پزشکی، واحد اردبیل، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، اردبیل، ایران. رایانامه: h. parsa@arums.ac.ir

شیما بورنگ
دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: sh.bourang@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۳۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۳۰

چکیده

هدف: گیاه مورینگا (*Moringa oleifera* L.) عضوی از خانوادهی *Moringaceae* است که به دلیل داشتن ترکیبات شیمیایی دارویی قابل توجهی از جمله فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کینون‌ها، ترکیبات فنلی و آلکالوئیدی شناخته می‌شود. در این پژوهش شرایط بهینه تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های برگ گیاه مورینگا و اندازه‌گیری ترکیبات بیو شیمیایی کالوس‌های حا صل بررسی شد.

مواد و روش‌ها: جهت تولید بافت کالوس ریزنمونه‌های برگ گیاه مورینگا روی محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف Kin یا BAP (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) به تنهایی و یا در ترکیب با 2,4-D یا NAA و یا IBA (هر یک در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر) کشت شدند و درصد تولید بافت کالوس، ریشه و اندام هوایی و ترکیبات بیوشیمیایی حاصل (مقدار فلاونوئید کل و محتوای آنتوسیانین) پس از ۳ الی ۴ هفته ثبت شدند.

نتایج: در این پژوهش درصد تولید بافت کالوس، ریشه و اندام هوایی حاصل از بافت کالوس و هم‌چنین وزن‌تر کالوس جمع‌آوری شده بین اکثر تیمارهای هورمونی و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد. بهترین تیمار هورمونی از نظر درصد تولید بافت کالوس (۱۰۰ درصد) مربوط به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. هم‌چنین از نظر درصد تولید ریشه از بافت کالوس نیز بهترین (۱۰۰ درصد) مربوط به محیط کشت‌های MS حاوی ۲ یا ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. محیط کشت محیط کشت‌های MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین درصد تولید اندام هوایی از نمونه کالوس‌های گیاه مورینگا (۳۰/۵۳ درصد) را به خود اختصاص داد. هم‌چنین از نظر میزان ترکیبات بیوشیمیایی کالوس‌های حاصل نیز بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج حاصل، استفاده از هورمون‌های گیاهی بر مقدار تولید بافت کالوس، تولید ریشه و اندام هوایی، و هم‌چنین خصوصیات بیوشیمیایی گیاه مورینگا اثر مثبتی داشت. به طوری که با استفاده از هورمون‌های BAP و2-4-D در محیط کشت MS حداکثر میزان وزن‌تر کالوس به‌دست آمد. جهت افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی، افزایش مقدار فلاونوئید و آنتوسیانین کالوس‌های گیاهی اهمیت بسزایی دارد، که در پژوهش حاضر، بیشترین میزان ترکیبات بیوشیمیایی به خصوص میزان فلاونوئید تام و محتوای آنتوسیانینی در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه مورینگا با افزایش غلظت اکسین و سیتوکنین همراه بود.

کلیدواژه‌ها: بافت کالوس، ترکیبات بیوشیمیایی، تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی، سیتوکینین، مورینگا.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: نوروزپور مهران، اصغری‌زکریا رسول، زارع ناصر، ابراهیمی حسینعلی، پارساخانکندی حامد، بورنگ شیما (۱۴۰۳) تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و اندام‌زایی گیاه مورینگا (*Moringa oleifera* L.) و خصوصیات بیوشیمیایی کالوس‌های حاصل. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۲)، ۱-۲۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

گیاه مورینگا با نام علمی. *Moringa oleifera* L عضوی از خانوادهی *Moringaceae* میباشد. خاستگاه اصلی این گیاه مناطقی از جنوب تبت و شمال هندوستان میباشد (Saini et al. 2016). در بسیاری از کشورهای توسعه یافته از ریشه و برگ گیاه مورینگا به عنوان چاشنی غذایی استفاده میشود (Kuete 2017). اسیدپالمتیک[1]، اسیداستئاریک[2]، اسیدبهنیک[3] و اسیداولئیک[4] از جمله اسید چربهای مهم موجود در روغن دانههای این گیاه شناسایی و گزارش شدهاند (Bhattacharya et al. 2018). خواص منحصر به فرد گیاه مورینگا در زمینههای دارویی بیشمار بوده به نحوی که این گیاه به عنوان «درخت معجزه» لقب گرفته است (Islam et al. 2021). این گیاه به عنوان منبعی سرشار از مواد معدنی و ویتامینهایی نظیرA، B و C محسوب میشود (Dhakad et al. 2019). برگ های گیاه مورینگا دارای ترکیبات شیمیایی مهم دارویی از جمله کربوهیدرات ها، ساپونینها، تانن ها، ا ستروئیدها، فلاونوئیدها، کومارین ها، کوئینون ها، ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی هستند. از ا سانس و عصاره های این گیاه برای پیشگیری و درمان سرطان، فعالیت های ضدمیکروبی و ضدقارچی استفاده می شود (Al-Rahbi et al. 2023). از دیگر ترکیبات ارزشمند دارویی این گیاه میتوان به Niazimicin، Moringin و Glucomoringin اشاره نمود (Abdelsayed et al. 2021). روش های سنتی از جمله ا ستفاده از تکثیر به کمک بذر، پیوند زدن، قلمه زدن و خوابانیدن جهت تکثیر این گیاه مورینگا استفاده میشود، با این حال این روش ها به دلایلی از جمله کاهش قدرت جوانهزنی بذر در انبارداری طولانی، افزایش تنوع ژنتیکی در اثر تلفیق گامت های جنسی نر و ماده، کاهش کیفیت نهال به دلیل بروز بیماری های ویروسی و میکروبی با محدودیت هایی مواجه هستند. با ظهور زیستفناوری و علوم مربوط به کشت بافت و اندام گیاهی در دههای گذ شته بسیاری از مشکلات مربوط به تکثیر، حفاظت ژرمپلاسم گیاهی، تولید متابولیت های نادر، افزایش تولید متابولیت های ارزشمند رفع شده و همچنین امکان تلاقی بین گونه های دور به کمک کشت جوانه های جانبی، پروتوپلاست، مریستم و تولید بافت کالوس فراهم شده است (Gandji et al. 2018). استفاده از روش های مبتنی بر زیستفناوری همانند ریزازدیادی، تولید بافت کالوس، باززایی (اندامزایی) از بافت کالوس و غیره میتواند مانع از بروز تنوع ژنتیکی ناشی از تلفیق گامتی شده و گیاهان کلون (کاملا شبیه به پایه مادری) را تولید نماید (Abdullah et al. 2019). از ویژگی های منحصربهفرد روش های مختلف کشت بافت و اندام گیاهی (بر پایه بیوتکنولوژی) میتوان به غلبه بر محدودیت های ناشی از شرایط محیطی، فضای کشت، آلودگی و غیره اشاره نمود که امکان تولید مواد گیاهی سالم در سطح وسیع را فراهم مینماید (Bukar & Abba 2022). تولید بافت کالوس در شرایط درون آزمایشگاهی امکان تولید و افزایش تولید انواع ترکیبات زیستی فعال (متابولیت های ثانویه با ارزش) را فراهم مینماید. علاوهبراین، بافت کالوس بسته به نوع و غلظت تنظیمکننده رشد گیاهی و محیط کشت پایه میتواند به عنوان یک ریزنمونه برای ایجاد جنین

[1] Palmitic acid
[2] Stearic acid
[3] Behenic Acid
4-Oleic acid

سوماتیکی، ریخت‌زایی و تولید اندام‌های گیاهی طی فرآیند باززایی استفاده شود (Mustafa et al. 2021). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی فرایندهای بسیار مهمی از جمله تقسیم سلولی، رشد و تمایز سلولی و هم‌چنین واکنش گیاه به تنش‌های محیطی را کنترل می‌نمایند (Phillips & Garda 2019). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اصلی عبارت‌اند از اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها، اتیلن و اسیدآبسیزیک (Jamwal et al. 2018). اکسین‌ها فیتوهورمون‌های آلی با وزن مولکولی کمی هستند که در هر جنبه‌ای از رشد و نمو گیاه از جمله تنظیم مورفوژنز، تحریک/کنترل تقسیم سلولی و طویل شدگی ساقه نقش دارند (Gomes & Scortecci 2021). سیتوکینین‌ها، فیتوهورمون‌هایی هستند که به طور طبیعی در رشد و نمو بافت‌ها و اندام‌های مریستمی همانند رأس ساقه، رأس ریشه و اندام‌های نابالغ موثر هستند (Li et al. 2021). سیتوکینین‌ها برای تقسیم سلول گیاهی حیاتی هستند، زیرا به طور مستقیم سنتز پروتئین‌های دخیل در میتوز سلولی را تنظیم می‌کنند (Mok 2019). از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اصلی مورد استفاده جهت تولید بافت کالوس در محیط کشت گیاه مورینگا می‌توان به سیتوکینین‌هایی نظیر زآتین، BAP، Kin و اکسین‌هایی نظیر IAA، IBA، 2,4-D و NAA اشاره نمود (Samarakoon & Kandegama 2020). محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بهترین تیمار هورمونی برای تولید بافت کالوس از نمونه برگ‌های گیاه *M. oleifera* محسوب می شود (Al-Hamidi et al. 2023a). محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر زآتین مؤثرترین ترکیب برای القای بافت کالوس در ریزنمونه‌های برگ گیاه مورینگا با ۱۰۰٪ تولید کالوس از هفته سوم پس از کشت بود (Samarakoon & Kandegama 2020). بنابراین و با توجه به اهمیت گیاه مورینگا از نظر دارویی و تغذیه‌ای و هم‌چنین اطلاعات اندک در مورد نحوه کشت و بافت نمونه‌های گیاهی آن، در این پژوهش ابتدا به تأثیر نوع و غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین بر تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های برگ این گیاه ارزشمند پرداخته شد و سپس میزان فلاونوئید و آنتوسیانین نمونه کالوس‌های حاصل مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت ریزنمونه: ریزنمونه‌های برگ گیاه مورینگا (*M. oleifera* L.) جهت تولید بافت کالوس در شرایط درون‌شیشه‌ای، از گیاهان رشد یافته از نمونه بذور تهیه شده از استان خوزستان (شهرستان دزفول) در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از ضدعفونی سطحی (Noruzpuor et al. 2022) و قبل از قرار گرفتن در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف Kin (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) یا BAP (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر) به تنهایی و یا در ترکیب با 2,4-D (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) یا NAA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و یا IBA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) ریزنمونه‌ها سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط آب استریل (دو بار اتوکلاو شده) آب‌کشی شدند. پس از انتقال ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت جهت تولید

بافت کالوس، محیط کشت‌های حاوی ریزنمونه به اتاقک رشد فاقد روشنایی و با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. درصد تولید بافت کالوس، وزن‌تر کالوس، درصد تولید ریشه و اندام هوایی، رنگ و نوع بافت کالوس پس از گذشت چهار هفته ثبت شد.

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی بافت‌های کالوس حاصل-اندازه‌گیری فلاونوئید کل: برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل از روش Chang et al. (2002) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد (جرمی-حجمی)، ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات یک مولار به یک میلی‌لیتر عصاره حاصل اضافه شد و مقادیر جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد کوئرستین با استفاده از غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر متانول) تهیه و برای کمی‌سازی میزان فلاونوئید کل در نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Chang et al. 2002). سپس با استفاده از فرمول $T=(C\times V)/M$ مقدار فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم در یک گرم بافت کالوس محاسبه گردید. در این فرمول T، میزان فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت کالوس؛ C، غلظت فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در میلی‌لیتر؛ V، حجم نهایی عصاره و M، وزن نمونه (بافت کالوس برحسب گرم) است.

اندازه‌گیری آنتوسیانین: برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین نمونه‌های کالوس از روش Wagner (1979) استفاده شد. برای این منظور جذب نوری عصاره حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Wagner 1979). سپس میزان آنتوسیانین با استفاده از فرمول $A=\varepsilon bc$ و ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ محاسبه گردید. در فرمول فوق A برابر مقدار عدد جذبی، b برابر عرض کووت[5]، ε برابر ضریب خاموشی و c برابر غلظت آنتوسیانین است.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری: آزمایش در قالب فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 26 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL انجام شد.

نتایج و بحث

طبق نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های برگ گیاه *M. oleifera* کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای (جدول۱) درصد تولید بافت کالوس، تولید ریشه و اندام هوایی و وزن‌تر بافت کالوس حاصل به طور معنی‌دار و در سطح احتمال ۱ درصد تحت تأثیر نوع و غلظت اکسین، نوع و غلظت سیتوکینین و اثر متقابل دو جانبه بین نوع اکسین و غلظت‌های آن، اثر متقابل بین نوع اکسین و نوع سیتوکینین و نوع اکسین و غلظت سیتوکینین قرار گرفتند. وزن‌تر کالوس نیز به طور معنی‌دار و در سطح احتمال ۱ درصد تحت تأثیر اثر متقابل دو جانبه بین غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین، نوع و غلظت سیتوکینین، اثر متقابل سه جانبه بین نوع و غلظت اکسین-غلظت سیتوکینین و نوع اکسین- غلظت سیتوکینین قرار گرفتند

[5] -Cuvette

(جدول۱). طبق نتایج به دست آمده (جدول ۱) سایر اثرات متقابل دو جانبه، سه جانبه و چهار جانبه تأثیر معنی‌داری بر میزان درصد تولید کالوس و وزن‌تر آن نداشت.

جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد تولید و وزن‌تر کالوس ریزنمونه‌های گیاه مورینگا (*M. oleifera* L.) و باززایی آن در شرایط درون‌شیشه‌ای

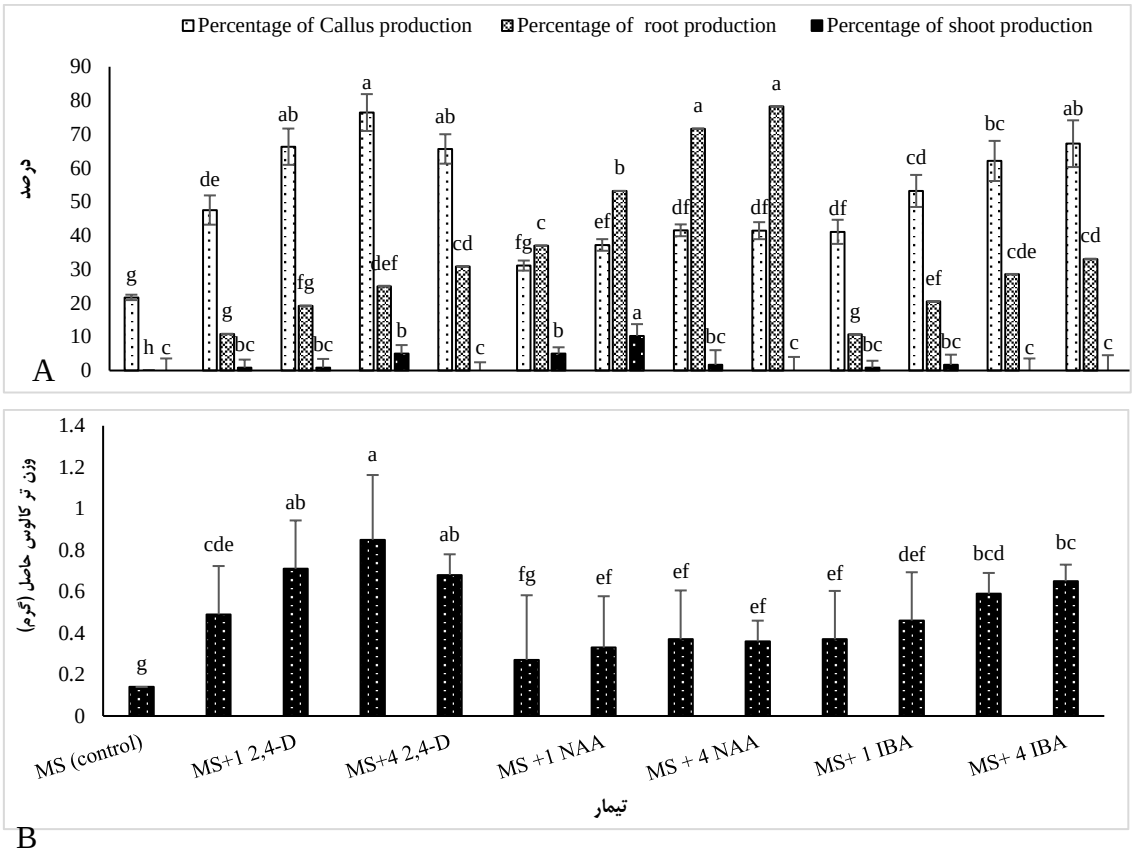
Table 1. Analysis of variance for the effects of different types and concentrations of plant growth regulators on the callus production percentage and fresh weight in Moringa and its regeneration under *in vitro* conditions

منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS			
		وزن‌تر کالوس (گرم) Fresh weight of callus (gr)	درصد تولید کالوس Callus production (%)	درصد تولید ریشه Root production (%)	درصد تولید اندام هوایی Shoot production (%)
نوع اکسین (A) Auxin type (A)	2	1.433 **	8380.40 **	28486.52 **	152.80 **
غلظت اکسین (B) Auxin concentration (B)	3	0.358 **	3032.86 **	66. 82.34 **	100.39 **
نوع سیتوکینین (C) Cytokinin type (C)	1	0.393 **	429.10 **	1479.38 **	370.77 *
غلظت سیتوکینین (D) Cytokinin concentration (D)	1	1.072 **	6463.54 **	2249.89 **	121.02 **
A×B	6	0.053 **	294.80 **	450.83 **	95.06 **
A×C	2	0.639 **	542.20 **	634.78 **	112.13 **
A×D	2	0.275 **	780.49 **	52.70 ns	91.88 **
B×C	3	0.010 ns	185.46 **	81.09 ns	104.56 **
B×D	3	0.082 **	59.81 ns	55.85 ns	42.37 **
C×D	1	0.154 **	162.81*	1582.40 **	59.28 **
A×B×C	6	0.024 ns	49.28 ns	68.49 ns	99.15 **
A×B×D	6	0.048 **	86.82 ns	49.14 ns	44.19 **
A×C×D	2	0.137 **	130.37 *	829.14 **	4.44 ns
B×C×D	3	0.011 ns	39.13 ns	84.21ns	13.48 ns
A×B×C×D	30	0.015 ns	29.52 ns	51.69 ns	20.35 ns
Error	130	0.013	53.69	74.59	13.17
ضریب تغییرات (درصد) (CV%)	–	20.83	14.60	26.82	18.13

ns , ** and *: Non-significant and significant at 1 and 5 % level of probability, respectively

مقایسه میانگین داده‌ها (شکل۱–A و B) نشان داد که از نظر نوع و غلظت‌های مختلف اکسین مورد استفاده بین تیمار شاهد و سایر تیمارها از نظر درصد تولید بافت کالوس، درصد تولید ریشه از بافت کالوس حاصل و وزن‌تر بافت کالوس جمع‌آوری شده از

محیط‌های کشت اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد. این در حالیست که از نظر درصد تولید اندام هوایی بین تیمار شاهد و اکثر تیمارهای هورمونی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. طبق نتایج حاصل از شکل ۱-A و B، بیشترین درصد تولید کالوس (۷۶/۴۳ درصد) و بیشترین مقدار وزن کالوس حاصل (۰/۸۵ گرم) مربوط به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. از نظر درصد تولید بافت کالوس و وزن‌تر کالوس بین این تیمار هورمونی و محیط کشت‌های دارای ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و هم‌چنین محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما استفاده از ترکیب‌های هورمونی مذکور در مقایسه با سایر موارد (سایر اکسین‌ها و غلظت‌های مختلف آن‌ها) درصد تولید بافت کالوس و وزن‌تر حاصل از آن را در ریزنمونه‌های برگ گیاه مورینگا به‌طور معنی‌داری افزایش داد (شکل۱-A و B). هم‌چنین استفاده از NAA در غلظت‌های مختلف (به تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکینین‌های مختلف) نسبت به 2,4-D و IBA عملکرد غیرقابل قبولی از نظر تولید بافت کالوس و وزن‌تر آن در شرایط درون شیشه‌ای داشت. علاوه‌براین، نوع اکسین و غلظت‌های مختلف استفاده از آن درون محیط کشت پایه MS به‌طور معنی‌داری بر درصد تولید ریشه از بافت کالوس حاصل از ریزنمونه‌های برگ کشت شده گیاه *M. oleifera* مؤثر بود (شکل۱-A). استفاده از NAA (به خصوص در غلظت‌های بالاتر) در مقایسه با تیمار شاهد، محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA یا 2,4-D (به‌تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکینین) به طور معنی‌داری در صد تولید ریشه از بافت کالوس حاصل را افزایش داد. بیشترین درصد تولید ریشه از بافت کالوس ریزنمونه‌های برگ گیاه مورینگا (۷۸/۲ درصد) مربوط به محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (با بالاترین در صد تولید اندام هوایی با ۱۰/۲۷ در صد)، با تیمار شاهد و سایر تیمارهای هورمونی از نظر در صد تولید اندام هوایی از بافت کالوس حاصل از ریزنمونه‌های برگ گیاه مورینگا در شرایط درون‌شیشه‌ای اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل۱-A). ولی بین تیمار شاهد و اکثر تیمارهای هورمونی دیگر اختلاف معنی‌داری از نظر درصد تولید اندام هوایی از بافت کالوس گیاه مورینگا مشاهده نشد. درصد تولید بافت کالوس، ریشه و اندام هوایی حاصل از آن و هم‌چنین وزن‌تر کالوس حاصل از ریزنمونه‌های برگ گیاه *M. oleifera* به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع و غلظت‌های مورد استفاده از سیتوکینین درون محیط کشت بود (شکل۲-A و B). استفاده از BAP در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (به تنهایی و یا در ترکیب با اکسین‌های مختلف) به طور معنی‌داری درصد تولید بافت کالوس، ریشه و اندام هوایی حاصل از آن و هم‌چنین وزن‌تر کالوس حاصل از ریزنمونه‌های برگ گیاه *M. oleifera* را در مقایسه با تیمار شاهد و محیط کشت حاوی Kin در غلظت‌های مختلف افزایش داد (شکل۲-A و B). بیشترین در صد تولید بافت کالوس، در صد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت حاصل به ترتیب (۶۵/۸، ۴۵/۳۲ و ۶/۱۹ درصد) مربوط به محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. هم‌چنین استفاده از BAP به عنوان سیتوکینین (به تنهایی یا در ترکیب با اکسین‌های مختلف) در مقایسه با Kin به طور معنی‌داری وزن‌تر کالوس را افزایش داد (شکل۲-B).

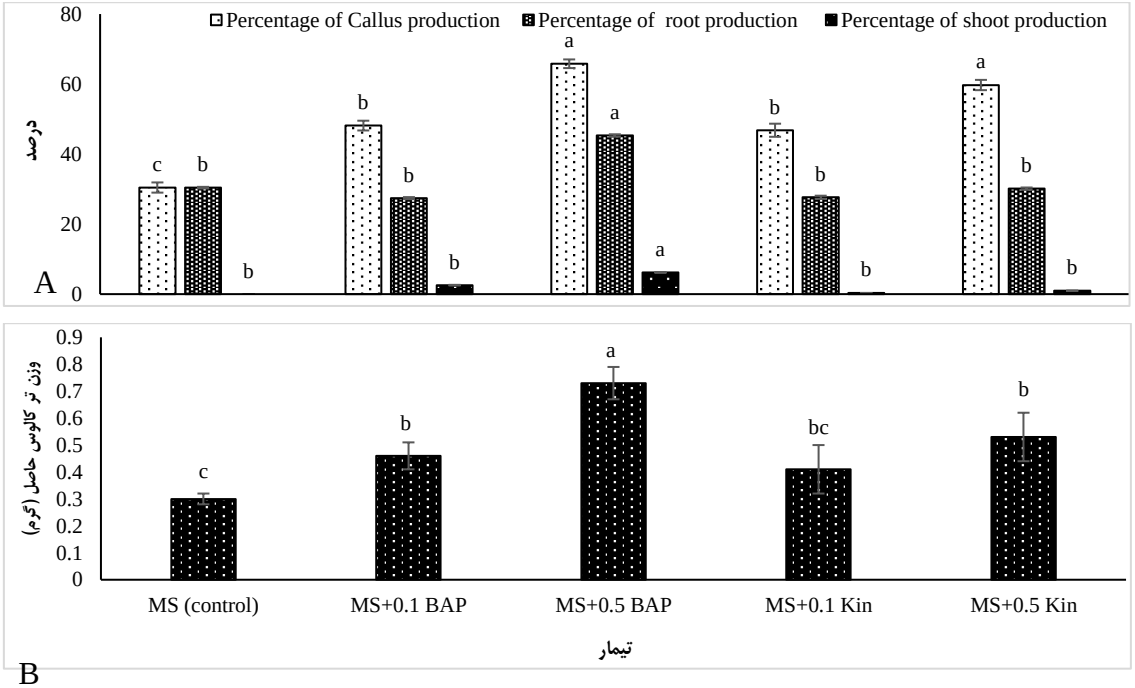


شکل ۱. تأثیر نوع و غلظت اکسین A) درصد تولید کالوس، ریشه و اندام هوایی؛ B) وزن‌تر بافت کالوس

Figure 1. Effect of type and concentration of auxin A) percentage of callus, root and shoot production; B) Fresh weight of callus

بیشـترین وزن‌تر کالوس (۰/۷۳ گرم) نیز مربوط به محیط کشـت پایه MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. هم‌چنین از نظر اثرات متقابل نوع اکسین- نوع سیتوکینین (شکل۳-A و B)، بین تیمارهای هورمونی مختلف در صد تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های برگ گیاه مورینگا و وزن‌تر آن و درصد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس حاصل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بیشترین درصد تولید بافت کالوس و بالاترین مقدار وزنی بافت کالوس (۷۶/۴۴ در صد و ۰/۹۶ گرم) مربوط به محیط کشت MS+ 2,4-D + BAP بود. طبق نتایج به دست آمده (شکل۳-A و B) بین محیط کشت‌های دارای NAA به همراه BAP یا Kin و هم‌چنین محیط کشـت‌های دارای IBA به همراه BAP یا Kin از نظر درصـد تولید بافت کالوس و وزن‌تر آن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و لذا تغییر نوع سیتوکینین از BAP به Kin در محیط کشت‌های دارای NAA یا IBA تأثیری بر درصد تولید بافت کالوس و وزن‌تر آن نداشت. این در حالیست که در محیط کشت دارای 2,4-D جایگزینی BAP با Kin در صد تولید بافت کالوس را به طور معنی‌داری از ۷۶/۴۴ در صد به ۶۴/۹۷ در صد کاهش داد. این امر در مورد وزن‌تر کالوس جمع‌آوری شده نیز صادق بود که وزن‌تر نمونه کالوس جمع‌آوری شده از محیط کشت دارای Kin و 2,4-D به طور معنی‌داری از محیط کشت دارای

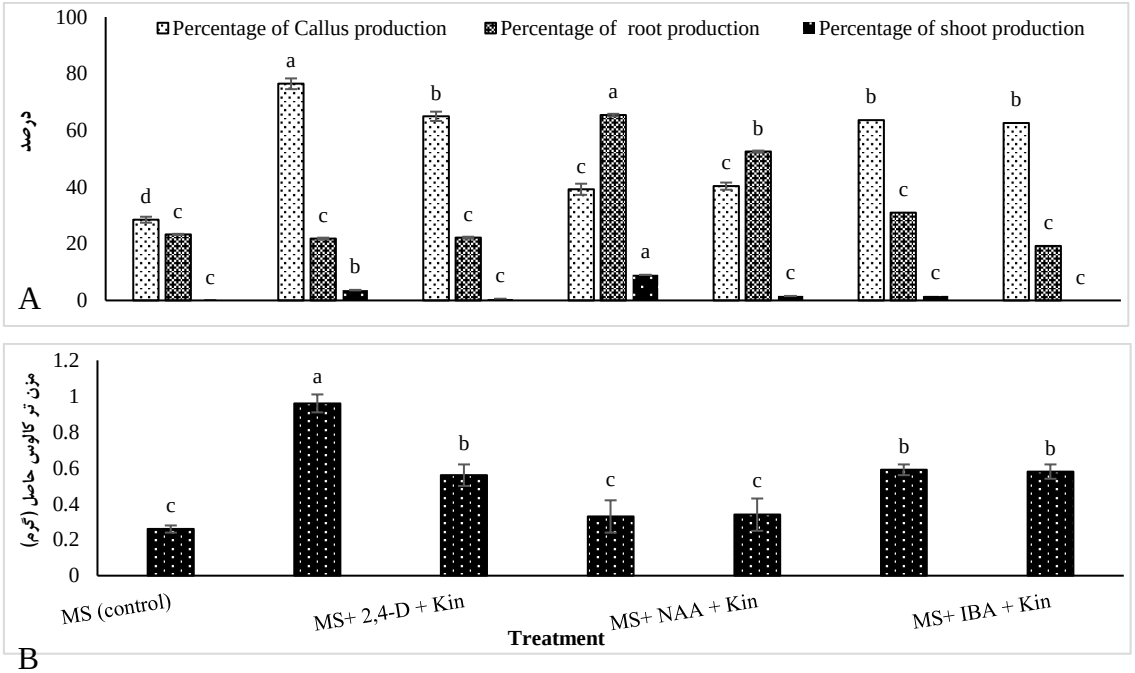
2,4-D+BAP کمتر بود. از نظر درصد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس حاصل نیز بین تیمار شاهد و سایر تیمارهای هورمونی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل۳-A). بیشترین درصد تولید بافت ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس به ترتیب (۶۵/۳۹ و ۹/۰۲ درصد) در محیط کشت MS+NAA+BAP بود. در صد تولید ریشه از بافت کالوس بین تیمار شاهد و محیط کشت MS حاوی 2,4-D و BAP یا Kin و همچنین محیط کشت MS دارای IBA به همراه BAP یا Kin اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل۳-A) از نظر درصد تولید اندام هوایی بین تیمار شاهد و اکثر محیط کشت‌های دارای ترکیبات هورمونی مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل۳-A). اندام هوایی تولید شده از محیط کشت MS+NAA+BAP با ۹/۰۲ درصد به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و سایر تیمارهای هورمونی دیگر بود. میانگین داده‌های اثر متقابل بین اکسین-سیتوکینین در غلظت‌های مختلف (شکل ۵-A، B، C و D)، نشان داد که بین تیمار شاهد و اکثر محیط‌های کشت حاوی اکسین یا سیتوکینین (به تنهایی و در غلظت‌های مختلف) از نظر در صد تولید بافت کالوس معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد. محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (به تنهایی) (۴۴/۴۳ درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و سایر تیمارهای حاوی اکسین و یا سیتوکینین (به تنهایی) بود (شکل۵-A).



شکل ۲. تأثیر نوع و غلظت سیتوکینین A) درصد تولید کالوس، ریشه و اندام هوایی؛ B) وزن‌تر بافت کالوس

Figure 2. Effect of type and concentration of Cytokinin on percentage of callus, root and shoot production (A) and fresh weight of callus (B)

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

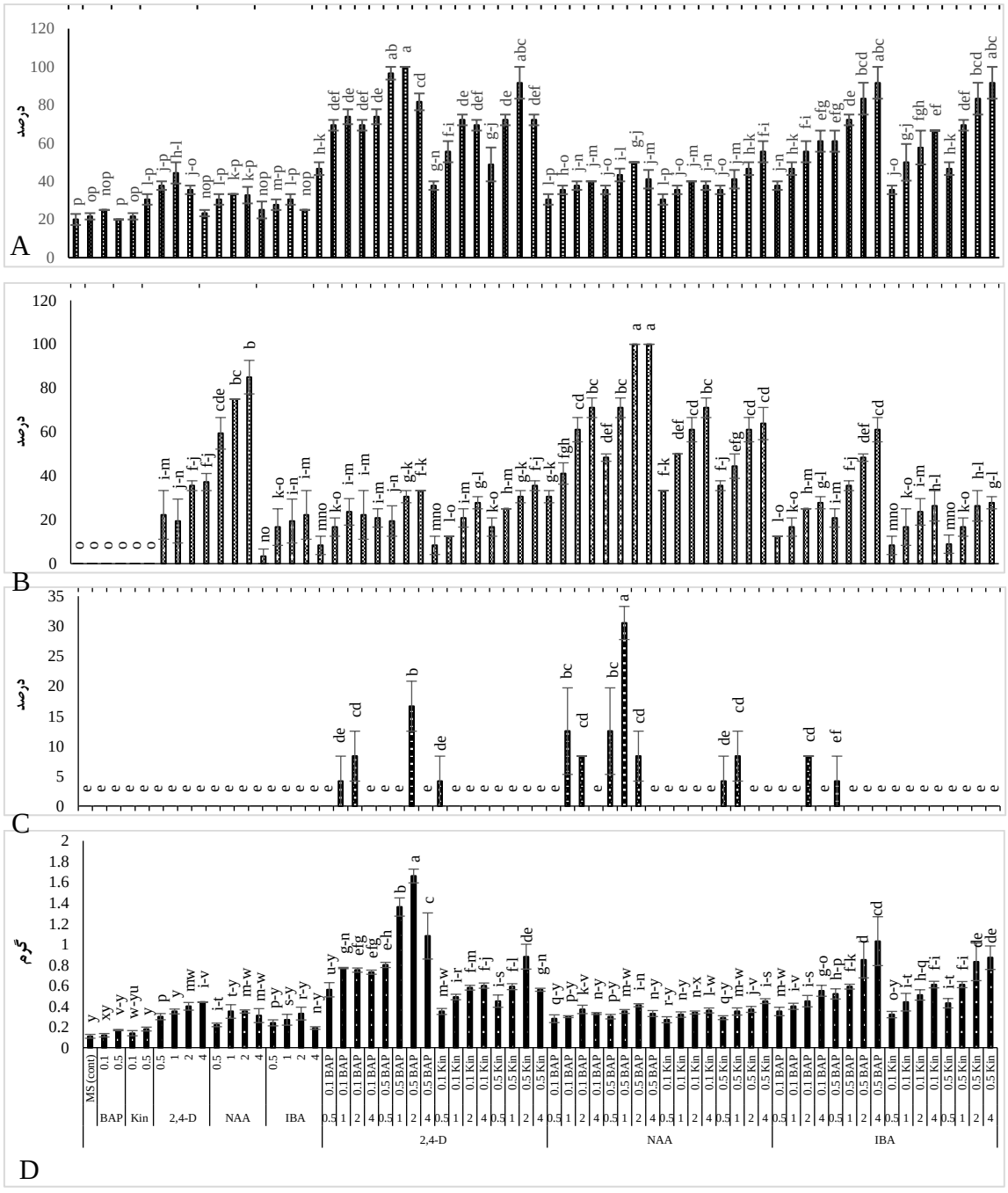


شکل ۳. اثر متقابل نوع اکسین-نوع سیتوکینین بر A) درصد تولید کالوس، ریشه و اندام هوایی؛ B) وزن‌تر بافت کالوس

Figure 3. Auxin -Cytokinin type interaction effects on percentage of callus, root and shoot production (A) and fresh weight of callus (B)

شکل ۴-A نشان داد که استفاده از سیتوکینین در کنار اکسین تولید بافت کالوس را در مقایسه با محیط کشت دارای اکسین یا سیتوکینین (به تنهایی) به طور معنی‌داری افزایش داد. این افزایش درصد تولید بافت کالوس به خصوص در مورد اثر متقابل 2,4-D- BAP و Kin (در اکثر تیمارها) کاملا مشهود بود. هم‌چنین شکل ۴-A نشان داد که درصد تولید بافت کالوس، در استفاده از 2,4-D به عنوان اکسین در ترکیب با BAP یا Kin (در اکثر موارد) در مقایسه با NAA و IBA به طور معنی‌داری افزایش یافت. هم‌چنین طبق نتایج به دست آمده بیشترین درصد تولید بافت کالوس (۱۰۰ درصد) در تیمارهای هورمونی حاوی 2,4-D مربوط به غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل۵- B و C). طبق نتایج به دست آمده درصد تولید بافت کالوس در استفاده از BAP به عنوان سیتوکینین در ترکیب با اکسین‌های مختلف نسبت به Kin عملکرد بهتری داشت. به طوری که بیشترین درصد تولید بافت کالوس (۱۰۰ درصد) مربوط به محیط کشت MS+2 2,4-D+0.5 BAP بود. درحالی که جایگزینی Kin با BAP در محیط مذکور درصد تولید بافت کالوس را تا ۱۰ درصد کاهش داد، اما این کاهش معنی‌دار نبود (شکل۵-A). از نظر درصد تولید ریشه از بافت کالوس گیاه *M. oleifera* نیز بین تیمار شاهد و اکثر تیمارهای هورمونی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل۴-B). شکل ۴-B نشان داد که جهت القاء و تولید ریشه از بافت کالوس گیاه مورینگا نیاز به افزودن اکسین به درون محیط کشت

پایه است، به‌طوری که در تیمار شاهد و محیط کشت‌های دارای فقط سیتوکینین (BAP و Kin در غلظت‌های مختلف) القاء و تولید ریشه از بافت کالوس پس از گذشت ۴ هفته در کمترین میزان (صفر درصد) مشاهده شد. در صورتی که افزودن اکسین‌های مختلف (2,4-D، NAA و IBA) در غلظت‌های مختلف القاء و تولید بافت کالوس را افزایش می‌دهد. بیشترین درصد تولید ریشه از بافت کالوس گیاه *M. oleifera* (۱۰۰ درصد) به ترتیب مربوط به محیط کشت MS+2 NAA+0.5 BAP و MS+4 NAA+0.5 BAP بود (شکل۵- D و E). در حالی که افزودن BAP به محیط کشت حاوی NAA (در مقایسه با محیط کشت فقط دارای NAA) القاء و تولید اندام ریشه از بافت کالوس گیاه *M. oleifera* را بین ۲۰ الی ۲۵ درصد افزایش داد (شکل۴-B). درحالی که افزودن BAP و Kin (در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) به محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D تأثیر مثبتی بر درصد تولید ریشه از نمونه کالوس‌های مذکور نداشت. اما در مورد IBA افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، درصد تولید ریشه از بافت کالوس گیاه *M. oleifera* در مقایسه با محیط کشت فقط حاوی IBA به طور معنی‌داری افزایش داد (شکل۴-B). هم‌چنین درصد تولید اندام هوایی از بافت کالوس حاصل (پس از گذشت ۴ هفته)، بین تیمار شاهد و برخی از تیمارهای هورمونی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل۴-C). شکل۴-C نشان داد، بیشترین درصد تولید اندام هوایی از نمونه بافت‌های کالوس گیاه *M. oleifera* مربوط به محیط کشت‌های دارای BAP بود. هم‌چنین افزودن Kin به محیط کشت تأثیر زیادی در القاء و تولید اندام هوایی از نمونه کالوس‌های مذکور نداشت، همچنین افزودن اکسین به تنهایی به درون محیط کشت تأثیری بر تولید اندام هوایی نداشت. بیشترین درصد تولید اندام هوایی از نمونه کالوس‌های گیاه *M. oleifera* (۳۰/۵۳ درصد) مربوط به محیط کشت MS+1 NAA+0.5 BAP بود (شکل۵-F، G و H). از نظر وزن‌تر کالوس نیز بین تیمار شاهد و اکثر تیمارهای هورمونی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل۴-D). بیشترین میزان وزن‌تر کالوس (۱/۶۶ گرم) مربوط به محیط کشت MS+2 2,4-D+ 0.5 BAP بود. افزودن BAP (در همه غلظت‌ها) و Kin (در اکثر موارد) به محیط کشت حاوی 2,4-D (در غلظت‌های مختلف) وزن‌تر کالوس جمع‌آوری شده از محیط کشت‌ها را به طور معنی‌داری افزایش داد. در مورد NAA، افزودن BAP یا Kin تأثیر معنی‌داری بر وزن‌تر کالوس حاصل نداشت. هم‌چنین در مورد محیط کشت‌های دارای IBA نیز افزودن BAP به خصوص در غلظت‌های بالاتر وزن‌تر کالوس حاصل نسبت به محیط کشت فقط دارای IBA به طور معنی‌داری افزایش داد (شکل۴-D). از نظر رنگ بافت کالوس و نوع آن (از نظر زبری یا نرمی) (جدول۲) محیط کشت‌های دارای 2,4-D (۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط کشت‌های دارای 2,4-D (۱، ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر) به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin بافت کالوس‌های به رنگ سبز را تولید کردند و بقیه تیمارهای هورمونی کالوس‌های قهوه‌ای تولید شدند. از نظر زبری یا نرمی کالوس نیز نمونه کالوس‌های به دست آمده از محیط کشت‌های دارای NAA زبر بودند که آن هم می‌تواند به دلیل تولید بافت ریشه از کالوس مورد نظر باشد. سایر محیط‌ها دارای بافت کالوس نرمی داشتند (جدول ۲).



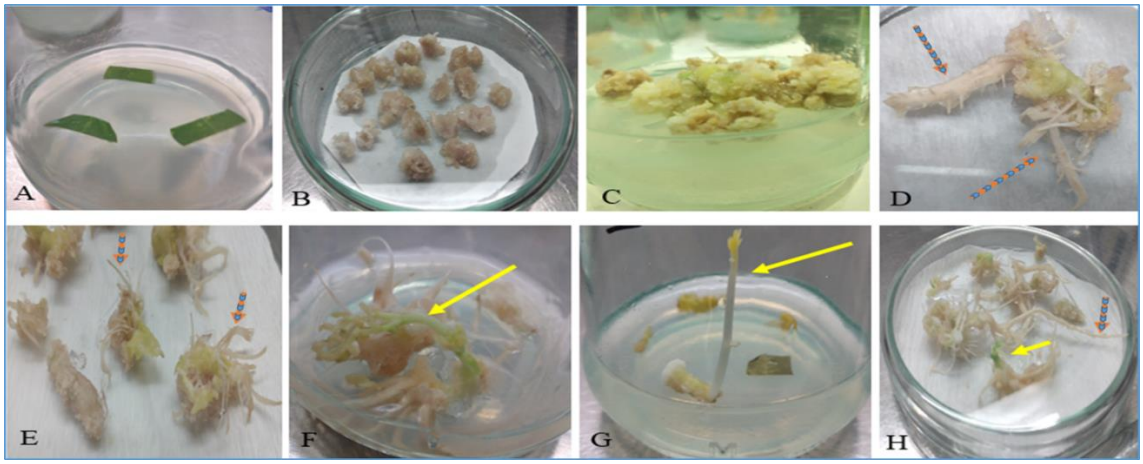
شکل ٤. اثرات متقابل اکسین-سیتوکینین A، Bو C) درصد تولید کالوس، ریشه و اندام هوایی (به ترتیب)؛ D) وزن‌تر کالوس

Figure 4. Auxin-Cytokinin interaction in different concentrations: A, B and C) The percentage of callus, root and shoot production (Respectively), D) Fresh weight of callus

جدول ۲. نوع و رنگ بافت کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گیاه مورینگا (*M. oleifera* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 2. Type and color of callus tissue obtained from *M. oleifera* explants in *in vitro*

Auxin type	Auxin concentration (mg/L)	Cytokinin type	Cytokinin concentration (mg/L)	Callus color	Callus type
–	–	–	–	Brown	Soft
–	–	BAP	0.1	Brown	Soft
–	–	BAP	0.5	Brown	Soft
–	–	Kin	0.1	Brown	Soft
–	–	Kin	0.5	Brown	Soft
2,4-D	0. 5	-	-	Brown	Soft
	1	-	-	Brown	Soft
	2	-	-	Brown	Soft
	4	-	-	Brown	Soft
	0.5	BAP	0.1	Brown	Soft
	1	BAP	0.1	Brown	Soft
	2	BAP	0.1	Brown	Soft
	4	BAP	0.1	Brown	Soft
	0.5	BAP	0.5	Brown	Soft
	1	BAP	0.5	Green	Rough
	2	BAP	0.5	Green	Rough
	4	BAP	0.5	Green	Rough
	0.5	Kin	0.1	Brown	Soft
	1	Kin	0.1	Green	Rough
	2	Kin	0.1	Green	Rough
	4	Kin	0.1	Green	Rough
	0.5	Kin	0.5	Brown	Soft
	1	Kin	0.5	Brown	Soft
	2	Kin	0.5	Brown	Soft
	4	Kin	0.5	Brown	Soft
NAA	0.5	-	-	Brown	Rough
	1	-	-	Brown	Rough
	2	-	-	Brown	Rough
	4	-	-	Brown	Rough
	0.5	BAP	0.1	Brown	Rough
	1	BAP	0.1	Brown	Rough
	2	BAP	0.1	Brown	Rough
	4	BAP	0.1	Brown	Rough
	0.5	BAP	0.5	Brown	Rough
	1	BAP	0.5	Brown	Rough
	2	BAP	0.5	Brown	Rough
	4	BAP	0.5	Brown	Rough
	0.5	Kin	0.1	Brown	Rough
	1	Kin	0.1	Brown	Rough
	2	Kin	0.1	Brown	Rough
	4	Kin	0.1	Brown	Rough
	0.5	Kin	0.5	Brown	Rough
	1	Kin	0.5	Brown	Rough
	2	Kin	0.5	Brown	Rough
	4	Kin	0.5	Brown	Rough
IBA	0.5	-	-	Brown	Soft
	1	-	-	Brown	Soft
	2	-	-	Brown	Soft
	4	-	-	Brown	Soft
	0.5	BAP	0.1	Brown	Soft
	1	BAP	0.1	Brown	Soft
	2	BAP	0.1	Brown	Soft
	4	BAP	0.1	Brown	Soft
	0.5	BAP	0.5	Brown	Soft
	1	BAP	0.5	Brown	Soft
	2	BAP	0.5	Brown	Soft
	4	BAP	0.5	Brown	Soft
	0.5	Kin	0.1	Brown	Soft
	1	Kin	0.1	Brown	Soft
	2	Kin	0.1	Brown	Soft
	4	Kin	0.1	Brown	Soft
	0.5	Kin	0.5	Brown	Soft
	1	Kin	0.5	Brown	Soft
	2	Kin	0.5	Brown	Soft
	4	Kin	0.5	Brown	Soft



شکل ۵. استقرار و تولید بافت کالوس، ریشه و اندام هوایی از ریزنمونه‌های برگ گیاه *M. oleifera*؛ A) مرحله استقرار محیط کشت MS+2 2,4-D+0.5 BAP؛ B و C) تولید بافت کالوس از محیط کشت MS+2 2,4-D+0.5 BAP و MS+1 2,4-D+0.5 BAP (به ترتیب)؛ D وE) تولید ریشه از بافت کالوس درون محیط کشت MS+2 NAA+0.5 BAP و MS+4 NAA+0.5 BAP (به ترتیب)؛ F، G و H) تولید ریشه و اندام هوایی از محیط کشت MS+1 NAA+0.5 BAP و MS+1 NAA+0.1 BAP و MS+0.5 NAA+0.5 BAP (به ترتیب). در تصویر (فلش با خطوط مقطع بیانگر ریشه و فلش با خطوط صاف بیانگر اندام هوایی حاصل از کالوس ریزنمونه‌های برگ گیاه *M. oleifera* است)

Figure 5. Establishment and production of callus, root and shoot tissue from *M. oleifera* leaf explants; A) establishment stage of culture medium MS+2 2,4-D+0.5 BAP, B and C) production of callus tissue from culture medium MS+2 2,4-D+0.5 BAP and MS+1 2,4-D+ 0.5 BAP (respectively), D and E) root production from callus tissue and culture medium MS+2 NAA+0.5 BAP and MS+4 NAA+0.5 BAP (respectively), F, G and H) root and shoot production from culture medium MS+1 NAA+0.5 BAP and MS+1 NAA+0.1 BAP and MS+0.5 NAA+0.5 BAP (respectively). In the picture (The cross-sectional lines arrows indicate the roots and the straight lines arrows indicate aerial parts obtained from the callus of *M. oleifera* plant leaf explants)

بررسی میزان ترکیبات بیوشیمیایی نمونه کالوس‌های منتخب: نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که انواع مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌طور معنی‌داری و در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان فلاونوئیدکل و آنتوسیانین نمونه کالوس‌های گیاه *M. oleifera* در شرایط درون‌شیشه‌ای مؤثر است (جدول۳). طبق نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها (جدول۴)، از نظر میزان فلاونوئیدکل نمونه کالوس‌های گیاه *M. oleifera* بین اکثر تیمارها و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری

مشاهده نشد. بیشترین مقدار فلاونوئید ($mg\ Quercetin.g^{-1}$ ۰/۰۶۱) مربوط به محیط کشت MS+1 IBA+0.5 Kin بود. اما از نظر مقدار آنتوسیانین نمونه کالوس‌های جمع‌آوری شده بین تیمار شاهد و سایر تیمارهای هورمونی اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد (جدول۴). بیشترین مقدار آنتوسیانین ($\mu mol.\ g^{-1}$ ۳/۹۳) نیز مربوط به محیط کشت MS+0.5 NAA+0.1 BAP بود.

جدول ۳. میانگین مربعات تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر متابولیت‌های ثانویه نمونه کالوس‌های گیاه *M. oleifera* در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 3. Mean squares of plant growth regulators effect on secondary metabolites of *M. oleifera* callus samples under in vitro conditions

Source of Variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS	
		فلاونوئید Flavonoid	آنتوسیانین Anthocyanin
تنظیم‌کننده رشد گیاهی Plant growth regulators	24	0.001**	0.38**
خطا Error	50	0.001	0.09
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	9.03	9.56

**: significant at 1 level of probability.

گیاه *M. oleifera* به عنوان گیاه دارویی ارزشمند در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است. یکی از روش‌های بسیار مهم در فرایند کشت بافت و اندام گیاهی تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های هدف است. کالوس به عنوان بافت هدفمند برای بررسی‌های آزمایشگاهی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Islam et al. 2021). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به گروه بزرگی از ترکیبات اطلاق می‌شود که در شرایط طبیعی و شرایط کشت درون‌شیشه‌ای موجب رشد، نمو و تولید اندام گیاهان می‌شود (Khan et al. 2020). سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی موجب القاء و تولید و رشد بافت کالوس از ریزنمونه‌های گیاهی می‌شوند. اکسین‌ها در غلظت‌های پایین‌تر موجب القای ریشه در ریزنمونه‌های گیاهی و تولید بافت کالوس در محیط کشت بافت گیاهی می‌شوند ولی افزایش غلظت در آن موجب کاهش رشد ریشه می‌شود. سیتوکینین‌ها نیز در غلظت‌های پایین‌تر موجب القای اندام هوایی و رشد بافت کالوس از ریزنمونه‌های گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌شود (Zaid et al. 2020). Al-Hamidi *et al*. (2023) ، با بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف جهت تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های گیاه *M. oleifera* بیان کردند که استفاده از 2,4-D و زآتین نسبت به NAA تولید بافت کالوس را تا ۱۰۰ درصد افزایش می‌دهد.

جدول ٤. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر میزان فلاونوئید و آنتوسیانین کالوس‌های گیاه *M. oleifera*

Table 4. The effect of different plant growth regulators on the flavonoid and anthocyanin contents in *M. oleifera* callus

محیط کشت MS حاوی MS medium containing	فلاونوئید Flavonoid (mg Quercetin.g^{-1})	آنتوسیانین Anthocyanin (µmol.g^{-1})
MS (free)	0.018 ^{bc*}	2.52 ^{f}
0.5 2,4-D + 0.1 BAP	0.009 ^{c}	3.63 ^{abc}
1 2,4-D + 0.1 BAP	0.025 ^{abc}	3.33 $^{a-d}$
0.5 2,4-D + 0.5 BAP	0.011 ^{bc}	3.53 ^{abc}
1 2,4-D + 0.5 BAP	0.018 ^{bc}	3.73 ^{ab}
0.5 2,4-D + 0.1 Kin	0.011 ^{bc}	3.53 ^{abc}
1 2,4-D + 0.1 Kin	0.032 ^{abc}	3.23 $^{b-e}$
0.5 2,4-D + 0.5 Kin	0.039 ^{abc}	3.03 $^{c-f}$
1 2,4-D + 0. 5 Kin	0.039 ^{abc}	2.72 ^{ef}
0.5 NAA + 0.1 BAP	0.018 ^{bc}	3.93 ^{a}
1 NAA + 0.1 BAP	0.018 ^{bc}	3.73 ^{ab}
0.5 NAA + 0.5 BAP	0.060 ^{a}	3.73 ^{ab}
1 NAA + 0.5 BAP	0.046 ^{ab}	3.53 ^{abc}
0.5 NAA + 0.1 Kin	0.032 ^{abc}	2.92 ^{def}
1 NAA + 0.1 Kin	0.060 ^{a}	3.13 $^{b-e}$
0.5 NAA + 0.5 Kin	0.039 ^{abc}	3.73 ^{ab}
1 NAA + 0.5 Kin	0.025 ^{abc}	3.33 $^{a-d}$
0.5 IBA + 0.1 BAP	0.032 ^{abc}	3.43 $^{a-d}$
1 IBA + 0.1 BAP	0.046 ^{ab}	3.73 ^{ab}
0.5 IBA + 0.5 BAP	0.060 ^{a}	3.63 ^{abc}
1 IBA + 0.5 BAP	0.046 ^{ab}	3.73 ^{ab}
0.5 IBA + 0.1 Kin	0.039 ^{abc}	3.13 $^{b-e}$
1 IBA + 0.1 Kin	0.046 ^{ab}	3.13 $^{b-e}$
0.5 IBA + 0.5 Kin	0.046 ^{ab}	3.73 ^{ab}
1 IBA + 0.5 Kin	0.061 ^{a}	3.43 $^{a-d}$

*حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) است.

هم‌چنین مشخص گردید که بین غلظت‌های مختلف نیز استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D عملکرد بهتری دارد و افزایش غلظت 2,4-D درون محیط کشت به ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر در صد تولید بافت کالوس را کاهش می‌دهد (Al-Hamidi et al. 2023a). El-Banna (2018) نشـان داد تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های مختلف گیاه *M. oleifera* در محیط کشت حاوی 2,4-D در مقایسه با محیط کشت دارای NAA به طور معنی‌داری بیشتر بود (El-Banna 2018). Aspuria & Nieves (2011) ، با بررسی میزان وزن‌تر کالوس گیاه *M. oleifera* در شرایط درون شیشه‌ای بیان کردند که اســتفاده از 2,4-D در مقایســه با IAA و NAA بافت کالوس‌های با وزن‌تر بالاتری را تولید می‌کند (Nieves & Aspuria 2011) که شباهت بسیاری به نتایج به دست آمده در پژوهش ما دارد. طبق نتایج ما استفاده از 2,4-D به جای NAA تولید بافت کالوس را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (شــکل۱–A). برخلاف نتایج به دســت آمده در این پژوهش Al-Hussein et al. (2023) و Muslihatin et al. (2017) بیان کردند که بهترین محیط کشــت جهت تولید بافت کالوس از

ریزنمونه‌های برگ گیاه *M. oleifera* مربوط به محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA یا IAA می‌باشد (Muslihatin et al. 2017). (Riyathong *et al*. 2010 ; Al-Hussein & Almasoody 2023)، بیان کردند که استفاده از BAP (در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در مقایسه با TDZ و Kin القاء و تولید بافت کالوس، قدرت باززایی و رشد جوانه‌های جانبی گیاه *M. oleifera* را افزایش می‌دهد (Riyathong et al. 2010). هم‌چنین Oriabi (2016)، بالاترین وزن‌تر کالوس (۰/۳۷ گرم) حاصل از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه *M. oleifera* را در محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آورد. هم‌چنین افزایش غلظت BAP تا ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر وزن‌تر بافت کالوس را به ترتیب به ۰/۲۳ و ۰/۲۰ گرم کاهش می‌دهد (Oriabi 2016) که با نتایج حاصل در این پژوهش مطابقت دارد. در پژوهش ما مشخص شد که افزایش غلظت سیتوکینین از ۰/۱ به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (به تنهایی و یا در ترکیب با اکسین) موجب افزایش وزن‌تر کالوس حاصل می‌شود (شکل۲-B). بهترین محیط کشت به همراه تیمار هورمونی جهت تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های گیاه *M. oleifera* در شرایط درون شیشه‌ای مربوط به محیط کشت MS و WPM به همراه BAP یا زآتین به عنوان سیتوکینین و 2,4-D به عنوان اکسین می‌باشد (El-Banna 2018). هم‌چنین Riyathong et al. (2010)، گزارش کردند که بهترین ترکیب هورمونی جهت تولید بافت کالوس (۱۰۰ درصد) در کنار بالاترین وزن آن از ریزنمونه‌های گیاه *M. oleifera* مربوط به محیط کشت دارای BAP به همراه 2,4-D می‌باشد (Riyathong et al. 2010). Aspuria & Nieves (2011)، بیان کردند که بیشترین درصد تولید بافت کالوس (۱۰۰ درصد) حاصل از ریزنمونه‌های برگ *M. oleifera*در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست می‌آید که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد. اما بر خلاف نتایج ما Evan et al. (2017)، گزارش نمود که استفاده از Kin در ترکیب با NAA در صد تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های برگ گیاه *M. oleifera* را تا ۱۰۰ در صد افزایش می‌دهد (Evan et al. 2017). Zheng et al. (2022) نیز بیان کردند که بیشترین درصد تولید بافت کالوس از بافت هیپوکوتیل *M. oleifera* مربوط به محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود (Zheng et al. 2022). تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس گیاه *M. oleifera* در محیط کشت MS حاوی NAA بسیار بیشتر و معنی‌دارتر از محیط کشت‌های حاوی 2,4-D می‌باشد (Al-Hussein & Almasoody 2023). هم‌راستا با نتایج به دست آمده در این پژوهش، Evan et al. (2017)، بیان کردند که استفاده از غلظت‌های ۱و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA درصد تولید اندام هوایی را در نمونه کالوس‌های گیاه *M. oleifera* را نسبت به غلظت‌های دیگر به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (Evan et al. 2017).

پژوهش حاضر مشخص کرد که استفاده از NAA در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با 2,4-D و IBA به طور معنی‌داری در صد تولید ریشه از بافت کالوس ریزنمونه برگ گیاه *M. oleifera* را افزایش می‌دهد (شکل ۱-A). استفاده از BAP در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با TDZ و Kin القاء و تولید اندام هوایی حاصل از بافت کالوس از گیاه *M. oleifera* به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (Al-Hamidi et al. 2023b). افزایش غلظت سیتوکینین به ۲ میلی‌گرم در

لیتر امکان القا و تولید اندام هوایی را کاهش می‌دهد (Zulalia & Tileye 2019). مشابه نتایج به دست آمده در این پژوهش Leljak *et al*. (2016)، بیان کردند در فرایند باززایی گیاه *M. oleifera* استفاده از NAA در ترکیب با BAP امکان تولید بافت ریشه از نمونه کالوس‌های حاصل را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (Leljak-Levanić et al. 2016). بهترین ترکیب هورمونی جهت تولید ریشه از بافت کالوس گیاه *M. oleifera* در شرایط درون شیشه‌ای مربوط به محیط کشت دارای NAA و BAP می‌باشد (Al-Hamidi et al. 2023a). Zhang et al. (2020)، بیان کردند که بهترین محیط کشت جهت تولید ریشه از بافت کالوس ریزنمونه‌های گیاه *M. oleifera* مربوط به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP است (Zhang et al. 2020). Muslihatin et al. (2017) با بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و محیط کشت‌های مختلف در فرایند باززایی از نمونه کالوس‌های *M. oleifera* گزارش نمودند که امکان باززایی و تولید اندام هوایی مانند ساقه‌های اصلی و جانبی از نمونه کالوس‌های گیاه *M. oleifera* درون محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA به همراه BAP به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارهای هورمونی و سایر محیط کشت‌های پایه اصلی می‌باشد (Muslihatin et al. 2017). نتایج به دست آمده در این پژوهش شباهت بسیاری به نتایج گزارش شده توسط سایر محققین دارد. در این پژوهش مشخص شد که محیط کشت MS حاوی 1 NAA+0.5 BAP بیشترین مقدار درصد تولید اندام هوایی (۳۰/۵۳ درصد) را داشته است (شکل۴-C). Fatima et al. (2016)، بیان کردند بالاترین درصد تولید اندام هوایی (۱۹/۶۶ درصد) از نمونه بافت‌های کالوس گیاه *M. oleifera* مربوط به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA می‌باشد (Fatima et al. 2016). در میان فیتوکمیکال‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی و آنتوسیانین‌ها از ترکیبات شناخته شده‌ای هستند که خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی دارند که ممکن است به دلیل فعالیت قوی مهار رادیکال‌های آزاد آن‌ها باشد (Tungmunnithum et al. 2018). علاقه فزاینده‌ای به بهبود تولید این مواد شیمیایی گیاهی ارزشمند در سلول‌های گیاهی از طریق تکنیک‌های کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد. دستکاری و بهینه‌سازی شرایط کشت سلولی و ترکیبات محیطی مانند تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی یک رویکرد عملی برای دستکاری و بهبود رشد سلولی و تولید متابولیت ثانویه ارائه می‌کند. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به عنوان یکی از عوامل حیاتی مؤثر بر رشد و نمو سلول‌های گیاهی در کشت کامل گیاه و در شرایط آزمایشگاهی عمل می‌کنند (Firoozi et al. 2019). نتایج ما نشان داد که میزان آنتوسیانین کالوس‌های گیاه *M. oleifera* تحت تأثیر نوع و غلظت اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها قرار گرفت (جدول۴). Javed et al. (2017)، گزارش دادند که بیشترین میزان تولید ترکیبات بیوشیمیایی به خصوص فلاونوئید کل، فنل تام و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در کشت‌های درون شیشه‌ای *Stevia rebaudiana* در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP تولید شد (Javed et al. 2017).

نتیجه‌گیری: طبق نتایج بدست آمده، استفاده از هورمون‌های گیاهی برا مقدار تولید بافت کالوس، تولید ریشه و اندام هوایی، و هم‌چنین خصوصیات بیوشیمیایی گیاه مورینگا تاثیرات مثبتی به همراه داشته‌است. به طوری که با استفاده از هورمون‌های BAP و2-4-D در محیط کشت MS می‌توان به حداکثر میزان وزن‌تر کالوس دست یافت. جهت افزایش خواص آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی گیاهان، افزایش مقدار فلاونوئید و آنتوسیانین کالوس‌های گیاهی اهمیت بسزایی دارد، که در پژوهش حاضر، بیشترین میزان ترکیبات بیوشیمیایی به خصوص میزان فلاونوئید تام و محتوای آنتوسیانینی در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه مورینگا با افزایش غلظت اکسین و سیتوکنین همراه بوده‌است.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

Abdelsayed EM, Medhat D, Mandour YM, et al. (2021) Niazimicin: A thiocarbamate glycoside from *Moringa oleifera* Lam. seeds with a novel neuroprotective activity. J Food Biochem 45**,** 13992.

Abdullah EN, Hassanein A, Salem J, Faheed F (2019) Some important aspects in *Moringa oleifera* Lam. micropropagation. Acta Agric Slov 113**,** 13-27.

Al-Hamidi A, Al-Hadedy S, Bashi A (2023a) Effect of 2,4-D and NAA in callus induction and differentiation from different explants of *Moringa oleifera* Lam. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing pp, 012091.

Al-Hamidi AOA, Bashi AZAK, Hadedy SHA (2023b) The response of *Moringa oleifera* Lam. nodes to multiply on MS and WPM media supplemented with different concentrations of BA and Kin. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing pp, 012120.

Al-Hussein FA, Almasoody MMM (2023) Effect of growth regulators (NAA and BA) on callus from *Moringa oleifera* Lam. *In vitro*. Ann For Res 66**,** 4489-4494.

Al-Rahbi BAA, Al-Sadi AM, Al-Harrasi MMA, et al. (2023) Effectiveness of endophytic and rhizospheric bacteria from *Moringa* spp. in controlling *Pythium aphanidermatum* damping-off of cabbage. Plants 12**,** 668.

Bhattacharya A, Tiwari P, Sahu PK, Kumar S (2018) A review of the phytochemical and pharmacological characteristics of *Moringa oleifera*. J Pharm Bioallied Sci 10**,** 181.

Bukar SM, Abba HM (2022) Macro-and Micropropagation of *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae): A Mini Review. Asian J Plant Sci 4**,** 20-25.

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. J Food Drug Anal 10(3), p. 3.

Dhakad AK, Ikram M, Sharma S, et al. (2019) Biological, nutritional, and therapeutic significance of *Moringa oleifera* Lam. Phytother Res 33**,** 2870-2903.

El-Banna H (2018) Callus iduction and differentiation for value medicinal plant (*Moringa oleifera*) in response to different explant types and growth regulators. J Plant Prod Sci 9**,** 403-408.

Evan NM, Wirdhatul M (2017) Induction of somatic embryogenesis *Moringa oleifera* Lam. with addition of various concentration naphtalene acetic acid (NAA) and kinetin in medium MS *in-vitro*. UI Proceedings on Science and Technology 1.

Fatima H, Perveen A, Quiser M (2016) Micropropagation to rescue endangered plant *Moringa concanensis* nimmo (moringaceae). Park J Bot 48**,** 291-294.

Firoozi B, Nasser Z, Sofalian O, Sheikhzade-Mosadegh P (2019) *In vitro* indirect somatic embryogenesis and secondary metabolites production in the saffron: emphasis on ultrasound and plant growth regulators. J Agric Sci 25**,** 1-10.

Gandji K, Chadare F, Idohou R, et al. (2018) Status and utilisation of *Moringa oleifera* Lam: A review. Afr Crop Sci J 26**,** 137-156.

Gomes G, Scortecci K (2021) Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. Plant Biology 23**,** 894-904.

Islam Z, Islam S, Hossen F et al. (2021) *Moringa oleifera* is a prominent source of nutrients with potential health benefits. Int J Food Sci 12, 26-57.

Jamwal K, Bhattacharya S, Puri S (2018) Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. J Appl Res Med 9**,** 26-38.

Javed R, Mohamed A, Yücesan B, et al. (2017) CuO nanoparticles significantly influence *in vitro* culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Cell, Tissue Organ Cult 131, 611-620.

Khan N, Bano AM, Babar A (2020) Impacts of plant growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture. PloS One 15**,** e0231426.

Kuete V (2017) *Moringa oleifera*. In: Medicinal spices and vegetables from Africa. Elsevier pp. 485-496.

Leljak-Levanić D, Mrvková M, Turečková V, et al. (2016) Hormonal and epigenetic regulation during embryogenic tissue habituation in Cucurbita pepo L. Plant Cell Rep 35**,** 77-89.

Li S-M, Zheng H-X, Zhang X-S, Sui N (2021) Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. Plant Cell Rep 40**,** 271-282.

Mok MC (2019) Cytokinins and plant development—an overview. Cytokinins**,** 155-166.

Muslihatin W, Jadid N, Puspitasari ID, Safitri CE (2017) Growth of vegetative explant *Moringa oleifera* on different composition of auxin and cytokinin and its synthetic seed germination. In: AIP Conference Proceedings. AIP Publishing.

Mustafa R, El-Naggar EB, Svajdlenka E, et al. (2021) Enhancement of phenolic content, antioxidant and cytotoxic activities of *Moringa oleifera* leaf and seed by suspension culture. Nat Prod Res 35**,** 5233-5237.

Nieves MC, Aspuria ET (2011) Callus induction in cotyledons of *Moringa oleifera* Lam. Philipp. Agric Sci 94.

Noruzpuor M, Zare N, Asghari Zakaria R, Sheikhzade P (2022) Effects of benomyl and cytokinin on *in vitro* contamination and growth of *Vaccinium arctostaphylos* L. node explants. IJMAPR, 38(1), 150-165.

Oriabi AG (2016) *Moringa oleifera in vitro* culture and its application as anti-diabetic in alloxan induced diabetic albino mice. Int J Curr Microbiol App Sci 5**,** 43-49.

Phillips GC, Garda M (2019) Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro* Cell Dev Biol 55**,** 242-257.

Riyathong T, Dheeranupattana S, Palee J, Shank L (2010) Shoot multiplication and plant regeneration from *in vitro* cultures of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). In: The 8th international symposium on biocontrol and biotechnology King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang and Khon Kaen University, Nongkhai Campus, Thailand. pp. 99-104.

Saini RK, Sivanesan I, Keum Y-S (2016) Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. 3 Biotech 6**,** 1-14.

Samarakoon S, Kandegama W (2020) Aphytogenic plant growth regulator from Moringa (*Moringa oleifera*) leaf extract. In: Молодежная наука-развитию агропромышленного комплекса. pp. 388-395.

Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A (2018) Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. Medicines 5**,** 93.

Wagner GJ, (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiol 64(1), p. 88-93.

Zaid A, Mohammad F, Fariduddin Q (2020) Plant growth regulators improve growth, photosynthesis, mineral nutrient and antioxidant system under cadmium stress in menthol mint (*Mentha arvensis* L.). Physiol Mol Biol Plants 26**,** 25-39.

Zhang J, Pian R, Yang E, et al. (2020) *In vitro* induction and characterisation of tetraploid drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). Open Life Sci 15**,** 840-847.

Zheng M, Yang H, Yang E, et al. (2022) Efficient *in vitro* shoot bud proliferation from cotyledonary nodes and apical buds of *Moringa oleifera* Lam. Ind Crops Prod 187**,** 115394.

Zulalia J, Tileye F (2019) Micropropagation of *Moringa oleifera* Lam. from shoot tip explants. Ethiop J Biol Sci 18**,** 139–152.