Research Article

Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research

DOI: 10.22092/ijrfpbgr.2026.372749.1496

Vol. 34, No. 1, Page 29- 40 (2026)

Evaluation of Different Hormonal Concentrations on Callus Induction in Three Iranian Ecotypes of Borage (*Echium amoenum*).

Fahimeh Davoodi[1], Mohammad Reza Azimi[2], Ali Amarlou[3], and Arman Haghnazari[4*]

1- M.Sc. student, Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran.
2- Assoc. Prof., Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3- Assoc. Prof., Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran
4-Corresponding author: M.Sc. graduate in Plant Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received: 2026/05/18 Revised: 2026/06/12 Accepted: 2026/08/13

Abstract

Background and Objective: Iranian borage (*Echium amoenum*) is a medicinal plant of the Boraginaceae family that has long been used in traditional medicine to treat anxiety and cardiovascular disorders. This plant contains valuable secondary metabolites such as anthocyanins and phenolic compounds with strong antioxidant properties. Due to the limitations of conventional propagation and the increasing demand for medicinal compounds, plant tissue culture can be an efficient tool for studying physiological responses, callus production, and providing a platform for advanced research, such as secondary metabolite production and gene engineering studies. Therefore, callus induction and the study of factors affecting it are the objectives of this study.

Materials and Methods: To investigate the effect of hormonal compounds on callus induction in Iranian borage, seeds of three ecotypes from Zanjan, Qazvin, and Gilan were used. The seeds were first stored at 4°C, and then they were soaked in sterile distilled water at 5°C for 7 days to break dormancy. Then the seeds were sown on a substrate consisting of sand, compost and perlite that had been previously autoclaved. After approximately 10 to 14 days of germination, the seedlings were grown under controlled conditions at 25°C in a greenhouse. After approximately 60 days of seedling growth, approximately 3 mm leaf explants and approximately 2 mm root explants were isolated. The explants were surface-sterilized with 70% ethanol for 30 seconds and 5% sodium hypochlorite solution for 10 minutes, and then rinsed three times with sterile distilled water. The sterilized explants were cultured on MS basal medium, which was adjusted to pH 5.8 before autoclaving, containing 30 g/L sucrose and 8 g/L agar. A factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with three replications. The hormones, of naphthalene acetic acid (NAA) and benzylaminopurine (BAP) at three concentrations (0, 0.5, and 1 mg/L), with the explants in two levels (leaf and stem) of three ecotypes. The explants were maintained at 25°C in a dark environment, and after eight weeks, traits such as fresh callus weight and callus color were evaluated. Data analysis was performed using SPSS version 26 software, and means were compared using Tukey's honestly significant difference (HSD) test at the 5% probability level.

Copyright: © 2026 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijrfpbgr.areeo.ac.ir//) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Results: the result of ANOVA revealed the significant effects of the main factor of NAA, BAP, and explant type on callus fresh weight, whereas the main effect of ecotype was not significant. There were significant interaction effects of ecotypes by hormones and explant type by hormones, indicating the different responses of explant type across hormonal combinations. The highest callus fresh weight (2.73 g) was obtained from leaf explants of the Zanjan ecotype grown on MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP. This value represented more than a 21-fold increase compared with the hormone-free control. In general, leaf explants showed a greater potential for callus production than root explants. In the absence of NAA, callus fresh weight was very low, and in some treatments, no callus formation was observed. The concentration of 1 mg/L NAA promoted the highest callus growth, whereas increasing NAA to 1.5 mg/L and BAP to 1 mg/L reduced callus fresh weight in some treatments. Callus color varied from green in hormone-free or low-hormone media to white, creamy, and brown in media containing higher concentrations of growth regulators. According to Tukey's HSD test, the superior treatment was grouped among the highest-performing treatments, and its interpretation was made based on the revised mean comparison results.
Conclusion: The combination of 1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP in leaf explants of the Zanjan ecotype was identified as the optimal protocol for callus induction in E. amoenum. NAA played a key role in callus formation, and leaf explants showed higher potential than roots. Ecotype responses varied significantly, and significant interactions indicate the necessity of protocol optimization for each ecotype.

Keywords: Benzylaminopurine (BAP), Callus induction, Tissue culture, Iranian borage, Naphthalene acetic acid (NAA)

بررسی اثر غلظت‌های مختلف هورمونی بر کالوس‌زایی سه اکوتیپ گل گاو زبان ایرانی (*Echium amoenum*)

فهیمه داوودی[۱]، محمدرضا عظیمی[۲]، علی عمارلو[۳] و آرمان حق‌نظری[۴*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲- دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳- دانشیار، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۴- نویسنده مسئول مکاتبات، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

پست‌الکترونیک: haghnazari.arman@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۲۸ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۰۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: گل گاو زبان ایرانی (*Echium amoenum*) گیاهی دارویی از خانواده Boraginaceae است که در طب سنتی برای درمان اضطراب و اختلالات قلبی—عروقی استفاده می‌شود. این گیاه حاوی متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی مانند آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنلی با خواص آنتی‌اکسیدانی است. با توجه به محدودیت‌های تکثیر جنسی و افزایش تقاضای دارویی، کشت‌بافت به‌عنوان روشی کارآمد مطرح است. کشت بافت گیاهی می‌تواند به‌عنوان ابزاری کارآمد برای مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیک، تولید کالوس و فراهم کردن بستر لازم برای پژوهش‌های پیشرفته مانند تولید متابولیت‌های ثانویه و مطالعات مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد. ازاین‌رو، القای کالوس و بررسی عوامل مؤثر بر آن از اهداف این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی اثر ترکیبات هورمونی بر القای کالوس در گل گاو زبان ایرانی، بذر سه اکوتیپ زنجان، قزوین و گیلان مورد استفاده قرار گرفت. بذرها ابتدا در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بعد به‌منظور شکست خواب، به‌مدت ۷ روز در آب مقطر استریل در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد پیش‌تیمار گردیدند. بذرها روی بستری از ماسه، خاک‌برگ و پرلیت به نسبت مساوی که قبلاً اتوکلاو شده بود، کشت شدند. پس از حدود ۱۰ تا ۱۴ روز جوانه‌زنی، گیاهچه‌های حاصل در شرایط کنترل‌شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در گلخانه رشد داده شدند. پس از حدود ۶۰ روز از رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های برگ به اندازه حدود ۳ میلی‌متر و ریشه به اندازه حدود ۲ میلی‌متر جدا شد. ریزنمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ریزنمونه‌های استریل شده بر روی محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار کشت داده شدند. برای بررسی اثر هورمون‌ها، محیط کشت با سه غلظت نفتالین استیک اسید NAA (۰، ۱ و ۱٫۵ میلی‌گرم در لیتر) و سه غلظت بنزیل آمین پورین BAP (۰، ۰٫۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) تهیه شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی کامل نگهداری شدند و پس از هشت هفته، صفات وزن تر کالوس و رنگ کالوس ارزیابی گردید. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج: نتایج تجزیه واریانس فاکتوریلی نشان داد که اثر اصلی هورمون‌های NAA، BAP و نوع ریزنمونه بر وزن تر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود، در حالی که اثر اصلی اکوتیپ معنی‌دار نشد. با این حال، معنی‌دار بودن برخی اثرهای متقابل اکوتیپ در ریزنمونه و هورمون در ریزنمونه نشان داد که پاسخ اکوتیپ‌ها به نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی یکسان نبوده است. بیشترین وزن تر کالوس (۲/۷۳ گرم) از ریزنمونه برگ اکوتیپ زنجان در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. این مقدار نسبت به شاهد فاقد هورمون (بافت برگ و اکوتیپ زنجان) ۲۱ برابر افزایش نشان داد. به‌طورکلی، ریزنمونه‌های

برگ نسبت به ریزنمونه‌های ریشه توان بیشتری برای تولید کالوس نشان دادند. در نبود NAA، وزن تر کالوس بسیار پایین بود و در برخی تیمارها کالوس تشکیل نشد. غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین رشد کالوس را ایجاد کرد، در حالی که افزایش غلظت NAA به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و BAP به ۱ میلی‌گرم در لیتر در برخی تیمارها اثر بازدارنده داشت. رنگ غالب کالوس‌ها نیز از سبز در محیط‌های فاقد هورمون یا کم هورمون به سفید، شیری و قهوه‌ای در محیط‌های دارای غلظت‌های بالاتر تنظیم‌کننده‌های رشد تغییر یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که القای کالوس در *E. Amoenum* به‌شدت تحت تأثیر اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه قرار دارد. ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ریزنمونه‌های برگ اکوتیپ زنجان به‌عنوان یکی از مؤثرترین تیمارها برای القای کالوس شناسایی شد. اگرچه اثر اصلی اکوتیپ معنی‌دار نبود، اما معنی‌دار بودن اثر متقابل نشان داد که پاسخ اکوتیپ‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌تواند وابسته به شرایط کشت باشد. این یافته‌ها می‌تواند مبنایی مناسب برای بهینه‌سازی شیوه‌نامه‌های تولید کالوس در گل گاوزبان ایرانی فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آمینوپورین (BAP)، کالوس‌زایی، کشت بافت، گل گاوزبان ایرانی، نفتالین استیک اسید (NAA)

مقدمه

خانواده *Boraginaceae* یکی از خانواده‌های مهم گیاهان نهان‌دانه به‌شمار می‌رود و شامل بیش از ۱۳۰ جنس و ۲۳۰۰ گونه است (Chacón *et al.*, 2016؛ Weigend *et al.*, 2010). جنس *Echium* یکی از مهمترین جنس‌های این خانواده بوده و گونه‌های آن عمدتاً در مناطق مدیترانه‌ای، اروپای جنوبی، آسیای غربی و شمال آفریقا پراکنش دارند (Cinbilgel *et al.*, 2022). در ایران چهار گونه از این جنس وجود دارد که در میان آنها گل گاو زبان ایرانی *E. amoenum* به دلیل اهمیت دارویی و کاربرد گسترده در طب سنتی جایگاه ویژه‌ای دارد (Mehrabani *et al.*, 2005). گل گاوزبان ایرانی گیاهی چندساله، علفی و کرک‌دار است که در مناطق مرطوب و نیمه‌مرطوب شمال و غرب ایران رشد می‌کند و به‌عنوان یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی در طب سنتی ایران برای درمان اضطراب، التهاب، درد و اختلالات تنفسی به‌کار می‌رود (Davodi *et al.*, 2025؛ Khandanizadeh *et al.*, 2025). مطالعات جدید نیز اثرهای آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد اضطراب و محافظت‌کننده عصبی عصاره و ترکیبات این گیاه را تأیید کرده‌اند (Asghari *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2020).

افزایش تقاضا برای مواد گیاهی دارویی و فشار برداشت از رویشگاه‌های طبیعی، نگرانی‌هایی را در مورد کاهش جمعیت‌های طبیعی، تخریب زیستگاه و افت تنوع ژنتیکی این گونه ایجاد کرده است. ازاین‌رو، بهره‌گیری از روش‌های بیوتکنولوژی به‌ویژه کشت بافت گیاهی به‌عنوان رویکردی پایدار برای مطالعات سلولی، حفظ ژرم‌پلاسم، تولید متابولیت‌های ثانویه و فراهم‌سازی بستر پژوهش‌های پیشرفته اهمیت فزاینده‌ای پیدا کرده است (Bogdanović & Ćuković, 2025; Wang *et al.*, 2021).

در میان تکنیک‌های کشت بافت، القای کالوس مرحله‌ای حیاتی برای مطالعات فیزیولوژیکی، باززایی غیرمستقیم، بررسی پاسخ‌های سلولی به تنظیم‌کننده‌های رشد و ایجاد سیستم‌های آزمایشی درون‌شیشه‌ای محسوب می‌شود. القای کالوس تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند نوع ریزنمونه، ترکیب پایه محیط کشت و مهمتر از آن نوع و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی قرار دارد (Ikeuchi *et al.*, 2019). اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها نقش کلیدی در القای تقسیم سلولی و تمایززدایی دارند و ترکیب مناسب آنها می‌تواند به‌طور چشمگیری بر سرعت القای کالوس، میزان رشد و ویژگی‌های مورفولوژیکی آن اثر بگذارد. در این میان، نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) یکی از اکسین‌های رایج برای القای کالوس و بنزیل‌آمین‌پورین (BAP) یکی از سیتوکینین‌های مهم برای تحریک تکثیر سلولی است (Faisal *et al.*, 2018؛ Rahman *et al.*, 2015).

بررسی پاسخ اکوتیپ‌های مختلف به تنظیم‌کننده‌های رشد در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌تواند اطلاعات ارزشمندی درباره

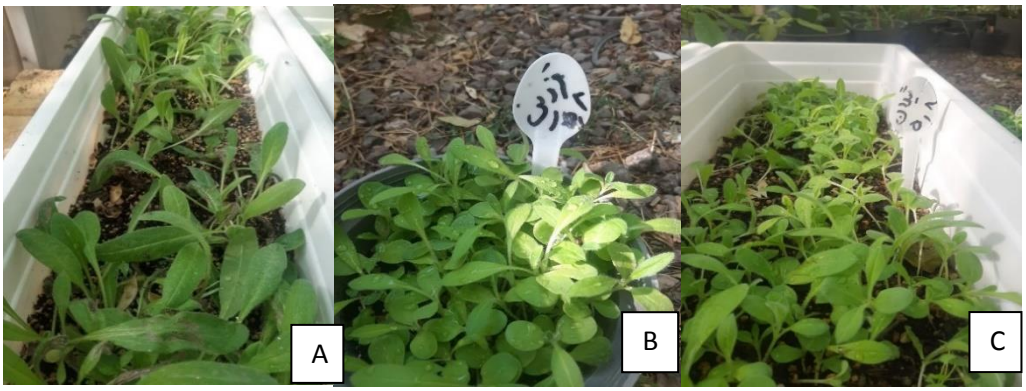
تنوع درون‌گونه‌ای در سطح سلولی و ظرفیت بازبرنامه‌ریزی سلولی فراهم کند. چنین دانشی می‌تواند به‌عنوان پیش‌نیاز توسعه سامانه‌های باززایی، تولید متابولیت‌های ثانویه و مطالعات به‌نژادی یا مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار بگیرد. هدف این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) و بنزیل‌آمین‌پورین (BAP) بر القای کالوس و ویژگی‌های رشدی کالوس در سه اکوتیپ بومی ایران در گیاه *E. amoenum* تحت شرایط کشت درون‌شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، آماده‌سازی بذرها و تهیه ریزنمونه‌ها

این پژوهش در سال ۱۴۰۳ در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی پژوهشکده فناوری‌های نوین دانشگاه زنجان انجام شد. مواد اولیه شامل بذرهای *E. amoenum* متعلق به ۳ اکوتیپ بومی از استان‌های گیلان، قزوین و زنجان بود. انتخاب این سه اکوتیپ با هدف بررسی تفاوت‌های پاسخ القای کالوس در سطح درون‌گونه‌ای و ارزیابی اثر تنوع ژنتیکی بر توانایی تمایززدایی بافتی انجام شد. بذرهای جمع‌آوری‌شده پیش از آغاز مراحل آزمایشگاهی، پس از پاک‌سازی اولیه در پاکت‌های کاغذی استریل قرار داده شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا از کاهش قوه‌نامیه و تغییرات فیزیولوژیک ناخواسته جلوگیری شود.

برای رفع خواب بذرها، فرایند پیش‌تیمار سرمادهی انجام شد. در این مرحله، بذرها به مدت هفت روز در آب مقطر استریل و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. این تیمار نقش مؤثری در تسریع جوانه‌زنی و افزایش یکنواختی آن داشت. پس از پایان دوره سرمادهی، بذرها در بستر کشت شامل مخلوطی از ماسه، خاک‌برگ و پرلیت (به نسبت مساوی)، که پیش‌تر اتوکلاو شده بود، کشت شدند. جوانه‌زنی طی حدود ۱۰ تا ۱۴ روز ظاهر شد و گیاهچه‌ها تحت شرایط کنترل‌شده رشد کردند (شکل ۱). برای جلوگیری از بروز بیماری‌های قارچی، آبیاری دوره‌ای با محلول قارچ‌کش مناسب انجام شد. پس از گذشت ۶۰ روز از رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌ها از بافت برگ و ریشه تهیه شدند. ریزنمونه‌های برگ به قطعات تقریباً ۳ میلی‌متری و ریزنمونه‌های ریشه به قطعات حدود ۲ میلی‌متری تقسیم گردیدند. تمامی نمونه‌برداری‌ها با تیغ استریل و تحت هود لامینار انجام شد تا آلودگی‌های احتمالی محیطی به حداقل برسد.



شکل ۱. اکوتیپ‌های مورد استفاده به‌عنوان گیاه مادری: A: اکوتیپ زنجان، B: اکوتیپ قزوین، C: اکوتیپ گیلان

Figure 1. Ecotypes used as mother plants: A: Zanjan ecotype – B: Qazvin ecotype – C: Gilan ecotype

کشت ریزنمونه‌ها، تیمارهای هورمونی و شرایط نگه‌داری

برای حذف آلودگی‌ها و انجام سترون‌سازی، ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در محلول الکل ۷۰ درصد قرار داده شدند و بعد به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد غوطه‌ور گردیدند. پس از پایان ضدعفونی، نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند تا بقایای مواد

ضدعفونی‌کننده به‌طور کامل حذف شود. ریزنمونه‌ها بلافاصله پس از استریل‌سازی به محیط کشت منتقل شدند تا از کاهش زنده‌مانی ناشی از خشک‌شدن بافت جلوگیری گردد.

محیط پایه مورد استفاده برای القای کالوس، محیط MS بود که به آن ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار افزوده شد. pH محیط پیش از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم گردید. پس از استریل‌سازی محیط در اتوکلاو و سرد شدن آن تا حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد، محلول‌های استوک تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل NAA و BAP پس از استریل شدن با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر به محیط افزوده شدند تا تیمارهای هورمونی مورد نظر آماده‌سازی شوند. سطوح مورد استفاده برای هورمون NAA شامل ۰، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و برای هورمون BAP شامل ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بود. با استفاده از تمام ترکیبات ممکن این سطوح، ۹ تیمار هورمونی مختلف تهیه شد (جدول ۱). تمام محیط‌ها تحت شرایط استریل و در ظروف کشت یکسان و استاندارد توزیع شدند تا اثر عوامل محیطی و احتمالی تفاوت بین ظروف به حداقل برسد.

آزمایش در قالب طرح فاکتوریل چهارعاملی بر پایه طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل اکوتیپ گیاهی در سه سطح (گیلان، قزوین و زنجان)، غلظت هورمون NAA در سه سطح (۰، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت هورمون BAP در سه سطح (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و نوع ریزنمونه در دو سطح (برگ و ریشه) بودند. هر پتری‌دیش به‌عنوان یک واحد آزمایشی و یک تکرار در نظر گرفته شد و در هر پتری‌دیش سه ریزنمونه قرار داده شد. میانگین سه ریزنمونه هر پتری‌دیش به‌عنوان داده آن واحد آزمایشی در تجزیه آماری استفاده گردید. تمامی ظروف کشت در اتاق رشد با شرایط کاملاً کنترل‌شده شامل دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی کامل نگه‌داری شدند تا عوامل محیطی اثر حداقلی بر نتایج داشته باشند.

فرایند القای کالوس به‌صورت هفتگی پایش گردید و تغییرات مورفولوژیک اولیه مانند تورم بافت و آغاز تشکیل توده‌های کالوسی ثبت شد. پس از هشت هفته از زمان کشت، صفات مورد ارزیابی شامل وزن تر کالوس و رنگ کالوس اندازه‌گیری گردید. این دو شاخص به‌عنوان معیارهای اصلی پاسخ ریزنمونه‌ها به تیمارهای هورمونی در نظر گرفته شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ تجزیه‌وتحلیل آماری شدند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون Tukey در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

جدول ۱. محیط‌های تهیه شده برای کشت ریزنمونه‌ها

Table 1. Culture media prepared for explant cultivation

Treatment No.	Medium	NAA (mg/L)	BAP (mg/L)
1	MS	0	0
2	MS	0	0.5
3	MS	0	1.0
4	MS	1.0	0
5	MS	1.0	0.5
6	MS	1.0	1.0
7	MS	1.5	0
8	MS	1.5	0.5
9	MS	1.5	1.0

نتایج

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر معنی‌دار فاکتورهای مختلف بر وزن تر کالوس را در گل گاوزبان ایرانی نشان داد. اثر اصلی اکوتیپ معنی‌دار نبود، اما اثر اصلی NAA، BAP و نوع ریزنمونه در سطح یک درصد معنی‌دار بودند. این یافته‌ها حکایت از نقش حیاتی تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع بافت اولیه در فرایند کالوس‌زایی دارد. اثر متقابل هورمون‌های NAA در BAP در سطح پنج درصد معنی‌دار بود، همچنین اثرهای متقابل اکوتیپ در ریزنمونه و هورمون NAA در ریزنمونه در سطح یک درصد معنی‌دار بودند. اثر متقابل هورمونBAP در ریزنمونه و اثر متقابل هورمون NAA در ریزنمونه در اکوتیپ نیز در سطح پنج درصد معنی‌دار بودند که نشان‌دهنده پیچیدگی تعامل بین عوامل مختلف در تعیین پاسخ کالوس‌زایی است. در این میان سایر اثرات متقابل دو گانه، سه گانه و چهارگانه

معنی‌دار نبودند (جدول ۲).

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد، اکوتیپ و ریزنمونه بر وزن تر کالوس

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) of the effects of different concentrations of growth regulators, ecotype, and explant on callus fresh weight

Source of Variation	DF	Mean Square
Ecotype	2	0.24
NAA	2	13.05**
BAP	2	2.79**
Ecotype × NAA	4	0.37
Ecotype × BAP	4	0.13
NAA × BAP	4	0.5*
Ecotype × NAA × BAP	8	0.26
Explant	1	9.25**
Ecotype × Explant	2	2.5**
NAA × Explant	2	1.36**
BAP × Explant	2	0.7*
BAP × Explant × Ecotype	4	0.26
NAA × Explant × Ecotype	4	0.49*
NAA × BAP × Explant	4	0.32
NAA × BAP × Explant × Ecotype	8	0.14
Error	108	0.17

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and **: significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

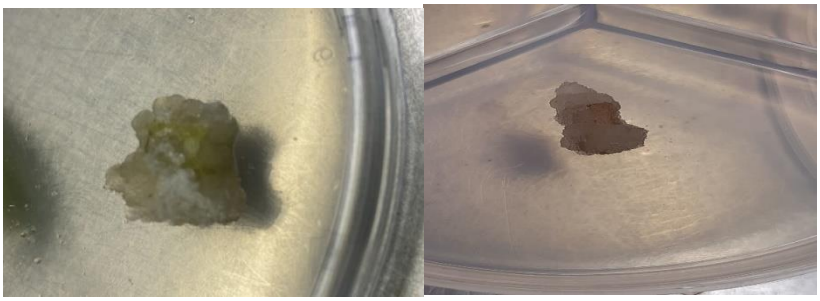
مقایسه میانگین تیمارها (جدول ۳) نشان داد که غلظت NAA و BAP تأثیر قابل توجهی بر وزن تر کالوس داشتند. در تیمارهای بدون NAA (صفر میلی‌گرم در لیتر)، کالوس ایجاد نشد و حالت برفکی روی ریزنمونه‌ها بوجود آمد که وزن تر آنها بسیار پایین بود. افزودن یک میلی‌گرم در لیتر NAA به‌طور چشمگیری وزن تر کالوس را افزایش داد، به‌طوری‌که ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ریزنمونه برگ اکوتیپ زنجان بالاترین وزن تر کالوس (۲/۷۳ گرم) را تولید کرد. این تیمار در مقایسه با شاهد فاقد هورمون در همان اکوتیپ و همان نوع ریزنمونه، ۲۱ برابر افزایش وزن کالوس نشان داد. با افزایش غلظت NAA به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، در برخی تیمارها وزن کالوس کاهش یافت که نشان‌دهنده وجود غلظت بهینه و اثر بازدارنده غلظت‌های بالاتر است. به‌طور مشابه، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در حضور NAA، بیشترین وزن تر کالوس را القا کرد و افزایش آن به یک میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش وزن کالوس در برخی تیمارها شد.

ریزنمونه‌های برگ به‌طورکلی ظرفیت کالوس‌زایی بسیار بالاتری نسبت به ریزنمونه‌های ریشه داشتند (شکل ۲). در اکوتیپ زنجان، ریزنمونه برگ با بهترین ترکیب هورمونی (یک میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) ۲/۷۳ گرم کالوس تولید کرد، در حالی که ریزنمونه ریشه تنها ۰/۲۶گرم کالوس داد. اگرچه ریزنمونه‌های ریشه پاسخ ضعیف‌تری داشتند، اما در برخی تیمارها (مانند اکوتیپ قزوین با یک میلی‌گرم در لیتر NAA + یک میلی‌گرم در لیتر BAP) نیز وزن تر کالوس قابل توجهی (۱/۱۶ گرم) تولید کردند (جدول ۳).

در مقایسه اکوتیپ‌ها، اگرچه اثر اصلی اکوتیپ معنی‌دار نبود، اما معنی‌دار بودن برخی اثرهای متقابل، به‌ویژه اثر متقابل اکوتیپ × ریزنمونه، نشان داد که پاسخ اکوتیپ‌ها با توجه به نوع ریزنمونه

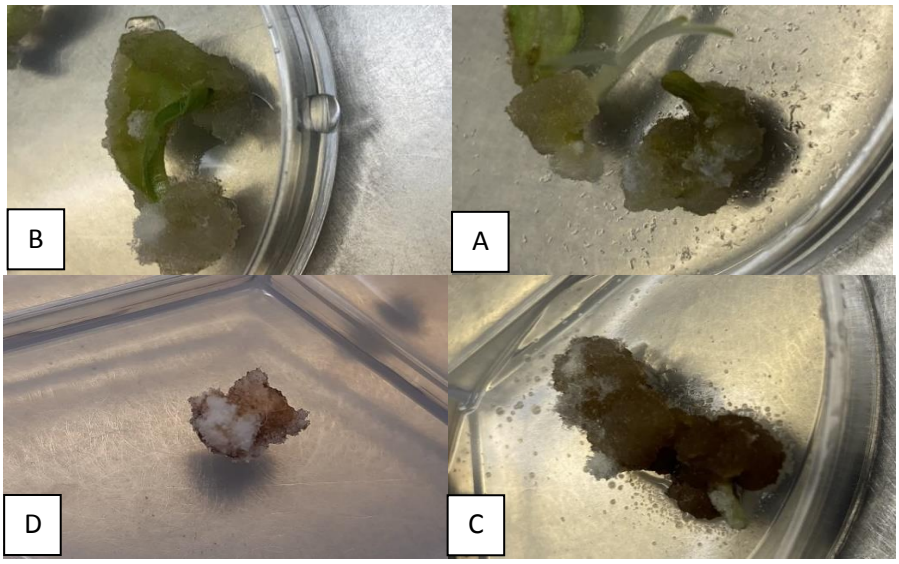
و ترکیب هورمونی متفاوت است. اکوتیپ زنجان عموماً بالاترین وزن تر کالوس را در بیشتر تیمارها تولید کرد. اکوتیپ قزوین در تیمارهای حاوی غلظت‌های بالاتر NAA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) پاسخ خوبی نشان داد و اکوتیپ گیلان به‌طورکلی کمترین وزن تر کالوس را تولید کرد و در تیمار شاهد هیچ کالوسی نداشت.

ویژگی‌های کیفی کالوس نیز تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت. کالوس‌های سبزرنگ در تیمارهای بدون NAA یا با غلظت پایین NAA مشاهده شدند که می‌تواند نشان‌دهنده فعالیت فتوسنتزی باشد. با افزایش غلظت NAA، رنگ کالوس به سفید، برفی و قهوه‌ای تغییر یافت. کالوس‌های سفید و برفی معمولاً در تیمارهای حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و کالوس‌های قهوه‌ای در غلظت‌های بالاتر NAA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (یک میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شدند که ممکن است نشان‌دهنده استرس اکسیداتیو یا تجمع ترکیبات فنلی باشد. ریزنمونه‌های ریشه عمدتاً کالوس‌های سفیدرنگ تولید کردند. بهترین تیمار برای کالوس‌زایی، ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ریزنمونه برگ اکوتیپ زنجان بود که بیشترین وزن تر کالوس و کالوس برفی‌رنگ تولید کرد (شکل ۳).



شکل ۲. کالوس‌زایی در بافت ریشه (شکل سمت راست) و کالوس‌زایی در بافت برگ (شکل سمت چپ)

Figure 2. Callus formation in root tissue (right) and callus formation in leaf tissue (left)



شکل ۳. تنوع در رنگ کالوس‌های گل گاو زبان: **A**: کالوس سبز رنگ، **B**: کالوس سفید، **C**: قهوه‌ای شدن کالوس به‌دلیل اکسیداسیون ترکیبات فنلی، **D**: کالوس برفکی

Figure 3. Variation in callus color in Iranian borage: A: Green callus – B: White callus – C: Browning of callus due to oxidation of phenolic compounds – D: Snowy callus

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده‌های رشد، اکوتیپ و ریزنمونه بر وزن تر کالوس

Table 3. Mean comparison of the effects of growth regulators, ecotype, and explant on callus fresh weight

NAA (mg/L)	BAP (mg/L)	Explant	Callus fresh weight (g)	Dominant callus color	Callus fresh weight (g)	Dominant callus color	Callus fresh weight (g)	Dominant callus color
			Zanjan		Qazvin		Gilan	
0	0	Leaf	0.13 b	Green	0.06 b	Green	0.00 b	No callus
0	0	Root	0.01 b	White	0.02 b	White	0.00 b	No callus
0	0/5	Leaf	0.67 b	Green	0.26 b	Green	0.26 b	White
0	0/5	Root	0.02 b	White	0.16 b	White	0.50 b	White
0	1	Leaf	0.17 b	Green	0.30 b	Green	0.36 b	White
0	1	Root	0.03 b	White	0.20 b	Snowy	0.26 b	White
1	0	Leaf	0.69 b	Green	0.30 b	Snowy	0.76 b	White
1	0	Root	0.07 b	White	0.14 b	White	0.70 b	Snowy
1	0/5	Leaf	2.73 a	Snowy	1.20 b	White	1.50 a	White
1	0/5	Root	0.26 b	White	0.83 b	White	0.83 b	White
1	1	Leaf	1.94 a	White	1.53 a	Brown	0.76 b	White
1	1	Root	0.20 b	White	1.16 b	White	0.93 b	Brown
1/5	0	Leaf	1.63 a	White	1.60 a	Brown	0.83 b	White
1/5	0	Root	0.56 b	White	0.80 b	White	0.56 b	Brown
1/5	0/5	Leaf	2.16 a	Snowy	1.86 a	Brown	1.10 b	Brown
1/5	0/5	Root	0.66 b	White	1.03 b	Brown	0.76 b	White
1/5	1	Leaf	1.43 a	White	1.23 b	Brown	1.10 b	White
1/5	1	Root	1.06 b	White	1.03 b	Brown	0.86 b	White

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها بر اساس آزمون توکی است

Means followed by different letters differ significantly according to Tukey's HSD test at $P \leq 0.05$.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که کالوس‌زایی در گاو زبان ایرانی *E. amoenum* تحت تأثیر عوامل پیچیده‌ای از تعادل هورمونی، نوع ریزنمونه و اکوتیپ قرار دارد. NAA مهم‌ترین عامل در القای کالوس شناسایی شد، به‌طوری‌که اثر اصلی آن در سطح یک درصد معنی‌دار بود. در غیاب NAA، کالوس‌زایی بسیار ضعیف بود و در اکوتیپ گیلان اصلاً کالوسی تشکیل نشد. این یافته با نقش شناخته‌شده اکسین‌ها در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافتی مطابقت دارد. اکسین‌ها از طریق فعال‌سازی ژن‌های چرخه سلولی و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با پلاستیسیته سلولی، نقش کلیدی در القای کالوس ایفا می‌کنند (Ikeuchi *et al.*, 2019). مطالعات مشابه در گونه‌های مختلف خانواده *Boraginaceae* نیز نقش حیاتی اکسین‌ها را در کالوس‌زایی تأیید کرده‌اند (Azizi *et al.*, 2015).

بالاترین وزن تر کالوس (۲/۷۳ گرم) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد، در حالی که افزایش غلظت به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر در برخی تیمارها منجر به کاهش وزن کالوس شد. این پدیده نشان‌دهنده وجود یک غلظت بهینه برای NAA است که فراتر از آن، اثرهای بازدارنده ظاهر می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که غلظت‌های بالای اکسین می‌توانند منجر به تجمع اتیلن، افزایش استرس اکسیداتیو و مهار رشد شوند (Schaller *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای بر روی *E. amoenum*، Arastegi و همکاران (۲۰۲۳) نیز گزارش کردند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بهینه‌ترین سطح برای کالوس‌زایی است.

اگرچه اثر اصلی (غلظت‌های) BAP نیز در سطح یک درصد معنی‌دار بود، اما اثر آن نسبت به NAA کمتر بود. BAP به تنهایی نتوانست کالوس‌زایی مؤثری را القا کند، اما در ترکیب با NAA، وزن تر کالوس را به‌طور چشمگیری افزایش داد. برای نمونه، در اکوتیپ زنجان، افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، وزن تر کالوس را از ۰/۶۹ گرم به ۲/۷۳ گرم افزایش داد که تقریباً چهار برابر شد. این یافته با مدل کلاسیک Skoog و Miller (۱۹۵۷) مطابقت دارد که نسبت اکسین به سیتوکینین را عامل تعیین‌کننده سرنوشت سلولی در کشت بافت می‌داند. اثر متقابل معنی‌دار NAA و BAP در سطح پنج درصد نشان داد که پاسخ کالوس‌زایی به غلظت NAA با توجه به سطح BAP متفاوت است. این تعامل از طریق مسیرهای سیگنالینگ

مشترک و تنظیم متقابل بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به اکسین و سیتوکینین انجام می‌شود (Moubayidin *et al.*, 2009). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که اکسین و سیتوکینین از طریق تنظیم فاکتورهای رونویسی مانند ARF و B-type ARR، به‌صورت هماهنگ بر تقسیم و تمایز سلولی نظارت می‌کنند (Schaller *et al.*, 2015; Wybouw & De Rybel, 2019).

غلظت بهینه BAP در این مطالعه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود و افزایش آن به ۱ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش وزن کالوس شد. این پدیده ممکن است به دلیل اثرهای بازدارنده غلظت‌های بالای سیتوکینین بر تقسیم سلولی یا القای تمایز زودرس باشد. Kieber و Schaller (۲۰۱۸) گزارش کردند که غلظت‌های بالای سیتوکینین می‌توانند منجر به فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ استرس و مهار رشد شوند.

یکی از یافته‌های مهم این مطالعه، تفاوت معنی‌دار بین ظرفیت کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ و ریشه بود که در سطح یک درصد معنی‌دار شد. ریزنمونه‌های برگ در تمامی تیمارها وزن تر کالوس بسیار بیشتری نسبت به ریزنمونه‌های ریشه تولید کردند. این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در وضعیت فیزیولوژیکی، محتوای هورمونی درون‌زا و پتانسیل تقسیم سلولی بافت‌های برگ و ریشه باشد. بافت‌های برگ معمولاً سلول‌های مریستمی بیشتری دارند و از پلاستیسیته بالاتری برخوردارند (Ikeuchi *et al.*, 2016). اثر متقابل معنی‌دار اکوتیپ و ریزنمونه در سطح یک درصد نشان داد که پاسخ ریزنمونه‌های برگ و ریشه در سه اکوتیپ متفاوت است. این تفاوت می‌تواند ناشی از تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها در بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنظیم‌کننده‌های رشد باشد. مطالعات نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی در بیان ژن‌های خانواده ARF و PIN می‌تواند منجر به تفاوت در پاسخ بافت‌ها به اکسین شود (Salehin *et al.*, 2015).

اثر متقابل معنی‌دار NAA و ریزنمونه در سطح یک درصد و BAP و ریزنمونه در سطح پنج درصد نشان داد که پاسخ ریزنمونه‌های برگ و ریشه به غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد متفاوت است. این یافته با مطالعات قبلی که نشان داده‌اند بافت‌های مختلف گیاهی حساسیت متفاوتی به هورمون‌های خارجی دارند، مطابقت دارد (Ikeuchi *et al.*, 2019). برای نمونه، در مطالعه‌ای بر روی *Arabidopsis*، نشان داده شد که بافت‌های برگ و ریشه از نظر بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به اکسین تفاوت‌های قابل توجهی دارند (Xu *et al.*, 2018).

اگرچه اثر اصلی اکوتیپ در تجزیه واریانس معنی‌دار نبود، اما مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اکوتیپ‌ها در پاسخ به تیمارهای مختلف تفاوت‌هایی دارند. اکوتیپ زنجان بالاترین وزن تر کالوس را تولید کرد، در حالی که اکوتیپ گیلان کمترین پاسخ را نشان داد. این تفاوت‌ها می‌توانند ناشی از تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها در ژن‌های مرتبط با سیگنالینگ هورمونی، متابولیسم و پاسخ به تنش (استرس) باشد. عدم تشکیل کالوس و کالوس‌های ضعیف در این گیاه در تیمار شاهد نشان می‌دهد که این گیاه برای کالوس‌زایی به حضور تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی وابستگی بیشتری دارد. این ممکن است به دلیل سطوح پایین‌تر هورمون‌های درون‌زا یا حساسیت کمتر به هورمون‌های درون‌زا در این اکوتیپ باشد. مطالعات نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی در بیان ژن‌های بیوسنتز و سیگنالینگ هورمونی می‌تواند منجر به تفاوت‌های قابل توجهی در پاسخ به کشت بافت شود (Fehér, 2015).

اثر متقابل سه جانبه معنی‌دار NAA، ریزنمونه و اکوتیپ در سطح پنج درصد نشان داد که پاسخ ریزنمونه‌های برگ و ریشه به غلظت‌های مختلف NAA در سه اکوتیپ متفاوت است. این پیچیدگی نشان‌دهنده تعامل پیچیده بین اکوتیپ، نوع بافت و محیط هورمونی در تعیین پاسخ کالوس‌زایی است. مطالعات اخیر با استفاده از رویکردهای ژنومیکی و ترانسکریپتومیکی نشان داده‌اند که پاسخ به کالوس‌زایی تحت کنترل شبکه‌های پیچیده‌ای از ژن‌ها قرار دارد که به‌صورت بافت–خاص و ژنوتیپ–خاص بیان می‌شوند (Ikeuchi *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2018).

تغییرات رنگ کالوس در تیمارهای مختلف اطلاعات مهمی درباره وضعیت فیزیولوژیکی و متابولیکی بافت ارائه می‌دهد. کالوس‌های سبز رنگ که در تیمارهای فاقد NAA یا حاوی غلظت‌های پایین NAA مشاهده شدند، نشان‌دهنده حفظ کلروپلاست‌ها و شاید فعالیت فتوسنتزی باشد. این کالوس‌ها معمولاً از سلول‌های پارانشیمی برگ که هنوز تمایز خود را حفظ کرده‌اند، منشأ می‌گیرند (Ikeuchi *et al.*, 2016). کالوس‌های

سفید و برفی که در تیمارهای حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شدند، نشان‌دهنده تمایززدایی کامل سلول‌ها و از دست دادن کلروفیل هستند. این نوع کالوس‌ها معمولاً از سلول‌های مریستمی با پتانسیل تقسیم بالا تشکیل می‌شوند و برای مراحل بعدی باززایی گیاه مناسب‌تر هستند (Fehér, 2015). مطالعات نشان داده‌اند که کالوس‌های سفید معمولاً بیان بالاتری از ژن‌های مرتبط با پلوری‌پتانسی مانند WUS و CLV دارند (Ikeuchi *et al.*, 2016).

کالوس‌های قهوه‌ای رنگ که در تیمارهای حاوی غلظت‌های بالای NAA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شدند، نشان‌دهنده اکسیداسیون فنلی و احتمالاً استرس اکسیداتیو هستند. تجمع ترکیبات فنلی و اکسیداسیون آنها توسط آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز می‌تواند منجر به قهوه‌ای شدن بافت و در نهایت مرگ سلولی شود. این پدیده معمولاً در پاسخ به استرس‌های محیطی یا غلظت‌های نامتعادل هورمونی رخ می‌دهد (Azizi *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای بر روی گونه‌های دارویی خانواده *Boraginaceae*، گزارش شد که کالوس‌های قهوه‌ای رنگ معمولاً پتانسیل باززایی کمتری دارند (Azizi *et al.*, 2015).

نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی بر روی *E. amoenum* و گونه‌های مرتبط مطابقت دارد. Arastegi و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین تیمار برای کالوس‌زایی در *E. amoenum* است، که با یافته‌های این مطالعه کاملاً مطابقت دارد. همچنین، آنان نشان دادند که ریزنمونه‌های برگ پاسخ بهتری نسبت به ریزنمونه‌های ریشه دارند، که با نتایج ما همخوانی دارد. در مطالعه‌ای بر روی *Echium vulgare*، Azizi و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که غلظت‌های بالای NAA (بیش از ۲ میلی‌گرم در لیتر) منجر به کاهش وزن کالوس و افزایش قهوه‌ای شدن بافت می‌شود، که با مشاهدات ما در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مطابقت دارد. آنان همچنین گزارش کردند که تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مختلف می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر پاسخ کالوس‌زایی داشته باشد.

نتایج این مطالعه پایه‌ای برای توسعه شیوه‌نامه‌های کارآمد کشت بافت و باززایی گیاه در *E. amoenum* را فراهم می‌کند. کالوس‌های تولیدشده می‌توانند برای تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی مانند رزمارینیک اسید و آنتوسیانین‌ها استفاده شوند (Arastegi *et al.*, 2023). همچنین، این کالوس‌ها می‌توانند به‌عنوان مواد اولیه برای باززایی گیاه، تولید انبوه گیاهچه‌های یکنواخت و حفاظت ژرم‌پلاسم استفاده گردند. تنوع اکوتیپی مشاهده شده در این مطالعه نشان می‌دهد که انتخاب اکوتیپ مناسب می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر کارایی کشت بافت داشته باشد. اکوتیپ زنجان با بالاترین پتانسیل کالوس‌زایی، انتخاب مناسبی برای مطالعات بیوتکنولوژیکی آینده است. مطالعات آینده می‌توانند بر روی شناسایی مارکرهای مولکولی مرتبط با پاسخ بالای کالوس‌زایی در این اکوتیپ متمرکز شوند.

برای بهینه‌سازی بیشتر شیوه‌نامه کالوس‌زایی، مطالعات آینده می‌توانند اثر سایر تنظیم‌کننده‌های رشد مانند 2-4-D، TDZ و کینتین را بررسی کنند. همچنین، بررسی اثر عوامل فیزیکی مانند نور، دما و pH محیط کشت می‌تواند به بهبود کارایی کالوس‌زایی کمک کند. استفاده از رویکردهای مولکولی مانند آنالیز بیان ژن، پروفایل هورمونی و متابولومیکس می‌تواند درک عمیق‌تری از سازوکارهای مولکولی کالوس‌زایی در *E. amoenum* را فراهم کند.

References

Arastegi, H., Ghaffarzadeh Namazi, L., Maleki, H., Asghari-Zakaria, R., Bourang, S. (2023). Evaluation of the effect of different types and concentrations of growth regulators on callus production in in vitro cultivation of *Echium amoenum*, *Journal of Developmental Biology*, 14(4), 51-56. (In Persian). magiran.com/p2520187

Azizi, P., Rafii, M. Y., Maziah, M., Abdullah, S. N. A., Hanafi, M. M., Latif, M. A., Rashid, A. A. & Sahebi, M. 2015. Understanding the shoot apical meristem regulation: A study of the phytohormones, auxin and cytokinin, in rice. *Mechanisms of Development*, *135*, 1-15. 10.1016/j.mod.2014.11.001.

Bogdanović, M. D., & Ćuković, K. B. 2025. Secondary somatic embryogenesis in plants: From cellular mechanisms to biotechnological potential. *Plants*, *14*(22), 3413. DOI:10.3390/plants14223413

Chacón, J., Luebert, F., Hilger, H. H., Ovchinnikova, S., Selvi, F., Cecchi, L., Matt Guilliams, C., Hasenstab-Lehman, K., Karel Sutorý, K., Michael G. Simpson,

MG., Maximilian Weigend, M. 2016. The borage family (Boraginaceae. str.): A revised infrafamilial classification based on new phylogenetic evidence, with emphasis on the placement of some enigmatic genera. *Taxon*, *65*(3), 523-546. DOI:10.12705/653.6.

Cinbilgel, I. 2022. Morphology and ecology of Anchusa limbata (Boraginaceae)–native to Antalya (Turkey). *Pak. J. Bot*, *54*(4), 1433-1444. http://dx.doi.org/10.30848/PJB2022-4(6)

Davodi, F., Azimi Moghadam, M., & Amarloo, A. 2025. A review of the history of biotechnology with a focus on bioactive medicinal compounds in the medicinal plant *Echium amoenum* Fisch. & CA Mey, Persian borage. *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*, *11*(1), 245-261. doi.org/10.30470/jmpb.2025.729210.

Faisal, M., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A. A., & Qahtan, A. A. 2018. Auxin-cytokinin synergism in vitro for producing genetically stable plants *of Ruta graveolens* using shoot tip meristems. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 273-277. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.09.009.

Fehér, A. 2015. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1849*(4), 385-402. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2014.07.005.

Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K. 2019. Molecular mechanisms of plant regeneration. Annual Review of Plant Biology, 70, 377–406.DOI:10.1146/annurev-arplant-050718-100434.

Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. 2016. Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. Development, 143(9), 1442–1451.DOI:10.1242/dev.134668.

Khandanizadeh, B., Alizadeh, A., Aien, A., Mohammadinejad, G., & Ebrahimi, F. 2025. Evaluation of genetic diversity and population structure of Iranian native henna ecotypes using ISSR molecular markers and phenotypic traits. *Agricultural Biotechnology Journal*, *17*(1), 27-44. doi.org/10.22103/jab.2024.23528.1573.

Jin, J., Boersch, M., Nagarajan, A., Davey, A. K., & Zunk, M. 2020. Antioxidant properties and reported ethnomedicinal use of the genus Echium (Boraginaceae). *Antioxidants*, *9*(8), 722.10.3390/antiox9080722.

Kieber, J. J., & Schaller, G. E. 2018. Cytokinin signaling in plant development. Development, 145(4), dev149344. DOI:10.1242/dev.149344.

Asghari, B., Mafakheri, S., Zarrabi, M. M., Erdem, S. A., Orhan, I. E., & Bahadori, M. B. 2019. Therapeutic target enzymes, inhibitory potential, antioxidant activity, and rosmarinic acid content of *Echium amoenum*. *South African Journal of Botany*, *120*, 191-197. doi.org/10.1016/j.sajb.2018.05.017.

Mehrabani, M., Ghassemi, N., Ghannadi, E. S. A., & Shams-Ardakani, M. 2005. Main phenolic compound of petals of Echium amoenum Fisch. and CA Mey., a famous medicinal plant of Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, *13*(2), 65-69.

Moubayidin, L., Di Mambro, R., & Sabatini, S. 2009. Cytokinin–auxin crosstalk. Trends in Plant Science, 14(10), 557–562. doi.org/10.1016/j.tplants.2009.06.010.

Rahman, W., Zohora, S., Talukder, A. I., & Kayess, O. 2015. Effect of different hormone combinations on callus induction and plant regeneration of strawberry. *International Journal of Advanced Research*, *3*(6), 1244-1250. ISSN 2320-5407.

Salehin, M., Bagchi, R., & Estelle, M. 2015. SCF/TIR1/AFB-based auxin perception: Mechanism and role in plant growth and development. *The Plant Cell*, *27*(1), 9–19. 10.1105/tpc. 114.133744.

Schaller, G. E., Bishopp, A., & Kieber, J. J. 2015. The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. The Plant Cell, 27(1), 44–63. 10.1105/tpc. 114.133595.

Skoog, F., & Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology, 11, 118–131.

Wang, T., Zhang, C., Zhang, H., & Zhu, H. 2021. CRISPR/Cas9-mediated gene editing revolutionizes the improvement of horticultural food crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(45), 13260-13269. 10.1021/acs.jafc.1c00104.

Weigend, M., Gottschling, M., Selvi, F., & Hilger, H. H. 2010. Fossil and extant western hemisphere borageineae, and the polyphyly of "Trigonotideae" Riedl (Boraginaceae: Boraginoideae), 35 (2), 409-419. 10.1600/036364410791638423.

Wybouw, B., & De Rybel, B. 2019. Cytokinin—A developing story. Trends in Plant Science, 24(2), 177–185.10.1016/j.tplants.2018.10.012.

Xu, C., Cao, H., Zhang, Q., Wang, H., Xin, W., Xu, E., Zhang, S., Yu, R., Yu, D., Hu, Y. 2018. Control of auxin-induced callus formation by bZIP59–LBD complex in Arabidopsis regeneration. Nature Plants, 4(2), 108–115. 10.1038/s41477-017-0095-4.