**Journal of Saffron Research (semi-annual)**

**Vol. 12, No. 2, Fall & Winter, 2024-2025**

**p. 193- 207**

*http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2025.8420.1245*

**University of Birjand**

**Original Article**

# Effect of Some Hormones and Carbon Nanotube Concentrations on Optimizing Saffron Callus Formation

**Mahsa Fazel[1*], Mohammad Armin[2]**

1- PhD in Plant Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

2- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

*Corresponding author: *mfazel30@yahoo.com*

Received 14 November 2024; Accepted 20 January 2025

## Extended Abstract

**Introduction:** Saffron, a member of the lily family, is highly valued for its low water requirements, potential for job creation, and medicinal properties. Despite the high costs associated with traditional saffron cultivation, the use of tissue culture is recommended to enhance cultivation practices and produce disease-free seedlings. In vitro cultivation can significantly boost the production rate of new seedlings, with success largely dependent on the hormonal composition used. Additionally, carbon nanotubes, which have various applications in biology, have demonstrated a positive impact on plant growth. This study employs the response surface methodology (RSM) to optimize the saffron culture medium with carbon nanotubes and to identify the appropriate hormonal composition.

**Materials and Methods:** This research was conducted using in vitro culture techniques and a RSM design, comprising four replications. The factors investigated included concentrations of 2,4-D (0.2-0.5 mg/L), BAP (1.5-6 mg/L), and multi-walled carbon nanotubes (30-70 µg/mL). The culture medium and equipment were sterilized in an autoclave at 120°C and 1.5 atmospheres. Pedicel shells were removed, washed, and then immersed in Vitex solution for 30 minutes. The explants were placed in culture dishes and maintained under controlled light and temperature conditions. After five weeks, callus induction characteristics, such as callus induction percentage, diameter, and fresh weight, were measured. The Box-Benken statistical design was utilized for data analysis, and necessary transformations were applied based on software recommendations. A quadratic function was generally selected for the fitted model, even in cases of non-significance, and response surface curves along with contour diagrams were used to interpret the interaction effects of the traits. Tissue culture optimization aimed at maximizing callus formation, fresh weight, and diameter, with the highest model fitness identified as the optimal environment

**Results and Discussion:** The study's findings indicated that the concentrations of nanocarbon and 2,4-D significantly affected the number of calluses produced. At lower concentrations of 2,4-D, increasing BAP resulted in a higher number of calluses, while at higher concentrations, this effect remained positive. The maximum number of calluses was achieved with specific combinations of 2,4-D and BAP concentrations. High levels of BAP and carbon nanotubes increased the callus production percentage to 174%, whereas at lower concentrations, it was below 85%. The ratios exhibited a saddle function, with the highest number of calluses observed at low concentrations of 2,4-D and nanocarbon. Additionally, the linear effects of 2,4-D and carbon nanotube concentrations were significant at the 1% level, while the effect of BAP was not significant. Elevated concentrations of 2,4-D negatively impacted callus diameter, whereas increasing nanocarbon at high concentrations contributed to an increase in diameter. Ultimately, raising the concentration of 2,4-D led to an increase in callus induction percentage from 79.68% to 92.185%, although high concentrations had a detrimental effect. The highest callus induction percentage was noted with a specific combination of 2,4-D and carbon nanotubes.

**Conclusion:** The experimental results demonstrated that carbon nanotubes and the hormones BAP and 2,4-D significantly influenced saffron callus induction. High concentrations of 2,4-D exhibited the most substantial effect on the number of calluses produced. Furthermore, the application of BAP hormone up to a certain concentration increased callus number, but higher concentrations resulted in a decrease. Finally, the percentage of callus induction was positively affected by carbon nanotubes, while other characteristics did not show significant effects.

**Conflict of Interest:** The authors declare no potential conflict of interest related to the work.

**Keywords:** Response surface methodology, Optimization, Tissue culture, Carbon nanotubes.

نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد دوازدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۳
شماره صفحه: ۲۰۷ - ۱۹۳
http://dx.doi.org/10.22077/jsr.2025.8420.1245

**مقاله پژوهشی**

# تاثیر برخی هورمون‌ها و غلظت‌های نانولوله کربنی در بهینه‌سازی کالوس‌زایی زعفران

**مهسا فاضل[1*]، محمد آرمین[2]**

۱- دانش آموخته دکتری ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران.

*. نویسنده مسئول: Email: *mfazel30@yahoo.com*

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۱**

## چکیده

**به منظور بهینه‌سازی کالوس‌زایی زعفران در غلظت‌های مختلف هورمونی در شرایط حضور نانولوله‌های کربنی، آزمایشی در قالب روش‌شناسی سطح پاسخ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار انجام شد. صفات مورد بررسی شامل تعداد کالوس، قطر کالوس، وزن کالوس، درصد القا کالوس و فاکتورها شامل غلظت‌های هورمون 2-4-D (۰/۵ -۲ میلی‌گرم در لیتر)، BAP (۰- ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت‌های نانولوله کربنی چند جداره (۰-۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در این آزمایش بودند. نتایج برازش مدل رگرسیونی نشان داد که تابع درجه دو برازش مناسبی برای تعداد کالوس، قطر کالوس، وزن تر کالوس و درصد کالوس‌زایی بود. بیشترین درصد کالوس‌زایی در غلظت ۰/۵ میلی مولار 2-4-D و ۲۵میلی‌گرم نانولوله کربنی مشاهده شد. در غلظت‌های پایین 2-4-D، افزایش مقدار نانولوله کربنی سبب کاهش درصد القاء کالوس اما در غلظت‌های بالای 2-4-D سبب افزایش درصد القاء کالوس شد. تغیرات تعداد، وزن و قطر کالوس در برابر غلظت‌های مختلف 2-4-D و BAP تقریبا مشابه بود، به نحوی که هم در غلظت‌های پایین و هم در غلظت‌های بالا افزایش غلظت BAP سبب افزایش صفات مورد بررسی شد. تعداد، وزن و قطر کالوس با افزایش غلظت نانولوله‌های کربنی در حضور BAP افزایش نشان داد. در مجموع نتایج بهینه‌سازی آزمایش نشان داد که بالاترین قطر کالوس( ۱۸/۸۱ میلی‌متر، وزن کالوس ۰/۲۶ میلی‌گرم و القاء (کالوس ۹۱/۹۲٪) در شرایط مصرف ۰/۵ میلی‌مولار 2-4-D ، ۱/۵ میلی‌مولار BAP، ۲۸/۹۴ میلی‌گرم نانولوله کربنی چند جداره مشاهده شد.**

**واژه‌های کلیدی: روش‌شناسی سطح پاسخ، بهینه‌سازی، کشت بافت، نانولوله‌های کربنی.**

**مقدمه**

زعفران گیاهی است چند ساله، از خانواده زنبقیان و تک لپه‌ای با نام علمی (*Crocus sativus* L.) که تکثیر آن از طریق پیاز که بنه نامیده می‌شود، انجام می‌گیرد. زعفران به خاطر نیاز آبی کم، اشتغال‌زایی بالا، درآمدزایی مناسب، ارزآوری خوب، تحمل شرایط سخت زیستی در برابر گرما و سرما و بیماری‌ها و آفات، خواص دارویی و غذایی، از دیرباز یک محصول با ارزش بوده است (Moradi et al., 2024). روش‌های کشت مزرعه‌ای زعفران هزینه بالایی در بر دارد. هر گونه فعالیت برای بهبود زراعت زعفران نیاز به تولید انبوه بنه‌های عاری از عوامل بیماری‌زا می‌باشد که کاربرد روش‌های کشت بافت برای این هدف می تواند بسیار سودمند باشد (Izanloo et al., 2019). این گیاه دارای ارزش تجاری بالایی است که افزایش سریع درون‌شیشه‌ای[1] آن را توجیه می‌کند زیرا سرعت تولید مثل طبیعی بنه‌های جدید با روش‌های متداول خیلی کند می‌باشد و روش‌های کشت درون شیشه‌ای می‌تواند به طور قابل توجهی تولید بنه‌های جدید را در مدت زمان کوتاهی سرعت بخشد.

موفقیت در کشت بافت زعفران به عوامل متعددی به خصوص ترکیب هورمونی محیط کشت دارد. سجادی‌فرد و پژوهنده (۲۰۱۵) گزارش کردند در بین انواع ریز نمونه‌ها تنها ریز نمونه‌های بنه نسبت به کالوس‌زایی در محیط MS حاوی هورمون‌های IBA (1 mg/l) و BAP (2 mg/l) هم در شرایط تاریکی و هم در شرایط سرما پاسخ مناسبی دادند. همچنین بالاترین درصد باززایی در محیط MS با ترکیب هورمونی TDZ (0.3 mg/l)، BAP (1 mg/l)، IBA (2 mg/l) و$GA_3$ (0.01 mg/l) و در شرایط سرما بدست آمد. دینگ و همکاران (Ding et al., 1979) برای اولین بار موفق به کشت بافت زعفران با استفاده از هورمون‌های IAA و 2-4-D و ریز نمونه‌های بنه شدند. پس از آن بنه‌های کوچک و باززایی با استفاده از هورمون 2-4-D (Homes et al., 1987)، تولید کالوس از طریق بنه با استفاده از هورمون 2-4-D (Ilahi et al.,1987)، توسعه شاخسار از طریق بنه با استفاده از هورمون‌های سیتوکینینی و 2-4-D (Plessner et al., 1990)، تولید بهینه کالوس از طریق ریزنمونه گل و تخمدان (Choob et al., 1994)، تولید کالوس از طریق بنه در شرایط ۱۰ درجه سانتی‌گراد، باززایی مستقیم از طریق تخمدان با استفاده از هورمون NAA و BA ابتدا در شرایط تاریکی مداوم و سپس روشنایی (Bhagyalakshmi et al. ,1999)، تولید کالوس از طریق برگ با استفاده از هورمون BA و 2-4-D (Raja et al.,2007) و مطالعه بر روی منشأ القا کالوس با استفاده از هورمون‌های NAA و BAP (Sharifi et al., 2010) گزارشات موفقیت آمیزی بوده‌اند که تاکنون گزارش شده‌اند.

نانولوله‌های کربنی (*Carbon NanoTubes: CNTs*) دارای خواص ویژه ای از جمله هدایت الکتریکی و استحکام کششی بالا است و از طرفی به خاطر خواص کربنی CNTs، کاربردهای فراوانی در علوم مختلف از جمله در زیست شناسی کسب کرده‌اند. از خواص قابل ذکر و مهم CNTs در علوم زیستی می‌توان به قابلیت منحصر به فرد این نانو لوله‌ها در افزایش نفوذ پذیری غشاء سلولی برای انتقال مولکول‌های زیستی اشاره کرد. در ارزیابی اثر نانولوله‌های کربنی بر توتون و تنباکو معلوم شد که نانولوله‌های کربنی بر درصد جوانه زنی و رشد گیاه موثر می‌باشند بطوریکه استفاده از غلظت‌های ۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانولوله‌های کربنی در کشت سلول‌های توتون و تنباکو باعث افزایش ۶۵-۵۵ درصدی رشد سلول‌ها نسبت به شاهد شد (Khodakovaskaya et al., 2012). نانولوله‌های کربنی چند جداره فنوتیپ گیاه گوجه‌فرنگی را تحت تاثیر قرار می‌دهند، زیرا گیاهان کشت شده در خاک ترکیب‌شده با نانولوله‌ها در مقایسه با گیاهان کشت شده در خاک عاری از نانولوله‌های کربنی چند جداره تولید گل و میوه دوبرابر داشتند (Khodakovaskaya et al., 2013). بررسی تاثیر نانولوله‌های کربنی چند جداره در سرعت جوانه زنی و رشد نهال گیاه گوجه‌فرنگی نشان داد که حداکثر سرعت جوانه زنی و رشد گیاهچه در ۴۰ میکروگرم/میلی‌لیتر غلظت نانولوله‌های کربنی می‌باشد (Morla et al., 2011). در تحقیقی دیگر بیان شد که نانولوله‌های کربنی می‌توانند در پوسته بذر گیاه

[1] In vitro

گوجه‌فرنگی نفوذ کنند و بطور چشمگیری روی جوانه زنی و رشد گیاه موثر می‌باشند. در این تحقیق مشخص شد که غلظت‌های ۱۰ تا ۴۰ میکروگرم نانولوله‌های کربنی می‌تواند بطور فزاینده‌ای روی جوانه زنی بذر گوجه‌فرنگی و رشد گیاه موثر باشد. همچنین در این تحقیق معلوم شد که نانولوله‌های کربنی با نفوذ در پوسته بذر به جذب آب در داخل بذر کمک می‌کنند و در نهایت روی جوانه زنی و رشد جوانه گیاه گوجه‌فرنگی اثر می‌گذارند (Ghodake et al., 2010). در تحقیقی دیگر اثرات سمی نانولوله‌های کربنی چند جداره در رشد و جوانه‌زنی دو گونه گیاه زراعی خردل و باقلا مورد ارزیابی قرار گرفت. در در هر دو گیاه ۱۰۰٪ جوانه‌زنی با استفاده از نانولوله‌ها مشاهده شد و نانولوله‌ها ماهیت غیر خطرناک خود را برای جوانه‌زنی بذر نشان دادند (Ghodake et al., 2010).

روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از فن‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرآیندهایی به کار می‌رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. شمای گرافیکی مدل ریاضی سبب تعریف واژه روش سطح پاسخ شده است. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها، قابل برآورد می‌باشد. از انجا که تاکنون در مورد بهینه‌سازی محیط کشت زعفران و اثر نانولوله‌های کربنی چندر جداره بر کشت بافت زعفران مطالعه‌ای صورت نگرفته است، لذا این بررسی به منظور تعیین مناسب‌ترین ترکیب هورمونی در کشت بافت زعفران با استفاده از فن سطح پاسخ انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

آزمایش به روش کشت درون‌شیشه‌ای در قالب روش سطح پاسخ با ۴ تکرار اجرا گردید. غلظت‌های هورمون 2-4-D (۰/۵ -۲ میلی‌گرم در لیتر)، BAP (۱/۵-۶/۵ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت‌های نانولوله کربنی چند جداره (۷۰-۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) فاکتورهای مورد بررسی در آزمایش بودند.

برای کشت، پوسته‌های اطراف بنه‌ها جدا شده و سپس به چهار قسمت تقسیم و برای ۵ دقیقه در ظرفی که حاوی ۵ قطره مایع ظرفشویی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب بود، قرار داده شدند. پس از آن ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری شسته شدند. سپس قطعه‌های بنه به مدت ۳۰ دقیقه در وایتکس ۳۰٪ (محلول تجاری آن دارای ۵/۲۵ درصد هیپوکلریت سدیم است) با ۰/۲٪ مایع ظرفشویی (به عنوان مویان) قرار گرفتند و سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. پس از سترون سطحی و شستشو، ریزنمونه‌های اولیه که حدود یک چهارم اندازه بنه بودند، در شرایط سترون به ظروف کشت منتقل شدند. نمونه‌های کشت شده در طول روز ۱۶ ساعت با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس با استفاده از لامپ فلورسنت خنک قرار گرفتند. میانگین دما در دوران آزمایش‌ها ۳±۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. پنج هفته پس از قرارگیری نمونه‌ها در اتاق رشد نمونه‌ها از اتاق خارج گردید و خصوصیات کالوس‌زایی آنها نظیر درصد القاء کالوس، قطر کالوس و وزن تر کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت.

مدل مورد استفاده در روش سطح پاسخ عموماً رابطه درجه دوم می‌باشد (Manouchehri et al., 2021). در روش سطح پاسخ برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید (رابطه ۱). در معادله یاد شده، Y پاسخ پیش بینی شده، $\beta_0$ ضریب ثابت، $\beta_1$ ، $\beta_2$، $\beta_3$ ($\beta_i$)ضرایب خطی، $\beta_{11}$، $\beta_{22}$، $\beta_{33}$ ($\beta_{ii}$) اثرات مربعی و $\beta_{12}$، $\beta_{13}$ و $\beta_{23}$ ($\beta_{ij}$) اثرات متقابل می‌باشد. در این تحقیق متغیرهای مستقل سطوح مختلف هورمون‌ها و متغیرهای وابسته کالوس‌ها می‌باشند.

رابطه ۱

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i}^{k-1} \sum_{j}^{k} \beta_{ij} X_i X_j$$

طرح آماری مورد استفاده باکس بنکن[1] بود (Ahmadian et al., 2016). برای کلیه صفات اندازه‌گیری شده، تبدیل لازم بر اساس توصیه نرم‌افزار

[1] Box Benken

صورت گرفت که در این بررسی برای تعداد کالوس و درصد القا کالوس از تبدیل جذری استفاده شد. در این روش تابع برازش داده شده مناسب تابعی است که فقدان برازش آن معنی‌دار نشده باشد. اگرچه ساده‌ترین تابع مناسب‌ترین تابع در نظر گرفته می‌شود اما در این بررسی برای کلیه صفات مورد بررسی چه در صورت معنی‌دار بودن چه در صورت معنی‌دار نبودن فقدان برازش، تابع درجه دو برازش داده شد. از منحنی سطح پاسخ به همراه نمودار کانتور برای تفسیر اثرات متقابل صفات مورد بررسی استفاده شد.

جهت بهینه‌سازی کشت بافت، بهینه‌سازی با فرض حداکثر کالوس‌زایی، حداکثر وزن تر کالوس و قطر کالوس انجام شد و بالاترین مطلوبیت مدل به عنوان محیط بهینه مورد استفاده قرار گرفت. جهت انجام تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت[1] استفاده شد.

**جدول ۱. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات صفات مورد بررسی**

**Table 1. Sources of variation, degrees of freedom and mean squares of the studied traits**

| منابع تغییر | درجه آزادی | تعداد کالوس | قطر کالوس | وزن کالوس | درصد القا کالوس |
|---|---|---|---|---|---|
| S.O. V | df | Number of calluses | Diameter of callus | Weight of callus | Percentage of callus induction |
| مدل | ۹ | ۱/۲۹$^{ns}$ | ۳۷/۰۶$^{*}$ | ۰/۰۳۵$^{*}$ | ۳۳۰۳$^{ns}$ |
| 2-4-D (A) | ۱ | ۲/۵۳$^{ns}$ | ۱۰۳/۳۲$^{**}$ | ۰/۰۴۶$^{ns}$ | ۶۳۲۸$^{ns}$ |
| BAP(B) | ۱ | ۰/۱۲$^{ns}$ | ۴۱/۶۳$^{ns}$ | ۰/۰۷۹$^{*}$ | ۳۱۲$^{ns}$ |
| نانو لوله (C) | ۱ | ۳/۷۸$^{*}$ | ۱۰۵/۱۳$^{**}$ | ۰/۰۲۶$^{ns}$ | ۹۴۵۳$^{*}$ |
| AB | ۱ | ۰/۰۶۳$^{ns}$ | ۳/۰۶$^{ns}$ | ۰/۰۵۰$^{ns}$ | ۱۵۶$^{ns}$ |
| AC | ۱ | ۲/۲۵$^{ns}$ | ۱۹/۱۴$^{ns}$ | ۰/۰۳۲$^{ns}$ | ۵۶۲۵$^{ns}$ |
| BC | ۱ | ۰/۰۶۳$^{ns}$ | ۱۷/۰۲$^{ns}$ | ۹/۳۷$^{ns}$ | ۱۵۶$^{ns}$ |
| $A^2$ | ۱ | ۰/۱۷$^{ns}$ | ۱۳/۰۸$^{ns}$ | ۶/۱۲$^{ns}$ | ۲۳۶$^{ns}$ |
| $B^2$ | ۱ | ۰/۰۲۴$^{ns}$ | ۰/۲۴$^{ns}$ | ۶/۲۲$^{ns}$ | ۶/۵۸$^{ns}$ |
| $C^2$ | ۱ | ۲/۶۹$^{*}$ | ۳۳/۰۱$^{ns}$ | ۰/۰۶۴$^{*}$ | ۷۰۶۵$^{*}$ |
| خطا | ۵۸ | ۰/۶۹ | ۱۶/۳۴ | ۰/۰۱۷ | ۱۷۵۰ |
| فقدان برازش | ۳ | ۱/۰۲$^{ns}$ | ۱۶/۹۱$^{ns}$ | ۰/۰۱۹ | ۲۵۵۲$^{ns}$ |
| خطای خالص | ۵۵ | ۰/۶۸ | ۱۶/۳۱ | ۰/۰۱۷ | ۱۷۰۶ |
| ضریب تغییرات | - | ۸/۷۲ | ۸/۰۱ | ۱۳/۵ | ۱۰/۲۵ |

$^{*}$ و $^{**}$ به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی‌داری

* and ** are significant at 5 and 1% probability levels respectively. ns: non-significant.

[1] Design Expert

## نتایج و بحث

### تعداد کالوس

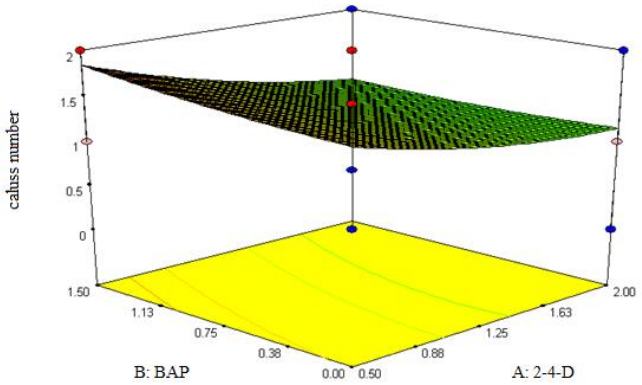
نتایج برازش مدل درجه دوم برای تعداد کالوس نشان داد که در بین متغیرهای مورد بررسی تنها اثر درجه اول غلظت نانوکربن معنی‌دار است. بعد از غلظت نانوکربن، 2-4-D بیشترین تاثیر را بر تعداد کالوس داشت. در بین اثرات متقابل نیز تنها اثر غلظت 2-4-D و غلظت نانوکربن بر تعداد کالوس معنی‌دار بود (جدول ۱).

در غلظت‌های بالای 2-4-D افزایش غلظت BAP تا سطح ۰/۷۳ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش تعداد کالوس شد و افزایش بیشتر غلظت BAP، کاهش تعداد کالوس را به همراه داشت در حالیکه در غلظت‌های پایین 2-4-D یک روند افزایشی در تعداد کالوس به همراه افزایش غلظت BAP مشاهده شد. بیشترین تعداد کالوس زمانی مشاهده شد که غلظت 2-4-D برابر با ۱/۱۱ میلی‌گرم در لیتر و غلظت BAP ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و کمترین تعداد کالوس نیز در غلظت ۱/۹۸ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D و غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود که در آن تولید کالوس به صفر رسید (شکل ۱).

اعتقاد بر این است که که بهترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای القاء کالوس در ریزنمونه‌ها و باززایی گیاهچه از کالوس برحسب نوع گونه گیاهی، نوع هورمون استفاده شده درمحیط کشت، مرحله نموی و سن گیاه مادری و نوع ریز نمونه متفاوت خواهد بود (Tang,. 2002). در تحقیق دیگری که برروی گیاه *E.gunni* انجام شده بیشترین میزان کالوس‌زایی در حضور ۰/۱ میلی‌گرم درلیتر TDZ و ۲ میلی‌گرم لیتر 2-4-D مشاهده گردید (Assareh,. 1998).

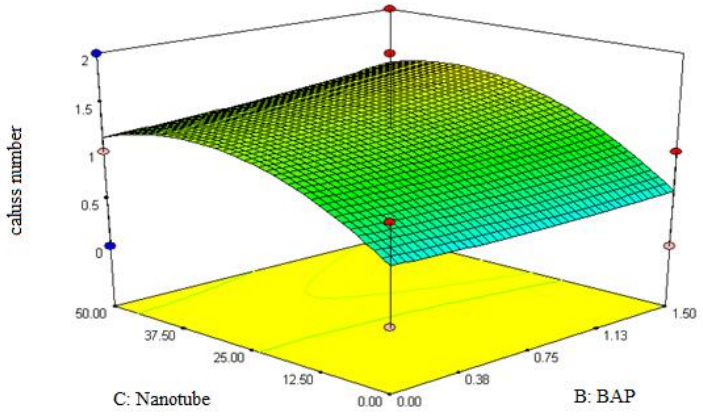
شکل (۲) روند تغییرات تعداد کالوس را در برابر غلظت BAP و نانولوله‌های کربنی نشان می‌دهد. هم در غلظت‌های پایین و هم در غلظت‌های بالای BAP، افزایش غلظت نانولوله‌های کربنی سبب افزایش تعداد کالوس شد. واکنش تعداد کالوس به غلظت نانولوله کربن و غلظت‌های بالای BAP نسبت به غلظت پایین بیشتر بود. درصد کالوس تولیدی در غلظت‌های بالای BAP و نانولوله‌های کربن ۱۷۴ درصد بود در حالیکه این نسبت برای غلظت پایین BAP و غلظت بالای نانولوله‌های کربنی تنها ۸۵ درصد مشاهده شد. در تحقیقی دریافتند بکار بردن هورمون BAP و 2-4-D برای باززایی اندام‌های زعفران در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای مساعد می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد کاربرد ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP و 2-4-D بر روی باززایی مستقیم موثر بود و بهترین ترکیب مشاهده شده در کاربرد غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر از 2-4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر از BAPبود (Simona et al,. 2013). همچنین در تحقیقی دیگر شریفی و همکاران (Sharifi et al,. 2010) اثرات ذرات نانو بر کالوس‌زایی گل راعی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که بین سطوح مختلف کاربرد نانو مواد و نوع ریز نمونه اثر معنی‌دار در سطح یک درصد از نظر کال زایی و زنده مانی کالوس وجود دارد. کاربرد نانواکسید روی با غلظت ۱۰۰ پی پی بی در محیط کشت، بیشترین اثر را بر میزان کال‌زایی و زنده‌مانی کالوس گل راعی داشت و کاربرد نانو اکسید آهن با غلظت ۱۰۰ پی پی بی کمترین و با غلظت ۷۵ پی پی بی بیشترین تأثیر را بر صفات مورد ارزیابی برای هر سه نوع ریز نمونه در پی داشت. در مجموع این نتایج نشان می‌دهد سطوح مختلف کاربرد هورمون‌ها اثر معنی‌داری برروی کال‌زایی دارد.

روند تغییرات تعداد کالوس در برابر غلظت‌های 2-4-D و نانولوله‌های کربن یک نمودار زین اسبی بود. در غلظت‌های پایین 2-4-D بالاترین تعداد کالوس (۱/۶۷ عدد) در غلظت ۲۳/۹۳ میکروگرم در میلی‌لیتر نانولوله کربن مشاهده شد در حالیکه در غلظت بالای 2-4-D بالاترین تعداد کالوس ( ۱/۴۵ عدد) در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانولوله کربن به دست آمد. در غلظت‌های پایین 2-4-D با افزایش غلظت نانولوله کربن شدت روند کاهشی از یک تابع درجه دو پیروی کرد در حالیکه در غلظت‌های بالا یک روند خطی با افزایش غلظت نانولوله کربن از نظر تعداد کالوس تولید شده مشاهده شد (شکل ۳). در بهینه سازی کالوس‌زایی گیاه پراونش گزارش شده است که بافت برگ با ۸۱ درصد کالوس‌زایی بیشترین، ریشه با۷۰ درصد و ساقه با ۳۴ درصد کالوس‌زایی در رتبه بعدی قرار دارد.



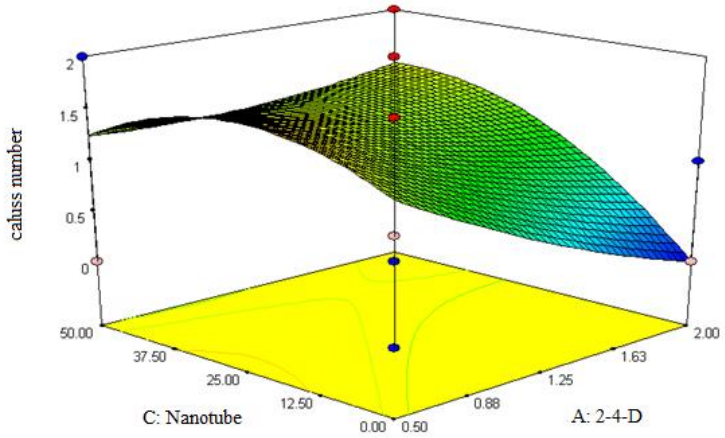

**شکل ۱. اثر متقابل 2-4-D و BAP بر تعداد کالوس**

**Fig 1. Interaction effect of 2-4-D and BAP on callus number**




**شکل ۲. اثر متقابل نانولوله کربنی و BAP بر تعداد کالوس**

**Fig 2. Interaction effect of carbon nanotubes and BAP on callus number**




**شکل ۳. اثر متقابل 2-4-D و نانولوله‌های کربنی بر تعداد کالوس**

**Fig 3. Interaction effect of 2-4-D and carbon nanotubes on callus number**

بین سه غلظت BAP (0.5-1-1.5 میلی‌گرم در لیتر) تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ وجود داشت که نشان از تاثیر غلظت‌های مختلف BAP بر کالوس‌زایی پروانش دارد. ولی بین دو غلظت 2-4-D (صفر و ۲ میلی‌گرم در لیتر) تفاوت معنی‌داری دیده نشد که دلالت بر عدم وابستگی صفت کالوس‌زایی بر این تنظیم کننده دارد (Ahmadi et al,. 2014). گوبیسا و همکاران (Gopitha et al,. 2010) دریافتند اثر غلظت‌های مختلف اکسین، سیتوکنین و هورمون 2-4-D بر کالوس‌زایی گیاه نیشکر موثر می‌باشد بطوریکه بهترین کالوس‌زایی در کاربرد غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D مشاهده شد. بیشترین باززایی نیز در کاربرد غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد. در تحقیقی دیگر قربانی و جامی (Ghorbani & Jami,. 2017) اثر نانو لوله‌های کربنی چند جداره را بر بازایی مستقیم و القا کالوس در ارقام مختلف سیب زمینی مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج حاصل از آن نشان داد که اثر نانو لوله‌های کربنی بر کلیه ویژگی‌های باززایی و کالوس‌زایی معنی‌دار شد.

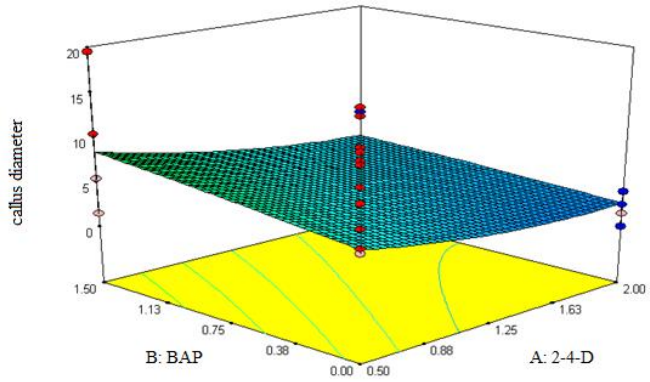
**قطر کالوس**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در بین اثرات مورد مطالعه اثر خطی غلظت 2-4-D و نانولوله‌های کربن در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بوده در حالیکه اثر خطی غلظت BAP معنی‌دار نبود اثرات متقابل هیچ کدام از فاکتورهای مورد مطالعه بر قطر کالوس معنی‌دار نشد (جدول ۱).

بر همکنش غلظت 2-4-D وBAP یک رابطه خطی برای قطر کالوس نشان داد بالاترین تعداد کالوس تولید شده در غلظت پایین 2-4-D و غلظت بالای BAP مشاهده شد. به عبارت دیگر غلظت‌های بالای 2-4-D اثرات بازدارنده بر قطر کالوس تولید شده است به نحوی که کمترین قطر کالوس تولید شده در بالاترین غلظت 2-4-D و کمترین غلظت BAP مشاهده شد ( شکل۴). اعتدالی و همکاران (Etedali et al,. 2004) اثر ژنوتیپ، محیط کشت و ریزنمونه بر القا و رشد کالوس کلزا در محیط‌های کشت حاوی هورمون و بدون هورمون را مورد ارزیابی قرار دادند. در این تحقیق درصد کالزایی، قطر کالوس، وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس و محتوی آبی کالوس‌ها اندازه‌گیری شدند. نتایج این تحقیق نشان داد در محیط‌های کشت حاوی هورمون، اثر ژنوتیپ، محیط کشت و ریزنمونه برای کلیه صفات در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود.

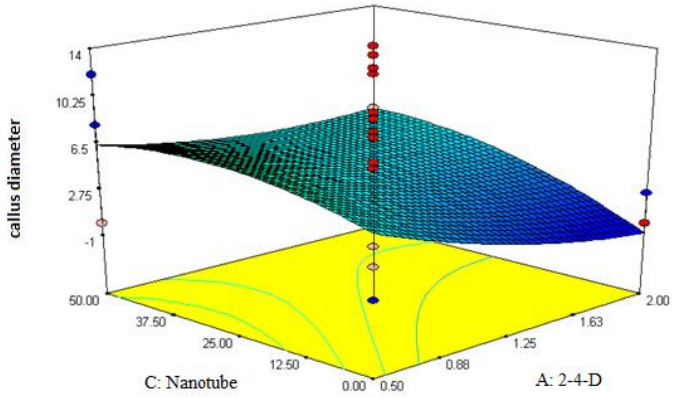
اثر متقابل 2-4-D و غلظت نانولوله‌های کربنی یک تابع زین اسبی بود (شکل۵). بالاترین قطر کالوس (۷/۱۶ میلی متر) در غلظت ۰/۵۱ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D و ۲۹/۳۸ میکروگرم در میلی‌لیتر نانولوله کربن مشاهده شد. اگرچه هم در غلظت‌های بالا و پایین 2-4-D افزایش غلظت نانولوله‌های کربن سبب افزایش قطر کالوس تولید شده گردید اما این میزان افزایش در غلظت‌های پایین 2-4-D در مقایسه با غلظت‌های بالا بیشتر بود. تدین و همکاران (Tadayon et al,. 2013) اثر نانولوله‌های کربنی چند جداره را بر شاخص‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک گیاه باقلا بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که واکنش گیاه باقلا نسبت به نوع و غلظت‌های مختلف نانولوله‌های کربنی متفاوت می‌باشد بطوریکه در کاربرد غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله واکنش مثبتی نشان داد. در پنیرباد گزارش شده است که تیمار حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانولوله کربنی و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D بیشترین میانگین قطر کالوس تولید شد در حالی که در شرایط عدم مصرف نانولوله‌های کربنی مصرف ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین قطر کالوس را در پنیرباد تولید کرد (Arbab et al,. 2014).

اثر متقابل BAP و غلظت نانولوله‌های کربن به صورت افزایشی بود به این معنی که بالاترین قطر کالوس در غلظت‌های بالای BAP و نانولوله‌های کربن مشاهده شد. در غلظت‌های پایین BAP افزایش غلظت نانولوله‌های کربن اثرات افزایشی چندانی بر قطر کالوس تولید شده نداشت در حالیکه در غلظت‌های بالای BAP با افزایش غلظت نانولوله‌های کربن، قطر کالوس تولید شده به صورت خطی افزایش پیدا کرد (شکل ۶). سایر مطالعات نشان داده است که نانولوله‌های کربنی سبب افزایش تقسیم سلولی و رشد سلول‌ها در گیاهان می‌گردد که این افزایش تقسیم سلولی موجب افزایش قطر کالوس خواهد شد (khodakoeskaya et al,. 2012).



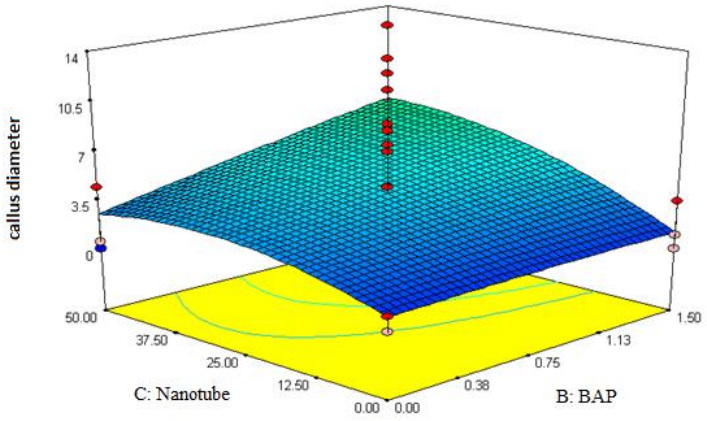

**شکل ۴. اثر متقابل 2-4-D و BAP بر قطر کالوس**

**Fig 4. Interaction effect of 2-4-D and BAP on callus diameter**




**شکل ۵. اثر متقابل 2-4-D و نانولوله‌های کربنی بر قطر کالوس**

**Fig 5. Interaction of 2-4-D and carbon nanotubes on callus diameter**




**شکل ۶. اثر متقابل نانولوله کربنی و BAP بر قطر کالوس**

**Fig 6. Interaction effect of carbon nanotubes and BAP on callus diameter**

**وزن تر کالوس**

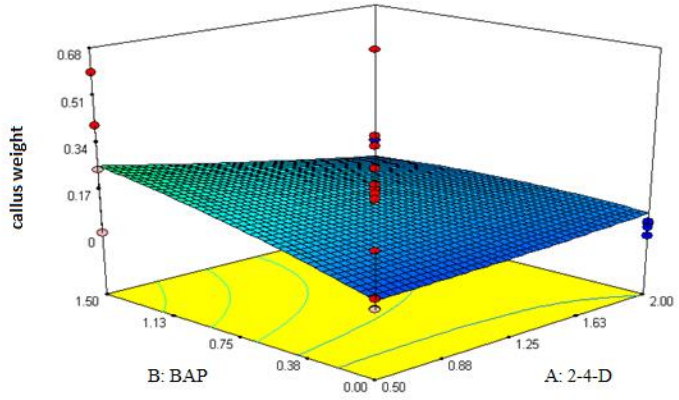
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در بین اثرات مورد بررسی اثر خطی غلظت 2-4-D و اثر درجه دو غلظت نانولوله‌های کربن اثر معنی‌داری بر وزن کالوس تولیدی داشت. سایر اثرات خطی، درجه دو اثر متقابل عوامل مورد بررسی اثر معنی‌داری بر وزن کالوس تولیدی نداشت (جدول ۱).

رابطه بین غلظت 2-4-D و BAP به صورت منفی بود. کمترین وزن کالوس تولیدی در بالاترین غلظت 2-4-D و کمترین غلظت BAP مشاهده شد. روند افزایشی وزن کالوس در حالت عدم حضور 2-4-D در مقایسه با حضور 2-4-D بسیار متفاوت بود. در غلظت پایین 2-4-D، افزایش BAP به صورت خطی سبب افزایش وزن کالوس شد در حالیکه در غلظت‌های بالای 2-4-D، افزایش BAP، ابتدا سبب افزایش وزن کالوس تولیدی شد اما با افزایش غلظت BAP، یک روند کاهشی در وزن کالوس تولیدی مشاهده شد (شکل ۷).

روند تغییرات وزن کالوس تولیدی در غلظت‌های 2-4-D و نانولوله‌های کربن از یک شکل خاصی تبعیت نکرد. در غلظت‌های پایین 2-4-D وزن کالوس واکنش مشخص‌تری به افزایش غلظت نانولوله‌های کربنی نشان داد. تا غلظت ۲۵/۰۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانولوله کربن، افزایش غلظت نانولوله کربنی سبب افزایش وزن کالوس تولیدی (۰/۱۷۳ میلی‌لیتر) شد. درحالیکه در غلظت بالای 2-4-D افزایش غلظت نانولوله‌های کربن به صورت خطی سبب افزایش وزن کالوس شد (شکل ۸). قربانی و جامی (Ghorbani & Jami,. 2017) اثر نانو لوله‌های کربنی بر دو رقم سیب زمینی را مورد بررسی قرار داد که بیشترین میانگین قطر و وزن تر کالوس در غلظت۱۰۰ گرم بر میلی‌لیتر نانولوله‌های کربنی مشاهده شد. اثرات منفی غلظت‌های بالای نانولوله‌های کربنی بر وزن ترکالوس در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (Ramandi et al,. 2022).

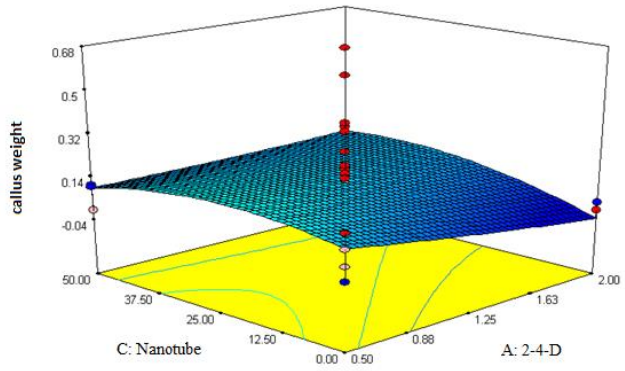
ایرانیان و همکاران (Iranian et al,. 2014) اثر اکسین‌ها بر درصد کالوس‌زایی و وزن خشک کالوس گیاه آلوورا را بررسی کردند. این آزمایش با هورمون‌های 2-4-D، NAA و Picloram، در محیط کشت MS انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون Picloram به ترتیب با ۰/۲ و ۰/۲۳گرم بیشترین وزن خشک و غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA با ۰/۰۵ گرم کمترین وزن خشک کالوس را تولید نمودند.

روند تغییرات وزن کالوس در غلظت‌های مختلف BAP و نانولوله‌های کربن برخلاف روند تغیرات وزن کالوس در غلظت‌های مختلف 2-4-D و نانولوله‌های کربن بود. به نحوی که بالاترین وزن کالوس تولید شده زمانی مشاهده شد که غلظت نانولوله‌های کربن و BAP در حداکثر مقدار خود بود. این افزایش در وزن ترکالوس تولیدی همبستگی مثبت با قطر کالوس تولید شده در غلظت‌های BAP و نانولوله‌های کربنی داشت. در غلظت‌های پایین BAP، افزایش غلظت نانولوله کربن تغیرات چندانی را بر وزن کالوس موجب شد در حالیکه در غلظت‌های بالای BAP، افزایش غلظت نانولوله کربن سبب افزایش خطی در وزن کالوس تولیدی شد (شکل ۹).



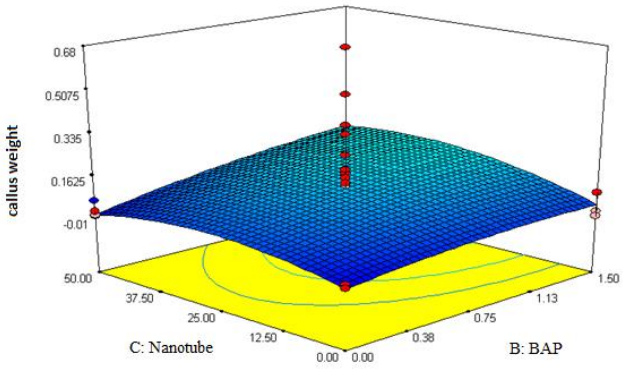

**شکل ۷. اثر متقابل 2-4-D و BAP بر وزن تر کالوس**

**Fig 7. Interaction effect of 2-4-D and BAP on callus fresh weight**




**شکل ۸. اثر متقابل 2-4-D و نانولوله‌های کربنی بر وزن تر کالوس**

**Fig 8. Interaction effect of 2-4-D and carbon nanotubes on callus fresh weight**




**شکل ۹. اثر متقابل نانولوله کربنی و BAP بر وزن تر کالوس**

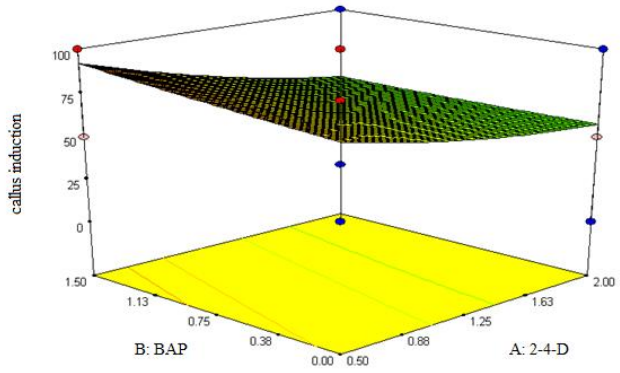
**Fig 9. Interaction effect of carbon nanotubes and BAP on callus fresh weight**

**درصد القاء کالوس**

درصد القاء کالوس تحت تاثیر اثر درجه اول و دوم غلظت نانولوله‌های کربن قرار گرفت و سایر اثرات خطی، درجه دو و اثر متقابل فاکتورهای مورد بررسی اثر معنی‌داری بر درصد القاء کالوس نداشت (جدول۱).

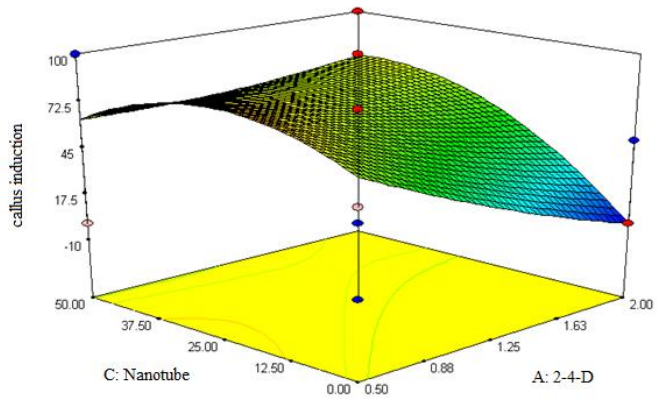
در غلظت پایین 2-4-D با افزایش غلظت 2-4-D درصد القاء کالوس از ۷۹/۶۸ درصد به ۹۲/۱۸۵ درصد افزایش پیدا کرد درحالیکه غلظت بالای 2-4-D اثر بازدارنده بر درصد القاء کالوس داشت. به نحوی که درصد القاء کالوس تقریبا هم در غلظت‌های بالا و پایین BAP یکسان و برابر ۵۷/۸۱ درصد بود (شکل۱۰). اکسین بطور متداول برای القای کالوس از ریزنمونه‌ها ضروری و لازم است.

تغییرات درصد القاء کالوس در برابر غلظت‌های 2-4-D و نانولوله‌های کربنی از یک منحنی زین اسبی پیروی کرد. بیشترین درصد القاء کالوس در غلظت ۰/۵ میلی‌لیتر 2-4-D و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نانولوله‌های کربن (۸۵/۰۸٪) مشاهده شد. در غلظت پایین 2-4-D تا سطح ۲۵ میلی‌گرم نانولوله‌های کربنی درصد القاء کالوس افزایش و سپس کاهش یافت در حالیکه در غلظت‌های بالای 2-4-D یک روند افزایشی با تغییرات غلظت نانولوله‌های کربن مشاهده شد. در این سطح 2-4-D بالاترین درصد القاء کالوس (۷۲/۱۷٪) در بالاترین غلظت نانوکربن مشاهده شد (شکل ۱۱). قربانی و جامی (Ghorbani & Jami,. 2017) بیان کردند که استفاده از نانولوله‌های کربنی در محیط کشت، باعث افزایش معنی‌دار درصد القاء کالوس در مقایسه با شرایط عدم مصرف نانولوله کربنی گردید.




**شکل ۱۰. اثر متقابل 2-4-D و BAP بر درصد القاء کالوس**

**Fig 10. Interaction effect of 2-4-D and BAP on callus induction percentage**




**شکل ۱۱. اثر متقابل 2-4-D و نانولوله‌های کربنی بر درصد القاء کالوس**

**Fig 11. Interaction effect of 2-4-D and carbon nanotubes on callus induction percentage**

## نتیجه گیری

در مجموع نتایج این آزمایش نشان داد که کاربرد نانولوله‌های کربنی و هورمون‌های BAP و 2-4-D بر کالوس‌زایی زعفران موثر می‌باشند بطوریکه اثر درجه اول غلظت‌های نانولوله‌های کربن بر کالوس‌زایی و تعداد کالوس معنی‌دار شد. کاربرد هورمون 2-4-D بیشترین تاثیر را بر تعداد کالوس نشان داد. کاربرد هورمون BAP تا سطح ۰/۷۳ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش و از آن به بعد سبب کاهش تعداد کالوس شد. تعداد کالوس‌زایی هم در غلظت‌های پایین و هم در غلظت‌های بالای هورمون BAP در کنار کاربرد نانولوله‌های کربنی روند افزایشی داشت. بالاترین قطر کالوس گزارش شده در کاربرد پایین‌ترین مقدار هورمون 2-4-D و غلظت بالای هورمون BAP مشاهده شد که نشان از یک واکنش منفی به افزایش قطر کالوس نسبت به کاربرد هورمون 2-4-D داشت. بطوریکه در کاربرد ۰/۵۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2-4-D و ۲۹/۳۸ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانو لوله‌های کربنی مشاهده شد. کمترین وزن کالوس تولیدی در بالاترین غلظت هورمون 2-4-D و کمترین غلظت هورمون BAP مشاهده شد. درصد القاء کالوس نیز تنها تحت تاثیر غلظت‌های درجه اول و دوم کاربرد نانو لوله‌های کربنی قرار گرفت و سایر صفات مورد بررسی اثر معنی‌داری بر القاء کالوس نشان ندادند.

## منابع


Ahmadi, J., Mohammadi, R., & Groosi, Gh. (2014). In vitro Micropropagation of Catharanthus roseus *(Linn.)* G. Don via shoot multiplication. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 27(1), 14-25.

Ahmadian, Z., & Niazmand, R. (2016). Extraction of active components from saffron petal with the help of ultrasound and optimization of extraction conditions. *Innovative Food Technologies*, *4*(1), 121-135.

Arbab, M. (2014). Effect of multi walled carbon nanotubes on in vitro callus induction and plant regeneration in withania coagulants (Master's thesis). Islamic Azad University of Sabzevar, Sabzevar, Iran.

Assareh, M. (1998). In vitro culture plant regeneration through organogenesis, Somatic embryo genesis and photoautotrophic micro propagation of some Eucalyptus (Ph.D. thesis). National University of Ireland, Dublin, Ireland.

Bhagyalakshmi, N. (1999). Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 58, 205–211.

Choob, V.V., Vlassova, T.A. and Butenko R.G. (1994). Callusogenesis and morphogenesis in generative organ culture of the spring flowering species of Crocus L. *Russ J. Plant Physiol*, 41, 712–716.

Ding, B., Bai, S., Wu, Y. & Wang, B.K. (1979). Preliminary report on tissue culture of corms of *Crocus sativus*. *Acta. Bot. Sin.*, 21, 387.

Etedali, E., Moghadam, M., Khosrovshahli., M., Motlabi, A., Valizadeh, M., & Javidfar, F. (2004). The effect of medium and explant genotype on the induction and growth of rapeseed callus in mediums containing and without hormones, *Quarterly Journal of Agricultural Science*, 14(2), 95.

Ghodake, G., Seo, Y. D., Park, D., & Lee, D. S. (2010). Phytotoxicity of carbon nanotubes assessed by Brassica juncea and Phaseolus mungo. *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics*, *5*(2), 157-160.

Ghorbani, M., & Jami, M. (2017). Effect of carbon nanotubes on callus formation of Marfona and Sinora potato varieties, The 4th National Congress on Development and Promotion of Agricultural Engineering and Soil Sciences of Iran papers, Environment and natural resources. [in Persian].

Gopitha, K, Lakshmi. B, A & Senthilmanickam, J. (2010). Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot root regeneration in sugarcane. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 1(3).

Ilahi, I., Jabeen, M. & Firdous, N. (1987). Morphogenesis with saffron tissue cultures. *J. Plant Physiol*., 128: 227-232.

Iranian, S., Masoumian, M., & Masoudsinki., J. (2014). The effect of NAA and IBA hormones on rooting of the medicinal plant Aloe vera. Iranian Congress of Agricultural Sciences and Plant Breeding.

Izanloo, A., Derakhshan, A., Alizadeh, Z., & Behdani, M. (2019). Cormlet production of saffron *(Crocus sativus L.)* using in vitro Culture Techniques. *Journal of Saffron Research*, 6(2), 179-189.

Khodakovaskaya, M., Silva, K., Biris, A. & Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano*, 6(3): 2128-2135.

Khodakovaskaya, M., Kim, B. S., Kim, J. N. & Cernigla, C. (2013). Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small*, 9(1): 115-123.

Manouchehri, P., A.Milani, S., & Abolghasemi, H. (2021). Use of response surface methodology for optimizing process parameters of thorium adsorption on amino-functionalized titanosilicate nanoparticles. *Journal of Nuclear Science, Engineering and Technology (JONSAT)*, 42(1), 57-66.

Moral, S., Rao, R. & Chakrapani, R. (2011). Factors affecting seed germination and seedling growth of tomato plants cultured in vitro conditions. *Chemical, Biological and Physical Sciences*, 1(2): 328-334.

Moradi, S., Fallahi, H. R., Behdani, M. A., & Mahmoodi, S. (2024). The effect of corm storage conditions during the summer dormancy stage on reproductive growth and yield of saffron. *Journal of Saffron Research*, 12(1), 1-14. doi: 10.22077/jsr.2020.3747.1141

Plessner, O., Ziv, M. & Negbi, M. (1990). In vitro corm production in the saffron *(Crocus sativus L.)*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 20: 89-94.

Ramandi, A., Gholizadegan, A., & Seifi, A. (2022). Optimization of callogenesis and cell suspension culture in saffron. *Journal of Saffron Research*, 10(2), 276-284. doi: 10.22077/jsr.2022.5718.1198

Raja, W., Zaffer, G. & Wani, S. (2007). In vitro microcorm formation in saffron *(Crocus sativus L.)*. *Acta Hortic*, 739: 291-296.

Sajjadi, M., & Pazhouhandeh, M., (2015). Study on effect of type of explant and hormone on callus induction and regeneration in saffron *(Crocus sativus L.)*, *Saffron Agronomy and Technology*, 3(3), 195-202. magiran.com/p1445584

Sharifi, G., Ebrahimzadeh, H., Ghareyazie, B. & Karimi, M. (2010). Globular embryo-like structures and highly efficient thidiazuron-induced multiple shoot formation in saffron *(Crocus sativus L.)*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 46: 274-280.

Simona, L., Petolescu, C., Florina, F., Lazar, A., Giancarla, V., Danci, M. & Maria, B. (2013). In vitro regeneration of Crocus sativus L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 17, 244-247.

Tadayon, M., Falah, S., Fadaei, A., & Norouzim, S. (2013). Effects of multi wall carbon nanotube and nanosilver on some physiological and morphological traits of faba bean *(Vicia faba L.)*. *Journal of Plant Process and Function*, 2(3), 61-72.

Tang, J., Chen, X., Katuyoshi, S. (2002). The influences of culture conditions on the callus induction, tissue culture and regulation of secondary metabolism of eucommia ulmoides oliver, *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)*, 2(36), 193-198.

**COPYRIGHTS**

© 2024- 2025 by the authors. Published by University of Birjand – Saffron Research Group. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)