فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱۳، شماره ۵۹، فروردین و اردیبهشت‌ماه ۱۴۰۳ صفحه: ۳۸۳-۳۹۶
https://doi.org/10.22034/13.59.383

مقاله پژوهشی

مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر صفات رشدی و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis*)

هوشمند محمودجانلو[۱]، بهاره کاشفی[۱*] و اسماعیل باباخان‌زاده[۲]

[۱] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

[۲] سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سمنان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۴/۲۷)

چکیده

گیاه زوفا متعلق به خانواده نعناعیان بوده و در طب سنتی و در صنایع دارویی و غذایی کاربرد داشته و دارای فعالیت‌های ضدباکتری، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی و ضداسپاسم بوده و در درمان سرفه، برونشیت، آسم شدید، و سایر بیماری‌های تنفسی مؤثر استفاده می‌شود. در این مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D (صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر) بر کالوس‌زایی، رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه زوفا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف 2,4-D تأثیر معنی‌دار روی درصد کالوس‌زایی، طول گیاهچه و ریشه، وزن تر گیاهچه، تعداد و سطح برگ، محتوای اسید رزمارینیک، اسید فولیک، کوئرستین، لوتئولین، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدان دارد. بطورکلی، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۷/۴۰ درصد) با کاربرد ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل شد. بیشترین طول گیاهچه (۸/۹۲ سانتی‌متر)، طول ریشه (۱/۶۶ سانتی‌متر)، وزن تر گیاهچه (۰/۱۵ گرم)، سطح برگ (۱/۴۴ سانتی‌متر مربع) و تعداد برگ (۲۱/۸۰ عدد) در شرایط عدم کاربرد 2,4-D بدست آمد. بالاترین مقدار اسید رزمارینیک (۰/۶۴ میکروگرم در گرم وزن خشک) و لوتئولین (۲/۴۲ میکروگرم در گرم وزن خشک) در حضور ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. بیشترین محتوای اسید فولیک (۳۶/۶۵ میکروگرم در گرم وزن خشک)، کوئرستین (۱/۷۲ میکروگرم در گرم وزن خشک) و فلاونوئید (۲/۴۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک) با کاربرد ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل گردید. همچنین، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدان (۳/۹۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) با افزودن ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد. نتایج نشان داد کاربرد تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D می‌تواند در بهبود صفات رشدی، درصد کالوس‌زایی و میزان متابولیت‌های ثانویه مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اسید رزمارینیک، تنظیم‌کننده رشد، کوئرستین، لوتئولین

مقدمه

از زمان‌های قدیم، گیاهان به عنوان منابع داروهای طبیعی برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان می‌دهد که بیش از ۶۰ درصد داروهای ضدسرطان و ۷۵ درصد داروهای درمان بیماری‌های عفونی از گیاهان مشتق شده و یا مشابه ترکیبات گیاهی هستند (Anand *et al.*, 2019). اهمیت دارویی گیاهان بستگی به حضور گروه بزرگی از ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم دارد که به عنوان

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: bahareh.kashefi@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند و در مقادیر بسیار کم (کمتر از یک درصد وزن خشک گیاهان) در دسترس هستند. این متابولیت‌ها به‌عنوان اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، تانن‌ها، لیگنان‌ها و اسانس‌ها طبقه‌بندی می‌شوند و در محافظت از گیاهان در برابر گیاه‌خواران، به‌عنوان جذب‌کننده موجودات گرده‌افشان و در همزیستی گیاه با میکروارگانیسم‌ها نقش دارند (Jain *et al*., 2019). تولید این ترکیبات ممکن است به یک خانواده گیاهی خاص، جنس یا حتی یک گونه خاص محدود شود (Shoja and Shishavan, 2021).

گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis*) متعلق به خانواده نعناعیان بوده و در طب‌سنتی و در صنایع دارویی و غذایی کاربرد داشته و دارای فعالیت‌های ضدعفونی‌کننده، ضدباکتری، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی است (Stancheva *et al*., 2019). زوفا به عنوان یک گیاه دارویی دارای اثر ضداسپاسم بوده و در درمان سرفه، برونشیت، آسم شدید، و سایر بیماری‌های تنفسی مؤثر استفاده می‌شود. اسانس زوفا حاوی ایزوپینوکامفون، پینن، کامفن و ترپینن، پینوکارون، کارواکرول، پی‌سیمن و میرتنال است (Wesolowska *et al*., 2010).

برای دستیابی به سطح بالایی از تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، روش کشت سلول و بافت گیاهی به عنوان روشی قدرتمند در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند عوامل مؤثر بر سنتز و/یا تجمع این متابولیت‌ها را کنترل کند (Jain *et al*., 2019). کشت‌بافت گیاهی جایگزینی برای تولید گیاه در مزرعه جهت بدست آوردن زیست‌توده به عنوان یک منبع پایدار از ترکیبات زیستی فعال است، زیرا سیستم درون شیشه تحت تأثیر محدودیت منابع مواد مغذی یا تغییرات آب و هوایی قرار نمی‌گیرد. همچنین، این سیستم آزمایشی امکان بررسی تأثیر تعدادی از عوامل شیمیایی و فیزیکی بر متابولیسم ثانویه سلول گیاهی را فراهم می‌کند. این رویکرد می‌تواند در بدست آوردن کلونی‌های با تولید بالا از گیاهان دارویی و همچنین کلونی‌های جدیدی که متابولیت‌های غیرمعمول با ارزش دارویی فوق‌العاده را سنتز می‌کنند، مفید باشد. بسیاری از رویکردهای آزمایشگاهی برای افزایش بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی استفاده شده است (Stancheva *et al*., 2019). کشت کالوس یک منبع تجدیدپذیر از متابولیت‌های ثانویه است که مستقل از عوامل فصلی است (Espinosa-Leal *et al*., 2018). به دست آوردن متابولیت‌های ثانویه از کشت کالوس مد نظر بسیاری از محققان بوده و محیط غذایی می‌تواند بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه هدف را تحریک و عملکرد آن‌ها را افزایش دهد (Ahmad *et al*., 2019). تولید ترکیبات طبیعی از طریق کشت کالوس نویدبخش توسعه بیوتکنولوژی صنعتی برای به دست آوردن مواد با ارزش پزشکی است (Hendrawati *et al*., 2012). توسعه تکنیک‌هایی برای بهبود اسانس محصولات و ترکیبات خاص آن‌ها مطلوب بوده و عوامل درون‌زا (مرحله خاص رشد کل گیاه و اندام‌های خاص) و برون‌زا (زیستی و غیرزیستی) می‌توانند تولید اسانس و ترکیب شیمیایی را تغییر دهند (Shakoori and Kashefi, 2019; Stancheva *et al*., 2019; Teixeira *et al*., 2019; Yaacob *et al*., 2022). Teixeira و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی گزارش کردند که تنظیم‌کننده‌های رشد از جمله 2,4-D می‌توانند بر میزان برخی از ترکیبات مؤثره در گیاهان تأثیر مثبت داشته باشند. از دیگر عوامل مؤثر بر تولید اسانس، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند (Prins *et al*., 2010). Shakoori و Kashefi (۲۰۱۹) اعلام داشتند مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی در تمام جنبه‌های چرخه حیاتی گیاه کاربرد دارد به‌طوری‌که این مواد می‌توانند اثر عمیقی بر روی واکنش‌های گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه داشته باشند. از مهمترین ترکیباتی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند می‌توان به کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها و ترکیبات فنلی اشاره نمود. این ترکیبات از محرک‌های رشد گیاه و بازدارنده‌های زیستی تشکیل شده‌اند و برای افزایش رشد گیاه و عملکرد محصول استفاده می‌شوند و می‌توانند محتوای پروتئین‌ها و قندها را بهبود بخشند و مقاومت گیاه را در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش دهند (Farjaminezhad and Garoosi, 2019). گزارش‌های متعددی در خصوص تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر میزان کال‌زایی در گیاه زوفا موجود است

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

Tayefeh *et al*., 2018; Maslova *et al*., 2021; Sedaghati and Assareh, 2022). 2,4-D یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی بسیار مؤثر از گروه اکسین‌ها می‌باشد که در تحریک تشکیل سلول‌های کالوس نقش دارد (Mahadi *et al*., 2016). همچنین، این هورمون در مقایسه با انواع دیگر اکسین‌ها دارای خواص پایدارتری است، زیرا به راحتی توسط آنزیم‌های آزادشده توسط ریزنمونه‌ها یا با حرارت‌دادن در طی فرآیند استریل‌کردن تجزیه نمی‌شود (George *et al*., 2008). در بررسی تأثیر 2,4-D، بیشترین میزان تولید کالوس در دو گونه زوفا در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد که در آن زوفا معمولی پس از شش روز کالوس نشان داد درحالی‌که گونه محلی زوفا پس از ۱۱ روز شروع به پینه‌زدن کرد. براساس این تحقیق، این تیمار برای القای کالوس در هر دو گونه پیشنهاد شد (Tayefeh *et al*., 2018). تنظیم‌کننده‌های رشد با نقش تعیین‌کننده‌ای که در کشت درون شیشه گیاهان مختلف دارند می‌توانند بر رشد و تولید ترکیبات مؤثره گیاهان دارویی مختلف اثرگذار باشند. از این رو هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر سطوح مختلف 2,4-D بر صفات رشدی، درصد کالوس‌زایی و تولید متابولیت‌های ثانویه در کالوس گیاه زوفا بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان انجام شد. بذر گیاه زوفا از بانک بذر مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه گردید. ابتدا بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در آب شهری شسته شدند. سپس با اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی سطحی شده و در نهایت سه بار با آب‌مقطر استریل آبکشی شدند. بذرهای ضدعفونی‌شده در شیشه‌های کشت حاوی محیط‌کشت MS جهت جوانه‌زنی کشت و در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند (Alizadeh and Hosseini, 2013). گیاهچه‌های حاصل به منظور اعمال تیمار مورد استفاده قرار گرفت.

تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر کالوس‌زایی و رشد ریزنمونه: به منظور مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر ویژگی‌های رشدی، کالوس‌زایی و میزان متابولیت‌های ثانویه، ریزنمونه‌های ساقه دارای یک گره و دو عدد برگ از گیاهچه‌های حاصل در مرحله قبل تهیه و توسط قیچی ضدعفونی جدا شده و بر روی محیط‌کشت MS پایه حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D (صفر، ۱، ۲، ۳، ۴، و ۵ میلی‌گرم در لیتر) به صورت عمودی قرار داده شد. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۴۰ روز نگهداری و هر ۲۰ روز یکبار واکشت شدند (Alizadeh and Hosseini, 2013). پس از ۴۰ روز شاخص‌های طول گیاهچه، طول ریشه، وزن تر و خشک گیاهچه، سطح برگ، تعداد برگ، درصد کالوس‌زایی، محتوای اسید رزمارینیک، اسید فولیک، کوئرستین، لوتئولین، فنول، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: اندازه‌گیری طول گیاهچه و طول ریشه با استفاده از خط‌کش انجام شد. به منظور تعیین وزن تر و خشک نمونه‌ها از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ استفاده گردید (به منظور تعیین وزن خشک، گیاهچه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون نگهداری شدند). همچنین تعداد برگ شمارش و سطح برگ با استفاده از دستگاه Leaf area meter اندازه‌گیری شد. درصد کالوس‌زایی نیز از درصد تعداد ریزنمونه‌های دارای کالوس بر تعداد کل ریزنمونه‌ها محاسبه شد.

تهیه عصاره از برگ‌ها: ابتدا، ۵ گرم پودر برگ خشک‌شده با ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت با استفاده از دستگاه روتاری حلال از عصاره جدا شد و عصاره خالص در ظرف کوچکی نگهداری شد (Ebrahimzade *et al*., 2008).

اندازه‌گیری محتوای فنول: مقدار فنول عصاره تهیه‌شده به روش Ebrahimzade و همکاران (۲۰۰۸) مشخص شد. برای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

این منظور، ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره بدست آمده با ۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو (رقیق‌شده با نسبت ۱ به ۱۰ توسط آب‌مقطر) مخلوط شده و سپس ۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم یک مولار اضافه شد. برای شاهد نیز بجای عصاره خشک، از متانول استفاده شد که از این محلول برای صفرکردن اسپکتروفتومتر استفاده شد. محلول حاصل ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و مقدار جذب در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و از طریق منحنی استاندارد اسید گالیک مقدار فنول بر حسب اکی‌والان اسید گالیک در گرم عصاره خشک گزارش گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: میزان مهار رادیکال‌های (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH با روش Ebrahimzade و همکاران (۲۰۰۸) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا از عصاره خشک تهیه‌شده، ۴۰ میلی‌گرم در ۲۵ میلی‌لیتر متانول حل گردید. در این مرحله رادیکال DPPH به غلظت ۰/۱ میلی‌مولار تهیه شد. پس از افزودن عصاره‌ها، ۲ میلی‌لیتر متانول و ۲ میلی‌لیتر DPPH اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و مقدار جذب در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. اعداد توسط فرمول زیر به درصد مهار تبدیل و ضمن تعیین معادله خط، درصد مهار ۵۰ (IC_{50}) محاسبه و بر اساس میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH= ((Ac-As) /Ac) ×۱۰۰

در این رابطه، Ac جذب نوری شاهد و As جذب نوری نمونه برحسب نانومتر است.

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید: اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید به روش Ebrahimzade و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد. برای این منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪ در اتانول، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر مخلوط شدند. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفته و مقدار جذب در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. محتوای فلاونوئید با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه و برحسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک گزارش شد.

استخراج و اندازه‌گیری اسید رزمارینیک، اسید فولیک، کوئرستین و لوتئولین: برای این منظور، ۲۰ گرم بافت خشک پودرشده در ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم قرار داده شد. سپس نمونه‌ها خنک شده و با دور rpm ۴۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. این فرآیند دوبار تکرار شد. عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شده و محلول رویی تا زمان تزریق به دستگاه HPLC در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مقدار اسید رزمارینیک، اسید فولیک، کوئرستین و لوتئولین با استفاده دستگاه Knauer HPLC system (UV detector, Germany) با ستون کربن ۱۸ (TSKgel-ODS C-18, 5µm, 4. 6 × 250 mm, Japan) اندازه‌گیری شد. فاز متحرک شامل متانول و استیک اسید ۰/۱ درصد با نسبت ۵۰:۵۰ بود. سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود. میزان جذب در چهار دقیقه اول با طول‌موج ۳۳۰ نانومتر و در ادامه با طول‌موج ۳۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار سنتز این ترکیبات با استفاده از منحنی استاندارد اسید رزمارینیک اسید، اسید فولیک، کوئرستین و لوتئولین بدست آمد (Vlase *et al.*, 2014).

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و پنج تکرار انجام و پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 24.0 انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel 2016 استفاده شد.

نتایج و بحث

آنالیز واریانس صفات مورد مطالعه: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که افزودن مقادیر مختلف 2,4-D به محیط‌کشت MS تأثیر معنی‌داری روی درصد کالوس‌زایی،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

جدول ۱- آنالیز واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد کالوس‌زایی و رشد گیاهچه‌های زوفا

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		درصد کالوس‌زایی	طول گیاهچه	طول ریشه	وزن تر گیاهچه	وزن خشک گیاهچه	سطح برگ	تعداد برگ
2,4-D	۵	۵۶۰۹/۷۱**	۲۸/۴۱**	۰/۶۰**	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۰۲ ns	۰/۳۱۷**	۱۱۵/۲۳**
خطا	۲۴	۲۶/۱۸۳	۱/۸۰۷	۰/۰۹۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱۵۸	۰/۰۴۹	۷/۸۶۷
ضریب تغییرات (٪)		۸/۷۲	۱۰/۳۲	۱۱/۴۰	۱۳/۸۶	۸/۲۵	۱۲/۸۹	۹/۵۲

**** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ns غیرمعنی‌دار**

جدول ۲- آنالیز واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان و سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های زوفا

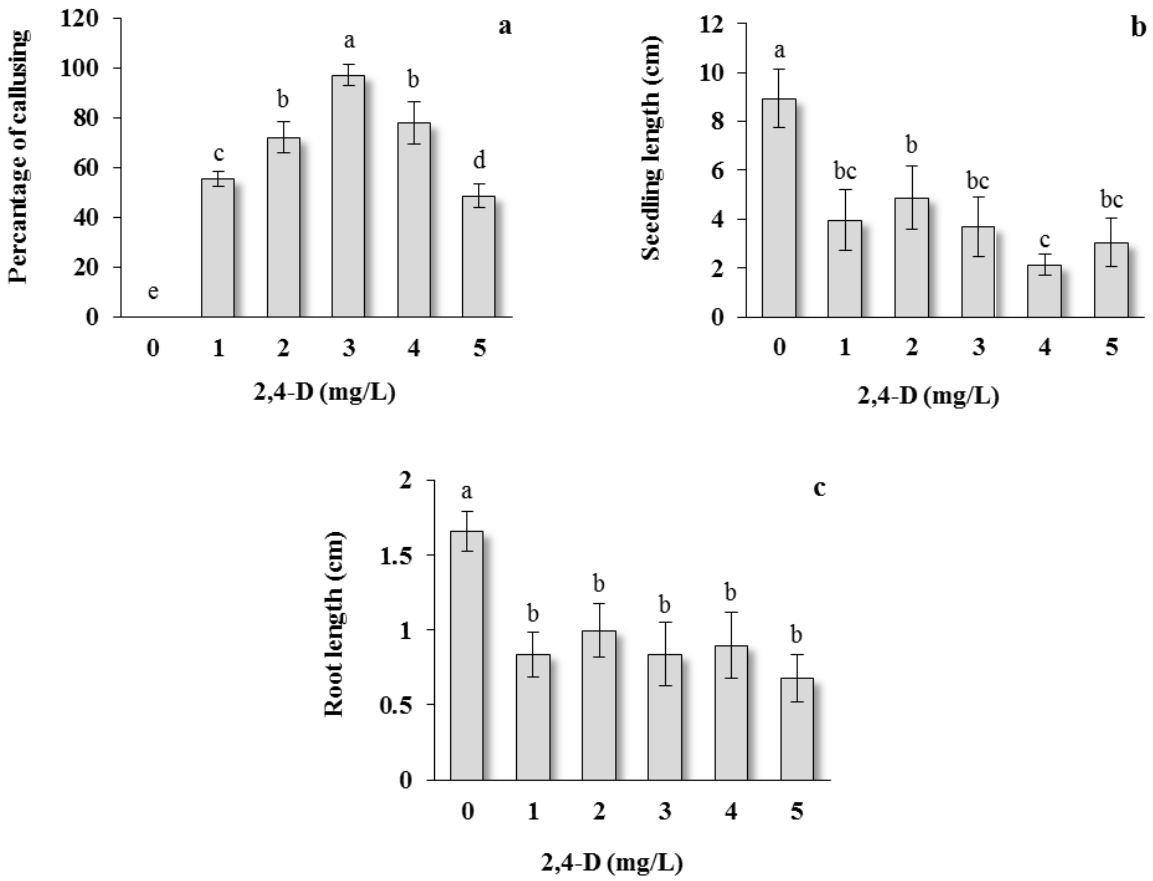
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		اسید رزمارینیک	اسید فولیک	کوئرستین	لوتئولین	فنول	فلاونوئید	آنتی‌اکسیدان
2,4-D	۵	۰/۲۰۶**	۷۶/۵۰۵**	۰/۵۰۴**	۰/۴۰۸**	۰/۰۰۲ ns	۰/۰۲۳**	۵/۵۶۷**
خطا	۲۴	۰/۰۱۲	۰/۷۱۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۳۴۷
ضریب تغییرات (٪)		۱۳/۵۶	۶/۶۲	۶/۲۱	۶/۵۶	۱۰/۵۲	۱۲/۹۲	۸/۰۹

**** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ns غیرمعنی‌دار**

طول گیاهچه، وزن تر گیاهچه، سطح برگ، تعداد برگ، محتوای اسید رزمارینیک، محتوای اسید فولیک، کوئرستین، لوتئولین، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدان داشت، اما تأثیری بر وزن خشک گیاهچه و محتوای فنول نداشت (جدول ۱ و ۲).

درصد کالوس‌زایی: استفاده از غلظت‌های مختلف 2,4-D موجب القاء کالوس شده بود، درحالی‌که در شاهد القاء کالوس مشاهده نشد. با کاربرد ۱، ۲، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D درصد کالوس‌زایی به ترتیب ۵۵/۶، ۷۲/۲، ۷۸ و ۴۸/۶ درصد بود. بین غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین درصد کالوس‌زایی به میزان ۹۷/۴ درصد در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که نسبت به غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۱/۷۵، ۱/۳۵، ۱/۲۵ و ۲/۰۰ برابر بود (شکل 1a). تعیین ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی در محیط‌کشت یک راهکار مهم برای القاء کالوس و تولید متابولیت‌های ثانویه است (Farjaminezhad *et al.*, 2013; Murthy *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2015). در کشت‌بافت گیاهی برای تولید بیشترین مقدار بیوماس و متابولیت‌های ثانویه بایستی ترکیب اکسین/سیتوکینین بهینه شود (Raj *et al.*, 2015). اکسین‌ها نقش مهمی را در القاء کالوس داشته و انواع مختلف اکسین‌ها اثرات مختلفی را دارند (Giannakoula *et al.*, 2012). در مطالعه صورت گرفته روی گیاه گیلاس زمستانی مشخص شد که محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین بیشتر درصد کالوس‌زایی (۹۸ درصد) را دارد (Chakraborty *et al.*, 2013). مطالعه انجام‌شده روی کشت گل نارس چریش نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۸ درصد) در محیط‌کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد ساکارز حاصل می‌شود (Rafiq and Dahot, 2010). در گیاه *Rhodiola imbricata*، کالوس در محیط‌کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد (Kapoor *et al.*, 2018). در کشت گیاه مخملی با کاربرد ریزنمونه‌های برگ، ساقه و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد کالوس‌زایی (a) و طول گیاهچه (b) و ریشه (c) در کشت درون‌شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است. ارور بارها بر اساس خطای استاندارد رسم شده است.

دمبرگ کالوس در محیط‌کشت MS حاوی بیش از ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد (Jie *et al.*, 2019). در *گیاه Tridx procumbens* بیشترین میزان القای کالوس و درصد باززایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D حاصل شد (Wani *et al.*, 2010). مشخص شد که بالاترین درصد کال‌زایی و وزن کالوس در محیط‌کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D برای Angustifolia تولید شد (Keikhaakhar *et al.*, 2013). در مطالعه انجام‌شده بر روی گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) مشخص شد که بهترین محیط‌کشت برای تشکیل و تکثیر کالوس، محیط‌کشت پایه MS حاوی 2,4-D با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر است (Kumari and Saradhi, 1992).

صفات رشدی، طول گیاهچه و ریشه: غلظت‌های مختلف 2,4-D طول گیاهچه را نسبت به شاهد کاهش داد. با کاربرد غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین طول گیاهچه با میانگین ۴/۸۸ سانتی‌متر در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد ۴۵ درصد کاهش یافت. بطورکلی، بیشترین طول گیاهچه با میانگین ۸/۹۲ سانتی‌متر در تیمار شاهد و کمترین طول گیاهچه با میانگین ۲/۱۲ سانتی‌متر در تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد (شکل 1b). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در بین غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D بیشترین طول ریشه (۱ سانتی‌متر) با کاربرد ۲ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد ۴۰ درصد کاهش یافته بود. بنابراین، افزودن غلظت‌های 2,4-D موجب کاهش طول ریشه گیاه زوفا شد. کمترین طول ریشه نیز با میانگین ۰/۶۸ سانتی‌متر با کاربرد ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

شکل ۲- گیاهچه‌های گیاه زوفا پس از اعمال غلظت‌های مختلف 2,4-D

که نسبت به شاهد بیش از ۵۹ درصد کاهش نشان داد (شکل ۱c و ۲).

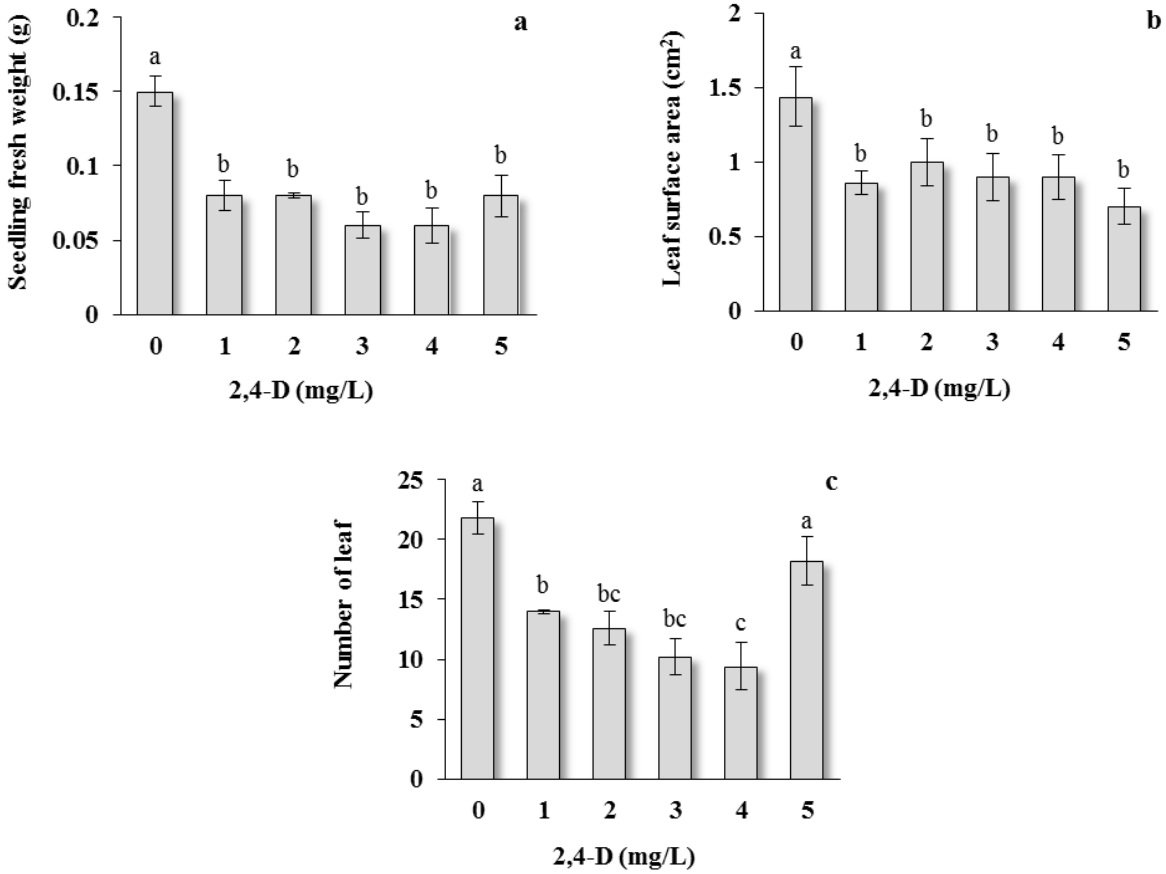
وزن تر و خشک گیاهچه: نتایج نشان داد که استفاده از 2,4-D موجب کاهش رشد گیاهچه و در نتیجه کاهش وزن تر گیاهچه گردید. با کاربرد ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D میانگین وزن تر گیاهچه به ترتیب ۰/۰۷۹، ۰/۰۸۱، ۰/۰۵۸، ۰/۰۶ و ۰/۰۸۱ گرم بود. بین غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین (۰/۰۸۱ گرم) و کمترین (۰/۰۵۸ گرم) وزن تر گیاهچه با کاربرد ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد به ترتیب ۴۶ و ۶۱ درصد کاهش نشان داد (شکل ۳a). نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک گیاهچه نداشت. بطورکلی، بین غلظت‌های مختلف 2,4-D اضافه شده به محیط‌کشت و شاهد اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

تعداد و سطح برگ: نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D تأثیر منفی بر تعداد برگ داشت و تعداد آن نسبت به شاهد کاهش یافت. با کاربرد غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین تعداد برگ با میانگین ۱۸/۲ عدد در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد ۱۶ درصد کاهش نشان داد. بطورکلی، بیشترین تعداد برگ با میانگین ۲۱/۸ عدد در تیمار شاهد و کمترین تعداد برگ با میانگین ۹/۴ عدد در تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد (شکل ۳b) براساس مقایسه میانگین، در بین غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D بیشترین سطح برگ با میانگین ۱ سانتی‌متر مربع با کاربرد غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد ۳۰ درصد کاهش یافت. بنابراین، افزودن غلظت‌های 2,4-D موجب کاهش سطح برگ گیاه زوفا گردید. کمترین سطح برگ نیز با میانگین ۰/۷۰ سانتی‌مترمربع با کاربرد ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که نسبت به شاهد ۵۱ درصد کاهش نشان داد (شکل ۳c).

تحقیقات متعددی، گویای تأثیرگذاری عوامل خارجی و داخلی بر نتایج حاصل از کشت‌بافت می‌باشد که از جمله این عوامل می‌توان به نوع ریزنمونه، ترکیبات محیط‌کشت و شرایط فیزیکی محیط اشاره کرد (Lal *et al.*, 2016). کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد از جمله اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها می‌توانند موجب بهبود صفات رشدی شوند. بر طبق نتایج کاربرد توأم و تنهای هورمون‌های رشد موجب افزایش شاخص‌های رشد، ترکیبات بیوشیمیایی و مواد مؤثره گیاه ترخون در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌شود (Shakoori and Kashefi, 2019; Yaacob *et al.*, 2022; Sedaghati and Assareh, 2022).

محتوای اسید رزمارینیک و اسید فولیک: نتایج نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف 2,4-D بسته به غلظت تأثیر مثبت و منفی بر تولید اسید رزمارینیک داشت. بطورکلی، بیشترین مقدار اسید رزمارینیک با میانگین ۰/۷۷ میکروگرم در گرم وزن خشک در ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D که نسبت به شاهد افزایش

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

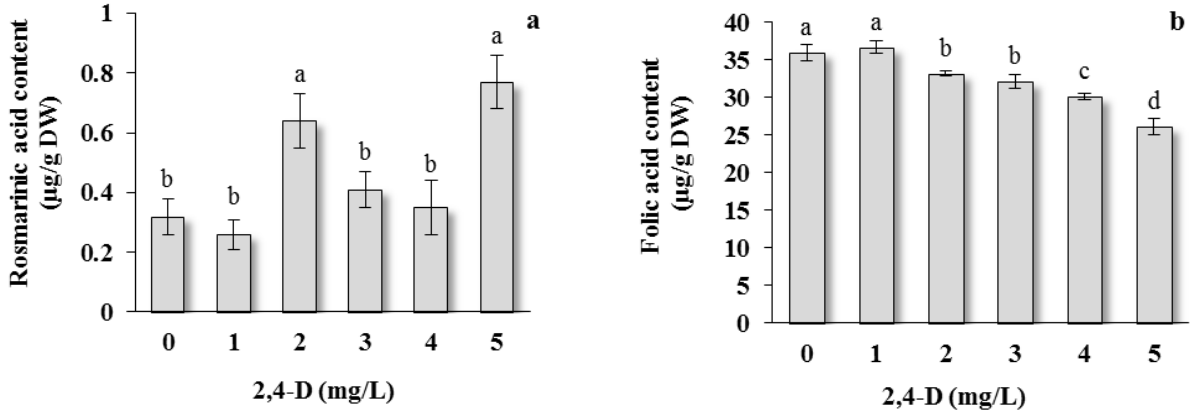


شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر وزن تر گیاهچه (a)، سطح برگ (b) و تعداد برگ (c) در کشت درون‌شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است. ارور بارها بر اساس خطای استاندارد رسم شده است.

داشت و کمترین مقدار آن با میانگین ۰/۲۶ میکروگرم در گرم وزن خشک در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد (شکل ۴a). در بین غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D بیشترین مقدار اسید فولیک (۳۶/۶۵ میکروگرم در گرم وزن خشک) با کاربرد ۱ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. غلظت‌های بالای آن تأثیر منفی بر سنتز اسید فولیک نشان داد. کمترین مقدار اسید فولیک با میانگین ۲۶/۰۹ میکروگرم در گرم وزن خشک با کاربرد ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که نسبت به شاهد بیش از ۲۷ درصد کاهش یافت. بنابراین، افزودن غلظت‌های پایین 2,4-D موجب افزایش سنتز اسید فولیک در گیاه زوفا گردید (شکل ۴b). بسیاری از گزارش‌های اولیه نقش اساسی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در رشد سلول و سنتز متابولیت‌های ثانویه را شرح داده‌اند. علاوه‌براین، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مشابه برحسب نوع و غلظت آن‌ها می‌توانند بیوسنتز متابولیت‌های خاص را تحریک یا مهار کنند. بنابراین، تعیین نوع و غلظت بهینه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها برای رشد سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Farjaminezhad and Garoosi, 2019). گیاهان مختلف پاسخ‌های متفاوتی را به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نشان می‌دهند. به عنوان مثال، بهترین رشد کشت سلول گیاه تشنه‌دارو در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شده است (Khanpour-Ardestani *et al*., 2015).

محتوای کوئرستین و لتئولین: افزودن غلظت‌های مختلف 2,4-D به محیط‌کشت موجب تغییر مقدار سنتز کوئرستین در گیاهچه‌ها شد. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت‌های پایین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

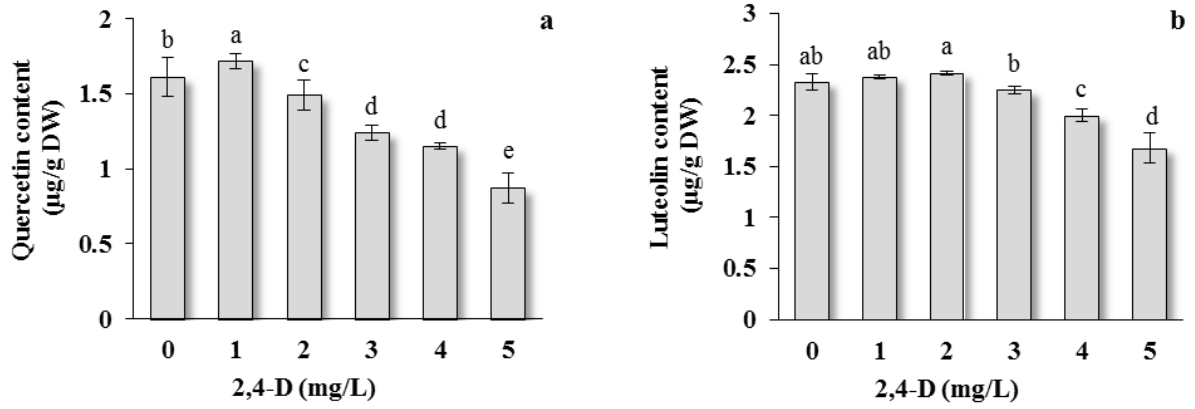


شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر محتوای اسید رزمارینیک (a) و اسید فولیک (b) در کشت درون‌شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار است. ارور بارها بر اساس خطای استاندارد رسم شده است.

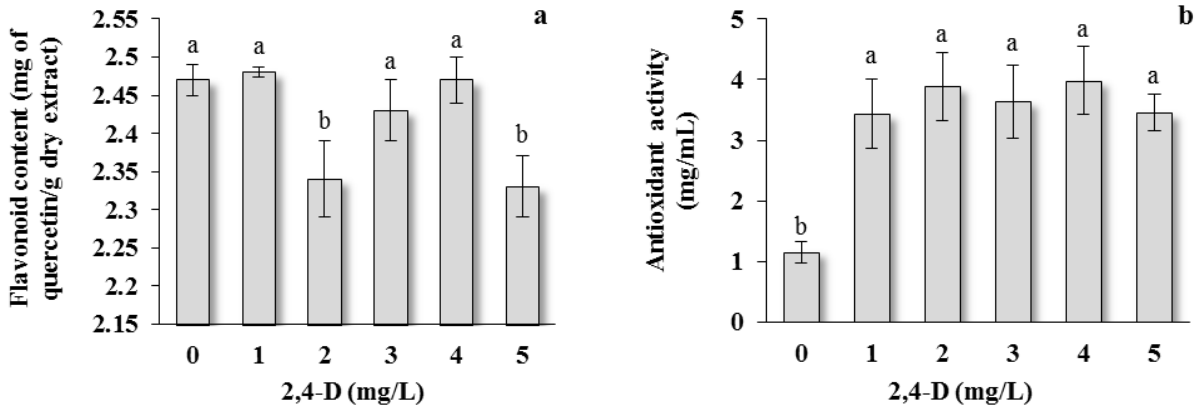
2,4-D موجب افزایش سنتز کوئرستین گردید، اما غلظت‌های بالاتر سنتز آن را مهار نمود. با کاربرد ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D میانگین مقدار کوئرستین به ترتیب ۱/۷۲، ۱/۴۹، ۱/۲۴، ۱/۱۵ و ۰/۸۷ میکروگرم در گرم وزن خشک بود. بین غلظت‌های مختلف 2,4-D، بیشترین مقدار کوئرستین (۱/۷۲ میکروگرم در گرم وزن خشک) و کمترین مقدار آن (۰/۸۷ میکروگرم در گرم وزن خشک) با کاربرد ۱ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نسبت به شاهد به ترتیب ۷ درصد افزایش و ۴۵ درصد کاهش یافت (شکل ۵a). در بین غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D بیشترین مقدار لوتئولین با میانگین ۲/۴۲ میکروگرم در گرم وزن خشک با کاربرد غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. بنابراین، افزودن غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D موجب افزایش سنتز لوتئولین در گیاه زوفا گردید، اما غلظت‌های بالاتر منجر به مهار سنتز آن شد. کمترین مقدار لوتئولین با میانگین ۱/۶۸ میکروگرم در گرم وزن خشک با کاربرد ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که نسبت به شاهد حدود ۲۸ درصد کاهش داشت (شکل ۵b). گزارش‌های اولیه اثرات نسبت اکسین به سیتوکینین روی تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر ایزوفلاون‌ها (Luczkiewicz *et al.*, 2014)، اسیدهای فنولی (Szopa and Ekiert, 2014) و آلکالوئیدها (Raj *et al.*, 2015) در کشت‌های سلول گیاهی را نشان داده‌اند. در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه تشنه‌دارو بیشترین مقدار استوزید در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA تولید شد (Khanpour-Ardestani *et al.*, 2015). برطبق گزارش‌ها، محیط‌کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین مقدار هیپرسین در *Hypricum maculatum* و هیپرفورین در *Hypricum hirustum* افزایش یافت، اما در هر دو گونه هنگام استفاده از TDZ غلظت هیپرسین و هیپرفورین روند کاهشی مشاهده شد (Coste *et al.*, 2011). در کشت سوسپانسیون سلولی جنسینگ آمریکایی بیشترین مقدار ساپونین‌های جنسینوزید با کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و بدون کاربرد 2,4-D بدست آمده بود (Zhong *et al.*, 1996). در کشت گیاه رنگین زرد بالاترین محتوای ایزوفلاون با کاربرد ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین تولید شده بود (Luczkiewicz *et al.*, 2014).

محتوای فنول، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدان: نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D تأثیری بر مقدار فنول نداشته و بین غلظت‌های مختلف 2,4-D اضافه‌شده به محیط‌کشت و شاهد از نظر مقدار فنول اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. لذا، نتایج عددی تأثیر هورمون بر میزان فنول در اینجا ارائه نشد. مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف 2,4-D اثرات متفاوتی بر مقدار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر محتوای کوئرستین (a) و لوتئولین (b) در کشت درون‌شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است. ارور بارها براساس خطای استاندارد رسم شده است.



شکل ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر محتوای فلاونوئید (a) و فعالیت آنتی‌اکسیدان (b) در کشت درون‌شیشه زوفا. مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است. ارور بارها براساس خطای استاندارد رسم شده است.

فلاونوئید دارد. به‌طوری‌که، بیشترین مقدار فلاونوئید با میانگین ۲/۴۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین مقدار آن با میانگین ۲/۳۳ و ۲/۳۴ میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره خشک در تیمار ۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد (شکل ۶a). بین غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین (۳/۹۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین (۳/۴۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) فعالیت آنتی‌اکسیدان با کاربرد ۴ و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد؛ با این حال، بین غلظت‌های مختلف 2,4-D اعمال‌شده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۶b).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D بر صفات رشدی، کالوس‌زایی و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه زوفا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی با کاربرد ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل می‌شود. بیشترین طول گیاهچه، طول ریشه، وزن تر گیاهچه، سطح برگ و تعداد برگ در شرایط عدم کاربرد 2,4-D بدست آمد. بالاترین مقدار اسید رزمارینیک و لوتئولین در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

حضور ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده شد. بیشترین محتوای اسید فولیک، کوئرستین و فلاونوئید با کاربرد ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D حاصل شد. همچنین، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدان با افزودن ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد. نتایج نشان داد کاربرد تنظیم‌کننده رشد 2,4-D می‌تواند در بهبود درصد کالوس‌زایی و میزان متابولیت‌های ثانویه مؤثر باشد. با توجه به اهمیت این گیاه و احتمال انقراض آن، می‌توان از این نتایج برای حفاظت از این گیاه ارزشمند استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان جهت فراهم آوردن امکانات پژوهشی برای انجام این تحقیق ابراز می‌دارند.

منابع

Ahmad, W., Zahir, A., Nadeem, M., Zia, M., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2019). Thidiazuron-induced efficient biosynthesis of phenolic compounds in callus culture of *Ipomoea turbinata* Lagasca and Segura. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, *55*(6), 710-719. https://doi.org/10.1007/s11627-019-10027-1

Alizadeh, M, & Hosseini, B. (2013). Effect of population type and BAP treatments on in vitro regeneration of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of Horticultural Science*, 27(2), 201-207. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.24822.

Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., & Lakhssassi, N. (2019). A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, *9*(11), 258. https://doi.org/10.3390/metabo9110258.

Chakraborty, N., Banerjee, D., Ghosh, M., Pradhan, P., Gupta, N. S., Acharya, K., & Banerjee, M. (2013). Influence of plant growth regulators on callus mediated regeneration and secondary metabolites synthesis in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *19*(1), 117-125. https://doi.org/10.1007%2Fs12298-012-0146-2

Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C., & Coldea, G. (2011). Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *106*(2), 279-288. http://doi.org/10.1007/s11240-011-9919-5

Ebrahimzade, M. A., Hosseinimehr, S. J., Hamidinia, A., & Jafari, M. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sellowiana* fruits peel and leaves. *Pharmacologyonline*, *1*, 7-14.

Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & Garcia-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: Means for production of biological active compounds. *Planta*, *248*(1), 1-18. https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1

Farjaminezhad, R, & Garoosi, G. A. (2019). New biological trends on cell and callus growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica*. *3 Biotech*, *9*(8), 1-17. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1836-z

Farjaminezhad, R., Zare, N., Zakaria, R. A., & Farjaminezhad, M. (2013). Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum*: A biotechnology approach for thebaine production. *Turkish Journal of Biology*, *37*(6), 689-697. https://doi.org/10.3906/biy-1304-54

George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Ed. Springer, Berlin.

Giannakoula, A. E., Ilias, I. F., Maksimovic, J. J. D., Maksimovic, V. M., & Zivanovic, B. D. (2012). The effects of plant growth regulators on growth, yield, and phenolic profile of lentil plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, *28*(1), 46-53. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.06.005

Hendrawati, O., Woerdenbag, H. J., Hille, J., & Kayser, O. (2012). Metabolic engineering of medicinal plants and microorganisms for the production of natural products. In: Pharmaceutical Biotechnology: Drug Discovery and Clinical Applications (eds. Kayser, O. and Warzecha, H.) Wiley-VCH Verlag GmbH and Co KGaA, Weinheim.

Jain, C., Khatana, S., & Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research*, *10*(2), 494-504. http://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232

Jie, E. Y., Atong, N. S., Ahn, W. S., Ahn, M. S., Min, B. H., Kadzimin, S., & Kim, S. W. (2019). High-frequency plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of *Gynura procumbens*. *Plant Biotechnology Reports*, *13*(1), 27-33. http://doi.org/10.1007/s11816-018-0507-6

Kapoor, S., Raghuvanshi, R., Bhardwaj, P., Sood, H., Saxena, S., & Chaurasia, O. P. (2018). Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricate* Edgew. *Journal of Photochemistry and photobiology B biology*, *183*, 258-265. http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.018.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

Keikhaakhar, F., Khadem, A., & Sharifi, A. (2013). Improving of Tissue Culture of Angustifolia. 3rd Iranian Agricultural Biotechnology Conference, Mashhad, Iran.

Khanpour-Ardestani, N., Sharifi, M., & Behmanesh, M. (2015). Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss.: An in vitro approach for acteoside production. *Cytotechnology*, *67*(3), 475-485. https://doi.org/10.1007%2Fs10616-014-9705-4

Kumari, N, & Saradhi, P. (1992). Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare*. Plant Cell Reproductive, 11(9), 476-479. https://doi.org/10.1007/bf00232694

Lal, D., Sharma, A., Tak, K. R., & Ashok, T. H. (2016). Effect of growth regulators and chemical supplements on callus induction in japonica rice varieties through anther culture. *Research in Environment and Life Sciences*, *9*(7), 903-906. http://doi.org/10.3923/pjbs.2004.331.334

Luczkiewicz, M., Kokotkiewicz, A., & Glod, D. (2014). Plant growth regulators affect biosynthesis and accumulation profile of isoflavone phytoestrogens in high-productive in vitro cultures of *Genista tinctoria*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *118*(3), 419-429. http://doi.org/10.1007/s11240-014-0494-4

Mahadi, I., Syafi, I. W., & Sari, Y. (2016). Callus induction of calamansi (*Citrus microcarpa*) using 2,4-D and BAP hormones by in vitro methods. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, *21*(2), 84-89. http://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84

Maslova, E., Gulya, N., Perelugina, T., Semykina, V., & Kalashnikova, E. (2021). Introduction of *Hyssopus officinalis* L. into in vitro culture to optimize the conditions for obtaining callus tissues and microclonal propagation as a promising method of innovative agrobiotechnologies. BIO Web of Conferences 30, 05006. https://doi.org/10.1051/bioconf/20213005006

Murthy, H. N., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *118*(1), 1-16. http://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7

Prins, C. L., Vieira, I. J., & Freitas, S. P. (2010). Growth regulators and essential oil production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *22*, 91-102. https://doi.org/10.1590/S1677-04202010000200003

Rafiq, M, & Dahot, M. U. (2010). Callus and azadirachtin related limonoids production through in vitro culture of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *African Journal of Biotechnology*, *9*(4), 449- 453. https://doi.org/10.5897/AJB09.1091

Raj, D., Kokotkiewicz, A., Drys, A., & Luczkiewicz, M. (2015). Effect of plant growth regulators on the accumulation of indolizidine alkaloids in *Securinega suffruticosa* callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *123*(1), 39-45. http://doi.org/10.1007/s11240-015-0811-6

Sedaghati, M, & Assareh, M. H. (2022). Response of different plant species to callus induction. *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*, *7*(2), 98-105.

Shakoori, Y, & Kashefi, B. (2019). Effects of culture medium and growth regulators on growth traits and secondary metabolites of *Artemisia dracunculus* L. under in vitro conditions. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *35*(3), 437-455. https://doi.org/10.22092/ijmapr.2019.122953.2377

Shoja, H. M, & Shishavan, H. K. (2021). Effects of different hormonal treatments on growth parameters and secondary metabolite production in organ culture of *Hyssopus officinalis* L. *BioTechnologia*. *Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, *102*(1), 33-41. http://doi.org/10.5114/bta.2021.103760

Stancheva, I., Geneva, M., Hristozkova, M., & Zayova, E. (2019). Comparison of bioactive compounds in *Hyssopus officinalis* plants collected from natural habitats with those propagated from seed and in vitro. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, *25*(2), 104-113. https://doi.org/10.1080/10496475.2019.1572686

Szopa, A, & Ekiert, H. (2014). Production of biologically active phenolic acids in *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott in vitro cultures cultivated on different variants of the Murashige and Skoog medium. *Plant Growth Regulation*, *72*(1), 51-58. http://doi.org/10.1007/s10725-013-9835-2

Tayefeh, S., Mahna, N., Kazemitabar, S. K., & Ghasemi-Omran, V. (2018). Callogenesis induction in two Hyssopus species (*H. officinalis* and *H. angustifolius*) using different hormonal levels and culture media. *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*, *3*(2), 29-39.

Teixeira, M. G., Carvalho, M., Leite, M. A., Barbosa, S., Santos, P. R., & Santos, B. R. (2019). Effect of salicylic acid, 2, 4-D and 2i-P on the production of secondary metabolites in *Garcinia brasiliensis* Mart. callus. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *62*, 1-11. http://doi.org/10.1590/1678-4324-2019170303

Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillaq, I., Sevastre, B., Mot, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R., & Tilea, I. (2014). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*, *19*, 5490-5507. https://doi.org/10.3390/molecules19055490.

Wani, M., Pande, S., & More, M. (2010). Callus induction studies in *Tridax procumbents* L. *International Journal of Biotechnology Application*, *2*(1), 11-14. http://dx.doi.org/10.9735/0975-2943

Wesolowska, A., Jadczak, D. O. R. O. T. A., & Grzeszczuk, M. O. N. I. K. A. (2010). Essential oil composition of hyssop *Hyssopus officinalis* L. cultivated in north-western Poland. *Herba Polonica*, *56*(1), 57-65.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

Yaacob, J. S., Ramli, M., Abd Rahim, M. H., Selvaraj, A. M. R., & Nyanasaigran, L. (2022). Comparative analysis on the role of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in the expression of bioactive compounds in callus of *Capsicum frutescens*. *Sains Malaysiana*, *51*(10), 3171-3182. http://doi.org/10.17576/jsm-2022-5110-05

Zhong, J. J., Bai, Y., & Wang, S. J. (1996). Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*. *Journal of Biotechnology*, *45*(3), 227-234. https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00170-0

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]

Studying the effect of different concentrations of 2,4-D on the growth and secondary metabolites production in hyssop (*Hyssopus officinalis*) in *in vitro* culture

Hoshmand Mahmoudjanlou[1], Bahareh Kashefi[1*], Esmaeil Babakhanzadeh[2]

[1] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
[2] Agricultural Research, Education and Extension Organization, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), Semnan, Iran
(Received: 2022/10/24, Accepted: 2023/07/18)

Abstract

The hyssop belongs to the Lamiaceae family and is used in traditional medicine and in the pharmaceutical and food industries. It has antibacterial, antifungal, antioxidant and antispasmodic activities and is used effectively in the treatment of cough, bronchitis, severe asthma and other respiratory diseases. In this study, the effect of different concentrations of 2,4-D (0, 1, 2, 3, 4 and 5 mg/liter) on callusing, growth and production of secondary metabolites of the studied hyssop plant. The results showed that the use of different concentrations of 2,4-D had a significant effect on the percentage of callusing, seedling and root length, seedling fresh weight, number and leaf surface area, content of rosmarinic acid, folic acid, quercetin, luteolin, flavonoid and antioxidant activity. In general, the highest percentage of callusing (97.40%) was achieved with the application of 3 mg/L 2,4-D. The maximum seedling length (8.92 cm), root length (1.66 cm), seedling fresh weight (0.15 g), leaf surface area (1.44 cm^2), and number of leaves (21.80) 2,4-D were obtained under the control condition. The maximum amount of rosmarinic acid (0.64 µg/g dry weight) and luteolin (2.42 µg/g dry weight) was observed in the presence of 2 mg/L 2,4-D. The maximum contents of folic acid (36.65 µg/g dry weight), quercetin (1.72 µg/g dry weight), and flavonoid (2.48 mg quercetin/g dry extract) were obtained with application of 1 mg/L 2,4-D.Also, the maximum antioxidant activity (3.98 µg/mL) was obtained by adding 4 mg/L 2,4-D.

Keywords: Antioxidant, Acid Rosmarinic, Growth regulators, Quercetin, Luteolin

Corresponding author, Email: bahareh.kashefi@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-12-25]