مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

سال ششم، شماره اول، بهار و تابستان، ۱۳۹۹

مطالعه کالزایی از ریزنمونه‌های مختلف گیاه دارویی مورد (*Myrtus communis* L.)

نازیلا باقری[۱]، بهرام ملکی[۱]، علی عمارلو[۲]

چکیده

گیاه دارویی مورد *Myrtus communis* L. یکی از گونه‌های گیاهی مهم و دارویی بین درختچه‌های دارویی است که شامل حدود ۵۰ گونه بومی حوضه مدیترانه می‌شود. تکثیر این گیاه به دلیل داشتن پوسته سخت و غیر قابل نفوذ بذر با دشواری‌های بسیاری همراه است. درصد ریشه‌زایی اندک قلمه از عمده ترین محدودیت‌های قلمه‌زنی آن است. کشت بافت و به تبع آن تولید کالوس در شرایط درون شیشه‌ای یکی از فرایندهای مهم در کشاورزی مولکولی می‌باشد. در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد ۲ و۴-دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) در چهار سطح (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بر سه نوع ریزنمونه برگچه، ساقچه و ریشه‌چه در قالب آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در سه تکرار در محیط غذایی موراشیک- اسکوگ مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه برگچه به میزان ۹۰ درصد نسبت به سایر ریزنمونه-های مورد آزمایش بیشتر و همچنین میزان نسبی کالوس تشکیل شده برگچه در غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر از سایر تیمارها حداکثر بوده ولیکن تفاوت معنی‌داری در سطوح هورمونی ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر (2,4-D) مشاهده نشد. نتایج این تحقیق می‌تواند در راستای تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی در شرایط درون شیشه‌ای مورد بهره‌برداری محققین مربوطه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: گیاه دارویی، مورد، کشت بافت، کالزایی

---

[۱]گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زنجان. * نویسنده مسئول: bagheri5980@yahoo.com

[۲]پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان

مقدمه

گیاه مورد یا مورد با نام علمی *Myrtus communis* L. از خانواده میرتاسه می‌باشد. درختچه مورد قدمتی طولانی در تاریخچه گیاهان دارویی دنیا دارد. بعضی ملل، از جمله یونانیان برای این گیاه احترام خاصی قائل بوده‌اند. از قدیم برگ مورد را به عنوان ماده ضدعفونی کننده مورد استفاده قرار می‌دادند. از میوه ی آن جهت التیام زخم‌ها بهره می‌بردند. در قرون وسطی از مورد به عنوان گیاه دارویی استفاده چندانی نمی‌شد و از قرن ۱۶ میلادی به بعد این گیاه به طور علمی مورد مطالعه قرار گرفت. استفاده از آن به عنوان مقوی معده، رفع ورم روده و بواسیر در بین مردم رایج شد (Stewart, 2005). گیاه مورد برگ‌هایی به رنگ سبزتیره و معطردارد. این گیاه گل‌های درشت و سفید رنگی داشته و میوه آن از نظررنگ بر دوگونه است حالت اول سیاه متمایل به آبی و حالت دوم تا زمان رسیدن میوه همچنان سفید باقی می‌ماند گیاه مورد تحمل بالایی به شرایط خشکی و کم آبی دارد و ریشه آن دو تا چهار برابر عرض تاج گیاه رشد می‌کند (Mitrushi, 1955). مورد یکی از گیاهان دارویی مهمی است که در طب سنتی در بسیاری از نقاط جهان استفاده می‌شود. برگ و میوه آن به طور گسترده‌ای به عنوان یک طب عامیانه سنتی برای درمان بسیاری از اختلالات و بیماری‌ها استفاده می‌شود (Stewart, 2005). روغن مورد را می‌توان از برگ‌های آن استخراج کرد این روغن خاصیت دارویی داشته و در دمای اتاق مایع است. گیاه مورد می‌تواند موجب افزایش و یا کاهش فعالیت تیروئید بسته به شرایط فرد شود. میوه‌ها و برگ‌های گیاه ذکر شده خاصیت آنتی‌موتاژنیک و ضدالتهابی داشته و ضدعفونی کننده است و برای درمان عفونت‌های داخلی و موضعی استفاده می‌شود (Bonjar, 2004). مزیت اصلی دارویی گیاه مورد، اسانس آن می باشد که حاوی سینئول، میرتول، پینن، ژرانیول، لینالول و کامفن می‌باشد. در سال‌های اخیر پژوهشگران آلمانی و ایتالیایی ترکیبات آسیل فلوروگلوسینول‌ها را در گیاه مورد کشف کردند که خاصیت ضد سرطانی دارد. گیاه ذکر شده همچنین حاوی الیاف، قند و آنتی اکسیدان و بسیاری از ترکیبات بیولوژیک فعال می‌باشد. از اسانس گیاه مورد برای تولید داروهای طبیعی و از برگ‌های آن برای مصرف چای استفاده می‌شود. دردهه‌های گذشته اسانس شاخ وبرگ مورد استفاده‌ی گسترده‌ای در زمینه‌ی موادغذایی، موادگیاهی و همین‌طور درعطرسازی داشته است. این گیاه عموما از طریق بذر تکثیر می‌گردد. برخی از گزارشات حاکی از امکان تکثیر آن با قلمه نیز می باشد. در هر دو روش ذکر شده تکثیر گیاه مورد با دشواریهای عمده‌ای همراه است. دوره خواب طولانی بذر و تولید گیاهچه‌های کوچک و ضعیف از معایب تکثیر با بذر می‌باشد. درصد ریشه‌زایی پایین قلمه از عمده ترین محدودیتهای قلمه‌زنی آن است. مبحث کشاورزی مولکولی یکی از موضوعات نوین و کاربردی در حوزه ی کشاورزی است. کشت گیاهان جهت تولید پروتئین های نوترکیب ،آنزیم‌ها یا متابولیت‌های ثانویه با کاربردهای صنعتی و درمانی از طریق مهندسی ژنتیک، کشاورزی مولکولی نامیده می‌شود (Haque and Ghosh, 2013). امروزه تکثیر درون شیشه‌ای[1] یکی از جنبه های تجاری تکثیر انبوه بسیاری

[1] In vitro

از گیاهان بوده و روند رو به افزایشی دارد. کشت بافت و سلول‌ها در محیط کشت حاوی مواد غذایی به عنوان منبع تامین کننده مواد ارزشمند و باززایی از آن‌ها از کاربردهای بیوتکنولوژی می‌باشد و به عنوان روشی برای کاهش هزینه‌های تولید مورد استفاده قرار می‌گیرد. ریزازدیادی یکی از کاربردهای وسیع و عملی در بیوتکنولوژی گیاهی بوده که از آن طریق درآمدزایی بالایی قابل مدیریت است. کالوس‌زایی یکی از فرایندهای مهم کشاورزی مولکولی می‌باشد. یکی از مهمترین کاربردهای کشت بافت، ریزازدیادی و تکثیر سریع می‌باشد. در مقایسه با تکثیر به روش سنتی؛ ریزازدیادی از طریق کشت بافت با مزیت تکثیر سریع و یکنواخت از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. شرایط انکوباسیون محیط کشت از قبیل نور، دما و رطوبت نسبی از پارامترهای مهم در کشت محسوب می‌گردند. تکنیک درون شیشه‌ای مطلوب‌ترین روش برای جمع‌آوری، تکثیر و ذخیره ژرم پلاسم است. اولین گزارش مربوط به کشت بافت در گیاه دارویی مورد به سال ۱۹۹۴ توسط نوبر بر می‌گردد. عدم جوانه‌زنی به موقع بذر گیاه مورد به دلیل داشتن پوست سخت آن می‌باشد بنابراین به دست آوردن گیاه با ارزشمندی چون گیاه مورد به زمان زیادی نیاز دارد. با استفاده از تکنیک کشت بافت می‌توان زمان به دست آوردن گیاهان دارویی از جمله گیاه مورد را کاهش داده و در هر زمانی این گیاهان را قابل دسترس قرار داد. با این تکنیک گیاه مورد مطالعه عاری از ویروس و بیماری بوده و تولید سریع شمار زیادی از گیاه دارویی که از نظر ژنتیکی یکسان هستند، میسر خواهد بود. در این تحقیق امکان کشت بافت گیاه مورد با هدف کالوس‌زایی از بافت های مختلف آن در پاسخ به غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D بر روی پایه‌های بومی ایران بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه دارویی مورد از پژوهشکده‌ی فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان در پاییز ۱۳۹۵ تهیه گردید. بذور به مدت ۲۰ دقیقه در هیپو کلریت سدیم ۲٪(w/v) ، ۵ دقیقه در محلول آب اکسیژنه ۱۱٪ (v/v) و به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰٪ (v/v) ضدعفونی شدند. بذرها بعد از هر مرحله ۲ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به منظور شکستن خواب بذرها از اسید جیبرلیک، سرما، خراش‌دهی و قرار دادن در آب جوش استفاده گردید. سپس بذور استریل شده در محیط MS حاوی هورمون NAA درون پتری دیش‌ها کشت شدند. و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و دوره‌ی نوری ۱۶/۸ساعت تاریکی/روشنایی در زیر نور فلورسنت سفید ملایم بر روی قفسه نگهداری گردیدند. پس از گذشت ۴۰ روز و بعداز جوانه زدن، ریزنمونه‌های ریشه‌چه،ساقه‌چه وبرگچه از آنها تهیه شده و در محیط MS حاوی هورمون 2,4-D در چهار سطح (۰ ، ۱ ، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) قرارگرفت. برای تولید کالوس نیاز به رشد کافی گیاهچه‌های حاصل شده از آزمایش اول و گرفتن ریز نمونه از این گیاهچه‌های استریل بود. بعد از جوانه زنی بذور و تبدیل به دانهال[1]، از گیاهچه‌های رشد یافته، از برگ، ساقه و ریشه به طول ۵ میلی متر انتخاب شده و بر روی محیط کشت کالوس زایی قرار داده

[1] Seedlings

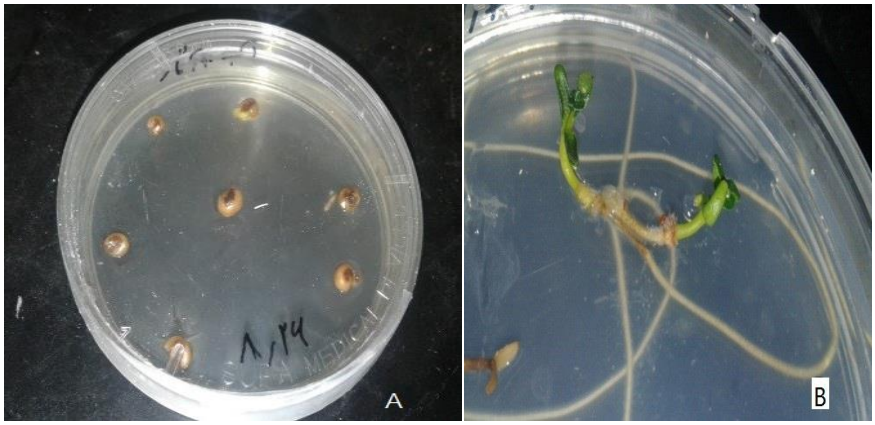
شدند. جهت کالزایی گیاه مورد از محیط MS استفاده شد. بعد از تهیه ی محیط موراشیک-اسکوگ pH آن در حدود ۵/۷ تنظیم شده و آگار به میزان ۱۰گرم جهت بستن محیط اضافه می‌شود. برای حل شدن آگار در محیط موراشیک-اسکوگ و همین طوراستریل شدن تمامی ترکیبات داخل آن محیط در دستگاه اتوکلاو تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از قرار گیری ریزنمونه‌ها در محیط موراشیک –اسکوگ تحت شرایط کنترل شده نوری و دمایی (متوسط دما ۲۵ درجه و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس) در اتاقک رشد قرار داده شدند. اتاقک رشد با دارا بودن قابلیت کنترل رطوبت و دما، نقش یک اتاقک کوچک کشت را بازی کرده و محیط مناسبی را برای رشد و نمو بهینه نمونه‌ها فراهم می‌کند. همه مراحل ذکر شده در اتاقک کشت انجام گرفت. این اتاقک مجهز به هود لامینار ایرفلو و دستگاه استریلایزر می‌باشد. داده های تحقیق در قالب آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار در سه سطح مورد تجزیه و تحلیل واریانس قرار گرفتند. ریز نمونه‌ها جهت کالوس زایی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول برای کالزایی به مدت ۱۵ روز در تاریکی تحت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از طی دوره‌ی تاریکی، تمامی کشت‌ها جهت رشد کالوس در روشنایی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زیر نور فلورسنت سفید ملایم نگهداری شدند. گروه دوم از ریزنمونه‌ها بدون قرار گرفتن در تاریکی، به طور مستقیم وارد گروس چنبر روشنایی شدند. بعد از حدود ۴ هفته از گرفتن ریزنمونه، اقدام به شمارش میزان کالوس‌زایی از ریز نمونه‌ها گردید.

نتایج

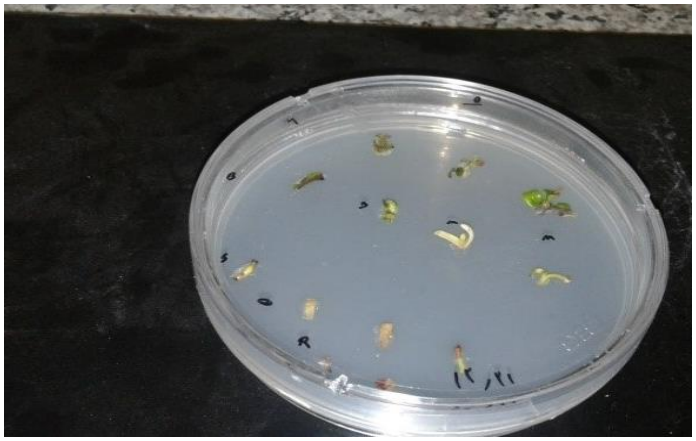
ریزنمونه‌های زیادی با اندازه‌های متفاوت جهت کالوس-زایی در محیط موراشیک-اسکوگ کشت شد و همین-طور برگچه‌هایی از گیاهان مورد از کلکسیون گیاهان دارویی پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی نیز جهت کالوس‌زایی مورد مطالعه قرار گرفت ولی میزان کالوس-زایی بسیار کمی در برداشت. همان گونه که در تصویر مشاهده می‌گردد بهترین بافت جهت کالوس‌زایی ریزنمونه برگچه است ومیزان کالوس‌زایی ساقه‌چه بیشتر ازریشه‌چه می‌باشد. درصد کالوس‌زایی با افزایش سطح هورمون افزایش می‌یابد. به طوری‌که میزان ۳ میلی‌گرم برلیتر هورمون 2,4-D تاثیر زیادی روی کالوس‌زایی ریزنمونه برگچه داشته است. کالوس‌زایی ریزنمونه برگچه، در مقایسه با سایر ریزنمونه‌های مورد استفاده (ساقه‌چه و ریشه‌چه) در گیاه دارویی مورد با شرایط کاملا یکسان محیطی (نور، مواد غذایی و هورمون) موفقیت چشمگیری داشت. به طور معمول ریزنمونه برگچه کشت داده شده در محیط موراشیک-اسکوگ فاقد هورمون 2,4-D بعد از گذشت سی روز، کالزایی محدودی را نشان داد. در حالی‌که ریزنمونه قرار گرفته در محیط MS حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر هورمون ذکر شده قدرت کالزایی زیادی داشته و استقرار آن نیز در محیط بالا بود. کالزایی این ریزنمونه در دو غلظت ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر تقریبا مشابه هم می‌باشد. موفقیت کالوس‌زایی ریزنمونه ساقه‌چه نسبت به ریزنمونه ریشه چه بیشتر می‌باشد. استقرار و موفقیت ریزنمونه ساقه‌چه در غلظت ۳ میلی گرم بر لیتر هورمون 2,4-D بیشتر از

سایر غلظت‌ها بوده و محیط فاقد هورمون معمولا توانایی کمتری در کالوس‌زایی ریزنمونه ساقه‌چه گیاه دارویی مورد به همراه داشته است. غلظت ۱و۲ میلی-گرم بر لیتر هورمون 2,4-D تقریبا نتایج مشابهی به دنبال داشته است. ریزنمونه ریشه‌چه نسبت به سایر ریزنمونه‌های استفاده شده در این آزمایش توانایی محدودی در تولید کالوس داشت. کالوس‌زایی این ریزنمونه در غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر نست به سایر غلظت‌ها بیشتر بود.

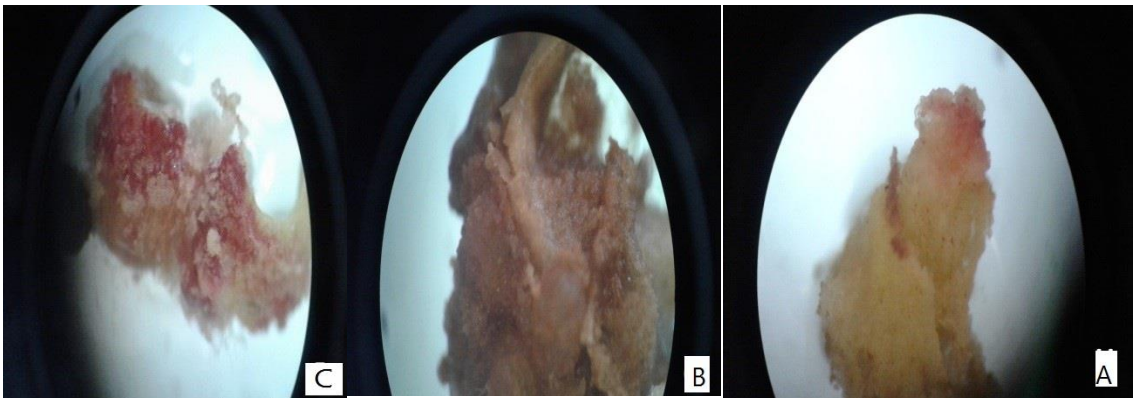
شکل ۱- A: بوته گیاه دارویی مورد، B: میوه گیاه دارویی مورد



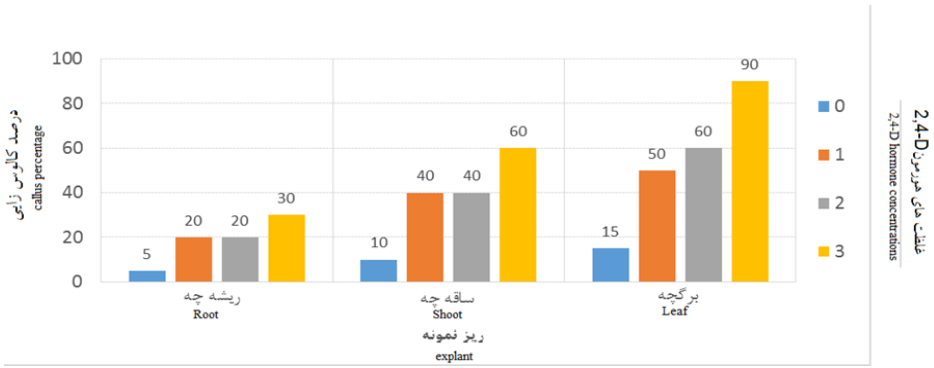
شکل ۲- A: قرارگیری بذر گیاه دارویی مورد در محیط MS ، B : جوانه‌زنی بذرگیاه دارویی مورد بعداز ۳۱ روز قرارگیری در محیط MS



شکل ۳- قرارگیری ریزنمونه‌های تهیه شده ازگیاه مورد در محیط MS حاوی هورمون2,4-D



شکل ۴- A: کالزایی ریزنمونه ی برگچه ی گیاه دارویی مورد در محیطMSحاوی هورمون2,4-D، B:کالزایی ریزنمونه‌ی ساقه چه‌ی گیاه دارویی مورد در محیط MS حاوی هورمون 2,4-D ،C:کالزایی ریزنمونه‌ی ریشه چه‌ی گیاه دارویی مورد در محیط MS حاوی هورمون 2,4-D



شکل ۵- نمودار مربوط به تغییرات کالوسزایی در ریزنمونه‌ها در واکنش به غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D

همان‌طور که از نمودار مشخص است، درصد کالزایی ریزنمونه برگچه در گیاه دارویی مورد در چهار سطح هورمونی ذکر شده بیش از سایر ریزنمونه‌های مورد استفاده است و همین‌طور غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون ذکر شده بیشترین درصد کالزایی را در سه ریزنمونه (برگچه، ساقه‌چه و ریشه‌چه) داشته است. همان‌طور که از نمودار مشخص است ریزنمونه ریشه‌چه کمترین کالزایی را به خود اختصاص داده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی بر گیاه مورد

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		قطر کالوس	وزن کالوس	درصد کالزایی
ریز نمونه	۲	۷۵۸/۵۴**	۵۱۸/۰**	۵۰۰۰/۰**
ترکیب هورمون	۳	۳۶۶/۸۶**	۸۶۴/۰**	۴۲/۱۱۵**
هورمون *ریزنمونه	۶	۹۴/۷**	۶۸/۰**	۷۵/۲۳**
خطا	۱۲	۷/۳۸	۳/۰	۴/۶۵
ضریب تغییرات (٪)	-	۶۹/۱۶	۸۹/۱۴	۶۶/۱۶

**اختلاف معنی دار در سطح ۱٪

برای تعیین بهترین ریزنمونه و تیمار هورمونی برای کالوس‌زایی، ابتدا نیاز به تجزیه‌ی واریانس است تا از وجود اختلاف معنی‌دار بین این فاکتورها اطمینان حاصل گردد. برای تجزیه‌ی واریانس از داده‌های نرمال شده استفاده گردید. برای این منظور از نرم افزار SPSS استفاده گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول آورده شده است. همان‌طور که جدول نشان می‌دهد، تنظیم کننده‌ی رشد گیاهی بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف گیاه مورد اثرات و تفاوت بسیار معنی-داری در سطح یک درصد داشته‌اند. هرچه میزان هورمون استفاده شده افزایش می‌یابد تاثیر مستقیمی بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف گیاه ذکر شده می‌گذارد.

بحث

همان‌طور که مشاهده گردید، بهترین ریزنمونه جهت کالوس‌زایی ریزنمونه برگچه و بهترین سطح هورمونی برای افزایش کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها سطح ۳ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D می‌باشد. ریزنمونه برگچه در غلظت شاهد (۰) کمترین میزان کالزایی را داشت. مطالعات نشان داده است که در حالت عدم حضور 2,4-D در محیط کشت، کالوس‌زایی صورت نمی‌گیرد (Khan et al., 2002) ولی با این حال درصد کوچکی از ریز نمونه‌ها در محیط فاقد از 2,4-D وارد کالوس‌زایی شدند. کاردوزا و استروارت (۲۰۰۳) بهترین محیط برای کالوس‌زایی را محیط MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم در لیتر از BAP معرفی کردند. خان و همکاران (۲۰۰۲) بهترین محیط را محیط MS به همراه ۲ میلی گرم در لیتر از هورمون 2,4-D معرفی کردند.

References

Bonjar GS (2004) Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. Fitoterapia 75**,** 231-235.

Canhoto JM, Lopes ML, Cruz GS (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). Plant Cell Tissue Organ Cult 57**,** 13-21.

Cardoza V, Stewart C (2003) Increased Agrobacterium-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. Plant Cell Rep 21**,** 599-604.

Flamini G, Cioni PL, Morelli I et al. (2004) Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy). Food Chem 85**,** 599-604.

Haque SM, Ghosh B (2013) High frequency microcloning of Aloe vera and their true-to-type conformity by molecular cytogenetic assessment of two years old field growing regenerated plants. Bot Stud 54**,** 46.

Hayder N, Abdelwahed A, Kilani S et al. (2004) Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 564**,** 89-95.

Khan MR, Rashid H, Quraishi A (2002) Effects of various growth regulators on callus formation and regeneration in Brassica napus cv. Oscar. Pak J Biol Sci 5**,** 693-695.

Lakshmi-sita G (1993) Micropropagation of Eucalyptus. In: Kluwer Academic Publisher, Netherlands. pp. 263-280.

McComb J (1986) Eucalyptus (*Eucalyptus* spp.). In: Biotechnology in agriculture and forestry. pp. 340-362.

McComb J, Bennett I, Tonkin C (1996) In vitro propagation of Eucalyptus species. University of New England, Armidale. pp. 112-156.

Mitrushi I (1955) Drurët e shkurret e Shqipërisë. Instituti i Shkencave, Tiranë. pp. 1-604.

Nobre J (1994) In vitro shoot proliferation of *Myrtus communis* L. from field-grown plants. Sci Hort 58**,** 253-258.

Ogur R (1994) A Review about myrtle (*Myrtus communis* L.). Cevre Dergisi 10**,** 21-25 (Abstract).

Parra R, Amo-Marco J (1998) Factors affecting in vitro shoot proliferation of *Myrtus communis* L.: A comparison of adult and seedling material. In Vitro Cell Dev Biol Plant 34**,** 104-107.

Scarpa GM, Milia M, Satta M (2000) The influence of growth regulators on proliferation and rooting of in vitro propagated myrtle. Plant Cell Tissue Organ Cult 62**,** 175-179.

Stewart D (2005) The chemistry of essential oils made simple: God's love manifest in molecules. Care publications.

Taylor R (1996) Lemon myrtle, the essential oil. Rural Res 172**,** 18-19.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 6, No 1, Spring & Summer 2020

A callus study of different explants of the medicinal Myrtle plant (*Myrtus communis* L.)

Nazila Bagheri[1], Bahram Maleki[1], Ali Ammarlou[2]

Abstract

The pharmaceuticals plant (*Myrtus communis* L.) is one of the most important medicinal plant species that consist of around 50 species of the Mediterranean basin. This plant is a perennial flowering shrubs or a small tree. The propagation of this plant is associated with certain difficulties due to its rigid crust. The low percentage of cuttings is one of the major limitations of cuttings approach propagation. The callogenesis is one of the important processes in molecular farming. For start of research the seeds were obtained from Zanjan University's Research Institute of Modern Biological Techniques. In this study, the effect of different concentrations of growth regulator 2 and 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at four levels on three types of leaf explants, shoots and roots. A factorial experiment based on a completely randomized design with three replications was studied on the Murashige - Skoog medium (MS). The onset of callus formation was observed after about one month. The color of calluses was often white to brown and red. The results showed that callus formation was higher in leaf explants by 90% compared to the other explants and the lowest percentage of callus belonged to root explants. Also, the relative amount of callus formation at leaf concentration of 1 mg / L was higher than other treatments but no significant differences were observed at hormonal levels of 1 and 2 mg / L 2,4-D. Due to the limited scientific reports on the tissue culture of this plant worldwide, and based on the available scientific reports available, the results of this study have been investigated on Iranian varieties as a first report.

Keywords: Medicinal plant, Myrtle, tissue culture, callus

[1] Department of Agriculture and Plant Breeding, University of Zanjan, Zanjan, Iran.* Corresponding author: bagheri5980@yahoo.com

[2] Assistant Professor, Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran.