دراسة تأثير بعض منظمات النمو وعدد الزراعات الثانوية في الإكثار الدقيق لنبات الزيزيفورا الطبي *Ziziphora canescens* Benth

عبد الكريم دقه[1] و محمد سليمان[2] و سليم زيد[3]

تاريخ الإيداع 2013/12/16
قبل للنشر في 2014/02/16

الملخص

يعدُّ النوع ***Ziziphora canescens*** **(*Ziziphora clinopodioides* Lam)** من النباتات الطبية المهمة في سورية لما يتمتع به من خصائص طبية مهمة كمضادات حيوية ومنكهات وتوابل في الأطعمة المختلفة. ونظراً إلى أهمية هذه النباتات وخاصة في الطب الشعبي في بعض المناطق (القلمون) من ناحية، ولتراجع مساحات انتشاره التي قد تؤدي بالنهاية إلى انقراضه من ناحية أخرى، فقد وُضع بروتوكول للإكثار السريع باستعمال تقانة زراعة الأنسجة النباتية؛ وذلك انطلاقاً من البراعم الجانبية والقمية على وسط MS المزود بأنواع وتراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية. أدى استعمال 0.1% من كلوريد الزئبق مدة دقيقتين إلى أفضل نسبة براعم حية وغير ملوثة وصلت إلى 80%. لم تكن الفروق معنوية بعدد النموات الناتجة من إضافة التوافقات 0.1 IBA + 0.1 BA (8 نموات) أو 0.1 Kin + 0.1 IBA (7.8)، في حين انخفض عدد النموات المتشكلة عند رفع تركيز السيتوكينينات BA وKin إلى 0.3, 0.6 و1 ملغ/ل. ازداد معدل الإكثار بتكرار الزراعة على الوسط نفسه وذلك مدة 7 أشهر إذْ كان أعلى عدد للنموات المتشكلة (14) و(14.3) عند الزراعة السادسة عند إضافة 0.1 ملغ/ل BA أو Kin بوجود 0.1 ملغ/ل IBA على التوالي، في حين كان عدد النموات المتشكلة (10) على الوسط MS من دون أي إضافات لمنظمات النمو عند الزراعة السابعة. أعطت النباتات أعلى نسبة تجذير 95% وعدد جذور 7.1 بوجود 1 ملغ/ل NAA مقارنة مع 2 ملغ/ل IBA بنسبة تجذير 90% وعدد جذور 5.8 جذراً بوجود 1 ملغ/ل IBA. وصلت نسبة النباتات الحية بعد مرحلة الأقلمة إلى 95%. تعدُّ هذه الدراسة الأولى للإكثار الدقيق للنوع ***Ziziphora canescens***.

الكلمات المفتاحية: منظمات النمو، الإكثار الدقيق، *Ziziphora canescens (Ziziphora clinopodioides* Lam)، الزراعة الثانوية.

[1] طالب دكتوراه، [2] و[3] أستاذ، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سورية.

Study the effect of some growth regulators and number of subcultures on micropropagation of medicinal plant *Ziziphora canescens* Benth

A. K. Dakah[(1)]; M. Suleiman[(2)] and S. Zaid[(3)]

Received 16/12/2013
Accepted 16/02/2014

ABSTRACT

***Ziziphora canescens* is a species of important medicinal plants in Syria due to its medicinal properties as antibiotic, flavors and spices in various foods. This plant is important, especially in folk medicine in some areas (Kalamoon) on the one hand, and retreat of its spread which may lead eventually to its extinction on the other hand, so a protocol for rapid micropropagation has been developing by using lateral and apical buds on nutrient media MS supplemented with different types and concentrations of plant growth regulators. The use of 0.1% mercuric chloride ($MgCl_2$) for two minutes gave a better percentage 80% of living and uncontaminated buds. The differences were not significant with a number of shoots that formed from adding the combination 0.1 BA + 0.1 IBA (8 shoots) or 0.1 Kin + 0.1 IBA (7.8 shoots) while the number of formed shoots decreased when increase concentration of BA and Kin to 0.3, 0.6 and 1 mg/ l. Multiplication Increased when repeat of culture on the same medium for 7 months, the number of formed shoots were 14 and 14.3 at the sixth subculture when adding 0.1 mg/ l BA or Kin with the presence of 0.1 mg/ l IBA, respectively, while the number of formed shoots were 10 on MS medium without any additions of growth regulators at seventh subculture. In the rooting stage the best percentage of rooting was 95% and number of roots was 7.1 on medium supplemented with 1 mg/ l NAA compared with 2 mg/ l IBA with the percentage of rooting was 90% and the number of roots was 5.8 with 1 mg/l IBA. The percentage of healthy and living plants after stage of acclimatization was 95%. The results contained in this research is the first study on the micropropagation of *Ziziphora canescens*.**

Keyword: Growth regulators, *In vitro* propagation, *Ziziphora canescens* (*Ziziphora clinopodioides* Lam), Subculture.

[(1)]PhD., Student, [(2), (3)] Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syria.

المقدمة

تنتشر نباتات الفصيلة الشفوية Lamiaceae على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم وتتنوع بيئات انتشارها وأماكنها فهي تتوزع في الأراضي العشبية والغابات والمناطق الساحلية والقاحلة والجبلية وتستعمل منذ القدم كمنكهات أو توابل في الأطعمة المختلفة، فضلاً عن استخدامها في الطب الشعبي لمعالجة الأمراض الهضمية والفيروسية (Khodaparast *et al*., 2007). ومن بين الأجناس التي تنتمي إلى هذه الفصيلة الجنس *Ziziphora* وهو من النباتات المهمة في سوريه لما يتمتع به من خصائص طبية، وينتشر في آسية خاصة وفي أوروبه وجبال الهيميلايا، ويضم 25 – 30 نوعاً من بينها النوع *Ziziphora canescens* Benth (*Ziziphora clinopodioides* Lam) وهو نبات طبي صالح للأكل تضاف سوقه وأزهاره وأوراقه لإعطاء النكهة في الطعام (Zargari, 1995)، كما تستعمل أجزاؤه الهوائية المجففة لمعالجة السعال ونزلات البرد (Verdian-rizi, 2008) وكذلك لمعالجة الاضطرابات الهضمية والالتهابات(Zargari,1997;Naghibi *et al*. 2005). وقد بينت العديد من الدراسات تأثير النبات كمضاد للبكتريا (Salehi *et al*., 2005; Sonboli *et al*.,2006) ومضاد للفطريات (Behravan *et al*.,2007) ومضاد للأكسدة (Meral *et al*., 2002; Salehi *et al*., 2005) ومضاد التهاب (Ghafari *et al*., 2006). وأشارت العديد من الدراسات إلى أن المواد الأكثر فاعلية في النوع *Z clinopodioides* هي: Pulegone، Iso menthone، menthol، 1,8-cineole menthone، thymol، p-cymene، carvacrol، terpinen-4-01 وLinalool (Kivanc and Akguel,1986; Baser *et al*.,1991).

تعدُّ سوريه غنية بالنباتات ذات الخصائص الحيوية المتنوعة، ويمتلك العديد من أنواع النباتات السورية دوراً مهماً في المجال الطبي والعلاجي، إذْ تشكل النباتات الطبية في الوقت الحاضر أحد المصادر الرئيسة للعقاقير ومصدراً للمواد الفعالة التي تدخل في تحضير الدواء على شكل خلاصات لإنتاج العديد من المركبات الكيميائية.

تؤدي زراعة الأنسجة النباتية دوراً مهماً في حفظ النباتات الطبية والصيدلانية وتحسينها وراثياً، إذْ يوجد ميل لتطوير زراعة النباتات في الأنابيب لاستعمالها كمصادر لمركبات فعالة بدلاً من زراعة النبات في الحقل (Karalija and Parić, 2011). إذْ يمكن زراعة الخلايا في شروط بيئية مضبوطة يمكن التحكم بها مستقلة عن التأثيرات المناخية، ومن ثمَّ إمكانية تحسين الإنتاج(Hakkinen and Ritala, 2010). كما يتطلب إنتاج مواد الاستقلاب الثانوية وجود منظمات النمو النباتية (Plant Growth Regulators) في وسط الزراعة (Zhong *et al*., 1996; Al-Sane' *et al*., 2005; Shilpashree and Ravishankar, 2009) إذ تؤدي منظمات النمو دوراً في زيادة انقسام الخلايا وإكثارها،

ومن ثمَّ يزداد إنتاج مركبات الاستقلاب الثانويــة (Kurz and Constabel , 1979; Staba , 1980). وقد ركزت معظم الدراسات على المستخلصات والزيت العطــري، وقــد درس (Khosravi *et al*., 2011) الفعالية المثبطة للزيوت الطيارة المستخلــصة مــن النباتــات الطبية ومنها النوع *Z. clinopodioides* لنمــو نــوعين مــن الفطريــات *Aspergillus fumigatus* و *A. flavus* وتبين فعالية الزيت العطري كمــضاد للأســبيرجيللوس anti-*Aspergillus* التي يمكن استعمالها مستقبلاً كمــواد مــضادة للفطريــات. كمــا قــارن (Ebrahimi *et al*., 2012) تركيز التربينات الموجــودة فــي الزيــت العطــري للنــوع *Z. clinopodioides* من مناطق مختلفة من إيران وتبيّن له وجود بعض الاختلافات فــي المركبات الأساسية وتركيزها بحسب البيئات المختلفة لانتشار النبات. أمَّا (Anzabi *et al*., 2013) فقد وجد أن الزيت العطري والمستخلص الميتانولي للنــوع *Z. clinopodioides* يمتلك تأثيرات مضادة للبكتريا كــالنوع *Staphylococcus epidermidis* و *Klebsiella pneumonia*، في حين لم يكن هناك تأثير في النوع *Pseudomonas aeruginosa*.

نظراً إلى أهمية النوع *Z. clinopodioides* الطبية وتناقص مساحة انتشاره في جبــال القلمون نتيجة استهلاك الموائل وتدميرها بسبب استغلال الأراضي غيــر الرشــيد الــذي سيؤدي في النهاية إلى فقد التنوع الوراثي لهذه الأنواع البرية المهمة، لابدَّ مــن التفكيــر بوسيلة تمكننا من حفظ النوع من الانقراض إذْ تبرز أهمية تقانة زراعة الأنسجة النباتيــة مخبرياً كحل فعال وسريع لإكثار مثل هذه النباتات وإعادة زراعتها في الطبيعة، كما توفر زراعة الخلايا النباتية، في الأنابيب إمكانية الحصول على المركبات الطبية المرغوب فيها وضمان الحفاظ على التنوع الحيوي (Coste *et al*., 2011).

من خلال الدراسات المرجعية التي قمنا بها لم توجد أي دراسة محلية أو عالمية عــن الإكثار الدقيق لهذا النوع؛ لذلك هدف البحث الحالي إلى وضع بروتوكول متكامل لإكثــار النبات بتقنية زراعة الأنسجة من خلال دراسة تأثير بعض منظمات النمــو فــي إكثــار وتجذير النبات، ومن ثمَّ حفظ النبات في الأنابيب وإعادة زراعته في أماكن انتشاره، كمــا دُرس تأثير عدد الزراعات الثانوية في الإكثار.

مواد البحث وطرائقه

نُفّذ هذا البحث في مختبر زراعة الأنسجة النباتية في قسم علم الحياة النباتيــة بكليــة العلوم في جامعة دمشق.

أولاً: المادة النباتية

استُخدمت في هذا البحث عينات نباتية جمعت من منطقة عسال الــورد فــي جبــال القلمون في حزيران 2012 الشكل (1-1)، وصُنّفت في قسم علم الحياة النباتية بكلية العلوم

في جامعة دمشق بمساعدة خبير التصنيف النباتي الدكتور عماد القاضي. إذْ عُـدّت هـذه العينات المادة الأولية للبدء بإكثارها.

يوجد النوع *Ziziphora canescens* في المناطق الجبلية المرتفعة، وهو عشب معمـر ذو قاعدة متخشبة تتفرع بشدة، طوله 10-40 سم، الأوراق صغيرة (5-6 مم) بيـضوية إلى مستطيلة، تجتمع الأزهار في رؤيسات انتهائية، الكأس أسطواني ضيق طوله 5-8 مم أسنانه قصيرة جداً تتقارب نهاياتها، التويج أبيض طوله يصل إلى مرة ونصف من طـول الكأس، تلتحم بتلاته الخمس في أنبوب يبرز قليلاً من الكأس ولا يلبث أن ينـشطر إلـى شفتين. يزهر النبات من حزيران – آب.

ثانياً: التعقيم السطحي

أحضرت النباتات من الحقل إلى المختبر وأخذت البراعم القمية والجانبية ووضعت في أوعية زجاجية وغسلت بالماء الجاري 30 دقيقة، ثم عقمت بمبيد فطري (بيليكوت) تركيزه 1% مدة 5 دقائق، وغسلت بالماء المقطر ثلاث مرات لإزالة آثار المبيد الفطري، نقلـت العينات النباتية إلى جهاز العزل Flow Laminar Hood واختبرت عدة معاملات للتعقيم بمحلول الكلوركس التجاري (% 10,20) المحتوي على هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl مدة 5 و10 دقائق لكل معاملة، وكلوريد الزئبق 0.1% مدة 1 و 2 دقيقة لكل معاملة، كما أضيفت عدة قطرات من محلول Tween 20 لخفض التوتر الـسطحي وزيـادة تمـاس الأجزاء النباتية مع مادة التعقيم، وغسلت العينات بعد ذلك بالماء المقطر ثـلاث مـرات ووضعت ضمن أوعية زجاجية معقمة.

ثالثاً: الزراعة الأولية للأجزاء النباتية

زُرعت 4 أجزاء نباتية (explant) معقمة في كل مرطبان على وسـط غـذائي MS (Murashig and skoog, 1962) يحتوي على أملاح معدنية وفيتامينـات وخاليـاً مـن منظمات النمو مضافاً إليها 3% سكروز، 0.7% آغار.

رابعاً: الإكثار الدقيق للبراعم

نقلت البراعم النامية بعد شهر من الزراعة التأسيسية إلى وسط MS يحتـوي علـى توافقات مختلفة من السيتوكينينات (الكينيتين Kin – البنزيـل أدنـين BA) والأوكـسينات (إندول بيوترك أسيد IBA). (جدول 1). جرت الزراعة بمعدل 40 برعماً لكل معاملـة، وكررت التجارب ثلاث مرات. أخذت النتائج من حيث عدد النموات الجديـدة المتـشكلة، وطول النموات بعد 4 أسابيع من الزراعة.

الجدول (1) توافقات منظمات النمو المستخدمة في عملية الإكثار (mg\1)

رمز الوسط	توافقات منظمات النمو		
	BA	Kin	IBA
MPM 1	0.1	-	0.1
MPM 2	0.3	-	0.1
MPM 3	0.6	-	0.1
MPM 4	1	-	0.1
MPM 5	-	0.1	0.1
MPM 6	-	0.3	0.1
MPM 7	-	0.6	0.1
MPM 8	-	1	0.1
MS	-	-	-

خامساً: دراسة تأثير عدد الزراعات الثانوية في إكثار النبات

دُرس تأثير عدد الزراعات الثانوية (Subcultures) في معدل زيادة عدد النموات الخضرية المتشكلة وذلك مدة سبعة أشهر، إذْ جُزّئت النموات الخضرية المتفرعة كل 4 أسابيع وأُعيدتْ زراعتها على ذات الوسط بعد أخذَ النتائج من حيث عدد النموات المتشكلة.

سادساً: تجذير النموات

نقلت البراعم السليمة والجيدة النمو بطول 3 سم إلى أوساط التجذير MS المحتوية على الأوكسينات (NAA-IBA) بتراكيز مختلفة (جدول 2). زرعت 4 براعم في كل مرطبان، وبمعدل 20 برعماً لكل معاملة، كررت التجربة ثلاث مرات. أخذت النتائج من حيث نسبة التجذير%، وعدد الجذور وطولها (سم) بعد 4 أسابيع من الزراعة.

الجدول (2) نوع الأوكسينات المستخدمة وتركيزها خلال مرحلة التجذير (mg\1)

رمز الوسط	تركيز الأوكسينات	
	IBA	NAA
RIM 1	0.5	-
RIM 2	1	-
RIM 3	2	-
RIM 4	-	0.5
RIM 5	-	1
RIM 6	-	2
MS	-	-

سابعاً: نقل النباتات المجذرة إلى الأصص وأقلمتها

نقلت النباتات التي اجتازت مرحلة التجذير من الأوعية الزجاجية إلى أصص تحتوي خليطاً معقماً من التورب والبرليت (1:2) وذلك بعد غسيل الجذور بالماء للتخلص من الآغار وتجنباً لنمو الفطريات. حيث حضنت في ظروف غرف النمو، وذلك مدة 4

أسابيع، وغطيت الأصص خلال هذه المدة بأكياس بلاستيكية شفافة من أجل المحافظة على الرطوبة العالية ومنع النبات من الجفاف وفقد الماء ومع بداية الأسبوع الثاني فُتحت الأكياس تدريجياً حتى أُزيلت تماماً نهاية الأسبوع الرابع. وسُمّدت النباتات خلال هذه المدة بمحلول MS 1\10، ثم نقلت بعد ذلك إلى النمو بشروط المختبر.

شروط الزراعة

ضُبط pH الوسط بين 5.8–5.7 قبل التعقيم وعقمت الأوساط الغذائية بجهاز الأوتوغلاف في درجة 121 درجة مئوية تحت ضغط 1 بار مدة 15 دقيقة. حضنت الزراعات في غرفة نمو Growth Room ومدة إضاءة 16 ساعة نهاراً وشدة إضاءة على مستوى النبات تقدر بـ 2000 لوكس.

التحليل الإحصائي

قُورنت النتائج وحُلّلت باستعمال البرنامج الإحصائي SPSS (ANOVA)؛ وذلك باستعمال اختبار Duncan عند مستوى المعنوية 0.05 وقد كررت التجارب ثلاث مرات.

النتائـــــج

أولاً: التعقيم السطحي والحصول على نموات خالية من التلوث

أظهرت النتائج التأثير الكبير لنوع المادة المستعملة في التعقيم وزمن المعالجة بها في التقليل من نسبة التلوث والحفاظ على أكبر نسبة من البراعم الحية، إذ أدى استعمال كلوريد الزئبق بتركيز 0.1% وزمن 2 دقيقة إلى الحصول على أعلى نسبة للبراعم الحية وغير الملوثة (80%)، في حين انخفضت هذه النسبة إلى 70% في زمن 1 دقيقة. أظهر هيبوكلوريت الصوديوم فعالية أقل من كلوريد الزئبق في التعقيم وقد وصلت أفضل نسبة للبراعم الحية وغير الملوثة إلى 65% عند استعمال هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 20% مدة 10 دقائق.

ثانياً: تأثير BA وKin بوجود IBA في إكثار النوع *Z. canescens*

أظهرت النتائج أن أفضل معدل للإكثار كان على الأوساط المحتوية تركيزاً منخفضاً (0.1 ملغ/ل) من البنزيل أدنين BA والكينيتين Kin، إذْ وصل عدد النموات إلى 8 بوجود BA و7.8 بوجود Kin ولم تكن الفروق معنوية بينهما، وقد تفوق معدل الإكثار على هذه الأوساط معنوياً على الوسط MS الخالي من منظمات النمو، وكذلك على باقي الأوساط المحتوية على تراكيز أعلى من BA وKin، كما تفوق معدل الإكثار على الأوساط المحتوية Kin معنوياً على معدل الإكثار على الأوساط المحتوية BA عند استعمال التركيز نفسه (0.3 و0.6 و1 ملغ/ل)، كما أظهرت النتائج أن عدد النموات كان 7.3 على

الوسط MS. حيث يتضح أن التركيز المنخفض فقط من السيتوكينينات شجع على زيادة النموات، ولكن ازدياد تركيز السيتوكينينات تدريجياً أدى إلى تناقص عدد النموات.

أمّا من حيث الطول فلوحظت زيادة في طول النموات المتشكلة على الوسط المحتوي على Kin أكثر من طولها على الوسط المحتوي BA عند التراكيز المرتفعة (0.6 و1 ملغ/ل)، في حين لم تكن الفروق معنوية عند التركيز (0.1 و0.3 ملغ/ل). أمَّا أفضل طول فكان 8.6 سم على الوسط MS وقد تفوق معنوياً على الأوساط جميعها المزودة بمنظمات النمو. (جدول 3). (الشكل 2,3 -1).

الجدول (3) تأثير توافقات منظمات النمو المستعملة للإكثار في متوسط عدد النموات الخضرية المتشكلة وطولها لنبات *z. canescens* بعد 4 أسابيع من الزراعة (المتوسط ±الخطأ المعياري SE)

رمز الوسط	تركيب الوسط	عدد النموات المتشكلة	طول النموات المتشكلة (سم)
MPM 1	0.1 BA + 0.1 ^{IBA}	**8± 0.11^{a}**	8.1± 0.096^{bc}
MPM 2	0.3 BA + 0.1 ^{IBA}	6.1± 0.147^{c}	7.9± 0.098^{c}
MPM 3	0.6 BA + 0.1 ^{IBA}	4.7± 0.074^{d}	7± 0.08^{e}
MPM 4	1 BA + 0.1 ^{IBA}	3± 0.117^{f}	6.2± 0.087^{f}
MPM 5	0.1 Kin + 0.1 ^{IBA}	**7.8± 0.088^{a}**	8.2± 0.065^{b}
MPM 6	0.3 Kin + 0.1 ^{IBA}	7± 0.091^{b}	8± 0.06^{bc}
MPM 7	0.6 Kin + 0.1 ^{IBA}	6.2± 0.132^{c}	7.5± 0.05^{d}
MPM 8	1 Kin + 0.1 ^{IBA}	4.2± 0.046^{e}	6.9± 0.078^{e}
MS	-	7.3± 0.033^{b}	**8.6± 0.072^{a}**

القيم ذات الأحرف المتشابهة في العمود ذاته غير مختلفة إحصائياً عند مستوى المعنوية 0.05 .

ثالثاً: تأثير عدد الزراعات الثانوية في معدل إكثار النوع *Z. canescens*

أظهرت النتائج ازدياد معدل النمو بازدياد عدد الزراعات الثانوية على الوسط المحتوي على BA وKin بتركيز (0.1 ملغ/ل) ليصل معدل الإكثار إلى 14 نمواً على الوسط المحتوي BA و14.3 نمواً على الوسط المحتوي Kin في الزراعة 6، في حين لوحظ انخفاض معدل الإكثار في الزراعة 7 ليصل عدد النموات إلى 12.8 و13.5 في الأوساط المحتوية على BA وKin على الترتيب. كما لوحظ نمو بعض الجذور للنموات بدءاً من الزراعة 4.

أظهرت النباتات المزروعة على الأوساط المحتوية على 0.3 و0.6 ملغ/ل من BA وKin تراجعاً في معدل الإكثار بدءاً من الزراعة الثانية، إذ لوحظ تفوق لنمو البراعم المزروعة وعدم استطالتها ثم ما لبثت البراعم أن بدأت بالتماوت وتساقط الأوراق في الزراعة رقم 6 و7 عند ارتفاع محتوى السيتوكينين إلى 1 ملغ/ل. أمَّا على الوسط MS فحافظت النموات على معدل إكثارها 7.5 نمواً حتى الزراعة 4 وازدادت بعد ذلك لتصل إلى 10 نموات في الزراعة رقم 7. (جدول 4). (الشكل 4, 5 -1).

الجدول (4) تأثير عدد الزراعات الثانوية في معدل الإكثار للنوع *Z. canescens* (متوسط عدد النموات ± الخطأ المعياري SE)

رمز الوسط	Sub1	Sub2	Sub3	Sub4	Sub5	Sub6	Sub7
	متوسط عدد النموات	متوسط عدد النموات	متوسط عدد النموات	متوسط عدد النموات	متوسط عدد النموات	متوسط عدد النموات	متوسط عدد النموات
MPM1	8± 0.192^{e}	9.5±0.246^{d}	11.1±0.216^{c}	12.3±0.309^{b}	13.2±0.2^{ab}	**14± 0.192**^{a}	12.8± 0.172^{b}
MPM2	6.1± 0.191^{a}	5.9±0.19^{a}	5.7±0.105^{a}	4.8±0.186^{b}	4.2±0.225^{bc}	3.6± 0.184^{cd}	3.1± 0.161^{d}
MPM3	4.7± 0.252^{a}	4.4±0.222^{ab}	4.3±0.231^{ab}	3.7± 0.105^{bc}	3.4±0.184^{cd}	3±0.205 ^{cd}	2.8± 0.172^{d}
MPM4	3± 0.178 ^{a}	2.8±0.092 ^{a}	2.6±0.112^{a}	2± 0.178^{b}	1.2±0.092^{c}	0.9±0.1^{cd}	0.5± 0.115^{d}
MPM5	7.8± 0.268^{e}	9.2±0.172^{d}	10.8± 0.186^{c}	11.9±0.204^{b}	13.6±0.245^{a}	**14.3± 0.252** ^{a}	13.5± 0.246 ^{a}
MPM6	7± 0.192 ^{a}	6.8±0.2^{ab}	6.4± 0.112^{abc}	6.1±0.176^{bc}	5.6±0.184^{cd}	4.9± 0.261^{de}	4.2± 0.258^{e}
MPM7	6.2± 0.258 ^{a}	5.9±0.176^{ab}	5.6± 0.184^{ab}	5±0.271^{bc}	4.4±0.234^{cd}	4±0.145^{d}	3.7± 0.193^{d}
MPM8	**4.2**± 0.268 ^{a}	4.1±0.307 ^{a}	3.7±0.252^{ab}	3.3±0.263^{ab}	2.8±0.186^{bc}	2.1±0.25 ^{cd}	1.5± 0.115^{d}
MS	7.3± 0.272^{c}	7.4±0.285^{c}	7.5±0.256^{c}	7.5±0.235^{c}	8.1± 0.191^{bc}	8.9± 0.362^{ab}	10±0.34 ^{a}

القيم ذات الأحرف المتشابهة في الصف ذاته غير مختلفة إحصائياً عند مستوى المعنوية 0.05

رابعاً: تأثير الأوكسينات NAA وIBA في تجذير النوع *Z. canescens*

أظهرت النتائج تفوقاً معنوياً لـ NAA على IBA عند التركيز ذاته المستعمل في المعاملات المدروسة جميعها. وقد وصلت أعلى نسبة للتجذير 95% ومتوسط عدد الجذور 7.1 في الأوساط المحتوية على1 ملغ/ل من NAA، في حين كانت أعلى نسبة تجذير 90% على الأوساط المحتوية على 2 ملغ/ل من IBA. كما لوحظ ازدياد عدد الجذور بزيادة تركيز الأوكسينات، ثم تناقص عند التركيز2 ملغ/ل. كما تفوقت الأوساط جميعها المحتوية على الأوكسينات بفروق معنوية على الوسط MS الخالي من منظمات النمو إذْ كانت نسبة التجذير قليلة جداً 5% وعدد الجذور 1.1 جذراً.

أمَّا من حيث الطول فكانت جميعها ذات طول جيد وصل إلى 10.5 و10.3سم على الوسط المحتوي على 1 ملغ/ل من NAA وIBA على الترتيب. وكان أصغر طول 7.1 سم على الوسط MS. (جدول 5). (الشكل 6, 7 -1).

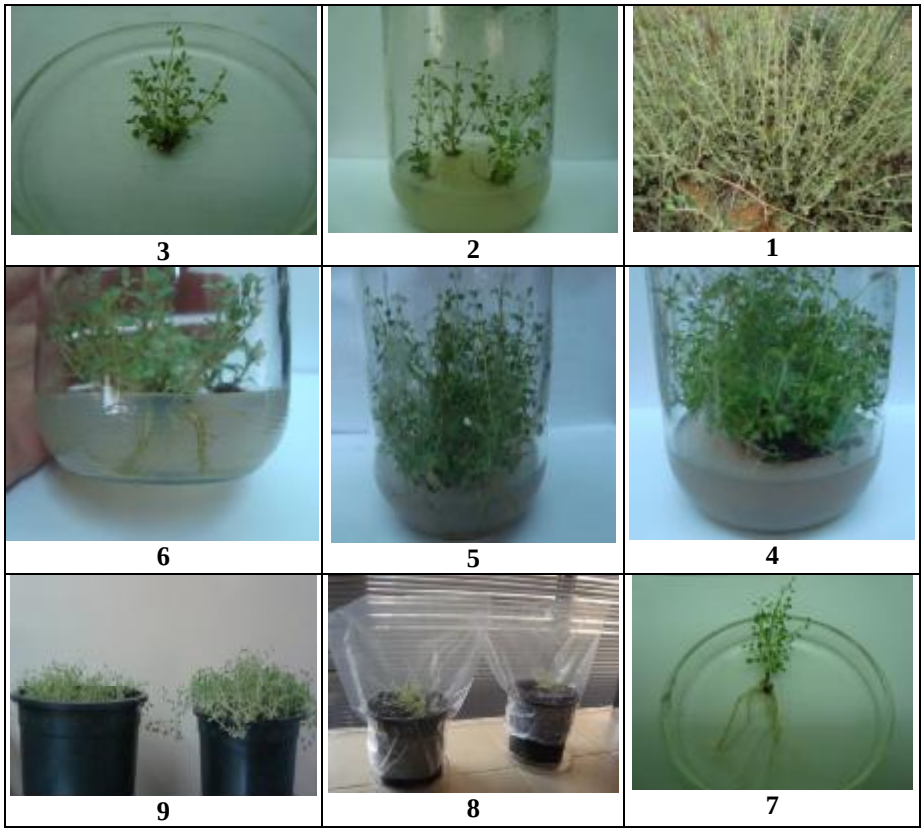
الجدول (5) مقارنة تأثير IBA وNAA في تجذير النموات الخضرية المتشكلة لنبات *z. canescens* بعد 4 أسابيع من الزراعة (المتوسط ± الخطأ المعياري SE)

رمز الوسط	تركيب الوسط	نسبة التجذير %	عدد الجذور المتشكلة	طول الجذور المتشكلة (سم)
RIM 1	0.5 ^{IBA}	80%	4.3± 0.118^{d}	8.2± 0.081^{d}
RIM 2	1 ^{IBA}	85%	5.8± 0.14^{bc}	10.3± 0.104^{a}
RIM 3	2 ^{IBA}	90%	3.9± 0.159^{d}	9.2± 0.103^{b}
RIM 4	0.5 ^{NAA}	85%	5.5± 0.179^{c}	8.8± 0.099^{bc}
RIM 5	1 ^{NAA}	95%	**7.1± 0.201**^{a}	**10.5±0.089**^{a}
RIM 6	2 ^{NAA}	90%	6.2± 0.179^{b}	9.1± 0.072^{b}
MS	-	5%e	1.1± 0.152^{e}	7.1± 0.03^{e}

القيم ذات الأحرف المتشابهة في العمود ذاته غير مختلفة إحصائياً عند مستوى المعنوية 0.05

خامساً: الأقلمة

وصلت نسبة النباتات التي اجتازت مرحلة الأقلمة إلى 95%، وكانت جميعها نامية بشكل جيد، ولوحظ تشكل تفرعات جديدة للنباتات في غرفة النمو، وكذلك عندما نقلت إلى النمو في شروط المختبر، كما لوحظ تأثير المجموع الجذري في سرعة نمو النباتات في الأصص، إذ ازداد النمو وعدد الأفرع بزيادة المجموع الجذري. (الشكل 9 ,8 -1).



الشكل (1) مراحل الإكثار الدقيق لنبات *Ziziphora canescens*.

(1) النبات في الطبيعة.
(2) إكثار النموات على الوسط (MS+ 0.1 Kin+ 0.1 IBA) بعد 4 أسابيع من الزراعة.
(3) إكثار النموات على الوسط (MS+ 0.1 BA+ 0.1 IBA) بعد 4 أسابيع من الزراعة.
(4) تأثير تكرار الزراعة في زيادة عدد النموات في الزراعة رقم 6 على الوسط (MS+ 0.1 Kin+ 0.1IBA).
(5) ظهور بعض الجذور في أثناء تكرار الزراعة على الوسط (MS+0.1BA+ 0.1 IBA) في الزراعة رقم 6.
(6) تجذير النموات على الوسط (MS+ 2 IBA) بعد 4 أسابيع من الزراعة.
(7) طول الجذور وعددها على الوسط (MS+ 1 NAA) بعد 4 أسابيع من الزراعة.
(8) أقلمة النباتات في غرفة النمو في أثناء الفتح التدريجي للأكياس بعد أسبوعين من بداية الأقلمة.
(9) نمو النبات في شروط المختبر؛ وذلك بعد 4 أسابيع من إزالة الأكياس بشكل كامل.

المناقشة

أولاً: التعقيم السطحي للنموات النباتية

تعدُّ عملية التعقيم من أهم المراحل التأسيسية المهمة لبدء العمل؛ وذلك للانطلاق من هذه النموات الخالية من الملوثات البكتيرية والفطرية في مرحلة الإكثار. تستعمل مواد عدَّة في عملية التعقيم السطحي ومنها كلوريد الزئبق، وهيبوكلوريت الصوديوم، والإيتانول والماء الأكسجيني وغيرها من المواد الكيميائية. أظهرت نتائجنا تفوقاً لكلوريد الزئبق على هيبوكلوريت الصوديوم من حيث التقليل من نسبة الملوثات والحفاظ على نموات حية، إذْ يعدُّ كلوريد الزئبق من المعقمات القوية (Gopal *et al*., 1998). وهذا ما توافق مع عدد من الدراسات منها دراسة (Srivastava *et al*., 2010) وقد بيّن تفوق كلوريد الزئبق 0.1% مدة 5 دقائق على هيبوكلوريت الصوديوم والماء الأوكسجيني عند تعقيم براعم النوع *Acontium heterophyllum*. كما أن (Dharmapalan *et al*., 2011) حصل على أفضل استجابة مع أقل كمية تلوث لبراعم النوع Jacob *Coleus vettiveroides* عند استعمال هيبوكلوريت الصوديوم 1.5% مدة 3 دقائق وكلوريد الزئبق 0.1% مدة 1 دقيقة. كما نلاحظ أن نجاح عملية التعقيم تتعلق بنوع العينات النباتية وعمرها ومدى تلوثها، وكذلك بتركيز المادة المعقمة وزمن المعاملة بها.

ثانياً: تأثير BA وKin بوجود IBA في إكثار النوع *Z. canescens*

تستعمل السيتوكينينات في وسط الإكثار لتنشيط نمو البراعم الجانبية (Nitsch *et al*., 1967; Jain and Ochatt, 2010). وتختلف متطلبات الأنواع النباتية من السيتوكينينات والأوكسينات اللازمة لتحريض عملية الإكثار واستمرارها فمنها ما يحتاج إلى مستويات عالية من السيتوكينيات مع مستويات منخفضة من الأوكسينات لزيادة نمو البراعم (Van Staden *et al*., 2008; Hashemabadi and Kaviani, 2010) وبالنسبة إلى نتائجنا فقد أعطى استعمال BA عدداً كبيراً من النموات بفروق غير معنوية مع Kin وذلك في الأوساط المزودة بالتركيز 0.1 ملغ/ل. أمَّا في الأوساط المحتوية على تركيز أعلى فتفوّق Kin على BA وتخالف هذه النتيجة العديد من الدراسات التي أشارت إلى تفوق BA على Kin؛ في مرحلة الإكثار (Faisal *et al*., 2006; Sanusi *et al*., 2008). كما أن التركيز العالي من BA، كان مثبطاً لتشكيل النموات أكثر من Kin، وتتوافق هذه النتيجة مع (Nordine *et al*., 2013) عند إكثار نبات Lange *Thymus hyemalis* إذْ انخفض لديه عدد النموات بزيادة تركيز Kin وBA وكان معدل الإكثار على الأوساط المحتوية على Kin، أفضل من تلك المحتوية على BA، كما تتوافق مع (Saha *et al*., 2010) عند إكثار النوع *Ocimum kilimandscharicum*، إذْ تفوق عدد النموات المزروعة على الأوساط المحتوية على Kin مقارنة مع BA عند التركيز 2 ملغ/ل. أمَّا بالتراكيز المنخفضة

1 و1.5 ملغ/ل فتفوّق عدد النموات بوجود BA على Kin. وفي دراسة لـ (Bonyanpour and Khosh-Khui, 2013) تفوق عدد النموات على الوسط WPM المزود بـ 5 ملغ/ل Kin على BA عند إكثار النوع L *Punica granatum*.

يتبيّن من خلال نتائجنا أن نجاح طرائق الإكثار الدقيق يتوقف على نوع منظمات النمو النباتية المستعملة وتركيزها، كما تبيّن إمكانية إكثار النبات على الوسط MS الخالي من منظمات النمو، إذْ أعطى معدلات عالية من الإكثار.

ثالثاً: تأثير تكرار الزراعات الثانوية في معدل الإكثار

ركزت معظم الدراسات على تأثير الوسط المغذي من حيث تركيز العناصر المعدنية وتركيز منظمات النمو النباتية ونوع السكريات وغيرها من العوامل المؤثرة في الإكثار، أمَّا تأثير عدد الزراعات الثانوية في إكثار البراعم ونموها فقد لاقت القليل من الاهتمام. مع العلم أن تكرار زراعة النبات على الوسط نفسه قد يزيد أو ينقص من معدل الإكثار (Nagakubo *et al*., 1997). واعتماداً على النتائج التي حصلنا عليها يمكن القول: إنَّ معدل الإكثار يتأثر بتركيز السيتوكينينات عند تكرار الزراعة على الوسط نفسه عدة مرات، إذْ لوحظ انخفاض في معدل الإكثار بدءاً من الزراعة 2 على الأوساط المحتوية على (0.3, 0.6, 1 ملغ/ل) من BA أو Kin. أمَّا الأوساط المحتوية على التركيز 0.1 ملغ/ل فلوحظ ازدياد في معدل الإكثار حتى الزراعة رقم 6، ثم انخفض بعد ذلك أمَّا الأوساط الخالية من منظمات النمو فلوحظ ازدياد في معدل الإكثار، ويتوافق مع (Corchete *et al*., 1997) وقد بيَّن أن بعض النباتات تتأثر خلال مراحل الإكثار بزيادة تركيز السيتوكينينات في الوسط، ومن ثمَّ من الممكن أن يؤدي ذلك إلى انخفاض في معدل الإكثار، كما تتوافق مع نتائج (Vujović *et al*., 2012) إذْ لاحظ انخفاض معدل الإكثار بشكل كبير بدءاً من الزراعة رقم 2 و3 خلال إكثاره لبعض أصول الكرز، وكذلك تتوافق مع (Senapati and Rout, 2008)، إذْ وجدوا ازدياداً في عدد النموات ليصل إلى أعلى معدل إكثار في الزراعة رقم 8، ثم تناقص في الزراعات اللاحقة حتى الزراعة رقم 12 عند إكثارهم نبات الورد Rosa. يتبيّن من هذه النتائج أن انخفاض معدل الإكثار مع زيادة تركيز السيتوكينينات ربما يعود إلى التأثير التراكمي لمنظمات النمو النباتية التي أدَّت دوراً مثبطاً للنمو.

رابعاً: تأثير NAA وIBA في تجذير النباتات في الزجاج

يعدُّ NAA وIBA من منظمات النمو النباتية التي تحث على تشكل الجذور، إذْ تضاف إلى وسط الزراعة إمَّا بمفردها أو بشكل توافقات (Gupta *et al*., 1981). وقد بيَّن (Danso *et al*., 2008) أن عدد الجذور على الأوساط المزودة بكل من NAA وIBA بتركيز 1 ملغ/ل أفضل من الأوساط المزودة بكل أوكسين بمفرده. كما بيَّن (دقه وآخرون،

2012) أن وجود الأوكسينات ضروري لتشكل الجذور وأن التجذير لم يحدث بغياب IBA عند تجذير الأصل GF-677. حصل (James, 1995) على نسبة تجذير 81% و71.4% عند استعمال IBA وNAA على الترتيب عند تجذير النوع *Lachenalia arbuthnotiae*، كما حصل (Faisal *et al*., 2006) على أفضل نسبة تجذير 87% و82% عند استعمال IBA وNAA على الترتيب عند تجذير النوع *Mucuna pruriens* .

بينت النتائج التأثير الواضح لإضافة الأوكسينات إلى وسط الزراعة مقارنة بالأوساط الخالية منها وهذا يخالف نتيجة (Zuzartea *et al*., 2010) إذْ حصل على نسبة تجذير 73.61% دون إضافة أي أوكسين إلى وسط الزراعة عند تجذير النوع *Lavandula pedunculata* من الفصيلة الشفوية. كما بينت نتائجنا أن NAA أكثر فاعلية من IBA من إذْ نسبة التجذير وعدد الجذور المتشكلة إذْ وصلت نسبة التجذير إلى 95% باستعمال 1 ملغ/ل NAA وعدد الجذور 7.1 جذر، وتتوافق هذه النتيجة مع (Nordine *et al*., 2013) حيث حصل على أفضل نسبة تجذير وعدد للجذور باستعمال NAA مقارنة مع IBA عند تجذير نوع الزعتر *Thymus hyemalis* Lange. كما تتوافق نتيجتنا مع (Rout, 2004) إذْ تفوق NAA على IBA في المعاملات المدروسة جميعها عند تجذير النوع *Clitoria ternatea*.

الاستنتاجات

يمكن الاعتماد على طريقة زراعة الأنسجة النباتية لإكثار النوع *Z. canescens* في الحصول على أعداد كبيرة بمدة زمنية قصيرة، وقد أمكن الحصول على أكثر من 512 برعماً انطلاقاً من برعم واحد بعد 3 أشهر من الزراعة. كما يمكننا الاعتماد على الوسط MS الخالي من منظمات النمو لإكثاره وتكرار زراعته مدةً طويلة، وهذا يعدُّ مهماً من الناحية الاقتصادية من أجل التقليل من تكاليف الزراعة النسيجية.

REFERENCES المراجع

دقه، عبد الكريم. زيد، سليم. محسن، وسيم. 2012. تأثير بعض منظمات النمو في إكثار وتجذير الأصل GF-677 (*Prunus persica* × *P.amygdalus*) في الزجاج. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية. 28:(2). 401 - 416.

Al-Sane, K. O. Shibli, R. A. Freihat, N. M. and Hammouri, M. K., 2005. Cell Suspension Culture and Secondary Metabolites Production in African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Jordan Journal of Agricultural Sciences*.1(1): 84-92.

Anzabi, Y. Aghdam, B. V. Makoui, H. M. Anvarian, M. and Mousavinia, N. M., 2013. Evaluation of antibacterial Properties of Edible Oils and Extracts of A Native Plant, *Ziziphora Clinopodioides* (Mountains' Kakoty), on Bacteria Isolated From Urinary Tract Infections. *Life Science Journal*. 10: 121-127.

Baser, K. H.C. Sezik, E. and Tumen, G., 1991. Composition of the essential oil of Ziziphora clinopodioides Lam. *J. Essential oil Res*. 3: 237-239.

Behravan, J. Ramezani, M. Hassanzadeh, M. K. Eskandari, M. Kasaian, J. and Sabeti, Z., 2007. Composition, antimycotic and antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil from Iran. *J Essent Oil-Bearing Plants*. 10:339-345.

Bonyanpour, A. and Khosh-Khui, M., 2013. Callus Induction and Plant Regeneration in *Punica granatum* L. from Leaf Explants. *Journal of Central European Agriculture*, 14(3), p.75-83.

Corchete, M. P. Fenning, T. Gartcand, L. S. and Valle, T., 1997. Micropropagation of *Ulmus* species (Elms). In *Biotechnology in Agriculture and Forestry. 39. High-Tech and Micro-propagation, V* (Baja, Y. P. S., d.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. pp.381-392.

Coste, A. Vlase, L. Halmagyi, A. Deliu, C. and 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 Tiss Organ Cult* . 106: 279–288.

Danso, K.E. Ayeh, K.O. Oduro, V. Amiteye, S. and Amoatey, H.M., 2008. Effect of 6-Benzylaminopurine and -Naphthalene Acetic Acid on *In vitro* Production of MD2 Pineapple Planting Materials. *World Applied Sciences Journal* 3 (4): 614-619.

Dharmapalan, B. Das, K.A. and Stalin, N. 2011. An efficient protocol for multiple shoot initiation in *Coleus vettiveroides* Jacob, medicinally important plant. Advanced biotech 10 (9): 34-36.

Ebrahimi, P. Mirarab-Razi, A. and Biabani, A., 2012. Comparative evaluation of the essential oil terpenoids in the stem and leaf of *ziziphora clinopodioides* in the regions of almeh and sojough of golestan province. *Iran. APTEFF*. 43, 283-291.

Faisal, M. Siddique, I. and Anis, M., 2006. In vitro rapid regeneration of lantlets from nodal explants of Mucuna pruriens – a valuable medicinal plant. *Annals of Applied Biology* (148): 1–6.

Ghafari, H. Yasa, N. Mohamadirad, A. and Dehghan, G., 2006. Protection by *Ziziphora clinopodioides* of acid-induced toxic bowel inflammation through reduction of cellular Lipid peroxidation and myeloperoxidase activity. *Hum Exp Toxicol*. 6:325-332.

Gopal, J. Minocha, L. J. and Dhaliwal, S. H., 1998. Microtuber-ization in Potato (*Solanum tuberosum* L.), *Plant Cell Reports*, Vol. 17, No. 10, 1998, pp. 794-798.

Gupta, P. K. Mascarenhas, A. F. and Jagannathan, V., 1981. Tissue culture of trees: clonal propagation of mature trees of Eucalyptus th citriodora Hook, by tissue culture. *Plant Science Letters*, 20: 195-201.

Hakkinen, T.S. and Ritala, A ., 2010. Medicinal Plant Biotechnology, Medicinal compounds produced in plant cell factories. ED. Rajesh Arora. 35.

Hashemabadi, D. and Kaviani, B., 2010. *In vitro* proliferation of an important medicinal plant Aloe- A method for rapid production. *Aus J. Crop. Sci.* 4 (4): 216-222.

Jain, SM. and Ochatt, S.J., 2010. Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. Springer Protocols. Humana Press.

James, R., 1995. in vitro rooting and greenhouse acclimatization of *Lachenalia* shoots. *Hortscience*. 30(6): 1304-1305.

Karalija, E. and Parić, A., 2011. The effect of BA and IBA on the secondary metabolite production by shoot culture of *Thymus vulgaris* L. *Biologica nyssana*. 2 (1): 29-35.

Khodaparast, H. Hosein, M. Sangatash, M. Najafi, H.R.K. Bagher, M. and Shahram, T.B., 2007. Effect of Essential Oil and Extract of *Ziziphora clinopodioides* on Yoghurt Starter Culture Activity. *World Applied Sciences Journal* 2 (3): 194-197.

Khosravi, A. R. Minooeianhaghighi, M. H. Shokri, H. Emami, S. A. Alavi, S.M. and Asili, J., 2011. The potential inhibitory effect of *cuminum cyminum*, ziziphora clinopodioides and nigella sativa essential oils on the growth of aspergillus fumigatus and aspergillus flavus. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 216-224.

Kivanc, M. and Akguel, A., 1986. Antimicrobial Activites of Essential oils From Turkish Spices and Citrus. *Flavoar and Fragnance J*. 1: 175-179.

Kurz, W. E. W. and Constabel, F., 1979. Plant cell cultures, a potential source of pharmaceuticals. *Advances in Applied Microbiology*. 25: 209-240.

Meral, G. E. Konyalioglu, S. Ozturk, B., 2002. Essential oil composition and antioxidant activity of endemic *Ziziphora taurica* subsp. cleonioides. *Fitoterapia*. 73:716-718.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.

Nagakubo, T. Takaichi, M. and Oeda, K., 1997. Micropropagation of *Allium sativum* L. (Garlic). In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. *39*. *High-Tech and micropropagation, V* (Bajaj, Y. P. S., ed.),. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg. pp. 3-19

Naghibi, F. Mosaddegh, M. Mohammadi, M. S. and Ghorbani, A., 2005. Labiatae Family in folk medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iran J. Pharm . Res*.; 2:63-79.

Nitsch, JP. Nitsch, C. Rossini, L.M.E. and Ha, D.B.D. 1967. The role of adenine on bud differentiation. *Photomorph* 17: 446-453.

Nordine, A. Bousta, D. El Khanchoufi, A. and El Meskaoui, A., 2013. An efficient and rapid *in vitro* propagation system of *Thymus hyemalis* lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region. *International Journal of Pharma Bioscience and Technology*. 1(3): 118-129.

Rout, R.G. 2004. Effect of cytokinins and auxins on micropropagation of *Clitoria ternatea* L. *Biol. Lett.*41(1): 21-26.

Saha, S. Dey, T. and Ghosh, P., 2010. Micropropagation of *Ocimum kilimandscharicum* guerke (Labiatae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 52(2): 50–58.

Salehi, P. Sonboli, A. Eftekhar, F. Nejad-Ebrahimi, S. Yousefzadi, M., 2005. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. rigida (BOISS.) RECH. f. from Iran. *Biol. Pharm. Bull.* 28:1892-6.

Sanusi, I.S. Odofin, W.T. Aladele, S.E. Olayode, M.N. Gamra, E.O. Fajimi O., 2008. *In vitro* culture of *Telfairia occidentalis* under different cytokininss and auxin combination. *African Journal of Biotechnology*. 7 (14): 2407-2408.

Senapati, K.S. and Rout, R.G., 2008. Study of culture conditions for improved micropropagation of hybrid rose. *HORT. SCI.* (PRAGUE), 35, (1): 27-34.

Shilpashree, H.P. Ravishankar, R., 2009: *In vitro* plant regeneration and accumulation of flavonoids in *Hypericum mysorense. International Journal of Integrative Biology*. 8: 43-49.

Sonboli, A. Mirjalili, M. H. Hadian, J. Ebrahimi, S. N. and Yousefzadi, M., 2006. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Ziziphor clinopodioides* subsp. bungeana (Juz.) Rech. f. from Iran. *Z Naturforsch* [C] 61:677-680.

Srivastava, N. Kamal, B. Sharma, V. Negi, K.Y. Dobriya, K.A. Gupta, S. and Jadon, S. V. 2010. Standardization of Sterilization Protocol for Micropropagation of *Aconitum heterophyllum*- An Endangered Medicinal Herb. *Academic Arena*, 2 (6): 62-66.

Staba, E. J., 1980. Plant Tissue Culture as a source of biochemicals.CRC Press, Boca Raton, Florida.

Van Staden, D. Zazimalora, E. and George, E. F., 2008. Plant growth regulators, II: cytokinins, their analogues and inhibitors. In: Plant Propagation by Tissue Culture (edn 3) (George EF, *et al* eds) Springer, pp 205-226.

Verdian-rizi, M., 2008. Essential Oil Composition and Biological Activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. From Iran. *Am.-Eurasian J. Sustain. Agric.*, 2(1): 69-71.

Vujović, T. Ružić, D.J. and Cerović, R., 2012. *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. *Hort. Sci. 39, 3: 101–107.*

Zargari, A., 1995. "Iranian Medicinal Plants," Vol. 4, Tehran University Press, Tehran, pp: 103-104.

Zargari, A., 1997. Iranian Medicinal Plants. 5th ed. Tehran: Tehran University Press; Vol. 4.

Zhong, J.J. Bai, Y. and 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.

Zuzartea, R.M. Dinis, M.A. Cavaleiro, C. Salgueiro, R.L. Jorge M. and Canhoto, M. J. 2010. Trichomes, essential oils and in vitro propagation of Lavandula pedunculata (Lamiaceae).*Industrial Crops and Products* 32: 580–587.