فصلنامه مطالعات محیط زیست، منابع طبیعی و توسعه پایدار
سال ششم، شماره ۳ (پیاپی: ۲۱)، پاییز ۱۴۰۱
ISSN: 2588-4255

اثر ترکیب سطوح مختلف D-۲،٤ و BAP در محیط کشت MS ٤/۱ بر برخی خصوصیات کالوس‌زایی قطعات گره‌دار شاخه فرعی میانی نسترن وحشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷
کد مقاله: ۷۹۳۱۶

محبوبه رحیمی[۱*]، وحید روحی[۲]، عبدالرحمان محمدخانی[۳]

چکـیده

پژوهش حاضر در راستای دست‌یابی به روش مناسب ریزازدیادی گیاه دارویی نسترن وحشی (Rosa canina L.) به‌عنوان مهم‌ترین پایه گل رز انجام‌پذیرفت. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور BAP با غلظت‌های (صفر، ۰/۷۵، ۱/۵، ۲/۲۵ و سه mgL-1) و D-۲،۴ با غلظت‌های (صفر، ۱/۵، ۲/۵، چهار و ۵/۵ mgL-1) در محیط‌کشت MS 1/4 در چهار تکرار (هر تکرار شامل دو ریزنمونه) انجام‌شد. نمونه‌ها در اواسط فصل پاییز از قسمت‌میانی ساقه‌های فرعی میانی درختچه‌ای در مرحله میوه‌دهی (قرمز پررنگ) تهیه‌شدند، قطعات‌گره‌دار ۱/۵ سانتی متری با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و سپس آب‌شویی شدند. نمونه‌ها در اتاق رشد در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد و دوره فتوپریودی ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. پس از گذشت سه ماه از تاریخ‌کشت و بدون انجام هیچ‌گونه واکشتی، آزمایش متوقف‌گردید. نتایج نشان داد؛ در محیط‌کشت MS ۴/۱، افزایش غلظت D-۲،۴ موجب افزایش دو شاخص وزن تازه و خشک کالوس و افزایش غلظت BAP موجب کاهش دو شاخص مذکور می‌شود. تیمار دارای ۲/۵ mgL-1 2,4-D به‌علاوه ۰/۷۵ mgL-1 BAP، تیمار دارای ۵/۵ mgL-1 2,4-D به‌علاوه ۲/۲۵ mgL-1 BAP و هم‌چنین تیمار دارای ۵/۵ mgL-1 2,4-D به‌علاوه ۰/۷۵ mgL-1 BAP بیشترین وزن تازه و خشک کالوس را داشتند. در ضمن، کالوس‌های به‌دست آمده دارای بافتی با سفتی متوسط (ترد)، ناصاف (گره‌دار) و به رنگ سفید برفکی آمیخته به سبز کم‌رنگ بودند، روی برخی از کالوس‌ها لکه‌های صورتی نیز مشاهده شد.

واژگـان کلـیدی: سفید برفکی، گیاه دارویی، لکه صورتی، وزن تازه، وزن خشک.

۱- دانشجوی دکتری علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس، تهران (نویسنده مسئول)
mahrahimi8@gmail.com
۲- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
۳- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۱- مقدمه

نسترن‌وحشی (*Rosa canina* L.)، مهم‌ترین پایه‌گل رز و گیاهی‌دارویی است. شش- بنزیل آمینو پورین (BAP) نوعی سیتوکینین مصنوعی است (Davies, 1980). با توجه به این که BAP تا حدی ارزان و مقاوم به شرایط اتوکلاو است، بیشترین کاربرد را در کشت‌بافت دارد. توفوردی به‌عنوان یک اکسین‌قوی کاربرد زیادی دارد. سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها آثار متقابلی دارند. اگر غلظت مناسب سیتوکینین‌ها همراه با اکسین‌ها در یک محیط‌کشت مورد استفاده قرار گیرد، تقسیم سلولی را به‌همراه خواهد داشت. اثر ترکیبات هورمونی اکسین و سیتوکینین بر کالوس‌زایی، به نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و هم‌چنین نوع ریزنمونه بستگی دارد (El-Baz *et al*., 2010). شاخص‌های متعددی برای ارزیابی کالوس‌ها وجود دارند که از جمله آنها می‌توان به وزن تازه، درصد وزن‌خشک، شمارش تعداد سلول، شاخص میتوزی و شاخص تنفس اشاره نمود (باقری و صفاری، ۱۳۷۶). لذا پژوهش‌حاضر به‌منظور بررسی اثر ترکیبی BAP و 2,4-D در محیط‌کشت 1/4MS بر برخی خصوصیات کالوس‌زایی نسترن وحشی صورت پذیرفت.

۲- مواد و روش‌ها

آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح‌پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور BAP با غلظت‌های (صفر، ۰/۷۵، ۱/۵، ۲/۲۵ و سه میلی‌گرم بر لیتر) و 2,4-D با غلظت‌های (صفر، ۱/۵، ۲/۵، چهار و ۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط‌کشت 1/4 MS در چهار تکرار (هر تکرار شامل دو ریزنمونه) انجام‌پذیرفت. نمونه‌ها در اواسط فصل‌پاییز از قسمت میانی ساقه‌های‌فرعی میانی درختچه‌ای در مرحله‌میوه‌دهی (قرمز پررنگ) تهیه‌شدند. قطعات‌گره‌دار ۱/۵ سانتی‌متری توسط محلول‌های‌اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک‌دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (۵/۲۵ درصد ماده مؤثره) به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل آب-شویی شدند. محیط‌کشت‌ها دارای pH ۵/۷–۵/۸ بودند. جهت تنظیم pH از سود ۰/۱ نرمال و اسید هیدروکلریک یک نرمال استفاده شد. برای هر ظرف‌کشت، مقدار ۴۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت در نظر گرفته‌شد که توسط اتوکلاو تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر در مدت ۲۰ دقیقه استریل‌شدند. ریزنمونه‌ها در شرایط کاملاً استریل به‌صورت افقی کشت‌گردیدند. سپس در اتاق رشد در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره فتوپریودی ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگه‌داری-شدند. پس‌از گذشت سه‌ماه از تاریخ‌کشت و بدون‌انجام هیچ‌گونه واکشتی، آزمایش متوقف‌گردید. شاخص‌هایی نظیر؛ وزن‌تازه و خشک کالوس اندازه‌گیری‌شد. وزن‌تازه با انتقال به ورق آلومینیومی وزن‌شده، سریع اندازه‌گیری‌شد. وزن‌خشک پس‌از گذشت ۴۸ ساعت قرارگیری در آون، تحت دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد ثبت‌گردید.

داده‌های صفر و کوچک‌تر از ۱۰، از طریق رابطه شماره یک نرمال‌سازی شدند (یزدی صمدی و همکاران، ۱۳۷۹).

$$Y=\sqrt{(X+0.5)} \qquad (۱)$$

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (version 9.2) SAS® و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از برنامه MSTAT-C و توسط آزمون LSD ($P<0.05$) انجام پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

BAP بر وزن تازه کالوس اثر معنی‌دار و بر وزن خشک آن اثر بسیار معنی‌دار داشت. 2,4-D و اثرات متقابل دو تنظیم‌کننده رشد مذکور بر صفات مورد آزمون دارای اثر بسیار معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر ترکیب سطوح مختلف 2,4-D و BAP در محیط‌کشت 1/4 MS بر برخی خصوصیات کالوس‌زایی قطعات گره‌دار شاخه فرعی میانی نسترن وحشی پس از گذشت سه ماه

منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تازه کالوس	وزن خشک کالوس
(A) 2,4-D	۳	۸۵/۷۳ **	۴/۰۲ **
(B) BAP	۳	۲۲/۳۶ *	۳/۳۳ **
(A) × (B)	۹	۳۱/۴۱ **	۲/۶۴ **
خطا	۴۸	۰۷/۱۵	۰/۶۵
CV (%)		۱۹/۳۰	۱۶/۱۳

**** اختلاف بسیار معنی‌دار در سطح یک درصد و * اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد**

بیشترین و کمترین وزن تازه و خشک کالوس به ترتیب متعلق‌به غلظت‌های ۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر و یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود. بیشترین وزن تازه متعلق‌به دو غلظت ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و کمترین وزن تازه متعلق‌به غلظت سه میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. بیشترین وزن خشک مربوط به غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر ترکیب سطوح مختلف 2,4-D و BAP در محیط‌کشت 1/4MS بر برخی خصوصیات کالوس‌زایی قطعات گره‌دار شاخه فرعی میانی نسترن پس از گذشت سه ماه

تیمارها		وزن تازه کالوس (mg)	وزن خشک کالوس (mg)
2,4-D(mg L^{-1})	۱/۰۰	۱۲۷/۸۸ c	۲۰/۳۷ c
	۲/۵۰	۲۴۴/۱۹ ab	۲۸/۶۹ ab
	۴/۰۰	۱۹۴/۷۵ b	۲۳/۴۴ bc
	۵/۵۰	۲۵۸/۷۵ a	۳۰/۸۷ a
BAP(mg L^{-1})	۰/۷۵	۲۵۲/۳۸ a	۳۲/۳۷ a
	۱/۵۰	۲۱۹/۲۵ a	۲۵/۷۵ b
	۲/۲۵	۱۹۱/۶۹ ab	۲۳/۰۰ b
	۳/۰۰	۱۶۲/۲۵ b	۲۲/۲۵ b

***: حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.**

بیشترین وزن تازه و خشک کالوس مربوط به تیمار دارای ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌علاوه ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. کمترین وزن تازه مربوط به گروه تیماری دارای یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌همراه ۰/۷۵، ۲/۲۵ و سه میلی‌گرم بر لیتر BAP و هم‌چنین مربوط به تیمار دارای چهار میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. کمترین وزن خشک نیز متعلق به تیماری دارای یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌همراه ۲/۲۵ و سه میلی‌گرم بر لیتر BAP و تیمار دارای چهار میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل ترکیب سطوح مختلف 2,4-D و BAP در محیط‌کشت 1/4 MS بر برخی خصوصیات کالوس‌زایی قطعات گره‌دار شاخه فرعی میانی نسترن پس از گذشت سه ماه

تیمارها			وزن کالوس (mg)	
2,4-D (mg L^{-1})	BAP (mg L^{-1})		تازه	خشک
۱/۰۰	۰/۷۵		۶۶/۵۰ g	۲۸/۵۰ bcd
۱/۰۰	۱/۵۰		۲۴۴/۰۰ bcde	۲۸/۵۰ bcd
۱/۰۰	۲/۲۵		۱۲۶/۵۰ fg	۱۵/۲۵ fg
۱/۰۰	۳/۰۰		۷۴/۵۰ g	۰۹/۲۵ g
۲/۵۰	۰/۷۵		۴۲۲/۵۰ a	۴۴/۵۰ a
۲/۵۰	۱/۵۰		۱۷۳/۲۵ def	۱۹/۷۵ def
۲/۵۰	۲/۲۵		۱۷۸/۲۵ cdef	۲۱/۷۵ cdef
۲/۵۰	۳/۰۰		۲۰۲/۷۵ bcdef	۲۸/۷۵ bcd
۴/۰۰	۰/۷۵		۲۱۶/۷۵ bcde	۲۳/۷۵ cdef
۴/۰۰	۱/۵۰		۲۴۵/۵۰ bcd	۲۸/۷۵ bcd
۴/۰۰	۲/۲۵		۱۴۰/۵۰ efg	۱۶/۲۵ efg
۴/۰۰	۳/۰۰		۱۷۶/۲۵ cdef	۲۵/۰۰ cde
۵/۵۰	۰/۷۵		۳۰۳/۷۵ abc	۳۲/۷۵ abc
۵/۵۰	۱/۵۰		۲۱۴/۲۵ bcdef	۲۶/۰۰ bcde
۵/۵۰	۲/۲۵		۳۲۱/۵۰ ab	۳۸/۷۵ ab
۵/۵۰	۳/۰۰		۱۹۵/۵۰ cdef	۲۶/۰۰ bcde

***: حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.**

به‌طور کلی رشد کالوس‌ها در ماه اول بسیار ناچیز و به‌صورت پراکنده بود. این مطلب با نتیجه تحقیقی در رابطه با باززایی رز از کالوس مطابقت داشت (ویشلقی و همکاران، ۱۳۸۹). در پایان بازه زمانی سه ماهه (بدون هیچ‌گونه عمل واکشت) اندام‌زایی و جنین‌زایی خاصی مشاهده نشد. زیرا در پایان این مدت، کالوس‌ها در مرحله رشد تصاعدی به‌سر می‌بردند و هم‌چنان در حال رشد بودند. در پژوهش حاضر، ۴۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت توانست تا سه ماه نیاز غذایی لازم برای کالوس‌زایی دو ریزنمونه را فراهم آورد. به‌طوری‌که، هر دو ریزنمونه دارای کالوس سالم و شاداب بودند. یک کشت کالوس که در شرایط خاص می‌تواند کاملاً در حالت پارانشیمی باقی بماند، فاقد عناصر آوندی است و یک نمونه مناسب برای مطالعه اثرات عوامل فیزیکی و شیمیایی مختلف بر تمایزیابی عناصر آوندی در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهد. این موضوع علاوه بر این‌که به اثر هورمون‌ها اشاره دارد به پایداری هورمون‌ها در محیط‌کشت و حساسیت بافت هدف نیز اشاره دارد.

اثر هورمون‌ها تنها به میزان جذب آنها از محیط‌کشت بستگی ندارد، بلکه به پایداری در محیط‌کشت، بافت‌های کشت شده و حساسیت بافت هدف نیز بستگی دارد. نقش BAP تحریک بیوسنتز سیتوکینین طبیعی در بافت‌هایی از گیاه می‌باشد. سیتوکینین‌ها باعث تحریک تقسیم سلولی می‌شوند (سادات نوری و همکاران، ۱۳۹۰). باید توجه داشت که هورمون‌های اضافه شده به محیط‌کشت، روی سنتز یا تجزیه هورمون‌های‌درونی نیز تأثیر می‌گذارند. نیاز بافت به اکسین و سیتوکینینی که از خارج به محیط اضافه می‌شود (Exogenous)، به میزان هورمون منتشر شده درون بافتی (Endogenous) بستگی دارد. هم‌چنین، به‌طور کلی، هیچ واکنشی را نمی‌توان به‌تنهایی نتیجه اثر یک هورمون منحصر به فرد دانست. در واکنش‌های هورمونی ممکن است یک هورمون، اثر هورمون دیگر را تشدید یا خنثی نماید (سید طباطبایی و امیدی،۱۳۹۰). بافت‌کالوس اغلب به‌طور ژنتیکی کنترل‌می‌گردد و ممکن است در هر شرایطی به‌دست آوردن یک پراکندگی خوب سلولی امکان‌پذیر نگردد. افزودن توفوردی باعث افزایش جدا شدن سلول‌ها در محیط‌کشت می‌گردد. از آنجا که، ریزنمونه دارای انواع مختلفی از سلول‌هاست، در نتیجه توده سلولی حاصل از آن هم غیر همگن است که نشانگر توانایی سلول‌های تشکیل‌دهنده آن برای ایجاد گیاه‌کامل یا یک اندام‌گیاهی است (سادات نوری و همکاران، ۱۳۹۰).

کالوس‌های به‌دست آمده در این پژوهش، دارای بافتی با سفتی متوسط (ترد) و ناصاف (گره‌دار) به رنگ سفید برفکی آمیخته به سبز کم‌رنگ بودند که روی برخی از کالوس‌ها لکه‌های صورتی رنگ نیز مشاهده شد. کشت در محیط دارای آگار اغلب باعث ایجاد بافت کالوس ترد و شکننده (Friable) می‌شود که برای کشت تعلیقی سلولی بسیار مناسب است (سادات نوری و همکاران، ۱۳۹۰). کالوس سبز حاوی کلروفیل است و کلروفیل‌دار شدن برای آغاز رویش ساقه ضروری است (عبدمیشانی، ۱۳۷۲). کالوس-های جنین‌زا متراکم‌اند و رنگ سفید (برفکی) و ساختار فشرده‌تری دارند (سادات نوری و همکاران، ۱۳۹۰).

Ghiorghita *et al.* (2012) تولید کالوس‌های سبزرنگ از محیط‌کشت MS حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D را گزارش نمودند. لذا کالوس‌های به‌دست آمده در این پژوهش با مشخصات اولیه کالوس‌های جنین‌زا و اندام‌زا مطابقت دارد، البته جهت دست‌یابی به نتایج بهتر، زمان و تحقیقات بیشتری لازم می‌باشد.

بُروز رنگ در اثر آنتوسیانین پدیده‌ای بس پیچیده است. آنتوسیانین‌ها در pH اسیدی قرمز هستند. تشکیل آنتوسیانین‌ها در گیاهان معمولاً با تجمع قندها در بافت‌های گیاهی همراه می‌باشد. هم‌چنین، سیتوکینین‌ها به‌طور غیر مستقیم در جمع‌آوری کربوهیدرات‌ها دخالت دارند. از طرفی، انتقال مواد معینی از قبیل توفوردی که اثر هورمون مانند روی گیاه دارد نیز از نزدیک با جریان قندها مربوط است. هر عامل محیطی از قبیل شدت زیاد نور، درجه‌حرارت کم، خشکی یا کمبود میزان ازت که مناسب افزایش محتویات قند در یک بافت گیاهی است، اغلب ساخته شدن آنتوسیانین را در آن بافت رونق می‌بخشد (لسانی و مجتهدی، ۱۳۸۱).

در مجموع؛ بهترین‌ترکیب‌تیماری برای افزایش میزان وزن تازه و خشک کالوس به‌ترتیب عبارتند از: تیمار دارای ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌علاوه ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، تیمار دارای ۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌علاوه ۲/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و تیمار دارای ۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌علاوه ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP (جدول ۳).

منابع

۱. باقری ع. و صفاری م. ۱۳۷۶. مبانی کشت بافت‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۰۶ صفحه.
۲. سادات نوری س. ا. میرمعصومی س. م. میرباقر ن. ۱۳۹۰. اصول‌کشت‌سلول‌وبافت‌گیاهی. جهاد دانشگاهی تهران.
۳. سید طباطبایی ب. ا. و امیدی م. ۱۳۹۰. کشت بافت و سلول گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران.
۴. عبدمیشانی س. ۱۳۷۲. بیوتکنولوژی گیاهی و اصلاح نباتات. اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات.
۵. لسانی ح. مجتهدی م. ۱۳۸۱. مبانی فیزیولوژی گیاهی. چاپ ششم. انتشارات دانشگاه‌تهران. ۷۲۶ صفحه.
۶. ویشلقی ن. جلالی جواران م. و معینی ا. ۱۳۸۹. باززایی رز مینیاتوری هفت رنگ *Rosa hybrida*,. cv 'Tanbakeda' از جنین‌های سوماتیکی. مجله علوم باغبانی ایران، دوره ۴۱، شماره ۴، صفحات ۳۴۵-۳۵۷.

۷. یزدی‌صمدی ب. رضایی ع. و ولی‌زاده م. ۱۳۷۹. طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی. دانشگاه تهران.
8. Davies D.R. 1980. Rapid propagation of roses in vitro. Scienthia Horticulture 13: 385-389.
9. El-Baz F.K., Mohamed A.A, and Ali S.I. 2010. Callus formation, phenolics content and related antioxidant activities in tissue culture of a medicinal plant colocynth. Nova Biotechnologica 10(2):79-94.
10. Ghiorghita G. Nicuta D. Maftei D.E. and Maftei I.D. 2012. Preliminary Data of the in vitro culture response of *Rosa canina* L. species. Analele Stiintifice ale Universitatii Alexandru Ioan Cuza, Sectiunea Genetica si Biologie Moleculara 13: 67-71.

Effect of combination of different levels of 2,4-D and BAP on a medium culture of 1/4 MS on some callus characteristics of nodals segment of Dog rose

M. Rahimi[1*], V. Rouhi[2], A. MohammadKhani[2]
1 PhD Student Dept. of Horticultural Sciences, Tarbiat modares University, Tehran- Iran.
2 Associate Professor Dept. of Horticultural Sciences, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

[*]*Corresponding Author:* mahrahimi8@gmail.com

Abstract

The present study was carried out in order to find a suitable method for micropropagation of *Rosa canina* L. as the most important rootstock of rose flower. The experiment was a factorial based on a completely randomized design with two factors BAP with concentrations (0, 0.75, 1.5, 2.5 and 3 mgL^{-1}) and 2,4-D with concentration (0, 1, 2.5, 4 and 5.5 mgL^{-1}) in four replicates (each replicate contains two samples). Samples were prepared in the middle of autumn from the middle part of the stems of the shrubs in the fruiting stage (red), nodal segments are 1.5 cm that with ethanol 70% for one minute and sodium hypochlorite 10% for 15 minutes and then washed. The samples were kept in a room at a temperature of 23 to 25 degrees Celsius and a photoperiod of 16 hours of light and eight hours of darkness. Since the growth of calluses in the first month was very slowly, after three months and without any reculture, the experiment was stopped. Results showed that increasing the concentration of 2,4-D increase fresh and dry weight of calluses and an increase in BAP concentration in the medium of 1/4 MS, two indices decreased. The treatment was 2.5 mgL^{-1} 2,4-D plus 0.75 mgL^{-1} BAP and treatment 5.5 mgL^{-1} 2.4-D, 2.25 mgL^{-1} BAP and also 5.5 mgL^{-1} 2,4-D plus 0.75 mgL^{-1} BAP had the highest fresh and dry callus weight. the calluses obtained had a medium with rigid (crunchy), lumpy (nodular) and white to white, some pink spots were observed on some calluses.

Keywords: White Flavor, Medicinal Plant, Pink Spot, Fresh Weight, Dry Weight.