DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2015.12218

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۲، صفحه ۱۹۱-۱۸۱ (۱۳۹۳)

بررسی ریزازدیادی و میزان فلاونوئید زالزالک (*Crataegus sp*) از طریق کشت بافت

زهرا مقیمی[۱] و عباس صفرنژاد[۲*]

۱- کارشناسی‌ارشد، گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و سرپرست مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شرق و شمال‌شرق کشور، پست الکترونیک: sebre14@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش:۱۳۹۳/۰۴/۰۲

چکیده

زالزالک (*Crataegus sp*) ازجمله گیاهانی است که جوانه‌زنی بذر آن به سختی انجام می‌شود. بنابراین هدف از این تحقیق تعیین محیط بهینه برای تکثیر گیاه زالزالک از طریق کشت‌بافت و مقایسه میزان فلاونوئید موجود در کالوس، برگ و میوه این گیاه بود. محیط‌های مورد استفاده شامل محیط‌کشت پایه B_5، MS و N_6 بود که همراه با تیمارهای هورمونی مختلف استفاده گردیدند. آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. براساس نتایج بدست آمده، بهترین تیمار برای سترون‌سازی جوانه‌ها محلول ۰/۰۲ درصد کلریدجیوه به‌مدت ۳ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۲ دقیقه و هیپوکلریت‌سدیم به‌مدت ۱۵ دقیقه شناخته شد. نتایج نشان داد که بهترین محیط برای القاء کالوس محیط N_6 همراه با ۷ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، بهترین محیط برای باززایی محیط B_5 همراه با ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و بهترین محیط برای پرآوری محیط MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بود. ریشه‌زایی تنها در محیط MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با فراوانی پایین مشاهده شد. نتایج نشان داد که میزان فلاونوئید برگ بیش از میوه و میزان فلاونوئید موجود در کالوس بسیار ناچیز است.

واژه‌های کلیدی: *Crataegus sp*، فلاونوئید، کشت بافت، هورمون‌های گیاهی.

مقدمه

زالزالک درختان یا درختچه‌های خزان‌کننده متعلق به خانواده گل‌سرخ می‌باشد. جنس کراتاگوس دارای ۲۰۰ گونه در سرتاسر جهان است (Donmez, 2004). براساس آخرین مطالعات این جنس در ایران دارای ۲۲ گونه و ۵ تیره است (Arjmandi *et al*., 2009). زالزالک امروزه در درمان ضایعات قلبی، گردش خون، آنژین قلبی، فشار خون بالا به‌ویژه ضدعفونی‌کننده‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها، تب‌بر، خواب‌آور و حل‌کننده سنگ‌های مجاری ادراری و قابض استفاده می‌شود (Emami *et al*., 2002؛ Omidbeygi., 2007؛ Kao *et al*., 2005). عصاره این گیاه غنی از فلاونوئیدها و اسیدهای هیدروکسی‌سینامیک است (Predrag *et al*., 2005). بیشتر محصولات حاصل از برگ و گل این گیاه براساس فلاونوئید تام آن استاندارد شده‌اند (Wieland *et al*., 2008).

زالزالک ازجمله گیاهانی است که جوانه‌زنی بذر آن به سختی انجام می‌شود و جوانه‌زنی آن ممکن است ۲ تا ۳ سال طول بکشد. بذر آن دارای پوسته چوبی بسیار سختی است. قلمه‌ها عمدتاً به سختی ریشه‌دار می‌شوند و برای القای ریشه‌زایی در آنها نیاز به داشتن دانش تخصصی در این زمینه می‌باشد (Phipps *et al*., 2003). از این‌رو از طریق کشت‌بافت می‌توان سریع‌تر آن را تکثیر نمود (Ebrahimie *et al*., 2003). ریزازدیادی از طریق کشت این‌ویترو جنبه مهمی از کاربردهای این تکنیک است که امروزه از آن در سطح وسیع برای تکثیر گونه‌های جنگلی، باغی و زینتی استفاده می‌شود. البته تحقیقاتی در زمینه کشت بافت زالزالک انجام شده است. در مطالعه‌ای Maharik و همکاران (۲۰۰۹) برای باززایی جوانه‌های شاخه‌های نابجای زالزالک از برگ‌های لپه زالزالک بر روی محیط‌کشت MS حاوی ترکیبات مختلف مثل بنزیل‌آدنین (BA) و نفتالین استیک اسید (NAA) استفاده کرده‌اند، به‌طوری‌که در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین درصد ریزنمونه‌ها (۴۵ درصد) و بیشترین تعداد (۷/۶۷±۰/۴) جوانه‌های شاخه در هر ریزنمونه گزارش شده است. در این‌خصوص Alamdari و Safarnejad (۲۰۱۰) در بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کشت بافت زالزالک (*Crataegus spp*) نشان داده‌اند که بیشترین میزان کالوس‌زایی به‌ترتیب در محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و نیز محیط MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ می‌باشد. همچنین Al- Manasrah (۲۰۱۲) گزارش کرده است که بیشترین پرآوری در گیاه زالزالک در محیط QL همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر زآتین و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده شده است. ریشه‌زایی در هیچ کدام از تیمارها دیده نشده است. البته محیط B5 و MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بهترین تیمار برای کالوس‌زایی شناخته شده است. در تحقیقی که Gok bunar (۲۰۰۷) بر روی کشت‌بافت زالزالک انجام داد، به این نتیجه رسید که تعداد ساقه‌های حاصل از هر ریزنمونه بر روی محیط‌کشت با سطوح بالای BA به‌طور معنی‌داری بالاتر از محیطی بود که دارای سطح پایینی از BA بود. نتایج حاصل از تحقیق Ghasemi Dehkordi و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که بیشترین سهم درصد فلاونوئیدها براساس هیپروزید مربوط به برگ *C. spontiea* و کمترین مقدار آن مربوط به میوه بود.

هدف از این پژوهش تکثیر سریع زالزالک به‌وسیله کشت بافت و اندازه‌گیری میزان فلاونوئید برگ و میوه زالزالک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر از گونه گیاهی زالزالک (*C. pontica*) جمع‌آوری‌شده از کلکسیون گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی استفاده گردید.

ضدعفونی: ریزنمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش شامل جوانه‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی بودند. برای تهیه ریزنمونه از مریستم انتهایی و مریستم جانبی شاخه‌های جوان در فصل بهار استفاده شد. پس از جداسازی کلیه برگ‌ها، شاخه‌ها به قطعاتی به طول ۳-۴ سانتی‌متر تقسیم شده و به‌مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفتند.

به‌منظور کاهش آلودگی‌های شدید باکتریایی، قطعات شاخه‌های دارای جوانه پس از شستشو با آب جاری به قطعات کوچکتر (هر قطعه دارای یک عدد جوانه) تقسیم شده و به‌منظور ضد عفونی کردن از محلول‌های مختلف ضدعفونی استفاده شد (جدول ۱).

باززایی: ریزنمونه‌ها از سرشاخه‌های ضدعفونی شده به اندازه ۱/۵-۱ سانتی‌متر جدا شده و به ظروف شیشه‌ای دارای محیط کشت شاخه‌زایی (جدول ۲) منتقل شدند و شرایط محیطی لازم برای رشد مهیا شد. طی دو هفته اول ریزنمونه‌های آلوده حذف شدند. به‌طوری‌که اولین باززایی پس از یک هفته ظاهر شد.

جدول ۱- تیمارهای ضدعفونی به‌کار برده شده در آزمایش

ردیف	تیمارهای ضدعفونی
۱	هیپوکلریت‌سدیم ۳٪ (۲۰ دقیقه)
۲	هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵٪ (۱۵ دقیقه) + اتانول ۷۰٪ (۳۰ ثانیه)
۳	کلرید جیوه ۰/۰۲ ٪ (۳ دقیقه) + هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵٪ (۱۵ دقیقه)
۴	کلرید جیوه ۰/۰۲ ٪ (۳ دقیقه) + اتانول ۷۰٪ (۲دقیقه) + هیپوکلریت ۱/۵٪ (۱۵دقیقه)

جدول ۲- محتوای هورمونی مربوط به محیط کشت شاخه‌زایی

علامت اختصاری	محیط پایه	محتوای هورمونی	علامت اختصاری	محیط پایه	محتوای هورمونی
G	B_5	BA(0.49 mg/L) + Kin(0.49 mg/L) +IAA(0.1 mg/L)	D	MS	BA(0.5mg/L)
P	N_6	BA(7 mg/L) + (1.5 mg/L) NAA	W	MS	BA(3 mg/L) + IBA(0.01 mg/L)
A	MS	(4 mg/L) BA + (1 mg/L) NAA	B	MS	(5 mg/L) BA + (2 mg/L) IBA
H	MS	(2 mg/L) BA + (0.01 mg/L) IBA	WH	MS	فاقد هورمون
N	MS	(1 mg/L) BA + (0.49 mg/L) IBA			

Murashig and Skoog (1962) : MS

جدول ۳- مقادیر هورمونی مربوط به محیط پرآوری

علامت اختصاری	محیط پایه	محتوای هورمونی
H	MS	BA(2 mg/L) +IBA (0.01 mg/L)
N	MS	BA(1 mg/L) + IBA(0.49 mg/L)
B	MS	BA(5 mg/L) + IBA(2 mg/L)
G	B_5	BA(0.49 mg/L) + Kin(0.5 mg/L) + IAA(0.1 mg/L)

پرآوری: در انتهای هر ماه شاخساره‌های جدید جدا شده و به محیط‌کشت جدید منتقل شدند. به‌این ترتیب تعداد نمونه‌ها به‌صورت تصاعدی افزایش یافتند (جدول ۳). این کار تا زمانی انجام شد که شاخساره کافی برای آزمایش‌های ریزازدیادی به‌دست آمد.

کالوس‌زایی: ریزنمونه‌ها از سرشاخه‌های ضدعفونی شده به‌وسیله اسکالپل به اندازه ۱-۱/۵ سانتی‌متر جدا و به ظروف شیشه‌ای دارای محیط‌کشت کالوس‌زایی (جدول ۴) منتقل شدند (تیمارهای هورمونی براساس گزارش‌های قبلی ارائه شده در مورد زالزالک و گیاهان نزدیک به این گونه انتخاب شد) و شرایط محیطی لازم برای رشد مهیا شد. زمان ظهور کالوس از جوانه یک هفته بعد از کشت مشاهده شد. به‌طور معمول هر ۲۵ تا ۲۸ روز یکبار نمونه‌ها واکشت گردید. واکشت‌ها نیز مانند کشت ریزنمونه‌های اولیه زیر هود استریل انجام شد.

جدول ۴- مقادیر هورمونی مربوط به محیط کالوس‌زایی

علامت اختصاری	محیط پایه	محتوای هورمونی
C	MS	BA(1.5 mg/L) + IAA(0. 1 mg/L)
J	MS	TDZ(4 mg/L)
P	N_6	BA(7 mg/L) + NAA(1.5 mg/L)
N	MS	BA (1 mg/L) + IAA(0.49 mg/L)

جدول ۵- مقادیر هورمونی مربوط به محیط ریشه‌زایی

علامت اختصاری	محیط پایه	محتوای هورمونی	علامت اختصاری	محیط پایه	محتوای هورمونی
۱	MS½	(0.1 mg/L) IBA	۷	MS	IBA(0.25 mg/L)
۲	MS½	(0.25 mg/L) IBA	۸	MS	(0.5 mg/L) IBA
۳	MS½	(0.5 mg/L) IBA	۹	MS	(1 mg/L) IBA
۴	MS½	(1 mg/L) IBA	۱۰	MS	(5 mg/L) IBA
۵	MS½	(0.2 mg/L) IBA	۱۱	MS½	بدون هورمون
۶	MS	(0.1 mg/L) IBA + (0.2 mg/L) NAA	۱۲	MS	بدون هورمون

ریشه‌زایی: پس از به‌دست آمدن بهترین تیمار برای شاخه‌زایی، شاخه‌هایی با طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر برای ریشه‌زایی در محیط‌های تیمارهای هورمونی مختلف مطابق جدول ۵ واکشت گردیدند.

دمای اتاق رشد در ۲±۲۵ درجه‌سانتی‌گراد و شدت نور در حدود ۵۰۰۰ لوکس تنظیم گردید. دوره نوری که در اتاق رشد اعمال گردید، شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود.

آزمایش‌های مربوط به کشت‌بافت در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها در نرم‌افزار Excel وارد شده و با نرم‌افزار آماری SAS تجزیه گردیدند. مقایسات میانگین به روش دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

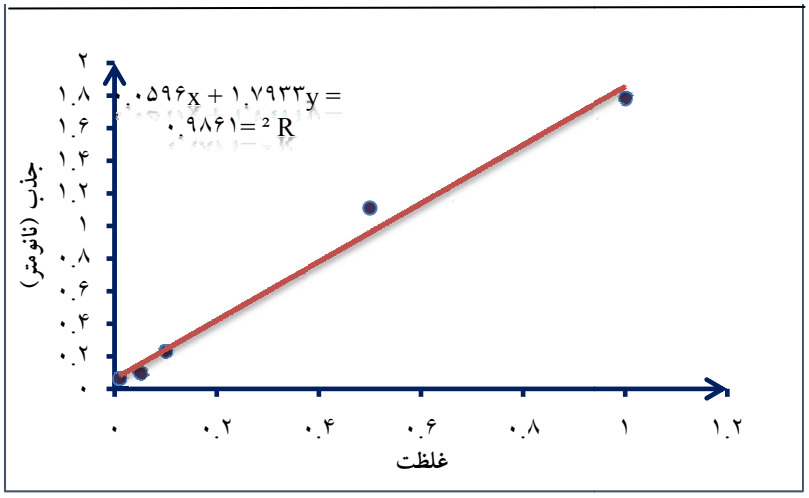
استخراج عصاره: ابتدا نمونه‌های برگ و میوه خشک شده با آسیاب به‌صورت پودر درآمدند. سپس برای استخراج به ۱۰ گرم پودر گیاه خشک شده، ۱۰۰ میلی‌لیتر (۱۰۰cc) متانول اضافه نموده و مخلوط حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر خوب همزده شد. سپس عصاره حاصل توسط کاغذ صافی و قیف بوخنر صاف شده و بر روی تفاله باقی مانده ۵۰ میلی‌لیتر متانول ریخته و به‌مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر خوب همزده شده و دوباره صاف و به عصاره اول اضافه گردید. در نهایت عصاره حاصل خشک و حلال‌زدایی شد.

تعیین مقدار کل فلاونوئید کالوس: سنجش فلاونوئید با استفاده از کوئرستین انجام شد. ۰/۵ میلی‌گرم کالوس در هاون چینی له گردید و بعد ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (v/v ۸۰۰ میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به آن اضافه و بر روی شیکر قرار گرفت تا خوب مخلوط شوند. سپس مخلوط حاصل به‌مدت ۴ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۰/۵ میلی‌لیتر از رسوب حاصل، ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآمونیوم ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول استات پتاسیم ۱ مولار اضافه شد. در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و محلول به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق

نگهداری شد، سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری قرائت شد. این آزمایش در ۳ تکرار انجام گردید.

تعیین مقدار فلاونوئید برگ و میوه: سنجش فلاونوئید با استفاده از کوئرستین انجام شد. بدین‌منظور از روش رنگ‌سنجی کلریدآمونیوم برای تعیین مقدار فلاونوئید کل عصاره برگ و میوه استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم از عصاره گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل شده و روی شیکر خوب هم‌زده شد. آنگاه ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی گیاهی را به‌صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآمونیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین متانولی تهیه شد و منحنی با نرم‌افزار Excel رسم گردید. سپس معادله خط y=bx+a به‌دست آمد. جذب‌های خوانده شده از نمونه‌ها به‌عنوان y در معادله فرض شد و مقدار x به‌دست آمده به‌عنوان غلظت در نظر گرفته شد. منحنی استاندارد کوئرستین (شکل ۱) و معادله خط رگرسیونی، که رابطه غلظت کوئرستین با جذب محلول را در طول موج ۴۱۵ نانومتر نشان می‌دهد، به‌صورت زیر بود. در این معادله y مقدار جذب و x مقدار ترکیب‌های فلاونوئیدی را براساس اکی‌والانت کوئرستین نشان می‌دهد.

$$Y= 1.79x + 0/06\ R^2 = 0.986$$



شکل ۱- منحنی استاندارد کوئرستین

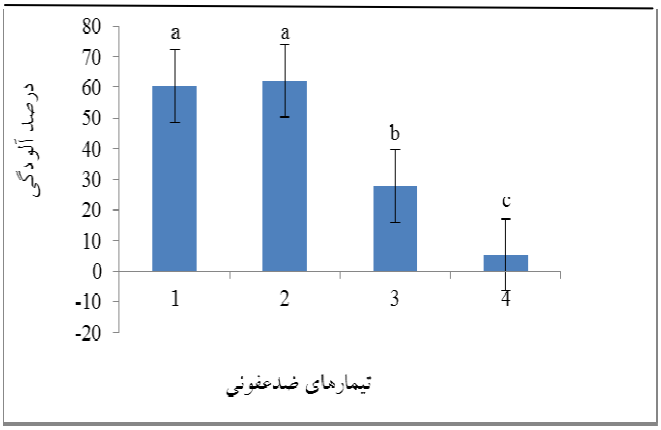
نتایج

ضدعفونی ریزنمونه‌ها: به‌منظور کاهش آلودگی و بهینه‌سازی روش سترون‌سازی از تیمارهای مختلف برای به‌دست آوردن بهترین روش ضدعفونی استفاده گردید. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد استفاده وجود دارد. نتایج حاصل نشان داد که تیمار ۴ یعنی کلرید جیوه ۰/۰۲ درصد (۳ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت ۳۰ درصد (۱۵ دقیقه) کمترین میزان آلودگی را نشان دادند (شکل ۲).

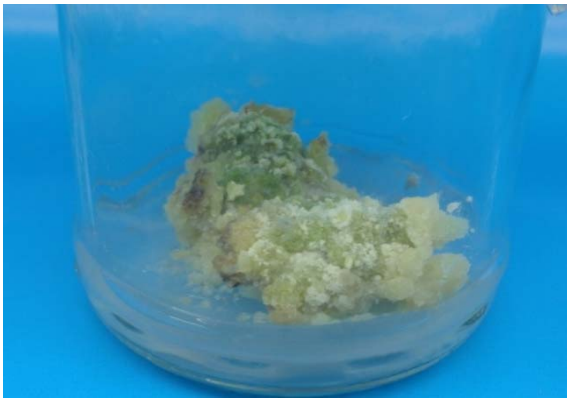
القای کالوس: کالوس‌زایی پس از حدود یک هفته (شکل ۳) با نسبت‌های مختلف در همه تیمارهای هورمونی مشاهده گردید.

نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای کالوس‌زایی نشان داد. مقایسه میانگین‌ها نشان

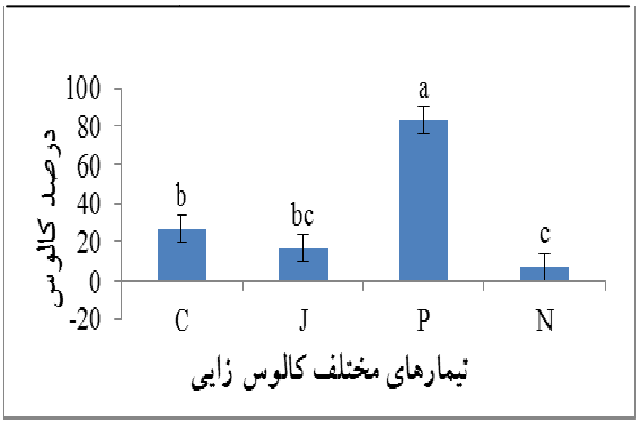
داد که بیشترین میزان القاء کالوس با میانگین ۸۳ درصد در محیط N_6 حاوی ۷ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید (شکل ۴).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای ضدعفونی



شکل ۳- کالوس‌های حاصل از واکشت در محیط کالوس‌زایی

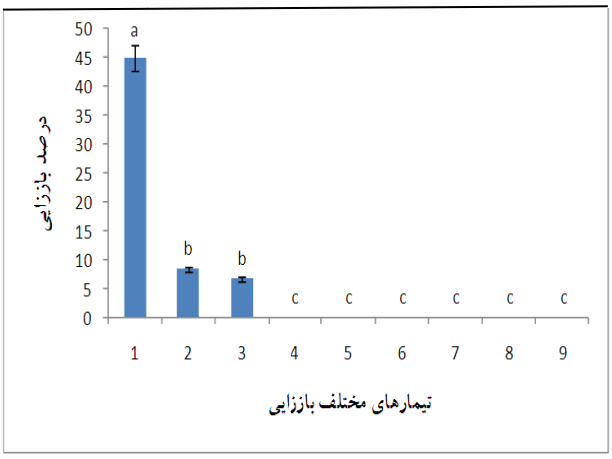


شکل ۴- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای مختلف کالوس‌زایی

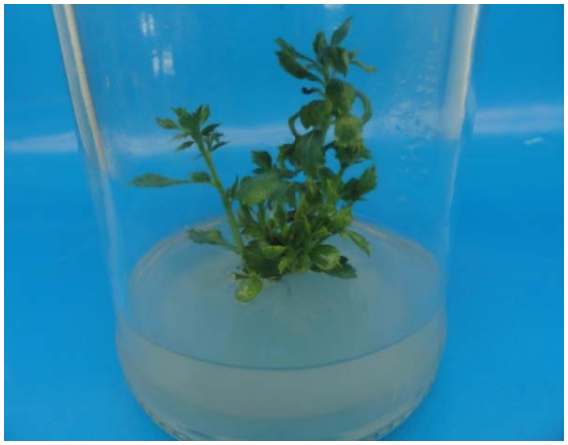
باززایی: پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های مختلف هورمونی برای باززایی، جوانه‌ها شروع به رشد کرده و پس از یک هفته شاخه تشکیل شد (شکل ۵). همچنین نتایج نشان داد که بهترین زمان برای باززایی ریزنمونه‌ها اول بهار بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بهترین محیط برای باززایی محیط B_5 حاوی ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA بود (شکل ۶).

پرآوری و میانگین تعداد شاخه: پس از کشت جوانه‌ها در محیط‌های حاوی غلظت‌ها و ترکیبات مختلف هورمونی شاخه‌زایی انجام شد (شکل ۷). نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای پرآوری بود.

شکل ۵- نمونه واکشت شده در محیط باززایی

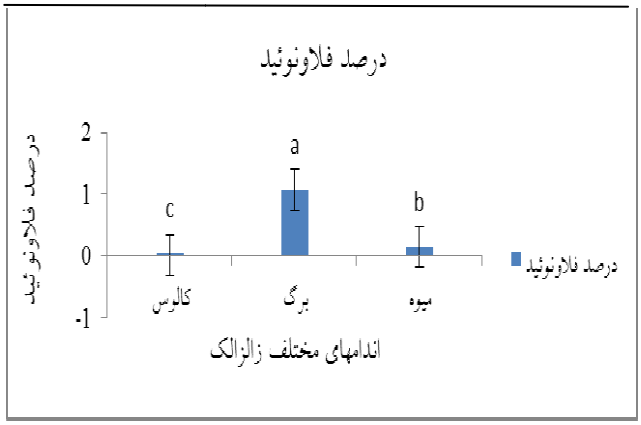


شکل ۶- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای باززایی



شکل ۷- نمونه‌های حاصل از پرآوری

شکل ۸- مقایسه میانگین تعداد شاخه تحت تأثیر تیمارهای هورمونی مختلف در ریزنمونه‌های زالزالک



شکل ۹- مقایسه میانگین درصد فلاونوئید اندام‌های مختلف زالزالک

در برخی ریزنمونه‌ها تعدادی شاخه به‌وجود آمد. با بررسی تیمارهای هورمونی مختلف مشخص شد که بهترین محیط برای تشکیل بیشترین تعداد شاخه (۸ عدد) محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بود (شکل ۸).

ریشه‌زایی: ریشه‌زایی با وجود انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های مختلف هورمونی، موفقیت‌آمیز نبود و فقط تعداد معدودی موفق به ریشه‌زایی در محیط MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر IBA شدند.

درصد فلاونوئید موجود در اندام‌های گیاهی: نتایج تجزیه واریانس درصد فلاونوئید موجود در بافت برگ، میوه و کالوس نشان داد که بین این سه بافت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین درصد فلاونوئید این سه بافت نیز نشان داد که برگ زالزالک در مقایسه با میوه و کالوس دارای میزان بالاتر (۱/۰۷ میلی‌گرم در گرم) و کالوس دارای کمترین میزان فلاونوئید (۰/۰۰۱ میلی‌گرم در گرم) در مقایسه با دو بافت دیگر بود (شکل ۹).

بحث

در زمینه تکثیر گیاه زالزالک با استفاده از روش‌های کشت بافت اطلاعات کمی وجود دارد. مهمترین منبع آلودگی در کشت‌بافت، ریزنمونه‌گیاهی می‌باشد، که باید قبل از قرارگرفتن در محیط‌کشت به خوبی ضدعفونی شود. استفاده از محلول هیپوکلریت‌سدیم به تنهایی بالاترین درصد آلودگی را (۶۰ درصد) از خود نشان داد و استفاده از کلریدجیوه ۰/۰۲ درصد، به‌طور قابل‌توجهی درصد آلودگی را پائین آورد. در تحقیقی Dai و همکاران (۲۰۰۷) برای ضدعفونی میان‌گره زالزالک (*C. pinnatifide*) ابتدا میان‌گره را با آب جاری شستشوی سطحی و در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و در کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه و درنهایت در آب مقطر استریل شستشو دادند. در تحقیقی که Kumar و همکاران (۲۰۰۲) بر روی

ریزازدیادی زالزالک (*C. ougeantha*) از طریق کشت‌بافت نوک شاخساره انجام دادند، از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه، کلریدجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۴ دقیقه و هیپوکلریت ۱۰ درصد به‌مدت ۴ دقیقه برای ضدعفونی استفاده کردند.

در تولید کالوس، مهمترین عوامل تأثیرگذار ترکیب هورمونی محیط‌کشت و مقادیر آنها می‌باشد. بالاترین درصد کالوس‌زایی در محیط پایه N_6 که نسبت هورمون سیتوکینین ۵ برابر اکسین بود، مشاهده شد. با توجه به نتایج کالوس-زایی ریزنمونه‌های زالزالک می‌توان نتیجه‌گرفت که محیط پایه N_6 در کالوس‌زایی به محیط MS برتری دارد و همچنین نسبت بیشتر سیتوکینین به اکسین کالوس‌زایی را در ریزنمونه‌های زالزالک افزایش می‌دهد. در بررسی‌های Alamdari و Safarnejad (۲۰۱۰) محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و نیز محیط MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ را به‌عنوان مناسب‌ترین ترکیب هورمونی برای کالوس‌زایی گیاه زالزالک معرفی نمودند. در تحقیق حاضر از این دو تیمار استفاده شد که در تیمار اول میزان کالوس‌زایی ۲۶ درصد و در تیمار دوم میزان کالوس‌زایی ۱۶ درصد مشاهده شد. همچنین Muna و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که در محیط حاوی مقادیر کم NAA و یا IBA به‌ویژه زمانی که در ترکیب با غلظت‌های بالای BA همراه هستند تشکیل کالوس اتفاق افتاده که با نتایج ارائه شده مطابقت دارد. در بررسی Maharik و همکاران (۲۰۰۹) تولید آنتوسیانین در کشت کالوس (*C. sinaica* boiss) نشان داده که بالاترین درصد کالوس‌زایی زالزالک بر روی محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4D و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin بود، که این مطلب با نتایج ارائه شده مغایرت داشت.

باززایی به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم انجام می‌شود. در روش مستقیم گیاهچه بطور مستقیم و بدون تشکیل توده سلولی تمایز نیافته کالوس به‌وجود می‌آید. در باززایی مستقیم، گیاه تولید شده مشابه گیاه والد بوده ولی در باززایی غیرمستقیم امکان بروز تغییرات ژنتیکی و عدم ثبات ژنتیکی وجود دارد. در این پژوهش فقط از باززایی مستقیم استفاده شده است. از سه محیط‌کشت پایه B_5، MS و N_6 برای باززایی استفاده شد. تیمار G که محیط‌کشت پایه آن B_5 و ترکیب هورمونی آن BA، Kin و IAA بودند و نسبت هورمون سیتوکینین ۱۰ برابر اکسین بود، بهترین محیط برای باززایی زالزالک شناخته شد. درصد باززایی در این تیمار ۴۵ درصد بود. در تحقیقی که Gokbunar (۲۰۰۷) بر روی کشت‌بافت زالزالک انجام داده است، به این نتیجه رسیده که تعداد ساقه‌های حاصل از هر ریزنمونه بر روی محیط‌کشت با سطوح بالای BA به‌طور معنی‌داری بالاتر از محیطی بود که دارای سطح پایینی از BA بود. این مطلب بعکس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بود. معمولاً با افزایش میزان هورمون BA میزان شاخه‌زایی در گیاهان افزایش می‌یابد. در مورد زالزالک نیز این امر صدق نمود، اما با افزایش میزان BA از ۱ میلی‌گرم در لیتر به بالا، میزان شاخه‌زایی ثابت و یا کاهش یافت.

تحقیقات انجام شده توسط Mahari و همکاران (۲۰۰۹)، نشان داد که بیشترین درصد باززایی جوانه زالزالک *C. cinaica* boiss در محیط کشت MS، حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA می‌باشد. در تحقیق حاضر بیشترین باززایی در محیط‌کشت B_5 حاوی ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده شد. همچنین Maharik و همکاران (۲۰۰۹) بالاترین پرآوری شاخه را در ۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بیان کردند.

از ۳ محیط N_6، B_5 و MS برای باززایی جوانه‌های زالزالک استفاده شد، که در محیط MS، شاخه‌زایی بسیار ناچیز (۸ درصد) و در تیمارهای دیگر هیچ باززایی مشاهده نشد. در محیط N_6 درصد باززایی ۶/۷۶ درصد مشاهده شد که نسبت هورمون سیتوکنین ۵ برابر اکسین بود. تحقیقات Dai و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان داد که محیط B_5 حاوی ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA، بهترین محیط برای باززایی زالزالک (*C. pinnatifida* Bge. Var. magor) می‌باشد، که به‌طور کامل با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.

عصاره گیاه زالزالک قسمتی از فلاونوئید و اسیدهای هیدروکسی‌سینامیک است (Predrag *et al*., 2005). بیشتر محصولات حاصل از برگ و گل این گیاه براساس فلاونوئید تام آن استاندارد شده‌اند (Wieland *et al*., 2008). نوع و درصد فلاونوئیدها نشانه کیفیت گیاه است (*et al*., 2006 Urbonaviciute).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که میزان فلاونوئید برگ بیش از میوه و میزان فلاونوئید موجود در کالوس بسیار ناچیز است. در مطالعات سیستماتیک شیمیایی زالزالک گرجی (*C.* C.koch *spontiea*) Ghasemi Dehkordi و همکاران (۲۰۱۲) از روش کروماتوگرافی لایه‌نازک عصاره زالزالک *C. oxyacantha* و *C. spontiea* برای اندازه‌گیری فلاونوئیدها استفاده کرده‌اند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده که بیشترین سهم درصد فلاونوئیدها براساس هیپروزید مربوط به برگ *C. spontiea* و کمترین مقدار آن مربوط به میوه بود، که با نتایج ما مطابقت داشت.در مطالعه‌ای Hemmati و همکاران (۲۰۰۷) تأثیر اقلیم و اندام‌های مختلف روی برخی فلاونوئیدهای درختچه سرخ‌ولیک را مورد بررسی قرار دادند. اندازه‌گیری فلاونوئیدها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شده است. براساس نتایج به‌دست آمده، در مورد میزان فلاونوئید کوئرستین در دو مکان اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به‌طوری که میزان کوئرستین در اندام گل سرخ‌ولیک در کلاردشت (۳۸ درصد) بیشتر از گرگان (۳ درصد) بود. به‌نحوی‌که بیشترین میزان روتین در برگ‌ها (۱۷ درصد) و در کلاردشت بیشتر از گرگان (۱۴ درصد) به‌دست آمد. درصد کوئرستین در گل‌ها بیش از برگ‌ها و میوه‌ها گزارش شده است. در این تحقیق نیز میزان کوئرستین موجود در برگ در مقایسه با میوه و کالوس بالاتر بوده و کمترین میزان فلاونوئید نیز در کالوس مشاهده شد. همین امر باعث می‌شود که میزان فلاونوئیدهای برگ در کالوس ناچیز و کمتر از برگ باشد. در تحقیقی Sepehrifar و Hassanlu (۲۰۰۹) برای اندازه‌گیری فلاونوئید قره‌قاط از روش آلومینیوم‌کلراید استفاده کرده‌اند. در این تحقیق میزان فلاونوئید برگ در مقایسه با میوه بیشتر بود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت.

جمع‌بندی

به‌طورکلی براساس این پژوهش، برگ به‌عنوان بهترین منبع فلاونوئید در گیاه زالزالک معرفی می‌شود. همچنین توصیه می‌شود برای کشت‌بافت زالزالک از ریزنمونه جوانه آن برای القاء کالوس، باززایی و تولید شاخساره استفاده شود. بهترین محیط برای القاء کالوس محیط N_6 همراه با ۷ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ بهترین محیط برای باززایی محیط B_5 همراه با ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA؛ و بهترین محیط برای پرآوری شاخه محیط MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بود. البته ریشه‌زایی تنها در محیط MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد.

منابع مورد استفاده

- Alamdari, S.B.L. and Safarnejad, A., 2010. Effect of growth regulators on tissue culture of hawthorn (*Crataegus* spp.). Proceedings of the Fifth National Conference on New Ideas in Agriculture. Esfahan, 66-69 P.
- Arjmandi, A.A., Nazeri, V., Ejtehadi, H. and Joharchi, M.R., 2009. Review of the genus *Crataegus* in the North East and East of Iran. Rostaniha, 10: 1-12.
- Dai, H., Zhany, Z. and Xiuwu, G., 2007. Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E. Br.). *In vitro* Cell. Developmental Biology/ Morphogenesis, 43: 2-8.
- Donmez, A.A., 2004. The genus *Crataegus* L. (Rosaceae) with special reference to hybridization and biodiversity in Turkey. Turkey Journa of Botany, 28: 29-37.
- Ebrahimie, E., Habashi, A.A., Ghareyazie, B., Ghannadha, M. and Mohammadie. M., 2003. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75: 19-25.

semi–dwarfing cherry rootstock. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59: 203-208.
– Murashig, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. Physiology Plant, 15: 473-497.
– Omidbeygi, R., 2007. Production and processing of medicinal plants. Volume I. Fifth edition with full review. Publication of Astan Quds Razavi. Mashhad, 347 pages.
– Phipps, J.B., O'kennon, R.C. and Lance, R.W., 2003. Hawthorn and medlars. Royal Horticulture Society, Cambridge, UK. 180 P.
– Predrag, L., Irina, P. and Uri, C., 2005. Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine. Journal of Ethnopharmacology, 101: 153-161.
– Sepehrifar, R., and Hasanlu, T., 2009. Evaluation of polyphenolic, anthocyanins compounds and total flavonoids and antioxidant properties of medicinal plant Cranberrey (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Collected from four different regions of Iran. Medicinal Plants, 9: 66-74.
– Urbonaviciute, A., Jakstas, V., Kornysova, O., Janulis, V. and Maruska, A., 2006. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) mthanolic extracts. Journal of Chromatography, 1112:339-344.
– Wieland, P., Christine, B. and Andreas, P., 2008. Variability of total flavonoids in *Crataegus* – Factor evaluation for the monitored production of industrial starting material. Fitoterapia 79: 6-20.
– Emami, A., Ardakani, M.Sh. and Naeeni, N., 2001. Recovery and Thrapei Plant. Rahe Kamal Publisher, 272 P.
– Gok Bunar, L., 2007. *In vitro* micropropagation of hawthorn (*Crataegus sp*). M.Sc. of Horticulture. Kahamanmaras Sutcu Imam University 42 p.
– Ghasemi Dehkordi, N., Ghannadi, A. and Khabbaz Mehrjerdi, A., 2012. Evaluation of macroscopic characteristics, chemical and using them in chemical systematic studies of *C. pontica* C.koch. Taxonomic and Biosystematics, 4: 53-62.
– Hemmati, Kh., Bashirisadr, Z., Barzali, M., and Kalati, H., 2007. Effect of climate and different organs on the flavonoids of red hawthorn shrubs. Journal of Agriculture Science and Natural Resources. 4: 151-161.
– Kao, E.S., Wang, C.J., Lin, W.L., Wang, C.P., and Tseng, T.H., 2005. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit of *Crataegus pinnatifida In vitro* and *In vivo*. J. Agric Food Chem., 53:430-436.
– Kumar, R. and Bist, L.D., 2002. Micropropagation of hawthorn (*Crataegus oxycantha* Linn.) through shoot tip culture. Indian Journal of Horticulture, 59: 435-439.
– Maharik, N., Elgengaih, S. and Taha, H., 2009. *In vitro* mass propagation of the endangered sinai hawthorn *Crataegus sinaica* Boiss. International Journal of Acadeemic. Research, 1: 24-28.
– Muna, A. S., Ahmad, A.K., Mahmoud, K. and Kalhout, A.R., 1999. *In vitro* propagation of a

Assessment of micropropagation and flavonoid content of hawthorn through tissue culture

Z. Moghimi[1] and A. Safarnejad[2*]

1. M.Sc. Medicinal Plants, Islamic Azad University of Karaj, I.R.Iran.
2*- Corresponding author, Assoc. Prof., Faculty member of Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, I.R.Iran. Email: Sebre14@yahoo.com

Received: 13.01.2014 Accepted: 23.06.2014

Abstract

Hawthorn (*Crataegus* sp.) is one of the plants, which suffers of low seed germination rate. Purposes of this research was evaluation of optimizing a medium for propagation of hawthorn and comparison of callus flavonoid, to that of leaf and fruit of the species. Media including MS, N_6 and B_5 supplemented by various plant growth regulators were used. The study was carried out based on a completely randomized design with 3 replicates. Flavonoid content was determined using a colorimetric (Aluminum Chloride) method. Results showed that mercuric chloride %0.02 for 3 min, ethanol %70 for 2 min and NaOCl for 15 min were the best treatments for sterilization. N_6 medium supplemented with 7 mg/L BA + 1.5 mg/L NAA was the best medium for callus induction. The most regeneration was observed in B_5 medium supplemented with 0.49 mg/L BA + 0.49 mg/L Kin and 0.1 mg/l IAA and MS medium supplemented with 1 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA was the best for multiplication. Rooting was observed only in MS medium supplemented with 1 mg/L IBA with low frequency. The results indicated that flavonoid content of leaf was more than fruit and flavonoid content of callus was very low.

Keywords: *Crataegus sp,* flavonoid, plant hormones, tissue culture.