

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

زهرا مقیمی^۱ و عباس صفرنژاد^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد، 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 شمال شرق کشور، پست الکترونیک: sebre14@yahoo.com

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

چکیده

زالزالک (*Crataegus sp*) از جمله گیاهانی است که جوانه‌زنی بذر آن به سختی انجام می‌شود. بنابراین هدف از این تحقیق تعیین محیط بهینه برای تکثیر گیاه زالزالک از طریق کشت بافت و مقایسه میزان فلاونوئید موجود در کالوس، برگ و میوه این گیاه بود. محیط‌های مورد استفاده شامل محیط‌کشت پایه MS، B₅ و N₆ 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 کلرید جیوه به مدت ۳ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه شناخته شد. نتایج نشان داد که بهترین محیط برای القاء کالوس محیط N₆ همراه با ۷ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، بهترین محیط برای باززایی محیط B₅ 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

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 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، آئزین قلبی، فشار خون بالا به‌ویژه ضد عفونی‌کننده‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها، تب‌بر،

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. spontia* 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*) جمع‌آوری شده 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 به مدت 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 ضد عفونی استفاده شد (جدول ۱).

باززایی: ریزنمونه‌ها از سرشاخه‌های ضد عفونی شده به اندازه ۱-۱/۵ 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. به طوری که اولین باززایی پس از یک هفته ظاهر شد.

زالزالک از جمله 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 کشت بافت می‌توان سریع‌تر آن را تکثیر نمود (Ebrahimie et al., 2003). ریزازدیادی از طریق کشت این ویترو 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 بنزیل آدنین (BA) و نفتالین استیک اسید (NAA) استفاده کرده‌اند، به طوری که در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین درصد ریزنمونه‌ها (۴۵ درصد) و بیشترین تعداد ($7/67 \pm 0/4$) جوانه‌های شاخه در هر ریزنمونه گزارش شده است. در این خصوص Safarnejad و Alamdari (۲۰۱۰) در بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کشت بافت زالزالک (*Crataegus spp*) نشان داده‌اند که بیشترین میزان کالوس‌زایی به ترتیب 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 کشت بافت زالزالک انجام داد، به

جدول ۱- تیمارهای ضد عفونی به کار برده شده در آزمایش

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

جدول ۲- محتوای هورمونی مربوط به محیط کشت شاخه زایی

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)

منتقل شدند (تیمارهای هورمونی براساس گزارش‌های قبلی ارائه شده در مورد زالک 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. به طور معمول هر ۲۵ تا ۲۸ روز یکبار نمونه‌ها واکشت گردید. واکشت‌ها نیز مانند کشت ریزنمونه‌های اولیه زیر هود استریل انجام شد.

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

کالوس زایی: ریزنمونه‌ها از سرشاخه‌های ضد عفونی شده به وسیله اسکالپل به اندازه ۱-۱/۵ سانتی متر جدا و به ظروف شیشه‌ای دارای محیط کشت کالوس زایی (جدول ۴)

جدول ۴- مقادیر هورمونی مربوط به محیط کالوس‌زایی

محتوای هورمونی	محیط پایه	علامت اختصاری
BA(1.5 mg/L) + IAA(0.1 mg/L)	MS	C
TDZ(4 mg/L)	MS	J
BA(7 mg/L) + NAA(1.5 mg/L)	N ₆	P
BA (1 mg/L) + IAA(0.49 mg/L)	MS	N

جدول ۵- مقادیر هورمونی مربوط به محیط ریشه‌زایی

محتوای هورمونی	محیط پایه	علامت اختصاری	محتوای هورمونی	محیط پایه	علامت اختصاری
IBA(0.25 mg/L)	MS	۷	(0.1 mg/L) IBA	MS ^{1/2}	۱
(0.5 mg/L) IBA	MS	۸	(0.25 mg/L) IBA	MS ^{1/2}	۲
(1 mg/L) IBA	MS	۹	(0.5 mg/L) IBA	MS ^{1/2}	۳
(5 mg/L) IBA	MS	۱۰	(1 mg/L) IBA	MS ^{1/2}	۴
بدون هورمون	MS ^{1/2}	۱۱	(0.2 mg/L) IBA	MS ^{1/2}	۵
بدون هورمون	MS	۱۲	(0.1 mg/L) IBA + (0.2 mg/L) NAA	MS	۶

اضافه نموده و مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر خوب هم‌زده شد. سپس عصاره حاصل توسط کاغذ صافی و قیف بوختر صاف شده و بر روی تقاله باقی مانده ۵۰ میلی‌لیتر متانول ریخته و به مدت 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 به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۰/۵ میلی‌لیتر از رسوب حاصل، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آمونیوم ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول استات پتاسیم ۱ مولار اضافه شد. در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق

ریشه‌زایی: پس از به دست 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 درجه سانتی‌گراد 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.

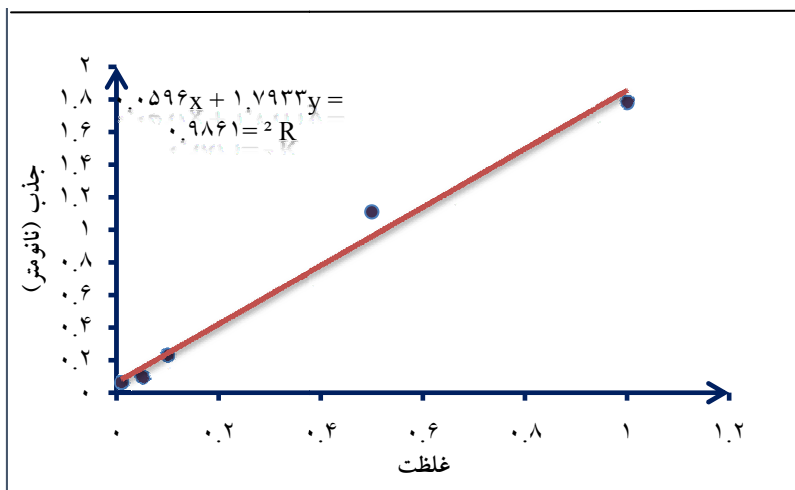
آزمایش‌های مربوط به کشت‌بافت در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها در نرم‌افزار Excel وارد شده و با نرم‌افزار آماری SAS تجزیه گردیدند. مقایسات میانگین به روش دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

استخراج عصاره: ابتدا نمونه‌های برگ و میوه خشک شده با آسیاب به صورت پودر درآمدند. سپس برای استخراج به ۱۰ گرم پودر گیاه خشک شده، ۱۰۰ میلی‌لیتر (۱۰۰cc) متانول

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. به این منظور از روش رنگ سنجی کلرید آمونیوم برای تعیین مقدار فلاونوئید کل عصاره برگ و میوه استفاده شد. ابتدا ۰/۵ گرم از عصاره گیاهی در ۱۰ میلی لیتر متانول حل شده و روی شیکر خوب هم زده شد. آنگاه ۰/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی گیاهی را به صورت جداگانه با ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر کلرید آمونیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس

محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین متانولی تهیه شد و منحنی با نرم افزار Excel رسم گردید. سپس معادله خط $y=bx+a$ به دست آمد. جذب‌های خوانده شده از نمونه‌ها به عنوان y در معادله فرض شد و مقدار x به دست آمده به عنوان 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 می دهد، به صورت زیر بود. در این معادله y مقدار جذب و x مقدار ترکیب‌های فلاونوئیدی را بر اساس اکی والانت کوئرستین نشان می دهد.

$$Y = 1.79x + 0.06 \quad R^2 = 0.986$$



شکل ۱- منحنی استاندارد کوئرستین

اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت ۳۰ درصد (۱۵ دقیقه) کمترین میزان آلودگی را نشان دادند (شکل ۲). القای کالوس: کالوس زایی پس از حدود یک هفته (شکل ۳) با نسبت‌های مختلف در همه تیمارهای هورمونی مشاهده گردید. نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی داری را بین تیمارهای کالوس زایی نشان داد. مقایسه میانگین‌ها نشان

نتایج

ضد عفونی ریزنمونه‌ها: به منظور کاهش آلودگی و بهینه سازی روش سترون سازی از تیمارهای مختلف برای به دست آوردن بهترین روش ضد عفونی استفاده گردید. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین تیمارهای مورد استفاده وجود دارد. نتایج حاصل نشان داد که تیمار ۴ یعنی کلرید جیوه ۰/۰۲ درصد (۳ دقیقه) +

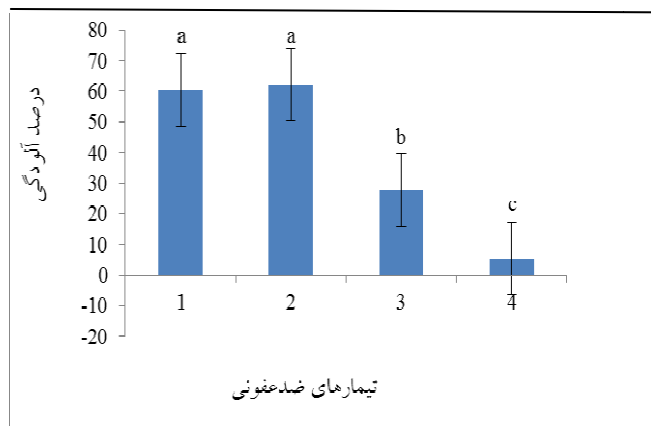
باززایی: پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های مختلف هورمونی برای باززایی، جوانه‌ها شروع به رشد کرده و پس از یک هفته شاخه تشکیل شد (شکل ۵). همچنین نتایج نشان داد که بهترین زمان برای باززایی ریزنمونه‌ها اول بهار بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بهترین محیط برای باززایی محیط B_5 حاوی $0/49$ میلی‌گرم در لیتر BA، $0/49$ میلی‌گرم در لیتر Kin و $0/1$ 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

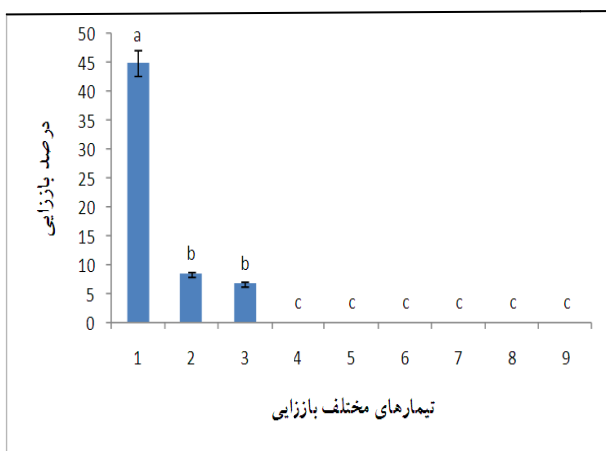
داد که بیشترین میزان القاء کالوس با میانگین ۸۳ درصد در محیط N_6 حاوی ۷ میلی‌گرم در لیتر BA و $1/5$ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید (شکل ۴).



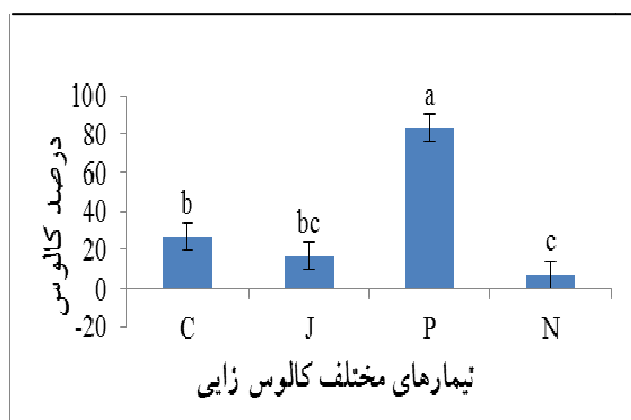
شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای ضد عفونی



شکل ۳- کالوس‌های حاصل از واکشت در محیط کالوس‌زایی



شکل ۶- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای باززایی



شکل ۴- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای مختلف کالوس‌زایی

در برخی ریزنمونه‌ها تعدادی شاخه به وجود 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 میلی‌گرم بر لیتر IBA شدند.

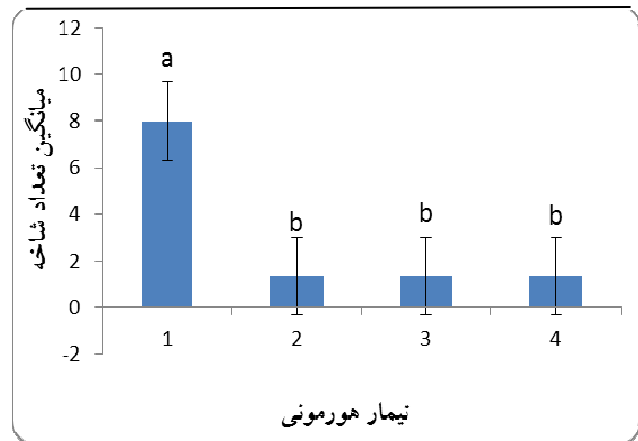
درصد فلاونوئید موجود در اندام‌های گیاهی: نتایج تجزیه واریانس درصد فلاونوئید موجود در بافت برگ، میوه و کالوس نشان داد که بین این سه بافت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین درصد فلاونوئید این سه بافت نیز نشان داد که برگ زالزالک در مقایسه با میوه و کالوس دارای میزان بالاتر (۱/۰۷ میلی‌گرم 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 کشت بافت، ریزنمونه گیاهی می‌باشد، که باید قبل از قرارگرفتن در محیط کشت به خوبی ضدعفونی شود. استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم به تنهایی بالاترین درصد آلودگی را (۶۰ درصد) از خود نشان داد و استفاده از کلرید جیوه ۰/۰۲ درصد، به‌طور قابل توجهی درصد آلودگی را پائین آورد. در تحقیقی Dai و همکاران (۲۰۰۷) برای ضدعفونی میان‌گره زالزالک (C. pinatifide) ابتدا میان‌گره را با آب جاری شستشوی سطحی و در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و در کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه و در نهایت در آب مقطر استریل شستشو دادند. در تحقیقی که Kumar و همکاران (۲۰۰۲) بر روی

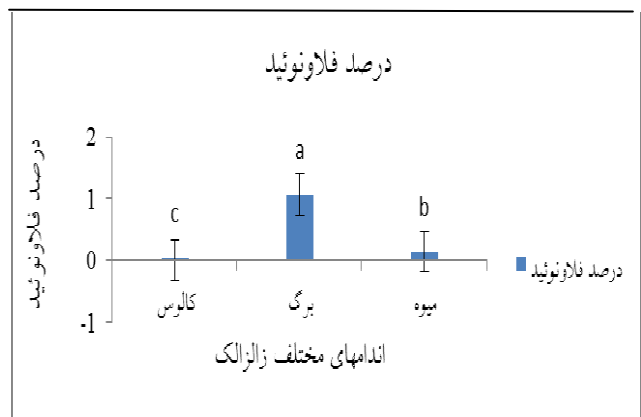


شکل ۷- نمونه‌های حاصل از پرآوری



شکل ۸- مقایسه میانگین تعداد شاخه تحت تأثیر تیمارهای

هورمونی مختلف در ریزنمونه‌های زالزالک



شکل ۹- مقایسه میانگین درصد فلاونوئید اندام‌های مختلف

زالزالک

شده است. از سه محیط کشت پایه B_5 ، MS و N_6 برای باززایی استفاده شد. تیمار G که محیط کشت 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 کشت بافت زالزالک انجام داده است، به این نتیجه رسیده که تعداد ساقه‌های حاصل از هر ریزنمونه بر روی محیط کشت 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 محیط کشت 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 سیتوکینین 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.

ریزازدیادی زالزالک (*C. ougeantha*) از طریق کشت بافت نوک شاخساره انجام دادند، از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۴ دقیقه و هیپوکلریت ۱۰ درصد به مدت ۴ دقیقه برای ضد عفونی استفاده کردند.

در تولید کالوس، مهمترین عوامل تأثیرگذار ترکیب هورمونی محیط کشت 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 نتیجه گرفت 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) محیط کشت 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 $2,4,D$ 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 به‌طور 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

آلومینیوم کلراید استفاده کرده‌اند. در این تحقیق میزان فلاونوئید برگ در مقایسه با میوه بیشتر بود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت.

جمع‌بندی

به‌طور کلی براساس این پژوهش، برگ به‌عنوان بهترین منبع فلاونوئید در گیاه زالزالک معرفی می‌شود. همچنین توصیه می‌شود برای کشت بافت زالزالک از ریزنمونه جوانه آن برای القاء کالوس، باززایی و تولید شاخساره استفاده شود. بهترین محیط برای القاء کالوس محیط N₆ همراه با ۷ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ بهترین محیط برای باززایی محیط B₅ 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., Eftehadi, 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 Journal of Botany, 28: 29-37.
- Ebrahimie, E., Habashi, A.A., Ghareyazie, B., Ghannadha, M. and Mohammadi, 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.

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. Ghasemi Dehkordi *spontiea* C.koch و همکاران (۲۰۱۲) از روش کروماتوگرافی لایه‌نازک عصاره زالزالک *C. spontiea* و *C. oxyacantha* 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. به‌نحوی که 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 Hassanlu و Sepehrifar (۲۰۰۹) برای اندازه‌گیری فلاونوئید قره‌قاپ از روش

- 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 Cranberry (*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.) methanolic 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 pinatifida* *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 Academic 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. Moghimi¹ 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, N₆ and B₅ 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. N₆ 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 B₅ 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.