"مقاله پژوهشی"

بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای زالزالک خونین (*Cratagus atrosanguinea*)

مرضیه ولی‌زاده[۱]، سیّدمحمّد حسینی‌نصر[۲]، حمید جلیلوند[۳] و جان سدبروک[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران،
(نویسنده مسوول: valizadehmarzieh@yahoo.com)
۲- دانشیار، علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۳- استاد، علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۴- استاد، گروه علوم زیستی، دانشگاه ایالت ایلینویز، ایالت متحده آمریکا
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۱۷
صفحه: تا

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: زالزالک یکی از جنس‌های مهم گیاهان دارویی محسوب می‌شود که تکثیر جنسی آن به‌سختی و از طریق آپومیکسی امکان‌پذیر است و تکثیر از راه ریشه‌دار کردن قلمه نیز با مشکلات فراوانی مواجه است. بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای زالزالک خونین به‌عنوان یکی از گونه‌های طبیعی ایران می‌تواند راهکار مناسبی برای تکثیر آن باشد. پژوهش حاضر با هدف کنترل آلودگی، کنترل قهوه‌ای‌شدن و القای کالوس زالزالک خونین (*Cratagus atrosanguinea*) در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای این منظور، از ساقه‌های جوان و سالم زالزالک در ابتدای فصل رویش نمونه‌برداری و از آنها ریزنمونه تهیه شد. تیمارهای کنترل آلودگی شامل $HgCl_2$، H_2O_2، NaClO و $AgNO_3$ و تیمارهای کنترل قهوه‌ای شدن شامل شاهد، آب روان، اسیداسکوربیک، پلی‌وینیل‌کلراید و ذغال فعال بود. برای القای کالوس، تیمارهای IBA، NAA، 2,4-D، BAP، TDZ و Kin در سه سطح غلظت ۰/۱، ۱ و ۶ میلی‌گرم در لیتر و ترکیب 6 mgl^{-1} NAA+1 mgl^{-1} BAP و mgl^{-1} BAP+1 mgl^{-1} IBA+1 6 mgl^{-1} در محیط کشت MS استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که $HgCl_2$ (۰/۵ درصد، ۱۶ دقیقه) با میانگین ۱۰۰ درصد سلامت به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار کنترل آلودگی بود. تیمار شاهد با ۹۸ درصد سلامت به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار کنترل قهوه‌ای‌شدن مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که نوع، غلظت و اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر مشخصه‌های القای کالوس زالزالک خونین اثر معنی‌داری دارد ($P<0.01$). بیشترین وزن تر و خشک کالوس، درصد و درجه کالوس‌زایی و سطح مقطع کالوس در بین تیمارهای اکسین و سیتوکنین به‌ترتیب برای تیمارهای ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین مقدار مشخصه‌های القای کالوس مورد مطالعه در محیط کشت حاوی ترکیب اکسین و سیتوکنین (6 mgl^{-1} IBA+1 mgl^{-1} BAP) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج نشان داد که در حالت عادی و بدون اعمال هیچ تیماری تا ۹۰ درصد احتمال کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های سرشاخه‌های طبیعی زالزالک خونین وجود دارد. برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها استفاده از کلرید جیوه نیم درصد به‌مدت ۱۶ دقیقه پیشنهاد می‌شود. ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت برای القای کالوس زالزاک خونین بسیار مناسب ارزیابی شد. ارائه نتایج این پژوهش می‌تواند دستورالعمل آزمایشگاهی برای باززایی و پرآوری زالزالک خونین فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: القای کالوس، آپومیکسی، تنظیم‌کننده‌های رشد، کنترل آلودگی، قهوه‌ای شدن

مقدمه

زالزالک یکی از جنس‌های ارزشمند گیاهان دارویی است که تکثیر جنسی آن به‌سختی و از طریق آپومیکسی (بکرزایی گیاهی) امکان پذیر است (Lo et al., 2009). تکثیر جنسی زالزالک به دلایل پوسته ضخیم (Phipps et al., 2003) و دو نوع خفتگی فیزیکی و فیزیولوژیک (Maharik et al., 2009) همچنین تکثیر غیر جنسی آن از راه ریشه‌دار کردن قلمه با مشکلات فراوانی مواجه می‌باشد. از طرف دیگر، تکثیر غیر جنسی آن از راه قلمه زمان‌بر و با مشکلات فراوانی همراه است (Phipps et al., 2003). زالزالک خونین از خانواده Rosaceae، یکی از گونه‌های بومی و با ارزش جنگل‌های شمال و غرب کشور محسوب می‌شود که به دلیل مثمر بودن و داشتن چوب بسیار محکم و خواص دارویی متعدد دارای اهمیت فراوان است. خواص دارویی زالزالک در درمان فشار خون، تصلب شرائین و احتقان قلب، ضعف عضلات قلب و نارسایی کرونر به اثبات رسیده است (Salehi Sormaghi, 2008). زالزالک حاوی متابولیت‌های ثانویه فراوان مانند فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین (Radpooya, 1996) و گیلکوزیدها است (Ghassemi Dehkordi and Ghannadi, 1993). کشت بافت می‌تواند راه حل مناسبی برای تکثیر و پرآوری درختان جنگلی (Imani et al., 2022; Tafazoli et al., 2021) و به‌ویژه زالزالک (Zarnadze et al., 2019; Dincer, et al., 2023) باشد.

کنترل آلودگی ریزنمونه، بذر و بافت گیاهان از اهمیت بالایی برای موفقیت کشت بافت گیاهان محسوب می‌شود (Esna-Ashari and Zokaei-Khosroshahi, 2013). برای کنترل آلودگی ریزنمونه‌های طبیعی به‌ویژه سرشاخه‌های جنس زالزالک مواد ضدعفونی کننده مختلف مانند هیپوکلرید سدیم (Motaghi et al., 2019; Sakvand Soufiabadi, 2019)، کلرید جیوه ۰/۰۲ درصد (Moghimi and Safarnejad, 2014) و مرکوریک‌کلراید (Zarnadze et al., 2019) استفاده شده است. بنابراین انتخاب ماده ضدعفونی‌کننده برای کنترل آلودگی ریزنمونه طبیعی زالزالک بسیاراهمیت دارد. از آنجا که پرآوری از ریزنمونه‌های طبیعی گیاهان برای کشت بافت در اولویت قرار دارد (Bagheri et al., 2010) معمولا این مهم با قهوه‌ای شدن به‌ویژه برای گیاهان چوبی که دارای ساقه ضخیم و چوبی هستند با مشکلات فراوانی همراه است. قهوه‌ای شدن ریزنمونه یعنی

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

مرگ آن و مرگ ریزنمونه به معنی شکست استراتژی پرآوری گیاه در شرایط درون شیشه‌ای است.

پژوهش‌های مختلفی در ارتباط با کشت بافت جنس زالزالک گزارش شده است اما پژوهش در زمینه گونه زالزالک خونین اندک است. در بیشتر پژوهش‌ها محیط MS را به‌عنوان مناسب‌ترین محیط کشت بافت برای خانواده Rosaceae معرفی کردند (Mahdavian et al., 2010). در پژوهش دیگری القای کالوس ریزنمونه‌های سرشاخه طبیعی زالزالک در محیط کشت N6 حاوی ۷ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA گزارش شده است (Moghimi and Safarnejad, 2014). در پژوهش دیگری، محیط کشت MS حاوی ۱۱/۱۰ میکرومول BAP و ۴/۹۲ میکرومول IBA را برای القای کالوس سرشاخه‌های طبیعی زالزالک معرفی کردند (Amiri and Mohammadi, 2020). Maharik و همکاران (2009) محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA را برای باززایی زالزالک را مناسب دانستند. در پژوهش دیگری بیشترین درصد کالوس‌زایی سرشاخه طبیعی زالزالک را در محیط کشت MS حاوی ترکیبات IAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده کردند (Al-Manasrah, 2012). Chaabani و همکاران (2015) القای کالوس از برگ زالزالک زرد (*Crataegus azarolus* L. var.aronia) را در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش کردند. Zarnadze و همکاران (۲۰۱۹) مؤثرترین روش ریشه‌زایی زالزالک برگ‌ریز (*Crataegus monogina*) را در محیط کشت B5 حاوی ۵ میکرومول IBA و ۲۰ میکرومول BAP بیان کردند. در پژوهش دیگری که روی زالزالک برگ‌ریز انجام شد ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP برای باززایی مناسب‌تر است (Dincer et al., 2023). بنابراین تعیین نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد یک عامل متغیر برای رشد گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای ضروری است.

بعد از اعمال تنظیم‌کننده رشد به محیط کشت، گیاه واکنش‌های مختلفی نشان خواهد داد اما یکی از راه‌های مناسب برای انتخاب مسیر صحیح باززایی گیاهان، تعیین وزن تر و خشک کالوس است که به‌طور گسترده به‌عنوان معیاری از رشد کالوس‌ها مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد (Hutteman and Preece, 1993). با استفاده از وزن تر و خشک کالوس می‌توان منحنی رشد کالوس را به‌دست آورد. در پژوهش‌هایی روی لیلکی ایرانی (*Gleditschia Capsica* Desf.) (Imani et al., 2022) و اقاقیا و شب‌خسب (Albizzia and Robinia) (Hosseini Nasr, 1999) منحنی رشد کالوس ترسیم شد و با توجه به اطلاعات آن روند باززایی گیاهان مورد مطالعه تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد پیش‌بینی شد.

همان‌طور که مشخص است نتایج پژوهش‌های گذشته حاکی از دامنه وسیع تغییرات نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر کالوس‌زایی و باززایی گونه‌های مختلف جنس زالزالک است و متناسب با نوع گونه گیاهی باید نوع و غلظت خاصی از تنظیم‌کننده‌های رشد را اعمال کرد. پژوهش‌ها در ارتباط با کشت بافت زالزالک خونین بسیار اندک است و نیاز پژوهش در این زمینه احساس می‌شود. از این‌رو پژوهش حاضر با هدف بررسی بهینه‌سازی شرایط کنترل آلودگی و قهوه‌ای شدن کشت بافت زالزالک خونین و تعیین مناسب‌ترین نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد برای کالوس‌زایی این گونه دارویی ارزشمند انجام شد.

مواد و روش‌ها

ساقه‌های جوان و سالم زالزالک خونین در آذرماه (۱۴۰۰) از لاریجان آمل، استان مازندران، ایران با مختصات جغرافیایی ۳۸' ۵۸° شمالی و ۱۰' ۵۲° شرقی جمع‌آوری شد. ساقه‌های جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران منتقل شدند. ضدعفونی ساقه‌های طبیعی زالزالک به دلیل آلودگی سطحی و بافتی فراوان بسیار ضروری است. برای این منظور ابتدا ساقه‌ها به ریزنمونه‌هایی به اندازه ۰/۵ تا یک سانتی‌متری برش داده شدند. برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها تیمارهای کنترل آلودگی (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها پنج تیمار طراحی شد که در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- تیمارهای کنترل آلودگی و قهوه‌ای شدن مورد استفاده برای ریزنمونه‌های زالزالک خونین

Table 1. Pollution and browning control treatments used to *C. atrosanguinea* explants

ردیف Row	تیمارهای کنترل آلودگی Disinfection treatments	تیمارهای کنترل قهوه‌ای Browning control treatments
1	$HgCl_2$ 0.5% (16min), Ethanol 70% (1 min)	شاهد (Control)
2	$HgCl_2$ 1% (16min), Ethanol 70% (1 min)	آب روان (Tap water)
3	$HgCl_2$ 10% (10min), Ethanol 70% (1 min)	اسیداسکوربیک (Ascorbic acid)
4	H_2O_2 20% (10min), Ethanol 70% (1 min)	پلی‌وینیل‌کلراید (Polyvinyl chloride (PVP))
5	NaClO 0.6% (15 min), Ethanol 70% (1 min)	ذغال فعال (Active coal)
6	NaClO 1.2% (15 min), Ethanol 70% (1 min)	
7	$AgNO_3$ 1% (20 min), Ethanol 70% (1 min)	
8	$AgNO_3$ 0.5% (20 min), Ethanol 70% (1 min)	

برای القای کالوس از تیمارهای آزمایشی شامل اکسین‌های IBA، NAA و 2,4-D و سیتوکنین‌های BAP، TDZ و Kin در سه غلظت۰/۱، ۱ و ۶ میلی‌گرم در لیتر به‌صورت انفرادی در محیط کشت MS استفاده شد. در ادامه برای بالابردن دقت پژوهش، تنظیم‌کننده‌های رشد منتخب (آنهایی که بیشترین مقدار القای کالوس را داشتند) به‌صورت منفرد و ترکیب (استفاده همزمان ااکسین و سیتوکنین در محیط کشت) مورد بررسی قرار گرفتند. در این پژوهش

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

تیمارهای منتخب شامل 6 mgl-1 NAA، 6 mgl-1 IBA و 1 mgl-1 BAP و تیمارهای ترکیبی شامل 6 mgl-1 NAA+1 mgl-1 BAP و 6 mgl-1 IBA+1 mgl-1 BAP بودند.

برای بررسی القای کالوس، مشخصه‌های درصد کالوس‌زایی، درجه کالوس‌زایی، وزن تر و خشک کالوس و مساحت سطح مقطع کالوس اندازه‌گیری شد. درصد کالوس‌زایی از نسبت ریزنمونه‌هایی که تولید کالوس کردند به تعداد کل ریزنمونه کشت شده ضربدر ۱۰۰ (Del Monte and Tarquis, 1997) محاسبه گردید. درجه کالوس‌زایی به‌صورت مشاهده‌ای و به‌ترتیب به اعداد صفر=بدون کالوس، یک= کالوس با انبوهی کم، دو= کالوس با انبوهی متوسط و سه= کالوس با انبوهی زیاد امتیازدهی شد. توزین کالوس با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌گرم انجام گرفت. برای خشک کردن کالوس‌ها، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون قرار داده شدند و سپس وزن خشک کالوس اندازه‌گیری شد. سطح مقطع کالوس با استفاده از نرم‌افزار Digimizer و پس از تهیه عکس از کالوس انجام گرفت.

برای رسم منحنی رشد از اکسین و سیتوکنین‌هایی که بیشترین درصد کالوس‌زایی را داشتند، ۲۴ قطعه کالوس در اندازه و وزن یکسان تهیه شد. وزن اولیه کالوس‌ها در زیر هود لامینار اندازه‌گیری شد. سپس هر کالوس در یک لوله آزمایشگاه کشت و در زمان‌های نمونه‌برداری ۱، ۴، ۹، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۳ روز، وزن تر و خشک سه قطعه از کالوس توزین شد (Hosseini-Nasr, 1999). پس از توزین وزن خشک کالوس‌ها و مقایسه با وزن تر آنها، منحنی رشد کالوس ترسیم شد (Esna-Ashari and Zokaei-Khosroshahi, 2013).

پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل با فاکتورهای تنظیم‌کننده‌های رشد و غلظت با ۲۰ تکرار مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. تجزیه واریانس کلیه داده‌های حاصل از مشخصه‌های اندازه‌گیری شده و مقایسه میانگین تیمارهای مورد آزمایش بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. تنظیم، پردازش اولیه و رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای کنترل آلودگی ریزنمونه زالزالک نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد ($p<0.01$) بین تیمارهای ضدعفونی وجود داشت (جدول ۱). همچنین نتایج تجزیه واریانس در ارتباط با کنترل قهوه‌ای شدن نشان داد که تیمارهای کنترل قهوه‌ای شدن در سطح یک درصد ($p<0.01$) دارای تفاوت معنی‌دار بودند (جدول ۱).

جدول ۲- تجزیه واریانس تیمارهای کنترل آلودگی و کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های زالزالک خونین

Table 2. Variance analysis of pollution control treatments and browning control of *Cratagus atrosanguinea* explants

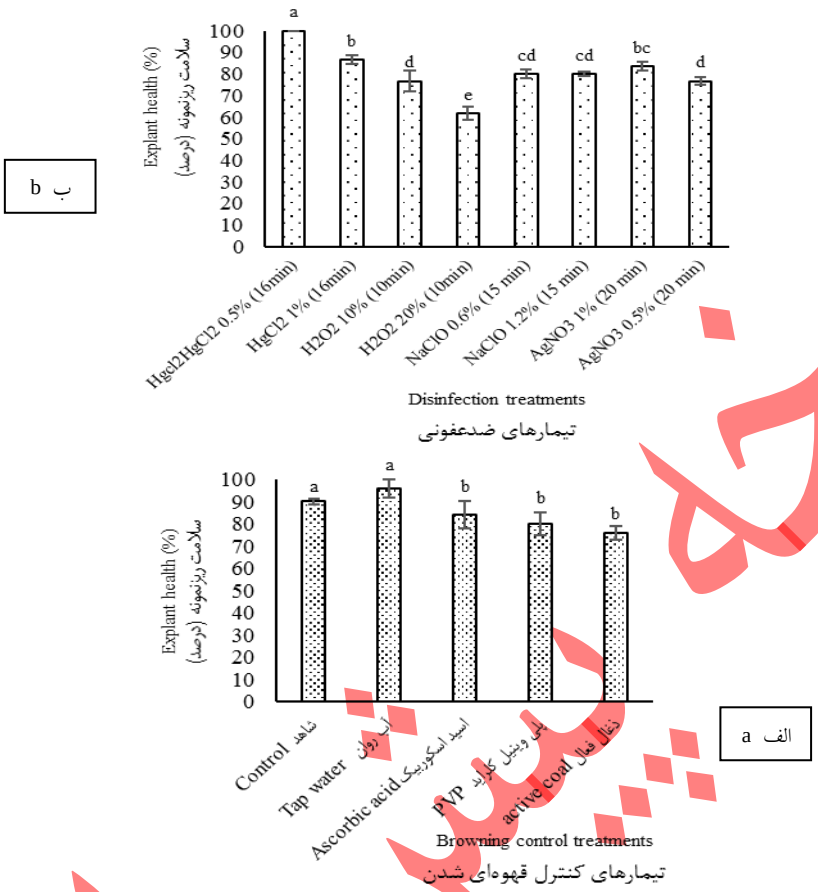
	درجه آزادی Degrees of freedom	منبع تغییرات S.O. V	میانگین مربعات Mean of Squares	آماره F و معنی‌داری F and significance	ضریب تغییرات CV
کنترل آلودگی Disinfection treatments	7	مدل Model	347.470	41.7**	8.85
		خطا Error	8.333		
کنترل قهوه‌ای شدن Browning control treatments	4	مدل Model	476	12.86**	14.13
		خطا Error	37		

** نشان دهنده معنی‌داری در سطح یک درصد است ($P<0.01$).

**indicates significance at the one percent level ($P<0.01$).

نتایج نشان داد که ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌های زالزالک در تیمار ضدعفونی $HgCl_2$ نیم درصد با زمان ۱۶ دقیقه سالم ماندند و هیچ گونه علائم آلودگی در این تیمار مشاهده نشد (شکل ۱- الف). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین کنترل آلودگی در تیمارهای آب روان و شاهد به‌ترتیب با میانگین ۹۶ و ۹۰ درصد مشاهده شد (شکل ۱-ب).

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]



شکل ۲- الف) مقایسه میانگین تیمارهای کنترل قهوه‌ای شدن؛ (ب) مقایسه میانگین تیمارهای کنترل آلودگی برای ریزنمونه زالزالک خونین. حروف معنی‌داری غیریکسان روی نمودار بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است.

Figure 2- a) Comparison of mean browning control treatments; (b) Comparison of mean control treatments for the blood hawthorn explant. Different letters of significance on the graph indicate the existence of a significant difference between the treatments.

نتایج نشان داد که نوع تنظیم‌کننده‌های رشد، غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد و اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر مشخصه‌های القای کالوس زالزالک خونین اثر معنی‌داری دارد (P<0.01) (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس مشخصه‌های مورد مطالعه برای تنظیم‌کننده‌های رشد آزمایشی

Table 3. Variance analysis of studied characteristics for experimental growth regulators

مشخصه‌های مورد مطالعه Study characteristics	منبع تغییرات S.O. V	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات Mean of Squares	آماره F و معنی‌داری F and significance	ضریب تغییرات CV
کالوس‌زایی (٪) Callusing (%)	تنظیم کننده رشد	2	4401.009	210.79**	11.56
	غلظت	5	2188.986	104.84**	
	تنظیم کننده × غلظت	10	921.777	44.15**	
درجه کالوس‌زایی Degree of callusing	تنظیم کننده رشد	2	7.060	106.77**	7.61
	غلظت	5	1.071	16.20**	
	تنظیم کننده × غلظت	10	0.210	3.18**	
سطح مقطع کالوس Cross section of callus	تنظیم کننده رشد	2	5.480	314.93**	8.54
	غلظت	5	0.552	31.75**	
	تنظیم کننده × غلظت	10	0.309	17.79**	
وزن تر کالوس Wet weight of callus	تنظیم کننده رشد	2	431230.314	1117.28**	18.77
	غلظت	5	386429.842	1001.21**	
	تنظیم کننده × غلظت	10	125739.909	325.78**	
وزن خشک کالوس Dry weight of callus	تنظیم کننده رشد	2	26509.647	105.27**	3.89
	غلظت	5	17556.578	69.72**	
	تنظیم کننده × غلظت	10	9434.216	37.47**	

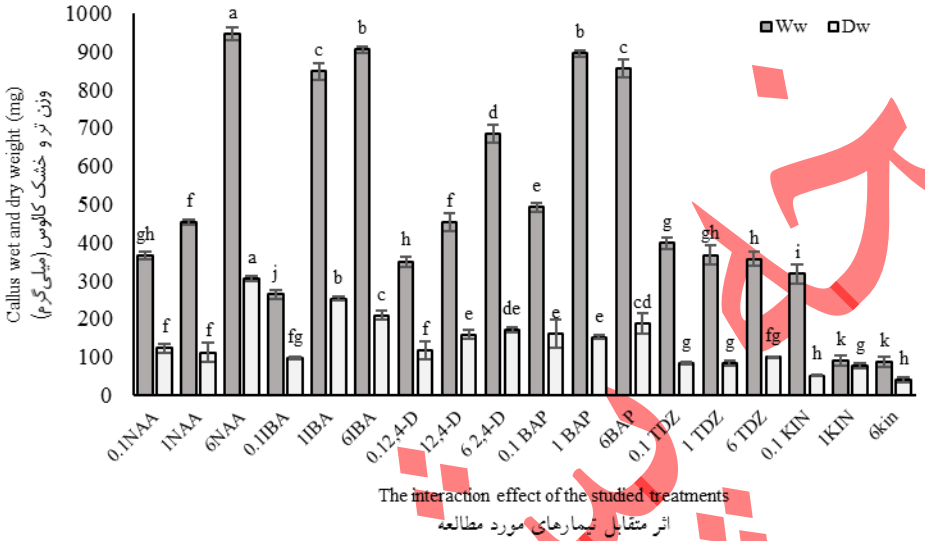
** نشان دهنده معنی‌داری در سطح یک درصد است (P<0.01).

**indicates significance at the one percent level (P<0.01).

نسخه پیش از انتشار

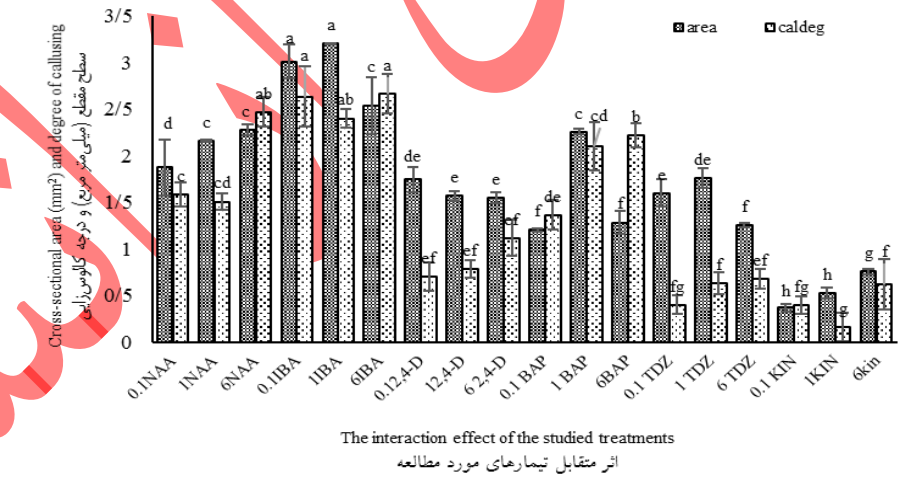
[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

نتایج اثر متقابل نوع در غلظت تنظیم‌کننده رشد نشان داد که بیشترین و کمترین وزن تر کالوس به‌ترتیب در تیمار ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA (۹۴۶ میلی‌گرم) و ۶ میلی‌گرم در لیتر Kin (۸۷ میلی‌گرم) مشاهده شد (شکل ۳). همچنین بیشترین و کمترین وزن خشک کالوس نیز به‌ترتیب در تیمار ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA (۳۰۵ میلی‌گرم) و ۶ میلی‌گرم در لیتر Kin (۳۹ میلی‌گرم) وجود داشت. تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین وزن تر (۸۹۵ میلی‌گرم) و وزن خشک (۱۵۲ میلی‌گرم) کالوس را داشت.



شکل ۳- اثر نوع تنظیم‌کننده رشد و غلظت آن بر میانگین وزن تر و خشک کالوس زالزالک خونین. حروف معنی‌داری غیریکسان روی نمودار بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است. معنی‌داری هر مشخصه مورد مطالعه به‌صورت مجزا گروه‌بندی شده است.

Figure 3. The type and concentration of growth regulator on the average fresh and dry weight of blood hawthorn callus. Different letters of significance on the graph indicate the existence of a significant difference between the treatments. The significance of each studied characteristic is grouped separately.



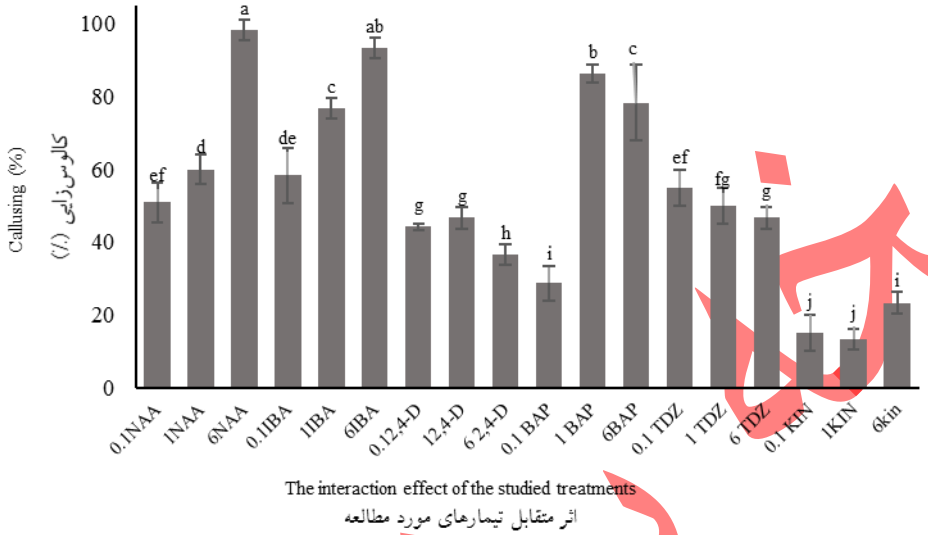
شکل ۴- نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر میانگین سطح مقطع کالوس و درجه کالوس‌زایی زالزالک خونین. حروف معنی‌داری غیریکسان روی نمودار بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است. معنی‌داری هر مشخصه مورد مطالعه به‌صورت مجزا گروه‌بندی شده است.

The type and concentration of growth regulator on the average cross-sectional area of callus and the degree of callus formation of blood hawthorn. Different letters of significance on the graph indicate the existence of a significant difference between the treatments. The significance of each studied characteristic is grouped separately.

نتایج اثر متقابل نوع در غلظت تنظیم‌کننده رشد نشان داد که بیشترین و کمترین سطح مقطع کالوس به‌ترتیب در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (۳/۲ میلی‌متر مربع) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر Kin (۰/۶ میلی‌متر مربع) مشاهده شد (شکل ۴). البته با توجه به آزمون مقایسه میانگین‌ها، تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (۳ میلی‌متر مربع) نیز در طبقه بالاترین مقدار سطح مقطع قرار گرفت و با تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA دارای تفاوت معنی‌دار نیست. همچنین بیشترین و

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

کمترین درجه کالوس‌زایی به‌ترتیب در تیمار ۶ میلی‌گرم در لیتر IBA (میانگین ۲/۷ انبوهی) و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin (با میانگین ۰/۶ انبوهی) وجود داشت. تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در بین سیتوکنین‌ها بیشترین سطح مقطع کالوس (۲/۳ میلی‌متر مربع) و درجه کالوس‌زایی (۲/۱ درجه انبوهی) را داشت (شکل ۴).



شکل ۵- نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر میانگین درصد کالوس‌زایی زالزالک خونین. حروف معنی‌داری غیریکسان روی نمودار بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است. معنی‌داری هر مشخصه مورد مطالعه به‌صورت مجزا گروه‌بندی شده است.

Figure 5. The type and concentration of growth regulator on the average percentage of callus formation of blood hawthorn. Different letters of significance on the graph indicate the existence of a significant difference between the treatments. The significance of each studied characteristic is grouped separately

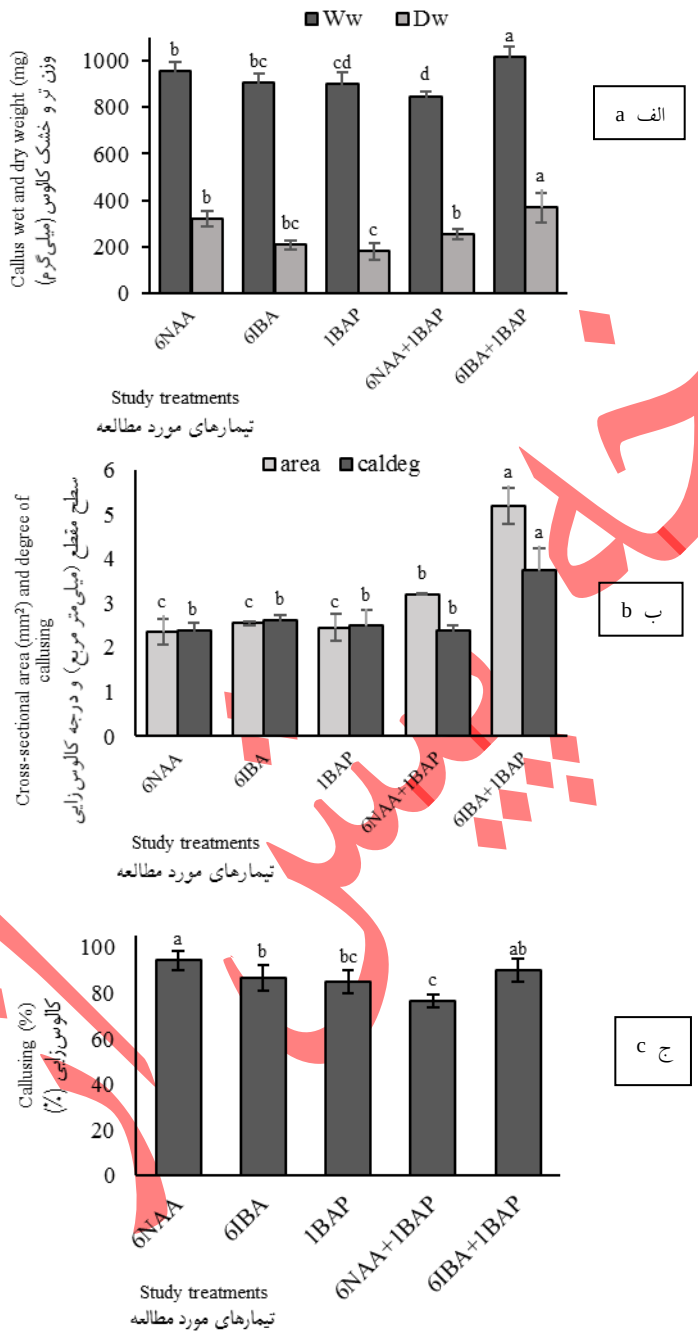
نتایج اثر برهمکنش نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد کالوس‌زایی نشان داد که تیمار ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۶ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌ترتیب با ۹۸ و ۹۳ درصد، بیشترین مقدار کالوس‌زایی را داشتند. همچنین تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin کمترین درصد کالوس‌زایی را داشت. در بین سیتوکنین‌های مورد مطالعه، تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۸۶ درصد بیشترین کالوس‌زایی را داشت (شکل ۵). نتایج تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که تیمارهای تنظیم‌کننده رشد منتخب اثر معنی‌داری بر درصد کالوس‌زایی ($P<0.05$) و درجه کالوس‌زایی، وزن تر و خشک کالوس و سطح مقطع کالوس ($P<0.01$) داشت (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس مشخصه‌های مورد مطالعه برای تنظیم‌کننده‌های رشد منتخب

Table 3. Variance analysis of the studied characteristics for selected growth regulators

منبع تغییرات S.O. V	درجه آزادی Degrees of freedom	مشخصه‌های مورد مطالعه Study characteristics	میانگین مربعات Mean of Squares	آماره F و معنی‌داری F and significance	ضریب تغییرات CV
تنظیم‌کننده رشد Growth regulation	4	کالوس‌زایی (٪) Callusing (%)	130.741	5.98*	5.401
		درجه کالوس‌زایی Degree of callus	0.972	11.30**	10.74
		سطح مقطع کالوس Cross section of callus	4.268	62.44**	8.30
		وزن تر کالوس Wet weight of callus	12427.116	14.50**	3.16
		وزن خشک کالوس Dry weight of callus	18332.489	14.77**	13.27

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

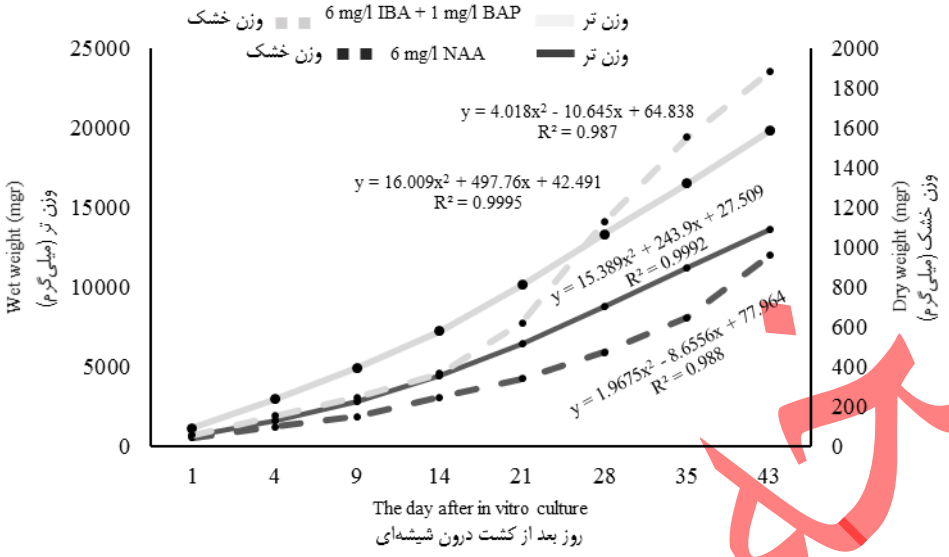


شکل ۶- مقایسه میانگین الف- وزن تر و خشک کالوس، ب- سطح مقطع کالوس و درجه کالوس‌زایی و ج- درصد کالوس‌زایی زالزالک خونین تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد. حروف معنی‌داری غیریکسان روی نمودار بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است. معنی‌داری هر مشخصه مورد مطالعه به‌صورت مجزا گروه‌بندی شده است.

Figure 6. Comparison of average a- fresh and dry weight of callus, b- basal area of callus and degree of callus formation and c- percentage of callus formation of blood hawthorn under the influence of growth regulators. Different letters of significance on the graph indicate the existence of a significant difference between the treatments. The significance of each studied characteristic is grouped separately

نتایج آزمون مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس، سطح مقطع کالوس و درجه کالوس‌زایی به‌ترتیب با میانگین ۱۰۱۷/۲۵ میلی‌گرم، ۳۶۷/۸۴۷ میلی‌گرم، ۵/۲ میلی‌متر مربع و ۳/۷۳ درجه انبوهی در تیمار ترکیب BAP mgl^{-1} 1+IBA mgl^{-1} 6 مشاهد شد. همچنین بیشترین درصد کالوس‌زایی در تیمارهای ۶ میلی‌گرم NAA (۹۴/۴۴ درصد) و BAP mgl^{-1} 1+IBA mgl^{-1} 6 (۹۰ درصد) به ثبت رسید.

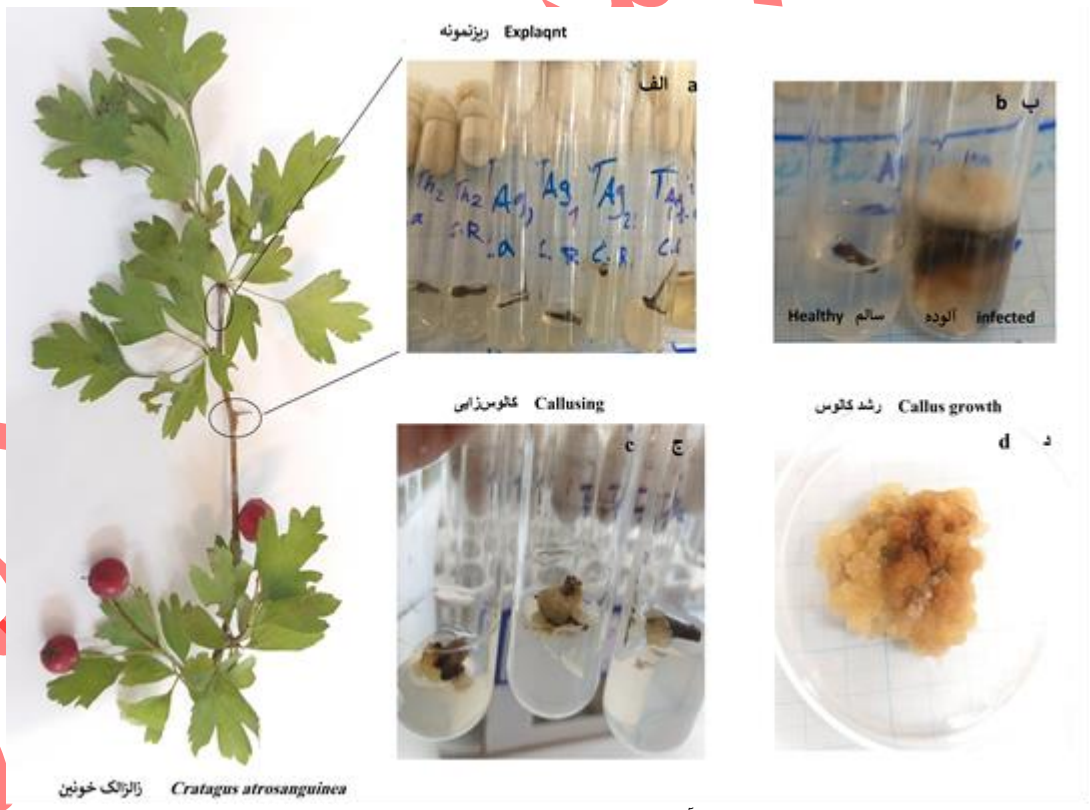
[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]



شکل ۷– منحنی رشد وزن تر کالوس (الف) و وزن خشک کالوس (ب) در بازه زمانی ۴۳ روز.

Figure 7. Growth curve of callus fresh weight (a) and callus dry weight (b) in a period of 43 days.

نتایج نشان داد که با گذشت زمان، وزن تر و خشک کالوس‌ها در همه تیمارها افزایش داشته است. روند رشد وزن تر و خشک کالوس در تیمار 6 mgl^{-1} IBA+1 mgl^{-1} BAP بعد از گذشت ۴۳ روز بیشتر از تیمار 6 mgl^{-1} NAA بود (شکل ۷). بررسی منحنی‌های رویش نتایج قبلی این پژوهش را در ارتباط با وزن تر و خشک کالوس را تأئید می‌کند به طوری‌که منحنی‌های مذکور نشان می‌دهند که رشد کالوس تحت تأثیر ترکیب سیتوکنین و اکسین (6 mgl^{-1} NAA+1 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت بیشترین رشد را داشته است.



شکل ۸– الف) تهیه ریزنمونه، ب) کالوس‌های آلوده و سالم، ج) کالوس‌زایی و د) رشد کالوس از ریزنمونه‌های زالزالک خونین.

Figure 8. a) Explant preparation, b) Infected and healthy calluses c) callusing and d) callus growth from *C. atrosanguinea* explants

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

مهم‌ترین مسئله‌ای که در کشت بافت بایستی رعایت شود این نکته است که هر نوع عمل مرتبط با کار کشت بایستی کاملاً در شرایط استریل صورت گیرد وگرنه به دلیل انواع آلودگی‌ها هیچ نتیجه‌ای به‌دست نخواهد آمد (Piri et al., 2018). آلوده شدن محیط کشت به وسیله میکروارگانیسم‌ها از مشکلات عمده و اساسی کشت گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای است. منابع آلودگی می‌تواند شامل وسائل و ابزار مورد استفاده، آب، هوا و بافت گیاهی مورد استفاده باشد (Hosseini-Nasr, 1999). قارچ‌ها، باکتری و مخمرها مهم‌ترین منابع آلودگی محیط کشت‌ها به شمار می‌روند (Leifert and Waites, 1990). البته عدم دقت و نحوه کار در استریل کردن بافت گیاهی نیز باعث آلودگی محیط کشت می‌شوند (Leggatt et al., 1988). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان آلودگی محیط‌کشت‌ها در تیمارهای مختلف تا حدود ۵۰ درصد رفع خواهد شد (شکل ۲-الف). اما در تیمار ضدعفونی $HgCl_2$ نیم درصد با زمان ۱۶ دقیقه هیچ گونه علائم آلودگی وجود نداشت و ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها و محیط کشت سالم باقی ماندند. در بسیاری از پژوهش‌ها کلرید جیوه ($HgCl_2$)، اتانول (C_2H_6O) و هیپوکلریت سدیم (NaClO)به تنهایی یا استفاده به‌صورت همزمان از آنها به‌عنوان بهترین تیمار ضدعفونی معرفی شدند (Mihaljevic et al., 2013; Singhal et al., 2012; Afolabi et al., 2020). روش بهینه برای ضد عفونی کردن ریزنمونه‌ها محلول کلرید جیوه گزارش شده است (Tian et al., 2008) که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. اما باید توجه کرد که کلریدجیوه ماده شیمیایی مضر برای سلامتی انسان است ولی در پژوهش‌های مختلف برای ضدعفونی گونه‌های درختی مختلفی (Chalupa, 1987) استفاده شده است.

یکی دیگر از موارد مهمی که در کشت بافت گیاهی مورد اهمیت است مسئله کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌باشد. بافت‌های کشت شده بعضی از گیاهان، بویژه چند ساله‌های چوبی در اثر آلودگی به پاتوژن‌ها یا جراحت ناشی از بریدن ریزنمونه، رنگدانه‌های قهوه‌ای یا سیاه رنگ تولید می‌نمایند (Yaacob and Tindall, 1995). قهوه‌ای شدن بافت در گونه‌هایی بیشتر دیده می‌شود که حاوی مقدار زیادی تانن یا دیگر هیدروکسی‌فنول‌ها می‌باشند (Silva et al., 2007). نتایج پژوهش نشان داد که قرار دادن ریزنمونه‌ها در آب روان از قهوه‌ای شدن آنها تا ۹۶ درصد جلوگیری خواهد کرد (شکل ۲-ب). اما با توجه به اینکه در تیمار شاهد نیز تا ۹۰ درصد، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها کنترل شد پیشنهاد می‌شود که در کشت بافت شاخه‌های زالزالک خونین از تیمار خاصی استفاده نشود و اگر نرخ قهوه‌ای شدن بالا بود از تیمار آب روان استفاده کنند چرا که پرهیز از تماس مواد شیمیایی با ریزنمونه‌ها به کیفیت باززایی گیاهان کمک خواهد کرد (Esna-Ashari and Zokaei-Khosroshahi, 2013; Bagheri et al., 2010).

اثر بخشی کشت بافت گیاهی با القای کالوس، باززایی و پرآوری گیاه تعیین می‌شود که به‌طور کلی این فرآیند توسط تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تنظیم می‌شود (Zarnadze et al., 2019). اهمیت تنظیم‌کننده‌های رشد برای تحریک و القای کالوس آشکار است (Gbadamosi and Egunyomi, 2010; Rajoriya et al., 2018; Siddique et al., 2013). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت به‌طور انفرادی یا ترکیبی، اثر معنی‌داری بر مشخصه‌های القای کالوس از شاخه‌های طبیعی زالزالک قرمز دارد (جداول ۲، ۳ و ۵). به عبارت دیگر ریزنمونه‌های شاخه زالزالک وابستگی زیادی به نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد نشان داد که مشابه این نتیجه در پژوهش‌های مختلفی که روی ریزنمونه شاخه‌های طبیعی زالزالک انجام شده آمده است (Aragao et al., 2017; Mahoney et al., 2018; Stevens and Pijut, 2018).

نتایج پژوهش در ارتباط با نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد نشان داد که در بین سیتوکنین‌های مورد مطالعه، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بر مشخصه‌های القای کالوس بیشترین تأثیر را داشته است (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). البته انتظار می‌رفت که BAP به مانند بسیاری از پژوهش‌ها (Gangulee et al., 1972; Arikat et al., 2004; Debnath, 2008; Zarnadze et al., 2019; Dincer et al., 2023) از دیگر سایتوکینین‌ها درصد کالوس‌زایی بیشتری را نشان دهد. دلیل این امر را می‌توان به سرشت و حساسیت گونه‌های گیاهی نسبت به BAP مرتبط دانست (Ebrahimi et al., 2006). همچنین نتایج پژوهش نشان داد که ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA زمانی که در محیط کشت وجود داشتند بیشترین مقدار مشخصه‌های القای کالوس مشاهده خواهد شد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش‌های گذشته روی جنس زالزالک مبنی بر وجود تأثیرگذار IBA در محیط کشت برای القای کالوس و باززایی (Zarnadze et al., 2019; Dincer et al., 2023) همخوانی دارد. البته نتایج پژوهش نشان داد که استفاده همزمان اکسین و سیتوکنین در محیط کشت، بر مشخصه‌های القای کالوس اثر بیشتری خواهد داشت به‌طوری که بیشتر مشخصه‌های القای کالوس و منحنی رشد کالوس در تیمار 6 MS+ mgl^{-1} IBA+1 mgl^{-1} BAP بیشترین مقدار خود را داشتند. در برخی پژوهش‌های گذشته استفاده همزمان BAP و IBA در القای کالوس بافت‌های مختلف جنس زالزالک گزارش شده است (Iapichino, and Airo, 2009; Zarnadze et al., 2019; Amiri and Mohammadi, 2020). هر چند که وجود همزمان سیتوکنین و اکسین در محیط کشت بیشتر به باززایی گیاهان کمک می‌کند اما نتایج این پژوهش بیانگر آن بود که استفاده همزمان آنها منجر به القای کالوس بیشتر در مقایسه با تنها یک تنظیم‌کننده در محیط کشت بود. کما اینکه با توجه به پژوهش‌های گذشته در ابتدا انتظار بود که وجود یک تنظیم‌کننده در محیط کشت در القای کالوس ریزنمونه سرشاخه زالزالک کافی باشد (Aragao et al., 2017; Amiri and Mohammadi, 2020).

بر اساس نتایج به‌دست آمده از منحنی رشد کالوس برای القای کالوس زالزالک خونین وزن تر و خشک کالوس با گذر زمان روند افزایشی دارد و نشان دهنده روند رویشی مناسب کالوس در محیط کشت تحت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد مطالعه است (شکل ۷). همان‌طور که مشاهده شد وزن تر و

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

خشک کالوس با گذشت زمان در محیط کشت حاوی ۶ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشتر از تیمار مورد مطالعه دیگر (۶ میلی‌گرم در لیتر NAA) بود. مطابق معادله رگرسیونی پیش‌بینی می‌شود که وزن تر (R^2=0.9995) و وزن خشک (R^2=0.9870) کالوس شرایط بهینه‌ای با گذشت زمان بر جا خواهد گذاشت. استفاده از درک تغییرات وزن تر و خشک کالوس که در طول رشد و نمو کالوس رخ می‌دهد می‌تواند از فرآیند کشت آزمایشگاهی پشتیبانی کند. بنابراین بررسی منحنی رشد کالوس در پیداکردن مسیر بهینه کشت بافت بسیار حائز اهیمت است. در پژوهش‌های فراوانی بررسی منحنی رشد کالوس بر اساس وزن تر و خشک کالوس در پیش‌بینی مسیر رشد کالوس مورد بررسی قرار گرفته است (Ogihara and Tsunewaki, 1978; Karam et al., 2003). وزن‌تر و خشک گیاه به‌عنوان تابعی از زمان، به‌عنوان اساسی‌ترین اطلاعات برای آنالیزهای رشد مطرح است (Kafi et al., 2001).

نوع محیط کشت، نسبت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استفاده شده در محیط کشت و همچنین شرایط محیط کشت از جمله عوامل مهم کنترل در القای کالوس و رشد آن می باشند. با توجه به اهداف پژوهش نتایج نشان داد که برای کنترل آلودگی و قهوه‌ای شدن شاخه‌های طبیعی زالزالک خونین به‌ترتیب از کلرید جیوه با غلظت نیم درصد با زمان ۱۶ دقیقه و آب روان استفاده شود. بیشترین درصد کالوس‌زایی در حضور اکسین‌های ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۶ میلی‌گرم در لیتر IBA و سیتوکنین ۱ میلی‌گرم BAP مشاهده شد. اما به‌طور کلی با توجه به نتایج منحنی رشد پیشنهاد می‌شود که برای القای کالوس بهینه از 6 mgl^{-1} IBA+1 mgl^{-1} BAP در محیط کشت MS استفاده شود. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان دستورالعمل مناسبی برای استراتژی باززایی و پرآوری گیاه دارویی ارزشمند زالزالک خونین فراهم کرد.

منابع

Aguda, Y. O., & Adekunle, E. A. (2020). In-vitro development of Nauclea diderrichii (de Willd. & Th. Dur) Merrin liquid-M Smedia supplemented with benzyl amino purine (BAP) and naphthalene acetic acid (NAA). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, *24*(12), 2065-2069.

Al-Manasrah, W. S. (2012). In vitro propagation of Crataegus aronia L. and secondary metabolites detection. *Biotechnology Master program. (Palestine Polytechnique University, Hebron, 2012) http://biotech. ppu. edu/sites/default/files/thesis/Wala% 20Shuaib% 20Al-% 20Manasrah. pdf*.

Amiri, S., & Mohammadi, R. (2020). The effect of plant growth regulators on hawthorn (Crataegus sp.) in vitro direct regeneration and confirmation of the genetic fidelity. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, *154*(6), 786-791.

Aragão, V. P. M., Navarro, B. V., da Silva, A. T., Silveira, V., & Santa-Catarina, C. (2017). Micropropagation of Cariniana legalis (Martius) O. Kuntze, an endangered hardwood tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909*, *13*(2), 41-50.

Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S., & Shibli, R. A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (Salvia fruticosa Mill.). *Scientia Horticulturae*, *100*(1-4), 193-202.

Chaâbani, G., Tabart, J., Kevers, C., Dommes, J., Khan, M. I., Zaoui, S., ... & Karray-Bouraoui, N. (2015). Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid combined to 6-Benzylaminopurine on callus induction, total phenolic and ascorbic acid production, and antioxidant activities in leaf tissue cultures of Crataegus azarolus L. var. aronia. *Acta physiologiae plantarum*, *37*, 1-9.

Chalupa, V. (1987). Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on in vitro shoot proliferation of Tilia cordata Mill., Sorbus aucuparia L. and Robinia pseudoacacia L. *Biologia plantarum*, *29*(6), 425-429.

Debnath, M. (2008). Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant Stevia rebaudiana. *Journal of medicinal plants research*, *2*(2), 45-51.

Del Monte, J. P., & Tarquis, A. M. (1997). The role of temperature in the seed germination of two species of the Solanum nigrum complex. *Journal of Experimental Botany*, *48*(12), 2087-2093.

Dinçer, D., Bekiryazıcı, F., Dündar, H., & Ögçe, H. (2023). Germination and Micropropagation of Crataegus monogyna Jacq. Seeds by Tissue Culture Method. *Forest Science*, *69*(2), 178-186.

Ebrahimie, E., Habashy, A. A., Mohammadie-Dehcheshmeh, M., Ghannadha, M. R., Ghareyazie, B., & Yazdi-Amadi, B. J. I. V. C. (2006). Direct shoot regeneration from mature embryo as a rapid and genotype-independent pathway in tissue culture of heterogeneous diverse sets of cumin (Cuminum cyminum L.) genotypes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *42*, 455-460.

Esna-Ashari, M. & Zokaei-Khosroshahi. M.R. (2013). Comprehensive guide to plant tissue culture. Bu-Ali Sina University press, 474 pp. (In Persian)

Gangulee, H.C., Das, K.S., Datta, C. & Kar, A.K. (1972). College botany. New Central Book Agency, 587pp.

Gbadamosi, I. T., & Egunyomi, A. (2010). Micropropagation of Plumbago zeylanica L.(Plumbaginaceae) in Ibadan, Southwestern, Nigeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, *4*(4), 293-297.

Ghassemi, N., & Ghanadi, A. R. (1993). A Study on the Morphology and Phytochemlstry of Some Iranian Equisetum Species. *Planta Medica*, *59*(S 1), A638-A638.

Hosseini-Nasr, M. (1999). In vitro regeneration of leguminous trees (*Albizzia Gleditsia* and Robinia). Thesis Submitted to the university of celhi for the degree of doctor of philosophy, 110 pp.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

Huetteman, A. & Preese, E.J. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant cell tissue organ culture, 33, 105-119.
Iapichino, G., & Airò, M. (2007, September). Multiplication of Crataegus monogyna by in vitro culture of nodal segments. In *III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 812* (pp. 135-140).
Imani, R. M., HOSSEINI, N. S. M., RANJBAR, G. A., & Khoshhal, S. M. (2022). In Vitro Callus Induction and Regeneration of Gleditsia caspica Desf.
Kafi, M., Kamkar, B., & Mahdavi Damghani, A. (2001). Biological Seed and Yield of Grain Products (Translation. *First Print. Press-Ferdowsi University of Mashhad, p232*.
Karam, N. S., Jawad, F. M., Arikat, N. A., & Shibl, R. A. (2003). Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild Salvia fruticosa. *Plant cell, tissue and organ culture*, *73*, 117-121.
Leggatt, I. V., Waites, W. M., Leifert, C., & Nicholas, J. (1987). Characterisation of micro-organisms isolated from plants during micropropagation. *Bacterial and Bacteria-like Contaminants of Plant Tissue Cultures 225*, 93-102.
Leifert, C.H.W. & Waites, M. (1990). Contaminations of plant tissue culture. Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture. No. 60.
Lo, E. Y., STEFANOVIĆ, S., & Dickinson, T. A. (2009). Population genetic structure of diploid sexual and polyploid apomictic hawthorns (Crataegus; Rosaceae) in the Pacific Northwest. *Molecular ecology*, *18*(6), 1145-1160.
Maharik, N., Elgengaihi, S., & Taha, H. (2009). Anthocyanin production in callus cultures of Crataegus sinaica boiss. *Int J Acad Res*, *1*(1), 30-34.
Mahdavian, M., Bouzari, N., & Abdollahi, H. (2010). Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahlab rootstock (SL-64). *Seed and Plant Journal*, *26*(1), 15-26.
Mahoney, J. D., Apicella, P. V., & Brand, M. H. (2018). Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of Aronia mitschurinii and cotyledons of closely related Pyrinae taxa. *Scientia horticulturae*, *237*, 135-141.
Mihaljevic, I., Dugalic, K., Tomas, V., Viljevac, M., Pranjic, A., Cmelik, Z., Puskar, B. & Jurkovic, Z. (2013). In vitro sterilization procedures for micropropagation of 'Oblacinska'sour cherry. Journal of Agricultural Sciences, Belgrade, 58(2): 117-126.
Moghimi, Z., & Safarnejad, A. (2015). Assessment of micropropagation and flavonoid content of hawthorn through tissue culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, *22*(2).
Motaghi, M., & Mokhtari, A. (2019). The determination of optimal condition for micro propagation of Cratagus aronia under in vitro culture. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, *32*(1), 205-217.
Ogihara, Y., & Tsunewaki, K. (1978). Tissue culture in Haworthia: I. Effects of auxins and kinetin on callus growth. *The botanical magazine= Shokubutsu-gaku-zasshi*, *91*, 83-91.
O'Kennon, B., & Lance, R. (2003). *Hawthorns and Medlars*. Portland, Or.: Timber Press.
Piri, Kh., Nazarian Firouzabadi, F. & Seifi Nabiabad, H. (2018). A guide to plant tissue culture. Boali Sina University, Hamedan press, 306 p. (In Persian)
Radpooya, A. A. (1996). The plants food etonments.
Rajoriya, P., Singh, V. K., Jaiswal, N., & Lall, R. (2018). Optimizing the effect of plant growth regulators on in vitro micro propagation of Indian red banana (Musa acuminata). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *7*(1S), 628-634.
Sakvand Soufiabadi, M. (2019). Effect of type of culture medium, explant and growth regulators on callus formation, branching and rooting of *Crataegus microphylla*. Master's thesis, Ferdowsi University of Mashhad, 107 p. (In Persian)
Salehi Sormaghi MH. (2008). Medical plants and phytotherapy. Food world Publishe; 43(2): 178-183. (In Persian)
Sharifi, A., Moshtaghi, N., & Bagheri, A. R. (2010). Applied Plant Tissue Culture. Jahad-e-Daneshgahi Publication, Mashhad.
Siddique, I., Javed, S. B., Al-Othman, M. R., & Anis, M. (2013). Stimulation of in vitro organogenesis from epicotyl explants and successive micropropagation round in Cassia angustifolia Vahl.: an important source of sennosides. *Agroforestry systems*, *87*, 583-590.
Silva, J. D., Rashid, Z., Nhut, D. T., Sivakumar, D., Gera, A., Souza, M. T., & Tennant, P. (2007). Papaya (Carica papaya L.) biology and biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, *1*(1), 47-73.
Singhal, A. K., Jarald, E. E., Showkat, A., & Daud, A. (2012). In vitro evaluation of Moringa oleifera gum for colon-specific drug delivery. *International journal of pharmaceutical investigation*, *2*(1), 48.
Stevens, M. E., & Pijut, P. M. (2018). Rapid in vitro shoot multiplication of the recalcitrant species Juglans nigra L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *54*, 309-317.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

Tafazoli, M., Hosseini Nasr, S. M., Jalilvand, H., & Tafazoli, M. (2021). Micropropagation of Chestnut (Castanea sativa Mill.) Affected by Plant Growth Regulators under In Vitro Conditions. *Ecology of Iranian Forest*, *9*(17), 114-122.

Tian, L., Wang, Y., Niu, L., & Tang, D. (2008). Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild Vitis spp.: I. In vitro embryo rescue and plant development. *Scientia horticulturae*, *117*(2), 136-141.

Yaacob, O., & Tindall, H. D. (1995). *Mangosteen cultivation* (No. 129). Food & Agriculture Org

Zarnadze, N., Dolidze, K., Manjgaladze, S., Turmanidze, N., Chitanava, J., Bolkvadze, G., & Jakeli, E. (2019, September). Microclonal Propagation of Crataegus Monogyna Jacq. in Vitro. In *CBU International Conference Proceedings* (Vol. 7, pp. 1020-1025).

نسخه پیش از انتشار

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]

"Research Paper"

Optimization of in vitro cultivation conditions of blood hawthorn (*Cratagus atrosanguinea*)

Marzieh Valizadeh[1], Seyed Mohammad Hosseini Nasr[2], Hamid Jalilvand[3] and Jan Sedbrouk[4]

1- PhD student, Department of Forest Science and Engineering, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, (Corresponding author: valizadehmarzieh@yahoo.com)
2- Associate Professor, Forest Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
3- Professor, Forest Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
4- Professor, Department of Biological Sciences, Illinois State University, USA
Received: 8 May, 2023 Accepted: 8 August, 2023

Extended Abstract

Introduction and Objective: Hawthorn is considered one of the important species of medicinal plants, whose sexual reproduction is difficult and possible through apomixis, and reproduction by rooting cuttings also faces many problems. Optimizing the conditions of in vitro cultivation of blood hawthorn as one of the natural species of Iran can be a suitable solution for its propagation. Therefore, the current research was conducted with the aim of controlling pollution, controlling browning and inducing callus of blood hawthorn (*Cratagus atrosanguinea*) in vitro.

Material and Methods: For this purpose, young and healthy stems of hawthorn were sampled at the beginning of the growing season and explants were prepared from them. Pollution control treatments included HgCl2, H2O2, NaClO, and AgNO3, and browning control treatments included controls, running water, ascorbic acid, polyvinyl chloride, and activated charcoal. For callus induction, IBA, NAA, 2,4-D, BAP, TDZ and Kin treatments at three concentration levels of 0.1, 1 and 6 mg/l and the combination of 6 mgl^{-1} NAA+1 mgl^{-1} BAP and 6 mgl^{-1} IBA+1 mgl^{-1} BAP was used in MS culture medium.

Results: The results showed that HgCl2 (0.5%, 16 minutes) with an average of 100% health was the most appropriate pollution control treatment. The control treatment with 98% of health was observed as the most appropriate browning control treatment. Also, the results showed that the type, concentration, and the interaction effect of the type and concentration of the growth regulator had a significant effect on the callus induction characteristics of blood hawthorn ($P<0.01$). The highest fresh and dry weight of callus, percentage and degree of callus formation and cross-sectional area of callus were observed among auxin and cytokinin treatments, respectively, for 6 mg/L NAA and 1 mg/L BAP treatments. Also, the results showed that the highest amount of the studied callus induction characteristics was observed in the culture medium containing the combination of auxin and cytokinin (6 mgl-1 IBA+1 mgl-1 BAP).

Conclusion: In general, the results showed that in a normal state and without applying any treatment, there is a 90% chance of controlling the browning of the explants of natural blood hawthorn branches. It is recommended to use half percent mercuric chloride for 16 minutes to disinfect the explants. The combination of growth regulators in the culture medium was evaluated as very suitable for the induction of callus of bloody hawthorn. Presenting the results of this research can provide laboratory instructions for the regeneration and mass reproduction of blood hawthorn.

Keywords: Apomixis, Browning, Callus induction, Plan growth regulations (PGRs), Pollution control

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-05-03]