

Research Paper

Optimization of *in Vitro* Cultivation Conditions of Blood Hawthorn (*Crataegus atosanguinea*)

Marzieh Valizadeh¹ , Seyed Mohammad Hosseini Nasr², Hamid Jalilvand³ and Jan Sedbrouk⁴

1- Ph.D. student, Department of Forest Science and Engineering, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, 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, Sari, Iran

3- Professor, Forest Sciences and Engineering, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

4- Professor, Department of Biological Sciences, Illinois State University, USA

Received: 8 May, 2023

Accepted: 8 August, 2023

Revised: 6 August, 2023

Available Online: 8 August, 2023

Extended Abstract

Background: It is important to research in the field of germplasm protection of native and medicinal tree species in northern Iran forests, especially blood hawthorn with many medicinal properties. Sexual reproduction of hawthorn is possible with apomixis due to the thick shell and two types of physical and physiological dormancy, and its asexual reproduction by rooting cuttings faces many problems. Bloody hawthorn (*Crataegus atosanguinea* from the Rosaceae family) is considered one of the valuable species of the forests of the north and west of the country, which is very important due to its fruitfulness, very strong wood, and numerous medicinal properties. The medicinal properties of hawthorn have been proven in the treatment of blood pressure, arteriosclerosis, heart congestion, heart muscle weakness, and coronary insufficiency. Hawthorn contains many secondary metabolites such as flavonoids proanthocyanidin and glycosides. Optimizing the *in vitro* cultivation conditions of blood hawthorn as one of the natural species of Iran can be a suitable solution for its propagation. The present research was carried out to control pollution, control browning, and induce the callus of blood hawthorn (*C. atosanguinea*) *in vitro*. Controlling the contamination of explants, seeds, and plant tissues is of great importance for the success of plant tissue culture. Since the enrichment of natural plant explants is a priority for tissue culture, this is usually associated with many problems with browning, especially for woody plants that have a thick and woody stem. Determining the type and concentration of the growth regulator of a variable factor is necessary for the growth of plants under *in vitro* conditions. After applying the growth regulator to the culture medium, the plant will show different reactions, but one of the appropriate ways to choose the correct path of plant regeneration is to determine the wet and dry weights of the callus, which is widely measured as a standard of callus growth. The callus growth curve can be obtained using the wet and dry weights of the callus. The results of past research indicate a wide range of changes in the type and concentration of growth regulators on callus formation and regeneration of different species of the hawthorn genus. A specific type and concentration of growth regulators should be applied according to the type of plant species.

Methods: Young and healthy stems of blood hawthorn were collected from Larijan in Amol, Mazandaran province, Iran, with geographical coordinates of 38° 58' N and 10° 52' E, at the beginning of the growing season. The collected stems were immediately transferred to the plant tissue culture laboratory of the Faculty of Natural Resources at Sari University of Agriculture and Natural Resources, Iran. Disinfection of natural hawthorn stems is very necessary due to surface and tissue contamination. For this purpose, explants of 0.5-1 cm size were cut from the stems. The infection control treatments included HgCl₂, H₂O₂, NaClO, and AgNO₃, and five treatments were designed to control the browning of explants. Browning control treatments included control, running water, ascorbic acid, polyvinyl chloride, and activated charcoal. In general, the culture medium consisted of substances including mineral salts (micro- and macroelements) as providers of maximum growth, amino acids and vitamins as nitrogen

sources, sugar as a source of carbon and energy, growth regulators as growth and morphogenesis stimulants, agar as the solidifier of the cultivation medium, and water, which includes 90% of the cultivation medium. In this research, the culture medium was MS, which was first created by Driver and Koniaki (1984) and prepared according to Dufussard (1976). In this study, the pH of the culture medium was set to 5.8. 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 a combination of NAA (6 mg⁻¹) + BAP (1 mg⁻¹), and IBA (6 mg l⁻¹) + BAP (1 mg⁻¹) were used in the MS culture medium. Stem explants were placed horizontally on the culture medium. Among different callus treatments, callus percentage, degree of callus, callus fresh and dry weights, and cross-sectional area of callus were measured to investigate callus induction. The best treatment was obtained by calculating the mentioned characteristics and that treatment was used for planting. It was transplanted approximately every 20 days and a total of 5-6 times. After callus cultivation in the reproduction medium, the explants were placed in a culture chamber and adaptation racks under 16 hours of light and 8 hours of dark treatment at 25 ± 2 °C with a humidity of 70%.

Results: HgCl₂ (0.5%, 16 minutes) with an average of 100% health was the most appropriate pollution control treatment. The control treatment with 98% health was observed as the most appropriate browning control treatment. Moreover, the type, concentration, and interaction effect of the type and concentration of the growth regulator significantly affected the callus induction characteristics of blood hawthorn ($P < 0.01$). The highest fresh and dry weights 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 of NAA and 1 mg/L of BAP treatments. The highest levels of the studied callus induction characteristics were observed in the culture medium containing the combination of auxin and cytokinin (6 mg⁻¹ of IBA+1 mg⁻¹ of BAP).

Conclusion: In general, the results showed a 90% chance of controlling the browning of the explants of natural blood hawthorn branches in a normal state and without applying any treatment. It is recommended to use 0.5% 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 callus induction of bloody hawthorn. 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

How to Cite This Article: Valizadeh, M., Hosseini Nasr, S. M., Jalilvand, H., Sedbrouk, J. (2024). Optimization of in Vitro Cultivation Conditions of Blood Hawthorn (*Crataegus atrosanguinea*). *Ecol Iran For*, 12(1), 37-49. DOI: 10.61186/ifei.12.1.37



مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای زالزالک خونین (*Crataegus atrosanguinea*)مرضیه ولی‌زاده^۱ , سیدمحمد حسینی‌نصر^۲، حمید جلیوند^۳ و جان سدبروک^۴^۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران،
(نویسنده مسوول: valizadehmarzieh@yahoo.com)^۲- دانشیار، علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران^۳- استاد، علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران^۴- استاد، گروه علوم زیستی، دانشگاه ایالت ایلینویز، ایالت متحده آمریکا

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۱۷ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۵/۱۵ تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۵/۱۷

صفحه: ۳۷ تا ۴۹

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: پژوهش در زمینه حفاظت از ژرمپلاس گونه‌های درختی بومی و دارویی جنگل‌های شمال ایران به‌ویژه زالزالک خونین با خواص دارویی فراوان، دارای اهمیت است. تکثیر جنسی زالزالک به دلایل پوسه ضخیم و دو نوع خفگی فیزیکی و فیزیولوژیک به‌سختی و با آپومیکسی امکان‌پذیر است و تکثیر غیرجنسی آن از راه ریشه‌دار کردن قلمه نیز با مشکلات فراوانی مواجهه است. زالزالک خونین (*Crataegus atrosanguinea*) از خانواده Rosaceae یکی از گونه‌های با ارزش جنگل‌های شمال و غرب کشور محسوب می‌شود که به‌دلیل متمر بودن و داشتن چوب بسیار محکم و خواص دارویی متعدد دارای اهمیت فراوان است. خواص دارویی زالزالک در درمان فشار خون، تصلب شرایین و احتقان قلب، ضعف عضلات قلب و نارسایی کرونر به اثبات رسیده است. زالزالک حاوی متابولیت‌های ثانویه فراوان مانند فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین و گلیکوزیدها 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 (*Crataegus atrosanguinea*) در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. کنترل آلودگی ریزنمونه، بذر و بافت گیاهان از اهمیت بالایی برای موفقیت کشت بافت گیاهان محسوب می‌شود. از آنجا که پرآوری از ریزنمونه‌های طبیعی گیاهان برای کشت بافت در اولویت قرار دارد، معمولاً این مهم با قهوه‌ای شدن به‌ویژه برای گیاهان چوبی که دارای ساقه ضخیم و چوبی هستند با مشکلات فراوانی همراه است. تعیین نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد به‌عنوان 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. با استفاده از وزن تر و خشک کالوس می‌توان منحنی رشد کالوس را به‌دست آورد. 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.

مواد و روش‌ها: ساقه‌های جوان و سالم زالزالک خونین از لاریجان امل، استان مازندران، ایران با مختصات جغرافیایی ۵۸° ۳۸' شمالی و ۵۲° ۱۰' شرقی در ابتدای فصل رویش جمع‌آوری شد. ساقه‌های جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشکده منابع طبیعی در دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران منتقل شدند. ضدعفونی ساقه‌های طبیعی زالزالک به‌دلیل آلودگی سطحی و بافی فراوان بسیار ضروری است. برای این منظور از ساقه‌ها ریزنمونه‌هایی به اندازه ۰/۵ تا یک سانتی‌متری برش داده شدند. تیمارهای کنترل آلودگی شامل H_2O_2 ، $HgCl_2$ ، $NaClO$ و $AgNO_3$ و همچنین برای کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها پنج تیمار طراحی شد. تیمارهای کنترل قهوه‌ای شدن شامل شاهد، آب روان، اسیداسکوربیک، پلی‌وینیل‌کلراید و ذغال فعال بود. به‌طور کلی محیط‌کشت از موادی شامل نمک‌های معدنی (عناصر کم مصرف و پر مصرف) به‌عنوان تأمین‌کننده رشد بیشینه، اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها به‌عنوان نیتروژن، قند به‌عنوان منبع کربن و انرژی، تنظیم‌کننده‌های رشد به‌عنوان محرک رشد و ریخت‌زایی، آگار به‌عنوان جامدکننده محیط‌کشت و آب که ۹۰ درصد محیط‌کشت را شامل می‌شود، تشکیل می‌گردد. محیط‌کشت به‌کار رفته در این تحقیق MS بود که اولین بار توسط دیابو و کیناکی در سال ۱۹۸۴ ساخته شد و با در نظر گرفتن روش دوفوسارد ۱۹۷۶ تهیه شد. در این پژوهش pH محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم گردید. برای القای کالوس، تیمارهای IBA، TDZ، BAP، 2,4-D، Kin و NAA در سه سطح غلظت ۰/۱، ۱ و ۶ میلی‌گرم در لیتر و ترکیب 6 mg l^{-1} BAP + 1 mg l^{-1} NAA + 6 mg l^{-1} IBA در محیط کشت MS استفاده شد. در این مطالعه ریزنمونه‌های ساقه به‌صورت افقی روی محیط‌کشت قرار گرفتند. از بین تیمارهای مختلف کالوس‌زایی برای بررسی القای کالوس، درصد کالوس‌زایی، درجه کالوس‌زایی، وزن تر و خشک کالوس و مساحت سطح مقطع کالوس اندازه‌گیری شد. بهترین تیمار از طریق محاسبه مشخصه‌های مذکور به‌دست آمد و برای واکنش از آن تیمار استفاده می‌شد. به‌طور تقریبی هر ۲۰ روز و در مجموع پنج الی شش بار واکنش انجام گرفت. بعد از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی، ریزنمونه‌ها در اتاقک کشت و قفسه‌های سازگاری تحت تیمار ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۷۰ درصد قرار گرفتند.

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 قهوه‌ای شدن 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 سیتوکینین 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 سیتوکینین (6 mg l^{-1} IBA + 1 mg l^{-1} BAP) مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری کلی: 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 نیم‌درصد به‌مدت ۱۶ دقیقه پیشنهاد می‌شود. ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت برای القای کالوس زالزالک خونین بسیار مناسب ارزیابی شد. ارائه نتایج این پژوهش می‌تواند دستورالعمل آزمایشگاهی برای باززایی و پرآوری زالزالک خونین فراهم کند.

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

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 غیرجنسی آن از راه قلمه زمان‌بر و با مشکلات فراوانی همراه است (Phipps et al., 2003). زالزالک خونین (*Crataegus atrosanguinea*) از خانواده Rosaceae، یکی از گونه‌های بومی و با ارزش جنگل‌های شمال و غرب کشور محسوب می‌شود که به‌دلیل 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 گلیکوزیدها است (Ghassemi Dehkordi and Ghannadi, 1993). کشت بافت می‌تواند راه‌حل 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)، کلریدجیوه ۰/۲ درصد (Moghimi and Safarnejad, 2014) و مرکوریک کلراید (Zarnadze et al., 2019) استفاده شده است. بنابراین انتخاب ماده ضدعفونی کننده برای کنترل آلودگی ریزنمونه طبیعی زالزالک بسیاراهمیت دارد. از آنجاکه 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 مرگ آن و مرگ ریزنمونه به‌معنی 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 میلی گرم در لیتر BA و ۱/۵ میلی گرم 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 (Maharik et al., 2009) محیط کشت MS حاوی ۴ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم 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 (۰/۸ میلی گرم در لیتر) و BAP (۱/۵ میلی گرم در لیتر) مشاهده کردند (Al-Manasrah, 2012). Chaabani و همکاران (Chaabani et al., 2015) القای کالوس از برگ زالزالک زرد (*Crataegus azarolus* L. var. aronia) را در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم در لیتر BAP گزارش کردند. Zarnadze و همکاران (Zarnadze et al., 2019) 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 میلی گرم در لیتر IAA و ۳ میلی گرم 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 (*Gleditsia Capsica* Desf.) (Imani et al., 2022) و اقاچیا و شب‌خسب (Albizia 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

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.

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

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

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

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 (Eсна-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).

برای القای کالوس از تیمارهای آزمایشی شامل اکسین‌های IBA، NAA و 2,4-D و سیتوکنین‌های BAP، TDZ و Kin در سه غلظت ۰/۱، 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 اکسین و سیتوکنین در محیط کشت) مورد بررسی قرار گرفتند. در این پژوهش تیمارهای منتخب شامل 6 mg/l-1 IBA، 6 mg/l-1 NAA و 6 mg/l-1 BAP و 1 mg/l-1 BAP و تیمارهای ترکیبی شامل 6 mg/l-1 IBA+1 mg/l-1 BAP و 6 mg/l-1 IBA+1 mg/l-1 BAP و NAA+1 mg/l-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.

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 *Crataegus atrosanguinea* explants

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

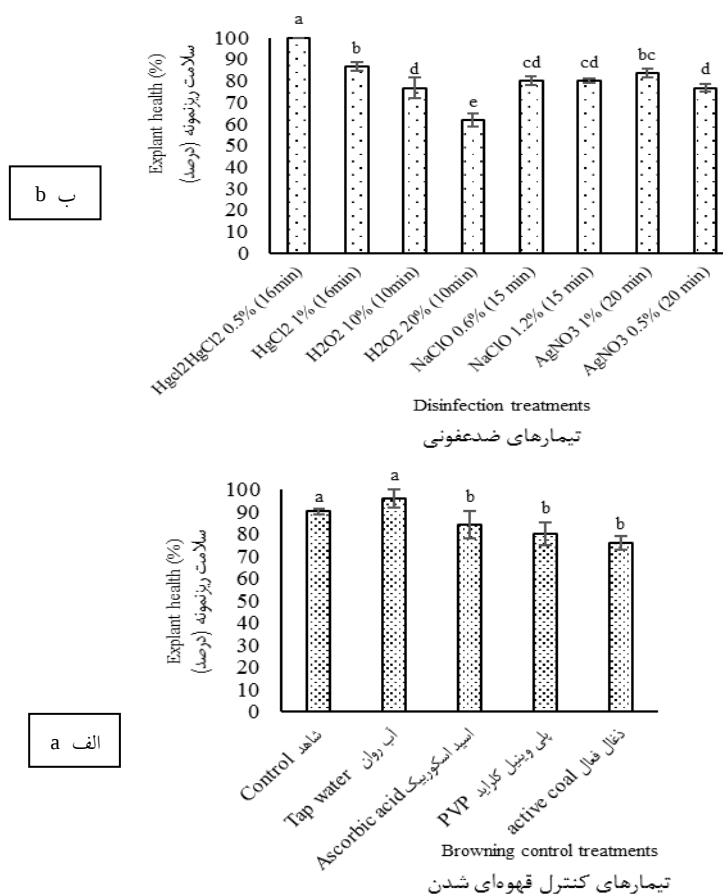
** نشان دهنده معنی‌داری در سطح یک درصد است ($P < 0.01$).

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

ماندند و هیچ گونه علائم آلودگی در این تیمار مشاهده نشد (شکل ۱-الف). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین

نتایج نشان داد که ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌های زالزالک در تیمار ضدعفونی HgCl₂ نیم درصد با زمان ۱۶ دقیقه سالم

کنترل آلودگی در تیمارهای آب روان و شاهد به‌ترتیب با میانگین ۹۶ و ۹۰ درصد مشاهده شد (شکل ۱-ب).



شکل ۲- الف) مقایسه میانگین تیمارهای کنترل قهوه‌ای شدن؛ ب) مقایسه میانگین تیمارهای کنترل آلودگی برای ریزنمونه زالک 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 خونین اثر معنی‌داری دارد ($P < 0.01$) (جدول ۳).

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

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

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

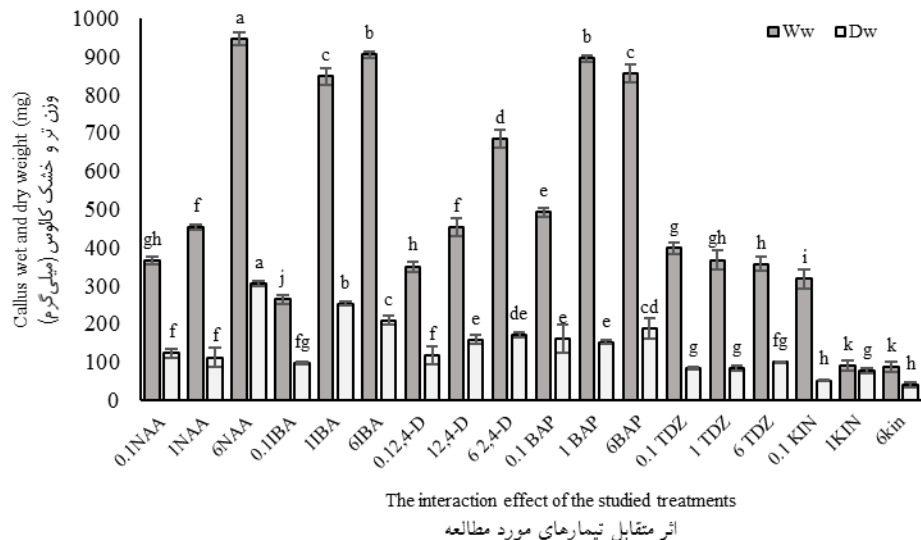
** نشان دهنده معنی‌داری در سطح یک درصد است ($P < 0.01$).

میلی گرم در لیتر NAA (۹۴۶ میلی گرم) و ۶ میلی گرم در لیتر Kin (۸۷ میلی گرم) مشاهده شد (شکل ۳). همچنین بیشترین

نتایج اثر متقابل نوع در غلظت تنظیم‌کننده رشد نشان داد که بیشترین و کمترین وزن تر کالوس به‌ترتیب در تیمار ۶

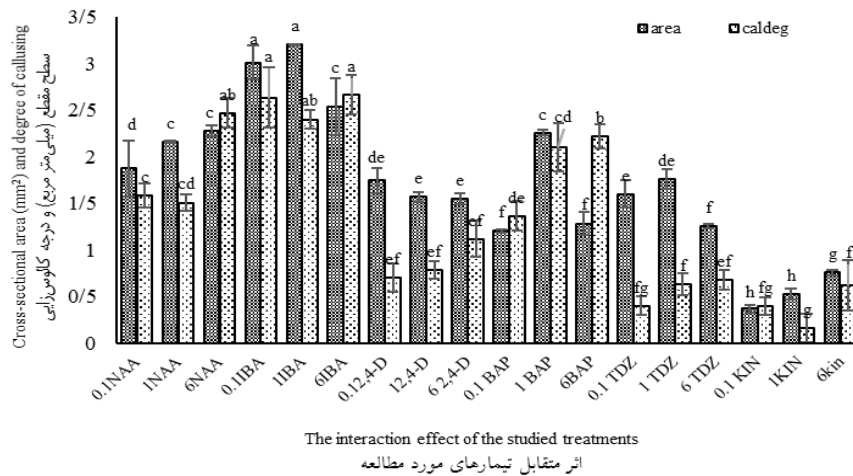
BAP بیشترین وزن تر (۸۹۵ میلی گرم) و وزن خشک (۱۵۲ میلی گرم) کالوس را داشت.

و کمترین وزن خشک کالوس نیز به ترتیب در تیمار ۶ میلی گرم در لیتر NAA (۳۰۵ میلی گرم) و ۶ میلی گرم در لیتر Kin (۳۹ میلی گرم) وجود داشت. تیمار ۱ میلی گرم در لیتر



شکل ۳- اثر نوع تنظیم کننده رشد و غلظت آن بر میانگین وزن تر و خشک کالوس زالزالک خونین. حروف معنی داری غیریکسان روی نمودار بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین تیمارها است. معنی داری هر مشخصه مورد مطالعه به صورت مجزا گروه بندی 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 تنظیم کننده رشد بر میانگین سطح مقطع کالوس و درجه کالوس زایی زالزالک خونین. حروف معنی داری غیریکسان روی نمودار بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین تیمارها است. معنی داری هر مشخصه مورد مطالعه به صورت مجزا گروه بندی شده است.

Figure 4 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.

IBA دارای تفاوت معنی دار نیست. همچنین بیشترین و کمترین درجه کالوس زایی به ترتیب در تیمار ۶ میلی گرم در لیتر IBA (میانگین ۲/۷ انبوهی) و ۱ میلی گرم در لیتر Kin (با میانگین ۰/۶ انبوهی) وجود داشت. تیمار ۱ میلی گرم در لیتر BAP در بین سیتوکینین ها بیشترین سطح مقطع کالوس (۲/۳ میلی متر مربع) و درجه کالوس زایی (۲/۱ درجه انبوهی) را داشت (شکل ۴).

نتایج اثر متقابل نوع در غلظت تنظیم کننده رشد نشان داد که بیشترین و کمترین سطح مقطع کالوس به ترتیب در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر IBA (۳/۲ میلی متر مربع) و ۰/۱ میلی گرم در لیتر Kin (۰/۶ میلی متر مربع) مشاهده شد (شکل ۴). البته با توجه به آزمون مقایسه میانگین ها، تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA (۳ میلی متر مربع) نیز در طبقه بالاترین مقدار سطح مقطع قرار گرفت و با تیمار ۱ میلی گرم در لیتر



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

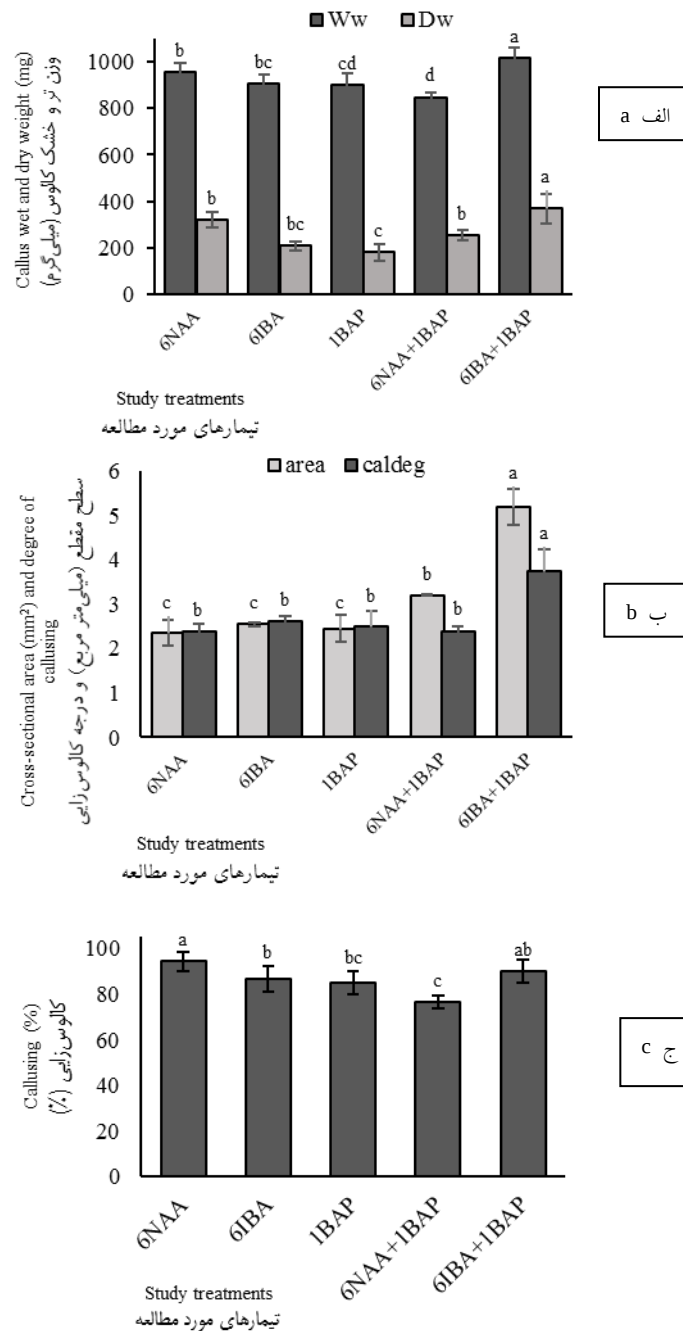
بین سیتوکینین‌های مورد مطالعه، تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۸۶ درصد بیشترین کالوس‌زایی را داشت (شکل ۵). نتایج تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که تیمارهای تنظیم‌کننده رشد منتخب اثر معنی‌داری بر درصد کالوس‌زایی ($P < 0.05$) و درجه کالوس‌زایی، وزن تر و خشک کالوس و سطح مقطع کالوس ($P < 0.01$) داشت (جدول ۳).

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

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

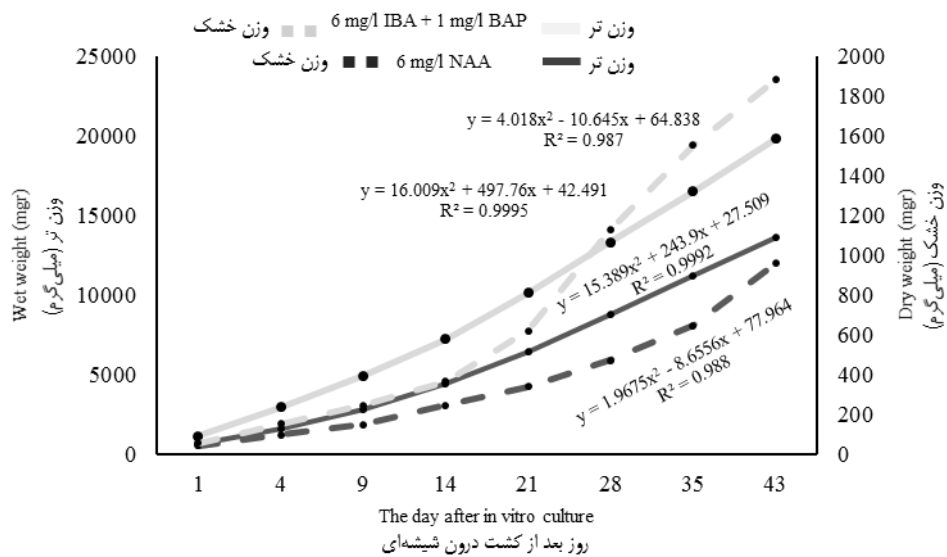


شکل ۶- مقایسه میانگین الف- وزن تر و خشک کالوس، ب- سطح مقطع کالوس و درجه کالوس‌زایی و ج- درصد کالوس‌زایی زالزالک خونین تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد. حروف معنی‌داری غیریکسان روی نمودار بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است. معنی‌داری هر مشخصه مورد مطالعه به صورت مجزا گروه‌بندی شده است.

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

در تیمار ترکیب $6 \text{ mg l}^{-1} \text{ IBA} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BAP}$ ۶ مشاهده شد. همچنین بیشترین درصد کالوس‌زایی در تیمارهای ۶ میلی‌گرم $6 \text{ mg l}^{-1} \text{ IBA} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BAP}$ و $94/44$ درصد) و 90 درصد) به ثبت رسید.

نتایج آزمون مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس، سطح مقطع کالوس و درجه کالوس‌زایی به ترتیب با میانگین $1017/25$ میلی‌گرم، $367/847$ میلی‌گرم، $5/2$ میلی‌متر مربع و $3/73$ درجه انبوهی

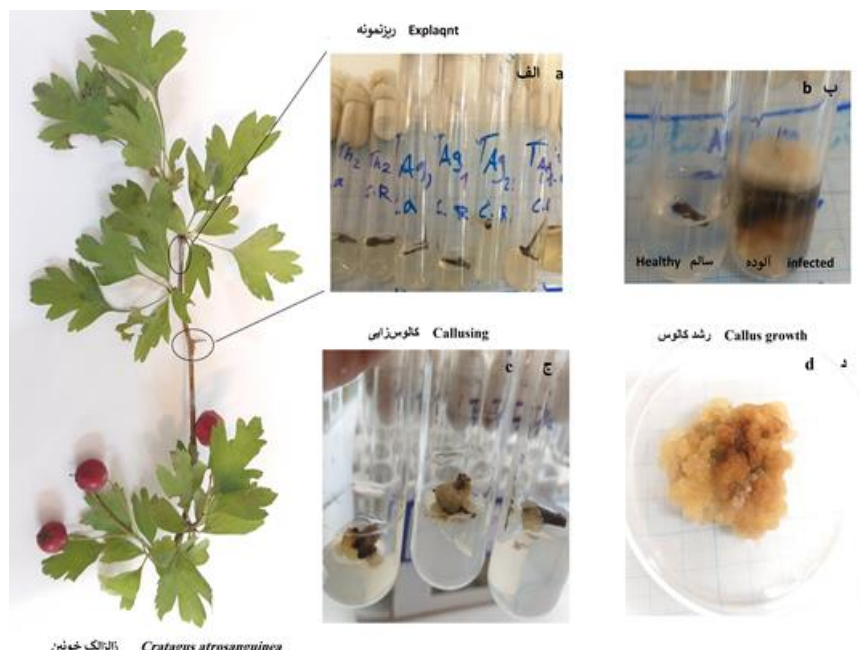


شکل ۷- منحنی رشد وزن تر کالوس (الف) و وزن خشک کالوس (ب) در بازه زمانی ۴۳ روز.

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

را در ارتباط با وزن تر و خشک کالوس را تأیید می‌کند به‌طوری‌که منحنی‌های مذکور نشان می‌دهند که رشد کالوس تحت تأثیر ترکیب سیتوکینین و اکسین ($6 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BAP}$) در محیط کشت بیشترین رشد را داشته است.

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 $6 \text{ mg l}^{-1} \text{ IBA} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BAP}$ بعد از گذشت ۴۳ روز بیشتر از تیمار $6 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$ بود (شکل ۷). بررسی منحنی‌های رویش نتایج قبلی این پژوهش



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

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

(al., 2018). آلوده شدن محیط کشت به‌وسیله 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

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 به‌دلیل انواع آلودگی‌ها هیچ نتیجه‌ای به‌دست نخواهد آمد (Piri et

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 سیتوکین‌های 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 سیتوکین‌ها 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 سیتوکین در محیط کشت، بر مشخصه‌های القای کالوس اثر بیشتری خواهد داشت به طوری که بیشتر مشخصه‌های القای کالوس و منحنی رشد کالوس در تیمار BAP 1 mg l^{-1} IBA + 6 mg l^{-1} MS 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). هرچند که وجود همزمان سیتوکین 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 به دست 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 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

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 محیط کشت‌ها در تیمارهای مختلف تا حدود ۵۰ درصد رفع خواهد شد (شکل ۲-الف). اما در تیمار ضدعفونی HgCl_2 نیم‌درصد با زمان ۱۶ دقیقه هیچ‌گونه علائم آلودگی وجود نداشت و ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها و محیط کشت سالم باقی ماندند. در بسیاری از پژوهش‌ها کلریدجیوه (HgCl_2)، اتانول ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) و هیپوکلریت سدیم (NaClO) به تنهایی یا استفاده به صورت همزمان از آنها به عنوان 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 Zokaie-Khosroshahi, 2013; Bagheri et al., 2010).

اثر بخشی کشت بافت گیاهی با القای کالوس، باززایی و پرآوری گیاه تعیین می‌شود که به طور 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 به طور انفرادی یا ترکیبی، اثر معنی‌داری بر مشخصه‌های القای کالوس از شاخه‌های طبیعی زالزالک قرمز دارد (جداول ۲، ۳ و ۵). به عبارت دیگر

از جمله عوامل مهم کنترل در القای کالوس و رشد آن می‌باشند. با توجه به اهداف پژوهش نتایج نشان داد که برای کنترل آلودگی و قهوه‌ای شدن شاخه‌های طبیعی زالزالک خونین به ترتیب 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 سی‌توکینین ۱ میلی‌گرم BAP مشاهده شد. اما به‌طور کلی با توجه به نتایج منحنی رشد پیشنهاد می‌شود که برای القای کالوس بهینه از 6 mg l^{-1} IBA + 1 mg l^{-1} BAP در محیط کشت MS استفاده شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان دستورالعمل مناسبی برای استراتژی باززایی و پرآوری گیاه دارویی ارزشمند زالزالک خونین فراهم کرد.

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 اهمیت 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). وزن تر 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

References

- Aguda, Y. O., & Adekunle, E. A. (2020). In-vitro development of *Nauclea diderrichii* (de Willd. & Th. Dur) Merrin liquid-M media 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., Dommès, 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. & Zokaie-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, 587 pp.
- 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.
- 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* (135-140).
- Imani, R. M., Hosseini Nasr, S. M., Ranjbar, G. A., & Khoshhal Sarmast, 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, 232 pp.

- 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 pp (In Persian).
- Radpooya, A. A. (1996). The plants food etonments. 34-38
- 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(15), 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 pp (In Persian).
- Salehi Sormaghi M. H. (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.
- 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*, 7, 1020-1025.