مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال سوم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۶

اثر تنظیم کننده‌های رشد بر القاء کالوس و باززایی از ریزنمونه برگ در *Crataegus pseudohetrophylla* Pojark

فاطمه احمدلو[۱*]، غلامرضا گودرزی[۲] و آزاده صالحی[۳]

چکیده

زالزالک (*Crataegus pseudohetrophylla* Pojark.) از جنس (*Crataegus*) از خانواده Rosaceae است که از لحاظ زینتی، خوراکی، دارویی، صادراتی، پناهگاه برای حیات وحش و پرندگان، حفاظت خاک و کنترل فرسایش حائز اهمیت است. جهت تولید کالوس آن، قطعات برگ‌ها در اندازه‌های ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر مربع از گیاهچه‌های کشت بافتی تهیه و پس از ضد عفونی سطحی در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های 2, 4-D در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و BAP در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تحت شرایط تاریکی در اتاقک رشد قرار گرفتند. در مرحله بعد کالوس‌ها به محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، TDZ و NAA و IBA در غلظت‌های مختلف جهت باززایی از کالوس انتقال یافتند و مشخصه‌های درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، نوع کالوس و رنگ کالوس آنها اندازه‌گیری شد. ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با بیشترین قطر کالوس در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP از نوع سفت و کروی و جنین زا به رنگ سبز روشن-سبز تیره در محیط MS مشاهده شد. ۱۰۰ درصد باززایی از کالوس در تیمارهای ۱۲ و ۱۴ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و بیشترین تعداد ساقه در هر ریز نمونه در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تنظیم کننده‌های رشد، درصد کالوس‌زایی، زالزالک، کشت درون شیشه‌ای، محیط کشت MS

۱*- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
fatemeh_ahmadloo@yahoo.com
۲- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک، ایران
۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات جنگل، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مقدمه

جنس (*Crataegus*) از زیر تیره Maloideae و خانواده Rosaceae است که در کشورهایی همچون افغانستان، ایران، ترکیه و جمهوری آسیای مرکزی از جمله قفقاز و آناتولی پراکنش دارد. زالزالک از لحاظ زینتی، خوراکی، صادراتی، پناهگاه برای حیات وحش و پرندگان، حفاظت خاک و کنترل فرسایش حائز اهمیت است. همچنین به دلیل خاصیت دارویی از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانتی، ضد التهابی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی، اثر بر سیستم قلبی-عروقی و مغزی در صنایع مختلف دارویی، شیمیایی، بهداشتی و غذایی مورد توجه قرار گرفته است. میوه‌های خوراکی غنی از مواد معدنی، پلی‌فنل و هیپروزید و آنتی اکسیدانت‌ها است (O¨zcan et al., 2005) در حالی که برگ‌ها و گل‌ها شامل سطوح بالاتر vitexin-2-rhamnoside، فلاونوئیدها و oligomeric procyanidins می‌باشند (Kingston, 2007). میوه‌ها و بذرهای آن قادر بـه کـاهش اسـید اوریـک و درمان نقرس می‌باشند و در کاهش فشارخون و حمله‌های قلبی، کاهش کلسترول سرم و تقویـت حرکـات قلـب بسـیار مؤثر هستند. استفاده از کشت سلول و بافت و تشکیل کالوس از اندام‌های مختلف *C. pseudohetrophylla* در شرایط آزمایشگاهی یکی از روش‌های جایگزین، برای تولید ماده دارویی و ازدیاد متابولیت های ثانویه می‌باشد، کشت بافت با وجود هزینه و سرمایه زیاد و همچنین نیاز به نیروی متخصص توانسته است راهی عملی در جهت تولید محصولات متابولیتی منحصر به فرد ایجاد نماید که ساختن مصنوعی آنها به‌دلیل مشکلات تکنیکی، مقدور نیست (Bajaj et al., 1988). ساختار پیچیده بسیاری از متابولیت‌های ثانویه باعث شده که نتوان آنها را به‌صورت مصنوعی سنتز نمود و لذا تنها منبع تولید آنها سلول گیاه و سپس تشکیل کالوس از طریق کشت ریزنمونه می‌باشد (Scragg, 1986). بافت ریز نمونه، یك بافت تمایز یافته است که به‌عنوان ماده آغازین برای تولید کالوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از زیرساخت‌های لازم برای تولید انبوه مواد پایه دارویی یا صنعتی، موفقیت در تولید کالوس از بافت گیاه است. کشت موفقیت‌آمیز کالوس به نوع و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد نیز بستگی دارد. بیشترین میزان کالوس از ریزنمونه‌های ساقه *Crataegus cuneata* در محیط شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (Okamura et al., 1999). درصد باززایی از قطعات جدا کشت برگ *Crataegus pinnatifida* حاصل از جوانه‌های زمستان ۱۷/۶ درصد در محیط N6 در ترکیب با ۷/۱۶ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA و درصد باززایی از قطعات جدا کشت برگ‌های حاصل از جوانه‌های بهاره ۲۷/۷ درصد در محیط MS در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ توسط Dai et al. (2007) نتیجه گرفته شده است. مقیمی و صفر نژاد (۱۳۹۳) ۸۰ درصد کالوس‌زایی *Crataegus* sp. را در محیط کشت N6 شامل ۷ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نتیجه گرفتند و بهترین محیط برای باززایی را محیط کشت B5 در ترکیب با ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۴۹ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA گزارش کردند. مجد و همکاران (۱۳۹۵) روی زالزالک سرخ ولیک، ۳۰ درصد کالوس‌زایی از نوع آبدار و صاف در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، 2, 4-D و IAA و ۴۰ درصد کالوس‌زایی از نوع حجیم، گره‌دار با بخش‌های انتهایی سفید در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، 2, 4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA نتیجه گرفتند. میزان ۲۰ درصد باززایی از کالوس در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر Zeatin و ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و BAP انجام شد.

Declerck and Korban (1996) در بررسی کالوس‌زایی *Prunus persica* L. در محیط کشت نیم غلظت MS و ۶ تنظیم‌کننده رشد با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرو مولار، TDZ کالوس‌های سفت سبز رنگ، BA و Zeatin کالوس‌های کوچک و 2, 4-D کالوس‌های ترد سفید متمایل به زرد رنگ را تولید کردند در حالی که در KIN کالوسی تولید نشد و در محیط کشت MS، بیشترین درصد کالوس

در غلظت‌هایی از ۸ تا ۱۳ میکرو مولار TDZ تولید شد. Isikalan et al. (2010) توانستند ۹۰ درصد کالوس‌های سفت و سبز تیره جنین‌زا در *Amygdalus communis* L. را در محیط کشت MS با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و Shekhar Kumar et al. (2016) بیشترین درصد کالوس‌زایی *Pyrus malus* L. (۸۶/۶۷ درصد) را در ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نتیجه گرفتند.

باززایی غیر مستقیم که به وسیله تولید کالوس صورت می‌گیرد دارای فواید زیادی از جمله مطالعه مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان، تولید متابولیت‌های ثانویه، تنوع سوموکلونال و انتقال پایدار ژن می‌باشد (پیریک، ۱۹۷۶). پتانسیل باززایی در گیاهان مختلف و ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان متفاوت می‌باشد. باززایی یکی از موانع موجود در کشت درون شیشه‌ای، تولید کالوس و باززایی غیر مستقیم خانواده رزاسه، تراوش فنول‌ها و قهوه‌ای شدن کالوس و نهایتاً مرگ تدریجی آن می‌باشد که از طریق فعالیت پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز بوسیله تحریک واکنش دفاعی ناشی از زخم شدن رخ می‌دهد (Cördük and Aki, 2011). تاکنون مطالعه‌ای جامع روی تولید کالوس و باززایی زالزالک انجام نگرفته است. احمدلو و همکاران (۱۳۹۴) به ریشه‌زایی سخت گونه *C. pseudohetrophylla* در شرایط کشت درون شیشه‌ای اشاره کرده‌اند که غلظت تنظیم کننده‌های رشد می‌تواند در ریشه‌زایی و تکثیر گیاهچه آن تأثیرگذار باشد.

تحقیق حاضر به‌دنبال یافتن دستورالعمل مناسب برای تولید کالوس و باززایی گونه *C. pseudohetrophylla* با قطعات جدا کشت برگ و غلظت‌های مختلف انواع تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد در محیط کشت می‌باشد تا نتایج آن برای مطالعات بعدی در خصوص ریزازدیادی، مهندسی ژنتیك و انتقال ژن مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مشخصات منطقه مورد مطالعه

تحقیق حاضر در پژوهشکده تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات با طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۳۰ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۵۳ دقیقه شمالی، در جنوب شرقی مرکز استان مرکزی قرار دارد. اقلیم آن براساس روش آمبرژه نیمه خشك و بر اساس روش دومارتن خشك بیابانی سرد با ارتفاع ۱۷۵۰ متر از سطح دریا، میانگین بارندگی سالیانه ۲۲۰ میلی‌متر و میانگین دمای سالیانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد در طی دوره اجرای طرح بوده است. بافت خاك شنی رسی نسبتاً سبك (بافت سنگین) و شنی لومی (شنی رسی سبك) می‌باشد.

روش تحقیق

برای انجام این پژوهش از سر شاخه‌های یکساله نیمه خشبی و واجد جوانه در حال رشد پایه‌های مادری گیاه *C. pseudoheterophylla* با ویژگی‌های یکسان از نظر قطر و ارتفاع و مورفولوژی استفاده گردید. نمونه‌ها از روستای دو خواهران در شهرستان شازند با عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۵۱ دقیقه و ۵۲ ثانیه شمالی و طول جغرافیایی ۴۱ درجه و ۲۴ دقیقه و ۱۲ ثانیه شرقی جمع‌آوری گردید. متوسط ارتفاع منطقه ۲۲۳۳ متر، متوسط بارندگی ۵۲۸/۵۴ میلی‌متر، اقلیم منطقه نیمه مرطوب سرد و کوهستانی، بافت خاک لومی شنی تا لومی رسی شنی با اسیدیته ۸-۷/۸ است.

سر شاخه‌های جوان واجد جوانه در حال رشد درختان مادری در بسته‌بندی‌های تمیز به‌وسیله فلاسک یخ به آزمایشگاه پژوهشکده تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات انتقال یافت. ریزنمونه تک گره حاوی جوانه جانبی به اندازه ۱ سانتی‌متری از شاخه‌ها جدا و ضدعفونی شده و کشت در محیط MS انجام و شاخه‌ها ازدیاد گردید. کشت‌ها در شرایط خاص اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و حرارت ۲۵ درجه و تشعشع لامپ‌های فلورسنت ۳ هزار لوکس قرار گرفت.

جهت تولید کالوس، قطعات برگ‌ها در اندازه‌های ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر مربع از گیاهچه‌های کشت بافتی تهیه و پس از ضد عفونی سطحی به‌مدت ۳۰ دقیقه، ضدعفونی با محلول اتانول ۷۰ درصد و محلول سفید کننده تجاری هیپو کلریت سدیم ۱ درصد انجام گرفت. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های 2, 4-D در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و BAP در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تحت شرایط تاریکی برای مدت زمان دو ماه در اتاقک رشد با حرارت ۲۵ درجه و رطوبت ۵۰ درصد قرار گرفتند به نحوی‌که سطح پشتی برگ (سطح پر روزنه) به سمت بالا و حاوی رگبرگ میانی بوده است. عمل واکشت نمونه‌ها هر چهار هفته یکبار صورت گرفت. ریزنمونه‌ها پس از ۴ هفته تولید کالوس نمودند. تعداد ۲۴ ریزنمونه در هر تیمار (۳ پتری‌دیش و در هر یک ۸ ریزنمونه) و تعداد کل ۱۵ تیمار و ۳۶۰ ریزنمونه در مرحله کالوس‌زایی استفاده شد. ۳ ماه پس از کشت، درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس (Hooker and Nabors, 1977)، کیفیت و رنگ کالوس اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد کالوس‌ها به محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد BAP (۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ میلی‌گرم در لیتر)، TDZ (۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و اکسین NAA در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و IBA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جهت باززایی از کالوس انتقال یافتند. تعداد ۱۲ کالوس در هر تیمار (۳ شیشه و در هر یک ۴ ریزنمونه) و تعداد کل ۸ تیمار و ۹۶ کالوس در مرحله باززایی از کالوس استفاده شد. پس از گذشت مدت زمان ۴ ماه، مشخصه‌های درصد باززایی و میانگین تعداد ساقه در هر ریزنمونه اندازه‌گیری شد.

نتایج

مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی و قطر کالوس در ریز نمونه‌های برگ *C. pseudoheterophylla* در محیط کشت MS تحت تأثیر 2, 4-D در ترکیب با BAP در غلظت‌های مختلف توسط آزمون تجزیه واریانس اختلاف معنی‌دار آماری را نشان می‌دهد. ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین قطر کالوس در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP از نوع سفت و کروی و جنین‌زا به رنگ سبز روشن-سبز تیره وجود دارد. تیمار با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر و بدون BAP کالوسی را تولید نکردند (جدول ۱). 2, 4-D در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ کالوس‌های نرم و تردی را تولید کرد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین مشخصه‌های درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، نوع کالوس و رنگ کالوس در ریزنمونه‌های برگ *C. pseudoheterophylla* تحت تأثیر 2, 4-D در ترکیب با BAP در محیط کشت MS

تیمارها	2, 4-D (میلی‌گرم در لیتر)	BAP (میلی‌گرم در لیتر)	درصد کالوس‌زایی	قطر کالوس (سانتی‌متر)	نوع کالوس	رنگ کالوس
F			۲۱۳/۲۶**	۱۳/۳۳**	-	-
۱	۰/۲۵	۰	۰/۰۰(۰/۰۰)h	۰/۰۰(۰/۰۰)g	-	-
۲	۰/۲۵	۰/۵	۴۲/۸۷(۲/۰۷)e	۱۳(۱/۵۳)cde	ترد	سفید-کرم
۳	۰/۲۵	۱	۷۱/۴۳(۲/۵۴)c	۱۴(۱)bcd	ترد	سفید-کرم
۴	۰/۵	۰	۱۰/۳۳ (۰/۰۷)g	۹(۱)ef	نرم	قهوه‌ای
۵	۰/۵	۰/۵	۶۶/۷(۲/۳۱)c	۱۲(۱/۱۵)def	ترد	سفید-کرم
۶	۰/۵	۱	۵۷/۱۴(۳/۴۶)d	۱۱(۰/۵۸)def	ترد	کرم
۷	۱	۰	۲۵/۱۴(۰/۷۲)f	۱۱(۰/۵۸)def	ترد و به‌طور جزئی نرم	سفید-کرم
۸	۱	۰/۵	۸۳/۳۳(۳/۶۲)b	۱۵(۲/۰۸)bcd	ترد و به‌طور جزئی نرم	سفید-کرم
۹	۱	۱	۷۲/۸۶(۰/۷۸)c	۸(۰/۶۷)f	کروی و جنین زا	سبز روشن تا تیره
۱۰	۲	۰	۳۱/۳۳(۳/۰۷)f	۱۳(۱/۵۳)cde	به‌طور جزئی نرم	سفید
۱۱	۲	۰/۵	۱۰۰(۰/۰۰)a	۱۸(۰/۵۸)ab	سفت و کروی و جنین زا	سبز تیره
۱۲	۲	۱	۱۰۰(۲/۳۱)a	۲۱(۱/۵۳)a	سفت و کروی و جنین زا	سبز روشن تا تیره
۱۳	۳	۰	۲۸/۹(۱/۱)f	۱۴(۲/۰۸)bcd	نرم	سفید-کرم
۱۴	۳	۰/۵	۴۲/۸۷(۰/۴۴)e	۱۷(۱/۷۳)abc	ترد	کرم
۱۵	۳	۱	۵۶/۷(۲/۳۴)d	۱۳(۱/۵۳)cde	سفت و کروی و برخی جنین زا	سبز روشن

**معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۹ درصد اعداد داخل پرانتز اشتباه معیار هستند. حروف لاتین کوچک مشابه معرف عدم وجود تفاوت معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

بیشترین درصد باززایی از کالوس در تیمارهای ۱۲ و ۱۴ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و بیشترین تعداد ساقه در هر ریز نمونه در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA وجود دارد. تیمار TDZ در ترکیب با IBA پاسخ مناسبی را نسبت به مشخصه‌های اندازه‌گیری شده نشان ندادند (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین مشخصه‌های درصد باززایی و میانگین تعداد ساقه در هر ریزنمونه *C. pseudoheterophylla* تحت تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف در محیط کشت MS

تیمارها	تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (میلی‌گرم در لیتر)				درصد باززایی	میانگین تعداد ساقه در هر ریزنمونه
F	BAP	NAA	TDZ	IBA	۷۲/۵۴**	۲۴/۳۷**
۱	۶	۲	-	-	۷۰(۷)c	۱/۶(۰/۱۲)d
۲	۸	۲	-	-	۸۵(۵/۰۳)b	۷/۹(۰/۵۹)b
۳	۱۰	۲	-	-	۹۵(۱)ab	۱۲/۳(۱/۲۱)a
۴	۱۲	۲	-	-	۱۰۰ (۰/۰۰)a	۹/۲(۱/۰۵)b
۵	۱۴	۲	-	-	۱۰۰(۰/۰۰)a	۵/۳(۰/۸۵)c
۶	-	-	۱	۰/۱	۷۰(۴/۵۱)c	۸/۳(۰/۳۲)b
۷	-	-	۱/۵	۰/۱	۲۳(۲/۵۲)d	۵/۴(۰/۶)c
۸	-	-	۲	۰/۱	۲۵(۲/۵۲)d	۲/۵(۰/۲۱)d

** معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۹ درصد اعداد داخل پرانتز اشتباه معیار هستند. حروف لاتین کوچک معرف وجود تفاوت معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

بحث

نسبت بهینه از دو تنظیم‌کننده رشد اکسین و سیتوکینین عموماً BAP برای تشکیل کالوس مورد نیاز است (Dixon and Gonzales, 1996). اکسین‌ها به خصوص 2, 4-D تشکیل جنین‌های سوماتیکی را القا کرده و تقسیم سلولی را باعث می‌شوند، این تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس نیز نقش داشته و از رشد جوانه‌های جانبی و ریشه جلوگیری می‌کنند. سیتوکینین‌ها نیز هم تقسیم سلولی را و هم تمایز جوانه‌های جانبی را بر عهده دارند. در تحقیق حاضر استفاده از غلظت‌های بالای تنظیم‌کننده‌های رشد تأثیر بیشتری بر درصد کالوس‌زایی نشان داد. میزان کاربرد تنظیم‌کننده‌های خارجی به ژنوتیپ و میزان هورمون داخلی گیاه بستگی دارد. محیط 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، بیشترین میزان کالوس‌زایی را نشان دادند (علمداری و صفرنژاد، ۱۳۸۹). ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی در شرایط تاریکی در ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN و ماکزیمم قطر کالوس در ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN. و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN توسط Taimori et al. (2016) در *C. pseudoheterophylla* نتیجه گرفته شد. ۱ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN. در هر دو جدا کشت ساقه و برگ بیشترین میزان کالوس‌زایی را در *Crataegus sinaica* نشان داد (Maharik et al., 2009). جدا کشت ساقه در ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN در *Crataegus aronia*، بیشترین میزان کالوس را نشان داد (Al Abdallat et al., 2011).

مطالعات Tarrahi and Rezanejad (2013) روی *Rosa gallica* و *R. hybrida* نشان داد که ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین غلظت برای تشکیل کالوس می‌باشند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. Ram et al. (2011) در *R. hybrida* میزان کال‌زایی (۹۱/۱۱ درصد) را در ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و Peer et al. (2012) در *P. avium* میزان کال‌زایی ۶۶/۱۹ درصد را در ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP نتیجه گرفتند. مطالعات Sakurai et al. (1997) روی گونه *Rosa spp.* نشان داد که بیشترین درصد

کالوس در محیط کشت MS در ترکیب با ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد. گزارش شده است که غلظت‌های خیلی زیاد هورمون 2, 4-D ممکن است برای بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت، مهار کننده باشد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی ندارد.

بافت کالوس بسته به گونه گیاهی می‌تواند سفت و سخت (به علت وجود لیگنین) و یا ترد و شکننده باشد. با وجود اینکه کشت ریزنمونه‌های اولیه به‌کارگیری شده در تحقیق به‌صورت همزمان انجام گرفت، ویژگی‌های کیفی ازجمله بافت و رنگ کالوس‌های ایجاد شده در محیط کشت‌ها متفاوت بود. در مطالعه Avilés et al. (2009) کشت ریزنمونه برگ *Juglans regia* در ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP کمترین نرخ قهوه‌ای شدن را نشان داد. عوامل متعددی بر نوع رنگ کالوس مؤثرند. در تحقیق حاضر میزان قهوه‌ای شدن و آبکی شدن کالوس‌ها در غلظت‌های پایین 2, 4-D مشاهده شد و در غلظت‌های بالای 2, 4-D ویژگی جنین‌زا بودن مشاهده شد. کالوس‌های غیر جنین‌زا اغلب آبکی و دارای سلول‌های کشیده هستند که هسته حجم کمی از سلول را اشغال کرده است و به سختی باززا می‌شوند در صورتی که کالوس‌های جنین‌زا ساختار فشرده‌تری دارند و سلول‌های تشکیل‌دهنده آنها کم و بیش کروی و دارای هسته بزرگی هستند. میزان اکسین و سیتوکینین به کار برده شده در محیط کشت و شرایط اتاق کشت نیز بر رنگ و سفتی بافت کالوس مؤثرند.

کالوس تولید شده دارای خصوصیات ظاهری و فیزیکی متفاوتی بوده و قابلیت تمایز به ریشه، اندام‌های هوایی و یا جنین‌های سوماتیکی را دارا می‌باشد. در این بررسی ضمن تشکیل کالوس‌هایی با رنگ‌ها و اشکال مختلف، در نمونه-های مورد بررسی، شروع کالوس‌دهی و رشد آن از سرعت بالایی برخوردار بوده است که میزانی از تمایز در آنها مشاهده می‌شد. ازآنجا که کیفیت کالوس به نوع و میزان عناصر موجود در محیط کشت (ماکرو، میکرو، ویتامین‌ها و غیره) وابسته است، تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد می‌توانند روی این متغیر اثرگذار باشند.

در تحقیق حاضر غلظت ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP را به‌دلیل تولید ۱۰۰ درصد کالوس با بیشترین قطر و از نوع کروی و جنین‌زا و به رنگ سبز در محیط کشت MS را می‌توان به‌عنوان پروتکل کالوس‌زایی *C. pseudoheterophylla* معرفی نمود اگرچه نیاز به تحقیق بیشتری در این زمینه برای دستیابی به نتایج بهتری می‌باشد.

منابع

احمدلو، ف.، طبری کوچکسرایی، م.، آزادی، پ.، حمیدی. و بیرامی زاده، ا. (۱۳۹۴). اثر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر اندام زایی گونه زالزالک ایروانی (*Crataegus pseudoheterophylla* Pojark.) در کشت درون شیشه ای. نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی، ۵ (۱۷): ۸۵-۹۵.

پیریک، آر. ال. ام. (۱۹۷۶). مبانی کشت بافتهای گیاهی، (مترجمین: باقری، ع.ر.، صفاری، م.، ۱۳۷۶)، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، شماره ۲۱۱، مشهد، ۴۰۶ صفحه.

علمداری، س.ب.ل. و صفرنژاد، ع. (۱۳۸۹). تأثیر تنظیم کننده های رشد بر کشت بافت زالزالک (*Crataegus* spp.)، پنجمین همایش ملی ایده‌های نو در کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، ۲۸-۲۷ بهمن. ۳-۱ ص.

مجد، ا.، زندی، ن.، اربابیان، ص. و شریف نیا، ف. (۱۳۹۵). بررسی مقایسه‌ای تولید بذر مصنوعی دو گونه سرخ ولیک (زالزالک) از راه‌های کشت مریستم و رویان‌های پیکری، مجله سلول و بافت، ۷ (۲): ۱۲۱-۱۲۹.

مقیمی، ز. و صفرنژاد، ع. (۱۳۹۳). بررسی ریزازدیادی و میزان فلاونوئید زالزالک (*Crataegus* spp.) از طریق کشت بافت، دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۲ (۲): ۱۸۱-۱۹۱.

Al Abdallat, A.M., Sawwan, J.S. and Al Zoubi, B. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of callus cells of *Crataegus aronia*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 31-39.

Avilés, F., Ríos, D., González, R. and Sánchez-Olate, M. (2009). Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans regia* L.). Chilean Journal of Agricultural Research, 69 (3): 460-467.

Bajaj, Y.P.S., Furmanowa, M. and Olszowska, O. (1988). Biotechnology of micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj Y P S (Ed.). Springer-Verlag, New York, 68 p.

Cördük, N. and Aki, C. (2011). Inhibition of browning problem during micropropagation of *Sideritis trojana*, an endemic medicinal herb of Turkey. Romanian Biotechnological Letters, 16: 6760–6765.

Dai, H., Zhang, Z., Guo, X., (2007). Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E.Br.). In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 43(1): 2-8.

Declerck, V. and Korban, S.S. (1996). Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). Journal of Horticultural Science, 71 (1): 49-55.

Dixon, R.N. and Gonzales, R.A. (1996). Plant cell culture: A practical Approach, Oxford University Press, 362 p.

Hooker, M.P. and Nabors, M.W. (1977). Callus initiation, growth and organogenesis in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Z. Pflanzenphysiol, 84: 237-246.

Isikalan, C., Akbas, F., Namli, S. and Basaran, D. (2010). Adventitious shoot development from leaf and stem explants of *Amygdalus communis* L. cv. Yaltinski. Plant Omics Journal, 3 (3):92-96.

Kingston R. (2007): A phyotchemical analysis of selected constituents of *Crataegus* flos and fruct. to determine whether ethanol, whiskey and brandy solvents affect the chemical constituent profi le of the herbal preparations 2007, Scottish School of Herbal Medicine, 15 (3): 16-18.

Maharik, N., Elgengaihi, S. and Taha, H. (2009). In vitro mass propagation of the endangered sinai howthorn *Crataegus sinaica* Boiss. International journal of academic research, 1 (1): 24-29.

O¨zcan, M., Haciseferogullari, H., Marakoglu, T. and Arslan, D. (2005). Hawthorn (*Crataegus* spp.) fruit, some physical an d chemical properties. Journal of Food Engineering, 69, 409–413.

Okamura, T., Akino, R. and Ohfuka, Y. (1999). Induction of callus from *Crataegus cuneata* stems, Bull. Mukogawa Women's Univ. Natural Science, 47: 43-45.

Peer, F.A., Rather, Z.A., Mir, M.A., Bhat, K.M., Dar, K.R. and Hussain, G. (2012). Callus induction and adventitious shoot regeneration in two genotypes of sweet cherry (*Prunus avium*). The Indian Journal of Agriculture Sciences, 82 (9): 737-741.

Ram, M., Prasad, K.V., Kumar, S., Singh, S.K., Arora, A. and Kumar, S. (2011). Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 171–179.

Sakurai, M., Ozeki, Y. and Mori, T. (1997). Induction of anthocyanin accumulation in rose suspension-cultured cells by conditioned medium of strawberry suspension cultures. Plant Cell, Tissue

growth regulators on in vitro callus growth of *Taxus baccata* L. Food Technology and Biotechnology, 40 (4): 299-303.

Taimori, N., Kahrizi, D., Abdossi, V. and Papzan, A.H. (2016). Cell dedifferentiation, callus induction and somatic embryogenesis in *Crataegus* spp., Cellular and molecular biology (Noisy-Ie-Grand), 62 (11): 100-107.

Tarrahi, R. and Rezanejad, F. (2013). Callogenesis and production of anthocyanin and chlorophyll in callus cultures of vegetative and floral explants in *Rosa gallica* and *Rosa hybrida* (Rosaceae). Turkish Journal of Botany, 37: 1-10.

and Organ Culture, 50 (3): 211-214.

Scragg, A.H. (1986). The economics of mass cell culture. In: Morris P, Scragg AH, Stafford A, Fowler MW. (Eds) Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge University Press, Cambridge, 202p.

Shekhar Kumar, R., Joshi, C. and Kumar Nailwal, T. (2016). Callus induction and plant regeneration from leaf explants of apple (*Pyrus malus* L.) cv. golden delicious. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5 (2): 502 – 510.

Snjezana, M., Bjedov, I., Kovac, M., Levanic, D.L. and Jejaska, S. 2002. Effect of explant source and

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 3, No 1, Spring & Summer 2017

Effect of growth regulators on callus induction and regeneration of *Crataegus pseudohetrophylla* from leaf segment

Fatemeh Ahmadloo[1*], Gholam Reza Goodarzi[2], Azadeh Salehi [3]

[1*] Assistant Professor, Forest Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran. fatemeh_ahmadloo@yahoo.com
[2] Assistant Professor, Research Division of Natural Resources, Markazi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Arak, I.R. Iran.
3 Assistant Professor, Forest Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, I.R. Iran.

Abstract

Crataegus pseudohetrophylla Pojark. of the genus *Crataegus* is a member of the Rosaceae family that is important in terms of ornamental, food, medicinal, exported, shelter for wildlife and birds, soil conservation and erosion control applications. For callus induction, Leaf pieces (0.5–1.0 cm^2) produced by plantlets after surface sterilization in MS medium containing 2, 4-D at concentrations of 0.25, 0.5, 1, 2, and 3 mg l^{-1} and BAP at concentrations of 0, 0.5, and 1 mg l^{-1}, placed in a growth chamber under dark conditions. In the next step, the calli were transferred to culture medium supplemented with growth regulators of BAP, TDZ, NAA, and IBA in different concentrations for regeneration and then characteristics of callus induction (%), callus diameter (mm), callus type, and callus color were recorded. 100% callusing at concentration of 2 mg l^{-1} 2, 4-D in combination with 0.5 and 1 mg l^{-1} BAP with the greatest diameter at concentration of 2 mg l^{-1} 2, 4-D in combination with 1 mg l^{-1} BAP and hard, globular and embryonic in texture with light green to dark green in color were observed on MS medium. 100% explants forming shoots (regeneration) was obtained using of 12 and 14 mg l^{-1} BAP in combination with 2 mg l^{-1} NAA and the highest means number of shoots per explants was observed at concentration of 10 mg l^{-1} BAP in combination with 2 mg l^{-1} NAA.

Keywords: Growth regulators, Callus induction (%), *Crataegus pseudohetrophylla*, In vitro culture, MS culture medium