مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال چهارم، شماره دوم، پاییز و زمستان، ۱۳۹۷

بهینه‌سازی تشکیل کالوس و ریشه‌های نوپدید به منظور تولید متابولیت‌های با ارزش دارویی گیاه رازک

موژان گلعلی‌پور[۱]، مهناز اقدسی*[۱]، محمد فاطمی[۱]

چکیده

رازك (*Humulus lupulus* L.) گیاهي از خانواده شاهدانه است که در بیشتر نقاط جهان به منظور مصارف دارویي و صنعتي کشت مي‌شود. مواد موثره این گیاه ترکیبات رزیني، اسانس، فنل و فلاونویید است. هدف از پژوهش حاضر بهینه‌سازی تولید کالوس و ریشه‌های نوپدید جهت تولید متابولیت‌های ثانویه است. به این منظور قطعه جدا کشت دمبرگ در دو نوع محیط کشت MS وB5 حاوی غلظت‌های مختلف (۵، ۳، ۲.۵، ۲، ۱.۵، ۱، ۰.۵، ۱، ۰ میلی گرم در لیتر) Kin به تنهایی یا همراه با غلظت‌های مختلف (۵، ۳، ۲.۵، ۲، ۱.۵، ۱، ۰.۵، ۱، ۰) NAA و یا 2,4-D کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در 8 تکرار و تعداد پنج قطعه جدا کشت در هر تکرار انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که محیط MS و B5 اثر یکسانی در تحریک کالزایی دارند. بیشترین میزان کالزایی (۱۰۰%) در تیمار (۲.۵ و ۲.۵) و (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر NAA+Kin و یا 2,4-D+Kin در هر دو محیط دیده شد. بیشترین میزان وزن خشک و تر در محیط کشت حاوی (۲.۵ و ۲.۵) میلی‌گرم در لیتر NAA+Kin مشاهده شد. نتایج حاضر همچنین نشان داد که تیمار (۰.۵ و ۰.۵) میلی‌گرم در لیتر NAA+Kin و نیز (۱ و ۰.۵) میلی‌گرم در لیتر 2,4-D+Kin در هر دو محیط سبب تحریک بیشترین درصد (۸۵%) ریشه‌زایی می‌شود. بیشترین میزان فنل و فلاونویید به ترتیب در محیط MS حاوی (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر NAA+Kin و محیط B5 حاوی (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر 2,4-D+Kin تولید شد.

کلمات کلیدي: رازک، کالوس، ریشه نوپدید، فنل، فلاونویید

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان. *نویسنده مسول، ایمیل: aghdasi1346@gmail.com

مقدمه

رازک با نام علمی *Humulus lupulus* L. گیاهی علفی، بالارونده، چند ساله و از خانواده Cannabinaceae یا شاهدانه است (Bremer et al., 2003). رویشگاه اصلی این گیاه در ایران در استان‌های مازندران، گیلان و گلستان است (زرگری، ۱۳۷۳). تاکنون خواص دارویی متعددی از این گیاه گزارش شده است. در طب سنتی چین از رازک برای تقویت معده و کم اشتهایی استفاده می‌شود. بومیان آمریکا از رازک برای درمان افسردگی و التهاب استفاده می‌کردند (Bown, 2001). استفاده از گل رازک به‌عنوان یک ماده هیجان‌آور و کاهنده تنش‌های عصبی، بهبود و متعادل کننده مزاج، آرام کننده درد دندان و گوش مرسوم بوده است (Grieve, 1971). علاوه بر این اثرات ضد تشنج و آنتی‌باکتریایی بسیار بالایی از این گیاه گزارش شده است (Duke, 1985; Weiss, 1988, Blumenthal, 1998). در گذشته از عصاره الکلی رازک در درمان جذام، سل، اسهال خونی و از بخور درمانی آن برای درمان عوارض پوستی، مشکلات تنفسی و عصبی استفاده می‌شده است (Lawless, 1995).

تاکنون بیش از هزار ترکیب مختلف در رازک شناسایی شده است که عمده این ترکیب‌ها در سه دسته ترپن‌ها، چالکون‌ها و اسیدهای تلخ قرار دارند. از جمله ترکیبات ترپنوئیدی مهم این گیاه می توان به بتا کاریوفیلین، فارنزن، هیومولین و مرسین اشاره کرد (Eri et al., 2000; Zanoli et al., 2005). رازک همچنین غنی از انواع فلاونول گلیکوزیدها (کامفرول، کوئرستین، کوئرسیترین، روتین) و کاتشین‌ها (کاتشین‌گالات و اپی‌کاتشین‌گالات) است (Sagesser and Denzer, 1996; Steenackers et al., 2015). ترکیبات رزینی موجود درگل‌های ماده‌ی رازك به دو دسته ي آلفا اسیدهای تلخ و بتا اسیدهای تلخ تقسیم‌بندی می‌شوند (Zhang et al., 2004; Farag et al., 2012). آلفا اسیدها از ترکیبات بسیار مهم گل‌های رازک است که در ساخت برخی از انواع نوشیدنی‌ها اهمیت دارد. این ترکیب به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی بسیار بالا، در نگهداری این مایعات نقش زیادی دارد (Masek et al., 2014). علاوه بر آن رازک با رسوب پروتئین‌ها سبب شفاف شدن نوشیدنی‌ها شده و عطر خاصی به آن می‌بخشد. این ویژگی‌ها، عامل منحصر به فردکننده رازک از دیگر گیاهان قابل استفاده است، به گونه‌ای که ۹۸ % صنایع آبجوسازی در دنیا از رازک استفاده می‌کنند. گل‌های رازک به‌عنوان یک منبع طبیعی برای معطر کردن فراورده‌های غلات، سس‌ها، غذاهای آماده و تنباکو استفاده می‌شود. همچنین برخی دیگر از گونه‌های رازک مانند *H. japonicus* و *H. yunnanensis* بیشتر در ساخت لوازم آرایشی و بهداشتی اهمیت دارند (Lawless, 1995; Steenackers et al., 2015). همچنین نشان داده شده که عصاره الکلی رازک اثر آنتاگونیستی با آمفتامین‌های مخرب صنعتی دارد (Zanoli et al., 2005). از رازک در صنایع تولید پارچه و کاغذ نیز استفاده می‌شود (Grieve,1971).

تاکنون گزارش‌های متعددی از کشت بافت گیاه رازک منتشر شده است که به عنوان مثال می‌توان به تولید گیاهان عاری از ویروس به روش کشت مریستم (Postman et al., 2005)، نگهداری ژرم پلاسم در شرایط سرد و شرایط انجماد (Reed et al., 2003)، تولید انبوه این گیاه از طریق باززایی نابجا (Gurriaran et al., 1999)، انتقال ژن (Horlemann et al., 2003)، بررسی تنوع سوماکلونال در کشت مریستم (Patzak, 2003) و مقایسه بین رازک‌های ترانسژنیک با انواع

وحشی از نظر تولید فلاونوئید (Gatica-Arias et al., 2012) اشاره کرد. اولین بار در سال ۱۹۶۸ تولید کالوس از کشت بافت گیاه رازک را گزارش شده است، اما هدف اصلی این تحقیق بررسی فرایند آلودگی گیاه رازک توسط قارچ *psudopernospora* بوده است (Griffin and Coley-Smith, 1968) .

گیاه رازك از گیاهان بومي شمال کشور است که در منابع به عنوان یک گیاه در معرض خطر انقراض گزارش شده است. با توجه به اینکه کشت بافت روشی مناسب جهت تولید متابولیت‌های ثانویه مهم گیاهی است، هدف از تحقیق حاضر بهینه سازی کشت‌بافت گیاه رازک جهت تولید ترکیبات با ارزش دارویی و صنعتی آن است. به این منظور اثر دو نوع محیط‌کشت (MS و B5) حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی بر روی تولید کالوس و ریشه های نوپدید و نیز برخی متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها:

شرایط کشت: قطعه جداکشت دمبرگ از گیاهچه‌های استریلی که در محیط کشت پایه MS رشد یافته بودند، تهیه شد. این گیاهچه‌ها از آزمایشگاه کشت بافت هیرکان در شهر گرگان تهیه شدند. سپس قطعات جداکشت در محیط کشت MS و B5 که حاوی غلظت-های مختلفی از تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی (2,4-D، NAA و Kin) بودند، کشت شدند. برای هر تیمار ۸ پتری و در هر ظرف ۵ قطعه جداکشت در نظر گرفته شد. سپس نمونه‌ها به اتاقک کشت با دمای ۲۴±۲ $^{\circ}C$ و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. پس از ۴ هفته پارامترهای مختلفی نظیر درصد کالزایی، وزن خشک و تر کالوس، رنگ کالوس، درصد تولید ریشه نوپدید و نیز میزان فنل کل وفلاونویید در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

درصد کالزایی: این فاکتور در یک دوره یک ماهه مورد بررسی و نتایج به دست آمده ثبت شدند.

اندازه‌گیری وزن خشک و تر: وزن تر کالوس‌های جمع آوری شده با ترازو توزین شد. سپس کالوس‌ها در پاکت‌های کاغذی قرار داده شده و در آون با دمای $^{\circ}C$ ۳۷ خشک و دوباره وزن شدند (وزن خشک).

عصاره‌گیری: ابتدا مقدار یک گرم از پودر خشک شده نمونه‌ها در ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق خیسانیده شد. سپس عصاره‌ها صاف شدند. روش استخراج سه بار تکرار و در نهایت عصاره‌ها با هم مخلوط شدند. در مرحله بعد، حلال عصاره‌ها در دمای کمتر از ۴۰ $^{\circ}C$ با استفاده از دستگاه روتاری تبخیر شد. نمونه‌های به دست آمده تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در یخچال و در دمای $^{\circ}C$۴ نگهداری شدند (Meda et al., 2005).

اندازه‌گیری فنل کل: با استفاده از معرف فولین - سیوکالچو انجام گرفت. به این منظور مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به دست آمده با ۱.۲۵ میلي ليتر از معرف فولین‌سیوکالتیو ۰.۲ مولار مخلوط و پس از ۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط، یک میلی‌لیتر از محلول Na_2CO_3 به آن اضافه و مجدداً به مدت ۲ ساعت در دمای محیط انکوبه شد. سپس جذب محلول در طول موج ۷۶۰ nm خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد غلظت‌های مختلفی از اسید گالیک (۲ ،۱.۵ ، ۱ ، ۰.۵ ، ۰ میلي‌گرم در لیتر) تهیه و طول موج آن با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقادیر فنل کل به-صورت اکی‌والان میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد (Meda et al., 2005).

سنجش فلاونوئید: به روش رنگ سنجی و با استفاده از معرف آلومینیوم کلراید ($AlCl_3$) انجام شد. در این روش

۲۵۰ میکرولیتر از عصاره پس از فیلتر شدن (فیلتر µm ۰.۴۵) با ۷۵۰ میکرولیتر متانول، ۵۰ میکرولیتر محلول الکلی۱۰ درصد$AlCl_3$، ۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم یک مولار و ۱.۴ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ nm خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف کوئرسیتین (۲، ۱، ۰.۵، ۰.۱، ۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. محتوی فلاوونوئید کل عصاره بر مبنای میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره استخراج شده تعیین شد (Chang et al., 2002).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار R و با بسته آماری ggplot2.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. فاکتورهای اندازه‌گیری شده در چهار گروه تیمار-محیط کشت بررسی و نتایج تجزیه و تحلیل‌ها داده‌ها به صورت نمودارهای باکس‌پلات تهیه شدند. برای تهیه نمودار باکس‌پلات، داده‌ها به صورت صعودی مرتب شدند. سپس داده‌ها در چهار دسته قرار داده شده و بر روی نمودار پیاده‌سازی شدند. چارک نخست (Q1) به صورت خط عمودی نشان داده شده، چارک دوم (Q2) و سوم (Q3) به صورت مستطیل (باکس) کشیده شده که میانه نیز در آن نشان داده شده است. چارک چهارم (Q4) همانند چارک نخست به صورت خط عمودی ترسیم شد. در صورتی که داده‌ای بیش از ۱/۵ برابر دو چارک سوم و چهارم از میانه فاصله داشته باشد، داده پرت (Outlier) در نظر گرفته شده و به صورت نقطه در بالا یا پایین نمودار نشان داده شدند.

نتایج

به منظور بهینه سازی تولید کالوس از قطعه جداکشت دمبرگ رازک، اثر دو نوع محیط کشت MS و B5 و نیز اثر نوع وغلظت تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی (2,4-D، NAA و Kin) مورد بررسی قرار گرفت.

اثر محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف NAA و Kin: نتایج نشان داد که از بین ۱۴ تیمار هورمونی مورد استفاده در ۱۲ تیمار کالوس تشکیل شد و از بین این تیمارها در ده تیمار درصد کال‌زایی بیشتر از ۵۰% بود. تیمارهای (۱.۵ و ۱.۵)، (۲ و ۲)، (۲.۵ و ۲.۵)، (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA سبب تحریک تولید کالوس تا ۱۰۰٪ شد (جدول 1). همه کالوس‌هاي به‌دست آمده بافتی نرم داشته و رنگ آن‌ها از زرد کمرنگ تا زرد تیره متغیّر بود (شکل۱-a). از طرفی دیگر در برخی تیمارها علاوه بر تشکیل کالوس ریشه نوپدید نیز ظاهر شد. به طوریکه از بین ۱۴ تیمار هورمونی مورد استفاده در ۱۲ تیمار ریشه نوپدید تشکیل شد و از بین این تیمارها در چهار تیمار درصد ریشه‌زایی بالای ۵۰% بود. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۵%) در تیمار (۰.۵ و ۰.۵) مشاهده شد. اما در غلظت‌های بالا و برابر بتدریج درصد ریشه‌زایی کاهش یافت. به طوریکه در تیمار (۳ و ۳) کمترین میزان تولید ریشه نوپدید (۵%) مشاهده شد، در حالیکه در این تیمار میزان کالزایی ۱۰۰% بوده است (**Error! Reference source not found.**-e۱ و جدول ۱).

بیشترین وزن تر و خشک (وزن تر ۸۰۰ میلی‌گرم، وزن خشک ۷۰ میلی‌گرم) در تیمار (۲.۵ و ۲.۵) دیده شده است. نتایج حاصل نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این غلظت و سایر تیمارها وجود دارد. کالوس‌های حاصل از تیمارهای (۱.۵ و ۱.۵)، (۲ و۲)، (۱.۵ و ۱.۵)، (۲ و ۲)، (۳ و۳) و (۵ و۵) نیز وزن تر و خشک بالاتری نسبت به سایر تیمارها داشتند اما اختلاف معنی‌داری

بین این تیمارها مشاهده نشد. در حالی‌که کمترین وزن تر و خشک کالوس در تیمار (۰ و۱) میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA مشاهده شد (شکل ۲).

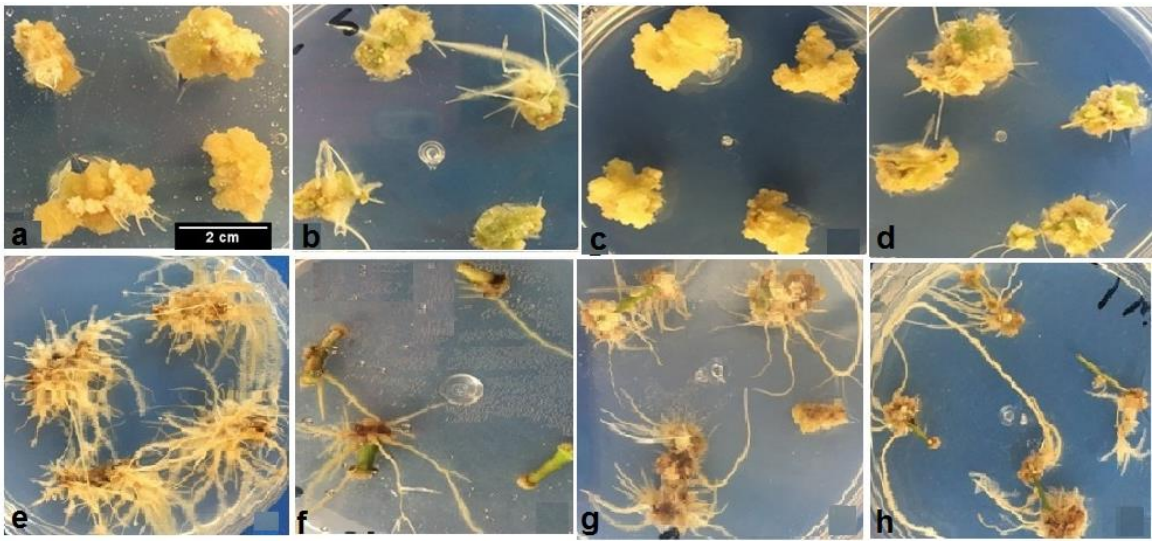
نتایج حاصل از مقایسه اثر تیمارهای مختلف NAA و Kin بر میزان فنل نشان داد که بیشترین میزان فنل (۱۹۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار (۳ و ۳) تولید شد. کمترین میزان فنل (۲۵.۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار (۱ و ۰) تولید شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد. نتایج حاصل از مقایسه اثر غلظت‌های مختلف NAA و Kin بر میزان فلاونوئید نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار (۲.۵ و ۲.۵) تولید شد که تفاوت معنی‌داری با ایر تیمارها نشان داد (شکل ۳).

اثر محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D وKin: نتایج حاصل نشان داد که در ۱۱ تیمار بکار رفته کالزایی تحریک شده و در شش تیمار درصد کالزایی بیش از ۵۰% بود (جدول ۱). همه کالوس‌هاي به‌دست آمده بافتی نرم داشته و رنگ آن‌ها در تیمارهای هورمونی مورد استفاده از زرد کمرنگ تا سبز کمرنگ متغیّر بود (شکل ۱- b). درصد کالزایی در تیمارهای (۱.۵ و ۱.۵)، (۲.۵ و ۲.۵) و (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر ۱۰۰% بوده است. از طرفی دیگر نتایج حاضر نشان داد که در ۱۰ تیمار بکار رفته ریشه نوپدید تشکیل شد. بیشترین درصد میزان تولید ریشه نوپدید (۸۵%) در تیمار (۱ و ۰.۵) مشاهده شد. همچنین نتایج حاضر نشان داد که با افزایش غلظت‌های تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی درصد کالزایی افزایش یافته اما تولید ریشه نوپدید کاهش می‌یابد. به‌طوریکه در تیمار ۳ و۳ میلی گرم در لیتر Kin و 2,4-D کالزایی به میزان ۱۰۰ درصد مشاهده شده اما هیچ ریشه نوپدیدی ظاهر نشد. در برخی تیمارها (مانند ۱ و ۰) میزان کالزایی ۲۵% بوده، درحالیکه درصد ریشه زایی ۶۰% بوده است (شکل۱-f و جدول ۲).

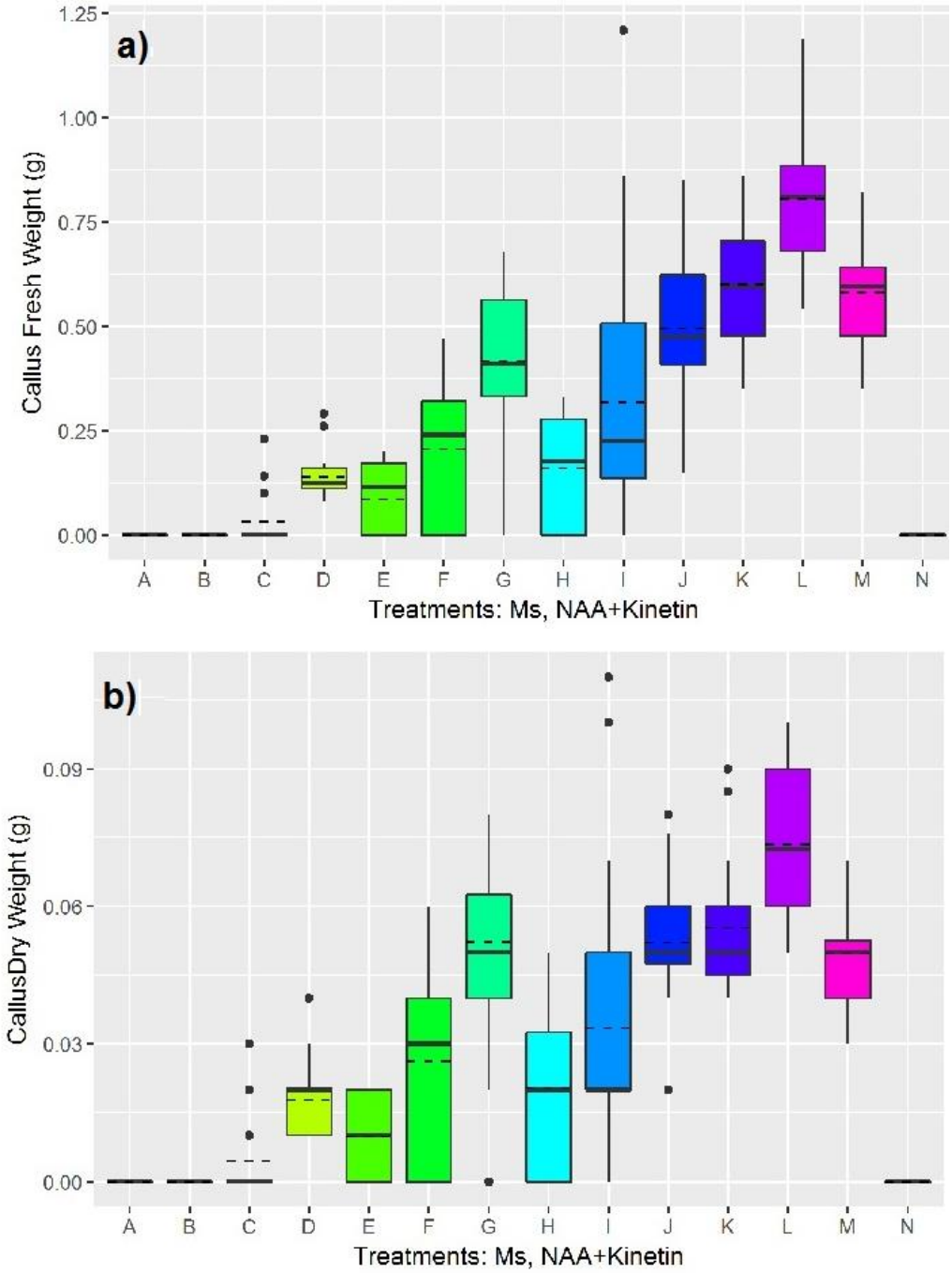
بیشترین وزن تر و خشک در تیمار (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر Kin و 2,4-D تولید شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان داد. در حالی‌که کمترین وزن تر و خشک کالوس در تیمار (۰ و ۰.۵) مشاهده شد (شکل ۴).

جدول ۱- درصد کالزایی و تولید ریشه‌های نوپدید از قطعات جدا کشت دمبرگ رازک در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D، NAA و Kin پس از یک ماه.

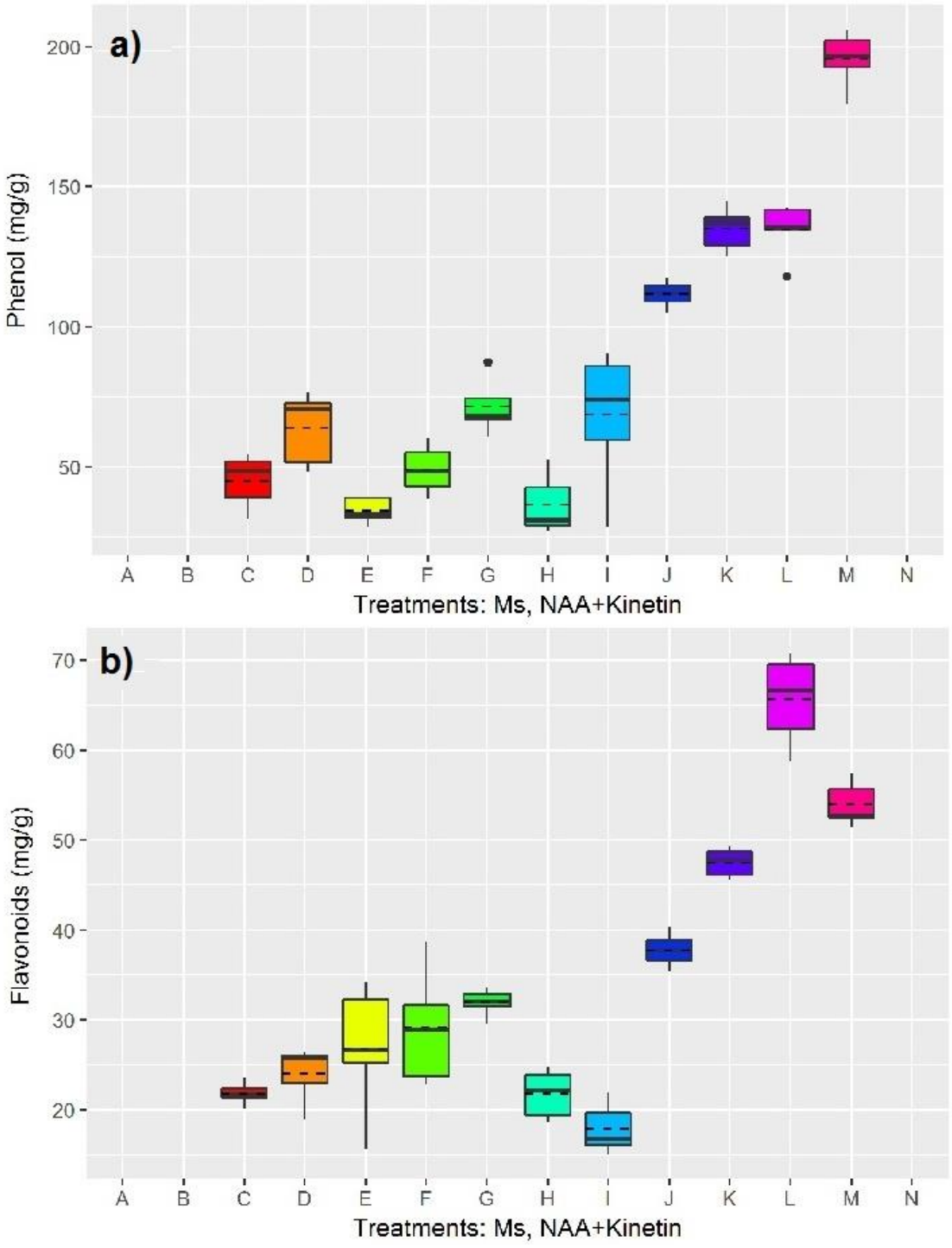
تیمار	تنظیم کننده رشد گیاهی(PGR)		کالزایی(%) Callus induction	ریشه‌زایی(%) Root induction	تنظیم کننده رشد گیاهی(PGR)		کالزایی(%) Callus induction	ریشه‌زایی(%) Root induction
	Kin	NAA			Kin	2,4-D		
A	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
B	۰.۵	۰	۱۰	۲۰	۰.۵	۰	۰	۰
C	۱	۰	۱۵	۲۵	۱	۰	10	۲۰
D	۰.۵	۱	۷۵	۶۰	۰.۵	۱	۷۵	۶۵
E	۰	۱	۵۵	۲۵	۰	۱	۲۵	۶۰
F	۰	۰.۵	۷۵	۷۵	۰	۰.۵	۶۰	۷۰
G	۰.۵	۰.۵	۷۰	۸۵	۰.۵	۰.۵	۳۵	75
H	۱	۰.۵	۶۵	۷۵	۱	۰.۵	۷۰	85
I	۱	۱	۸۰	۴۵	۱	۱	۸۵	80
J	۱/۵	۱/۵	۱۰۰	۳۰	۱/۵	۱/۵	۱۰۰	۳۰
K	۲	۲	۱۰۰	۲۵	۲	۲	۹۵	۱۵
L	۲/۵	۲/۵	۱۰۰	۲۰	۲/۵	۲/۵	۱۰۰	۱۰
M	۳	۳	۱۰۰	۵	۳	۳	۱۰۰	۰
N	۵	۵	۰	۰	۵	۵	۰	۰



شکل ۱- تولید کالوس در محیط کشت a) MS حاوی ۳ و۳ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA، b) MS حاوی ۳ و۳ میلی‌گرم در لیتر Kin و2,4-D ، c) B5 حاوی ۳ و۳ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA، d) B5 حاوی ۳ و۳ میلی‌گرم در لیتر Kin و2,4-D و تولید ریشه های نوپدید در محیط کشت e) MS حاوی ۰ و 0.5 میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA، f) MS حاوی 0 و1 میلی‌گرم در لیتر Kin و2,4-D ، g) B5 حاوی ۰.۵ و ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و NAA، h) B5 حاوی ۰.۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و2,4-D



شکل ۲- نمودار باکس پلات a) وزن تر و b) وزن خشک کالوس حاصل از قطعات جدا کشت دمبرگ رازک در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف NAA و Kin پس از یک ماه.



شکل **Error! No text of specified style in document.-** نمودار باکس پلات میزان a) فنل کل و b) فلاونوئید در کالوس‌های حاصل از قطعه جدا کشت دمبرگ رازک در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف NAA و Kin پس از یک ماه.

جدول ۲- درصد کالزایی و تولید ریشه‌های نوپدید از قطعات جداکشت دمبرگ گیاه رازک در محیط کشت B5 حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D، NAA و Kin پس از یک ماه.

تیمار	تنظیم‌کننده رشد گیاهی		کالزایی (%)	ریشه‌زایی (%)	تنظیم‌کننده رشد گیاهی		کالزایی(%)	ریشه‌زایی(%)
	Kin	NAA			Kin	2,4-D		
A	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
B	۰.۵	۰	۱۰	۲۵	۰.۵	۰	۰	۰
C	۱	۰	۱۰	۳۰	۱	۰	۲۰	۵۰
D	۰.۵	۱	۶۰	۵۰	۰.۵	۱	۳۵	۳۰
E	۰	۱	۶۰	۶۵	۰	۱	۴۵	۷۵
F	۰	۰.۵	۷۰	۷۰	۰	۰.۵	۳۰	۸۰
G	۰.۵	۰.۵	۷۵	۸۵	۰.۵	۰.۵	۶۰	۸۰
H	۱	۰.۵	۶۵	۸۰	۱	۰.۵	۵۰	۸۵
I	۱	۱	۷۰	۸۰	۱	۱	۸۵	۴۰
J	۱/۵	۱/۵	۱۰۰	۲۰	۱/۵	۱/۵	۹۰	۲۵
K	۲	۲	۱۰۰	۰	۲	۲	۱۰۰	۱۵
L	۲/۵	۲/۵	۱۰۰	۱۰	۲/۵	۲/۵	۱۰۰	۰
M	۳	۳	۱۰۰	۰	۳	۳	۱۰۰	۰
N	۵	۵	۰	۰	۵	۵	۰	۰

نتایج حاصل از مقایسه اثر تیمارهای مختلف 2,4-D و Kin بر میزان فنل موجود در کالوس‌ها نشان داد که بیشترین (۱۰۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و کمترین (۳۵.۶ میلی گرم بر گرم وزن خشک) میزان فنل به ترتیب در تیمار (۲.۵ و ۲.۵) و (۰ و۰.۵) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد. نتایج حاصل از مقایسه اثر غلظت‌های مختلف بر میزان فلاونوئید نشان داد که بیشترین و کمترین میزان فلاونوئید به ترتیب در تیمار(۲.۵ و ۲.۵) و (۰.۵ و۰) به دست آمد که نسبت به سایر تیمارها اثر معنی‌داری بر میزان فلاونویید داشته است (شکل ۵).

اثر محیط کشت B5 حاوی غلظت‌های مختلف NAA و Kin: استفاده از محیط کشت B5 با غلظت های مختلف NAA و Kin سبب تحریک کالزایی در ۱۲ تیمار به‌کار رفته شد. به طوریکه در ده تیمار درصد کال‌زایی بیشتر از ۵۰% بود. تیمارهای (۱.۵ و ۱.۵)، (۲ و ۲)، (۲.۵ و ۲.۵) و (۳ و ۳) سبب تحریک تولید کالوس تا ۱۰۰% شدند (جدول ۲). همه کالوس‌هاي به‌دست آمده بافتی نرم داشته و رنگ آن‌ها از زرد کمرنگ تا زرد تیره متغیّر بود (شکل۱-c). از طرفی دیگر در برخی تیمارها علاوه بر تشکیل کالوس ریشه نوپدید نیز ظاهر شد. به طوریکه از بین ۱۴ تیمار هورمونی مورد استفاده در ۱۰

تیمار ریشه نوپدید تشکیل شد و از بین این تیمارها در شش تیمار درصد ریشه‌زایی بیشتر از ۵۰% بود. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۵%) در تیمار (۰.۵ و ۰.۵) مشاهده شد. اما در غلظت‌های بالا و برابر NAA و Kin بتدریج درصد ریشه‌زایی کاهش یافت. به طوریکه در غلظت ۳ و ۳ میلی‌گرم در لیتر کمترین میزان تولید ریشه نوپدید (۵%) مشاهده شد. در حالیکه در این تیمار میزان کالزایی ۱۰۰% بوده است (**Error! Reference source not found.**g-۱ و جدول ۲).

بیشترین وزن‌تر و خشک در تیمار (۳ و ۳) مشاهده شد. نتایج حاصل نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این تیمار با سایر تیمارها در وزن تر کالوس وجود دارد. درحالی‌که کمترین وزن تر و خشک کالوس در تیمار (۰.۵ و ۰) مشاهده شد (شکل۶).

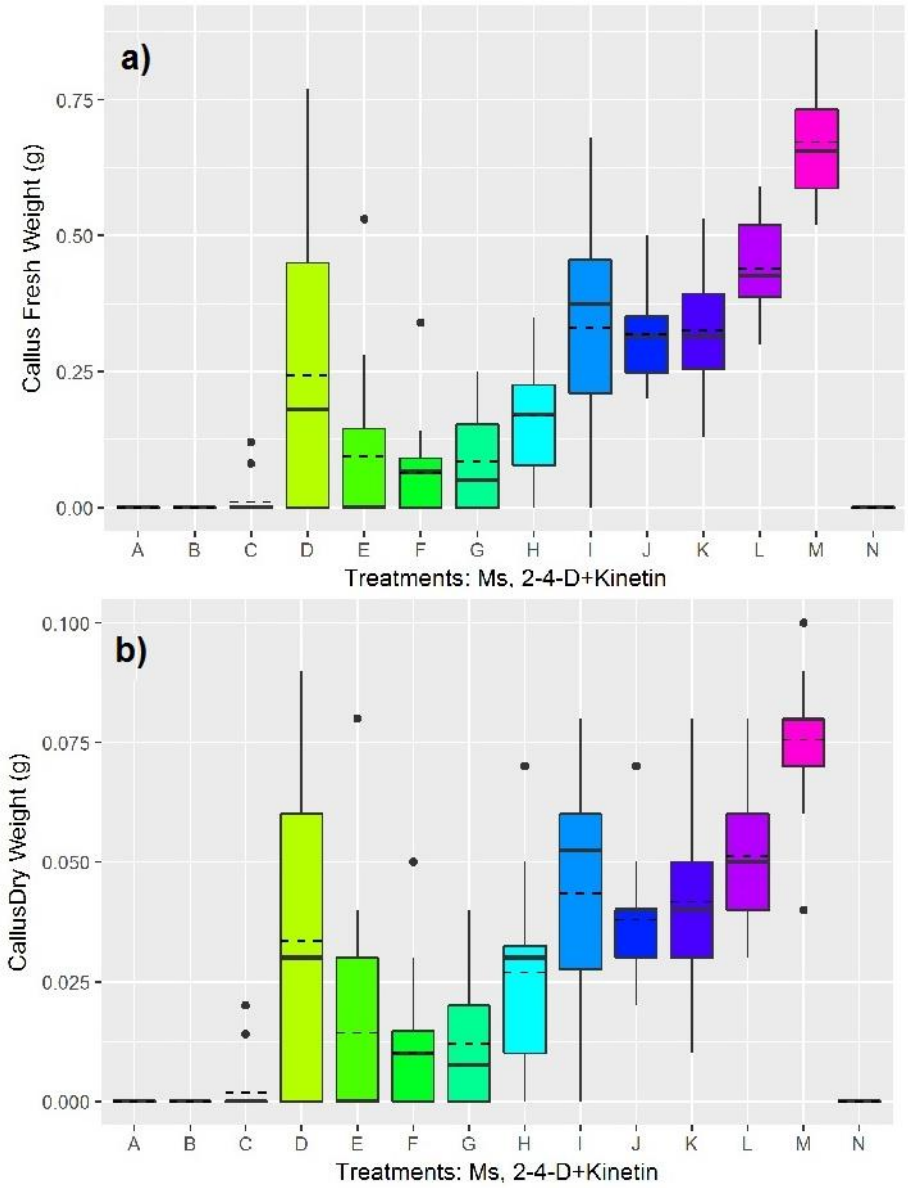
نتایج حاصل از مقایسه اثر تیمارهای مختلف Kin و NAA بر میزان فنل موجود در کالوس‌ها نشان داد که بیشترین مقدار فنل (۹۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار (۰ و ۰.۵) تولید شده که در مقایسه با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان داده است. کمترین میزان فنل (۲۹.۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار (۰.۵ و ۱) مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه اثر غلظت‌های مختلف NAA و Kin نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید (۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار (۲ و ۲) تولید شد که نسبت به سایر تیمارها اثر معنی‌داری را نشان داده است. کمترین میزان فلاونوئید (۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) نیز در تیمار(۱ و ۱) به دست آمد (شکل ۷).

اثر محیط‌کشت B5 حاوی 2,4-D و Kin: نتایج به دست آمده نشان داد که کالزایی در ۱۰ تیمار بکار رفته تحریک شده و در هفت تیمار کال‌زایی بیش از ۵۰% بود. همه کالوس‌هاي به‌دست آمده بافتی نرم داشته و رنگ آن‌ها در تیمارهای مختلف از زرد کمرنگ تا سبز کمرنگ متغیّر بود (شکل ۱- d و جدول ۲). درصد کالزایی در تیمارهای (۲ و۲)، (۲.۵ و ۲.۵) و (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر ۱۰۰% بوده است. از طرفی دیگر نتایج حاضر نشان داد که در نه تیمار بکار رفته ریشه نوپدید تشکیل شد. بیشترین درصد تولید ریشه نوپدید (۸۵%) در تیمار (۱ و ۰.۵) مشاهده شد. همچنین نتایج حاضر نشان داد که با افزایش غلظت تنظیم-کنندگان رشد گیاهی درصد کالزایی افزایش یافته اما تولید ریشه نوپدید کاهش می‌یابد. به‌طوریکه در تیمار ۳ و۳ میلی گرم در لیتر Kin و 2,4-D کالزایی به میزان ۱۰۰ درصد مشاهده شده اما هیچ ریشه نوپدیدی ظاهر نشد. در برخی تیمارها نیز (۱ و ۰) میزان کالزایی اندک بوده، درحالیکه درصد ریشه زایی بالا بوده است (شکل۱-h و جدول ۲).

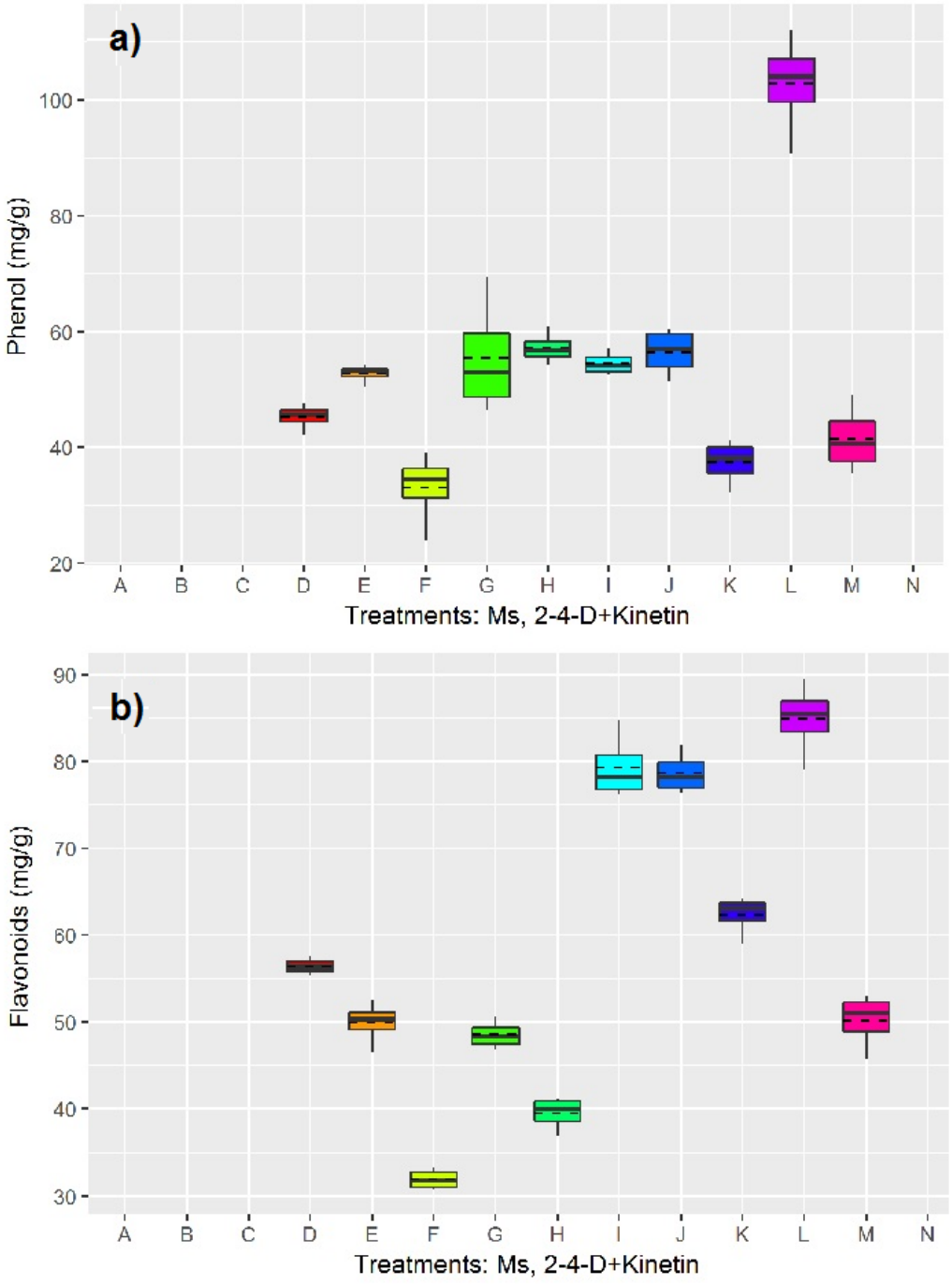
بیشترین وزن تر و خشک در تیمار (۳ و ۳) میلی‌گرم بر لیتر Kin و 2,4-D تولید شد. نتایج حاصل نشان داد این تیمار اثر تفاوت معنی‌داری در وزن تر و خشک کالوس در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. کالوس‌های حاصل از تیمارهای (۱.۵ و ۱.۵)، (۲ و ۲)، (۲.۵ و ۲.۵) و (۱ و ۰.۵) نیز وزن تر و خشک بالاتری نسبت به سایر تیمارها داشتند اما اختلاف معنی‌داری بین این تیمارها مشاهده نشده است. در حالی‌که کمترین وزن تر و خشک کالوس (وزن تر ۳۳ و وزن خشک ۲ میلی‌گرم) در تیمار (۰ و ۰.۵) مشاهده شد (شکل ۸).

نتایج حاصل از مقایسه اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin بر میزان فنل موجود در کالوس‌ها نشان داد که بیشترین میزان فنل (۹۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار (۳ و ۳) تولید شد. کمترین میزان فنل (۲۴

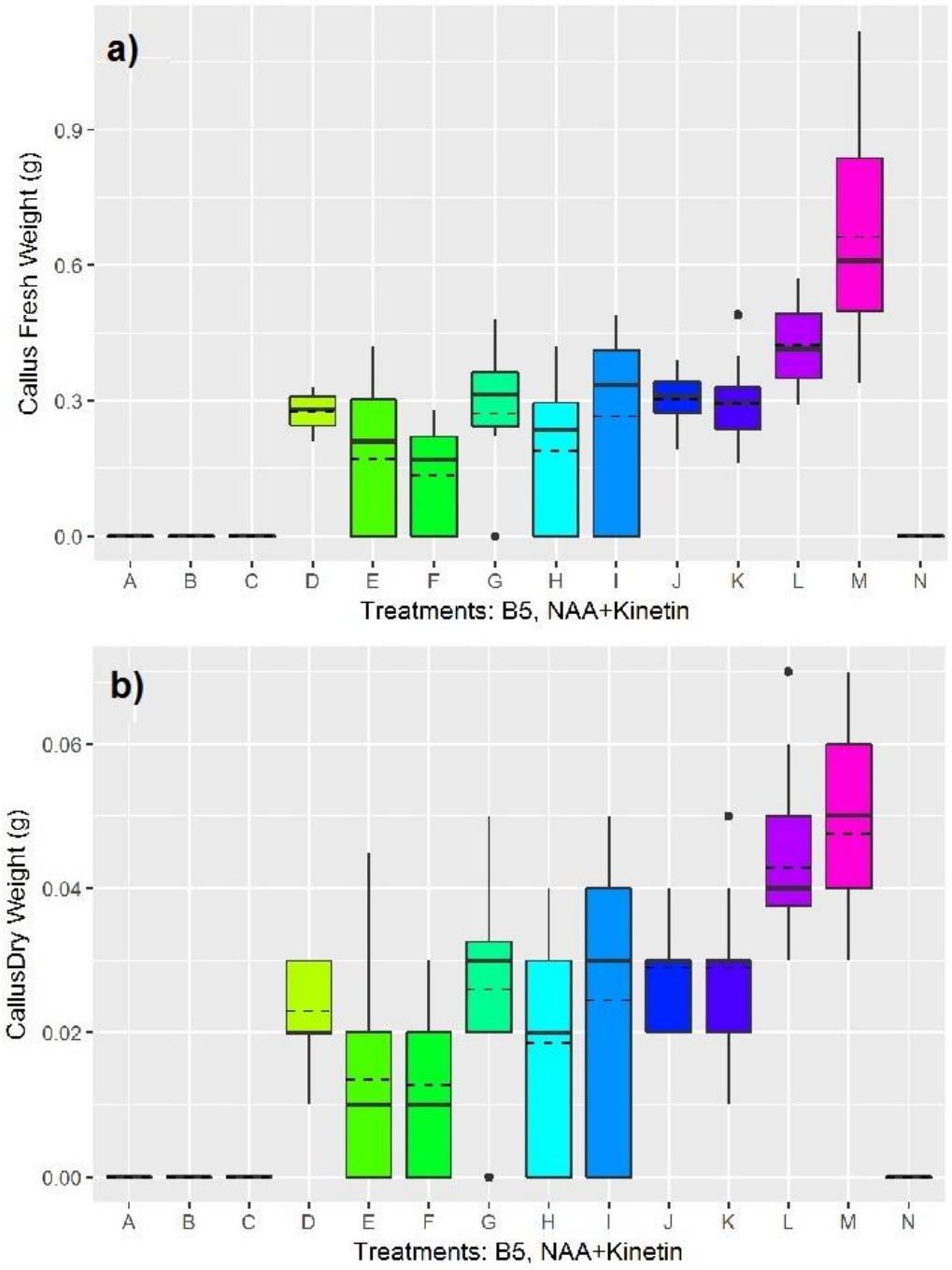
میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار (۰ و۱) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. نتایج حاصل از مقایسه اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin بر میزان فلاونوئید نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید (۶۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار (۰.۵ و ۱) به دست آمده که نسبت به سایر تیمارها اثر معنی‌داری داشته است. کمترین میزان فلاونوئید (۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار (۱ و۰.۵) تولید شد (شکل ۹).



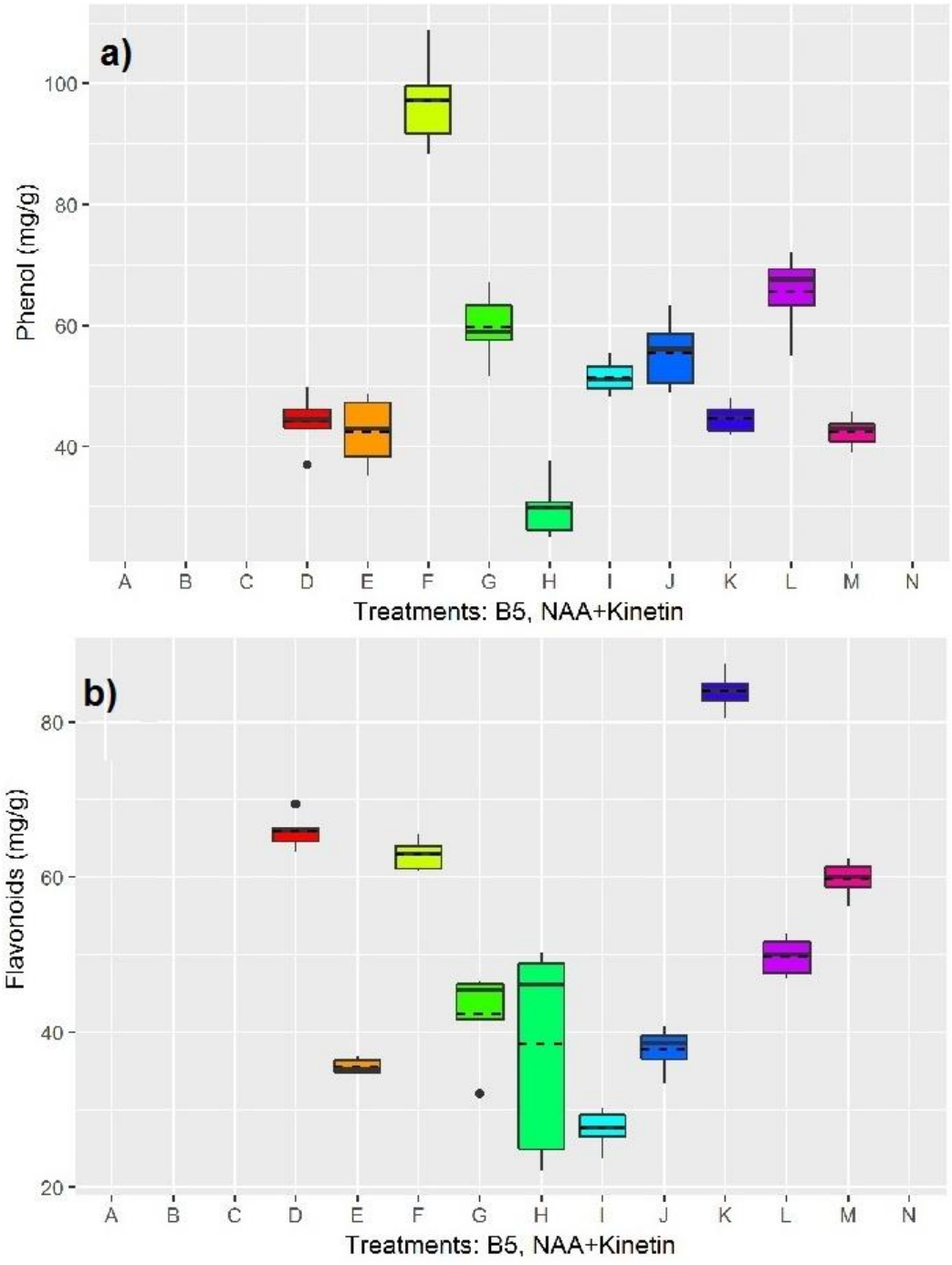
شکل **Error! No text of specified style in document.**۴- نمودار باکس پلات وزن a) تر و b) خشک در کالوس‌های حاصل از قطعه جدا کشت دمبرگ رازک در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin پس از یک ماه.



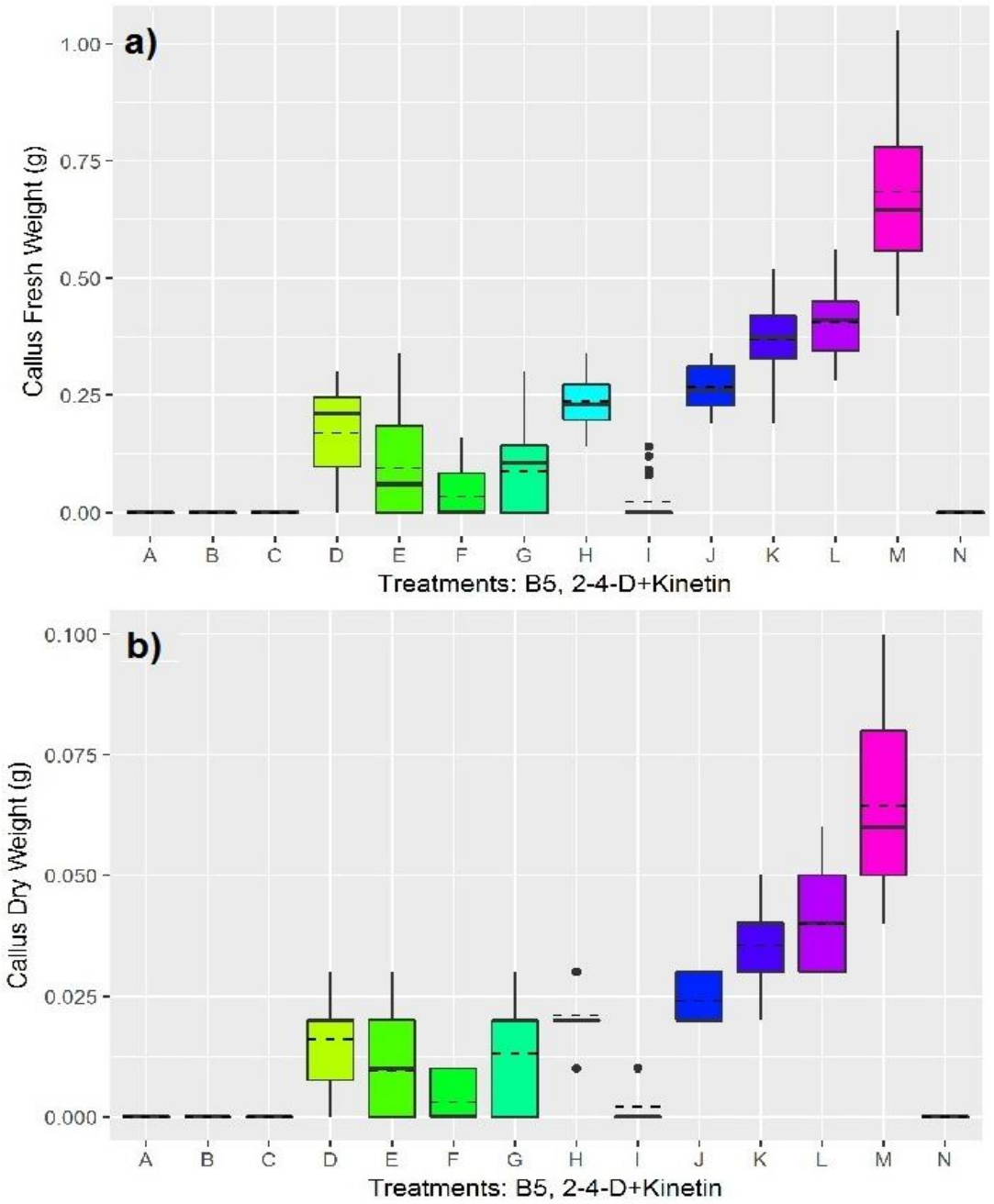
شکل ۵- نمودار باکس پلات میزان a) فنل کل و b) فلاونوئید در کالوس‌های حاصل از قطعه جدا کشت دمبرگ رازک در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin پس از یک ماه.



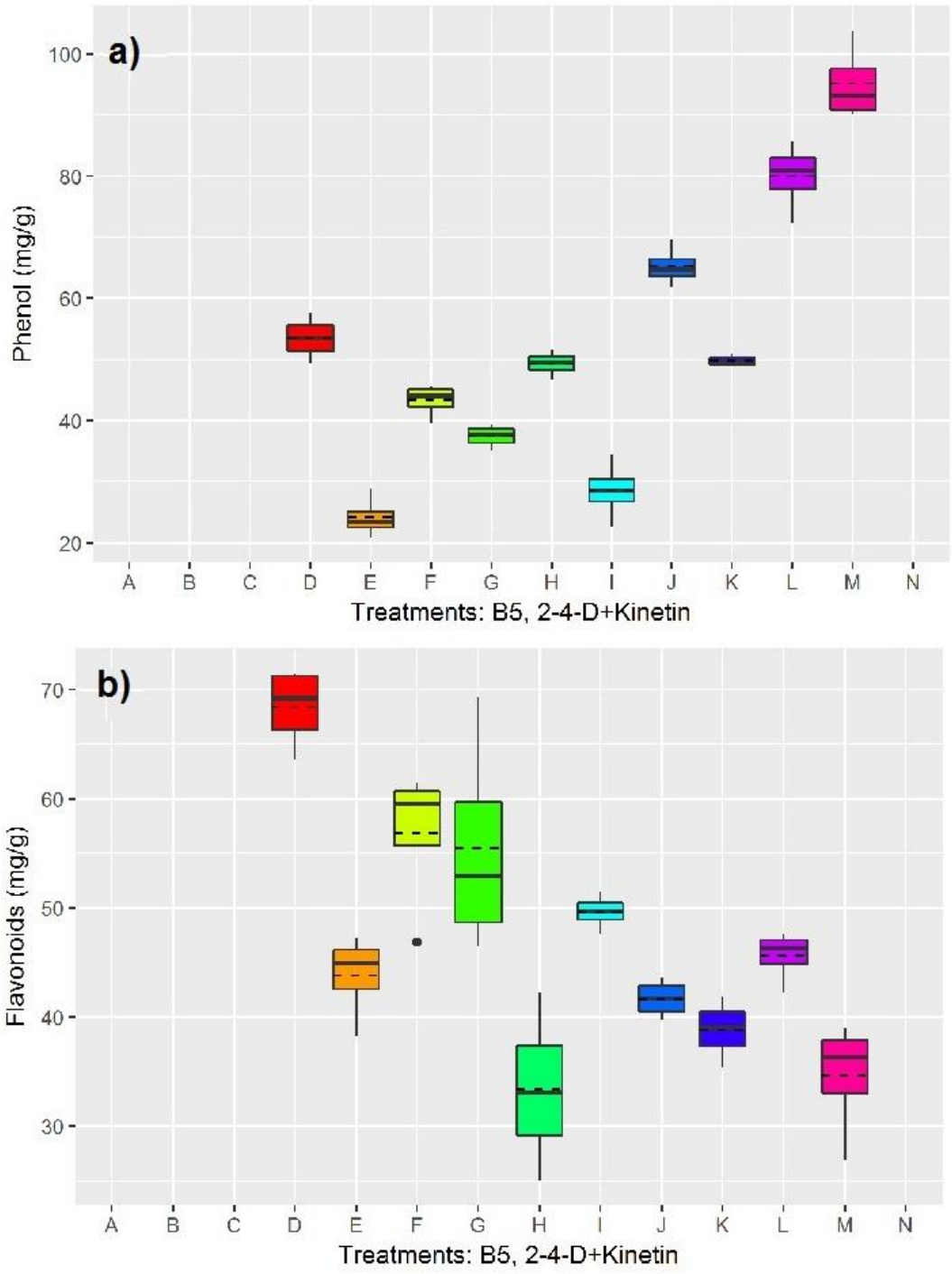
شکل ۶- نمودار باکس پلات a) وزن تر و b) وزن خشک کالوس حاصل از قطعه جدا کشت دمبرگ رازک در محیط کشت B5 حاوی غلظت‌های مختلف NAA و Kin پس از یک ماه.



شکل۷- نمودار باکس پلات میزان a) فنل کل و b) فلاونوئید در کالوس‌های حاصل از قطعه جدا کشت دمبرگ رازک در محیط کشت B5حاوی غلظت‌های مختلف NAA و Kin پس از یک ماه.



شکل ۸- نمودار باکس پلات وزن a) وزن تر و b) وزن خشک کالوس‌های حاصل از قطعه جدا کشت دمبرگ رازک در محیط کشت B5حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin پس از یک ماه



شکل۹- نمودار باکس پلات میزان a) فنل کل و b) فلاونویید در کالوس‌های حاصل از قطعه جدا کشت دمبرگ رازک در محیط کشت B5 حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin پس از یک ماه.

بحث:

در تحقیق حاضر اثر محیط کشت (MS و B5) و نیز غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (2,4-D، NAA و Kin) بر تولید کالوس و برخی متابولیت‌های ثانویه از قطعه جداکشت دمبرگ گیاه رازک مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است. نتایج حاضر نشان داد که محیط کشت MS و B5 اثر مشابهی بر تولید کالوس دارند. به طوریکه در غلظت‌های (۱.۵ و ۱.۵، ۲ و ۲، ۲.۵ و ۲.۵، ۳ و ۳) بالاترین درصد کالزایی (۱۰۰%) مشاهده شده است. تولید کالوس از گیاهان به فاکتورهای متعددی وابسته است که از آن جمله می‌توان به نوع گیاه، شرایط فیزیولوژیک گیاه، قطعه جداکشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اشاره کرد. تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی نظیر اکسین و سیتوکینین، فاکتورهای مهمی هستند که تشکیل کالوس را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این فاکتورها در چرخه‌سلولی نقش مهمی دارند. به طوری که اکسین، رونویسی DNA و سیتوکینین تقسیم میتوز را تنظیم می‌کند (Hobbie, 1998; Mok, 1994) اکسین‌ها محرک‌های قوی تولید کالوس هستند، درحالی‌که سیتوکینین‌ها، هم در تشکیل کالوس و هم در تسریع سایر فرآیندهای درگیر در تقسیم‌سلولی نقش دارند (Skoog and Miller, 1957). از طرفی دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌توانند بیان ژن‌های آغازکننده تقسیم سلولی را در شرایط کشت‌بافت تحت تاثیر قرار دهند. در مجموع اثر متقابل اکسین و سیتوکینین‌ها نقش حیاتی در رشد، نمو، تمایز و تشکیل اندام‌های نوپدید ایفا می‌کند (Che et al., 2006).

در حال حاضر گزارش‌های اندکی بر روی کشت‌بافت و تولید کالوس از گیاه رازک وجود دارد. بیشترین گزارش‌ها در زمینه کشت‌بافت رازک به ریزازدیادی و تولید گیاهچه‌های جدید مربوط می‌شود. در سال ۲۰۰۸ برای اولین بار گزارشی در خصوص تولید کالوس با هدف تولید متابولیت‌های ثانویه منتشر شده است. در این تحقیق محققان اثر محیط کشت MS حاوی دو نوع تنظیم کننده رشد گیاهی(BAP + NAA و یا BAP + 2,4-D) را بر روی کالزایی دو نوع قطعه جدا کشت برگ و میانگره از سه ژنوتیپ مختلف، در دو شرایط تاریکی و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی مورد بررسی قرار دادند. اما این محققان تنها از غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کنندگان رشد استفاده کردند (Psenakova et al., 2009). این گزارش نشان داد استفاده از این غلظت بدون توجه به نوع قطعه جداکشت و یا شرایط کشت، سبب کالزایی به میزان ۱۰۰% می شود.

بررسی اثر دو نوع محیط کشت MS و B5 بر تولید کالوس از قطعات جدا کشت دمبرگ، ساقه و برگ گیاه شاهدانه (جنس دیگری از خانواده رازک) نشان داده که بیشترین میزان وزن تر کالوس از قطعه جدا کشت دمبرگ در محیط کشت B5 حاوی ۰.۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست می‌آید (ملک سعیدی، ۱۳۸۸). گزارش دیگری نیز نشان داده که بیشترین میزان وزن تر وخشک کالوس حاصل از قطعات جدا کشت برگ و هیپوکوتیل گیاهچه شاهدانه در محیط‌کشت MS حاوی ۱ و ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و IBA به‌دست می‌آید. این گزارش نشان داد که بیشترین حجم کالوس تولید شده، در غلظت ۲ و ۰.۵ میلی‌گرم در لیترIBA TDZ از قطعه جدا کشت برگ بوده است (موحدی و همکاران، ۱۳۹۵). نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک

کالوس‌ها در محیط کشت MS حاوی (۲.۵ و ۲.۵) میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin و (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و Kin به‌دست می‌آید. در حالی‌که بالاترین میزان وزن تر و خشک کالوس‌ها در محیط کشت B5 حاوی (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin و یا 2,4-D و Kin، بوده است.

با توجه به آنکه هدف اصلی از انجام پژوهش حاضر بهینه سازی تولید کالوس جهت تولید متابولیت‌های با ارزش دارویی گیاه رازک نظیر فنل ها و فلاونوییدها بود، میزان این نوع از متابولیت‌ها نیز در ادامه اندازه‌گیری شد. مجموع نتایج به دست آمده نشان داد که بالاترین میزان فنل به میزان ۱۹۵ میلی گرم در هر گرم وزن خشک در محیط‌کشت B5 حاوی (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های 2,4-D و Kin تولید شد. که نسبت به منبع اصلی تولید کالوس یعنی قطعه جدا کشت برگ (۱۳۰ میلی گرم در گرم وزن خشک) میزان فنل آن افزایش یافته است. این در حالی است که Psenakova و همکاران در سال ۲۰۰۹ بالاترین میزان فنل تولید شده در کالوس حاصل از گیاه رازک را ۶۰ تا ۱۳۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک گزارش کرده اند. بیشترین میزان فلاوونویید در محیط کشت B5 حاوی (۳ و ۳) میلی‌گرم در لیتر NAA و Kin مشاهده شد که در مقایسه با منبع اصلی تولید کالوس یعنی قطعه جدا کشت برگ (۲۵ میلی گرم در گرم وزن خشک) میزان فنل آن افزایش یافته است (اطلاعات منتشر نشده). نتایج تحقیقات انجام شده بر روی تولید ترکیبات فنلی در کشت‌سلولی گیاه *Catharantus sroseus* نشان داده که نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی استفاده شده می‌تواند اثرات متفاوتی بر مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه داشته و در نتیجه اثرات متفاوتی بر تجمع این ترکیبات در گیاه داشته باشد. این اثر بسته به نوع گیاه و نیز غلظت تنظیم کنندگان رشد درونزاد متفاوت می باشد (Mustafa and Verpoorte, 2005). برخی محققان نیز نشان داده‌اند که اکسین و سیتوکنین، نقش مهمی در بیوسنتز ترکیبات فلاونوئیدی دارند در حالیکه استفاده از هر یک از تنظیم کنندگان رشد گیاهی به تنهایی، سبب کاهش تولید ترکیبات فلاونوئیدی در شرایط کشت بافت می‌شود (Shilpashree and Ravishankar, 2009).

Psenakova و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز در گزارش خود نشان دادند که برخی از کالوس‌های حاصل از قطعات جداکشت برگ در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر (BAP +NAA) در شرایط تاریکی ریشه نوپدید تولید می‌کنند. اما درصد ریشه‌زایی در این گزارش تنها ۲۵ درصد ذکر شده است. در تحقیق حاضر بیشترین درصد ریشه‌زایی در کالوس‌های حاصل از قطعه جدا کشت دمبرگ در هر دو محیط کشت MS و B5 حاوی (۰.۵ و 0.5) میلی گرم در لیتر از NAA+Kin و یا 2,4-D+Kin مشاهده شده است. گزارش‌های دیگر نیز نشان داده‌اند که کالوس حاصل از قطعات جداکشت برگ شاهدانه نیز به راحتی ریشه تولید کرده اما تولید ساقه نوپدید در این گیاه به ندرت اتفاق می افتد. در گزارش حاضر نیز در بیشتر تیمارهای به کار رفته تولید ریشه نوپدید دیده شده اما ساقه‌زایی مشاهده نشد (Feeney and Punja, 2003) . در تحقیق حاضر نیز غلظت برابر اکسین و ستوکینین ریشه زایی را تحریک کرده است. تولید ریشه در گیاهان تحت تاثیر میزان سنتز، انتقال و همچنین مسیرهای انتقال پیام اکسین است(Sauer et al., 2013) . گزارش‌ها نشان می دهد که تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA+ IAA بالاترین درصد ریشه‌زایی (۹۰%) درصد سبب می‌شود (مفاخری ۱۳۹۳). طبق نتایج Smykalova و همکاران (۲۰۰۱)

بالاترین درصد ریشه‌زایی در قطعه جداکشت برگ دو میکروکلون رازک (Osvald 31, Osvald 72) در حضور ۱۱ و ۱.۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP+ 2,4-D به میزان ۶۷/۳ درصد مشاهده شد. اگر چه باید در نظر داشت که افزایش غلظت اکسین و سیتوکینین همیشه باعث افزایش کال‌زایی و یا ریشه‌زایی نشده، بلکه در غلظت‌های بالا ممکن است سبب نکروزه شدن کالوس‌ها یا ریشه‌هاي نوپدید شود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاضر نشان داد که محیط کشت MS و B5 در تحریک کالزایی قطعات جداکشت دمبرگ گیاه رازک تفاوتی را نشان نمی‌دهند. همچنین غلظت-های (۲.۵ و ۲.۵) و (۳ و ۳) از هر دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kin و 2,4-D و یا NAA غلظت‌های بهینه در تحریک کالزایی هستند. از طرفی غلظت‌های ۰.۵ و ۰.۵ و یا ۰.۵ و ۱ از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده نقش موثری در تولید ریشه‌های نوپدید دارند. با توجه به اینکه امروزه ریشه‌های نوپدید منابع با اهمیتی در تولید متابولیت‌های ثانویه هستند، نتایج حاضر می تواند در تولید ترکیبات با ارزش دارویی از گیاه رازک به روش کشت بافت مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری: نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه گلستان به سبب حمایت مالی از پایان نامه کارشناسی ارشد موژان گلعلی پور تشکر و قدردانی دارند.

منابع:

زرگری، ع. (۱۳۷۳). گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران. ۵۹۸-۵۹۵.

مفاخری، م. (۱۳۹۳). ریز ازدیادی گیاه رازک (*Humulus lupulus L.*) باستفاده از کشت جوانه، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان.

ملک سعیدی، س. (۱۳۸۸). بررسی کشت بافت شاهدانه به صورت کالوس از نظر تولید ماده اصلی تتراهیدوکانابینول، پایان نامه دکتری داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان.

موحدی، م.، قاسمی عمران، ک. و ترابی، س. (۱۳۹۵). کالوس زایی و اندام زایی گیاه دارویی شاهدانه در شرایط درون شیشه ای، مجله تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۷۶۹-۷۵۸.

Blumenthal, M. (1998). The Complete German Commission E Monograph: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. American Botanical Council, Austin,TX, 147-148.

Bown, D. (2001). The Herb Society of America New Encyclopedia of Herbs and Their Uses. Dorling Kindersley Ltd., London.

Bremer, B., Bremer, K., Chase, M., Reveal, J.L. and Soltis, D.E. (2003). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. APG II. Botanical Journal Linn. Society, 141, 399-436.

Chang, C., Yang, M.,Wen, H. and Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Druge analysis, 10,178–182.

Che, P., Lall, S., Nettleton, D. and Howell, S.H. (2006). Gene expression programs during shoot, root, and callus development in Arabidopsis tissue culture. Plant Physiology, 141, 620-637.

Duke, J.A. (1985). Handbook of medicinal herbs. Florida: CRC Press.

Eri, S., Khoo, B.K., Lech, J. and Hartman, T.G. (2000). Direct thermal desorption – gas chromatography and gas chromatography – mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils in support of varietal characterization. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48, 11401149.

Farag, M.A. and Wessjohann, L.A. (2012). Comparative anticancer activity of commercial *Humulus lupulus* L. (hop) preparations in

comparison to its metabolomic fingerprint. Journal of Advanced Research, 4, 417-421.

Feeney, M. and Punja, Z.K. (2003). Tissue Culture and Agrobacterium-Mediated Transformation of Hemp (*Cannabis sativa* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 6, 578-585.

Gatica-Arias, A., Farag, M.A., Stanke, M., Matousek, J., Wessjohann, L. and Weber, G. (2012). Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered byPAP1/MYB75from *Arabidopsis thaliana* L. Plant Cell Report, 31, 111–119.

Grieve, M (1971). A Modern Herbal. Dover Publications, Inc., New York.

Griffin, M.J. and Coley-Smithy, J.R. (1968). The establishment of hop tissue cultures and their infection by *Pseudoperonospora humuli* under aseptic culture. Journal of Genetical Microbiology, 53, 231-236.

Gurriaran, M.J., Revilla, M.A. and Tames, R.S. (1999). Adeventitiuos shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cv. Brewers Gold and Nugget. Plant Cell Report, 18, 1007–11.

Hobbie, L.J. (1998). Auxins, Molecular genetic approach in Arabidopsis. Plant Physiology Biochemistry, 36, 91-102.

Horlemann, C.A., Schwekendiek, M., Ho¨hnle, A. and Weber, G. (2003). Regeneration and Agrobacterium mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Report, 22, 210–7.

Lawless, J. (1995). The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils: The Complete Guide to the Use of Oils in Aromatherapy and Herbalism. Element Books, Ltd., Dorset, UK.

Masek, A., Ewa, C., Kosmalska, K. and Marian, Z. (2014). Characteristics of compounds in hops using cyclic voltammetry, UV–VIS, FTIR and GC–MS analysis. Food Chemistry,165, 353-36.

Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry, 91, 571-577.

Mok, M.C. (1994). Cytokinins and plant development–An overview. In Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function, ed. DWS Mok, MC Mok. Boca Raton, Florida: CRC Press. 1994;155-66.

Mustafa, N.R. and Verpoorte, R. (2005). Chorismate derived C6C1 compounds in plants. Planta, 22, 1–5.

Patzak, J. (2003). Assessment of somaclonal variability in hop (*Humulus lupulus* L.) in vitro meristem cultures and clones by molecular methods. Euphytica, 131, 343–350.

Postman, J.D., DeNoma, J.S. and Reed, M.B. (2005). Detection and elimination of viruses in USDA hop (*Humulus lupulus*) germoplasm collection. In: Hummer KE, Henning JA, editors, Proceedings of the first international.

Psenakova, I., Gasparkova, L. and Farago, J. (2009). Polyphenol and flavonoid contents of hop callus and cell suspension cultures. Proc. Sci. Comm. IHGC, León, Spain. 109.

Rakousky, S. and Matousek, J. (1994). Direct organogenesis in hop - a prerequisite for an application of A. /wme/ac/eMS-mediated transformation. Biologia Plantarum, 36, 191-200.

Reed, B.M., Okut, N., Achino, J.D., Narver, L. and DeNoma, J. (2003). Cold storage and cryopreservation of hops (*Humulus lupulus*) shoot cultures through applications of standard protocols. Cryoletters, 24, 389–96.

Sagesser, M, and Deinzer, M. (1996). HPLC-ion spray-tandem mass spectrometry of flavonol glycosides in hops. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 54, 129–134.

Sauer, M., Robert, S. and Kleine-Vehn, J. (2013). Auxin: simply complicated. Journal of Experimental Botany, 9, 2565-2677.

Shilpashree, H.P. and Ravishankar, R.V. (2009). In vitro plant regeneration and accumulation of flavonoids in *Hypericum mysorense*.

International Journal of Integrative Biology. 8:43-49.

Skoog, F. and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in

Smykalova, A., Ortova, M., Lipavska, H. and Patzak, J. (2001). Efficient in vitro micropropagatin and regeneration of *Humulus lupulus* on low sugar, starch-Gelrite media. Biologia Plantarum, 44, 7-12.

Steenackers, B., Cooman, L.D. and Drik, D.V. (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. Food chemistry, 172, 742-752.

Weiss, R.F. (1988). Herbal Medicine. Ab Arcanum, Gothenburg, Sweden. pp. 285–286.

Zanoli, P.M., Rivasi, M., Zavatti, F. and Brusiani, M. (2005). New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. Journal of Ethnopharmacology, 102, 102–106.

Zhang, X.Z., Liang, H.B., Xiao, X. and Xu, Q. (2004). Direct characterization of bitter acids in a crude hop extract by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 15, 180–187.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 4, No 2, Autumn & Winter 2019

Optimization of callus and adventitious root formation of *Humulus lupulus* for some medicinal secondary metabolites production

Moojan Golalipoor[1], Mahnaz Aghdasi*[1], Mohammad Fatemi[1]

Abstract

Humulus lupulus belongs to cannabaceae family which cultivated in different regions of word for its medicinal and industrial importance. It has several medicinal components including: resin, essential oils, phenols and flavonoids. The aim of current research was optimization of callus and adventitious root formation for secondary metabolites production. For this purpose, petiole explant were cultured on MS or B5 medium culture supplemented with different concentrations (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 5 mg/l) of Kin either alone or in combination with (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 5 mg/l) 2,4-D or NAA. The experiment plan was completely randomized factorial design at 8 replications and five samples in each replicate. The obtained results showed that there is not any difference between MS and B5 medium culture for callus induction. The highest percentage of callus induction (100%) was achived in (2.5, 2.5) and (3, 3) mg/l of NAA+Kin and or 2,4-D+Kin, in both medium culture. Meanwhile, the highest amount of dry and fresh weigth was obtained in MS medium contained (2.5, 2.5) mg/l NAA+Kin. Medium containing (0.5, 0.5) mg/l NAA+Kin and or (0.5, 1) mg/l 2,4-D +Kin were the most effective for adventitious root induction. The results revealed that the highest amount of phenol was observed in MS medium supplemented with (3, 3) mg/l NAA+Kin, but the highest amount of flavonoid was produced in B5 medium containing (3, 3) mg/l 2,4-D +Kin.

Keywords: *Humulus lupulus*, Callus, Adventitious root, Phenol, Flavonoid

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan-IRAN, Corresponding author: aghdasi1346@gmail.com