Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 2, Summer 2019 (435-448)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.252894.1415

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۸ (ص ۴۴۸-۴۳۵)

تأثیر محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های مختلف بر استقرار درون‌شیشه‌ای و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه *Vaccinium arctostaphylos* L.

مهران نوروزپور[۱]، ناصر زارع[۲*]، رسول‌اصغری‌ذکریا[۳] و پریسا شیخ زاده[۴]
۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۳۰)

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر نوع محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های قره‌قاط و میزان متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای انجام گردید. برای این منظور، ریزنمونه‌های تک‌گره‌ای و جوانه‌های انتهایی قره‌قاط از مناطق جنگلی استان اردبیل تهیه و از طریق تیمار با محلول ۳g/l بنومیل، محلول H_2O_2 (۵٪)، اتانول ۷۰٪ و در نهایت محلول هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ با pH=۱۰ به‌مدت ۱۲دقیقه به‌ترتیب ضدعفونی شدند. ریزنمونه‌ها روی محیط کشت‌های MS، AN و WPM حاوی ۰/۱mg/l NAA یا IBA و سطوح مختلف BAP، زآتین و TDZ کشت شدند. نتایج نشان داد که درصد ریزنمونه‌های رشد کرده و تعداد برگ در هر ریزنمونه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع محیط کشت پایه، ترکیب هورمونی محیط کشت و اثر متقابل بین آنها قرار گرفت. تعداد برگ در هر ریزنمونه و رشد ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط کشت‌های پایه AN و WPM بود. بیشترین درصد ریزنمونه‌های رشد کرده و تعداد برگ در هر ریزنمونه در محیط کشت پایه MS حاوی IBA (۰/۱ mg/l) به‌همراه ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین یا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد. همچنین از نظر میزان متابولیت‌های ثانویه بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین میزان ترکیبات آنتوسیانینی و فلاونوئید به‌ترتیب در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر IBA و MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای، فلاونوئید، قره‌قاط، گیاه دارویی، محیط کشت پایه MS.

Effect of culture media and plant growth regulators on *in vitro* growth and production of secondary metabolites in *Vaccinium arctostaphylos* L.

Mehran Noruzpour[1] , Nasser Zare[2*], Rasool Asghari-Zakaria[3] and Parisa Sheikhzade-Mosadegh[4]
1, 2, 3, 4. M.Sc. Student, Associate Professor, Professor and Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
(Received: Mar. 3, 2018 - Accepted: Jul. 21, 2018)

ABSTRACT

The current study was conducted to evaluate the effect of basal culture media and plant growth regulators on establishment and growth of Whortleberry explants and production of secondary metabolites in *in vitro* conditions. Accordingly, single node explants and apical buds of Whortleberry were collected from forestry areas (Soha, Ardabil, Iran), surface sterilized by benomyl (3 g/l), H_2O_2 (5%), Ethanol (70%) and sodium hypochlorite (2.5%, pH=10) for 12 min, respectively. The explants were cultured on MS, AN, and WPM media supplemented with 0.1 mg/l NAA or IBA, and different levels of BAP, Zeatin and TDZ. Results showed that growth of explants (%) and number of leaves per explant were affected significantly by type of basal culture medium, plant growth regulators combination and their interaction. Number of leaves per explant and explant's growth in MS medium was significantly higher than in AN, and WPM media. The highest shoots (%) and number of leaves were obtained in MS basal medium supplemented with 0.1 mg/l IBA plus 0.5 and 1 mg/l Zeatin or 0.5 mg/l BAP. Moreover, there were significant differences among the treatments for secondary metabolite contents. The highest amount of anthocyanin and flavonoid were obtained in MS medium supplemented with 2 mg/l BAP+ 0.1 mg/l IBA and MS medium plus 2 mg/l TDZ and 0.1 mg/l NAA.

Keywords: Basal MS medium, Caucasian whortleberry, *In vitro* micro-propagation, flavonoids, medicinal plant.

* Corresponding author E-mail: zarenasser@yahoo.com, nzare@uma.ac.ir

مقدمه

گیاه قره‌قاط (بلوبری قفقازی[1]) با نام علمی *Vaccinium arctostaphylos* L. از خانواده‌ی اریکاسه[2] می‌باشد. این گیاه درختچه‌ای به ارتفاع ۱/۵ متر بوده که میوه و برگ‌های آن دارای خواص دارویی است. از جمله خواص دارویی آن می‌توان به کاهش قند خون و اثر ضدسرطانی آن به‌طور مخصوص اشاره کرد. میوه و برگ این گیاه به‌دلیل دارا بودن ترکیبات ضدسرطان و ضدمیکروبی از ارزش تجاری بالایی برخوردار است (Akhondzadeh, 2000). جنس *Vaccinium* در حال حاضر حدود ۴۵۰ گونه را در بر می‌گیرد که در اقلیم‌های مختلف گسترش یافته است (Debnath & McRae, 2002). از جمله گونه‌های مهم این جنس می‌توان به *V. arctostaphylos* اشاره کرد که در اکثر نواحی جنگلی آسیای صغیر، قفقاز و بخشی‌هایی از اروپا یافت می‌شود. خاستگاه اصلی *V. arctostaphylos* مربوط به راشستان جنگل‌های شمال ایران می‌باشد. از دیگر گونه‌های این جنس *V. corymbosum* می‌باشد که بومی اروپا و آمریکای شمالی است و به‌دلیل اهمیت تجاری و ارزش دارویی بالا در اکثر نواحی مستعد مورد کشت و کار قرار گرفته است (Sabeti, 1994). با توجه به افزایش تقاضا، مطالعات وسیعی در زمینه بهنژادی، افزایش کمی و کیفی محصول و سیستم‌های کاشت این گیاه آغاز شده و نیاز به یک روش سریع و کارآمد برای تکثیر این گیاه دارویی ارزشمند، بیش از پیش احساس می‌شود (Debnath, 2002). از جمله روش‌هایی که برای تکثیر گیاهان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای[3] می‌باشد، که روش کارآمد و مؤثری برای ازدیاد سریع گیاهان به‌ویژه تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی را فراهم می‌کند. ریزازدیادی در مقایسه با سایر روش‌های سنتی تکثیر، از کارآیی و نرخ تکثیر بالایی برخوردار است. همچنین، به کمک روش کشت بافت در شرایط درون‌شیشه‌ای، می‌توان برای حفاظت ژرم‌پلاسم گیاهی اقدام نمود (Debnath & McRae, 2002).

عوامل متعددی در پاسخ کشت بافت گیاهان و موفقیت در کشت و تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان مؤثر است که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به نوع محیط کشت پایه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ویژگی‌های اپی‌ژنتیکی ریزنمونه و شرایط رشدی گیاه مادری اشاره کرد (Nourafcan & Ansari, 2017; Kazeroonian *et al.*, 2017). محیط‌های کشت مختلفی برای کشت بافت گیاهان مختلف جنس *Vaccinium* به‌منظور استقرار، اندام‌زایی، پرآوری و ریشه‌زایی پیشنهاد شده است که از جمله آنها می‌توان به محیط کشت اندرسون (AN) (Anderson, 1984)، محیط کشت موراشیج و اسکوگ (MS) (Murashige & Skoog, 1977)، محیط کشت گیاهان چوبی[4] (WPM) (Lloyd & McCown, 1980) اشاره نمود. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از عوامل مهم درگیر در کنترل فرایندهای رشد و نموی سلول‌های گیاهی بوده و نقش بسیار مهمی در پاسخ درون‌شیشه‌ای سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی دارند. Meiners *et al.* (2007) با تحقیق روی گونه‌های *V. corymbosum* و *Vaccinium idaea* گزارش کردند که زآتین[5] با غلظت ۲/۰ mg/L در ترکیب با ایندول-۳- استیک اسید (IAA) در غلظت ۰/۱ mg/L در محیط کشت WPM به‌طور معنی‌داری تکثیر نهال‌ها را افزایش داد (Meiners *et al.*, 2007). علاوه بر این، تغییرات اپی‌ژنتیک گیاهان در طی فصول مختلف سال ناشی از شرایط محیطی، یکی دیگر از عوامل تأثیرگذار در پاسخ ریزنمونه‌ها بر کشت درون‌شیشه‌ای است. این امر به‌ویژه در گیاهان جنگلی که ریزنمونه‌ها از رویشگاه طبیعی تهیه می‌گردد از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (Farsi, 2006)؛ بنابراین، تهیه ریزنمونه‌ها باید در فصل رشدی مناسب و از گیاهان (درختان) با شرایط مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مناسب و عاری از بیماری انجام گیرد.

با وجود پیشرفت‌ها در زمینه شیمی، فعالان صنایع دارویی هنوز نیازمند گیاهان مطلوب به‌عنوان منابع بیولوژیک برای تولید تعدادی از متابولیت‌های ثانویه از جمله مواد دارویی هستند (Daryani *et al.*, 2016). بسیاری از متابولیت‌های ثانویه همانند فنل‌ها و

1. Caucasian whortleberry
2. Ericaceae
3. *In vitro* micropropagation
4. Woody plant medium
5. Zeatin

فلاونوئیدها، در کشت‌های درون‌شیشه‌ای نیز بیوسنتز شده و به‌عنوان منبع مهمی برای تهیه ترکیبات با ارزش اقتصادی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Alfermann & Petersen, 1995; Ramirez-Estrada *et al*., 2016). گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن خواص ضددرد، ضدالتهاب، ضدافسردگی، ضداضطراب و غیره در صنایع دارویی کاربرد فراوانی دارند. مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی به‌دلیل همراه‌بودن با مواد زیستی دیگر در بدن انباشته نمی‌شوند و اثرات جانبی کمتری از خود به جای می‌گذارند. این امر سبب برتری این مواد نسبت به داروهای شیمیایی شده است (Castilho *et al*., 2006). با این حال، مشکلاتی بر سر راه استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور درمان بیماری‌ها وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به غلظت پایین ترکیبات دارویی در گیاه، محدودیت منابع طبیعی، سرعت پایین سنتز متابولیت‌های ثانویه، تخریب روزافزون مراتع و نابودی گونه‌های متنوع گیاهی، مشکلات مرتبط با اصلاح و اهلی‌نمودن و کشت این گیاهان و گستردگی گیاهان دارویی اشاره نمود؛ از این‌رو، روش‌هایی که بتواند سبب کاهش این محدودیت‌ها شوند و همچنین شناسایی، تولید و افزایش ترکیبات ثانویه را در گیاهان دارویی موجب گردند، از اهمیت بالایی برخوردار هستند. کشت سلول و بافت گیاهی راهکارهای موثری را برای بررسی مسیرهای بیوسنتزی مؤثر در تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش بیان ژن‌های درگیر در این مسیرهای بیوسنتزی را فراهم نموده تا بتوان کارآیی گیاهان به‌عنوان منابع تجدیدپذیر برای تولید دارو را افزایش داد (Kumar & Gupta, 2008; Mulabagal & Tsay, 2004; Sato *et al*., 2001). کشت درون‌شیشه‌ای سلول، بافت و اندام گیاهی به‌عنوان یک روش پایدار در زمینه بررسی متابولیت‌های گیاهی به‌طور گسترده در تولید مواد مؤثره با ارزش در اکثر گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است که با استفاده از آن، تولید با سرعت بالا و هزینه کم در محیطی کنترل‌شده و مستقل از تغییرات آب و هوایی امکان‌پذیر است (Tripathi & Tripathi, 2003; Siddiqui *et al*., 2013; Hazrati Jahan *et al*., 2017). بنابراین، در این تحقیق پاسخ رشدی ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاط تهیه‌شده از رویشگاه‌های طبیعی به انواع محیط‌های کشت پایه شامل MS، AN و WPM و تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف شامل اکسین و سیتوکینین مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر این، تأثیر نوع محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در برگ‌های رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای نیز بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت ریزنمونه

سرشاخه‌های یک‌ساله و حاوی جوانه‌های سالم (از لحاظ فنوتیپی) قره‌قاط در اواخر فصل بهار و در طول تابستان از مناطق جنگلی روستای سوها (N^0: ۳۸/۲۵ و E^0: ۴۸/۶۴ و ۱۶۷۰متر) از توابع شهرستان اردبیل تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. ریزنمونه‌های تک یا دو گره‌ای قره‌قاط ابتدا با محلول مایع ظرف‌شویی به‌مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شده و زیر آب جاری به‌مدت یک ساعت آبکشی شدند. سپس، ریزنمونه‌ها در محلول ۳ گرم بر لیتر بنومیل به‌مدت ۲ ساعت و سپس، محلول ٪۵ H_2O_2 به‌مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شده و با آب استریل به‌مدت ۵ دقیقه آبکشی شدند. در نهایت ریزنمونه‌ها با اتانول ٪۷۰ به‌مدت ۵۰ ثانیه و هیپوکلریت‌سدیم ٪۲/۵ با pH=۱۰ و حاوی Tween20 ٪۰/۱ به‌مدت ۱۲ دقیقه تیمار شده و پس از سه بار آبکشی با آب‌مقطر استریل و حذف آب اضافی، روی محیط کشت‌های پایه مختلف (MS، AN و WPM) حاوی تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف (جدول۱) کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۴±۱°C، دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۳۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. حدود ۴ هفته پس از کشت، صفات درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها و مقدار برگ در هر ریزنمونه ثبت گردید. میزان رشد ساقه نیز به‌صورت مشاهده‌ای از صفر تا ۳ (صفر عدم رشد ریزنمونه و ۳ ریزنمونه‌های حاوی بیشترین مقدار رشد با بیشترین تعداد ساقه با بیشترین طول) رتبه‌بندی گردید. در همه موارد، محیط کشت‌ها از طریق اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی گردید.

اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه در برگ‌های رشد کرده در شرایط درون‌شیشه‌ای

به‌منظور ارزیابی شرایط درون‌شیشه‌ای و تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر میزان متابولیت‌های ثانویه، ریزنمونه‌های تک یا دو گره‌ای قره‌قاط روی محیط کشت‌های پایه MS و WPM حاوی تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف (جدول ۲) کشت گردید. حدود ۴۵ روز پس از کشت، برگ‌های رشدکرده در شرایط درون‌شیشه‌ای برداشت شده و میزان فلاونوئید، آنتوسیانین و فنل تام در آنها اندازه‌گیری شد. از برگ‌های تهیه‌شده از رویشگاه طبیعی نیز به‌عنوان شاهد استفاده گردید.

به‌منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه، حدود ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی (نمونه تازه) درون هاون‌چینی با ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۹۹:۱) کاملاً سائیده و عصاره به‌دست آمده درون لوله‌های آزمایش سرپیچ‌دار منتقل شده و به‌مدت ۷۲ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵°C نگه‌داری شدند (Chang *et al.*, 2002). سپس، به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتریفوژ شده و مقدار فلاونوئید، فنل‌تام و آنتوسیانین محلول رویی آن اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید

فلاونوئید کل نمونه‌ها براساس منحنی استاندارد کوئرسیتین[1] و با استفاده از روش Chang *et al.* (2002) سنجیده شد. به این صورت که به یک میلی‌لیتر عصاره گیاهی، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم‌استات[2] یک مولار اضافه گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۸ نانومتر قرائت شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین (Sigma-Aldrich) (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متانول) به‌عنوان استاندارد استفاده گردید و منحنی استاندارد رسم شد. از منحنی استاندارد کوئرستین و معادله رگرسیون حاصل از آن برای کمی‌سازی مقدار فلاونوئید نمونه‌ها استفاده گردید. سپس مقدار فلاونوئید با استفاده از فرمول $T=(C\times V)/M$ برحسب میلی‌گرم در یک گرم برگ تازه محاسبه گردید. در این فرمول؛ T برابر با میزان فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم برگ تر، C برابر است با مقدار غلظت فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر، V برابر است با حجم نهایی عصاره (برحسب میلی‌لیتر) و M برابر وزن نمونه گیاهی (برحسب گرم نمونه تازه) است.

اندازه‌گیری فنل‌تام

برای اندازه‌گیری مقدار فنل‌تام از معرف فولین سیوکالتیو[3] طبق روش Al-Farsi *et al.* (2005) با کمی تغییر استفاده شد. به این صورت که ۳ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو رقیق‌شده (به نسبت ۱۰:۱) به ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی اضافه گردید و به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب (بن‌ماری) با دمای ۲۲°C نگهداری گردید. سپس به آن ۳ میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات‌سدیم (۷ درصد) افزوده شد و مجدداً در بن‌ماری با دمای ۲۲ °C به‌مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. پس از ۹۰ دقیقه جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل بلانک[4] (متانول اسیدی به‌همراه نسبت‌های برابر فولین سیوکالتو و بی‌کربنات‌سدیم ۷٪) اندازه‌گیری شد. به‌منظور کمی‌سازی مقدار فنل کل، از منحنی استاندارد گالیک‌اسید[5] در غلظت‌های (۰/۰۳، ۰/۴۸، ۰/۹۶ و ۱/۲ میلی‌گرم بر لیتر متانول) و منحنی رگرسیون حاصل از آن استفاده گردید. سپس مقدار فنل کل نیز با استفاده از فرمول $T=(C\times V)/M$ برحسب میلی‌گرم گالیک‌اسید در یک گرم برگ تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری آنتوسیانین

جهت اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین از روش Wagner (1979) استفاده شد. برای این منظور، جذب نوری عصاره گیاهی در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. محاسبه غلظت با استفاده از فرمول $A=\varepsilon bc$ و ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ انجام شد و عدد به‌دست‌آمده در 10^6 ضرب گردید تا نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردد. در فرمول فوق A برابر مقدار عدد جذبی، b برابر عرض کووت[6]، ε برابر ضریب خاموشی و c برابر غلظت آنتوسیانین است.

1. Quercetin
2. Potassium acetate
3. Folin-Ciocalteu
4. Blank
5. Gallic acid
6. Cuvette

جدول ۱. انواع محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده برای استقرار و تکثیر درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های گره قره‌قاط

Table 1. Different culture media and plant growth regulators used for *in vitro* propagation of Whortleberry nodal explants

Cytokinin				Auxin	Cytokinin				Auxin	Culture
TDZ (mg/L)	BAP (mg/L)		Zeatin (mg/L)	0.1 (mg/L)	TDZ (mg/L)	BAP (mg/L)		Zeatin (mg/L)	0.1 (mg/L)	media
.	.		.	.	.	.		.	.	MS
.	.		0.5	NAA	.	.		0.5	IBA	MS
.	.		1	NAA	.	.		1	IBA	MS
.	.		2	NAA	.	.		2	IBA	MS
.	0.5		.	NAA	.	0.5		.	IBA	MS
.	1		.	NAA	.	1		.	IBA	MS
.	2		.	NAA	.	2		.	IBA	MS
0.5	.		.	NAA	0.5	.		.	IBA	MS
1	.		.	NAA	1	.		.	IBA	MS
2	.		.	NAA	2	.		.	IBA	MS
.	.		.	.	.	.		.	.	AN
.	.		0.5	NAA	.	.		0.5	IBA	AN
.	.		1	NAA	.	.		1	IBA	AN
.	.		2	NAA	.	.		2	IBA	AN
.	0.5		.	NAA	.	0.5		.	IBA	AN
.	1		.	NAA	.	1		.	IBA	AN
.	2		.	NAA	.	2		.	IBA	AN
0.5	.		.	NAA	0.5	.		.	IBA	AN
1	.		.	NAA	1	.		.	IBA	AN
2	.		.	NAA	2	.		.	IBA	AN
.	.		.	.	.	.		.	.	WPM
.	.		0.5	NAA	.	.		0.5	IBA	WPM
.	.		1	NAA	.	.		1	IBA	WPM
.	.		2	NAA	.	.		2	IBA	WPM
.	0.5		.	NAA	.	0.5		.	IBA	WPM
.	1		.	NAA	.	1		.	IBA	WPM
.	2		.	NAA	.	2		.	IBA	WPM
0.5	.		.	NAA	0.5	.		.	IBA	WPM
1	.		.	NAA	1	.		.	IBA	WPM
2	.		.	NAA	2	.		.	IBA	WPM

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

آزمایش مربوط به بررسی تأثیر محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف بر رشد درون‌شیشه‌ایی ریزنمونه‌های قره‌قاط به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و حداقل ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار انجام گرفت. در این آزمایش نوع محیط کشت پایه با سه سطح (MS، AN و WPM) به‌عنوان عامل اول و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی (شامل ترکیب ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA یا NAA با غلظت‌های صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین، TDZ یا BAP) به‌عنوان عامل دوم نظر گرفته شد. آزمایش بررسی تأثیر عوامل مختلف بر تولید متابولیت‌های ثانویه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و حداقل ۱۰ لوله آزمایشی در هر تکرار انجام گرفت. قبل از انجام تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، تست نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون تک‌نمونه‌ای کولوگروف- اسمیرنوف انجام گرفت. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL انجام گرفت.

جدول ۲. انواع محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده برای ارزیابی متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های درون‌شیشه‌ایی قره قاط

Table 2. Culture media and plant growth regulators used for evaluation of secondary metabolites of Whortleberry in *in vitro* cultures

Culture media	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	TDZ (mg/L)	BAP (mg/L)
MS	.	.	.	.
MS	.	0.1	.	1
MS	.	0.1	.	2
MS	.	0.1	1	.
MS	.	0.1	2	.
MS	0.1	.	1	.
MS	0.1	.	2	.
WPM	.	.	.	.
WPM	.	0.1	.	1
WPM	.	0.1	.	2
WPM	0.1	.	.	2
WPM	.	0.1	1	.
WPM	.	0.1	2	.
WPM	0.1	.	2	.

نتایج و بحث

تأثیر نوع محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاط

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد

که درصد برگ‌دهی، درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها و تعداد برگ‌های قره‌قاط به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع محیط کشت پایه قرار گرفتند. ترکیب هورمونی و اثر متقابل محیط کشت پایه و ترکیب هورمونی نیز برای صفات درصد برگ‌دهی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره‌قاط معنی‌دار بود، ولی برای صفت تعداد برگ در هر ریزنمونه از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تعداد برگ در هر ریزنمونه در محیط کشت پایه MS به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر محیط کشت‌های پایه بود، درحالیکه بین دو محیط کشت پایه AN و WPM از نظر این صفت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل A-۱). علاوه بر این، درصد برگ‌دهی ریزنمونه‌ها در محیط کشت‌های پایه MS و AN به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط WPM بود؛ با این حال، درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های گره قره‌قاط در محیط کشت WPM بیشتر از محیط کشت AN و MS بود (شکل B-۱). نیاز سلول‌ها و بافت‌های گیاهی برای پاسخ رشدی بهینه در شرایط درون‌شیشه بسته به گونه‌گیاهی و همچنین نوع ریزنمونه متفاوت است. بر همین اساس، فرمولاسیون‌های متعددی بر اساس نوع و غلظت مواد معدنی و همچنین مواد آلی مورد استفاده در ترکیب محیط‌کشت ارایه شده است (George *et al*., 2008). در تحقیق حاضر نیز پاسخ رشدی ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاط در محیط کشت‌های MS، AN و WPM متفاوت بوده و مناسب‌ترین شرایط برای استقرار و رشد ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS به‌دست آمد (شکل ۱). با توجه به این‌که این محیط‌ها از نظر غلظت یا ترکیب برخی از نمک‌ها با هم متفاوت هستند این نتایج ممکن است به‌خاطر غلظت بالای نمک‌ها به‌ویژه نیترات آمونیوم (NH_4NO_3) در ترکیب محیط کشت MS باشد. نیتروژن یک عنصر اصلی برای بیوسنتز اسیدآمینه، پروتئین و اسید نوکلئیک است و نقش بسیار مهمی در مسیرهای متابولیسمی، رشد و تمایز سلولی دارد که کمبود آن به‌سرعت باعث کاهش رشد و نمو گیاهی در کشت درون‌شیشه‌ای می‌شود (Taiz & Zeiger, 2002). نیترات آمونیوم (NH_4NO_3) مهمترین ترکیب معدنی مورد استفاده به‌عنوان منبع نیتروژن است که نقش آن در تقسیم سلولی، زنده‌مانی سلول‌ها، تولید کالوس، تشکیل مریستم‌ها و برگ‌ها و همچنین در تقویت فعالیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی در گیاهان مختلف به اثبات رسیده است؛ به‌طوری‌که کمبود آن باعث ایجاد یک سری اختلالات در فرایندهای رشد و نموی ریزنمونه‌های گیاهی می‌شود (Ramage & Williams, 2001; Sae-Lee *et al*., 2014). علاوه‌بر این، تعادل یون‌های NH_4^+ و NO_3^- در محیط کشت برای جذب بهتر NO_3 و سمیت کمتر NH_3 در داخل بافت‌ها ضروری است (Lenee & Chupeau, 1989). اهمیت تعادل بین یون‌های NH_4^+ و NO_3^- در آلوئه مارپیچ (*Aloe polyphylla*) (Ivanova & Van Staden, 2009) و گونه‌های مختلف گلابی (Wada *et al*., 2015) نیز گزارش شده است.

بررسی ترکیب تیماری محیط کشت پایه و نوع اکسین نشان داد که محیط کشت پایه‌ی MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA از نظر میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه، درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه (۲/۶۹ عدد، ۷۲/۳۴ درصد و ۹۲/۶۲ درصد به ترتیب) عملکرد بهتری نسبت به سایر تیمارها داشته است (جدول ۴).

جدول ۳. تجزیه واریانس تأثیر محیط کشت پایه، اکسین و سیتوکینین بر رشد ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای
Table 3. Variance analysis of the effects of basal culture media, auxin and cytokinin on *in vitro* growth of Whortleberry nodal exaplants

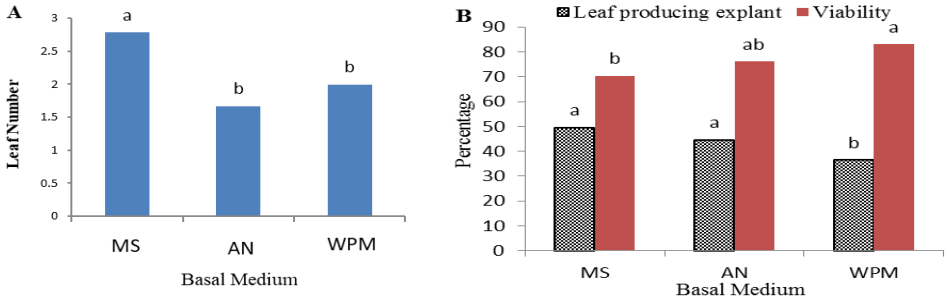
Source of variation	df	MS		
		Number of leaves	Leafing percentage	Percentage of viability
Basal medium (a)	2	19.15**	2719.94**	2414.86**
Plant growth regulators (b)	19	2.37^{ns}	1855.86**	2961.22**
a × b	38	1.64^{ns}	2524.85**	1023.81**
Error	120	1.58	288.21	395.00
C.V (%)	-	63.70	71.24	37.53

ns و **: به‌ترتیب نبود اختلاف معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

ns, **: Non-significant and significant at 1% level of probability, respectively.

همان‌طوری‌که در جدول ۴ مشاهده می‌شود بین محیط‌های کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم‌برلیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم‌برلیتر IBA از نظر درصد برگ‌دهی و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت. اما از نظر میانگین تعداد برگ در هر ریزنمونه، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین، درصد برگ‌دهی در محیط کشت MS حاوی NAA به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط MS حاوی IBA بود؛ درحالیکه، در محیط کشت‌های پایه AN و WPM، درصد ریزنمونه‌های برگ داده در محیط کشت حاوی IBA به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط حاوی NAA است (جدول ۴). این امر نشان‌دهنده اهمیت و تأثیر اثر متقابل بین نوع اکسین و محیط کشت پایه در پاسخ کشت بافتی ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاط است؛ بنابراین، برای به‌دست‌آوردن نتیجه مناسب در استقرار و رشد درون‌شیشه‌ایی ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاط باید از ترکیب مناسب محیط کشت پایه و اکسین استفاده نمود. مطالعات متعدد نشان داده که استفاده از اکسین در غلظت پایین در محیط کشت ریزنمونه‌های گره، علاوه بر تحریک رشد سلول‌ها، باعث کاهش اثر بازدارندگی سیتوکینین‌ها در رشد طولی ساقه می‌شود (Machakova *et al.*, 2008).

بین محیط کشت‌های پایه MS، AN و WPM حاوی IBA و NAA بسته به نوع و غلظت سیتوکینین مورداستفاده از نظر درصد برگ‌دهی اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید؛ به طوری‌که بیشترین درصد (۱۰۰ درصد) برگ‌دهی مربوط به محیط کشت WPM حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر IBA بود. علاوه‌براین، همان‌طورکه در شکل ۲- A مشاهده می‌شود در محیط کشت پایه MS، درصد ریزنمونه‌های برگ داده در محیط‌های حاوی NAA mg/l ۰/۱ بیشتر از محیط‌های حاوی IBA mg/l ۰/۱ بوده ولی در محیط کشت‌های AN و WPM، درصد ریزنمونه‌های برگ داده در محیط‌های حاوی IBA بیشتر از محیط‌های حاوی NAA بود. که بیانگر اثر متقابل معنی‌دار بین محیط کشت پایه و ترکیبات هورمونی مورد استفاده است.



شکل ۱. تأثیر نوع محیط کشت پایه بر (A) میانگین تعداد برگ و (B) درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره‌قاط. حروف متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Figure 1. Effect of basal medium on (A) leaf number; (B) leafing and viability percentages of Whortleberry explants. Different letters indicate a significant difference at the 5% probability level.

جدول ۴. تأثیر انواع محیط کشت پایه و نوع اکسین بر تعداد برگ، درصد برگ‌دهی و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره‌قاط در کشت درون‌شیشه‌ای

Table 4. The effect of different basal medium and auxin type on number of leaves per explant, leafing percentages and viability of Whortleberry explants at *in vitro* cultures

Basal Medium	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	Number of leaves/explant	Percentage of leaf producing explants	Percentage of viability
MS	0.1	.	2.86 ^{a}	26.80 ^{c}	48.04 ^{c}
AN	0.1	.	1.71 ^{b}	59.39 ^{ab}	76.24 ^{b}
WPM	0.1	.	2.17 ^{ab}	50.46 ^{b}	81 ^{ab}
MS	.	0.1	2.69 ^{a}	72.34 ^{a}	92.62 ^{a}
AN	.	0.1	1.63 ^{b}	29.47 ^{c}	75.82 ^{b}
WPM	.	0.1	1.81 ^{b}	22.47 ^{c}	84.99 ^{ab}

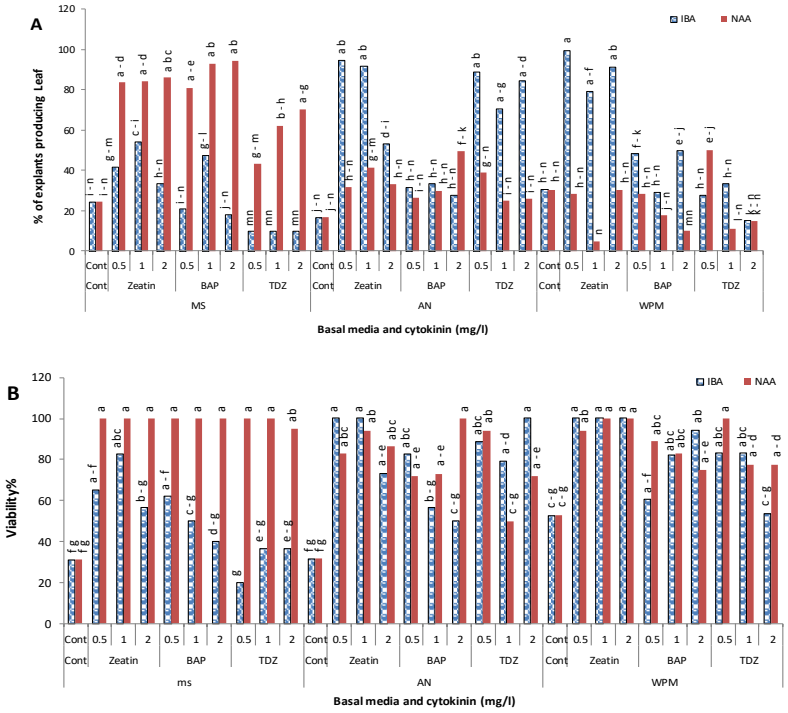
بر اساس نتایج حاصل از تیمارهای حاوی IBA، بین محیط کشت‌های پایه MS، AN و WPM از نظر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های قره‌قاط اختلاف معنی‌داری وجود داشت. علاوه‌براین، در محیط کشت MS در تمام سطوح سیتوکینین مورد استفاده از نظر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها اختلاف معنی‌داری بین محیط‌کشت‌های حاوی IBA و NAA وجود داشت (شکل ۲-B)، به‌طوری‌که، در محیط‌کشت‌های MS حاوی NAA درصد زنده‌مانی بیشتر از محیط حاوی IBA بود. برای مثال بیشترین درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به‌دست آمد، درحالی‌که در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها به حدود ۲۰٪ (کمترین مقدار در بین تیمارها) کاهش یافت ولی در محیط کشت‌های AN و WPM حاوی سطوح مختلف سیتوکنین به غیر از محیط‌کشت AN حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP، اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های حاوی NAA و IBA وجود نداشت (شکل ۲-B).

اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها برای تقسیم سلولی، به‌ویژه در مراحل انتقال سلول گیاهی از G1 به S و G2 به M نقش بسیار مهمی دارند. علاوه‌براین، اکسین‌ها در القای رونویسی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مرتبط با رشد سلولی نقش داشته و از طریق اسیدی‌کردن دیواره‌سلولی و در نتیجه افزایش توسعه‌پذیری آن، منجر به رشد سلولی می‌شوند. سیتوکینین‌ها نیز از طریق تنظیم سنتز پروتئین‌های درگیر در شکل‌گیری دوک‌های میتوزی، به‌طور مستقیم چرخه سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Stals & Inze, 2001). در تحقیق حاضر، سیتوکینین‌های BAP و زآتین در مقایسه با TDZ برای استقرار و رشد درون‌شیشه‌ایی ریزنمونه‌های قره‌قاط مناسب‌تر بودند. همچنین پاسخ رشدی ریزنمونه‌ها در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های پایین‌تر این سیتوکینین‌ها بیشتر از غلظت‌های نسبتاً بالای آنها بود. بیشترین تعداد برگ در هر ریزنمونه در ریزنمونه‌های کشت‌شده روی محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP یا زآتین به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و پس از آن در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از بقیه تیمارها بود. با این حال، Cuce *et al.* (2013) با ارزیابی کشت جوانه‌های انتهایی گونه *V. arctostaphylos* در محیط‌کشت‌های پایه WPM، DKW و MS مناسب‌ترین ترکیب محیط کشت برای این گیاه را MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA گزارش نمودند. البته با توجه به این‌که آنان از زآتین استفاده کرده‌اند، با نتایج تحقیق حاضر که از سیتوکینین‌های مختلف در سطوح مختلف استفاده شده است قابل مقایسه و بحث نخواهد بود. در یک مطالعه دیگر، ریزازدیادی گونه *Vaccinium vitis-idaea* در محیط کشت‌های اندرسون (AN)، WPM و 1/2MS در ترکیب با غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) زآتین مورد بررسی قرار گرفت که محیط کشت WPM در بالاترین غلظت زآتین، مناسب‌ترین سطح رشد ریزنمونه‌های گره‌ای این گونه را فراهم کرد (Paprstein & Sedlak, 2015). علاوه‌براین، در مطالعه‌ای در مورد ریزازدیادی گونه‌های *Vaccinium vitis-idaea* و *Vaccinium corymbosum* نیز گزارش شده که سیتوکینین زآتین از نظر تحریک شاخه‌های نابجا برتر از TDZ و متا-توبولین بود (Meiners *et al.*, 2007). در مطالعه دیگری، ریزازدیادی *Vaccinium vitis-idaea* تحت تأثیر غلظت‌های مختلفی از TDZ و زآتین مورد ارزیابی قرار گرفته و گزارش شده که TDZ در غلظت‌های پایین (۰/۱ تا ۱ میکرومولار) تکثیر شاخه‌ها را فراهم نموده ولی از رشد طولی ساقه‌ها ممانعت می‌کند (Debnath, 2005). Ostroluka *et al.* (2004) با کشت درون‌شیشه‌ای دو گونه *Vaccinium vitis-idaea* و *Vaccinium corymbosum*، گزارش کردند محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر زآتین، مناسب‌ترین محیط برای کشت درون‌شیشه‌ای و ریزازدیادی این گونه است. در تحقیق حاضر، رشد طولی ساقه‌های حاصل از کشت گره قره‌قاط (*V. arctostaphylos*) به‌صورت رتبه‌دهی مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۵). رشد طولی ساقه‌ها در محیط کشت پایه MS بیشتر از محیط‌های WPM و AN بود و نیز در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر زآتین به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و MS

حاوی ۱ یا ۲ میلی‌گرم برلیتر زآتین به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA یا NAA و همچنین MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA رشد طولی ساقه بیشتر از بقیه تیمارها بود (جدول ۵). بنابراین با توجه به ارزان‌بودن و همچنین پایداری بالاتر BAP در مقایسه با زآتین، استفاده از BAP در ریزازدیادی این گیاه دارویی توصیه می‌شود.

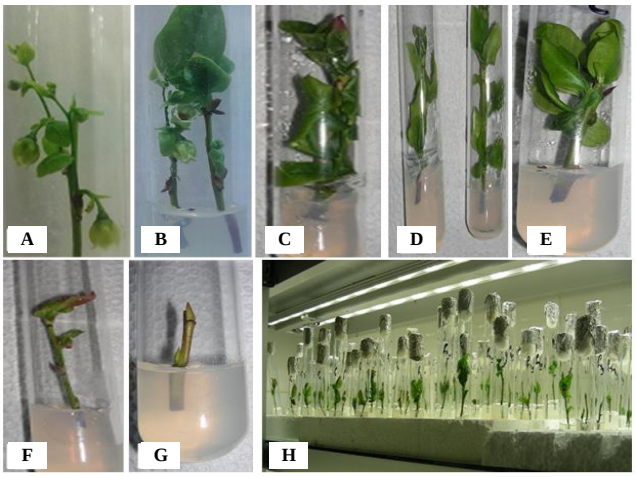
در مطالعات متعددی اثبات شده که عوامل متعددی مانند گونه و ژنوتیپ گیاه مادری، ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی، ترکیب محیط کشت× ژنوتیپ گیاه و شرایط فیزیولوژیک ریزنمونه‌ها در کنار ترکیب محیط کشت پایه، از عوامل بسیار مهم و مؤثر در پاسخ رشدی مناسب درون‌شیشه‌ای گیاه می‌باشد (Machakova *et al*., 2008; Paprstein & Sedlak, 2015; Daryani *et al*., 2016). بنابراین امکان توصیه یک ترکیب محیط کشتی برای دامنه وسیعی از گونه‌ها، ژنوتیپ‌ها و شرایط فیزیولوژیک وجود نداشته و باید به‌طور تجربی مورد بهینه‌سازی قرار گیرد.

در محیط کشت‌های پایه و برخی از تیمارهای هورمونی به‌خصوص محیط کشت‌های MS و AN حاوی زآتین و BAP به‌همراه IBA، رشد برگ‌ها و ساقه‌ها به‌وضوح قابل‌مشاهده می‌باشد (شکل ۳). براساس نتایج به‌دست‌آمده محیط کشت‌های MS و AN حاوی غلظت‌های پایین‌تر زآتین تأثیر قابل‌توجهی بر تولید غنچه‌های گل در ساقه‌های رشد کرده داشت. گلدهی در شرایط درون شیشه‌ای، روشی برای کنترل و شناسایی مکانیسم‌های فرآیند گلدهی و همچنین مراحل تشکیل گل، تکوین اندام‌های زایشی است که تحت تأثیر عوامل متعددی از قبیل سیتوکینین‌ها، مقدار ساکارز، دوره نوری و زمان زیرکشت ریزنمونه‌ها قرار می‌گیرد (Wang *et al*., 2002). محیط کشت MS حاوی عناصر ماکرو، میکرو، آهن و ویتامین‌های بالایی است که یک محیط مغذی را برای رشد غنچه‌های گل فراهم می‌کند (May & Cellier, 1973). علاوه‌براین، گزارش شده که کاهش نیتروژن در محیط کشت، باعث کاهش غنچه‌های گل در ریزنمونه‌های کشت‌شده می‌شود (Okamoto *et al*., 2000).



شکل ۲. تأثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر (A) درصد برگ‌دهی و (B) درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های گره‌ای قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ایی

Figure 2. Effect of different culture media and plant growth regulators on (A) percentage of leaf producing explants and (B) percentage of explant viability of Whortleberry at *in vitro* cultures



شکل ۳. رشد درون‌شیشه‌ایی ریزنمونه‌های گره قره‌قاط در محیط کشت و ترکیبات هورمونی مختلف؛ (A و B) تشکیل غنچه گل در ساقه رشد کرده روی محیط MS حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم‌برلیتر زآتین به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم‌برلیتر IBA؛ (C) ریزنمونه‌های رشد کرده روی محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم‌برلیتر زآتین به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم‌برلیتر IBA؛ (D) محیط AN حاوی ۰/۵ میلی‌گرم‌برلیتر BAP به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم‌برلیتر IBA؛ (E) محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم‌برلیتر زآتین به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم‌برلیتر NAA؛ (F) محیط WPM حاوی ۲ میلی‌گرم‌برلیتر BAP به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم‌برلیتر NAA ؛ (G) محیط کشت بدون هورمون (شاهد) و (H) نگه‌داری نمونه‌ها در اتاقک رشد با شدت نوری ۳۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس.

Figure 3. *In vitro* growth of Whortleberry nodal explants on different culture media and plant growth regulators; (A and B) formation of flower buds on MS medium containing 0.5 and 1 mg/l zeatin with 0.5 mg/l IBA; (C) explant growth on MS medium containing 0.5 mg /l of zatin with 0.1 mg/ l IBA; (D) AN medium containing 0.5 mg/l BAP with 0.1 mg/l IBA; (E) MS medium containing 0.5 mg/l of zeatin with 0.1 mg/l of NAA; (F) WPM medium containing 2 mg/l BAP with 0.1 mg/l of NAA; (G) medium without plant growth regulator, and (H) *In vitro* cultures of Whortleberry nodal explants in a growth chamber with a light intensity of 3000-3500 lux

بررسی میزان ترکیبات آنتوسیانینی، فنلی‌تام و فلاونوئیدی ریزنمونه‌های قره‌قاط در کشت درون‌شیشه‌ای

بین تیمارهای هورمونی مختلف و نمونه شاهد (جمع‌آوری شده از طبیعت) از نظر میزان آنتوسیانین، فلاونوئید و فنل تام اختلاف معنی‌داری وجود داشت. مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۶) نشان داد که از نظر مقدار آنتوسیانین کل، نمونه برگ‌های تیمار شاهد (جمع‌آوری شده از طبیعت) و تیمارهای هورمونی مورد استفاده در شرایط درون‌شیشه‌ای (به‌جز محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. این در حالی است که بیشترین میزان ترکیبات آنتوسیانینی مربوط به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود. به‌طوری‌که بین تیمار هورمونی مذکور و نمونه برگ شاهد و محیط کشت MS فاقد ترکیب هورمونی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین از نظر ترکیبات فلاونوئیدی نیز بین نمونه برگ‌های به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ایی و نمونه برگ شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر TDZ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی (۱۴/۱۹ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم نمونه تازه) را نشان داد، به‌طوری‌که استفاده از ترکیب هورمونی مذکور تأثیر مناسبی بر سطح فلاونوئید کل نسبت به تیمارهای دیگر داشت. بررسی نتایج به‌دست‌آمده از میانگین داده‌ها از نظر مقدار فنل‌تام نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری مابین نتایج به‌دست‌آمده از نمونه‌های تهیه‌شده از کشت درون‌شیشه‌ای و برگ‌های تهیه‌شده از طبیعت وجود نداشت. اما محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و WPM حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر NAA به‌ترتیب (۱۱۱/۱۲ و ۱۱۱/۱۱ میکرو گرم گالیک‌اسید بر گرم نمونه تازه) عملکرد بهتری را داشتند.

کشت سلول‌های گیاهی یک منبع مناسب و مهم

برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در اکثر گیاهان است (Alferman & Petersen, 1995). براساس فرضیه توتی‌پتانسی، هر سلول گیاهی تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را داراست و می‌تواند دامنه وسیعی از مواد بیوشیمیایی که در گیاه کامل یافت می‌شود را تولید نماید (Ramachandra & Ravishankar, 2002). نوع و مقدار اکسین یا سیتوکنین، یا نسبت اکسین به سیتوکنین، تشکیل و تجمع متابولیت‌های ثانویه را در سلول‌های گیاهی کشت‌شده تغییر می‌دهد (Bohn & Rink, 1988). استفاده از BAP، 2ip و زآتین تأثیر مناسبی بر سطح متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از آزمایش‌ها داشته است. همچنین مشخص شده است که جیبرلیک‌اسید و آبسیزیک‌اسید، تولید آنتوسیانین را در برخی از کشت‌های درون‌شیشه‌ای متوقف می‌سازند (Seitz & Hinderer, 1988). در بسیاری از موارد، مشاهده گردیده که تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D مانع تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. برای مثال، حذف 2,4-D و یا جایگزینی آن با NAA یا IAA باعث افزایش تولید آنتوسیانین در کشت تعلیقی *Daucus carota*، نیکوتین در کشت تعلیقی *Nicotiana tabacum*، شیکونین در کشت تعلیقی *Portulaca grandiflora* می‌شود (Rajendran *et al*., 1992). با این وجود، تحریک توسط 2,4-D در بیوسنتز کاروتنوئید در کشت تعلیقی *Daucus carota* و تولید آنتوسیانین در کشت کالوس *Oxalis linearis* گزارش شده است (Mok *et al*., 1976; Meyer & Van Staden, 1995). سیتوکنین‌ها بسته به نوع متابولیت و گونه گیاهی اثرات متفاوتی دارند. برای مثال، Kin تولید آنتوسیانین را در کشت *Haplopappus gracilus* تحریک می‌کند ولی مانع تولید آن در کشت سلول جنس *Populus* می‌شود (Mok *et al*., 1976; Seitz & Hinderer, 1988).

جدول ۵. تأثیر محیط کشت پایه و تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف بر رشد ساقه در ریزنمونه‌های گره قره‌قاط

Table 5. Effect of different culture media and plant growth regulators on *in vitro* stem growth of Whortleberry nodal explants

Culture media	NAA (0.1 mg/l)	IBA (0.1 mg/l)
MS + 0.5 ZT	***	**
MS + 1 ZT	***	***
MS + 2 ZT	***	***
MS + 0.5 BAP	*	***
MS + 1 BAP	*	**
MS + 2 BAP	-	**
MS + 0.5 TDZ	-	-
MS + 1 TDZ	-	*
MS + 2 TDZ	*	*
(Without hormone) MS	-	-
AN + 0.5 ZT	-	**
AN + 1 ZT	-	**
AN + 2 ZT	-	**
AN + 0.5 BAP	-	*
AN + 1 BAP	-	-
AN + 2 BAP	-	*
AN + 0.5 TDZ	-	-
AN + 1 TDZ	-	**
AN + 2 TDZ	-	**
(Without hormone) AN	-	-
WPM + 0.5 ZT	-	**
WPM + 1 ZT	*	*
WPM + 2 ZT	-	-
WPM + 0.5 BAP	-	**
WPM + 1 BAP	-	*
WPM + 2 BAP	-	**
WPM + 0.5 TDZ	-	*
WPM + 1 TDZ	-	-
WPM + 2 TDZ	-	-
(Without hormone) WPM	-	-

***: ساقه‌های با طول ۳-۲ سانتی‌متر، **: ساقه‌های با طول ۲-۱ سانتی‌متر، *: ساقه‌های با طول ۱-۰/۵ سانتی‌متر، - : بدون رشد ساقه

***: Shoots with length of 3-4 cm, **: Shoots with length of 2-3 cm, *: Shoots with length of 0.5-1 cm, -: Without stem growth

جدول ۶. میزان آنتوسیانین، فلاونوئید و فنل‌تام در برگ‌های قره‌قاط رشد کرده در شرایط درون‌شیشه

Table 6. Amount of anthocyanins, flavonoids and total phenol of Whortleberry leaves grown at *in vitro* condition

Treatment	Anthocyanins (µmol/ g fresh sample)	Flavonoid (mg Quercetin/g fresh sample)	Total phenol (µg Gallic acid/ g fresh sample)
Control (In vivo)	16.23 [b]	12.82 [abc]	82.49 [ab]
Free (MS)	16.24 [b]	8.61 [bc]	81.61 [ab]
MS + 1 BAP + 0.1 IBA	13.15 [b]	9.45 [abc]	88.30 [ab]
MS + 2 BAP + 0. 1IBA	24.22 [a]	12.89 [abc]	111.12 [a]
MS + 1 TDZ + 0.1 NAA	15.19 [b]	9.24 [abc]	87.55 [ab]
MS + 2 TDZ + 0.1 NAA	20.31 [ab]	14.19 [a]	99.07 [ab]
MS + 1 TDZ + 0.1 IBA	14.33 [b]	7.64 [c]	90.50 [ab]
MS + 2 TDZ + 0.1 IBA	17.76 [ab]	10.14 [abc]	83.51 [ab]
Free (WPM)	17.19 [ab]	10.30 [abc]	85.01 [ab]
WPM + 2 BAP + 0.1 NAA	17.49 [ab]	13.25 [ab]	111.11 [a]
WPM + 1 BAP + 0.1 IBA	16.68 [ab]	9.55 [abc]	73.67 [b]
WPM + 2 BAP + 0.1 IBA	19.96 [ab]	12.61 [abc]	86.68 [ab]
WPM + 1 TDZ + 0.1 IBA	16.04 [b]	8.50 [bc]	81.29 [ab]
WPM + 2 TDZ + 0.1 IBA	17.85 [ab]	11.87 [abc]	89.90 [ab]
WPM + 2 TDZ + 0.1 NAA	18.69 [ab]	11.84 [abc]	98.16 [ab]

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از روش کشت درون‌شیشه‌ای علاوه بر افزایش نرخ تکثیر و تولید گیاهانی مشابه پایه مادری، گیاهانی فاقد آلودگی داخلی و با نرخ رشد بیشتری را تولید می‌نماید. همچنین ترکیبات ثانویه گیاهان دارویی برای اهداف غذایی و درمانی دارای اهمیت هستند. لذا هر عاملی که بتواند ضمن ایجاد کمترین تغییر در ساختار ژنتیکی گیاه، تولید این ترکیبات را افزایش دهد با ارزش خواهد بود. در این تحقیق، سعی بر ارائه محیط کشت مناسب در کنار ترکیب هورمونی مطلوب برای کشت درون‌شیشه‌ای قره‌قاط و همچنین بررسی تأثیر شرایط کشت درون‌شیشه‌ای بر سطوح متابولیت‌های ثانویه بود. با بررسی نتایج محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم برلیتر IBA به‌همراه غلظت‌های مختلف زآتین و BAP تأثیر معنی‌داری بر رشد ریز نمونه‌ها داشتند.

REFERENCES

1. Akhondzadeh, Sh. (2000). *Encyclopedia of Medicinal Plants of Iran*. Arjmandi Publishing, 144 p. (in Farsi)
2. Al-Farsi, M., Alsalvar, C., Morris, A., Baron, M. & Shadih, F. (2005). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19) 7592-7599.
3. Alfermann, A.W. & Petersen, M. (1995). Natural products formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Orgaince Culture*, 43, 199-205.
4. Anderson, W.C. (1980). Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Horticulturae*, 112, 13-20.
5. Bohn, H. & Rink, E. (1988). Betalains. In: F. Constabel & I.K. Vasil (Editors). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. New York, Academic Press, 5, 449-463.
6. Castilho, P., Liu, K., Rodrigues, A., Feio, S., Tomi, F. & Casanova, J. (2006). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio from Madeira. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 139-144.
7. Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.
8. Cüce, M., Bektaş, E. & Sökmen, A. (2013). Micropropagation of *Vaccinium arctostaphylos* L. via lateral-bud culture. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(1), 40-44
9. Daryani, P., Zare, N., Chamani. E., Sheikhzadeh Mossadeg, P. & Javadi mojaddad, D. (2016). Eevaluation of the effects of different basal medium and plant growth regulators on *in vitro* growth of hazelnut. *Journal of Horticultural Science*, 30, 417-422. (in Farsi)
10. Debnath, S. C. & McRae, K. B. (2002). An efficient adventitious shoot regeneration system on excised leaves of micropropagated lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77, 744-752.
11. Debnath, S. C. (2002). *In vitro* culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): The influence of cytokinins and media types on propagation. *Small Fruits Review*, 1, 3-19.

12. Debnath, S. C. (2005). Micropropagation of lingonberry: Influence of genotype, explant orientation and overcoming TDZ-induced inhibition of shoot elongation using zeatin. *Horticultural Science*, 40, 185-188.
13. Farsi, M. (2006). *Principles of Plant Breeding*. Mashhad University Press. (pp. 234-239). (in Farsi)
14. George, E. F., Micheal, A. H. & Greet-Jan, D. K. (2008). The components of plant tissue culture media I, macro and micro nutrients. In: George, E.F., Micheal, A.H. & Greet-Jan, D.K. (Eds), *Plant Propagation by Tissue Culture*. V.1, *The Background*. (pp. 65-113) Springer.
15. Hazrati Jahan, R., Zare, N., Dezhsetan, S. & Sheikhzadeh Mosaddegh, P. (2017). Enhanced Taxol production in cell suspension cultures of hazelnut (*Corylus avellana* L.) by combination of elicitor and precursor. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33, 73-89. (in Farsi)
16. Ivanova, M. & Van Staden, J. (2009). Nitrogen source, concentration, and NH_4^+: NO_3^- ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(2), 167-174.
17. Kazeroonian, R., Kalatejari, S., Mousavi, A. & Tohidfar, M. (2017). Reaction of various explants of a *Chrysanthemum morifolium* cultivar to plant growth regulators *in vitro*. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48(3), 527-534.
18. Kumar, J. & Gupta, P.K. (2008). Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports*, 2(2), 93-112.
19. Lenee, P. & Chupeau, Y. (1989). Development of nitrogen assimilating enzymes during growth of cells derived from protoplasts of sunflower and tobacco. *Plant Science*, 59, 109-117.
20. Lloyd, G. & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. In: Combined Proceedings of. *International Plant Propagators. Society USA*, 30, 421-427.
21. Machakova, I., Zazimalova, E. & George, E. F. (2008). Plant growth regulators. I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In: George, E.F., Micheal, A.H. & Greet-Jan, D.K. (Eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*. V.1, *the Background*, (pp. 175-204). Springer.
22. May, P. & Cellier, K. M. (1973). The fruitfulness of grape buds. II. The variability in bud fruitfulness in ten cultivars over four seasons. *Annals Amelior Plant*, 23, 13-26.
23. Meiners, J., Schwab, M. & Szankowski, I. (2007). Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89, 169-176.
24. Meyer H. J. & Van Staden J. (1995). The in vitro production of an anthocyanin from callus culture of *Oxalis linearis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40, 55-58.
25. Mok, M. C., Gabelman, W. H. & Skoog, F. (1976). Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 10, 9-42.
26. Mulabagal, V. & Tsay, H. S. (2004). Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering Research*, 2(1), 29-48.
27. Murashige, T. & Skoog, F. (1977). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
28. Mustafa, C., Ersan, B. & Atalay, S. (2013). Micropropagation of *Vaccinium arctostaphylos* L. via lateral- bud culture. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 40-44.
29. Nourafcan, H. & Ansari, F. (2017). The effect of MS and B5 media on growth indices of lemon 'Verbena' in *in vitro* condition. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48(1), 249-252.
30. Okamoto, G., Tada, H., Suyama, A., Hayashi, Y. & Hirano, K. (2001). Effect of shoot vigor on the development of transmitting tissue and pollen tube growth in pistils of tetraploid grape, cv. Pione. *Vitis*, 40(3), 105-110.
31. Ostrolucka, M. G., Libiakova, G., Ondruskova, E. & Gajdosova, A. (2004). *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitias Latviensis Biology*, 676, 207-212.
32. Paprstein, F. & Sedlak, J. (2015). *In vitro* multiplication of lingonberry. *Horticultural Science*, 42 (2), 102-106.
33. Pezzuto, J. M. (1995). Natural product cancer chemoprotective agents In: Arnason, J.T., Mata, R. & Romeo, J. T. (Eds). *Recent Advances in Phytochemistry*. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. New York. Plenum Press, pp. 19-45.
34. Radman, R., Saez, T., Bucke, C. & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plant and microbial systems. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 37, 91-102.
35. Rajendran, L., Ravishankar, G. A., Venkataraman, L. V. & Prathiba, K. R. (1992). Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. as influenced by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnology Letters*, 14, 707-712.
36. Ramachandra, S. & Ravishankar, G. A. (2002). Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20,101-153.

37. Ramage, C. M. & Williams, R. R. (2001). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro*. *Cellular & Developmental Biology Plant*, 38, 116-124.
38. Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusido, R. M. & Palazon, J. (2016) Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2),182
39. Sabeti, H. (1994). *Forests, Trees and Shrubs of Iran*. Yazd University, Second Edition. (in Farsi)
40. Sae-Lee, N., Kerdchoechuen, O. & Laohakunjit, N. (2014). Enhancement of phenolics, resveratrol and antioxidant activity by nitrogen enrichment in cell suspension culture of *Vitis vinifera*. *Molecules*, 19, 7901-7912.
41. Sato, F., Hashimoto, T. & Hachiya, A. (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, 98(1), 367-372.
42. Seitz, H. U. & Hinderer, W. (1988). Anthocyanins. In: Constabel, F. & Vasil, I. (Eds). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol 5. *Phytochemicals in Plant Cell Cultures*. Academic Press, San Diego, (pp. 49-76) Springer.
43. Siddiqui, Z. H., Mujib, A., Aslam, J. & Hakeem, K. R. (2013). *In vitro* production of secondary metabolites using elicitor in *Catharanthus roseus*: A case study. In: Hakeem, K.R., Ahmad, P. & Ozturk, M. (Eds). *Crop Improvement, New Approaches and Modern Techniques*. (pp. 401–419). Springer Science, Berlin, Germany.
44. Stals, H. & Inze, D. (2001). When plant cells decide to divide. *Trends in Plant Science*, 8, 359-364.
45. Taiz, E. & Zeiger, L. (2003). *Plant Physiology*. (3rd ed.). Sinauer Associates Publisher, 690p.
46. Tripathi, L. & Tripathi, J. N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2), 243-253.
47. Wada, S., Niedz, R. P. & Reed, B. M. (2015). Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51, 19-27.
48. Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64, 88-93.
49. Wang, G. Y., Yuan, M. F. & Hong, Y. (2002). *In vitro* flower induction in roses. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38, 513-518.