

Optimizing the *in vitro* Culture for Callus Induction of Iranian St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)

M. Abdollahpoor¹, M. Azizi^{2*}, S. Kalantari¹, Y. A. Saadat³

1- Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

2- Department of Horticulture Science and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Fars, Iran

(*- Corresponding author's Email: azizi@um.ac.ir)

Received: 06 March 2017

Revised: 09 March 2021

Accepted: 05 April 2021

Available Online: 05 April 2021

How to cite this article:

Abdollahpoor, M., Azizi, M., Kalantari, S., & Saadat, Y. A. (2026). Optimizing the *in vitro* culture for callus induction of Iranian St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Journal of Horticultural Science*, 40(1), 19-30. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/jhs.2021.59629.0>

Introduction

Hypericum perforatum L. is an important medicinal plant that used for depression treatment. *In vitro* regeneration has been successfully achieved for many *Hypericum* species from a range of explants sources with different growth regulators. Recent studies have demonstrated that *in vitro* culture is an option for multiplication of different *Hypericum* species. With consideration this notice that tissue culture can provide an affordable alternative method for propagation with high speed to production of intensive plant material as well as suitable materials for breeding programs of *H. perforatum*, the objective of this study was to investigate the effects of explant types (leaf and stem), plant growth regulators (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Naphthalene Acetic Acid (NAA), Benzyl Adenine (BA) and Kinetin (Kin)), light (dark and weak light), media culture (MS medium and MS medium with B5 vitamins) and poly vinyl pyrrolidone (PVP) on callus induction in *H. perforatum* at *in vitro* culture condition.

Materials and Methods

For preparation of sterile plantlets, the seeds of Iranian *H. perforatum* (Azadshahr population) were cultured in 1.2 MS growth regulator free-media. For investigation the callus induction of Iranian *H. perforatum* the leaf and stem explants of *in vitro* obtained plantlets were used. Explants were cultured in different concentrations of 2,4-D (0.2, 0.5 and 1 mg.l⁻¹) with two kinds of cytokines BA and Kin (0.2, 0.5 and 1 mg.l⁻¹) as well as 1 mg.l⁻¹ NAA. For browning control of calli the effects of light (dark and weak light), media culture (MS medium and MS medium with B5 vitamins) and four concentrations of poly vinyl pyrrolidone (0, 50, 100 and 200 mg.l⁻¹) were also surveyed.

Results and Discussion

Callus cultures could be used for cell suspension initiation, studying of their morphogenetic potential and screening of secondary metabolite profile. In present study the response of two *H. perforatum* explants (leaf and stem) to different levels and combinations of auxins and cytokinins were tested. The callus induction in both studied explants (leaf and stem) was just observed in supplemented media with plant growth regulators. The calli of leaf explants were showed better growth in dark and the highest callus fresh weight was obtained in 0.25 mg.l⁻¹



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

<https://doi.org/10.22067/jhs.2021.59629.0>

¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ Kin and 0.5 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ BA. of the various concentrations and combination of growth regulators, the minimum response about callus induction was observed in the presence of 1 mg.l⁻¹ 2,4-D in combination with 1 mg.l⁻¹ NAA. The obtained calli got browning shortly after induction. The investigation of light effect on callus quantity and quality showed that not only light did not affect the callus induction and callus browning but also reduced the callus growth. The highest callus fresh weight was obtained in 100 mg.l⁻¹ poly vinyl pyrrolidone in leaf explant. Few species within the genus *Hypericum* have been used to produce callus. In *H. perforatum* seedling, different explants such as shoot apical meristem, stem segments and leaves were used for callus induction. In *H. erectum* callus induction was obtained by culturing seedlings in the presence of Indole Acetic Acid (IAA) and BA under darkness. The combination of cytokinins and auxins did not support callus growth of *H. brasiliense* and callus of nodal explants was only obtained in the presence of 2,4-D or NAA using either MS or B5 medium. These differences among literatures can be due to different cultivars, culture conditions, explant type and medium composition.

Conclusion

The plant growth regulators is necessary for callus induction in Iranian *H. perforatum* and leaf is suitable for this purpose. The light intensity and poly vinyl pyrrolidone did not control the browning of *H. perforatum* calli.

Keywords: Browning, Media culture, Medicinal plant, Plant growth regulators, Poly vinyl pyrrolidone

بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای برای کالوس‌زایی گیاه گل راعی

(Hypericum perforatum L.) بومی ایرانمنیژه عبدالله پور^۱ - مجید عزیزی^{۲*} - سیامک کلانتری^۳ - یوسف علی سعادت^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۶

چکیده

گل راعی (*Hypericum perforatum L.*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد که در درمان افسردگی به کار برده می‌شود. این تحقیق با هدف بهینه‌سازی کالوس‌زایی گیاه گل راعی در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام گردید. به منظور مطالعه و بررسی وضعیت کالوس‌زایی گیاه گل راعی بومی ایران (توده آزاد شهر) از ریزنمونه‌های برگ و ساقه حاصل از شاخساره‌های درون شیشه‌ای این گیاه استفاده شد. ریزنمونه‌ها در غلظت‌های مختلف 2,4-D (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ میلی گرم در لیتر) همراه با دو نوع سیتوکینین بنزیل آمینو پورین (BA) و کینیتین (Kin) (۰/۲، ۰/۵، ۱ میلی گرم در لیتر) و نیز غلظت یک میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) کشت شدند. کالوس‌ها در ریزنمونه برگ در شرایط تاریکی رشد بیشتری داشته و بیشترین وزن تر کالوس (۲/۳۰ گرم) در تیمارهای ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D + یک میلی گرم در لیتر کینیتین و ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D + یک میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین به دست آمد. کالوس‌های به دست آمده پس از مدت کوتاهی قهوه‌ای شدند. به منظور کنترل قهوه‌ای شدن کالوس‌ها، اثر نور (تاریکی و روشنایی ضعیف)، محیط کشت (محیط کشت MS و محیط کشت MS با ویتامین‌های محیط B5) و چهار غلظت پلی‌ونیل پیرولیدین (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. روشنایی اثری بر کالوس‌زایی و قهوه‌ای شدن کالوس‌ها نداشت، ولی موجب کاهش رشد آن‌ها گردید. استفاده از پلی‌ونیل پیرولیدین منجر به کنترل قهوه‌ای شدن کالوس‌ها نشد، اگرچه رشد کالوس‌ها را بهبود بخشید و بیشترین وزن تر کالوس (۴/۱۰ گرم) در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پلی‌ونیل پیرولیدین و در ریزنمونه برگ به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: پلی وینیل پیرولیدون، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، قهوه‌ای شدن، گیاه دارویی، محیط کشت

مقدمه

کنترل تولید هزاران متابولیت ثانویه مفید ایجاد کرده است و از این طریق می‌توان ترکیبات دارویی خاص را با سرعتی مشابه یا بالاتر از گیاه سالم تولید نمود (Azizi et al., 2002). افزون بر این استفاده از این تکنیک، امکان دست‌ورزی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و افزایش کارایی تکثیر ریزنمونه‌ها را در مقایسه با گیاهان کامل ممکن می‌سازد (Kirakosyan et al., 2004). ایران با وسعت زیاد و آب‌وهوای متنوع جزء مراکز مهم انتشار گونه‌های مختلف دارویی می‌باشد که در حال حاضر به علت برداشت نادرست و بی‌رویه، بسیاری از آن‌ها در خطر انقراض قرار گرفته‌اند، بنابراین شناسایی و حفاظت از این منابع ژنتیکی امری ضروری است. استفاده از تکنیک‌های کشت بافت می‌تواند در زمینه حفظ و تولید گیاهان دارویی و مواد مؤثره آن مفید واقع گردد.

گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum L.* از جمله گیاهان دارویی ارزشمند و مهم خانواده Hypericaceae می‌باشد.

روند روبه‌رشد مصرف گیاهان دارویی بدون توسعه روش‌های مناسب کاشت، مدیریت و برنامه‌ریزی صحیح، پیامد تخریب طبیعت را در بر خواهد داشت. کشت بافت یکی از بخش‌های مهم بیوتکنولوژی است که کاربردهای مختلف آن در زمینه گیاهان دارویی از جنبه‌های مختلفی قابل بررسی است. کشت بافت گیاهی، نقطه عطفی را برای

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- مرکز تحقیقات آموزش علوم کشاورزی و منابع طبیعی، استان فارس، ایران

(*)- نویسنده مسئول: (Email: azizi@um.ac.ir)

<https://doi.org/10.22067/jhs.2021.59629.0>

راعی بومی ایران انجام گرفت. افزون بر این اثر نور، محیط کشت و ترکیب پلی وینیل پیرولیدین (PVP)^۵ برای افزایش کیفیت کالوس‌های تولیدشده بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

اثر ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی

به منظور مطالعه و بررسی وضعیت کالوس‌زایی در گیاه گل راعی بومی ایران (توده آزاد شهر) از ریزنمونه‌های برگ و ساقه حاصل از شاخساره‌های درون شیشه‌ای تولیدشده این گیاه در محیط کشت MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک استیک اسید (IBA)^۶ استفاده گردید. برگ‌ها به‌طور کامل و قطعات ساقه‌ها به طول ۱-۱/۵ سانتی‌متر دارای ۳-۱ گره در محیط کشت MS دارای ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و غلظت‌های مختلف 2,4-D (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) همراه با دو نوع سیتوکینین BA و Kin (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و نیز غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA کشت گردید. شاهد فاقد تنظیم‌کننده رشد بود. نمونه‌های کشت‌شده به اتاقک رشد با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی منتقل شدند. pH محیط‌های کشت قبل از اتوکلاو، روی 5.7 ± 0.1 تنظیم گردید و ضدعفونی محیط‌های کشت توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱/۵ کیلوگرم در مترمربع به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. بازکشت ریزنمونه‌ها در فواصل زمانی هر ۲۰ روز انجام شده و هشت هفته پس از کشت تعداد روز تا کالوس‌زایی، درصد کالوس‌زایی، حجم و وزن تر کالوس بررسی شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و چهار ریزنمونه انجام شد.

از آنجایی که کالوس‌های تولیدشده در این آزمایش پس از مدتی قهوه‌ای شدند، دو احتمال برای آن در نظر گرفته شد: ۱- قهوه‌ای شدن کالوس‌ها ناشی از محیط کشت و یا شرایط نوری باشد، ۲- کالوس و اندام‌های گل راعی سرشار از ترکیبات فنلی می‌باشند و مواد فنلی در معرض هوا اکسیده شده و باعث ایجاد رنگ قهوه‌ای در اندام‌های گیاه می‌شود. بنابراین آزمایش‌های تکمیلی برای کنترل قهوه‌ای شدن و بهبود کیفیت و رشد در کالوس‌ها به‌شرح زیر انجام گرفت.

اثر نور و محیط کشت بر کالوس‌زایی

برای بررسی اثر شرایط نوری (روشنایی و تاریکی) و محیط کشت بر کالوس‌زایی گل راعی، با توجه به نتایج آزمایش قبلی، تیمارهای

جنس گل راعی بیش از ۴۶۹ گونه در جهان دارد که ۱۹ گونه آن تاکنون در ایران گزارش شده است (Azadi, 1999; Crockett, 2010). گیاه گل راعی دارای متابولیت ثانویه مهمی از جمله نفتودیانترون‌ها (هیپرسیپین و سودوهیپرسیپین)، آسیل فلورو گلوکسینول‌ها (هیپرفورین و آدهیپرفورین)، زانتون‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد (Radusienea et al., 2005). به دلیل پتانسیل بالای این گیاه در درمان برخی از بیماری‌های مهم به‌ویژه افسردگی، اکنون تقاضا برای ترکیبات حاصل از این گیاه در حال افزایش است (Kirakosyan et al., 2008). القای کالوس می‌تواند برای بیوسنتز تولیدات طبیعی این گیاه مانند هیپرسیپین مفید باشد و از این طریق امکان تولید متابولیت‌های ثانوی گیاه گل راعی در سطح وسیع فراهم می‌گردد (Bais et al., 2002).

پاسخ‌های مورفوزنتیک کشت بافت گل راعی وابسته به نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و شرایط نوری دارد. برای تولید کالوس در گل راعی از ریزنمونه‌های مختلف مانند برگ، ساقه، هیپوکوتیل و قطعات گره به‌طور معمول در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) استفاده شده است. ترکیب اکسین و سیتوکینین برای القای کالوس در گل راعی مفید می‌باشد (Dias et al., 1998). توسی و همکاران (Tocci et al., 2010) از تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D^۱، کینیتین (Kin)^۲ و نفتالین استیک اسید (NAA)^۳ برای القای کالوس‌زایی در گل راعی استفاده کرده‌اند. پرتو و سانتارم (Pretto & Santarem, 2000) کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ گل راعی را در محیط کشت MS حاوی 2,4-D به همراه بنزیل آمینو پورین (BA)^۴ یا Kin در هر دو شرایط روشنایی و تاریکی گزارش نموده‌اند. قاضیان تفریشی و عزیز (Ghazian et al., 2006) کالوس‌زایی و شاخه‌زایی گل راعی بومی ایران توده اردبیل را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که بیشترین مقدار کالوس از نظر وزن در محیط کشت دارای یک میلی‌گرم در لیتر Kin به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به دست آمد. کشت ریزنمونه برگ‌گی حاصل از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای توده آذربایجان در محیط‌های کشت دارای ترکیبی از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها و در شرایط تاریکی، پس از حدود ۱۴ روز منجر به تشکیل کالوس‌های به رنگ زرد و با نواحی متراکم قرمز رنگ شد (Farsad Akhtar et al., 2013).

این مطالعه با هدف بهینه‌سازی محیط کشت از نظر نوع و مقدار استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای کالوس‌زایی گیاه گل

- 1- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
- 2- Kinetin
- 3- Naphthaleneacetic acid (NAA)
- 4- Benzylaminopurine (BA)

5- Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP)

6- Indolebutyric acid (IBA)

در این مطالعه برای تولید کالوس از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل 2,4-D، BA، Kin و NAA در سطوح مختلف استفاده شد و اثر آن‌ها بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ و ساقه گیاهچه‌های درون شیشه‌ای گل راعی در شرایط تاریکی بررسی شد. براساس نتایج تجزیه واریانس، زمان آغاز کالوس‌زایی، درصد کالوس‌زایی، وزن و حجم کالوس‌ها در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه قرار گرفتند. القای کالوس در تمام تیمارهای هورمونی مورد مطالعه به‌جز شاهد بعد از ۱۰ تا ۱۷ روز مشاهده شد. در این آزمایش، بین ریزنمونه‌های برگ و ساقه در سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد از نظر القای کالوس تفاوت چندانی مشاهده نشد، ولی رشد کالوس در ریزنمونه برگ نسبت به ساقه از نظر وزن و حجم بهتر بود (جدول ۱). پاسخ متفاوت ریزنمونه به تولید کالوس در سایر گیاهان نیز گزارش شده است (Kalidass et al., 2010).

نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد برای کالوس‌زایی گیاه گل راعی ضروری می‌باشد و اکسین 2,4-D در ترکیب با سیتوکینین BA و Kin بر کالوس‌زایی تأثیر مثبت دارد و زمانی که مقدار 2,4-D کمتر یا مساوی با این سیتوکینین‌ها باشد، اثر بهتری بر رشد کالوس‌ها می‌گذارد، چرا که 2,4-D در غلظت‌های نسبتاً بالا هم به‌عنوان محرک و هم بازدارنده تقسیم سلولی عمل می‌کند و سلول‌ها با غلظت بالای 2,4-D به مرحله رکود می‌روند که سبب عدم رشد کالوس می‌گردد (Feher, 2001). این نتایج مشابه با گزارش‌های قبلی در خصوص کالوس‌زایی گل راعی با استفاده از ترکیبات مختلف اکسین و سیتوکینین است (Pretto & Santarem, 2000).

وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه برگ و ساقه در تیمارهای هورمونی مختلف تفاوت معنی‌داری داشت و بیشترین وزن تر و حجم کالوس در ریزنمونه برگ و در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و نیز در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌دست آمد که به‌ترتیب ۲/۳۰، ۲/۰۹ گرم و ۱/۴۳ و ۱/۱ سانتی‌مترمکعب بود. کمترین وزن تر کالوس در ریزنمونه برگ و ساقه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. پرتو و سانتارم (Pretto & Santarem, 2000) نیز گزارش کرده‌اند که رشد کالوس در گل راعی به‌شدت به‌وسیله تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف تحت تأثیر قرار می‌گیرد و 2,4-D به‌تنهایی نتیجه مثبتی بر تولید کالوس ندارد و باعث نکروزه شدن نمونه‌ها بعد از سه هفته می‌شود. قاضیان و همکاران (Ghazian Tafreshi et al., 2006) در مطالعه روی گل راعی بومی ایران توده اردبیل نیز بیان کردند که با افزایش مقدار NAA، تولید

مناسب از تنظیم‌کننده‌های رشد برای القای کالوس‌زایی انتخاب شدند که در این آزمایش برای ریزنمونه‌های برگ تیمارهای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و برای ریزنمونه‌های ساقه تیمارهای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + یک میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA انتخاب گردید. از محیط کشت MS با ترکیب ویتامین‌های توصیف‌شده توسط موراشیک و اسکوگ (Murashige & Skoog, 1962) و محیط کشت MS ویتامین‌های محیط B5 (Gamborg et al., 1968) استفاده گردید. ریزنمونه‌های کشت‌شده به اتاقک رشد با شرایط تاریکی و روشنایی ضعیف (دارای یک لامپ مهتابی سفید) منتقل شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و پنج ریزنمونه انجام شد. بازکشت ریزنمونه‌ها در فواصل زمانی هر ۱۵ روز انجام گردید و ۱۲ هفته پس شروع کشت تعداد روز تا القای کالوس، درصد کالوس‌زایی و حجم و وزن تر کالوس اندازه‌گیری شد.

اثر پلی‌ونیل‌پیرولیدین بر کالوس‌زایی

پلی‌ونیل‌پیرولیدین یک ترکیب جاذب پلی‌فنل‌ها می‌باشد که به‌طور معمول برای جذب مواد فنلی استفاده می‌گردد (Pick Kiong et al., 2008). برای کنترل قهوه‌ای شدن در کشت کالوس‌هایی گل راعی، در این آزمایش از چهار غلظت PVP (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیزشده استفاده شد و اثر آن در دو سطح هورمونی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با یک میلی‌گرم در لیتر Kin و یا یک میلی‌گرم در لیتر BA با استفاده از دو ریزنمونه برگ و ساقه بررسی شد. این آزمایش به‌صورت طرح فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و پنج ریزنمونه انجام گردید. بازکشت ریزنمونه‌ها در فواصل زمانی هر ۲۰ روز انجام گردید و هشت هفته پس شروع کشت، تعداد روز تا القای کالوس، درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصل از آزمایش به وسیله نرم افزار SAS 9.3 تجزیه و تحلیل آماری شدند و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه-ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

اثر ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی گل راعی بومی ایران

کالوس کاهش پیدا می‌کند. کبیر و اسچالر (Kieber & Schaller, 2014) گزارش کردند که سیتوکینین خارجی، متابولیسم اکسین داخلی را به وسیله کاهش فعالیت آنزیم ایندول استیک اسید-اکسیداز تغییر می‌دهد و سطوح بالای ایندول استیک اسید، رشد سلول را با افزایش ساخت RNA و متعاقب آن سنتز پروتئین‌ها القاء می‌کند که منجر به تکثیر سلول‌های کالوس می‌شود. در گونه‌های مختلف جنس

Hypericum برای تولید کالوس، نتایج متفاوتی نسبت به *H. perforatum* گزارش شده‌است، از جمله در *H. brasiliense* استفاده از قطعات گره‌ای در محیط کشت دارای ترکیب اکسین و سیتوکینین منجر به رشد کالوس‌ها نشده و رشد کالوس تنها در حضور 2,4-D و NAA در روی محیط کشت MS یا B5 و تحت فتوپریود ۱۶ ساعت به دست آمده است (Cardoso & de Oliveira, 1996).

جدول ۱- اثر متقابل نوع ریزنمونه × تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی گل راعی بومی ایران

Table 1- The interaction effects of explant type × plant growth regulators on the callus induction of Iranian *H. perforatum*

تنظیم‌کننده‌های رشد Plant growth regulator (mg.l ⁻¹)	ریزنمونه Explant type	تعداد روز تا کالوس‌زایی Days to callus induction	درصد کالوس‌زایی Callus induction (%)	وزن کالوس Callus weight (g)	حجم کالوس Callus volume (cm ³)
0.5 2,4-D + 0.5 Kin	ساقه Stem	10 c*	100 a	0.83 g	0.40 ef
	برگ Leaf	10 c	100 a	1.13 ed	0.90 c
0.25 2,4-D + 1 Kin	ساقه Stem	10 c	93.75 a	1.14 ed	0.99 cb
	برگ Leaf	10 c	100 a	2.30 a	1.43 a
1 2,4-D + 0.2 Kin + 0.1 NAA	ساقه Stem	10 c	100 a	0.70 h	0.34 f
	برگ Leaf	10 c	100 a	1.15 ed	0.65 d
0.5 2,4-D + 0.5 BA	ساقه Stem	10 c	100 a	0.82 g	0.83 c
	برگ Leaf	17 a	100 a	2.09 b	1.10 b
0.25 2,4-D + 1 BA	ساقه Stem	10 c	100 a	1.38 c	0.99 cb
	برگ Leaf	10 c	100 a	1.22 d	0.59 d
1 2,4-D + 0.2 BA + 0.1 NAA	ساقه Stem	10 c	100 a	1.05 ef	0.53 ed
	برگ Leaf	14 b	100 a	0.96 f	0.33 f
1 2,4-D + 1 NAA	ساقه Stem	14 b	12.5 b	0.08 i	0
	برگ Leaf	7 d	18.7 b	0.02 i	0

* وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس آزمون دانکن چنددامنه‌ای در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

* Values followed by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

کالوس‌های تولیدشده در این مطالعه کرم‌رنگ بوده و حالت فشرده داشتند (شکل ۱-A و ۱-B) و نقاط قرمز که در مطالعات قبلی در کالوس‌زایی گل راعی گزارش شده بود (Bais et al., 2002) در این کالوس‌ها مشاهده نشد. کالوس‌های تولیدشده پس از ۱۰ تا ۲۰ روز شروع به قهوه‌ای شدن گردید (شکل ۱-C). براساس گزارش نو

در *H. erectum* القای کالوس در کشت دانه‌ها در حضور ایندول استیک اسید (IAA) و BA در شرایط تاریکی گزارش شده است (Yazaki & Okuda, 1990).

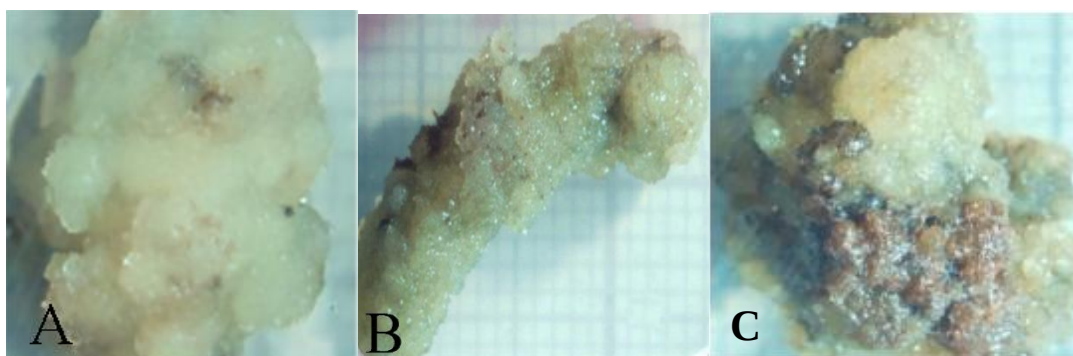
1- Indole-3-acetic acid (IAA)

بررسی اثر نور و محیط کشت به‌منظور بهبود کیفیت کالوس گل‌راعی و کنترل قهوه‌ای شدن آن انجام گرفت. براساس نتایج آزمایش قبل، بهترین تیمارها از تنظیم‌کننده‌های رشد برای القای کالوس در ریزنمونه‌های برگ و ساقه انتخاب شدند (جدول ۲) و اثر روشنایی، تاریکی و دو نوع محیط کشت MS و محیط کشت MS همراه با ویتامین‌های محیط کشت B5 روی کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

و همکاران (No et al., 2005) محتوای هیپریسین در کالوس‌های قهوه‌ای‌شده گل‌راعی ۷/۵ تا ۹ برابر بیشتر از کالوس‌هایی است که رشد بهتری دارند.

اثر نور و محیط کشت بر کالوس‌زایی گل‌راعی بومی ایران

در آزمایش اول، کالوس‌های تولیدشده گل‌راعی در تمام سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد و هر دو ریزنمونه با گذشت زمان به‌تدریج قهوه‌ای شدند (شکل ۱- C)، در این راستا، آزمایش دیگری برای



شکل ۱- کالوس حاصل از ریزنمونه برگ گل‌راعی بومی ایران در محیط کشت MS دارای ۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin (A)، کالوس حاصل از ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS دارای ۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر BA (B)، قهوه‌ای شدن کالوس (C)

Figure 1- derived callus from leaf explant of Iranian *H. perforatum* in supplemented MS media with 0.25 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ Kin (A), derived callus from stem explant in MS media supplemented with 0.25 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ BA(B), browning callus (C)

ریزنمونه‌هایی که نقاط قرمز روشن بیشتری داشتند، بعد از مدت تقریباً یک هفته، از محل این نقاط شروع به قهوه‌ای شدن کرده و رشد چندان نکردند. این نقاط قرمز رنگ معمولاً به وجود هیپریسین یا آنتوسیانین نسبت داده می‌شود. مولیناسی و همکاران (Mulinacci et al., 2008) با آنالیز HPLC به این نتیجه رسیدند که هیپریسین فقط در نقاط سیاه رنگی وجود دارد که بر روی کالوس‌هایی که روی آن جوانه اولیه تولید شده تشکیل می‌شود و تنها ترکیباتی که در کالوس کاملاً تمایز نیافته گل‌راعی وجود دارد، زانتون‌ها می‌باشند. همچنین آن‌ها بیان کردند که در کالوس تمایز نیافته گل‌راعی و نیز در شاخه‌های حاصل از این کالوس‌ها، آنتوسیانین وجود دارد که به‌شکل نقاط قرمز روشن مشاهده می‌شود و گاه با هیپریسین اشتباه گرفته می‌شود، ولی بون و همکاران (Bohn et al., 1996) در بررسی وضعیت کالوس-زایی هفت گونه جنس *Hypericum* با استفاده از ریزنمونه بذر، رنگ قرمز کالوس‌های حاصل را به هیپریسین نسبت دادند. القای کالوس در هر دو ریزنمونه در دو محیط کشت MS و محیط کشت MS دارای ویتامین‌های B5 تفاوت معنی‌داری نداشتند.

براساس نتایج به‌دست‌آمده، بین القای کالوس در ریزنمونه‌های برگ و ساقه تفاوت معنی‌داری بین شرایط روشنایی و تاریکی وجود نداشت. ولی از نظر زمان القای کالوس‌زایی و وزن کالوس در ریزنمونه برگ و ساقه بین تیمارها در شرایط روشنایی و تاریکی تفاوت معنی‌دار مشاهده شد و القای کالوس در هر دو ریزنمونه در زمان کمتری در تاریکی صورت گرفته و همچنین کالوس‌ها رشد بهتری در تاریکی داشتند (جدول ۲ و ۳). وجود نور در شرایط درون شیشه‌ای، فعالیت آنزیم ایندول استیک اسید-اکسیداز را افزایش می‌دهد که سبب تغییر تعادل اکسین/سیتوکینین درونی شده و در نتیجه رشد کالوس کاهش پیدا می‌کند (Kieber & Schaller, 2014).

کالوس‌های تولیدشده در شرایط تاریکی کرم‌رنگ بود و حالت فشرده داشتند (شکل ۱)، ولی کالوس‌های تولیدشده در شرایط روشنایی در هر دو ریزنمونه برگ و ساقه سبزرنگ بوده و حالت فشرده داشتند (شکل ۲-A و ۲-B). در مرحله القای کالوس در شرایط روشنایی، نقاط قرمز شفاف روی کالوس‌ها مشاهده شد که در تیمارهای تاریکی چنین نقاطی دیده نمی‌شد (شکل ۲-C و ۲-D).

(۱۵ روز در مقایسه با ۲۰ روز در آزمایش اول) نیز بر کنترل قهوه‌ای شدن کالوس‌ها اثری نداشت.

اثر PVP بر کالوس‌زایی گل راعی بومی ایران

برای کنترل قهوه‌ای شدن کالوس، از چهار غلظت مختلف پلی‌وینیل پیرولیدون به همراه ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کازئین هیدرولیز شده استفاده شد. PVP برای جذب ترکیبات فنلی استفاده می‌شود و باند-های هیدروژنی آن، این ترکیبات را جذب می‌کند (Pick Kiong et al., 2008). بنابراین این ترکیب برای جلوگیری از نکروزه شدن کالوس به محیط کشت اضافه می‌شود و کازئین هیدرولیز شده نیز یک منبع غنی از آمینو اسیدها می‌باشد که در بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز پلی‌فنل‌ها نقش دارد (Talapatra & Raychaudhuri, 2012).

رشد کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ و ساقه در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت MS با ویتامین B5 بهتر بود و وزن تر کالوس‌های حاصل از دو محیط تفاوت معنی‌داری نشان دادند. کالوس‌های تشکیل شده از هر دو ریزنمونه برگ و ساقه در محیط کشت MS و در شرایط تاریکی رشد بهتری داشتند. بیشترین وزن تر کالوس در ریزنمونه برگ (۳/۲ گرم) در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA و در ریزنمونه ساقه (۳/۲۹ گرم) در محیط کشت دارای ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی گرم در لیتر BA حاصل شد (جدول ۲ و ۳).

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که شرایط تاریکی نسبت به روشنایی ضعیف برای رشد کالوس‌ها در گل راعی بومی ایران بهتر است، اگرچه این شرایط تأثیری بر قهوه‌ای شدن کالوس‌ها نداشت. همچنین دو نوع محیط کشت به‌کاررفته و باز کشت در فاصله زمانی کوتاه‌تر

جدول ۲- اثر متقابل نور × محیط کشت بر کالوس‌زایی ریزنمونه برگ گل راعی بومی ایران

Table 2- The interaction effect of light and media culture on the callus induction of leaf explant in Iranian *H. perforatum*

محیط کشت Media	تنظیم‌کننده‌های رشد Growth regulators (mg.l ⁻¹)	نور Light	تعداد روز تا کالوس‌زایی Days to callus induction (day)	کالوس‌زایی Callus induction (%)	وزن کالوس Callus weight (g)
MS	0.25 2,4-D + 1 Kin	نور Light	17 a*	85 b	0.005 h
		تاریکی Dark	14 cb	100 a	2.23 c
MS	0.5 2,4-D + 0.5 BA	نور Light	14 cb	95 a	1.93 d
		تاریکی Dark	14 cb	100 a	3.2 a
MS	1 2,4-D + 0.2 Kin + 0.1 NAA	نور Light	14.25 b	95 a	0.005 h
		تاریکی Dark	13.75 cb	95 a	1.73 f
MSB5	0.25 2,4-D + 1 Kin	نور Light	17 a	100 a	0.008 h
		تاریکی Dark	12.25 d	100 a	1.99 d
MSB5	0.5 2,4-D + 0.5 BA	نور Light	17 a	95 a	0.25 g
		تاریکی Dark	13.5 bcd	95 a	2.64 b
MSB5	1 2,4-D + 0.2 Kin + 0.1 NAA	نور Light	14 bc	100 a	0.001 h
		تاریکی Dark	12.5 cd	95 a	1.36 e

* حروف غیرمشابه در هرستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

* Values followed by different letters are significantly different based on Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

اثری در کنترل قهوه‌ای شدن کالوس‌ها نداشت که بیانگر آن است که قهوه‌ای شدن کالوس‌ها احتمالاً ناشی از اکسیداسیون ترکیبات فنلی نمی‌باشد، چرا که استفاده از PVP نتوانست از این اکسیداسیون جلوگیری کند.

القای کالوس در تمام تیمارها و ریزنمونه‌های مورد استفاده ۱۰ تا ۱۴ روز پس از کشت صورت گرفت و تفاوتی در القای کالوس در غلظت‌های مختلف PVP وجود نداشت. کالوس‌های تولیدشده سبز تا سبز کم‌رنگ و حالت فشرده داشتند (شکل ۳). نتایج آزمایش نشان داد که PVP باعث بهبود رشد کالوس در ریزنمونه برگ و ساقه شده، ولی

جدول ۳- اثر متقابل نور × محیط کشت بر کالوس‌زایی ریزنمونه ساقه گل‌راعی بومی ایران

Table 3- The interaction effect of light × media on the callus induction of stem explant in Iranian *H. perforatum*

محیط کشت Media	تنظیم‌کننده‌های رشد Growth regulators (mg.l ⁻¹)	نور Light	تعداد روز تا کالوس‌زایی Days to callus induction (day)	کالوس‌زایی Callus induction (%)	وزن کالوس Callus weight (g)
MS	0.25 2,4-D + 1 BA	نور Light	12 c*	100 a	2.44 c
		تاریکی Dark	13 abc	90 ab	3.29 a
MS	1 2,4-D + 0.2 Kin + 0.1 NAA	نور Light	14 a	90 ab	0.53 f
		تاریکی Dark	13.25 ab	100 a	1.21 e
MSB5	0.25 2,4-D + 1 BA	نور Light	14 a	100 a	2.75 b
		تاریکی Dark	12.5 bc	95 ab	2.89 b
MSB5	1 2,4-D + 0.2 Kin + 0.1 NAA	نور Light	14 a	80 b	0.6 f
		تاریکی Dark	12 c	100 a	1.6 d

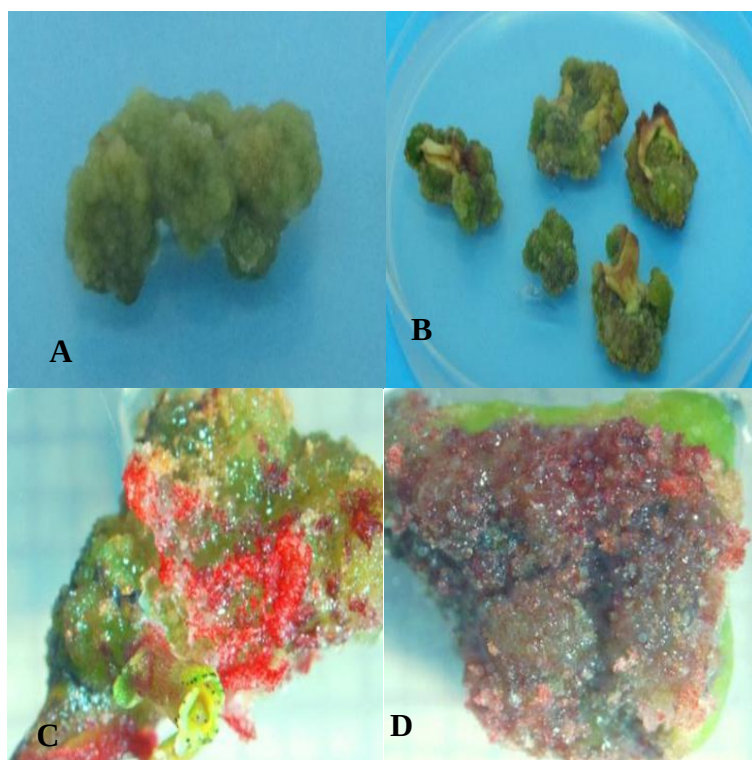
* حروف غیرمشابه در هرستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

* Values followed by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

براساس نتایج به‌دست‌آمده، اثر PVP بر رشد کالوس‌ها به نوع تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده نیز بستگی دارد که بین دو تیمار هورمونی به‌کاررفته، غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر BA اثر بهتری در القا کالوس داشت. مقایسه نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ در حضور PVP در محیط کشت دارای BA وزن تر بیشتری داشتند، ولی در محیط کشت فاقد PVP بیشترین وزن تر در محیط کشت دارای Kin بوده است، درحالی‌که رشد کالوس در ریزنمونه ساقه در صورت وجود و یا عدم وجود PVP در محیط کشت دارای BA بهتر بود (جدول ۴)، این یافته‌ها نتیجه آزمایش اول را تأیید می‌کند. در گزارش‌های قبلی در مورد گل راعی نیز اضافه کردن PVP به محیط کشت باعث بهبود رشد کالوس شده است (Xu et al., 2011). استفاده از PVP در کشت درون شیشه‌ای گیاهان دیگر نیز گزارش شده است. در بامبو (*Phyllostachys nigra*) اضافه کردن ۰/۲۵ گرم در لیتر PVP به محیط کشت باعث کنترل قهوه‌ای شدن محیط کشت و تحریک رشد جنین‌های سوماتیکی گردید (Ogita, 2005).

برخلاف نتایج حاضر، در *Cycas revoluta* اضافه کردن یک گرم در لیتر PVP باعث جلوگیری از نکروزه شدن کالوس به‌دلیل جذب مواد فنلی شده و کالوس‌ها در این محیط زنده و بافت نرم به رنگ سفید مایل به زرد داشتند (Pick Kiong et al., 2008). در آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) نیز اضافه کردن یک گرم در لیتر PVP برای موفقیت در کشت درون شیشه‌ای آن مؤثر بوده است (Choudhary et al., 2011).

بیشترین وزن تر کالوس (۴/۱ گرم) در ریزنمونه برگ و در محیط کشت دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP به دست آمد. کمترین وزن تر کالوس (۱/۴۱ گرم) در ریزنمونه ساقه و در محیط کشت دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP حاصل گردید (جدول ۴). بین غلظت‌های PVP مورد استفاده، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در بهبود رشد کالوس در هر دو ریزنمونه‌های برگ و ساقه مؤثرتر بوده است.



شکل ۲- کالوس سبزرنگ حاصل از ریزنمونه برگ گل راعی ایرانی در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA (A)، کالوس سبزرنگ تولیدشده از ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS دارای ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی گرم در لیتر BA (B)، نقاط قرمز تشکیل شده روی کالوس حاصل از ریزنمونه برگ (C)، نقاط قرمز تشکیل شده روی کالوس حاصل از ریزنمونه ساقه (D)

Figure 2- green derived callus from leaf explant of Iranian *H. perforatum* in supplemented MS media with 0.5 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg.l⁻¹ BA (A), green derived callus from stem explant in MS media supplemented with 0.25 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ BA (B), c: formed red points on derived callus from leaf explant (C), formed red points on derived callus from stem explant (D)

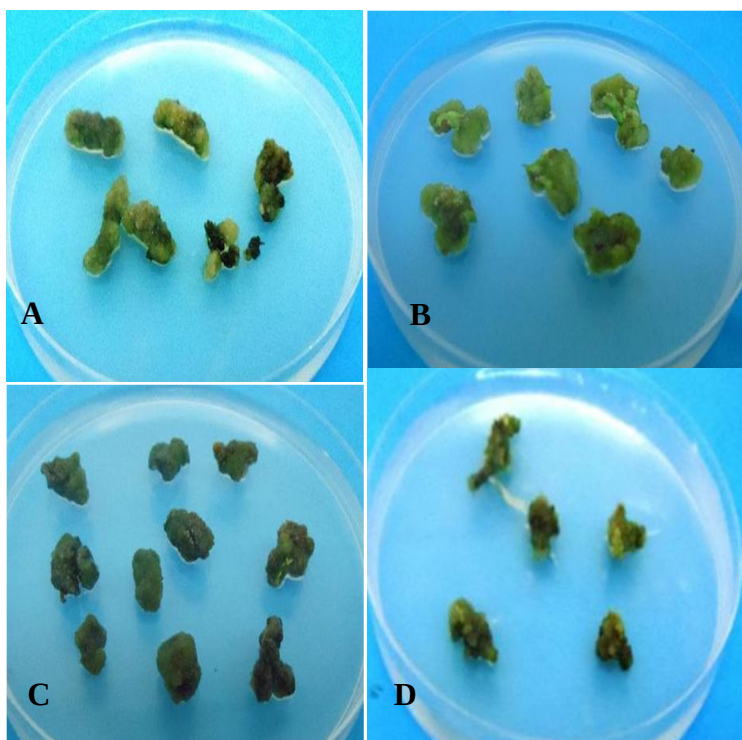
جدول ۴- اثر متقابل نوع ریزنمونه × غلظت‌های مختلف PVP بر کالوس‌زایی گل راعی بومی ایران

Table 4- The interaction effect of explant type × different concentrations of PVP on the callus induction of Iranian *H. perforatum*

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی Growth regulator (mg.l ⁻¹)	ریزنمونه Explant	پلی‌وینیل پیرولیدون PVP (mg.l ⁻¹)	تعداد روز تا کالوس‌زایی Days to callus induction	کالوس‌زایی Callus induction (%)	وزن کالوس Callus weight (g)
0.25 2,4-D + 1 Kin	ساقه Stem	0	10.5 e	100 a	1.62 gh
		50	10.25 e	100 a	1.41 h
		100	10 e	100 a	1.41 h
		200	12.25 cd	100 a	1.53 gh
0.25 2,4-D + 1 Kin	برگ Leaf	0	13.88 a	97.5 ab	3.01 b
		50	12.67 b	97.5 ab	1.79 fg
		100	14 a	100 a	3.18 b
		200	13.5 a	100 a	2.29 ed
0.25 2,4-D + 1 BA	ساقه Stem	0	10 e	100 a	2.26 ed
		50	10 e	100 a	2.4 cd
		100	10 e	100 a	2.46 cd
		200	10 e	100 a	2 e
0.25 2,4-D + 1 BA	برگ Leaf	0	10.25 e	100 a	2.22 ed
		50	10.75 cde	95 b	2.34 d
		100	11.25 cd	97.5 ab	4.1 a
		200	11.5 c	97.5 ab	2.65 c

* حروف غیرمشابه در هرستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

* Values followed by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.



شکل ۳- کالوس سبز رنگ تولیدشده از ریزنمونه برگ گل راعی ایرانی در محیط کشت دارای 0.25 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} BA و 100 mg.l^{-1} PVP (A)، کالوس سبز رنگ تولیدشده از ریزنمونه ساقه در محیط کشت دارای 0.25 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} BA و 100 mg.l^{-1} PVP (B)، رشد کم کالوس در ریزنمونه ساقه در محیط کشت دارای 0.25 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} Kin و 100 mg.l^{-1} PVP (C)، عدم کنترل قهوه‌ای شدن کالوس در غلظت 200 mg.l^{-1} PVP (D)

Figure 3- green derived callus from leaf explant of Iranian *H. perforatum* in media supplemented with 0.25 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} BA and 100 mg.l^{-1} PVP (A), green derived callus from stem explant in media supplemented with 0.25 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} BA and 100 mg.l^{-1} PVP (B), low growth of stem derived callus in media supplemented with 0.25 mg.l^{-1} 2,4-D + 1 mg.l^{-1} Kin and 100 mg.l^{-1} PVP (C), uncontrolled callus browning in 200 mg.l^{-1} PVP (D)

نتیجه‌گیری

قهوه‌ای می‌شوند و تغییر شرایط نوری از تاریکی به روشنایی ضعیف و استفاده از محیط کشت MS همراه با ویتامین‌های محیط کشت B5 تأثیری بر کنترل قهوه‌ای شدن کالوس‌ها نداشت. اگرچه استفاده از ترکیب پلی‌ونیل پیرولیدین باعث بهبود رشد کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ شد، ولی نتوانست قهوه‌ای شدن کالوس‌ها را کاهش دهد.

به‌طورکلی، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای کالوس‌زایی گیاه گل راعی بومی ایران ضروری می‌باشد و استفاده از ریزنمونه برگ برای دستیابی به حداکثر کالوس‌زایی در این گیاه مناسب‌تر می‌باشد. یکی از ویژگی‌های کالوس‌های گل راعی بومی ایران این است که کالوس‌ها به‌سرعت

References

1. Azadi R. (1999). Flora Iranica. *Hypericaceae* family. Forest and Rangeland Institute, Iran, pp. 62.
2. Azizi M., Jafarymofid Abadi A., & Omidbaigi, R. (2002). Investigation the in vitro cultures of *Hypericum perforatum* L. in production of Hypercin and other secondary metabolites. *Pazhouhesh and Sazandeghi Journal*, 54, 40-45. (In Persian)
3. Bais. H. P., Walker. T. S., Mc Grew. J. J., & Vivanco. J. M. (2002). Factors affecting the growth of cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. Johns wort) and production of hypericin. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 38, 58-65. <https://doi.org/10.1079/IVP2001253>
4. Bohn, T. H., Fabritius, E., Kauth, S., & Plotz, S. (1996). First results of comparative investigation about callus and suspension culture of seven *Hypericum* species. Proceeding, International Symposium: Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, Quedlinburg, Germany, p. 286-289.

5. Cardoso, N. A., & de Oliveira, D. E. (1996). Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 44, 91-94. <https://doi.org/10.1007/BF00048184>
6. Choudhary, A. K., Ray, A. K., Jha, S., Mishra, I. N. (2011). Callus formation, shoot initiation and *in vitro* culture of *Aloevera*. *Biotechnology Bioinformatics and Bioengineering*, 1(4), 551-553.
7. Crockett, S. (2010). Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). *Natural Product Communication*, 5, 1493-1506. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500926>
8. Dias, A. C. P., Barber, F. A., Ferreira, M., & Ferreres, F. (1998). Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 48, 1165-1168. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00963-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00963-1)
9. Farsad Akhtar, N., Aharizad, S., Mohammadi, S.A., Motallebi-Azar, A., Movafeghi, A., & Banan Khojasteh, S. M. (2013). *In vitro* shoot regeneration and hypericin production in four *hypericum perforatum* genotypes. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 3, 887-893
10. Feher, A. (2001). Why somatic plant cells start to form embryos. In: A. Mujib and J. Samaj (Eds). *Somatic Embryogenesis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 58-101. https://doi.org/10.1007/7089_019
11. Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, O. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Experimental Cell Research*, 50, 151-158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
12. Ghazian Tafrishi, G., Azizi, M., & Farsi, M. (2006). Investigation of *in vitro* culture of Iranian St Johns Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 22(3), 172-179. (in Persian with English abstract)
13. Kalidass, C. H., Mohan, V. R., & Daniel, A. (2010). Effect of auxin and cytokinin on vincristine production by callus cultures of *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 283-288.
14. Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, 12, e0168. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
15. Kirakosyan, A., Gibson, D. M., & Kaufman, P. B. (2008). The production of dianthrones and phloroglucinol derivatives in St. John's Wort. In: K. G. Ramawat & J. M. Merillon (Eds.). *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. Springer, Berlin, pp. 149-164. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74603-4_7
16. Kirakosyan, A., Sirvent, T. M., Gibson, D. M., & Kaufman, P. B. (2004). The production of hypericins and hyperforin by *in vitro* culture of St Johns Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39(1), 71-81. <https://doi.org/10.1042/BA20030144>
17. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
18. No, Z., Xiu-qing, Z., Dong-Hai, S., Li, W., & Jun-She, S. (2005). Induction of *Hypericum Perforatum* L. callus and detection of hypericin in the cultures. *Journal of Henan Agricultural Science*, 6, 66-69.
19. Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology*, 22(2), 119-125. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.22.119>
20. Pick Kiong, A., Shu Thing, Y., Azlan Gansau, J., & Hussein, H. (2008). Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revolute*. *African Journal of Biotechnology*, 7(23), 4279-4284.
21. Pretto, F. R., & Santarem, E. R. (2000). Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* L. leaves. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 67, 107-113. <https://doi.org/10.1023/A:1026534818574>
22. Radusienea, J., Judzientieneb, A., & Bernotieneb, G. (2005). Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. *Biochemistry Systematic and Ecology*, 55, 113-124. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.06.010>
23. Mulinacci, N., Giaccherini, C., Santamaria, A. R., Caniato, R., Ferrari, F., Valletta, A., Vincieri, F. F., & Pasqua, G. (2008). Anthocyanins and xanthones in the calli and regenerated shoots of *Hypericum perforatum* var. *Angustifolium* (sin. *Frohlich*) Borkh. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.005>
24. Talapatra, S., & Raychaudhuri, S.S. (2012). *In vitro* enhanced accumulation of polyphenols during somatic embryogenesis in *Plantago ovata* Forsk. *American Journal of Bio-pharmacology Biochemistry and Life*, 1(1), 43-52.
25. Tocci, N., Ferrari, F., Santamaria, A. R., Valletta, A., & Pasqua, R. (2010). Chitosan enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* subsp. *Angustifolium* cell cultures. *Natural Product Research*, 24(3), 286-290. <https://doi.org/10.1080/14786410903006353>
26. Xu, M., Yang, B., Dong, J., Lu, D., Jian, H., Sun, L., Zhu, Y., & Xu, Z. (2011). Enhancing hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension culture by ozone exposure. *Biotechnology Progress*, 27(4), 1101-1106. <https://doi.org/10.1002/btpr.614>
27. Yazaki, K., & Okuda, T. (1990). Procyaninins in callus and multiple shoots of *Hypericum erectum*. *Planta Medica*, 56, 490-491. DOI: 10.1055/s-2006-960073