



Medium Optimization for Callogenesis, Shoot Regeneration and Rooting of *Hypericum perforatum* from Shoot and Leaf Explants

N. Afsharzadeh¹, M. Azizi^{1*}, L. Samiei^{1*}

1- Department of Horticultural Science and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

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

Received: 28 November 2017
Revised: 15 February 2023
Accepted: 04 April 2020
Available Online: 05 April 2021

How to cite this article:

Afsharzadeh, N., Azizi, M., & Samiei, L. (2026). Medium optimization for callogenesis, shoot regeneration and rooting of *Hypericum perforatum* from shoot and leaf explants. *Journal of Horticultural Science*, 40(3), 537-547. (In Persian).
<https://doi.org/10.22067/jhs.2021.60331.0>

Introduction

Hypericum perforatum is a perennial plant that has been used in traditional medicine. *H. perforatum* have several types of medicinal compounds including antiviral compounds, antioxidants, flavonoids and also has valuable compounds such as Hypericin, Hyperforin, Pseudo-hypericin and xanthenes that have effect on human physiology. Aerial parts of *H. perforatum* are dotted with dark glands that appear as black nodules. Black glands were known as localization of secondary metabolites. As a consequence of the commercial potential of this species attempts have been at plant improvement by application of in vitro culture methods. Among seedling explants of *H. perforatum*, it appears that roots are superior for shoot regeneration. It is generally accepted that explants source is an important factor for successful establishment of tissue culture in many cases. Production of secondary metabolites via plant cell and tissue culture yields various advantages, including standardization and quality. These criteria are also valid for the main economically important chemical in *st. John's wort*, namely hypericin, pseudo hypericin and hyperforin. The aim of this study was to evaluate the effect of some tissue cultures on plant callogenesis, regeneration and also, study the effect of cytokinin and auxin on rooting rate and shoot multiplication.

Materials and Methods

This research included two experiments; first experiment was a completely randomized design in the form of factorial research. Second experiment was completely randomized design. First part of experiment: this part was conducted with two explants type, leaf and shoot which, maintained in light and dark condition. Shoot explants were derived from sterile seedlings that was obtained from seeds which were cultured on MS medium. Seeds were decontaminated by NaClO 20% (V/V) for 20 min and were washed with sterile deionized water. Leaf explants were derived from seedlings in the *in vivo* condition and decontaminated by NaClO 20% (V/V) for 20 min then washed with sterile deionized water. Both of the explants cultured on MS medium supplemented with BA (3 and 4 mg.l⁻¹) and 2,4-D (0, 1 and 2.5 mg.l⁻¹). Callogenesis and regeneration were measured after 4 weeks. Second part of experiment: shoot of indirect regeneration for rooting study, were cultured on ½ MS medium supplemented with BA (0 and 0.5 mg.l⁻¹) and IBA (0 and 1 mg.l⁻¹). Proliferation, shoot and root length were measured after 4 and 8 weeks.

Results and Discussion

Effects of the factors on first part of experiment; calluses of shoot and leaf explants were induced after 4 weeks. Shoot explants in medium supplemented with 4 mg.l⁻¹ BA and 2.5 mg.l⁻¹ 2, 4-D showed 95% callogenesis. Leaf explants in medium supplemented with 3 mg.l⁻¹ BA and 2.5 mg.l⁻¹ 2, 4-D showed 98% callogenesis. Shoot explants



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.2021.60331.0>

in medium supplemented with BA (3 mg.l^{-1}) showed 62% regeneration and leaf explants in medium supplemented with BA (4 mg.l^{-1}) showed 8% regeneration. For second part of experiments; root induction on half strength medium without hormone and medium supplemented with 0.5 mg.l^{-1} BA and 1 mg.l^{-1} IBA had the highest rooting frequencies. Average of root length was registered as 5.25 cm. half strength medium supplemented with 0.5 mg.l^{-1} BA had 100% and also, medium with 0.5 mg.l^{-1} BA and 1 mg.l^{-1} IBA had 86% shoot multiplication and were not appeared any roots. Average shoot length on medium without hormone and medium supplemented with 0.5 mg.l^{-1} BA and 1 mg.l^{-1} IBA was registered as 6.24 cm and in media with 0.5 mg.l^{-1} BA and 1 mg.l^{-1} IBA was registered as 1.8 cm. Based on the result of this experiments, the concentration levels of the two hormones BA and 2, 4-D in the induction of calli formation and regeneration of the *H. perforatum* have been effective. In the second experiment, hormone BA, in the absence of IBA did not cause rooting and increased the degree of shoots and ultimately proliferation was effective. Also, in treatment with 0.5 mg.l^{-1} BA and 1 mg.l^{-1} IBA, although the concentration of cytokinin was less than auxin, rooting was not done.

Conclusion

The goal of this study was to introduce the suitable medium for callogenesis and regeneration of *H. perforatum* for production and breeding aims. Tissue and cell culture methods are used for various purposes. The result of each section can be used effectively in research topics, including corrective tests, processes for increasing secondary metabolites, as well as increasing commercial products. Therefore, by introducing efficient and effective methods, it is possible to increase the production of plants by micropropagation in less time.

Keywords: Auxins, *In vitro* culture, Micropropagation, Secondary metabolites, 6-benzylaminopurine



بهینه‌سازی محیط کشت گل راعی (*Hypericum perforatum*) با هدف کال‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های برگ و ساقه

نگین افشارزاده^۱ - مجید عزیزی^{۱*} - لایلا سمیعی^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۱۶

چکیده

گل‌راعی (*Hypericum perforatum*) با نام‌های فارسی هوفاریقون، هزارچشم و گل شهناز، گیاهی چندساله و دارای مواد مؤثره باارزشی همچون هایپرپرسین، سودوهایپرپرسین و هایپرپورین می‌باشد که از حیث اثرات ضدافسردگی، ضدسرطانی و افزایش ایمنی بدن اهمیت دارد. کاربرد تکنیک‌های کشت بافت در این گیاه به‌منظور هدایت آن به سمت تولید مواد دارویی ارزشمند آن می‌باشد. لذا این پژوهش با هدف بهینه‌سازی محیط کشت در راستای تولید کالوس، باززایی و ریشه‌زایی صورت گرفت. این پژوهش به‌صورت دو آزمایش مجزا در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. آزمایش اول شامل شش تیمار هورمونی با سطوح متفاوتی از بنزیل‌آدنین و توفوردی بر روی دو ریزنمونه برگ و ساقه، تحت دو شرایط نور و تاریکی بود. نمونه‌های تیمار شده از لحاظ میزان کال‌زایی و باززایی مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایش دوم، نمونه‌های باززایی شده از ریزنمونه ساقه به‌منظور ریشه‌زایی به محیط کشت با چهار تیمار هورمونی شامل بنزیل‌آدنین و ایندول بوتیریک اسید انتقال یافتند. نتایج نشان داد که در آزمایش اول برای ریزنمونه برگ، تیمار بنزیل‌آدنین با غلظت سه میلی‌گرم بر لیتر و توفوردی با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر با ۹۸ درصد و برای ریزنمونه ساقه، تیمار بنزیل‌آدنین با غلظت چهار میلی‌گرم بر لیتر و توفوردی با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر با ۹۵ درصد بیشترین میزان کال‌زایی را داشتند. از نظر باززایی نیز در ریزنمونه‌های برگ و ساقه به‌ترتیب تیمارهای حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر و سه میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین ۸ و ۶۲ درصد باززایی نشان دادند. در آزمایش دوم، نمونه‌های باززایی شده کالوس ساقه نیز در تیمار حاوی ایندول بوتیریک اسید با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر و تیمار فاقد هورمون بیشترین میزان ریشه‌زایی و در تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین همراه با ایندول بوتیریک اسید یک میلی‌گرم بر لیتر و تیمار فاقد ایندول بوتیریک اسید به‌ترتیب ۱۰۰ و ۸۶ درصد پُرآوری نشان دادند و ریشه‌زایی نداشتند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، ریزازدیادی، کشت درون شیشه‌ای، متابولیت‌های ثانویه، ۶- بنزیل‌آمینوپورین

مقدمه

و شمال آفریقا می‌باشد. این گیاه با نام انگلیسی St. John's Wort شناخته می‌شود. گل راعی حاوی ترکیبات بیولوژیکی قابل استخراج از جمله نفتودیانترون‌ها^۲، فلوروگلوکوسینول‌ها^۳، فلاونوئیدها^۴، پروآنتوسیانیدین‌ها^۵، تانن‌ها^۶، اسانس^۷، فنیل پروپانوئید^۸، زانتون‌ها و

گل راعی، گیاهی چندساله با نام علمی *Hypericum perforatum* و متعلق به خانواده Hypericaceae می‌باشد. جنس *Hypericum* بیش از ۴۵۸ گونه را شامل می‌شود که گونه *H. perforatum* گیاهی چندساله و کُند رشد بوده و بومی آسیا، غرب اروپا

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

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

<https://doi.org/10.22067/jhs.2021.60331.0>

2- Naphthodianthrone

3- Phloroglucinol

4- Flavonoid

5- Procyanidin

6- Tannin

7- Essential oil

8- Phenylpropanoid

با ساختارهای گرهکی حاوی هایپرپسین موجود در دو گروه مجزا از گیاه *H. perforatum* انجام دادند و با اندازه‌گیری صفات فیتوشیمیایی و ریخت‌شناختی، وضعیت استقرار غدد سیاه رنگ در سلول‌های پیرامونی موجود در اندام‌های سازنده متابولیت‌های ثانویه را مورد بررسی قرار دادند. عزیزی و همکاران (Azizi et al., 2002) نیز کشت درون شیشه‌ای گل راعی رقم توپاز^۲ را به‌منظور استخراج مواد مؤثره آن مورد بررسی قرار دادند که مشخص شد، متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های باززایی شده بیش از کالوس بود.

استخراج ماده مؤثره از کالوس باعث افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. افزایش مقدار و کیفیت ماده مؤثره باعث کاهش نیاز به ماده خام اولیه و در نتیجه تسهیل و کاهش عملیات کشاورزی می‌شود (Ayan et al., 2005). همچنین مطالعه فرآیند کال‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گل راعی به‌عنوان تحقیقات بنیادی و پایه به‌منظور مطالعات انتقال ژن و تحقیقات بیوتکنولوژی ضروری است (Zhao et al., 2015). همچنین محدودیت منابع طبیعی و پیچیدگی سنتز برخی ترکیبات دارویی و ارزش تجاری بالای آن‌ها سبب تولید این متابولیت‌ها از طریق کشت درون شیشه‌ای شده و به‌منظور انتخاب ژرم پلاسماهای برگزیده و گسترش تولیدات مؤثر متابولیت‌های ثانویه مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد (Upton, 1997). لذا هدف از انجام این آزمایش‌ها، بهینه‌سازی محیط کشت بافت گل راعی و انتخاب روش‌هایی با راندمان بالا در تولید کالوس، باززایی، تولید گیاهچه استریل و شناسایی روشی جهت تکثیر آسان (ریزآزادی) گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی، افزایش کیفیت و میزان ماده مؤثره در گل راعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در دو آزمایش مجزا در قالب طرح کاملاً تصادفی در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید. بذر مورد استفاده در این تحقیق، بذور توده بومی اردبیل بود که قبلاً توسط مؤلف طی چندین سال کشت با شرایط آب‌وهوایی مشهد سازگار شده بود. آزمایش اول به‌صورت فاکتوریل بوده و شامل شش تیمار با غلظت‌های متفاوتی از هورمون‌های بنزیل آدنین و توفوردی اجرا گردید. ریزنمونه‌های مورد بررسی در این آزمایش شامل برگ و میان‌گره بود. ریزنمونه‌های باززایی شده به‌منظور بررسی میزان ریشه زایی و پُرآوری به آزمایش دوم شامل چهار تیمار با غلظت‌های مختلف از هورمون‌های بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک اسید انتقال یافتند.

دیگر ترکیبات قابل حل در آب می‌باشد (Levin & Hickman, 1993; Kirakosyan, Gibson et al., 2004). همچنین این گیاه دارای مواد مؤثره از خانواده آنتراکوئینون‌های فعال نوری؛ هایپرپسین، هایپرفورین و سودوهایپرپسین است که دارای خواص ضدسرطانی، درمان زخم، ضدویروس، بهبود سوختگی، مسکن، ضدباکتری و مؤثر در درمان افسردگی‌های خفیف تا متوسط می‌باشد. مواد مؤثره گل راعی در بخش‌های هوایی شامل برگ، ساقه و گلپوش‌هاست. این مواد در غده‌های کوچک و سیاه رنگ در بخش‌های ساقه و برگ‌ها پراکنده‌اند که به‌صورت ساختارهای تیره در حاشیه برگ‌ها و گل‌برگ‌ها ظهور می‌یابند. طبق پژوهش‌های صورت گرفته مشخص گردید که ترکیبات مؤثره گل راعی در برابر رتروویروس‌ها مقابله می‌کند و به‌عنوان دارویی گیاهی جهت درمان ایدز پیشنهاد شده است (Levin & Hickman, 1993; Pretto & Santarém, 2000).

اکنون روش‌های بسیاری به‌منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه مهم گل راعی با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و همچنین از طریق کشت در شرایط مزرعه‌ای و گلخانه‌ای صورت گرفته است. یکی از جدیدترین پژوهش‌های صورت گرفته توسط توسوسکی و همکاران که (Tusevski et al., 2016) انجام گردید، براساس مقایسه میزان مواد مؤثره گل راعی در کشت درون شیشه‌ای و کشت در شرایط *in vivo* مشخص گردید که کالوس‌های حاصل حاوی ماده مؤثره دارویی تجاری و ارزشمند زانتون^۱ می‌باشند. این ماده دارویی به‌صورت اختصاصی در کالوس‌های این گیاه تولید می‌شود، درحالی که در آنالیز ترکیبات حاصل از نمونه‌های رشدیافته در شرایط *in vivo* مشاهده نگردید (Tusevski et al., 2016).

در پژوهش‌های اخیر، هدایت گل راعی به سمت تولید درون شیشه‌ای با هدف تولید و استخراج ماده خام دارویی و ارزشمند زانتون مورد توجه قرار گرفته است. لذا وجود دستورالعمل با راندمان بالا جهت تولید کالوس‌های مناسب به‌منظور استخراج مواد مؤثره خاص و همچنین دستیابی به گیاهان باززایی شده به‌منظور تکثیر انبوه و انجام آزمایش‌هایی با اهداف اصلاحی در جهت بهبود میزان مواد مؤثره در گیاه گل راعی، از اهداف مورد بررسی در این پژوهش بوده است.

هیکمن (Hickman, 1993) به‌منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه برگ، کال‌زایی و باززایی آن را مورد آزمایش قرار داده و بعد از پنج ماه در گلخانه سازگار نمودند. در پژوهشی دیگر آیان و کوسراگلو (Çirak et al., 2007)، باززایی مستقیم و غیرمستقیم گرهک‌ها و ریزنمونه‌های برگی گونه *H. bupleuroides* را مورد بررسی قرار دادند و توانستند بیش از ۹۰ درصد از گیاهچه‌های تولیدشده را سازگار نمایند. کورنفلد و همکاران (Kornfeld et al., 2007)، تحقیقاتی را در رابطه

آزمایش اول

۱- کشت ریزنمونه ساقه

بدین منظور، ابتدا گیاهچه‌های استریل از طریق کشت بذر *H. perforatum* در شرایط درون‌شیشه‌ای تولید گردید. بذر ها با استفاده از سدیم هیپوکلریت ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل آب‌شویی شد و در محیط کشت MS بدون هورمون کشت گردید (شکل ۱). پس از چهار هفته، ریزنمونه‌های مورد نظر از بخش ساقه شامل یک تا دو گره تهیه گردید و در محیط کشت MS کشت شد. محیط کشت مورد استفاده شامل نمک‌های MS و ویتامین‌های محیط B₅ بوده و حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۰/۷ درصد آگار بود. pH محیط کشت نیز ۵/۷۰ تا ۵/۸۰ تنظیم شد و در نهایت محیط مذکور در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده شامل بنزیل آدنین با غلظت‌های (سه و چهار میلی-گرم بر لیتر) و توفوردی (با غلظت‌های صفر، ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بود و کشت‌های صورت گرفته در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری هشت ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفت. نور مورد استفاده در بازه ۱۳۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس در نظر گرفته شد. در هر پتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت، ۱۰ ریزنمونه قرار گرفت. صفات مورد بررسی در پایان هفته چهارم اندازه‌گیری شد (شکل ۱).

۲- کشت ریزنمونه برگ

به‌منظور تهیه ریزنمونه‌های برگ از گیاهان رشد یافته در شرایط درون شیشه ای استفاده شد. جهت ضدعفونی ریزنمونه‌ها، سدیم هیپوکلریت ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۲۰ دقیقه و سپس سه مرتبه آب‌کشی با آب مقطر استریل صورت گرفت. هر یک از نمونه‌های ضدعفونی‌شده به قطعات ۱۵ تا ۲۰ میلی‌متر مربع تقسیم و سپس در هر پتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰ ریزنمونه قرار گرفت. محیط کشت به‌کاربرده‌شده و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی اعمال شده مشابه با مشخصات ذکر شده در بخش کشت ریزنمونه ساقه بود. صفات مورد بررسی بعد از چهار هفته ثبت گردید (شکل ۲).

آزمایش دوم

ریشه‌زایی

بدین منظور، گیاهچه‌های باززایی‌شده حاصل از کالوس‌های ساقه به محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۰/۷ درصد آگار منتقل شدند. تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده شامل غلظت‌های مختلفی از بنزیل آدنین (صفر و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و ایندول بوتیریک

اسید (صفر و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) بود. اطلاعات تیمارها شامل طول ساقه، طول ریشه و میزان پُرآوری در پایان هفته چهارم و هشتم ثبت گردید (شکل ۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP نسخه ۸، داده‌های آزمایش اول به‌صورت فاکتوریل و آزمایش دوم به‌صورت ساده در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شدند و سپس مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

آزمایش اول

نتایج آزمایش اول نشان داد که بین سطوح تیمارهای دو هورمون بنزیل آدنین و توفوردی و همچنین اثر متقابل دو عامل غلظت هورمون‌ها و ریزنمونه برگ و ساقه از نظر کال‌زایی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد وجود داشت. همچنین نتایج نشان داد که برهم‌کنش متقابل نور و تاریکی اثر معنی‌داری بر کال‌زایی دو ریزنمونه برگ و ساقه نداشت (شکل ۳).

از لحاظ باززایی نیز بین سطوح تیمارهای دو هورمون بنزیل آدنین و توفوردی بر هر دو ریزنمونه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد مشاهده شد. همچنین بین اثر متقابل روشنایی و تاریکی و ریزنمونه ساقه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد مشاهده گردید، درحالی‌که عامل روشنایی و تاریکی بر ریزنمونه برگ اثر معنی‌داری نداشت.

کال‌زایی ریزنمونه ساقه

بررسی ریزنمونه‌های کشت‌شده ساقه نشان داد که پس از ۱۰ روز، القای کالوس آغاز گردید و تا پایان هفته چهارم کالوس‌ها تولید شدند. رنگ کالوس‌ها براساس شرایط تاریکی و نور و همچنین سطوح مختلف هورمونی، طیفی از سبز کم‌رنگ و شیری رنگ تا سبز تیره داشتند. در ریزنمونه ساقه، تیمار حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی با ۹۵ درصد کال‌زایی و تیمار حاوی سه میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و یک میلی‌گرم بر لیتر توفوردی با ۸۶ درصد کال‌زایی بیشترین درصد تولید کالوس را داشت و کمترین میزان کال‌زایی در تیمار چهار میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و فاقد توفوردی ثبت شد (شکل ۳).



شکل ۱- کالزایی ساقه (۱) و گیاهچه‌های بذری استریل (۲) در گل راعی
Figure 1- Shoot callogenesis (1) and sterile seedling (2) of *Hypericum perforatum*

کالزایی ریزنمونه برگ

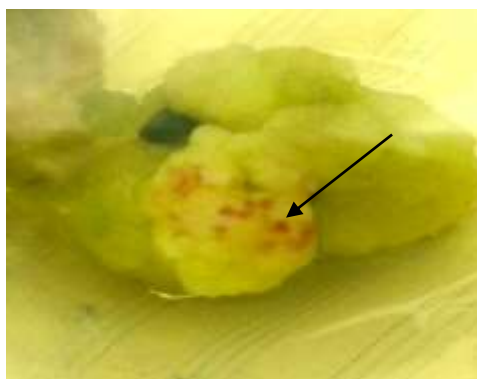
القای کالوس با تغییر رنگ برگ‌ها از سبز به قهوه‌ای تیره و متورم شدن آن در هفته دوم آغاز شده و تا پنج هفته به طول انجامید. رنگ کالوس‌های باززایی شده از نمونه‌های برگ سبز تیره و دارای بافتی ترد و فشرده بود. لذا با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در بین سطوح هورمونی مورد آزمایش، بهترین تیمار به‌منظور کالزایی ریزنمونه برگ، تیمار حاوی سه میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲/۵ میلی گرم بر لیتر توفوردی با ۹۵ درصد کالزایی و پس از آن تیمار حاوی چهار میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و یک میلی گرم بر لیتر توفوردی با ۸۸ درصد کالزایی بود که بیشترین درصد کالزایی در ریزنمونه برگ را نشان دادند. همچنین کمترین درصد تولید کالوس در تیمار سه میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و فاقد توفوردی مشاهده شد. بر روی کالوس‌های رشد یافته ریزنمونه برگ، وجود نقاط قرمز رنگ حاوی متابولیت‌های ثانویه به‌وضوح قابل مشاهده بود (شکل ۲، شکل ۳). در تیمار حاوی چهار

میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲/۵ میلی گرم بر لیتر توفوردی هر دو ریزنمونه برگ و ساقه، کالزایی نشان دادند (شکل ۳).

باززایی ریزنمونه برگ و ساقه

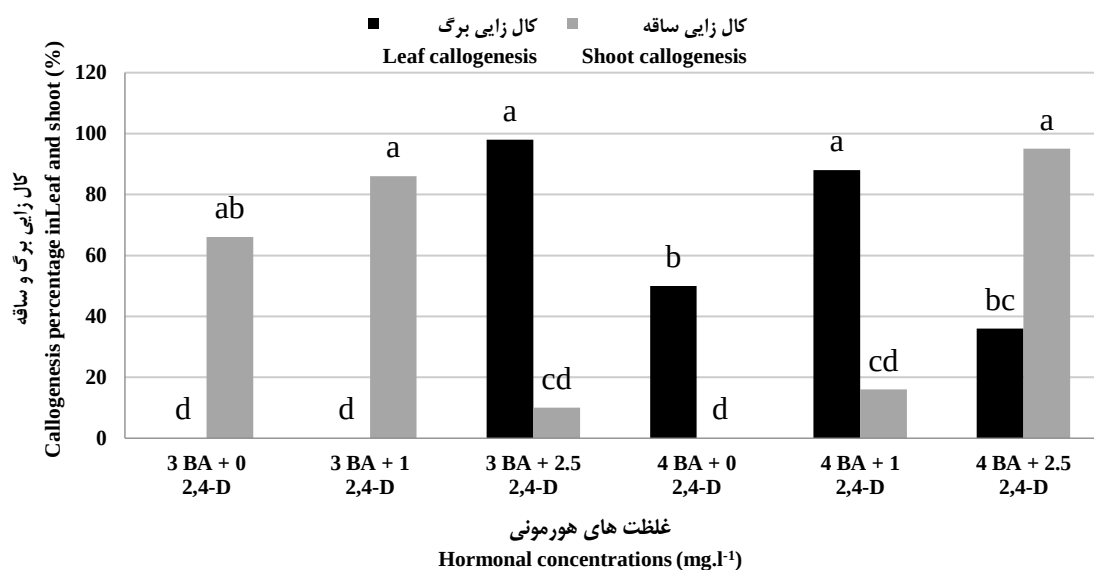
نتایج نشان داد که اثر دو عامل روشنایی و تاریکی و سطوح هورمون‌های بنزیل آدنین و توفوردی بر میزان باززایی ریزنمونه ساقه در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بوده ولی اثر معنی داری بر ریزنمونه برگ نداشت.

در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه ساقه، تیمار حاوی سه میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و فاقد توفوردی در شرایط روشنایی با ۶۲ درصد بیشترین میزان باززایی را نشان داد و تیمار حاوی چهار میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و فاقد توفوردی در ریزنمونه برگ، هشت درصد باززایی را نشان داد (شکل ۴ و ۵). همچنین اثر کلی سطوح هورمونی تیمارها نشان داد که تیمار حاوی سه میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و فاقد توفوردی در هر دو ریزنمونه برگ و ساقه سبب باززایی شد (شکل ۵).



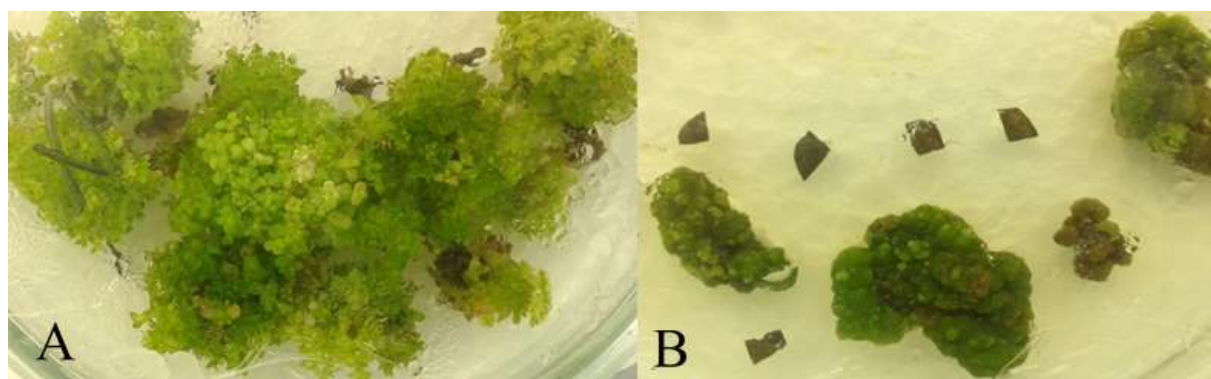
شکل ۲- کالزایی برگ در گل راعی (پیکان در شکل نشان دهنده نقاط قرمز تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه است)

Figure 2- Leaf callogenesis in *Hypericum perforatum* (the arrow indicates the red spots producing secondary metabolites)



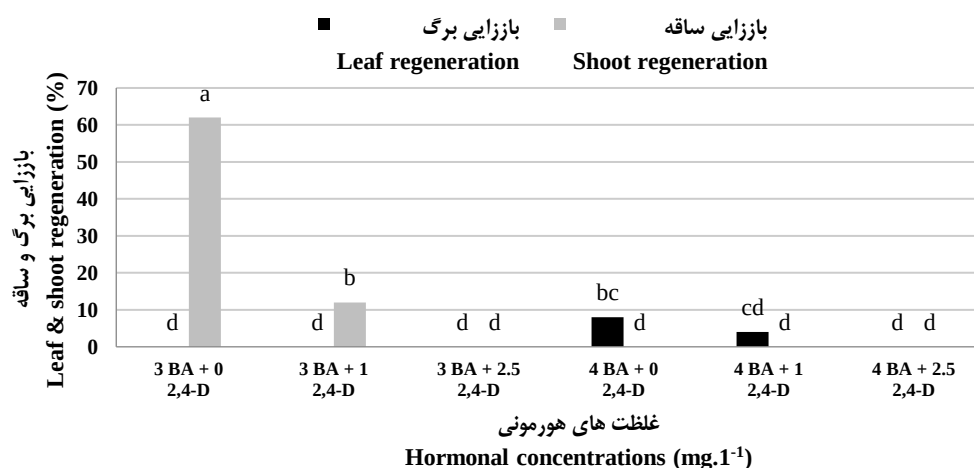
شکل ۳- اثر تیمارهای هورمونی بر میزان کال‌زایی برگ و ساقه گل راعی

Figure 3- Effect of hormone treatments on the leaf and shoot callogenesis of *Hypericum perforatum* (Tukey, $p \leq 0.05$).



شکل ۴- باززایی از ساقه (A) و برگ (B) گل راعی

Figure 4- Shoot (A) and leaf regeneration (B) of *Hypericum perforatum*.



شکل ۵- اثر تیمارهای هورمونی بر میزان باززایی برگ و ساقه گل راعی

Figure 5- Effect of hormone treatments on the leaf and shoot regeneration of *Hypericum perforatum* (Tukey, $p \leq 0.05$).

نتایج آزمایش دوم (ریشه‌زایی)

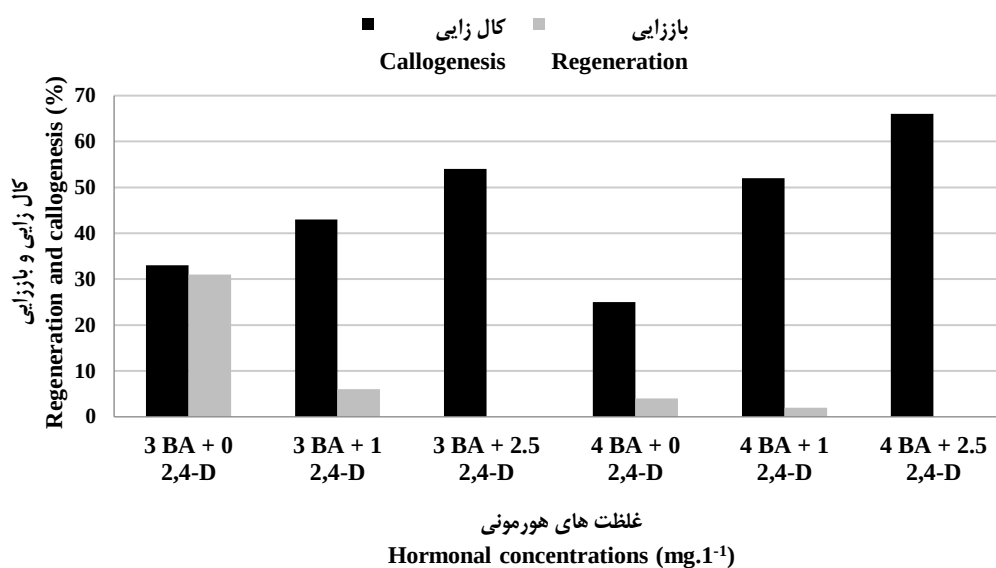
آزمایش دوم

اثر سطوح تیمار هورمون‌های ایندول بوتیریک اسید و بنزیل آدنین بر میزان ریشه‌زایی گیاهان در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود و بر میزان پُرآوری، طول گیاهچه‌ها و طول ریشه نیز تأثیر معنی‌داری داشت.

نتایج نشان داد که سطوح تیمار هورمون‌های ایندول بوتیریک اسید و بنزیل آدنین اعمال شده سبب اثر معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

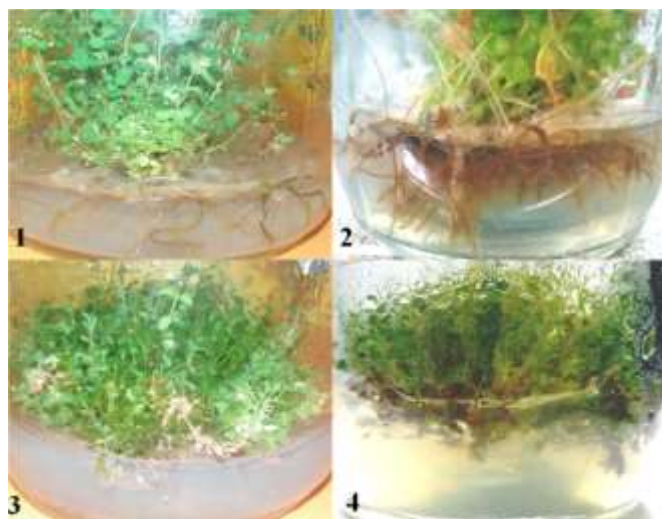
بر طول ساقه و طول ریشه و همچنین بر میزان پُرآوری گیاهچه‌ها شد (شکل ۷ و ۸).

نتایج نشان داد که اثر سطوح هورمون بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک اسید بر طول ساقه در تیمار فاقد هورمون با میانگین ۶/۲۴ سانتی‌متر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد با تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بنزیل آدنین به‌تنهایی و تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بنزیل آدنین و یک میلی‌گرم ایندول بوتیریک اسید با میانگین ۱/۸ سانتی‌متر نشان داد (شکل ۸).



شکل ۶- اثر تیمارهای هورمونی بر میزان کال‌زایی و باززایی گل راعی

Figure 6- Effect of hormone treatments on the regeneration and callogenesis of *Hypericum perforatum* (Tukey, $p \leq 0.05$).

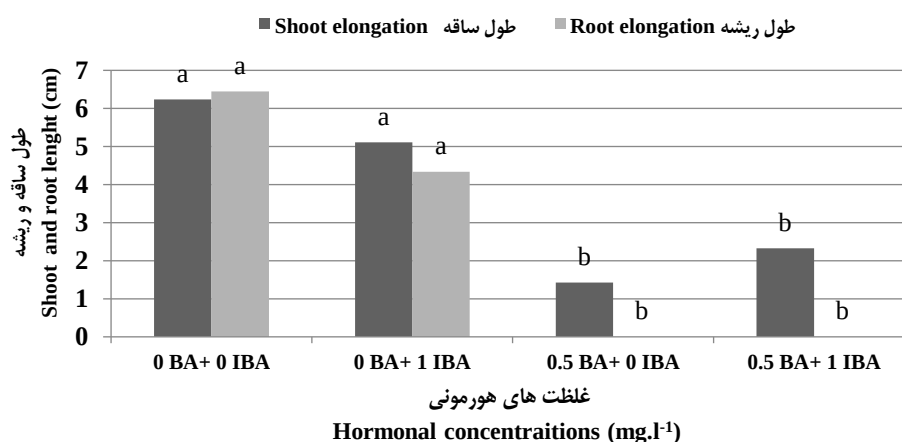


شکل ۷- وضعیت ریشه‌زایی ریزشاهه‌های گل راعی در محیط کشت فاقد هورمون (۱)، و حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید (۲)، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (۳)، و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین + یک میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید

Figure 7- Rooting of *in vitro* shoots of *Hypericum perforatum* in medium without hormones (1), and with 1 mg.l⁻¹ IBA (2), 5.0 mg.l⁻¹ BA (3), and 5.0 mg.l⁻¹ BA + 1 mg.l⁻¹ IBA (4)

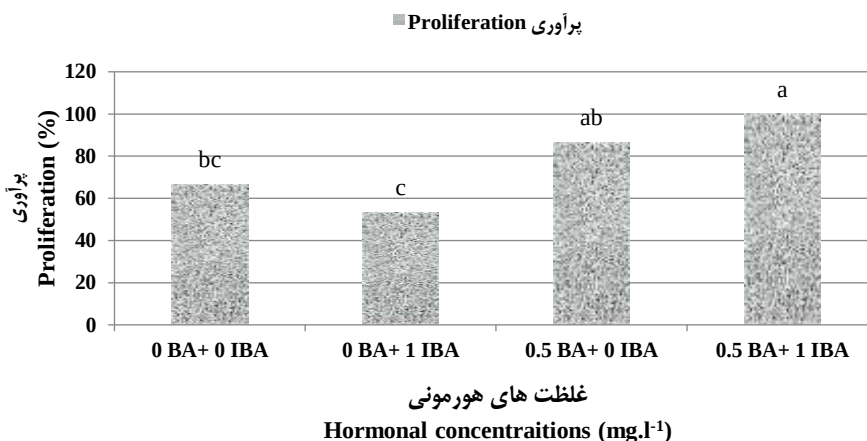
بوتیریک اسید با حداقل میانگین طولی ۴/۳ سانتی‌متر ثبت شد. دو تیمار حاوی ۰/۵ میلی گرم بنزیل آدنین به‌تنهایی و حاوی ۰/۵ میلی گرم بنزیل آدنین و یک میلی گرم ایندول بوتیریک اسید ریشه‌زایی قابل اندازه‌گیری از خود بروز ندادند، درحالی‌که میزان پُرآوری آن‌ها به‌ترتیب ۱۰۰ و ۸۷ درصد بود و بیشترین میزان پُرآوری را داشتند (بیش از ۵۰ ساقه در هر سه سانتی‌مترمربع). تیمار فاقد هورمون و تیمار حاوی یک میلی‌گرم ایندول بوتیریک اسید نیز به‌ترتیب ۶۷ و ۵۳ درصد پُرآوری را نشان دادند (شکل ۷ و ۸ و ۹).

همچنین اثر سطوح هورمون بنزیل آدنین و ایندول بوتیریک اسید بر افزایش طول ریشه‌ها نشان داد که تیمارهای فاقد هورمون و تیمار حاوی یک میلی‌گرم ایندول بوتیریک اسید با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند، درحالی‌که با تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بنزیل آدنین به‌تنهایی و تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بنزیل آدنین و یک میلی‌گرم ایندول بوتیریک اسید تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد داشت. بیشترین میزان ریشه‌زایی در تیمار فاقد هورمون با حداقل میانگین طولی ۶/۲ سانتی‌متر و سپس تیمار حاوی یک میلی‌گرم ایندول



شکل ۸- اثر تیمارهای هورمونی بر طول ساقه و ریشه در گل راعی

Figure 8- Effect of hormone treatments on the shoot and root length of *Hypericum perforatum* (Tukey, $p \leq 0.05$).



شکل ۹- اثر تیمارهای هورمونی بر میزان شاخه‌زایی (پُرآوری) گل راعی

Figure 9- Effect of hormone treatments on the multiplication (proliferation) of *Hypericum perforatum* (Tukey, $p \leq 0.05$).

۰/۵ میلی‌گرم بنزیل آدنین و یک میلی‌گرم ایندول بوتیریک اسید اگرچه غلظت سایتوکینین از اکسین کمتر بود، ریشه‌زایی صورت نگرفت. پرتو و سانتارنوم (Pretto & Santarém, 2000) نیز محیط ۱/۲ MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشدی را به‌عنوان محیط مناسبی برای ریشه‌زایی این گیاه معرفی کرد. نتایج تحقیقات گریسون و همکاران

براساس نتایج این آزمایش، بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت ۱/۲ MS بدون هورمون مشاهده شد که در مقالات متعددی گزارش شده است، درحالی‌که در تیمار حاوی هورمون بنزیل آدنین بدون حضور ایندول بوتیریک اسید سبب عدم ریشه‌زایی گردید و بر افزایش میزان شاخه‌زایی و در نهایت پُرآوری مؤثر بود. همچنین در تیمار حاوی

کشت پایه MS ½ بدون حضور هورمون بیشترین میزان ریشه‌زایی را داشت.

نتایج این پژوهش نشان داد که محیط کشت بهینه به‌منظور کال‌زایی ریزنمونه ساقه گل راعی حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید و برای ریزنمونه برگ محیط کشت حاوی سه میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید است، همچنین محیط کشت بهینه به‌منظور باززایی ریزنمونه ساقه نیز حاوی سه میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی تیمارهای ریشه‌زایی نشان داد که ریشه‌زایی در محیط کشت فاقد هورمون و حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید دارای بیشترین میزان و بالاترین طول ریشه بود، درحالی‌که حضور بنزیل آدنین به همراه ایندول بوتیریک اسید سبب کاهش ریشه‌زایی و حضور بنزیل آدنین به تنهایی در محیط کشت سبب عدم ریشه‌زایی گردید.

روش‌های کشت بافت و سلول با اهداف مختلفی صورت می‌گیرد که نتایج به‌دست‌آمده از هر بخش می‌تواند کاربرد مؤثری را در مباحث پژوهشی دیگر از جمله کاربرد در راستای آزمایش‌های اصلاحی، فرآیندهای افزایش متابولیت‌های ثانویه ارزشمند و در نهایت در افزایش راندمان تولیدات تجاری و غیره ایفا نماید. لذا با معرفی روش‌های کارآمد و مؤثر می‌توان میزان تولید گیاهان (از طریق ریزازدیادی) را در مدت زمان کمتری افزایش داده و با اعمال الیسیتورهای مناسب، نتایج حاصل را به سمت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه هدایت نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر پاسخ گل راعی در شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیر می‌گذارند و مراحل مختلف کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی این گیاه به شرایط هورمونی متفاوتی نیاز دارند. به‌طور کلی، استفاده از اکسین و سایتوکینین بر القای کالوس مؤثر بود و با کاهش میزان اکسین، باززایی شاخساره افزایش یافت. همچنین، تفاوت در پاسخ ریزنمونه‌های برگ و ساقه نشان داد که نوع ریزنمونه یکی از عوامل مهم در موفقیت کشت‌بافت این گیاه است.

در مجموع، در این تحقیق پروتکل تکثیر درون‌شیشه‌ای گل راعی به‌طور مؤثری به دست آمد. همچنین مشخص شد که مراحل مختلف کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی گیاه به شرایط هورمونی متفاوتی نیاز دارد و لازم است هر مرحله به‌صورت جداگانه بهینه‌سازی شود. نتایج این تحقیق می‌تواند در مطالعات مربوط به تولید متابولیت‌های ثانویه و اصلاح گیاه این گیاه مورد استفاده قرار گیرد.

(Greeson et al., 2001) نشان داد که ریشه‌زایی در محیط کشت ½ MS و فاقد هورمون نسبت به محیط حاوی یک میلی‌گرم ایندول بوتیریک اسید بیشتر بوده است که با نتایج حاصل از این آزمایش مطابقت دارد. همچنین فرانکلین و همکاران (Franklin et al., 2007) نیز در تحقیقات خود روی *H. perforatum* از محیط مایع MS ½ استفاده کردند. در پژوهشی که توسط قاضیان و همکاران (Ghazian Tafrishi et al., 2006) صورت گرفت، مقادیر ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی و یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین بیشترین میزان کال‌زایی را داشت. در پژوهشی دیگر که توسط سالارووا و کیماکووا (Čellárová, & Kimakova, 1999) انجام شد، مشخص گردید که ایندول استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید بیشترین اثر را بر ریشه‌زایی گل راعی گذاشتند. همچنین در پژوهشی که توسط شرفی و همکاران (Sharafi et al., 2013) صورت گرفت، استفاده از توفوردی و بنزیل آدنین بر میزان کال‌زایی ریزنمونه ساقه مؤثر بود و تفاوت بین سطوح غلظت‌های اکسین و سایتوکینین بر میزان کالوس‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی مؤثر بوده، اگرچه در ریزنمونه‌های مختلف ریشه، ساقه و برگ میزان ریشه‌زایی با نتایج متفاوتی همراه بود، اما به‌طور کلی اعمال اکسین به‌تنهایی در محیط کشت سبب افزایش ریشه‌زایی گردید، درحالی‌که با ترکیب مقادیر اکسین و سایتوکینین در محیط کشت میزان ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های مختلف از جمله برگ و ساقه کاهش چشمگیری داشت که نتایج حاصل از این آزمایش را تأیید می‌کند. بررسی‌های صورت‌گرفته در مطالعات قبلی نشان داد که نتایج آزمایش‌های این مقاله با دستاوردهای پژوهش‌های صورت‌گرفته همسو بوده است (Schinazi et al., 1990). اگرچه تفاوت‌های جزئی در مقادیر هورمون‌های به‌کاررفته در تیمارهای این پژوهش با دیگر پژوهش‌های پیشین یافت شد (Kirakosyan, Sirvent et al., 2004). در پژوهشی که توسط بزو و استفانووا (Bezo & Stefunova, 2001) صورت گرفت، استفاده توأم از اکسین و سایتوکینین را بهترین شرایط برای باززایی شاخه در گل راعی معرفی نمود و محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید به همراه پنج میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین را بهترین محیط کشت برای تولید بیشترین تعداد شاخه بیان کرد که نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش تأییدکننده آن نیست. در این آزمایش، میزان باززایی با افزایش توفوردی اثر منفی را نشان داد و بیشترین سطح کالوس‌زایی در سه میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی در برگ و چهار میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲/۵ گرم بر لیتر توفوردی در ساقه گزارش شد. همچنین بیشترین میزان باززایی در سطح سه میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین برای برگ و چهار میلی‌گرم بر لیتر برای ساقه حاصل گردید. در نهایت محیط

References

1. Ayan, A.K., Çirak, C., Kevseroglu, K., & Sökmen, A. (2005). Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29(3), 197-204.
2. Azizi, M., Jafari Mofid Abadi, A., & Omid Beigi, R. (2002). Investigation of in vitro cultures of *Hypericum perforatum* L. in the production of hypericin and other secondary metabolites. *Research and Construction*, 15(1), 40-45. (In Persian)
3. Bezo, M., & Stefunova, V. (2001). Indirect regeneration of *Hypericum perforatum* L. under in vitro conditions. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 4, 277-279.
4. Čellárová, E., & Kimakova, K. (1999). Morphoregulatory effect of plant growth regulators on *Hypericum perforatum* L. seedlings. *Acta Biotechnologica*, 19(2), 163-169. <https://doi.org/10.1002/abio.370190210>
5. Çirak, C., Ayan, A.K., & Kevseroğlu, K. (2007). Direct and indirect regeneration of plants from internodal and leaf explants of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Plant Biology*, 50(1), 24. <https://doi.org/10.1007/BF03030596>
6. Franklin, G., Oliveira, M., & Dias, A.C.P. (2007). Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. *Plant Science*, 172(6), 1193-1203. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.02.017>
7. Ghazian Tafreshi, G., Azizi, M., & Farsi, M. (2006). Investigation of in vitro culture of Iranian St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 22(3), 172-179. (In Persian)
8. Greeson, J.M., Sanford, B., & Monti, D.A. (2001). St. John's wort (*Hypericum perforatum*), a review of the current pharmacological, toxicological and clinical literature. *Psychopharmacology*, 153(4), 402-414. <https://doi.org/10.1007/s002130000625>
9. Kirakosyan, A., Gibson, D.M., & Sirvent, T. (2004). A comparative study of *Hypericum perforatum* plants as sources of hypericins and hyperforins. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 10(4), 73-88. https://doi.org/10.1300/J044v10n04_08
10. Kirakosyan, A., Sirvent, T.M., Gibson, D.M., & Kaufman, P.B. (2004). The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39(1), 71-81. <https://doi.org/10.1042/BA20030144>
11. Kornfeld, A., Kaufman, P.B., Lu, C.R., Gibson, D.M., Bolling, S.F., Warber, S.L., Chang, S.C., & Kirakosyan, A. (2007). The production of hypericins in two selected *Hypericum perforatum* shoot cultures is related to differences in black gland structure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(1), 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.12.009>
12. Levin, G.A., & Hickman, J.C. (1993). The Jepson manual: Higher plants of California. California Botanical Society. California. <https://doi.org/10.2307/1223166>
13. Hickman, J.C. (Ed.) (1993). *The Jepson manual: Higher plants of California*. University of California press. Berkeley, CA.
14. Pretto, F.R., & Santarém, E.R. (2000). Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62(2), 107-113. <https://doi.org/10.1023/A:1026534818574>
15. Schinazi, R.F., Chu, C.K., Babu, J.R., Oswald, B.J., Saalman, V., Cannon, D.L., Eriksson, B.F., & Nasr, M. (1990). Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. *Antiviral Research*, 13(5), 265-272. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(90\)90071-E](https://doi.org/10.1016/0166-3542(90)90071-E)
16. Sharafi, E., Khayam Nekoe, S.M., Fotokian, M.H., Davoodi, D., & Hasanloo, T. (2013). Effect of different growth regulators levels and explants types of callogenesis and organogenesis *Hypericum perforatum* L. under in vitro condition. *Agricultural Biotechnology Journal*, 5(3), 57-66. (In Persian). <https://doi.org/10.22103/jab.2013.1212>
17. Tusevski, O., Stanoeva, J.P., Markoska, E., Brndevska, N., Stefova, M., & Simic, S.G. (2016). Callus cultures of *Hypericum perforatum* L. a novel and efficient source for xanthone production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(2), 309-319. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0951-3>
18. Upton, R. (1997). St. John's Wort, *Hypericum perforatum*: Quality control, analytical and therapeutic monograph. Santa Cruz, CA: American Herbal Pharmacopoeia 32 p. En *Hypericum perforatum*, medicines, review, Guttiferae, chemical analysis, laboratory tests (EBBD, 190107948).
19. Zhao, L., Liu, L., Wang, J., Guo, H., Gu, J., Zhao, S., Li, J., & Xie, Y. (2015). Development of a new wheat germplasm with high anther culture ability by using a combination of gamma-ray irradiation and anther culture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 120-125. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6691>