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

نگین افشار زاده؛ مجید عزیزی؛ لیلا سمیعی

دانشگاه فردوسی مشهد

DOI: 10.22067/jhs.2021.60331.0

چکیده

گل‌راعی با نام‌های فارسی هوفاریقون، هزارچشم و گل شهناز گیاهی چندساله و دارای مواد موثره با ارزشی همچون هایپریسین، سودوهایپریسین و هایپرفورین می‌باشد که از حیث اثرات ضدافسردگی، ضدسرطانی و افزایش ایمنی‌بدن اهمیت دارد. کاربرد تکنیک‌های کشت‌بافت در این گیاه بمنظور هدایت آن به سمت تولید مواد دارویی ارزشمند آن می‌باشد. لذا این پژوهش با هدف بهینه‌سازی محیط‌کشت در راستای تولید کالوس، باززایی و ریشه‌زایی صورت گرفت. این پژوهش به صورت دو آزمایش مجزا در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. آزمایش اول شامل شش تیمار هورمونی با سطوح متفاوتی از بنزیل‌آدنین و توفوردی برروی دو ریزنمونه برگ و ساقه، در 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 به منظور ریشه‌زایی به محیط‌کشت با چهار تیمار هورمونی شامل بنزیل‌آدنین و ایندول‌بوتیریک‌اسید انتقال یافتند. نتایج نشان داد، در آزمایش اول برای ریزنمونه برگ تیمار بنزیل‌آدنین با غلظت ۳ mg/l و توفوردی با غلظت ۲/۵ mg/l با ۹۸ درصد و برای ریزنمونه ساقه تیمار بنزیل‌آدنین با غلظت ۴ mg/l و توفوردی با غلظت ۲/۵ mg/l با ۹۵ درصد بیشترین میزان کال‌زایی را داشتند. از نظر باززایی نیز در ریز نمونه‌های برگ و ساقه به‌ترتیب تیمارهای حاوی ۴ mg/l و ۳ mg/l بنزیل‌آدنین ۸ و ۶۲ درصد باززایی نشان دادند. در آزمایش دوم نمونه‌های باززایی شده کالوس ساقه نیز در تیمار حاوی IBA با غلظت۱ mg/l و تیمار فاقد هورمون بیشترین

میزان ریشه‌زایی و در تیمار حاوی ۰/۵ mg/l بنزیل‌آدنین همراه با ۱ mg/l IBA و تیمار فاقد IBA به ترتیب ۱۰۰ و ۸۶ درصد پرآوری نشان دادند و ریشه‌زایی نداشتند.

کلمات کلیدی: بنزیل‌آدنین، برگ، ریشه‌زایی، ساقه، متابولیت‌های ثانویه

مقدمه

گل راعی گیاهی چندساله با نام علمی *Hypericum perforatum* و از خانواده Hypericaceae می‌باشد. جنس *Hypericum* بیش از ۴۵۸ گونه را شامل می‌شود که گونه *H. perforatum* گیاهی چندساله و کند رشد بوده و بومی آسیا، غرب اروپا و شمال آفریقا می باشد. این گیاه با نام انگلیسی St. John's Wort شناخته می‌شود.گل راعی حاوی ترکیبات بیولوژیکی قابل استخراج از جمله نفتودیانترون‌ها[۱]، فلوروگلوسینول‌ها[۲]، فلاوونوییدها[۳]، پروآنتوسیانیدین‌ها[۴]، تانن‌ها[۵]، اسانس[۶]، فنیل پروپانوئید[۷]، زانتون‌ها و دیگر ترکیبات قابل حل در آب می‌باشد(۱۲). همچنین این گیاه دارای مواد موثره از خانواده آنتراکوئینون‌های فعال نوری؛ هایپریسین، هایپرفورین و سودوهایپریسین است که دارای خواص ضدسرطانی، درمان زخم، ضدویروس، بهبود سوختگی، مسکن، ضدباکتری و موثر در درمان افسردگی‌های خفیف تا متوسط می باشد. مواد موثره گل راعی در بخش‌های هوایی شامل برگ، ساقه، گلپوش‌هاست. این مواد در غده‌های کوچک و سیاه رنگ در بخش‌های ساقه و برگ‌ها پراکنده‌اند که به صورت ساختارهای تیره در حاشیه برگ‌ها و گلبرگ‌ها ظهور می‌یابند. برطبق پژوهش‌های صورت گرفته مشخص گردید که ترکیبات موثره گل راعی در برابر رتروویروس‌ها مقابله می‌کند و به عنوان دارویی گیاهی جهت درمان ایدز پیشنهاد گردیده است (۱۲، ۱۴).

تاکنون روش‌های بسیاری به منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه مهم گل راعی با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و همچنین از طریق کشت در شرایط مزرعه ای و گلخانه‌ای صورت گرفته است. یکی از جدیدترین پژوهش‌های صورت گرفته توسط توسوسکی و همکاران که در سال ۲۰۱۶انجام گردید، براساس مقایسه میزان مواد موثره گل راعی در کشت درون شیشه‌ای و کشت در شرایط in vivo مشخص گردید که کالوس‌های حاصل حاوی ماده موثره دارویی تجاری و ارزشمند زانتون[۸] می‌باشند. این ماده دارویی به صورت اختصاصی در کالوس‌های این گیاه تولید می‌شود درحالی که در آنالیز ترکیبات حاصل از نمونه‌های رشد یافته در شرایط in vivo مشاهده نگردیده است(۱۶).

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 پروتکلی با راندمان بالا در جهت تولید کالوس‌های مناسب به منظور استخراج مواد موثره خاص و همچنین دست‌یابی به گیاهان باززایی شده جهت تکثیر انبوه و و انجام آزمایش‌هایی با اهداف اصلاحی در جهت بهبود میزان مواد موثره در گیاه گل راعی، از اهداف مورد بررسی در این پژوهش بوده است.

فابین راکوئل و همکاران (۱۳) به منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه برگ، کال‌زایی و باززایی آن را مورد آزمایش قرار داده و بعد از ۵ ماه در گلخانه سازگار نمودند. در پژوهشی دیگر آیان و همکاران(۲) باززایی مستقیم و غیرمستقیم گرهک ها و ریزنمونه‌های برگی گونه *H. bupleuroides* را مورد بررسی قرار دادند و توانستند بیش از ۹۰ درصد از گیاهچه‌های تولید شده

---

[۱] Naphthodianthrone
[۲] Phloroglucinol
[۳] Flavonoid
[۴] Procyanidin
[۵] Tannin
[۶] Essential oil
[۷] Phenilpropanoid

[۸] Xanthon

را سازگار نمایند. در سال ۲۰۰۶ نیز کامفلد و همکاران(۱۱) تحقیقاتی را در رابطه با ساختارهای گرهکی حاوی هایپریسین موجود در دو گروه مجزا از گیاه *H. perforatum* انجام دادند و با اندازه‌گیری صفات فیتوشیمیایی و مورفولوژیکی، وضعیت استقرار غدد سیاه رنگ در سلول‌های پیرامونی موجود در اندام‌های سازنده متابولیت های ثانویه را مورد بررسی قرار دادند. .عزیزی و همکاران (۳) نیز کشت درون شیشه‌ای گل راعی رقم توپاز[۹] را به منظور استخراج مواد موثره آن مورد بررسی قرار دادندکه مشخص شد متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های باززایی شده بیش از کالوس بود.

استخراج ماده موثره از کالوس باعث افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. افزایش مقدار و کیفیت ماده موثره، باعث کاهش نیاز به ماده خام اولیه و در نتیجه تسهیل و کاهش عملیات کشاورزی می شود (۷). همچنین مطالعه فرآیند کال‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گل راعی به عنوان تحقیقات بنیادی و پایه به منظور مطالعات انتقال ژن و تحقیقات بیوتکنولوژی ضروری است. همچنین محدودیت منابع طبیعی و پیچیدگی سنتز برخی ترکیبات دارویی و ارزش تجاری بالای آن ها سبب تولید این متابولیت‌ها از طریق کشت درون شیشه‌ای بوده و به منظور انتخاب ژرم پلاسم‌های برگزیده و گسترش تولیدات موثر متابولیت-های ثانویه مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد(۱۸). 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 (ریز ازدیادی) گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی، افزایش کیفیت و میزان ماده موثره در گل راعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در دو آزمایش مجزا در قالب طرح کاملا تصادفی در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید. بذر مورد استفاده در این تحقیق بذور توده بومی اردبیل بود که قبلا توسط مولف طی چندین سال کشت با شرایط آب و هوایی مشهد سازگار شد. آزمایش اول به صورت فاکتوریل بوده و شامل شش تیمار با غلظت‌های متفاوتی از هورمون‌های BA (۳ و ۴ میلی گرم بر لیتر) و 2,4-D (۰، ۱ و ۲/۵ میلی گرم بر لیتر) اجرا گردید. ریز نمونه‌های مورد بررسی در این آزمایش شامل برگ و میان‌گره بود. ریزنمونه‌های باززایی شده به منظور بررسی میزان ریشه‌زایی و پرآوری به آزمایش دوم شامل چهار تیمار با غلظت‌های مختلف از هورمون‌های BA و IBA انتقال یافتند.

۱- آزمایش اول

۱- ۱)کشت ریزنمونه ساقه

بدین منظور ابتدا از طریق کشت بذر *H. perforatum* در شرایط in-vitro گیاهچه‌های استریل تولید شد. بذرها با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) ضدعفونی و سپس ۳ مرتبه با آب مقطر استریل آبشویی شد و در محیط کشت MS بدون هورمون کشت گردید(تصویر ۱). پس از ۴ هفته ریز نمونه‌های مورد نظر از بخش ساقه شامل ۱ تا ۲ گره تهیه گردید و در محیط کشت MS با مشخصات زیر 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 بوده است. pH محیط کشت نیز۵/۷۰ تا ۵/۸۰ در نظر گرفته شد و در نهایت محیط مذکور در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده شامل BA با غلظت‌های (۳ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و 2,4-D با غلظت‌های (۰،۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر)بود و کشت‌های صورت گرفته در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفت.

[۹] Topaz

نور مورد استفاده در بازه ۱۳۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس در نظر گرفته شد. در هر پتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت، ۱۰ ریزنمونه قرار گرفت. صفات مورد بررسی تیمارهای اعمال شده در پایان هفته چهارم اندازه‌گیری شد (تصویر ۱، نمودار ۱).

۲- ۱) کشت ریز نمونه برگ

به منظور تهیه ریزنمونه‌های برگ از گیاهان رشد یافته در شرایط in vivo استفاده شد. جهت ضدعفونی ریزنمونه‌ها، هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۲۰ دقیقه و سپس ۳ مرتبه آبکشی با آب مقطر استریل صورت گرفت. هریک از نمونه‌های ضدعفونی شده به قطعات ۱۵ تا ۲۰ میلی‌متر مربع تقسیم و سپس در هر پتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت ۱۰ ریزنمونه قرار گرفت. محیط کشت به کار برده شده و غلظت تنظیم کننده‌های رشدی اعمال شده مشابه با مشخصات ذکر شده در بخش کشت ریزنمونه ساقه بود. صفات مورد بررسی بعد از چهار هفته ثبت گردید (تصویر ۲).

۲) آزمایش دوم

ریشه‌زایی

بدین منظور گیاهچه‌های باززایی شده حاصل از کالوس‌های ساقه به محیط کشت ½MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز ۰/۷ درصد آگار منتقل شدند. تنظیم کننده های رشدی مورد استفاده شامل غلظت‌های مختلفی از BA (۰ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) و IBA (۰ و ۱ میلی گرم بر لیتر) بود. اطلاعات تیمارها شامل طول ساقه، طول ریشه و میزان پرآوری در پایان هفته چهارم و هشتم ثبت گردید(تصویر ۳).

تجزیه و تحلیل داده ها

برای تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار JMP ، داده های آزمایش اول به صورت فاکتوریل و آزمایش دوم به صورت ساده در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شدند و سپس مقایسه میانگین ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول:

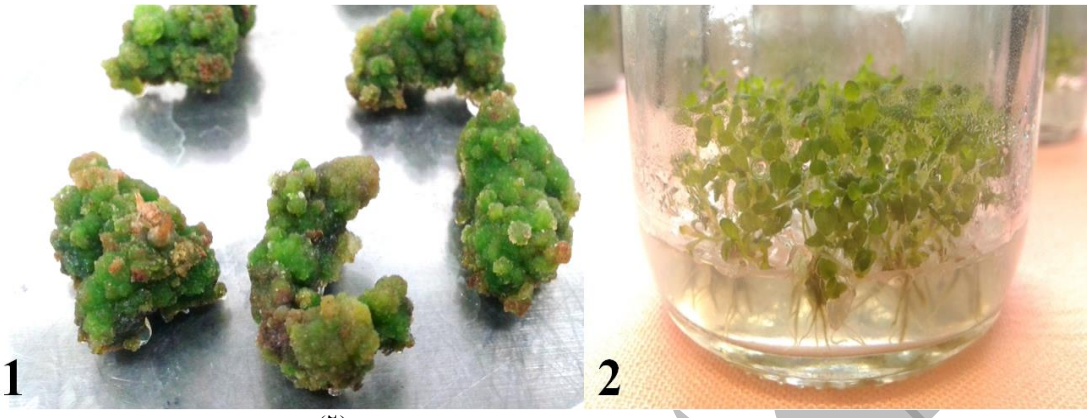
نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس در آزمایش اول نشان داد بین سطوح تیمارهای دو هورمون BA و 2,4-D و همچنین اثر متقابل دو فاکتور غلظت هورمون‌ها و ریز نمونه برگ و ساقه از نظر کال‌زایی تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت. همچنین نتایج نشان داد برهم‌کنش متقابل نور و تاریکی اثر معنی‌داری بر کال‌زایی دو ریزنمونه برگ و ساقه نداشته است (نمودار ۱).

از لحاظ باززایی نیز بین سطوح تیمارهای دو هورمون BA و 2,4-D بر هر دو ریزنمونه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد. همچنین بین اثر متقابل روشنایی و تاریکی و ریزنمونه ساقه تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد در حالی که فاکتور روشنایی و تاریکی بر ریزنمونه برگ اثر معنی‌داری نداشت.

۱- ۱) کال‌زایی ریزنمونه ساقه

بررسی ریزنمونه‌های کشت شده ساقه نشان داد پس از ۱۰ روز القای کالوس آغاز گردیده و تا پایان هفته چهارم کالوس‌ها تولید می‌شوند. رنگ کالوس‌ها بر اساس شرایط تاریکی و نور و همچنین سطوح مختلف هورمونی، طیفی از سبز کم‌رنگ و

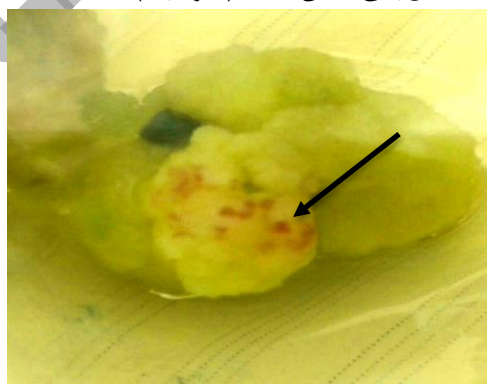
شیری رنگ تا سبز تیره داشتند. در ریز نمونه ساقه تیمار حاوی mg/l ۴ بنزیل آدنین و mg/l ۲/۵ توفوردی با ۹۵ درصد کال-زایی و تیمار حاوی mg/l ۳ بنزیل آدنین و mg/l ۱توفوردی با ۸۶ درصد کال‌زایی بیشترین درصد تولید کالوس را داشت و کمترین میزان کال‌زایی در تیمار mg/l ۴بنزیل آدنین و فاقد توفوردی ثبت شد (تصویر ۱، نمودار ۱).



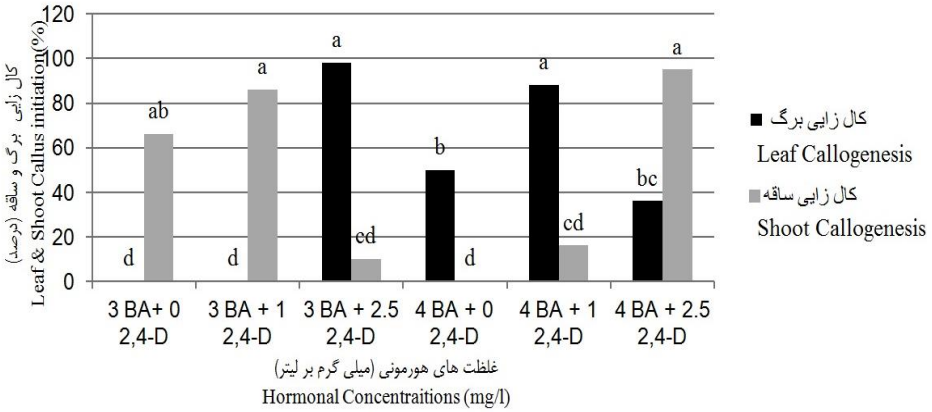
تصویر ۱- کال‌زایی ساقه (۱)، گیاهچه های بذری استریل(۲)
Image 1 – Shoot Callogenesis (1), sterile seedling (2)

۲- ۱) 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 به منظور کال‌زایی ریزنمونه برگ، تیمار حاوی mg/l ۳ بنزیل آدنین و mg/l ۲/۵ توفوردی با ۹۵ درصد کال‌زایی و پس از آن تیمار حاوی mg/l ۴ بنزیل آدنین و mg/l ۱ توفوردی با ۸۸ درصد کال‌زایی بوده است که بیشترین درصد کال‌زایی در ریزنمونه برگ را نشان دادند. همچنین کمترین درصد تولید کالوس در تیمار mg/l ۳ بنزیل آدنین و فاقد توفوردی بود. بر روی کالوس های رشد یافته ریز نمونه برگ وجود نقاط قرمز رنگ حاوی متابولیت‌های ثانویه به وضوح قابل مشاهده بود (تصویر ۲،نمودار ۱).در تیمار حاوی mg/l ۴ بنزیل آدنین و mg/l ۲/۵ توفوردی هر دو ریزنمونه برگ و ساقه کال‌زایی نشان دادند (نمودار ۱).



تصویر ۲ : کال‌زایی برگ (پیکان در شکل نشان دهنده نقاط قرمز تولید کننده متابولیت‌های ثانویه در گل راعی است)
Image 2: Leaf Callogenesis
Sign in image shows the dots that produced secondary metabolites



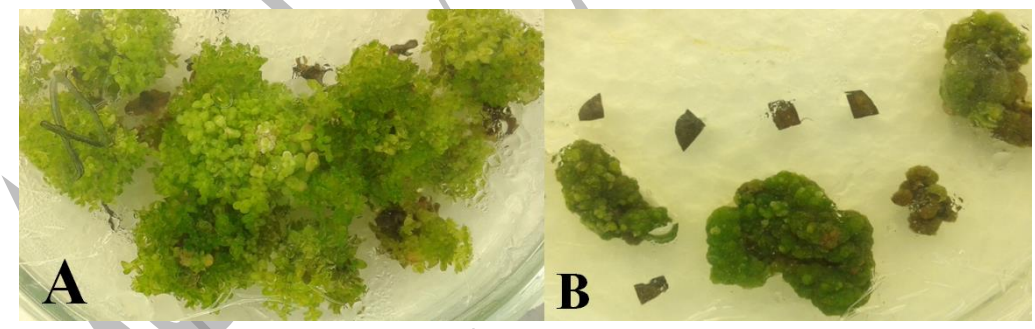
نمودار۱–اثر تیمارهای هورمونی بر میزان کال زایی برگ و ساقه

Figure 1 – Effect of hormone Treatments on Leaf & shoot Callogenesis

۲- ۱)باززایی ریزنمونه برگ و ساقه

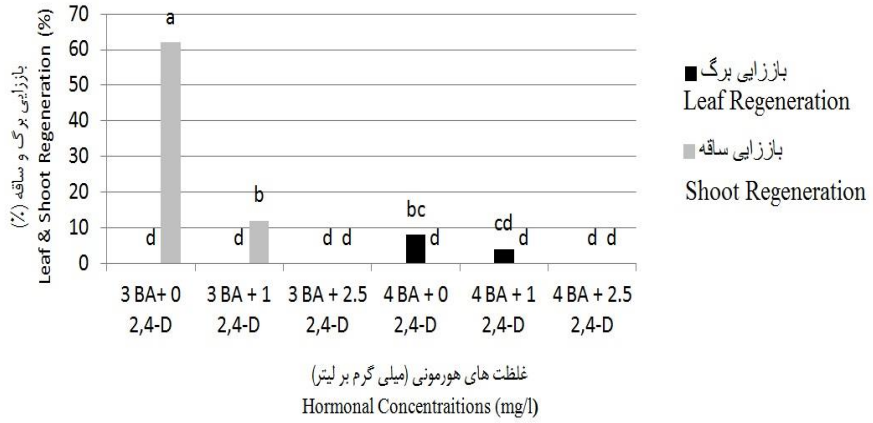
نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس نشان داد اثر دو فاکتور روشنایی و تاریکی و سطوح هورمون‌های بنزیل‌آدنین و توفوردی بر میزان باززایی ریزنمونه ساقه در سطح احتمال ۵ درصد دارای تفاوت معنی دار بوده و بر ریزنمونه برگ بی‌تاثیر بوده است.

در کالوس های حاصل از ریزنمونه ساقه تیمار حاوی mg/l ۳ بنزیل آدنین و فاقد توفوردی در شرایط روشنایی با ۶۲ درصد بیشترین میزان باززایی را نشان داد و تیمار حاوی mg/l ۴ بنزیل‌آدنین و فاقد توفوردی در ریز نمونه برگ ۸ درصد باززایی را نشان داد (تصویر ۳، نمودار ۲). همچنین اثر کلی سطوح هورمونی تیمارها نشان داد تیمار حاوی mg/l ۳ بنزیل آدنین وفاقد توفوردی درهر دو ریز نمونه برگ و ساقه سبب باززایی شد (نمودار ۳).



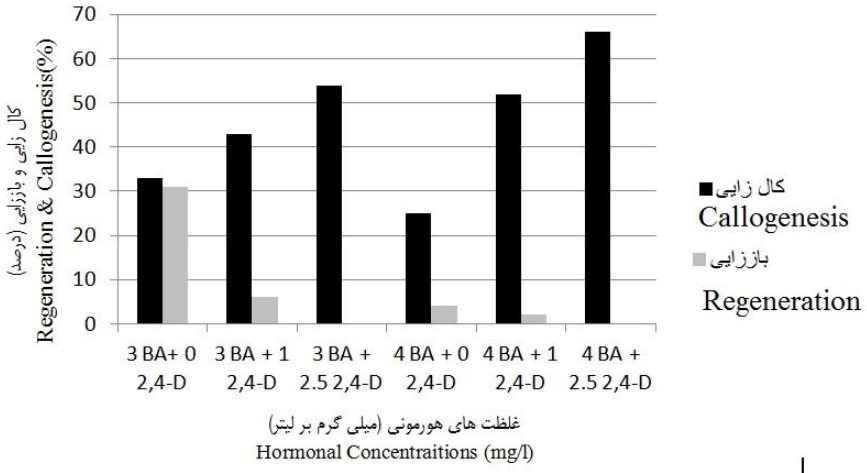
تصویر ۳– باززایی ساقه (A)، باززایی برگ (B)،

Image 4 - Shoot regeneration, Leaf regeneration (B)



نمودار ۲- اثر تیمارهای هورمونی بر میزان باززایی برگ و ساقه

Figure 2 – Effect of hormone Treatments on Leaf & shoot regeneration



نمودار ۳-اثر تیمارهای هورمونی بر میزان کال_زایی و باززایی

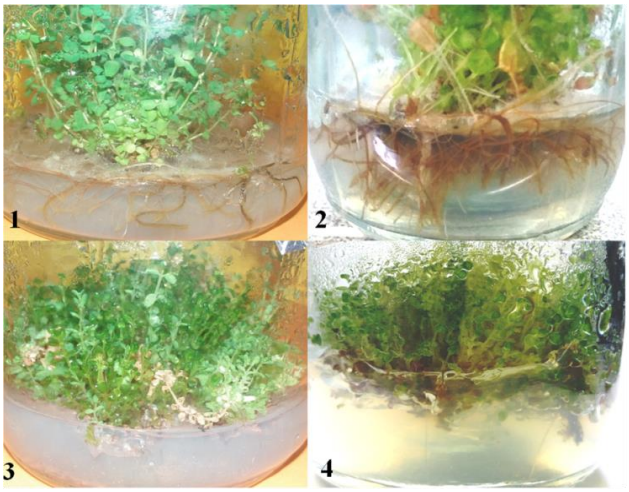
Figure 3 – Effect of hormone Treatments on Regeneration & Callogenesis

۲) نتایج آزمایش دوم(ریشه زایی)

آزمایش دوم:

اثر سطوح تیمار هورمون‌های IBA و BA بر میزان ریشه‌زایی گیاهان در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بوده و بر میزان پرآوری،طول گیاهچه‌ها و طول ریشه نیز اثر گذار بوده است.

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد ؛ سطوح تیمار هورمون های IBA و BA اعمال شده سبب اثر بر طول ساقه و طول ریشه و همچنین بر میزان پرآوری گیاهچه‌ها شده و تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد بیان می‌کند (نمودار ۴ و ۵).

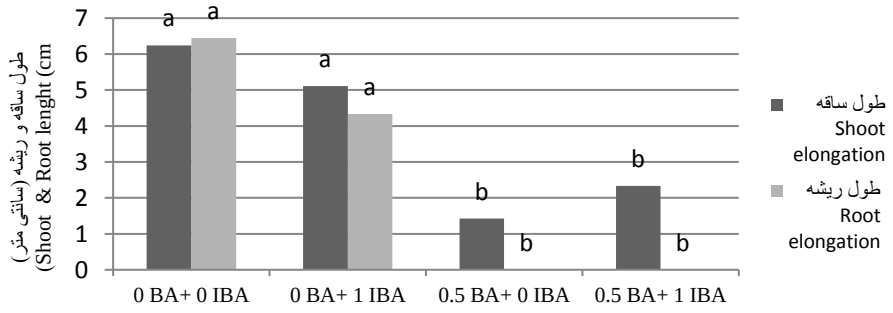


تصویر ۳- وضعیت ریشه زایی در؛ تیمار فاقد هورمون(۱)، تیمار ۱ mg/l ایندول بوتیریک اسید (۲)، تیمار ۰/۵ mg/l بنزیل آدنین(۳)، تیمار ۰/۵ mg/l بنزیل آدنین و ۱ mg/l ایندول بوتیریک اسید

Image 3- Rooting in treatment; Culture without hormones(1), Culture with 1 mg/l IBA(2), Culture with 5/0mg/l BA(3), Culture with 5/0mg/l BA & 1 mg/l IBA(4)

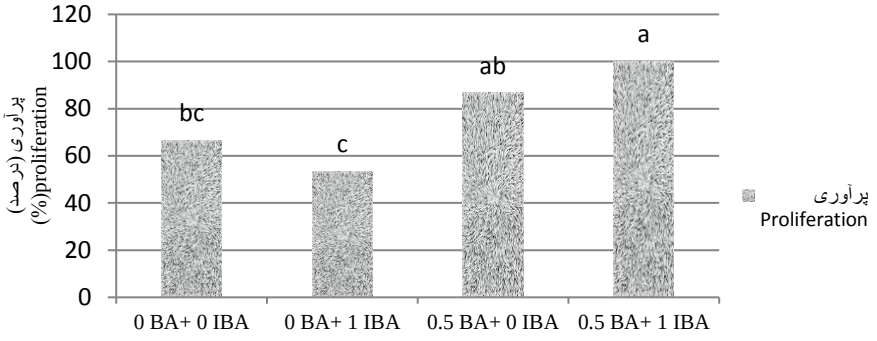
بررسی نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس نشان داد؛ اثر سطوح هورمون BA و IBA بر طول ساقه در تیمار فاقد هورمون با میانگین ۶/۲۴ سانتی‌متر تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد با تیمار حاوی ۰/۵ میلی گرم BA به تنهایی و تیمار حاوی ۰/۵ میلی گرم BA و ۱ میلی گرم IBA با میانگین ۱/۸ سانتی‌متر نشان داد (نمودار ۴).

همچنین اثر سطوح هورمون BA و IBA بر افزایش طول ریشه ها نشان داد تیمارهای فاقد هورمون و تیمار حاوی ۱ میلی گرم IBA با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشت در حالی که با تیمار حاوی ۰/۵ میلی گرم BA به تنهایی و تیمار حاوی ۰/۵ میلی گرم BA و ۱ میلی گرم IBA دارای تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بود. بیشترین میزان ریشه‌زایی در تیمار فاقد هورمون با حداقل میانگین طولی ۶/۲ سانتی متر و سپس تیمار حاوی ۱ میلی گرم IBA با حداقل میانگین طولی ۴,۳ سانتی متر ثبت شد. دو تیمار حاوی ۰/۵ میلی گرم BA به تنهایی و حاوی ۰/۵ میلی گرم BA و ۱ میلی گرم IBA ریشه زایی قابل اندازه گیری از خود بروز ندادند، در حالی که میزان پرآوری آن‌ها به ترتیب ۱۰۰ و ۸۷ درصد بوده و بیشترین میزان پر آوری را داشتند (بیش از ۵۰ ساقه در هر ۳ سانتی‌متر مربع). تیمار فاقد هورمون و تیمار حاوی ۱ میلی گرم IBA نیز به ترتیب ۶۷ و ۵۳ درصد پرآوری را نشان دادند (تصویر ۳، نمودار ۴ و ۵).



نمودار ۴-اثر تیمارهای هورمونی بر طول ساقه و ریشه

Figure 4 – Effect of hormone Treatments on Shoot & Root Length



نمودار ۵–اثر تیمارهای هورمونی بر میزان شاخه‌زایی(پرآوری)

Figure 5 – Effect of hormone Treatments on multiplication (proliferation)

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، برای ریشه زایی محیط کشت MS ۱/۲ بدون استفاده از هورمون، بیشترین میزان ریشه زایی را داشت که در مقالات متعددی گزارش شده است در حالی‌که در تیمار حاوی هورمون BA بدون حضور IBA سبب عدم ریشه زایی گردید و بر افزایش میزان شاخه‌زایی و در نهایت پرآوری موثر بود. همچنین در تیمار حاوی ۰/۵ میلی گرم BA و ۱ میلی گرم IBA اگرچه غلظت سایتوکینین از اکسین کمتر بود، ریشه‌زایی صورت نگرفت.

پرتو و همکاران (۱۳) نیز محیط MS ½ فاقد تنظیم کننده های رشدی را به عنوان محیط مناسبی برای ریشه زایی این گیاه معرفی کرد. نتایج تحقیقات فابین راکوئل و همکاران (۱۳) نشان داد ریشه زایی در محیط کشت MS ½ و فاقد هورمون نسبت به محیط حاوی ۱ میلی گرم IBA بیشتر بوده است که با نتایج حاصل از این آزمایش مطابقت دارد. همچنین فرانکلین و همکاران (۶) نیز در تحقیقات خود بر روی *H. perforatum* از محیط مایع MS ½ استفاده کردند. در پژوهشی که توسط قاضیان و همکاران (۷) صورت گرفت در مقادیر ۰/۵ mg/l و ۰/۲۵ mg/l 2,4-D و ۱میلی‌گرم برلیتر BA بیشترین میزان کال‌زایی را داشت. در پژوهشی دیگر که توسط سلاروا و کیماکووا (۵) انجام شد، مشخص شد IAA و IBA بیشترین اثر را بر ریشه‌زایی گل راعی می‌گذارند. همچنین در پژوهشی که توسط شرفی و همکاران (۱۵) صورت گرفت استفاده از 2,4-D و BA بر میزان کال‌زایی ریز نمونه ساقه موثر بود و تفاوت بین سطوح غلظت‌های اکسین و سایتوکینین بر میزان کالوس زایی، شاخه زایی و ریشه زایی موثر بوده، اگرچه در ریزنمونه های مختلف ریشه، ساقه و برگ میزان ریشه زایی با نتایج متفاوتی همراه بود، اما به طور کلی اعمال اکسین به تنهایی در محیط کشت سبب افزایش ریشه زایی گردید در حالی که با ترکیب مقادیر اکسین و سایتوکینین در محیط کشت میزان ریشه زایی در ریزنمونه های مختلف از جمله برگ و ساقه کاهش چشمگیری داشت که نتایج حاصل از این آزمایش را تایید می‌کند. بررسی‌های صورت گرفته در مطالعات قبلی نشان داد نتایج آزمایش‌های این مقاله با دستاوردهای پژوهش‌های صورت گرفته همسو بوده است. اگرچه تفاوت‌های جزیی در مقادیر هورمون‌های به کار رفته در تیمارهای این پژوهش با دیگر پژوهش‌های پیشین یافت شددر پژوهشی که توسط بنزو و استفانووا (۴) صورت گرفت استفاده توام از اکسین و سیتوکنین را بهترین شرایط برای باززایی شاخه در گل راعی معرفی نمود و محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به همراه ۵ میلی گرم بر لیتر BA را بهترین محیط کشت برای تولید بیشترین تعداد شاخه بیان کرد که نتایج بدست آمده در این پژوهش تایید کننده آن نیست. در این آزمایش میزان باززایی با افزایش توفوردی اثر منفی را نشان می دهد و بیشترین سطح کالوس‌زایی در۳ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲,۵ میلی گرم بر لیتر توفوردی در برگ و ۴ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۲,۵ گرم بر لیتر توفوردی درساقه گزارش شد. همچنین بیشترین میزان باززایی در سطح ۳ میلی گرم بر لیتر بنزیل

آدنین برای برگ و ۴ میلی گرم بر لیتر برای ساقه حاصل شد. در نهایت محیط کشت پایه MS ۱/۲ بدون حضور هورمون بیشترین میزان ریشه زایی را داشت.

نتایج این پژوهش نشان داد، محیط کشت بهینه به منظور کالزایی ریز نمونه ساقه گل راعی حاوی ۴ میلی گرم بر لیتر BA و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و برای ریز نمونه برگ محیط کشت حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر BA و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA است، همچنین محیط کشت بهینه به منظور باززایی ریزنمونه ساقه نیز حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر BA می باشد. نتایج حاصل از بررسی تیمارهای ریشه‌زایی نشان داد، ریشه زایی در محیط کشت فاقد هورمون و حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA دارای بیشترین میزان و بالاترین طول ریشه ثبت گردید، در حالی که حضور BA به همراه IBA سبب کاهش ریشه زایی و حضور BA به تنهایی در محیط کشت سبب عدم ریشه زایی گردید.

روش های کشت بافت و سلول با اهداف مختلفی صورت می گیرد که نتایج بدست آمده از هر بخش می تواند کاربرد موثری 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 روش های کارآمد و موثر می‌توان میزان تولید گیاهان (از طریق ریز ازدیادی) را در مدت زمان کمتری افزایش داده و با اعمال الیسیتورهای مناسب نتایج حاصل را به سمت افزایش تولید متابولیت های ثانویه هدایت نمود.

نسخه پیش انتشار

منابع

1. Ayan A.K., Çirak C., Kevseroglu K., and Sökmen A. 2005. Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytoharmones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum L*. Turkish journal of agriculture and forestry, 29(3):197-204.
2. Ayan A.K., and KevseroĞlu K. 2007. Direct and indirect regeneration of plants from internodal and leaf expiants of *Hypencum bupleuroides gris*. Journal of Plant Biology, 50(1):24.

3. Azizi M., Jafari Mofid Abadi A., and 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)

4. Bezo M., and Stefunova V. 2001. Indirect regeneration of *Hypericum perforatum L.* under in vitro conditions. Acta Fytotechnica et Zootechnica, 4:277-279.

5. Čellárová E., and Kimakova K. 1999. Morphoregulatory effect of plant growth regulators on *Hypericum perforatum L.* seedlings. Engineering in Life Sciences, 19(2):163-169.

6. Franklin G., Oliveira M., and 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.

7. Ghazian Tafrishi 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, 3(33):172- 179. (in Persian with English abstract)

8. Greeson J.M., Sanford B., and 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.

9. Kirakosyan Ara., Gibson D.M., and 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.

10. Kirakosyan Ara., Sirvent T.M., Gibson D.M., and 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.

11. Kornfeld A., Kaufman Peter B.L., Casey R., Gibson D.M, Bolling S.F., Warber S.L., and 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.

12. Levin G.A., and Hickman J.C. 1993. The Jepson manual: higher plants of California. California Botanical Society.California

13. Raquel P.F., and Romanato S.E. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62(2):107-113.

14. Schinazi, R.F., Chu C.K., Babu J.R., Oswald B.J., Saalmann V., Cannon D.L., Eriksson B.F., and Nasr M. 1990. Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. Antiviral research, 13(5):265-272.

15. Sharafi E., Khayam Nekoe S.M., Fotokian M.H., Davoodi D. and Hasanloo T. 2013. Investigating the effect of growth regulators and different explants on callogenesis and organization of *Hypericum perforatum* under in vitro conditions. Agricultural Biotechnology Journal.5(3):57-66.(in Persian)

16. Tusevski O., Stanoeva J.P., Markoska E., Brndevska N., Stefova M., and 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

17. Upton R. 1997. St. John's Wort, *Hypericum perforatum*: Quality control, analytical and therapeutic monograph. Santa Cruz, CA: American Herbal Pharmacopoeia 32p. En Hypericum_perforatum, medicines, review, Guttiferae, chemical_analysis, laboratory_tests (EBBD, 190107948).

18. Zhao L., Liu L., Wang J., Guo H., Gu J., Zhao S., Li J., and 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.

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

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, flavonoides and also has valuable compounds such as Hypericin, Hyperforin, Pseudohypericin and xanthones that have effect on human physiology. Aerial parts of *H. perforatum* are dotted with dark glands that appear as black or red 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 r 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 plan was a completely randomized in the form of a factorial. Second experiment plan was completely random.
First part of experiment : this part was conducted with two explants, leaf and shoot, maintained in light and dark condition. Shoot explants were derived from sterile seedlings that was obtained from seeds 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 explants cultured on MS media supplemented with BA (3 and 4 mg/l) and 2,4-D (0, 1 and 2.5 mg/l). Callogenesis and regeneration was measured after 4 weeks.
Second part of experiment: shoot of indirect regeneration for rooting study, were cultured on ½ MS media supplemented with BA (0 and 5/0 mg/l) and IBA (0 and 1 mg/l). 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 Medium supplemented with 4 mg/l BA and 2.5 mg/l 2, 4-D showed 95% Callogenesis. Leaf explants Medium supplemented with 3 mg/l BA and 2.5 mg/l 2, 4-D showed 98% Callogenesis. Shoot explants Medium supplemented with BA 3 mg/l showed 62% regeneration and leaf explants Medium supplemented with BA 4 mg/l showed 8% regeneration.
For second part of experiments; root induction on half strength medium without hormone and medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 1 mg/l IBA had highest rooting frequencies. Average of root length was registered 5.25 cm. half strength medium supplemented with 0.5 mg/l BA had 100% and also, medium with 0.5 mg/l BA and 1 mg/l 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 BA and 1 mg/l IBA was registered 6.24 cm and in media with 0.5 mg/l BA and 1 mg/l IBA was registered 1.8 cm. based on result of this experiments, the concentration levels of the two hormone 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 BA and 1 mg/l 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: 6-Banzy adenine, leaf, rooting, secondary metabolites, shoot

نسخه پیش انتشار