بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای برای کالوس‌زایی گیاه گل راعی بومی ایران (*Hypericum perforatum* L.)

منیزه عبدالله پور؛ مجید عزیزی؛ سیامک کلانتری؛ یوسف علی سعادت

DOI: 10.22067/jhs.2021.59629.0

چکیده

گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی می‌باشد که در درمان افسردگی و سردردهای عصبی به کار برده می‌شود. این تحقیق با هدف بهینه‌سازی کالوس‌زایی در گیاه گل راعی در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام گردید. به منظور مطالعه و بررسی وضعیت کالوس‌زایی در گیاه گل راعی بومی ایران (توده آزاد شهر) از ریز نمونه‌های برگ و ساقه حاصل از شاخساره‌های درون شیشه‌ای این گیاه استفاده شد. ریز نمونه‌ها در 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 شدند. کالوس‌ها در ریزنمونه برگ در شرایط تاریکی رشد بیشتری داشته و بیشترین وزن‌تر کالوس (۲/۳۰ گرم) در تیمارهای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + یک میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + یک میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد. کالوس‌های بدست 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 ۴ غلظت پلی‌ونیل پیرولیدین (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم در لیتر پلی‌ونیل پیرولیدین و در ریزنمونه برگ به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: گل راعی، کالوس‌زایی، تنظیم کننده‌های رشد، قهوه‌ای شدن، پلی‌ونیل پیرولیدین

مقدمه

روند رو به رشد 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 برای کنترل تولید هزاران متابولیت ثانویه مفید را ایجاد کرده است و از این طریق می‌توان ترکیبات دارویی خاص را با سرعتی مشابه یا بالاتر از گیاه سالم تولید نمود (۲). 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 (۱۶). ایران با وسعت زیاد و آب و هوای متنوع جز 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، 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 گیاهان دارویی ارزشمند و مهم خانواده Hypericaceae می‌باشد. جنس گل راعی بیش از ۴۶۹ گونه در جهان دارد که ۱۹ گونه آن تاکنون در ایران گزارش شده است (۷،۱). گیاه گل راعی دارای متابولیت ثانویه مهمی از جمله نفتودیانترون‌ها (هیپریسین و سودوهیپریسین)، آسیل فلورو گلوگسینول‌ها (هیپرفورین و آدهیپرفورین)، زانتون‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد (۲۲). به دلیل پتانسیل بالای این گیاه در درمان برخی از بیماری‌های مهم به‌ویژه افسردگی اکنون تقاضا برای ترکیبات حاصله از این گیاه در حال افزایش است (۱۵). القای کالوس می‌تواند برای بیوسنتز تولیدات طبیعی این گیاه مانند هیپریسین مفید باشد و از این طریق امکان تولید متابولیت‌های ثانوی گیاه گل راعی در سطح وسیع فراهم می‌گردد (۳).

پاسخ‌های مورفوژنتیک کشت بافت گل راعی وابسته به نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و شرایط نوری دارد. برای تولید کالوس در گل راعی از ریزنمونه‌های مختلف مانند برگ، ساقه، هیپوکوتیل و قطعات گره به طور معمول در محیط کشت MS (۱۷) استفاده شده است. ترکیب اکسین و سیتوکینین برای القا کالوس در گل راعی مفید می باشد (۸). توسی و همکاران (۲۵) از تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D[۱] ، کینیتین (Kin)[۲] و نفتالین استیک اسید (NAA)[۳] برای القای کالوس‌زایی در گل راعی استفاده کرده‌اند. پرتتو و سانتارم (۲۱) کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ گل راعی 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 عزیزی (۱۲) کالوس زایی و شاخه‌زایی در 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 بدست آمد. کشت ریزنمونه برگی 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 (۹).

این مطالعه با هدف بهینه‌سازی محیط کشت از نظر نوع و مقدار استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای کالوس‌زایی گیاه گل راعی بومی ایران انجام گرفت. افزون بر این اثر نور، محیط کشت و ترکیب پلی‌ونیل پیرولیدین (PVP)[۵] برای افزایش کیفیت کالوس‌های تولید شده بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

اثر ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی

[۱] 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
[۲] Kinetin
[۳] Naphthaleneacetic acid (NAA)
[۴] Benzylaminopurine (BA)
[۵] Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP)

به منظور مطالعه و بررسی وضعیت کالوس‌زایی در گیاه گل راعی بومی ایران از بذرهای توده آزاد شهر استفاده شد. با توجه به کند بودن جوانه‌زنی بذرهای گل راعی، برای تحریک جوانه‌زنی، بذرها به مدت سه روز با آب جاری شستشو داده شدند همچنین استفاده از وایتکس ۶۰ درصد جهت ضد عفونی نیز در تحریک جوانه زنی موثر بود. برای تهیه ریز نمونه‌های برگ و ساقه، بذرها پس از ضدعفونی در محیط کشت MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک استیک اسید (IBA)[۱] کشت گردیدند.

برای بررسی اثر ریز نمونه و تنظیم کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی گل راعی، این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار و ۴ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. تیمارها شامل دو ریز نمونه (برگ و ساقه)، غلظت‌های مختلف 2,4-D و دو سیتوکینین BA و Kin بودند. برگ‌ها به‌طور کامل و قطعات ساقه‌ها به طول ۱/۵-۱سانتی‌متر 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 گردیدند. تیمار شاهد فاقد تنظیم کننده رشد بود. نمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی منتقل شدند. pH محیط‌های کشت قبل از اتوکلاو، روی ۰/۱±۵/۷ تنظیم گردید و ضدعفونی محیط‌های کشت توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱/۵ کیلوگرم در متر مربع به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. بازکشت ریز نمونه‌ها 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. درصد کالوس‌زایی بر اساس درصد ریز نمونه‌هایی که در آن‌ها کالوس‌زایی مشاهده گردید، تعیین شد. حجم کالوس‌های حاصل با اندازه گیری ابعاد کالوس با استفاده از کاغذ میلیمتری و و وزن تر نیز با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ مشخص گردید.

از آنجایی‌که کالوس‌های تولید شده 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

[۱] Indolebutyric acid (IBA)

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 به شرح زیر انجام گرفت.

اثر نور و محیط کشت بر کالوس‌زایی

برای بررسی اثر شرایط نوری (روشنایی و تاریکی) و محیط کشت (MS و MS همراه با ویتامین‌های محیط کشت B5) بر کالوس‌زایی گل راعی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار و ۵ ریز نمونه در هر تکرار برای دو ریز نمونه برگ و ساقه انجام شد. با توجه به نتایج آزمایش قبلی، تیمارهای مناسب از تنظیم کننده‌های رشد برای القای کالوس‌زایی انتخاب شدند که در این آزمایش برای ریز نمونه‌های برگی تیمارهای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ 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 ریز نمونه‌های 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 گردیدند. از محیط کشت MS با ترکیب ویتامین‌های توصیف شده توسط موراشیک و اسکوگ (۱۷) و محیط کشت MS با ویتامین‌های محیط B5 (۱۱) استفاده گردید. ریزنمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد با شرایط تاریکی و روشنایی ضعیف (دارای یک لامپ مهتابی سفید) منتقل شدند. بازکشت ریزنمونه‌ها در فواصل زمانی هر ۱۵ روز انجام گردید و ۱۲ هفته پس شروع کشت تعداد روز تا القا کالوس، درصد کالوس‌زایی و حجم و وزن تر کالوس اندازه‌گیری شد.

اثر پلی‌ونیل پیرولیدین برکالوس‌زایی

پلی‌ونیل پیرولیدین یک ترکیب جاذب پلی‌فنل‌ها می‌باشد که به‌طور معمول برای جذب مواد فنلی استفاده می‌گردد (پیک کیونگ، ۲۰۰۸). برای کنترل قهوه‌ای شدن در کشت کالوس‌هایی گل راعی، در این آزمایش از ۴ غلظت PVP (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدورلیز شده 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 میلی

گرم در لیتر BA با استفاده از دو ریزنمونه برگ و ساقه بررسی شد. این آزمایش به صورت طرح فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار و ۵ ریز نمونه در هر تکرار انجام شد. بازکشت ریزنمونه‌ها در فواصل زمانی هر ۲۰ روز انجام گردید و ۸ هفته پس شروع کشت تعداد روز تا القا کالوس، درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس و همچنین میزان قهوه‌ای شدن کالوس‌های حاصل ثبت شد.

تمام ترکیبات و تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیگما خریداری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

مقایسات میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم افزار آماری SAS انجام شد.

نتایج و بحث

اثر ریز نمونه و تنظیم کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی گل راعی بومی ایران

در این مطالعه برای تولید کالوس از تنظیم کننده‌های 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. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، زمان آغاز کالوس‌زایی، درصد کالوس‌زایی، وزن و حجم کالوس‌ها در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر تنظیم کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه قرار گرفتند. القای کالوس در تمام تیمارهای هورمونی مورد مطالعه به‌جز تیمار شاهد بعد از ۱۰ تا ۱۷ روز مشاهده شد. در این آزمایش بین ریزنمونه‌های برگ و ساقه در سطوح مختلف از تنظیم کننده‌های 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 (۱۳).

نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از تنظیم کننده‌های 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 غلظت-های نسبتا بالا هم به عنوان محرک و هم بازدارنده تقسیم سلولی عمل می‌کند و سلول‌ها با غلظت بالای 2,4-D به مرحله رکود می روند که سبب عدم رشد کالوس می‌گردد (۱۰). این نتایج مشابه با گزارش‌های قبلی در خصوص کالوس‌زایی گل راعی با استفاده از ترکیبات مختلف اکسین و سیتوکینین است (۲۱).

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 به ترتیب ۲/۳۰، ۲/۰۹ گرم و ۱/۴۳ و ۱/۱ سانتی‌متر مکعب بود. کمترین وزن تر کالوس در ریزنمونه برگ و ساقه در غلظت ۱ میلی-گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. پرتتو و سانتارم (۲۱) نیز گزارش کرده‌اند که رشد کالوس در گل راعی به شدت به وسیله تنظیم کننده‌های رشد مختلف تحت تأثیر قرار می‌گیرد و 2,4-D به تنهایی نتیجه مثبتی در تولید کالوس ندارد و باعث نکروزه شدن نمونه‌ها بعد از سه هفته می‌شود. قاضیان و عزیزی (۱۲) در مطالعه بر روی گل راعی بومی ایران توده اردبیل نیز بیان کردند که با افزایش مقدار NAA، تولید کالوس کاهش پیدا می‌کند. کیبر و اسچالر (۱۴) گزارش کرده‌اند که سیتوکینین خارجی متابولیسم اکسین داخلی را بوسیله کاهش فعالیت آنزیم ایندول استیک اسید–اکسیداز تغییر می‌دهد و سطوح بالای ایندول استیک اسید رشد سلول را با افزایش ساخت RNA و متعاقبا سنتز پروتئین‌ها القا 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 بدست آمده است (۵). در *H. erectum* القای کالوس در کشت دانهال در حضور ایندول استیک اسید (IAA)[۱] و BA در شرایط تاریکی گزارش شده است (۲۷).

[۱] Indole-3-acetic acid (IAA)

جدول ۱- اثر نوع ریز نمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی گل راعی بومی ایرانی.

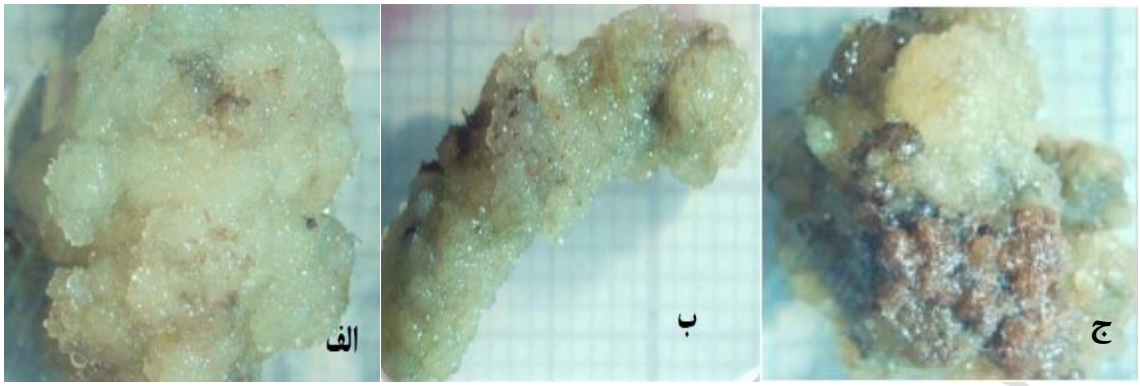
Table 1- Effects of explant type and plant growth regulator on callus induction of Iranian *H. perforatum.*

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

*Values followed by different letters are significantly different according to Duncan test at $P \leq 0.05$.

وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

کالوس‌های تولید شده در این مطالعه کرم‌رنگ بوده و حالت فشرده داشتند (شکل۱ الف و ب) و نقاط قرمز که در مطالعات قبلی در کالوس‌زایی گل راعی گزارش شده بود (۳) در این کالوس‌ها مشاهده نشد که احتمالا به دلیل نبود نور در طول مرحله کالوس‌زایی می‌باشد. کالوس‌های تولید شده پس از ۱۰ تا ۲۰ روز شروع به قهوه‌ای شدن گردیدند (شکل ۱ ج). بر اساس گزارش نو و همکاران (۱۸) محتوی هیپریسین در کالوس‌های قهوه‌ای شده گل راعی ۷/۵ تا ۹ برابر بیشتر از کالوس‌هایی است که رشد بهتری دارند.



شکل ۱– الف : کالوس حاصل از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱میلی‌گرم در لیتر Kin ، ب : کالوس حاصل از ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر BA ، ج: قهوه‌ای شدن کالوس.

Figure 1-a: Derived callus from leaf explant in supplemented MS media with 0.25 mg l^{-1} 2,4-D + 1 mg l^{-1} Kin, b: Derived callus from stem explant in supplemented MS media with 0.25 mg l^{-1} 2,4-D + 1 mg l^{-1} BA, c: Browning callus.

اثر نور و محیط کشت بر کالوس‌زایی گل راعی بومی ایران

در آزمایش اول کالوس‌های تولید شده گل راعی در تمام سطوح تنظیم کننده‌های رشد و هر دو ریزنمونه با گذشت زمان به‌تدریج قهوه‌ای شدند (شکل ۱ ج)، در این راستا آزمایش دیگری برای بررسی اثر نور و محیط کشت برای بهبود کیفیت کالوس گل راعی و کنترل قهوه‌ای شدن آن انجام گرفت. بر اساس نتایج آزمایش قبل، بهترین تیمارها از تنظیم کننده‌های 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.

بر اساس نتایج به‌دست آمده بین القای کالوس در ریزنمونه‌های برگ و ساقه تفاوت معنی‌داری بین شرایط روشنایی و تاریکی وجود نداشت. ولی از لحاظ 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 ریز نمونه 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 (۱۴).

کالوس‌های تولید شده در شرایط تاریکی کرم‌رنگ بود و حالت فشرده داشتند (شکل ۱) ولی کالوس‌های تولید شده در شرایط روشنایی در هر دو ریز نمونه برگ و ساقه سبزرنگ بوده و حالت فشرده داشتند (شکل ۲ الف–ب). در مرحله القای کالوس در شرایط روشنایی نقاط قرمز شفاف روی کالوس‌ها مشاهده شد که در تیمارهای تاریکی چنین نقاطی دیده نمی‌شد (شکل ۲ ج و د). ریزنمونه‌هایی که نقاط قرمز روشن بیشتری داشتند بعد از مدت تقریبا یک هفته از محل این نقاط شروع به قهوه‌ای شدن کرده و رشد چندانی نکردند. این نقاط قرمز رنگ معمولا به وجود هیپریسین یا آنتوسیانین نسبت داده می‌شود. مولیناسی و همکاران (۲۳) 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 کاملا تمایز نیافته گل‌راعی وجود دارد زانتون‌ها می‌باشند. همچنین آن‌ها بیان کردند که در کالوس تمایز یافته گل‌راعی و نیز در شاخه‌های حاصل از این کالوس‌ها آنتوسیانین وجود دارد که به شکل نقاط قرمز روشن مشاهده می‌شود و گاه با هیپریسین اشتباه گرفته می‌شود ولی بون و همکاران (۴) در بررسی وضعیت کالوس‌زایی هفت گونه جنس *Hypericum* با استفاده از ریز نمونه بذر، رنگ قرمز کالوس‌های حاصل را به هیپریسین نسبت دادند.

القای کالوس در هر دو ریز نمونه در دو محیط کشت MS و محیط کشت MS دارای ویتامین‌های B5 تفاوت معنی‌داری نداشتند. 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 ریز نمونه برگ (۳/۲ گرم) در تیمار ۰/۵ میلی-گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و در ریزنمونه ساقه (۳/۲۹ گرم) در محیط کشت دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد (جدول ۲ و ۳).

جدول ۲- اثر نور و محیط کشت بر کالوس‌زایی ریزنمونه برگ گل‌راعی بومی ایران.

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

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

*Values followed by different letters are significantly different according to Duncan test at $P \leq 0.05$.
a +:Light, -:Dark

* حروف غیر مشابه در هرستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.
a +:روشنایی، -:تاریکی

نتایج به‌دست آمده 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 به‌کار رفته و باز کشت در فاصله زمانی کوتاه‌تر (۱۵ روز در مقایسه با ۲۰ روز در آزمایش اول) نیز بر کنترل قهوه‌ای شدن کالوس‌ها اثری نداشت.

جدول ۳- اثر نور و محیط کشت بر کالوس‌زایی ریزنمونه ساقه گل‌راعی بومی ایران.

Table 3: The effect of light and media on callus induction of stem explant in Iranian *H. perforatum.*

Media محیط کشت	Growth regulators ($mg\ l^{-1}$) تنظیم کننده‌های رشد	Light نور	Days to callus induction تعدار روز تا کالوس‌زایی	Callus induction (%) کالوس‌زایی	Callus weight (g) وزن کالوس
MS	0.25 2,4-D + 1 BA	+ [a]	12c	100a	2.44c
MS	0.25 2,4-D + 1 BA	-	13abc	90ab	3.29a
MS	1 2,4-D+ 0.2 Kin + 0.1 NAA	+	14a	90ab	0.53f
MS	1 2,4-D+ 0.2 Kin + 0.1 NAA	-	13.25ab	100a	1.21e
MSB5	0.25 2,4-D + 1 BA	+	14a	100a	2.75b
MSB5	0.25 2,4-D + 1 BA	-	12.5bc	95ab	2.89b
MSB5	1 2,4-D + 0.2 Kin + 0.1 NAA	+	14a	80b	0.6f
MSB5	1 2,4-D + 0.2 Kin + 0.1 NAA	-	12c	100a	1.6d

*Values followed by different letters are significantly different according to Duncan test at $P \leq 0.05$.
a +:Light, -:Dark

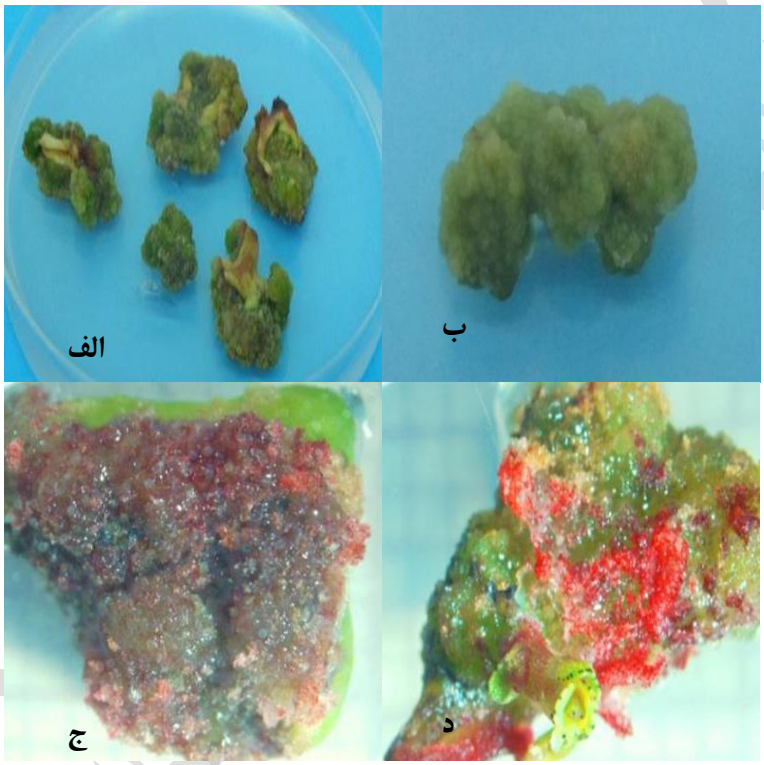
* حروف غیر مشابه در هرستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.
a +:روشنایی، -:تاریکی

اثر PVP بر کالوس‌زایی گل راعی بومی ایران

برای کنترل قهوه‌ای شدن کالوس از چهار غلظت مختلف پلی‌وینیل پیرولیدون به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیز شده استفاده شد. PVP برای جذب ترکیبات فنلی استفاده می‌شود و باندهای هیدروژنی آن این ترکیبات را جذب می‌کند (۲۰). بنابراین برای جلوگیری از نکروزه شدن کالوس این ترکیب به محیط کشت اضافه می‌شود و کازئین هیدرولیز شده نیز یک منبع غنی از آمینو اسیدها می‌باشد که در بیان ژن‌های درگیر دربیوسنتز پلی-فنل‌ها نقش دارد (۲۴).

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 تولید شده 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 اثری در کنترل قهوه‌ای شدن کالوس‌ها نداشت که بیانگر آن است که قهوه‌ای شدن کالوس‌ها احتمالا ناشی از

اکسیداسیون ترکیبات فنلی نمی‌باشد چرا که استفاده از PVP نتوانست از این اکسیداسیون جلوگیری کند. بر خـلاف نتایج حاضر در *Cycas revoluta* اضافه کردن یک گرم در لیتر PVP باعث جلوگیری از نکروزه شدن کالوس بـه دلیل جذب مواد فنلی شده و کالوس‌ها در این محیط زنده و بافت نرم به رنگ سفید مایل بـه زرد داشـتند (۲۰) . در آلوئه ورا نیز اضافه کردن یک گرم در لیتر PVP برای موفقیت در کشت درون شیشه‌ای آن موثر بوده است (۶).



شکل ۲– الف: کالوس سبزرنگ حاصل از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ب: کالوس سبزرنگ تولید شده از ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر BA ، ج: نقاط قرمز تشکیل شده روی کالوس حاصل از ریزنمونه برگ، د: نقاط قرمز تشکیل شده روی کالوس حاصل از ریزنمونه ساقه.

Figure 2- a: Green derived callus from leaf explant in supplemented MS media with 0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} BA, b: Green derived callus from stem explant in supplemented MS media with 0.25 mg l^{-1} 2,4-D + 1 mg l^{-1} BA, c: Formed red points on derived callus from leaf explant, d: Formed red points on derived callus from stem explant.

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 بدست آمد. کمترین وزن تر کالوس (۱/۴۱گرم) 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 میلی گرم در لیتر PVP حاصل گردید (جدول ۴). بین غلظت‌های PVP مورد استفاده غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در بهبود رشد کالوس در هر دو ریزنمونه‌های برگ و ساقه مؤثرتر بوده است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده اثر PVP بر رشد کالوس‌ها به نوع تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده نیز بستگی دارد که بین دو تیمار هورمونی به کار رفته غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در القا کالوس اثر بهتری داشته است. مقایسه نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ در حضور PVP در محیط کشت دارای BA وزن تر بیشتری داشته‌اند ولی در محیط کشت فاقد PVP بیشترین وزن تر در محیط کشت دارای Kin بوده است، در حالی‌که رشد کالوس در ریزنمونه ساقه در صورت وجود و یا عدم وجود PVP در محیط کشت دارای BA بهتر بوده است (جدول ۴)، این یافته‌ها نتیجه آزمایش اول را تایید می‌کند. در گزارش‌های قبلی در مورد گل راعی نیز اضافه کردن PVP به محیط کشت باعث بهبود رشد کالوس شده است (۲۶). استفاده از PVP در کشت درون شیشه‌ای گیاهان دیگر نیز گزارش شده است. در بامبو (*Dracaena sanderiana*) اضافه‌کردن ۰/۲۵ گرم در لیتر PVP به محیط کشت باعث کنترل قهوه‌ای شدن محیط کشت و تحریک رشد جنین‌های سوماتیکی گردیده است (۱۹).

جدول۴- اثر غلظت‌های مختلف PVP بر کالوس‌زایی گل راعی بومی ایران.

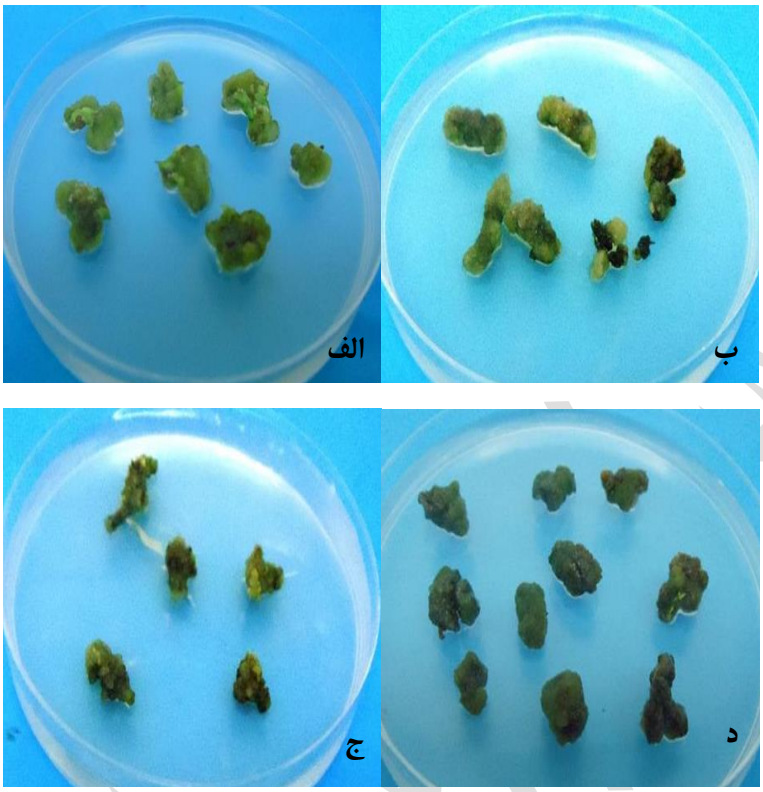
Table 4: The effect of different concentrations of PVP on callus induction of Iranian *H. perforatum.*

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

*Values followed by different letters are significantly different according to Duncan test at $P \leq 0.05$.

حروف غیر مشابه در هرستون بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

به‌طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از تنظیم کننده‌های 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 به سرعت 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. استفاده از ترکیب پلی‌ونیل پیرولیدین اگر چه باعث بهبود رشد کالوس‌های حاصل از ریز نمونه برگ شد ولی نتوانست قهوه‌ای شدن کالوس‌ها را کاهش دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، برای کنترل قهوه‌ای شدن کالوس گل راعی پیشنهاد می‌شود اثرات شرایط مختلف نوری از نظر کیفیت و شدت، محیط‌های کشت متنوع‌تر و ترکیبات آلی مؤثر در کاهش میزان قهوه‌ای شدن مورد بررسی قرار گیرد.



شکل ۳– الف : کالوس سبز رنگ تولید شده از ریزنمونه برگ در محیط کشت دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر PVP، ب: کالوس سبز رنگ تولید شده از ریزنمونه ساقه در محیط کشت دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر PVP، ج: رشد کم کالوس در ریزنمونه ساقه در محیط کشت دارای ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر PVP، د: عدم کنترل قهوه‌ای شدن کالوس در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP.

Figure 3- a: Green derived callus from leaf explant in supplemented media 0.25 mg l^{-1} 2,4-D + 1 mg l^{-1} BA and 100 mg l^{-1} PVP. b: Green derived callus from stem explant in supplemented media 0.25 mg l^{-1} 2,4-D + 1 mg l^{-1} BA and 100 mg l^{-1} PVP. c: Low growth of stem derived callus in supplemented media 0.25 mg l^{-1} 2,4-D + 1 mg l^{-1} Kin and 100 mg l^{-1} PVP. d: Uncontrolled callus browning in 200 mg l^{-1} PVP.

منابع

1. Azadi R. 1999. Flora Iranica. *Hypericaceae* family. Forest and Rangeland Institute, Iran, pp. 62.
2. Azizi M., Jafarymofid Abadi A., and Omidbaigi R. 2002. Investigation the on vitro cultures of *Hypericum perforatum* L. in production of Hypercin and other secondary metabolites. Pazhouhesh and Sazandeghi Journal, 54: 40-45
3. Bais H.P., Walker T.S., Mc Grew J.J., and 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.
4. Bohn T.H., Fabritius E., Kauth S., and Plotz S. 1996. First results of comparative investigation about callus and suspension culture of seven *Hypericum* species. Proceeding, International Symposiu: Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, Quedlinburg, Germany, 286-289.
5. Cardoso N.A., and de Oliviera D.E. 1996. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. Plant Cell and Tissue Organ Culture, 44: 91-94.
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.
8. Dias A.C.P., Barber F.A., Ferreira M., and Ferreres F. 1998. Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. Phytochemistry, 48: 1165-1168.
9. Farsad Akhtar N., Aharizad S., Mohammadi S.A., Motallebi-Azar A., Movafeghi A., and 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: Mujib A., and Samaj J. (eds). Somatic emberyogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 58-101.
11. Gamborg O.L., Miller R.A., and Ojima O. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
12. Ghazian Tafrishi G., Azizi M., and 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.
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., and Schaller G.E. 2014. Cytokinins. Arabidopsis Book, 12: e0168
15. Kirakosyan A., Gibson D.M., Kaufman P.B. 2008. The production of dianthrones and phloroglucinol derivatives in St. John's Wort. In: Ramawat K.G., and Merillon J.M. (eds.). Bioactive molecules and medicinal plants. Springer, Berlin, pp 149-164.
16. Kirakosyan A., Sirvent T.M., Gibson D.M., and 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.
17. Murashige T., and 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., and 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.
20. Pick Kiong A., Shu Thing Y., Azlan Gansau J., and 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., and Santarem E.R. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* L. leaves. Plant Cell and Tissue Organ Culture, 67: 107-113.
22. Radusienea J., Judzentieneb A., and Bernotieneb G. 2005. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. Biochemistry Systematic and Ecology, 55: 113-124.
23. Mulinacci N., Giaccherini C., Santamaria A.R., Caniato R., Ferrari F., Valletta A., Vincieri F.F., and 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.
24. Talapatra S., and 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.
26. Xu M., Yang B., Dong J., Lu D., Jian H., Sun L., Zhu Y., and Xu Z. 2011. Enhancing hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension culture by ozone exposure. Biotechnology Progress, 27 (4): 1101-1106.
27. Yazaki K., and Okuda T. 1990. Procyaninins in callus and multiple shoots of *Hypericum erectum*. Planta Medica, 56: 490-491.

Optimizing the in vitro culture for callus induction of Iranian St John's-wort (*Hypericum perforatum* L.)

Abstract

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), culture media (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} 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 are 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 of *H. perforatum* calli.
Key words: *Hypericum perforatum*, callus induction, plant growth regulators, browning, poly vinyl pyrrolidone

نسخه پیش انتشار