# بهینه‌سازی شرایط باززایی گل راعی *Hypericum perforatum* در کشت درون شیشه‌ای

زینب پارسامنش[۱]، فرشته بیات[۲]* و محمد هدایت[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
۲-***نویسنده مسئول:** استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران (bayatfereshteh59@gmail.com)
۳- استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۲۷

## چکیده

**گل راعی (*Hypericum perforatum* گیاهی دارویی با خواص مهمی چون ضد افسردگی، ضد ویروسی و ضد باکتری می‌باشد. به منظور مطالعه القاء کالوس رد ریز نمونه‌های گل راعی آزمایشی در سال ۹۴- ۱۳۹۳ بر روی ریزنمونه‌های برگ و شاخساره گل راعی در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت MS انجام شد. جهت ایجاد شاخساره از تنظیم‌کننده رشد BA (با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و به منظور تولید ریشه از IBA (با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و ۱ میلی گرم در لیتر) استفاده شد. پس از گذشت ٤ هفته روند القاء کالوس، تولید شاخساره و ریشه‌زایی در نمونه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد کالوس از نظر تعداد ریزنمونه برگ در تیمار حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر ۲، ٤-D حاصل شد. بیشترین تعداد کالوس از نظر وزن توده کالوس را ریزنمونه تک گره در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر ۲، ٤-D به خود اختصاص داد. همچنین بیشترین تعداد شاخساره و بلندترین طول شاخساره تولید شده از کالوس به‌ترتیب در محیط های کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه یک میلی گرم در لیتر Kin حاصل شدند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد شاخساره‌های گل راعی برای تولید ریشه نیازی به تنظیم‌کننده‌های رشد بیرونی ندارند.**

***کلید واژه‌ها: تشکیل کالوس، تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزازدیادی، کشت بافت***

## مقدمه

شناسایی و بررسی ترکیبات شیمیایی گیاهان دارویی، نه تنها به درمان آسان‌تر و ارزان‌تر بیماری‌ها کمک می‌نماید، بلکه از خارج شدن بخشی از ثروت کشور نیز برای واردات این فرآورده‌ها، جلوگیری می‌کند (Esmaeilzadeh and Sharifi, 2013 Bahabadi). گل راعی یک علف هرز خطرناک برای احشام و یک محصول با ارزش برای جمع‌آوری‌کنندگان گیاهان وحشی برای صنعت می‌باشد (Sirvent *et al*., 2002). گیاهی است علفی و پایا که در سال اول دارای رشد بطئی رویشی و خزنده است و رشد مطلوب و گل دهی آن از سال دوم به بعد آغاز می‌شود (Crompton *et al*., 1988).

برگ‌های این گیاه بدون دمبرگ، متقابل، کشیده، با انتهای گرد و بدون بریدگی می‌باشد. روی برگ‌ها دو نوع نقطه تیره و روشن دیده می‌شود که نقاط روشن در تمام سطح برگ پراکنده هستند و محل تجمع اسانس می‌باشند و نقاط تیره در حاشیه برگ‌ها وجود دارند و محل تجمع هیپریسین ماده مؤثر مهم گیاه می‌باشد (Hobbs, 1996؛ Curtis and Lersten, 1990). این گیاه دارویی حاوی دامنه وسیعی از متابولیت های ثانویه

مانند فلاونوئیدها، پروآنتوسیانیدین‌ها[1]، نفتودیانترون‌ها (یپریسین[2] و آسیل سودوهایپریسین[3])، فلوروگلوسینول‌ها[4] (هیپرفورین[5] و ادهایپرفورین) است (Kubin *et al.*, 2005). مواد مؤثره اصلی این گیاه شامل هیپرفورین (یک فلوروگلوسینول پرنیله‌شده) و هیپریسین (یک نفتودیانترون) می‌باشد (Barnes *et al.*, 2001). هیپریسین ماده‌ای کینونی است و به‌عنوان مهم‌ترین ماده مؤثر هوفاریقون شناخته می شود. این ماده در نقطه های سیاه رنگی که روی اندام‌های مختلف گیاه تشکیل می‌شوند، وجود دارد (Tripathi and Tripathi, 2003). در طب سنتی ایران، گل راعی برای ضدعفونی کردن و ترمیم زخم‌ها و همچنین برای جلوگیری از افسردگی و درد مصرف می‌شود (Engelmeyer and Campbell, 1985؛ Brabdle, 1998). کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی، امکان تکثیر انبوه و سریع گیاهان و تولید متابولیت های ثانویه را در شرایط درون شیشه‌ای فراهم می‌آورد. با استفاده از کشت درون شیشه ای گیاه، علاوه بر دسترسی به منبع اولیه دارو در شرایط کنترل شده و مستقل از محیط، افزایش تولید ترکیبات نسبت به حالت طبیعی در گیاه و هم‌چنین تولید ترکیبات جدید امکان‌پذیر می گردد (Bourgaud *et al.*, 2002). همچنین با توجه به پایداری بیشتر سیستم های کشت سلول و بافت نسبت به تغییرات محیط و محدودیت‌های زیستگاه، می‌توان با تنظیم دقیق شرایط کشت، تولید آلکالوئیدهایی که در شرایط طبیعی به میزان کم و یا اصلا در گیاه تولید نمی‌شود، را افزایش داد (Hughes and Shanks, 2002). اما اکثر گیاهان برای تشکیل شاخساره به سیتوکینین نیاز دارند، در حالی‌که اکسین مانع از آن می شود و گروه دیگری از گیاهان برای تشکیل شاخساره نیاز به اکسین برونزا دارند، ولی در بسیاری از گونه‌های گیاهی به نظر می‌رسد که غلظت بالای سیتوکنین و غلظت پایین اکسین برای تشکیل شاخساره خیلی مهم است، به‌طورکلی می توان گفت نسبت بین این دو تنظیم‌کننده، تعیین کننده تشکیل اندام است و اغلب توصیه می گردد که شاخساره‌های نابجا که روی محیط کشت با غلظت بالای سیتوکینین تشکیل شده‌اند، به محیطی با غلظت پایین سیتوکینین منتقل گردند، که رشد و نمو بعدی تحریک نشود (Bagheri, 1998). Ghazian Tafrishi *et al.* (2006)، بیشترین تعداد کالوس از نظر وزن را در محیط کشت MS[6] و تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر ۲، ۴-D[7] (۲/۱۹۳۷ گرم وزن تر کالوس) به‌دست آوردند. Ghtbzadh Kermani *et al.* (2013) در باززایی گیاه دارویی ازمک (*Cardaria draba* L.) تیمار حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر BAP[8] به همراه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA[9] و تیمار ۳ میلی گرم بر لیتر BAP به همراه یک میلی گرم بر لیتر NAA به‌ترتیب بهترین کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های برگ‌های لپه‌ای و مناسب‌ترین تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های محور زیرلپه را نشان دادند. Amini *et al.* (2014) در بهینه‌سازی تولید کالوس و باززایی گیاه دارویی *Salsola arbuscula* pall بیان کردند بهترین تیمار در تولید کالوس محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۲، ۴-D بود و در تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin از ساقه باززایی مستقیم صورت گرفت.

دلیل توجه به جنبه‌های مختلف کشت بافت گیاهان دارویی، بهینه کردن این روش‌ها به‌عنوان ابزاری مهم جهت مطالعات مربوط به عوامل مؤثر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و هم‌چنین کاربرد آن‌ها در اصلاح گیاهان دارویی است. اگرچه تحقیقاتی در زمینه کشت بافت برخی ارقام گل راعی انجام شده است (Ghazian Tafrishi, 2006). اما هدف از این پژوهش بهینه سازی شرایط باززایی گل راعی در شرایط درون شیشه است. در این تحقیق با بررسی عوامل تأثیرگذار بر باززایی نظیر ریزنمونه،

1- Proanthocyanidin
2- Hypericin
3- Pseudohypericin
4- Acyl phloroglucinol
5- Hyperforin
6- Murashige and Skoog
7- Dichlorophenoxy Acetic Acid
8- Benzyl Adenine Purine
9- Naphthaleneacetic Acid

نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، حداکثر بازدهی برای باززایی این گیاه مدنظر است.

## مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۴ در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس، به منظور بررسی باززایی گل راعی، گیاهچه های استریل از مرکز تحقیقات استان بوشهر تهیه و برای بررسی وضعیت القاء کالوس[1] از دو ریزنمونه برگ و شاخساره استفاده شد. آزمایش اول به‌صورت فاکتوریل سه عاملی که عامل اول تنظیم کننده رشد اکسینی، عامل دوم تنظیم‌کننده رشد سیتوکینینی و عامل سوم ریزنمونه برگ و شاخساره مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارهای القاء کالوس شامل استفاده از تنظیم کننده رشد BA به میزان صفر، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر و Kin به میزان ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر به همراه ۲، ۴-D به میزان ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی گرم در لیتر بود، که به محیط کشت MS افزوده شدند. هر تیمار شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۴ نمونه بود. نمونه‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. آزمایش دوم به صورت فاکتوریل دو عاملی که عامل اول تنظیم کننده رشد BA و عامل دوم تنظیم‌کننده رشد Kin بود. به منظور تولید شاخساره[2] گل راعی در کشت های درون شیشه‌ای، پس از القاء کالوس قطعات یکسانی از کالوس‌ها جدا و در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد BA شامل صفر، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر و Kin شامل صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند هر دو آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید.

آزمایش سوم که به‌صورت طرح کاملاً تصادفی بود، به منظور تولید ریشه بر روی شاخساره‌های به‌دست آمده، از سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد، IBA[3] با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم در لیتر استفاده شد. برای این منظور شاخساره‌های به‌دست آمده با طول ۲ سانتی متر شامل جوانه انتهایی در محیط کشت با تیمارهای مورد نظر کشت شدند. از هر تیمار ۳ تکرار و در هر تیمار ۳ عدد ریزنمونه جهت ریشه‌زایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی در اتاقک رشد قرار گرفتند. تجزیه داده ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.1) و MSTATC و مقایسه میانگین ها به روش آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

## نتایج و بحث

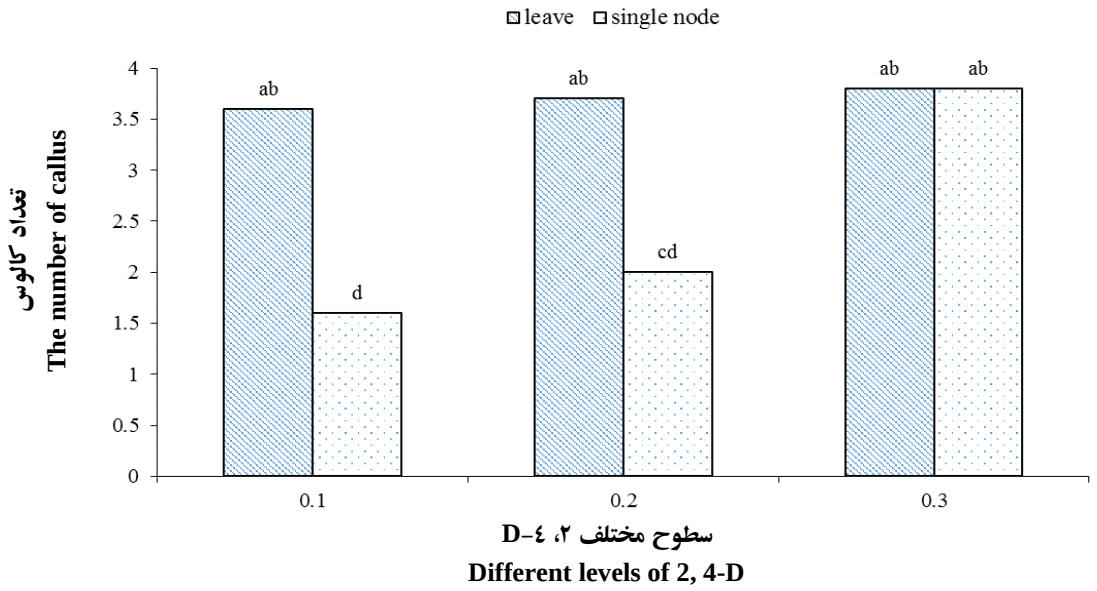
بررسی ریزنمونه‌های برگ و یک گره در محیط القاء کالوس نشان داد که شش هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط القاء کالوس، کالوس‌های ترد با رنگ سبز تیره (برای ریزنمونه برگ) و سبز مایل به قهوه‌ای (برای ریزنمونه یک گره) ایجاد شدند. جدول تجزیه واریانس القاء کالوس نشان داد که اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد، اثر ریزنمونه‌ها و اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد و ریزنمونه، برای القاء کالوس در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. برای درک بهتر نتایج از ۵ شکل که قسمتی از یک شکل واحد استفاده شده است.

نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف ۲، ۴-D نشان می‌دهد که ریزنمونه برگ نسبت به یک گره تعداد بیشتری کالوس تولید کرده است و افزایش غلظت ۲، ۴-D تأثیری در القاء کالوس از ریز نمونه برگ نداشته است، ولی در ریزنمونه یک گره با افزایش غلظت ۲، ۴-D میزان القاء کالوس افزایش یافته است (شکل ۱).

در حضور BA و با افزایش غلظت ۲، ۴-D القاء کالوس در هر دو ریزنمونه برگ و یک گره افزایش یافت، در ضمن در تمام سطوح ۲، ۴-D تفاوتی بین ریزنمونه برگی و تک گره مشاهده نشد، یعنی افزودن BA این تفاوت را غیرمعنی‌دار کرد (شکل ۲). افزایش غلظت BA هیچ تفاوتی در نتایج القاء کالوس از نظر ایجاد برتری برای ریزنمونه‌ها نداشت، فقط باعث افزایش القاء کالوس در هر دو نوع ریزنمونه در پایین‌ترین سطح ۲، ۴-D (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) شد (شکل ۳). بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت که کاربرد BA در محیط کشت حاوی ۲، ۴-D سبب افزایش

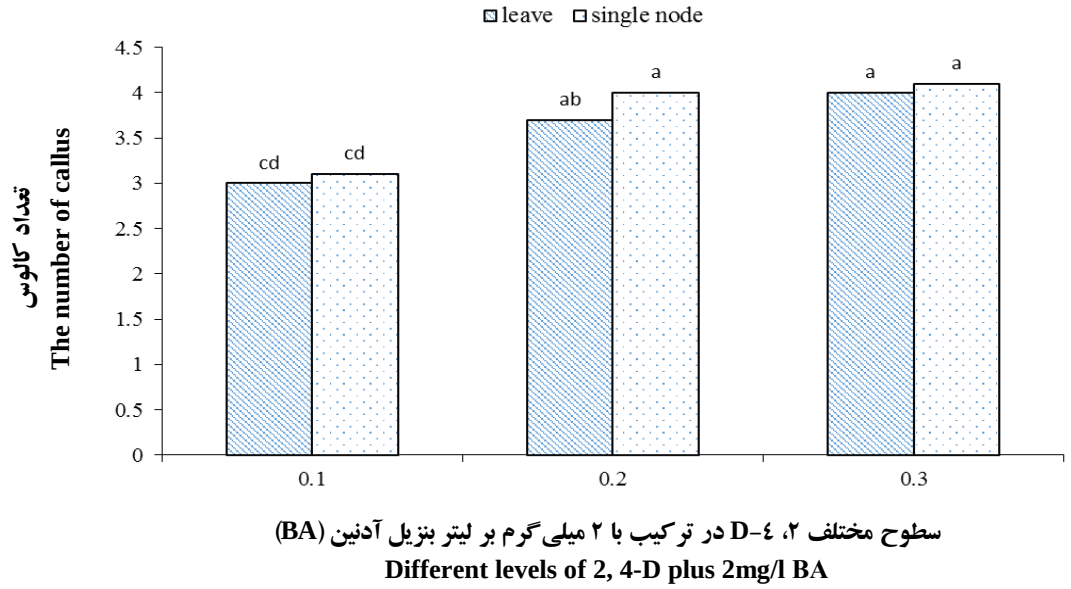
1- Callus induction
2- Shoot regeneration
3- Indole Butyric Acid

القاء کالوس می‌شود، ریزنمونه تک گره در سطوح مختلف ۲، ۴-D در مقایسه با ریزنمونه برگی در القاء کالوس موفقیت چندانی نداشته هر چند با افزودن BA القاء کالوس افزایش یافت (شکل‌های ۲ و ۳).



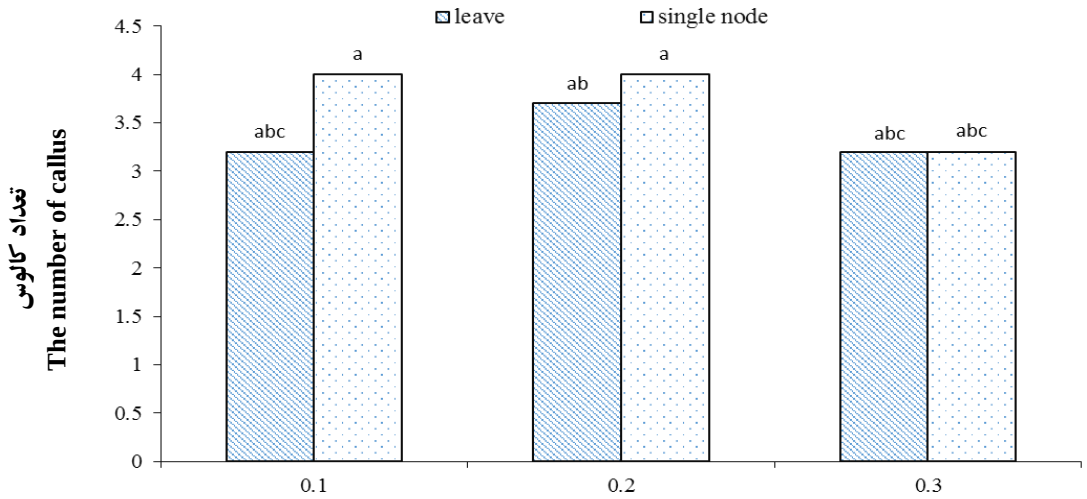

**شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف ۲، ٤-D بر روی تشکیل کالوس ریز نمونه‌های برگ و یک گره**

**Figure 1. Effect of different levels of 2, 4-D on callus induction of leave and single node explants**




**شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف ۲، ٤-D در ترکیب با دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA) بر روی تشکیل کالوس ریزنمونه‌های برگ و یک گره**

**Figure 2. Effect of different levels of 2, 4-D and 2mg/l BA on callus induction of leave and single node explants**




**سطوح مختلف ۲، ٤-D به همراه ٤ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA)**
**Different levels of 2, 4-D plus 4mg/l BA**

**شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف ۲، ٤-D به همراه چهار میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA) بر تشکیل کالوس ریز نمونه‌های برگ و یک گره**

**Figure 3. Effect of different levels of 2, 4-D plus 4mg/l BA on callus induction of leave and single node explants**

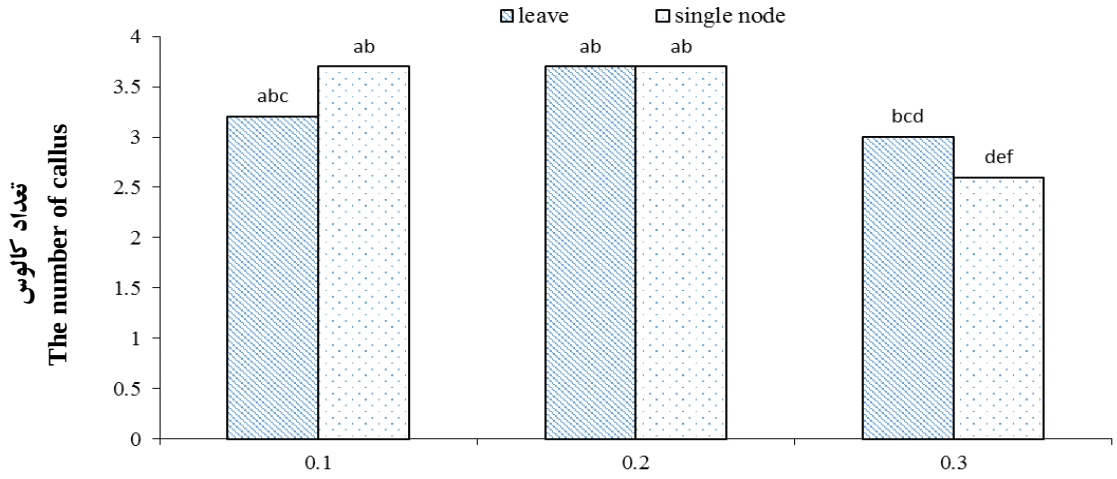
در غلظت ۴ میلی گرم در لیتر BA به همراه غلظت های مختلف ۲، ۴-D بیشترین تعداد کالوس برای ریزنمونه برگ و یک گره به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۱ به‌دست آمد (شکل ۳).

نتایج مقایسه میانگین تیمار Kin به همراه غلظت‌های مختلف ۲، ۴-D نشان داد که افزایش غلظت ۲، ۴-D در حضور یک میلی گرم در لیتر Kin سبب کاهش القاء کالوس در هر دو ریزنمونه برگی و تک گره شد. تفاوتی در میزان القاء کالوس برگ و تک گره در هیچ کدام از سطوح ۲، ۴-D در حضور Kin مشاهده نشد (شکل ۴). Rani *et al.* (2001) به منظور اندازه‌گیری هیپرسین از کشت درون شیشه‌ای گل راعی، مناسب‌ترین محیط کشت برای استقرار کالوس گل راعی را محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر Kin و دو میلی گرم در لیتر ۲، ۴-D گزارش کردند.

در غلظت دو میلی گرم در لیتر Kin، اگرچه افزایش غلظت ۲، ۴-D باعث افزایش القاء کالوس در هر دو ریزنمونه برگی و تک گره شد، ولی این افزایش القاء کالوس معنی‌دار نبود. بیشترین تعداد کالوس در ریزنمونه برگ و یک گره در حضور ۰/۳ میلی گرم در لیتر ۲، ۴-D بود (شکل ۵).

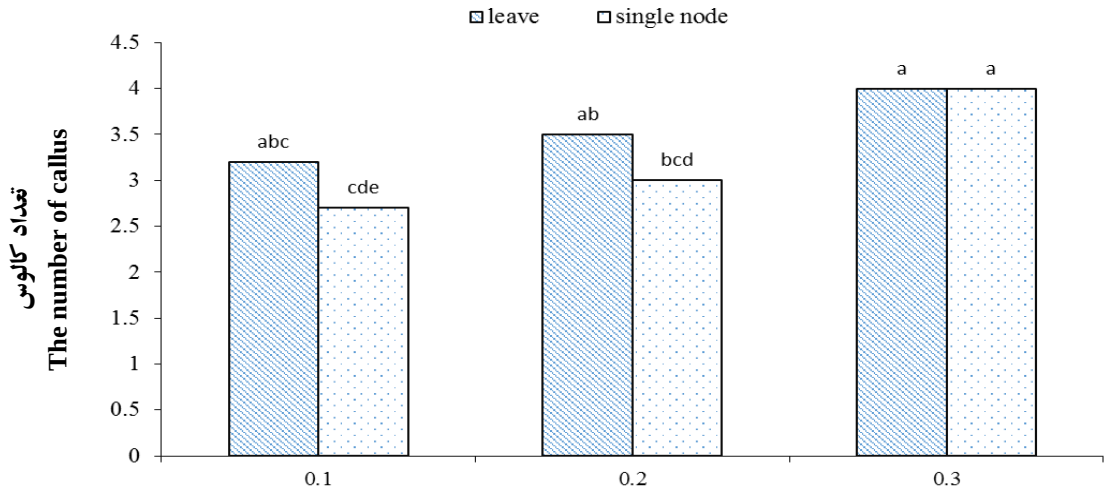
نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش تنظیم‌کننده‌های سیتوکنینی و اکسینی نشان داد که تعداد کالوس در تیمار حاوی ۰/۳ میلی گرم در لیتر ۲، ۴-D با برخی از تیمارهایی که حاوی تنظیم‌کننده رشد سیتوکنینی هستند، اختلاف معنی‌داری ندارد و تنها افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنینی به همراه اکسینی موجب افزایش اندک تعداد القاء کالوس شده است، به‌طوری‌که تفاوت معنی‌داری از نظر آماری ایجاد نشده است. بنابراین به نظر می‌رسد این گیاه جهت القاء کالوس نیازی به استفاده از تنظیم‌کننده سیتوکنین ندارد، این امر را می‌توان به حضور مقادیر درون‌زای تنظیم‌کننده رشد سیتوکنینی ریزنمونه نسبت داد و بنابراین نمی‌توان تنها با استفاده از غلظت‌های بیشتر تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی ریزنمونه را وادار به القاء کالوس کرد. بنابراین به نظر می‌رسد کاربرد تنظیم‌کننده‌های اکسین خارجی با سیتوکنین‌های داخلی گیاه، تعادل مورد نیاز ریزنمونه جهت تحریک به القاء کالوس را در گل راعی فراهم می‌سازد. Ayan *et al.* (2005) در پژوهشی

مشابه نشان دادند که بیشترین وزن توده کالوس در تیمارهای حاوی یک میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴-D و یک میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد. Stefunova and Bezo (2001) گزارش کردند که بهترین رشد کالوس از نظر اندازه در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin به همراه یک میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴-D و هم‌چنین در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴-D به دست می‌آید. Carolina *et al.* (2001) نتیجه گرفتند که بیشترین تولید کالوس در گل راعی از ریزنمونه‌های کشت‌شده در حضور یک میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴-D در تاریکی به‌دست می‌آید.




**سطوح مختلف ۲، ٤-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin**
**Different levels of 2, 4-D plus 1mg/l Kin**

**شکل ٤- تأثیر سطوح مختلف ۲، ٤-D به همراه یک میلی‌گرم بر لیتر Kin بر تشکیل کالوس ریز نمونه‌های برگ و یک گره**
**Figure 4. Effect of different levels of 2, 4-D plus 1mg/l Kin on callus induction of leave and single node explants**




**سطوح مختلف ۲، ٤-D به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin**
**Different levels of 2, 4-D plus 2mg/l Kin**

**شکل ٥- تأثیر سطوح مختلف ۲، ٤-D به همراه دو میلی‌گرم بر لیتر Kin بر تشکیل کالوس ریزنمونه‌های برگ و یک گره**
**Figure 5. Effect of different levels of 2, 4-D plus 2mg/l Kin on callus induction of leave and single node explants**

بیشترین وزن توده کالوس را ریزنمونه تک گره در محیط کشت حاوی چهار میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ۲، ۴-D به خود اختصاص داد، که از نظر آماری با ریزنمونه تک گره محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ۲، ۴-D اختلاف معنی‌داری نداشت، در صورتی‌که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها در سطح ۵ درصد بود. کمترین وزن توده کالوس در ریزنمونه برگ با تیمار حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ۲، ۴-D مشاهده شد (جدول ۱). اما کاربرد گروه اکسینی شامل ۲، ۴-D می‌تواند در تحریک گیاه به سمت تولید کالوس تأثیرگذار باشد. هم‌چنین نوع ریزنمونه نیز برای تولید کالوس توانایی یکسانی ندارند، علت را می‌توان به سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد درونی ریزنمونه‌ها نسبت داد و این که سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زا با استعداد القاء کالوس ریزنمونه‌ها مرتبط می‌باشند. به نظر می‌رسد ریزنمونه برگ دارای غلظت متعادل‌تری از تنظیم‌کننده رشد اکسینی بوده که باعث بیشترین القاء کالوس شده است. طبق پژوهش‌های انجام شده پاسخ‌های متفاوت ریزنمونه‌های مختلف یک گیاه به تنظیم‌کننده‌های رشد در یک محیط کشت، علت اختلاف در خصوصیات ویژه درون سلولی ریزنمونه‌ها از قبیل بیان ژن و سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زاد ریزنمونه بستگی دارد. Ayan *et al.* (2005) در پژوهشی مشابه که بر کشت درون شیشه‌ای گل راعی صورت گرفت نشان دادند که بیشترین وزن توده کالوس در تیمارهای حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر ۲، ۴-D و یک میلی‌گرم بر لیتر Kin حاصل شد. Bezo and Stefunova (2001) در پژوهشی که روی باززایی گل راعی انجام شد، بهترین رشد کالوس از نظر اندازه در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر Kin به همراه یک میلی‌گرم بر لیتر ۲، ۴-D به میزان ۱۰ درصد و هم‌چنین یک میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه یک میلی‌گرم بر لیتر ۲، ۴-D به میزان ۱۲/۷ درصد نشان دادند.

نتایج مقایسه میانگین شاخساره‌های تولید شده از کالوس گل راعی، نشان داد که بیشترین طول شاخساره تولید شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin حاصل شد، که اختلاف معنی‌داری با محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin نشان نداد، اما با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد بود (جدول ۲).

**جدول ۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل وزن کالوس در ریزنمونه‌های مختلف شامل برگ و تک گره و غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی (۲، ٤-D) و سیتوکنینی (BA و Kin)**

**Table 1. Mean comparison of callus mass weight different explants of leaves and single node at different level of auxcin (2, 4-D) and cytokenin (BA and Kin) growth regulators**

| وزن توده کالوس (گرم) Callus mass weight (g) | | | | | | تنظیم‌کننده رشد سیتوکنینی (میلی‌گرم بر لیتر) Cytokenin growth regulators (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| گره Node | | | برگ Leave | | | | |
| 2, 4-D (mg/l) | | | 2, 4-D (mg/l) | | | | |
| 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | | |
| $0.140^{b}$ | $0.063^{ghi}$ | $0.040^{jk}$ | $0.066^{fgh}$ | $0.060^{hij}$ | $0.050^{ijk}$ | | بنزیل آدنین BA |
| $0.110^{c}$ | $0.130^{b}$ | $0.160^{a}$ | $0.120^{c}$ | $0.063^{ghi}$ | $0.010^{i}$ | | |
| $0.100^{c}$ | $0.110^{c}$ | $0.170^{a}$ | $0.050^{ijk}$ | $0.070^{efg}$ | $0.073^{lef}$ | | |
| $0.080^{def}$ | $0.100^{c}$ | $0.110^{c}$ | $0.050^{ijk}$ | $0.050^{ijk}$ | $0.030^{k}$ | 1 | کنیتین Kin |
| $0.140^{b}$ | $0.083^{de}$ | $0.070^{efg}$ | $0.066^{fgh}$ | $0.060^{hij}$ | $0.090^{d}$ | 2 | |

میانگین‌های با حروف مشترک از لحاظ آماری و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

Numbers with the same letters were not statistically different at 5% probability level of Duncan's test.

**جدول ۲- مقایسه میانگین صفات تعداد و طول شاخساره باززایی شده از کالوس در گل راعی**
**Table 2. Mean comparison of regenerate's number and length of shoot of Hypericum**

| شاخساره Shoots | | تیمار Treatment |
|---|---|---|
| طول Length (cm) | تعداد Number | |
| 1.33[c] | 0.02[f] | 0 |
| 1.66[bc] | 1.54[b] | 0.5 mg/l kin |
| 1.33[c] | 1.22[cd] | 1 mg/l kin |
| 2.33[abc] | 1.15[de] | 0.5 mg/l BA |
| 2.33[abc] | 1.05[e] | 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l kin |
| 2.33[abc] | 1.75[a] | 0.5 mg/l BA + 1 mg/l kin |
| 1.66[bc] | 1.22[cd] | 1 mg/l BA |
| 3.33[a] | 1.34[c] | 1 mg/l BA + 0.5 mg/l kin |
| 2.66[ab] | 1.02[e] | 1 mg/l BA + 1 mg/l kin |

میانگین‌های با حروف مشترک از لحاظ آماری و بر اساس آزمون جدید دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

Numbers with the same letters were not statistically different at 5% probability level of Duncan's test.

کمترین تعداد باززایی شاخساره در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد حاصل شد. هم‌چنین نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه یک میلی‌گرم بر لیتر Kin به‌دست آمده است که با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد. در ضمن کمترین طول شاخساره در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد به‌دست آمد (جدول ۲).

فاکتورهای شیمیایی، مواد معدنی و تنظیم‌کننده‌های رشد به‌عنوان مهم ترین عوامل مؤثر بر تمایزیابی و رشد گیاه شناخته می‌شوند (Hagimori *et al.*, 1980؛ Smith and Gould, 1989). در کشت سلولی، رشد و ریخت‌زایی به‌طور مشابه به وسیله نوع و غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و روابط متقابل بین آن‌ها کنترل می‌شود (Perez- Bermudez, 1983). با توجه به جدول (۲) مشاهده می‌شود که در تولید شاخساره از کالوس گل راعی، نخست کاربرد تنظیم‌کننده رشد سیتوکنینی جهت باززایی شاخساره الزامی است و دوم این که استفاده توام تنظیم‌کننده های رشد بنزیل آدنین و کینتین تأثیر بیشتری نسبت به کاربرد هر کدام از آن دو تنظیم‌کننده رشد به تنهایی دارد. سیتوکنین‌ها جز مهم ترین تنظیم‌کننده های رشد برای تولید شاخساره از کالوس محسوب می‌شوند. Karimi *et al.* (2014) در پژوهشی گزارش کردند که در کشت بافت گیاه گل انگشتانه تنظیم‌کننده رشدBA نسبت به Kin تأثیر بیشتری دارد. Ghazian Tafrishi *et al.* (2006) نیز بیشترین تعداد شاخساره از کالوس گل راعی را از محیط کشت حاوی یک میلی گرم بر لیتر NAA به همراه یک میلی گرم بر لیتر Kin گزارش کردند. این پژوهش ها با پژوهش حاضر از لحاظ استفاده از تنظیم‌کننده رشد Kin مطابقت دارد.

نتایج مقایسه میانگین اثر محیط کشت با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد IBA، نشان داد که غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده رشد IBA تأثیر معنی‌داری بر تعداد ریشه نداشت. اما اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد بر طول ریشه نشان داد که بیشترین طول ریشه در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد، که با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان نداد، ولی با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری بود. هم‌چنین بین افزایش طول ریشه با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد IBA رابطه مستقیمی مشاهده شد، بدین صورت که با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد، طول ریشه نیز افزایش یافت (جدول ۳).

**جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد و طول ریشه از شاخساره گل راعی**

**Table 3. Mean comparison of root's number and length of Hypericum**

| تنظیم‌کننده رشد IBA (میلی‌گرم بر لیتر) Growth regulators (mg/l) | تعداد ریشه Root number | طول ریشه (سانتی‌متر) Length root (cm) |
|---|---|---|
| 0 | $2^{a}$ | $0.5^{c}$ |
| 0.2 | $2.1^{a}$ | $0.59^{c}$ |
| 0.4 | $2.3^{a}$ | $0.79^{bc}$ |
| 0.6 | $2.5^{a}$ | $0.87^{bc}$ |
| 0.8 | $2.6^{a}$ | $1.2^{ab}$ |
| 1 | $2.4^{a}$ | $1.4^{a}$ |

میانگین‌های با حروف مشترک از لحاظ آماری و بر اساس آزمون جدید دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

Numbers with the same letters were not statistically different at 5% probability level of Duncan's test.

از آن جایی که به‌طور معمول تنظیم کننده‌های رشد اکسینی در تولید سرآغازه‌های ریشه‌زایی تأثیر دارند، به نظر می‌رسد که میزان کاربرد IBA بیش از این، توانایی افزایش سرآغازه ریشه‌زایی را ندارد به گونه‌ای که بالاترین غلظت از IBA، آغازی برای کاهش تولید ریشه‌های جدید می‌باشد. اما با افزایش غلظت IBA افزایش طول ریشه مشاهده شد که احتمالاً به دلیل این افزایش حاصل شده است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که شاخساره‌های گل راعی بدون حضور اکسین به راحتی قادر به تولید ریشه می‌باشند و برای تولید ریشه نیازی به تنظیم‌کننده‌های رشد بیرونی ندارند. در ضمن استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد برون‌زا مقرون به صرفه نیست. نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر با نتایج سایر آزمایش‌ها مطابقت داشت. Carolina *et al.* (2001) نشان دادند جوانه‌های به‌دست آمده از باززایی گل راعی در محیط کشت MS ½ بدون تنظیم‌کننده رشد ریشه‌دار شدند. Pretto and Santarem (2000) عنوان کردند که تولید ریشه از شاخساره‌های گل راعی، در محیط کشت MS و MS ½ در حضور و عدم حضور IBA یکسان است.

## نتیجه‌گیری

در این تحقیق با بررسی عوامل تأثیر گذار بر باززایی نظیر ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی،یافته‌های پژوهش نشان داد که بیشترین تعداد کالوس از نظر تعداد ریزنمونه برگ در تیمار حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴-D حاصل شد. بیشترین تعداد کالوس از نظر وزن توده کالوس را ریزنمونه تک گره در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴-D به خود اختصاص داد. همچنین بیشترین تعداد شاخساره و بلندترین طول شاخساره تولید شده از کالوس به‌ترتیب در محیط‌های کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه یک میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شدند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد شاخساره‌های گل راعی برای تولید ریشه نیازی به تنظیم‌کننده‌های رشد بیرونی ندارند.

## References

Amini, F., Ghanbarzadeh, Z. and Askari Mehrabadi, M. (2014). Optimization of callus induction and plant regeneration *Salsola arbuscula pall.* Journal of Cell and Tissue, 4(2), 129-137. [In Farsi]

Ayan, A. K., Cirak, C., Kevserolu, K. and Sokmen, A. (2005). Effect of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. Turkish Journal of Agriculture, 29, 197-204.

Bagheri, A. S. (1998). Foundations of Tissue cultures. In: R. Pyryk (Ed.). Mashhad: The University of Mashhad. [In Farsi]

Barnes, J., Anderson, A. and Phillipson, D. (2001). John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53(5), 583-600.

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

Bourgaud, F., Gravot, A. and Goniter, E. (2002). Production of plant secondary metabolites. Plant Science, 161(5), 839-851.

Campbell, M. H. (1985). Germination, emergence and seedling growth of *Hypericum perforatum* L. Weed Resaerch, 25(4), 259-266.

Carolina, A., Astarita, L. V. and Santarem, E. R. (2001). Organogenese in *Hypericum perforatum* L. IV Encontro Latino-Americano de Biotechnologin Vegetal. Goiania, Resumos.

Crompton, C. W., Hall, I. V., Jensen, K. I. N. and Hildebrand, P. (1988). The biology of Canadian weeds *Hypericum Perforatum* L. Canadian Journal Plant Science, 68(1), 149-162.

Curtis, J. D. and Lersten, N. R. (1990). Internal secretary structure in Hypericum (Glusiaceae): *H. Perforatum* L. and *H. balearicum* L. New Phytologist Journal, *114*, 571-580.

Engelmeyer, C. E. and Brandle, J. E. (1998). Southern crop protection and food research centre. Canada: Agriculture and Agri-food.

Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Sharifi, M. (2013). Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. Journal of Cell & Tissue Culture (JCT), 4(2), 119-128. [In Farsi]

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. [In Farsi]

Ghtbzadh Kermani, S., Pourseyedi, Sh. Mohammadi, Gh. A., Moini, A. and Baghizadeh, A. (2013). Regeneration *Cardaria draba* L. through tissue culture. Journal of Agricultural Biotechnology, 7(1), 133-154. [In Farsi]

Hagimori, M., Matsumoto, T. and Kiaski, T. (1980). Determination of digitoxin and digoxin contents in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several *Digitalis* species by radioimmunoassay. Plant Physiology, 21(8), 1391-1063.

Hobbs, Ch. (1996). St. John’s wort. Herbal Gram, *35*, 18-32.

Hughes, E. H. and Shanks, J. V. (2002). Metabolic engineering of plants for alkaloid production. Metabolic Engineering, 4(1), 41-48.

Karimi, M., Kamal Kazemitabar, S., Azad Bakht, M. and Nematzadeh, G. (2014). Tissue Cultur Studty in Foxglove Plant (*Digitalis Nervosa* Staud & Hochst). Journal of Crop Breeding, 13(6), 18-28. [In Farsi]

Kubin, A., Wierrani, F., Burner, U., Alth, G. and Grunberger, W. (2005). Hypericin the facts about a controversial agent. Current Pharmaceutical Design, 11(2), 233-253.

Perez-Bermudez, P., Cornejo, M. J. and Segura, J. (1983). *In vitro* propogaion of *Digitalis obscura* L. Plant Science Letters, 30(1), 77-82.

Pretto, R. F. and Santarem, R. E. (2000). Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62(2), 107-113.

Rani, N. S., Balaji, K. and Ciddi, V. (2001). Production of hypericin from tissue culture of *Hypericum perforatum*. Indian Journal of Pharmaceuticals Science, 63(5), 431-433.

Sirvent, T. M., Walker, L. Vance, N. and Gibson, D. M. (2002). Variation in hypericins from wild populations of *Hypericum perforatum* L. In the Pacific Northwest of the U.S.A. Economic Botany, *56*(1), 41-48.

Smith, R. H. and Gould, J. H. (1989). Introductory Assay. In: J. Janick (Ed.), Classic Papers in Horticultural Science (pp: 52-90). Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall

Tripathi, L. and Tripathi, J. N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2), 243-253.

# Optimizing *In Vitro* Regeneration of Hypericum (*Hypericum Perforatum* L.)

Z. Parsamanesh[1], F. Bayat[2]* and M. Hedayat[3]

1- M.Sc. Student of Plant Breeding, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
2- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran (bayatfereshteh59@gmail.com)
3- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

Received: 15 September, 2016 Accepted: 17 May, 2017

## Abstract

### Background and Objectives

*Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) has received considerable interest worldwide due to its biochemical characteristics and unique secondary metabolites. In particular, aromatic polycyclic diones, such as hypericin and pseudohypericin have an interest as their antiviral, anticancer and antidepressant activities. To date, field grown plant material has generally been used for commercial St. John's Wort production but the quality of these products may be affected by different environmental conditions, pollutants, fungi, bacteria, viruses, and insects which can alter the concentration of medicinal metabolites. In vitro systems have been reported as an effective tool for the development of genetically uniform plants. In order to approach optimal micropropagation of *Hypericum perforatum*, it is necessary to optimize shoot proliferation stage in *in vitro* culture.

### Materials and Methods

In the present study, at 2015-2016, *in vitro* regeneration of *Hypericum perforatum* L. using different plant growth regulators on MS media has been developed. Callus was induced from leaves and shoots explants of St. Johns wort on MS medium containing different levels of growth regulator (0, 2 and 4 mg/l BA; 1 and 2 mg/l Kin plus 0.1, 0.2 and 0.3 mg/l 2,4-D) in a factorial experiment with completely randomized design in three replications. To shoot induction, an equal size of formed callus was separated and evaluated on MS media containing BA (0, 0.5 and 1 mg/l) and Kin (0, 0.5 and 1 mg/l). The shoots with terminal node were used on MS media containing IBA (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mg/l) to root induction.

### Results

After 4 weeks, callus and shoot/root induction of explants was measured. Data analysis indicated that leaf explants produced higher callus mass than single node explant. In leaf explants 2, 4-D increment had no significant effect on callus mass induction while in single nodes, callus induction increased as 2, 4-D increased. In presence of BA, callus induction from both explants increased with 2, 4-D concentration raising. Single node explants produced highest mass of callus in media containing 2 mg/l BA plus 0.1 mg/l of 2, 4-D. The highest number of shoots and the longest shoot were achieved in presence of 1 mg/l BA with 0.5 mg/l Kin and 0.5 mg/l BA plus 1 mg/l Kin.

### Discussion

Theresults revealed that different explants can be used to achieve high regeneration efficiency using different levels of growth regulators. Also, it seems that external growth regulators are not essential in *Hypericum* branch for rooting.

***Keywords: Callus, Growth regulators, Micropropagation, Tissue culture***