Archiv

Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Effects of Different Concentrations of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Shoot Regeneration in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)

Mehdi Soltanpour

MSc Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: mehdisoltanpour67@gmail.com

Nasser Mahna

*Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture University of Tabriz, Tabriz, Iran, Tel: 33392027 Email: mahna@tabrizu.ac.ir; n.mahna@gmail.com

Nader Farsad Akhtar

Assistant Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: naderfarsad@gmail.com

Abstract

Objective

St. John's wort belongs to Hypericaceae family and has been used since ancient Greeks as a herb for the treatment of anxiety, depression, wounds and burns. In present study, the effects of different concentrations of CPPU and BA (each in three concentrations) in combination with two concentrations of IAA on callus production and shoot regeneration of *Hypericum perforatum* from leaf and stem explants were evaluated to identify the best growth regulator combination for obtaining the highest yield of in vitro regenerated shoots.

Materials and methods

This was implemented in a CRD-based factorial experiment with three replicates and five samples in each replicate and the traits including callus fresh weight, number of shoots, shoot length, length of the tallest shoots, and the number of nodes of the tallest shoots were measured and examined.

www.SID.ir

Results

Results showed that the most effective combination for regeneration was 1.5 mg/l CPPU and 1 mg/l IAA, which may be a proof for more effectiveness of CPPU in comparison with BA as cytokinin source on shoot regeneration in *Hypericum perforatum*.

Conclusions

The use of 1 mg/l IAA in combination with 1.5 mg/l CPPU or BA resulted in a significant increase in shoot regeneration. It was also showed that 1 mg/l IAA in combination with 0.5 mg/l BA could cause a significant increase in callus fresh weight.

Key Words: BA, CPPU, *Hypericum perforatum*, IAA, Regeneration.

Citation: Soltanpour M, Mahna N, Farsad Akhtar N (2019) Effects of Different Concentrations of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Shoot Regeneration in St. John's Wort (Hypericum perforatum). Agricultural Biotechnology Journal 10 (4), 75-92.

DOI: 10.22103/jab.2019.2250

Received: August 23, 2018; Accepted: November 3, 2018

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر کالوس زایی و باززایی گل راعی (*Hypericum perforatum*)

مهدی سلطانپور

دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، ایمیل: mehdisoltanpour67@gmail.com

ناصر مهنا

* نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، تلفن: ۳۳۳۹۲۰۲۷ ایمیل: n.mahna@gmail.com; mahna@tabrizu.ac.ir

نادر فرساد اختر

استادیار گروه زیست گیاهی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، ایمیل: naderfarsad@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۳

چکیده

هدف: گیاه گل راعی (*Hypericum perforatom*) متعلق به خانواده هایپریکاسه بوده و از زمان یونان باستان به عنوان یک گیاه دارویی برای درمان اضطراب، افسردگی، زخم و سوختگی استفاده شده است. در مطالعهٔ حاضر، اثر غلظت‌های مختلف CPPU و BA (هر کدام در سه غلظت) در ترکیب با دو غلظت IAA بر کالوس‌زایی و باززایی شاخساره گل راعی از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره به منظور تعیین مناسبترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد اکسینی و سیتوکینینی و مشخص نمودن مناسب ترین ترکیب هورمونی برای به دست آوردن بیشترین باززایی شاخساره در محیط کشت پایه MS انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و پنج ریزنمونه در هر تکرار مورد بررسی قرار گرفت و صفات وزن تر کالوس، تعداد شاخساره، طول شاخساره و تعداد گره بلندترین شاخساره اندازه‌گیری و بررسی شد.

نتایج: براساس نتایج حاصل در بین تیمارهای هورمونی، ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA بیشترین اثر را روی باززایی گل راعی داشت که اثبات کننده نقش تنظیم کنندگی سیتوکینینی CPPU در باززایی شاخساره در گل راعی به خوبی مشاهده گردید.

نتیجه گیری: غلظت ۱ میلی‌گرم درلیتر IAA به همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU یا BA باعث افزایش معنی‌داری در باززایی شاخساره گردید. همچنین، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA باعث افزایش وزن تر کالوس در گل راعی شد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، IAA، علف چای، CPPU، BA

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل روشن شدن عوارض جانبی تعداد زیادی از داروهای شیمیایی گرایش نسبت به استفاده از گیاهان دارویی افزایش یافته و این گیاهان در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته اند (Aktuna 2014). گیاه گل راعی (*Hypericum perforatum*) با نام‌های مختلف دیگر مانند هوفاریقون و علف چای، گیاهی چندساله، علفی و با برگهای متقابل، بیضی و کمی دراز است (Cui et al. 2010). استفاده از گونه های مختلف گل راعی (*Hypericum perforatum*) به عنوان یک گیاه دارویی به زمان یونان باستان برمی‌گردد. گل راعی دارای ده‌ها مواد فعال بیولوژیکی می‌باشد که از میان آن‌ها هیپریسین و هیپرفورین بیشترین کاربرد را در صنایع دارویی دارند (Klemow et al. 2004). گل راعی معمولاً بیش از سه سال در مزارع کشت نمی‌شود که علت آن مربوط به بیماری قارچی آنتراکنوز است (Gaudin et al. 2002). از سوی دیگر جمعیت‌های طبیعی و لاین‌های اصلاح شده از لحاظ تولید میزان مواد فعال بسیار متنوع می‌باشند (Cellarova 2003). روش درون شیشه‌ای ابزاری مهم برای بدست آوردن گیاهان یکنواخت ژنتیکی است (Santarém and Astarita 2003). از طرف دیگر، برای انجام انتقال ژن به این گیاه پروتکل باززایی کارایی لازم می باشد. برای نیل به این دو هدف، تعیین غلظت مواد تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت بسیار مهم است (Chawla 2002). از جمله این تنظیم کننده‌های رشد، برخی از مشتقات اوره را می توان نام برد که ترکیبات مصنوعی هستند و روی تقسیم و تمایز سلول‌ها اثر مثبت دارند. به عنوان مثال، CPPU[1] به عنوان یک سیتوکینین اوره ای به خوبی شناخته شده است و به طور گسترده‌ای در کشت بافت گیاهان برای مطالعات مورفوژنز استفاده می‌شود و فعالیت شبه سیتوکینینی آن اغلب بیشتر از ترکیبات آدنین‌دار است (Ricci and Bertoletti 2009). در مورد کاربرد و تاثیر تنظیم کننده‌های رشد بر روی علف چای کارهای مختلفی انجام شده است. Farsad Akhtar et al. (2013) بالاترین تعداد شاخساره در ریزنمونه برگ علف چای را در غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آوردند. از بین سیتوکینین‌های فنیل اوره‌ای اثر TDZ روی گل راعی مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج حاصل بیانگر این است که kinetin و BAP اثر بیشتری نسبت به TDZ بر شاخه‌زایی این گیاه داشته است (Santarém and Astarita 2003). تاثیر CPPU نیز بر گیاهان مختلف بررسی شده است. مثلا Tsuro et al. (1999) سرعت تشکیل شاخه و شاخه‌زایی را در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی سیتوکینین‌های BA، CPPU و TDZ[2] در گیاه اسطوخودوس مورد بررسی قرار دادند و بیش‌ترین شاخه‌زایی را در محیط کشت حاوی ۴/۴ میکرومولار BA و ۰/۴ میکرو مولار CPPU مشاهده کردند. ولی، تاکنون گزارشی در مورد تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد CPPU بر باززایی گیاه علف چای به ثبت نرسیده است. در این مطالعه، اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌ی رشد CPPU بر کالوس زایی و باززایی گل راعی در مقایسه با BA مورد بررسی قرار گرفت.

1-N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea
2-Thidiazuron

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

بذور علف چای (*Hypericum perforatum*) رقم Helos (یک رقم اصلاح شده با مقاومت خوب در برابر آنتراکنوز) که از یکنواختی بالایی برخوردار می‌باشد، از شرکت ریکترز کانادا تهیه گردید. این آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه تبریز انجام گردید. بذور برای ضدعفونی زیر هود لامینار ایر فلو ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و سپس با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی گردیدند. بعد از ضدعفونی سطحی بذور روی محیط کشت MS استریل شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، برای جوانه‌زنی قرار داده شد و به اتاق رشد با دمای 23±2 درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند (Murashige and Skoog 1962). ریزنمونه‌های برگی و میان‌گره در ۶ هفتگی از نمونه‌ها جدا و بر روی محیط MS حاوی ویتامین‌های B5 باضافه‌ی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال یافتند. تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده در این محیط غلظت‌های مختلفی از CPPU (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با IAA (۰/۰ و ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۰/۵، ۱/۰، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با IAA (۰/۰ و ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. برای انجام این تحقیق از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و پنج ریزنمونه در هر تکرار استفاده شد. بعد از ۲۰ روز وزن تر کالوس اندازه‌گیری شد و پس از ۳۰ روز کالوس‌های حاوی شاخساره‌های باززایی شده به ظروف شیشه‌ای حاوی تنظیم کننده‌های فوق انتقال یافته و به دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاق رشد منتقل و بعد از ۱۴ روز صفات مورد نظر اندازه گیری شد.

صفات مورد اندازه‌گیری در این آزمایش وزن تر کالوس، تعداد شاخساره، طول شاخساره و تعداد گره بلندترین شاخساره بودند. برای اندازه‌گیری وزن تر کالوس از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد. برای محاسبه تعداد شاخساره تعداد شاخساره در هر ریزنمونه شمارش گردید و میانگین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه ثبت گردید. برای محاسبه طول شاخساره در هر ریزنمونه، میانگین طول شاخساره‌های تولید شده در هر ریزنمونه محاسبه شد. برای اندازه‌گیری تعداد گره بلندترین شاخساره، تعداد گره بلندترین شاخساره در هر ریزنمونه را شمارش کرده و میانگین تعداد گره در بلندترین شاخساره محاسبه گردید. داده ها با استفاده از نرم افزار IBM SPSS v. 22 و MSTATC تجزیه گردیدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. نمودارها با نرم افزار MS Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

در مورد صفت وزن تر کالوس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ریزنمونه و IAA در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل IAA × BA در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تجزیه واریانس ویژگی‌های مورد مطالعه گل راعی در پاسخ به سطوح مختلف BAP، IAA و ریز نمونه

Table 1. Analysis of variance of some of the studied characteristics in different levels of IAA, BA and explants in St. John's wort

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی Df	میانگین مربعات(MS) وزن تر کالوس Callus fresh weight	طول شاخساره Length of shoot	تعداد گره بلندترین شاخساره Node number of the tallest shoot	تعداد شاخساره Shoot number
ریزنمونه Explant	1	185.822**	210.226**	3.213**	347.184**
ایندول استیک اسید IAA	1	4270.405**	1307.365**	17.796**	827.238**
بنزیل آدنین BA	2	2.846 ^{ns}	33.332**	0.420 ^{ns}	150.463**
ریزنمونه× ایندول استیک اسید explant × IAA	1	0.540 ^{ns}	68.716**	2.065**	171.477**
بنزیل آدنین × ریزنمونه explant×BA	2	0.070 ^{ns}	19.043*	0.746*	32.957**
بنزیل آدنین × ایندول استیک اسید BA×IAA	2	22.526*	7.689 ^{ns}	0.656*	48.268**
بنزیل آدنین × ایندول استیک اسید×ریزنمونه BA×IAA×explant	2	0.356 ^{ns}	11.608 ^{ns}	0.143 ^{ns}	32.040**
خطا Error	24	4.570	5.019	0.164	2.523
ضریب تغییرات (%) (CV)		9.04	14.08	13.24	6.72

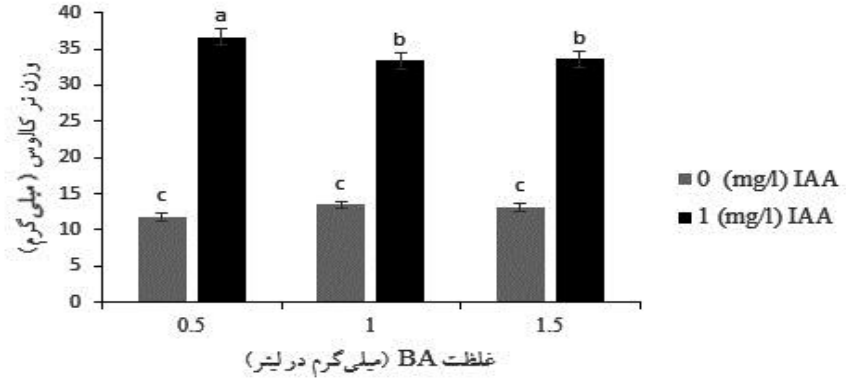
ns ، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns: Non-significant, * and **: Significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

نتایج این یافته نشان داد که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۳۶/۶۸ میلی‌گرم دارای بیشترین وزن تر کالوس و محیط کشت‌های فاقد IAA دارای کمترین وزن تر کالوس بودند (شکل ۱). سلول‌های

www.SID.ir

گیاه در پاسخ به IAA، بعضی از عوامل نرم کننده دیواره سلولی (یون هیدروژن) را خارج می‌کنند که انبساط پذیری دیواره را افزایش می‌دهد و باعث اسیدی شدن دیواره سلول می‌شود که در کنترل بزرگ شدن سلولی و تحریک طویل شدن سلول نقش دارد (Taiz and Zeiger 2010). بر این اساس مشاهده شد که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA منجر به افزایش وزن تر کالوس می‌شود.



شکل ۱. اثرات متقابل غلظتهای مختلف بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید بر وزن تر کالوس گل راعی حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد

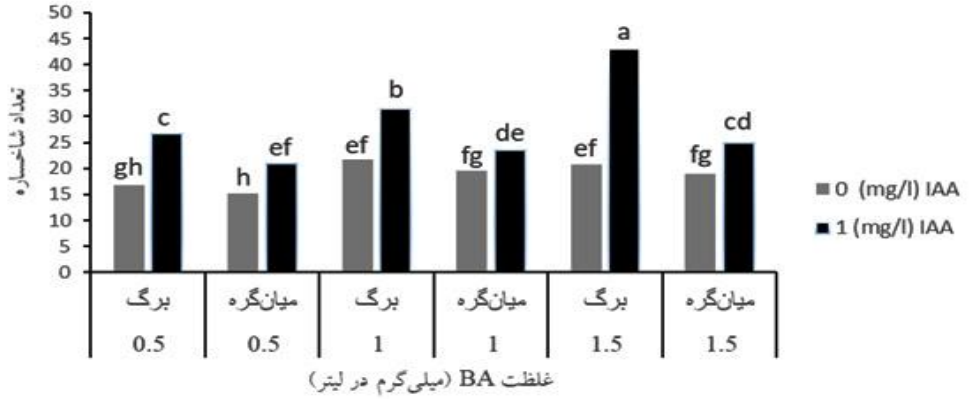
Figure 1- Interaction between different concentration of BA and callus fresh weight of St. John's wort Different letters show significance based on Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$)

تعداد شاخساره

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تمامی اثرات اصلی و متقابل برای صفت تعداد شاخساره در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که بیش‌ترین تعداد شاخساره در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۴۳/۰۶ مربوط به ریزنمونه برگ و کم‌ترین تعداد شاخساره در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه صفر میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۱۵/۲۵ مربوط به ریز نمونه میان‌گره می‌باشد (شکل ۲). باززایی یک فرآیند فوق العاده پیچیده است که عوامل متعدد کمی و کیفی مانند خصوصیات ژنتیکی گیاه، میزان مواد رشد گیاهی، مقدار مواد تنظیم کننده رشد و غیره بر آن تأثیر می‌گذارند (Bagheri and Saffari 1997). معلوم شده است که هورمونها اثر متقابل روی یکدیگر داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را بهبود بخشند (Del Poza et al. 2005). بر این اساس مشاهده می‌شود که در شرایط درون شیشه‌ای تشکیل شاخساره به نوع ریز نمونه مورد استفاده در محیط کشت وابسته است و اکسین ها و سیتوکینین ها نیز در تشکیل شاخساره در گونه‌های مختلف گل راعی موثر هستند (Namli et al. 2010).

www.SID.ir

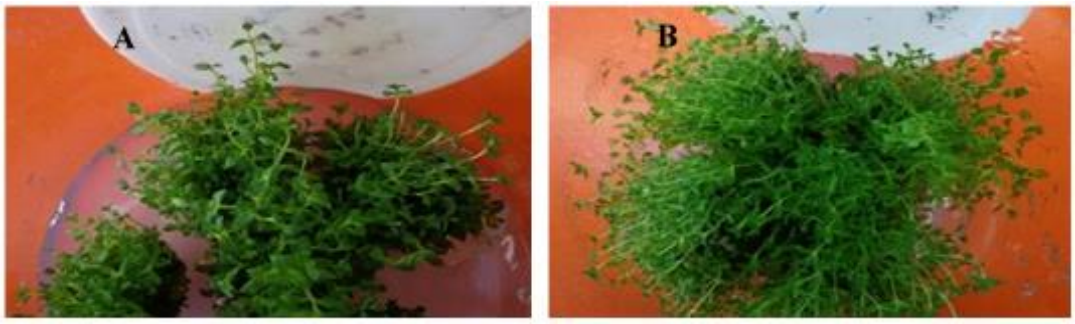
Archive of SID



شکل ۲. اثرات متقابل غلظت‌های مختلف ریزنمونه، بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید بر تعداد شاخساره گل راعی. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد

Figure 2- Interaction between different concentrations of BA, IAA and explant, on shoot number of St. John's wort Different letters show significance based on Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$)

در گل راعی BA به عنوان موثرترین سیتوکینین در تشکیل شاخساره از قسمت‌های مختلف جدا شده از دانهال معرفی شده است (Pretto and Santarem 2000) و براین اساس مشاهده شده است که افزایش غلظت BA تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش تعداد شاخساره در هر ریزنمونه می‌شود (شکل۳).



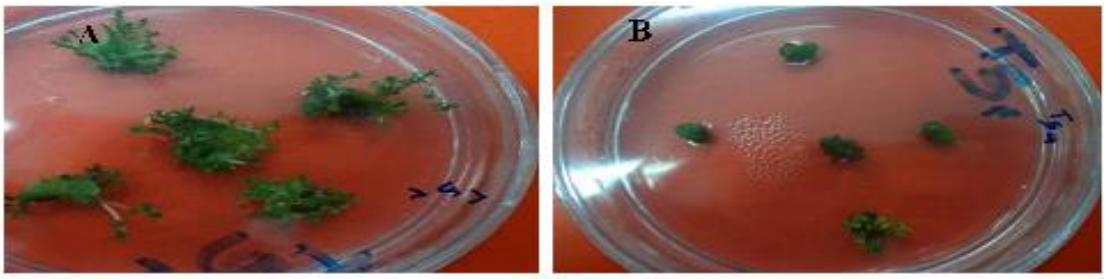
شکل۳. شاخه‌های باززایی شده از ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA شکل (A) و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA ٤٤ روز بعد از کاشت (B)

Figure 3. Regenerated shoots from leaf explants on the culture medium containing 0.5 mg / L BA and 1 mg / L IAA (A) and 1.5 mg / L BA and 1 mg / L IAA 44 days after planting (B)

www.SID.ir

طول شاخساره

در بیش‌تر تیمارها شاخساره سه هفته بعد از کشت تشکیل شد (شکل۴). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ریزنمونه، IAA و BA و نیز اثر متقابل ریزنمونه × IAA در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل ریزنمونه × BA در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).



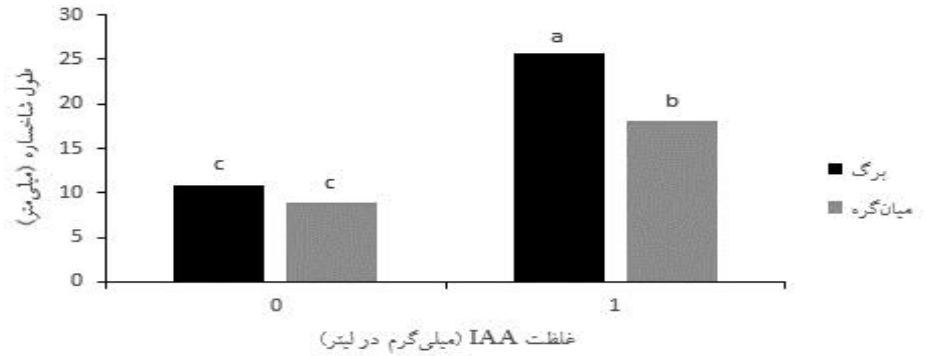
شکل ٤. شاخه‌های باززایی شده از ریزنمونه برگ (A) و میان‌گره (B) در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA ۲۱ روز بعد از کاشت

Figure 4. Regenerated shoots from leaf explants (A) and stem segments (B) on the culture medium containing 1 mg / L BA and 1 mg / L IAA 21 days after planting

نتایج این مطالعه نشان داد که بیش‌ترین طول شاخساره با میانگین ۲۵/۷۳ میلی‌متر مربوط به ریزنمونه برگ در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و کم‌ترین آن با میانگین‌های ۸/۸۵ و ۱۰/۹۲ میلی‌متر به ترتیب مربوط به ریزنمونه‌های میان‌گره و برگ در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر IAA بود (شکل ۵). بر این اساس مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت اکسین طول شاخساره افزایش می‌یابد. بنا به نظر .Taiz and Zeiger (2010)، IAA از مهم‌ترین اکسین‌های طبیعی گیاهان می‌باشد که رشد طولی ساقه و کولئوپتیل‌ها را افزایش می‌دهد. بنابرین می‌توان نتیجه گرفت که ساقه‌ها به طیف وسیعی از غلظت اکسین واکنش نشان می‌دهد و باعث تحریک رشد و طویل شدن آن می‌شود در حالی که رشد ریشه ها در قسمت اعظمی از دامنه غلظت اکسین کند می‌شود (Gardner 2010). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین طول شاخساره با میانگین‌های ۲۰/۲۳ و ۱۸/۹۶ میلی‌متر به ترتیب در غلظت‌های ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA مربوط به ریزنمونه برگ و کمترین طول شاخساره با میانگین ۱۱/۶۴ و ۱۳/۴۹ میلی‌متر به ترتیب در غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مربوط به ریزنمونه میان‌گره می‌باشد (شکل ۶).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. اثرهای متقابل غلظت‌های مختلف ایندول استیک اسید و ریزنمونه بر طول شاخساره گل راعی. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد

Figure 5. Interaction between different concentration of IAA and explant on length of shoot in St. John's wort. Different letters show significance based on Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$)

نتایج مطالعات Akbaş et al. (2011) که اثر غلظت‌های مختلف BAP روی باززایی گیاه *H. spectabile* از طریق ریزنمونه برگ را بررسی کردند، مشخص کردند که از بین شش غلظت BAP (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین طول شاخساره با میانگین ۳ سانتی‌متر در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده می‌شود.

تعداد گره بلندترین شاخساره

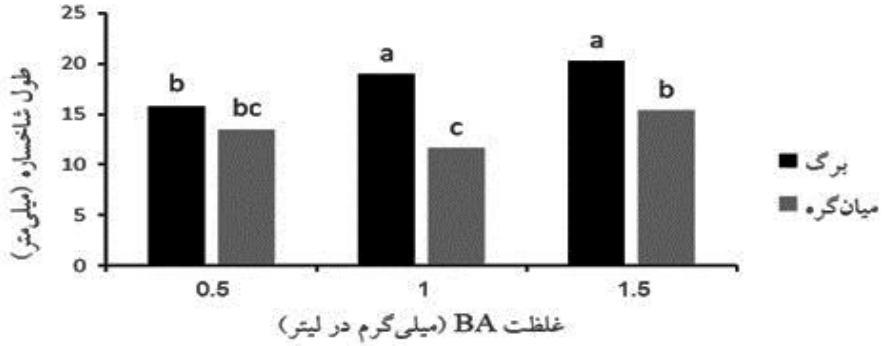
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی ریزنمونه و IAA و اثر متقابل ریزنمونه × IAA در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل ریزنمونه × BA و BA × IAA در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۴/۱۶ بیش‌ترین تعداد گره و در غلظت‌های مختلف BA که فاقد IAA بودند کم‌ترین تعداد گره در بلندترین شاخساره مشاهده شد (شکل ۷). پس می‌توان نتیجه گرفت که IAA نقش مهمی در تنظیم رشد و تمایز سلول گیاهی دارد. در شاخه‌های توسعه یافته جوان اکسین رشد طولی را با افزایش انبساط پذیری دیواره سلولی و تحریک رشد سلول و طویل شدن آن تنظیم می‌کند (Taiz and Zeiger 2010). بر این اساس مشاهده می‌شود که IAA در ترکیب با BA برای افزایش تعداد گره بلندترین شاخساره ضروری می‌باشد.

www.SID.ir

تاثیر غلظت‌های مختلف CPPU و IAA بر صفات مورد مطالعه

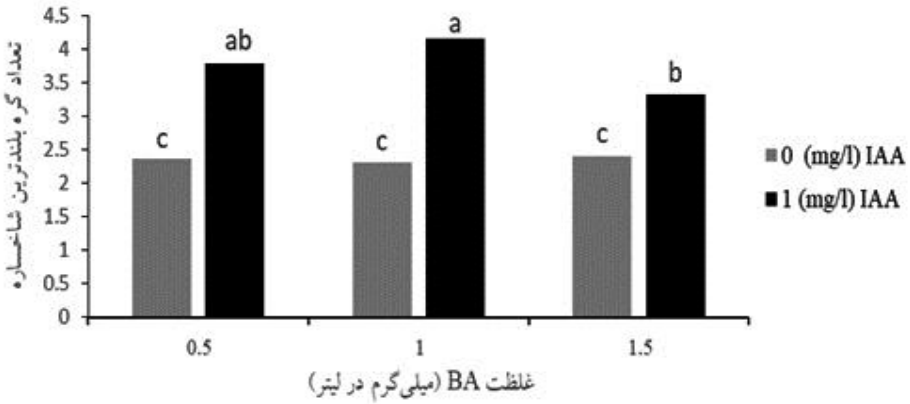
وزن تر کالوس

در رابطه با وزن تر کالوس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ریزنمونه و IAA در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).



شکل ٦. اثرات متقابل غلظت‌های مختلف ریزنمونه و بنزیل آدنین بر طول شاخساره گل راعی. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد

Figure 6. Interaction between different concentration of explant and BA on lengths of shoot of St. John's wort. Different letters show significance based on Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$)



شکل ۷. اثرات متقابل غلظتهای مختلف بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید بر تعداد گره بلندترین شاخساره گل راعی. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد

Figure 7. Interaction between different concentration of BA and IAA on node number of tallest shoots of St. John's wort. Different letters show significance based on Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. تجزیه واریانس برخی ویژگی‌های مورد مطالعه گل راعی در سطوح مختلف IAA، CPPU و ریزنمونه

Table 2. Analysis of variance of some of the studied characteristics in different levels of IAA, CPPU and explants in St. John's wort

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی Df	میانگین مربعات (MS) وزن تر کالوس Callus fresh weight	طول شاخساره Length of shoot	تعداد گره بلندترین شاخساره Node number of tallest shoot	تعداد شاخساره Shoot number
ریزنمونه Explant	1	82.568**	127.950**	0.871 ns	478.516**
فورکلرفنورون CPPU	2	23.127ns	33.453**	0.311 ns	229.170**
ریزنمونه× فورکلرفنورون explant × CPPU	2	1.182ns	10.052 ns	0.554 ns	37.840*
ایندول استیک اسید IAA	1	3914.588**	1566.352**	48.536 **	1975.065**
ریزنمونه× ایندول استیک اسید explant × IAA	1	26.522ns	0.267 ns	0.695 ns	312.013**
ایندول استیک اسید× فورکلرفنورون CPPU × IAA	2	14.952ns	29.408**	0.835 ns	31.916*
ایندول استیک اسید× فورکلرفنورون×ریزنمونه CPPU ×IAA× explant	2	1.951ns	3.050 ns	0.951*	7.167 ns
خطا Error	24	7.922	3.044	0.260	7.896
ضریب تغییرات (CV)(%)		12.86	8.49	13.49	9.76

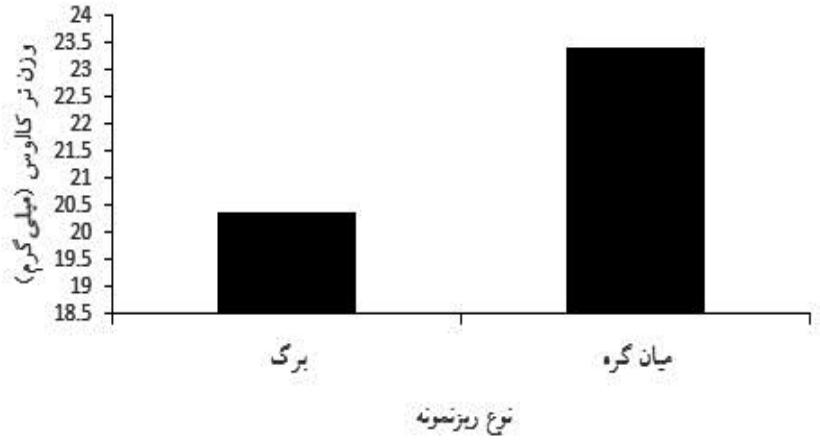
ns ، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns: Non-significant, * and **: Significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

www.SID.ir

Archive of SID

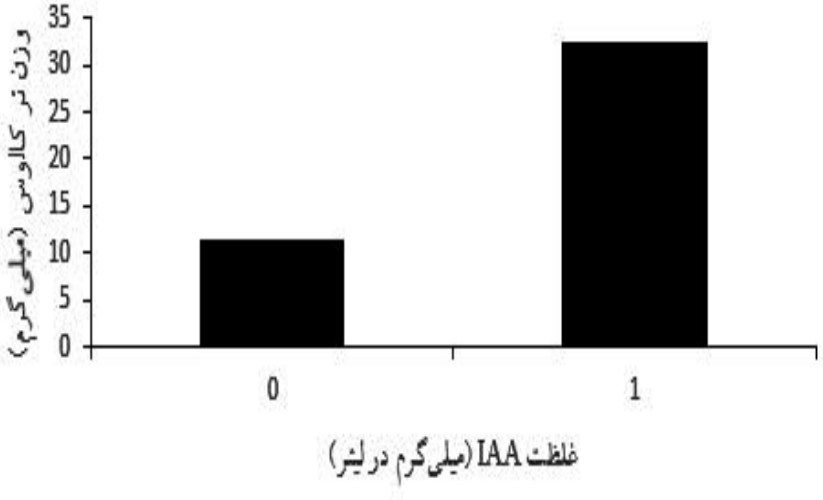
بر اساس نتایج مقایسه میانگین مشاهده شد که ریزنمونه میان‌گره با میانگین ۲۳/۴ میلی‌گرم دارای بیشترین و ریزنمونه برگ با میانگین ۲۰/۳۷ میلی‌گرم دارای کمترین وزن تر کالوس بودند (شکل ۸). بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که ریزنمونه میان‌گره برای افزایش وزن تر کالوس مناسب‌تر از ریزنمونه برگ می‌باشد.



شکل ۸. مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه بر وزن تر کالوس گل راعی

Figure 8. Comparison of means of the effect of explant type on the callus fresh weight in St. John's wort

همچنین غلظت ۱ و صفر میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب با میانگین‌های ۳۲/۳۲ و۱۱/۴۶ میلی‌گرم دارای بیشترین و کمترین وزن تر کالوس بودند (شکل ۹).



شکل ۹. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف IAA بر وزن تر کالوس گل راعی

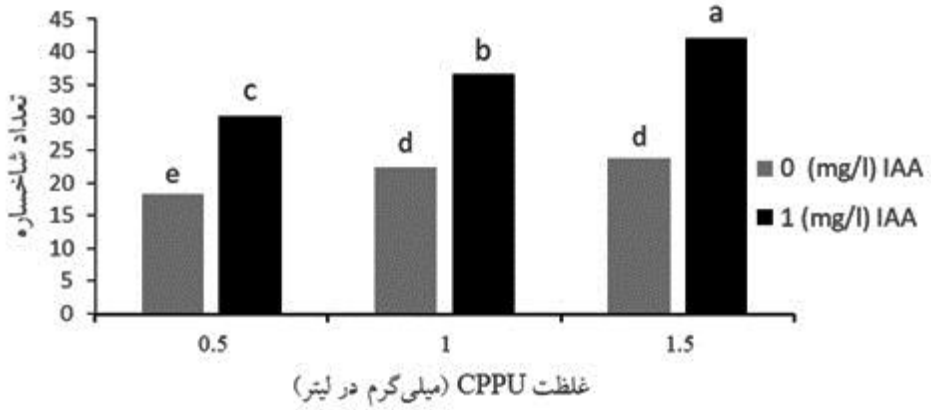
Figure 9. Comparison of means of the effect of different concentrations of IAA on callus fresh weight in St. John's wort

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد شاخساره

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ریزنمونه، CPPU و IAA و اثر متقابل ریزنمونه × IAA در سطح احتمال ۱ درصد و همچنین اثر متقابل ریزنمونه × CPPU و CPPU × IAA در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در بین ترکیبات تیماری مختلف غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین ۴۱/۹۸ دارای بیش‌ترین و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU به‌همراه صفر میلی‌گرم در لیترIAA با میانگین ۱۸/۱۹ دارای کمترین تعداد شاخساره بودند (شکل ۱۰). این نتایج مشابه نتایج Wójcik and Podstolski (2007)، بود که نشان دادند بیش‌ترین تعداد شاخساره از کالوس برگ زمانی بدست می‌آید که BAP به همراه IAA استفاده شود. همچنین استفاده از اکسین باعث تشکیل کالوس و باززایی شاخساره‌ها می‌شود و در ترکیب با سیتوکینین باعث سریعتر شدن سرعت تقسیم سلولی و در نهایت باعث تشکیل تعداد زیادی سلول‌های کوچک و تمایز نیافته می‌شود (Mendoza and Kaeppler 2002).



شکل ۱۰. اثرات متقابل غلظت‌های مختلف فورکلرفنورون و ایندول استیک اسید بر تعداد شاخساره گل راعی. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد

Figure 10. Interaction between different concentration of CPPU and IAA on shoot number of St. John's wort. Different letters show significance based on Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$)

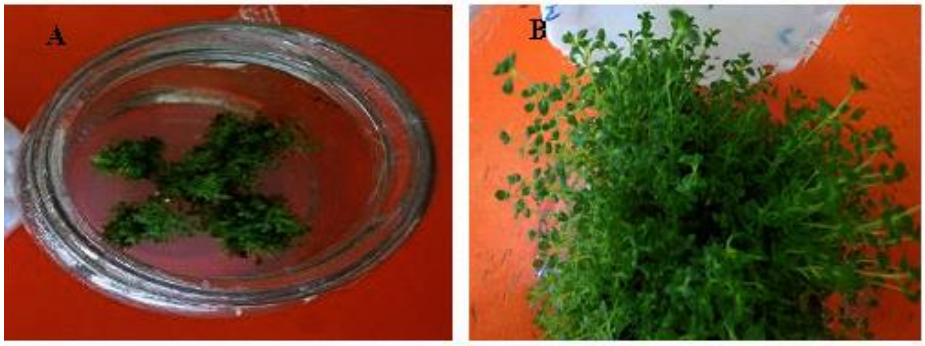
بر این اساس مشاهده شد که غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA برای افزایش باززایی گل راعی موثر می‌باشد (شکل۱۱).

طول شاخساره

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ریزنمونه، CPPU، IAA و اثر متقابل CPPU × IAA در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). دربین ترکیبات تیماری مختلف غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر

www.SID.ir

IAA با میانگین ۳۰/۴۳ میلی‌متر دارای بیش‌ترین و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU به‌همراه صفر میلی گرم در لیتر IAA با میانگین ۱۲/۴ میلی‌متر دارای کم‌ترین طول شاخساره بودند (شکل ۱۲).



شکل ۱۱. ریزنمونه برگ گل راعی در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU (A) و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA ٤٤ روز بعد از کشت (B)

Figure 11. St. John's wort leaf explants in the medium containing 0.5 mg/l CPPU (A) and 1.5 mg/l CPPU and 1 mg/l IAA 44 days after planting (B)

براین اساس مشاهده می‌شود که IAA به‌همراه CPPU نقش موثرتری در افزایش طول شاخساره در گیاه گل راعی دارد. اکسین‌ها در غلظت پایین اثر بازدارنده مقادیر زیاد سیتوکینین بر رشد طولی ساقه‌های جانبی را خنثی نموده و روند رشد ساقه‌ها را به حالت عادی باز می‌گردانند (Chawla 2002). بنابراین، استفاده از غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیترCPPU در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA باعث بهبود رشد طولی شاخساره در گیاه دارویی گل راعی می‌شود.

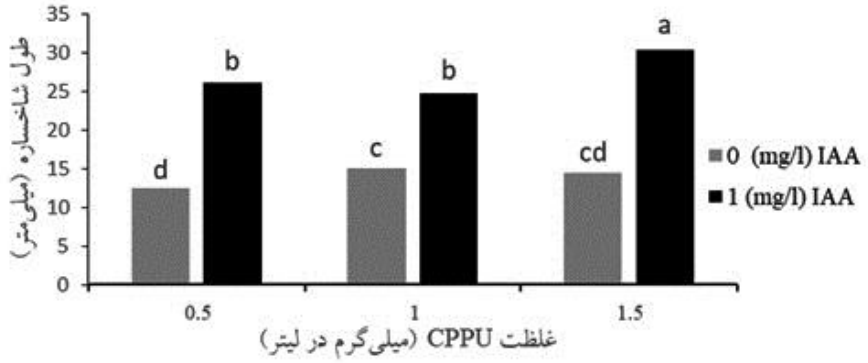
تعداد گره بلندترین شاخساره

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی IAA برای تعداد گره بلندترین شاخساره در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل سه جانبه ریزنمونه × IAA × CPPU در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در بین ترکیبات تیماری مختلف غلظت ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر CPPU به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA با میانگین‌های ۶/۰۱ و ۵/۱۶ در هر ریزنمونه برگ دارای بیش‌ترین و غلظت‌های مختلف CPPU که فاقد IAA بودند دارای کمترین تعداد گره در بلندترین شاخساره در هر دو ریزنمونه برگ و میان‌گره بودند (شکل ۱۳). پس می‌توان نتیجه گرفت که هورمون‌ها اثر متقابل روی یکدیگر دارند و اثرات همدیگر را با افزایش بزرگ شدن سلولی و تقسیم سلولی بهبود می‌بخشند. علت تعامل اکسین با سیتوکینین در تقسیم سلولی این است که در سلول ابتدا باید بزرگ شدن سلول اتفاق بیفتد وسپس تقسیم سلولی صورت گیرد و تا زمانی که اندازه سلول به یک حد معین نرسیده باشد تقسیم صورت نخواهد گرفت، همچنین مراحل اولیه تقسیم سلولی نیازمند

www.SID.ir

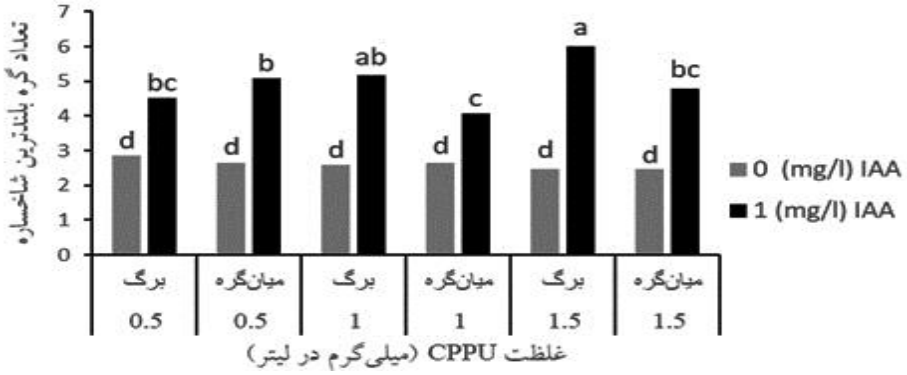
Archive of SID

حضور اکسین می‌باشد (Wang et al. 1981; Bayliss 1985). بنابراین، غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU در ترکیب با ۱میلی‌گرم در لیتر IAA نقش موثری را در افزایش صفت فوق در ریزنمونه برگ دارد.



شکل ۱۲. اثرات متقابل غلظتهای مختلف فورکلرفنورون و ایندول استیک اسید بر طول شاخساره گل راعی. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد

Figure 12. Interaction between different concentration of CPPU and IAA on shoot length of St. John's wort. Different letters show significance based on Duncan's multiple range test (p≤0.05)



شکل ۱۳. اثرات متقابل غلظتهای مختلف ریزنمونه، ایندول استیک اسید و CPPU بر تعداد گره بلندترین شاخساره گل راعی. حروف متفاوت نشان دهنده تغییرات معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد

Figure 13. Interaction between different concentration of explant, IAA and CPPU on node number of tallest shoots of St. John's wort. Different letters show significance based on Duncan's multiple range test (p≤0.05)

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

باززایی شاخساره در گل راعی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد قرار گرفت. به‌طور کلی نقش تنظیم کنندگی CPPU به عنوان هورمون سیتوکینین در گل راعی ثابت شد. حضور اکسین در محیط کشت باززایی در ترکیب با سیتوکینین باعث افزایش معنی‌دار باززایی می‌شود. بیشترین میزان باززایی شاخساره مربوط به ریزنمونه برگ در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA می‌باشد. غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر CPPU یا BA در ترکیب با IAA باعث افزایش معنی‌دار باززایی شد. غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA باعث افزایش وزن تر کالوس در گل راعی شد.

منابع

باقری عبدالرضا، صفاری مهری (۱۳۷۶) مبانی کشت بافت‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۰۶ صفحه.

References

Akbaş F, Karakuş P, Başaran D (2011) Direct plant regeneration from in vitro-derived leaf explants of *Hypericum spectabile*, a medicinal plant. J Med Plants Res 5, 2175-2181.

Aktuna O (2014) Optimization of hypericin extraction from *Hypericum perforatum* L. Tissues and evaluation of ITS applicabiy in dye-sensitized solar cells. Middle East Technical University Press. PP. 1-14.

Bagheri A, Saffari M (1997) In vitro culture of higher plants. Ferdowsi University of Mashhad Press. 406 pages (In Persian).

Bayliss M (1985) Control of cell division in cultured cells. In: Bryant JA and Francis D (eds) The cell division cycle in plants. Cambridge University Press. pp. 157-178.

Cellarova E (2003) Culture and biotechnology of Hypericum In: Ernst, E. (ed.). Hypericum, Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles. CRC Press PP. 65-75.

Chawla H (2002) Introduction to plant biotechnology. Science Publishers pp. 39-56

Cui XH, Chakrabarty D, Lee EJ, Paek KY (2010). Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. Bioresour Technol 101, 4708-4716.

Del-Poza Jc, Lopez-Matas MA, Ramirez-Parra E, Gutierrez C (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. Physiol Plant 123, 173-183.

Farsad Akhtar N, Aharizad S, Mohammadi SA et al. (2013) In vitro shoot regeneration and hypericin production in four *Hypericum perforatum* L. genotypes. Int J Agric: Res Rev. 3, 887-893.

Gardner FP, Pearce RB, Mitchell RL(2010) Physiology of crop plants. Published by Scientific Publishers pp. 180-230.

www.SID.ir

Gaudin M, Simonnet X, Debrunner N, Ryser A (2002) Breeding for a *Hypericum perforatum* L. variety both productive and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) tolerant. J Herbs Spices Med Plants 9, 107-120.

Klemow KM, Bartlow A, Crawford J, et al. Medical Attributes of St. John's Wort (Hypericum perforatum) In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 11.

Mendoza MG, Kaeppler HF (2002) Auxin and suger effects on callus induction and plant regeneration Frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum L.*). In Vitro Cell Dev Biol Plant 38, 39-45.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15, 473-497

Namli S, Akbas F, Isikalan C et al. (2010) The effect of different plant hormones (PGRs) on multiple shoots of *Hypericum retusum* Aucher. Plant Omics 3, 12-17.

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

Ricci A, Bertoletti C (2009) Urea derivatives on the move: cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement depend on chemical structure. Plant Biol (Stuttg) 11, 262-272.

Santarém ER, Astarita LV (2003) Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. Braz J Plant Physiol 15, 43-47.

Taiz L, Zeiger E (2010) Plant physiology Fifth Edition. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts USA pp. 545-640

Tsuro M, Koda M, Inoue M (1999) Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC). Sci Hortic (Amsterdam) 81(3), 331-336.

Wang TL, Everett NP, Gould AR, Street HP (1981) Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. Protoplasma 106, 23-35.

Wójcik A, Podstolski A (2007) Leaf explant response in in vitro culture of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Acta Physiol Plant 29, 151-156.

www.SID.ir