فصلنامهٔ علمی - پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۲ شمارهٔ ۳ ، صفحهٔ ۱۷۲-۱۷۹ ، (۱۳۸۵)

بررسی کشت درون شیشه‌ای گل راعی بومی ایران (*Hypericum perforatum*)

گلنار قاضیان تفریشی[۱]، مجید عزیزی[۲] و محمد فارسی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
e-mail: Ghazian_golnar@yahoo.com
۲- عضو هیئت علمی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

گل راعی(*Hypericum perforatum*) متعلق به خانواده *Hypericaceae*، یک گیاه دارویی مهم است که مواد موثر آن یعنی هیپریسین و هیپرفورین دارای خواص مهمی مانند خاصیت ضد افسردگی، ضد ویروس و ضد باکتری می‌باشند و در صنایع دارویی کاربرد فراوانی دارند. دلیل توجه به جنبه‌های مختلف کشت بافت گیاهان دارویی، بهینه نمودن این روشها به عنوان ابزار مهم جهت مطالعات بعدی مربوط به عوامل موثر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و همچنین کاربرد آنها در اصلاح گیاهان دارویی می‌باشد. در این تحقیق برای اولین بار نحوه کال‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گل راعی بومی ایران مورد مطالعه قرار گرفت. ماده گیاهی مورد استفاده در این آزمایش بذر گل راعی بومی ایران توده بومی اردبیل بود. محیط کشت مورد استفاده MS و از هورمونهای 2,4-D (۰/۲۵ ، ۰/۵ ، ۱ ، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و BA (۰/۲۵ ، ۰/۵ ، ۱، ۲و ۵ میلی‌گرم در لیتر) یا Kin (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی گرم در لیتر) برای کال‌زایی در بذر و از سطوح مختلف BA (۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر) به تنهایی و یا یک سطح ثابت NAA (۱ میلی گرم بر لیتر) به همراه سطوح مختلف Kin (۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر) برای شاخه‌زایی استفاده شد. همچنین تیمارهای NAA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی گرم در لیتر) برای ریشه‌زایی در قلمه تهیه شده از گیاهچه استریل استفاده شد. نمونه‌های کشت شده، در دمای ۲۱ درجه سانتیگراد و روشنایی ۱۶ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت ۲ هفته روند کال زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه داده‌ها در سطح ۵ درصد نشان داد که بیشترین مقدار کالوس از نظر وزن در تیمار حاوی ۱ میلی گرم در لیتر Kin به همراه ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D (۲/۱۹۳۷ گرم وزن تر کالوس) بود. همچنین بررسی نتایج شاخه‌زایی و ریشه‌زایی با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد نشان داد که بیشترین تعداد و طول شاخه در تیمار ۱ میلی گرم بر لیتر NAA به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر Kin (۹۵ شاخه از کالوس و میانگین طول ٤ سانتیمتر) و بیشترین ریشه‌زایی از نظر تعداد و طول ریشه در تیمار بدون هورمون (٤/۷ عدد ریشه در هر قلمه و میانگین طول ریشه‌ها ۲/۲ سانتیمتر) بود.

واژه‌های کلیدی: گل راعی، کال زایی، ریشه زایی، شاخه زایی.

مقدمه

تولید مواد موثره در گیاهان دارویی با هدایت فرآیندهای ژنتیکی است، ولی به طور بارزی تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. به‌طوری که عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و نیز در کیفیت مواد موثره آنها می‌شود (امیدبیگی، ۱۳۷٤). استخراج ماده موثره از کالوس باعث افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. افزایش مقدار و کیفیت ماده موثره، باعث کاهش نیاز به ماده خام اولیه و در نتیجه تسهیل و کاهش عملیات کشاورزی می‌شود. همچنین مطالعه واکنش

Archive of SID
www.SID.ir

کال‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گل راعی بومی ایران به عنوان تحقیقات بنیادی و پایه به منظور مطالعات بعدی انتقال ژن و تحقیقات بیوتکنولوژی ضروری است. بنابراین هدف از انجام این آزمایشها، شناسایی روشی جهت تکثیر آسان (ریز ازدیادی) برای تولید گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی و افزایش میزان ماده موثره (کشت بافت) در گل راعی بومی ایران می‌باشد. بنابر این هدف دیگر این تحقیق تعیین توانایی این گیاه جهت جایگزینی ارقام خارجی می‌باشد. تا کنون محققان زیادی جنبه‌های کشت بافت ارقام خارجی گل راعی را مورد بررسی قرار داده‌اند، اما این اولین بار است که ما این تحقیقات را بر روی گل راعی بومی ایران انجام دادیم.

Li و همکاران (۲۰۰۰) در آزمایشهای خود به این نتیجه رسیدند که بهترین محیط کشت برای تحریک تولید کالوس از برگ و ساقه‌های گل راعی، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر NAA است. Carolina و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که بیشترین تولید کالوس در گل راعی از ریز نمونه‌های کشت شده در حضور ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D در تاریکی بدست آمد و بیشترین تعداد جوانه‌های بدست آمده از کالوس در حضور ۱ میلی گرم بر لیتر KIN و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد که به طور میانگین ۲۲/۲ جوانه از کالوس بود و جوانه‌ها در محیط کشت MS ½ بدون هورمون ریشه‌دار شدند. Ayan و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که بیشترین وزن تر کالوس در تیمار حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم بر لیتر KIN بدست آمد و کالوس‌های بدست آمده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA بیشترین شاخه‌زایی (۱۹ شاخه در هر کالوس) را داشتند و شاخه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر IAA ریشه‌دار شدند.

مواد و روشها

به منظور مطالعه و بررسی وضعیت کال‌زایی در گل راعی بومی ایران، از بذر برای تولید کالوس استفاده شد. بذرهای گل راعی بومی ایران توده اردبیل پس از ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه و بعد ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل در مجموع به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط استریل در داخل و یال‌های حاوی نمکهای محیط کشت MS دارای ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۸ گرم بر لیتر آگار، pH بین ۵/۷ تا ۵/۸ و سطوح مختلفی از مواد تنظیم کننده رشد به این ترتیب کشت شدند: سطوح مختلف 2,4-D (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی گرم بر لیتر) به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر KIN، سطوح مختلف 2,4-D (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ میلی گرم بر لیتر) به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر BA، سطوح مختلف BA (۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی گرم بر لیتر) به همراه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و سطوح مختلف NAA (۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی گرم بر لیتر). از هر تیمار، ۳ تکرار و در هر تکرار ٤ نمونه در نظر گرفته شد. ویال‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تاریکی برای تولید کالوس قرار گرفتند.

به منظور بررسی وضعیت شاخه‌زایی گل راعی در کشت‌های درون شیشه‌ای، پس از کال‌زایی قطعات یکسانی از کالوس‌ها جدا گردید و بعد در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف BA شامل ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی گرم بر لیتر کشت شد. تیمار دیگری که برای شاخه‌زایی در کالوس‌های گل راعی استفاده شد، استفاده توام از هر دو اکسین و سیتوکنین بود. این تیمارها شامل یک سطح ثابت NAA (۱ میلی گرم بر لیتر) به همراه سطوح مختلف KIN (۱، ۲ و ۵ میلی گرم بر لیتر) بود. همچنین تیمارهای سطوح مختلف BA، جهت شاخه‌زایی در قطعات گیاهچه استریل نیز استفاده شد. کالوس‌ها یا گیاهچه‌ها، تحت شرایط استریل در ویال‌های حاوی محیط کشت‌های مورد نظر کشت شدند. از هر تیمار ۳ تکرار و در هر تکرار ٤

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه در نظر گرفته شد و ویال‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و روشنایی ۱٦ ساعت در روز قرار گرفتند.

به منظور تولید ریشه بر روی شاخه‌های بدست آمده از تیمارهای شاخه زایی، از سطوح مختلف هورمون NAA (شامل ۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ میلی گرم بر لیتر) استفاده شد. به منظور انجام آزمایش، شاخه‌های گل راعی بدست آمده از کالوس به طول ۲ سانتیمتر و حاوی جوانه انتهایی در داخل ویال و در محیط کشت حاوی تیمارهای مورد نظر کاشته شدند. از هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و در هر تیمار در داخل هر ویال ۳ عدد ریز نمونه جهت ریشه‌زایی قرار گرفت. ویال‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و روشنایی ۱٦ ساعت در روز در اتاقک رشد قرار گرفتند.

این آزمایشها در قالب طرح‌های کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار Mstatc و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن در سطح ۵ درصد صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

بررسی بذرهای کشت شده در محیط کال‌زایی نشان داد که دو هفته پس از کشت بذرها در محیط کال زایی، کالوس‌های ترد و شکننده با رنگ سبز تیره تا مایل به قهوه‌ای بر روی بذرهای ایجاد شدند. جدول تجزیه واریانس اثرات هورمون‌های مختلف بر توان کال‌زایی بذرهای گل راعی بومی ایران، نمایانگر وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمارهای هورمونی متفاوت در سطح ۵ درصد بود اما سطوح مختلف هورمون‌ها در تمام تیمارها تفاوت معنی‌داری را در وزن کالوس نشان نداد (شکلهای ۱ تا ٤).

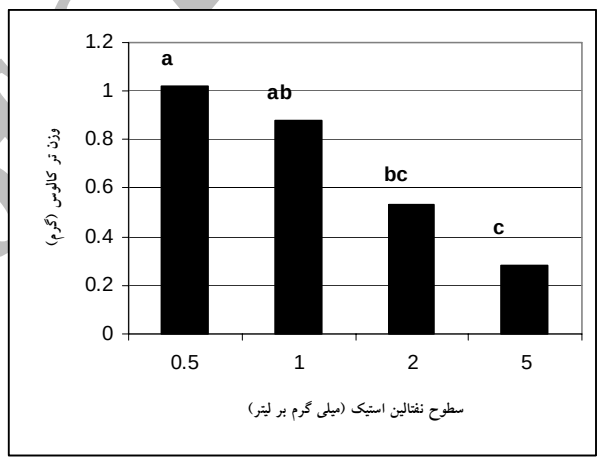
نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر روی توان تاثیر هورمون‌های مورد استفاده بر میزان باززایی (تعداد شاخه تولید شده بر روی هر توده کالوس) نیز بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) در تعداد شاخه‌های بدست آمده بین تیمارهای هورمونی متفاوت بود اما طول شاخه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. مشاهدات حاکی از آن بود که شاخه‌های بدست آمده در تیمارهای حاوی BA به تنهایی، نازک و به رنگ سبز روشن بودند، نسبت به شاخه‌های باززایی شده در تیمارهای حاوی KIN و NAA که قوی تر و به رنگ سبز تیره بودند.

شکل ۱- تاثیر سطوح مختلف توفوردی به همراه کاینتین بر روی کال زایی بذور گل راعی بومی ایران

شکل ۲-تاثیر سطوح مختلف توفوردی به همراه بنزیل آدنین بر روی کال زایی بذر گل راعی بومی ایران

Archive of SID
www.SID.ir

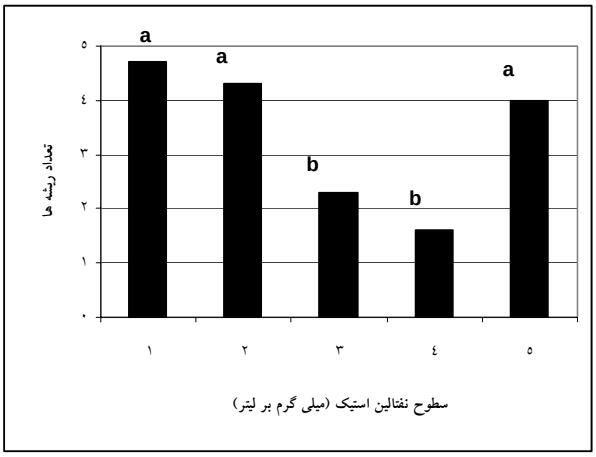
شکل ۳- تاثیر سطوح مختلف بنزیل آدنین به همراه ۵/۰ میلی گرم بر لیتر توفوردی بر کال زایی بذر گل راعی بومی ایران



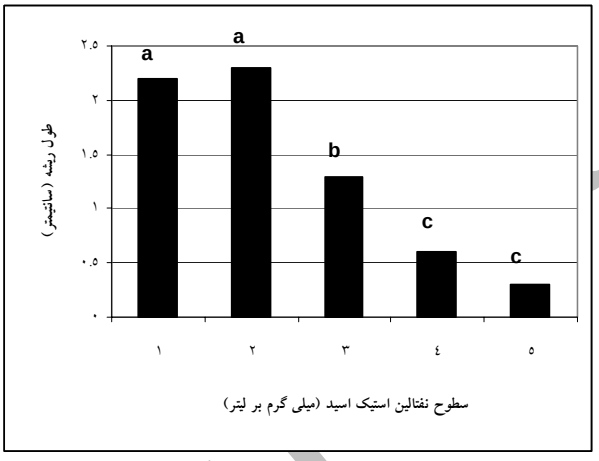
شکل ٤- تاثیر سطوح مختلف نفتالین استیک اسید بر روی کال زایی بذر گل راعی بومی ایران

نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر روی توان تاثیر هورمون‌های مورد استفاده بر میزان باززایی (تعداد شاخه تولید شده بر روی هر قطعه گیاهچه استریل) نیز بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) در تعداد و طول شاخه‌های بدست آمده بین تیمارهای هورمونی متفاوت بود (جدول ۱).

در تیمارهای ریشه زایی، نتایج تجزیه واریانس به روش آزمون دانکن در سطح ۵ درصد نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین استفاده از غلظت‌های مختلف NAA بر روی ریشه‌زایی شاخه‌های گل راعی بومی ایران وجود داشت (شکلهای ۵ و ٦).



شکل ۵- تاثیر سطوح مختلف نفتالین استیک اسید بر روی تعداد ریشه تولید شده بر روی شاخه های گل راعی بومی ایران



شکل ٦- تاثیر سطوح مختلف نفتالین استیک اسید بر روی طول ریشه های تولید شده بر روی شاخه های گل راعی بومی ایران

بحث

در تیمارهای کال زایی، مقایسه میانگین‌های بدست آمده با آزمون دانکن نشان داد که در سطح ۵ درصد بین تیمارهای حاوی سطوح ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم بر لیتر BA با سایر تیمارهای بکار گرفته شده، اختلاف معنی‌داری وجود دارد و بیشترین

Archive of SID

www.SID.ir

میزان کال‌زایی (به ترتیب ۲/۱۹۳۷ و ۲/۱۱۷۵ گرم وزن تر کالوس) مربوط به تیمارهای فوق بود. با افزایش میزان NAA میزان تولید کالوس کاهش یافت، به طوری که کمترین میزان کال‌زایی در تیمار حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر NAA به تنهایی بدست آمد که برابر ۰/۲۸۲۶ گرم وزن تر کالوس بود. استفاده از غلظت‌های مختلف NAA به عنوان تنها منبع اکسین بکار رفته جهت کال‌زایی نشان داد که میزان تولید کالوس در این تیمارها به طور معنی‌داری کمتر از میزان کالوس در محیط کشت‌های حاوی 2,4-D بود. این امر نشان دهنده آن است که حضور هورمون 2,4-D برای کال‌زایی در بذرهای گل راعی بومی ایران ضرورت دارد. همچنین نتایج نشان داد که در یک سطح ثابت 2,4-D (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) افزایش میزان BA از ۰/۵ به ۵ میلی گرم بر لیتر باعث افزایش وزن تر کالوس شد. میزان تولید کالوس با افزایش سطح 2,4-D از ۰/۲۵ تا ۱ میلی گرم بر لیتر در یک سطح ثابت BA (۱ میلی گرم بر لیتر) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. افزایش میزان 2,4-D از ۰/۵ به ۵ میلی گرم بر لیتر نه تنها میزان کالوس بدست آمده را افزایش نداد، بلکه باعث کاهش شدید تولید کالوس نیز شد. در مقادیر ثابت ۱ میلی گرم بر لیتر KIN به عنوان منبع سیتوکنین، با افزایش میزان 2,4-D از ۰/۲۵ به ۰/۵ میلی گرم بر لیتر، میزان کالوس تولیدی از ۲/۱۹۳۷ به ۲/۱۱۷۵ کاهش یافت و این کاهش همچنان با افزایش میزان سطح 2,4-D تا ۵ میلی گرم بر لیتر ادامه یافت. نتایج بدست آمده در این آزمایش با نتایج بسیاری از آزمایشهایی که پیش از این بر روی ارقام خارجی گل راعی انجام گرفته است، مطابقت دارد. Bezo و Stefunova (۲۰۰۱) بیان کردند که بهترین رشد کالوس از نظر اندازه، در محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر KIN به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D (۱۰ درصد) و ۱ میلی گرم بر لیتر BA به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D (۱۲/۷ درصد) بدست آمد. Ayan و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که بیشترین وزن تر کالوس در تیمار حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم بر لیتر KIN بدست آمد. Rani و همکاران (۲۰۰۱) نیز بیان کردند که محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم بر لیتر کینتین برای استقرار کالوس گل راعی مناسب است.

نتایج حاصل از آزمایشهای شاخه‌زایی نشان می‌دهد که گل راعی بومی ایران دارای توان شاخه‌زایی بالایی بوده و بنابراین به راحتی می‌تواند از این طریق تکثیر شود. مقایسه میانگین تعداد شاخساره باززایی شده بر روی هر توده کالوس در اثر تیمارهای هورمونی متفاوت با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد که استفاده توام از اکسین و سیتوکنین باعث افزایش در تعداد و طول شاخه‌های بدست آمده از کالوس شد (حداکثر ۹۵ و حداقل ۹۰ شاخه در هر کالوس). همچنین افزایش سطح BA به ۵ میلی گرم بر لیتر باعث کاهش تعداد و طول شاخه‌ها شد (۲۳/٦٦ در مقابل۳۳/ ۵۸ شاخه و ۱/۰٦ در مقابل ۲/٤ سانتیمتر). نتایج بدست آمده از این آزمایش با نتایج بسیاری از آزمایشهای مشابه که بر روی ارقام خارجی گل راعی انجام گرفته بود، مطابقت دارد. Bezo و Stefunova (۲۰۰۱) استفاده توام از اکسین و سیتوکنین را بهترین شرایط برای باززایی شاخه در گل راعی معرفی و محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IBA به همراه ۵ میلی گرم بر لیتر BA را بهترین محیط کشت برای تولید بیشترین تعداد شاخه (۷/۷ درصد) بیان کردند. Ayan و همکاران (۲۰۰۵) نیز بیشترین شاخه‌زایی در کالوس گل راعی را در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA (۱۹ شاخه در هر کالوس) گزارش کردند.

قطعات گیاهچه استریل گل راعی بومی ایران توانایی بالایی برای تولید شاخساره‌های جدید ندارند (حداکثر ۱۲/٦٦ و حداقل ۲/۳۳ شاخه). همچنین افزایش سطح BA به ۵ میلی گرم بر لیتر باعث کاهش تعداد و طول شاخه‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

شد (۲/۳۳ در مقابل ۱۲/٦٦ شاخه و ۱/۲ در مقابل ۳/۲۳ سانتیمتر). نتایج آزمایش نشان داد که بین عدم استفاده از NAA و استفاده از سطوح پایین NAA مانند ۰/۵ میلی گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

نتایج بدست آمده از این آزمایش با نتایج بسیاری از آزمایشهای مشابه که در مورد ارقام خارجی گل راعی انجام گرفته بود، مطابقت دارد. Carolina و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که در روش باززایی مستقیم، در تیمار حاوی ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر NAA به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر BA یا ۱ میلی گرم بر لیتر KIN به ترتیب ۵/۸ و ۵/۳ جوانه از ریز نمونه بدست آمد. Fabiane و همکاران (۲۰۰۱) نیز بیان کردند که بیشترین تعداد شاخه در باززایی مستقیم، در محیط کشت ½ MS حاوی ۰/۸۸ میکرو مولBA به دست آمد که ۱۱ عدد شاخه بود، اما در این تیمار طول شاخه‌ها تنها ۱/۹۹ سانتیمتر بود.

نتایج ریشه‌زایی نشان داد که اگرچه افزایش میزان NAA از ۰/۵ تا ۲ میلی گرم بر لیتر باعث کاهش تولید ریشه شد اما در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر NAA میزان ریشه‌زایی دوباره افزایش یافت. با این وجود، افزایش غلظت NAA از ۰/۵ تا ۵ میلی گرم بر لیتر باعث کاهش شدید طول ریشه‌های حاصله شد. مقایسه میانگین تعداد و طول ریشه‌های بدست آمده در هر شاخه نشان داد که شاخه‌های گل راعی بومی ایران می‌توانند به راحتی در محیط کشت بدون هورمون تولید ریشه کنند. این نتیجه با نتایج آزمایشهایی که دیگران بر روی ارقام خارجی گل راعی بدست آوردند مطابقت داشت. Pretto و Santarem (۲۰۰۰) بیان کردند که تولید ریشه از شاخه‌های گل راعی، در محیط کشت MS و ½ MS در حضور و عدم حضور ٤/۹ میکرو مول IBA یکسان بود. Buter (۲۰۰۰) نیز محیط کشت ½ MS بدون هورمون را بهترین محیط کشت برای ریشه‌زایی در شاخه‌های گل راعی معرفی کرد. بنابر این بهترین محیط کشت جهت کال‌زایی در بذرهای گل راعی بومی ایران، محیط کشت MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر Kin و برای شاخه‌زایی در قطعات کالوس، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر NAA به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر Kin معرفی می‌شود. همچنین از آنجایی که شاخه‌های گل راعی بومی ایران بدون حضور اکسین به راحتی قادر به تولید ریشه می‌باشند، توصیه می‌شود که از محیط کشت بدون هورمون جهت ریشه‌زایی، استفاده گردد.

جدول ۱- مقایسه میانگین تعداد و طول شاخساره باززایی شده بر روی کالوس یا گیاهچه استریل گل راعی بومی ایران (میانگین‌های با حروف یکسان از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند).

تیمار مورد استفاده	تعداد شاخه	طول شاخه (Cm)
0.25 mg/ l BA در گیاهچه استریل	۱۲/٦٦ h	۳/۲۳ c
0.5 mg/l BA در گیاهچه استریل	۱۲ h	۲/۲۶ f
1mg/l BA در گیاهچه استریل	٦/٦٦ i	۲/۶۶ d
5 mg/l BA در گیاهچه استریل	۲/۳۳ c	۱/۲ g
0.25 mg/l BA در کالوس	۵۸/۳۳ f	۲/۴ e
0.5 mg/l BA در کالوس	۷۲/۳۳ d	۲/۳۳ ef
۱ mg/l BA در کالوس	٦٤/۳۳ e	۲/۳ f
۵ mg/l BA در کالوس	۲۳/٦٦ g	۱/۰٦ h
۱ mg/l NAA+1 mg /l KIN در کالوس	۹۵ a	٤/۰۰ b
۱ mg/l NAA+2 mg/l KIN در کالوس	۹۳ b	٤/۲۳ a
۱ mg/l NAA+5 mg/l KIN در کالوس	۹۰ c	۳/۹٦ b

جدول ۲- تجزیه واریانس کال زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در گل راعی بومی ایران

منبع تغییرات	کال زایی	شاخه زایی		ریشه زایی	
		تعداد شاخه	طول شاخه	تعداد ریشه	طول ریشه
نکرار	۰/۰۵۹۵ ns	۰/۳۰۲۹ ns	۰/۰٦ ns	۰/۰٦۹۰ ns	۰/۱۲۳۰ ns
تیمار	۰/۰۰۰۰ xx	۰/۰۰۰۰ xx	۰/۰۰۰۰ xx	۰/۰۰۷۷ xx	۰/۰۰۰۰ xx

Archive of SID
www.SID.ir

منابع مورد استفاده

– امید بیگی، ر.، ۱۳۷٤. رهیافتهای تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات فکر روز، ۲۸۳ صفحه.

- Ayan, A.K., Cirak, C., Kevserolu, K. and Sokmen, A., 2005. Effects of expellant types and different concentrations of sucrose and phytoharmones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. Turkish Journal of Agriculture, 29: 197-204.
- Bezo, M. and Stefunova, V., 2001. Indirect regeneration of *Hypericum perforatum* L. under invitro conditions. Acta Fytotechnica Et Zootechnica, 4: 277-279.
- Buter, B., 2000. Optimization of *in vitro* androgenesis in *Hypericum perforatum*. University of Basal Pharmazeutiches Institute, Department of Pharmazeutiches Biologie, schweis. Online: http://www.bbw.admin.ch/html/pages/abstracts/html/cost/c97.0068.htm.
- Carolina, A., Astarita, L.V. and Santarem E.R., 2001. Organogenese in *Hypericum perforatum* L. IV Encontro Latino-Americano de Biotechnologin Vegetal , Goiania, Resumos, p 81.
- Fabiane, R., Borre, L., Sato, A. and Apparecida, M., 2001. Micro propagation *in vitro* of *Hypericum perforatum* L. University of the River of Janeiro/DCN 1, Laboratory of Vegetal Physiology.
- Li, J., Wang, T., Yang, X. and Zhang, J., 2000. Study on the callus and cell culture of *Hypericum perforatum*. Zhong Yao Cai, 23(5): 449-451.
- 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation of *in vitro* Culture of Iranian St Johns Wort (*Hypericum perforatum* L.)

G. Ghazian Tafrishi[1], M. Azizi[1] and M. Farsi[2]
1- Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
2- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

Abstract

St Johns Wort (*Hypericum perforatum* L.) from *Hypericaceae* is an important medicinal plant, which its secondary metabolites, hypericin and hyperforine, have several medicinal effects such as antidepressant, antiviral, antibacterial and etc. The importance of studying in vitro culture of medicinal plants is optimizing these protocols for subsequent studies about effective factors on biosynthesis of secondary metabolites and applying these methods in improving medicinal plants. Since now there are no report on *in vitro* culture of Iranian St Johns Wort and for the first time we studied the callogenesis, shoot regeneration and rooting process of this plant. The seeds of Iranian St Johns Wort were collected from Ardebil province and the base growth media was MS and for callogenesis we studied the effect of several levels of 2,4-D (0.25, 0.5, 1, 2 and 5 mg/l) and BA (0.25, 0.5, 1 mg/l) or KIN (0.25, 0.5, 1, 2 and 5 mg/l) and NAA (0.5, 1, 2 and 5 mg/l). Several levels of BA (0.25, 0.5, 1and 5 mg/l) and several levels of KIN (1, 2 and 5 mg/l) accompanied by 1 mg/l NAA were used for shoot regeneration in callus. Several levels of NAA (0, 0.5, 1, 2 and 5 mg/l) were used for rooting of the shoots. The growth condition was 25°c and 16/8 hours period for rooting and shoot regeneration, darkness for callogenesis. The results of callogenesis with Duncans Multiple Range Test at 5% showed that highest callus fresh weight (2.1937 gr) was obtained in 0.25 mg/l 2,4-D with 1 mg/l KIN. Results of shoot regeneration in level 5% showed that maximum number of shoots (95 shoots/call and 4 Cm length) obtained in treatment contain 1 mg/l NAA with 1 mg/l KIN. Results also showed that maximum root number (4.7 roots per shoot and 2.2 Cm length) was in hormone free media.

Key words: St Johns Wort, callogenesis, rooting, shoots regeneration.

Archive of SID

www.SID.ir