بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه‌های مختلف برکال‌زایی و اندام‌زایی گل راعی در شرایط درون شیشه‌ای

ابراهیم شرفی[۱و۳]، سید مجتبی خیام نکویی[۲]، محمدحسین فتوکیان[۳]، داریوش داودی[٤]، طاهره حسنلو*[۱]

[۱]- بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
[۲]- بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
[۳]- بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد
[٤]- بخش نانوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/٤/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/٦

چکیده

در این پژوهش اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بر کالوس‌زایی و اندام‌زایی گل‌راعی در یک دوره ۲۸ روزه مورد بررسی قرار گرفت. این ریزنمونه‌ها شامل ریشه، ساقه و برگ بود که از گیاهچه‌های استریل کشت شده در محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) تهیه شده و به محیط MS حاوی هورمون‌های IAA، پیکلورام، 2,4-D با غلظت (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و BAP با غلظت (صفر، ۰/٤، ۰/۸ میلی‌گرم برلیتر) در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و ۵ ریزنمونه منتقل شده و در تاریکی، در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بین سطوح تیمارهای پیکلورام، BAP تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد از نظر اندازه کالوس مشاهده شد. بین سطوح تیمارهای IAA، BAP و همچنین اثر متقابل دو فاکتور تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد از نظر اندازه کالوس، تعداد شاخه و تعداد ریشه مشاهده شد. بین سطوح تیمارهای 2,4-D، BAP و همچنین اثر متقابل دو فاکتور تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد از نظر اندازه کالوس و تعداد شاخه مشاهده شد. بیشترین اندازه کالوس در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر پیکلورام و ۰/٤ میلی‌گرم بر لیتر BAP (۵ میلی‌متر) از ریزنمونه ساقه به وجود آمد. بیشترین تعداد شاخه (۸۳ شاخه) از ریزنمونه برگ در تیمار ۰/٤ میلی‌گرم بر لیترBAP بدست آمد. بالاترین تعداد ریشه (۹۱ ریشه) در تیمار ۲ میلی‌گرم برلیتر IAA در ریزنمونه برگ مشاهده شد.

کلمات کلیدی: *به‌نژادی گیاه، ریزازدیادی، کشت بافت، گیاه دارویی.*

* نویسنده مسئول: طاهره حسنلو تلفن: ۰۲٦۳۲۷۰۳۵۳٦ Email: thasanloo@abrii.ac.ir

مقدمه

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تأمین بهداشت و سلامت جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماری‌ها برخوردار بوده و هستند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی هم پای بشر داشته و یکی از مهمترین منابع تأمین غذا و داروی بشر در طول نسل‌ها بوده‌اند (Gadzovska *et al*., 2007). گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* از خانواده Hypericaceae، از گیاهان دارویی بسیار مهم است که یک منبع متنوع از ترکیبات و فعال کننده‌های بیولوژیکی است و منابع هایپرسین از آن‌ها مشتق می‌شود. گونه‌های مختلف این گیاه در بسیاری از کشورها به عنوان عامل شفادهنده به کار می‌رود و دارای خواص مختلف پزشکی است. جزء گیاهان علفی چند ساله می باشد و به طور قابل توجهی در سراسر جهان رشد می‌کند (Cirak *et al*., 2005). گل راعی به طور سنتی و مدرن برای درمان عارضه‌های عصبی و افسردگی استفاده می‌شود (Alali *et al*., 2004).

یکی از راهکارهای تولید متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی کشت آنها در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی می‌باشد. کشت بافت روشی مناسب جهت تکثیر آسان برای تولید گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی و افزایش میزان ماده موثره می‌باشد (Azizi & Omidbeigi, 2002). در شرایط آزمایشگاهی می‌توان متابولیت‌های با ارزش مورد نظر را در تمام فصول سال و با مقدار و کیفیت دلخواه تولید کرد (Denath *et al*., 2006). مطالعه واکنش کال زایی، شاخه زایی و ریشه زایی گل راعی به عنوان تحقیقات بنیادی و پایه به منظور مطالعات بعدی انتقال ژن و تحقیقات بیوتکنولوژی ضروری است (Dias & Ferreira, 2003).

تاکنون محققان زیادی جنبه‌های مختلف کشت بافت گل راعی را مورد بررسی قرار داده‌اند. Akcamolut (2010) در آزمایش‌های خود به این نتیجه رسید که بهترین محیط کشت برای تحریک تولید کالوس از برگ و ساقه‌های گل راعی، محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه یک میلی گرم بر لیتر NAA است.

در پژوهشی Carolina *et al*. (2001) گزارش کردند که بیشترین تولید کالوس در گل راعی از ریز نمونه‌های کشت شده در حضور یک میلی‌گرم بر لیتر BA و یک میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در تاریکی بدست آمد و بیشترین تعداد جوانه‌های بدست آمده از کالوس در حضور یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود. Ayan *et al*.(2005) گزارش کردند که بیشترین وزن تر کالوس در تیمار حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین بدست آمد و کالوس‌های بدست آمده در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیترBA بیشترین شاخه زایی (۱۹ شاخه در هر کالوس) را داشتند و شاخه‌ها در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر IAA ریشه دار شدند.

هدف از انجام این آزمایش تعیین بهترین ریزنمونه و ترکیب هورمونی جهت افزایش میزان

کالوس تولید شده برای کشت سوسپانسیون سلولی و بررسی اثر سایر القاکننده‌ها بر میزان تولید ماده مؤثره در گل‌راعی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه، ضد عفونی و کشت بذرها

بذرهای گل‌راعی از بانک بذر مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تهیه شد. بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار گرفتند و سپس ۳ مرتبه با آب مقطر استریل به مدت ۱۲ دقیقه شستشو داده شدند. بذرهای شسته شده در زیر هود استریل به مدت ٦۰ دقیقه قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. سپس بر روی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۳۰ گرم ساکارز و ۷/۵ گرم آگار با pH ۵/۷ قرار گرفتند. در اتاقک رشد با شرایط نوری ۲٤۰۰ لوکس، دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲ ± ۲۵ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استقرار در محیط کشت و انجام آزمایشات

ریزنمونه‌های برگ، ریشه و ساقه از دانه-رست‌های ۳۰ روزه جدا شده و به محیط‌کشت-های حاوی هورمون انتقال یافتند. هورمون‌های مورد استفاده پیکلورام، IAA، 2,4-D (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و BAP (صفر، ۰/٤ و ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. ۱۲ میلی لیتر از هر محیط کشت در ۵ تکرار داخل پتری دیش‌های شیشه ای با ابعاد ۱/۸×٦ سانتی متر توزیع، و در هر ظرف ۵ قطعه از اندام مورد نظر کشت داده شد. نمونه‌ها در شرایط تاریکی در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۸ روز اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و سطوح هورمون‌ها از نظر کالوس زایی و اندام زایی مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی آماری نتایج

تعداد شاخه، تعداد ریشه و اندازه کالوس در هر محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت و داده‌های بدست آمده در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با نرم افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن درسطح یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول. در این آزمایش تمام ریز نمونه‌ها تشکیل کالوس دادند. نتایج نشان داد که اثر تنظیم کننده‌های رشد پیکلورام، BAP بر میزان کالوس زایی معنی دار بود (جدول ۱). بین سطوح تیمارهای پیکلورام، BAP در ریز نمونه ریشه در سطح ۵ درصد و در ریزنمونه ساقه در سطح ۱ درصد اثر معنی دار مشاهده شد. همچنین برای اثر متقابل دو فاکتور تفاوت معنی‌داری از نظر اندازه کالوس مشاهده نشد. BAP و پیکلورام به ترتیب با غلظت ۰/٤ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین اثر را بر تولید کالوس داشتند (جدول ۲).

جدول۱- تجزیه واریانس اثر پیکلورام، 2,4-D، ایندول استیک اسید (صفر،۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم برلیتر) و بنزیل آمینو پورین (صفر،۰/٤ و ۰/۸ میلی‌گرم برلیتر) بر میزان اندازه کالوس، شاخه زایی و ریشه زایی گل راعی در شرایط درون شیشه‌ای.

		میانگین مربعات Mean of Squar								
		ریز نمونه ریشه Root explants			ریز نمونه ساقه Stem explant			ریز نمونه برگ Leaf explant		
منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	اندازه کالوس (میلی متر) callus size (mm)	تعداد ریشه Number root	تعداد شاخه Number shoot	اندازه کالوس (میلیمتر) callus size (mm)	تعداد ریشه Number root	تعداد شاخه Number shoot	اندازه کالوس (میلیمتر) callus size (mm)	تعداد ریشه Number root	تعداد شاخه Number shoot
Picloram	3	0.219**	0.00	0.00	1.384**	0.00	0.00	0.219**	0.00	.436ns
BAP	2	0.220	0.00	0.00	0.069	0.00	0.00	0.220	0.00	0.567 ns
Picloram ×BAP	6	0.147ns	0.00	0.00	0.468ns	0.00	0.00	0.147ns	0.00	1.261ns
Error	36	0.065	0.00	0.00	3.239	0.00	0.00	0.065	0.00	3.203
Samplig Error	144	0.109	0.00	0.00	13.649	0.00	0.00	0.109	0.00	15.965
2,4-D	3	0.00	0.00	0.00	20.048**	0.00	30.288**	0.00	0.00	0.00
BAP	3	0.00	0.00	0.00	57.203**	0.00	49. 303 **	0.00	0.00	0.00
2,4-D×BAP	6	0.00	0.00	0.00	20.048**	0.00	20.041 **	0.00	0.00	0.00
Error	48	0.00	0.00	0.00	0.137	0.00	0.993	0.00	0.00	0.00
Samplig Error	240	0.00	0.00	0.00	0.143	0.00	0.837	0.00	0.00	0.00
IAA	2	10.1**	9.8**	86.2**	15.7**	13**	74.7**	15.2**	19.2**	67.2**
BAP	2	3.6**	63.5**	9.1**	2.8**	46.4**	43.4**	11.4**	144**	89.6**
IAA×BAP	6	8.6**	9.86**	39**	7.3**	6.7**	35.4**	26.6**	19.2**	35.4**
Error	48	0.07	0.63	0.85	0.26	3.18	1.13	0.32	.14	1.01
Samplig Error	240	0.25	0.052	0.92	0.51	0.04	1.36	0.17	0.21	0.92

ns: عدم اختلاف معنی دار، *: معنی دار در سطح ۵٪ ، **: معنی دار در سطح ۱٪

ns: non Significant,* Significant at the 5% level of probability, ** Significant at the 1% level of probability

Table1- ANOVA table for effect of different concentrations of picloram, 2, 4-D, IAA (0, 0.5, 1, 2 mgl^{-1}) and BAP (0, 0.4, 0.8 mg l^{-1}) on callus size, number shoot and number root of *H. perforatum* under *in vitro* condition.

در این آزمایش هر سه ریزنمونه به سمت تشکیل کالوس پیش رفتند، که بسیار مهم است زیرا استفاده از پیکلورام سرعت القای کالوس، سرعت رشد کالوس‌ها و اندازه کالوس‌ها را افزایش داد. هنگامی که غلظت پیکلورام با BAP تقریبا یکسان بود بیشترین میزان کالوس تولید شد (۵ میلی‌متر). نتیجه‌ای که از این آزمایش بدست آمد، این بود که هیچ گونه ریشه یا شاخه‌ای برروی کالوس‌ها تشکیل نشد، که می‌توان کالوس‌ها را برای کشت سلولی به کاربرد.

آزمایش‌دوم: در این آزمایش فقط از ریزنمونه ساقه استفاده شد. بین سطوح تیمارهای

2,4-D، BAP و همچنین اثر متقابل دو فاکتور تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد از نظر اندازه کالوس و میزان شاخه زایی مشاهده شد. نتایج نشان داد که اثر تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D، BAP بر میزان کالوس زایی معنی دار بود (جدول ۱). BAP با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر کالوس بیشتر و با غلظت ۰/٤ میلی‌گرم بر لیتر تعداد شاخه بیشتری تولید کرد (جدول ۲). 2,4-D با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر کالوس بیشتر و با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم تعداد شاخه بیشتری را تولید کرد (جدول ۲). بر اساس گزارشات قبلی تولید شاخه از کالوس های گل راعی به وسیله NAA و BA تحریک می‌شود (Akcamolut,2010).

در پژوهشی Bezo and Stefunova (2001) استفاده توام از اکسین و سیتوکنین را بهترین شرایط برای باززایی شاخه در گل راعی معرفی و محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به همراه ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA را بهترین محیط کشت برای تولید بیشترین تعداد شاخه (۷/۷ درصد) بیان کردند. در این تحقیق نشان داده شد که می‌توان از 2,4-D و BAP برای ایجاد شاخه و ریز ازدیادی گل راعی استفاده کرد.

آزمایش‌سوم: بین سطوح تیمارهای IAA، BAP و همچنین اثر متقابل دو فاکتور تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد از نظر اندازه کالوس، تعداد شاخه و تعداد ریشه مشاهده شد. نتایج نشان داد که اثر تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و IAA برتمامی ویژگی‌های (شاخه زایی، کالوس زایی و ریشه زایی) معنی‌دار بود (جدول ۱).

BAP با غلظت ۰/٤ یا ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر و IAA با غلظت ۱ یا ۲ میلی‌گرم برلیتر بیشترین اثر را بر میزان کالوس زایی داشت (جدول ۲). نتایج حاصل از آزمایش‌های شاخه زایی نشان داد که هر سه ریزنمونه (ریشه، ساقه و برگ) گل‌راعی دارای توان شاخه زایی بالایی بوده، بنابراین به راحتی می‌تواند از این طریق تکثیر شود. در هر سه ریز نمونه (ریشه، ساقه و برگ) BAP با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر تعداد شاخه بیشتری تولید کرد (جدول ۲). بر اساس گزارش (2007) *Dias et al.* بیشترین تعداد شاخه بدست آمده در تیمار۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA بود. همچنین در گزارشات قبلی نیز بر این نکته تاکید شده بود که استفاده از BAP میزان باز زایی شاخه ها را از ریزنمونه های برگ افزایش می‌دهد (Pertto & Santarem, 2000). شاخه‌های تشکیل شده بر روی کالوس با افزایش میزان BAP در محیط افزایش یافت که درنتیجه انتظار تولید بیشتر متابولیت‌ها می‌رود (Omidbeigi & Azizi, 2002). IAA با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین اثر را بر میزان ریشه زایی ریز نمونه های ریشه، ساقه و برگ گل راعی داشت (جدول ۲). بر اساس گزارش (2011) *Akbes et al.* ، در کشت ریزنمونه برگ، افزودن میزان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA بیشترین میزان ریشه زایی را در پی دارد و استفاده از IAA در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر اثر بسیار کمی بر ریشه زایی دارد و حتی از ایجاد ریشه نیز جلوگیری می‌کند. اما براساس نتایج پژوهش

موجود، هنگامی که از IAA به تنهایی یا در غلظت های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد، بیشترین تعداد ریشه تشکیل شده در هرسه ریز نمونه مشاهده شد. Cellarova and (1999) Kimakova نشان دادند که IAA و IBA بیشترین اثر را بر ریشه زایی گل‌راعی می‌گذارند. سرعت و میزان ریشه زایی به میزان IAA موجود در محیط کشت وابسته است. در پژوهشی Ayan *et al.* (2005) گزارش کردند که IAA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر میزان ریشه‌دهی شاخه‌های گل-راعی را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد، که تایید کننده نتایج پژوهش موجود است. هنگامی که غلظت BAP و IAA در تناسب با یکدیگر باشند، بر روی هر سه ریز نمونه مقدار کالوس بیشتری تشکیل شد.

نتیجه‌گیری کلی

روش‌های نوین و کاربردی کشت سلول و کشت بافت در به‌نژادی و ازدیاد گیاهان دارویی این فرصت را فراهم می‌کند که بتوان از گیاهان دارویی بهره برداری بیشتری کرد و به مقدار بیشتری از ترکیبات ثانویه ارزشمند دست‌یافت. تکنیک کشت بافت و سلول یک فرصت کمیاب برای دخالت در پروفایل شیمیایی و افزایش تولیدات فیتو شیمیایی در اختیار انسان قرار می دهد. در صورتی که تمام شرایط به خوبی پیش رود، می توان دامنه وسیعی از ترکیبات فیتوشیمیایی با ارزش را از کالوس‌های تمایز نیافته و سلول‌های کشت شده بدست آورد. در این پژوهش سعی شد تا با کاربرد غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد و نوع ریز نمونه، بهترین ریزنمونه و بهترین سطح هورمونی جهت بدست آوردن بیشترین مقدار کالوس برای کاربرد در محیط کشت سوسپانسیون سلولی پیدا شود. تا با کاربرد اثر سایر القا کننده‌ها بتوان به مقدار بیشتری از ترکیبات ثانویه مفید دست یافت.

تشکر و قدردانی

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران جهت تأمین هزینه‌های پژوهش سپاس‌گزاری می-شود.

جدول۲- برهمکنش بین پیکلورام، 2,4-D، ایندول استیک اسید (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم برلیتر) و بنزیل آمینو پورین (صفر، ۰/٤ و ۰/۸ میلی‌گرم برلیتر) بر میزان اندازه کالوس، شاخه زایی و ریشه زایی گل راعی در شرایط درون شیشه‌ای.

تیمار (میلی گرم بر لیتر) Treatment (mg l^{-1})		ریز نمونه ریشه Root explant			ریز نمونه ساقه Stem explant			ریز نمونه برگ Leaf explant		
BAP	Pic	تعداد ریشه Number root	تعداد شاخه Number shoot	اندازه کالوس (میلیمتر) callus size (mm)	تعداد ریشه Number root	تعداد شاخه Number shoot	اندازه کالوس (میلیمتر) callus size (mm)	تعداد ریشه Number root	تعداد شاخه Number shoot	اندازه کالوس (میلیمتر) callus size (mm)
0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	2.25[a]	-	-	2[a]	-	-	2[a]
	1	-	-	2.62[a]	-	-	2.50[a]	-	-	2.62[a]
	2	-	-	2[a]	-	-	2.31[a]	-	-	1.93[a]
0.4	0	-	-	2.37[a]	-	-	2.06[a]	-	-	2.69[a]
	0.5	-	-	2.56[a]	-	-	2.87[a]	-	-	2.56[a]
	1	-	-	2.37[a]	-	-	2.50[a]	-	-	2.38[a]
	2	-	-	2.37[a]	-	-	2.62[a]	-	-	2.16[a]
0.8	0	-	-	2.25[a]	-	-	2.25[a]	-	-	2.37[a]
	0.5	-	-	2.25[a]	-	-	2.62[a]	-	-	2.62[a]
	1	-	-	2.25[a]	-	-	2.12[a]	-	-	2.28[a]
	2	-	-	2.37[a]	-	-	2.56[a]	-	-	2.21[a]
0	0	-	-	-	-	1.20[b]	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	2.32[a]	-	-	-	-

	1	-	-	-	-	2.24[a]	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	2.04[a]	-	-	-	-
0.4	0	-	-	-	-	2.40[a]	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	2.16[a]	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	2.20[a]	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	2.12[a]	-	-	-	-
0.8	0	-	-	-	-	2.16[a]	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	2.32[a]	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	2.40[a]	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	2.72[a]	-	-	-
0	0	-	1[b]	-	-	1[b]	-	-	1.76[a]	-
	0.5	1.28[b]	-	-	1.88[c]	0.20	-	2[b]	0.12[b]	-
	1	1.60[b]	0.12[b]	-	2.32[b]	0.12[b]	-	2.80[a]	0.12[b]	-
	2	2.64[a]	-	0.38[b]	2.88[a]	-	0.84[b]	3.52[a]	-	-
0.4	0	-	2.12[a]	-	-	2.80[a]	-	-	3.32[a]	-
	0.5	-	1.64[a]	-	-	2.64[a]	-	-	3[a]	-
	1	-	2[a]	-	-	2.40[a]	-	-	3.08[a]	-
	2	-	۰.24[b]	1.46[a]	-	0.16[b]	1.40[a]	-	0.44[b]	2.40[a]
0.8	0	-	2.48[a]	-	-	2.84[a]	-	-	3.32[a]	-
	0.5	-	2.56[a]	-	-	2.48[a]	-	-	2.76[b]	-
	1	-	-	1.52[a]	-	0.00[b]	1.57[a]	-	0.28[c]	2.28[a]
	2		1.68[a]	0.33[b]	-	2.68[a]	0.60[b]	-	2.88[b]	-

* درهرستون میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون آماری دانکن در سطح ۱٪ تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

*Means in each column with the same letters are not significantly different at 1% level

Table 2– Interaction of different concentrations of picloram, 2, 4-D, IAA (0, 0.5, 1, 2 mgl^{-1}) and BAP (0, 0.4, 0.8 mg l^{-1}) on callus size, number shoot and number root of *H. perforatum* under *in vitro* condition.

منابع

Akbas F, Cigdem I, Sureyya N, Pinar K, Davut B (2011). Direct plant regeneration from *in vitro*- derived leaf explants *Hypericum spectabile* , a medicinal plant. Journal of Medicinal Plants Research 11: 2175-2181.

Akcamoluk E (2010). Hight efficiancy in direct shoot regeneration and hypericin content in embryogenic callus of *H. triquetrifolium* Turra. African Journal of biotechnology 9: 2229-2239.

Alali F, Tawaha K, Al-Eleimat T (2004). Determination of hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Tuna. (*Hypericaceae*) growing wild in Jordan. Natural Product Research 18: 147-151.

Ayan AK, Cirak C, Kevserolu K, 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.

Azizi M, Omidbeigi R (2002). The investigation of *Hypericum perforatum* L .in the *in vitro* condition in production of hypericin and other secondary metabolites. Pajouhesh and sazandegi journal 40: 15-45.

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

Carolina A, Astarita LV, Santarem ER (2001). Organogenese in *Hypericum perforatum* L. IV Encontro Latino-Americano de BiotechnologinVegetal, Goiania, Resumos, p 81.

Cellarova E, Kimakova k (1999). Morpholeguratory effect of plant growth regulators on *Hypericum perforatum*L. Seedling. Acta Biotechnology 19: 163-169.

Çirak C, Aksoy HM, Ayan AK, Saglam B, Kevseroglu K (2005). Enhanced hypericin production in *Hypericum perforatum* and *Hypericum pruinatum* in Response to Inoculation with Two Fungal Pathogens. Plant protection Science 3: 109–114.

Denath M, Malik CP, Bisen PS (2006). Micropropagation: a tool for the production of high quality plant –based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology 7: 33-49.

Dias A, Franklin G, Oliveria M (2007). Production of transgenic *Hypericum perforatum*L. plants via particle bombardment –mediated transformation of novel organogenic cell of novel organogenic cell suspension cultures. PlantScience 172: 1193-1203.

Dias ACP, Ferreira MF (2003). Production of phenolics by in vitro cultures of *Hypericum perforatum*: a case study, in: A.P. Rauter, M.E. Araujo, F.B. Palma, J. ustino, S.P. Santos (Eds.), Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application, Kluwer Academic Publishers, Dordrechtpp 367–374.

Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, Joseph J, Hage`ge D (2007). Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphtodianthrones. Plant Cell Tissue Organ Culture 89:1-13.

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

Pertto FR, Santarem ER (2000). Callus formation and plant regeneration form *Hypericum perforatum*L. leaves. Plant Cell Tissue Organ Culture 67: 107- 113.

Effect of different growth regulators levels and explants types of callogenesis and organogenesis *Hypericum perforatum* L. under *in vitro* condition

Sharafi E.[1,3], Khayymnkyy S.M. [2], Fotokian M.H.[3], Davoodi D. [4], Hassanloo T.*[1]

[1] Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran.
[2] Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran.
[3] Department of Agricultural Biotechnology, Shahed University, Tehran, Iran.
[4] Department of Nanotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran.

Abstract

In this study the effect of different levels of plant growth regulators (picloram, 2,4-D, IAA and BAP) and explants type (root, stem and leaf) were examined on callogenesis and organogenesis of st John's wort with factorial experiment design on the basis of completely randomized design with five repeats and five explants. The explants were obtained from 30 days plantlets and transferred to media supplemented with picloram, 2,4-D, IAA (0, 0.5, 1, 2 mgl^{-1}) and BAP (0, 0.4, 0.8 mg l^{-1}). Samples were kept in the growth chamber in the darkness condition at 23°C. After 28 days, the interactions between explants types and hormone levels were investigated. The significant effect at the 1 percent probability was observed between treatment levels of 2, 4-D, picloram, BAP and its interaction (2, 4-D * BAP) for the calluses size and shoot numbers. Also the significant effect at the 1 percent probability was observed between treatment levels of IAA, BAP and its interaction (IAA*BAP) for the calluses size, shoot and root numbers. The highest numbers of shoots (83 shoots) were achieved in the leaf explants treated with 0.4 mgl^{-1} BAP. The highest callus size (5 mm) was observed in media containing 0.5 mg l^{-1} picloram and 0.4 mg l^{-1} BAP and stem explants also greatest number (91 roots) of roots were observed in media supplemented with 2 mgl^{-1} IAA in the leaf explants.

Key words: *Medicinal plant, Micro-propagation, Plant breeding, Tissue culture*.

* Corresponding author: Hassanloo T. Tel: 02632703536 Email: thasanloo@abrii.ac.ir