مطالعه و بررسی بهینه‌سازی محیط کشت گل راعی (*Hypericum perforatum*) با هدف کال‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های برگ و ساقه

نگین افشارزاده[۱]، مجید عزیزی ارانی*[۲]، لیلا سمیعی

[۱*] گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

[*] گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

[۳] گروه گیاهان زینتی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

*نویسنده مسئول: azizi@um.ac.ir

چکیده

گل راعی گیاهی چندساله با کاربرد گسترده‌ای در طب سنتی است. این گیاه علاوه بر ترکیبات آنتی اکسیدانتی و فلاونوئیدی، دارای مواد مؤثره باارزشی ازجمله هایپریسین، سودوهایپریسین و هایپرفورین می‌باشد که از حیث اثرات ضدافسردگی، ضدسرطانی و افزایش ایمنی بدن مورد اهمیت واقع شده است. لذا با توجه به نیاز روزافزون بشر به مواد خام دارویی و تمایل برای جایگزینی موادخام اولیه شیمیایی با انواع گیاهی، بهره‌وری از روش‌های کشت بافت این گیاه و هدایت گیاه به سمت تولید مواد دارویی ارزشمند کمک شایانی بر تولید مواد اولیه با منشأ گیاهی خواهد نمود. لذا این پژوهش با هدف بهینه‌سازی محیط کشت این گیاه و در راستای تولید کالوس و باززایی به‌منظور فعالیت‌های اصلاحی بر روی این گیاه صورت گرفته است. این پژوهش به‌صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۶ تیمار هورمونی با سطوح متفاوتی از بنزیل‌آدنین و توفوردی بر روی دو ریزنمونه برگ و ساقه، در دو شرایط نور و تاریکی اجرا گردید. نمونه‌های تیمار شده از لحاظ میزان کال‌زایی و باززایی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که برای ریزنمونه برگی تیمار بنزیل‌آدنین با غلظت۳ میلی‌گرم بر لیتر و توفوردی با غلظت ۲,۵ میلی‌گرم بر لیتر با ۹۸درصد بیشترین میزان کال‌زایی را به خود اختصاص داد درحالی‌که برای ریزنمونه ساقه تیمار بنزیل‌آدنین با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر و توفوردی با غلظت۲,۵ میلی‌گرم بر لیتر با ۹۵ درصد بیشترین میزان کال‌زایی را داشته است. از نظر شاخه‌زایی به‌ترتیب در ریز نمونه‌های برگی و ساقه بهترین تیمارها شامل mg/L BA ۴ و 3 mg/L BA بودند.

***کلمات کلیدی*: بنزیل‌آدنین، توفوردی، متابولیت‌های ثانویه، میانگره، برگ**

مقدمه

گل راعی گیاهی چندساله با نام علمی *H. perforatum* و از خانواده Hypericaceae می‌باشد.این گیاه با نام انگلیسی St. John's Wort شناخته می‌شود. این گیاه دارای مواد مؤثره از خانواده آنتراکوئینون‌های فعال نوری؛ هایپریسین، هایپرفورین و سودوهایپریسین می‌باشد. مواد مؤثره این گیاه دارای خواص ضدسرطانی، درمان زخم، ضدویروس، بهبود سوختگی، مسکن، ضد باکتری و مؤثر در درمان افسردگی‌های خفیف تا متوسط می‌باشد. مواد مؤثره این گیاه در بخش‌های هوایی شامل برگ، ساقه، گل‌پوش‌هاست. مواد مؤثره گل راعی در غده‌های کوچک و سیاه‌رنگ در بخش‌های ساقه و برگ‌ها پراکنده‌اند. این ساختارهای تیره در حاشیه برگ‌ها و گلبرگ‌ها ظهور می‌یابند. بر طبق پژوهش‌های صورت گرفته مشخص گردید که ترکیبات مؤثره این گیاه در برابر رتروویروس‌ها مقابله می‌کند و به‌عنوان دارویی گیاهی جهت درمان ایدز پیشنهاد گردیده است.

تاکنون روش‌های بسیاری به‌منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه مهم در این گیاه با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و همچنین از طریق کشت در شرایط in vivo صورت گرفته است. یکی از جدیدترین پژوهش‌های صورت

گرفته در سال ۲۰۱۶ و بر اساس مقایسه میزان مواد مؤثره این گیاه در کشت درون شیشه‌ای و کشت در شرایط in vivo این گیاه مشخص گردید که کالوس‌های حاصل از این گیاه حاوی ماده مؤثره دارویی و ارزشمند تجاری زانتون می باشد. این ماده دارویی به‌صورت اختصاصی در کالوس‌های این گیاه تولید می‌شود درحالی‌که در آنالیز ترکیبات حاصل از نمونه‌های رشد یافته در شرایط in vivo مشاهده نگردیده است(Ayan et al., 2005).

با توجه به این‌که در پژوهش‌های اخیر هدایت گیاه *H. perforatum* به سمت تولید درون شیشه‌ای با هدف تولید و استخراج ماده خام دارویی و ارزشمند زانتون مورد توجه قرار گرفته است. لذا وجود پروتکلی با بازخورد بالا در جهت تولید کالوس‌های مناسب به‌منظور استخراج مواد مؤثره خاص و همچنین دست‌یابی به گیاهان باززایی شده جهت تکثیر انبوه و فعالیت‌های اصلاحی در جهت بهبود میزان مواد مؤثره در گیاه گل راعی هدف مورد بررسی در این پژوهش بوده است.

فابین راکوئل و همکاران، در پژوهشی با هدف کال‌زایی و باززایی برگ‌های گل راعی بر روی ارقام برزیلی انجام دادند (Raquel Pretto & Romanato Santarém, 2000). در پژوهشی که بر روی باززایی مستقیم و غیرمستقیم گرهک‌ها و ریزنمونه‌های برگی گونه *H. bupleuroides* پژوهش صورت گرفت (Ayan & KevseroĞlu, 2007). در سال ۲۰۰۶ نیز کامفلد و همکاران تحقیقاتی را در رابطه با ساختارهای گرهکی حاوی هایپریسین موجود در دو گروه مجزا از گیاه *H.perforatum* و بررسی‌های فیتوشیمیایی بر روی ریز نمونه ساقه انجام دادند(Kornfeld et al., 2007).

مواد و روش‌ها

پژوهش مذکور در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. ریز نمونه‌های مورد بررسی شامل برگ و میان‌گره بوده است.

کشت ریزنمونه ساقه

بدین منظور از طریق کشت بذر *H.perforatum* گیاهچه‌های استریل تولید شد. ریز نمونه‌های موردنظر از بخش ساقه شامل ۱ تا ۲ گره تهیه گردید و در محیط کشت MS با مشخصات زیر کشت شد. محیط مذکور شامل نمک‌های MS و ویتامین‌های محیط B5 بوده و حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۰,۷ درصد آگار بوده است. pH محیط کشت نیز ۵,۷۰ تا ۵,۸۰ در نظر گرفته شد و اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط در جدول ۱ درج شده است. کشت‌های صورت گرفته در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفت. نور مورد استفاده در بازه ۱۳۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس در نظر گرفته شد. در هر ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت ۵ ریزنمونه قرار گرفت. اطلاعات تیمارها در پایان هفته چهارم اندازه‌گیری شد (جدول۱).

کشت ریز نمونه برگ

به‌منظور تهیه ریزنمونه‌های برگ از گیاهان رشد یافته در شرایط in vivo استفاده شد. جهت ضدعفونی نمونه‌های برگ، هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۲۰ دقیقه و سپس ۳ مرتبه آبکشی با آب مقطر استریل صورت گرفت. به‌منظور تهیه ریزنمونه، هر یک از نمونه‌های برگی ضدعفونی شده به قطعات ۱۵ تا ۲۰ میلی‌متر مربع تقسیم و سپس در هر۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت ۵ ریزنمونه قرار گرفت.

محیط کشت به کار برده شده مشابه با محیط کشت ذکر شده در بخش کشت ریزنمونه ساقه بوده است.

تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده در این بخش در جدول ۱ درج گردیده است. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP انجام گردید.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس؛ غلظت هورمون‌های به کار برده شده و نوع ریز نمونه‌های برگ و ساقه بر توانایی کال‌زایی و باززایی مؤثر بوده‌اند و دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند. میان اثر غلظت هورمون های اعمال‌شده در ۶ سطح و همچنین برهمکنش اثر غلظت‌های هورمونی بر ریز نمونه‌ها در سطح ۰/۰۰۰۱ درصد معنی‌دار گردید.

از لحاظ تولید کالوس، اثر هورمون‌ها بر میزان کال‌زایی دارای اثر معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۰۱ درصد بوده و همچنین تأثیر برهمکنش سطوح هورمونی اعمال‌شده بر نوع ریزنمونه نیز در سطح احتمال ۰/۰۰۰۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج نشان داد؛ وجود نور و تاریکی تأثیر معنی‌داری بر درصد تولید کالوس نداشته است.

از لحاظ میزان باززایی: اثر معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۰۱ درصد در توانایی هورمون‌ها بر میزان باززایی و همچنین تأثیر غلظت‌های مختلف هورمونی بر نوع ریزنمونه‌ها مشاهده گردید، علاوه بر این اثر متقابل شرایط نوری و نوع ریز نمونه نیز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار گردید.

کال‌زایی

ریز نمونه ساقه

بررسی ریز نمونه‌های کشت شده ساقه نشان داد پس از ۱۰ روز القای کالوس آغاز گردیده و تا پایان هفته چهارم کالوس‌ها تولید می‌شوند. رنگ کالوس‌ها بر اساس شرایط تاریکی و نور و همچنین سطوح مختلف هورمونی، طیفی از سبز کم‌رنگ و شیری‌رنگ تا سبز تیره داشتند (شکل۱- A و B). در ریز نمونه ساقه نیز تیمار B2D3 حاوی ۴ mg/L بنزیل آدنین و ۲,۵ mg/L توفوردی با ۹۵ درصد کال‌زایی و تیمار B1D2 حاوی ۳ mg/L بنزیل آدنین و mg/L ۱توفوردی با ۸۶ درصد کال‌زایی بیشترین درصد تولید کالوس را داشته‌اند و کمترین میزان کال‌زایی در تیمارB2D1 با غلظت ۴mg/L بنزیل آدنین و فاقد توفوردی بوده است (نمودار-۱).

ریز نمونه برگی

القای کالوس با تغییر رنگ برگ‌ها از سبز به قهوه‌ای تیره و متورم شدن آن در هفته دوم آغاز شده و تا پنج هفته به طول انجامید. رنگ کالوس‌های باززایی شده از نمونه‌های برگ سبز تیره و دارای بافتی ترد و فشرده بود (شکل C, D). لذا با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در بین سطوح هورمونی مورد آزمایش، بهترین تیمار به‌منظور کال‌زایی ریزنمونه برگ، تیمار B1D3 حاوی ۳ mg/L بنزیل آدنین و ۲,۵ mg/L توفوردی با ۹۵ درصد کال‌زایی و پس از آن تیمار B2D2 حاوی ۴ mg/L بنزیل آدنین و ۱ mg/L توفوردی با ۸۸درصد کال‌زایی بوده است که بیشترین درصد تولید کالوس در ریزنمونه برگ را شامل می‌شوند. همچنین کمترین درصد تولید کالوس در تیمار B1D1 با غلظت ۳ mg/L بنزیل آدنین و فاقد توفوردی بوده است (نمودار-۱، شکل D).

باززایی

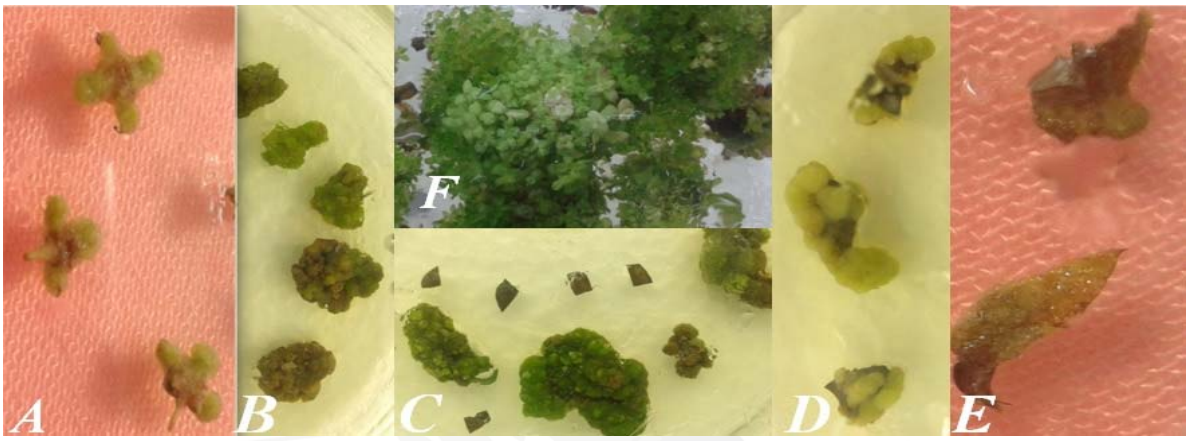
نتایج مشاهده شده حاصل از باززایی نشان می‌دهد؛ تیمار مشترک B1D1 حاوی ۳ mg/L بنزیل آدنین و فاقد توفوردی در هر دو ریز نمونه برگ و ساقه بیشترین میزان باززایی (بیش از ۵۰ عدد در هر قطعه کالوس میانگره) را دارا بوده‌اند (نمودار- ۲، شکلF,C).

در ریز نمونه برگی به‌طور اختصاصی تیمار B2D1 حاوی ۴ mg/L بنزیل آدنین و فاقد توفوردی با ۵۵درصد بیشترین میزان باززایی را داشته است و در ریزنمونه ساقه تیمار B1D1 حاوی ۳ mg/L بنزیل آدنین و فاقد توفوردی با ۵۷,۵درصد بیشترین میزان باززایی صورت گرفته است(شکل C).

در طی آزمایشات صورت گرفته، تأثیر وجود یا عدم وجود کازئین هیدرولیزات نیز در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاکی از آن بود که در روند کال‌زایی ریز نمونه‌های برگی وجود کازیین هیدرولیزات ضروری به نظر می‌رسد و در محیط‌های فاقد کازیین هیدرولیزات، ریز نمونه‌های برگی کال‌زایی بسیار کم و غیر قابل توجه را داشتند.

همچنین وجود کازیین هیدرولیزات در محیط کشت‌های حاوی ساقه موجب تسریع القای کالوس در آن‌ها نسبت به محیط‌های فاقد کازیین هیدرولیزات گردید. نتایج حاصل از آنالیز این بخش در این مقاله ثبت نگردیده است.

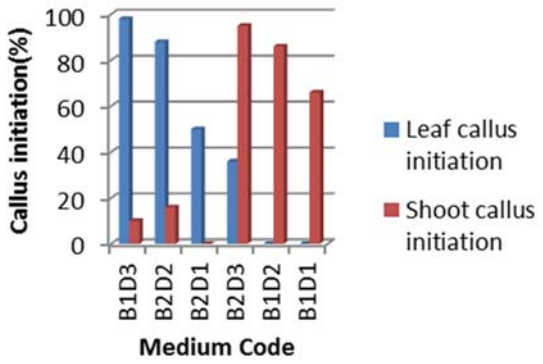
به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت در کشت‌هایی با هدف تولید کالوس، بنزیل آدنین به‌تنهایی مؤثر نبوده و وجود توفوردی نیز لازم به نظر می‌رسد. نتایج حاصل از مقایسه برهم‌کنش تیمارهای هورمونی بر میزان کال‌زایی و باززایی دو ریز نمونه برگ و ساقه گل راعی در نمودار ۳ نشان داده شده است.



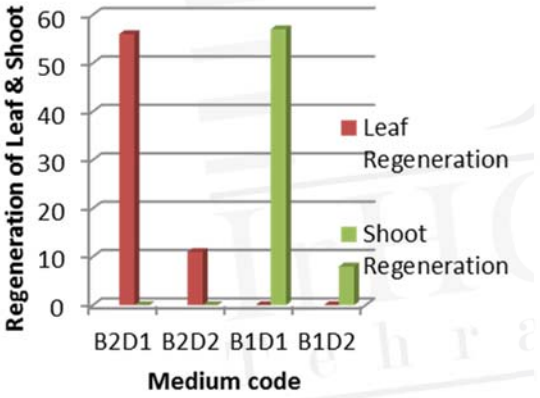
شکل ۱ – کال‌زایی برگ (E, C, D)، کال‌زایی ساقه (A, B)، باززایی ساقه (F)، باززایی برگ (C)

جدول ۱- نوع و غلظت هورمون‌ها

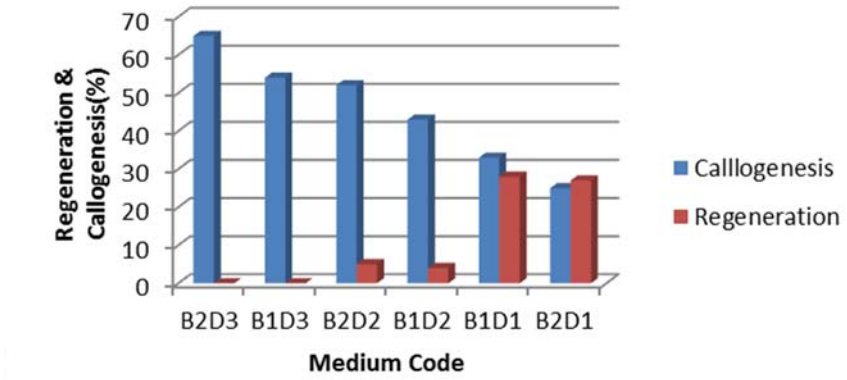
نام تیمار	BA Concentration	۲,4-D Concentration
B1D1	3	0
B1D2	3	1
B1D3	3	2.5
B2D1	4	0
B2D2	4	1
B2D3	4	2.5



نمودار ۱- اثر غلظت‌های هورمونی بر میزان کال‌زایی برگ و ساقه



نمودار ۲- اثر غلظت‌های هورمونی بر میزان باززایی برگ و ساقه



نمودار۳-اثر تیمارهای اعمال‌شده بر میزان کال‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های برگ و ساقه

منابع

Ayan, Ali Kemal, Çirak, Cüneyt, Kevseroglu, Kudret, & Sökmen, Atalay. (2005). Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytoharmones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum L. Turkish journal of agriculture and forestry, 29*(3), 197-204.

Ayan, Ali Kemal, & KevseroĞlu, Kudret. (2007). Direct and indirect regeneration of plants from internodal and leaf expiants of *Hypencum bupleuroides gris. Journal of Plant Biology, 50*(1), 24.

Ghazian, Tafrishi g, Azizi, Majid, & Farsi, Mohamad. (2006). Investigation of in vitro culture of Iranian St. John's Wort (*Hypericum perforatum L.*).

Kirakosyan, Ara, Gibson, Donna M, & Sirvent, Tara. (2004). A comparative study of Hypericum perforatum plants as sources of hypericins and hyperforins. *Journal of herbs, spices & medicinal plants, 10*(4), 73-88.

Kirakosyan, Ara, Sirvent, Tara Michelle, Gibson, Donna Marie, & Kaufman, Peter B. (2004). The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Biotechnology and applied biochemistry, 39*(1), 71-81.

Kornfeld, Ari, Kaufman, Peter B, Lu, Casey R, Gibson, Donna M, Bolling, Steven F, Warber, Sara L, Kirakosyan, Ara. (2007). The production of hypericins in two selected Hypericum perforatum shoot cultures is related to differences in black gland structure. *Plant physiology and Biochemistry, 45*(1), 24-32.

Levin, Geoffrey A, & Hickman, James C. (1993). The Jepson manual: higher plants of California: JSTOR.

Raquel Pretto, Fabiane, & Romanato Santarém, Eliane. (2000). Callus formation and plant regeneration from Hypericum perforatum leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62*(2), 107-113.

Upton, Roy. (1997). St. John's Wort, Hypericum perforatum: Quality control, analytical and therapeutic monograph. *Santa Cruz, CA: American Herbal Pharmacopoeia 32p. En Hypericum_perforatum, medicines, review, Guttiferae, chemical_analysis, laboratory_tests (EBBD, 190107948).*

Zhao, Linshu, Liu, Luxiang, Wang, Jing, Guo, Huijun, Gu, Jiayu, Zhao, Shirong, Xie, Yongdun. (2015). Development of a new wheat germplasm with high anther culture ability by using a combination of gamma-ray irradiation and anther culture. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 95*(1), 120-125.

Study for Medium Optimization for Callus Induction and Shoot Regeneration of *Hypericum perforatum* from Stem and Leaf Explants

Negin Afsharzadeh[1], Majid Azizi*[2], Leila Samiei[3]
[1] Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Horticultural Science, Mashhad, Iran.
[2] Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Horticultural Science, Mashhad, Iran.
[3] Ferdowsi University of Mashhad, Research Center for Plant Science, Mashhad, Iran.
*Corresponding Author: azizi@um.ac.ir

Abstract

Hypericum perforatum **is a perennial plant that has been used in traditional medicine. *H. perforatum* have several types of medicinal compounds including antiviral compounds, antioxidants, flavonoides and also has valuable compounds such as Hypericin, Hyperforin, Pseudo hypericin that have effect on human physiology.**

Xanthones, the other valuable compounds were produced in the calluses of *H. perforatum*. They are important compounds in pharmaceutical industry. The goal of this study was to introduce the suitable medium for callogenesis and regeneration of *H. perforatum* for production and breeding aims.

This research was conducted with two explants, leaf discs and stem segment, that were cultured on MS medium with different concentration of N6-Benzyladenine and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid hormones. Explants were cultivated under dark and light conditions to induce calluses.

The effects of the factors that tested on regeneration and callogenesis were different. The optimized medium for callogenesis of the leaf discs supplemented with 4mg/L BA and 2.5 mg/L 2,4-D and for the stem callogenesis the medium supplemented with 3 mg/L BA and 2.5 mg/L 2,4-D have the maximum callogenesis. The optimization mediums for regeneration of leaf and stem were 3 mg/L BA and 4 mg/L BA.

Keywords**: BA, 2,4-D, secondary metabolites, stem segment, leaf**