

Investigation of morphological, physiological, histological characteristics and hypericin content of 20 populations of *Hypericum perforatum* L. in vitro

Mozhdeh Shafaei¹, Morteza Ebrahimi^{2*} and Arash Mokhtari³

- 1- Department of plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran- Isfahan Branch, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, Iran, E-mail: m.ebrahimi@abrii.ac.ir
3- Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran- Isfahan Branch, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, Iran

Received: March 2021

Revised: September 2021

Accepted: September 2021

Abstract

Background and objective: St. John's Wort, known as *Hypericum perforatum* L., is a valuable medicinal plant in the *Hypericaceae* family. Its most common use is for its antidepressant properties. The active compounds hypericin and hyperforin in St. John's Wort and their proven therapeutic effects have made this plant one of the most valuable medicinal plants worldwide. Hypericin, a major plant metabolite, has antiviral and anticancer effects. Hypericin belongs to the naphthodianthrones family and is light-sensitive. It mainly accumulates in the dark-colored glands on the leaves and flowers of the plant, and its concentration ranges from 0.3% to 3.0% in the leaves and 1% to 14% in the flower buds, depending on the plant variety, height, light conditions, and season. Hyperforin is another important compound of the phloroglucinols group found abundantly in St. John's Wort flowers, especially in the stamens and the fruit. However, it is also present in large amounts in the leaves. Hyperforin content of 6.9% in flower buds, 8.5% in unripe fruit, and 5.1% in leaves has been reported. Unlike hypericin, hyperforin accumulates in transparent glands. Since hypericin and hyperforin depend on environmental conditions, asexual reproduction is preferred over sexual reproduction.

Methodology: In this study, 20 populations from 20 different regions of Iran were collected and examined for micropropagation optimization. In addition to identifying the most suitable medium for micropropagation of these populations, the morphological, physiological, biochemical, and histological characteristics of them were also investigated. To prepare the modified culture medium, ½ MS salts, FeEDDHA, B5 vitamins, and two g.l⁻¹ Glycine was used. The MS basal medium was used as a control after adjusting the pH to 8.5 and adding 8.6 g.l⁻¹ Agar, the desired medium, was distributed into culture vessels and autoclaved at 121°C and 2 bar pressure for 20 minutes. Seven explants containing 1-2 buds were placed in each culture vessel. All cultures were incubated in a growth room with 8 hours of darkness and 16 hours of light at an intensity of 1500-2000 lux, a temperature of 25°C, and a relative humidity of 60-70% for four weeks. After the emergence of new shoots, data were collected on the number of branches, length of branches, fresh weight, and dry weight. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to measure the hypericin content in the leaves of the plantlets.

Results: This study shows that changing the culture medium composition in most studied populations increases branch length and number. Reducing the amount of mineral salts in the culture medium has affected the plant's osmotic relationships to water and nutrient uptake. This and increased glycine concentration have created a better fine growth trend. This study showed



that among twenty native es of Iran, the North Khorasan population had the highest morphological (shoot number, shoot length), physiological (fresh weight, dry weight), and biochemical (hypericin content) indices in the modified medium. Also, histological studies in this study showed a larger growth of dark glands in the modified medium than in the basal medium.

Conclusion: Based on the findings for twenty native populations of *Hypericum perforatum* in Iran, the North Khorasan population had the highest morphological (shoot number, shoot length), physiological (fresh weight, dry weight), and biochemical (hypericin content) indices in the modified medium. Also, histological studies showed a larger growth of dark glands in the modified medium than in the basal medium.

Keywords: Hypericin, FeEDDHA, modified culture medium, glycine, *Hypericum perforatum* L.

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، هیستولوژیک و میزان هایپرین ۲۰ جمعیت گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) در شرایط درون شیشه

مژده شفائی^۱، مرتضی ابراهیمی^{۲*} و آرش مختاری^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

پست الکترونیک: m.ebrahimi@abrii.ac.ir

۳- کارشناس ارشد، بخش کشت بافت، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۹

چکیده

سابقه و هدف: گل راعی، علف چای، هزارچشم یا هوفاریقون با نام علمی (*Hypericum perforatum* L.) یک گیاه دارویی ارزشمند از خانواده Hypericaceae است. بیشترین کاربرد این گیاه مربوط به خاصیت ضدافسردگی آن می‌باشد. وجود ترکیبات مؤثره هایپرین و هایپرفورین در گل راعی و اثرهای درمانی ثابت شده آن، این گیاه را به یکی از گیاهان دارویی با ارزش در سطح جهان تبدیل کرده است. هایپرین به عنوان متابولیت مهم این گیاه اثرهای ضدویروسی و ضد سرطانی نشان داده است. هایپرین از خانواده نفتودیانترون‌ها بوده و به نور حساس است و عمدتاً در غده‌هایی تیره‌رنگ روی برگ و گل‌های گیاه تجمع می‌یابد و میزان آن بین ۰/۰۳-۰/۳٪ در برگ‌ها و ۱۴-۱٪ در جوانه‌های گل‌های این گیاه است. این مقدار با توجه به رقم گیاه، ارتفاع، شرایط نور و دوره سال متفاوت است. هایپرفورین یکی دیگر از مهمترین ترکیبات گروه فلوگلوکوسینول‌ها در گل راعی است که به فراوانی در گل‌های گل راعی، به‌ویژه در مادگی و در میوه یافت می‌شود، اما در برگ نیز به میزان زیادی وجود دارد. محتوای هایپرفورین ۹/۶٪ در جوانه‌های گل، ۵/۸٪ در میوه‌های نارس و ۱/۵٪ در برگ‌ها گزارش شده است. هایپرفورین برخلاف هایپرین در غدد شفاف انباشته می‌گردد. از آنجا که وابستگی مقدار هایپرین و هایپرفورین به شرایط محیطی بسیار زیاد است، تکثیر غیرجنسی به تکثیر جنسی ترجیح دارد. مواد و روش‌ها: در این پژوهش بیست جمعیت از ۲۰ منطقه مختلف ایران جمع‌آوری و با هدف بهینه‌سازی مراحل ریزازدیادی و پرآوری بررسی شد. در این پژوهش علاوه بر بررسی و معرفی بهترین محیط برای پرآوری این ۲۰ جمعیت ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و هیستولوژی آنها نیز بررسی شد. به منظور تهیه محیط کشت تغییر یافته، از نمک‌های ۱/۲MS و منبع آهن FeEDDHA، ویتامین‌های B₅ و ۲ g.l⁻¹ گلایسین استفاده شد. محیط کشت MS پایه به‌عنوان محیط کنترل استفاده گردید. پس از تنظیم pH روی ۵/۸ و افزودن ۶/۸ g.l⁻¹ آگار، محیط مورد نظر در ظروف کشت توزیع و در دمای ۱۲۱°C و فشار ۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس از تهیه قطعات ساقه (به طول ۲-۱ سانتی‌متر) حاوی ۲-۱ جوانه گرده از گیاهچه‌های ضدعفونی شده، تعداد هفت ریزنمونه در هر ظرف کشت شد. همه کشت‌ها به اتاق رشد با دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۲۰۰۰-۱۵۰۰ لوکس و دمای ۲۵°C و رطوبت نسبی ۷۰-۶۰٪ به مدت ۴ هفته منتقل شدند. پس از شروع رشد شاخساره‌های جدید داده‌برداری شامل تعداد شاخه، طول شاخه، وزن تر و وزن خشک انجام شد. به منظور سنجش محتوای هایپرین در برگ‌های گیاهچه از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد.

نتایج: بررسی‌ها نشان می‌دهد در بیشتر جمعیت‌های مورد مطالعه با تغییر ترکیبات محیط کشت طول و تعداد شاخساره افزایش یافته است. به نظر می‌رسد کاهش میزان نمک‌های معدنی محیط کشت، بر روابط اسمزی گیاه برای جذب آب و مواد مغذی تأثیر گذاشته و به‌همراه افزایش غلظت گلایسین برای حفظ بازدهی فتوسنتز توانسته روند ریزازدیادی بهتری را ایجاد کند. این بررسی نشان داد که از میان بیست جمعیت بومی ایران، جمعیت خراسان شمالی بالاترین شاخص‌های مورفولوژیکی (تعداد شاخه و طول شاخه)،

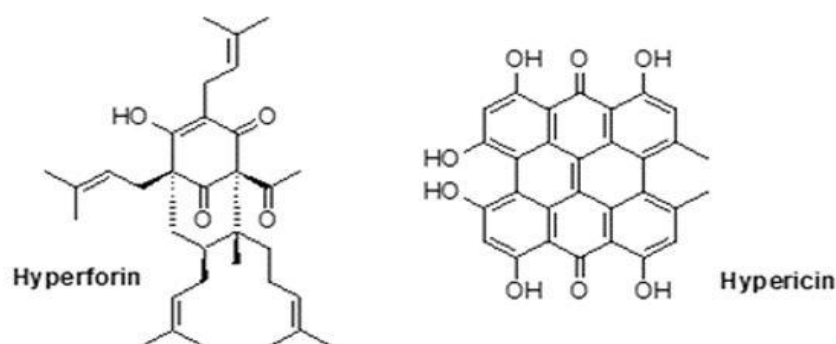
فیزیولوژیکی (وزن تر، وزن خشک) و بیوشیمیایی (محتوای هایپرین) را در محیط تغییر یافته نشان داد. همچنین، بررسی‌های هستیتولوژی در این مطالعه، بیانگر نمو غده‌های تیره بزرگ‌تر در محیط تغییر یافته نسبت به محیط پایه بود. نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این تحقیق بر روی بیست جمعیت بومی *Hypericum perforatum* در ایران، جمعیت خراسان شمالی دارای بالاترین شاخص‌های مورفولوژیکی (تعداد ساقه، طول ساقه)، فیزیولوژیکی (وزن تر، وزن خشک) و بیوشیمیایی (محتوای هایپرین) در محیط کشت اصلاح شده بودند. همچنین، مطالعات بافت‌شناسی رشد بیشتری از غدد تیره را در محیط اصلاح شده نسبت به محیط پایه نشان داد.

واژه‌های کلیدی: هایپرین، FeEDDHA، گلاپسین، محیط کشت تغییر یافته، *Hypericum perforatum* L.

مقدمه

ضدویروسی و ضد سرطانی دارد (Kirakosyan *et al.*, 2004). هایپرین از خانواده نفتودیانترون‌ها بوده و به نور حساس است (Bertoli *et al.*, 2008) و عمدتاً در غده‌هایی تیره‌رنگ روی برگ و گل‌های گیاه تجمع می‌یابد و میزان آن بین ۰/۳-۰/۳٪ در برگ‌ها و ۱-۱۴٪ در جوانه‌های گل‌های این گیاه است. این مقدار با توجه به رقم گیاه، ارتفاع، شرایط نور و دوره سال متفاوت است (Ramezani & Karppinen, 2010). هایپرین یکی دیگر از مهمترین ترکیبات گروه فلوگلوکوسینول‌ها در گل راعی است که به فراوانی در گل‌های گل راعی، به‌ویژه در مادگی و در میوه یافت می‌شود، اما در برگ نیز به میزان زیادی وجود دارد. محتوای هایپرین ۹/۶٪ در جوانه‌های گل، ۵/۸٪ در میوه‌های نارس و ۱/۵٪ در برگ‌ها گزارش شده است. هایپرین برخلاف هایپرین در غدد شفاف انباشته می‌شود (Karppinen, 2010).

گل راعی، علف چای، هزارچشم یا هوفاریقون با نام علمی *Hypericum perforatum* L. یک گیاه دارویی ارزشمند از خانواده *Hypericaceae* است. بیشترین کاربرد این گیاه مربوط به خاصیت ضدافسردگی آن می‌باشد. وجود ترکیبات مؤثره هایپرین و هایپرین (شکل ۱) در گل راعی و اثرهای درمانی ثابت شده آنها، این گیاه را به یکی از گیاهان دارویی با ارزش در سطح جهان تبدیل کرده است. مصرف روزافزون فرآورده‌های دارویی حاصل از آن سبب شده تا تأمین مواد اولیه این داروها مشکلی جدی باشد. کشور ایران نیز یکی از مصرف‌کنندگان این ترکیبات در صنایع دارویی است. این گیاه به طور گسترده‌ای در مناطق معتدل اروپا، آسیا و شمال آفریقا توزیع شده است. گل راعی در ایران در دامنه کوه‌های البرز، چالوس، مازندران و نقاط غرب ایران می‌روید (Bertoli *et al.*, 2008). هایپرین به‌عنوان متابولیت مهم این گیاه اثرهای



شکل ۱- ساختار شیمیایی هایپرین و هایپرین (Karppinen, 2010)

Figure 1. Hypericin and hyperforin chemical structure (Karppinen, 2010)

۱ تا ۲ گره در محیط MS حاوی 5 mg.l^{-1} کاینیتین بدست آمد. Sood و همکاران (۲۰۱۵) سریع‌ترین روش ریزازدیادی گل راعی را در شرایط درون شیشه با میانگین $3/3$ شاخه روی هر ریزنمونه روی محیط MS حاوی 3 mg.l^{-1} ایندول بوتیریک اسید (IBA) و 1 mg.l^{-1} کاینیتین (KN) گزارش کردند. در مطالعه دیگری روی ریزازدیادی سریع گیاه گل راعی، ریزنمونه‌های گره روی محیط MS حاوی $5/7 \mu\text{M}$ BAP و $2 \mu\text{M}$ IAA کشت شد و بالاترین میزان شاخه ($50/5$ به‌ازای هر ریزنمونه) پس از ۲۴ روز کشت را نشان داد (Mir et al., 2019).

Abdollahpoor و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که ریزنمونه نوک ساقه روی محیط MS حاوی $1/1 \text{ mg.l}^{-1}$ بنزیل آدنین (BA) بالاترین تعداد شاخه ($15/5$ شاخه) را به‌ازای هر ریزنمونه و طول $2/07 \text{ cm}$ تولید کرده است. Morshedloo و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهش خود، برای بررسی ترکیبات فرار در سرشاخه گل راعی، شش ریزنمونه گره در سه محیط مختلف MS، B5 و محیط $1/2 \text{ MS}$ حاوی $0/5 \text{ mg.l}^{-1}$ BA کشت کردند و بالاترین میزان رشد ($49/95 \text{ g.flask}^{-1}$) در محیط B5 مشاهده شد. در بررسی اثر ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف BAP روی ریزازدیادی و تولید هاپیرسین در سرشاخه گیاه گل راعی، برگ چهار ژنوتیپ گل راعی به‌عنوان ریزنمونه روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP و IAA قرار گرفتند. بالاترین میزان القاء شاخه در محیط کشت حاوی $1-1/5 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP با میانگین $24/4$ و $37/9$ شاخه به‌ازای هر ریزنمونه بدست آمد (Farsad Akhtar et al., 2013).

Latawa و همکاران (۲۰۱۶) در ریزازدیادی فندق از آهن FeEDDHA در چهار غلظت (230 ، 345 ، 460 و 575) استفاده کردند و پس از ۶ هفته مشاهده کردند که استفاده از FeEDDHA تا میزان $460 \mu\text{mol}^{-1}$ رشد شاخه، طول شاخه و تعداد گره به‌ازای هر ریزنمونه را افزایش داد. Eshaghi Sanayi و همکاران (۲۰۱۸) به منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های انار از

افزایش کمی و کیفی مواد مؤثره گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از مهمترین مسائل تحقیقاتی است. زمان و هزینه زیاد در کشت سنتی و تنوع منطقه جغرافیایی و تأثیر آن بر کمیّت و کیفیت ماده مؤثره در سیستم کشت سنتی از جمله عوامل محدود کننده محسوب می‌شود. از میان روش‌های مختلف، تکنولوژی کشت بافت گیاهی به‌عنوان یکی از روش‌های مطلوب برای تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کنترل‌شده، بکار می‌رود. روش‌های بیوتکنولوژی با استفاده از کشت سلول و اندام گیاهی فرصت تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی از طریق کشت در شرایط درون شیشه با یکنواختی بالا و صرف‌نظر از محدودیت‌های جغرافیایی و فصلی و عوامل محیطی را فراهم می‌کند. از سوی دیگر، برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی از طبیعت سبب نابودی ذخایر ژنتیکی شده است و صنایع داروسازی متقاضی گیاهانی است که یکنواخت بوده و دارای مقدار مشخصی از متابولیت ثانویه هستند. از این رو، راهکار این مشکل، بهره‌گیری از روش‌های بیوتکنولوژی و تولید گیاهان دارویی با مواد مؤثره یکنواخت بدون اعمال فشار بر مراتع و رویشگاه‌های طبیعی است (Franklin & Dias, 2006). با توجه به اینکه تکثیر از طریق روش‌های سنتی و جنسی مثل تکثیر از طریق بذر مشکل عدم یکنواختی ژنتیکی و بازدهی پایین را ایجاد می‌کند و وابستگی مقدار هاپیرسین و هاپیرفورین به شرایط محیطی بسیار زیاد است، بنابراین تکثیر غیرجنسی به تکثیر جنسی ترجیح داده می‌شود. کشت درون شیشه به‌عنوان یکی از فنون ارزشمند در تکثیر رویشی، امکان تکثیر انبوه این گیاه را فراهم می‌کند.

پیش از این پژوهش‌های بسیاری در مورد گل راعی انجام شده است، به‌عنوان نمونه به منظور ریزازدیادی شاخه از این گیاه ریزنمونه گره را در محیط MS حاوی $1/1 \text{ mg.l}^{-1}$ بنزیل آدنین (BA) قرار دادند (Karpinen, 2010). Goel و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که حداکثر تعداد شاخساره گل راعی از قطعات ساقه حاوی

طول و عرض جغرافیایی مشخص (جدول ۱) از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه و برای دستیابی به گیاهچه در محیط حاوی پیت‌ماس کشت شدند. پس از گذشت چهار هفته از جوانه‌زنی، گیاهچه حاصل برای استفاده به‌عنوان ریزنمونه‌های گره استفاده شد. به‌منظور ضدعفونی سطحی، گیاهچه‌ها ابتدا با آب شهری شستشو شده و بعد در اتانول ۷۰٪ (اتانول ۹۶٪ از شرکت مرک آلمان: ۷۳CC و ۲۷CC آب مقطر) به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شدند. در ادامه، گیاهچه‌ها با آب مقطر استریل آبکشی و درون محلول هیپوکلریت ۵٪ و ۱-۲ قطره تویین ۸۰ (TWEEN® 80 از شرکت مرک آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور گردیدند. در نهایت، گیاهچه‌ها با آب مقطر استریل در شرایط استریل در زیر هود لامینار آبکشی شدند.

به منظور تهیه محیط کشت تغییر یافته، محیط کشت MS ۱/۲MS حاوی مخلوط ویتامین‌های محیط کشت B5 (ترکیبات موجود در ویتامین‌های محیط کشت B5 در جدول ۲ آمده است)، آهن از منبع EDDHA ((Ethylenediamine Di-2-Hydroxyphenyl)) Duchefa از شرکت Biochemie ساخت کشور هلند) به میزان 96 mg.l^{-1} و گلیسین (Glycinecas number 56-40-6) از شرکت Biochemie Duchefa ساخت کشور هلند) به میزان 2 g.l^{-1} استفاده شد. همچنین، محیط کشت MS پایه به‌عنوان محیط کنترل استفاده شد. پس از تنظیم pH روی ۵/۸ و افزودن $6/8 \text{ g.l}^{-1}$ آگار (از شرکت مرک آلمان)، محیط مورد نظر در ظروف کشت توزیع و در دمای 121°C و فشار ۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس از تهیه قطعات ساقه (به طول ۱-۲ سانتی‌متر) حاوی ۱-۲ جوانه گرده از گیاهچه‌های ضدعفونی شده، تعداد هفت ریزنمونه در هر ظرف کشت شد. همه کشت‌ها به اتاق رشد با دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۱۵۰۰-۲۰۰۰ لوکس و دمای 25°C و رطوبت نسبی ۶۰-۷۰٪ به مدت ۴ هفته منتقل

آهن FeEDDHA استفاده کردند و نتایج نشان داد که استفاده از این نوع آهن از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها به میزان ۵۵/۸٪ جلوگیری کرد و مشکل ریشه‌زایی ریزنمونه‌های انار را کاهش داد. Moradian و Bagheri (۲۰۱۹) در بررسی کاهش زرد شدن برگ در دو گونه رز نشان دادند که استفاده از FeEDDHA در محیط کشت MS میزان سبزینه‌گی برگ‌ها را تا ۶۷/۱۵٪ افزایش داد، همچنین طول شاخه و وزن خشک نیز افزایش یافت.

Noroozlo و همکاران (۲۰۱۹) اثر گلیسین و گلوتامین را روی رشد کاهو بررسی کردند. در این پژوهش گلیسین در سه غلظت (250 mg.l^{-1} ، 500 و 1000) استفاده شد و نتایج این بررسی افزایش محتوای کلروفیل II در برگ گیاهان تیمار شده با گلیسین در هر سه غلظت نسبت به شاهد را نشان داد. همچنین بالاترین میزان وزن تر و خشک سرشاخه در غلظت 500 mg.l^{-1} گلیسین مشاهده شد. Souri و Mohammadipour (۲۰۱۹) در بررسی سطوح مختلف غلظت گلیسین بر رشد تغذیه‌ای گشنیز نشان دادند که از میان چهار غلظت (5 mg.l^{-1} ، 10 ، 20 و 40) بکار رفته در این بررسی، غلظت 10 mg.l^{-1} قطر ساقه، وزن تر و خشک بالاتری را نشان داد. این پژوهش نشان داد که غلظت متعادل گلیسین (10 mg.l^{-1}) می‌تواند در بهبود رشد و ارزش غذایی گشنیز مؤثر باشد.

در این پژوهش بیست جمعیت از ۲۰ منطقه مختلف ایران جمع‌آوری و با هدف بهینه‌سازی مراحل ریزازدیادی و پرآوری بررسی شد. این پژوهش علاوه بر بررسی و معرفی بهترین محیط برای پرآوری این ۲۰ جمعیت ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و هیستولوژی این جمعیت‌ها را نیز بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهان دارویی و متابولیت‌های ثانویه اصفهان انجام شد. بذرها ۲۰ جمعیت از قسمت‌های مختلف ایران با مختصات و

شدند.

پس از شروع رشد شاخساره‌های جدید داده‌برداری شامل تعداد شاخه، طول شاخه، وزن تر و وزن خشک انجام شد. برای فاکتور تعداد شاخه از شمارش تعداد شاخه به‌ازای هر بوته استفاده شد، برای سنجش طول شاخه طول شاخه‌های هر بوته به کمک خط‌کش برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. وزن تر گیاهچه‌ها پس از برداشت به کمک ترازو (با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم) اندازه‌گیری شد. وزن خشک گیاهچه پس از خشک‌شدن گیاهچه‌ها در آون با دمای ۵۰°C به مدت ۲۴ ساعت و با همان ترازویی که وزن تر گرفته شده بود تهیه شد.

به منظور سنجش محتوای هاپرسیین در برگ‌های گیاهچه از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مدل Sykam ساخت کشور آلمان، شامل پمپ S7131 و فلورسنس مدل ۳۲۱۰ استفاده شد. فاز متحرک شامل اتیل استات (۳۹ میلی‌لیتر)، بافر سدیم دی‌هیدروژن فسفات (۴۱ میلی‌لیتر) و متانول (۱۶۰ میلی‌لیتر) بود. برای تهیه بافر فسفات مقدار ۱۵/۶ گرم سدیم دی‌هیدروژن فسفات وزن و در یک لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. سپس pH آن با استفاده از اسید فسفریک یک نرمال بر روی ۲ تنظیم گردید. مقدار ۲۰ میکرولیتر نمونه (عصاره متانولی) به دستگاه تزریق شد و با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه از ستون C18 با قطر ذرات ۵ میکرون و ابعاد ۴/۶ × ۲۰۰ میلی‌متر عبور داده شدند. قرائت هاپرسیین در ۶ دقیقه و در طول موج ۵۹۰ نانومتر انجام شد. سطح زیر پیک هر نمودار با استفاده از نرم‌افزار Chromstar 7.0 محاسبه گردید و

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel ثبت شدند. استاندارد هاپرسیین (CAS number ۵۴۸-۰۴-۹) از شرکت سیگما (Sigma, Aldrich) تهیه گردید.

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعات هیستولوژی، برای تهیه برش‌های پارافینی میکروتومی و رنگ‌آمیزی آنها از روش‌های معمول بافت‌شناختی به روش زیر استفاده شد. انتخاب برگ از جمعیت‌های مختلف به‌صورت مجزا، کنسرو کردن نمونه‌ها در محلول حاوی آب، اتانول و گلیسرین (از شرکت مرک آلمان، CAS number ۵۶-۸۱-۵) برای چند روز، شستشوی ماده تثبیت‌کننده، آبگیری در محلول اتانول و شفاف‌سازی با گزیلول (از شرکت مرک آلمان، CAS number ۱۳۳۰-۲۰-۷)، پارافین‌دهی با پارافین مذاب ۶۰-۶۲ درجه سانتی‌گراد، قالب‌گیری و تهیه بلوک در قالب‌ها، مقطع‌گیری با میکروتوم و قراردادن نوارهای مقطع در محلول گرم آب و گلیسرین و تثبیت نوارهای مقطع بر روی لام‌های شماره‌گذاری شده و خشک کردن لام‌ها، پارافین‌زدایی با گزیلول در چندین مرحله و آبدهی، رنگ‌آمیزی مقاطع روی لام، آبگیری مقاطع و شفاف‌سازی نهایی و تثبیت نمونه‌ها در محیط تثبیت دائمی و چسبانیدن لامل و در نهایت مطالعه و عکس‌برداری از نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری Olympus مدل X21 متصل به دوربین Canon مدل Eos انجام شد.

نتایج این پژوهش به کمک نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۷) به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز و مقایسه میانگین به کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵٪ انجام شد.

جدول ۱- مشخصات محل جمع‌آوری ۲۰ جمعیت ایرانی گل راعی

Table 1. Location characteristics of 20 Iranian *Hypericum perforatum* populations collected from

Number	Sample ID	Province	City	Altitude (m)	Latitude (°-'-")	Longitude (°-'-")
1	17016	Kordestan	Sanandaj	2000	-	-
2	18596	Ardabil	Ardabil	1260	37-22-03	48-19-04
3	21617	Semnan	Semnan	1701	36-02-48	53-25-20
4	21653	Semnan	Semnan	2033	36-04-03	53-35-82
5	22664	Qom	Qom	2220	34-43-44	50-09-14
6	27078	Gilan	Fouman	890	37-05-06	49-05-51
7	27112	Gilan	Masal	1280	37-22-01	48-50-38
8	30825	Khorasan	Esfarayen	1440	37-19-28	57-06-85
9	32811	Zanjan	Zanjan	2350	36-41-43	48-44-17
10	35001	Tehran	Karaj	2127	36-13-05	50-46-06
11	35614	Mazandaran	Ghamestan	2470	36-15-54	52-11-55
12	35641	Mazandaran	Gelogah	1875	36-35-10	53-59-51
13	35871	Hamedan	Maryanej	-	38-48-07	48-23-31
14	36726	East Azarbayjan	Arasbaran	1360	38-58-38	46-42-25
15	37655	Golestan	Ramiyan	580	36-55-13	55-07-45
16	42337	Golestan	Ali Abad katoul	1850	-	-
17	42890	North Khorasn	Bojnord	730	37-39-56	57-14-20
18	43848	North Khorasn	Shirvan	1405	37-12-23	57-54-03
19	44190	Qazvin	Qazvin	1520	36-28-46	50-24-86
20	44543	Ardabil	Meshgin Shahr	1889	38-28-67	47-23-66

جدول ۲- ویتامین‌های موجود در محیط کشت B5

Table 2. Vitamins added to B5 culture medium

Manufacturer of the compound used	Amount per liter of medium (mg. l ⁻¹)	Vitamin
CAS number 87-89-8 Duchefa Biochemie Made in the Netherlands	100	Myo-Inositol
CAS number 59-67-6 Duchefa Biochemie Made in the Netherlands	1	Nicotinic acid
CAS number 58-56-0 Duchefa Biochemie Made in the Netherlands	1	Pyridoxine HCL
CAS number 67-03-8 Duchefa Biochemie Made in the Netherlands	10	Thiamine HCL

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد بین دو محیط کشت مورد آزمایش، محیط کشت ۱/۲MS تغییر یافته در ریزازدیادی گل راعی در سطح احتمال ۵٪ اثر معنی داری دارد (جدول ۳). تجزیه واریانس نشان داد که بین جمعیت‌ها و بین دو محیط کشت از نظر فاکتور تعداد شاخه، طول شاخه و وزن تر، وزن خشک و محتوای هایپرسین در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی دار وجود دارد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش جمعیت و

محیط کشت بر ریزازدیادی نشان داد که محیط کشت تغییر یافته در ریزنمونه گره در تمامی جمعیت‌ها بیشترین نقش را در ریزازدیادی شاخساره داشته، به طوری که بالاترین طول شاخه در جمعیت ۱۷ (خراسان شمالی) روی محیط کشت تغییر یافته به میزان ۲/۵ سانتی‌متر ثبت شده است (شکل ۲-b) و به همین ترتیب جمعیت ۱۵ (گلستان ۱) و ۲۰ (مشکین‌شهر) روی محیط کشت تغییر یافته دارای طول شاخه ۱/۶۷ سانتی‌متر بودند.

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر نوع جمعیت و محیط کشت بر فاکتورهای مورفوفیزیولوژیک و محتوای هایپرسین گل راعی

Table 3. ANOVA of population type and culture medium on morphophysiological factors and hypericin content in *Hypericum perforatum*

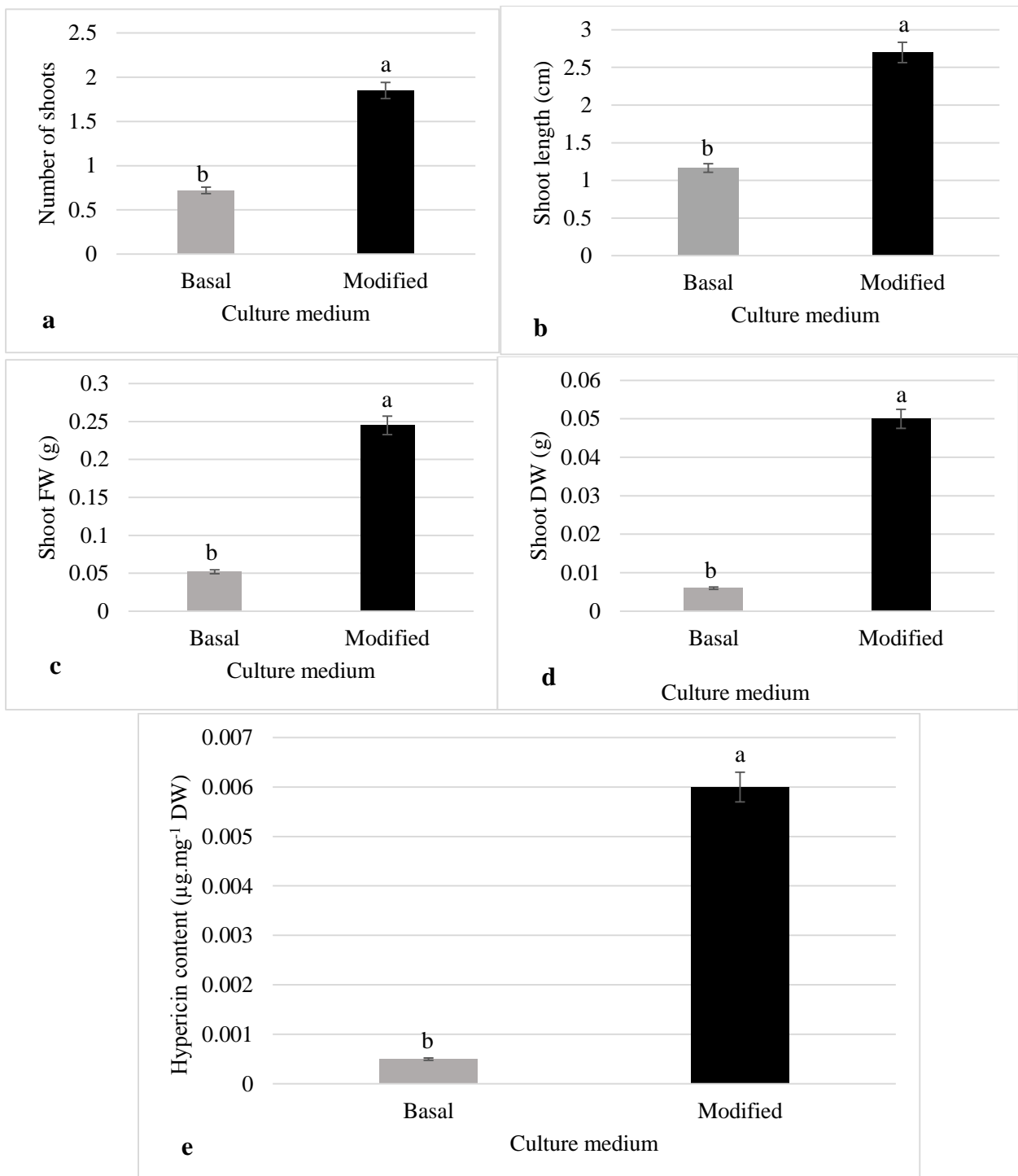
S.O.V.	d.f.	Number of shoots	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Hypericin content ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ DW}$)
Medium	1	38.53*	70.07*	0.86*	0.01*	0.001*
Population	19	1.58*	3.26*	0.03*	0*	0*
Population \times Medium	39	2.02*	4.59*	0.04*	0.001*	0*
Experimental error	99	0.46	1.06	0.01	0	0
C.V. (%)		0.76	0.74	0.97	1.28	0.85

*: significant at 5% probability level

وزن تر و خشک در محیط تغییر یافته رخ داده است. جمعیت ۱۷ (خراسان شمالی) بهترین نتیجه را نشان داد (جدول ۴). از سوی دیگر، همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است محیط کشت تغییر یافته توانسته است از نکرزگی برگ‌ها جلوگیری کند.

مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت بر فاکتورهای فیزیولوژیک در شکل ۲ نشان می‌دهد که محیط کشت تغییر یافته از نظر آماری اختلاف معنی داری با محیط کشت MS پایه داشته است (شکل ۲).

مقایسه میانگین اثر جمعیت بر پارامترهای فیزیولوژیک ریزازدیادی نشان داده که بهترین تعداد شاخه، طول شاخه،



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت بر (a) تعداد شاخه، (b) طول شاخه، (c) وزن تر شاخساره، (d) وزن خشک شاخساره و (e) محتوای هایپرسین گل راعی

Figure 2. Means comparison of culture medium effects on (a) number of shoots, (b) shoot length, (c) Shoot fresh weight, (d) Shoot dry weight, and (e) hypericin content in *Hypericum perforatum*
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر نوع جمعیت بر تعداد شاخه، طول شاخه، وزن تر شاخساره، وزن خشک شاخساره و محتوی هایپرسین گل راعی

Table 4. Means comparison of population type effects on number of shoots, length, fresh, and dry weight of shoots, and hypericin content in *Hypericum perforatum*

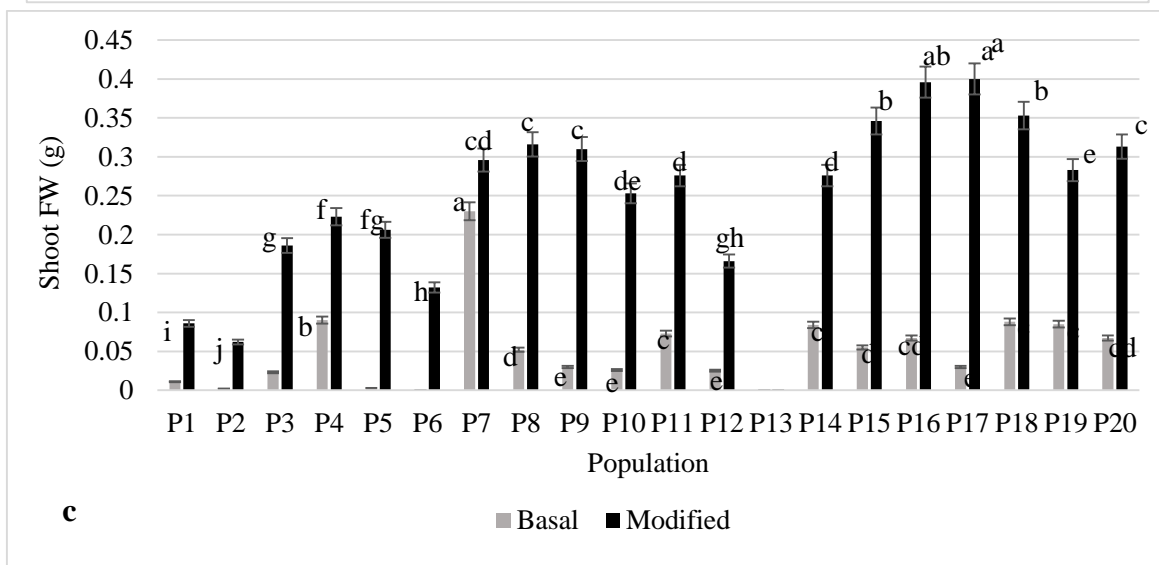
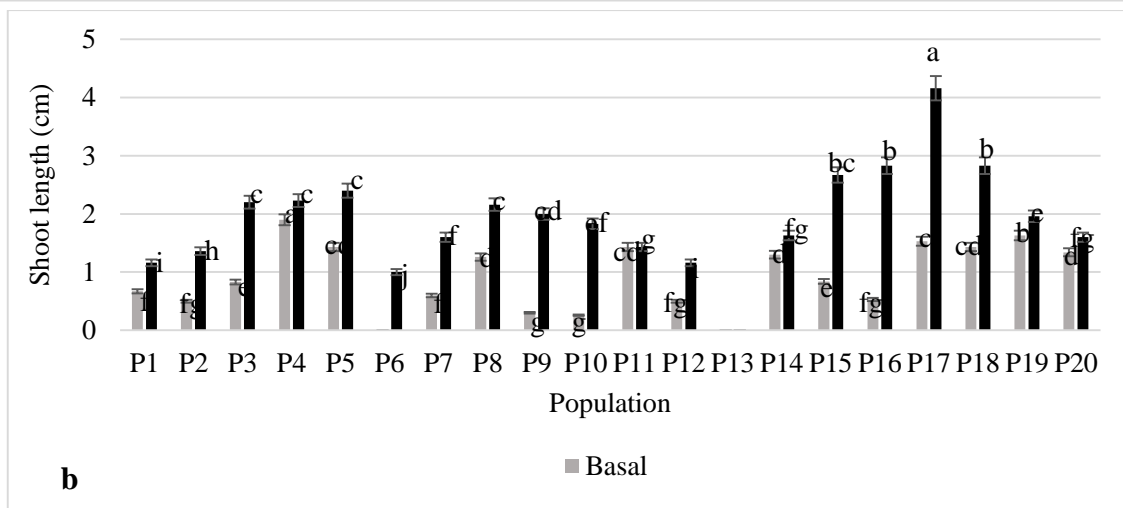
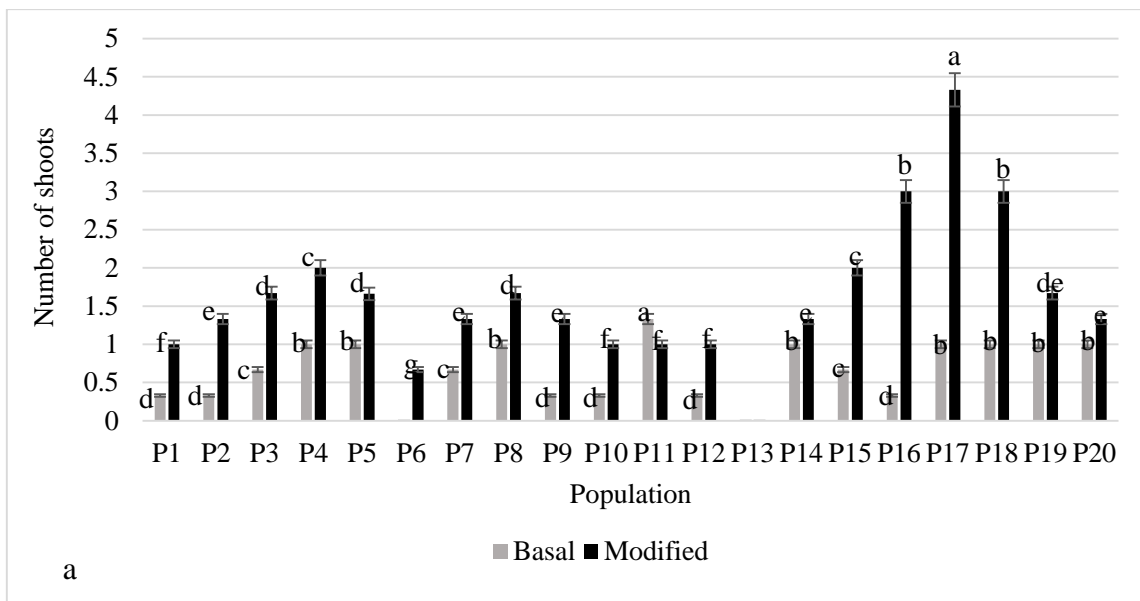
Population	Number of shoots	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Hypericin content ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ DW)
1	1.17 ^{bc}	1.5 ^{abcde}	0.059 ^{defg}	0.01 ^{bc}	0 ^b
2	0.67 ^{cd}	1.17 ^{def}	0.047 ^{fg}	0.01 ^{bc}	0 ^b
3	1.33 ^{bc}	1.4 ^{cde}	0.1 ^{bcdefg}	0.01 ^{bc}	0 ^b
4	1.33 ^{bc}	1.5 ^{abcde}	0.156 ^{abcd}	0.01 ^{bc}	0 ^b
5	1.67 ^{ab}	2.88 ^{ab}	0.14 ^{abcdefg}	0.01 ^{bc}	0 ^b
6	0.67 ^{cd}	0.83 ^{ef}	0.066 ^{cdefg}	0.003 ^{bc}	0 ^b
7	1.17 ^{bc}	2.63 ^{abc}	0.26 ^{ab}	0.01 ^{bc}	0 ^b
8	1.5 ^{bc}	2.5 ^{abcde}	0.184 ^{abcde}	0.01 ^{bc}	0 ^b
9	1.17 ^{bc}	1.87 ^{abcde}	0.17 ^{abcde}	0.01 ^{bc}	0 ^b
10	1.67 ^{ab}	2.13 ^{abcde}	0.22 ^{abcde}	0.01 ^{bc}	0 ^b
11	1.67 ^{ab}	2.15 ^{abcde}	0.175 ^{abcde}	0.02 ^{bc}	0 ^b
12	0.83 ^{cd}	1.17 ^{def}	0.096 ^{cdefg}	0.008 ^{bc}	0 ^b
13	0 ^d	0 ^f	0 ^g	0 ^c	0 ^b
14	1.17 ^{bc}	2.47 ^{abcd}	0.178 ^{abcde}	0.01 ^{abc}	0 ^b
15	1.67 ^{ab}	2.5 ^{abcd}	0.2 ^{abcde}	0.02 ^{abc}	0 ^b
16	1.5 ^{bc}	2.38 ^{abcd}	0.23 ^{abc}	0.02 ^{abc}	0 ^b
17	2.5 ^a	2.88 ^{ab}	0.291 ^a	0.36 ^a	0.03 ^a
18	1.17 ^{bc}	2.15 ^{abcde}	0.22 ^{abcde}	0.02 ^{ab}	0 ^b
19	1.17 ^{bc}	1.47 ^{abcde}	0.184 ^{abcde}	0.01 ^{abc}	0 ^b
20	1.67 ^{ab}	2.22 ^{abcde}	0.19 ^{abcde}	0.02 ^{abc}	0 ^b

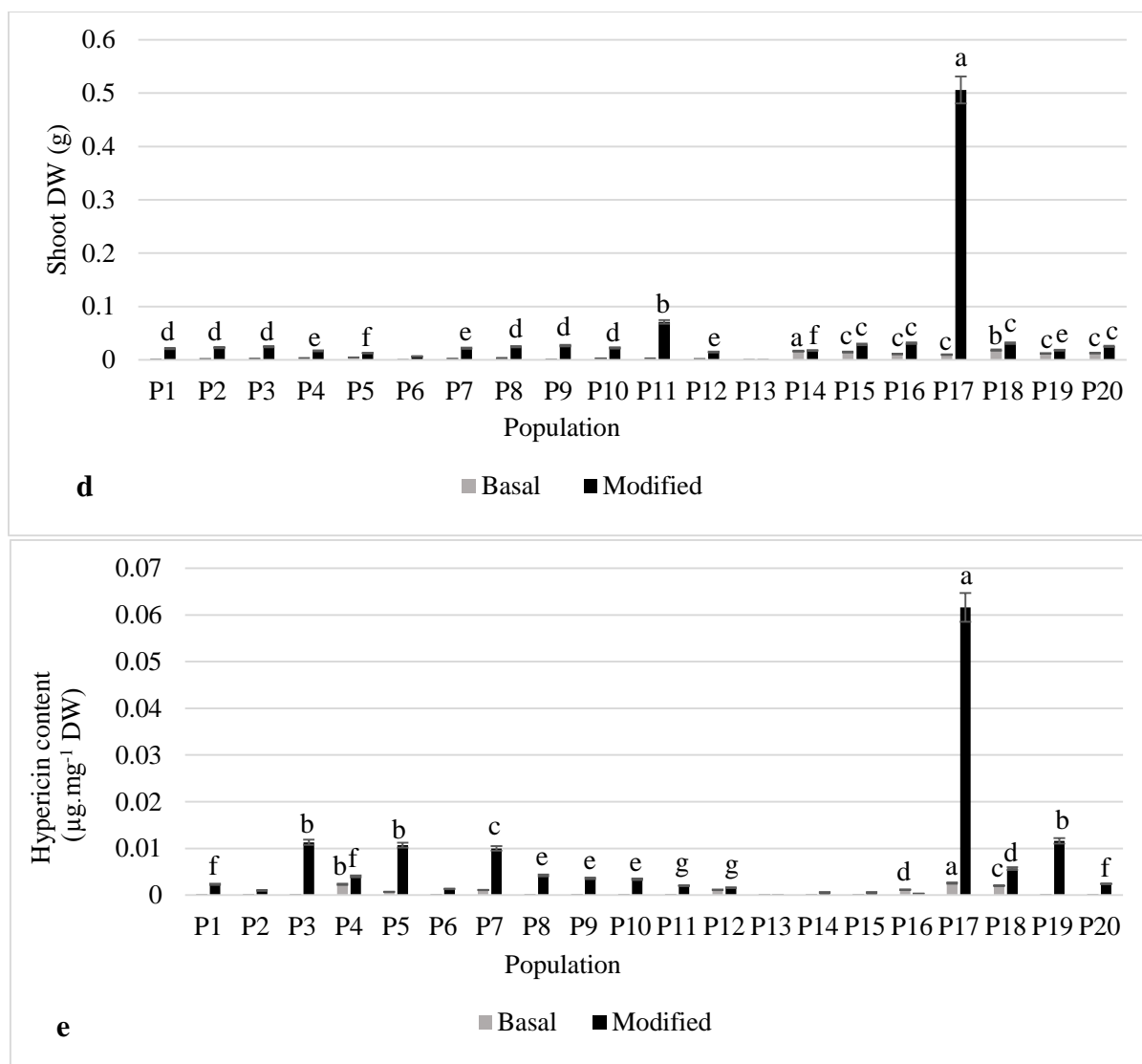
In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

(خراسان شمالی) روی محیط کشت تغییر یافته با اختلاف معنی داری محتوای هایپرسین بالاتری را نشان داده است (شکل ۳).

مقطع عرضی برگ گل راعی رشد کرده در دو نوع محیط کشت در شکل ۵ نشان داده شده است. برگ رشد کرده در محیط کشت MS تغییر یافته دارای غده‌های بزرگ‌تر نیز هستند. این اختلاف در اندازه گلندهای تیره سبب افزایش محتوای هایپرسین در گیاهان رشد کرده روی محیط کشت تغییر یافته شده است (شکل ۵).

تجزیه واریانس اثر متقابل محیط کشت و جمعیت در سطح ۰/۰۵٪ معنی دار بود (جدول ۳). از سوی دیگر، مقایسه میانگین برهم‌کنش جمعیت و محیط کشت بر پارامترهای فیزیولوژیک ریزازدیادی نشان داده که بهترین تعداد شاخه، طول شاخه، وزن تر و خشک در محیط تغییر یافته رخ داده است. جمعیت ۱۷ (خراسان شمالی) و بین دو محیط کشت مطالعه شده محیط تغییر یافته بهترین نتیجه را نشان داد (شکل ۳). همچنین مقایسه میانگین برهم‌کنش جمعیت و محیط کشت نشان داد که جمعیت ۱۷





شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر متقابل نوع جمعیت و محیط کشت بر (a) تعداد شاخه، (b) طول شاخه، (c) وزن تر شاخساره، (d) وزن خشک شاخساره و (e) محتوای هایپرسین در گل راعی

Figure 3. Means comparison of population type × culture medium effects on (a) number of shoots, (b) shoot length, (c) shoot fresh weight, (d) shoot dry weight, and (e) hypericin content in *Hypericum perforatum*. Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

بحث

کند. گلايسين يکي از معمول ترين ترکيب های آلي سازگار است که در میکروارگانيسم های مختلف گیاهان عالی و حیوانات می تواند وجود داشته باشد و نقش عمده ای در تعديل تنش های اسمزی ناشی از کم آبی یا شوری در گیاهان ایفاء می کند (Hosseinian et al., 2019). پژوهش های متعددی مشخص کرده که غلظت های کامل و بالای نمک های معدنی در محیط کشت MS

نتایج نشان می دهد در بیشتر جمعیت ها با تغییر ترکيب های محیط کشت طول و تعداد شاخساره افزایش یافته است. به نظر می رسد کاهش میزان نمک های معدنی محیط کشت، بر روابط اسمزی گیاه برای جذب آب و مواد مغذی و به همراه افزایش غلظت گلايسين برای حفظ بازدهی فتوسنتز توانسته روند ریزازدیادی بهتری را ایجاد

است. به‌طور مشابه در تحقیق Bagheri و Moradian (۲۰۱۹) نتایج نشان داد که استفاده ترکیبی از FeSO_4 و Fe-EDDHA توانسته بیشترین درصد سبزیگی برگ‌ها، طول شاخه و وزن خشک را تولید نماید. Latawa و همکاران (۲۰۱۶) اثر دو نوع آهن کلات را بر تکثیر و رشد شاخه در نوعی هیبرید گردو بررسی کردند و نتایج نشان داد که استفاده از غلظت مناسب آهن EDDHA به‌طور معنی‌داری تعداد و طول شاخه و سطح برگ و محتوای کلروفیل II را افزایش داده است. Karimi و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی اثر آهن EDDHA و نانوذرات آهن گزارش کردند که رشد و محتوای کلروفیل II در تیمارهای هر دو ترکیب مورد استفاده مناسب بوده است.

استفاده از اسیدهای آمینه مانند گلیسین می‌تواند اثرهای مفیدی بر عملکرد و کیفیت محصولات برگی داشته باشد. این ماده با عناصر غذایی برای تولید کلات‌ها ترکیب می‌شود تا جذب و انتقال مواد مغذی در گیاهان تسهیل شود. نتایج Noroozlo و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی اثر گلیسین و گلوتامین بر رشد کاهو نشان داد که افزایش غلظت گلیسین ($1000-250 \text{ mg.l}^{-1}$) سبب افزایش محتوای کلروفیل II شد و همچنین در غلظت 500 mg.l^{-1} گلیسین افزایش وزن تر و خشک شاخساره مشاهده شد. در این تحقیق نیز محیط کشت تغییر یافته که در آن از محتوای گلیسین بیشتری استفاده شده است و نسبت به محیط کشت $1/2 \text{MS}$ نیز افزایش وزن تر و شاخساره نشان داد. به‌طور مشابه Mohammadipour و Souri (۲۰۱۹)، در مطالعه روی غلظت‌های مختلف گلیسین روی رشد، ترکیب مواد مغذی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گشنیز نشان دادند که افزایش غلظت گلیسین (10 mg.l^{-1}) روی افزایش سبزیگی برگ، قطر ساقه و وزن تر و خشک گیاه تأثیر معنی‌دار نشان داده است.

تحقیقات متنوعی در زمینه جمعیت‌های گل راعی و تأثیر جمعیت (ژنوتیپ) و اختلاف آنها از نظر

ریزازدیادی را افزایش نمی‌دهد، از این موارد می‌توان به تحقیق Parsamanesh و همکاران (۲۰۱۸) اشاره کرد. در این تحقیق آنان نشان دادند که بهترین محیط کشت پرآوری گل راعی در ریزنمونه گره محیط کشت $2/3 \text{MS}$ بوده است. افزایش غلظت نمک‌های محیط کشت موجب افزایش ظرفیت اسمزی محیط کشت شده، در نتیجه موجب کاهش سرعت جذب آب، مواد غذایی و محرک رشد و متعاقباً سبب کاهش ریزازدیادی شده است. نتایج این پژوهش با گزارش Ghazian و همکاران (۲۰۰۶) مبنی بر اینکه بیشترین تعداد و طول شاخه در جمعیت بومی اردبیل گل راعی در محیط MS کامل بدست آمده، تفاوت دارد که می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع جمعیت گیاهی و پاسخ آنها در واکنش به غلظت محیط کشت ریزازدیادی باشد. نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش جمعیت و محیط کشت بر ریزازدیادی نشان داد که بالاترین میزان طول شاخه در جمعیت ۱۷ (خراسان شمالی) و در محیط کشت تغییر یافته به میزان $4/16$ سانتی‌متر است. همچنین جمعیت ۱۷ (خراسان شمالی) به میزان $0/4$ گرم وزن تر نشان داده است که به‌طور معنی‌داری بالاتر از دیگر جمعیت‌ها و محیط کشت MS پایه بوده است (شکل ۲).

کمبود آهن حجم ریشه را محدود کرده و رشد طوقه کم شده و اندازه گیاه کاهش یافته و به‌تبع آن اندازه برگ‌ها به شدت کوچک شده است، در نتیجه کاهش اندازه برگ‌ها میزان محتوای هاپیرسین و هاپیرفورین را کاهش داده است. میزان نکروزگی و قهوه‌ای شدن در ریزنمونه می‌تواند ریزازدیادی این گیاه را با مشکل مواجه کند. در این مطالعه از آهن EDDHA استفاده شده است که ترکیب آهن EDDHA در محیط کشت تغییر یافته قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها را نسبت به محیط کشت MS پایه کاهش داده است (شکل ۴). اضافه کردن کلات آهن EDDHA به محیط کشت در مطالعه Eshaghi Sanayi و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان داد که این ترکیب در ریشه‌زایی و جلوگیری از قهوه‌ای شدن گیاه انار مفید بوده

هستند که این موضوع میزان بالای هایپر سین در این جمعیت روی محیط کشت تغییر یافته را توجیه می‌کند. Cirak و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی که بر روی ترکیب‌های شیمیایی و چهار صفت مورفولوژیکی (تعداد غدد تیره برگ، سطح برگ، نسبت طول به عرض برگ و ارتفاع گیاه) جمعیت‌های گیاه گل راعی در ترکیه انجام دادند، اختلاف معنی‌داری را از نظر این صفات در بین جمعیت‌های مختلف گزارش کردند، همچنین در این مطالعه هایپر سین به‌عنوان اصلی‌ترین ترکیب شیمیایی عصاره با تعداد غدد تیره برگ همبستگی مثبت معنی‌دار نشان داد (Cirak et al., 2007). در بررسی دیگری که Maggia و همکاران (۲۰۰۴) در بخش مرکزی ایتالیا انجام دادند، مشخص شد که ویژگی‌های مورفولوژیکی، هیستولوژیکی و فیتوشیمیایی جنس *Hypericum* اختلاف معنی‌داری از نظر اندازه و شکل برگ‌ها و گل‌ها و اندازه و توزیع ساختارهای ثانویه در قسمت‌های مختلف با یکدیگر داشتند. Bergonzi و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که در جمعیت‌های مختلف گل راعی ترکیبات شیمیایی موجود در برگ‌ها کاملاً متفاوت است. آنان بیان کردند این تفاوت به علت اختلاف ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه است و عواملی مانند شرایط محیطی و مرحله نموی نیز می‌تواند این ترکیب‌های مؤثره را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین محققان دیگری گزارش کردند که کاربرد منابع مختلف ریزنمونه از هر ژنوتیپ در پاسخ به محیط کشت اثر متفاوتی دارد (Franklin & Dias, 2006; Zobayed et al., 2006). Riazی و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که از نظر ویژگی‌های فیزیولوژیک در بین ۲۵ جمعیت گل راعی جمع‌آوری شده از بخش‌های مختلف ایران تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد، این نتیجه یافته‌های این تحقیق را نیز تأیید می‌کند. به‌طور مشابه Ebadi و همکاران (۲۰۱۱) نیز تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بین جمعیت‌های مختلف گل راعی را از نظر خصوصیات آگرومورفولوژیکی و بیوشیمیایی گزارش کردند.

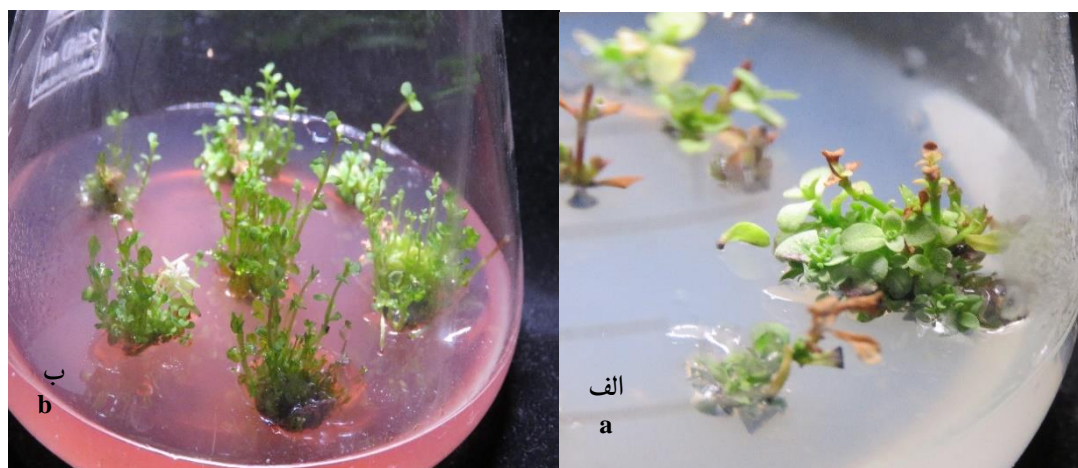
مورفولوژیکی و ترکیبات شیمیایی انجام شده است که در ذیل به برخی از آنها اشاره می‌شود.

نتایج تحقیقی در لیتوانی نشان داده که تنوع مورفولوژیکی و شیمیایی در جمعیت‌های وحشی *H. perforatum* وجود دارد و جمعیت‌های وحشی برای پروژه‌های اصلاحی و توسعه واریته‌های زراعی مناسب هستند. این جمعیت‌ها از نظر ارتفاع گیاهان، طول کاسبرگ، وزن ماده خام، عرض گل‌آذین، مشخصات برگ‌ها و تراکم غدد تیره متفاوت است. همچنین این بررسی نشان داده که طول برگ، فاکتور اصلی تأثیرگذارنده روی غلظت فلاونوئید در گونه *H. perforatum* مورد مطالعه بوده است (Radusiene & Bagdonaite, 2002). در تحقیقی بر روی جمعیت‌های مختلف گیاه گل راعی در شرایط مزرعه‌ای در کرج مشخص شد اثر جمعیت (ژنتیک) بر عملکرد وزن تر و ماده خشک از نظر آماری معنی‌دار بوده ولی روی میزان هایپر سین تأثیری نداشته است. از سویی مشاهده شد که میزان هایپر سین تحت تأثیر سال (شرایط محیطی) قرار گرفته است، به عبارت دیگر، عملکرد کمی تحت تأثیر ژنتیک (جمعیت) و عملکرد کیفی تحت تأثیر شرایط محیطی (سال) بوده است (Riazی et al., 2011). نوع جمعیت روی میزان همه ترکیبات به‌استثناء هایپرفورین تأثیر دارد و فاکتور کلیدی برای کشت موفق و اقتصادی این گیاه است. همچنین ژنتیک و محیط بر پارامترهای طول گل و طول گیاه تأثیر داشته و اثر متقابل جمعیت و محیط نیز بسیار معنی‌دار بوده است (Riazی et al., 2011).

با توجه به تأثیر شرایط محیطی بر رشد و میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاه گل راعی (Zobayed et al., 2006)، از برگ‌های جمعیت ۱۷ که روی هر یک از دو محیط کشت رشد کرده‌اند مقطع عرضی تهیه شده است (شکل ۵). از مقایسه این دو مقطع تهیه شده مشخص شد که برگ‌های گیاهچه‌های رشد کرده روی محیط کشت تغییر یافته دارای گلندهای بیشتر، بزرگتر و متراکم‌تری

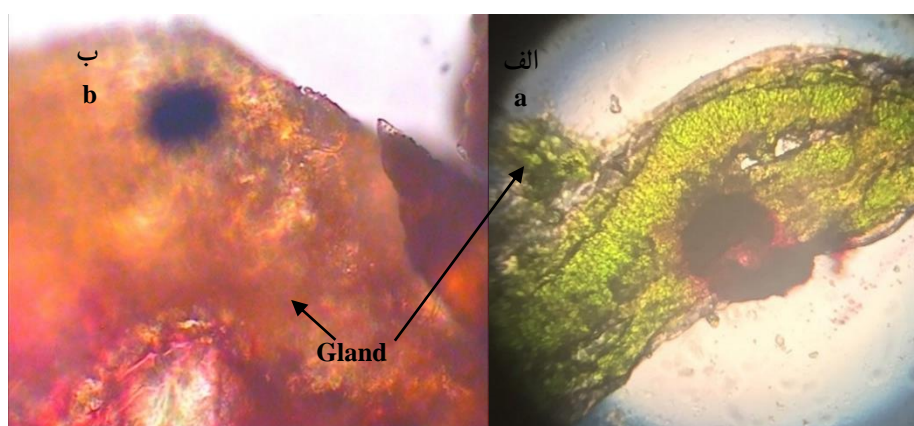
شده است. مطالعات متعددی در تأیید این موضوع منتشر شده است که نشان می‌دهد شرایط محیط کشت در این گیاه روی غلظت هایپرسیین مؤثر است (Zobayed *et al.*, 2007؛ Zou *et al.*, 2004).

هر پارامتری که سبب افزایش سطح برگ، افزایش و تعداد غده تیره در گیاه گل راعی شود محتوای هایپرسیین را در این گیاه بالا می‌برد. از آنجا که محیط کشت تغییر یافته سبب افزایش سطح برگ و وزن خشک گیاه شده است، در نتیجه سبب افزایش محتوای هایپرسیین نیز



شکل ۴- الف) علائم نکروزگی در گیاهچه گل راعی رشد یافته در محیط MS پایه و ب) عدم مشاهده نکروزگی در گیاهچه رشد یافته در محیط MS تغییر یافته

Figure 4. a) Signs of necrosis in *Hypericum perforatum* seedlings grown in MS basal medium and b) no necrosis observed in seedlings grown in MS modified medium



شکل ۵- الف) مقطع عرضی برگ و غده تیره در برگ گل راعی رشد کرده در محیط MS پایه و ب) مقطع عرضی برگ و غده تیره در برگ رشد کرده در محیط MS تغییر یافته

Figure 5. a) Cross section of a leaf together with its dark gland in *Hypericum perforatum* leaf grown in MS basal medium and b) cross section of a leaf together with its dark gland grown in MS modified medium

- Franklin, G. and Dias, A.C.P., 2006. Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42, 324-330.
- Ebadi, A., Morshedloo, M.R., Fatahi, M.M. and Yazdani, D., 2011. Evaluation of some population of *Hypericum perforatum* L. using agro-morphological traits and most components of essential oil. *Plant Products Technology*, 11: 1-14.
- Eshaghi Sanayi, T., Zare Mehrjerdi, M. and Sharifi, A., 2020. Effect of Medium, Iron-Chelating Agent and Plant Growth Regulator on Micropropagation of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Journal of Plant Productions*, 43(2): 309-322.
- Farsad Akhtar, N., Aharizad, S., Mohammadi, S.A., Motallebi-Azar, A., Movafeghi, A. and Khojasteh, S.M.B., 2013. In vitro shoot regeneration and hypericin production in four *Hypericum perforatum* L. genotypes. *International Journal of Agriculture*, 3(4): 887-893.
- Ghazian Tafrihi, 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.
- Goel, M.K., Kukreja, A.K. and Bisht, N.S., 2009. In vitro manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Plant cell, tissue and organ culture*, 96: 1-9.
- Hosseinian, S.H., Akbari, N., Eisvand, H.R., Akbarpour, O. and Saeedinia, M., 2018. Effect of drought stress and glycine betaine as foliar application on photosynthesis parameters of chickpea. *Water and Irrigation Management*, 8(2): 227-236.
- Karimi, S., Tavallali, V., Ferguson, L. and Mirzaei, S., 2020. Developing a nano-Fe complex to supply iron and improve salinity tolerance of pistachio under calcium bicarbonate stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 51(14): 1835-1851.
- Karppinen, K., 2010. Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort)-precursors and genes involved. Ph.D. thesis, Department of Biology. University of Oulu, Finland.
- Kirakosyan, A., Sirvent, T.M., Gibson, D.M. and Kaufman, P.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.
- Latawa, J., Shukla, M. R. and Saxena, P. K., 2016. An

به نظر می‌رسد هر یک از عوامل متغیر، تأثیر مستقیمی بر ریزازدیادی گل را می‌دارند و شرایط و روش ریزازدیادی نیز می‌تواند در تنوع پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و هیستولوژیک نقش مؤثر داشته باشد. از آنجایی که هایپرسیسین و هایپرفورین از جمله ترکیب‌های معروف هستند و جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارند، در این تحقیق، عمده محتوای هایپرسیسین در جمعیت‌های ۱۷ (خراسان شمالی) به میزان ۳٪ وزن خشک گیاه یافت شد، بنابراین از میان این جمعیت‌ها تیپ مهم از نظر بیوشیمیایی را شناسایی کرده و در برنامه‌های اصلاحی از آنها استفاده می‌نماییم. این پژوهش نشان داد که استفاده از محیط کشت تغییر یافته روشی مطمئن برای تولید گیاهان یکنواخت با محتوای مناسب هایپرسیسین است.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاران بخش کشت بافت پژوهشکده متابولیت‌های ثانویه گیاهان زراعی و باغی و پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، که امکان انجام این پژوهش را فراهم کردند، کمال تشکر را دارند.

References

- Abdollahpoor, M., Kalantari, S., Azizi, M. and Saadat, Y.A., 2017. In vitro shoot Proliferation of *Hypericum perforatum* L. through Indirect and direct plant regeneration. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 1: 81-89.
- Bergonzi, M., Bilia, A.R., Gallori, S., Guerrini, D. and Vincieri, F.F., 2001. Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27: 491-497.
- Bertoli, A., Giovannini, A., Ruffoni, B., Guardo, A.D., Spinelli, G., Mazzetti, M. and Pistelli, L., 2008. Bioactive constituent production in St. John's Wort in vitro hairy roots. Regenerated plant lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13): 5078-5082.
- Cirak, C., Radusiene, J., Karabuk, B. and Janulis, V., 2007. Variation of bioactive compounds in *Hypericum perforatum* growing in Turkey during its phenological cycle. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 615-620.

- Stimulation effects of foliar applied glycine and glutamine amino acids on lettuce growth. *Open Agriculture*, 4(1): 164-172.
- Parsamanesh, Z., Hedayat, M. and Bayat, F., 2018. Effects of Different Media Factors on In Vitro Proliferation of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Journal of Crop Breeding*, 10(27): 75-83.
 - Radusiene, J. and Bagdonaite, E., 2002. Phenotypic variation in *Hypericum perforatum* L. and *H. maculatum* Crantz wild populations in Lithuania. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 9(4): 345-351.
 - Ramezani, Z. and Zamani, M., 2017. A simple method for extraction and purification of hypericins from St John's wort. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12(1): e13864.
 - Sood, H., Shitiz, K. and Sharma, N., 2015. Rapid method for in vitro multiplication of hypericin rich shoots of *Hypericum perforatum*. *Journal of Plant Science*, 3(5): 279-284.
 - Zobayed, S.M.A., Afreen, F., Goto, E. and Kozai, T., 2006. Plant-environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany*, 98(4):793-804.
 - Zobayed, S.M.A., Afreen, F. and Kozai, T., 2007. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2): 109-116.
 - Zou, Y., Lu, Y. and Wei, D., 2004. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16): 5032-5039.
 - efficient temporary immersion system for micropropagation of hybrid hazelnut. *Botany*, 94: 1-8.
 - Maggia, F., Ferretti, G., Poceschi, N., Menghini, L. and Ricciutelli, M., 2004. Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus *Hypericum* of the Central Italy. *Fitoterapia*, 75(7-8): 702-711.
 - Mir, M.Y., Kamili, A.N., Hassan, Q.P., Rafi, S., Parray, J.A. and Jan, S., 2019. In vitro regeneration and free radical scavenging assay of *Hypericum perforatum* L. *National academy science letters*, 42: 161-167.
 - Mohammadipour, N. and Souri, M.K., 2019. Effects of different levels of glycine in the nutrient solution on the growth, nutrient composition, and antioxidant activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Acta Agrobotanica*, 72(1): 1759.
 - Moradian, M. and Bagheri, A., 2019. Effect of media composition and plant growth regulators on in vitro regeneration of *Rosa canina* and *Rosa beggeriana*. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 32(1): 218-230.
 - Morshedloo, M.R., Nabizadeh, M., Akramian, M. and Yazdani, D., 2017. Characterization of the volatile oil compositions from *Hypericum perforatum* L. shoot cultures in different basal media. *Azarian Journal of Agriculture*, 4(1): 7-11.
 - Riazi, A., Majnoun Hosseini, N., Naghdi Badi, H., Naghavi, M., Rezazadeh, S. and Ajani, Y., 2011. The Study of Morphological Characteristics of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) Populations in Iran's Natural Habitats. *Journal of Medicinal Plants*, 10(39): 49-64.
 - Noroozlo, Y.A., Souri, M.K. and Delshad, M., 2019.