Nova Biologica Reperta 6(2): 176-183 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۲، صفحات ۱۷۶ الی ۱۸۳ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

بررسی کالوس‌زایی گیاه خرفه تحت‌تاثیر غلظت‌های مختلف هورمونی و انواع ریزنمونه

فرشته حیدرقلی نژاد[۱]، حسین مرادی[۲]، مهناز کریمی[۲] و وحید اکبرپور[۲]

[۱]گروه بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران؛ [۲]گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

مسئول مکاتبات: حسین مرادی، h.moradi@sanru.ac.ir

چکیده. گیاه دارویی خرفه (*Portulaca oleracea* L.) حاوی مواد موثره ارزشمندی نظیر دوپامین، نورآدرینالین و امگا-۳ است. این گیاه در صنایع مختلف دارویی، غذایی و بهداشتی و در درمان بیماری‌های مختلفی نظیر دیابت، ناراحتی‌های قلبی، تسکین دردها کاربرد دارد. کالوس‌های تهیه شده از گیاهان دارویی مختلف را می‌توان به منظور افزایش مواد موثره در کشت سوسپانسیون سلولی و انتقال ژن مورد استفاده قرار داد. هدف از انجام این آزمایش بررسی اثرمتقابل غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و 2,4-D (۰، ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بر دو ریزنمونه برگی و مریستم انتهایی برای تولید کالوس بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرمتقابل هورمون‌ها و نوع ریزنمونه بر صفاتی مانند درصد القا کالوس، وزن تر و قطر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. بهترین کالوس‌دهی در ریزنمونه برگ با درصد القا کالوس ۱۰۰ درصد، وزن تر ۱۲۱ میلی‌گرم و قطر کالوس ۵/۱۰۶ میلی‌متر در ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد. ریزنمونه مریستم با ۷۵ درصد کالوس، ۱۰۶ میلی‌گرم وزن تر و ۳/۰۳ میلی‌متر قطر کالوس در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در رده بعدی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی. بنزیل آمینو پورین، پَرپَهَن، توفوردی، کشت بافت، گیاه دارویی

Callus induction in *Portulaca oleracea* L. by different hormone concentrations and explant types

Fereshteh Heidargholinezhad[1], Hossein Moradi[2], Mahnaz Karimi[2] & Vahid Akbarpour[2]

[1]Department of Biotechnology and Molecular Genetics in Horticultural Products, Sari Agricultural Sciences Natural Resources University, Sari, Iran; [2]Department of Horticulture, Sari Agricultural Sciences Natural Resources University, Sari, Iran

Correspondent author: Hossein Moradi, h.moradi@sanru.ac.ir

Abstract. Purslane (*Portulaca oleracea* L.) contains valuable secondary metabolites such as Dopamin, Noradrenaline and Omega-3. This plant is used in various medicinal, food and hygienic industries as well as the treatment of different diseases such as diabetes, heart disease and pain relief. Callus induced from medicinal plants are used to increase the production of secondary metabolities in cell suspension culture and gene transfer. The purpose of this experiment was the study of different concentrations of BAP and 2,4-D of two explants from leaf and shoot tips to produce callus. Leaf and shoot tip explants were used in MS with different concentrations of BAP at three levels (0, 1 and 2 mg/L) with 2,4-D at three levels (0, 0.5 and 1.5 mg/L). Results showed that interactions between hormones and explants were significant in the percentage of callus induction, fresh weight and callus diameter at 1% level. The best result which was the leaf explant with 100% callus induction, 121 mg fresh weight and 5.106 mm callus diameter was obtained by the combination of BAP 2 mg/L and 2,4-D 0.5 mg/L. Shoot tip explants with 75% callus induction, 106 mg fresh weight and 3.03 mm diameter was obtained by the application of 1 mg/L BAP and 0.5 mg/L 2,4-D.

Keywords. BAP, medicinal plant, purslane, tissue culture, 2,4-D

Received 29.09.2017/ Revised 24.09.2018/ Accepted 24.04.2018/ Published 01.08.2019

دریافت ۱۳۹۶/۰۷/۰۷/ اصلاح ۱۳۹۶/۱۲/۰۲/ پذیرش ۱۳۹۷/۰۲/۰۴/انتشار ۱۳۹۸/۰۵/۱۰

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.8.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.176]

مقدمه

گیاه دارویی خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L. متعلق به تیرهٔ خرفه‌ایان (Portulacaceae) است که در مناطق گرم و مرطوب در نیمکره شمالی پراکنش داشته و نقش‌های دارویی مختلفی دارد. نورآدرینالین و دوپامین مهم‌ترین ترکیبات موجود در گیاه فوق بوده و به عنوان یک تنظیم‌کننده سیستم ایمنی برای درمان اضطراب و ترس ایفای نقش می‌کنند (Chen *et al*., 2003). از جمله نقش‌های درمانی این گیاه استفاده در درمان بیماری‌های گوارشی، بیماری‌های قلبی، تسکین درد، کاهش‌دهنده قند خون است (Dighe *et al*., 2008). ترکیبات آلی موجود در گیاهان دارویی در بیش‌تر موارد در دوره خاصی از رشد گیاه تولید می‌شوند. نقش این مواد گوناگون بوده و در صنایع مختلف مانند دارویی، عطرسازی و غذایی به کار می‌روند و از همین رو در بیوتکنولوژی و زیست‌فناوری مورد توجه قرار گرفته‌اند (Maziard *et al*., 2011). با توجه به مواد موثره ارزشمند موجود در خرفه با استفاده از روش کشت بافت می توان با رفع محدودیت‌های زمانی و مکانی این مواد را در شرایط آزمایشگاهی تولید کرد و حتی میزان آن را افزایش داد. از بافت کالوس به منظور ازدیاد گیاهان، انتقال ژن به گیاه و هم‌چنین تولید متابولیت‌های ثانویه و سایر ترکیبات مفید می‌توان استفاده نمود (Sharafi *et al*., 2008). اکسین و سیتوکنین از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و تاثیرگذار بر تقسیم سلولی در کشت بافت هستند. براساس تحقیقات گذشته حضور دو هورمون اکسین و سیتوکنین به منظور القا کالوس در محیط کشت بافت ضروری است (Saleh *et al*., 2016; Saikia *et al*., 2013). در تاج خروس (*Celosia argenta* L.) القا کالوس در محیط موراشینگ اسکوک (MS) به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA) انجام شده است (Abubakar *et al*., 2014). استفاده از ترکیبات دو هورمون دی کلروفنوکسی‌استیک اسید (2,4-D) و بنزیل آمینو پورین (BAP) در سطوح ۰/۱تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر در *Michela champaca* L. باعث تشکیل کالوس‌های با کیفیتی شده است (Abdelmageed *et al*., 2012). در *Glinus lotoides* L. بالاترین مقدار تشکیل کالوس (۱۰۰ درصد) در محیط هورمونی حاوی 2,4-D در غلظت‌های (۰/۵، ۲ و ۳/۵) میلی‌گرم بر لیتر و NAA (۲ و ۲/۵) میلی‌گرم بر لیتر به همراه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP بدست آمد (Teshome & Feyssia, 2015). در بررسی کال‌زایی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) بهترین تیمار غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP برای ریزنمونه میانگره و دمبرگ در روشنایی بود، پس از این تیمار استفاده از ریزنمونه برگی با تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAPدرشرایط تاریکی و سپس نور، تیمار پربازده‌ای بود (Soltanipol *et al*., 2011). هم‌چنین در بهینه‌سازی کالوس‌زایی در پروانش (*Catharanthus roseus* L.) تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به تنهایی یا همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP یا کینتین (KN) بیش‌ترین کالوس را تولید کردند (Ahmadi *et al*., 2012). در کشت بافت بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) بیش‌ترین رشد کالوس مربوط به ریزنمونه برگ در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود و کم‌ترین مقدار کالوس‌دهی در محیط حاوی 2,4-D ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد (Kouhi *et al*., 2014). در گزارشی برای تعیین محیط مناسب برای کالوس‌زایی در خرفه از دو هورمون BAP و IBA استفاده شد، نتایج نشان داد بهترین محیط برای القا کالوس از ریزنمونه برگ در محیط MS شامل ۵ و ۱۰ میکرومولار BAP به همراه ۱۰میکرومولار IBA بود و تشکیل کالوس‌های اولیه یک هفته بعد از کشت در محیط هورمون‌دار در شرایط تاریکی دیده شد (Safdari & Kazamitabar, 2009). با توجه به ارزش مطلوب دارویی خرفه و انجام تحقیقات محدود در این گیاه، هدف از پژوهش حاضر تعیین بهترین ریزنمونه گیاهی و تیمار هورمونی در تشکیل کالوس مطلوب است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار (هر تکرار با پنج ریزنمونه) در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به اجرا درآمد. بذر خرفه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ابتدا بذرها در اتانول ۷۰ درصد و سپس هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه همراه با چند قطره توین ۲۰ قرار گرفتند. در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شده در زیر لامینارهود شست وشو داده شدند. بذر-

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.8.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.176]

های ضد عفونی شده در محیط MS همراه با ۳ درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار و pH ۵/۸ کشت شدند. سپس ریزنمونه جهت انجام آزمایش از برگ و مریستم انتهایی گیاهچه‌های کشت بافتی و ۲۵ روزه خرفه تهیه شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS همراه با سطوح مختلف از دو هورمون BAP و 2,4-D قرار گرفتند. از BAP در سه سطح ۰، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر و 2,4-D در سه سطح ۰، ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر استفاده گردید. سپس در دمای محیط و در شرایط تاریکی به مدت یک ماه نگه‌داری شدند. صفات مورد بررسی شامل زمان آغاز کالوس‌دهی، درصد القا کالوس، وزن تر و قطر کالوس‌ها بود. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SAS استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام شد.

نتایج

طبق نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس؛ تاثیر نوع ریزنمونه، هورمون‌ها و اثرمتقابل آن‌ها بر صفات درصد القا کالوس، وزن تر کالوس و قطر کالوس در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول۱). در صفت زمان آغاز کالوس‌دهی، اثرمتقابل نوع ریزنمونه و هورمون 2,4-D در سطح ۵ درصد و اثرمتقابل دو هورمون BAP و 2,4-D در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. طبق نتایج جدول مقایسه میانگین، بهترین نوع ریزنمونه و تیمار هورمونی مربوط به ریزنمونه برگ و ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بر درصد القا کالوس، وزن تر و قطر کالوس بود (جدول۲، شکل۱ A). در برگ استفاده از غلظت کمتر BAP (۱میلی‌گرم بر لیتر) همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D درصد کالوس‌دهی، وزن تر و قطر کالوس را کاهش داد. در ریزنمونه مریستم بهترین تیمار از نظر درصد القا کالوس و وزن تر تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به ترتیب با میانگین ۷۵ درصد و ۱۰۶ میلی‌گرم بود (شکل۱ B). در سطح ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D هنگامی که غلظت سیتوکنین از ۱ به ۲ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت میزان کالوس‌دهی کم شد، ریزنمونه‌ها از مسیر کالوس‌دهی خارج شده و رشد طولی در مریستم‌ها دیده شد. هم‌چنین افزایش BAP از سطح ۱ به ۲ میلی‌گرم بر لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D میزان درصد کالوس و وزن تر را کاهش داد. بهترین تیمار برای قطر کالوس BAP ۱ و۲ میلی‌گرم بر لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود (جدول ۲). در هر دو ریزنمونه در تمام تیمارهایی که از 2,4-D ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر به تنهایی یا در ترکیب با BAP استفاده شد کالوس‌زایی رخ نداد و ریزنمونه‌ها به تدریج سیاه شدند (شکل۲). در محیط‌های بدون هورمون (شاهد) کالوسی تشکیل نشد و ریشه‌های متعددی ایجاد گردید (شکل ۳).

در صفت زمان آغاز کالوس‌دهی در بررسی اثر ریزنمونه و هورمون 2,4-D، ریزنمونه‌های مریستم و برگ در سطح ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با میانگین ۹/۳۳ روز بهترین تیمار بودند (شکل۴ A). در بررسی اثرمتقابل هورمون‌ها در زمان آغاز کالوس‌دهی مشخص شد که سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر از BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از 2,4-D با میانگین ۸ روز زودتر از سایر تیمارها در هر دو ریزنمونه کالوس‌دهی داشته است (شکل ۴ B).

بحث

نتایج این تحقیق همانند مطالعات پیشین ضرورت حضور دو هورمون سیتوکنین و اکسین برای کالوس‌دهی در گیاه خرفه را نشان داد. طبق نتایج بدست آمده، بهترین کالوس‌دهی در ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود. درسطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D کالوس‌دهی و سایر صفات بررسی شده کاهش یافت. چنانچه مشاهده شد، افزایش BAP از ۱ به ۲ میلی‌گرم بر لیتر در ریزنمونه برگ تاثیر مطلوبی بر کالوس‌زایی داشته است. در گیاه *Solanum trilobatum* L. افزایش هورمون BA سبب افزایش کالوس‌زایی و تکثیر کالوس‌ها شد (Alagumanian *et al.*, 2004). هم‌چنین در استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) با اضافه کردن BA به محیط کشت‌های حاوی اکسین، تولید کالوس افزایش پیدا کرد (Ahmad *et al.*, 2011). در ریزنمونه مریستم بهترین کالوس‌زایی در BAP ۱ میلی‌گرم بر لیتر و 2,4-D ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر دیده شد، استفاده از ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D درصد کالوس‌زایی و میزان وزن تر را کاهش داد. استفاده از سطح بالاتر BAP (۲ میلی‌گرم بر لیتر) سبب رشد طولی در مریستم‌ها شد. در *Lippia dulcis* Trevir از دو ریزنمونه مریستم و گره به منظور

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.8.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.176]

جدول ۱- تجزیه واریانس برخی صفات مورد مطالعه در کشت بافت خرفه.

Table 1. Analysis of variance traits related to tissue culture in purslane.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square			
		زمان آغاز کالوس‌دهی(تعداد روز) Time of beginning callus induction (number of day)	درصد القا کالوس callus induction	وزن تر کالوس (میلی‌گرم بر لیتر) Fresh weight (mg/L)	قطر کالوس (میلی‌متر) Callus diameter (mm)
ریزنمونه Explant (A)	1	2.66*	937.5**	801.18**	4.369**
BAP (B)	2	108.74**	4664.35**	5275.24**	7.937**
2,4-D (C)	2	592.29**	17581.01**	25233.40**	52.88**
A×B	2	0.88ns	312.5**	1408.57**	1.54**
A×C	2	2.66*	937.5**	521.18**	1.13**
B×C	4	234.07**	1226.85**	1695.85**	5.101**
A×B×C	4	0.88ns	312.5*	1455.24**	0.460**
خطا Error	36	0.592	23.14	29.44	0.054
کل Total	53				
ضریب تغییرات (CV%)		11.67	15.51	15.38	13.17
برش‌دهی فیزیکی بر اساس نوع ریز نمونه The physical cutting basis of type of explant					
مریستم Shoot tip B×C	8	-	2436.34**	0.0004**	6.26**
برگ Leaf B×C	8	-	3981.48**	0.005**	12.38**

**، * و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و عدم تفاوت معنی‌دار.

*, ** significant at %1 and %5 levels respectively; ns: non-significant.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه براساس روش برش‌دهی.

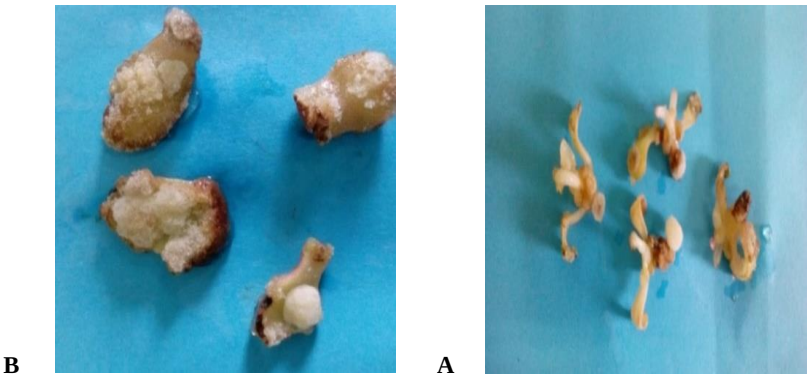
Table 2. Mean comparison of studied traits according to slicing.

ریزنمونه Explant	BAP	2,4-D	درصد القا کالوس (٪) Callus induction	وزن تر (میلی‌گرم بر لیتر) Fresh weight (mg/L)	قطر کالوس (میلی‌متر) Callus diameter (mm)
مریستم Shoot tip	شاهد Control (0)	control	0^{e}	0^{d}	0^{d}
		0.5	25^{d}	32^{c}	2.82^{ab}
		1.5	0^{e}	0^{d}	0^{d}
	1	control	50^{b}	59^{b}	2.60^{b}
		0.5	75^{a}	106.33^{a}	2.97^{a}
		1.5	0^{e}	0^{d}	0^{d}
	2	control	41.66^{c}	30^{c}	1.96^{c}
		0.5	50^{b}	55.33^{b}	3.03^{a}
		1.5	0^{e}	0^{d}	0^{d}
برگ Leaf	شاهد Control (0)	control	0^{d}	0^{d}	0^{c}
		0.5	50^{c}	65.33^{b}	3.13^{b}
		1.5	0^{d}	0^{d}	0^{c}
	1	control	50^{c}	63.66^{b}	3.21^{b}
		0.5	66.66^{b}	67.33^{b}	3.27^{b}
		1.5	0^{d}	0^{d}	0^{c}
	2	control	41.66^{c}	34.66^{c}	3.60^{b}
		0.5	100^{a}	121^{a}	5.106^{a}
		1.5	0^{d}	0^{d}	0^{c}

حروف غیر مشابه نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ است.

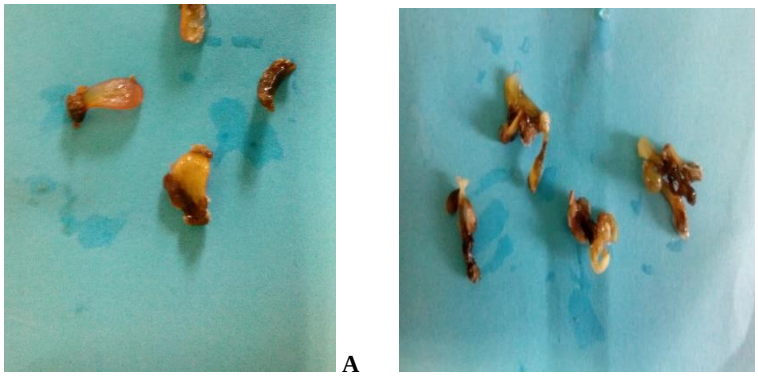
Non-similar letters indicate significant difference in the probability level of 1%.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.8.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.176]



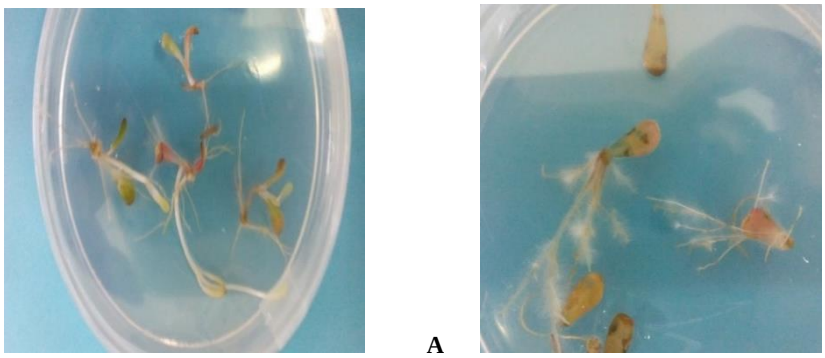
شکل ۱– A. ریزنمونه برگ در BAP ۲ و 2,4-D ۰/۵ mg/L. **B.** ریزنمونه مریستم در BAP ۱ و 2,4-D ۰/۵ mg/L.

Fig. 1. A. Leaf explants in BAP 2 and 2,4-D 0.5mg/L. **B.** Shoot tip explants in BAP 1 and 2,4-D 0.5 mg/L.



شکل ۲– اثر 2,4-D با غلظت ۱/۵ mg/L **A.** ریزنمونه برگ. **B.** ریزنمونه مریستم.

Fig. 2. Effect of 2,4-D in 1.5 mg/L **A.** Leaf explants **B.** Shoot tip explants.

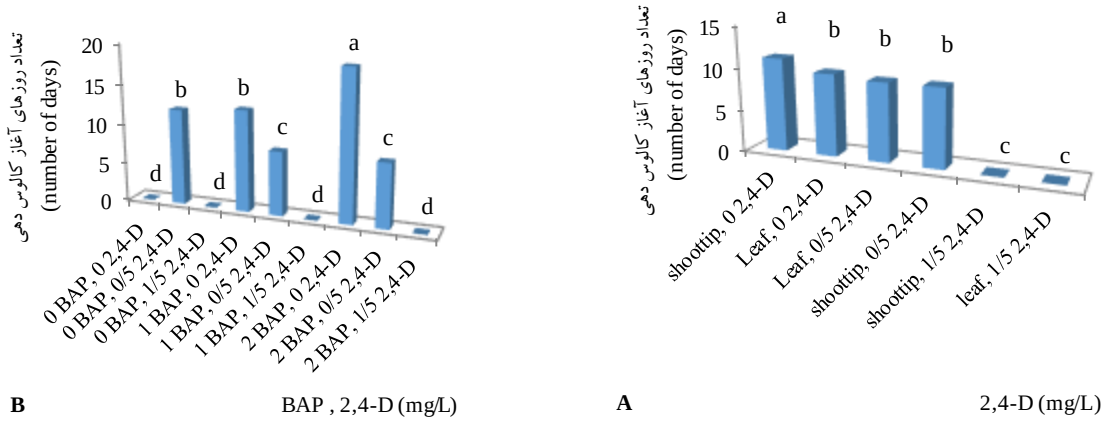


شکل ۳– ریشه‌دهی در محیط فاقد هورمون. **A.** ریزنمونه برگ؛ **B.** ریزنمونه مریستم.

Fig. 3. Rooting in hormone-free medium. **A.** Leaf explant. **B.** Shoot tip explants.

القا کالوس استفاده گردید و استفاده ترکیبی از 2,4-D در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و Kn در سطح ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در هر دو ریزنمونه بهترین کالوس‌دهی را داشت (Urrea *et al.*, 2009). در ریزنمونه مریستم با توجه به قابلیت این بخش از گیاه در رشد و تکثیر، استفاده از سطح بالاتر BAP سبب تحریک رشد طولی شد و بافت گیاهی را از مسیر کالوس‌دهی خارج کرد. بنابراین به نظر می‌رسد، برای کالوس‌دهی مطلوب در مریستم می‌بایست از سطح پایین‌تری از سیتوکنین در ترکیب با اکسین استفاده نمود. عوامل موثر در القا کالوس شامل نوع تنظیم‌کننده‌های رشد به کار رفته و نوع ریزنمونه است (Bakhtiar *et al.*, 2016). هم‌چنین رشد کالوس در یک گونه گیاهی براساس نوع ریزنمونه‌های آن گیاه متفاوت است (Magyar-Tabori *et al.*, 2010). همان‌گونه که بیان شد، در گیاه خرفه کالوس‌زایی در دو ریزنمونه در ترکیب هورمونی

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.8.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.176]



شکل ٤- A. تاثیر برهمکنش نوع ریزنمونه و 2,4-D بر زمان آغاز کالوس‌دهی. **B**. تاثیر برهمکنش دو هورمون BAP و 2,4-D در زمان آغاز کالوس‌دهی.

Fig. **4. A.** The effect of the interaction between explant type and 2,4-D on quality time of beginning callus induction. **B.** The effect of the interaction between BAP and 2,4-D on quality time of beginning callus induction.

مشابه نیز متفاوت بود. در بررسی کالوس‌زایی در نوعی خرفه (*Portulaca grandiflora* Hook.) تشکیل کالوس از برگ در ۱۰ میکرومولار NAA و ۵ و ۱۰میکرومولار BAP بدست آمد (Safdari & Kazemitabar, 2010).هم‌چنین در کالوس‌زایی از ریشه‌های مویین خرفه BAP ۱ میلی گرم بر لیتر و 2,4-D ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بهترین تیمار از نظر زمان آغاز کالوس‌دهی، درصد کالوس، وزن تر و قطر کالوس بود (Pirian & Piri, 2014). نتایج تحقیق پیش‌رو نیز نشان داد که استفاده ترکیبی از اکسین و سیتوکنین تاثیر مطلوب‌تری در کالوس‌زایی دارد. در تیمارهایی که از BAP و 2,4-D به تنهایی استفاده شد، کالوس‌هایی تشکیل شد ولی به طور قابل‌توجهی کم‌تر از تیمارهایی بود که به طور ترکیبی از این دو هورمون استفاده شده بود. استفاده ترکیبی از BAP و 2,4-D به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اثر قابل‌توجهی بر القا کالوس دارد (Teshome & Feyissa, 2015). اکسین‌ها نقش مهم و ضروری در القا کالوس ایفا می‌کنند. هم‌چنین باعث افزایش سنتز پروتئین به منظور افزایش رونویسی از RNA شده، بنابراین نقش مهمی در تشکیل و افزایش کالوس‌ها دارند (Yang *et al*., 2012). تفاوت‌هایی که در تولید کالوس در غلظت‌های مختلف از هورمون‌ها دیده می‌شود، می‌تواند به خاطر تمایز در بیان ژن‌هایی باشد که تولید کالوس را کنترل می‌کنند. علاوه بر آن در برخی از سطوح هورمونی برخی از ژن‌ها به طور کامل بیان نمی‌شوند (Mahmood *et al*., 2012). در گزارشات گوناگون به استفاده ترکیبی از دو هورمون BAP و 2,4-D به عنوان ترکیبات هورمونی مناسب در القا کالوس اشاره شده است. در گیاه *Tridax procumbens* L. از دو ریزنمونه مریستم و برگ کالوس‌های فراوانی در محیط MS همراه با 2,4-D و BAP ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد (Wani *et al*., 2010). در مطالعه‌ای بر روی گیاه *Amsonia orientalis* Dence.، استفاده ترکیبی از دو هورمون 2,4-D و BAP بیش‌ترین تاثیر را بر القا کالوس داشت، هم‌چنین بیان داشتند با توجه به نوع اکسین به کار رفته تفاوت‌های قابل-توجهی در تشکیل کالوس وجود داشت. ترکیبات 2,4-D و BAP می‌تواند تولید کالوس را به خوبی تحریک کرده و اثرات سینرژیکی در تشکیل کالوس دارند (Arda *et al*., 2012). تعادل بین هورمون‌های سیتوکنین و اکسین یک عامل مورفوژنتیکی مهم در تولید کالوس است (Abbasi *et al*., 2007). بهترین سطح هورمون 2,4-D غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بود، که در ترکیب با سیتوکنین بهترین نتیجه را داشت. هنگامی که غلظت آن به ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت، عدم کالوس‌زایی، تغییر رنگ بافت گیاهی و در نهایت سبب سیاه شدن ریزنمونه‌ها شد. در گزارشی بیان داشتند، غلظت‌های بالای 2,4-D ممکن است برای بیان ژن-های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت مهارکننده باشد (Mahmood *et al*., 2012). در بررسی نقش 2,4-D بر القا کالوسدر *Miniature rose* L. مشخص شد، محیط MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بالاترین کالوس‌دهی را داشت (Jala, 2014). در *Origanum vulgare* L. بهترین القا کالوس در سطوح پایین 2,4-D ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.8.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.176]

(Arafeh *et al.*, 2006). در گیاه *Brassica napus* L. کم‌ترین کالوس‌زایی در محیط همراه با 2,4-D ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر دیده شد (Borjian & Arak, 2013). در گیاه *Lippia duleis* Trevir. محیط MS همراه با غلظت‌های کم‌تر 2,4-D پاسخ مناسبی به القا کالوس داشت (Urrea *et al.*, 2009). نتایج تحقیق حاضر؛ همراستا با گزارش‌های فوق در ارتباط با سطوح پایین 2,4-D به عنوان سطح مناسب هورمونی در ترکیب با سیتوکنین در القا کالوس است. در محیط فاقد هورمون ریشه‌های متعددی در برگ و مریستم ایجاد شد. در گزارشی در خرفه بیان داشتند، در محیط فاقد هورمون پاسخی دیده نشد و ریشه‌دهی در محیط‌های هورمون‌دار که حاوی IBA و یا در ترکیب با سطوح پایین‌تر BAP بودند، دیده شد (Safdari & Kazemitabarm, 2010). اما در بررسی حاضر در محیط حاوی هورمون ریشه‌ای تشکیل نشد و تنها در محیط فاقد هورمون ریشه‌دهی اتفاق افتاد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق استفاده هم‌زمان از دو هورمون BAP و 2,4-D برای کالوس‌دهی در خرفه ضروری است. هم‌چنین واکنش ریزنمونه‌ها به ترکیبات هورمونی متفاوت بود. در ریزنمونه برگ استفاده از BAP در غلظت بالاتر به رشد و گسترش کالوس کمک کرد، اما در مریستم انتهایی غلظت بالاتر BAP باعث تولید کالوس‌های کمتر و رشد طولی ریزنمونه‌ها گردید. بنابراین تعادل هورمون‌های مورد استفاده در ترکیب با نوع ریزنمونه نسبت به دیگر صفات نقش موثرتری را نشان داد و در ریزنمونه‌های برگی در محیط محتوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D کالوس های مناسب‌تری مشاهده گردید.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری و مساعدت استادان و کارشناسان گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، جهت اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J. and Liu, C.Z. 2007. Echinacea botechnology: challenges and opportunities. – In vitro Cel. Dev. Bio. 43: 481-492.

Abdelmageed, A.H.A., Faridah, Q.Z., Norshuhada, K. and Julia, A.A. 2012. Call induction and plant regeneration of *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae). – J. Med. Pla. Re. 6: 3338-3344.

Abubakar, D., Bakrudeen, A.A. and Rosna, M.T. 2014. In vitro callus induction and plant regeneration of *Celosia argenta* L. an important medicinal plant. – Bra. Arc. Bio. Tech. Int. J. 57: 860-866.

Ahmad, N., Fazal, H. and Zamir, R. 2011. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni Bert. – Su. Tec. 13: 174-177.

Ahmadi, G., Mohammadi, R., Garousi, KH. and Hosseini, R. 2012. Optimization callus and cell suspension (*Catharanthus roseus* L.). – J. Agr. Bio. 4: 157-163.

Alagumanian, S., Perumal, V.s., Rameshkannar, R. and Rao, M.V. 2004. Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilobatum* L. – Cur. Sci. 86: 1478-1480.

Arafeh, R.M., Shibli, R.A., Al-Mahmoud, M. and Shatanwi, M.A. 2006. Callusing cell suspension culture and secondary metabolites production in Persian oregano (*Origanum vulgar* L.) and Arabian oregano (*O. syriacum* L.). – J. Agr. Sci. 2: 274-281.

Arda, A., Ozen, F. and Kiran, R. 2012. Development of an efficient callus production protocol for *Amsonia orientakis*: A critically endangered medicinal plant. – E. A. J. Bio. 6: 105-112.

Bakhtiar, Z., Mirjalilian, M.H. and Sonboli, A. 2016. In vitro callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* L. (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. – Cr. Br. Ap. Bio.16: 48-54.

Borijian, L. and Arak, H. 2013. A study on the effect of different concentration of plant hormones (BAP, NAA, 2,4-D, Kinetin) on callus induction in Brassica napus. – J. Ap. Ba. Sci. 5: 519-521.

Chen, J., Shi, Y.p. and Liu, J.Y. 2003. Determination of noradrenaline and dopamin in chines herbal extract from *Portulaca oleracea* L. by high-performance liquid chromatography. – J. Chr. A. 1003: 127-132.

Dighe, V., Dhotre, O., Gaurang, P. and Gursale, A. 2008. Quantification of dopamine in *Portulaca oleracea* L. by high-performanc thin layer chromatography. – J. Pla. Mat. 21: 183-186.

Jala, Anchalee. 2014. Role of 2,4-D on callus induction and shoot formation of increase number of shoot in *Miniature Rose* In vitro. – Am. Tra. Eng. Ap. Sci. 3: 207-212.

Kouhi, L., Zare, N., Asghari, Z. and Shiekhzadehm-ossadegh, P. 2014. The role of plant growth regulators and different explants on reply tissue culture and cell suspention (*Matricaria chomomilla* L.). – Eco. Cr. J. 8: 203-214.

Magyar-Taboti, k., Dobranszki, J., Teixeira, D.A. and Silva, J.A. 2010. The role of cytokinins in shoot orga-

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.8.5]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.176]

nogenesis in apple. – Plant Cell Tis. Org. Cul. 101: 251-267.

Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z., Hafez, I.A. and Kaleem, S. 2012. Valuation of tissue culture responses of promising Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. – Pa. J. Bot. 44: 277-284.

Maziard, M., Khan, T. and Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanism of plants. – Bio. Med. 3: 232-249.

Pirian, K., and Piri, Kh. 2014. Callus induction in hairy roots of *Portulaca oleracea* L. – Ir. J. Med. Aro. Plants. 30: 231-238.

Safdari, Y. and Kazemitabar, S.K. 2009. Plant tissue culture study on two different races of purslane (*Portulaca oleracea* L). – Af. J. Bio. 8: 5906-5912.

Safdari, Y. and Kazemitabar, S.K. 2010. Direct shoot regeneration, callus induction and plant regeneration from callus tissue in Mose Rose (*Portulaca grandiflora* Hook.). – Plant Oman J. 3: 47-51.

Saikia, M., Shrivastava, K. and Sigh, S. 2013. Effect of culture media and growth hormone on callus induction in *Aquilaria malaccensis* Lam., a medicinally and commercially important tree species north east Indian. – As. J. Bio. Sci. 6: 96-105.

Saleh, R., Ghorbani, M., and Khalife, S. 2016. Effect of various concentrations of different growth regulating hormones on callus weight and the amount of thymol of *Thymus daenensis* Celak. – Plant Phy. 7: 1919-1923.

Sharafi, A., Hashemi, S.H., and Jourabchi, E. 2008. Improvement on the situation of regeneration of medicinal plant *Artemisia annua* L. – J. Enviro. Re. 21: 565-573.

Soltanipol, M., Mohammadi, A., Rahnama, H. and Abbaszadeh, B. 2011. Callus induction in (*Melissa officinalis* L.). – J. Agri. Crop Improv. 7: 45-54.

Teshome, S. and Feyssia, T. 2015. In vitro callus inductin and shoot regeneration from leaf explant s of *Glinus lotoides* L. L. an important medicinal plant. – Am. J. Plant Sci. 6: 1329-1340.

Urrea, A.I., Castrillon, P.A. and Monsalve, Z. 2009. In vitro propagation and tisular differentiation in *Lippia dulcis* Trevir. – Actualidades Biol. 31: 21-29.

Wani, M., Pande, S. and More, N. 2010. Callus induction studies in *Tridax procumbens* L. – Inter. J. Biotechnol. Appli. 2: 11-14.

Yang, X., Zhang, X., Yuan, D., Jin, F., Zhang, Y. and Xu, J. 2012. Transcript profiling reveals complex auxin signaling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. – BMC Plant Bio. 12: 102-110.

*****

How to cite this article:

Heidargholinezhad, F., Moradi, H., Karimi, M. and Akbarpour, V. 2019. Callus induction in *Portulaca oleracea* L. by different hormone concentrations and explant types. – Nova Biol. Reperta 6: 176-183.

حیدرقلی‌نژاد، ف.، مرادی، ح.، کریمی، م. و اکبرپور، و. ۱۳۹۸. بررسی کالوس‌زایی گیاه خرفه تحت‌تاثیر غلظت‌های مختلف هورمونی و انواع ریزنمونه. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۱۸۳-۱۷۶.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.8.5]

[DOI: 10.29252/nbr.6.2.176]