دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شماره ۲، صفحه ۲۳۸-۲۳۱ (۱۳۹۳)

# بررسی کالوس‌زایی ریشه‌های موئین گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.)

کیانا پیریان[۱] و خسرو پیری[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، پست الکترونیک: khpiri@gmail.com

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۱

## چکیده

گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به علت داشتن متابولیت‌های ثانویه با ارزشی همانند نورآدرنالین، دوپامین و امگا-۳ اهمیت دارویی فراوانی دارد و به‌عنوان ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان و تصفیه‌کننده خون کاربرد دارد. کالوس‌های ایجاد شده از ریشه‌های موئین گیاهان دارویی را می‌توان برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، کشت سوسپانسیون سلولی، کشت پروتوپلاست، القاء کالوس‌های جنین‌زا و انتقال ژن مورد استفاده قرار داد. هدف از این آزمایش بررسی غلظت‌های مختلف هورمونی بر روی ریشه‌های موئین تراریخت گیاه خرفه برای تولید کالوس به‌عنوان یکی از منابع مهم تولید متابولیت‌های ثانویه بود. ریشه‌های موئین در این گیاه توسط اگروباکتریوم ریزوژنز استرین ۱۵۸۳۴ ایجاد گردید. به‌منظور تولید کالوس، ریشه‌ها به محیط MS همراه با ۳۰g/L ساکارز و ۸g/L آگار که حاوی غلظت‌های هورمونی مختلف BA و 2,4-D بودند، منتقل گردیدند. غلظت‌های مختلف بکار رفته برای هورمون‌های BA و 2,4-D، هر دو در سه سطح ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر و در سه تکرار انجام شد. نتایج بدست آمده از تیمارهای مورد استفاده نشان داد که هورمون‌های BA و 2,4-D به تنهایی و همچنین تیمار بدون هورمون (شاهد) هیچ‌گونه تشکیل کالوسی را نشان ندادند. تیمارهای دارای نسبت‌های مختلف از هورمون‌های BA و 2,4-D، به درجات متفاوت باعث ایجاد کالوس در ریشه‌های موئین گردیدند. در میان تیمارهای بکار برده شده، تیمار حاوی دو هورمون BA و 2,4-D هر یک در غلظت ۱mg/L، بهترین تیمار از نظر تولید کالوس (وزن متوسط و زمان تولید) بود.

**واژه‌های کلیدی:** خرفه (*Portulaca oleracea* L.)، اگروباکتریوم ریزوژنز استرین ۱۵۸۳۴، کالوس، BA، 2,4-D.

## مقدمه

گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) از گیاهان باارزش دارویی است که در مناطق معتدل و گرم پراکنده است و عموماً به عنوان یک گیاه دارویی و خوراکی مورد استفاده قرار می گیرد که سرشار از پروتئین، کربوهیدرات، Ca، K، Zn، Na، فلاونوئید، امگا-۳ و ترکیب‌های زیستی همانند دوپامین و نورآدرنالین است (Aberoumand, 2009). این گیاه اثر درمانی در اسهال خونی، مارگزیدگی و حشره‌گزیدگی، سرطان، بیماری قلبی، تصفیه خون، آنتی‌اکسیدانی، دیابت و غیره دارد. قابل ذکر است که هیچ نشانه سمّی قابل‌توجهی هنوز در ارتباط با این گیاه گزارش نشده‌است (Zhang *et al.*, 2002؛ Simopoulos, 1991). ریشه‌های موئین تراریخت از طریق آلودگی با باکتری اگروباکتریوم ریزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) در دولپه‌ای‌ها ایجاد می‌شوند (Chilton *et al.*, 1982). این ریشه ها بشدت رشد می‌کنند و در محیط فاقد هورمون گیاهی رشد کرده و به‌صورت گسترده و پایدار باعث تولید متابولیت ثانویه می شوند و در مواردی تولید متابولیت ثانویه را افزایش می‌دهند (Rhodes *et al.*, 1990). ریشه‌های موئین این توانایی را دارند که کالوس تولید نمایند.

Archive of SID

www.SID.ir

کالوس‌های ایجاد شده از ریشه‌های موئین برای چندین هدف ازجمله افزایش متابولیت ثانویه، استخراج متابولیت‌های ثانویه، کشت سوسپانسیون سلولی، کشت پروتوپلاست، القاء کالوس‌های جنین‌زا و انتقال ژن مفید هستند (Kumar & Kanwar, 2007؛ Frame *et al.*, 2000). کشت بافت گیاه خرفه و باززایی آن از بافت ساقه توسط Wang و همکاران (۲۰۰۶) انجام شده‌است. با توجه به اینکه هیچ‌گونه تحقیقی پیرامون ایجاد کالوس بر روی ریشه های موئین گیاه خرفه انجام نشده‌است، بنابراین با توجه به وجود متابولیت های ثانویه باارزش دارویی در این گیاه، هدف از این تحقیق، ایجاد کالوس از ریشه های موئین گیاه خرفه و انتخاب بهترین تیمار هورمونی ایجادکننده کالوس در این گیاه می‌باشد.

## مواد و روشها

### مواد گیاهی و ایجاد ریشه‌های موئین

بذرهای گیاه خرفه از باغ گیاهان دارویی بوعلی سینا زیر نظر مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان جمع‌آوری شدند. برای ضدعفونی، در زیر هود در شرایط کاملاً استریل ابتدا بذرها در اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و بعد در هیپوکلریت‌سدیم ۲٪ (V/V) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند، در نهایت نمونه‌ها سه مرتبه و هر دفعه به مدت پنج دقیقه با آب مقطر استریل شستشو گردیدند. بذرها پس از استریل شدن، برای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه به محیط MS ۱/۲ مایع (عناصر ماکرو و میکرو مورد استفاده در محیط کشت از شرکت سیگما تهیه شدند) منتقل شدند. برای تلقیح گیاه با اگروباکتریوم ریزوژنز، سویه AR15834 تهیه شده از مرکز پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی مورد استفاده قرار گرفت. برای تولید ریشه‌های موئین، ابتدا از گیاهچه‌های ۲۱ روزه، ریزنمونه‌های برگی جدا گردیدند و در محیط LB مایع حاوی اگروباکتریوم به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس ریزنمونه‌ها برای خشک شدن به روی کاغذ صافی مرطوب و بعد به محیط کشت MS ۱/۲ برای هم‌کشتی با باکتری منتقل گردیدند. بعد از ۲ روز هم‌کشتی، ریزنمونه ها به محیط MS ۱/۲ حاوی ۳۰۰mg/L آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم (تهیه شده از شرکت داروسازی جابرابن‌حیان) به مدت ۸ هفته، جهت حذف اگروباکتریوم انتقال داده شدند. پس از ایجاد ریشه‌های موئین و طی چندین مرحله زیر کشت نمودن ریشه‌ها و اطمینان از حذف باکتری استخراج DNA از ریشه‌ها به روش Cai و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد. برای تأیید مولکولی ریشه‌های موئین از روش PCR (Polymerase Chain Reaction) با آغازگرهای اختصاصی برای ژن *rolB* موجود در ناحیه T-DNA وارد شده به ژنوم گیاهی استفاده گردید.

### ایجاد کالوس

ریشه‌های موئین بدست آمده را در اندازه‌های ۳×۳ سانتی‌متر بریده و در پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط MS حاوی ۳۰g/L ساکارز، ۸g/L آگار و غلظت های مختلف هورمونی برای ایجاد کالوس قرار داده شدند. در این تحقیق از هورمون BA در غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D در غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان منابع اکسین و سیتوکینین استفاده شد و تمام ترکیب‌ها در دامنه غلظت‌های هورمونی مذکور مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی ۸ تیمار هورمونی و یک تیمار نیز به‌عنوان شاهد در محیط MS بدون هورمون در نظر گرفته شد و در هر پتری‌دیش ۴ ریزنمونه ریشه قرار داده شد. پتری‌دیش‌ها در دمای $1^{\circ}C$ ± ۲۵ و در تاریکی قرار داده شدند. بعد از گذشت ۴ هفته، مقایسه‌ای بین تیمارها از نظر متوسط زمان آغاز کالوس‌دهی، وزن تر کالوس ها و نوع کالوس ها انجام شد. برای بررسی وزن تر، کالوس‌های ۴ هفته‌ای تولید شده از ریشه‌های موئین بر روی کاغذ آلمینیومی استریل قرار گرفتند و وزن تر آنها توسط ترازوی آزمایشگاهی (با دقت ۰/۰۰۱) اندازه‌گیری شد. به ازاء هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ مورد بررسی قرار گرفتند.

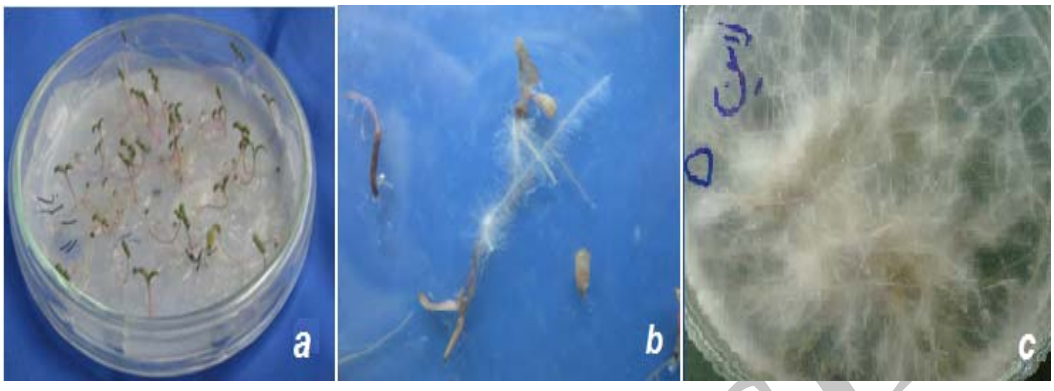
## نتایج

بذرهای گیاه خرفه سه روز بعد از کشت شروع به جوانه‌زنی کردند. بعد از تلقیح ریزنمونه‌های برگی با باکتری AR15834 ریشه‌های موئین بعد از هفت روز از محل‌های زخم ظاهر شدند و در محل آلودگی خیلی سریع رشد و توسعه یافتند. ریشه‌های موئین در محیط کشت جامد ۱/۲

Archive of SID

www.SID.ir

MS دارای رشد سریع، شاخه‌دهی بالا و توانایی رشد در محیط فاقد هورمون بودند. نتایج بدست آمده از القاء ریشه‌های موئین، تنوع گسترده‌ای از رشد ریشه‌ها بعد از هم‌کشتی با اگروباکتریوم ریزوژنز را نشان داد. ریشه‌ها به‌منظور هوادهی و رشد بهتر، در شرایط استریل به ارلن‌های ۲۵۰ml حاوی ۵۰ml محیط MS ۱/۲ مایع منتقل و بر روی تکان‌دهنده الکتریکی در شرایط آزمایشگاهی قرار گرفتند (شکل ۱).

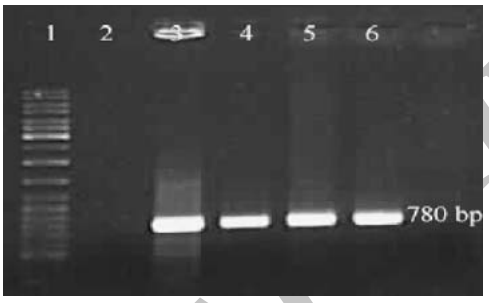



**شکل ۱- مراحل ایجاد گیاهچه تا تولید ریشه‌های موئین**
**a) تولید گیاهچه، b) ظهور ریشه‌های موئین در ریزنمونه برگی، c) رشد و گسترش ریشه‌ها در محیط MS ۱/۲ جامد**

همان‌طور که در شکل ۲ آمده‌است، نتایج مربوط به ژل الکتروفورز نشان‌دهنده حضور ژن *rolB* در ریشه های موئین می باشد. حضور ژن *rolB* به اندازه ۷۸۰ جفت باز (bp) در ریشه های موئین تراریخت شده توسط آنالیز PCR و ژل الکتروفورز تأیید شد.

چاهک ۱ مربوط به نشانگر، چاهک ۲ مربوط به لاین‌های ریشه‌های غیرتراریخت (ریشه‌های طبیعی)، چاهک ۳ مربوط به DNA پلاسمید باکتری اگروباکتریوم ریزوژنز ۱۵۸۳۴ (کنترل مثبت) و چاهک‌های ۴، ۵ و ۶ مربوط به ریشه های موئین تراریخت است. همه باندهای مشاهده شده در چاهک‌های مربوط به لاین‌های تراریخت و کنترل مثبت در یک ردیف قرار داشت. قطعه تکثیر یافته با استفاده از نشانگر، تعیین طول شد و مشخص گردید که طول قطعه تکثیر شده ۷۸۰bp است که دقیقاً با طول ژن *rolB* همخوانی دارد. این نتیجه نشان‌دهنده این موضوع است که ژن *rolB* که در پلاسمید باکتری (چاهک ۳) وجود داشت، به ژنوم ریشه‌های موئین (چاهک‌های ۴ تا ۶) هم مطابق انتظار وارد شده‌است، ولی این باند، همانند انتظار در ریشه‌های طبیعی گیاه (چاهک ۲) مشاهده نگردید (شکل ۲).

ریشه‌ها در معرض تیمارهای مختلف هورمونی قرار گرفتند که کلیه نتایج به‌طور خلاصه در جدول ۱ آمده‌است.



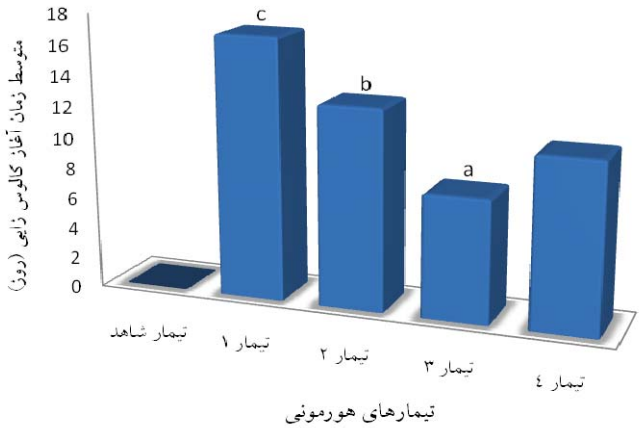

**شکل ۲- آنالیز PCR و ژل الکتروفورز برای تعیین ژن *rolB* در ریشه‌های ترانسفورم شده خرفه به‌وسیله اگروباکتریوم ریزوژنز استرین AR15834: چاهک ۱: مارکر، چاهک ۲: DNA ریشه‌های طبیعی، چاهک ۳: پلاسمید باکتری، چاهک‌های ۴-۶: DNA ریشه‌های موئین**

به‌طور کلی از ریشه‌های موئین در تیمارهای هورمونی ۱ (۰/۵mg/L BA و ۰/۵mg/L 2,4-D)، ۲ (۰/۵mg/L BA و ۱mg/L 2,4-D)، ۳ (۱mg/L BA و ۰/۵mg/L 2,4-D) و ۴ (۱mg/L BA و ۱mg/L 2,4-D) کالوس ایجاد شد، اما در چهار تیمار هورمونی دیگر (۵، ۶، ۷ و ۸) که حاوی BA و 2,4-D به تنهایی بودند و نیز در محیط MS بدون هورمون (شاهد) هیچ کالوسی از ریشه‌های موئین گرفته نشد. در

Archive of SID
www.SID.ir

نتیجه ۴ تیمار هورمونی ۱، ۲، ۳ و ۴ دارای کالوس، از نظر زمان آغاز کالوس‌دهی، وزن تر کالوس‌ها و نوع کالوس‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج بدست آمده از مقایسه تیمارهای هورمونی از نظر زمان آغاز کالوس‌دهی در شکل ۳ نشان می‌دهد که بیشترین زمان مربوط به تیمار هورمونی ۱ و کوتاهترین زمان مربوط به تیمار هورمونی ۳ است که به‌ترتیب به‌طور متوسط بعد از ۱۷ و ۸ روز کالوس‌ها از ریشه‌های موئین ایجاد شدند. البته تیمار هورمونی ۳ با بقیه محیط‌ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد.

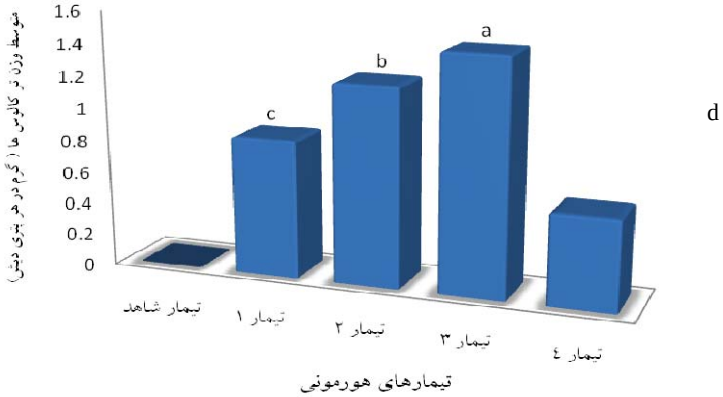



**شکل ۳- متوسط زمان آغاز کالوس‌دهی ریشه‌های موئین گیاه خرفه در تیمارهای هورمونی**

تیمار ۱ (۰/۵mg/L BA و ۰/۵mg/L 2,4-D)، ۲ (۰/۵mg/L BA و ۱mg/L 2,4-D)، ۳ (۱mg/L BA و ۰/۵mg/L 2,4-D) و ۴ (۱mg/L BA و ۱mg/L 2,4-D)، مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵٪

(حروف غیرمشابه نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.)

بعد از چهار هفته از مقایسه‌ای که بین وزن تر کالوس‌ها در تیمارهای هورمونی مختلف انجام شد، نتایج نشان داد که بالاترین وزن تر کالوس مربوط به تیمار هورمونی ۳ و پایین‌ترین وزن تر کالوس مربوط به تیمار هورمونی ۴ است، همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد هر چهار تیمار اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵٪ نشان می‌دهند.

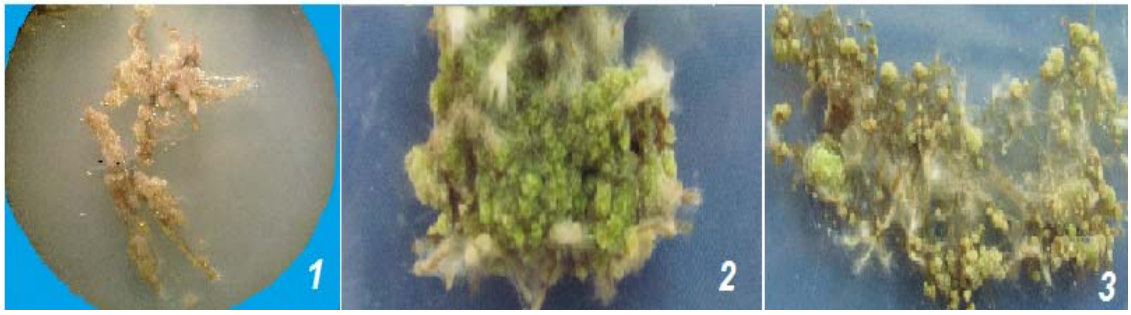



**شکل ۴- متوسط وزن تر کالوس‌های ایجاد شده از ریشه‌های موئین گیاه خرفه در هر تیمار هورمونی**

تیمار ۱ (۰/۵mg/L BA و ۰/۵mg/L 2,4-D)، ۲ (۰/۵mg/L BA و ۱mg/L 2,4-D)، ۳ (۱mg/L BA و ۰/۵mg/L 2,4-D) و ۴ (۱mg/L BA و ۱mg/L 2,4-D)، مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵٪

(حروف غیرمشابه نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.)

www.SID.ir




**شکل ۵- کالوس‌های ایجاد شده در تیمارهای هورمونی**

۱- تیمار هورمونی ۱ (کالوس‌ها کوچک و قهوه‌ای)، ۲- تیمار هورمونی ۲ (کالوس‌ها دارای رشد مناسب اما بشدت سفت و به‌هم فشرده)، ۳- تیمار هورمونی ۳ (کالوس‌ها از تراکم و رشد مناسبی برخوردار هستند)

(بزرگنمایی عکس‌ها ۱۰ می‌باشد.)

نتایج نشان دادند که کالوس‌های ایجاد شده در تیمار هورمونی ۳ به‌صورت مناسبی متراکم و توده‌ای بودند، اما کالوس‌های ایجاد شده در تیمار هورمونی ۱، قهوه‌ای، کوچک و دارای رشد کندی بودند. در تیمار هورمونی ۲، کالوس‌های تولید شده رشد خوبی را نشان دادند اما به‌صورت بسیار به هم فشرده و سفت بودند. در تیمار هورمونی ۴ کالوس‌های مناسبی ایجاد نشد و کالوس‌ها بشدت کم، کوچک و ضعیف بودند (شکل ۵).

به‌طور کلی نتایج بدست آمده از تیمارهای هورمونی مختلف نشان داد که تیمار ۱mg/L BA + ۱mg/L 2,4-D بهترین تیمار از نظر تولید کالوس، هم از نظر زمان ظهور و هم از نظر وزن تر بود و در آن کالوس‌های سبز و قهوه‌ای متراکم مطلوبی ایجاد شدند (جدول ۱).

**جدول ۱- مقایسه میانگین تیمارهای هورمونی BA و 2,4-D بعد از ۴ هفته کشت ریشه‌های موئین بر روی محیط‌های مختلف هورمونی**

| | تیمار هورمونی (mg/L) | متوسط زمان ایجاد اولین کالوس (روز) | وزن تر متوسط کالوس (گرم در هر پتری‌دیش) | ملاحظات |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۰/۵mg/L BA + ۰/۵mg/L 2,4-D | ۱۷ c | ۰/۸۶ c | رشد کم، بشدت قهوه‌ای و به‌صورت پراکنده |
| ۲ | ۰/۵mg/L BA + ۱mg/ 2,4-D | ۱۳ b | ۱/۲۳ b | رشد نسبتاً خوب اما به‌صورت بسیار فشرده و سفت |
| ۳ | ۱mg/L BA + ۰/۵mg/L 2,4-D | ۸ a | ۱/۴۵ a | رشد خوب و مطلوب و کالوس‌ها توده‌ای و متراکم |
| ۴ | ۱mg/L BA + ۱mg/L 2,4-D | ۱۱ b | ۰/۵۶ d | رشد بسیار کم و کوچک |
| ۵ | ۱mg/L BA | – | ۰ | عدم کالوس‌زایی |
| ۶ | ۱mg/L 2,4-D | – | ۰ | عدم کالوس‌زایی |
| ۷ | ۰/۵mg/L BA | – | ۰ | عدم کالوس‌زایی |
| ۸ | ۰/۵mg/L 2,4-D | – | ۰ | عدم کالوس‌زایی |
| ۹ | محیط بدون هورمون (شاهد) | – | ۰ | عدم کالوس‌زایی |

Archive of SID

www.SID.ir

## بحث

بذرهای خرفه در محیط MS ۱/۲ به راحتی جوانه زدند، به‌طور معمول کشت بذرهای گیاهان به‌منظور جوانه‌زنی نیازی به مواد غذایی با غلظت بالا نداشته و در محیط کشتی با غلظت کم MS و رطوبت مطلوب و اکسیژن‌رسانی خوب قابل جوانه‌زنی می‌باشند. میزان نیتروژن و ساکارز موجود در محیط بر روی جوانه‌زنی بذرها مؤثر است (ایزدی و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز استرین AR15834 برای آلودگی و ایجاد ریشه‌های موئین در گیاه خرفه موفقیت‌آمیز بوده‌است. این نتایج با تحقیقات Kamada و همکاران (۱۹۸۶) و Mano و همکاران (۱۹۸۶) که برای اولین‌بار به‌منظور تولید تروپان آلکالوئیدها در گیاهان *Atropa belladonna* و *Scopolia japonica* با استفاده از آگروباکتریوم ریزوژنز استرین ATCC15834 انجام شد و موفق به ایجاد ریشه‌های موئین شدند، مطابقت نشان داد. Dhakulkar و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعات خود روی ریشه‌های موئین، نوع استرین باکتری و حساسیت گونه‌ها را به‌عنوان عوامل مؤثر در ایجاد ریشه‌های موئین بیان نمودند. با توجه به این مطالعه، دلیل موفقیت‌آمیز بودن تراریختی گیاه خرفه توسط استرین AR15834، احتمال دارد به علت حساسیت بالای این گیاه به این استرین باکتری و خصوصیات مورفولوژیکی گیاه باشد. ظهور ریشه در محل زخم را می‌توان به‌دلیل آزاد شدن ترکیب‌های فنولیکی ازجمله استوسرینگون و بتا–هیدروکسی استوسرینگون دانست که باعث جذب باکتری به طرف محل زخم و انتقال T-DNA به ژنوم گیاهی می‌شود. این ترکیب‌ها همچنین بر فعالیت ژن‌های *vir* (نقش بیماری‌زایی دارند) مؤثر هستند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲). مزیت اصلی استفاده از کشت ریشه‌های موئین به‌دلیل توانایی رشد آنها در محیط‌های کشت پایه تعریف شده فاقد هورمون می‌باشد. این ریشه‌ها به‌دلیل طبیعت متمایزشان، دارای یک پایداری ژنتیکی بوده و تمایل به تولید سطوح بالایی از متابولیت‌های ثانویه دارند (Zhang *et al*., 2002). اگروباکتریوم ریزوژنز نژاد AR15834 دارای پلاسمید Ri (root induction) می‌باشد که در گیاهان ریشه موئین تولید می‌کند. ریشه‌های موئین می‌توانند در اثر یک یا ترکیبی از ژن‌های *rolA*، *rolB* و *rolC* که روی قسمت T-DNA پلاسمید Ri قرار دارند، ایجاد شوند (Ayala-Silva *et al*., 2007). در این کار نتایج مثبت بدست آمده در تکثیر ژن *rolB* در ریشه‌های ترانسفورم شده را می‌توان به رویدادهای صحیح ترانسفورماسیون نسبت داد. از روش ترانسفورماسیون با T-DNA Ri استفاده شده در این مطالعه، می‌توان برای توسعه گیاهان تراریخت با اهداف بهبودی مختلف استفاده کرد.

در بعضی تحقیقات گزارش شده که القاء کالوس با کاربرد هورمون‌های اکسین یا سیتوکینین از ریزنمونه‌های مختلف بدست آمده‌است (Ramgareeb *et al*., 2001)؛ در حالی‌که در بعضی دیگر، ترکیبی از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین را با هم استفاده کرده‌اند (Sharry & Saliva, 2006). در این تحقیق از دو ترکیب مختلف اکسین و سیتوکینین (2,4-D و BA) برای ایجاد کالوس در ریشه موئین گیاه خرفه استفاده شد. در بعضی گیاهان مانند *Solanum trilobatum* گزارش شده که اضافه شدن هورمون BA باعث القاء بهتر کالوس‌زایی می‌شود و نه تنها باعث القاء کالوس‌زایی بلکه تکثیر بهتر کالوس‌ها می‌شود (Alagumanian *et al*., 2004). بنابراین نتایج به ما نشان داد که ترکیبی از 2,4-D و BA باعث بهتر شدن ایجاد کالوس‌زایی در گیاه خرفه می‌شود. Safdari و Kazemitabar (۲۰۱۰) گزارش کرده‌اند که توسط هورمون BA به تنهایی هیچ‌گونه کالوسی در ریزنمونه‌های برگی گیاه خرفه مشاهده نمی‌شود. همچنین گزارش کردند که وقتی هورمون BA در سطح پایین‌تری از هورمون اکسین (2,4-D) قرار دارد، تشکیل کالوس از نمونه‌های برگی به خوبی انجام نمی‌گیرد (Safdari & Kazemitabar, 2009). نتایج ما نیز نشان داد که در تیمار هورمونی ۳ که میزان هورمون BA از 2,4-D بیشتر می‌باشد، کالوس‌زایی در سطح بهتری انجام می‌گیرد. این نتایج در مورد گونه دیگری از گیاه خرفه (*Portulaca grandiflora*) نیز بدست آمده‌است (Safdari & Kazemitabar, 2010). در تیمار هورمونی ۳ کالوس‌های سبز رنگی مشاهده شد؛ به‌طوری‌که وجود کالوس‌های سبز می‌تواند ناشی از تشکیل کلروپلاستید در سلول‌های بافت کالوسی باشد که در تاریکی تحت تأثیر اکسین استفاده شده، بتدریج شکل می گیرد و به محض قرار گرفتن در شرایط نوری بسرعت سبزینه تولید می‌شود، هر چند گرانادهای تشکیل شده در کلروپلاست کامل نیستند. اما

Archive of SID

www.SID.ir

ترکیب های کینون در بافت کالوسی از پلی‌مریزه شدن ترکیب های فنل حاصل شده و رنگ قهوه‌ای را در بافت کالوسی موجب می‌شوند (Kalyan, 1997).

## منابع مورد استفاده

– ایزدی، ن.، مشایخی، ک.، جمنی، ا. و کامکار، ب.، ۱۳۹۰. بررسی اندام‌زایی و کالوس‌زایی فلس گل سوسن (*Lilium longiflorum*) در شرایط درون شیشه‌ای. پژوهش‌های تولید گیاهی، ۱۸(۱): ۳۲-۱۱۹.

– فارسی، م. و ذوالعلی، ج.، ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه مشهد، مشهد، ۵۰۸ صفحه.

- Aberoumand, A., 2009. Nutritional evaluation of edible *Portulaca oleracia* as plant food. Food Analytical Methods, 2(3): 204-207.
- Alagumanian, S., Perumal, V.S., Balachandar, R., Rameshkannan, K. and Rao, M.V., 2004. Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilobatum* L. Current Science, 86(4): 1478-1480.
- Ayala-Silva, T., Beyl, C.A. and Dortch, G., 2007. *Agrobacterium rhizogenea* mediated transformation of *Asimina triloba* L. cuttings. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(1): 132-136.
- Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Horloff, H.J., Sandal, N.N., Marcker, K.A., Lankhorst, R.M.K., Salentijn, E.M.J., Lange, W., Stiekema, W.J., Wyss, V., Grundler, F.M.W. and Jung, C., 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science, 275(5301): 832-834.
- Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. and Tempe, J., 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature, 295(5848): 432-434.
- Dhakulkar, S., Ganapathi, T.R., Bhargava, S. and Bapat, V.A., 2005. Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. Plant Science, 169(5): 812-818.
- Frame, B.R., Zhang, H., Cocciolone, S.M., Sidorenko, L.V., Dietrich, C.R., Pegg, S.E., Zehen, S., Schnable, P.S. and Wang, K., 2000. Production of transgenic maize from bombarded type II callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 36: 21-29.
- Kalyan, K.D., 1997. An Introduction to Plant Tissue Culture. New Central Book Agency, 201p.
- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. and Shimomura, K., 1986. Alkaloid production by hairy root culture in *Atropa belladonna*. Plant Cell Report, 5(4): 239-242.
- Kumar, S. and Kanwar, J.K., 2007. Plant regeneration from cell suspension in *Gerbera jamesonii* Bolus. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 15: 157-166.
- Mano, H., Nabeshima, S., Matsui, C. and Ohkawa, H., 1986. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. Agricultural and biological chemistry, 50(11): 2715-2722.
- Ramgareeb, S., Waft, M.P. and Coohe, A.J., 2001. Micropropagation of *Cynodon dactylon* from leaf and nodal segments. South African Journal of Botany, 67(2): 250-257.
- Rhodes, M.J.C., Robins, R.J., Hamill, J.D., Parr, A.J., Hilton, M.H. and Walton, N.J., 1990. Properties of transformed root culture: 201-225. In: Charlwood, B.V., Rhodes, M.J.C., (Eds.). Secondary Product from Plant Tissue Culture (Proceedings of the Phytochemical Society of Europe). Clarendon Press, Oxford, 304p.
- Safdari, Y. and Kazemitabar, S.K., 2009. Plant tissue culture study on two different races of purslane (*Portulaca oleracea* L.). African Journal of Biotechnology, 8(21): 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* L.). Plants Omics Journal, 3(2): 47-51.
- Sharry, S. and Saliva, J.A.T., 2006. Effective organogenesis, somatic embryogenesis and salt tolerance induction *in vitro* in the Persian lilac tree (*Melia azedarach* L.). Floricultur, Ornamental Plant Biotechnology, 11: 317-324.
- Simopoulos, A.P., 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. The American Society for Clinical Nutrition, 54(3): 438-463.
- Wang, H.Y., Huang, Q.C., Qin, G.Y. and Huo, Y.P., 2006. Tissue culture and plantlet regeneration from *Portulaca oleracea* L. Journal of Henan Agricultural Sciences, 87: 203-225
- Zhang, J.Y., Chen, X.G., Hu, Z.D. and Ma, X., 2002. Quantification of noradrenalin and dopamine in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Analytica Chimica Acta, 471(2): 203-209.

Archive of SID

www.SID.ir

# Callus induction in hairy roots of *Portulaca oleracea* L.

**K. Pirian[1] and Kh. Piri[2*]**

1- MSc. Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2*- Corresponding author, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
E-mail: khpiri@gmail.com

Received: December 2011 Revised: May 2012 Accepted: May 2012

## Abstract

*Portulaca oleracea* L. as a medicinal plant, having valuable secondary metabolites, such as noradrenaline, dopamine and omega-3, is used as anti-cancer, antioxidant, and blood purifier factor. Callus inducted from hairy roots of some medicinal plants are used to increase the production of secondary metabolites, cell suspension culture, protoplast culture, induction of embryonic callus and gene transfer agents. In this experiment, various concentrations of two hormones of BA and 2,4-D were examined on transgenic hairy roots of *P. oleracea* to produce callus. Hairy roots transgenic of *P. oleracea* were induced by *Agrobacterium rhizogene*, 15834 strain. Hairy roots produced by *Agrobacterium rhizogenes*15834 strain, were transferred to 1/2MS medium containing different concentrations of BA and 2,4-D hormones. BA and 2,4-D hormones were used, both at three levels of 0, 0.5 and 1 mg per liter and in three replications. Our results indicated that BA and 2,4-D hormones alone as well as without hormone treatment (control) did not show any callus formation. The treatments containing different ratios of BA and 2,4-D hormones, caused callus formation in varying degrees. The medium containing 1mg/L BA and 1 mg/L of 2,4-D hormones showed the higher production of callus.

**Key words:** *Portulaca oleracea* L., *Agrobacterium rhizogenes*15834 strain, callus, BA, 2,4-D.

Archive of SID

www.SID.ir