

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 پذیرش: خرداد ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۰

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 آگروباکتریوم 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.)، آگروباکتریوم ریزوژنز استرین ۱۵۸۳۴، کالوس، BA، 2,4-D.

مقدمه

نشانه سمی قابل توجهی هنوز در ارتباط با این گیاه گزارش نشده‌است (Zhang et al., 2002; Simopoulos, 1991). ریشه‌های موئین تراریخت از طریق آلودگی با باکتری آگروباکتریوم ریزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) در دوپله‌ای‌ها ایجاد می‌شوند (Chilton et al., 1982). این ریشه‌ها بشدت رشد می‌کنند و در محیط فاقد هورمون گیاهی رشد کرده و به‌صورت گسترده و پایدار باعث تولید متابولیت ثانویه می‌شوند و در مواردی تولید متابولیت ثانویه را افزایش می‌دهند (Rhodes et al., 1990). ریشه‌های موئین این توانایی را دارند که کالوس تولید نمایند.

گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) از گیاهان باارزش دارویی است که در مناطق معتدل و گرم پراکنده است و عموماً به‌عنوان یک گیاه دارویی و خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد که سرشار از پروتئین، کربوهیدرات، K، Ca، Na، Zn، 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

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 میلی‌لیتر محیط MS حاوی ۳۰g/L ساکارز، ۸g/L آگار و غلظت‌های 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 ۱°C ± ۲۵ و در تاریکی قرار داده شدند. بعد از گذشت ۴ هفته، مقایسه‌ای بین تیمارها از نظر متوسط زمان آغاز کالوس‌دهی، وزن تر کالوس‌ها و نوع کالوس‌ها انجام شد. برای بررسی وزن تر، کالوس‌های ۴ هفته‌ای تولید شده از ریشه‌های موئین بر روی کاغذ آلومینیومی استریل قرار گرفتند و وزن تر آنها توسط ترازوی آزمایشگاهی (با دقت ۰/۰۰۱) اندازه‌گیری شد. به‌ازاء 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 برگ‌گی 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

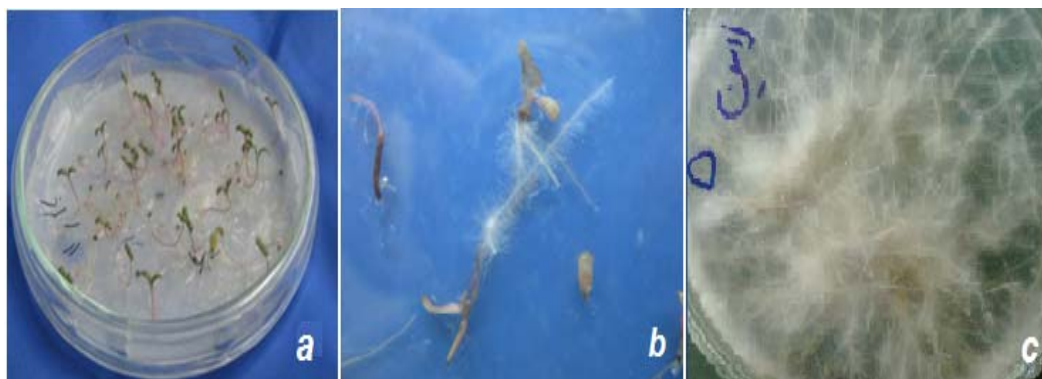
کالوس‌های ایجاد شده از ریشه‌های موئین برای چندین هدف ازجمله افزایش متابولیت ثانویه، استخراج متابولیت‌های ثانویه، کشت سوسپانسیون سلولی، کشت پروتوپلاست، القاء کالوس‌های جنین‌زا و انتقال ژن مفید هستند (Kumar & Kanwar, 2007؛ Frame et al., 2000). کشت بافت گیاه خرفه و باززایی آن از بافت ساقه توسط Wang و همکاران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

مواد و روشها

مواد گیاهی و ایجاد ریشه‌های موئین

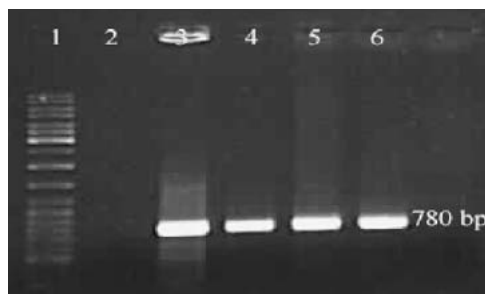
بذرهای گیاه خرفه از باغ گیاهان دارویی بوعلی سینا زیر نظر مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان جمع‌آوری شدند. برای ضدعفونی، در زیر هود در شرایط کاملاً استریل ابتدا بذرها در اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و بعد در هیپوکلریت سدیم ۲٪ (V/V) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند، در نهایت نمونه‌ها سه مرتبه 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 ۱/۲ MS مایع (عناصر ماکرو و میکرو مورد استفاده در محیط کشت از شرکت سیگما تهیه شدند) منتقل شدند. برای تلقیح گیاه با آگروباکتریوم ریزوژنز، سویه AR15834 تهیه شده از مرکز پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی مورد استفاده قرار گرفت. برای تولید ریشه‌های موئین، ابتدا از گیاهچه‌های ۲۱ روزه، ریزنمونه‌های برگ‌گی جدا گردیدند و در محیط LB مایع حاوی آگروباکتریوم به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس ریزنمونه‌ها برای خشک شدن به روی کاغذ صافی مرطوب و بعد به محیط کشت ۱/۲ MS برای هم‌کشتی با باکتری منتقل گردیدند. بعد از ۲ روز هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط ۱/۲ MS حاوی ۳۰۰mg/L آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم (تهیه شده از شرکت داروسازی جابراین‌حیان) به مدت ۸ هفته، جهت حذف آگروباکتریوم انتقال داده شدند. پس از ایجاد ریشه‌های

به منظور هوادهی و رشد بهتر، در شرایط استریل به ارلن‌های ۲۵۰ ml حاوی ۵۰ ml 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 برگ، (c) رشد و گسترش ریشه‌ها در محیط MS ۱/۲ جامد

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



شکل ۲- آنالیز PCR و ژل الکتروفورز برای تعیین ژن *rolB* در ریشه‌های ترانسفورم شده خرفه به وسیله آگروباکتریوم ریزوژن 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 2,4-D و ۱mg/L BA) و ۴ (۱mg/L 2,4-D و ۱mg/L BA) 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

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 آگروباکتریوم ریزوژن را نشان داد. ریشه‌ها

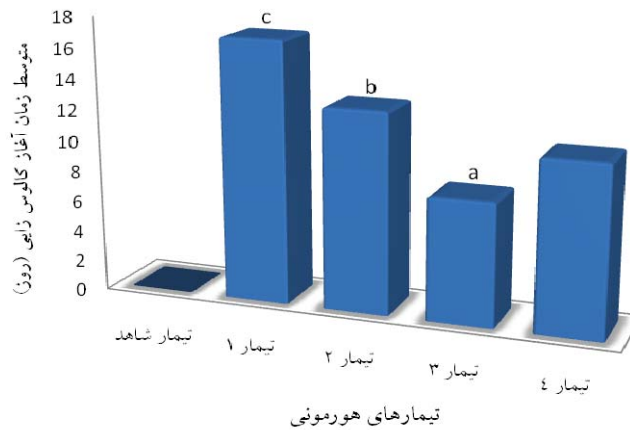
همان‌طور که در شکل ۲ آمده است، نتایج مربوط به ژل الکتروفورز نشان‌دهنده حضور ژن *rolB* در ریشه‌های موئین می‌باشد. حضور ژن *rolB* به اندازه ۷۸۰ جفت باز (bp) در ریشه‌های موئین تراریخت شده توسط آنالیز PCR و ژل الکتروفورز تأیید شد.

چاهک ۱ مربوط به نشانگر، چاهک ۲ مربوط به لاین‌های ریشه‌های غیرتراریخت (ریشه‌های طبیعی)، چاهک ۳ مربوط به DNA پلاسمید باکتری آگروباکتریوم ریزوژن ۱۵۸۳۴ (کنترل مثبت) و چاهک‌های ۴، ۵ و ۶ مربوط به ریشه‌های 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 ۷۸۰ bp 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 شده است، ولی این باند، همانند انتظار در ریشه‌های طبیعی گیاه (چاهک ۲) مشاهده نگردید (شکل ۲).

به تیمار هورمونی ۱ و کوتاهترین زمان مربوط به تیمار هورمونی ۳ است که به ترتیب 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.

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

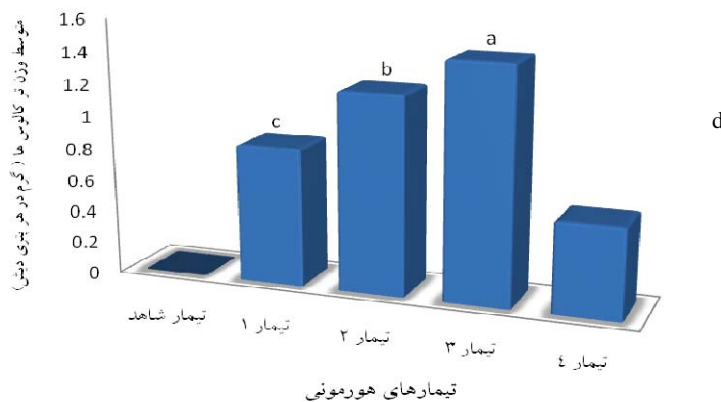


شکل ۳- متوسط زمان آغاز کالوس‌دهی ریشه‌های موئین گیاه خرفه در تیمارهای هورمونی

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

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.

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



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

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



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 به هم فشرده)،
 ۳- تیمار هورمونی ۳ (کالوس‌ها از تراکم و رشد مناسبی برخوردار هستند)
 (بزرگمایی عکس‌ها ۱۰ می‌باشد).

بشدت کم، کوچک و ضعیف بودند (شکل ۵).
 به‌طور کلی نتایج بدست آمده از تیمارهای هورمونی
 مختلف نشان داد که تیمار $1\text{ mg/L BA} + 1\text{ mg/L 2,4-D}$
 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).

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

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

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

بحث

بذرهای خرفه در محیط ۱/۲ MS 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 اولین بار 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 از جمله 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). آگروباکتریوم 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 برگ‌گی 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 برگ‌گی 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 می‌گیرد و به محض قرار گرفتن در شرایط نوری سرعت سبزینه تولید می‌شود، هر چند گرانداهای تشکیل شده در کلروپلاست کامل نیستند. اما

- 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 Cooho, 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.). *Floriculture, 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.
- ترکیب های کینون در بافت کالوسی از پلی-میرزه شدن ترکیب های فنل حاصل شده و رنگ قهوه‌ای را در بافت کالوسی موجب می‌شوند (Kalyan, 1997).
- ### منابع مورد استفاده
- ایزدی، ن.، مشایخی، ک.، جمینی، 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 oleracea* 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

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

K. Pirian¹ 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 induced 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.