القای کالوس در گیاه دارویی خرفه (*Portulaca oleracea* L.) تحت تاثیر تنظیم کننده های رشد در شرایط درون شیشه ای

هنگامه احمدی[۱]، محدثه یزدانی[۱]، فاطمه جمال امیدی[۱*]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل BAP، NAA و 2.4-D بر القا و رشد کالوس در بافت های مختلف گیاه دارویی خرفه انجام شد. بذرهای خرفه در محیط MS کشت شده و پس از تشکیل کالوس، به مدت ۴ تا ۶ هفته در شرایط تاریکی از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن کالوس تر مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد. نتایج نشان دادند که در محیط فاقد هورمون، کالوسی تشکیل نشد، از نظر هورمون‌های استفاده شده، 2,4-D بیشترین تاثیر برای کشت کالوس را داشته است و از نظر بافت های مورد استفاده، بافت برگ همراه با ترکیب هورمونی BAP و NAA بیشترین وزن کالوس را دارا بوده است.

مقدمه

خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L.، متعلق به خانواده Portulacaceae، گیاهی یک‌ساله است. این گیاه به‌طور سنتی برای کاهش درد و تورم، درمان اضطراب و به‌عنوان سبزی خوراکی استفاده می‌شود و منبع مهمی از اسیدهای چرب امگا-۳ و ویتامین ها و ترکیبات آنتی اکسیدان است و به همین جهت جزو گیاهان دارویی ارزشمند به حساب می آید. کشت بافت گیاهی امکان تولید انبوه گیاهان یکنواخت در زمان کوتاه و بدون آلودگی‌های میکروبی را فراهم می‌کند و در کشت بافت تاثیر تنظیم کننده های رشد، بسیار حائز اهمیت است. در کشت بافت کالوس‌زایی خرفه از تنظیم کننده های رشدی که بر روی کالوس‌زایی تاثیر بیشتری دارند(شامل اکسین ها و سیتوکینین ها) شد. در این مقاله از ترکیب مختلف هورمون های BAP، NAA و 2,4-D استفاده گردید که برطبق مطالعات، بر کالوس زایی خرفه موثر بوده‌اند. هدف این مطالعه بررسی و بهینه‌سازی پروتکل کالوس‌زایی خرفه با استفاده از غلظت‌های مختلف BAP، NAA و 2,4-D به‌منظور دستیابی به بیشترین مقدار و کیفیت کالوس بود.

مواد و روش‌ها

بذر گیاه خرفه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرها ابتدا ۳۰ دقیقه شست‌وشو داده شدند، سپس ۱۰ دقیقه با مایع ظرفشویی و زیر هود لامینار با قارچ‌کش ۱٪ (۵ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۱٪ (۲۰ دقیقه) ضدعفونی شدند و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل (هربار۱۰ دقیقه) شست‌وشو شدند. بذرها در محیط MS حاوی ۳٪ ساکارز، ۷٪ آگار و pH= ۵/۸ کشت و ابتدا در تاریکی نگهداری شدند. گیاهچه‌های دوهفته‌ای به ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ تقسیم و به محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D (۰، ۲، ۴ میلی‌گرم بر لیتر)، NAA (۰،۰/۵، ۱ میلی‌گرم بر لیتر) و BAP (۰، ۱، ۲ میلی‌گرم بر لیتر) به‌صورت منفرد و ترکیبی منتقل شدند. ریزنمونه‌ها ۴ هفته در تاریکی نگهداری شدند. پس از چهار هفته، درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس اندازه‌گیری شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تجزیه واریانس با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۱٪ انجام شد. رسم نمودارها با Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که تشکیل کالوس کاملاً وابسته به حضور تنظیم‌کننده‌های رشد بود و در تیمار شاهد هیچ کالوسی مشاهده نشد. هورمون2,4-D نسبت به BAP تأثیر قوی‌تری داشت و بیشترین وزن تر کالوس در تیمار ترکیبی ۴ میلی‌گرم بر لیتر2,4-D و۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد (به‌ترتیب ۰/۸۸، ۰/۷۲ و ۰/۵۵ گرم) در ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ (جدول۱). ریزنمونه‌های ریشه بیشترین پاسخ را نشان دادند. در تیمارهای NAA وBAP، بیشترین وزن کالوس در ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP حاصل شد (۰/۴۵، ۰/۴۲ و۰/۵۲ گرم)(جدول ۲). ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل پاسخ بهتری نسبت به ریشه نشان دادند.هورمون2,4-D تأثیر قوی‌تری نسبت به NAA و BAP به‌تنهایی در القای کالوس خرفه دارد. ترکیب ۴ میلی‌گرم بر2,4-D با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین وزن تر کالوس را در تمامی ریزنمونه‌ها تولید کرد. ترکیب NAA وBAP کالوس‌های یکنواخت‌تر و مناسب‌تر برای مراحل باززایی ایجاد می‌کند. ریزنمونه ریشه در تیمارهای2,4-D و برگ در تیمارهای NAA+BAPپاسخ بهتری نشان داد.

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP بر وزن تر کالوس ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ

2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	وزن کالوس (ریشه) (g)	وزن کالوس (هیپوکوتیل) (g)	وزن کالوس (برگ) (g)
۰	۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۰	۱	۰/۱۲	۰/۸	۰/۰۵
۰	۲	۰/۱۸	۰/۱۴	۰/۰۹
۲	۰	۰/۳	۰/۲۵	۰/۲
۲	۱	۰/۴۲	۰/۳۵	۰/۲۸
۲	۲	۰/۵۵	۰/۴۸	۰/۴
۴	۰	۰/۶۲	۰/۵	۰/۳۸
۴	۱	۰/۷۵	۰/۶۲	۰/۴۵
۴	۲	*۰/۸۸	*۰/۷۲	*۰/۵۵

جدول۲- اثر غلظت‌های مختلف NAA و BAP بر وزن تر کالوس ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و برگ

NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	وزن کالوس (ریشه) (g)	وزن کالوس (هیپوکوتیل) (g)	وزن کالوس (برگ) (g)
۰	۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۰	۱	۰/۰۵	۰/۱۲	۰/۱۸
۰	۲	۰/۰۷	۰/۱۵	۰/۲۵
۰/۵	۰	۰/۱۵	۰/۱	۰/۰۵
۰/۵	۱	۰/۲۲	۰/۲۵	۰/۳
۰/۵	۲	۰/۲۸	۰/۳۲	۰/۳۸
۱	۰	۰/۳	۰/۱۸	۰/۱
۱	۱	۰/۳۸	۰/۳۵	۰/۴
۱	۲	*۰/۴۵	*۰/۴۲	*۰/۲۵

هورمون 2,4-D تأثیر قوی‌تری نسبت به NAA وBAP به‌تنهایی در القای کالوس خرفه دارد. ترکیب ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین وزن تر کالوس را در تمامی ریزنمونه‌ها تولید کرد. ترکیب NAA و BAP کالوس‌های یکنواخت‌تر و مناسب‌تر برای مراحل باززایی ایجاد می‌کند. ریزنمونه ریشه در تیمارهای2,4-D و برگ در تیمارهای NAA+BAPپاسخ بهتری نشان داد.

منابع

[1]George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. Springer

[2]Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25, 3159–3173.

[3]Bidabadi, S. S., & Jain, S. M. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of plant regeneration in vitro.