مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال سوم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۶

اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر باززایی گیاه خرفه (*portulac oleracea*)

فرشته حیدرقلی نژاد[۱*]، حسین مرادی[۲]

چکیده

گیاه خرفه حاوی مواد موثره ارزشمندی نظیر دوپامین، نورآدرینالین و امگا-۳ است. این گیاه در صنایع مختلف دارویی، غذایی و بهداشتی و هم چنین در درمان بیماری‌های مختلفی نظیر دیابت، ناراحتی‌های قلبی، تسکین دردها کاربرد دارد. استفاده از کشت بافت به منظور تولید گیاهانی یکدست و عاری از آلودگی در مدت زمان کوتاه روشی مفید است که می‌تواند در به نژادی و مهندسی ژنتیک به کار روند. بدین منظور اثر هورمون BAP بر باززایی مستقیم خرفه در این تحقیق بررسی شده است. ریزنمونه مریستم انتهایی از گیاهان استریل حاصل از جوانه زنی بذور کشت شده در محیط MS تهیه گردیدند. سپس ریزنمونه‌ها جهت تحریک باززایی در محیط کشت MS محتوی غلظت‌های مختلف BAP (۰، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر) کشت گردیدند. صفات درصد باززایی، تعداد شاخه، تعداد برگ، طول ساقه، طول برگ، وزن تر و وزن خشک شاخساره‌ها بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر BAP بر تمامی صفات در سطح ۱ درصد معنی دار شده است. بالاترین درصد باززایی و صفات بررسی شده در غلظت ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بدست آمد. در محیط شاهد و غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر از این هورمون باززایی دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: خرفه، باززایی مستقیم، گیاه دارویی

۱*- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری sariagri201558@gmail.com
۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

گیاه خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* گیاه دارویی با ارزشی است که کاربرد فراوانی در صنایع مختلف دارد. خرفه گیاهی یکساله، با شاخه‌های قرمز، برگ‌هایی به شکل تخم مرغی وارونه و گل‌های زرد کوچک است. این گیاه به طور گسترده‌ای در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می‌کند (Chan *et al*., 2000). هم‌چنین یک منبع غنی از اسیدهای چرب (امگا-۳)، گالوتامین‌ها، کورسنین‌ها و شامل مقادیر فراوانی از کاتولامین، نورآدرینالین و دوپامین است (simopoulos, 2004). از جمله نقش‌های درمانی آن می‌توان به درمان بیماری‌های گوارشی، مشکلات هاضمه، بیماری‌های قلبی، تسکین دردها، ضد التهاب، ضد قارچ و کاهش دهنده قند خون اشاره کرد (Dighe *et al*., 2008). بالاترین مقادیر بتاکاروتن و آسکوربیک اسید در برگ‌ها و بعد از آن در گل‌ها و ساقه‌های گیاه وجود دارند (Uddin *et al*, 2012). برگ‌ها و ساقه‌های خرفه دارای پروتئین (۲۳%/۴۷)، لیپید (۵%/۲۶) و فیبر (۴۰%/۶۷) می‌باشند. هم‌چنین انرژی بالایی معادل ۳۰۳/۹ کیلو کالری بر صد گرم وزن خشک دارند (Aberoumand, 2009). از برتری‌های روش کشت بافت مستقل بودن از تغییرات اقلیمی، عوامل گوناگون محیطی و سرعت رشد بالای آن است. هم‌چنین ممکن است ترکیباتی تولید شوند که در گیاه مادری در شرایط طبیعی وجود ندارد (karatal *et al*., 2004). سیستم کشت بافت گیاهی روشی کاربردی و ارزشمند برای تکثیر و ازدیاد گونه‌های گیاهی است. تکنیک‌های کشت بافتی در گیاهان دارویی برای ریزازدیادی، تولید متابولیت‌های ثانویه و حفاظت ژرم پلاسم گیاهان به کار می‌رود (Rout *et al*., 2000). در اکثر تحقیقات از روش‌هایی نظیر ریزازدیادی و باززایی به خاطر کاربردهای فراوان نسبت به تکثیر سنتی استفاده می‌شود. در این روش‌ها، امکان تولید گیاهان عاری از آلودگی و به میزان بیش‌تر فراهم می‌شود (Larkin & Scowcroft, 1981). از روش‌های پرکاربرد در تکثیر سریع و زیاد گیاهان در کشت بافت اندام‌زایی مستقیم بدون ایجاد کالوس است که باعث صرفه جویی در زمان و ثبات ژنتیکی و کاهش تنوعات سوماکلونی می‌شود (Hissano *et al*.,2004; Begum *et al*., 2007). در گزارشات گوناگون به منظور باززایی در گیاهان مختلف به نقش موثر سیتوکنین‌ها اشاره شده است (Ugandhar *et al*., 2012; Hassan *et al*., 2010). در گزارشی در گیاه *Populus euramericana* از دو ریزنمونه مریستم و برگ به منظور باززایی مستقیم استفاده کردند، بالاترین میزان باززایی در ریزنمونه مریستم و ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) بدست آمد (Jiang *et al*., 2015). در گیاه دارویی *Pogostemon cablin* سیتوکنین BA بهترین اثر را بر روی باززایی شاخه داشت. زمانی که از BA و NAA به صورت ترکیبی استفاده شد باعث رشد و توسعه آهسته‌تر ریزنمونه‌ها گردید. هم چنین بیان داشتند با افزایش سیتوکنین در محیط کشت MS باززایی شاخه‌ها و تکثیر آن‌ها افزایش یافت (Jin *et al*., 2014). در *Lavandula officinalis* باززایی مستقیم از ریزنمونه مریستم در غلظت بالاتری از BAP ۵/۵ و ۶ میکرومولار دیده شد (Tyub *et al*., 2007). در گیاه *Solanum nigrum* L. از دو نوع سیتوکنین بنزیل آمینو پورین (BAP) و کینتین (Kn) استفاده شد. نتایج نشان داد در میان غلظت‌های مختلف سیتوکنین به کار رفته در محیط MS بالاترین تکثیر شاخه-ها در ریزنمونه مریستم همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و در ریزنمونه گره در غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر از این هورمون بدست آمد. هم‌چنین بیان داشتند استفاده ترکیبی از سیتوکنین و اکسین تنها باعث تشکیل کالوس شد و باززایی در ریزنمونه‌ها رخ نداد (Kavitha *et al*., 2012). در نوعی خرفه (*Portulaca grandiflora*) از ریزنمونه گره برای باززایی استفاده شد. بهترین باززایی در محیط MS همراه با BAP در غلظت ۱۰ میکرومولار بدست آمد (Safdari and Kazemitabar, 2010). با توجه به نقش موثر سیتوکنین‌ها از جمله BAP در باززایی و تکثیر گیاهان، این آزمایش جهت تعیین بهترین سطح از هورمون BAP به منظور باززایی مستقیم خرفه از ریزنمونه مریستم انتهایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق پیش رو در فروردین ماه ۱۳۹۵ در آزمایشگاه پژوهشی گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. بذر خرفه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ابتدا بذرها در اتانول ۷۰ درصد و سپس هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه به همراه چند قطره توین ۲۰ قرار گرفتند. در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شده در زیر لامینارهود شست‌وشو داده شدند. در مرحله اول جهت تهیه و آماده‌سازی ریزنمونه‌ها بذرهای ضد عفونی شده در محیط موراشینگ اسکوک همراه با ۳ درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار و pH حدود ۵/۸ کشت شدند. سپس ریزنمونه جهت انجام آزمایش از مریستم انتهایی گیاهچه‌های کشت بافتی و ۲۵ روزه خرفه تهیه شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS همراه با سطوح مختلف از هورمون BAP قرار گرفتند. از BAP در چهار سطح ۰، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد و در هر تکرار پنج ریزنمونه کشت گردید. بعد از گذشت ۶ هفته صفات مختلف درصد باززایی، تعداد شاخه، تعداد برگ، طول ساقه، طول برگ، وزن تر و وزن خشک ریزنمونه‌ها ارزیابی شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SAS استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل معنی دار (LSD) در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس اثر هورمون BAP بر تمامی صفات در سطح ۱درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). بالاترین درصد باززایی، تعداد شاخه، تعداد برگ، طول ساقه، وزن تر و وزن خشک در سطح هورمونی ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شد. استفاده از BAP در سطح ۳ میلی-گرم بر لیتر درصد باززایی، تعداد شاخه، تعداد برگ، طول ساقه، وزن تر و وزن خشک کم تری در مقایسه با ۴/۵ میلی-گرم بر لیتر BAP داشت. تنها در طول برگ تفاوتی میان این دو سطح هورمونی وجود نداشت و از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۲). در محیط شاهد و در سطح ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر از این هورمون باززایی رخ نداد، اما واکنش ریزنمونه‌ها متفاوت بود. در محیط شاهد ریزنمونه‌ها به گیاهی کامل همراه با ساقه قطور، برگ و ریشه تبدیل شدند و در سطح ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر فقط کالوس‌زایی در ریزنمونه‌ها دیده شد. در غلظت ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP درصد باززایی ۱۰۰ درصد بود. هم‌چنین میانگین صفات تعداد شاخه ۵/۲۵، تعداد برگ ۵/۷۵، طول ساقه ۲/۲۸ سانتی متر، وزن تر ۱/۵۲ گرم و وزن خشک ۰/۲۸گرم بدست آمد، که در تمامی صفات بالاتر از سطح ۳ میلی‌گرم بر لیتر بود.

جدول۱- میانگین مربعات صفات بررسی شده

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی	تعداد شاخه	تعداد برگ	طول ساقه	طول برگ	وزن تر	وزن خشک
BAP	۳	۵۸.۹۷۳۹**	۷۵.۲۶**	۲۵.۳۸**	۲۷.۵**	۵۷۴.۰**	۲۲۶.۲**	۱۰۸.۰**
خطا	۱۲	۰۸.۵۲	۱۲۵.۰	۲۵.۰	۰۲۶.۰	۰۰۳.۰	۰۰۶.۰	۰۰۰۶.۰
کل	۱۵							
ضریب تغییرات		۷۶.۱۷	۶۳.۱۶	۰۴.۱۹	۰۴.۱۷	۹۳.۱۶	۴۲.۱۳	۵۷.۱۹

** معنی دار در سطح احتمال ۱٪

جدول۲- مقایسه میانگین مربعات صفات بررسی شده

BAP (mg/L)	درصد باززایی	تعداد شاخه	تعداد برگ	طول ساقه(cm)	طول برگ	وزن تر(gr)	وزن خشک(gr)
۰	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{b}	۰^{c}	۰^{c}
۱/۵	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{b}	۰^{c}	۰^{c}
۳	۶۲.۵^{b}	۳.۲۵^{b}	۴.۵^{b}	۱.۵۵^{b}	۰.۶۵^{a}	۰.۹۰^{b}	۰.۱۷^{b}
۴/۵	۱۰۰^{a}	۵.۲۵^{a}	۶^{a}	۲.۲۸^{a}	۰.۶۶^{a}	۱.۵۲^{a}	۰.۳۴^{a}

بحث

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد غلظت سیتوکنین BAP نقش مهمی در میزان باززایی گیاه خرفه از ریزنمونه‌های مریستم انتهایی دارد. همین طور استفاده از سطوح بالاتر این هورمون بر باززایی و صفات مربوط به آن تاثیر مطلوبی داشت. استفاده از BAP در سطح ۴/۵ میلی-گرم بر لیتر بالاترین درصد باززایی، تعداد شاخه، تعداد برگ، طول ساقه، وزن تر و وزن خشک را داشت. در ریزازدیادی نوعی خرفه (*Portulaca grandiflora*) بهترین تکثیر از ریزنمونه مریستم در محیط MS همراه با هورمون BAP در سطح ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر انجام شد (Jain and Bashir, 2010). در نوعی خرفه (*Portulaca grandiflora*) برای تکثیر از ریزنمونه گره در غلظت‌های مختلف از دو نوع سیتوکنین BAP و Kn استفاده شد. نتایج نشان داد محیط کشت MS همراه با ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP بهترین نتیجه را برای ریزنمونه‌های گره داشت. هم چنین بیان داشتند در میان دو نوع سیتوکنین به کار رفته، BAP موثرتر بوده است (Jain and Bashir, 2010). هم‌چنین در *Musa* sp. در ریزنمونه‌های مریستم استفاده از BAP در سطح ۶ میلی-گرم بر لیتر تعداد شاخه‌ها و تکثیر آن‌ها را افزایش داد (Ngomuo *et al*., 2013). در تحقیق پیش رو نیز در میان سه سطح به کار رفته از هورمون BAP استفاده از ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر تاثیر مطلوب‌تری در باززایی داشت و استفاده از سیتوکنین در سطح بالاتر میزان باززایی شاخساره‌ها را به طور موثری افزایش داد. در گیاه *Physalis peruviana* L. نیز بالاترین مقدار باززایی در غلظت‌های بالاتری از سیتوکنین BAP و Kn دیده شد، افزایش BAP تا سطح ۴ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش میزان باززایی در ریزنمونه برگ و گره شد. استفاده از ایندول بوتریک اسید (IBA) (از گروه اکسین) تاثیر منفی بر تکثیر شاخه‌ها در محیط شاهد و محیط حاوی سیتوکنین داشت (Otroshy *et al*., 2013). در ریحان (*Ocimum basilicum*) بالاترین درصد باززایی و بالاترین تعداد شاخه-ها در محیط حاوی ۱۱ میکرومولار BAP و بدون حضور اکسین انجام شد (Asghari *et al*., 2012). در این تحقیق نیز استفاده از سیتوکنین به تنهایی باعث باززایی مطلوب در ریزنمونه‌های مریستم شد. در گیاه *Cicer arietinum* بهترین تکثیر در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر از سیتوکنین TDZ بدست آمد (Parveen *et al*., 2012). در باززایی گیاه *Mucuna pruriens* از میان سیتوکنین‌های مختلف، BA در سطح ۵ میکرومولار در القا تکثیر شاخه‌ها موثرتر بود (Faisal *et al*., 2006). در بررسی نوع سیتوکنین و غلظت‌های مختلف آن در *Chlorophytum borivilianum* از دو نوع سیتوکنین BAP و Kn استفاده شد. BAP به تنهایی در سطوح ۸/۸۸ تا ۲۶/۶ میکرومولار اثر قابل توجهی بر روی تکثیر شاخه‌ها داشت، در حالی که Kn در همین سطوح بر روی طویل شدن شاخه‌ها موثر بود (Ashraf *et al*., 2014). در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) بالاترین درصد باززایی در ریزنمونه‌های مریستم انتهایی و قطعات گره به ترتیب در محیط حاوی ۸/۸ و ۲/۲ میکرومولار BAP بدست آمد (جنگجو و همکاران، ۱۳۹۳). نتایج این تحقیق مطابق گزارشات فوق به نقش موثر سیتوکنین‌ها به خصوص BAP در باززایی و تکثیر از ریزنمونه‌های گیاهی اشاره دارد. نتایج تحقیق ما نشان داد BAP در سطح ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین درصد باززایی و صفات مربوط به آن را داشت.

منابع

جنگجو، خ.، حسنی، ع.، حسینی، ب.، جعفری، م. و علیزاده، م. (۱۳۹۳). اثر نوع ریزنمونه و ترکیبات مختلف هورمونی بر باززایی مستقیم گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)، مجله علوم باغبانی ایران، ۴۵(۴): ۳۹۹-۳۹۱.

Aberoumand, A. (2009). Nutritional evaluation of edible *Portulaca oleracea* as plant food. Food Analytical Methods, 2(3): 204-207.

Asghari, F., Hossieni, B., Hassani, A. and Shirzad, H. (2012). Effect of explants source and different hormonal combinations on direct regeneration of basil plants (Ocimum basilicum L.). Australian Journal of Agricultural Engineering, 3(1): 12-17.

Ashraf, M.F., Aziz, M.A., Kemat, N. and Ismail, I. (2014). Effect of cytokinin types, concentrations and their interactions on in vitro shoot regeneraton of Chlorophytum borivilianum Sant. & Fernandez. Electronic Journal of Biotechnology, 17(6): 275-279.

Beegum, S. A., Martin, K. P., Zhang, C. L., Nishitha, I. K., Ligimol, M, Slater, A. and Madhusoodanan, P. V. (2007). Organogenesis from leaf and internode explants of *Ophiorrhiza prostrata*, an anticancer drug (camptothecin) producing plant. Electronic Journal of Biotechnology 10 (1): 114–123.

chan, K., Islam, M.W., Kamil, M., Radhakrishnan , R., Zakaria, M.N.H., Habibulah, M., and Attas, A. (2000). The analgesic and anti-inflammatory effects of *portulaca oleracea* L. subsp. Sativa (haw) celak. Journal Ethnopharmacol, 73: 445-451.

Dighe, V., Dhotrem, O., Gaurang, P. and Gursale, A. (2008). Quantification of dopamine in *Portulaca oleracea L* by high-performanc thin layer chromatography. Journal Plannar Matogr, 21(3): 183-186.

Faisal, M., Siddigque, I. and Anis, M. (2006). In vitro rapid regeneration of plantlets from nodal explants of *Mucuna pruriens*- a valuable medicinal plant. Plant Biotechnology, 148(1): 1-6.

Hisano, H., Kimoto, Y., Hayakawa, H., Takeichi, J., Domae, T., Hashimoto, R., Abe, J., Kanazawa, A., and Shimamoto, Y. (2004). High frequency Agrobacterium mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima*. Plant Cell Reports, 22: 910–918.

Jain, A. and Bashir, M. (2010). In vitro propagation of a medicinal plant *Portulaca grandiflora* Hook. World Journal of Agricultural Sciences, 6(3): 327-330.

Jain, A. and Bashir, M. (2010). Efficient micropropagation protocol for *Portulaca grandiflora* Hook. using shoot tip explants. NewYork Science Journal, 3(10):170-175.

Jiang, CH., Liu, Z., and Zheng, Q. (2015). Direct regeneration of plants derived from in vitro cultured shoot tips and leaves of poplar (*Populus euramericana*). Journal of Life Sciences, 9:366-372.

Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G., and Alfermann, A.W. (2004). Comparison of different extraction methods for thedetermination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in Linum species. Pharmaco Biomed, 35: 441-447.

Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60, 197-214.

Ngomuo, M., Mneney, E. and Ndakidemi, P. (2013). The effects of auxins and cytokinin on growth and development of (Musa sp.) var Yangambi explants in tissue culture. American Journal of Plant Sciences, 4: 2174-2180.

Otroshy, M., Mokhtari, A., Khodaee, M.M. and Bazrafshan, A.M. (2013). Direct regeneration from leaves and nodes explants of *Physalis peruviana* L. International Journal of farming and Allied Sciences, 2(9): 214- 218.

Parveen, SH., Venkateshwarlu, M., Srinivas, D., Mohan, J. and Ugandhar, T. (2012). Direct in vitro shoots proliferation of Chick pea (*Cicer arietinum* L.) from shoot tip explants induced by Thidiazuron. Bioscience Discovery, 3(1): 01-05.

Rout, G.R., Samantaray, S., and Das, P. (2000). In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advances, 18(2): 91-120.

Uddin, Mk., Juraimi, AS., Ali, M.E., and Islamic, M.R. (2012). Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages. International Journal Molecular Sciences, 13(8): 10257-102670.

Sebastina, M.M. (2004). In vitro callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis* L. Journal of Plant Tissue Culture, 14(2): 167-172.

Simopoulos, A.P. (2004). Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. Food Review International. 20(1): 77-90.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 3, No 1, Spring & Summer 2017

Effect of different concentrations of hormome BAP on regeneration of purslane (*Portulaca oleracea*).

Fereshte Heidargholinezhad[1],Hossein Moradi[2*]

[1] MSc. student in Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products, Sari Agriculture and Natural Resources University

[2] Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Crop Science, Sari Agriculture and Natural Resources University.

moradiho@yahoo.com

Abstract

Purslane include valuable secondary metabolit such as dopamine, noradrinalin and omega-3. This plant is used in different industries medication, food and hygienic. Also is used in trearment of various diseases like diabetes, heart troubles and relieve pain. Tissue culture use to produce the same plants and free of contamination in short time. It is a useful method that can use in eugenic and genetic engineering. In this experiment the effect of hormone BAP on the direct regeneration of purslane has been studied. Shoot tip explant from from sterille plants derived from germination of seeds cultured in the medium MS containing different concentrations BAP (0, 1.5, 3, 4.5 mg/L). Percent regeneration, number stems, leave number, stem length, leaf length, fresh weight and dry weight were investigated. Analysis of variance of data showed effect of BAP on all traits at 1% level was significanted. The highest percentage of regeneration and other trairs was obtained at 4.5 mg/L BAP. In the control medium, 1.5 mg/L no regeneration was seen.

Key words: purslane, direct regeneration, medicinal plant