فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۹ ص. ۸۳-۷۱

مقاله پژوهشی

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و بهینه‌سازی کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی خرفه (*Portulaca oleracea* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای

منیژه جمشیدی[۱]

[۱] استادیار گروه گیاهپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

*Email: ma.jamshidi@yahoo.com

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۹

چکیده

در این تحقیق، تأثیر نوع و غلظت دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP و 2,4-D بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ در محیط کشت MS حاوی ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و BAP و بهینه سازی کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خرفه با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin حاوی غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده، هر دو ریزنمونه مورد استفاده دارای ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی بودند ولی عملکرد کالوس ریزنمونه هیپوکوتیل به‌صورت معنی‌داری بیشتر از ریزنمونه برگ بود. محیط‌کشت‌های MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، همگی حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدآسکوربیک در هر دو ریزنمونه بیشترین عملکرد (وزن تر کالوس) را داشتند. در کشت سوسپانسیون سلولی، بین تیمار با ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اعمال شده از نظر شاخص‌های تعداد سلول در یک میلی‌لیتر، SCV، PCV و مدت زمان اعمال تیمار اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بیشترین تعداد سلول، SCV و PCV در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز مشاهده شد. طی ۳۲ روز اندازه‌گیری، بیشترین تعداد سلول و SCV از روز ۲۶ ام تا ۳۲ ام و بیشترین PCV در روز ۲۶ ام مشاهده شد.

کلیدواژه‌ها: کالوس‌زایی، سوسپانسیون سلولی، *Portulaca oleracea* L.

مقدمه

گیاه خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L. گیاهی یک‌ساله از خانواده (Portulacaceae) و راسته‌ی (Caryophyllales) می‌باشد. از ویژگی‌های بارز مورفولوژیک این گیاه می‌توان به ساقه‌ی گوشتی قرمز، برگ‌های ضخیم متقابل، گل‌های زرد یا سفید رنگ و بذرهای سیاه ریز آن اشاره کرد. . این گیاه علفی در سرتاسر جهان به‌خصوص مناطق با آب و هوای گرمسیری یافت می‌شود و امروزه هم به صورت خودرو و هم به صورت زراعی در اغلب کشورها وجود دارد [۱۹،۱۲]. وجود اسیدهای ارزشمندی مانند امگا-۳ در گیاه خرفه که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی فراوانی هستند، استفاده از این گیاه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان را مطرح ساخته است [۲۰]. حضور پلی‌ساکاریدهای فعال زیستی در این گیاه در تحقیقات متعددی به اثبات رسیده است [۳۵]. از این رو با توجه به طیف وسیع خواص دارویی این گیاه همچون محافظ عصبی [۳۲]، ضددیابت [۳۵]، آنتی‌اکسیدان [۸]، آنتی‌تومور [۱۰]، ضدباکتریایی [۱۲]، ضد التهاب [۲۵]، ضد زخم، محافظ کبدی [۲۲] و خواص دیگر، سازمان بهداشت جهانی به آن لقب "اکسیر جهانی" داده است [۳۴]. در فرهنگ عامه چین نیز این گیاه به عنوان "سبزی عمر طولانی توصیف می‌شود [۹، ۱۷].

کشت بافت گیاهی به‌عنوان یک منبع بالقوه برای تولید ترکیبات ارزشمند گیاهی شناخته شده است. مزیت اصلی این روش آن است که می‌تواند به‌عنوان یک منبع مستمر و تجدیدپذیر مواد شیمیایی ارزشمند، بدون تخریب گیاه موجود در فلور طبیعی به‌کار رود [۲۵]. باتوجه به اهمیت اقتصادی متابولیت‌های ثانویه و نیز محدود بودن گونه‌های گیاهی در رویشگاهای طبیعی آن‌ها، کشت بافت راه مناسبی برای تولید ترکیبات شیمیایی ارزشمند می‌باشد [۱۳]. تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای زمان دستیابی به تعداد زیادی گیاه با ژنوتیپ یکسان را نیز کوتاه‌تر می‌کند و همچنین تولید متابولیت ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای نسبت به استخراج آن از گیاهان موجود در طبیعت دارای بهره‌وری بیشتری است [۳۱]. کشت کالوس در واقع رشد و نگهداری توده سلولی سازمان نیافته‌ای است که از رشد ناهماهنگ و نامنظم اندام‌های گیاهی کوچک، قطعات بافت گیاهی یا سلول‌های کشت شده به وجود می‌آید. نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع ریزنمونه و ژنوتیپ گیاه تشکیل کالوس در محیط کشت را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۲و۳]. کشت سوسپانسیون سلولی، شامل توده‌های سلولی پراکنده و در حال رشد در محیط کشت مایع و در حال تکان خوردن است. مرحله کالوس برای آغاز کشت سوسپانسیون سلولی در همه گیاهان ضروری نیست. برای مثال، قطعات برگی سلمه تره (*Chenopodium rubrum*) شناور شده در محیط کشت موراشیگ و اسکوک (1962) در مجاورت نور، تقسیم سلولی و رشد سریعی را در مزوفیل نشان می‌دهد و بعد از چهار روز بر روی شیکر می‌توانند به طور کامل از هم پاشیده شده و تعداد سلول بیشتری را در سوسپانسیون رها سازند [۱۵،۱٤] اما خود کالوس نیز منبع عظیمی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشد و استخراج این متابولیت‌ها از کالوس نیز میسر است به همین جهت کالوس‌زایی این گیاه نیز مورد مطالعه قرار گرفت. مقدار پراکندگی سلول در کشت‌های سوسپانسیون عمدتاً تحت تأثیر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد موجود در محیط‌کشت قرار می‌گیرد. تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها را افزایش داده و موجب تجزیه تیغه میانی دیواره سلولی می‌گردند [۲۸] بنابراین، با کاربرد غلظت نسبتاً بالای تنظیم کننده‌های رشد اکسین و غلظت پایین سایتوکنین در محیط کشت امکان افزایش پراکندگی سلول وجود دارد [۱۸]. کشت‌های سوسپانسیون با پراکندگی سلولی مناسب، متشکل از سلول‌های تمایز نیافته با دیواره سلولی نازک می‌باشند اما از نظر شکل و اندازه یکسان نیستند [۱۵]. در کشت سلول‌های گیاهی از قندهای ساده به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. مقدار و نوع کربن استفاده شده در محیط کشت تأثیر زیادی بر تولید متابولیت‌های ثانویه دارد. در واقع، مقدار ساکارز قابلیت تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برای مثال در کشت *Coleus blumei* غلظت ۲/۵% و ۷/۵% ساکارز به ترتیب

موجب تولید ۰/۸ و ۲/۳ گرم بر لیتر اسید رزمارینیک شده است (۱۶و۱۱).

باتوجه به محدودیت اطلاعات در مورد کشت بافت خرفه، این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و غلظت‌های مختلف آن‌ها بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های خرفه و بهینه‌سازی کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه با به‌کارگیری نوع و غلظت‌های مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در دو غلظت از ساکارز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی و کشت بذر: بذور تهیه شده از شهرستان اهر استان آذربایجان شرقی، پس از ضدعفونی سطحی توسط الکل ۷۰ % به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ % به مدت ۱۰ دقیقه روی محیط کشت MS کشت شدند (۵). برای تهیه هیپوکلریت سدیم از محلول وایتکس خانگی (حاوی ۵ % هیپوکلریت سدیم فعال) استفاده شد. بذور کشت شده، در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۳±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تهیه و کشت ریزنمونه و تولید کالوس: پس از جوانه‌زنی بذور و رشد مناسب گیاهچه‌ها (گیاهچه‌ها حدوداً به اندازه ۱۰ میلی‌متر رسیدند)، از قسمت هیپوکوتیل و برگ گیاهچه‌ها ریزنمونه تهیه شد. ریزنمونه‌ها ابتدا به وسیله اسکالپل تیز و استریل زیر هود در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز برش داده شدند سپس در شیشه‌های حاوی محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی مختلف جهت کالوس‌زایی کشت شدند (جدول ۱). در هر شیشه ۵ ریزنمونه حدوداً ۰/۵ سانتی‌متری کشت گردید. کشت‌ها هر ۴ هفته یک بار واکشت شدند. پس از یک ماه از صفات درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس و میزان قهوه‌ای شدن کالوس‌ها یادداشت برداری گردید.

کشت سوسپانسیون سلولی: با توجه به نتایج به‌دست آمده از کالوس‌زایی، برای ایجاد کشت سوسپانسیون، ۱ گرم از کالوس‌های سبز و تردتر به‌دست آمده از هر دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ به شیشه‌های حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و MS حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، هر دو شامل ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و فاقد آگار منتقل شدند و روی شیکر اوربیتال با دور ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت نگهداری شدند.

برای استقرار رشد سلولی از روش گام به گام استفاده شد. به این صورت که ابتدا توده کالوس به ۱۵ میلی‌لیتر

جدول ۱ - تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ خرفه

شماره محیط	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	اسید آسکوربیک (mg/l)
۱	۰/۵	۰/۵	۱۵۰
۲	۱	۰/۵	۱۵۰
۳	۲	۰/۵	۱۵۰
۴	۰/۵	۱	۱۵۰
۵	۱	۱	۱۵۰
۶	۲	۱	۱۵۰
۷	۰/۵	۲	۱۵۰
۸	۱	۲	۱۵۰
۹	۲	۲	۱۵۰
۱۰	–	–	–

محیط‌کشت MS مایع انتقال داده شد و ابتدا پس از یک هفته و سپس در فواصل دو هفته‌ای هر بار ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه به کشت‌ها اضافه شد. کالوس‌ها پس از قهوه‌ای شدن از محیط کشت خارج شدند. پس از استقرار سوسپانسیون سلولی، کشت‌ها هر دو هفته یکبار به صورت ۱:۱ با محیط کشت تازه واکشت شدند.

تیمارهای رشد سلول: پس از تکثیر سلول‌ها به مقدار کافی، به‌منظور بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت جهت به دست آوردن حداکثر رشد سلولی، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف بر تکثیر سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در راستای یکسان‌سازی تراکم سلولی اولیه، ابتدا به مقدار مورد نیاز از سوسپانسیون سلولی تکثیر شده و در ارلن مایر با هم مخلوط شدند و به‌صورت ۱:۱ با محیط کشت MS تازه حاوی ترکیبات هورمونی مختلف تیمار شدند (جدول ۲) و هر ۳ روز یک بار به‌مدت یک ماه شاخص‌های تراکم سلولی، حجم سلول ساکن (SCV) و حجم سلول فشرده شده (PCV) اندازه‌گیری گردید و در طول این مدت واکشت انجام نشد.

اندازه‌گیری حجم سلول ساکن (SCV) و حجم سلول فشرده شده (PCV): برای اندازه‌گیری SCV، ۳ میلی‌لیتر از محیط‌کشت حاوی سلول‌ها و توده‌های سلولی در فالکون درجه‌بندی شده ریخته و به مدت ۴۰ دقیقه به صورت ساکن رها شد تا سلول‌ها رسوب کنند. حجم سلولی یادداشت گردید و به‌صورت درصد بیان شد. برای اندازه‌گیری PCV نیز ۳ میلی‌لیتر از محیط‌کشت حاوی سلول‌ها و توده‌های سلولی به فالکون درجه‌بندی شده ریخته و به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از ته‌نشینی حجم سلول فشرده یادداشت و به‌صورت درصد بیان گردید (۳).

شمارش سلول: برای به‌دست آوردن تعداد سلول در یک میلی‌لیتر سوسپانسیون، به‌دلیل تشکیل توده‌های سلولی، یک میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی برداشته شد و دو میلی‌لیتر محلول کرومیوم تری اکسید (CrO_3) ۴% به آن اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس به مدت ۱۵ دقیقه ورتکس شدید شد. در نهایت مقداری از محلول مورد نظر روی لام هموسایتومتر منتقل و زیر میکروسکپ و با عدسی ۱۰ تعداد سلول شمارش و عکس‌برداری صورت گرفت (۳).

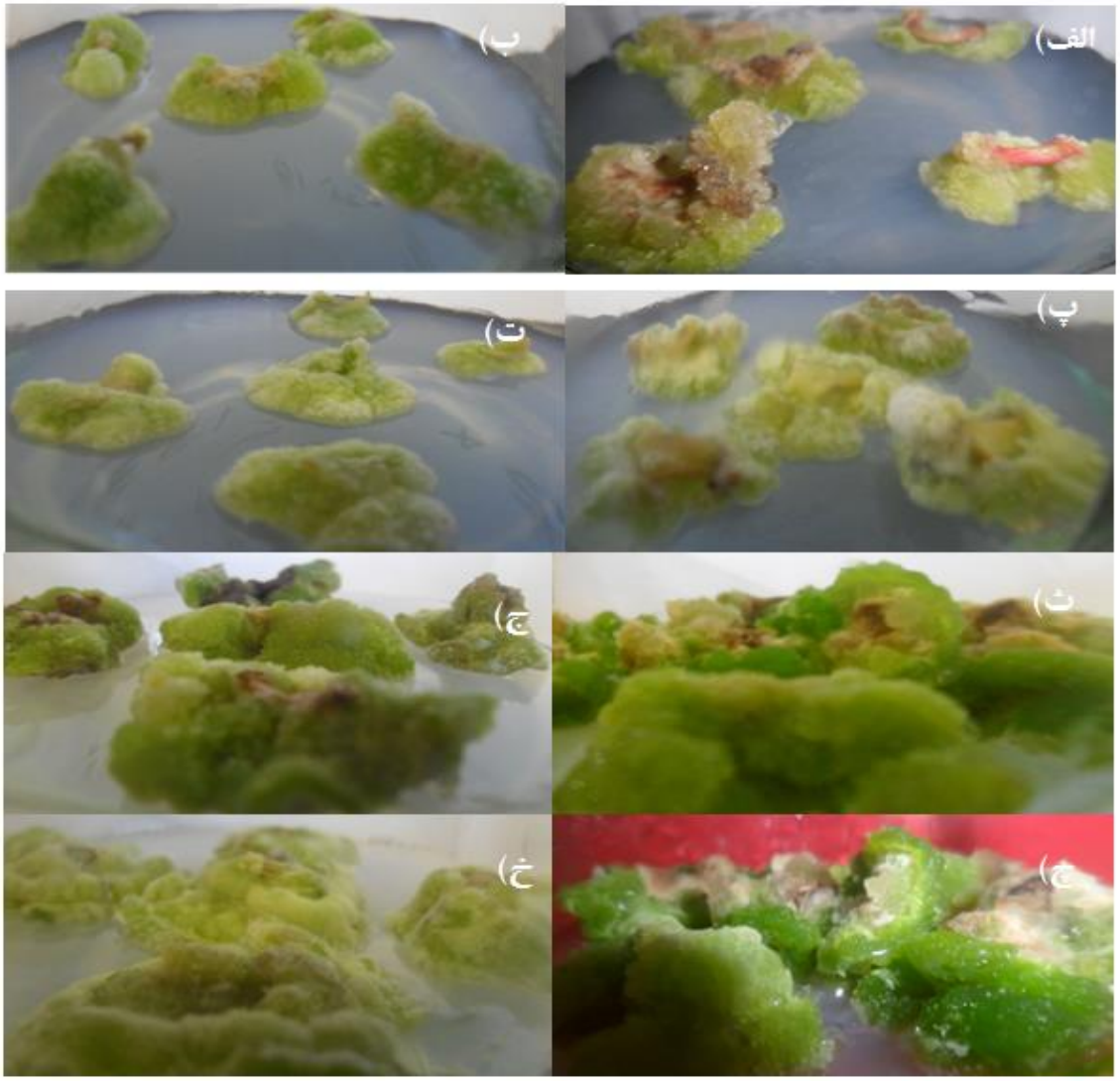
طرح آزمایشی و تجزیه تحلیل آماری: تیمارهای کالوس‌زایی به‌صورت فاکتوریل با ۴ تکرار و تیمارهای رشد سوسپانسیون سلولی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. محاسبات آماری و تجزیه واریانس و آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS 16 و SAS 9.1 انجام شد. مقایسه میانگین نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵% انجام گرفت. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 رسم گردید.

جدول ۲- ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی استفاده شده در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خرفه

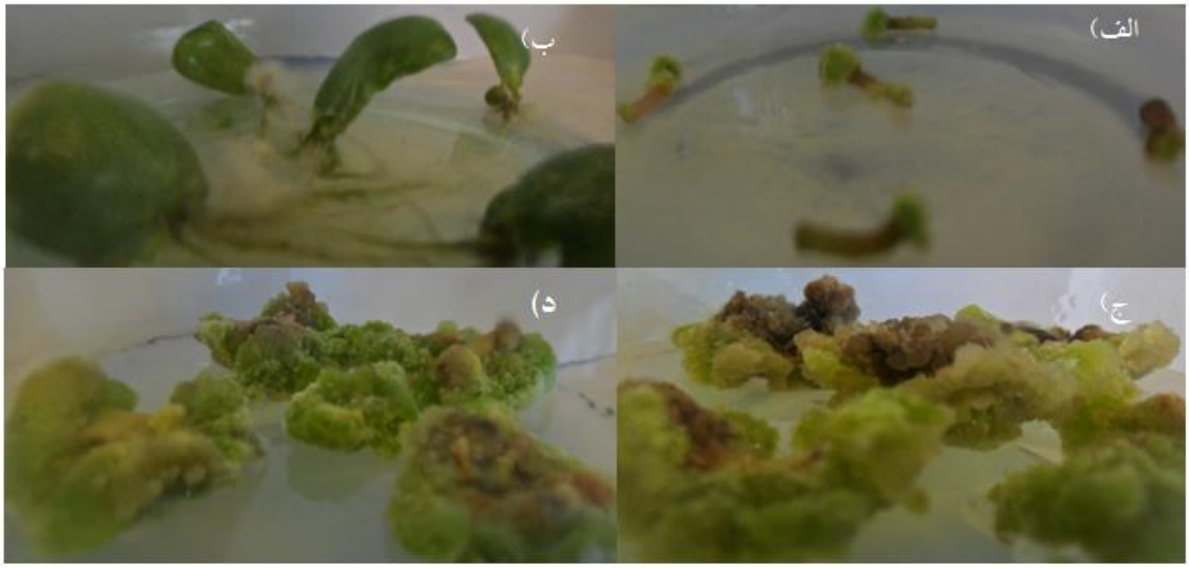
شماره محیط کشت	محیط پایه	2,4-D (mg/lit)	BAP (mg/lit)	Kinetin (mg/lit)	ساکارز (gr/lit)	اسیداسکوربیک (mg/lit)
۱	MS	۰/۵	۰/۵	-	۳۰	۱۵۰
۲	MS	۰/۵	۰/۵	-	۲۰	۱۵۰
۳	MS	۰/۵	۱	-	۳۰	۱۵۰
۴	MS	۰/۵	۱	-	۲۰	۱۵۰
۵	MS	۱	۰/۵	-	۳۰	۱۵۰
۶	MS	۱	۰/۵	-	۲۰	۱۵۰
۷	MS	۱	-	۰/۲	۳۰	۱۵۰
۸	MS	۱	-	۰/۲	۲۰	۱۵۰
۹	MS	۱	-	۰/۵	۳۰	۱۵۰
۱۰	MS	۱	-	۰/۵	۲۰	۱۵۰
۱۱	MS	۲	-	۰/۲	۳۰	۱۵۰
۱۲	MS	۲	-	۰/۲	۲۰	۱۵۰

نتایج

کالوس‌زایی: کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ گیاه خرفه تحت تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (2,4-D و BAP) بررسی شد. در اکثر محیط‌های کشت ریزنمونه‌ها پس از حدود ۲ هفته متورم شده و شروع به آماس و تولید کالوس (معمولاً از ناحیه برش) نمودند. (شکل ۱). هر دو ریزنمونه مورد استفاده از لحاظ درصد کالوس‌زایی، دارای ۱۰۰% کالوس‌زایی بودند و از نظر درصد کالوس‌زایی هیچ اختلافی با هم نداشتند. محیط‌های کشت MS فاقد هورمون نیز در ریزنمونه هیپوکوتیل کالوس‌زایی و در ریزنمونه برگ ریشه‌زایی از خود نشان دادند (شکل ۲).



شکل ۱ - کالوس‌زایی در محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در گیاه خرفه؛ الف) کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP؛ ب) کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP؛ پ) کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP؛ ت) کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP؛ ث) کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP؛ ج) کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP؛ چ) کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP؛ خ) کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP



شکل ۲- الف) کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی؛ ب) ریشه‌زایی ریزنمونه برگ در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی؛ ج) قهوه‌ای شدن تعدادی از کالوس‌های ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط‌کشت MS حاوی تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی پس از گذشت ۲ ماه از آغاز کشت؛ د) سبز ماندن بیشتر کالوس‌های ریزنمونه برگ در محیط‌کشت و زمان یکسان.

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس‌ها (جدول ۳)، مشاهده شد که مابین دو ریزنمونه مورد استفاده و نیز تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف، تفاوت معنی‌داری از نظر وزن تر کالوس در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. اثر متقابل ریزنمونه در تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند.

جدول ۳- تجزیه واریانس وزن تر کالوس در گیاه خرفه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
ریزنمونه	۱	۶/۶۰۸ **
تیمار	۸	۱/۹۶۷ **
ریزنمونه × تیمار	۸	۱/۰۱۷ n.s
خطا	۴۹	۰/۶۷۳
ضریب تغییرات		۱۴/۳۶۷

** : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ % ، * : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ % ، n.s : عدم وجود اختلاف معنی‌دار

ریزنمونه هیپوکوتیل دارای میانگین وزن تر کالوس بالاتری نسبت به ریزنمونه برگ بود. در آزمون غیرپارامتری کروسکال - والیس که برای مقایسه میزان قهوه‌ای شدن کالوس‌های دو ریزنمونه در محیط کشت‌های حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی انجام گرفت، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد که حاکی از میزان بالاتر قهوه‌ای شدن ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به ریزنمونه‌های برگی می‌باشد.

در اغلب مطالعات از وزن تر کالوس به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری میزان رشد کالوس استفاده می‌شود، از همین منظر بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۴)، مشاهده شد که محیط‌کشت‌های MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، همگی حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدآسکوربیک در هر دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ به‌ترتیب با میانگین ۶/۳۱۷، ۶/۲۰۵، ۶/۱۱۰، ۶/۰۱۸، ۵/۸۵۲ و ۵/۵۰۷ گرم به ازای ۵ کالوس در هر شیشه بیشترین عملکرد (وزن تر کالوس) را داشتند. محیط‌کشت‌های MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲

میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، همگی حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدآسکوربیک در هر دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ به‌ترتیب با میانگین ۵/۰۰۴، ۵/۰۹۶، ۵/۱۳۹، ۵/۵۰۷، ۵/۸۵۲ گرم کمترین وزن تر کالوس را در بین سایر غلظت‌ها به خود اختصاص دادند.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر وزن تر کالوس در گیاه خرفه

تیمار (شماره محیط کشت)	وزن تر کالوس (گرم)
۱	۵/۸۵۲ abc
۲	۵/۱۳۹ bc
۳	۵/۰۹۶ bc
۴	۶/۰۱۸ ab
۵	۶/۱۱۰ a
۶	۵/۵۰۷ abc
۷	۶/۳۱۷ a
۸	۶/۲۰۵ a
۹	۵/۰۰۴ c

میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف آماری معنی‌داری باهم ندارند.

کشت سوسپانسیون سلولی: براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، بین تیمارهای اعمال شده از نظر شاخص تعداد سلول در یک میلی لیتر در سطح احتمال ۵ % و از نظر شاخص‌های SCV و PCV در سطح احتمال ۱ % اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. زمان پس از کشت از نظر هر سه شاخص در سطح احتمال ۱ % اختلاف معنی‌داری داشت و اثر متقابل تیمار در زمان از نظر هر سه شاخص غیر معنی‌دار بود (جدول ۶). نمونه‌هایی از سلول‌های مشاهده شده با استفاده از لام هموسایتومتر در زیر میکروسکپ در شکل ۴ آورده شده است.

بر طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها (جدول ۷)، بیشترین تعداد سلول، SCV و PCV به‌ترتیب با میانگین ۶/۷۵×۱۰۴، ۶/۳۷ % و ۳/۱۷ % در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز مشاهده شد. کمترین مقدار تعداد سلول و PCV به‌ترتیب با میانگین ۴/۱×۱۰۴ و ۱/۹۲ % در محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP حاوی ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز و کمترین مقدار SCV نیز در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP حاوی ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز با میانگین ۴/۰۴ % و محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز با میانگین ۴/۰۸ % مشاهده شد. طی ۳۲ روز اندازه‌گیری، بیشترین تعداد سلول و SCV از روز ۲۶ ام تا ۳۲ ام و بیشترین PCV در روز ۲۶ ام مشاهده شد.

جدول ۶ - تجزیه واریانس شاخص‌های اندازه‌گیری شده درکشت سوسپانسیون سلولی گیاه خرفه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		تعداد سلول در یک میلی‌لیتر	SCV (درصد)	PCV(درصد)
تیمار	۱۱	$۱/۲۹ \times ۱۰^{۹}$ *	**۱۲/۰۲	**۲/۶۷
زمان پس از کشت	۷	$۱/۶۷ \times ۱۰^{۱۰}$ **	۳۹/۰۳ **	**۱۲/۵۱
تیمار × زمان	۷۷	$۳/۰۱ \times ۱۰^{۸}$ n.s	۱/۰٤ n.s	۰/۲۹ n.s
خطا	۱۸۹	$۵/۵۱ \times ۱۰^{۸}$	۲/۲۹	۰/۷۳
ضریب تغییرات (%)		٤۳/۹۵	۳۰/۱٤	۳٤/۰۲

n.s غیر معنی‌دار، * معنی‌دار در سطح احتمال ۵ %، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ %

جدول ۷ - مقایسه میانگین شاخص‌های اندازه‌گیری شده درکشت سوسپانسیون سلولی گیاه خرفه

شماره محیط کشت	تعدادسلول در یک میلی لیتر ($+10^4$)	SCV (درصد)	PCV (درصد)
۱	۶/۲۲ ab	۴/۹۹ cde	۲/۵۳ bc
۲	۴/۶۱ cd	۴/۲۹ de	۲/۲۹ cd
۳	۵/۳۰ abcd	۴/۷۹ cde	۲/۴۵ bcd
۴	۴/۱۰ d	۴/۰۴ e	۱/۹۲ d
۵	۵/۱۸ bcd	۴/۰۸ e	۲/۱۸ cd
۶	۴/۸۲ bcd	۴/۹۱ cde	۲/۵۱ bc
۷	۶/۰۱ abc	۵/۶۲ abc	۲/۷۵ abc
۸	۴/۹۳ bcd	۵/۲۵ bcd	۲/۷۴ abc
۹	۵/۱۷ bcd	۵/۱۲ bcd	۲/۴۳ bcd
۱۰	۵/۱۳ bcd	۴/۸۴ cde	۲/۳۰ cd
۱۱	۶/۷۵ a	۶/۳۷ a	۳/۱۷ a
۱۲	۵/۷۴ abc	۵/۹۶ ab	۲/۸۸ ab

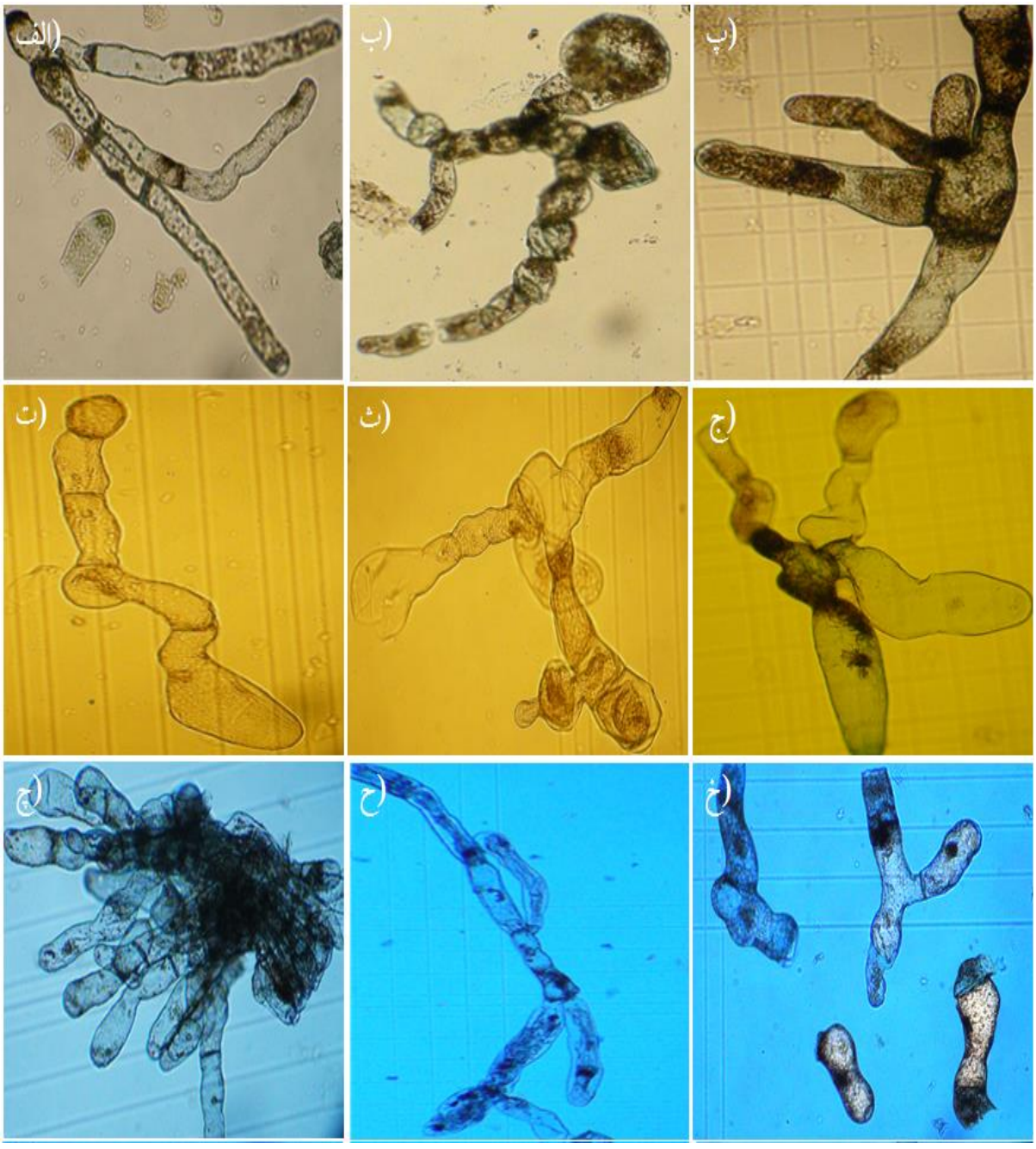
میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف آماری معنی‌داری با هم ندارند.

به طور کلی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز تقسیم و رشد سلولی بهتری داشت. شکل ۵ منحنی رشد سلول‌های گیاه خرفه را در این محیط نشان می‌دهد. همانطور که شکل نشان می‌دهد با گذشت زمان تعداد سلول در میلی‌لیتر، مقدار SCV و PCV افزایش یافته است. رشد سلول‌ها حدوداً تا ۶ روز بعد از کشت کند بوده ولی پس از آن تراکم سلولی افزایش یافته و ۲۶ روز پس از کشت به حداکثر مقدار خود رسیده است و پس از این مدت رشد سلول متوقف شده و تراکم سلولی ثابت مانده است. توقف رشد سلولی بعد از این مدت ممکن است به دلیل تخلیه عناصر و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی موجود در محیط کشت و یا افزایش تراکم مواد فنلی ترشح شده از سلول‌ها به محیط کشت باشد.

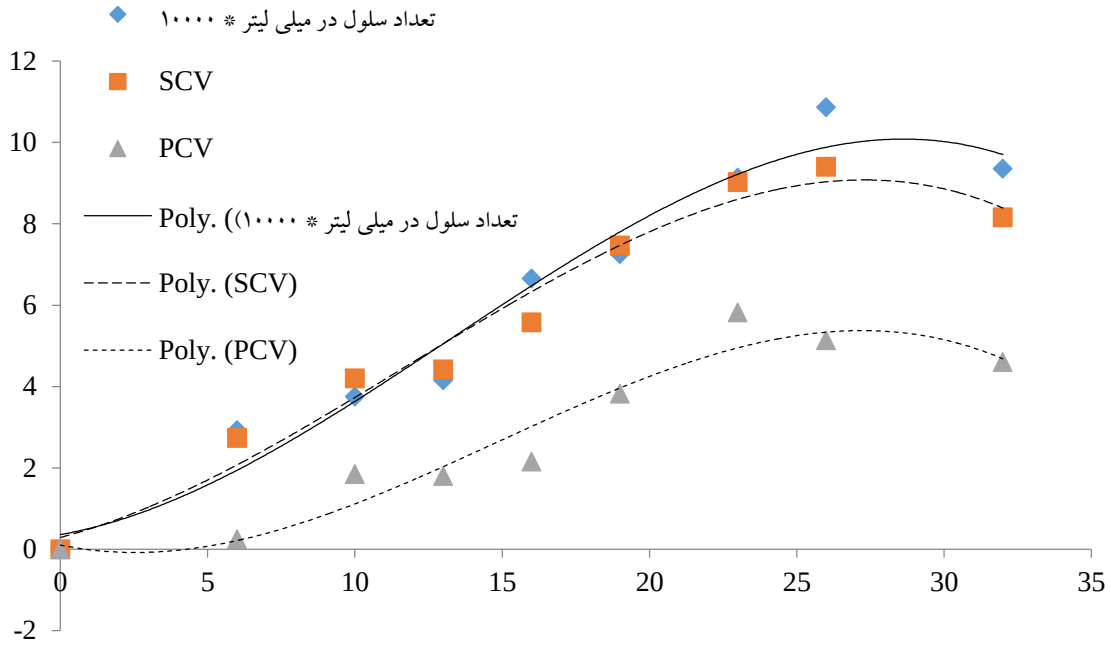
بحث

کالوس‌زایی: کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ در تمام ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده صد درصد مشاهده شد و ترکیبات مورد استفاده هیچ تفاوتی از این نظر با همدیگر نداشتند اما از نظر وزن تر کالوس، بین تیمار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۳). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده از عوامل بسیار مهمی هستند که کالوس‌زایی و رشد درون شیشه‌ای گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند ولی نوع و غلظت مورد نیاز برای هر گیاه و یا برای هر ژنوتیپ باید بهینه‌سازی شود [۲۳]. به نظر می‌رسد که در این گیاه حضور سایتوکنین BAP برای رشد کالوس‌های آن ضروری و احتمالاً کافی است و افزایش مقدار اکسین 2,4-D به صورت معنی‌داری باعث کاهش وزن تر کالوس می‌گردد. ریزنمونه هیپوکوتیل در ترکیبات مورد استفاده عملکرد بالاتری را نسبت به ریزنمونه برگی از خود نشان داد و سیتوکینین BAP به ویژه در غلظت‌های پایین‌تر تأثیر بسیار بیشتری روی ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به ریزنمونه‌های برگی داشت. آزمون غیرپارامتری کروسکال - والیس برای قهوه‌ای شدن کالوس‌های دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ میزان بالاتر قهوه‌ای شدن ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به ریزنمونه‌های برگی مشاهده شد که بیانگر عدم کافی بودن اسید آسکوربیک مورد استفاده در جلوگیری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها و نیاز به استفاده کردن از مواد با جذب سطحی بالا نظیر زغال فعال یا پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP) می‌باشد.

استاجی و همکاران (2020) در بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکنین در میزانتوده کالوس تحت شرایط درون شیشه نتیجه گرفتند که تیمارهای مختلف تنظیم کننده های رشد بر کالوس زایی و کالوس‌های جنین زا در گیاه سوسن چلچراغ معنی دار است [۲۷].



شکل ۴ - سلول‌های کشت سوسپانسیون سلولی گیاه خرفه مشاهده شده در زیر میکروسکوپ. الف، ب و پ) تنوع در شکل سلول‌ها به‌ترتیب سلول‌های میله‌ای، کروی و حجیم بدون رنگ‌آمیزی. ت، ث و ج) تنوع در اندازه سلول‌ها، حاصل از تیمار با کرومیوم تری اکسید ۴ %. چ، ح و خ) به‌ترتیب تشکیل توده سلولی، تقسیم سلولی و مشاهده زنده‌مانی سلول‌ها، رنگ‌آمیزی شده با تریپان بلو، سلول‌های زنده زرد و سلول‌های مرده آبی رنگ هستند.



شکل ۵ - منحنی رشد کشت سوسپانسیون گیاه خرفه در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin

یان (2006) برای القای کالوس در گیاه خرفه (*Portulaca oleracea L.*) از محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 6-BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یا MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 6-BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با صد درصد کالوس‌زایی استفاده کرد (۳۳). صفدری و کاظمی تبار (۲۰۱۰) القای کالوس و باززایی گیاه گل ناز (*Portulaca grandiflora L.*) را مورد بررسی قرار دادند. برای القای کالوس ریزنمونه‌های برگ در محیط‌کشت MS حاوی سطوح مختلف BAP (۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومول) و NAA (۵ و ۱۰ میکرومول) کشت شدند و مشاهده شد که تیمار حاوی ۱۰ میکرومول NAA در ترکیب با ۵ یا ۱۰ میکرومول BAP مناسبترین تیمار از نظر کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ می‌باشد (۲۶). به نظر می‌رسد که در این گیاه حضور سایتوکنین برای رشد کالوس‌های آن ضروری و احتمالاً کافی است و افزایش مقدار اکسین به صورت معنی‌داری باعث کاهش وزن تر کالوس می‌گردد اما از نظر درصد کالوس‌زایی تفاوتی مابین میزان اکسین و سایتوکنین مورد استفاده وجود نداشت و گیاه در حضور غلظت های مختلف اکسین و سایتوکنین همچنان دارای ۱۰۰ % کالوس‌زایی بود. تحقیق حاضر نیز همانند سایر مطالعات انجام گرفته در جنس پرتولاکا نشان می‌دهد که تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی گروه سایتوکنین به‌ویژه BAP در تمایززدایی، تقسیم، تکثیر سلولی و تولید کالوس نقشی بسیار حائز اهمیت دارند. همچنین شهسواری و همکاران (2010) در کاربرد تنظیم کننده‌های رشد بر ژنوتیپ‌های برنج به این نتیجه رسیدند که تفاوت کالوس زایی تیمار های مورد مطالعه در ژنوتیپ های برنج معنی دار بود.

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر رشد سلول‌های گیاه خرفه در کشت سوسپانسیون سلولی: با توجه به نتایج به‌دست آمده از جدول ۶ مشاهده شد که نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، غلظت ساکارز مورد استفاده و گذر زمان تأثیری معنی‌دار بر روی شاخص‌های مورد اندازه‌گیری دارند. در مطالعات مختلف از شاخص‌های متعددی نظیر تعداد سلول در یک میلی‌لیتر، SCV و PCV برای ارزیابی تکثیر و رشد سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی استفاده شده است [۲۶]. در کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه حضور اکسین 2,4-D برای رشد سلول‌ها ضروری به نظر می‌رسد زیرا در این تحقیق نیز بیشترین تعداد سلول، SCV و PCV در محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin حاوی

۳۰ گرم بر لیتر ساکارز حاصل شد. با توجه به نتایج حاصل از کالوس‌زایی احتمالاً حضور سایتوکنین Kin در کنار اکسین 2,4-D باعث رشد مناسب سلول‌ها گردیده است و این پاسخ در نتیجه حضور سایتوکینین در کنار اکسین در محیط‌کشت می‌باشد. سایتوکینین‌ها با تأثیر بر چرخه سلولی و تنظیم سنتز پروتئین‌های درگیر در تشکیل رشته‌های دوک تقسیم و اکسین‌ها با افزایش انبساط‌پذیری دیواره سلول و تحریک رونویسی mRNA های رمزکننده پروتئین‌های رشد، در چرخه سلولی دخالت می‌کنند [۲۸].

حضرتی و همکاران (۱۳۹۶) در مطالعه کشت سوسپانسیونی فندق نشان دادند که تیمارهای تنظیم کننده رشد، رشد سلول فندق را در کشت سوسپانسیون به طور معنی داری تحت تأثیر قرار داد. رشد سلول‌ها در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر MS و یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسکوربیک اسید در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی‌داری از بین تیمارهای محرك نیز از نظر رشد و زنده مانی سلولی اختلاف معنی‌داری وجود داشت [۴].

بوهم و همکاران (1991) تولید بتازانتین را در گیاه گل ناز (*Portulaca grandiflora L.*) با کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه بررسی کردند. برای کشت سوسپانسیون سلولی از محیط‌کشت MS مایع تغییریافته حاوی ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز، فاقد گلیسین ، ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin استفاده کردند. در این تحقیق مشاهده شد که سلول‌های محیط‌کشت سوسپانسیون ژنوتیپ با گل‌های زرد رنگ پس از چند بار واکشت قابلیت رشدی خود را از دست می‌دهند اما سلول‌های محیط‌کشت سوسپانسیون ژنوتیپ با گل‌های سفید رنگ قادرند مکرراً به رشد خود ادامه دهند [۷].

نازمول و همکاران (2003) سنتز بتاسیانین را در صورت استفاده از متیل جاسمونات و سایر محرک‌های رشد در کشت سوسپانسیون سلولی جنس پرتولاکا بررسی کردند. آن‌ها برای اعمال کشت سوسپانسیون از محیط کشت MS مایع حاوی ۴/۵ میکرومول بر لیتر 2,4-D استفاده کردند. سپس سلول‌ها به محیط کشت MS حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و ۲۰۰ میلی‌مول بر لیتر مانیتول یا سوربیتول منتقل شدند و شاهد رشد مناسب سلول‌ها در این جنس گیاهی بودند [۶].

با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها (جدول ۷) و عملکرد بالاتر تیمارهای حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز نسبت به تیمارهای حاوی ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز به نظر می‌رسد مقدار ساکارز مورد نیاز برای رشد و تقسیم سلولی ۳۰ گرم بر لیتر می‌باشد. به طور کلی محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز تقسیم و رشد سلولی بهتری داشت (شکل ۵) و با گذشت زمان تعداد سلول در میلی‌لیتر، مقدار SCV و PCV افزایش یافت. رشد سلول‌ها حدوداً تا ۶ روز بعد از کشت کند بوده ولی پس از آن تراکم سلولی افزایش یافته و ۲۶ روز پس از کشت به حداکثر مقدار خود رسیده است و پس از این مدت رشد سلول متوقف شده و تراکم سلولی محیط کشت ثابت مانده است. توقف رشد سلولی بعد از این مدت ممکن است به دلیل تخلیه عناصر و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی موجود در محیط کشت و یا افزایش تراکم مواد فنلی موجود در محیط کشت باشد. حضرتی جهان و همکاران (۱۳۹۶) نیز با کشت سوسپانسیون سلولی فندق گزارش کردند که در روز ۲۵ ام پس از کشت، بیشترین تراکم سلولی به چشم می‌خورد و سپس تقسیم سلولی متوقف می‌گردد [۴].

منابع

[۱] باقري، ع، صفاري، م، ۱۳۷۶، مباني كشت بافت‌هاي گياهي، دانشگاه فردوسي مشهد، ص ۴۰۶.

[۲] پیوندی، م، کاظمي، ل، مجد، ا، ۱۳۹۴، تأثير سيتوكينين‌هاي مختلف بر ريزازديادي گياه اسطوخودوس (Lavandula vera)، پژوهش‌های گیاهی (زیست شناسی ایران)، ۲۸ (۲): ۲۶۳-۲۵۷.

[۳] گل افشان، ح، ۱۳۹۲. روش‌های استاندارد در آزمایشگاه خون شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ص ۶۱۲.

[۴] حضرتی جهان، ر، زارع، ن، دژستان، س، شیخ‌زاده مصدق، پ، ۱۳۹۶، تقویت تولید تاکسول در کشت سوسپانسیون سلولی فندق (*Corylus avellana L.*) از طریق ترکیب محرک و

پیش‌ماده، تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۳ (۱): ۷۳-۸۹.

[5] Ahmadi Moghadam, Y., Piri, Kh., Bahramnejad, B., Habibi, P., 2013, Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Effects on the Dopamine Production in Hairy Cultures of Portulaca oleracea (Purslan), Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences, 2: 86-94.

[6] Bhuiyan N., Adachi T., 2003, Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of Portulaca, Plant Physiology, 160(9):1117-24.

[7] Bohm H., Bohm L., Rink E., 1991, Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from Portulaca grandiflora, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 26(2):75-82.

[8] Chen, B., Zhou, H., Zhao, W., Zhou, W., Yuan, Q., Yang, G., 2012, Effects of aqueous extract of Portulaca oleracea L. on oxidative stress and liver, spleen leptin, PARα and FAS mRNA expression in high-fat diet induced mice, Molecular Biology Reports, 39: 7981-7988.

[9] Chen, C.J. Wang, W.Y., Wang, X.L., etal., 2009, Anti-hypoxic activity of the ethanol extract from Portulaca oleracea in mice, Journal of Ethnopharmacology, 124: 246-250.

[10] Chen, T., Wang, j., Li, Y., Shen, J., Zhao, T., Zhang, H., 2010, Sulfated modification and cytotoxicity of Portulaca oleracea L. polysaccharides, Glycoconj J of springer, 27: 635-642.

[11] Elis, D.D., Zeldin, E.L., Brodhagen, M., Russin, W.A., McCowan, B.H., 1996, Taxol production in nodul cultures of Taxus, J. Nat. Pord., 59: 246-250.

[12] Elkhayat, E.S., Ibrahim, S.R.M., Aziz, M.A., 2008, Portulene, a new diterpene from Portulaca oleracea L., Asian Natural Products Research, 10: 1039-1043.

[13] Farkya, S., Bisaria, V., Sirvastava, A., 2004, Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin, Appl Microbiol Biotechnol, 65(5): 504-519.

[14] Geile, W., Wagner, E., 1980, Rapid development of cell suspension cultures from leaf sections of chenopodium rubrum L., Plant Cell Environ, 3: 141-148.

[15] George, E.F., Micheal, A.H., Greet-Jan, D.K., 2008, Plant propagation by tissue culture. V.1, The background, 3rd ed., Published by Springer.

[16] Hirasuna, T.J., Pestchanker, L.J., Srinivasan, V., Shuler, M.L., 1996, Taxol production in suspension cultures of Taxus baccata, Plant Cell Tiss Org, 44: 95-102.

[17] Jin, R., Lin, Z.J., Xue, C.M., Zhang, B., 2013, An improved association- mining research for exploring Chinese herbal property theory: based on data of the Shennong's Classic of Materia Medica, Journal of integrative medicine, 11: 352-365.

[18] Narayanaswamy, S., 1977, Regeneration of plants from tissue cultures, Springer-Verlag, pp: 179-206.

[19] Palaniswamy, U.R., Bible, B.B., McAvoy, R.J., 2002, Effect of nitrate: ammonium nitrogen ratio on oxalate levels of purslane, Trends in New Crops and New Uses, 11: 453-455.

[20] Palaniswamy, U.R., McAvoy, R.J., Bible, B.B., 2001, Stage of harvest and polyunsaturated essential fatty acid concentrations in purslane (Portulaca oleraceae) leaves, Agricultural and Food Chemistry, 49: 3490-3493.

[21] Rashed, A.N., Afifi, F.U., Disi, A.M., 2003, Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of Portulaca oleracea L. (growing in Jordan) in Mus musculus JVI-1, Journal of Ethno pharmacology, 88: 131-136.

[22] Richard D., Lescot M., Inze D., De Veylder L., 2002, Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 69: 167-176.

[23] Roja, G., Bhangale, A.S., Juvekar, A.R., Eapen, S., Dsouza, S.F., 2005, Enhanced Production of the Polysaccharide Arabinogalactan Using Immobilized Cultures of *Tinospora cordifolia* by Elicitation and In Situ Adsorption, Biotechnol. Prog., 21: 1688-1691.

[24] Safdari y., kazemitabar s.k., 2010, Direct shoot regeneration, callus induction and plant regeneration from callus tissue in Mose Rose (*Portulaca grandiflora* L.), Plant Omics, 3(2):45-51.

[25] Shahsavari E., Maheran A. A., Siti Nor Akram A., Hanafi M.M. 2010. The effect of plant growth regulators on optimization of tissue culture system in Malaysian upland rice. Afr. J. Biotechnol, 9: 1684-5315.

[26] Silveira V., Floh E.I.S., Handro W., Pedro Guerra M., 2004, Effect of plant growth regulators and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of Pinus taeda, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76: 53-60.

[27] Estaji A., Chamani E., Khazaie Z., 2020. Influence of Plant Growth Regulators on Callogenesis and the Biomass of Cell Suspensions in Lily (*Lilium ledebourii* and Lilium regal). Journal of Applied Biotechnology Report, 7: inpress.

[28] Street, H.E., 1977, Plant Tissue and Cell Culture, Blackwelt, Oxford, p: 512.

[29] Torrey, J.G., Reinert, J., 1961, Suspension culture of higher plant cells in synthetic media, Plant Physiol, 36: 483-491.

[30] Tripathi L., Tripathi J.N., 2003, Role of Biotechnology in medicinal plants, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.

[31] Wang, W., Dong, L., Jia, L., Xin, H., Ling, C., Li, M., 2012, Ethanol extract of Portulaca oleracea L. protects against hypoxia induced neuro damage through modulating endogenous erythropoietin expression. The Journal of Nutritional Biochemistry, 23: 385-391.

[32] Xu, X., Yu, L., Chen, G., 2006, Determination of flavonoids in Portulaca oleracea L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41: 493-499.

[33] Yan W.H., Ce H.Q., 2006, Establishment of Regeneration System and Study on Genetic Transformation of Portulaca Oleracea L., Master's thesis, Abstract.

[34] Zhao, R., Gao, X., Cai, Y., Shao, X., Jia, G., Huang, Y., etal., 2013, Antitumor activity of Portulaca oleracea L. polysaccharides against cervical carcinoma in vitro and in vivo, Carbohydrate Polymers, 96: 376- 383.

[35] Zhou, Y.X., Xin, H.L., Rahman, K., Wang, S.J., Peng, C., Zhang, H., 2015, Portulaca oleracea L.: A Review of Phytochemistry and Pharmacological Effects, BioMed Research International, 2015:1-11.

In Vitro Effect of Plant Growth Regulators on Callogenesis and Suspension Culture Optimization of *Portulaca oleracea* L.

Jamshidi, M.[1]

[1] Assistant professor, Department of Plant Protection, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Email: ma.jamshidi@yahoo.com

Received: December 2020 Accepted: January 2021

Abstract

In this research, the effect of type and concentration of BAP and 2,4-D plant growth regulators on callogenesis of hypocotyl and leaf explants of *Portulaca oleracea* in MS medium containing 0.5, 1 and 2 mg/L of 2,4-D and BAP and optimization of cell suspension culture with different plant growth regulators in MS medium containing 0.5, 1 and 2 mg/L 2,4-D, 0.5 and 1 mg/L BAP, 0.2 and 0.5 mg/L Kin each one containing 20 and 30 g/l sucrose concentration, were investigated. Based on the results, both of the samples had 100 percentage callus induction, but the function of hypocotyl callus was significantly higher than the leaf callus. MS culture media containing 2 mg/l BAP and 0.5 mg/l 2,4-D, 2 mg/l BAP and 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BAP and 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BAP and 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BAP And 0.5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BAP and 2 mg/l 2,4-D, all containing 150 mg/l ascorbic acid in both explants have the highest yield (wet weight of callus). In the cell suspension culture, there was a significant difference between treatments with the plant growth regulators in terms of number of cells in per ml, SCV, PCV and treatment duration. The most number of cells, SCV and PCV was observed in MS medium containing 2 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L Kin with 30 g/L sucrose concentration. During 32 days of measurement, the most number of cells and SCV was observed from 26 to 32 days and the most PCV was observed on the 26th day.

Keywords: Plant cells and tissue culture, callogenesis, suspension culture, *Portulaca oleracea* L.